

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成12年度博士課程進学

氏名 中山 明

指導教官名 山口 五十麿

論文題目 アサガオ未熟種子中のジベレリンの動態と機能の解析

ジベレリン (GA) は種子の発芽や茎部伸長など高等植物における種々の生理現象に関与する。特に、穀類種子の発芽過程では、胚で生合成された GA が糊粉層へ移動して、 α -アミラーゼ等の加水分解酵素遺伝子の発現を誘導し、胚乳中のデンプンの分解に関与することは広く知られている。穀類種子における GA 応答系に加えて、茎部伸長における GA 応答系についても、近年の遺伝学的・分子生物学的な解析により GA のシグナル伝達に関与する因子の特定や、その伝達経路が次第に明らかになりつつある。一方、ヒルガオ科やマメ科の植物など一部の双子葉植物では、種子の成熟過程で高濃度の GA が未熟種子中に蓄積するが、その具体的役割については不明な点が多い。そこで、本研究では代表的なヒルガオ科植物であるアサガオ (*Pharbitis nil*) の未熟種子を対象として、その中に含まれる GA の役割を明らかにすることを主な目的として様々な組織化学的解析を展開した。

1. 活性型 GA および GA 応答性 α -アミラーゼ PnAmy1 の局在部位に関する解析

凍結乾燥法とカルボジイミド系固定化試薬の活用を組み合わせ、アサガオ種子中の GA の免疫組織化学的解析が本研究室の朴により試みられていたが、圃場で開花・結実したものを専ら用いていたため収穫に時間を要し再現性を確認することが困難であった。そこで、人工気象室内でのアサガオの結実条件を精査し、通年栽培により種子調製を随時可能にした。得られた種子を用いて活性型 GA の内生量についてラジオイムノアッセイ法により定量した結果、開花後 6 日目 (6-DAA: Days after

anthesis)ではほとんど存在せず、その後急激に増加して12-DAAでピークに達し、以降は減少することが判明した。また、活性型GAとしてはGA₁およびGA₃が主に存在することをGC/MSを用いて明らかにした。続いて、活性型GAの免疫組織化学を行い、9-DAA頃から珠皮(Integument)に局在することを確認した。また、その近傍に分布するデンプン粒がGAの局在に伴い次第に分解される様子が観察された。このことから、GAが珠皮中のデンプン粒の分解に関与する可能性を想定し、その検証を目的として未熟種子中で発現する α -アミラーゼ遺伝子のクローニングと発現解析を行った。

未熟種子由来のcDNAライブラリーを用いたPCRおよび3', 5'-RACEにより2種(*PnAmy1*および*PnAmy2*)の α -アミラーゼ遺伝子完全長cDNAをクローニングした。これらの遺伝子に関するノーザン法による発現解析の結果、*PnAmy2*の発現は痕跡程度で弱く、種子での発現は*PnAmy1*が支配的であった。*PnAmy1*の種子内での発現時期についての解析では、6-DAAではほとんど発現が認められず、9~12-DAAで漸増し、15-DAAでプラトーに達する傾向が伺えた。そこで、*PnAmy1*の発現が漸増期にあたる9-DAAの種子を用いて*PnAmy1*のGA応答性を調べた結果、0.1 μ MのGA₃処理後6時間で顕著に発現量が増加し、本遺伝子がGA応答性を有することが判明した。

大腸菌発現系を用いて調製した*PnAmy1*-Trx融合タンパク質について、SDS-PAGEによる精製を経てウサギに免疫し、抗*PnAmy1*抗体を得た。未熟種子から調製した可溶性画分を対象に、本抗体を用いたウェスタン解析を行ったところ、*PnAmy1*の推定分子質量に該当する45kDaの位置にのみ明瞭なバンドが検出された。そこで、*PnAmy1*の種子中における分布状況を把握するため、アルデヒド溶液固定した6~18-DAAの種子切片を用いて免疫組織化学的解析を行ったところ、12-DAA以降、GAの局在部位と重複して存在することが明らかとなった。

