

学 位 論 文 要 旨

氏 名	吉満 勇也
題 目	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 (Study on the feedback control of brassinosteroid levels in <i>Arabidopsis thaliana</i>)

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、未だ実現には至っていない。その原因の一つとして、BR の作用機序、すなわち生合成、代謝、シグナル伝達などの機構解明が十分でないことが挙げられる。そこで、私は、上記機構のうち BR の内生量調節機構に焦点を当て研究を行うことにした。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、その両者に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、*DWF4* 発現に対する BR 以外の植物ホルモンの効果もほとんど分かっていない。これらの疑問に答えるため、私は *DWF4::GUS* 融合遺伝子を用いて *DWF4* 遺伝子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た。(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の 3 点である。また、薬理的解析を通じて、オーキシンによる側根の成長促進が BR 内生量に大きく依存することを見つけた。これらの結果は、オーキシンが *DWF4* 転写を誘導することで、すなわち BR 機能を介して根の伸長を制御することを示唆している。以上のように、私は、*DWF4* 転写調節が BR 恒常性維持を達成させるプロセスの一部として、また根の伸長に関わる 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を明らかにした。加えて、私はパーティクルガン法を行う際に遺伝子導入担体として用いるタングステン粒子がプラスミド DNA を細かく分解することを見つけた。また、タングステン粒子による DNA 分解反応の化学的性質を明らかにすると共に、分解を極力抑制した状態で担体粒子にプラスミド DNA を吸着させる方法を開発することに成功した。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Yuya Yoshimitsu
題 目	Study on the feedback control of brassinosteroid levels in <i>Arabidopsis thaliana</i> (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)

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, posttranscriptional 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* are 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 may 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 particles that is commonly employed as a DNA carrier in biolistic bombardment. Furthermore, I solved partly the chemical properties of tungsten-induced DNA degradation and succeeded to improve the current method of tungsten-DNA adsorption in which DNA degradation is suppressed to the sufficient level for the practical use of this complex on bombardment.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	吉満 勇也
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 松尾 友明
	副査 鹿児島 大学 准教授 岡本 繁久
	副査 佐賀 大学 准教授 穴井 豊昭
	副査 佐賀 大学 教授 石丸 幹二
	副査 鹿児島 大学 教授 八木 史郎
審査協力者	
題目	<p style="text-align: center;">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 (Study on the feedback control of brassinosteroid levels in <i>Arabidopsis thaliana</i>)</p>
<p>ブラシノステロイド (BR) は、比較的最近発見された植物ホルモンで、唯一のステロイド型植物ホルモンである。BR は植物の生活環を通して、細胞分裂および伸長の促進、分化誘導、光形態形成など様々な生理作用を示す。加えて、多くの植物にストレス耐性を付与するとともにいくつかの作物 (イネ、トマト、ブドウ、マンゴなど) では増収効果も報告されている。本研究は、農業上重要な作物の安定した増収を得る技術開発を最終的な目標として、BR の作用機構を明らかにすることを目的としている。</p> <p>特に、申請者 (吉満勇也) はBRの内生量調節機構に注目して、モデル植物シロイヌナズナを用いた分子生物学的研究を行った。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ていると考えられる。また、活性型のBR は多段階の酵素反応によって合成されることがすでに明らかとなっており、その中でもC2 2位水酸化酵素はBR 生合成経路の律速段階を担っている。そして、C2 2位水酸化酵素を</p>	

暗号化している *DWARF4* (*DWF4*) 遺伝子の発現は BR 内生量の調節の中心的な役割を果たしていることがすでに報告されている。しかし、その分子メカニズムは不明のままであった。

