

植物ホルモン・ブラシノステロイドの
内生量調節に関する分子生物学的研究

吉満 勇也

2012

目次

1 緒言1
2 材料及び方法5
2. 1 試薬と酵素	
2. 2 <i>DWF4::GUS</i> 融合遺伝子の作成	
2. 3 アグロバクテリウム法を用いた形質転換体作成	
2. 4 植物ホルモンと阻害剤	
2. 5 植物の栽培条件及び植物ホルモンと阻害剤の処理方法	
2. 6 定量的逆転写 PCR 法による発現解析	
2. 7 GUS 解析	
2. 8 形態計測	
2. 9 活性型 BR の定量	
2. 10 パーティクルガン法を用いた遺伝子導入	
2. 11 タングステン粒子懸濁溶液からのプラスミド DNA の回収と検出	
2. 12 タングステン粒子に吸着したプラスミド DNA の回収と検出	
3 結果15
3. 1 <i>DWF4::GUS</i> 融合遺伝子の作成と安定的形質転換体の作出	
3. 2 5'末端から段階的に欠失させた <i>DWF4</i> プロモーターを持つ <i>DWF4::GUS</i> 融	

合遺伝子の作成とその利用

- 3. 3 BR 内生量の変動に対する *DWF4* の転写応答
- 3. 4 オーキシンによる *DWF4* 転写の根系特異的な誘導
- 3. 5 *DWF4* の転写調節における BR とオーキシンとの関係
- 3. 6 根の発生・成長における BR とオーキシンの関連性と *DWF4* 転写の役割
- 3. 7 オーキシンを処理した野生型シロイヌナズナにおける活性型 BR の定量
- 3. 8 パーティクルガン法による *DWF4::GUS* 融合遺伝子の一過的発現解析
- 3. 9 タングステン粒子によるプラスミド DNA 分解を軽減する条件
- 3. 10 タングステン粒子により作られる ocDNA が一過的遺伝子発現に与える影

響

4 考察30

5 図表43

Figure 1~16

Table 1~7

要旨71

Summary73

参考文献75

謝辞84

植物ホルモン・ブラシノステロイドの
内生量調節に関する分子生物学的研究

吉満 勇也

2012

目次

1 緒言1
2 材料及び方法5
2.1 試薬と酵素	
2.2 <i>DWF4::GUS</i> 融合遺伝子の作成	
2.3 アグロバクテリウム法を用いた形質転換体作成	
2.4 植物ホルモンと阻害剤	
2.5 植物の栽培条件及び植物ホルモンと阻害剤の処理方法	
2.6 定量的逆転写 PCR 法による発現解析	
2.7 GUS 解析	
2.8 形態計測	
2.9 活性型 BR の定量	
2.10 パーティクルガン法を用いた遺伝子導入	
2.11 タングステン粒子懸濁溶液からのプラスミド DNA の回収と検出	
2.12 タングステン粒子に吸着したプラスミド DNA の回収と検出	
3 結果15
3.1 <i>DWF4::GUS</i> 融合遺伝子の作成と安定的形質転換体の作出	
3.2 5'末端から段階的に欠失させた <i>DWF4</i> プロモーターを持つ <i>DWF4::GUS</i> 融	

合遺伝子の作成とその利用

- 3. 3 BR 内生量の変動に対する *DWF4* の転写応答
- 3. 4 オーキシンによる *DWF4* 転写の根系特異的な誘導
- 3. 5 *DWF4* の転写調節における BR とオーキシンとの関係
- 3. 6 根の発生・成長における BR とオーキシンの関連性と *DWF4* 転写の役割
- 3. 7 オーキシンを処理した野生型シロイヌナズナにおける活性型 BR の定量
- 3. 8 パーティクルガン法による *DWF4::GUS* 融合遺伝子の一過的発現解析
- 3. 9 タングステン粒子によるプラスミド DNA 分解を軽減する条件
- 3. 10 タングステン粒子により作られる ocDNA が一過的遺伝子発現に与える影

響

4 考察30

5 図表43

Figure 1~16

Table 1~7

要旨71

Summary73

参考文献75

謝辞84

1 緒言

植物は、遺伝的にプログラムされた発生及び成長過程を制御するために、また日々刻々と変化する環境に順応するために植物ホルモンを利用している。植物ホルモンは、植物の正常な生育に不可欠な低分子のシグナル物質であり、非常に微量で生理作用を示す。そのため、ホルモンの内生量、感受性、輸送等は厳密に制御されている。

現在、植物ホルモンは 8 種類発見されており(Figure 1)、植物の生活環や環境に応じてそれぞれ特有の機能を発揮する。その中で、ブラシノステロイド(BR)は比較的最近見つかったホルモンであり、唯一ステロイド骨格を有する。BRは他のホルモンの比べて低い濃度(nM 水準)で細胞伸長、維管束分化、光形態形成などの生理作用を引き起こす(Clouse and Sasse, 1998)。また、BRは収量増加をもたらす、ストレス耐性を付与することが知られている。例えば、トウモロコシ由来のBR生合成酵素遺伝子 *CYP724B3* をイネの中で異所的に強制発現させると籾が大きくなることや (Wu *et al.* 2008)、高温あるいは病原菌に曝した植物をBR存在下で栽培すると生育が良くなることが報告されている(Dhaubhadel *et al.* 2002, Nakashita *et al.* 2003)。上述のように農業での利用が期待されたBRであるが(Rao *et al.* 2002, Divi and Krishna 2009)、実際に植物成長調整剤(農薬)として使われているのはロシアや中国など数カ国のみで、日本では全く利用されていない(岡本他、2007)。Kamuro and Takatsuto(1999)は、この理由を実験室レベルで見られた農業に有益な性質がガラス室、圃場、耕地へと移るに従って徐々に失われるためと説明している。また彼らは、BRの安定性、あるいは効果持続性が低いため最適な施用時期や施用器官の特定が困難であるとも指摘して

いる。実際、当研究室の大石らが過去に行った研究で、蛍光標識したブラシノライド (BL) をシロイヌナズナの培養細胞に投与すると数日以内に消失したことを見い出している(大石、修士論文)。従って、BR の機能を農業に有効利用するためには、持続的な効果を発揮する BR 誘導体を開発する必要がある。外から直接 BR を施用することとは別に、ジベレリンなどで見られるように生合成阻害剤または作用阻害剤を開発して利用する方法や、BR の内生量や機能を改変した品種を作出することも必要である。BR 生合成阻害剤としてブラシナゾール(Brz; Asami *et al.* 2000, Figure 2)、BR 作用阻害剤としてビキニン(De Rybel *et al.* 2009)などが知られているが、これまでに農業現場で利用された実績はない。一方、育種分野においては、半矮性オオムギの渦(*uzu* 変異体)や耐雪性ソラマメの倫玲(*rinrei* 変異体)が優良品種として長く使われてきたが、最近、それらの形質が BR 受容体遺伝子 *HvBR11* の弱いアレルや、BR 生合成酵素遺伝子 *BDD1* の欠損変異に起因することが分かった(Fukuta *et al.* 2004, Rikiishi *et al.* 2008)。これらの結果は、BR 関連遺伝子(生合成・代謝・シグナル伝達)が作物育種の標的遺伝子として有望であることを示唆している。

ここ 20 年の間に、BR の生合成やシグナル伝達の仕組みが徐々に明らかになってきた(Bishop 2007, Kim and Wang 2010)。BR 生合成経路は、ステロール合成経路と BR 特異的合成経路に大きく分けられる。ステロール合成経路では、メバロン酸から BR 合成前駆体であるカンペステロールが作られる。一方、BR 特異的合成経路では、カンペステロールを材料として生物活性を持つ BR であるカスタステロン(CS)と BL が作られる (Figure 2)。DWARF4(DWF4) と CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM(CPD)は、共に BR 特異的合成経路で

働くシトクロム P450 酵素であり、どちらも BR 合成の律速段階の反応を担うと考えられている(Szekeres *et al.* 1996, Choe *et al.* 1998)。DWF4 は、複数の BR 合成中間体の 22 位炭素の水酸化を触媒しており、植物の正常な生育や発生に必須な働きを持つ(Choe *et al.* 1998, Asami *et al.* 2000)。実際、DWF4 酵素の機能を直接阻害する Brz を野生型シロイヌナズナへ投与した場合、あるいは *dwf4* 変異体においては、BR 欠乏に起因する顕著な矮化が観察される。また田仲らは、*DWF4* 遺伝子の発現が BR 内生量に応じて速やかに増減することを見出した(Tanaka *et al.* 2005)。この結果は、*DWF4* 遺伝子が BR の生合成だけでなく BR 内生量の維持においても重要な役割を果たすことを示している。しかし、BR 内生量の変動に応じた *DWF4* の発現調節機構の全容は未だ解明されていない。

植物が示す生理現象の多くは、単一の植物ホルモンではなく、複数の植物ホルモンが相互作用(クロストーク)することによってもたらされると考えられている。有名な例としては、ジベレリンとアブシジン酸による種子休眠と発芽の調節(Nambara *et al.* 2000)、オーキシンとサイトカイニンによる拮抗的な頂芽優性の制御(Cline 1991)、アブシジン酸とエチレンによる協調的な離層形成の誘導(Gomez-Cadenas *et al.* 1996)などが知られている。BR に関しては、これまでオーキシンとの関連性がよく研究されてきた(Hardtke *et al.* 2007)。両ホルモンは、ときに協調的に、ときに拮抗的に作用し合うことが知られている。前者の例としては下胚軸の伸長や側根形成(Tanaka *et al.* 2003, Nemhauser *et al.* 2004, Bao *et al.* 2004)、後者の例としては根や下胚軸における重力屈性(Nakamoto *et al.* 2006, Kim *et al.* 2007)に対する働きが挙げられる。また、BR とオーキシンの両方に制御される遺伝子が数多く存在することも、これらの知見を支持

する(Goda *et al.* 2004, Nemhauser *et al.* 2004)。両ホルモンのクロストークについては、BR がもたらす生理現象の一部がオーキシンの機能を介しているという報告が多い(Hardtke *et al.* 2007)。例えば、BR がオーキシンの極性移動に影響を与えることで側根形成や根の屈性を制御することや(Bao *et al.* 2004, Li *et al.* 2005)、BR がオーキシンのシグナル伝達に関わる転写因子を暗号化する遺伝子 *Aux/IAA* の発現調節を介してその下流に位置する応答性遺伝子の発現を促進することが知られている(Nakamura *et al.* 2003 and 2006)。反対にオーキシンが BR の機能を制御する例はほとんど知られていない。唯一、オーキシンが機能未知の *BRABIS RADIX(BRX)* 遺伝子の働きを介して *CPD* の発現を誘導すること、また、その結果として主根伸長を制御することが報告されている(Mouchel *et al.* 2006)。

このような背景の下、私は BR 生合成の鍵酵素遺伝子 *DWF4* 機能の解明を目的として本研究を行い、*DWF4* 転写が BR 内生量のフィードバック調節及び BR とオーキシンとのクロストークにおいて大きな役割を果たすことを明らかにした。また、*DWF4* 遺伝子の一過的発現解析の実験の中で遭遇した問題点とその改善法についても述べる。

2 材料及び方法

2.1 試薬と酵素

本実験に用いた試薬は、特記していない限り和光純薬工業株式会社から購入した。*DWF4* プロモーターのクローニングには、校正機能を有する KOD DNA ポリメラーゼ(東洋紡株式会社)を、semi-qRT-PCR には Taq DNA ポリメラーゼを用いた。また、クローニングに用いた制限酵素 *XbaI* と *EcoRI* はタカラバイオ株式会社から、*EcoRV* と *BamHI* は株式会社ニッポンジーンから購入した。

2.2 *DWF4::GUS* 融合遺伝子の作成

シロイヌナズナの *DWF4* 遺伝子上流域約 2500bp の DNA 配列を増幅するため、校正機能を持つ KOD DNA ポリメラーゼを用いてゲノム PCR 法を行った(Figure 3)。プライマーとしては、D4proF(5'-GCATAAAGCATAAAGGACCCGTTC-3')と D4proR(5'-AGTTTCTCTCTCTCTCTCACTCAC-3')を使用した。得られた PCR 産物は pBluescriptKSII(+)*EcoRV* 切断部位にクローニングし、さらに、そこから *XbaI* と *BamHI* を用いて 1700bp の断片を切り出した。切り出した DNA 断片は同ベクターに再クローニングし、塩基配列解読を行った。解読した塩基配列がデータベースに登録された *DWF4* 遺伝子の 5' 上流域の配列と完全に一致することが確認できたので、この DNA 断片を *DWF4* 遺伝子の最長プロモーターとして用いた。また、*XbaI* 切断部位で直鎖状にした同プラスミドを鋳型として、PCR 法により末端から 200bp ずつ欠損させたプロモーター断片(1000, 800, 600, 400, 200, 100bp)を増幅した。尚、この実験に使用したプライマーの配列は、Table 1 に示す通りである。これらのプロモーター断片の塩基

配列を解読後、pBI201 ベクター上の *GUS* 構造遺伝子上流部にある *Bam*HI 切断部位に各プロモーター断片を挿入した。得られた一連の *DWF4::GUS::NOS-T* 融合遺伝子(以下 *DWF4::GUS* と表記)は一過的発現解析に用いた。一方、安定的形質転換の作成には、先に述べた pBlueScriptKSII(+)ベクターにクローニングした各プロモーター断片を切り出し、pBI101-Hm ベクター上の *GUS* 遺伝子上流部(*Bam*HI 部位)に挿入することで作成した。pBI101-Hm は、形質転換の選択マーカとしてカナマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ。尚、この際、100~1000bp の *DWF4::GUS* 融合遺伝子には、*GUS* 遺伝子のコード領域にシロイヌナズナ由来の *Trip1* 遺伝子の第二イントロンを挿入した(以下 *DWF4::intronGUS* と表記)。

2. 3 アグロバクテリウム法を用いた形質転換体作成

上記安定的形質転換体の作製に用いるプラスミドはアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* EH105 株)へ導入し、In planta 法(Bechtold *et al.* 1993)あるいは Floral dip 法(Clough and Bent, 1998)を用いて野生型シロイヌナズナ(*Ws*)へ菌を感染させた。In planta 法では、アグロバクテリウムの浸潤を促すため菌液に界面活性剤 Tween-80(終濃度 0.01%; ナカライテスク株式会社)を加えた。また、既に種子形成が始まっている花や莢を植物体から取り除いた。植物体に対する菌液の減圧浸潤は、アクリル製の真空デシケーターを用いて 40mmHg の陰圧下で 10 分間行った。Floral dip 法でも、上記と同じ理由から界面活性剤 Silwet L-77(終濃度 0.05%; ジーイー東芝シリコン社製)を加えた菌液に、花や莢を取り除いた植物体の先端部を約 10 秒間浸した。新聞紙を敷いたバットの中に菌液を浸潤させた各植物体を寝かせ、ラッ

プで蓋をして培養室(16時間明期/8時間暗期、24°C)に16~24時間静置した。その後、16時間明期/8時間暗期、22~26°Cの条件下で栽培し、種子を採取した。

2.4 植物ホルモンと阻害剤

以下に本実験で用いた植物ホルモン関連物質を記す。オーキシンとしては、下記の4種類の活性型オーキシンと2種類のオーキシン前駆体を用いた。天然オーキシンとしてはインドール3酢酸(IAA; ナカライテスク株式会社)及びインドール3酪酸(IBA)を、合成オーキシンとしては α ナフチル酢酸(NAA)及び2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D; Sigama-Aldrich Co., St. Louis, MO)を、前駆体としてはトリプトファン(Trp; ナカライテスク株式会社)及びインドール3アセトアミド(IAM)を用いた。その他の植物ホルモン関連物質としては、アブシジン酸(ABA)、サイトカイニン(BA)、ブラシノステロイド(BL; 有限会社ブラシノ)、ジベレリン(GA₃; ナカライテスク株式会社)、メチルジャスモン酸(MeJA)、サリチル酸(SA)、そしてエチレン前駆体である1-アミノシクロプロパン(ACC)を使用した。Trpを除く全ての試薬は、全てDMSO(99%以上)に溶解しストック溶液とした。TrpはDMSOに溶けないため、0.1N塩酸に溶解させた。重水素ラベルしたカスタステロン(CS; [²H]₄CS)及びBL([²H]₄BL)は理化学研究所の瀬戸秀春博士からご分与して頂き、BR量測定の内部標準として使用した。

オーキシンの阻害剤として、3種類のアンチオーキシンと2種類のオーキシン極性移動(Polar Auxin Transport; 以後PATと表記)阻害剤を用いた。前者としては2-パラクロロフェノキシ-2-メチルプロピオン酸(PCIB; Sigama-Aldrich Co., St. Louis, MO)、 α -*tert*-ブトキシカルボニルアミノヘキシル IAA(BH-IAA)、 α -フェニルエチル-2-オン

-IAA(PEO-IAA)、後者としては N-1-ナフチルフタラミン酸(NPA)及び 2,3,5-トリヨード安息香酸(TIBA; Sigama-Aldrich Co., St. Louis, MO)を用いた。BH-IAA と PEO-IAA は、岡山理科大学の林謙一郎博士よりご分与して頂いた(Hayashi *et al.* 2008; Nishimura *et al.* 2009)。また、BR の生合成阻害剤(Brz)は東京大学の浅見忠男博士及び理化学研究所の吉田茂男博士にご分与して頂いた(Min *et al.* 1999)。これらの試薬も DMSO(99%以上)に溶解し、ストック溶液を調製した。

2. 5 植物の栽培条件及び植物ホルモンと阻害剤の処理方法

本研究では、主にシロイヌナズナ[*Arabidopsis thaliana* ecotypes *Wassilewskija* (Ws), *Columbia* (*Col-0*)]を植物材料として用いた。*DWF4* 遺伝子の T-DNA 挿入変異体である *dwf4-102*(SALK_020761)の種子は、*Arabidopsis* Biological Resource Center(ABRC; Columbus, OH)から購入した。種子の滅菌と生育条件は、主に田仲ら(2003)の論文に記載された方法に従ったが、MS 固形培地に含まれるゲランガムの濃度は 5.0 g/l から 3.2 g/l に変更した。

14 日間 MS 固形培地上で栽培したシロイヌナズナ実生を、様々なホルモンや阻害剤を添加した MS 液体培地に移植し、80rpm(Recipro Shaker NR-10; 株式会社タイテック)で振盪培養した。MS 培地の液量に対する実生の数は、半定量的逆転写 PCR(semi-qRT-PCR)実験で 20 個体/10ml、生化学的 GUS 解析で 5 個体/2.5ml、組織化学的 GUS 解析で 1 個体/ml とした。いずれの場合も、溶媒として用いた DMSO の最終的な濃度は 0.1%を超えないように調整した。

形態計測解析では、シロイヌナズナ(*Col-0*, *dwf4*)を播種したプレートを垂直に立

てた状態で、連続光、22°C の条件で栽培した。7 日後、BL、Brz、IAA を様々な組み合わせで加えた培地に移植し、同じ条件下でさらに 3 日間培養した。

BR 量測定は以下のように行った。オーキシンの投与は、MS 固形培地上で育てた 14 日齢のシロイヌナズナ実生(*Ws*)の上部から 1 μ M IAA を含んだ MS 液体培地を添加することで行った。24 時間静置培養した後、実生を培地から抜き取り、地上部と根に切り分けた。切り分けた各器官はそれぞれプラスチックチューブに集めた。続いて、それらを凍結乾燥し解析まで-30°C で保存した。BR 量測定は、エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法(LC-ESI-MS/MS)を用いて行った。

2. 6 定量的逆転写 PCR 法による発現解析

RNA 抽出及び semi-qRT-PCR は田仲ら(2005)の方法に従った。鋳型に用いる RNA サンプル中にわずかに含まれるゲノム DNA を除去するため、逆転写反応は DNase I(タカラバイオ株式会社)で処理した後に行った。各遺伝子の発現解析に用いたプライマー、サイクル数、アニーリング温度については、Table 2 にまとめた。

2. 7 GUS 解析

生化学的な GUS 活性の測定は主に Jefferson(1987)の方法に従ったが、植物自身が持つ β グルクロニダーゼ活性を抑えるため基質溶液に 20%メタノールを加えるという変更点を加えた(Kosugi *et al.* 1990)。また、組織化学的な GUS 染色も同様に 20%メタノールを加えた改変 Jefferson(1987)法で行った。酵素反応後、葉緑素を除くために組織片を 100%エタノールにより洗浄・脱色し、実体顕微鏡(StemiDV4, Carl

