

## 論文内容の要旨

応用生命化学 専攻  
平成 18 年度博士課程 進学  
氏名 鈴木 浩之  
指導教員名 浅見 忠男

### 論文題目

シロイヌナズナにおけるジベレリン受容体 AtGID1 の解析

ジベレリン(GA)は発芽誘導、茎部伸長の促進、花器官の分化・生長など、植物に対して幅広い生理的機能を有し、植物の生長制御に必須の植物ホルモンである。2005 年にイネの GA 非感受性極矮性突然変異体の解析から、Gibberellin Insensitive Dwarf1 (GID1)が GA 受容体として同定され、それまでの知見との統合により GA のシグナル伝達に関する主経路が明瞭となった。すなわち、通常は DELLA と呼ばれるシグナル抑制因子が正常なシグナルの伝達をブロックしているが、ひとたび GA が受容体 GID1 に認識されると、GID1-GA 複合体を形成し、DELLA との親和性が生ずる。GID1-GA 複合体に捕捉された DELLA はシグナル抑制機能を失い、SCF 複合体によるユビキチン修飾およびプロテアソームによる分解を受ける。イネでは GA 受容体と DELLA 因子が各 1 種ずつしか存在しないが、双子葉植物のシロイヌナズナでは GA 受容体 3 種(GID1a, 1b, 1c)、DELLA 因子 5 種(GAI, RGA, RGL1, 2, 3)が存在することから、シロイヌナズナにはイネよりも複雑な GA シグナルの伝達制御機構が存在すると予想された。

そこで本博士論文研究では、まず 3 種の GA 受容体間に潜む機能的な差異を検出すべく、GA 受容体に関する機能欠失型多重変異体の作出を計画した。その解析により、特定の組み合わせで 2 種の受容体がともに機能を失った変

異体では、限定された器官で異常形質が現れた。その表現形質の原因究明こそ多様なシグナル伝達制御を理解する格好の材料と考え、関連遺伝子の発現解析および翻訳産物の植物体内での分布状況の把握を行った。その結果、単に GA 受容体が量的に欠乏していることが主原因と考えられるケースと、それに該当しないケースを見いだした。後者のケースに焦点を絞り、形質が認められた器官に存在する GA 受容体・DELLA 因子間のシグナル伝達に不具合が生じている可能性について検討した。

#### シロイヌナズナ・GA受容体の機能欠損型多重変異体の解析

Ds エlement または T-DNA 配列の挿入により発現に異常を来した各 *GID1* 変異体(1KO)を取得した。各 1KO はいずれも野生株と比較して背丈や発芽、稔実率に異常は認められず、機能的に重複する傾向が覗えた。これら 1KO を順次交雑して取得した 2 重変異体(2KO)のうち *gid1b gid1c*-2KO のみ野生株と変わらない生育を示したのに対して、*gid1a gid1c*-2KO では抽台後の花茎の伸長が鈍く矮性を示した。この矮化傾向は発芽から間もない幼胚軸においても確認された。各 2KO 花茎に対して GA 処理を行ない GA 応答性遺伝子の発現応答状況を Real time-PCR により解析した。その結果、他の 2KO と比較して *gid1a gid1c*-2KO では応答性遺伝子の発現量変化が乏しく、GA 応答性が弱まっていることが明らかとなった。*gid1a gid1b*-2KO については後述する。

次に全 *GID1* 遺伝子の機能欠損型変異体(*gid1a gid1b gid1c*-3KO)作出のため、交雑途上で取得したヘテロライン(*GID1a/gid1a gid1b gid1c*-2KO)の自家受粉による後代種子を得た。そのうち約 1/4 は通常の発芽条件、GA 添加による発芽促進条件のいずれも発芽せず、種皮の剥離処理により GA 生合成欠損変異体と形態的に類似する極矮性植物体に生長した。これら植物体のジェノタイプを調べたところいずれも 3KO と判明した。他方、種皮を剥離せずとも発芽した個体中には 3KO が全く含まれなかった。3KO 植物体は GA 投与で形態は変わらず、また GA 応答性遺伝子の発現応答も全く認められなかったことから、GA 非感受性と判断した。これにより、シロイヌナズナでは 3 種の *GID1* が GA 受容体として少なくとも支配的に機能していると結論付けた。なお、*gid1a gid1c*-2KO と比較して 3KO の矮性傾向が著しく強いいため、花茎における *GID1b* の機能は弱いものの皆無ではないことも判明した。

