

論文の内容の要旨

論文題目 イネの根の生長制御に関するジベレリン応答性タンパク質
fructose-1,6-bisphosphate aldolase C-1 の単離と機能解析

氏名 小西博郷

植物にとって重要な根の発生や伸長の過程は、遺伝的要因と環境要因によって様々に変化する。根は養水分の吸収や植物体の支持といった機能を担っているが、その効率は根の量や形状あるいは土壌中での分布の様相によって影響を受ける。したがって、根がどのように形成されて機能しているかを明らかにするためには、根の生長に関する要因を研究することが必要である。そのためには、プロテオーム解析技術を用いて根の生長に関するタンパク質群を総括的に同定し機能解析する方法が考えられる。プロテオーム解析技術は優れた分解能の二次元電気泳動で分離した個々のスポットに、タンパク質の構造と機能に関する情報を与えるものであり、ゲノム塩基配列情報が充実した現在、ある種の生理現象に関するタンパク質を探索する場合などには非常に有効な手法である。本研究では、プロテオーム解析を用いて、イネの根の伸長に関するタンパク質として、ジベレリン応答性の fructose-1,6-bisphosphate aldolase C-1 (aldolase C-1) を単離し、その生物学的機能の解明を試みた。

まず、根の生長促進に関するブラシノライドとジベレリンの最適濃度を検討した。根の伸長生長に対して、ブラシノライドは $0.01 \mu\text{M}$ で、ジベレリンは $0.1 \mu\text{M}$ で促進作用を示したので、これらの濃度で根を処理して変動するタンパ

ク質群を解析した。幼苗期イネの根からタンパク質を抽出し、一次元目にチューブゲルを用いた二次元電気泳動により分離した。クマシーブリリアントブルーで染色した二次元電気泳動像を画像解析して、得られた幼苗期イネの根タンパク質スポットについて気相プロテインシーケンサーおよび質量分析計を用いて分析した。促進がより顕著であった 0.1 μ M ジベレリン処理で、20S proteasome 5 subunit、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase、aldolase C-1 (図1左)が増加した。Aldolase C-1は、0.01 μ M ブラシノライド処理で同様に増加した。

ジベレリン処理により変動するタンパク質とジベレリンとの関連をさらに明確にするため、ジベレリンの生合成阻害剤であるウニコナゾール、ジベレリンと拮抗的に働くアブシジン酸、ジベレリン欠損変異体である短銀坊主を用いて発現量が変化するタンパク質群を検索した。ジベレリン処理により増加し、ウニコナゾールおよびアブシジン酸処理で減少し、さらに短銀坊主内で存在量が少ないタンパク質として aldolase C-1 を検出した (図1右)。

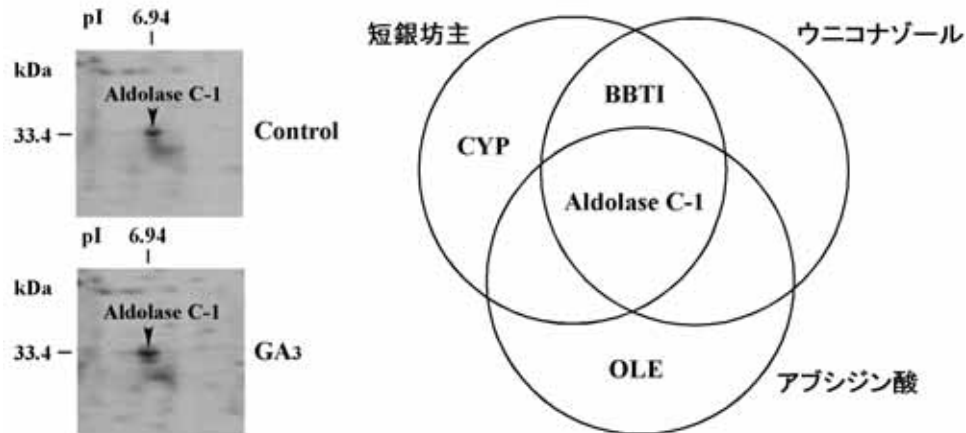


図1 ジベレリン処理で増加する aldolase C-1 (左) ウニコナゾールおよびアブシジン酸処理で減少または短銀坊主内で存在量が少ないタンパク質 (右)
BBTI : Bowman-Birk tripsin inhibitor CYP : cyclophilin OLE : oleosin

Aldolase はあらゆる生物に存在しており、その産生エネルギーは多様な生物機能に利用されている。ジベレリンで誘導される aldolase C-1 と根の生長との

