

シロイヌナズナの bHLH 転写因子・
BES1/BZR1 ホモログに関する分子生物学的研究

大谷 結

2023

**Molecular biological studies of the bHLH transcription
factors, BES1/BZR1 homolog 1–4 in *Arabidopsis* and
their involvement in brassinosteroid signaling**

Yui Otani

2023

目次

第1章 総合緒言

1-1 節 総合緒言……………1

1-2 節 図表……………5

第2章 bHLH 転写因子を暗号化する *BESI/BZRI* ファミリー遺伝子のシロイヌナズナ における発現プロファイル

2-1 節 緒言……………9

2-2 節 材料及び方法……………11

2-2-1 項 試薬……………11

2-2-2 項 植物と生育条件……………11

2-2-3 項 プラスミド構築と植物の形質転換……………12

2-2-4 項 薬剤の処理……………13

2-2-5 項 RNA 抽出……………13

2-2-6 項 逆転写 PCR (RT-PCR)……………13

2-2-7 項 レポーター解析……………14

2-3 節 結果

2-3-1 項 *BESI/BZRI* ファミリー遺伝子の時空間的発現パターン……………15

2-3-2 項 *BESI/BZRI* ファミリー遺伝子の様々なホルモンに対する応答性……………16

2-3-3 項 *BEH4* 遺伝子：組織・細胞水準の発現様式……………18

2-3-4 項 若い実生における *BEH4* 発現に対する ABA の影響……………19

2-4 節 考察……………21

2-5 節 図表……………27

第 3 章 ブラシノステロイドシグナル伝達におけるシロイヌナズナ *BES1/BZR1*

homolog 2 の動態と機能

3-1 節 緒言	38
3-2 節 材料及び方法	40
3-2-1 項 試薬	40
3-2-2 項 植物と生育条件	40
3-2-3 項 プラスミド構築と植物の形質転換	41
3-2-4 項 パーティクルガンを用いた遺伝子導入	41
3-2-5 項 薬理的解析	42
3-2-6 項 RNA 抽出と RT-PCR	42
3-2-7 項 RNA-seq 及び GO/KEGG エンリッチメント解析	43
3-2-8 項 レポーター解析	44
3-3 節 結果	
3-3-1 項 <i>BEH2</i> 遺伝子：組織特異的な発現と BR 応答性	45
3-3-2 項 BR による <i>BEH2</i> の発現低下は標準的な BR シグナル伝達経路を介している	46
3-3-3 項 <i>BEH2</i> タンパク質：細胞内局在	48
3-3-4 項 <i>BEH2</i> により発現制御される遺伝子候補と BR シグナル伝達に対する <i>BEH2</i> の貢献度	49
3-4 節 考察	53
3-5 節 図表	60

第 4 章 総合考察	75
第 5 章 要旨	81
第 6 章 Summary	83
謝辞	85
参考文献	86

第1章 総合緒言

1-1 節 総合緒言

植物成長調整剤は農薬分類群の一つで、農作物の品質向上・収量増加、不良条件下での生育回復・改善、作業労力や経費の軽減をもたらすために使われる、天然もしくは合成の薬剤である。またこれは、植物側の発生・成長を調節することで機能するため、外敵を標的とする殺虫剤や殺菌剤とは一線を画す。植物成長調整剤には植物ホルモンやそれらの阻害剤が含まれ、我が国においても、既知の植物ホルモンの幾つかがこの分類群で農薬登録されている (<https://www.acis.famic.go.jp/>)。例えば、オーキシンは発根促進剤、果菜類および果樹の着果促進剤、落果防止剤、除草剤として、ジベレリンはブドウの無種子化剤、葉菜類花き類の生育促進剤として、実際に農業現場で利用されている。

ブラシノステロイド (brassinosteroid; BR) はポリヒドロキシ化されたステロイド型の植物ホルモンで、オーキシンやジベレリンと同様に成長促進ホルモンに分類される (Figure 1) (Huot et al., 2014)。BRは細胞伸長、維管束分化、光形態形成、雄性稔性、そして老化を含む植物の成長や発生において重要な生理機能を持つのに加え、様々な非生物的・生物学的ストレスに対する耐性を付与する (Manghwar et al., 2022)。こういった知見から BR は発見当初より世界中の研究者の関心を集め、1980年代から2000年代にかけて分子水準の作用機序解明を目指したラボワークと並行して、実用化を目指したフィールドワークが盛んに行われた。しかしながら、フィールドワークでは安定した成果が得られず、ロシアやベラルーシ、中国といった一部の国を除いて、多くの

国々では未だに農業で利用するには至っていない (岡本ら., 2007)。事実、2022 年現在、我が国においても BR 及び BR 阻害剤類は植物成長調整剤として登録されていない (<https://www.jcpa.or.jp/>; <https://www.maff.go.jp/>)。

これまでの分子遺伝学的、生化学的、そしてオミクススペースの研究を通じて生合成やシグナル伝達経路を含む BR 作用機序の外観が明らかにされてきた (Figure 2)。BR は原形質膜上にある 2 つのロイシンリッチリピート (leucine-rich repeat; LRR) 型の受容体様キナーゼ : BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) と BRI1-associated receptor kinase 1 (BAK1) が作る複合体によって受容される (Li & Chory, 1997; Li et al., 2002; Nam & Li, 2002; Wang et al., 2001)。BR リガンドの結合によって細胞質内で生じた二次シグナルはリン酸リレーを介して下流因子に伝達され、最終的に植物特異的な glycogen synthase kinase 3 (GSK3) 様キナーゼ・BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 (BIN2)、及び 2 つのよく似た bHLH 転写因子 BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) と BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1) から構成されるモジュール (機能ユニット) に伝えられる。BR 量が少ないとき、BIN2 キナーゼは BES1 と BZR1 をリン酸化する (Zhao et al., 2002)。その結果、リン酸化された BES1 や BZR1 は 14-3-3 タンパク質による細胞質隔離、プロテアソームによる分解、標的プロモーターへの結合親和性低下などの制御を受け転写因子としての機能を果たせなくなる (Gampala et al., 2007; He et al., 2002; Ryu et al., 2010; Vert & Chory, 2006)。一方、BR が十分に存在するとき、BES1 と BZR1 の両転写因子は BIN2 キナーゼの不活化と、活性化されたタンパク質ホスファターゼ・protein phosphatase 2A (PP2A) の働きで脱リン酸化され、転写因子としての機能を回復する (Kim et al., 2009; Tang et al., 2011)。その結果、BES1 と BZR1 は標的遺伝子のプロモーター上にある BR responsive element (BRRE) や E-box といったシスエレメントに直

接結合する、また、複数種のパートナータンパク質と結合することで数千もの遺伝子の発現を制御する (Li et al., 2018; Sun et al., 2010; Yu et al., 2011)。

シロイヌナズナのゲノム DNA 上には、*BES1* と *BZR1* のホモログ遺伝子 (*BES1/BZR1 homolog 1-4 :BEH1-4*) が 4 つ存在し、これらは小さな遺伝子ファミリーを形成している (Figure 3)。これまでに *BES1*・*BZR1* に関する報告は数多くなされてきたが、対照的に 4 つのホモログに関する報告は少ない (Chen et al., 2019a; Chen et al., 2019b; Wang et al., 2013.)。Yin et al. (2005) は *BEH1-4* タンパク質が BR 依存的に脱リン酸化を受けることから、4 ホモログと BR シグナル伝達の関連性を指摘しているが、BR 経路での 4 ホモログの役割は不明のままである。また、*BES1* と *BZR1* を加えた 6 因子のアミノ酸構造が類似していることから (Zhao et al., 2002; Figure 3)、6 つの転写因子は冗長的に働いていると推測される。これまでの BR シグナル伝達研究の進展をまとめると以下ようになる。*BES1* と *BZR1* を中心とした精力的な研究を通じて BR 経路の概観が明らかになると共に、BR 経路とその他の細胞内シグナル伝達経路とのクロストークがいくつか発見された。しかし、4 つの *BEH* ホモログが本当に BR シグナル伝達に関与するのか、もしそうであるならば BR 経路内でどのような役割を果たすか、また、他経路とのクロストークに関与するのかといった疑問は未解決のままである。したがって、今後、上記事項に対する理解をさらに深めるためには、*BEH1-4* の分子生物学的・生理学的な特徴づけは不可欠と考えられる。

上述のような背景を踏まえ、筆者は BR 作用機序の総合的理解を目指すための一歩として、*BES1/BZR1* ファミリー全 6 遺伝子の発現を詳細に解析した。さらに *BEH2* に着目し、同転写因子の機能を解明するため、レポーターシステム、変異体、過剰発現体などを駆使して解析を進めた。本博士論文ではこれまでの研究を通じて得られた

BEH ホモログに関する新たな知見を報告する。尚、研究内容は大きく 2 つに分類されるため、以下の 2 章に分けて報告する。(第 2 章)【bHLH 転写因子を暗号化する *BES1/BZR1* ファミリー遺伝子のシロイヌナズナにおける発現プロファイル】と、(第 3 章)【ブラシノステロイドシグナル伝達におけるシロイヌナズナ *BES1/BZR1* homolog 2 の動態と機能】である。

1-2節 図表

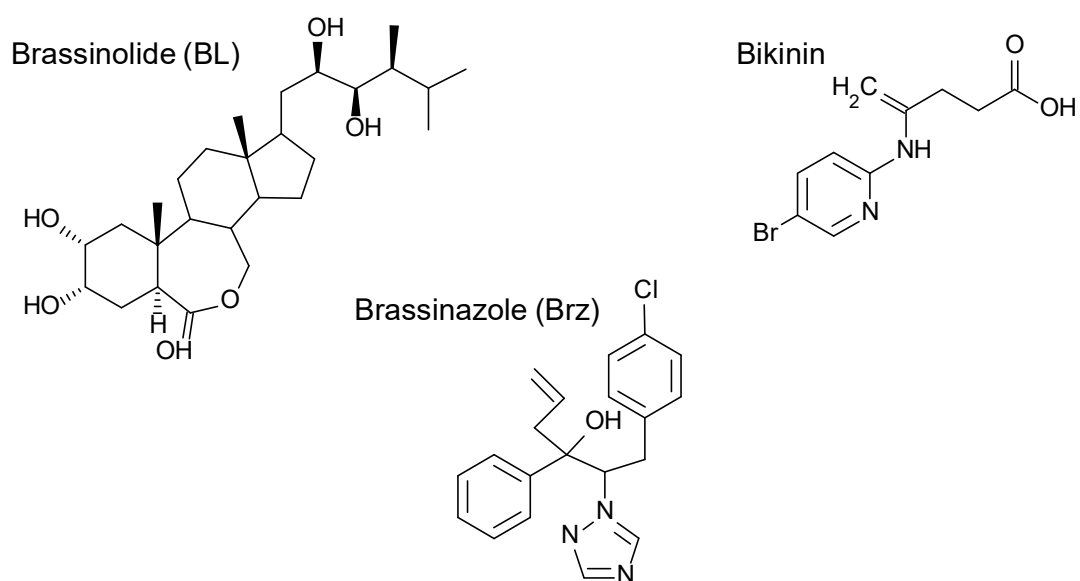
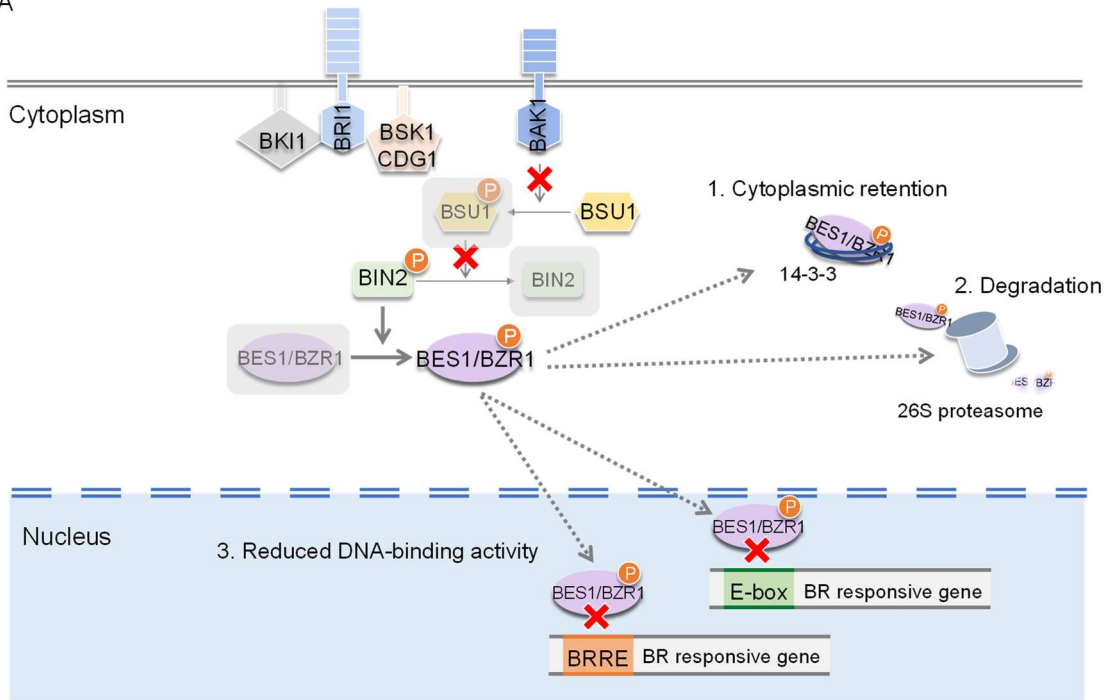


Figure 1. Chemical structure formulas of brassinolide and two BR related inhibitors

Brassinolide (BL) is the most bioactive BR. Brassinazole (Brz) is a specific BR biosynthesis inhibitor which binds and suppresses an enzymatic activity of C-22 hydroxylase, DWF4. BIKININ is a specific inhibitor of plant GSK3-like kinases such as BIN2, and thus can activate BR signal transduction in the absence of BL.

A



B

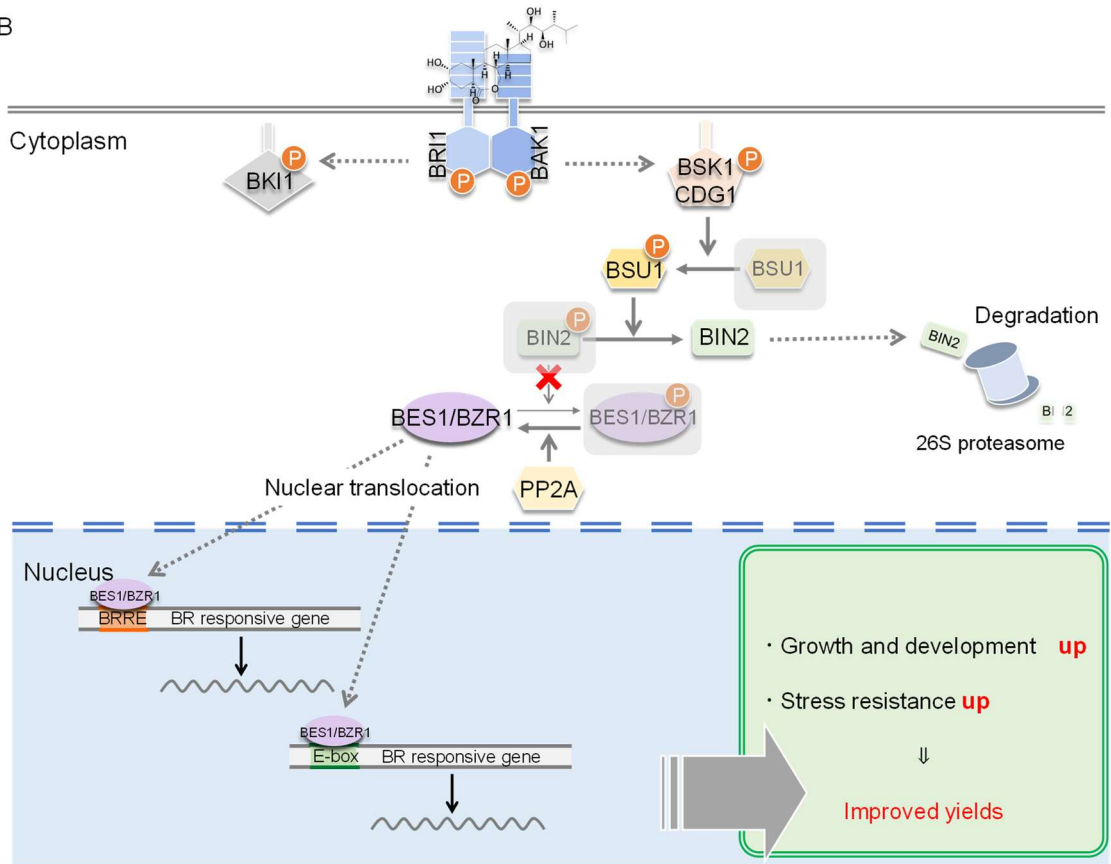


Figure 2. Outline of BR signaling pathway in *Arabidopsis*

(A) When endogenous BR levels are declined, BRI1 KINASE INHIBITOR 1 (BK11) interacts with BRI1 receptor kinase and inhibits its activity. At the same time, by BIN2 kinase, both BES1 and BZR1 transcription factors are phosphorylated and inactivated through several reactions, including cytoplasmic sequestration by 14-3-3 protein, 26S proteasome-mediated degradation, and reduced binding activity to the target promoter. (B) When BRs are perceived by the extracellular domain of BRI1, BRI1 and BRI1-associated receptor kinase 1 (BAK1) form a heterodimer complex and transphosphorylate each other. The complex in turn phosphorylates BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE 1 (BSK1) and CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH 1 (CDG1) kinases that interact with and activated BRI1 SUPPRESSOR 1 (BSU1) phosphatase. Activated BSU1 dephosphorylates BIN2, leading its degradation by 26S proteasome. In addition, PP2A phosphatase promotes the dephosphorylation of BES1 and BZR1. As a result, the two transcription factors BR-dependently regulate thousands of their target genes through binding to either E-box or BRRE motifs in their promoters. Hence, BES1 and BZR1 can lead a plethora of BR-mediated processes associated with plant growth and development as well as stress resistance.