Zeiss Inc.)下で GUS 染色の観察、あるいは GUS スポットの計測を行った。

2. 8 形態計測

植物ホルモンあるいは阻害剤処理したシロイヌナズナ実生の写真は、デジタルカメラ(PowerShot S5 IS, Canon)を使って撮影した。その後、画像をもとに ImageJ ソフトウェア(NIH, Maryland, USA)を用いて側根の長さや数、主根の長さを計測した。Tukey 法による多重検定は、統計解析ソフト PASW statistics 18.0 software を用いて行った。

2. 9 活性型 BR の定量

植物ホルモン類の抽出を行う前に、内部標準として 5 ng/g DW の $[^2\text{H}]_4\text{CS}$ と 1 ng/g DW の $[^2\text{H}]_4\text{BL}$ を組織片に添加した。Yoshimoto ら(2009)の論文にもとづいて、80%メタノールと 1%酢酸の混合溶液で抽出した後、親水性カートリッジ、陽イオン交換カートリッジ、陰イオン交換カートリッジの順で精製し、活性型 BR が含まれる中性画分を得た。抽出物を乾燥させた後、クロロホルム 1ml に再溶解させ、順相抽出カートリッジ(SepPak Silica, Waters, Milford, MA, USA)を通した。クロロホルム 1ml で洗浄した後、クロロホルム:メタノール=9:1(v/v)の溶液 2ml によって BR を溶出した。溶出液を乾燥させ、50%メタノール 100 μl に溶かした後、ODS カラム(CAPCELL PAK C18, 4.6 \times 250 mm, 株式会社資生堂)を取り付けた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供試した。ホルモン類の溶離は濃度勾配をつけたアセトニトリルにより行った。具体的には、10%アセトニトリルを 10 分間流した後、40%アセトニトリルで 1 分間、さらに濃度を

60%に増加させて 20 分間溶離した。最後に 90%アセトニトリルで 10 分以上洗浄した後、アセトニトリルを初期濃度である 10%に戻し、10 分間流すことでカラムを平衡化した。溶出液は 1tube/min の速度で収集し、溶媒を乾燥させた後、23 番目と 30 番目の画分を LC-ESI-MS/MS(Agilent, 1200-6410)によって分析した。LC-ESI-MS/MS の条件は Table 3 に示す。植物内の BR 量は、サンプル中の CS 及び BL のピークの面積と、各内部標準との比率から算出した。地上部における内生 CS 量は 3 つの特異的なプロダクトピークの平均値によって評価した。一方、根においてはピークの面積が低かったため、3 つのピークの内最も強いイオン(463/129)を使って計算した。そのため、Table 4 では根における CS 量を最大値(maximum value)として表記した。

2. 10 パーティクルガン法を用いた遺伝子導入

パーティクルガン法を用いた一過的発現解析には、細胞が大きく観察しやすいタバコ(*Nicotiana tabaccum* cv. bright yellow)葉を標的に用いた。タバコは、培養土を入れた黒ビニルポットに播種・定植し、自然光の下で栽培した。植物体から約 20~25cm の長さの葉を選び、クリーンベンチ内で 3×3 cm の大きさに切り分けた。続いて滅菌のために 70%エタノールに 30 秒間浸し、滅菌水で 2 回洗浄した後、ペーパータオルで余分な水分を取り除いた。葉切片の背軸側を上にして湿らせた滅菌ペーパーの上に置き、パーティクルガン装置にセットした。

導入するプラスミド DNA と、その担体として用いるタングステン粒子(M-17; Bio-Rad Laboratories, Inc.)及び金粒子(1.0 μm ; Bio-Rad Laboratories, Inc.)との吸着反応は、Sanford ら(1993)の方法に基づいて行った。ただし、反応溶液のスケールを

半分にし、金属粒子を 50%グリセロールではなく水あるいは TE 緩衝液(pH 8.0)に懸濁した。変更の理由は、グリセロールが DNA 吸着と一過的な *GUS* 発現に悪い影響を与えるという論文が報告されていたからである(Rasco-Gaunt and Barcelo 1999)。吸着反応は、DNA 担体に用いる金属粒子を分散させるために、ミキサー(MT-360; 株式会社トミー精工)を使って攪拌しながら行った。金属粒子の懸濁液に対して、DNA、塩化カルシウム、スペルミジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)の順で添加し、混合液を 3 分間攪拌した。その後、1 分間静置し、これを DNA-金属粒子吸着溶液とした。

遺伝子導入効率を調べる実験では、*DWF4::GUS* 融合遺伝子に代えて pBI221 プラスミドを用いた(5.7kb; Jefferson 1987)。pBI221 は、カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーターの下流に *GUS* 遺伝子をつなげた *35S::GUS* 融合遺伝子を持つ。変更の理由は、35S プロモーターが組織や器官に依存せず構成的な発現を示すからである。また、内部標準遺伝子としては p35S-sGFP プラスミドを用いた(4.1kb; Chiu *et al.* 1996)。p35S-sGFP は、35S プロモーターの下流に改良型緑色蛍光タンパク質を暗号化する *GFP* 遺伝子をつなげた *35S::sGFP* 融合遺伝子を持つ。パーティクルガン法へ供試する際には、pBI221 と p35S-sGFP が 9:1(v/v)になるように吸着反応溶液へ添加した。

パーティクルガン法は Biolistic PDS-1000/He 装置(Bio-Rad Laboratories Inc.)を用い、付属の説明書に従って行った。予備実験の結果から、プラスミド DNA の導入条件はチャンバー内圧力 28 inchHg、標的距離 9cm、ヘリウムガス圧力 900psi とした。チャンバー内にタバコ葉を乗せたシャーレを置き、DNA を吸着させた金属粒子を撃ち

込んだ。遺伝子導入後、16 時間明所/8 時間暗所、26°C に設定した培養室内でタバコ葉を静置した。24 時間培養後、470/490 nm の励起フィルターと 515/550 nm の蛍光フィルターを搭載した蛍光顕微鏡 (AX80; オリンパス株式会社) を用いて、緑色蛍光を発する細胞の数を計測した。その後、2.7 の方法に準じて X-Gluc を基質とした酵素反応を行い、生じたインディゴチンにより青く染まった細胞数を計測した。

2.11 タングステン粒子懸濁溶液からのプラスミド DNA の回収と検出

プラスミド DNA に対するタングステン粒子の影響を調べるため、保温実験を行った。タングステン粒子と DNA の割合はパーティクルガン法 (Sanford *et al.* 1993) の手順に準じて 600:1 (v/v) としたが、反応液の容量は推奨容量の半分にした。まず、1 µg/µl の濃度に調整した pBI221 プラスミド DNA 溶液 2.5 µl を水 60 µl に加えた。これらの溶液に 70% エタノール及び水で洗浄したタングステン粒子 (1.5 mg) を加え、25°C または 4°C で一定時間保温した。その後、遠心 (13,200 × g・3 分間) を 2 回行い、タングステン粒子と DNA を含む上清とを分離した。上清の pH は、簡易 pH メーター (twin pH; 株式会社堀場製作所) で測定した。上清をエタノール沈殿した後、DNA を 10T1E に再溶解し、0.7% アガロースゲル電気泳動で分離した。泳動後、アガロースゲルを臭化エチジウムで染色し、紫外線照射装置の下でゲル内の DNA を写真撮影した。

2.12 タングステン粒子に吸着したプラスミド DNA の回収と検出

タングステン粒子に吸着したプラスミド DNA の構造変化を調べるため、2.10 で示した方法に従い吸着反応を行った後、吸着溶液を粒子ごと別のチューブに移した。

遠心(13,200 × g・3 分間)によりタングステン粒子と上清(1)に分けた後、空になったチューブ(2)及びタングステン粒子(3)に 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)/1 mM EDTA (50T1E) 緩衝液を加え、チューブの壁面に付着した DNA 及びタングステン粒子に吸着した DNA を溶出した。上記の分画 1,2,3 から回収した DNA の解析と吸着液の pH 測定は、上述(2. 11を参照)と同様に行なった。

3 結果

3.1 *DWF4::GUS* 融合遺伝子の作成と安定的形質転換体の作出

DWF4 遺伝子の発現は、BR 生合成及び内生量調節において重要な役割を果たすことが知られている(Choe *et al.* 1998, Tanaka *et al.* 2005)。*DWF4* の機能、ひいては BR 作用機構を理解するためには、*DWF4* 遺伝子の発現様式、中でも転写様式を詳細に解析することは必要不可欠であると考えられる。

一般的な遺伝子プロモーターの長さは、近傍の遺伝子との距離(遺伝子間距離)による制約を受ける。シロイヌナズナの場合、平均的な遺伝子間距離は 2000bp-2500bp と算定されている(The Arabidopsis Genome Initiative 2000)。従って、大部分の遺伝子のプロモーターの長さはこの範囲に収まると推察される。実際、シロイヌナズナのステロイド及び BR の生合成・代謝に関わる酵素遺伝子のプロモーター解析でも、研究者の多くが 1000bp-2000bp のプロモーターを使用している(Table 5)。そこで本研究でも、この範囲の長さを持つプロモーターDNA を用いることにした。まず、NCBI(National Center of Biotechnology Information)の情報をもとにゲノム PCR に用いるプライマーを作成した(“材料及び方法”2. 2を参照)。このプライマーセットを用いてシロイヌナズナゲノムを鋳型として *DWF4* 遺伝子上流を含む約 2500bp の DNA 配列を PCR 増幅し、その断片を pBluescriptKSII(+)にクローニングした(Figure 3)。続いて、*DWF4* の翻訳開始点の上流約 1700bp にある *Xba*I 部位とベクター上にある *Bam*HI 部位を使ってプロモーター断片(約 1700bp)を切り出し、同ベクターに再クローニングした。この DNA 断片の塩基配列を解読したところ、データベース上の配列と完全に一致することを確認した。また、プロモーター配列上には、BR 量依存的に機能す

る転写因子 BZR1 が結合するシス配列 BRRE[CGTG(T/C)G]が 1 箇所存在した (Figure 3)。このことから、*DWF4* 遺伝子上流域を含むこのゲノム DNA 断片 (1700bp)は、少なくとも BR 量の増加に対して応答できると推測した。そこで、本研究ではこの断片を最長の *DWF4* プロモーターとして使用することにした。

安定的発現解析に用いる *DWF4::GUS* 融合遺伝子の構築は、pBI101-Hm プラスミドベクター上で行った。具体的には、上記の *DWF4* プロモーター断片をプラスミド上の *GUS* 遺伝子上流に位置するマルチクローニング部位に挿入することで作成した (Figure 3)。出来上がったプラスミドをアグロバクテリウムに移し、この細菌をシロイヌナズナの形質転換 (In planta 法) に供試した。その結果、独立な *DWF4::GUS* 形質転換体 (1700bp) を 15 系統得ることに成功した。

3. 2 5'末端から段階的に欠失させた *DWF4* プロモーターを持つ *DWF4::GUS* 融合遺伝子の作成とその利用

DWF4 遺伝子の翻訳開始点から約 690bp 上流のプロモーター領域には、BR シグナル伝達経路で働く転写因子 BZR1 が結合するシス配列 BRRE[CGTG(T/C)G]が存在する (Figure 3)。BZR1 は BL 依存的に *DWF4* の転写を抑制することが知られているが (He *et al.* 2005)、BR 量の低下、すなわち Brz 処理による転写誘導への関与は報告されていない。そこで、BRRE 配列の役割を解明すると共に未知のシス配列を探索するため、*DWF4* プロモーターを段階的に短くした DNA 断片を作成した。まず上述した 1700bp の *DWF4* プロモーター断片を鋳型として、KOD DNA ポリメラーゼを使った PCR により長さが異なる 6 つのプロモーター断片 (1000, 800, 600, 400, 200, 100bp) を

増幅した(Figure 3)。これらの DNA 断片の塩基配列を解読したところ、全てデータベース上の情報と一致した。続いて、上記 DNA 断片を pBI201 ベクター上の *GUS* 遺伝子と結合することで、一過的発現解析用の 6 種の *DWF4::GUS* 融合遺伝子シリーズを作出した。

一方、安定的発現解析用としては、改変 pBI101-Hm ベクター上の *GUS* 遺伝子と結合することで *DWF4::GUS* 融合遺伝子シリーズ(6 種)を作出した。尚、改変プラスミドの *GUS* 遺伝子には、細菌内での発現を阻止するためシロイヌナズナの *Trip1* 遺伝子由来の第二イントロンを組み込んだ(*intronGUS*)。従って、これら 6 種の *DWF4::intronGUS* 融合遺伝子は、安定的形質転換体を用いた発現解析に加え、アグロインフェクション法を用いた一過的発現解析にも使用できる。出来上がった *DWF4::intronGUS* 融合遺伝子を用いたシロイヌナズナの形質転換は、In planta 法に代え、形質転換効率が高い上に操作が簡便な Floral dip 法を用いて行った。これまでに 1000bp、800bp、600bp の *DWF4* プロモーターと *intronGUS* の融合遺伝子については、それぞれ 5 系統以上の独立の形質転換体を選抜できた(Table 6)。現在、上記 3 種の *DWF4::intronGUS* 形質転換体に加えて 400bp のプロモーターを持つもの(合計で 4 種)については、T3 世代のホモ個体を得るに至っている。一方、200bp と 100bp の *DWF4* プロモーターを持つものに関しては 1~2 系統の形質転換体(T2 世代)を得ている(Table 6)。

3. 3 BR 内生量の変動に対する *DWF4* の転写応答

DWF4 の発現は、BL や Brz に応答して急速に変動する(Tanaka *et al.* 2005)。こ

のことは、*DWF4* が BR の恒常性維持に深く関わっていることを示唆している。しかし、その *DWF4* 発現が転写調節、転写後調節、あるいはその両者の調節を受けているのかどうかについては、未だ分かっていない。そこで、BR 内生量の増減に伴う *DWF4* の転写応答を明らかにするため、作出した *DWF4::GUS* 形質転換体(1700bp)を使った安定的発現解析を行った。semi-qRT-PCR 法により BL あるいは Brz 処理に対する *GUS* mRNA 量と *DWF4* mRNA 量の変動を調べたところ、0.1 μ M BL 存在下では両 mRNA とも 2 時間以内に減少した(Figure 4)。一方、5 μ M Brz 存在下ではどちらも増加傾向を示したが、*GUS* mRNA 量が 2 日目から増加したのに対し、*DWF4* mRNA 量は 1 日目から増加した。また、その増加のレベルは *GUS* よりも *DWF4* の方が高かった。

次に、野生型シロイヌナズナのヘテロ核 RNA(hnRNA)の挙動を解析した(Figure 5)。hnRNA は mRNA 合成における一過的な中間体であるため、一般的に転写速度を反映すると考えられている(Yang and Kurkinen 1994)。これら 2 つの RNA を PCR により増幅するため、一つは hnRNA 検出用として *DWF4* 遺伝子の第 7 イントロンに、もう一つは mRNA 検出用として *DWF4* 遺伝子の第 7 エクソンと第 8 エクソンにまたがる領域に、それぞれ 2 つの異なるフォワードプライマーを設計した(Figure 5A)。一方、リバースプライマーは第 8 エクソン上に一つ設計し、両 RNA の検出に用いた。Figure 5B に示すように、0.1 μ M BL を投与すると、*DWF4* hnRNA と *DWF4* mRNA 量は 2 時間以内に急速に減少し、最小値に達した。そして少なくとも 24 時間後まではそのレベルを保っていた。一方、5 μ M Brz 投与により *DWF4* hnRNA は 1 日で最大値まで増加した後、その後の 4 日間で徐々に減少した。この挙動は、*DWF4* mRNA の蓄積パターンとよく似ていた。

続いて、*DWF4* 転写の BR 依存性と組織特異性を明らかにするため、*DWF4::GUS* 形質転換体を用いて GUS の活性を生化学的及び組織化学的に調査した。Figure 6A に示したように、実生全体の GUS 活性は Brz 処理によって約 1.5 倍に増加し、BL 処理によって無処理のレベルまで減少した。また、組織化学的に GUS 染色したところ、無処理の場合には茎頂、主根の伸長領域、側根の原基及び先端が青く染まった(Figure 6B)。Brz を処理したところ、茎頂と主根の伸長領域の GUS 染色が強くなった。一方、BL を処理すると、GUS 染色は無処理のレベルまで弱まった。しかし、どちらの場合においても、茎頂と主根の伸長領域以外の新しい器官や組織が染色されることはなかった。

3. 4 オーキシンによる *DWF4* 転写の根系特異的な誘導

DWF4 の転写様式をより詳細に解明するため、BR 以外の植物ホルモンの影響を調べた。BL を含む 8 種のホルモンを *DWF4::GUS* 形質転換体へ投与したところ、予想した通り BL は GUS 活性を半分程度まで減少させた(Figure 7A)。用いたホルモン類の中で IAA が唯一、GUS 活性を顕著に増加させた。その活性誘導は保温期間(1 日と 3 日)に関わらず 1 μ M よりも 10 μ M の方が高かった。また、IAA は GUS 活性を濃度及び時間依存的に誘導した(Figure 8)。残りの 6 種のホルモンはオーキシンのように大きな影響を与えることはなかったが、ジャスモン酸(JA)だけが調べた全ての条件下(保温期間; 1 日と 3 日、ホルモン濃度; 1 μ M と 10 μ M)で GUS 活性を減少させた(Figure 7A)。

IAA のみが融合遺伝子由来の GUS 活性を顕著に増加させたので、これ以降の

実験はオーキシシンに焦点を当て行った。まず IAA 以外の活性型オーキシシンとオーキシシン前駆体が *DWF4* 転写へ与える影響を調べた。活性型として IBA、NAA と 2,4-D を、前駆体として Trp と IAM を *DWF4::GUS* 形質転換体に投与して GUS 活性を測定したところ、用いた全ての活性型オーキシシンが酵素活性を上昇させた(Figure 7B)。また、GUS 活性の誘導効果は天然オーキシシンである IAA や IBA と比べて、合成オーキシシンである NAA や 2,4-D の方が高かった。一方、前駆体の影響については、IAA 合成経路の初期の基質である Trp は GUS 活性にほとんど影響を与えなかったが、最終反応の基質である IAM は活性をわずかに誘導した。しかし、その誘導には活性型オーキシシンの 10~100 倍高い濃度の IAM が必要であった。

続いて、組織化学的解析を行ったところ、IAA は根系全体の GUS 染色を強め、特に根端、伸長領域、側根原基を強く染めた(Figure 9)。IAA は、Brz の場合とは異なり(Figure 6B)、地上部の GUS 染色にほとんど影響を与えなかった(Figure 9)。また、IAA を投与したシロイヌナズナの実生では、オーキシシンによる典型的な形態変化、主根の肥大や側根数の増加などが観察された(Figure 9, Hayashi *et al.* 2008, Fukaki and Tasaka 2009)。さらに、根特異的な GUS 酵素活性の上昇は、定量的な生化学的解析によっても確認された(Figure 10)。

上述の通り、活性型オーキシシンが *DWF4* 転写を誘導したので(Figures 7~10)、続いて、この誘導現象にオーキシシンのシグナル伝達や極性輸送(PAT)が関与するか否かを調べた。IAA と共にアンチオーキシシン(PCIB、PEO-IAA、BH-IAA)、あるいは PAT 阻害剤(TIBA と NPA)を *DWF4::GUS* 形質転換体へ投与したところ、PEO-IAA と BH-IAA は、用いた濃度(10 μ M と 100 μ M)に関わらず IAA が誘導する GUS 活性を強

く抑制した(Figure 11A)。これら2つのアンチオーキシンは、SCF^{TIR1} オーキシン受容体を直接阻害することが示されている(Hayashi *et al.* 2008, Nishimura *et al.* 2009)。3つ目のアンチオーキシン PCIB は、100 μ M の場合には IAA による GUS 活性の上昇を完全に抑制したが、10 μ M ではわずかにしか抑制しなかった。一方、PAT 阻害剤に関しては、100 μ M TIBA は IAA による GUS 活性の上昇を完全に抑制したのに対し、100 μ M NPA はわずかにしか抑制しなかった。また、組織化学的解析を行ったところ、上記アンチオーキシン3種とPAT阻害剤1種(TIBA)のいずれかとIAAを同時投与した場合は、IAAの単独投与と比べて根系のGUS染色が著しく弱くなったが、地上部の染色に変化はなかった(Figure 11B)。

