

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小西 博郷

植物の生長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、根の生長に関与する要因を研究することが必要である。本論文は、プロテオーム解析手法を用いて、イネの根の伸長制御に関わる因子として fructose-1,6-bisphosphate aldolase C-1 (aldolase C-1) を単離・同定し、それが根の伸長を制御する植物ホルモンジベレリンのシグナル伝達に関与していることを明らかにしたものである。Aldolase C-1 は解糖系において、フルクトース 1,6-ビスリン酸をジヒドロキシアセトンリン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸へと分解する反応を可逆的に触媒する酵素である。

まず第 1 章では、根の生長やプロテオーム解析について概説した後、本研究の目的について述べている。第 2 章では、プロテオーム解析手法によるイネの根タンパク質の網羅的解析を行った。二次元電気泳動の一次元目に等電点電気泳動チューブゲルと固定化 pH 勾配チューブゲルを用いることでタンパク質を高度に分離・検出することが可能になった。また、検出した多数のタンパク質の同定をプロテインシークエンサーを用いたアミノ酸配列解析と質量分析により行い、イネの根タンパク質データファイルを充実させるとともに、プロテオーム解析の有用性を示した。

第 3 章では、イネの根の生長に関与するタンパク質の検索を行った。ジベレリン、ブラシノライド、アブシジン酸、さらにはジベレリンの生合成阻害剤であるウニコナゾールやジベレリン欠損矮性変異体である短銀坊主を用いて、イネの根の伸長が促進、あるいは抑制されている場合に発現レベルが変動しているタンパク質を検索した。その結果、aldolase C-1 が、根の伸長が促進される 0.1  $\mu$ M ジベレリン処理、0.01  $\mu$ M ブラシノライド処理で、共通して増加し、根の伸長が抑制されるアブシジン酸処理、ウニコナゾール処理、短銀坊主において共通して減少するタンパク質として同定された。

第 4 章では、イネの根の生長に関与すると考えられるaldolase C-1 の機能解析を行った。正常型イネ日本晴をウニコナゾール処理した場合や短銀坊主で減少しているaldolase C-1 の発現が、ジベレリンを加えることで回復することをタンパク質およびmRNAレベルで示した。また、日本晴におけるジベレリンの処理濃度とaldolase C-1 の発現レベルとの関連についても調べ、根の伸長促進が最大となる 0.1  $\mu$ M でタンパク質およびmRNAレベルで発現が最大となることを示した。Aldolase C-1 は根において発現量が多く、根の部位別では生長が盛んな根の先端部

位で特に発現レベルが高かった。Aldolase C-1 の発現抑制形質転換体イネを作製したところ、それらにおいては根の伸長が抑制され、ジベレリン処理した場合のアルドラーゼ活性も顕著に低下していた。一方、根の生長に關与する細胞伸長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 と液胞型ATPアーゼ( V-ATPase )との相互作用を解析した。V-ATPase 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、その中にaldolase C-1 が存在することを抗aldolase C-1 抗体を用いたウェスタンブロット法により確認した。こうして、aldolase C-1 の集積が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を促進している可能性が示された。さらに、ジベレリンのシグナル伝達系因子の一つであるCa<sup>2+</sup>-dependent protein kinase OsCDPK13 の発現抑制形質転換体イネにおいては、aldolase C-1 の発現がジベレリンにより誘導されないことを示し、aldolase C-1 のジベレリン応答性には、OsCDPK13 が關与していることを明らかにした。

第5章では、得られた結果を総括し、aldolase C-1 の誘導を介するジベレリンによる根の伸長促進機構のモデルを提案した。

以上、本論文は、プロテオーム解析手法を駆使して、ジベレリンによるイネの根の伸長生長制御に關与する因子として aldolase C-1 を単離・同定し、それが V-ATPase との相互作用を介して機能することを明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。