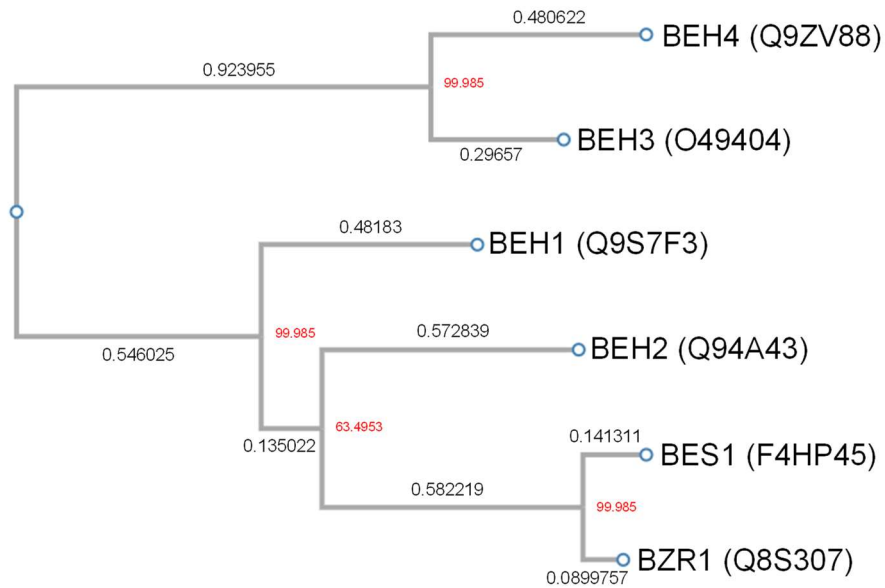


Figure 3. The phylogenetic tree of BES1/BZR1 family proteins

The phylogenetic tree of BES1/BZR1 family proteins with branch length was constructed using neighbor-joining method based on ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). The letters in parentheses indicate UniProt ID. The black and red numbers indicate branch length and the values of 1000 bootstrap replicates, respectively.

第2章 bHLH 転写因子を暗号化する *BES1/BZR1* ファミリー遺伝子のシロイヌナズナ における発現プロファイル

2-1 節 緒言

上述のように、BR シグナル伝達は複数のキナーゼとホスファターゼによるリン酸リレーによって精巧に制御されている。これまで *BES1* と *BZR1* は BR 経路下流で働く鍵転写因子として着目され、精力的に研究されてきた (Li et al., 2018)。一方、*BES1/BZR1* ホモログである *BEH1-4* の研究は前 2 者のそれと比べると少ないものの、いくつか報告はある。例えば、前述のように *BEH* ホモログは BR 依存的なリン酸化制御を受ける (Yin et al., 2005)。加えて、*BEH1* 以外の 3 ホモログは、*BES1*・*BZR1* と同様にストリゴラクトンシグナル伝達の正の制御因子である *MORE AXILLARY GROWTH 2 (MAX2)* と結合することが明らかになった (Wang et al., 2013)。このことは、BR とストリゴラクトン間の新たなクロストークの存在を示唆する。また、ダイズの *BEH1* ホモログである *GmBEHL1* は根粒形成に関係する転写因子 *Nodule Number Control 1* と結合することから、根粒形成に関与することが報告されている (Yan et al., 2018)。さらに、Furuya et al. (2021) は、*beh3* 変異体アリの維管束サイズが不揃いであることから、*BEH3* が二次的な維管束の発生を制御し、この過程の安定器 (stabilizer) として機能することを報告している。しかしながら、これらの報告において *BEH* ホモログは、論文内で主役 (主題) として扱われるタンパク質 (遺伝子) のパートナー (補助因子、脇役) として扱われることが多く、*BEH* ホモログ自身の細胞内における動態に着目した研究はない。

BR シグナル伝達や BR 生合成関連因子の変異体は優良な栽培品種となり得る。実際に品種として現場で利用されてきた耐雪性を持つソラマメの *rinrei* 変異体、倒伏耐性を持つオオムギの *uzu* 変異体の原因遺伝子はそれぞれ BR 生合成酵素遺伝子 *DWARF4* (*DWF4*) と BR 受容体を暗号化する *BRI1* であることが後に明らかにされた (Chono et al., 2003; Fukuta et al., 2004)。最近、園芸作物を用いた BR の効果や作用機序の研究も多くなされている。Wang et al. (2019) はトマトの *SIBRI1* について、*SIBRI1* の弱いアレル *cu3^{abs1}* を持つ変異体に正常な *SIBRI1* とリン酸化ドメインにミスセンス変異を持つ *SIBRI1* (*T1050A*) をそれぞれ相補したところ、*SIBRI1* (*T1050A*) の方が BR シグナルを強め、トマトの収量を増加させると報告している。上記の知見は、BR 関連遺伝子が作物育種の標的遺伝子の候補になりうること、そして、BR 作用機序の解明が関連遺伝子の有効利用に繋がることを示唆する。

筆者は BR 作用機序の総合的理解を目指すための第一歩として、*BES1/BZR1* ファミリー、特に *BEH1-4* の発現を詳細に解析した。本章では得られた結果に基づき BEH ホモログ個々の機能について議論する。

2-2 節 材料及び方法

2-2-1 項 試薬

試薬類は、特記しない限り富士フィルム和光純薬 (株) から購入した。本研究で使用した植物ホルモンは、BR (brassinolide; BL) (Brassino Co. Ltd, Toyama, Japan)、オーキシシン (indole-3-acetic acid; IAA) (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)、サイトカイニン (6-benzylaminopurine; BA)、ジベレリン (gibberellin A3; GA₃) (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan)、アブシジン酸 (abscisic acid; ABA)、エチレン (1-aminocyclopropanecarboxylic acid; ACC)、ジャスモン酸 (jasmonic acid; JA)、サリチル酸 (salicylic acid; SA) である。上記の植物ホルモン類に加えて、BR と ABA の生合成阻害剤であるブラシナゾール (brassinazole; Brz) とアバミン SG (abamine SG; ASG) を使用した。上記のホルモン類及び阻害剤は ACC 以外全てジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide; DMSO) に溶解し、DMSO の終濃度が 0.1%以下になるように 1/2 MS 培地に添加した。一方、ACC は Milli-Q 水に溶解した。

2-2-2 項 植物と生育条件

実験にはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型 Columbia (Col-0) 生態型とこれを親系統として作出した *BEH4::GUS* 形質転換体を用いた。種子の滅菌と固形培地への播種の手順は基本的に Tanaka et al. (2003) の方法に準じた。但し、種子の滅菌に用いる次亜塩素酸ナトリウムの濃度を 5%から 2.5%に、また、1/2 MS 培地のゲラン

ガムの濃度を 0.5% から 0.32% に変更した。シロイヌナズナの日齢は 22°C の恒温培養器で栽培を開始した日を 0 日目として数えた。また、空調を施した植物培養室でポット栽培する場合、直径 6.5 cm もしくは 7.5 cm のプラスチックポットに満たしたバーミキュライト上に種子を直接播き、24°C、16L:8D の光条件下で栽培した。

2-2-3 項 プラスミド構築と植物の形質転換

プラスミド構築に用いたオリゴヌクレオチド (PCR プライマー) の配列は Table 1 に示した。 *BEH4* プロモーターと β グルクロニダーゼ (β -glucuronidase; *GUS*) 構造遺伝子との転写融合遺伝子 (*BEH4::GUS*) の構築は以下のように行った。本実験では、遺伝子間領域ほぼ全長を含む当該遺伝子翻訳開始点より上流約 1.3 kb を *BEH4* プロモーターとした。初めに、KOD DNA ポリメラーゼ (Toyobo Co. Ltd., Osaka, Japan) を用いた PCR でシロイヌナズナのゲノム DNA から *BEH4* プロモーター断片を増幅した。得られた PCR 断片を pUC118 プラスミドの *Sma*I 切断部位に挿入した後に、塩基配列を解読してクローニングされた配列がデータベースに登録された配列と一致することを確認した。その後、プライマー内に設計した *Xba*I と *Bam*HI 部位でクローニングされた *BEH4* プロモーター配列を切り出し、制限酵素 *Xba*I と *Bam*HI で直鎖状にしたバイナリーベクター・pBI101-Hm プラスミド (Yoshimitsu et al., 2011) と結合した。これらの切断部位は *GUS* 構造遺伝子の 5' 側近傍に位置するので、*BEH4* プロモーターと *GUS* 構造遺伝子の転写融合遺伝子ができる。続いて、エレクトロポレーション法により上記のプラスミドをアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株) に導入した。上記のプラスミドを持つアグロバクテリウムをフローラルディップ法 (Narusaka et al., 2010) に供試し、*BEH4::GUS* 形質転換シロイヌナズナ (Col-0 バックグラウンド) を得た。

2-2-4 項 薬剤の処理

逆転写 PCR (RT-PCR) 解析に供試する植物の薬剤処理は、Tanaka et al. (2005) の方法に準じて行った。GUS 染色に供試する植物の薬剤処理は、次のように行った。*BEH4::GUS* 形質転換体を 1/2 MS 固形培地に播種し、暗所で 3 日間低温処理を行った。続いて、植物体を ABA (1 μ M)、もしくは ASG (50 μ M) を含む固形培地へ移植し、明所 24°C の条件下で一定期間栽培後に組織化学的 GUS 染色に供試した。

2-2-5 項 RNA 抽出

シロイヌナズナ実生からの全 RNA 抽出は、基本的に Tanaka et al. (2005) の手順に準じて行った。抽出した RNA は、1.6% アガロースゲルで泳動し、臭化エチジウムで染色してその品質を確認した。その際、18S と 25S リボソーム RNA の割合と分解程度を品質確認のための指標とした。実験目的によりゲノム DNA の混在が問題になる際には DNase I による処理を施した (Nippon Gene Co. Ltd., Tokyo, Japan)。

2-2-6 項 逆転写 PCR (RT-PCR)

mRNA 量の解析は、定量的 RT-PCR 法 (qRT-PCR 法、リアルタイム PCR) または半定量 RT-PCR 法 (semi qRT-PCR 法) を用いて行った。

全 RNA を鋳型とした cDNA の合成には ReverTra Ace キット (Toyobo Co. Ltd.,

Osaka, Japan) を用いた。リアルタイム PCR の反応には Green Master Mix (Power SYBR; Thermo Fisher Scientific Inc., NY, USA) を、反応産物の解析には real-time PCR system (ABI 7300; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。一方、semi qRT-PCR は Tanaka et al. (2005) の方法に従って行った。本解析で PCR プライマーとして使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列とアニーリング温度は Table 1 に列記した。

2-2-7 項 レポーター解析

組織化学的 GUS 解析は基本的に Yoshimitsu et al. (2011) の方法に従って行った。GUS 活性の染色像はデジタルカメラ (Power Shot S5 1S; Canon Inc.) で撮影した。尚、14 日齢以降の植物体を染色する際には、以下の通り GUS 染色反応の前にアセトン処理を行った (Brumos et al., 2018)。まず、植物体を 90%アセトンに 5 分間浸漬し、続いて、逆浸透膜水 (ROW; reverse osmosis membrane water) で 3 回洗浄することで同有機溶媒を除いた。その後は通常通り GUS 染色を行った。アセトンを用いた前処理の有効性は、基質 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) の浸透を阻む表皮クチクラ層を取り除くことにあると考えられている。

2-3節 結果

2-3-1 項 *BESI/BZRI* ファミリー遺伝子の時空間的発現パターン

初めに *BESI/BZRI* ファミリー6 遺伝子の各成長段階における発現様式を調べるため、生育 1-4 週目のシロイヌナズナに由来する RNA を qRT-PCR に供試した。Figure 4 に示したように、6 遺伝子の発現量は生育前期 (生育 1、2 週目) では殆ど変化しなかったが、その後成長に伴って増加した。生育 3、4 週目になると、1 週目と比較して *BEHI* の発現量は 4 倍ほど増加した。一方、他の 5 遺伝子はおよそ 2 倍程度に増加した。semi qRT-PCR を用いて、生育 2 週間目の実生における発現量を 6 遺伝子間で大まかに比較したところ、他 5 遺伝子の PCR 産物は 24 サイクル目にはっきりと確認できた一方で、*BEHI* の PCR 産物が明確に確認できたのは 26 サイクル目であった。このことから生育 2 週間目の実生において *BEHI* の発現量は他 5 遺伝子の 1/2 から 1/4 程度であると考えられた (Figure 5)。以上の結果をまとめると、この実験を通じて、①*BESI/BZRI* ファミリーメンバーの mRNA は成長に伴って増加すること、②生育早期において *BEHI* の発現量は他の 5 遺伝子に比べ少ないこと、③生育後期になると *BEHI* の発現が大きく上昇するため、結果的に 6 遺伝子の発現量はほぼ同程度になることが分かった。

次に、*BESI/BZRI* ファミリーの遺伝子発現における器官特異性を明らかにするため、根、ロゼット葉、茎生葉、花茎、花、鞘から抽出した RNA を用いて qRT-PCR を行った。Figure 6 に示したように、6 遺伝子は調べた全ての器官で発現していたが、発現パターンは互いに大きく異なっていた。しかし、一部遺伝子間では類似した発現パターンも見られた。6 遺伝子は発現パターンに基づいて 2 つのグループに分類できた。

1 つ目のグループ (*BES1*・*BEH1*・*BEH3*) は、器官ごとの発現量が大きく異なるという特徴を持っていた。対照的に 2 つ目のグループ (*BZR1*・*BEH2*・*BEH4*) は、器官ごとの発現量の差が比較的少なかった。1 つ目のグループを詳細に見ると、*BEH1* はロゼット葉、*BEH3* は根でよく発現していた。このことは *BEH1*、*BEH3* タンパク質がそれぞれロゼット葉と根で機能する可能性を示している。加えて、*BES1* と *BEH1* の発現様式は互いによく似ていた。これらはロゼット葉で最もよく発現し、茎生葉と花茎で中程度に発現し、根、花、鞘ではあまり発現していなかった。この結果は、器官レベルで見ると *BES1* と *BEH1* が相補的に、もしくは協調的に機能する可能性を示している。対照的に、2 つ目のグループは調べた全ての器官でおおよそ同程度発現していたが、例外的に *BEH2* の鞘における発現量は少なかった。しかし、*BEH2* の鞘と花での発現量には統計的な有意差は見られなかった。*BZR1* と *BEH4* は器官ごとの発現量に大きな差はなかったが、面白いことに、これら 2 遺伝子は他の 4 遺伝子に比べて花や鞘といった生殖器官で発現するという特徴が見られた。

2-3-2 項 *BES1/BZR1* ファミリー遺伝子の様々なホルモンに対する応答性

BR はオーキシシン (Yoshimitsu et al., 2011) やジベレリン (Bai et al., 2012)、エチレン (Lv et al., 2018)、アブシジン酸 (Gui et al., 2016)、ストリゴラクトン (Wang et al., 2013) といった様々なホルモンとクロストークすることが報告されている。そこで、*BES1/BZR1* ファミリー遺伝子の発現制御を介したホルモンクロストークの有無を明らかにするために、*BES1/BZR1* ファミリー遺伝子の発現に対する BL を含む 8 種植物ホルモンの影響を調査した。Figure 7 に示すように、BL 以外の 7 つのホルモンによる 6 遺

伝子の発現への影響はそれほど大きくなかった。ABAは*BES1*、*BEH1*、*BEH4*、GA3は*BEH1*の発現をわずかに増加させたが、対照区と比較して2倍以上の増加をもたらすことはなかった。対照的に、BLは*BEH1*と*BEH2*の発現を顕著に減少させ、*BES1*の発現をわずかに増加させた。*BEH2* mRNA量はBL投与後4時間目には対照区の1/5程度まで減少し、mRNA量の水準は24時間目も同程度に保たれていた。一方BLは*BEH1* mRNA量を1/2程度まで減少させた。