3.5 *DWF4* の転写調節におけるBRとオーキシンとの関係

これまでに述べてきた通り、*DWF4* 転写はオーキシンと Brz 投与によって誘導され、BL 投与によって抑制を受けた(Figures 4~10)。そこで、*DWF4* の転写制御に対してオーキシンとBRのどちらが優位に働くかを明らかにするため、*DWF4::GUS* 形質転換体に IAA と BL を同時投与した。Figure 12A に示すように、IAA による GUS 活性の誘導は 0.1 μ M BL によって強く抑制され、1 μ M BL により完全に抑えられた。また、組織化学的解析を行ったところ、BL と IAA を同時投与した形質転換体では、IAA 単独投与の場合と比べて根の GUS 染色が弱くなった(Figure 12B)。これらの結果は、*DWF4* 転写において、オーキシン(誘導)よりもBR(抑制)の方が優位性を持つことを示している。

続いて、*DWF4* の転写誘導におけるオーキシンと Brz の関係性を明らかにするた

め、*DWF4::GUS* 形質転換体に IAA と Brz を同時投与した。Figure 12A に示すように、IAA による GUS 活性の誘導は Brz によってさらに促進されたが、Brz の効果は相乗的というより相加的であった。また、組織化学的解析を行ったところ、Brz と IAA を同時投与した形質転換体では、IAA 単独投与の場合と比べて地上部における GUS 染色が強くなった(Figure 12B)。以上の結果から、IAA と Brz はそれぞれ独立に *DWF4* 転写を誘導することが示唆された。

3. 6 根の発生・成長における BR とオーキシンの関連性と *DWF4* 転写の役割

オーキシンは *DWF4::GUS* 融合遺伝子由来の GUS 活性を根特異的に誘導した (Figures 9, 10)。そこで、オーキシンによる *DWF4* 転写誘導の生理学的意義を明らかにするため、IAA と BR、BR 合成阻害剤 Brz が根の成長・発生に与える影響を調べた。7 日齢の野生型シロイヌナズナに 1nM と 10nM の IAA を与えると無処理と比較して側根が約 1.4 倍長くなったが、100nM IAA では伸長の促進効果は見られなかった (Figure 13A)。一方、Brz を与えると側根が無処理と比較して短くなった。また、低濃度の IAA による伸長促進も全く見られなくなった。しかし、その状態で BL を投与すると、Brz による側根の伸長抑制は打ち消され、IAA による促進効果も回復した。さらに、アンチオーキシン PEO-IAA 存在下で IAA 投与の影響を調べたところ、側根の伸長は観察されず、むしろ無処理の場合よりも短くなった (Figure 14)。また、その状態で BL を添加すると側根伸長は無処理と同等の長さまで回復した。続いて、*dwf4* 変異体の側根の長さを測定したところ、薬剤を投与しない場合でも野生型の側根の 1/5 程度の長さしか無く、Brz を投与した野生型と比べても短かった (Figure 13A)。また、*dwf4* 変異

体に IAA を与えても野生型で見られたような側根の伸長は見られなかった(Figure 13A)。この変異体に BL を与えると、側根は薬剤無処理の野生型と同程度の長さまで回復した。しかし、野生型の場合と異なり IAA による伸長促進効果は見られなかった。これらの結果は、オーキシンが BR を介して側根の伸長を制御することを示唆する。

次に、主根の伸長に対する IAA、BL 及び Brz の影響を調べた。野生型シロイヌナズナに IAA を投与したところ、側根の場合とは異なり、濃度依存的に主根の伸長速度が低下した(Figure 13B)。Brz を単独で与えると、主根の成長速度は半分以下に減速した。Brz と IAA を同時投与すると、伸長阻害はさらに促進した。しかし、その状態で BL を加えると、主根の成長速度は無処理の場合とほぼ同じレベルまで回復した。一方、*dwf4* 変異体での主根の伸長は、野生型と比較すると非常に遅かった。また、Brz 処理した野生型と比較した場合でも、やや遅い伸長速度を示した(Figure 13B)。IAA による主根の伸長阻害は、*dwf4* 変異体でも野生型と同じように見られた。さらに BL を添加すると、*dwf4* の主根の成長速度は無処理の野生型と同程度まで回復した。以上の結果から、主根の伸長に対して BR は正の効果、オーキシンは負の効果を持つことが明らかとなった。また、Brz を処理した野生型及び *dwf4* 変異体の両方において、IAA による主根の伸長阻害が見られたことから、オーキシンの添加と BR 欠乏による伸長阻害は独立に起こると考えられた。

続いて、側根形成に対する上記薬剤の影響を調べた。1nM や 10nM IAA は野生型シロイヌナズナの側根数にほとんど影響を与えなかったが、100nM の IAA は側根数を有意に増加させた(Figure 13C)。一方、Brz を単独で投与すると側根数の減少が見られたが、そこへ BL を投与すると Brz による側根数の減少は薬剤無処理のレベル

まで回復した。しかし、IAA 存在下では、Brz による側根数の減少も、BL による増加も見られなかった。次に *dwf4* 変異体の側根数を調べたところ、無処理の野生型の半分程度であった(Figure 13C)。そこへ BL を添加すると側根数はわずかに増加したが、野生型ほど顕著ではなかった。一方、*dwf4* 変異体に IAA を投与すると、Brz を投与した野生型の場合と同じように濃度依存的な側根数の増加が見られた。しかし、IAA と BL を同時投与した場合には、無処理の野生型、あるいは BL を投与した *dwf4* 変異体のように低濃度の IAA による増加効果は見られず、100nM の場合のみ顕著な増加が観察された。以上の結果から、オーキシンと BR は協調的に側根形成を誘導することが示唆された。また、IAA 存在下では Brz や BL の効果があまり見られなかったことから、オーキシンが強く側根形成を促すのに対し、BR は補助的に機能していると考えられた。

3. 7 オーキシンを処理した野生型シロイヌナズナにおける活性型 BR の定量

上述の通り、*DWF4* の転写はオーキシンによる根の伸長制御と強い関連性を持つことを明らかにした(Figures 9, 10, 13, 14)。そこで、オーキシンが実際に根中の BR 量を増加させているかどうかを調べるため、IAA を投与した野生型シロイヌナズナの実生に含まれる活性型 BR(CS と BL)を LC-ESI-MS/MS 法により定量した。その結果、IAA 処理に関わらず、実生の地上部では約 2ng/g DW の CS が検出され、その量は IAA 処理により影響を受けることはなかった(Table 4)。測定は独立に 2 回行ったが、両者の結果は同様の値を示した。IAA 投与の有無で地上部の CS 量が変わらなかったという結果は、*DWF4::GUS* 遺伝子に由来する地上部の GUS 活性が IAA の影響を

受けなかったことと一致する(Figure 9)。一方、根においては、最初の測定(600 個体を使用)では CS を検出することができなかった。しかし、サンプル数を倍に増やしてもう一度測定(1200 個体を使用)したところ、わずかに CS を検出することができた。根における CS 量は IAA 無処理区で <0.305 ng/g DW、IAA 処理区で <0.229 ng/g DW で、地上部と同様に IAA 処理による CS 量の増加は見られなかった。また、根の CS 量は、地上部の約 10 分の 1 程度と非常に少なかった(Table 4)。この比率は、土壌で 5 週間育てたシロイヌナズナを材料として得られた CS 量とほぼ一致する(Kim *et al.* 2006)。もう一つの活性型 BR、BL は測定した全てのサンプルで検出できなかった。また、IAA を投与したシロイヌナズナ実生では、JA 内生量が根では 1.1 倍程度のわずかな増加を示したのに対して、地上部では 1/2 から 1/3 程度まで減少した(Table 4)。さらに、対照として内生 IAA 量を測定したところ、IAA 処理した地上部と根の両方でわずかな増加が見られた(Table 4)。このことは、外から与えた IAA が植物体内へ吸収されたことを示している。

3. 8 パーティクルガン法による *DWF4::GUS* 融合遺伝子の一過的発現解析

遺伝子の転写様式の解析には、上述の安定的発現解析の他に一過的発現解析も有効である。そこで、pBI201 にクローニングした *DWF4::GUS* 融合遺伝子を用いて一過的発現解析系の構築を試みた。標的組織には、材料調製が容易な上、以前から同解析によく利用されてきたタバコ葉を用いた。遺伝子導入法としては、標的組織を選ばず操作が簡単なパーティクルガン法を採用した。また、条件検討で数多くの実験を繰り返す必要があることを考慮し、経済的な理由から DNA 担体には金粒子に

比べて安価なタングステン粒子を用いた。遺伝子発現効率は単位葉面積(cm^2)当たりの GUS スポット数を算出することで評価した。まず 1000bp の *DWF4* プロモーターを持つ融合遺伝子を導入したところ、遺伝子発現効率の平均値は 0.78 spot/cm^2 (3 回の実験で、それぞれ $0.3, 0.9, 1.1 \text{ spot/cm}^2$)程度と低い値であった。そこで、この原因が *DWF4* プロモーターにあると考え、発現が構成的な *35S* プロモーターと *GUS* の融合遺伝子(*35S::GUS*)を用いて実験を繰り返した。しかし、遺伝子発現効率の平均値は *DWF4::GUS* と同程度の 0.89 spot/cm^2 (3 回の実験でそれぞれ $0.7, 0.8, 1.2 \text{ spot/cm}^2$)であった。この値は、実験系を構築する際に参考にした Schenk ら(1998)の結果と比べて 60 分の 1 程度(平均値は 57.1 spot/cm^2)と非常に低かった。因みに、彼らの実験との大きな違いは、標的組織(彼らはトウモロコシ葉、本実験ではタバコ葉)と DNA 担体(彼らは金粒子、本実験ではタングステン粒子)の二点である。そこで、実験系をより至適化するため、遺伝子発現効率が低いという問題の解決を試みた。

3.9 タングステン粒子によるプラスミド DNA 分解を軽減する条件

標的組織のタバコ葉は *35S::GUS* 融合遺伝子を用いた一過的発現解析によく使われてきたため、上記のような問題を引き起こす要因としては、DNA 担体として用いたタングステン粒子が大きな要因であると推測した。このことに関する実験に先立ち過去の文献を検索したところ、タングステン粒子による DNA 切断に関する 3 つの論文を見つけた(Krysiak *et al.* 1999a, 1999b, Mazus *et al.* 2000)。これらの論文の中で、著者らはタングステン粒子が DNA の 1 本鎖切断(ニック形成)あるいは 2 本鎖切断(直鎖状化)の活性を持つことを報告している。そこで、本研究で一過的発現解析に用いた

タングステン粒子のDNA切断活性を検証することにした。この実験では、pBI221 プラスミドをモデル DNA として用いた。その理由は、発現解析を行う際に、構成的に発現する 35S::*GUS* 融合遺伝子の方が、発現様式が不明な *DWF4*::*GUS* 融合遺伝子よりも明確な結果を得られると考えたからである。

タングステン粒子と閉環状のプラスミド DNA(ccDNA)を水の中で混合し、25°C または 4°C で一定時間保温後、電気泳動を行った。臭化エチジウム染色によりゲル中の DNA 構造を観察したところ、25°C で保温した場合、プラスミド DNA は保温直後から消失していた(Figure 15A)。この結果は、タングステン粒子によって、プラスミド DNA がニック形成や直鎖状化にとどまらず完全に分解されたことを示している。一方、4°C で保温した場合は、タングステン粒子による DNA 分解は限定的で、保温開始から 8 時間後でも ccDNA が残っていた。続いて、25°C で保温した時の溶液の pH を測定したところ、タングステン粒子が無い場合には 6.0~6.3 に保たれていたのに対し、タングステン粒子存在下では短時間で 3.5 前後の酸性域まで低下していた(Figure 15B)。

予備的な実験から、TE(Tris-HCl+EDTA)緩衝液(pH8.0)がタングステン粒子による DNA 分解を抑制する効果が高いことが分かったため、様々な濃度の TE 緩衝液 [0.4T0.04E (0.04mM Tris-HCl+0.04mM EDTA), 10T1E (10mM Tris-HCl+1mM EDTA), 20T1E (20mM Tris-HCl+1mM EDTA), 50T1E (50mM Tris-HCl+1mM EDTA)]を用いて吸着反応を行った。Figure 16 に示す通り、0.4T0.04E、10T1E、あるいは 20T1E 存在下では、ほとんどのプラスミド DNA がタングステン粒子に吸着していた。一方、50T1E 存在下では、反応温度(25°C あるいは 4°C)に関わらず一部のプラス

ミド DNA しかタングステン粒子に吸着せず、半分以上がタングステン粒子を除いた後の反応液から回収された。続いて、タングステン粒子に吸着した DNA の構造を解析したところ、0.4T0.04E 存在下では吸着した ccDNA がほとんど開環状(oc)DNA へと変換していた(Figure 16)。一方、10T1E や 20T1E 存在下でも ocDNA への変換は見られたが、一部は ccDNA として残っていた。そのため、吸着 DNA に占める ccDNA/ocDNA の比率は、10T1E や 20T1E 存在下の方が 0.4T0.04E のときよりも高かった。また、4°C で吸着反応を行った場合の ccDNA/ocDNA 比は、0.4T0.04E と 10T1E 存在下では 25°C の場合よりも大きくなったが、20T1E 存在下では温度による違いはほとんど見られなかった。従って、現時点では 20T1E を用いた吸着反応が、タングステン粒子による DNA 分解抑制に最も効果的であると考えた。また、タングステン粒子とプラスミド DNA の吸着に対する pH の影響を明らかにするため、25°C で吸着を行った後の反応液の pH を測定した。その結果、0.4T0.04E、10T1E、20T1E を含む反応液の pH はそれぞれ 9.8、9.7、9.5 であったのに対して、DNA 吸着を阻害した 50T1E 溶液の pH は 8.6 まで低下していた(Figure 16)。

3. 10 タングステン粒子により作られる ocDNA が一過的遺伝子発現に与える影響

上述のように、20T1E はタングステン粒子へのプラスミド DNA の吸着に影響を与えることなく、有意に DNA の分解を抑制することが分かった(Figure 16)。また、その効果は反応温度の影響を受けなかった。しかし、20T1E 存在下においても吸着 DNA の一部は ocDNA へ変換していた。そこで、生じる ocDNA が一過的遺伝子発現に与える影響を調べた。まず、タングステン粒子の 10T1E 懸濁液と pBI221 の ccDNA を一

緒に保温(24 時間、25°C)することで ocDNA を調製した。続いて、pBI221 の ocDNA を化学的に不活性な金粒子に吸着させ、内部標準である p35S-sGFP の ccDNA と共にタバコ葉に導入した。Table 7 に示す通り、GFP のスポット数で補正後、pBI221 の ocDNA を導入して得られた GUS スポット数(spot number/cm²)を、ccDNA を導入して得られた GUS スポット数と比較したところ、両者にほとんど違いは見られなかった。さらに、化学的に不活性な金粒子に代え、ocDNA を再度タングステン粒子に吸着させ、一過的発現解析を行ってもほぼ同等の結果が得られた。また、このときに観察された GUS スポット数は Schenk ら(1998)が報告した結果よりも多かった。以上のように、タングステン粒子によって生じる ocDNA は *GUS* 遺伝子の一過的発現効率に大きな影響を与えなかった。また、DNA 担体として用いた金粒子とタングステン粒子の間で遺伝子発現効率に大差はなかった。従って、20T1E を使った新しい DNA 吸着法はタングステン粒子を用いた一過的発現解析に有効であると考えた。

4 考察

DWF4 遺伝子は BR 生合成の律速段階を担う酵素を暗号化しているだけでなく、BR 内生量の調節においても重要な機能を持つことが報告されている(Choe *et al.* 1998, Mathur *et al.* 1998)。当研究室では以前、BR 量の変動に応答してシロイヌナズナの *DWF4* 遺伝子の mRNA 量が大きく増減することを見つけた(Tanaka *et al.* 2005)。このことは *DWF4* のフィードバック発現が BR 内生量の恒常性維持に大きな役割を果たすことを示している。しかし、*DWF4* の発現応答が転写レベル、転写後レベル、あるいはその両方で達成されているかという点は未だ判然としない。そこで、本研究ではシロイヌナズナ *DWF4* 遺伝子の転写様式を詳しく解析した。その結果、BR 量が増加すると *DWF4* 転写が抑制され、逆に減少すると転写が誘導されることが明らかとなった(Figures 4~6)。このことは、*DWF4* のフィードバック発現が転写調節によって担われていることを示している。また、BR 量の減少に加えてオーキシンの投与が *DWF4* 転写を誘導することを見つけた(Figures 7, 8)。さらに、*DWF4* の転写誘導がオーキシンによる根の伸長制御に深く関与することも分かった(Figures 9, 10, 13, 14)。また、上記の *DWF4* に関する発見とは別に、一過的発現解析で直面したパーティクルガン遺伝子導入法の問題点を解明すると共に改善法を考案した(Figures 15, 16)。以下、これらの事柄について個別に考察する。

DWF4 遺伝子の発現は、活性型 BR である BL に依存して負に制御されることが知られている(Mathur *et al.* 1998)。また、*DWF4* の発現は、BR シグナル伝達経路の中で働く転写因子 BZR1 が BL 依存的に *DWF4* プロモーターに結合することにより抑制されることも分かっている(He *et al.* 2005)。本研究においても、BL は内生 *DWF4*

の hnRNA 量を減少させた(Figure 5)。mRNA の合成中間体である hnRNA の量は遺伝子の転写速度を反映していると考えられているので(Yang and Kurkinen 1994)、この結果は BL が *DWF4* の転写速度を低下させたことを示唆する。また、BL は *DWF4::GUS* 遺伝子由来の mRNA 量及び GUS 活性も同様に低下させた(Figures 4, 6)。これら結果は、過去の報告と合わせ、BL による *DWF4* 発現の抑制が主に転写レベルで調節されることを強く示唆する。一方、Brz による *DWF4* の発現誘導に関する研究はほとんど無く、わずかに数本の報告があるだけである(Tanaka *et al.* 2005, Kim *et al.* 2006, Vert *et al.* 2008)。これらの中で、Kim ら(2006)だけが Brz が *DWF4* 転写を誘導する証拠を示している。彼らは、*DWF4::GUS* 形質転換体を用いて Brz 処理が導入遺伝子由来の mRNA 量と GUS 活性の両方を増加させることを記述しているが、実験結果は定性的なもので動力的(キネティック)なデータは示されていない。本研究では、Brz が *DWF4::GUS* 遺伝子の mRNA 量(Figure 4)と内生 *DWF4* の hnRNA 量(Figure 5)を時間依存的に増加させること、また、GUS 活性(Figure 6)も同様に上昇させることを明らかにした。これらの結果は、前述した Kim ら(2006)の報告と共に、Brz による *DWF4* 発現の誘導にも転写調節が関わっていることを強く示唆するものである。さらに、Brz 処理による *GUS* mRNA 量の増加の程度は内生の *DWF4* の mRNA や hnRNA のそれと比べて弱いこと、そして増加の開始時期が遅れることが分かった(Figures 4, 5)。その内、Brz による *GUS* mRNA の増加量が少ないという点は Kim ら(2006)の報告と一致する。このことは、両研究室で使用した *DWF4::GUS* 融合遺伝子の構造が互いによく似ていること、すなわち、どちらの融合遺伝子も *DWF4* の 5' 上流域の後ろに *GUS* の構造遺伝子と *NOS* ターミネーター(*NOS-T*)を結合したもので、

pBI101 プラスミドをベースとして構築されていることに因るのかもしれない。それではなぜ、Brz による *GUS* mRNA 量の増加の程度が内生 *DWF4* の mRNA や hnRNA と比べて弱かったのだろうか？RNA ポリメラーゼ II による転写に必要な制御配列の大部分は遺伝子の 5' 上流域に存在するが、その配列はイントロンや 3' 下流域にも存在することが知られている(Masucci *et al.* 1990, Lamb *et al.* 1996, Bolduc and Hake 2009, Shibuya *et al.* 2009)。前述の通り、本研究で用いた *DWF4::GUS* 融合遺伝子は、*DWF4* 遺伝子の 5' 上流域のみを含んでいる。そのために *GUS* mRNA の弱い誘導が引き起こされたのかもしれない。しかし、Brz 処理による *DWF4* mRNA 量の増加に転写後調節が関与しているという可能性も排除できない。一方、Brz による *GUS* mRNA 量増加の立ち上がりが遅いことに関しては、Kim ら(2006)の報告とは異なる。本研究では Brz 処理 2 日目に *GUS* mRNA 量が増加したのに対し(Figure 4)、彼らの実験では Brz 処理 6 時間後に *GUS* mRNA 量の増加が見られた(Kim *et al.* 2006)。現時点ではこの違いが生じた原因は説明できないが、*DWF4* プロモーターの長さ(本研究は 1.7kb、彼らは 1.1kb)やシロイヌナズナ実生の年齢(本研究では 14 日齢、彼らは 7 日齢)などの実験条件の違いが影響したのかもしれない。以上をまとめると、本研究により得られた結果は、*DWF4* 転写が BR 内生量の恒常性維持のための分子機構の一部として機能することを強く示唆する。