以上の解析により、(i)*PnAmy1*がGA応答性を示すこと、(ii)*PnAmy1*とGAの存在する時期および部位がほぼ一致することを確認したことから、アサガオ未熟種子において活性型GAが*PnAmy1*の誘導を介して珠皮中に存在するデンプン粒の分解に関与することが強く示唆された。

2. *PnAmy1*の発現部位

免疫組織化学的な解析を行うことによってGAと α -アミラーゼとの関連性について重要な知見を得たものの、活性型GAや*PnAmy1*の局在が認められた珠皮は、一般的に組織破壊のおそれが少ないとされる穏やかな固定法を用いた場合でも細胞膜の一部の構造が破壊され、完全な細胞形態を保持していない状態の切片が大部分であった。このことから、珠皮が本当にGA応答の場であり、かつ、 α -アミラーゼ生合成の場と考えて良いかという点で疑問が残った。そもそも免疫組織化学で得た情報は対象物質が固定された部位を表しているが、別の場所から移動して存在するものと区別することは不可能である。そこで、疑問点について明らかにすべく、*PnAmy1*のmRNAについて*in situ* hybridizationによりその発現部位を特定し、免疫組織化学で明らかとなった活性型GAや*PnAmy1*の局在部位と比較・

検討したところ、免疫染色において α -アミラーゼが検出された珠皮と隣接する種皮 (seed coat) に明瞭なシグナルが観察された。一方、珠皮には全くシグナルが観察されなかった。また、このシグナルは種皮 (seed coat: 種皮の内側は珠皮と隣接する) 中の一部の組織に限定して 9~12-DAA 頃から認められ始め、成熟に伴い種皮内全域に次第に拡がる様子が認められた。このことは、 α -アミラーゼは種皮で合成され、珠皮に分泌されることを強く示唆している。他方、活性型 GA の免疫染色においては、GA は種皮ではなく珠皮に検出されていることから、活性型 GA をはじめとする GAs の生合成部位の特定を含めて、さらに詳細な検討を行った。

3. GA 生合成酵素遺伝子のクローニングと発現部位、発現時期の解析

アサガオの GA 生合成酵素に関する情報は皆無であったため、他の植物由来の GA 生合成酵素遺伝子の配列情報を基に GA 生合成の第 3 ステージで活性型 GA の生合成に関わる酵素遺伝子のクローニングを試み、2 種類の GA 3-oxidase 相同遺伝子 (*PnGA3ox1*, 2) および 2 種類の GA 20-oxidase 相同遺伝子 (*PnGA20ox1*, 2) の完全長 cDNA をクローニングした。

PnGA3ox1 および 2 の発現に関しては 6~18-DAA の種子を用いたノーザン解析の結果、*PnGA3ox1* のシグナルは認められなかったのに対し、*PnGA3ox2* のシグナルは 9-DAA 以降の種子で明瞭に検出されたことから、種子中で主に発現しているのは *PnGA3ox2* であることが明らかとなった。*PnGA3ox2* は 9~12-DAA で発現が認められ始め、15-DAA 以降は高発現レベルを維持していた。

PnGA3ox2 の発現部位を *in situ* hybridization により調べたところ、その発現パターンは時期的にも空間的にも完全に *PnAmy1* の発現パターンと重複していた。このことは、活性型 GA や *PnAmy1* の局在部位として免疫組織化学的な解析から得られた珠皮とは異なる共通の部位において両物質とも生合成され、珠皮へ移動し、蓄積されることを意味する。