BLが*BEH1*と*BEH2*の発現を抑制することが明らかになったので、これら遺伝子の発現に対するBRの影響をより詳細に明らかにするため、BL及びBR生合成阻害剤・Brzの影響を経時的に解析した。尚、この試験ではBLに対する感度を上げるため、生育2週間目の実生にBrzを2日間前処理し、内生BR量を十分に減少させた後にBL処理を行った。Figure 8Aに示したように*BEH1*と*BEH2*の発現量は著しく減少した。*BEH2* mRNAはBL処理後0.5時間目にほぼ1/2程度まで減少し、4時間目までに1/10まで達した。さらにこの発現量は24時間目まで維持された。同様に、*BEH1* mRNAは投与後2時間で1/2まで減少し、この発現量は24時間目までほぼ変化しなかった。続いて、Brzが単独でこれら2遺伝子の発現に影響するかどうか調べた。*BEH2* mRNA量はBrzによって処理時間依存的に増加した。しかしながら、*BEH1* mRNA量は大きく変化することはなかった (Figure 8B)。この結果は、*BEH1*と比較して*BEH2*遺伝子は内生BR量の変動によって厳密に制御されていることを示している。これまでの研究から、*BES1*や*BZR1*はプロモーター上にあるシスエレメントBRRE (CGTGT/CG)やE-box (CANNTG)に結合し、標的遺伝子の転写を制御していることが分かっている (Sun et al., 2010; Yu et al., 2011)。そこで、*BEH1*や*BEH2*遺伝子の5'上流領域にBRREやE-boxが存在するかどうか調べた。Table 2に示したように、*BEH1*と*BEH2*はこれらエレメント

を複数含んでいた。BRRE と E-box の一種である G-box (CACGTG) は *BEH1* (BRRE;2、G-box;2) よりも *BEH2* (BRRE;7、G-box;5) に多く存在していた。尚、G-box も含めた全 E-box 数は 2 遺伝子でほぼ等しかった。この解析から BR による *BEH1* と *BEH2* 発現の下方制御は *BES1* や *BZR1* を介していると考えられた。また、シスエレメントの種類や数、配置の違いが BR による異なる制御を導くと考えられた。

2-3-3 項 *BEH4* 遺伝子：組織・細胞水準の発現様式

qRT-PCR を用いた成長段階特異性 (Figure 4)、器官特異性 (Figure 6)、及びホルモン応答性 (Figure 7) に関する発現解析は、*BES1/BZR1* ファミリー 6 遺伝子のうち *BEH4* の発現がユビキタスであり、一生を通じて比較的恒常的であることを示した。このことは、*BEH4* が多くの細胞に必要とされる基本的な代謝に関わる、すなわちハウスキープ遺伝子として機能することを想像させる。そこで、*BEH4::GUS* 形質転換体を用いて *BEH4* の発現を組織化学的に解析した。その結果、生育前期 (生育 1、2 週目) から生育後期 (生育 3 週目以降) まで形質転換体のほぼ全ての器官が GUS 活性により青色に染色されることが明らかになった (Figure 9A, 9B)。GUS 活性に基づく染色像は、qRT-PCR の結果と矛盾なく (Figure 4, 6)、*BEH4* の発現が器官によらず概ねユビキタスであることを示している。しかしながら、組織・細胞水準で見ると時間・空間依存的な発現も観察された。例えば、根端 (Figure 9A; a, c) や花柱 (Figure 9B; g)、珠柄 (Figure 9B; i) は同器官内の他の部位よりも強く染色されていた。また、発芽直後の実生はまったく染色されなかった (Figure 9C) が、生育 6 時間目には実生全体でわずかに GUS 染色が見られ、生育時間の経過と共に GUS 染色は強くなっていった (生育 12–48 時間目)。こ

の時、特に主根の根端付近で GUS の強い染色が見られた。しかしながら、生育 12 時間目の根冠付近や生育 48 時間目の根毛では GUS 染色は見られなくなった。*BEH4* の発現における組織・細胞水準の特異性は葉の表皮組織でも観察された。Figure 9D に示したように、葉の種類 (子葉、ロゼット葉、茎生葉) や成長段階 (生育 1-4 週目) に関わらず、孔辺細胞で GUS 活性による強い染色が見られた。さらに孔辺細胞に隣接している敷石細胞は染色されるが、それら以外の孔辺細胞と接していない敷石細胞は染まらない傾向にあった。加えて子葉では、孔辺細胞とは隣接していない比較的小さな細胞が、しばしば青く染色された。この細胞はおそらく気孔の発生系譜、すなわち孔辺細胞の分化途上にある細胞であると推察されたが、このことを証明するには更なる研究が必要である。以上の結果をまとめると、*BEH4* の発現は、器官水準で見ると植物の生涯を通してユビキタスであるのに対して、組織・細胞水準では時間・空間的な特異性を有すると考えられた。

2-3-4 項 若い実生における *BEH4* 発現に対する ABA の影響

発芽やその後の実生の成長に対して、BR とアブシジン酸は拮抗的に働くとの報告がある (Saini et al., 2015)。前述の通り、*BEH4* の発現は、発芽後、実生の成長に伴って増加した (Figure 9C)。そこで、*BEH4* 遺伝子プロモーター上に既知のアブシジン酸応答に関与するシスエレメントがあるか調査したところ、ABA responsive elements (ABRE) 様エレメントが 2 つ、RAV1-A binding site motifs (RAV1-A) が 6 つ見つかった (Figure 10A, Table 3)。また、生育 2 週間目の植物体を用いた qRT-PCR 解析は、4 時間の ABA 処理が *BEH4* の発現を対照区の 1.7 倍に増加させることを示した (Figure 7)。以上

の結果から、*BEH4* は mRNA レベルでアブシジン酸により上方制御を受けており、発芽直後の実生でなんらかの働きを持つとの作業仮説を立てた。そこで、上記の作業仮説を検証するため *BEH4::GUS* 植物体の実生を用いて ABA 量の変動が *BEH4* の発現と成長に与える影響を調べた。Figure 10B に示すように、1 μ M の ABA を投与したとき、実生の成長は著しく遅れた。ABA 処理した生育 5 日目の実生は生育 1 日目の対照区の実生と形態的に似ていた。一方、*BEH4::GUS* 融合遺伝子に由来する GUS の染色像は、ABA の投与による時間的な遅延は見られたが、GUS の発現部位や強度の変化はなかった。事実、ABA 処理 1-5 日目の実生の染色像は、ABA 非存在下で 12-24 時間生育させたものとよく似ていた (Figure 9C, 10B)。対照的に ABA の特異的阻害剤である ASG (50 μ M) は実生の成長にも GUS 染色像にも影響を与えなかった (Figure 10B)。これらのことから、直接的か間接的かは不明であるが、ABA が発芽直後の実生における *BEH4* の発現を遅延させたと考えられた。

2-4 節 考察

BES1 と BZR1 は BR シグナル伝達に不可欠な転写因子であると共に、様々な内生シグナルや外生刺激と BR シグナルのクロストークにおいて重要な役割を担っている (Manghwar et al., 2022)。しかしながら、それらのホモログタンパク質 (BEH1-4) に関する研究は、BES1 や BZR1 の研究よりもはるかに遅れている。4 ホモログタンパク質は BL によって脱リン酸化されることは分かっているが (Yin et al., 2005)、BR シグナル伝達経路で働くか、そうであるならば、どのような機能を持つかは不明のままである。そこで、筆者は 4 ホモログに関する新たな知見を得るために *BES1/BZR1* ファミリー遺伝子の発現を、特に 4 ホモログ遺伝子に焦点を当て解析した。ここでは得られた発現プロファイルに基づいて、4 つのホモログ因子の生理機能について議論する。

6 つの *BES1/BZR1* ファミリー遺伝子は 1-4 週齢の植物体で常に発現していた (Figure 4)。また、6 遺伝子の mRNA 量は生育前期 (生育 1、2 週目) と比較して生育後期 (生育 3、4 週目) で増加していた。筆者が設定した実験条件では栄養成長期から生殖成長期への転換は生育 2 週目と 3 週目の間に起こると見積もられたので (Figure 9)、6 遺伝子は栄養成長期に加え、成長様式の転換期や生殖成長期により重要な役割を持つと考えられた。

BES1/BZR1 ファミリー 6 遺伝子は、一部類似する部分も見受けられたが、それぞれ異なる器官特異的発現を示した (Figure 6)。その中で、*BEH1* の発現は注目に値する。なぜならば *BEH1* は植物の成長に伴い著しく発現増加した (Figure 4) にも関わらず、花や鞘といった生殖に密接に関係する器官では殆ど発現していなかったからである。このことは *BEH1* が生殖成長期に重要な働きを持つものの、生殖器官以外の器官 (例え

ば、花茎や茎生葉など) で機能することを示唆する。対照的に、*BZR1* と *BEH4* は他のメンバーと比較してより花や鞘で発現していた (Figure 6)。さらに *BEH4* の発現は花において雌ずいと雄ずいの両方で見られた (Figure 9B)。Jiang et al. (2013) は *BZR1* が種子の外皮や胚乳、胚で機能するいくつかの遺伝子を制御することを報告している。ごく最近、*beh4* の欠損を含む *BES1/BZR1* ファミリー遺伝子の 4 重変異体以上の多重変異体が正常な種子を形成できないこと、また、その原因の一つは葯の発生異常であることが報告された (Chen et al., 2019a)。筆者が得た結果は、これらの従前の報告と概ね矛盾せず、*BEH4* も *BZR1* と同様に種子形成に貢献することを示しているのかもしれない。以上をまとめると、*BES1/BZR1* ファミリーの 6 タンパク質は構造の類似性 (Zhao et al 2002) や遺伝的な冗長性 (Chen et al., 2019a; Saito et al., 2018) から推測されるように互いに相補的な分子機能を持つことに加え、器官水準や発生段階別に発現様式を変えることで、部分的に各遺伝子に固有の生理機能も持ち合わせていることが推測された。

BR は様々な過程を通じて他の植物ホルモンとクロストークすることが知られている (Bai et al., 2012; Gui et al., 2016; Lv et al., 2018, Wang et al., 2013; Yoshimitsu et al., 2011)。それは例えば、BR の生合成・不活化・分解といった代謝過程を通じて、また、BR シグナル伝達経路を通じて達成される。しかしながら、本研究で行った qRT-PCR 解析では、BR 以外の植物ホルモンによる *BES1/BZR1* ファミリー6 遺伝子の発現に対する影響は概ね確認できなかった (Figure 7)。濃度や処理時間を含め、より広範な条件を検討する必要があるが、*BES1/BZR1* ファミリーを介した mRNA 水準でのホルモン間クロストークの可能性は低いのかもしれない。BR シグナル伝達経路において *BES1* と *BZR1* は (1) リン酸化・脱リン酸化制御、(2) 核—細胞質輸送、(3) プロテアソームを介した分解、そして (4) DNA 結合能の調節といったタンパク質水準の制御を受けることが報

告されている (Gampala et al., 2007; He et al., 2002; Ryu et al., 2010; Vert & Chory, 2006; Zhao et al., 2002,)。このことから類推すると、BES1/BZR1 ファミリーメンバーを介した BR とその他ホルモンとのクロストークは主にタンパク質レベルで起こっているということも考えられる。

BR による *BEH1*・*BEH2* 両遺伝子の mRNA 水準の発現制御は注目に値する (Figure 7)。上述のように、BL による脱リン酸化は *BEH1-4* も BR シグナル伝達経路に関与することを想像させる (Yin et al., 2005)。筆者が得た「BL が *BEH1* と *BEH2* の mRNA 量を減少させる」という結果は、これら 2 因子が BR シグナル伝達に関わるという考えをさらに強めた。また、*BEH1* の mRNA が BL のみに応答して減少し、Brz に応答しなかったのに対して、*BEH2* の mRNA が BL と Brz の両方に応答し、それぞれ減少、増加したことは興味深い (Figure 7, 8)。このことは BR がこれら 2 遺伝子の発現を異なる様式で制御していることを示している。Tanaka et al. (2005) は今回の結果とよく似た結果を報告している。彼らは 4 つの BR 合成特異的な生合成遺伝子 (*DWF4*, *CPD*, *BR6ox1*, *ROT3*) の発現が BL と Brz の両方によって制御されるのに対して、ステロール生合成遺伝子 (*DWF7*) と BR 不活化に関係した遺伝子 (*BASI*) は BL によってのみ制御されると報告している。BR 合成特異的な 4 つの酵素遺伝子は BR 生合成の中心反応を担うので、これらの遺伝子の発現は取り巻く状況変化に素早く対応して BR 量を適正化し、その恒常性を維持するためにより厳密に制御されているのかもしれない。前述の通り、*BEH1* は *DWF7* や *BASI* と同様に BL のみに応答したのに対して、*BEH2* は BR 合成特異的な 4 遺伝子と同様に BL と Brz の両方に応答した。この BR による発現制御の違いは、*BEH1* と比較して、*BEH2* が植物にとって重要な役割を持つことを示しているのかもしれない。

では *BEH1* と *BEH2* の発現はどのようにして BR によって負に制御されているのであろうか。従前の研究は BRRE (CGTGC/TG) が BR による抑制を受ける遺伝子のプロモーター上に、E-box (CANNTG) が BR によって促進される遺伝子のプロモーター上によく保存されていることを示している (Sun et al., 2010; Yu et al., 2011)。これらシスエレメントは BES1 と BZR1 の両方によって認識される。Sun et al. (2010) はさらに E-box の一種である G-box (CACGTG) もまた BR 抑制遺伝子上によく保存されていると記述している。筆者が検索したところ、*BEH1* や *BEH2* のプロモーター上にはこれらシスエレメントが数多く存在することが明らかになった (Table 2)。さらに、BRRE と G-box エレメントは *BEH1* よりも *BEH2* 上によく保存されていた。前述のように、*BEH2* の mRNA 量は *BEH1* と比較して BL によってより素早く、そしてより大きく減少した (Figure 8)。BR に対する両遺伝子の応答の違いには、上記のシス・エレメントの種類や数の違いが影響しているのかもしれない。Nosaki et al. (2018) は最近、*in vitro* の実験において、非典型的な bHLH 型転写因子である BES1 や BZR1 は NN-BRRE (NNCGTG) と G-box の両方に結合できるのに対して、PIF4 や BEE1、BIM1 などの典型的な bHLH 型転写因子は G-box に優先的に結合すると報告している。この報告は BL による *BEH1* と *BEH2* の発現抑制がどちらの場合も BES1 や BZR1 がこれらのエレメントへ結合することで起こるという考えを支持するが、その制御の詳細は異なるのかもしれない。いずれにせよ、BR による *BEH1*、*BEH2* 遺伝子の発現制御の分子メカニズムを解明するためにはさらなる研究が必要である。

BES1/BZR1 ファミリーの中で最も恒常的に発現していた *BEH4* もまた興味深い (Figure 4-7)。この発現様式から *BEH4* はより普遍的な機能、すなわちハウスキーピング様の機能を持つと推測された。これらの結果に加えて、成長段階に関わらず

*BEH4::GUS*形質転換体の全体が GUS 活性により強く染色された (Figure 9A, 9B) ことも、*BEH4* がハウスキーピング様の機能を持つという考えを支持する。しかしながら、組織・細胞レベルで詳細に観察すると *BEH4* の発現にいくらかの特異性があることが明らかになった。葉の表皮細胞においては生育段階に関わらず *BEH4* の発現は孔辺細胞とその周辺の敷石細胞に限られていた (Figure 9D)。加えて、生育 1 週間目の子葉の表皮では、孔辺細胞から離れて存在する小さな細胞も染色されていた。こういった小さな細胞はメリステモイド母細胞、メリステモイド細胞、stomatal lineage ground cells、孔辺母細胞などの気孔系譜細胞である可能性が考えられる (Lee & Bergmann, 2019)。

BEH4 の発現のうち、葉の気孔系譜細胞における発現様式は特に興味深い。なぜならば、BR は BIN2 キナーゼの不活化を介して気孔の発生を抑制することが報告されているからである (Kim et al., 2012)。BIN2 は BR シグナル伝達の負の制御因子として働くことに加え、気孔形成の正の制御因子として機能する。さらに、Lau et al. (2014) はメリステモイド数が増加した表現型を示す変異体シロイヌナズナにおいて、気孔形成過程の下流で機能する転写因子・SPCHLESS (SPCH) が *BEH4* のプロモーター上に結合し、発現を増加させると報告している。このことは *BEH4* が気孔形成に関与することを強く示唆する。加えて、成熟した孔辺細胞において *BEH4* が発現していることも興味深い。

なぜならば、BR はアブシジン酸との間で BAK1 を取り合うことでアブシジン酸による気孔の閉鎖に対して拮抗的に働くことが報告されているからである (Shang et al., 2016)。

葉表皮細胞における特異な発現様式から、筆者は *BEH4* が気孔形成や気孔開閉に対してなんらかの働きを持つと推測するが、*BEH4* の真の機能は不明のままである。実際のところ、機能欠損型の *beh4* 変異体における気孔と敷石細胞の数は、野生型植物体と比較して違いは見られなかった (未発表データ)。これに関してはファミリーの冗長性や