現在、ホルモン間のクロストークは、植物ホルモン分野で最もホットな研究テーマの一つである。そこで、*DWF4* 転写に対する BR 以外の植物ホルモン 7 種の効果を調べたところ、オーキシシン(IAA)だけが *DWF4::GUS* 由来の *GUS* 活性を顕著に増加させた(Figure 7A)。また、IAA の誘導効果は濃度依存的かつ時間依存的であった

(Figure 8)。加えて、IAA 以外の活性型オーキシシン IBA、NAA、2,4-D も GUS 活性を有意に増加させた。しかし、Trp や IAM などの IAA 合成前駆体はほとんど誘導活性を持たなかった (Figure 7B)。これらの結果は、BR とオーキシシンが *DWF4* の転写を介してクロストークしていることを示唆する。続いて、3 種のアンチオーキシシン(PCIB、PEO-IAA、BH-IAA)の効果を調べたところ、IAA による GUS 活性の誘導が強く抑制されることが分かった(Figure 11)。このうち PEO-IAA と BH-IAA は、オーキシシン受容体である TIR1 に直接結合し、SCF^{TIR1} ユビキチンリガーゼ機能を阻害することが示されている(Hayashi *et al.* 2008, Nishimura *et al.* 2009)。従って、上記の結果は、*DWF4* 転写が SCF^{TIR1} 受容体を介したオーキシシンシグナル伝達の支配下にあることを強く示唆する。本研究とは独立に、最近 Chung ら(2011)はオーキシシンが *DWF4::GUS* 発現を誘導すること、そしてその誘導は *axr6-2*(CUL1)などのオーキシシン非感受性変異体の中で抑制されることを報告しているが、このことも本研究の結果と矛盾しない。

オーキシシンの極性輸送(PAT)は、植物器官におけるオーキシシンの不等分布を形成することで、様々な発生プロセスに影響を与えることが知られている(Michniewicz *et al.* 2007)。そこで、2 種の PAT 阻害剤(TIBA, NPA)が *DWF4* 転写に与える影響を調べたところ、TIBA は 100 μ M で IAA が誘導する *DWF4::GUS* 由来の GUS 活性を完全に抑制したが、100 μ M NPA の投与はほとんど効果を示さなかった(Figure 11)。今のところ上記の矛盾をもたらす原因は不明であるが、この違いを説明することができる理由の一つは、2 つの阻害剤の働きが異なるというものである。すなわち、TIBA はオーキシシン排出キャリアである PIN1 と流入キャリアである AUX1 の細胞内輸送を阻害することが知られている(Michniewicz *et al.* 2007)。一方、NPA はオーキシシン排出に

必須の AtPGP1 や AtPGP19 といった P 糖タンパク質を阻害すると考えられている。このことが、相異なる結果を引き起こしたのかも知れない。また別な理由として、TIBA が PAT 阻害活性以外の副次的な効果を発揮することで、IAA 誘導性の *DWF4* 転写を抑制した可能性も考えられる。実際、Oono ら(2003)は NAA が BA[AuxRD(オーキシン応答ドメイン)B plus A]プロモーターと *GUS* の融合遺伝子(BA::*GUS*)由来の *GUS* 活性をシロイヌナズナの根端で誘導すること、そして TIBA は 50 μ M で NAA による *GUS* 活性誘導を抑制するが、20 μ M ではほとんど影響を与えないことを報告している。また、この結果に基づき TIBA は比較的高濃度では、PAT 活性に加えてアンチオーキシン様の機能を発揮すると考察している。彼らの知見が正しいとするならば、本研究で観察された 100 μ M TIBA による *DWF4* 転写の抑制効果も、アンチオーキシンの活性によってもたらされたのかもしれない。いずれにしても、PAT と *DWF4* 転写の関係を解明するためには、さらなる実験が必要である。

植物の成長・発生過程で見られる様々な現象に対して、BR とオーキシンが協調的あるいは拮抗的に作用することが知られている(Nemhauser *et al.* 2004, Hardtke *et al.* 2007)。上述の通り、根における *DWF4* の転写はオーキシンにより強く誘導されることが明らかとなった(Figure 9)。また、オーキシンによる根特異的な *DWF4* 転写誘導は、生化学的な *GUS* 活性の測定によっても確かめた(Figure 10)。これらのことから、*DWF4* 転写、あるいはそこから推定される BR 内生量の増加は根で起こる現象に対して何らかの働きを持つと考えられた。そこで、IAA、BL、Brz が根の発生成長に与える影響を調べたところ、低濃度の IAA(1 nM と 10 nM)が側根の伸長を有意に促進することが分かった(Figure 13A)。また、Brz は単独で側根伸長を阻害すると共に、IAA の

伸長効果も抑制した。しかし、そこへ BL を投与すると Brz の阻害効果は打ち消された (Figure 13A)。また、*dwf4* 変異体を用いた実験でも同様の結果が得られた。さらに、IAA がもたらす側根伸長に対してアンチオーキシン PEO-IAA は阻害効果を持つこと、また、BL は PEO-IAA による阻害を部分的に回復させることも分かった (Figure 14)。以上の結果は、BR が IAA による側根の成長促進に対して正の効果を持つことを示唆する。Figure 9 に示す通り、IAA は *DWF4::GUS* 由来の GUS 活性を側根の伸長領域や原基で顕著に誘導した。BR は細胞伸長に関わる *TCH4*、*XTR6*、*XTH19* などの細胞壁構築酵素遺伝子の発現を誘導すること、そしてこれらの遺伝子は根でも発現することが知られている (Yin *et al.* 2002, Goda *et al.* 2002 and 2004, Kozuka *et al.* 2010)。本研究より得られた結果と過去の報告を合わせると、BR はオーキシンによる側根の伸長促進機構の一部として機能する可能性が考えられる。例えば、オーキシンは *DWF4* 転写誘導を介して側根での BR 内生量を増加させ、続いて、内生量が増加した BR によって細胞壁構築酵素遺伝子の発現が誘導されるため、側根伸長が促進されるという仮説も考え得る。

植物ホルモンの多くは、主根の伸長に対して促進的あるいは抑制的に働くことが知られている (Benková and Hejácíko 2009)。主根の成長を外から与えたオーキシンが阻害することは報告されているが (Müssig *et al.* 2003)、本研究でも外生 IAA が濃度依存的に主根の伸長を阻害することが示された (Figure 13B)。また、IAA による伸長阻害は Brz 投与あるいは *dwf4* 変異によって助長されたが、BL の添加により回復した。これらの結果は、側根の場合と同じように主根の伸長に対して BR が正の効果を持つことを示唆する。IAA が側根に加えて主根の伸長領域でも *DWF4* の転写を誘導した

ことから(Figure 9)、オーキシンが誘導すると予想される BR 量の増加も主根の伸長に対して正の効果を持つと考えられた。このことに関して、最近 Mouchel ら(2006) が大変興味深い報告をしている。彼らは、野生型と比べて主根長が短くなる *brx* 変異体(機能欠損型)の原因遺伝子がオーキシン誘導性の転写因子様タンパク質(BRX)を暗号化していることに加え、BR 生合成酵素遺伝子 *CPD* の発現制御を通じて BR 生合成を促進することを示した。彼らの結果は、主根成長を巡るオーキシンと BR のクロストークが BRX を介して起こること、また、本研究と同様に BR 量の増加が主根成長に正の効果をもつことを示している。彼らの論文中に *DWF4* に関する記述はないが、オーキシンによる *DWF4* の転写誘導に BRX が関与するかどうかを突き止めることは大変興味深い。

先の段落で述べた通り、オーキシンが *DWF4* の転写誘導を介して、主根の伸長域でも BR 生産を高めることが推測された。また、本研究の生理学実験の結果から、BR は側根に加え主根の伸長に対しても促進的な機能を持つと考えられた。それでは、なぜ IAA の投与は主根全体の伸長を阻害したのだろうか(Figure 13B)? Benková and Hejác̃ko(2009)は、総説中で主根の伸長は既知の主要植物ホルモン(BR、オーキシン、エチレン、ジベレリン、サイトカイニン、アブシジン酸)によって複雑に制御されていると記述している。例えば、オーキシンは、エチレンと生合成・シグナル伝達・標的遺伝子の発現など様々なレベルで相互作用し、結果として主根の成長を阻害することが示されている(Stepanova *et al.* 2007, Swarup *et al.* 2007)。最近、JA が主根伸長を阻害することに加え、*DWF4* 発現を抑制することが報告された(Ren *et al.* 2009)。外生の JA が *DWF4* 転写を抑制することは本研究においても確認された(Figure 7)。また、

IAA を投与したシロイヌナズナ実生では地上部において JA 内生量の大幅な減少が見られた(Table 4)。一方、根においては JA 内生量のわずかな増加が観察された。地上部での JA 内生量の減少と *DWF4* 転写の関係については解釈が付かないが、根で見られる JA 内生量の増加は、*DWF4* の転写抑制を介して BR 内生量を負に制御した結果なのかも知れない。以上のことを合わせると、オーキシンは BR の機能を介して主根伸長を正に制御する一方で、エチレンや JA などと共同して主根伸長を負に制御すると考えられた。また、*DWF4* 転写制御がオーキシンによる主根成長の統合点 (integration node) としての役割を担うと考えられた。すなわち、オーキシンは *DWF4* 転写を直接誘導する一方で、JA を介して間接的に *DWF4* 発現を抑制しているのかもしれない。

上述の通り、オーキシンが根における *DWF4* 転写を誘導すること、また、BR は根の伸長を促進することが明らかとなった(Figures 9, 10, 13, 14)。このことから、オーキシンは *DWF4* や *CPD* のような BR 生合成遺伝子の発現誘導を通して、根の BR 内生量を増加させると考えた。しかし、IAA 投与した根で活性型 BR (CS と BL) 量の増加は認められなかった(Table 4)。この結果をもたらした原因はいくつか考えられるが、最も合理的な説明の一つは、オーキシンによって増加した BR 量が自身のフィードバック調節機構を介して定常レベルまで急速に減少したというものである。実際、Choe ら (2001) は *DWF4* を強制発現させたシロイヌナズナ (*AOD4*) は野生型より大きく育つが、*AOD4* 強制発現体の中では CS や BL の量がほとんど増加しないこと、そして BR 不活化酵素遺伝子 *BASI* の発現が上昇することを報告している。これらの知見は、IAA によって合成された BR がフィードバック調節を受けて速やかに代謝されたという仮説

を支持する。また別の原因として、例えば、用いた方法では検出できないほどのわずかな BR 量の増加が IAA によってもたらされ、その結果として根の成長を促したということも考えられる。実際、BR やオーキシンに対する感受性は、根の方が地上部よりも高いことが知られている(Thimann and Sweeney 1937, Clouse *et al.* 1993)。しかし、上記以外の可能性も排除することはできない。Nakamura ら(2009)はオーキシンが誘導するイネ子葉鞘の屈曲に BR の合成中間体が関与することを報告している。加えて、最近の報告によれば、シロイヌナズナにおいてもオーキシンは DWF4 の直接の反応産物である 22-OH カンペステロールや 22-OH-5 α エルゴスタン-3-オンなどの BR 中間体の内生量を増加させるようである(Chung *et al.* 2011)。これらの 2 グループの結果は、オーキシンが BR 合成中間体を介して根の成長を制御している可能性を示している。しかし、本研究において、BR 合成の最終産物である BL が Brz と IAA を同時投与した際に見られた根の伸長阻害を回復させたという結果は(Figure 13)、BR 中間体が生理作用を示すという先の考えと矛盾する。オーキシンによる根の伸長制御に BR 合成中間体と活性型 BR のどちらかが直接関わるのかを証明するには、今後の研究を待たねばならない。

遺伝子の転写様式を解明する上で、一過的発現解析は、上述の安定的発現解析にはない長所を有する。そこで、本研究においてもタンゲステン粒子を坦体に用いたパーティクルガン法によりタバコ葉への *DWF4::GUS* 融合遺伝子(1000bp)の導入を試みた。しかし、GUS 活性持つ細胞(組織)はほとんど検出できなかった(“結果”3. 8 参照)。このような結果を引き起こした原因として、少なくとも二つの可能性を考えた。一つ目は、標的組織として用いたタバコ葉と *DWF4* プロモーターとの相性が悪いとい

うものである。シロイヌナズナ実生における *DWF4* の mRNA 量は、同じ BR 生合成遺伝子である *CPD* と比べて非常に少なかったので(Tanaka *et al.* 2005)、子葉や本葉で発現する *CPD* とは異なり(Mathur *et al.* 1998)、葉(葉身)では *DWF4* がほとんど発現しないことが考えられた。実際、本研究で行った *DWF4::GUS* 形質転換体を用いた解析結果(Figure 9)もこの考えを支持する(後述)。また、異なる植物種であるタバコの細胞でシロイヌナズナ由来の *DWF4* がうまく発現しないということも、可能性は低いながらも完全に拭い去ることはできない。もう一つの可能性は、DNA 導入がうまくいかなかったというものである。そう考えた理由は、構成的な発現を示す *35S::GUS* を導入した場合でも *DWF4::GUS* と同程度の酵素活性しか示さなかったからである(“結果”3. 8 参照)。

Buchowicz のグループは、タングステン粒子に関する興味深い論文を発表している。彼らの報告によれば、タングステン粒子とプラスミド DNA を一緒に保温するとニック形成や直鎖状化などプラスミド DNA の切断(部分分解)が観察される(Krysiak *et al.* 1999a, 1999b, Mazuś *et al.* 2000)。このことから、本研究でもタングステン粒子がプラスミド DNA を切断し、そのため一過的発現解析が上手く行かなかったと考えた。そこで、本研究で用いたタングステン粒子の懸濁水の中で pBI221 DNA を保温したところ、プラスミド DNA はニック形成や直鎖状化を受けるのみならず、完全分解を受けることが分かった(Figure 15)。詳細は割愛するが、タングステン粒子による DNA 分解の化学的性質をさらに調べたところ、pH、温度、塩濃度に影響を受け、中でも高アルカリ条件下で強く抑制されることが分かった(データ未発表)。そこで、アルカリ pH を維持する塩溶液である TE 緩衝液(pH 8.0)を用いて、タングステン粒子とプラスミド DNA

の吸着反応の改良を試みた。その結果、20T1E が溶液中の DNA だけでなく粒子に吸着した DNA の分解を最も効果的に抑制することが分かった(Figure 16)。しかし、タングステン粒子による DNA 分解を抑制する 20T1E を使っても、ccDNA から ocDNA への完全な変換は止めることができなかった。これまで、ocDNA が一過的遺伝子発現に与える影響については、微生物や動物細胞を標的として用いた報告はあるが(Xie *et al.* 1992, Cherng *et al.* 1999, Remaut *et al.* 2006)、植物細胞を用いたものはほとんどない。私が調べた限りでは、Ballas ら(1988)の論文が唯一のものである。また、これらの研究で導かれた結論も様々である。そこで、タングステン粒子により作り出される ocDNA を化学的に不活性な金粒子に吸着させ、タバコ葉を標的とした一過的発現解析に供試した。その結果、ocDNA は ccDNA と同等の遺伝子発現効率を示すことが分かった(Table 7)。また、20T1E を使った新しい方法を使えば、金粒子に代えタングステン粒子を用いても遜色ない結果が得られることも分かった。以上のことを合わせると、20T1E を添加した新しい DNA 吸着法の開発により、研究当初に直面したタングステン粒子を用いたパーティクルガン法の問題点を大幅に改善できると考えられる。本研究で考案した方法は、高価な金粒子に代えてタングステン粒子の利用を可能にするもので、予算が限られている場合や多検体を使った解析を行う場合などに特に有効であると考えられる。

一過的発現解析で生じた問題の解決とは別に行っていた安定的発現解析の結果から、*DWF4* の発現は茎頂、花茎、根端などの分裂が活発な細胞に限定されることが分かった(Figure 9)。また、葉においては排水組織のみで観察され、葉肉細胞ではほとんど発現していなかった。これらのことから、当初予想した通り、タバコの葉は

DWF4 の一過的発現解析に適していないと考えられた。そのため、タバコ葉を用いることは中断した。しかし、一過的発現解析はシス配列の特定やトランス因子の探索に大変有効な方法である。そこで、タバコ葉に代えて *DWF4* 遺伝子の発現が見られるシロイヌナズナの組織(茎頂、花茎、根端)を直接標的にする、あるいは、常に分裂増殖を繰り返している T87 などのシロイヌナズナ培養細胞を標的として使用することを考えている。今後、上記の組織や培養細胞を改良パーティクルガン法に供試すること、また、アグロインフェクション法により作成済みの *DWF4::intronGUS* 融合遺伝子シリーズを T87 細胞に導入することなどを計画している。

植物ホルモンに関する遺伝子は、古くから作物育種に利用されてきた。例えば、ソラマメの“倫玲”や大麦の“渦”は長い間、優良品種として利用されてきたが、最近、それらの原因が BR の生合成(*DWF1* オーソログ)やシグナル(*BRI1* オーソログ)に関わる遺伝子の変異であることが判明した(Fukuta *et al.* 2004, Rikiishi *et al.* 2008)。これらの知見は、BR 関連遺伝子が作物育種の重要な標的になり得ることを示している。これまで、*DWF4* 遺伝子を標的とした作物育種の報告はないが、実験レベルでは *DWF4* を強制発現させるとシロイヌナズナやタバコの成長が促進されることが報告されている(Choe *et al.* 2001)。反対に、二つあるイネの *DWF4* オーソログの一方に変異をもつ植物体(*Osdwarf4-1*)は茎葉の立ち性が増し密植が可能となるため、単位面積当たりの収量が増加するとの報告もある(Sakamoto *et al.* 2006)。上記の報告は、*DWF4* 遺伝子が育種の標的になり得ることを示している。しかし、同じ遺伝子を強制発現させても、機能欠損させてもバイオマスや収量の増加につながるということについての科学的解釈は未だ為されていない。従って、*DWF4* 遺伝子を効果的に育種に

利用するためには、DWF4 の機能をより詳細に知ることが重要だと考えられる。私は、本研究を通じて *DWF4* がシロイヌナズナの若くて成長が盛んな細胞で発現していること、また、オーキシンの支配の下、根の発生成長に関与することなどを明らかにすることができた。今後 *DWF4* 遺伝子を作物育種に有効に利用するため、研究をさらに発展させ、*DWF4* 転写調節が BR 恒常性やオーキシンとのクロストークの中で果たす役割など基礎的知見を分子生物学的な観点から明らかにしていきたい。本研究から得られた成果やさらなる研究結果の蓄積が、将来、植物の形態デザインや収量増加、ストレス耐性の向上を目指した作物育種につながることを期待している。

5 图表

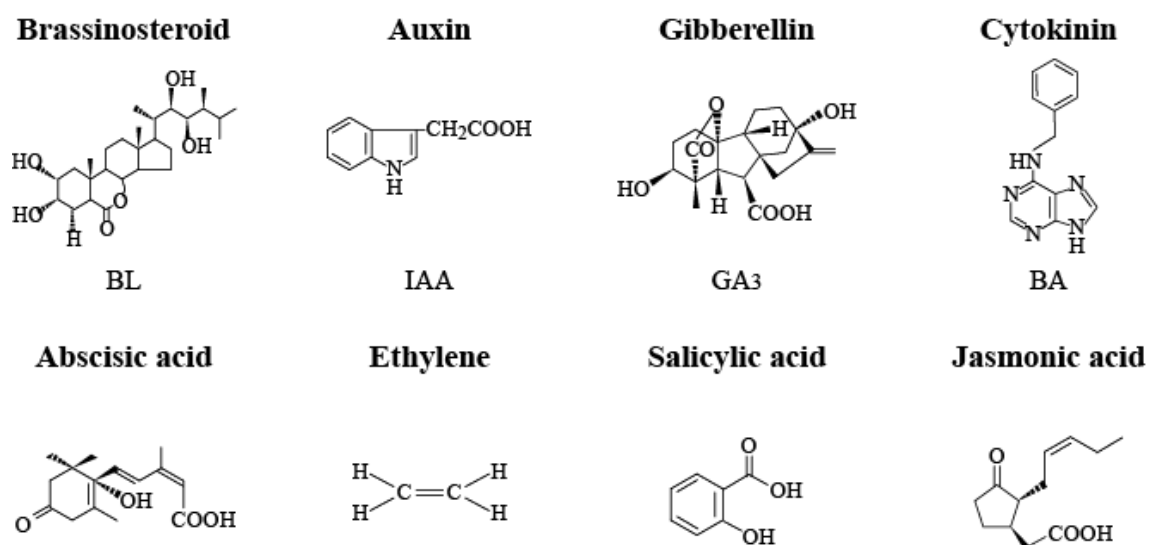


Figure 1. Chemical structural formula and names of eight major plant hormones.