そこで、申請者はシロイヌナズナ幼植物体を用いて、活性型 BR であるブラシノライド処理と BR 生合成阻害剤であるブラシナゾール処理を行ない、BR 内生量の増減に応答する生合成に関連する遺伝子の発現と酵素活性の変化を詳細に調べた。定量的 PCR を用いて BR 量に応答する *DWF4* 遺伝子の mRNA と hnRNA 量の変化を経時的に調べ、合わせて、*DWF4::GUS* 融合遺伝子を作成してプロモーターの働きを解析した結果から、以下のことを明らかにすることができた。

(1) BR 内生量の増減に応答して *DWF4* 遺伝子の転写がフィードバック調節を受けること、(2) BR 量以外の要因として、オーキシニン量がシグナル伝達依存的に *DWF4* 遺伝子の転写を誘導すること、(3) 他の植物ホルモンには顕著に応答しなかったこと、(4) オーキシニンによる *DWF4* 遺伝子の転写誘導が根系、特に主根と側根の分裂が盛んな組織及び伸長が著しい組織で起こること、(5) オーキシニンは *DWF4* 遺伝子の転写を誘導することで、すなわち BR 機能を介して根の伸長を制御していることである、これらのことから、成長点で生合成されて、移動が可能なオーキシニンと局所的に合成されて、成長を促すことのできるブラシノステロイドが生理的な役割分担をしていると推測することができた。また、パーティクルガン法を用いた融合遺伝子の一過的発現実験では、担体に用いたタングステン粒子の DNA 分解能を詳細に解析するとともに、プラスミド DNA の分解を抑制できる条件を見出した。このことによりレポーター遺伝子の発現をより効率的に測定できるようになった。

以上のように本論文で述べられた研究成果では、BR の内生量が律速段階に位置する *DWF4* 遺伝子のフィードバック機構によって調節されていること、および 2 種類の植物ホルモンのクロストークの交点として *DWF4* 遺伝子が働いていることを初めて明らかにしており、学術的に高く評価できるものである。加えて、今後の BR の応用面への道を切り開いたものと言える。

以上のことから、審査員一同、本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値があるものと判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	吉満 勇也
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 松尾 友明
	副査 鹿児島 大学 准教授 岡本 繁久
	副査 佐賀 大学 准教授 穴井 豊昭
	副査 佐賀 大学 教授 石丸 幹二
	副査 鹿児島 大学 教授 八木 史郎
審査協力者	
実施年月日	平成 23年 12月 24日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (口答)・筆答	
<p>主査及び副査は、平成23年12月24日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には次頁のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分な学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏名

吉満 勇也

当日の質疑応答の内容：

〔質問 1〕 現在まで、ブラシノステロイドが実際の農業に利用された具体例はあるのか。何が用いられたのか。

〔回答 1〕 中国、ロシアでは、(-)- エピブラシノライドと 28- ホモブラシノライドが農薬登録されている。トマト・ブドウ・マンゴーの結果促進に効果が見いだされています。

〔質問 2〕 BRがストレス耐性の付与を起こすと説明されていたが、どんなストレスに対する耐性を向上させた例があるのか。

〔回答 2〕 イネのいもち病耐性、イネの低温耐性、イネの農薬耐性、シロイヌナズナの低温耐性、ナシの低温耐性などに効果があるという報告があります。

〔質問 3〕 BR やオーキシンにより誘導される *DWF4* 遺伝子の発現が根だけで起こる局所的なものであったという結果だったが、生理的な反応と矛盾はないのか、たとえば、強制発現体では全身が大きくなっていることをどう考えるのか。

〔回答 3〕 本研究では、幼植物体を用いた実験結果のみで考察しているので、全生活環を通じて同じような結果が観察されるかは不明であります。今後、シロイヌナズナの成熟個体を用いて、経時的に同様な実験を行なってみたいと思っております。

〔質問 4〕 多種類の植物ホルモンを用いた投与実験で、各ホルモンは植物体に確実に吸収されているのか。吸収の違いによる、遺伝子のレスポンスの違いをひき起していないのか。