アレルの特性を考慮し、過剰発現体や多重変異体を含めた様々な *BEH4* の変異体、形質転換体を使った更なる研究が必要となる。しかしながら、現状においても、葉表皮で特徴的な発現を示す *BEH4* は気孔形成や気孔開閉の研究で使えるマーカー遺伝子としての資質を有する。葉表皮での特徴的な発現に加えて、*BEH4* の発現は種子発芽時やそれに続く実生の確立の間に劇的に変化した (Figure 9C)。この時期、アブシジン酸は主に発芽と成長を抑制し、ジベレリンや BR は発芽や実生の成長 (確立) を促進することが知られている (Shu et al., 2016)。では、発芽初期において何が *BEH4* の発現を制御しているのだろうか。栄養成長期 (14 日齢) の植物体では、上記 3 つのホルモンのうち ABA が *BEH4* の発現を僅かに増加させたのに対して、BR と GA はほとんど影響を与えなかった (Figure 7)。また、*BEH2* のプロモーター上にはアブシジン酸に関連するシスエレメントが数多く見つかった (Figure 10A)。そこで、初期実生を用いて *BEH2* 発現に対する ABA 及び ABA 合成阻害剤 ASG の影響を調べたが、得られた結果は解釈が難しいものとなった (Figure 10B)。すなわち、ABA は *BEH4* の発現のタイミングを遅らせたが、発現量や発現部位に影響することはなかった。したがって、この疑問に対する答えも将来の研究を待たねばならない。

2-5 節 図表

Table 1. Sequence of PCR-primers and their annealing temperatures used for this study

Name	Locus	Sequence	A.T. ^{a)}	Experiment
<i>ACT2</i>	<i>At3g18780</i>	5'- CCGCTCTTTCTTTCCAAGC -3'	55	qRT-PCR
		5'- CCGGTACCATTGTCACACAC -3'		
<i>EF1a4</i>	<i>At5g60390</i>	5'- GAGCCCAAGTTTTGAAGA -3'	55	
		5'- CTAACAGCGAAACGTCCCA -3'		
<i>BES1</i>	<i>At1g19350</i>	5'- ACCCGTTTTATGCGGTGTCT -3'	57	
		5'- AGCCGGAGCATGGAACATG -3'		
<i>BZR1</i>	<i>At1g75080</i>	5'- AACAGCCATTCTCTGCCTCTATG -3'	60	
		5'- TGAGGCGCAGGTTTCACA -3'		
<i>BEH1</i>	<i>At3g50750</i>	5'- CCTCCGTCGCCGACATT -3'	57	
		5'- CGGCTTCACCGACACATCTA -3'		
<i>BEH2</i>	<i>At4g36780</i>	5'- CGATAACAACGAGGTTCTTAAAGCT -3'	57	
		5'- TGGTGCCATCGTCTTCGA -3'		
<i>BEH3</i>	<i>At4g18890</i>	5'- TCCAAGCTTCCCTTCTTCCA -3'	60	
		5'- GGGCTTCGAGCCAATGG -3'		
<i>BEH4</i>	<i>At1g78700</i>	5'- CGGAGAGCAATCGCAGCTA -3'	57	
		5'- AATGCTTCGGAAGCTCGTAATT -3'		
<i>BES1</i>	<i>At1g19350</i>	5'- TGCGGCGAAGATTTATACTGG -3'	55	semi qRT-PCR
		5'- TCCAATCCTTCCCTCCGACA -3'		
<i>BZR1</i>	<i>At1g75080</i>	5'- TTTCGAGGGGTTGGTTGTTGGTTTT -3'	60	
		5'- ATGCCATTTGGGTTGCCTAGTTGT -3'		
<i>BEH1</i>	<i>At3g50750</i>	5'- TGCTCTCTTTTCTCCTCGTG -3'	56	
		5'- TTAAACCACGATATTAACCTAGCCG -3'		
<i>BEH2</i>	<i>At4g36780</i>	5'- CTTCAGACTCACACACACACC -3'	55	
		5'- TCCCATTTCATCCGGACATTC -3'		
<i>BEH3</i>	<i>At4g18890</i>	5'- CGTGTTATTTTTCCAAATTCGGTG -3'	54	
		5'- AGCAAACGACTTTGATTCTTCTCTG -3'		
<i>BEH4</i>	<i>At1g78700</i>	5'- TGAATTAGCTTGAGTTAGCTTCG -3'	54	
		5'- AGCTGTGTTTTAACTTTGAGCA -3'		
<i>BEH4</i> promoter	-	5'- CCTCTAGACGACTAGGATATATAGCAACCCGC -3'		Construction of <i>BEH4::GUS</i>
		5'- CCGGATCCACTACTCTCTGTTCTTCTTCC -3'		

a) Annealing temperature (°C)

Table 2. BRRE, E-box and G-box elements for BR response found in *BEH1* and *BEH2* promoter

gene	element	location from TSS ^{a)}		sequence (5'-3')
		(start)	(end)	
<i>BEH1</i>	E-box L1	-1528	-1523	CAGATG
	E-box L2	-800	-795	CATCTG
	E-box L3	-738	-733	CAAATG
	E-box L4	-604	-599	CACATG
	E-box L5 / G-box L1	-427	-422	CACGTG
	BRRE L1 / G-box L2	-359	-352	caCGTGCG / CACGTGcg
	E-box L6 / G-box L2	-357	-352	CACGTG
	BRRE L2 / G-box L2	-357	-350	caCGTGTG / CACGTGtg
	E-box L7	-181	-176	CAAATG
E-box L8	-29	-24	CAGATG	
<i>BEH2</i>	BRRE L1	-1170	-1165	CGTGCG
	E-box L1 / G-box L1	-1060	-1055	CACGTG
	E-box L2	-887	-882	CATTTG
	E-box L3	-864	-859	CAAATG
	E-box L4	-739	-734	CAGCTG
	BRRE L2 / G-box L2	-692	-685	caCGTGCG / CACGTGcg
	E-box L5 / G-box L2	-690	-685	CACGTG
	BRRE L3	-135	-130	CGTGCG
	E-box L6 / G-box L3	-115	-110	CACGTG
	BRRE L4 / G-box L4	-82	-75	caCGTGTG / CACGTGtg
	E-box L7 / G-box L4	-80	-75	CACGTG
	BRRE L5 / G-box L5	-63	-56	caCGTGTG / CACGTGtg
	E-box L8 / G-box L5	-61	-56	CACGTG
	BRRE L6 / G-box L5	-61	-54	caCGTGTG / CACGTGtg
	E-box L9	-49	-44	CAAATG
BRRE L7	89	94	CGTGCG	

^{a)} Transcription start site

Table 3. ABRE-like and RAV-1-like motifs for ABA response found in *BEH4* promoter

consensus / like	cis-element	sequence
consensus	ABRE consensus	PyACGTG / TC
like	ABRE L1	CACGTGGC
like	ABRE L2	GCACGTGGTA
consensus	RAV1-A binding site motif	CAACA
	RAV1-A L1	CAACA
	RAV1-A L2	CAACA
	RAV1-A L3	CAACA
	RAV1-A L4	CAACA
	RAV1-A L5	CAACA
	RAV1-A L6	CAACA

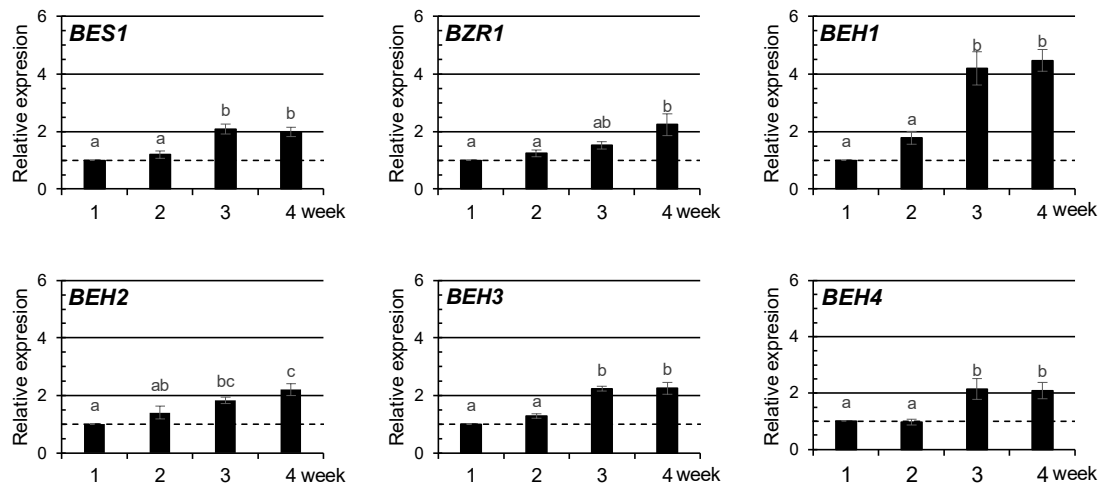


Figure 4. Growth-dependent expression of *BES1/BZR1* family members was examined using qRT-PCR. In the graphs, data are shown as relative values of the means with standard error (SE) (set 1 for 1-week-old), following normalization by that of *EF1aA4*. Statistical analyses were conducted using Tukey's test ($p < 0.05$).

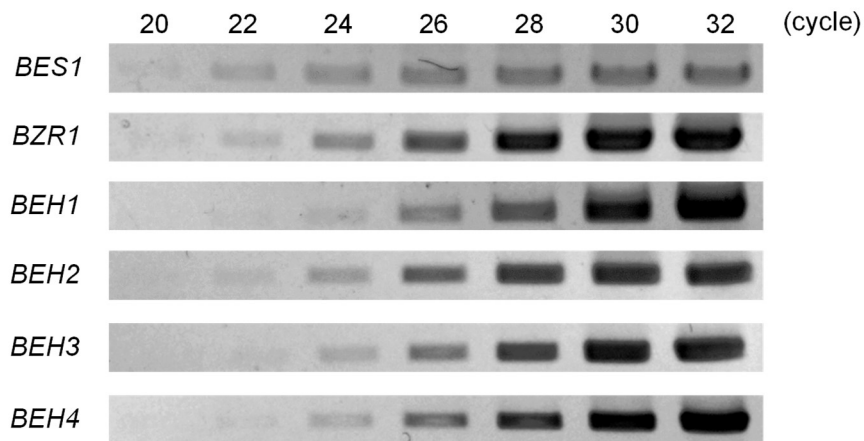


Figure 5. Expression levels of *BES1/BZR1* family members at an early growth stage were examined. Total RNAs prepared from 2-week wild-type *Arabidopsis* seedlings were subjected to semi-qRT-PCR with cycles of 20, 22, 24, 26, 28, 30, and 32 for rough comparison of mRNA levels between six *BES1/BZR1* family members. The PCR products were electrophoretically separated on 0.7% agarose gel and visualized using ethidium bromide. Similar results were obtained from biologically triplicated experiments, one of which is depicted in this figure.

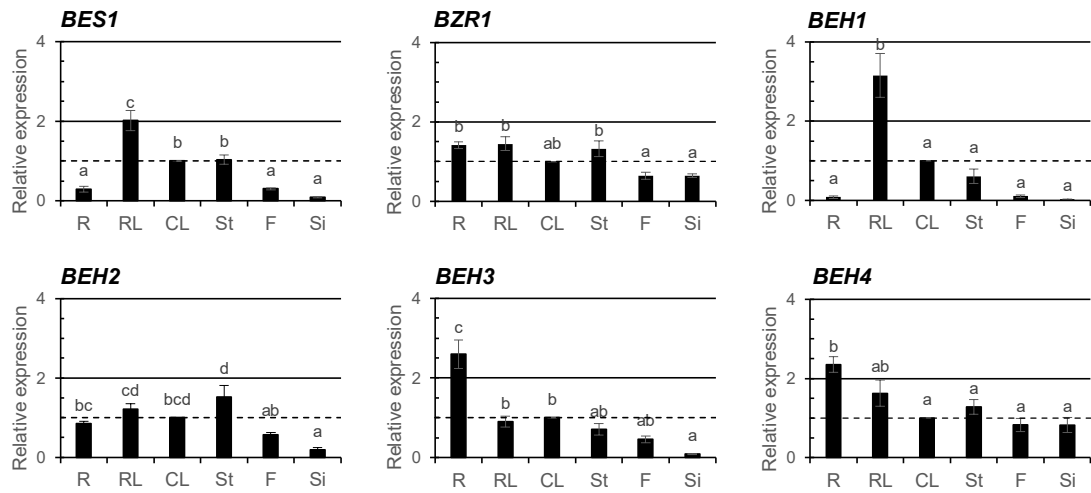


Figure 6. Organ-specific expression of *BES1/BZR1* family members was examined using qRT-PCR; the used organs were roots (R), rosette leaves (RL), cauline leaves (CL), and stems (St) prepared from 4-week-old plants as well as flowers (F) and siliques (Si) from 8-week-old plants. Graphed data are shown as the relative values of the means with SE (set 1 for CL). The presentation style of the graphs is identical to those in Figure 4.

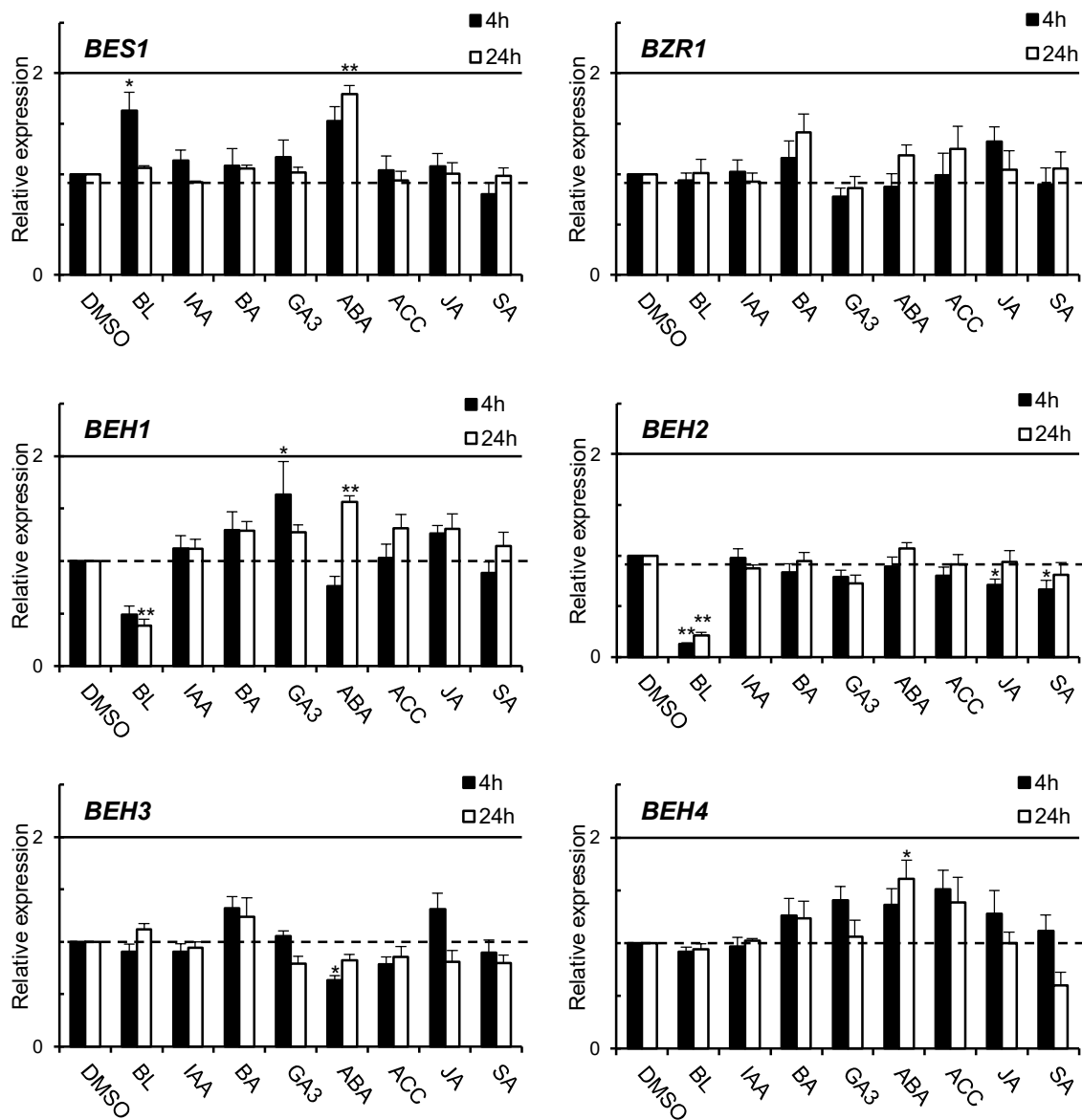


Figure 7. qRT-PCR was used to evaluate the effects of phytohormones on the expression of *BES1/BZR1* family members in 2-week-old seedlings. In the graphs, data are shown as relative values of the means with SE (set 1 for the control treatment with 0.1% DMSO used as a solvent), following normalization by that of *ACT2*. Statistical analyses were conducted using Dunnett's test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