In case of four hormones at the upper row, representative compounds in each group are shown with abbreviated names; BL, brassinolide; IAA, indole-3-acetic acid; GA₃, gibberellic acid 3; BA, benzyl adenine.

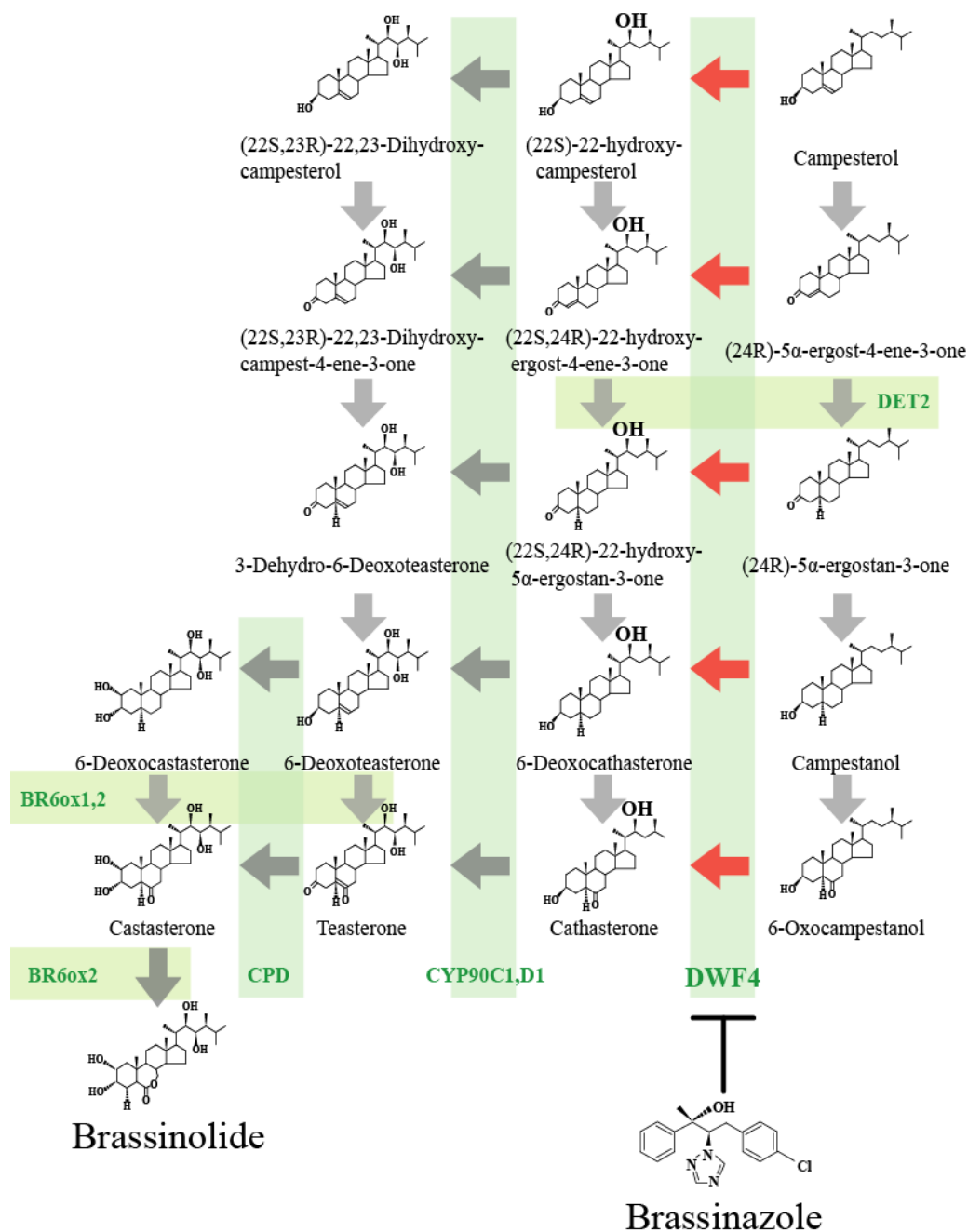


Figure 2. BR biosynthesis pathway in *Arabidopsis*.

A simplified pathway of BR biosynthesis is shown with several important enzymes (green letters). The most bioactive BRs, castasterone and brassinolide are synthesized through multiple reactions from campesterol as a starting material. *Arabidopsis* DWF4 enzyme is a C-22 hydroxylase that catalyzes multiple key regulatory steps (red arrows). BR biosynthesis inhibitor, brassinazole directly binds and inhibits the DWF4 enzyme. DET2, DE-ETIOLATED 2; DWF4, DWARF4; CPD, CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM; BR6ox1, 2, BRASSINOSTEROID-6-OXIDASE 1, 2.

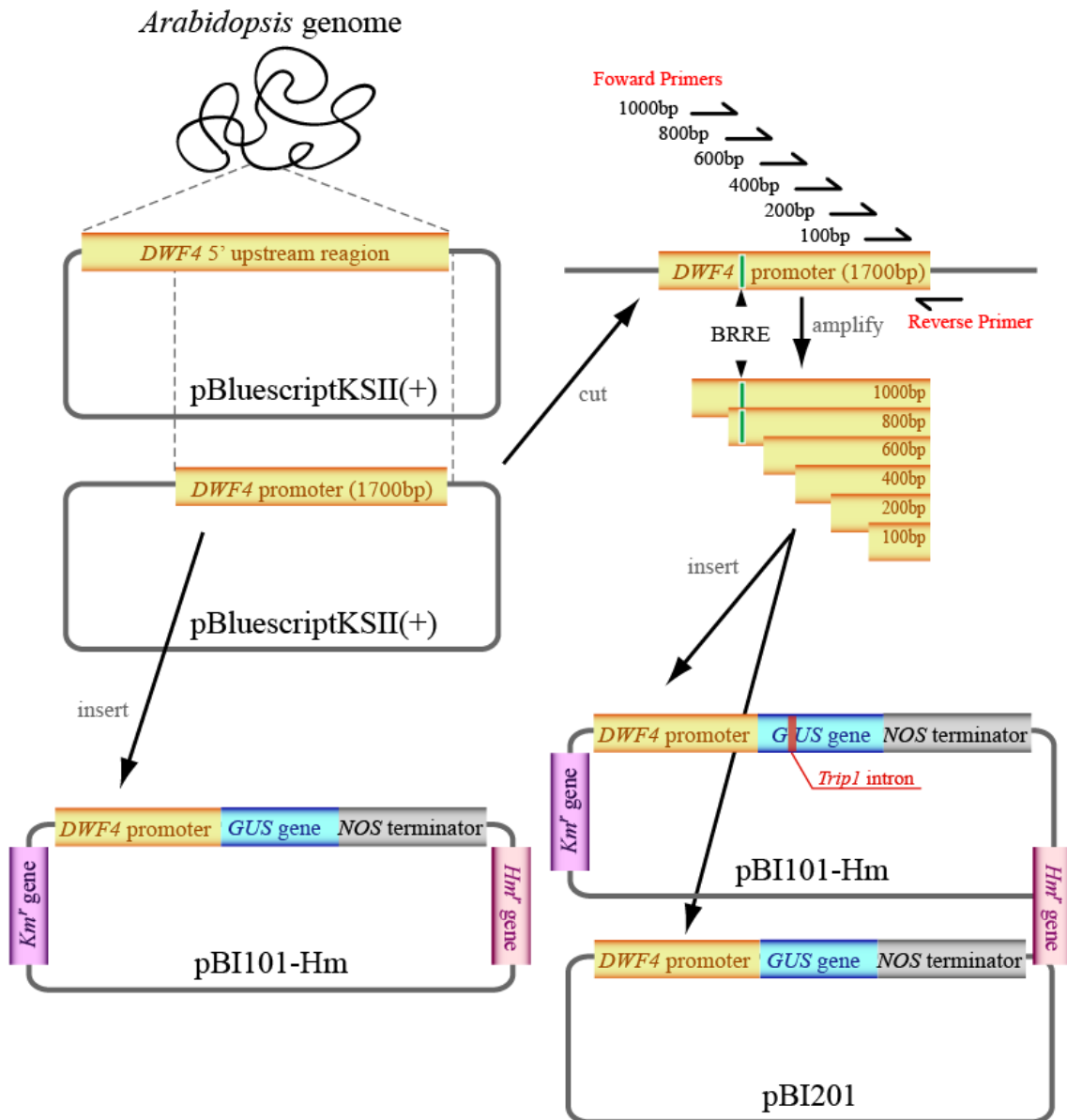


Figure 3. Schematic illustration for the construction process of *DWF4::GUS* chimeric genes.

To examine transcription activity, a 1.7-kb 5'-upstream sequence of *DWF4* gene was isolated from the genome DNA of *Arabidopsis* and then fused to a promoterless *GUS* gene in pBI101-Hm vector. For the deletion analysis, a series of KOD-PCR fragments containing *DWF4* promoter in different size (1000, 800, 600, 400, 200, 100bp) were fused to the *GUS* gene in pBI201 or the *GUS* gene engineered by inserting the second intron of *Arabidopsis Trip1* gene (red bar) into its coding region in pBI101-Hm. The details of construction procedure are described in "Materials and Methods" (2.2) and also in "Results" (3.1-3.2). Primer sequences used to amplify the KOD-PCR fragments were listed in Table 1. Green bars (1700, 1000, 800bp) indicate the positions of BR responsive element (BRRE) in *DWF4* promoter. Km^r; kanamycin resistant, Hm^r; hygromycin resistant.

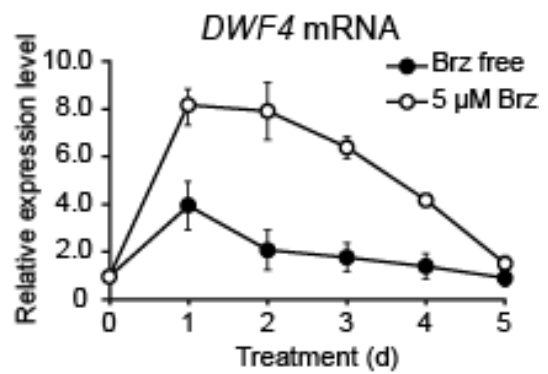
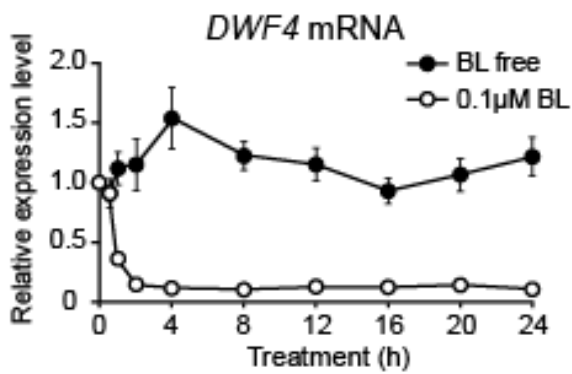
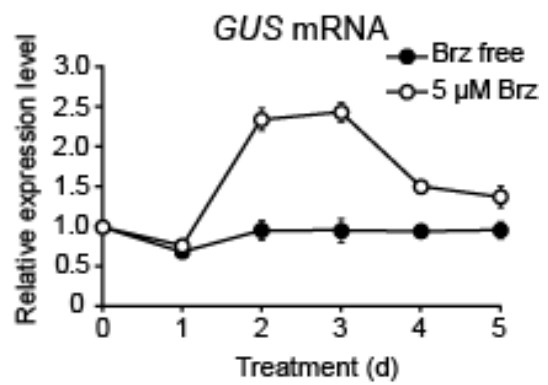
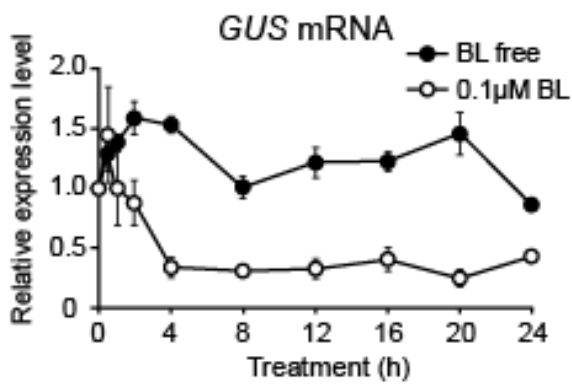


Figure 4. Fluctuations in *DWF4::GUS* and native *DWF4* mRNA levels dependent on BR levels in transgenic *Arabidopsis*.

Semi-qRT-PCR was performed to examine the expression of *DWF4::GUS* and native *DWF4* in response to exogenously applied Brz or BL. The culture conditions were the same as those described in “Materials and Methods” (2.5). The relative fluorescence value is shown in graphs comparing the initial period after normalization with that of the *ACT2* used as an internal control. Each experiment was conducted in biologically triplicate, and the means \pm SE were calculated.

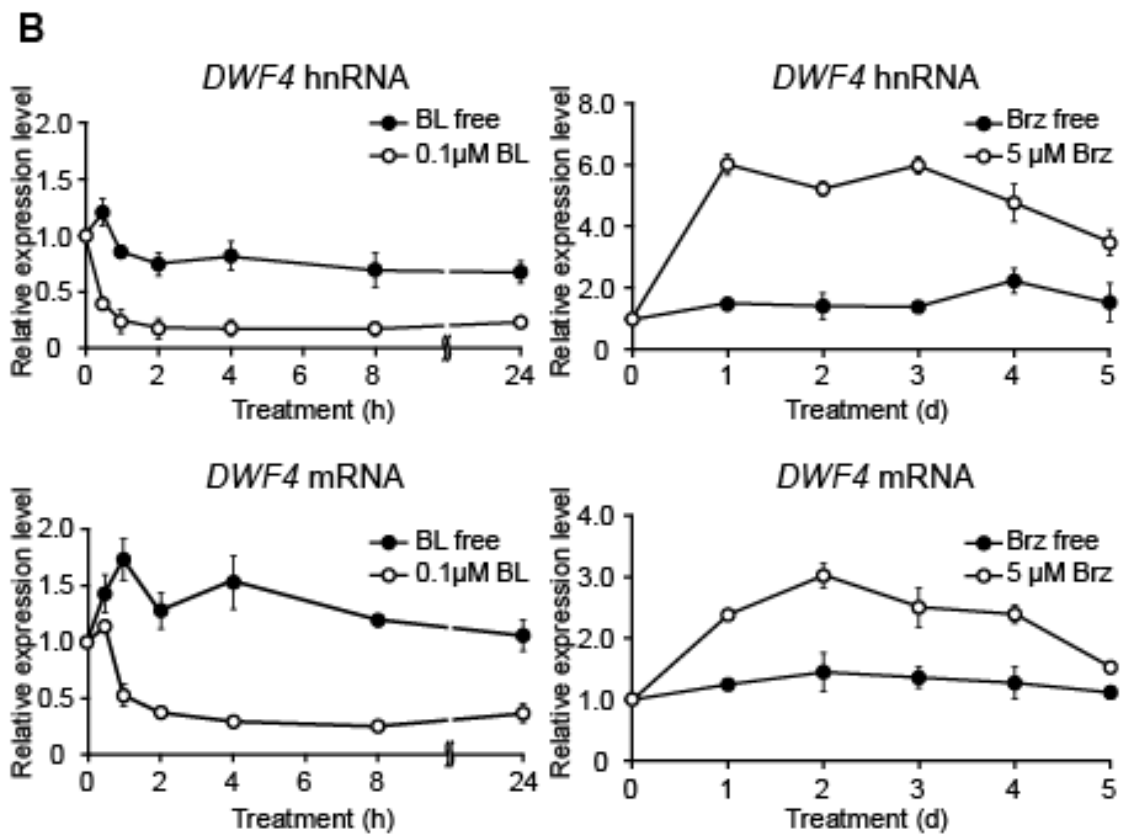
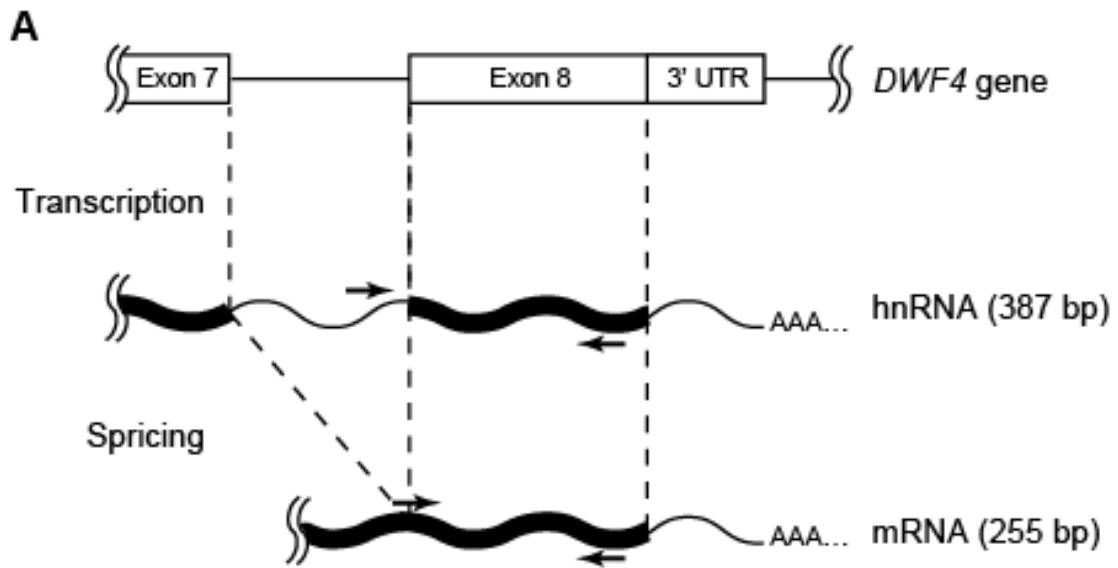


Figure 5. Fluctuations in *DWF4* hnRNA and *DWF4* mRNA levels dependent on BR content in wild-type *Arabidopsis*.

Using semi-qRT-PCR, *DWF4* hnRNA and mRNA levels were measured to evaluate the effects of Brz and BL on *DWF4* transcription. To detect both RNA species, we designed two types of primer (arrow) sets, shown in a schematic diagram of gene expression (A). The lengths (bp) of the PCR products derived from both RNAs are shown in parentheses. Fourteen-day-old wild-type *Arabidopsis* plants were cultured in liquid MS medium containing 5 μ M Brz for the indicated number of days to evaluate the effect of Brz, whereas the seedlings were incubated in the same medium containing 5 μ M Brz for 2 days and then cultured in the presence of 0.1 μ M BL for the indicated number of hours to evaluate the effect of BL (B). The fluorescence intensity of ethidium bromide of each PCR product band was scanned with a fluoro-image analyzer (FLA 2000; Fujifilm, Japan) after electrophoresis. The relative fluorescence values are shown in graphs comparing the initial period after normalization with that of *ACT2*, which was used as an internal control. Each experiment was conducted in biologically triplicate, and the means \pm SE were calculated.