関連について詳しく探究するため、抗 aldolase C-1 抗体を用いたウェスタンブロットおよび DNA プローブを用いたノーザンブロットを行った。タンパク質および mRNA レベルで、日本晴をユニコナゾール処理した場合や短銀坊主内で減少している aldolase C-1 の発現が、ジベレリンを加えることで回復した。また、日本晴をジベレリン処理し、根における aldolase C-1 の発現を経時的に解析したところ、mRNA は 12 時間で、タンパク質は 48 時間でそれぞれ発現が最大となった。また、濃度依存的処理では根の伸長生長を促進する $0.1 \mu\text{M}$ ジベレリンで aldolase C-1 の発現が最大であった。組織特異性解析において、aldolase C-1 は根において特に発現量が多く、根の部位別では生長に関わる根の先端部位で発現レベルが高かった。さらに、地上部の伸長組織を含んだ葉鞘において多く発現し、根と同様ジベレリン処理により aldolase C-1 発現量が増加した。

Aldolase C-1 と根の生長との直接的な関係を解析するため、アンチセンス法により aldolase C-1 の発現抑制形質転換イネを作製した。対照の根は播種後 6 日で 55 mm 伸長したが、アルドラーゼの発現を抑制した形質転換イネでは根の伸長が対照と比較して顕著に抑制された（図 2 左）。そして、播種 14 日後においても根の伸長は抑制されていた（図 2 右）。このことより、aldolase C-1 は根の形態形成を決定する一要因であることが明らかとなった。

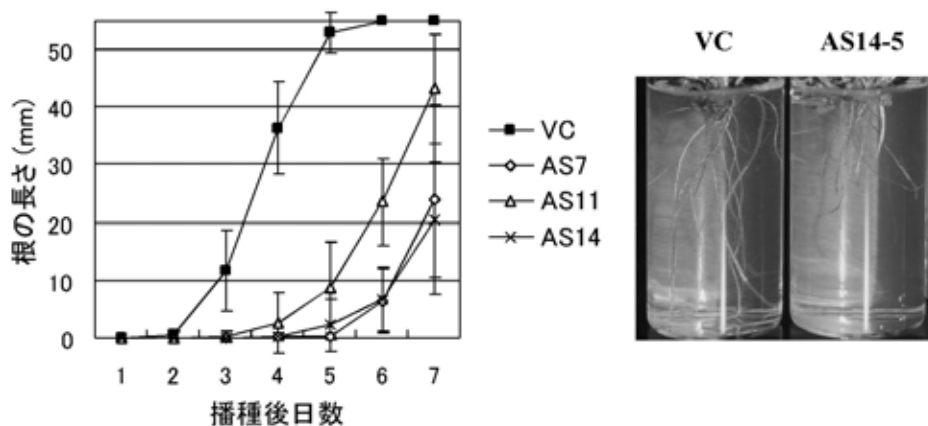


図 2 Aldolase C-1 発現抑制形質転換イネ (AS) の播種後 7 日間の根の生長曲線 (左) 播種 14 日後の根の状態 (右) VC : 対照

さらに aldolase C-1 発現抑制形質転換イネを用いて、根における aldolase 活性を測定した。ジベレリン処理により対照では活性が上昇したが、aldolase C-1 発現抑制形質転換イネでは対照と比較して活性が顕著に低く、ジベレリン応答性が低かった。この結果から、aldolase 活性がジベレリンの下流で調節され、根の生長の制御に関与していることが示された。

根の生長には細胞伸長が関与し、これは液胞の膨圧調節によることから、免疫沈降法により aldolase C-1 と vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) との相互作用を解析した。V-ATPase の 2 種のサブユニットを抗原として調製された抗体を用いて、イネの根タンパク質中で相互作用するタンパク質を沈殿させ、抗 aldolase C-1 抗体を用いたウェスタンブロットで検出した。イネの根において aldolase C-1 と V-ATPase が相互作用していることが明らかとなり、aldolase C-1 の集積促進が ATP 供給を増大し、V-ATPase を直接活性化することによって細胞伸長に影響を与える可能性が示された。

また、Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) は V-ATPase を活性化することより、ジベレリン情報伝達に関与する。そこで、CDPK が aldolase C-1 の発現に対してどのように影響を与えるかを検討した。ジベレリンで誘導される OsCDPK13 の発現抑制形質転換イネを作製した結果、対照ではカルシウムにより発現が誘導される aldolase C-1 が、OsCDPK13 発現抑制形質転換イネでは発現量が少なく、ジベレリンにより増加しなかった。このことより、ジベレリンにより誘導される aldolase C-1 の発現に、細胞質内カルシウムと OsCDPK13 が関与していることが明らかとなった。

以上のことから、プロテオーム解析手法を用いることにより、はじめてジベレリン情報伝達に aldolase C-1 が関与していることを明らかにした。そして、OsCDPK13 を介したジベレリン情報伝達系により誘導される aldolase C-1 が、糖代謝による ATP 産生を増大させて、V-ATPase の活性化や液胞機能に影響を与え、細胞伸長を活発にすることにより根の伸長生長を促進することが強く示唆された。