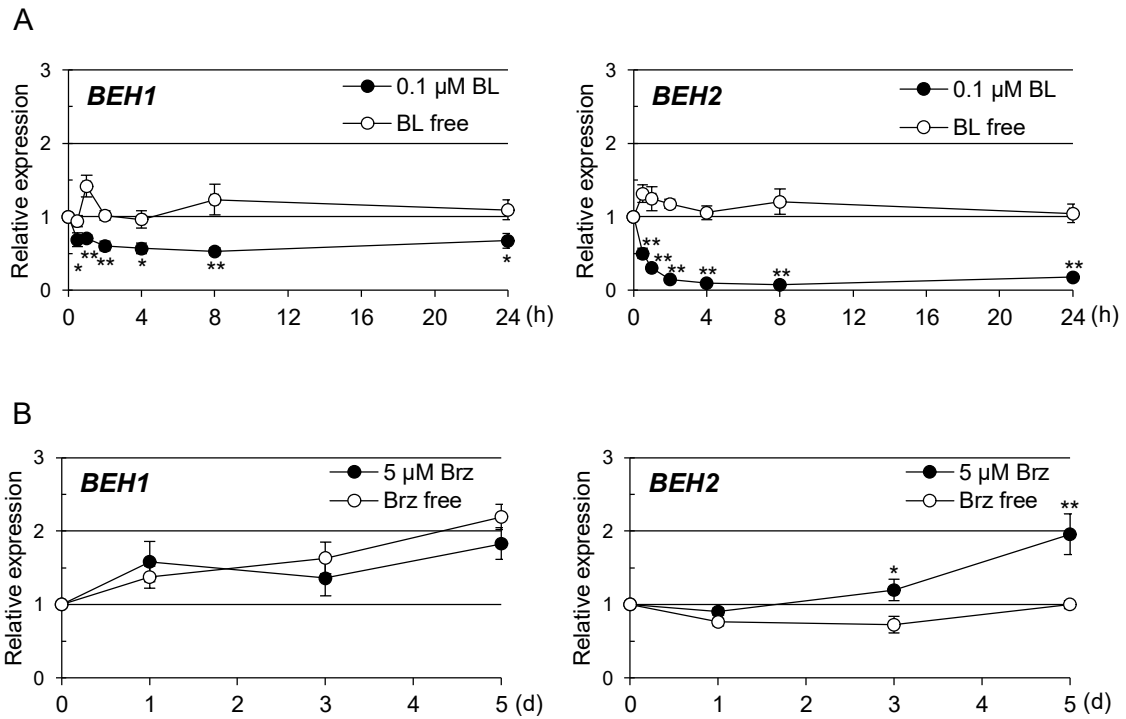
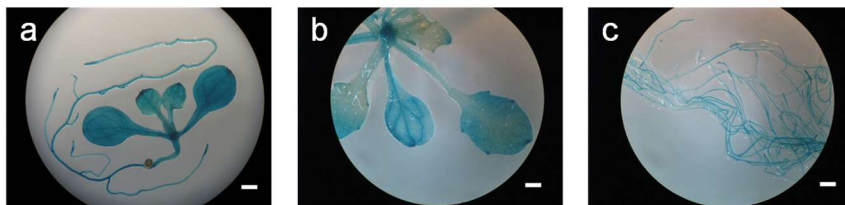
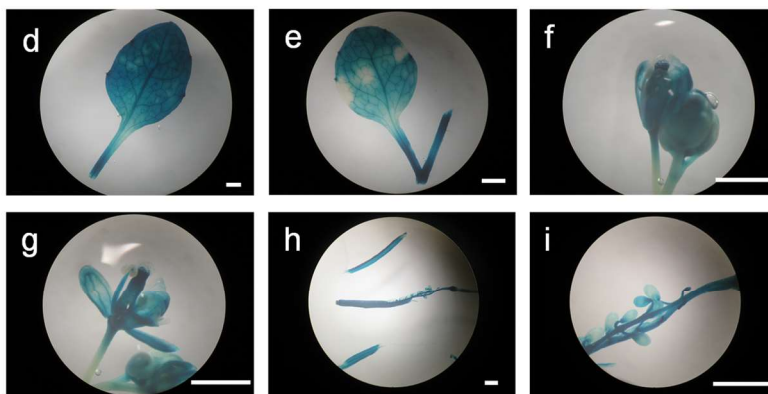


Figure 8. qRT-PCR was used to evaluate the time-dependent response of *BEH1* and *BEH2* to an increased or decreased BR level in 2-week-old seedlings. (A) 0.1 μM BL was given to plants for the indicated number of hours following 2 days' pretreatment with 5 μM Brz, a BR biosynthesis inhibitor. (B) 5 μM Brz was applied directly to the seedlings for the indicated number of days. In the graphs, data are shown as relative values of the means with SE (set 1 for time 0), following normalization by that of *ACT2*. Statistical analyses were performed with Student's t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

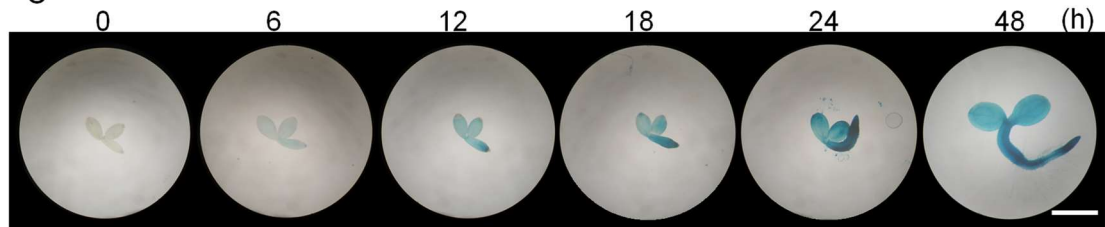
A



B



C



D

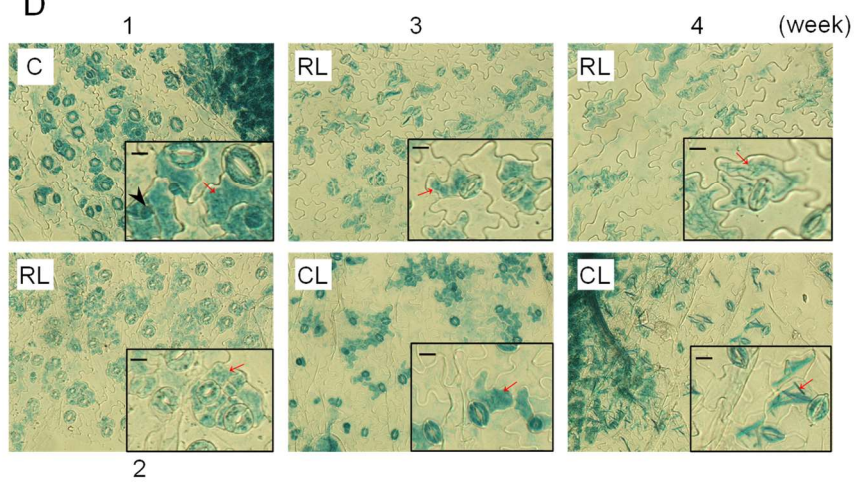


Figure 9. *BEH4::GUS* plants were subjected to histochemical GUS staining at different stages: seedlings in an early growth stage (A, 1 week and 2 weeks), several organ parts excised from adult plants in a late growth stage (B, 4 weeks or later), and seedlings in a very early stage (C, 0–48 hr). Leaf epidermal tissues (D) that were peeled off from the cotyledon (C, 1 week), rosette leaf (RL, 2–4 week), and cauline leaf (CL, 3 week and 4 week) of *BEH4::GUS* plants were subjected to GUS staining. The lowercase letters in A and B indicate a 1-week-old whole seedling (a); above-ground organs (b) and roots (c) of 2-week-old seedlings; a 4-week-old rosette leaf (d); a 4-week-old cauline leaf (e); a 5-week-old flower bud (f); an open flower (g); an immature silique (h); and a developing seed in a silique (i). Insets in Figure 6D present magnified images of the epidermal tissues. White bars and black bars represent 1 mm and 10 μ m, respectively. Red arrows and black arrowheads indicate pavement cells (PCs) located adjacently to guard cells (GCs) and smaller cells located away from GCs, respectively.

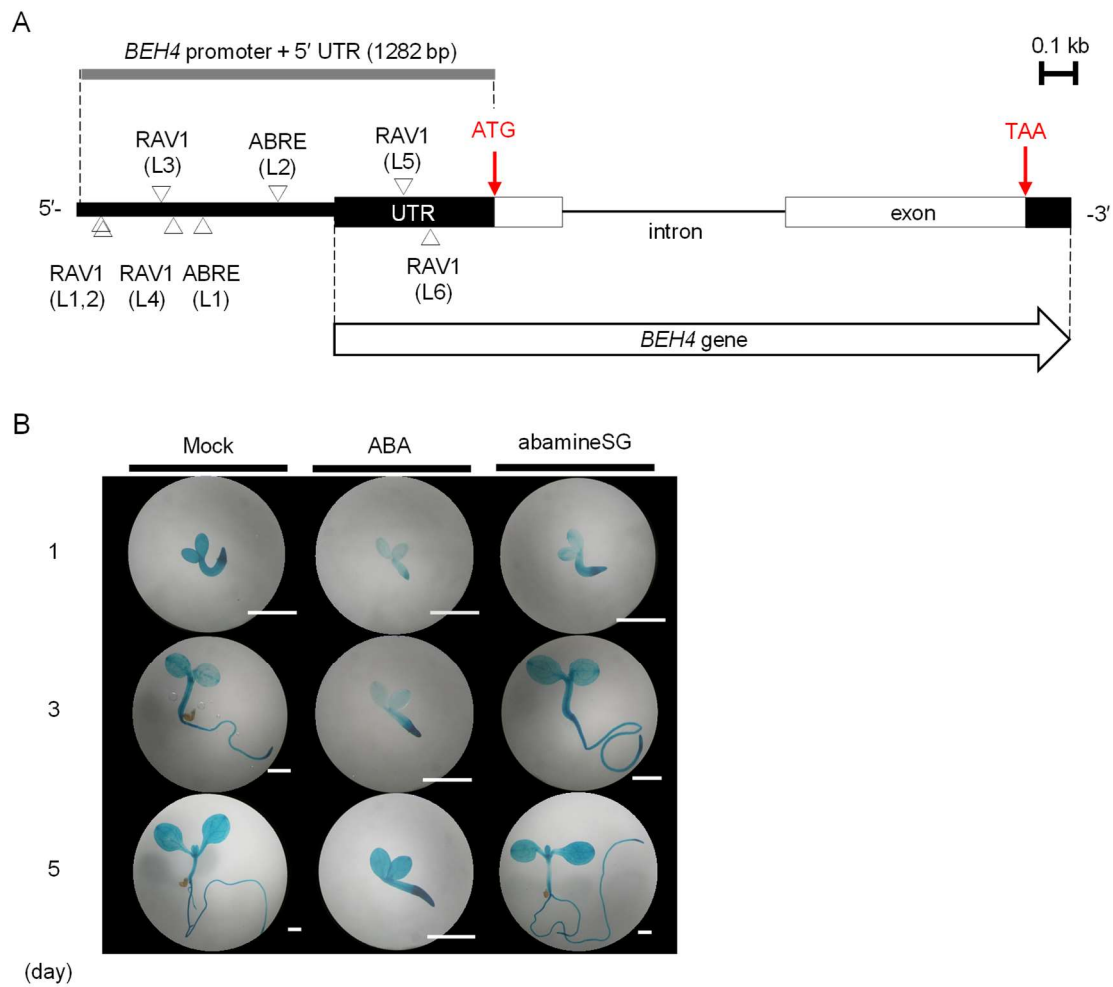


Figure 10. The response of *BEH4* to increased or decreased ABA levels was examined histochemically. (A) The triangles on a schematic drawing of the *BEH4* gene and its 5'-flanking sequence show the positions of ABRE-like and RAV1-like elements in both strands of the DNA double helix. The element sequences are presented in Table 3. Box, exon; thin line, intron; thick line, 5'-flanking (promoter) sequence; UTR, either 5'- or 3'-untranslated regions of *BEH4*. (B) *BEH4::GUS* transgenic seedlings were subjected to histochemical GUS staining; following the treatment of either ABA (1 μ M) or abamine SG (50 μ M), a specific inhibitor of ABA synthesis. DMSO (0.1%) was applied to plants as a mock treatment. Scale bars represent 1 mm.

第 3 章 ブラシノステロイドシグナル伝達におけるシロイヌナズナ BES1/BZR1

homolog 2 の動態と機能

3-1 節 緒言

BR シグナル伝達経路の反応過程のいくつかはパラログタンパク質によって冗長的に制御されていることが知られている。例えば BR 受容体 (Caño-Delgado et al., 2004; BRI1, BRL1, BRL3)、共受容体 (Ma et al., 2016; SERK1, SERK3/BAK1, SERK4, SERK5)、そして GSK3 様キナーゼ (Vert & Chory, 2006; BIN2, ASK1, ASK2) などである。同様に BES1 と BZR1 も他 4 因子: BEH1-4 と共に小さなファミリーを形成していることから、BES1 と BZR1 が担う BR 依存的な転写制御過程も 6 ファミリー因子により冗長的に制御されていると考えられている。こういった機能的冗長性は BR シグナル伝達経路に頑健性をもたらし、たとえ一部の因子が破損しても BR シグナルの停滞を避けることができる。これは飛行機の“フェイルセーフ設計”のようなものである。しかし、こういった精巧なシステムは、ファミリーの各因子の正確な役割や因子間の相互関係の解明にとって厄介な存在になる。

第 2 章で述べた通り、BES1/BZR1 ファミリー 6 因子の研究は、BES1 と BZR1 を中心に行われてきた。したがって、残る 4 つの BEH ホモログ因子の性格付けは遅れていたが、徐々にこれらに関する報告も増えてきた (Chen et al., 2019a; Chen et al., 2019b; Yin et al., 2005; Wang et al., 2013)。時を同じくして、筆者らも同研究を進め、発生段階特異性、器官特異性、ホルモン応答性などに係る BEH ホモログ 4 因子の発現様式を明らかにした (Figure 4-7)。また、BEH2 と BEH1 の発現が BL により下方制御を受けるこ

とを明らかにした。この結果は、Yin et al (2005) が報告した BR による BEH1 と BEH2 のリン酸化状態の制御に加えて、これら 2 因子が BR 機能と強い関連性を有することを示唆する。さらに BEH2 は BR シグナル伝達経路で働く新規 GSK3 様キナーゼ・*Arabidopsis* GSK3/Shaggy-like kinases θ (ASK θ) と直接結合し、リン酸化されることも明らかにした (Rozhon et al., 2010)。しかしながら、BEH2 の発現が既知 BR シグナル伝達経路を介して制御されるのか、また、経路内でどのような役割を果たすのかはほとんど分かっていない。そこで、BR による転写制御過程に関するさらなる知見を獲得するために、BEH2 に着目し、その振る舞いを解析することにした。

この研究を通じて、筆者は (1) BEH2 が他のメンバーとは大きく異なる発現様式を持つこと、また、(2) BL による BEH2 発現の下方制御が、主要な BR 経路を介して起こることを明らかにした。さらに、(3) BEH2 が BR によるリン酸化制御を受けるにも関わらず、常に核に局在すること、(4) RNA-seq データに基づく遺伝子エンリッチメント解析により、BEH2 がストレス応答や光合成に関わる可能性があることを明らかにした。

3-2 節 材料及び方法

3-2-1 項 試薬

試薬類の入手先及び使用法は 2-2-1 項に記載した通りである。本研究では、BR (BL) とその生合成阻害剤・Brz に加えて、BR シグナル伝達促進剤として植物特異的 GSK3 様キナーゼ阻害剤・ビキニンを使用した。上記のホルモン及び阻害剤は全て 100% DMSO に溶解し、DMSO の終濃度が 0.1% 以下になるように 1/2 MS 培地に添加した。

3-2-2 項 植物と生育条件

変異体や形質転換体を含め本研究に用いた全てのシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は、Columbia (Col-0) 生態型の遺伝的背景を有する。本研究では *BESI* と *BZRI* の機能獲得型変異体として *bes1-D* と *bzr1-ID* を使用した。*bes1-D* 変異体については、遺伝的背景を En2 から Col-0 へと変換するため Columbia 野生型との戻し交雑を 3 回行った。T-DNA 挿入変異体である *bes1* (SALK_098634, SALK_091133) と *bzr1* (GK-857E04) は Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University) から購入した。“*BEH2::GUS*”、“*35S::BEH2:GFP*”、“*35S::BZRI:GFP*” と名付けた 3 つの形質転換シロイヌナズナは筆者が所属する研究室で作出した。植物栽培用の 1/2 MS 培地の作成法、種子の滅菌法、生育条件などは第 2 章の材料及び方法 (2-2-2 項) の記載に準じた。

