

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 進学
氏 名 尹 禎敏
指導教員名 浅見 忠男

論文題目

ジベレリン受容体制御剤の創製と遺伝学への応用研究

1. 背景および目的

本研究の目的は、植物ホルモン・ジベレリン(GA)の信号伝達機構をより深く解析する上で有用な新分子ツールの発掘に向け、特に GA 受容体およびそれと直接相互作用する情報伝達因子 DELLA に着目し、その機能制御剤を探索・創製することである。

GA は種子の発芽、茎の伸長、花芽形成など植物の様々な生理現象を制御しており、信号伝達の主経路は以下のとおり説明される。(i) GA 濃度が低い場合、制御因子 DELLA は信号を伝えないように核内で機能している。(ii) GA 濃度が高まると、受容体は GA と結合して、新たに DELLA 因子との親和性を持つようにその性状を変化させる。(iii) 受容体-GA 複合体は DELLA 因子と結合し、SCF E3 ユビキチンリガーゼ構成因子の一つである F-box に DELLA 因子を引き渡す。(iv) プロテアソームが関与するタンパク質分解過程を経て DELLA 因子が分解され、信号伝達の抑制状態が弱まる結果 GA からの信号が伝わり始める。この主経路に加え、関わりが示唆される因子が幾つか知られており、経路全貌の解明が待たれる。

ところで、低分子化合物を用いて、ある遺伝子に対する機能欠損型の変異導入と同質の効果を及ぼすことを起点とする研究分野は「化学遺伝学」と呼ばれる。植物ホルモンの研究領域においても、この化学遺伝学的アプローチにより信号伝達に関わる有益な情報が得られた例がいくつかある。植物の化学遺伝学に応用された化合物は、ホ

ルモンの生合成酵素や受容体、あるいは以降の下流因子を標的としている。そこで本研究では、GA の信号伝達に関わる未解明領域への応用を期待して、GA 受容体を作作用点とする制御剤の開発を展開した。

2. オールラウンド型制御剤 Y13 の選抜と作用機構の解明¹⁾

多くの化合物群から GA 受容体の機能制御剤を探索するためには、可能な限り効率的で正確な探索システムの構築が不可欠である。そこで、双子葉のモデル植物シロイヌナズナの GA 受容体と、その受容体から信号を直接受け取る DELLA 因子との間で GA 依存的に形成される複合体形成過程を解析するため、これまで所属研究室で利用されてきた酵母 two-hybrid 系の転用を図り、多検体の同時試験が可能となるよう改良して用いた。また、放射性 GA を用いる *in vitro* 試験系により受容体の GA 結合活性が測定可能であったことからその併用も考慮した。

生育が制限される環境下、探索に用いた two-hybrid 用酵母は GA 依存的な増殖を示す。その増殖に応じて発現誘導されるレポーターの酵素活性に基づき、目視による候補化合物のハイスループットな選抜を実現した。各種合成化合物を納めた市販ライブラリーを対象として候補探索を行った結果、約 1 万種から 4%程度の陽性候補を一次選抜した。さらに、増殖に GA を要求しない対照環境においても同試験を行い、酵母の生育自体を阻害する約 9 割の偽陽性候補を除外して 45 種(Y1-Y45)までの絞り込みを達成した。研究の遂行加速のため、ひとまず選抜に用いた two-hybrid 系に対する阻害強度が比較的強い 13 種を以降は優先的に扱い、*in vitro* 試験系においても明瞭に受容体の GA 結合能を阻害した 5 種を選抜した。そこで、*in planta* レベルにおける GA 信号伝達阻害状況の評価を最終選抜段階と位置づけ、これら 5 種をシロイヌナズナに投与した。その結果、Y13 と呼称する 1 種のみが種子発芽過程、および、幼植物体の生長過程いずれに対しても明瞭に阻害活性を示すことが明らかとなった。

植物に対する Y13 の投与効果をより詳細に検証すべく、シロイヌナズナの GA 応答性遺伝子の発現状況を定量 PCR を用いて解析した。その結果、予想どおり GA からの信号伝達の抑制を裏付ける通常とは異なる発現状況を確認した。また、シロイヌナズナ以外の植物への投与効果を検討したところ、同じアブラナ科に限らず他科の双子葉植物でも総じて矮化する傾向が認められた。さらに、単子葉植物まで範囲を拡げ試験したところ、オオムギ種子の糊粉層において通常 GA が誘導する α -アミラーゼ遺伝子の発現に加え、液胞化および細胞死の誘導まで Y13 は明瞭に抑制した。よって、Y13 は子葉の単複を問わず広範囲に及ぶ植物の GA 信号伝達過程をほぼ網羅的に抑制することが可能な化合物であることが示された。

本研究の到達目標に据えていた化学遺伝学の領域に Y13 を応用すべく、シロイ

ヌズナの各種変異体プールを対象として Y13 低感受性変異体の選抜を実施した。具体的には、通常なら種子発芽や幼植物体の生長過程ともに阻害する濃度の Y13 存在下で、周囲と比較して相対的に生育が良い個体を選抜した。結果、シロイヌナズナに由来する特定の完全長 cDNA の過剰発現を狙った変異体プール(シロイヌナズナ FOX ライン)の中から独立に 2 系統を候補として見出した。後代種子を入手して、過剰発現が期待される各標的遺伝子の発現量を調べたところ、通常と比べ数十倍かそれ以上に及ぶ過剰な発現状況を確認した。両系統の Y13 低感受性について上述の 2 過程に分けて検討したところ 1 系統は発芽過程のみ、残る 1 系統は幼植物体の生育過程のみ Y13 に対する低感受性を示すことが明らかとなった。現在、機能欠失型および過剰発現型の変異体作出を行っている。この解析の進展が、GA からの信号伝達制御に関わる新因子特定に寄与することを期待する。

