

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ベフオチル ダワープレブ

ブラシノステロイド(BR)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。

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、BR 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を得られれば、それらは BR 情報伝達経路、もしくは BR 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 *bil1-1D* (*Brz-insensitive-long hypocotyl 1-1D*) / *bzr1* が単離された。

現在までに、細胞膜の BR 受容体 *BRI1* 近傍の *BAK1* などの遺伝子及び、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ギングラインから新しい突然変異体 *bil2-1D* (*Brz-insensitive-long hypocotyl 2-1D*) 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

bil2-1D 変異体は、Brz 存在下暗所発芽させた際に胚軸の徒長が見られたことから、BR 情報伝達因子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考察された。次に、上記形態を示す *bil2-1D* 変異体の原因遺伝子を単離するため、アクティベーションタギング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。以上の結果より、この遺伝子 (*At2g42080*) が *bil2-1D* 変異体の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、アミノ酸配列からタンパク質のフォールディングの制御を行う可能性を持つ 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。本変異体中において BR 応答性遺伝子は野生型株に比べて *BIL2-OX* において正に制御されていた。また、*BIL2-OX* は BR 受容体欠損株である *bri1-5* の矮性形態を回復することができた。野生型株の成長前期における *BIL2-GUS* 発現は胚軸で、成長後期の時は花粉でより強く発現が見られた。

BIL2-GFP 遺伝子形質転換シロイヌナズナの観察結果より、*BIL2* タンパク質はミトコンドリアに局在することが強く示唆された。これまでにミトコンドリアに局在する BR 情報伝達因子に関しての報告はなく、今回が初めての研究例となった。ミトコンドリア機能と BR 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行った。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 合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* においては野生型より、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。ATP 処理による BR 応答性遺伝子発現は制御されることが示唆された。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。

本研究において、新規な BR 情報伝達因子 *BIL2* 遺伝子が、BR 受容体 *BRI1* の下流で働いており、ミトコンドリア内 ATP 合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ミトコンドリア内の ATP 産生量を増加させ、BR 情報伝達経路を活性化し、植物成長を促進する機能や環境ストレス耐性を促進させる機能を持つことを明らかとした。これらの結果は BR 情報伝達に関する遺伝子の機能を明らかにするという基礎研究としての成果と共に、将来的に *BIL2* 遺伝子を応用することで農業生産性を高めた作物を作出するための応用基盤研究としても、重要な知見を得たと考えられる。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のあるものと認めた。