3-2-3 項 プラスミド構築と植物の形質転換

プラスミド構築に用いたオリゴヌクレオチド (PCR プライマー) の配列は Table 4 に示した。BEH2 プロモーターと GUS の構造遺伝子の転写融合遺伝子 (BEH2::GUS) の構築は第 2 章の材料及び方法 (2-2-3 項) で記述した BEH4::GUS 融合遺伝子と同様に行った。一方、35S プロモーターで制御される BEH2::GFP、もしくは BZRI::GFP 翻訳融合遺伝子 (35S::BEH2::GFP, 35S::BZRI::GFP) は以下のように構築した。まず、BEH2 と BZRI のそれぞれの cDNA から終止コドンを含まないように翻訳領域 (CDS) を PCR クローニングし、塩基配列を解読後、公共データベースに登録されている遺伝子配列と同じであることを確認した。続いて、CDS を含む断片を pTH2 プラスミド (Niwa, 2003) 上の 35S プロモーターと GFP 構造遺伝子の間に GFP 遺伝子のコドンとフレームが合うよう挿入した。得られた 2 つの翻訳融合遺伝子は、バイナリーベクター・pCAMBIA1300 (Hajdukiewicz et al., 1994) の T-DNA 領域に挿入した。第 2 章の材料及び方法 (2-2-3 項) に準じて、上記 3 種の融合遺伝子 (BEH2::GUS, 35S::BEH2::GFP, 35S::BZRI::GFP) を持つ pCAMBIA1300 をアグロバクテリウム EHA105 に導入し、同細菌を用いたフローラルディップ法にて形質転換シロイヌナズナを得た。

3-2-4 項 パーティクルガンを用いた遺伝子導入

一過的遺伝子発現解析のためのタマネギ表皮組織細胞への遺伝子導入は、バイオリスティック・ボンバードメント法により行った (Sanford et al., 1993)。まず、3 つの遺伝子 (35S::BEH2::GFP, 35S::BZRI::GFP, 35S::GFP) のいずれかを保持する pTH2 プ

ラスミド DNA (0.8 μg) を金粒子 (0.5 mg) に吸着させた。続いて、Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad, Richmond, CA) を用いて、DNA をまとった金粒子をタマネギの表皮組織に打ち込んだ。

3-2-5 項 薬理的解析

薬剤処理は、基本的に薬剤を含む 1/2 MS 培地で実生を培養することにより行った。組織化学的 GUS 解析においては、5 日齢の *BEH2::GUS* 形質転換体実生を 0.1、1 μM BL、もしくは 5 μM Brz を含む 1/2 MS 固形培地へ移し、明所 24°C の条件下で一定期間培養した後に組織化学的 GUS 染色に供試した。一方、生化学的 GUS 解析においては、14 日齢の *BEH2::GUS* 実生を 1 μM BL を含む 1/2 MS 固形培地へ移し、明所 24°C の条件下で 3 日間培養した。GFP 蛍光の解析においては、① *GFP* との翻訳融合遺伝子を導入したタマネギ表皮組織を BL や Brz を含む 1/2 MS 固形培地に置床し、暗所、24°C の条件下で 1 日間培養した。また、② *35S::BEH2:GFP* 及び *35S::BZR1:GFP* 形質転換シロイヌナズナ (7 日齢) を BL、もしくは Brz を含む 1/2 MS 液体培地へ移し、明所 24°C の条件下で 1 日間培養した。RNA-seq 解析においては、固体培地上で 14 日間育てた野生型と *35S::BEH2:GFP* の実生を 0.1 μM BL を含む、もしくは含まない 1/2 MS 液体培地へ移し、明所 24°C で 4 時間培養した。

3-2-6 項 RNA 抽出と RT-PCR

RNA の抽出と RT-PCR は第 2 章の材料及び方法 (2-2-5 項) に記載した方法に準

じた。RT-PCR に使用したプライマーの塩基配列とアニーリング温度は Table 4 に示した。

3-2-7 項 RNA-seq 及び GO/KEGG エンリッチメント解析

RNA-seq に用いる RNA サンプルは、以下のように調製した。まず、14 日齢の野生型と *35S::BEH2::GFP* 形質転換体を 0.1 μ M の BL を含む 1/2 MS 液体培地で 4 時間培養した。その後、Total RNA Extraction Kit Mini (Plant) (RBC Bioscience, Birmingham, UK) を用いて全 RNA を抽出し、1.6%アガロースゲル電気泳動により、抽出した RNA の分解がないことを確認した。さらに、semi qRT-PCR により複数種の BR 応答遺伝子の発現を調査することで、処理した BL の効果を確認した。

RNA-seq 解析は、株式会社ベリタス (Hangzhou, China) に委託した。そのため、薬剤処理を施した植物体から得られた RNA サンプル 4 種 (WTD, WTB, OXD, OXB) を同社に送付した。RNA-seq 反応はイルミナの NovaSeq 6000 Sequencing System (150 bp paired-end reads; 3G) を用いて行われた。得られた生データは FastQC (ver0.11.8) (Wingett & Andrews, 2018) を用いて全リードの品質を確認した後、カウントデータを得るために、まず Trim Galore (ver0.6.4) (Krueger, 2015) のデフォルト値を用いて低品質のリードが除かれた。次に残った高品質のリードを STAR (ver2.7.4a) (Dobin & Gingeras, 2015) のデフォルト値を使ってシロイヌナズナ TAIR10 のリファレンスゲノム上にマッピングした。続いて、featureCounts (v.1.6.4) (Liao et al., 2014) を用いて “gene symbol” (Ensembl v27) によって定義される各遺伝子のリードカウントを計算した。そして、各 RNA サンプルの総リード数を 100 万リードに揃えることで解析可能な遺伝子の発現量を標準化した。さらに、カウントデータを TMM 標準化した後、edgeR (ver3.22.3) (Robinson et al., 2010)

を用いて 2 群間比較を行った。本実験では、発現比 (fold change: FC) が $FC > 2$ 、もしくは $FC < 0.5$ の遺伝子を発現変動遺伝子 (DEGs; differentially expressed genes) とした。Gene ontology (GO)/Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) エンリッチメント解析はオンラインツール g:profiler (version e105_eg52_p16_e84549f) (Raudvere et al., 2019) を用いて行った。有意差の検定には g:SCS multiple testing correction 法を用い、閾値 0.05 とした。

3-2-8 項 レポーター解析

組織化学的 GUS 解析は第 2 章の材料及び方法 (2-2-7 項) に記載した方法に準じて、また、生化学的 GUS 解析は Jefferson et al. (1987) の方法に準じて行った。シロイヌナズナとタマネギ組織の GFP 蛍光の観察は、OP-66835 BZ filter GFP を装着した蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence Corporation, Osaka, Japan) を用いて行った。4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Dojindo Lab, Kumamoto, Japan) による核の対比染色は、供給元の説明書に従って行った。

3-3 節 結果

3-3-1 項 *BEH2* 遺伝子：組織特異的な発現と BR 応答性

上述の通り、筆者は *BEH2* 遺伝子の発現が内生 BR 量に応じて顕著に変動することを明らかにした (Figure 7, 8)。また、従前の報告から *BEH2* タンパク質が BL により脱リン酸化されること (Yin et al., 2005)、BR シグナル伝達経路で機能する新規 GSK3 様キナーゼ・ASK θ により、リン酸化されること (Rozhon et al., 2010) が知られている。これらの知見は、*BEH2* が BR シグナルと密接に関係していることを強く支持する。そこで、BR シグナル伝達経路、特に *BES1/BZR1* ファミリーによる転写制御機構を解き明かすため、*BEH2* の性格付けをさらに進めることにした。

初めに GUS レポーターを用いて *BEH2* の発現パターンを組織化学的に解析した。1、2 週齢の *BEH2::GUS* 植物体では、下胚軸を除いた全ての器官で青色の GUS 染色が観察され、中でも根が最も強く染まっていた (Figure 11A)。また、どの器官においても染色部位は限られていた。例えば、根は、メリステム付近や伸長領域が分化領域に比べて強く染色されていた (Figure 11A; d, h)。子葉においては、葉身の先端とそれに続く葉脈が強く染まっていた (Figure 11A; b, f)。生育途中の若いロゼット葉 (1 週齢) では葉身全体が染まっていたが、GUS 染色は成長が進むにつれて基部側の葉縁部 (Figure 11A; c) や鋸歯 (Figure 11A; g) に限定されていった。

次に BR による *BEH2* mRNA 量の減少が転写水準で起きるかどうかを明らかにするために、BL 処理した *BEH2::GUS* 植物体の GUS 活性を生化学的に調査した。Figure 11B に示すように、1 μ M BL を 3 日間処理した *BEH2::GUS* 植物体 (17 日齢) の GUS 活

性は DMSO 対照区と比較して 1/5 程度、未処理区 (14 日齢) と比較して 1/2 程度に減少した。

続いて、*BEH2* 遺伝子発現の BR 応答性をさらに明らかにするため、14 日齢の *BEH2::GUS* 形質転換体を地上部と地下部に分け、それぞれから抽出した RNA を鋳型として semi qRT-PCR を行った。解析対象は内生の *BEH2* 遺伝子 (*BEH2*) と導入遺伝子 (*BEH2::GUS*) である。Figure 11C に示すように、両遺伝子の mRNA 量は、根でもシュートでも BL によって減少する傾向がみられた。また、その中で、根における内生 *BEH2* 遺伝子の発現低下は統計的な有意差が認められた。一方、Brz は、シュート、根を問わず、両遺伝子の mRNA 量に影響しないか、僅かに増加させただけだった。また、BL に対する両遺伝子の発現応答は地上部と地下部でほとんど差がなかった。さらに、子葉ステージ (5 日齢) の実生を用いて BR に対する *BEH2::GUS* の応答を組織化学的に解析したところ、薬剤処理 1 日後、3 日後の根における GUS 染色の強度は明らかに BL によって低下し、Brz によって上昇した (Figure 11D)。対照的に子葉の GUS 染色像は両薬剤の影響をほとんど受けなかった。この結果は、14 日齢の実生を用いた qRT-PCR の結果 (Figure 11C) と異なる。以上をまとめると、BR による *BEH2* の発現低下は転写制御を介して起こること、転写制御は地上部・地下部を問わず起きることが明らかになった。

3-3-2 項 BR による *BEH2* の発現低下は標準的な BR シグナル伝達経路を介している

BR は数千もの遺伝子を転写レベルで制御することが知られているが、このことは BR シグナルの負の制御因子・BIN2 キナーゼの不活化を介して起きると考えられ

ている (Mao & Li, 2020)。また、シロイヌナズナでは、BIN2 はホモログ 10 種でファミリーを形成していることが報告されている (Jonak & Hirt, 2002)。そこで、GSK3 様キナーゼ阻害剤・ビキニンを用いて、BIN2 キナーゼとそのファミリーメンバーが *BEH2* の発現に与える影響を調査した。Figure 12A; a に示すように、30 μ M ビキニンを 4 時間、もしくは 24 時間処理したとき *BEH2* の mRNA 量は、BL を処理したときと同じく、DMSO 対照区と比較して 1/2 以下に減少した。次に、*BES1* と *BZR1* の劣性変異体 (T-DNA 挿入型、機能欠損型 ; Loss of function) である *bes1* (SALK_098634, SALK_091133) と *bzr1* (GK-857E04) を用いて同解析を行ったところ、ビキニンや BL による *BEH2* mRNA 量の減少は野生型植物体で見られたものと同程度であった (Figure 12A; b-d)。この結果は、BR による *BEH2* 発現の下方制御に関して *BES1/BZR1* ホモログ 6 種が冗長的に機能することを示唆する。一方、*BES1*、*BZR1* の優性変異体 (機能獲得型 ; Gain of function) である *bes1-D*、*bzr1-ID* を用いて同実験を行ったところ、*bes1-D* においては *BEH2* mRNA 量が野生型植物体の約半分ほどに減少したのに対して、*bzr1-ID* では野生型とほとんど変わらなかった (Figure 12B; a, b)。*BEH2* とは対照的に、*DWF4* mRNA 量は *bes1-D* と *bzr1-ID* 両変異体において著しく減少した (Figure 12B; c, d)。この結果は、*DWF4* が *BES1* と *BZR1* により負に制御されるという従前の報告と矛盾しない (Jiang et al., 2015; Kim et al., 2006)。以上の結果は BR が BIN2 を含む GSK3 様キナーゼの不活性化と *BES1/BZR1* ファミリーメンバーの活性化を介して *BEH2* の転写を抑制することを暗示する。また、*BZR1* と比較して *BES1* が優先的に *BEH2* の転写抑制に関わると考えられた。結論として、BR による *BEH2* の転写抑制は、これまでよく調べられてきた正規 (canonical) の BR シグナルによって制御されることが明らかになった。

3-3-3 項 BEH2 タンパク質：細胞内局在

BR シグナル伝達は経路の複数の段階でさまざまに調節されている (Manghwar et al., 2022; Mao & Li, 2020) が、BR 量に依存した BES1 及び BZR1 の核—細胞質移動制御も重要な調節の一つである (Ryu et al., 2007; Yin et al., 2002)。そこで、BR による核—細胞質移動制御が BEH2 にも適用されるかどうかを明らかにするために、BEH2:GFP 融合タンパク質の細胞内局在に対する BL と Brz の影響を調査した。薬剤を入れていない培地で培養した時、*35S::BEH2:GFP* 遺伝子を一過的に発現させたタマネギ表皮が放つ GFP 蛍光のほとんどが核と思われる構造体で観察された (Figure 13A)。その後、BEH2:GFP 融合タンパク質に由来する GFP 蛍光と DAPI の蛍光が共局在したことから、この構造体は核であることが確かめられた (Figure 13E)。対照的に、*35S::BZR1:GFP* や *35S::GFP* 遺伝子に由来する緑色蛍光はタマネギ表皮細胞の細胞質と核の両方で検出された (Figure 13A)。続いて、これらのタマネギ表皮を BL や Brz で処理したところ、BEH2:GFP の蛍光は、薬剤処理に関わらず一貫して核で検出された (Figure 13B)。対照的に、BZR1:GFP の蛍光は、薬剤の種類に関係なく細胞質と核の両方で見られたが、その蛍光強度は BL 処理区では細胞質に比べて核の方が強く、Brz 処理区では核よりも細胞質の方が強くなった (Figure 13C)。タマネギ表皮細胞において、BEH2:GFP に由来する緑色蛍光は薬剤の有無や種類に関わらず核で認められたので、次に、*35S::BEH2:GFP* 形質転換シロイヌナズナを用いて同様の観察を行った。Figure 13D と 13E に見られるように、8 日齢の形質転換シロイヌナズナの根の細胞においても、BEH2:GFP 由来の緑色蛍光が常に核で検出された。すなわち、BL や Brz といった内生 BR 量に変化を与える薬剤の存在下でも、BEH2 は核に局在すると考えられた。一方、

BZR1:GFP に由来する蛍光はシロイヌナズナの根の細胞の核と細胞質の両方で見られ、その蛍光様式はタマネギ表皮細胞の場合と同様に BL や Brz によって変化した。以上の結果は、BEH2 タンパク質が BZR1 や BES1 とは異なり BR 量に依存した核—細胞質移動制御を受けないことを示唆する。

3-3-4 項 BEH2 により発現制御される遺伝子候補と BR シグナル伝達に対する BEH2 の貢献度

アミノ酸水準における BES1 や BZR1 との類似性から、BEH2 は転写因子として機能すると考えられる (Nosaki et al., 2018)。そこで、BEH2 が発現を制御する遺伝子 (BEH2-regulated genes) を探索するため RNA-seq を行った。そして、得られたデータを用いて親系統のシロイヌナズナ野生型植物体と *BEH2* 過剰発現体 (BEH2OX; BEH2 overexpressor) との間のトランスクリプトームの違いを評価した。本実験に用いた BEH2OX における *BEH2* の発現量は野生型実生における発現の約 6 倍あり、*35S::BEH2* 遺伝子由来する *BEH2* (*intBEH2*) mRNA は BL により減少することはなかった (Figure 14)。Figure 15A に示すように、BL を含まない培地上で育てた野生型植物体と BEH2OX の間のトランスクリプトームの比較 (0.1% DMSO 処理区; WTD vs OXD) には、15670 の遺伝子が使われた。そのうち野生型に対して BEH2OX 実生で発現量が 2 倍以上 ($|\log_2FC| > 1$) 変動する遺伝子 (DEGs; Differentially Expressed Genes) は 631 個見付き、その中で 346 個は発現上昇遺伝子 (U-DEGs in WTD vs OXD)、285 個は発現低下遺伝子 (D-DEGs in WTD vs OXD) だった。同様に、BL を含む培地上で育てた野生型植物体と BEH2OX の間の比較 (BL 処理区; WTB vs OXB) に使われた 16242 遺伝子のうち、

BEH2OX で発現量が 2 倍以上変動した遺伝子は 606 個見つかった。そのうち 308 個が発現上昇遺伝子 (U-DEGs in WTB vs OXB)、298 個が発現低下遺伝子 (D-DEGs in WTB vs OXB) だった。また、BL 処理の有無 (有 606 ; 無 631) に関わらず発現が変動する遺伝子は 106 個あった。以上の結果は、*BEH2* の過剰発現が 1131 以上の遺伝子の発現に影響を与えていることを示している。ChIP-chip の解析により BES1 と BZR1 はそれぞれ 1609 個と 3410 個の一次標的遺伝子 (直接標的遺伝子) を持つことが報告されている (Sun et al., 2010; Yu et al., 2011)。そこで、*BEH2* の過剰発現により発現変動する遺伝子 (BEH2OX-mediated DEGs) 1131 個と BES1 及び BZR1 の標的遺伝子との重なりを調べたところ、BES1 標的遺伝子とは 41 個、BZR1 標的遺伝子とは 134 個が重複していた。また、このうち 18 個は全グループに存在していたことから、BES1、BZR1、*BEH2* が共通して制御している遺伝子であると考えられた (Figure 16)。