3. 器官選択型制御剤 Y25 の選抜と作用機構の解明

two-hybrid 用酵母に対する阻害強度が低く、解析を後回しにした 32 種についても上記 Y13 の選抜過程と同様に評価と選抜を実施した。その過程において、うち 1 種(Y25 と呼称)は胚軸の生長阻害がほとんど認められないのに対して、根の生長に対して明瞭な阻害効果を持つことを見出した。そこで、種子発芽、花茎の伸長、種子形成の各過程に及ぼす影響を調べて比較した結果、Y25 は発芽率や花茎の伸長にはほとんど影響を与えないのに対して、通常どおり花が咲くものの種子形成をほぼ完全に阻害することが新たに判明し、Y13 には備わっていない制御対象器官の選択性が認められた。*in vitro* 試験系を用いた検討から、Y25 の効力自体は Y13 より弱いものの、受容体の GA 結合能を有意に阻害することが判明した。加えて、Y25 処理個体の花を顕微鏡観察した結果、雄しべの短化により適正な受粉が行われないことが種子形成不全の主要因と考えられた。

ところで、所属研究室では GA 受容体の機能欠失型多重変異体の中に雄しべの短化を主要因とする種子形成不全系統が存在し、生化学的見地からその原因を探り報告している(Suzuki et al., Plant J, 2009)。これに拠ると、シロイヌナズナでは GA 受容体が 3 種、DELLA 因子が 5 種存在するが、花ではそれぞれの一部が GA 信号の伝達制御のために有効に機能している。そして、上記多重変異体中で正常に機能する受容体は、花で機能する DELLA 因子群に対し総じて親和性が低く、DELLA 因子の機能抑制に向け効率的な役目を果たせないことが形質出現の原因と考察している。そこで、Y25 処理で現れる同様の形質も、受容体を作用点とする現象との想定に立ち、「花における GA からの信号伝達制御に機能する GA 受容体と DELLA 因子のうち、とりわけ花に特異的な 2 分子間の組合せを選択的に、かつ、効率よく Y25 が阻害する」ことを示せ

ば、Y25 の花器官選択性を説明できると考えた。この作用点把握の一助とすべく、Y25 の構造的アナログ 11 種を有機化学的手法を用いて調製するとともに、市販品 6 種も入手した。計 17 種を用いて種子形成過程、根や胚軸の生長過程に対する阻害活性を評価した結果、Y25 同様に種子形成阻害能を有する新規化合物 3 種を見出すとともに、うち 1 種は Y25 が合わせ持っていた根の生長阻害活性を消失しており、より一層の器官特異性の向上を確認した。他方、Y25 が持たない胚軸の生長阻害活性が新たに付与された化合物も含まれた。「花器官で重要と目される受容体-DELLA 因子」間の相互作用解析時に用いる two-hybrid 用酵母を対象として、アナログ化合物の投与効果を調べた結果、少なくとも種子形成阻害能が高い化合物群は総じて酵母の生育阻害効果も高く、受容体-DELLA 因子間の相互作用がある程度効果的に阻害される傾向が伺えた。こうした微細な構造的変化が阻害対象となる器官選択性の変化を生じる点について、やはり Y25 の作用点を受容体であって、15 通りもの組合せが関与する DELLA 因子との相互作用状況とも関わっていることの傍証であろうと推測している。

より別の角度から、「Y25 の作用点＝受容体」を支持する情報を集めるべく、受容体-DELLA 因子間の相互作用に対する阻害効果を有する化合物を集め、その中から Y25 同様の器官特異性付与化合物の存在を検討した。既に実施済み *in vitro* 試験系による評価結果を再検討し、*in planta* レベル未検討の候補 13 種を新たに選抜した。これらの幼植物体胚軸および根の生長阻害活性を調べた結果、根に影響を与えず、胚軸の生長のみ大きく阻害する Y33 を見出した。Y33 は種子発芽や種子形成過程にも影響を与えず、胚軸選択的制御剤と判明した。この Y33 の選択性については、Y25 の種子形成過程選択性と合わせさらなる検討を重ねる必要がある。

最後に、器官選択性を生む機構解明状況のいかんに関わらず、Y25 の種子形成阻害作用は現在 F1 交雑品種の流通が盛んな育種の分野に多大な貢献をもたらす可能性を述べる。シロイヌナズナもこれに属する自家和合性の植物を人工交配する場合、自家受粉回避のため雄しべの摘除作業が欠かせない。しかし、花自体が小さいほどその作業には多大な労苦を伴う。Y25 処理個体の花は、正常な他個体の花粉を用いて交配させた場合、正常な種子形成が認められることから雌しべの種子形成能は維持されている。この結果から、少なくともシロイヌナズナの人工交配作業を劇的に簡略化する分子ツールとしてその有用性が示された。今後、シロイヌナズナ以外の植物に対する効果も検証していく必要がある。

1) JM Yoon, M Nakajima, K Mashiguchi, SH Park, M Otani and T Asami, Chemical screening of an inhibitor for gibberellin receptors based on a yeast two-hybrid system. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10.1016/j.bmcl.2012.12.007.