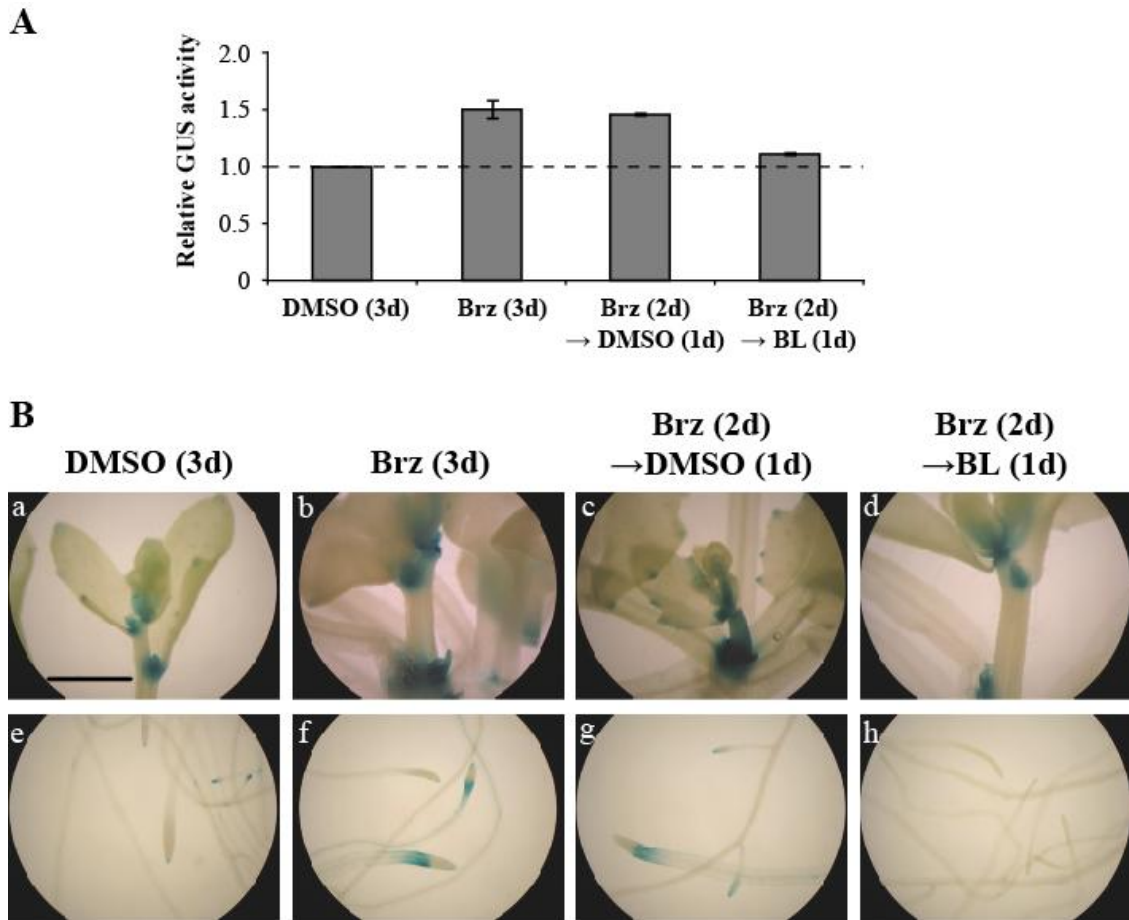


Figure 6. The changes in *DWF4::GUS* activity and staining dependent on BR content.

GUS activity was analyzed biochemically (A) and histochemically (B) to examine the effects of Brz and BL on *DWF4* transcription. Brz (5 μ M) was applied to 14-day-old *DWF4::GUS* transgenic seedlings and then the seedlings were cultured for 3 days in liquid MS medium to evaluate the effect of Brz, whereas Brz (for 2 days) and BL (0.1 μ M; for 1 day) were sequentially applied to evaluate the effect of BL. The graphs show representative results among three independent experiments. GUS assays in each experiment were conducted in triplicate, and the means \pm SD were calculated. GUS activity is shown as a value relative to that of the untreated control. The photographs represent the shoots (a-d) and roots (e-h) of transgenic *Arabidopsis*. The magnification is the same in all photographs, and a bar indicates 1.0 mm (a).

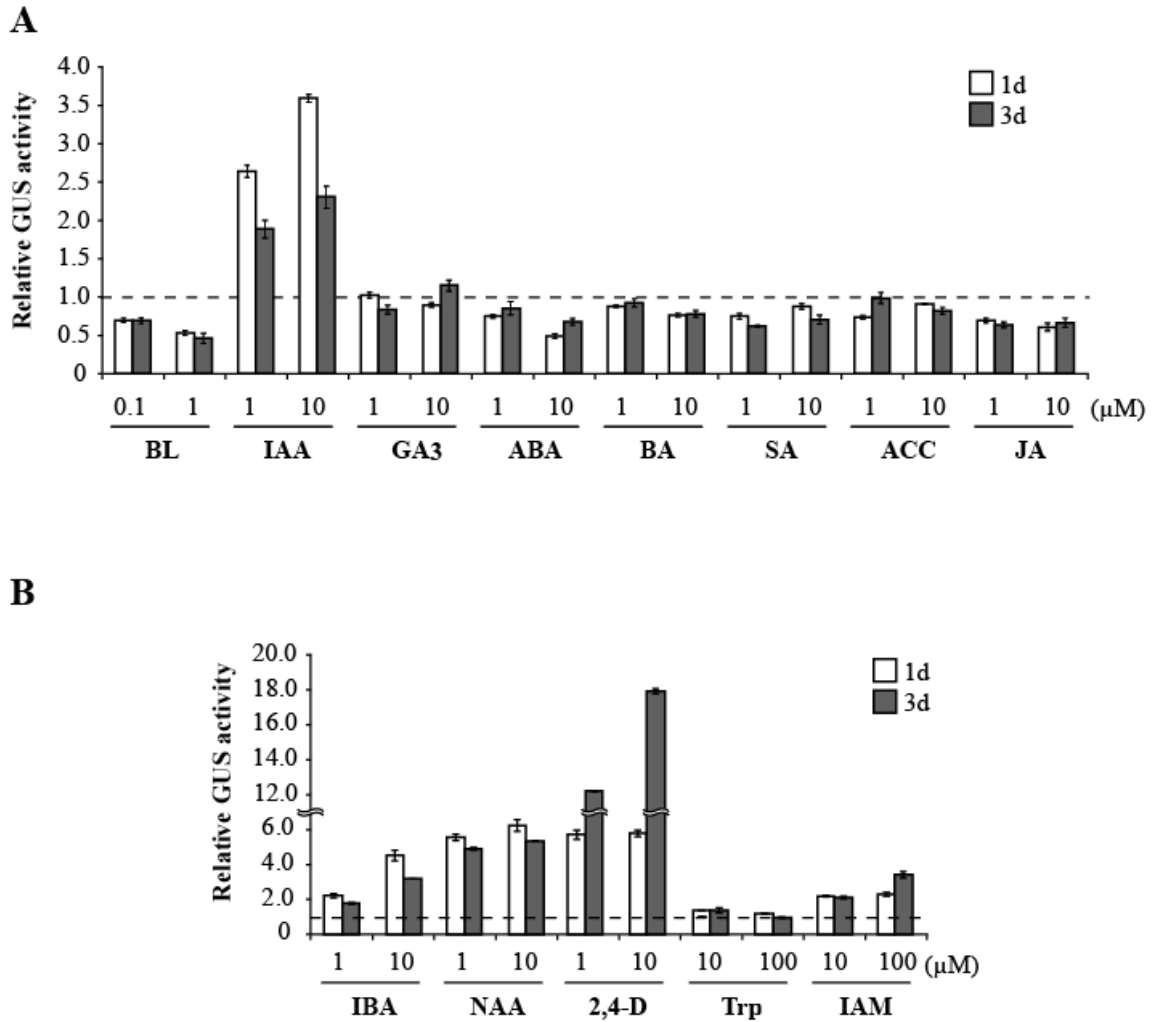


Figure 7. The induction of DWF4::GUS activity by bioactive auxins.

Fourteen-day-old *DWF4::GUS* transgenic plants were incubated in liquid MS medium containing one of either eight different plant hormones (A), three bioactive auxins or their precursors (B) for 1 or 3 days. GUS activity was measured biochemically. In the graphs, the GUS activity (the mean \pm SD) of a representative result among three biological replicates is shown as a value relative to that of the untreated control. BL, brassinolide; IAA, indole-3-acetic acid; GA₃, gibberellic acid 3; ABA, abscisic acid; BA, benzyl adenine; SA, salicylic acid; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; JA, jasmonic acid; IBA, indole-3-butylic acid; NAA, α -naphthylacetic acid; 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; Trp, L-tryptophan; IAM, indole-3-acetamide.

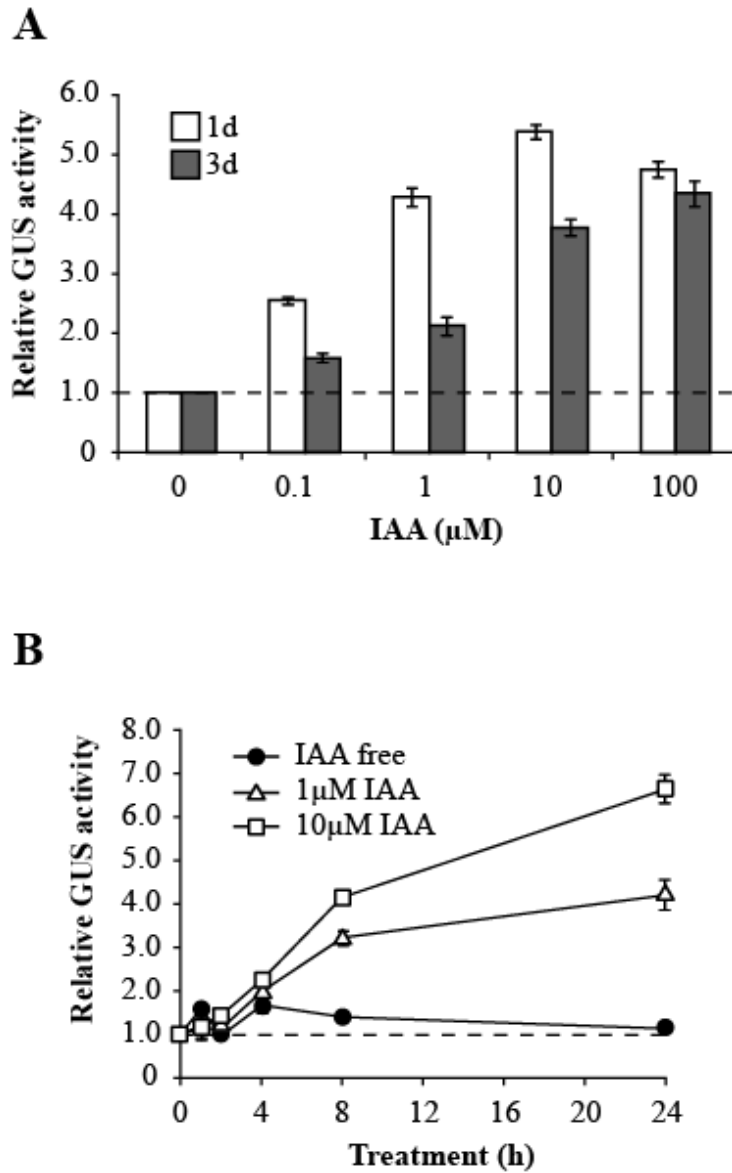


Figure 8. Dose- and time-dependent effects of IAA on DWF4::GUS activity.

The *DWF4::GUS* transgenic plants (14 days old) were incubated in liquid MS medium containing various concentrations of IAA for the indicated periods. Then, GUS activity was measured biochemically. The GUS activity is shown as a value relative to the activity of untreated plants (A) and at the initial period (B).

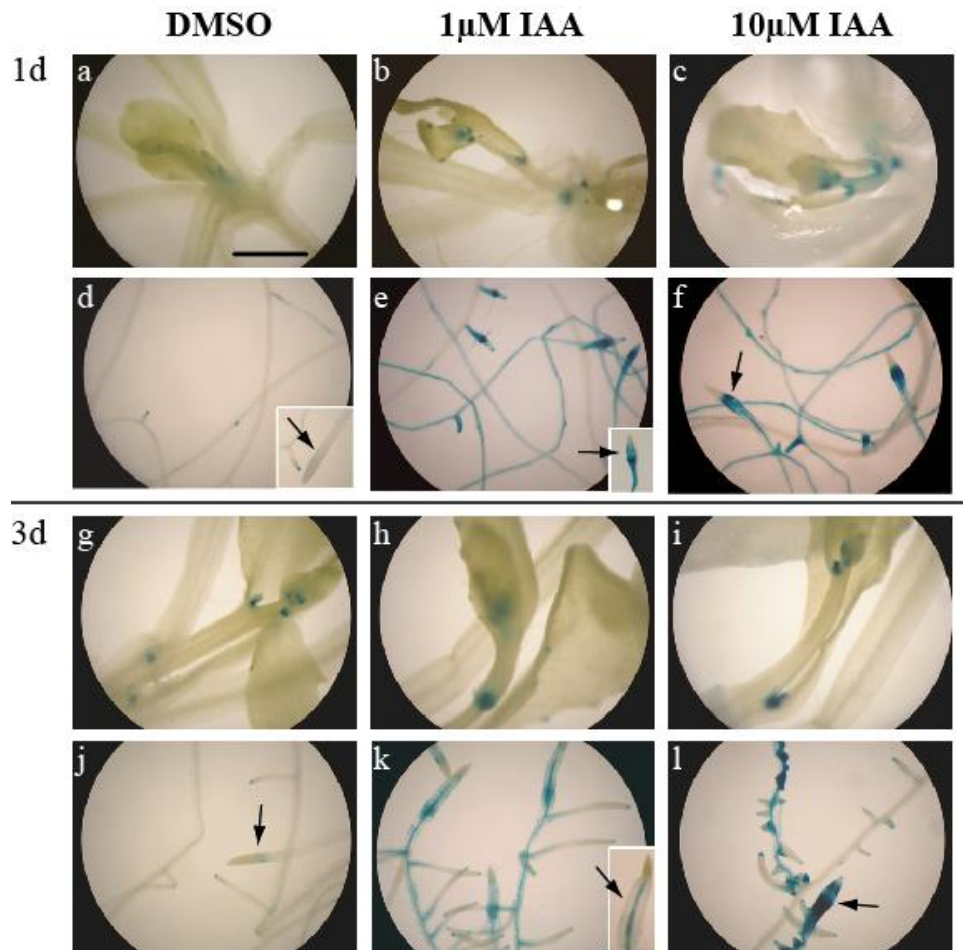


Figure 9. The root-specific induction of DWF4::GUS activity by IAA.

DWF4::GUS transgenic plants (14 days old) were incubated in liquid MS medium containing various concentrations of IAA for the indicated periods. Then, GUS activity was examined histochemically. The photographs represent the shoots (a-c, g-i) and roots (d-f, j-l) of transgenic *Arabidopsis*. The arrows indicate primary root tips (d-f, j-l). Primary root tips are shown in insets when they are absent in the main frames of photographs (d, e, k). The magnification is the same in all photographs, and the bar indicates 1.0 mm (a).

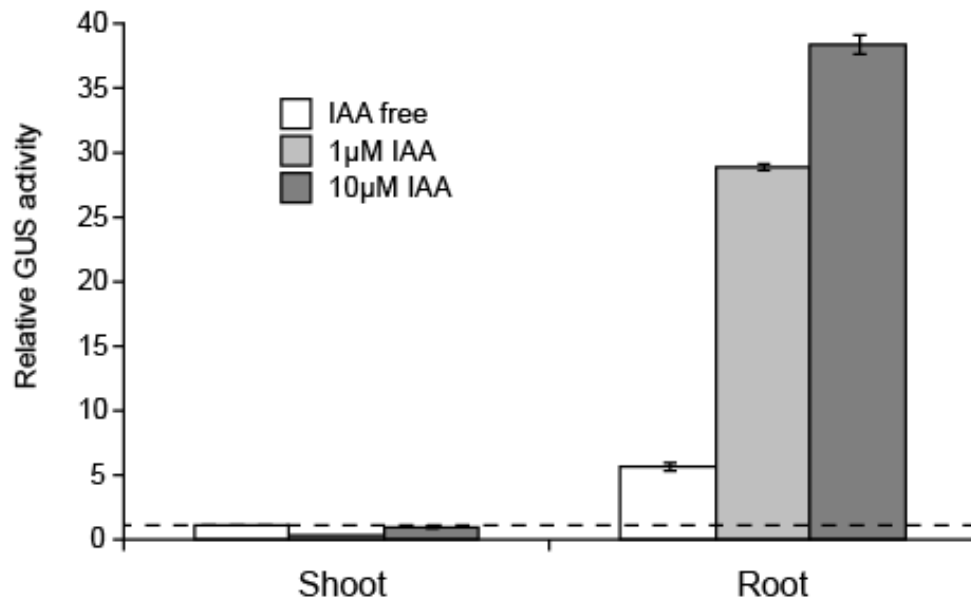


Figure 10. The *DWF4::GUS* activity in shoots and roots of IAA-treated seedlings.

Fourteen-day-old *DWF4::GUS* transgenic plants were incubated in liquid MS medium containing IAA. After 1 day of incubation, the seedlings were dissected at the shoot-root junction. GUS activities in the separated shoots and roots were measured biochemically. The GUS activity is shown as a value relative to the activity of untreated shoot.

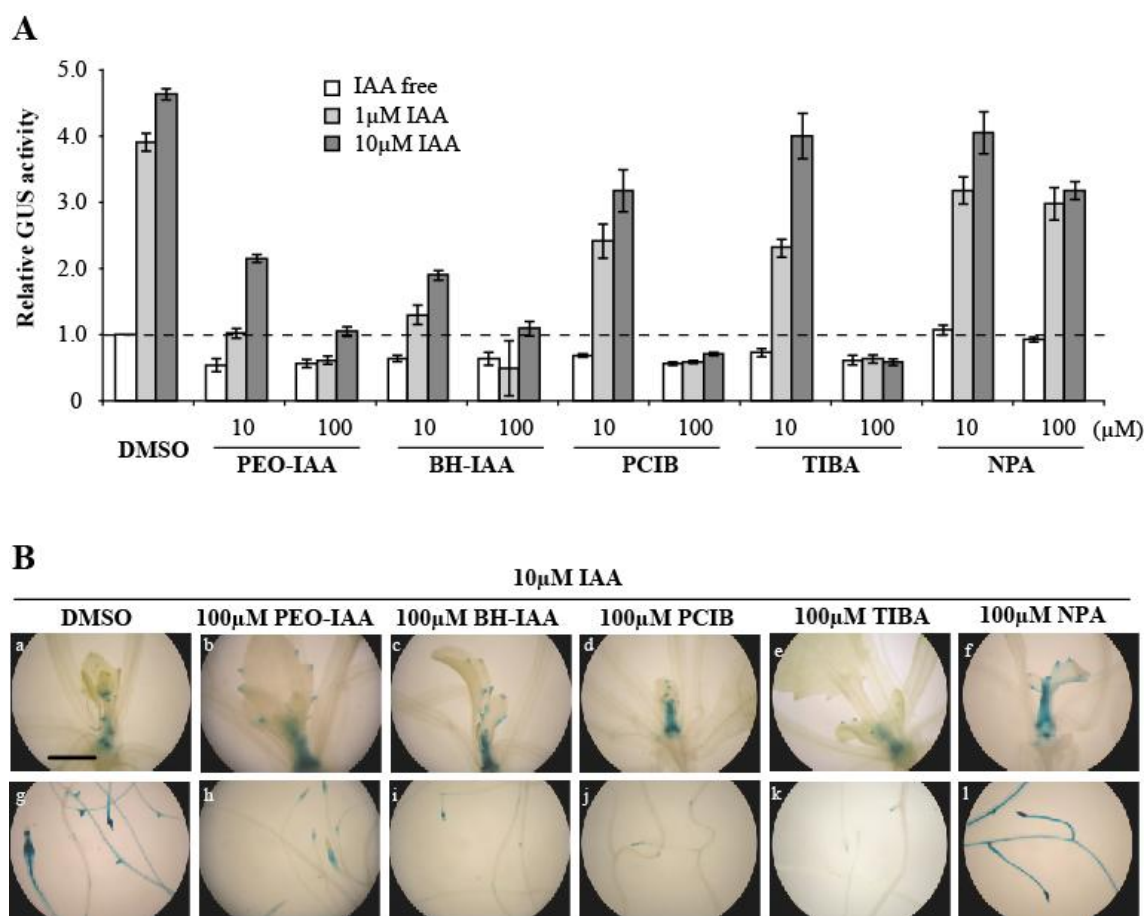


Figure 11. The inhibitory effects of three anti-auxins and the PAT inhibitor TIBA on IAA-induced *DWF4::GUS* activity.

