

## 論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻  
平成 22 年度博士課程 入学  
氏名ベフオチル ダワープレブ  
指導教員名 浅見 忠男

### 論文題目

ブラシノステロイド情報伝達遺伝子 *BIL2*に関する化学生物学研究

#### 1. 背景と目的

ブラシノステロイドは細胞伸長や細胞分裂、光形態形成、環境ストレス耐性促進などの生理活性を持つ植物ステロイドホルモンである。ブラシノステロイド生合成や情報伝達欠損変異体は、明所で矮性形態、葉長の短化など表現型が変化し、暗所発芽条件下で野生株では見られる胚軸の徒長や子葉の閉鎖が見られず、光存在下のような太く短い胚軸と展開した子葉をもつ形態”暗所光形態形成”を示すことから、ブラシノステロイドは植物の成長調節に重要な機能因子であると認識されるようになった。1990 年代以降、分子遺伝学的手法によってブラシノステロイドの生合成欠損変異体の解析が進められ、生合成経路についてはほぼ全ての変換過程が解明された。一方、ブラシノステロイドの情報伝達機構については、受容体 BRI1 以降の因子は未解明の部分が多く残されたままであった。そこで本研究で、この未知部分を明らかにするため、化学物質への生物の応答性の違いを利用して突然変異体を発見し、関連する遺伝子を単離する化学生物学によるアプローチを試みた。

植物は暗所で発芽した場合、胚軸が伸長するもやし状の形態を示すが、ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz 存在下で暗所発芽した植物は、生合成変異体の場合と同様に胚軸が伸長せずに、あたかも光存在下で発芽した形態「暗所光形態形成 (de-etiolation)」を示す。この阻害剤 Brz 処理条件下にも関わらず、胚軸が伸長するようなシロイヌナズナの突然変異体が得られれば、

それらはブラシノステロイド情報伝達経路、もしくはブラシノステロイド生合成後期過程が活性化した変異体であると考えられる。そこで、この暗所 BR 生合成阻害剤 Brz 存在下での胚軸徒長を指標として、シロイヌナズナの EMS 変異体プールから最初の [Brz 抵抗性変異体](#) 変異体 *bill-1D* (*Brz-insensitive-long hypocotyl 1-1D*) [/bzl1](#) が単離された。この *bill-1D*/[bzl1](#) の原因遺伝子は bHLH 型の転写因子であることが明らかにされている。

現在までに、細胞膜のブラシノステロイド受容体 *BRI1* 近傍の *BAK1* など幾つかの遺伝子及び、転写因子 *BIL1/BZR1*, *BES1* 近傍の *BSU1*, *BIN2* などの解明が進んでいるが、細胞壁と細胞核をつなぐ中間の細胞におけるブラシノステロイド情報伝達は不明ままであった。そこで本研究では、Brz を用いた化学生物学的アプローチによる、シロイヌナズナのアクティベーションタグラインから新しい突然変異体 *Brz-insensitive-long hypocotyl 2-1D* (*bil2-1D*) の選抜と遺伝子の単離を行い、それらの変異原因遺伝子の機能を解析することによるブラシノステロイド情報伝達機構解明を目的とした。

## 2. [ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz 耐性突然変異体 \*bil2-1D\* の選抜](#)

*bil2-1D* 変異体は Brz 存在下で暗所発芽させた際、胚軸の徒長が見られる。通常、Brz 濃度が高くなるに従い野生型株では胚軸の伸長が抑制されるが、*bil2-1D* は野生型と比較して Brz に耐性を示し、Brz 3  $\mu$ M の濃度では野生株の約 1.6 倍に伸長を示した。これらのことにより、*bil2-1D* は Brz 耐性を持ち、ブラシノステロイド情報伝達が恒常的に活性化されている突然変異体である可能性が示された。

リアルタイム PCR (RT-PCR) による、アクティベーションタグ [ギン](#) 近傍の遺伝子発現解析を行った結果、3 種の遺伝子の発現量が野生型と比較して増加している結果が得られた。この 3 種の遺伝子について高発現株を作製したところ、2 種は Brz 存在下で胚軸が徒長しなかったが、1 種については暗所 Brz 存在下で胚軸伸長する *bil2-1D* 変異体の形質が再現された。この遺伝子 (*At2g42080*) は *bil2-1D* 変異原因遺伝子であると結論した。

*BIL2* は 263 アミノ酸をコードすると予測される新規遺伝子であり、アミノ酸配列から DnaJ/Hsp40 ファミリーのタンパク質であることが明らかとなった。*BIL2* のアミノ酸配列を基にした BLAST 検索の結果、*BIL2* のホモログはシロイヌナズナ、トウゴマ、ダイズ豆、ブドウ、イネなどの植物に広く保存されていた。DnaJ/Hsp40 タンパク質は DnaK/Hsp70 と共に一つのシャペロン系を構成し、タンパク質の折りたたみ、タンパク質複合体の会合と解離、タンパク質の安定化、タンパク質のトランスロケーションやの環境ストレスによる変性タンパク質の修復など、総じてタンパク質の修飾を行う機能を持つことが知られているタンパク質である。