残る組み合わせの *gid1a gid1b*-2KO は他と比較して低い稔実率を有していた。光学顕微鏡を用いて開花直後の花器官を観察したところ、雄蕊の伸長不良および雌蕊側面への花粉の付着を検出した。綿棒を用いて自家受粉処理を施した場合には稔実率が向上したことから、*gid1a gid1b*-2KO 花粉は正常に発達しているが、雄蕊の伸長不良により柱頭に花粉が届かず、稔実率の低下を招いていると結論した。これにより、*gid1a gid1b*-2KO 植物体内で唯一機能するはずの *GID1c* が雄蕊の伸長に対して機能的に弱い可能性を見いだした。

## GA受容体遺伝子の発現状況および受容体タンパク質の存在状況の把握

*gid1a gid1c*-2KO 花茎の矮性形質、および、*gid1a gid1b*-2KO 雄蘗の伸長不良形質に焦点を絞り、これら異常形質の原因が唯一残る GA 受容体の量的欠乏である可能性を検証すべく、各 2KO の花茎、および、花器官から調製した全 RNA を用いて、3 種の *GID1* 遺伝子の mRNA 量を絶対定量法により測定した。その結果、3 種の *GID1* 遺伝子発現量の大幅な減少はいずれの 2KO においても確認されなかった。そこで、より局所的な *GID1* 遺伝子の発現抑制が生じている可能性を確かめるべく、own プロモーター&レポーター遺伝子発現ラインの作出を計画した。約 3kbp の *GID1* プロモーター制御下で *GID1-GUS* 融合遺伝子が発現する形質転換個体(*pGID1::GID1-GUS*)を作成し、後代植物体を用いて GUS 染色を行い、花茎、および、花器官における *GID1-GUS* 融合タンパク質の分布状況を解析した。その結果、花茎では *GID1a-GUS*、*GID1c-GUS* による発色は明瞭に検出されたが、*GID1b-GUS* による発色をほとんど検出できず、別の器官ではそれによる明瞭な発色を認めたことから花茎における *GID1b-GUS* 量が少ないと結論した。前述の絶対定量法で得た遺伝子発現情報との整合性を問うべく、各 *pGID1::GID1-GUS* ラインの花茎における *GID1-GUS* mRNA を定量した結果、焦点となっている *GID1b-GUS* mRNA を含めて先の結果にほぼ従う量の存在が明らかとなり、「花茎では *GID1b* 遺伝子が少なからず発現するが、その翻訳産物は何らかの理由により安定的に蓄積されず、結果、*GID1b* しか存在しない *gid1a gid1c*-2KO 花茎で GA 受容体が欠乏して矮性形質が現れた」と考えれば矛盾なく説明することが可能と判断した。

同様に花器官に着目した GUS 染色の結果、雄蘗における *GID1c-GUS* による発色は *GID1a-GUS* および *GID1b-GUS* による発色に比肩して明瞭に認められた。ただし、花器官を用いて行った定量結果と照合した場合、*pGID1c::GID1c-GUS* ラインにおける *GID1c-GUS* 遺伝子の発現量はその予想量を超えて高く、*GID1c* プロモーターによる発現制御が本来よりも増強されている可能性を否定できない。しかし、少なくとも形質が現れる器官において翻訳産物が安定的に存在できるという点において、*gid1a gid1c*-2KO 花茎で生ずる GA 受容体の欠乏とは異なる様式により *gid1a gid1b*-2KO 雄蘗の伸長不良は生ずる、と判断した。