Fourteen-day-old *DWF4::GUS* transgenic seedlings were cultured for 1 day in liquid MS medium containing IAA and one of either three anti-auxins (PEO-IAA, BH-IAA or PCIB) or two PAT inhibitors (TIBA or NPA) at the indicated doses. GUS activity was analyzed biochemically (A) and histochemically (B). In the graphs, the GUS activity (the mean \pm SD) of a representative result among three independent measurements is shown as a value relative to that of the untreated control. The photographs represent the shoots (a-f) and roots (g-l) of transgenic *Arabidopsis*. The magnification is same in all the photographs, and the bar indicates 1.0 mm (a). PEO-IAA, α -(phenylethyl-2-one)-IAA; BH-IAA, α -*tert*-butoxycarbonylaminohexyl-IAA; PCIB, 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid; TIBA, 2,3,5-triodobenzoic acid; NPA, *N*-1-naphthylphthalamic acid.

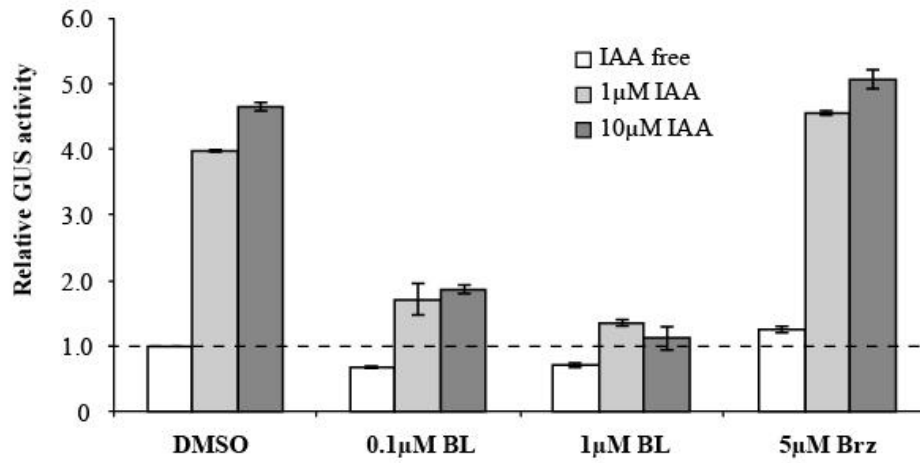
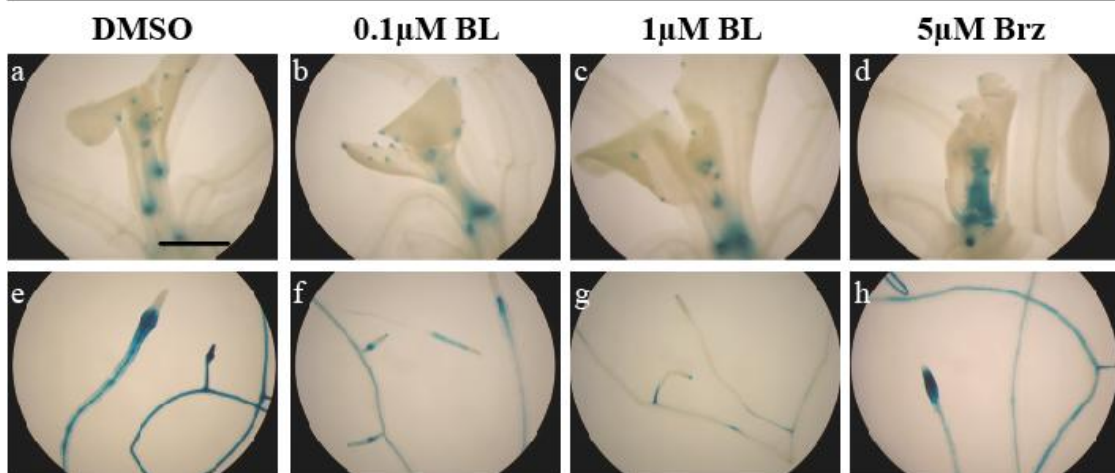
A**B****10 μM IAA**

Figure 12. The relationship between IAA and either BL or Brz regarding DWF4::GUS activity.

IAA was applied concurrently with either Brz or BL to 14-day-old *DWF4::GUS* transgenic seedlings at the indicated concentrations and then the seedlings were cultured for 1 day in liquid MS medium. GUS activity was analyzed in triplicate, biochemically (A) and histochemically (B). In the graphs, the GUS activity (the mean \pm SD) of the representative result is shown as a value relative to that of the untreated control. The photographs represent the shoots (a-d) and roots (e-h) of transgenic *Arabidopsis*. The magnification is the same in all photographs, and the bar indicates 1.0 mm (a).

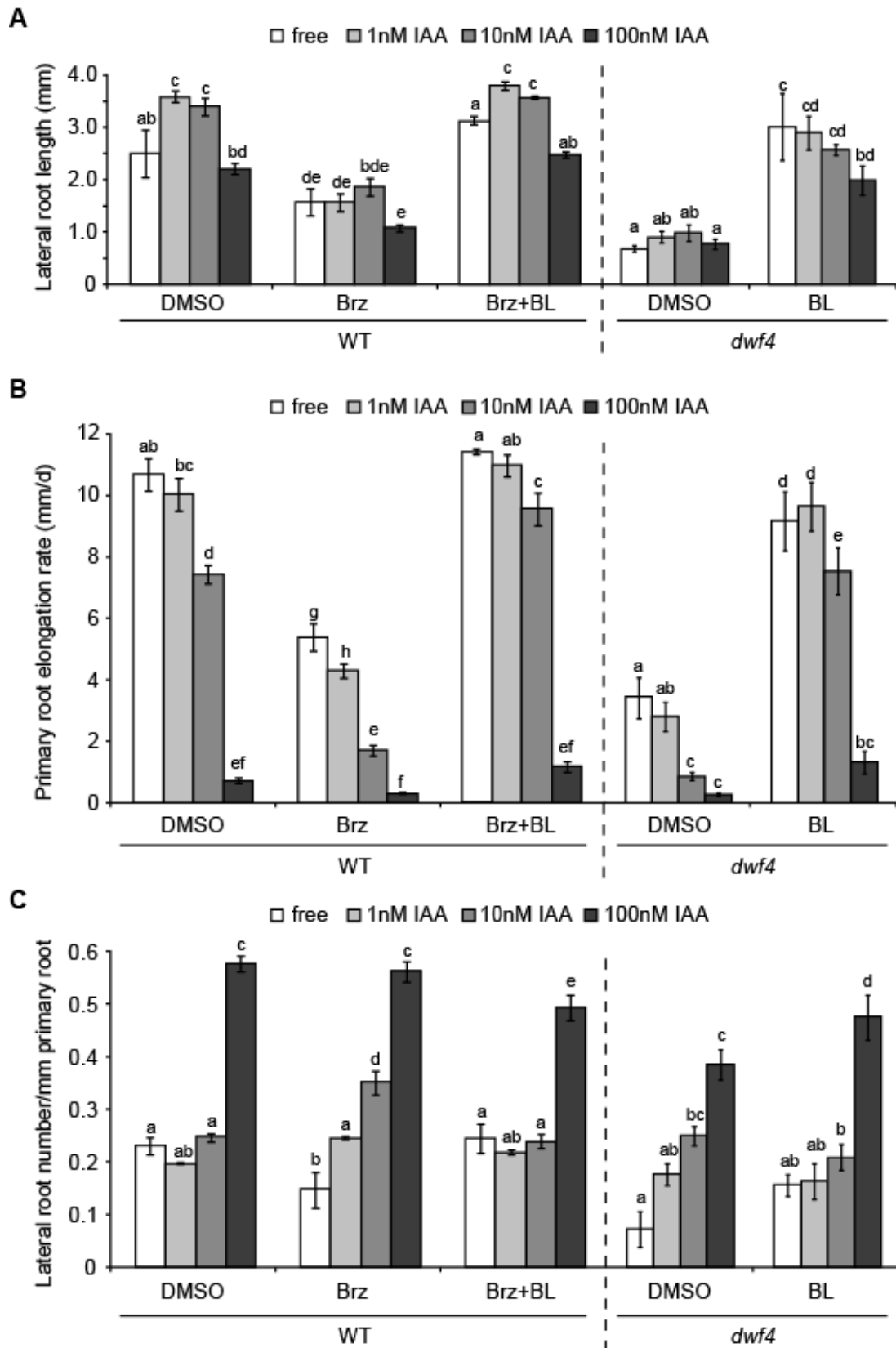


Figure 13. The effect of BR on auxin-regulated root elongation and lateral root formation.

Seven-day-old seedlings grown on solid MS medium of wild-type (*Col-0*) and *dwf4* mutant *Arabidopsis* (in a *Col-0* background) were transferred to the same medium containing different combinations of BL (1 nM), Brz (500 nM) or IAA (1, 10 or 100 nM) for 3 more days. The lengths of the lateral (A) and primary roots (B) and the number of lateral roots (C) of the seedlings were then measured. For the primary roots, the elongation was calculated by subtracting the root length at the initial point (day 7) from the total root length at day 10. The primary root elongation rate (B) refers to the average elongation rate (mm/d). The histograms in each graph show the means \pm SE of triplicate experiments (*Col-0*; n = 10, *dwf4*; n = 8 to 10). Statistical analyses were performed separately for each data set obtained using wild-type and *dwf4* plants. The different letters on the tops of the histograms indicate a statistically significant difference of $P < 0.01$ using a one-way ANOVA followed by Tukey's test.

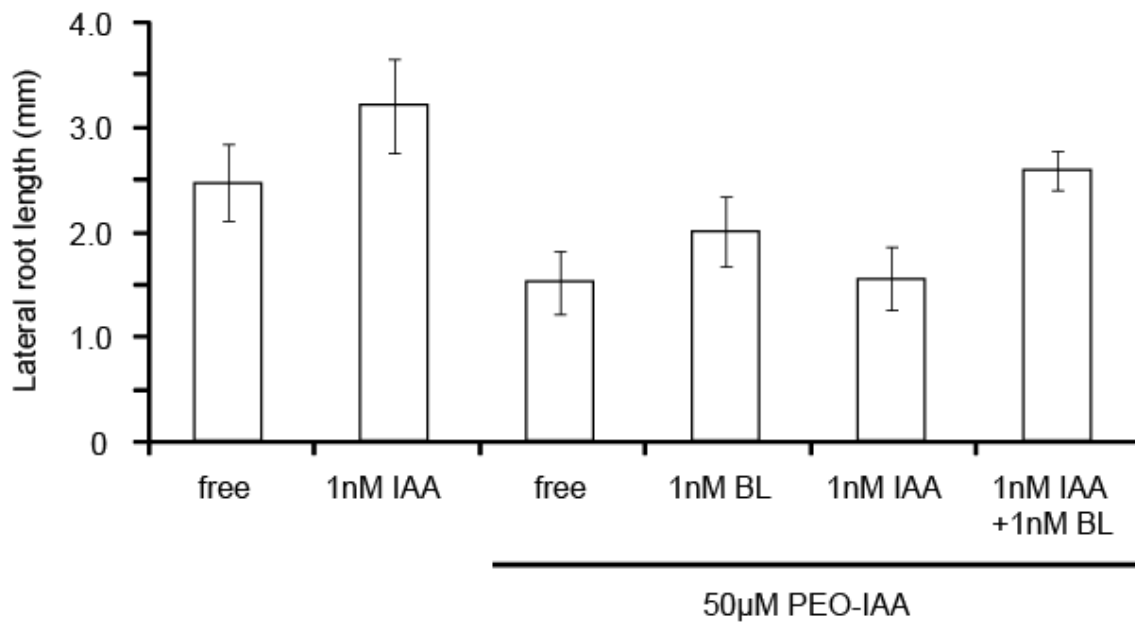


Figure 14. The relationship between auxin, BR and an auxin signaling inhibitor, PEO-IAA on lateral root elongation.

Seven-day-old seedlings grown on solid MS medium of wild-type *Arabidopsis* (*Col-0*) were transferred to the same medium containing different combinations of BL (1 nM), IAA (1 nM), or antiauxin PEO-IAA (50 µM) for 3 more days. The lengths of the lateral roots of the seedlings were then measured. The histograms in each graph show the means \pm SE of triplicate experiments (*Col-0*; n = 10).

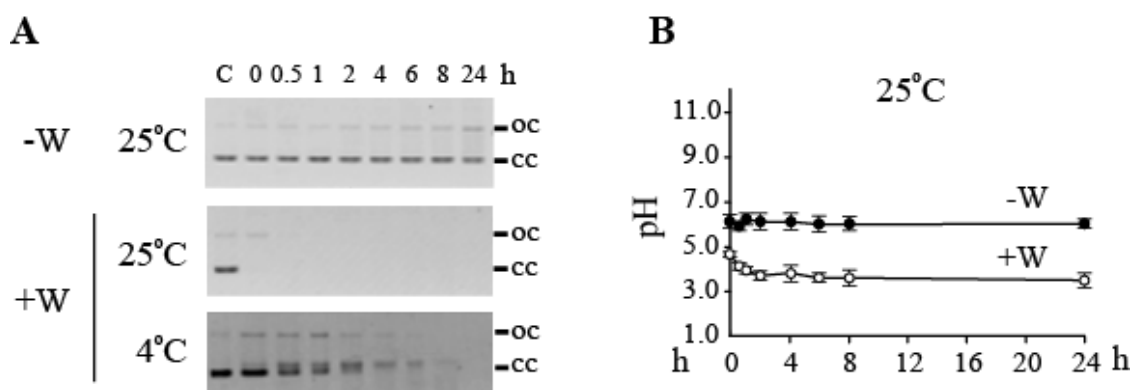


Figure 15. Effect of tungsten particles on plasmid DNA integrity in water.

(A) Plasmid pBI221 ccDNA was incubated with (+W) or without (-W) tungsten particles for the indicated periods, at 25°C or 4°C in pure water. The details of DNA recovery, electrophoresis, and detection are described in “Materials and Methods” (2.11). (B) The pH in the solution at 25°C was measured at the times indicated and its value is shown as an average \pm SE of three independent experiments: C, non-treated pBI221 ccDNA loaded as a control. Horizontal bars along the right side of each photograph indicate the migration positions of the ocDNA (oc) and ccDNA (cc) from the top. Open and closed circles used in the graph indicate the presence and absence of tungsten particles, respectively.

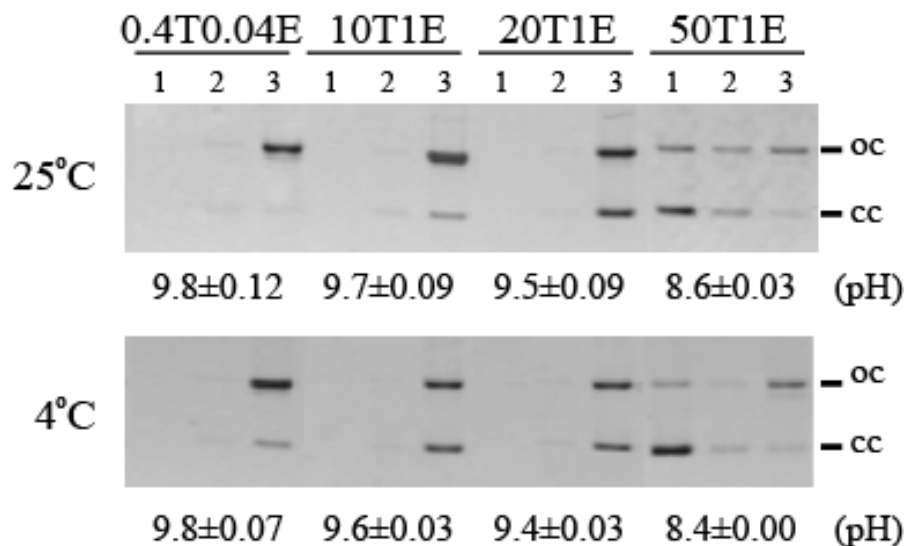


Figure 16. Dose-dependent effects of TE buffer on DNA adsorption to tungsten particles and integrity of the bound DNA.

Plasmid pBI221 ccDNA was bound to tungsten particles at 25°C or 4°C in the DNA adsorption mixture containing each of four kinds of TE buffer adjusted to pH 8.0. After the coating reaction, supernatant containing the unbound DNA (1) were separated from tungsten particles by centrifugation. The resulting supernatant was divided into two aliquots. Each aliquot was used for either DNA analysis or pH measurement. Tungsten particles were transferred to a new tube after preparing suspension in 100% ethanol, and then re-precipitated by centrifugation. DNA adsorbed to the vessel (2) and to the particles (3) was eluted in 50T1E buffer; it was then ethanol-precipitated, air-dried, and finally dissolved in 10T1E buffer. The methods of DNA handling and presentation style follow those of Figure 15. The pH value in DNA adsorption mixture is shown as an average \pm SE of three independent experiments.

Table 1. Primer sequences used for *DWF4::GUS* deletion lines.

Direction	<i>DWF4</i> promoter	Primer Sequence
Forward	1000bp	5'-AGATCTAGAACAATGCATAGAAAGTTC-3'
	800bp	5'-AGATCTAGATTAATAATGCATGGTGCG-3'
	600bp	5'-AGATCTAGAGCTCGTGTAGGGGTCCTT-3'
	400bp	5'-AGATCTAGAAACTCACAACCTTGATCAG-3'
	200bp	5'-AGATCTAGAGCTTTCTGCAAC TTTTGT-3'
	100bp	5'-AGATCTAGACATTGGTTAGGTTTAAGC-3'
Reverse	all	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

Table 2. Primer sequences, cycle numbers, and annealing temperatures used in the semi-qRT-PCR analyses.

Figure No.	Target	Gene name	Primer sequences	Cycle numbers	Annealing temperatures
Figure 4	mRNA	<i>DWF4</i>	5'-TACCTCTTCTTCTTCT CCCATCGC-3'	29	55
			5'-CGAGAAACCCTAAT AGGCAAACCG-3'		
		<i>GUS</i>	5'-GTGCCAGGCAGTTT TAACGA-3'	33	52
			5'-TTCACCGAAGTTCAT GCCAG-3'		
		<i>ACT2</i>	5'-TTCCGCTCTTTCTTTC CAAGCTCA-3'	31	50
			5'-AAGAGGCATCAATT CGATCACTCA-3'		
Figure 5	hnRNA	<i>DWF4</i>	5'-GAAGGTAAGAGGTG GTGAGAGATGA-3'	35	55
			5'-CGAGAAACCCTAAT AGGCAAACCG-3'		
		<i>ACT2</i>	5'-CTTGACCTTGATGGA GAGATCCATG-3'	27	55
			5'-GGTTAAGAGGAGCC TCGGTAAGAAG-3'		
	mRNA	<i>DWF4</i>	5'-TCCTTGGAGATGGCA ACAGCAAAC-3'	35	55
			5'-CGAGAAACCCTAAT AGGCAAACCG-3'		
<i>ACT2</i>		5'-TTCCGCTCTTTCTTTC CAAGCTCA-3'	31	55	
			5'-GGTTAAGAGGAGCC TCGGTAAGAAG-3'		

Table 3. LC and MS conditions using LC-ESI-MS/MS.**LC condition**

Solvent A	Solvent B	Composition of solvent B
Water containing 0.01% pyridine	Acetonitrile containing 0.01% pyridine	3 to 63% over 18 min

MS condition

	Retention time (min)	Charge	MS/MS transition (m/z)	Collision energy (V)	Fragmentor (V)
CS	15.5	-	463/129	22	190
			463/411		
			463/427		
[² H] ₄ CS	15.4	-	467/129	22	190
			467/415		
			467/431		
BL	15.0	-	479/129	28	170
			479/331		
			479/349		
[² H] ₄ BL	14.9	-	483/129	28	170
			483/335		
			483/353		

Table 4. Quantification of plant hormones in wild-type *Arabidopsis* seedlings.

Organs	Hormones (ng/g DW)	First test (600 seedlings)		Second test (1200 seedlings)	
		free	1 μ M IAA	free	1 μ M IAA
Shoots	CS	1.93	1.92	1.96	2.10
	BL	nd	nd	nd	nd
	JA	3534.95	1293.36	4421.39	1971.85
	IAA	200	249	96.2	101
Roots	CS	nd	nd	<0.305*	<0.229*
	BL	nd	nd	nd	nd
	JA	198.66	216.58	247.66	289.28
	IAA	291	377	264	357

* The maximum value is shown as for CS in roots [refer to “Materials and Methods” (2.9) for detail]. DW, dry weight. nd, not detected.