〔回答 4〕 一部オーキシンである IAA については、投与後内生量を調べて有意な上昇を観察しているが、一般に取り込まれてからも分解などの動的平衡により存在量が決まると予想されるので、大変難しい問題であると考えています。但し、様々な実験条件で、遺伝子や酵素が植物ホルモンに応答して変動していることが報告されているので、この実験系でも取り込まれて作用していると考えています。

〔質問 5〕 3種類のオーキシンを投与した実験で、2,4-D だけがより大きな効果をひき起していたが、この結果はどう考えるのか。

〔回答 5〕 天然のオーキシンである IAA などは生体内で容易に代謝されるため長く生理活性が維持できないことが報告されています。合成オーキシンである 2,4-D は植物中で安定で、長く活性を持続させていると推測している。

〔質問 6〕 活性型ブラシノライドの分解過程はどんな要因によって制御されているのか。配糖体化も起こるのか。

〔回答 6〕 26位の水酸化や配糖体化に関与する遺伝子や酵素が見つかっています。

〔質問 7〕 根で局所的に発現しているという結果だったが、BR の体内移動はあるのか。

オーキシシンと何らかの役割分担をしていると考えられるのか。

【回答7】 BR は現在までの報告では植物器官中を動かないと考えられています。一方、オーキシシンは極性移動することが明らかになっていますので、両者の間でクロストークがあることは何らかの役割分担していることが推測できますが、まだ私の結果からだけでは何も決定的なことは言えません。

【質問8】 これまでの実験結果から、主に転写の制御によってフィードバック調節が起きているという説明だったが、何か他に転写後調節の寄与に関する結果はあるのか。

【回答8】 BR 生合成阻害剤である Brz に対する応答性が内生の *DWF4* 遺伝子と *DWF4::GUS* 融合遺伝子の間でわずかに異なるという結果を得ております。このことから、Brz による発現誘導には転写に加えて転写後調節 (mRNA 分解抑制など) が関与する可能性もあると考えています。

【質問9】 GUS 酵素は安定なタンパク質なので、BL 投与後の活性の減少は必ずしも転写量を反映したのではないのではないか。

【回答9】 ご指摘のとおりだと思います。考察を再度検討したいと思います。

【質問10】 内生量を実際測定した報告はあるのか、どれくらいの濃度だったのか。

【回答10】 活性型ブラシノステロイドであるブラシノライドは通常検出限界以下の濃度しか植物中には存在しない。シグナル伝達の突然変異体では測定されている。植物の乾物重当たりでナノグラムオーダーです。ブラシノステロイドと比べて、生合成経路の1段階前に位置するカステステロンはよく定量されています。

【質問11】 *DWF4* 遺伝子の発現が律速段階と考えているという考察であるが、前駆物質が十分量供給されているのだろうか。また、*DWF4* 遺伝子の発現が増加すると、酵素活性も増加して、酵素の産物も増加しているのだろうか。

【回答11】 *DWF4* 遺伝子の強制発現体では前駆物質の蓄積が認められて、植物体も大きく生長しているので、この遺伝子発現が律速段階の1つだと考えています。

【質問12】 結局、植物生理学的には主根の成長がオーキシシンによりBRの生合成が誘導されて、生長が促進される、一方、ジャスモン酸やエチレンによって阻害されるという両方の制御がかかって正味の根の成長が起こるといえることでしょうか。

【回答12】 そうだと考えております。

【質問13】 ブラシノステロイドとオーキシシンのクロストークが今回の実験で見つかったが、他のホルモンとのクロストークの例は報告されているのか。

【回答13】 ブラシノステロイドはアブシジン酸とは互いの生合成に関して負の因子として働くことが報告されています。また、サイトカイニンがブラシノステロイド量を制御しているという報告もあります。

【質問14】 タングステン粒子がプラスミド DNA を分解する機構は何か分かったのか。

【回答14】 インキュベーション中に溶液が酸性化することが1つの要因だと考えていますが、それだけではないと推測しています。