

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鈴木浩之

ジベレリン(GA)は発芽誘導、莖部伸長の促進、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、植物体内における生理機能の解析を計画した。

第2章ではDsエレメントまたは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では抽台後の花莖の伸長が鈍く矮性を示した。*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、交雑途中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。

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。

第3章では*gid1a gid1c*-2KO花莖の矮性形質、および、*gid1a gid1b*-2KO雄蕊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の花莖、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。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。また、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。

第4章では GA シグナル伝達には、シグナル抑制因子 DELLA が GID1-GA 複合体に捕捉される必要性に着目した。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。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、解析した結果、雄蘗において主に機能する DELLA 因子 RGL2 および RGA に対して3種のうちで GID1c との親和性が最も低いと結論した。すなわち、雄蘗中の主要 DELLA に対する GID1c の捕捉機能が弱いことが *gid1a gid1b*-2KO 雄蘗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。

以上、本研究はシロイヌナズナに存在する3種の GA 受容体 GID1 についてその生理的な機能を解明し、さらに明らかとなった3種間の機能の違いが生じる原因の解明も進め、幾つかの仮説を支持する結果を得ることができた。これらの結果は学術的にも応用的にも寄与するところが多い。よって審査委員一同は、本研究が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。