穀類種子のアリューロン細胞では GA が細胞死に関わるという報告がなされている。今回、種皮で生合成された活性型 GA が珠皮に移動して蓄積すると考えられる結果を得たことから、活性型 GA の役割として *PnAmy1* の誘導だけでなく、珠皮細胞の細胞死を引き起こし、それによって種皮で生合成されたタンパク質 *PnAmy1* がデンプンを分解できるようになるという可能性も考えられる。また、*PnAmy1* の発現部位では、その産物である *PnAmy1* が存在するはずだが、それを検出できないということについては、生成した *PnAmy1* が速やかに珠皮に向けて分泌され、種皮におけるその存在量が免疫組織化学における検出感度を下回っているためであると考えられる。いずれにせよ、活性型 GA が生合成される種皮において *PnAmy1* が発現しており、その翻訳産物である *PnAmy1* は珠皮へ移動して、近傍に存在するデンプン粒の分解に関与すると考えられる。

上述のように、活性型 GA と *PnAmy1* はともに、種皮の細胞で合成されることが示された。また、これらの遺伝子の発現は、種皮の特定の部位から始まり、種皮全域に広がるのが *in situ* hybridization

により明らかになった。この特定の部位は種子が唯一外部との物流交換を行うと考えられる胎座と接する部分およびその近傍である。このことから、他の部位で生合成された活性型 GA の前駆体が種子に輸送され、種皮で活性型に変換させる可能性についても検討を加えた。アサガオ芽生えにおいては GA_1 の生合成前駆体である GA_{20} が子葉から茎頂へ移行するという知見が報告されていることから、あらためてアサガオ果実の種子および果皮や胎座など種子周辺部における活性型 GA および GA_{20} の分布を調べるとともに、 GA_{20} の生合成部位の特定を行った。

イムノアッセイによる定量分析の結果、6~12-DAA では種子周辺部（果皮や胎座を含む）で活性型 GA ($20 \rightarrow 50 \text{ ng/fruit}$) および GA_{20} ($10 \rightarrow 50 \text{ ng/fruit}$) とともに漸増するのに対し、種子では活性型 GA ($10 \rightarrow 100 \text{ ng/fruit}$) が漸増するが、 GA_{20} は常に痕跡量 ($\sim 10 \text{ ng/fruit}$) しか存在しないことが判明した。このことから、種子周辺部に存在する GA_{20} が種子内へ輸送され、種皮で活性型 GA に変換される可能性が示唆された。そこで、GA 20-oxidase 遺伝子の相同遺伝子、*PnGA20ox1* および 2 のノーザン解析を行ったところ、*PnGA20ox2* はほとんどシグナルが認められなかったが、*PnGA20ox1* に関しては種子で明瞭に発現していた。ただし、種子周辺部での *PnGA20ox1* についても全く発現が認められなかったことから、少なくとも種子周辺部において GA_{20} が生合成される可能性は否定された。*PnGA20ox1* について、種子中での発現部位、発現時期を *in situ* hybridization により解析したところ、*PnGA3ox2* および *PnAmy1* の発現パターンと重複することが明らかとなった。このことから、種子成熟初期の種皮において α -アミラーゼの誘導に関わる GA は、種皮で *de novo* 合成される可能性が示唆された。種子周辺部における GA_{20} の由来と去就ならびにその生理的意義については今後の課題として残った。

本研究のまとめ

本研究によりこれまでほとんど明らかにされなかった種子成熟過程における GA の役割について、アサガオを対象として役割の具体的な提示を行うに至った。すなわち、受精後数日のうちに種皮で生合成された GA が、 α -アミラーゼ *PnAmy1* を誘導する。その *PnAmy1* は珠皮に分泌され、デンプンを分解する。このデンプンは、おそらく種子成熟にともなう子葉の形成と発達に使われると考えられ、穀類種子の発芽時における GA の役割に対応させることが出来よう。ここで確認された現象について、双子葉植物に広く、普遍的に認められる現象であるかどうか、今後さらに研究を展開していく必要があるが、本研究を通してその研究基盤を築くことができた。

1) Nakayama A., Park S.-J., Xu Z.-J., Nakajima M. and Yamaguchi I. (2002) Immunohistochemistry of active gibberellins and gibberellin-inducible α -amylase in developing seeds of Morning glory. *Plant Physiol.* 129: 1045-1053.