

論文審査の結果の要旨

氏名 山本 亮

本論文は3章からなり、第1章は、ヒヤクニチソウ *in vitro* 分化系におけるブラシノステロイド活性の解析について、第2章はヒヤクニチソウ分化系における内生ブラシノステロイドの同定と定量について、第3章はブラシノステロイド合成関連遺伝子の単離とその発現解析について述べられている。

ブラシノステロイドは動物のステロイドホルモンに似た構造の植物ステロイドで、ブラシノステロイド合成または受容の変異体は矮性を示すとともに、雄性不稔や脱黄化現象、根の成長阻害、葉の形態異常などの変異を示す。これらの結果は、ブラシノステロイドが植物の成長や分化において重要な働きをしているを示しているが、細胞レベルでのブラシノステロイドの合成や機能はほとんど明らかでなかった。1991年に、岩崎と柴岡はヒヤクニチソウ管状要素分化系を用いて矮化剤であるウニコナゾールが管状要素分化を抑制し、ブラシノステロイドがその抑制効果を打ち消して分化を誘導することを明らかにした。この結果は、内生ブラシノステロイドが管状要素分化の進行に重要な働きをしていることを示した。論文提出者は修士課程において、ヒヤクニチソウ管状要素分化過程で発現する遺伝子を分子マーカーにして、ウニコナゾール抑止が分化の最終ステージ（ステージ2からステージ3）への移行を阻害していることを明らかにした。そこで、博士論文では実際に管状要素分化過程での内生ブラシノステロイド合成について研究し、最終分化に先立つ内生ブラシノステロイドの急激な合成が起こること、さらにその合成は特定の合成酵素の転写レベルでの増加により担われていることを明らかにした。さらに、ブラシノステロイドが培地中に大量に放出されていることが明らかになり、細胞外でのブラシノステロイドのシグナル受容の存在を示唆した。

まず、第1章では、ブラシノステロイド合成特異的阻害剤ブラシナゾールの管状要素分化抑制効果を調べ、ブラシノステロイド合成が管状要素分化に必須

であることを確認した。続いて、ウニコナゾールまたはブラシナゾールと共に様々なブラシノステロイド合成の中間体を与え、それらの活性を調べ、ヒャクニチソウ管状要素分化系におけるブラシノステロイド合成系の概要を調査した。その結果、ヒャクニチソウ管状要素分化過程で早期C6酸化経路、後期C6酸化経路の二つがほぼ均等に機能していることを示した。

第2章では、ヒャクニチソウ分化細胞のブラシノステロイド (BL、CS、TY、TE、DCS、DTY、DTE) の同定および、分化過程各時期の変化をGC-MSにより調べた。その結果、ステージ3に先立ってCS、TY、DCS、DTYが急激に合成されることが明らかになった。このうち、DCS、DTYが特に大量に蓄積した。また、培地中のブラシノステロイドを測定したところ、同様にステージ3に先立って急激に増加した。しかし、細胞中と異なり培地中では活性型ブラシノステロイドのCSを含むCS、TY、DCS、DTYがほぼ同レベルで存在していた。計算から、培養54時間目のCS、TY、DCS、DTYはそれぞれ総量の91.0%、64.5%、20.8%、1.9%が培地に存在していることがわかり、この結果はCSやTYがDCSやDTYに比べ選択的に培地へ放出されていることを示した。また、活性型ブラシノステロイドと考えられるCSに近いブラシノステロイドほど高い割合で培地に存在し、かつ細胞外に存在するブラシノステロイドの総和が0.3 nM以上と、添加実験での有効濃度を超えることから、細胞外でブラシノステロイドが作用する可能性が示唆された。

第3章では、第1章、第2章の結果を受けて、ステージ3に先立つブラシノステロイド合成上昇の調節機構を明らかにするために、ブラシノステロイド合成関連遺伝子の発現調節を解析した。まず、ブラシノステロイド合成に関与する遺伝子、*ZeSTE*、*ZeDIM*、*ZeDWF4*、*ZeCPD1*、*ZeCPD2*をヒャクニチソウより単離した。いずれの遺伝子の転写産物もステージ3に先立ち急激に上昇することから、ブラシノステロイド合成は各合成遺伝子の協調的な発現により制御されていることが明らかになった。このうち、*ZeDWF4*、*ZeCPD1*は分化特異的な制御を受けており、この2つの遺伝子の発現が管状要素分化のキーステップになっていることが明らかになった。これ

らの結果を基に、論文提出者は管状要素分化におけるブラシノステロイド合成とシグナル伝達の新たなモデルを提出した。

ここに得られた結果の多くは新知見であり、いずれもこの分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、かつ本人が自立して研究活動を行うのに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、山本亮提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。