次に、*BEH2* の過剰発現により発現変動する遺伝子 (BEH2OX-mediated DEGs) が、野生型植物体でどの程度 BR の制御を受けるか、すなわち、BR シグナル伝達における *BEH2* の貢献度を明らかにするために、BEH2OX-mediated DEGs と野生型植物体において BL により 2 倍以上発現が変動する遺伝子 (BL-mediated DEGs [U-DEGs (406) / D-DEGs (446) in WTD vs WTB; Figure 17]) の間の発現を比較した。Figure 15B に示したように、BR 非存在下で得られた *BEH2* の過剰発現で発現が上昇する遺伝子 346 個 (U-DEGs in WTD vs OXD) の 90 個が野生型植物体で BL に応答しており、その中の 85 個は発現上昇、5 個は発現低下していた。一方、BR 非存在下で得られた *BEH2* の過剰発現で発現が低下する遺伝子 285 個 (D-DEGs in WTD vs OXD) の 99 個が野生型植物体で BL に応答し、その中の 96 個は発現低下し、3 個は発現上昇していた。BR 存在下で得られた DEGs に対して同様の比較をしたところ、*BEH2* 過剰発現体内で発現上昇する遺伝子

308 個 (U-DEGs in WTB vs OXB) の 68 個が野生型植物体で BL に応答しており、そのうち 63 個は発現低下、5 個は発現上昇遺伝子だった。一方で、*BEH2* 過剰発現体で発現が低下する遺伝子 298 個 (D-DEGs in WTB vs OXB) の 66 個が野生型植物体で BL に応答しており、そのうちの 53 個は発現上昇、13 個は発現低下遺伝子だった。これらの結果は、*BEH2* の過剰発現により発現が変動する遺伝子群 (BEH2OX-mediated DEGs) の 20–30% [U-DEGs (90/346) and D-DEGs (99/285) in WTD vs OXD; U-DEGs (68/308) and D-DEGs (66/298) in WTB vs OXB] が野生型植物体において BR に制御されることを示す。また、その方向性は、BR 非存在下で見つかった BEH2OX-mediated DEGs における BR 応答遺伝子の多くが、*BEH2* の過剰発現と BR によって同一方向に発現制御される一方で、BR 存在下のそれは逆方向に制御されるようである。この傾向は発現比 (logFC) を使ったヒートマップ解析でも確かめられた (Figure 18)。

続いて、*BEH2* の生理機能にさらに迫るため、4 セットの DEGs (U-DEGs / D-DEGs in WTD vs OXD and U-DEGs / D-DEGs in WTB vs OXB) を用いて GO/KEGG エンリッチメント解析を行った (Figure 19)。Figure 19A に示したように、BL 非存在下で *BEH2* の過剰発現により発現上昇する遺伝子 (U-DEGs in WTD vs OXD) では、GO: Biological Processes (BP) term “positive regulation of iron ion transport” のみが選抜された。一方、BL 非存在下で *BEH2* の過剰発現により発現低下する遺伝子 (D-DEGs in WTD vs OXD) では 12 個の GO:BP term と 1 個の GO: Molecular Functions (MF) term が濃縮された。12 個の GO:BP term は化学ストレス、サリチル酸関連プロセス、全身獲得抵抗性、酸化ストレス (chemical stress、salicylic acid related process、systemic acquired resistance、oxidative stress) といったストレス・防御応答と強く関連していた (Table 5)。さらに、上記 12GO:BP term に含まれる全遺伝子は親 term である“response to stimulus”に含まれていた。

また、GO:MF term “DNA-binding transcription factor activity”に属する 33 遺伝子のうち 21 個はストレス関連の GO:BP term にも含まれていた。これらの結果は BEH2 がストレスなどの外的刺激に対する応答と深く関わること、さらにストレス関連の転写因子の発現制御に関わることを示している。一方、BL 存在下では、BL 非存在下の場合とは全く異なる GO term が濃縮された (Figure 19B)。BL 存在下で *BEH2* の過剰発現により発現上昇する遺伝子 (U-DEGs in WTB vs OXB) では、細胞壁、ストレス応答、化学物質に対する結合 (cell wall, stress response, chemical binding) に関係する 5 個の GO term (1 GO:CC, 1 GO:BP, 3 GO:MF) が濃縮された。一方、BL 存在下で *BEH2* の過剰発現により発現低下する遺伝子 (D-DEGs in WTB vs OXB) では 19 個の GO term (10 GO:CC, 7 GO:BP, 2 GO:MF) と 2 個の KEGG パスウェイが濃縮されてきた。これらの term 及びパスウェイのアノテーションから、BEH2 は葉緑体で起こる光合成反応、特に明反応や、その際に生じる光ストレスに関与すると考えられた (Figure 19B, Table 6)。

3-4節 考察

BR シグナル伝達における2つの鍵転写因子・BES1 と BZR1 については、これまでに豊富な知見が蓄積されている (Li et al., 2018)。一方、BES1/BZR1 ホモログ・BEH1-4 に関する知見は今も少ない。そこで、筆者は植物ホルモン BR が支配する遺伝子発現制御機構の更なる解明のために、4つの BEH ホモログのうち、BR シグナルとの密接な関係が指摘されている BEH2 に焦点を当て研究を進めた。

GUS 染色を利用した組織化学的発現解析は、器官水準から組織・細胞水準にわたる BEH2 の発現様式を詳細に明らかにした (Figure 11A)。BEH2 は多くの器官で極めて限られたところで発現していた。また、BEH2 の発現は地上部に比べて地下部により顕著であった。このことは BEH2 の主要な機能部位が根であることを示しているのかもしれない。今回明らかになった BEH2 の発現様式は、生活環を通じてほぼ恒常的に発現する BES1 (Jiang et al., 2015) や BEH4 (Figure 9)、葉や葉柄、特にそれらの維管束組織で発現している BEH3 (Furuya et al., 2021; Van Nguyen et al., 2021) とは大きく異なる。これらの結果を合わせて考えると、アミノ酸配列の類似性から類推されるように BES1/BZR1 ファミリーの各メンバーはよく似た分子機能を持つにも関わらず、それぞれ異なる発現様式を持つことで特有・固有の生理学的機能を発揮すると考えられる。

前半の研究から、BR が BES1/BZR1 ファミリー6 遺伝子のうちの幾つかの発現に影響することが分かった (Figure 7)。例えば、BL は BEH1 と BEH2 の mRNA 量を減少させ、BES1 の mRNA 量を増加させた。中でも BEH2 の変動が顕著であった。そこで、研究の後半では BL による BEH2 の転写抑制について集中して調べ、以下のような結果を得た。まず、BL を投与した BEH2::*GUS* 実生の GUS 活性は大きく減少すること

が分かった (Figure 11B)。加えて、子葉ステージの実生を用いた組織化学的 GUS 染色から、BL による転写抑制は地上部よりも根で顕著であることが分かった (Figure 11D)。しかし、14 日齢の *BEH2::GUS* 形質転換体を用いた semi qRT-PCR の結果は、BL が地上部でも根でも内生の *BEH2* 遺伝子と導入された *BEH2::GUS* 遺伝子に由来する mRNA 量を減少させることを示した (Figure 11C)。上記の結果を合わせて考えると、BR による *BEH2* 遺伝子発現の下方制御は、植物体全体でみられ、転写調節により達成されることを示している。しかし、現時点では BR による mRNA の分解など転写後修飾関与の可能性を排除することはできない。加えて、BL による *BEH2* 発現の下方制御は、子葉ステージ (5 日齢) の実生では地上部に比べ根で顕著であった (Figure 11D) が、14 日齢の植物体では根でも地上部でも起きていた (Figure 11C) ことから、この制御機構は成長段階に依存して変化する可能性が考えられた。今後、この下方制御が起こる器官・組織や成長時期を特定していくことは、*BEH2* 遺伝子の機能を解明する上で興味深い。BL が転写レベルで *BEH2* を下方制御していることが分かったので、続いて BIN2 を含む ASK ファミリーや BES1・BZR1 転写因子がこの制御に関わるかどうかを調べたところ、ピキニンが野生型植物体、そして *bes1*、*bzr1* 欠損変異体においても、BL と同様に *BEH2* mRNA を低下させることが分かった (Figure 12A)。この結果は、ASK ファミリーのキナーゼが BR による *BEH2* 発現の下方制御で働くことを示している。また、機能欠損型変異体を用いた実験結果は *BES1* や *BZR1* が BL による *BEH2* 発現の下方制御に対しても冗長的に働いているか、或いは全く関与しないことを示唆する。さらに、機能獲得型変異体を用いて研究を進めたところ、野生型と比較して *bes1-D* では *BEH2* mRNA 量が少なく、*bzr1-ID* では同程度であることが分かった (Figure 12B; a, b)。この結果は、少なくとも *BES1* は BL による *BEH2* 発現の下方制御に働くことを示している。以上の

結果をまとめると、BRによる *BEH2* 遺伝子の発現抑制は、BIN2 を含めた ASK キナーゼファミリーや BES1・BZR1 転写因子から構成される正規 (canonical) の BR シグナル伝達経路を通じて起こることを示している。シロイヌナズナの ASK は全部で 10 種存在し、そのうちの 7 種 (group II. BIN2, ASK₁, ASK_ζ; group I. ASK_α, ASK_γ, ASK_ε; group III. ASK_θ) は BR シグナル伝達の負の制御因子として働くことが報告されている (De Rybel et al., 2009)。したがって、BR 量が上昇したとき、または GSK3 様キナーゼ阻害剤ピキニンが投与されたとき、ASKs が不活化されると同時にタンパク質ホスファターゼ・PP2A が活性化され、その結果、BES1/BZR1 ファミリー転写因子が脱リン酸化を受けて活性化することで *BEH2* の発現減少を導くと考えられる。ASK ファミリーや BES1/BZR1 ファミリーのようにホモログタンパク質によってもたらされる高度な機能的冗長性は植物の生存に不可欠な細胞内機構を遺伝的損傷から守っていると考えられる。しかしながら、これらの存在は研究上の困難を引き起こす。したがって、筆者が属する研究グループの次なるチャレンジは、上記の課題を克服し ASKs や BES1/BZR1 ファミリーのどの因子が *BEH2* を制御しているのかを突き止めることになると考えられる。

BES1 や BZR1 の転写因子としての働きは、プロテアソームによる分解 (He et al., 2002)、核—細胞質移動 (Gampala et al., 2007; Ryu et al., 2007; Yin et al., 2002)、DNA 結合能力の変化 (Bai et al., 2007; Vert & Chory, 2006) など、リン酸化状態に依存したタンパク質水準の制御により調節される。*BEH2* もまた BR によって脱リン酸化されることが報告されている (Yin et al., 2005)。さらに、BR シグナル伝達において機能することが報告された ASK_θ キナーゼは *BEH2* タンパク質に直接結合し、これをリン酸化することが報告されている (Rozhon et al., 2010)。そこで、筆者は抗 GFP 抗体を用いたイムノブ

ロット法により、BR 量の変動が BEH2:GFP のリン酸化状態に与える影響を調べた。その結果、BL 処理によって BEH2:GFP 融合タンパク質は SDS-PAGE における移動距離が長くなり、一方、Brz によって移動距離が短くなった (Figure 20)。このことは、Yin et al. (2005) の結果と同様に、筆者が作出した 35S::BEH2:GFP 形質転換体においても BEH2:GFP 融合タンパク質が BR 量に依存したリン酸化・脱リン酸化制御を受けたことを示している。しかしながら、BL や Brz の処理にも関わらず BEH2:GFP タンパク質に由来する GFP 蛍光は常に核に局在したことから (Figure 13)、BR 量の変動に関係なく BEH2 が常に核に局在すると考えられた。つまり、BEH2 は BR 依存的なリン酸化制御を受ける一方で、BES1 や BZR1 とは異なり、このリン酸化制御を介した核—細胞質移動制御は受けないと考えられた。BEH2 のアミノ酸配列上には 2 つの核局在配列 (Wang et al., 2002) に加え、細胞質局在に必要な 14-3-3 認識様配列 (Madeira et al., 2015) も見つかっている。BEH2 の 14-3-3 認識配列 (PLRISN[S]APVT) は BES1 (PLRISN[S]APVT) や BZR1 (SLRISN[S]CPVT) のそれとよく似ている (Ryu et al., 2010; Ryu et al., 2007)。では何が BES1・BZR1 と BEH2 の細胞内局在の違いを生み出すのだろうか。Ryu et al. (2007) は BZR1 の 2 つのセリン残基 (S-130 と S-134) を含むもう一つのドメインについて記述している。このドメインは BIN2 キナーゼの標的となり、BZR1 が核から排出される際に必要とされる。BEH2 では、同ドメイン内の 2 つのセリン残基は保存されていたが、ドメイン内やその近傍の 3 つの残基 (Q-128 in BZR1 vs H-121 in BEH2; V-129 in BZR1 vs G-122 in BEH2; S-132 in BZR1 vs V-125 in BEH2) が BZR1 と異なっていた。また、3 つのうち 2 つの残基の置換は重大なアミノ酸特性の変化を引き起こすと考えられる。したがって、このドメイン内及び近傍のアミノ酸残基の違いが BEH2 の恒常的な核局在を引き起こしていることも考えられる。将来的に上記作業仮説の真偽の検証も含め BEH2

の構成的核局在の機構を解明する必要がある。

網羅的遺伝子発現解析は遺伝子の機能に迫るための強力なツールである。RNA-seqのデータを用いた野生型と *BEH2* 過剰発現体間のトランスクリプトームの比較は *BEH2-regulated genes* (*BEH2* により制御される遺伝子) に関していくつかの有益な情報を提供した。まず、1131 個以上の遺伝子が野生型植物体と比較して *BEH2OX* 植物体内で変動していることが明らかになった (Figure 15, 16)。この数は野生型植物体と *bes1-D* (4194) 変異体 (Yu et al., 2011) や、*bril-116* 単独変異体と *bzr1-1D;bril-116* (6742) 二重変異体 (Sun et al., 2010) の比較で見つかった DEG の数と比較して少ないことから、*BEH2* は *BES1* や *BZR1* ほど多くの遺伝子を制御していないのかもしれない。しかしながら、網羅的発現解析の結果の解釈は植物齢や培養条件、発現解析法といった実験の条件の違いを考慮に入れ、注意深く行う必要がある。いずれにせよ、直接的か間接的かは不明であるが潜在的に 1000 以上もの遺伝子を制御することから、*BEH2* は植物にとり重要な転写因子であると主張することはできるであろう。

さらに、網羅的発現解析から *BEH2OX-mediated* DEGs (*BEH2* 過剰発現体の中で発現変動する遺伝子) の約 1/4 が野生型植物体における BR 応答遺伝子であることが明らかになった (Figure 15B)。このことは *BEH2* mRNA 量が BR により減少すること (Figure 8) や、従前の報告 (Rozhon et al., 2010; Yin et al., 2005) と共に、*BEH2* が BR シグナル伝達において機能するという考えを強く支持する。しかし、逆に考えると *BEH2OX-mediated* DEGs の 3/4 ほどは野生型植物体において BL による影響を受けないとも考えることができる。この傾向は、*BES1* や *BZR1* でもみられる。例えば、1609 の *BES1* 標的遺伝子のうち 404 個のみが BR、*bes1-D*、もしくはその両方によって制御される遺伝子であり (Yu et al., 2011)、3410 の *BZR1* 標的遺伝子のうち 2457 個は BR 制御

とは無関係である (Sun et al., 2010)。さらに Yu et al. (2011) は、BES1 標的遺伝子のうち、野生型では BR 処理で変動せず *bes1-D* によってのみ変動するものは、*bes1-D* 変異が引き起こす表現型が間接的に影響した可能性を論じているが、このことを考慮に入れても、一部の遺伝子のみが BR 処理の影響を受けるという結果は、BEH2 も含め BES1/BZR1 ファミリー転写因子が BR シグナル伝達とは別の未知のシグナル伝達機構の下で数多くの遺伝子の発現を制御している可能性を暗示する。

加えて、1131 個の BEH2OX-mediated DEGs のうち、わずか 157 個のみが BES1 や BZR1 の標的遺伝子であることも明らかになった (Figure 16)。この数の少なさは、従前の報告から考えると予想外の結果であった。これまで、明確な形質異常を持つ *BES1/BZR1* ファミリー遺伝子の劣性突然変異体は得られていないことから、同ファミリーは互いに強い機能的冗長性を有すると考えられてきた (Chen et al., 2019b)。BEH2 と BES1 や BZR1 の間で共通する標的遺伝子が少ないという事実に関しては、いくつかの可能性が考えられる。例えば、BEH2 は BES1 や BZR1 とは大きく異なる機能を持つ、もしくは BEH2 の一次標的は BES1 や BZR1 とは大きく異なるけれども最終的な生理学的出力のポイントで機能的冗長性を有する、というような考えである。いずれの場合も、この疑問に対する答えは *BES1/BZR1* ファミリー遺伝子個々のさらなる分子水準の性格づけを待たなくてはならない。