### 3. BIL2 遺伝子の植物体における機能解析

*BIL2* 高発現株 (*BIL2-OX*) の成熟個体においては、花茎の伸長促進、枝数の増加を示すことが観察された。また、根においては、主根伸長促進と側根数の増加が観察された。*bil2-1D* の形態が *BIL2* 遺伝子の過剰発現を原因とする場合、同遺伝子のノックダウンは *bil2-1D* の形態と逆の形態を示すことが予測される。そこで、*BIL2-RNA* interference 形質転換体を作製し、形態観察を行った。この *BIL2-RNAi* 植物体において、胚軸短化が観察され、*BIL2* が胚軸伸長に促進的活性を持つ可能性が裏付けられた。さらに、*BIL2-RNAi* の成熟個体は野生型に比べて、花茎長の抑制と枝数の減少が見られた。これらの結果は、*BIL2* が植物成長において促進的な機能を持っている [可能性を示している](#)。

*BIL2* のブラシノステロイド情報伝達における分子的なレベルでの関連性を明らかにするため、*BIL2-OX* や *BIL2-RNAi* 植物体での BR 応答性遺伝子の発現について RT-PCR により解析を行った。その結果、通常ブラシノステロイドによる発現の上昇が見られる *TCH4* について、*BIL2-OX* において発現の上昇がみられ、*BIL2-RNAi* において発現の減少が見られた。ブラシノステロイド刺激でフィードバック的に発現が低下するブラシノステロイド生合成遺伝子の *CPD* は、*BIL2-OX* において発現の減少がみられ、*BIL2-RNAi* において発現の上昇が見られた。これらの結果 [より](#)、*BIL2* はブラシノステロイド応答遺伝子発現を制御しており、ブラシノステロイド情報伝達に重要な機能を果たしていることが示唆された。

*BIL2* のブラシノステロイド情報伝達経路での機能部位の解明を目指し、*BIL2-OX* とブラシノステロイド受容体欠損変異体である *bri1-5* との二重変異体を作製し、遺伝学的解析を行った。その結果、*BIL2-OX* と *bri1-5* との二重変異体において、*bri1-5* 変異体に比べて胚軸が長くなり、成熟個体の矮性形態の回復が認められた。これらの [結果は](#)、*BIL2* が受容体 BRI1 の下流で機能している [可能性を示している](#)。

*BIL2* は新規な遺伝子であるため、植物の成長における機能をより詳細に解明するため、*BIL2* の発現部位について、*BIL2* promoter-GUS 解析により調査した。その結果、暗所 2、3 日目の個体において胚軸で発現が認められた。この *BIL2* 発現はブラシノライド (BL) 処理により促進され、Brz により発現の抑制が観察された。さらに、野生型植物の芽生えについて [各](#) BL、Brz [を](#) 3 時間処理し、*BIL2* mRNA の発現量を RT-PCR により解析したところ、BL 処理により発現の上昇が見られ、Brz により発現の低下が見られる *BIL2* promoter-GUS 解析の時と同様な結果が得られた。さらに成長後期における *BIL2-GUS* 発現の解析の結果、明所 11 日目の個体においては幼葉、側根 [で](#) 発現し、28 日目の個体においては花蕾、花粉で発現が見られ [たことより](#)、植物成長の様々な局面で働いている可能性が [あると考えている](#)。

さらに、*BIL2* の細胞レベルでの機能解析を目指して、*BIL2::BIL2-GFP* 形質転換体を作製し、細胞内局在の観察を行った。その結果、*BIL2::GFP* はドット状オルガネラに蛍光が観察された。

ミトコンドリアが特異的に染まる Mitotracker を用いて、観察したところ、*BIL2::GFP* は Mitotracker と共局在する蛍光観察像を示した。このことから、*BIL2* タンパク質はミトコンドリアに局在することが明らかとなった。

#### 4. *BIL2* 遺伝子の ATP 産生における機能解析

ブラシノステロイド情報伝達因子は細胞膜、細胞核、小胞体、液胞などの色々なオルガネラに局在することが明らかになっているが、ミトコンドリアに局在するブラシノステロイド情報伝達因子は初めての報告である。ミトコンドリア機能とブラシノステロイド情報伝達の関わりの手掛かりとして、ミトコンドリアの最も重要な機能である ATP 産生を介した *BIL2* による胚軸伸長制御の可能性について解析を開始した。その結果、ATP 存在下で野生型植物は Brz 耐性胚軸伸長を示すことが明らかとなった。ATP はミトコンドリアの ATP 産生酵素によって産生されるため、この ATP 産生阻害であるオリゴマイシン処理条件下で発芽させたところ、野生型植物において胚軸伸長が阻害されたが、*BIL2-OX* はオリゴマイシン耐性の胚軸徒長を示した。続いて、細胞内 ATP 内生量の測定を行った結果、*BIL2-OX* において野生型より、ATP 産生が約 3.5 倍に増加していることが明らかとなった。さらに *BIL2-OX* 株は塩や強光ストレス耐性を示すことも明らかとなった。これらのことより、*BIL2* は、ミトコンドリア内 ATP 産生酵素のタンパク質フォールディングを補助することによって ATP 産生量を増加させ、ブラシノステロイド情報伝達経路を活性化し、植物成長を促進する機能を持つと考察した。