Table 5. The length of promoter used for the expression analysis of BR biosynthesis and metabolic genes in previous reports.

Category	Gene name	bp	Reference
Sterol biosynthesis	<i>FK</i>	1,700	Jang <i>et al.</i> 2000
	<i>HYD1</i>	2,000	Souter <i>et al.</i> 2002
	<i>CYP51A2</i>	1,550	Kim <i>et al.</i> 2005
	<i>SMT2</i>	1,500	Carland <i>et al.</i> 2002
	<i>SMT3</i>	1,500	Carland <i>et al.</i> 2002
BR-specific biosynthesis	<i>CYP90C1 (ROT3)</i>	1,900	Kim <i>et al.</i> 1999
	<i>CPD</i>	965	Mathur <i>et al.</i> 1998
	<i>BR6ox1 (CYP85A1)</i>	1,800	Castle <i>et al.</i> 2005
	<i>BR6ox2 (CYP85A2)</i>	1,800	Castle <i>et al.</i> 2005
BR inactivation	<i>BAS1</i>	1,500	Turk <i>et al.</i> 2003
	<i>SHK1</i>	2,000	Takahashi <i>et al.</i> 2005
Average of promoter length		1,656	

Table 6. The number of indepent transgenic lines of *DWF4::GUS Arabidopsis* harboring the indicated *DWF4* promoter in different size.

Length of <i>DWF4::GUS</i> promoter	Antibiotic-resistant lines (T2)	Selected lines by screening (T3)	Homo lines (T3)
1000bp	13	7	2
800bp	5	5	1
600bp	6	6	3
400bp	1	1	1
200bp	2	not yet	not yet
100bp	1	not yet	not yet

Table 7. Effect of plasmid DNA topology on transient gene expression.

Topology of pBI221 DNA	Spot number/cm ²	Gold particle		Tungsten particle	
cc	GUS	124.11	± 27.95	100.22	± 17.45
	GFP	677.83	± 80.56	297.59	± 54.70
	efficiency*	182.03	± 32.02 ^b	340.42	± 35.89 ^a
oc	GUS	70.51	± 4.53	112.10	± 28.78
	GFP	319.83	± 27.53	344.06	± 17.33
	efficiency*	221.34	± 5.2 ^b	319.33	± 64.94 ^a

* The efficiency of transient gene expression was presented as the number of GUS spots per one thousand GFP spots. Different letters at the right of the numbers indicate a statistically significant difference of values at $P < 0.1$, using a Student's t -test.

要旨

植物ホルモン・ブラシノステロイド(BR)は植物の生活環を通じて様々な生理作用を示す。また、多くの植物にストレス耐性を付与すると共に、作物の幾つかに対しては増収効果をもたらすことも報告されている。これらのことから、農業利用が長年期待されてきたBRであるが、未だそれは実現していない。その原因の一つは、BRの作用機序の理解が不十分であること、すなわち生合成、代謝、シグナル伝達などの機構が完全に解明されていないことが挙げられる。そこで、私は、上記のうちBRの内生量調節機構の解明を目的とし本研究を行うことにした。これが達成できれば、BR内生量の人為制御が可能になり、将来、BR機能の農業利用に大きく貢献すると思われる。

BRの内生量は、生合成と分解の速度のバランスによって調節されると考えられる。また、活性型のBRは、多段階の酵素反応により合成されることが知られている。この中でC22位水酸化酵素はBR生合成の律速反応を担うと共に、その遺伝子である*DWARF4(DWF4)*の発現はBR内生量のフィードバック調節において中心的な役割を果たすことが示されている。しかし、*DWF4*のフィードバック発現が転写調節により達成されるのか、転写後調節によるのか、その両者が関わるのかなど分子機構は未だよく分かっていない。また、BR以外の植物ホルモンと*DWF4*発現調節との関係についての報告もほとんどない。これらの課題を解決するため、私は*DWF4::GUS*融合遺伝子を作成し、安定的形質転換シロイヌナズナを用いた半定量的PCRやGUSレポーターアッセイにより*DWF4*の転写解析を行った。その結果、*DWF4*の転写調節について以下の新知見を得ることができた。それは、(1)BR内生量の増減に応

答して *DWF4* 転写がフィードバック調節を受けること、(2)BR とは別に、オーキシンがシグナル伝達依存的に *DWF4* 転写を誘導すること、(3)オーキシンによる *DWF4* の転写誘導が根系、特に主根と側根の分裂領域と伸長領域で起こること、(4)オーキシンは BR の内生量調節を介して根の伸長を制御することの 4 点である。以上のことから、*DWF4* 転写調節は BR 恒常性維持を達成させる機構の一部として、また根における BR-オーキシンクロストークの交点として2つの役割を持つことが明らかとなった。これらの成果は、農作物に対する内生 BR の人為的制御を目指した育種を確立する上で、重要な知見であると考えている。

また、上記の成果に加えて遺伝子導入法の一つ、パーティクルガン法の技術的問題、すなわち遺伝子導入担体に用いるタングステン粒子が DNA を断片化(完全分解)することを発見すると共に、この悪影響を排除する方法の開発に成功した。この成果も、今後一般化するであろう遺伝子導入を基礎とした作物の分子育種に大きく貢献すると考えている。

Summary

Brassinosteroids (BRs) are a class of plant hormones with a unique polyhydroxy steroid structure, and are essential for growth and development throughout plant life cycle. In addition, BRs contribute to the enhancement of biotic and abiotic stress tolerance in a variety of plants and promote increased yields in some crop plants, implying that BRs have a potential application in agriculture. To date, many aspects of BR biosynthesis, metabolism and signal transduction pathways have been revealed by both molecular genetic and biochemical research. Through these studies, numerous BR biosynthesis genes have been identified and characterized. Among them, the *Arabidopsis DWARF4 (DWF4)* that encodes a C-22 hydroxylase has been of interest because it catalyzes multiple key regulatory steps in BR biosynthesis and plays a crucial role in the feedback control of endogenous BR level. However, it still remains to be determined whether *DWF4* feedback expression is achieved either by its transcription, post-transcriptional control, or both. Moreover, it is almost unknown whether *DWF4* expression is controlled by plant hormones other than BRs. To answer these questions, the intensive analyses using a *DWF4::GUS* reporter gene were performed to determine the transcriptional behavior of this gene. Several findings regarding the transcriptional control of *DWF4* were obtained through these analyses as follows; (1) *DWF4* transcription functions as a part of the feedback control machinery that maintains adequate levels of endogenous BRs in response to both their excess and depletion; (2) *DWF4* transcription is positively regulated by auxin through the SCF^{TIR1}-mediated auxin signaling; (3) auxin-induced *DWF4* transcription is restricted in the elongation zones of both primary and lateral roots as well as the lateral root primordia. Furthermore, through pharmacological analysis, auxin was shown to elongate lateral roots

dependently of endogenous BR levels, suggesting that auxin stimulates lateral root growth partly through enhanced BR function, which seems to be caused by auxin-induced *DWF4* transcription. Altogether, the results indicate that *DWF4* transcription plays dual roles in both the BR homeostasis and the BR-auxin crosstalk that is associated with root growth. In addition to the above findings, I revealed that plasmid DNA is severely degraded and converted into oligonucleotides by tungsten particle that is commonly used as a DNA carrier in biolistic bombardment. Furthermore, I modified the most generally used method of tungsten-DNA adsorption and succeeded to reduce degradation of tungsten bound DNA to the sufficient level for the practical use of this complex on bombardment.

参考文献

1. The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
2. Asami T *et al.* (2000) Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol* 123: 93-100.
3. Ballas K *et al.* (1988) Linear forms of plasmid DNA are superior to supercoiled structures as active templates for gene expression in plant protoplasts. *Plant Mol Biol* 11: 517-527.
4. Bao F *et al.* (2004) Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134: 1624-1631.
5. Bechtold N *et al.* (1993) In-planta *Agrobacterium*-mediated gene-transfer by infiltration of adult *Arabidopsis-thaliana* plants. *CR Acad Sci Paris Life Sci* 316: 1194-1199.
6. Benková E and Hejácíko J (2009) Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Mol Biol* 69: 383-396.
7. Bishop GJ (2007) Refining the plant steroid hormone biosynthesis pathway. *Trends Plant Sci* 12: 377-380.
8. Bolduc N and Hake S (2009) The maize transcription factor KNOTTED1 directly regulates the gibberellin catabolism gene *ga2ox1*. *Plant Cell* 21: 1647-1658.
9. Carland FM *et al.* (2002) The identification of *CVPI* reveals a role for sterols in vascular patterning. *Plant Cell* 14: 2045-2058.
10. Castle J *et al.* (2005) Unique and overlapping expression patterns of *Arabidopsis* *CYP85* genes involved in brassinosteroid C-6 oxidation. *Plant Mol Biol* 57: 129-140.

11. Cherng J *et al.* (1999) Effect of DNA topology on the transfection efficiency of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid complexes. *J Control Release* 60: 343-353.
12. Chiu W *et al.* (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* 6: 325-330.
13. Choe S *et al.* (1998) The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 10: 231-243.
14. Choe S *et al.* (2001) Overexpression of *DWARF4* in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant J* 26: 573-582.
15. Chung Y *et al.* (2011) Auxin stimulates *DWARF4* expression and brassinosteroid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 66: 564-78.
16. Cline MG (1991) Apical dominance. *The Botanical Review* 57: 318-358.
17. Clough SJ and Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743.
18. Clouse S *et al.* (1993) Physiological and molecular effects of brassinosteroids on *Arabidopsis-thaliana*. *J Plant Growth Regul* 12: 61-66.
19. Clouse S and Sasse J (1998) Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 427-451.
20. De Rybel B *et al.* (2009) Chemical inhibition of a subset of *Arabidopsis thaliana* GSK3-like kinases activates brassinosteroid signaling. *Chem Biol* 16: 594-604.
21. Dhaubhadel S *et al.* (2002) Brassinosteroid functions to protect the translational

- machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *Plant J* 29: 681-691.
22. Divi UK and Krishna P (2009) Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *Nat Biotechnol* 26: 131-136.
 23. Fukaki H and Tasaka M (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol* 69: 437-449.
 24. Fukuta N *et al.* (2004) 'Rinrei', a brassinosteroid-deficient dwarf mutant of faba bean (*Vicia faba* L.). *Physiol Plant* 121: 506-512.
 25. Goda H *et al.* (2004) Comprehensive comparison brassinosteroid-regulated of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134: 1555-1573.
 26. Goda H *et al.* (2002) Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130: 1319-1334.
 27. Gomez-Cadenas A *et al.* (1996) Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol* 112: 401-408.
 28. Hardtke C *et al.* (2007) Phytohormone collaboration: zooming in on auxin-brassinosteroid interactions. *Trends Cell Biol* 17: 485-492.
 29. Hayashi K *et al.* (2008) Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein-substrate interactions in auxin perception and signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5632-5637.
 30. He J *et al.* (2005) BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307: 1634-1638.
 31. Jang JC *et al.* (2000) A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem

- programming revealed by the fackel mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 15: 1485-1497
32. Jefferson R (1987) Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405.
33. Kamuro Y and Takatsuto S (1999) Practical application of brassinosteroids in agricultural fields. Sakurai A, Yokota T and Clouse SD (eds.), Springer-Verlag: Tokyo, Japan.
34. Kim GT *et al.* (1999) Changes in the shapes of leaves and flowers upon overexpression of cytochrome P450 in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9433-9437.
35. Kim HB *et al.* (2005) *Arabidopsis cyp51* mutant shows postembryonic seedling lethality associated with lack of membrane integrity. *Plant Physiol* 138: 2033-2047.
36. Kim HB *et al.* (2006) The regulation of *DWARF4* expression is likely a critical mechanism in maintaining the homeostasis of bioactive brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140: 548-557.
37. Kim T *et al.* (2007) Elongation and gravitropic responses of *Arabidopsis* roots are regulated by brassinolide and IAA. *Plant Cell and Environ* 30: 679-689.
38. Kim T and Wang Z (2010) Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* 61: 681-704.
39. Kosugi S *et al.* (1990) An improved assay for beta-glucuronidase in transformed-cells - methanol almost completely suppresses a putative endogenous beta-glucuronidase activity. *Plant Sci* 70: 133-140.
40. Kozuka T *et al.* (2010) Involvement of auxin and brassinosteroid in the regulation of petiole elongation under the shade. *Plant Physiol* 153: 1608-1618.

41. Krysiak C *et al.* (1999a) Generation of DNA double-strand breaks and inhibition of somatic embryogenesis by tungsten microparticles in wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 58: 163-170.
42. Krysiak C *et al.* (1999b) Relaxation, linearization and fragmentation of supercoiled circular DNA by tungsten microprojectiles. *Transgenic Res* 8: 303-306.
43. Lamb K *et al.* (1996) Binding of transcription factors to widely-separated cis-regulatory elements of the murine *FGF-4* gene. *Mol Reprod Dev* 44: 460-471.
44. Li L *et al.* (2005) Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in *Brassica* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 2738-2753.
45. Masucci JD *et al.* (1990) Pattern-specific expression of the *Drosophila* decapentaplegic gene in imaginal disks is regulated by 3' cis-regulatory elements. *Genes Dev* 4: 2011-2023.
46. Mathur J *et al.* (1998) Transcription of the *Arabidopsis CPD* gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids. *Plant J* 14: 593-602.
47. Mazuś B *et al.* (2000) Tungsten particle-induced nicking of supercoiled plasmid DNA. *Plasmid* 44: 89-93.
48. Michniewicz M *et al.* (2007) Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book* 5: 1-28.
49. Min Y *et al.* (1999) New lead compounds for brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 9: 425-430.
50. Mouchel C *et al.* (2006) BRX mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. *Nature* 443: 458-461.
51. Müssig C *et al.* (2003) Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant*

- Physiol 133: 1261-1271.
52. Nakamoto D *et al.* (2006) Inhibition of brassinosteroid biosynthesis by either a *dwarf4* mutation or a brassinosteroid biosynthesis inhibitor rescues defects in tropic responses of hypocotyls in the *Arabidopsis* mutant *nonphototropic hypocotyl 4*. *Plant Physiol* 141: 456-464.
 53. Nakamura A *et al.* (2003) Brassinolide induces *IAA5*, *IAA19*, and *DR5*, a synthetic auxin response element in *Arabidopsis*, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant Physiol* 133: 1843-1853.
 54. Nakamura A *et al.* (2006) *Arabidopsis Aux/IAA* genes are involved in brassinosteroid-mediated growth responses in a manner dependent on organ type. *Plant J* 45: 193-205.
 55. Nakamura A *et al.* (2009) Involvement of C-22-hydroxylated brassinosteroids in auxin-induced lamina joint bending in rice. *Plant Cell Physiol* 50: 1627-1635.
 56. Nakashita H *et al.* (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J* 33: 887-898.
 57. Nambara E *et al.* (2000) The role of *ABI3* and *FUS3* loci in *Arabidopsis thaliana* on phase transition from late embryo development to germination. *Dev Biol* 220: 412-423.
 58. Nemhauser J *et al.* (2004) Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 2: 1460-1471.
 59. Nishimura T *et al.* (2009) Differential downward stream of auxin synthesized at the tip has a key role in gravitropic curvature via *TIR1/AFBs*-mediated auxin signaling pathways. *Plant Cell Physiol* 50: 1874-1885.
 60. Oono Y *et al.* (2003) p-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in

- Arabidopsis* root. Plant Physiol 133: 1135-1147.
61. Rao S *et al.* (2002) Brassinosteroids - A new class of phytohormones. Current Science 82: 1239-1245.
 62. Rasco-Gaunt S and Barcelo P (1999) Immature inflorescence culture of cereals. A highly responsive system for regeneration and transformation. Methods Mol Biol 111: 71-81.
 63. Remaut K *et al.* (2006) Influence of plasmid DNA topology on the transfection properties of DOTAP/DOPE lipoplexes. J Control Release 115: 335-343.
 64. Ren C *et al.* (2009) A leaky mutation in *DWARF4* reveals an antagonistic role of brassinosteroid in the inhibition of root growth by jasmonate in *Arabidopsis*. Plant Physiol 151: 1412-1420.
 65. Rikiishi K *et al.* (2008) Uzu, a barley semi-dwarf gene, suppresses plant regeneration in calli derived from immature embryos. Breed Sci 58: 149-155.
 66. Sakamoto T *et al.* (2006) Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. Nat Biotechnol 24: 105-109.
 67. Sanford J *et al.* (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. Methods Enzymol 217: 483-509.
 68. Schenk PM *et al.* (1998) Assessment of transient gene expression in plant tissues using the green fluorescent protein as a reference. Plant Mol Biol Rep 16: 313-322.
 69. Shibuya K *et al.* (2009) RNA-directed DNA methylation induces transcriptional activation in plants. Proc Natl Acad Sci USA 106: 1660-1665.
 70. Souter *et al.* (2002) *hydra* mutants of *Arabidopsis* are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. Plant Cell 14: 1017-1031
 71. Stepanova AN *et al.* (2007) Multilevel interactions between ethylene and auxin in

- Arabidopsis* roots. Plant Cell 19: 2169-2185.
72. Swarup R *et al.* (2007) Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. Plant Cell 19: 2186-2196.
73. Szekeres M *et al.* (1996) Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. Cell 85: 171-182.
74. Takahashi N *et al.* (2003) *shk1-D*, a dwarf *Arabidopsis* mutant caused by activation of the *CYP72C1* gene, has altered brassinosteroid levels. Plant J 42: 13-22
75. Tanaka K *et al.* (2003) Physiological roles of brassinosteroids in early growth of *Arabidopsis*: Brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation. J Plant Growth Regul 22: 259-271.
76. Tanaka K *et al.* (2005) Brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis* is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism. Plant Physiol 138: 1117-1125.
77. Thimann KV and Sweeney BM (1937) The effect of auxins upon protoplasmic streaming. J Gen Physiol 21: 123-135.
78. Vert G *et al.* (2008) Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. Proc Natl Acad Sci USA 105: 9829-9834.
79. Turk EM *et al.* (2005) BAS1 and SOB7 act redundantly to modulate *Arabidopsis* photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. Plant J 42: 23-24.
80. Wu CY *et al.* (2008) Brassinosteroids regulate grain filling in rice. Plant Cell 20: 2130-2145.

81. Xie T *et al.* (1992) Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection. IV. Effects of DNA topology on cell uptake and transfection efficiency. *Biophys J* 63: 1026-1031.
82. Yang M and Kurkinen M (1994) Different mechanisms of regulation of the human stromelysin and collagenase genes. Analysis by a reverse-transcription-coupled-PCR assay. *Eur J Biochem* 222: 651-658.
83. Yin Y *et al.* (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109: 181-191.
84. Yoshimoto K *et al.* (2009) Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 2914-2927.
85. 大石恵理子 (2007) ブラシノライドとブラシナゾールの培地中及び植物体中での挙動. 鹿児島大学農学部生物資源科学科 修士論文
86. 岡本繁久, 田仲究, 中村考志, 松尾友明 (2007) ブラシノステロイド研究の進歩と農業利用への期待. *農業および園芸* 82 巻 6 号 641-652 頁

謝辞

本大学大学院応用生命科学専攻教授・松尾友明先生、同専攻准教授・岡本繁久先生には本研究の実施の機会を与えて頂くと共に、その遂行及び本論文の執筆にあたって終始ご指導を頂きました。ここに深い謝意を表します。また、同専攻教授・八木史郎先生、佐賀大学教授・穴井豊昭先生、同大学教授・石丸幹二先生には副査として多くのご助言を頂きました。ここに感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、共同研究者として東京大学教授・浅見忠男先生、理化学研究所名誉研究員・吉田茂男博士、岡山理科大学准教授・林謙一郎先生には貴重な阻害剤をご分与して頂きました。また、理化学研究所グループディレクター・神谷勇治博士、同研究所研究員・軸丸裕介博士にはホルモン量分析に大きなお力添えを頂きました。加えて、同先生方からは有益なご討論ご助言も頂きました。ここに深謝の意を表します。

本大学農学部植物分子生物学研究室及び遺伝子制御学研究室の各位には、研究や学生生活を通して数多くのご助言や励ましを頂いたことに深く感謝致します。実験においては、ミズーリ大学博士研究員・田仲究博士、田川岳さん、福田亘さん、重田友明さん、上岡拓也さんに多くのお力添えを頂いたことに厚く御礼申し上げます。最後に、本論文の完成に至るまで長い間終始支え励ましてくださった家族、そして、妻に心より感謝致します。