## GID1-DELLA間の相互作用に関する親和性評価

GA シグナルが伝わるためには、シグナル抑制因子 DELLA は *GID1-GA* 複合体に捕捉される必要がある。この反応は平衡反応であって、15 通りの *GID1-DELLA* 間の組み合わせ中に「親和性が他に比べて弱いことが主原因となって *GID1-GA* 複合体に捕捉されにくく、そのために DELLA としての機能が残存するケース」があるとの作業仮説を立て、そのケースに *GID1c* と「*gid1a gid1b*-2KO 雄蘗内で存在する DELLA」が該当するか検証を計画した。簡便に *GID1-DELLA* 間の相互作用に関する親和性を評価するため、1 種の DELLA に対して 2 種の *GID1* が競合的に相互作

用する系を酵母内で構築した。すなわち、市販の three-hybrid 系を導入し、競合下にある 2 種の GID1 (<sup>BD</sup>GID1 と <sup>2nd</sup>GID1) のうち、<sup>2nd</sup>GID1 の <sup>AD</sup>DELLA に対する親和性が <sup>BD</sup>GID1 と比較して高いか同等の場合、<sup>2nd</sup>GID1 が <sup>BD</sup>GID1 から <sup>AD</sup>DELLA を奪うために <sup>BD</sup>GID1-<sup>AD</sup>DELLA 間の相互作用が成立しづらく、結果、制限培地での当該酵母の生育は困難となる。対して、<sup>2nd</sup>GID1 に比べて圧倒的に <sup>BD</sup>GID1 の <sup>AD</sup>DELLA に対する親和性が高い場合のみ生育は可能となる。よって、生育の可否を調べることにより 2 分子間の親和性評価ができるようになった。

花器官ではその遺伝子発現情報から、5 種の DELLA の中で RGL2、続いて RGA が多く存在しており、他の研究者らによる機能欠損型の多重変異体の解析からもそれを支持する結果が報告されている。そこで上記 three-hybrid 系を用いて、主に RGL2 あるいは RGA と、GID1c との相互作用に焦点を当てながら総当たり解析を行った。結果、<sup>BD</sup>GID1c-<sup>AD</sup>RGL2 間の相互作用は <sup>2nd</sup>GID1a あるいは <sup>2nd</sup>GID1b によって明瞭に阻害されたのに対し、<sup>BD</sup>GID1a-<sup>AD</sup>RGL2、<sup>BD</sup>GID1b-<sup>AD</sup>RGL2 間の相互作用に対して <sup>2nd</sup>GID1c の阻害効果は認められなかったことから、RGL2 にとっては 3 種のうちで GID1c との親和性が最も低いと結論した。<sup>AD</sup>RGA を用いた解析からも、GID1c が他の GA 受容体を圧倒するほど高い親和性を示す組み合わせに該当しなかったことから、雄薬中の主要 DELLA に対する GID1c の捕捉機能が弱いことが *gid1a gid1b*-2KO 雄薬の伸長不良の原因である可能性を支持する結果が得られた。

上述したとおり本研究の遂行によって、まず 3 種の GID1 がシロイヌナズナにおいて支配的に機能する GA 受容体であることを特定した。その上で、機能欠損型変異体を用いた解析から GID1b および GID1c には特定の器官で GA 受容体として十分に機能できない状況があることを見だし、それらの原因究明を展開した。花茎における GID1b の不安定化制御機構およびその生理的意義に関する解明や、植物体を用いての雄薬レベルにおける GID1c-DELLA 間の相互作用状況の把握など、全容の解明に向けて未だ検証されるべきことは多々残されているが、本研究を基盤としてそれら制御機構に関する理解がより進展することを期待する。

#### 発表論文

- (1) Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M & Yamaguchi I. (2006) Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J.*, **46**, 880–889.
- (2) Iuchi S\*, Suzuki H\*, Kim YC, Iuchi A, Kuromori T, Ueguchi-Tanaka M, Asami T, Yamaguchi I, Matsuoka M, Kobayashi M & Nakajima M. (2007) Multiple loss-of-function of *Arabidopsis* gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. *Plant J.*, **50**, 958-966. (\*equally contribution)
- (3) Suzuki H, Park SH, Okubo K, Kitamura J, Ueguchi-Tanaka M, Iuchi S, Katoh E, Kobayashi M, Yamaguchi I, Matsuoka M, Asami T & Nakajima M. Diversity in gibberellin signal transduction explains phenotypes emerged in *Arabidopsis* multiple KO mutants of its receptors, *submitted*.