GO/KEGG エンリッチメント解析の結果から、BEH2 が大きく二つの生理学的事象：ストレス応答 (stress response) と 光合成 (photosynthesis) と深い関係を持つことが示唆された (Figure 19, Table 5,6)。2つの事象が BL 無、BL 有の条件下でそれぞれ濃縮されたことは注目に値するが、この違いが何を意味するのかは現時点では分からない。過去に出版された数多くの論文の中で、BR とストレス応答、或いは光合成との密接な

関係が取り扱われている。例えば、BR は植物のストレス応答に対して正に働く、または負に働くことが確認されている (De Vleeschauwer et al., 2012; Divi et al., 2010; Huot et al., 2014; Nakashita et al., 2003)。この相反する報告から、現在でもストレス耐性に対する BR の立ち位置は定まっていない。一方、BR はクロロフィルの合成を増加すること、光化学系IIの効率を維持すること、光合成の炭素固定を増加することを通じて、光合成や炭酸同化に正に貢献していると考えられている (Siddiqui et al., 2018, Xia et al., 2009, Yin et al., 2021)。したがって、本研究を通じて筆者が見出した幾つかの知見は、BEH2 転写因子を魅力的な研究対象として提示すると共に、BR が制御するストレス応答や光合成の根底にある分子機構の解明を助けることになるであろう。

3-5 節 図表

Table 4. PCR primers used in this study

Name	Locus	Sequence	A.T. ^{a)}	Experiment	
<i>BEH2</i>	<i>AT4G36780</i>	5'- AGATTCAGAGCTCTTCAATGGCCGC -3'	67	semi qRT-PCR	
		5'- ATTTACCGGTTTTTCAGCATCTGGC -3'			
<i>DWF4</i>	<i>AT3G50660</i>	5'- TACCTCTTCTTCTTCCCATCGC -3'	55		
		5'- CGAGAAACCCTAATAGGCAAACCG -3'			
<i>ACT2</i>	<i>AT3G18780</i>	5'- TTCCGCTCTTCTTTCCAAGCTCA -3'	50		
		5'- AAGAGGCATCAATTCGATCACTCA -3'			
<i>GUS</i>	-	5'- GTGCCAGGCAGTTTTAACGA -3'	59		
		5'- ATGCGTCACCACGGTGATAT -3'			
<i>BEH2</i> promoter	-	5'- CCTCTAGATGATTCTTTCTGGATAAGTC -3'	55		Construction of <i>BEH2::GUS</i>
		5'- CCGGATCCAAGTCTTTGTCAGACTGGCGC -3'			
<i>BEH2</i> CDS	-	5'- GGACGTCGACCAGAGATTCAGAGCTCTTCAATG -3'	60	Construction of <i>35S::BEH2::GFP</i>	
		5'- GCCGCCATGGGGCATCTGGCTTTAGTGCCACCGA -3'			
<i>BZR1</i> CDS	-	5'- GGACGGTACCGGTTGTTGGTTTTCCCGATG -3'	53	Construction of <i>35S::BZR1::GFP</i>	
		5'- GCCGGGATCCACCACGAGCCTTCCCATTCCA -3'			

a) Annealing temperature (°C)

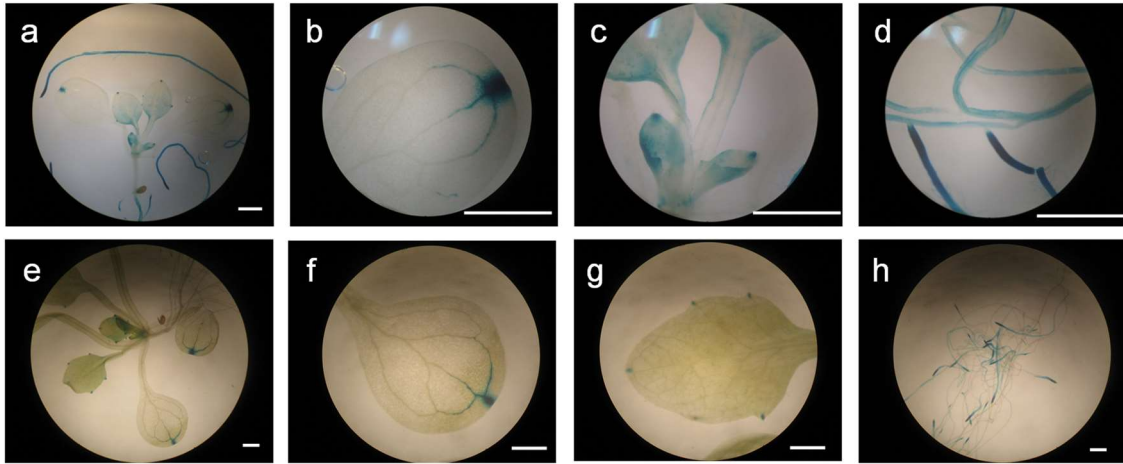
Table 5. Summary of enrichment analysis for D-DEGs in WTD vs OXD.

source	category	term	gene
GO:BP	chemical stress	4	56
GO:BP	salicylic acid related process	3	12
GO:BP	systemic acquired resistance	2	7
GO:BP	oxidative stress	2	11
GO:BP	stimulus	1	94
GO:MF	transcription	1	33

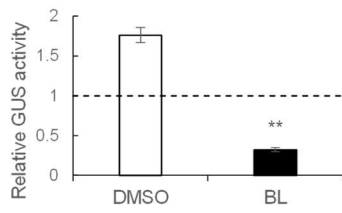
Table 6. Summary of enrichment analysis for D-DEGs in WTB vs OXB.

source	category	term	gene
GO:CC	photosynthesis	7	8
GO:CC	membrane	2	99
GO:CC	plastoglobule	1	9
GO:BP	photosynthesis	5	11
GO:BP	photo-stress	2	7
GO:MF	chlorophyll binding	1	8
GO:MF	tetrapyrrole binding	1	18
KEGG	photosynthesis – antenna proteins	1	6
KEGG	sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	1	3

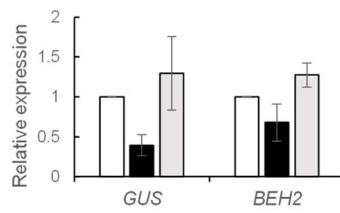
A



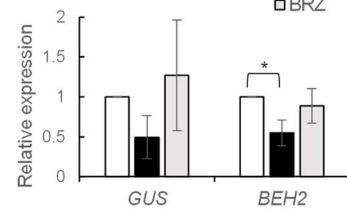
B *BEH2::GUS* activity



C **Shoot**



Root



D

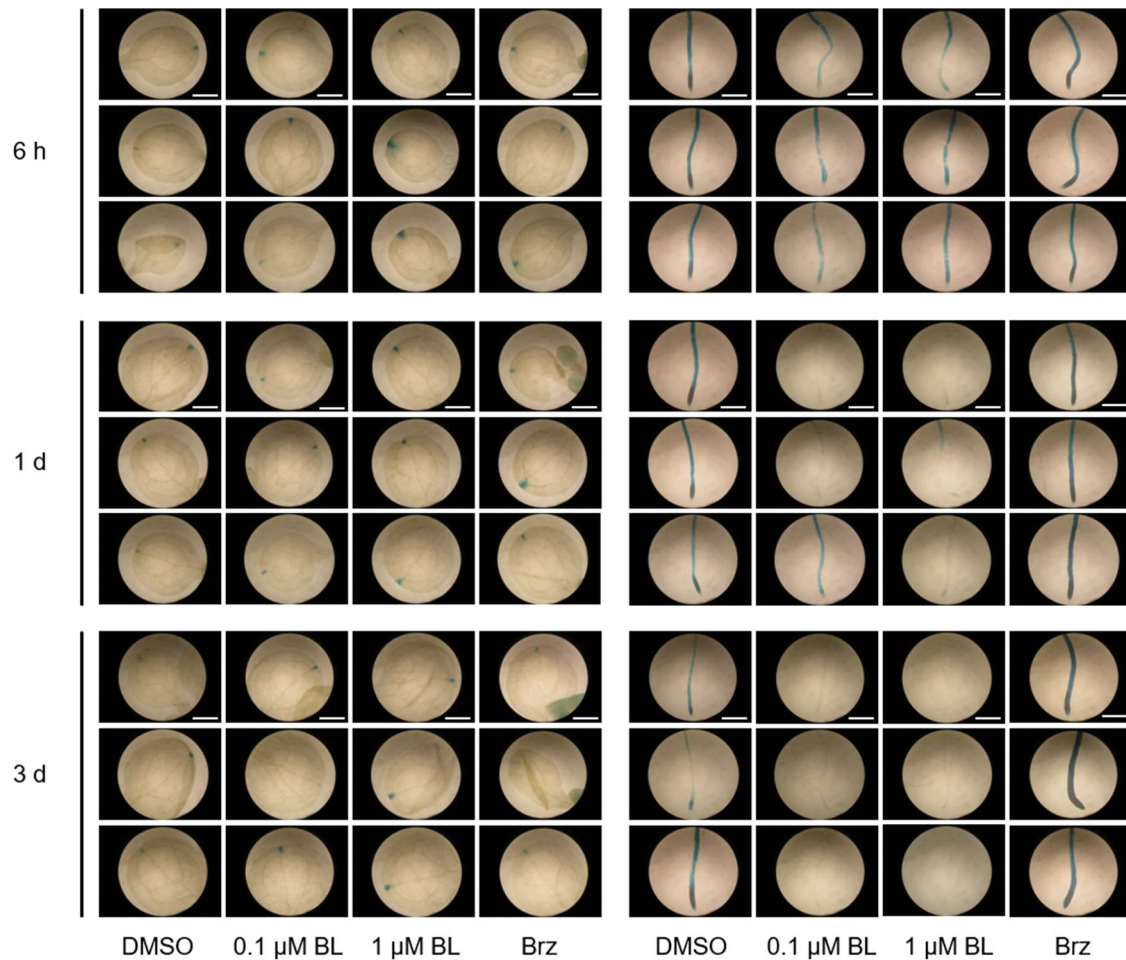


Figure 11. Responsiveness of *BEH2* expression to different BR levels. *BEH2::GUS* plants were used for all experiments in this figure. (A) 1-week-old (a–d) and 2-week-old (e–h) plants were subjected to histochemical GUS staining. Photographs represent the whole seedlings (a, e), cotyledons (b, f), true leaves (c, g), and roots (d, h). (B) Following 3 days treatment of 1 μ M BL or 0.1% DMSO, 17-day-old plants were subjected to biochemical GUS assay. The activity is shown as a relative value (means \pm S.D) to that of the initial control (time zero) in the graph. (C) Following 24 h treatment of 1 μ M BL, 5 μ M Brz or 0.1% DMSO, RNA prepared from the roots and shoots of 15-day-old plants were subjected to semi qRT-PCR. In the graphs, relative expression values (means \pm S.D) to that of the DMSO control calculated after normalization to *ACT2* are presented. (D) 5-day-old seedlings were treated for the defined periods with 0.1- and 1- μ M BL or 5 μ M Brz and then subjected to histochemical staining. Statistical analysis was performed by Student's t test (** $p < 0.01$) for (B) and by ANOVA with Dunnett's test (* $p < 0.05$) for (C). White bars in photographs (A, D) represent 1 mm.

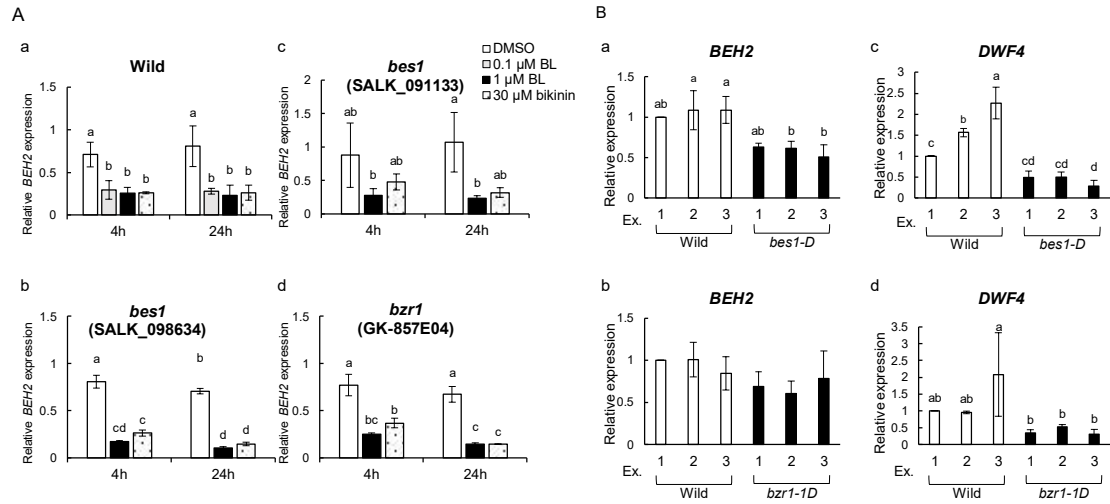
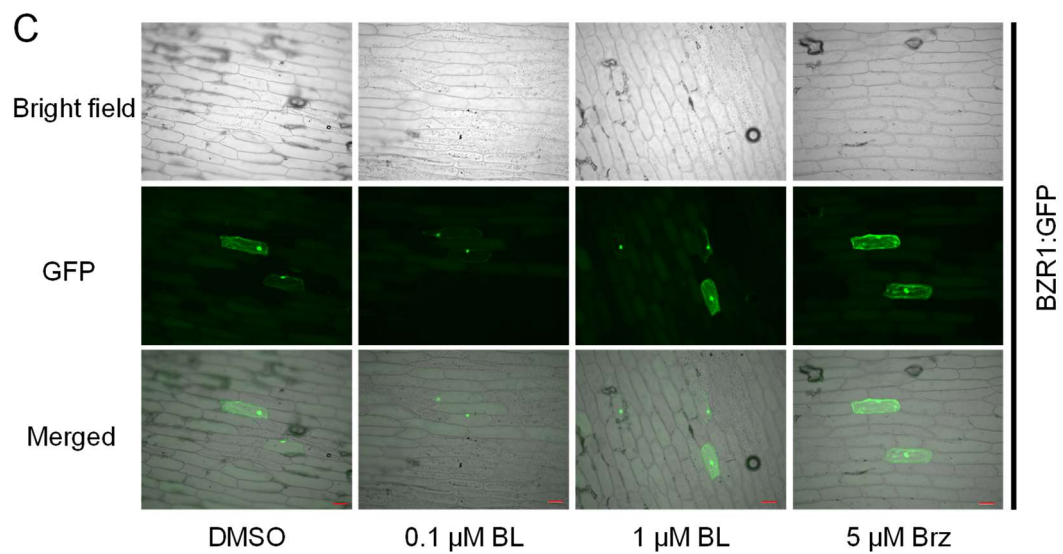
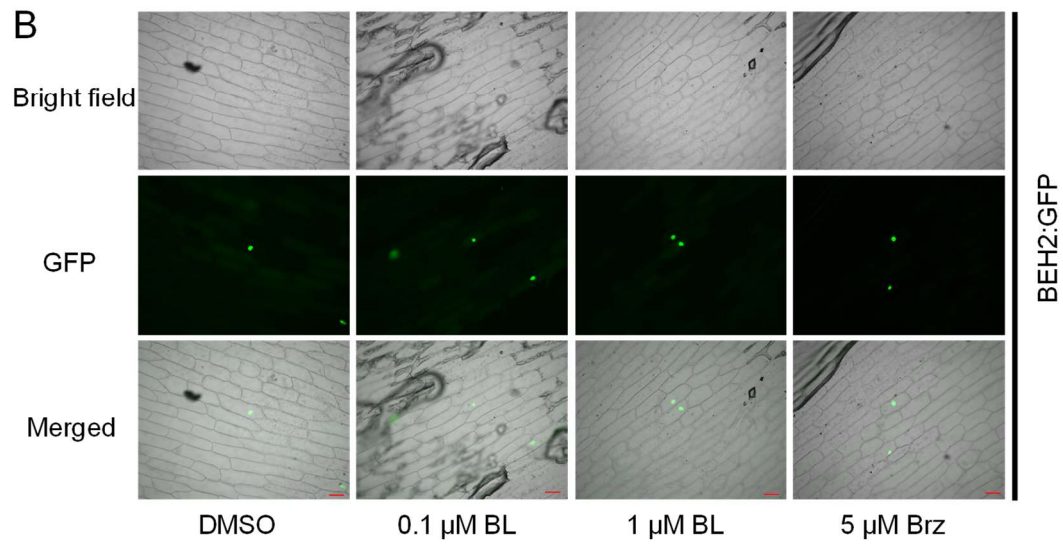
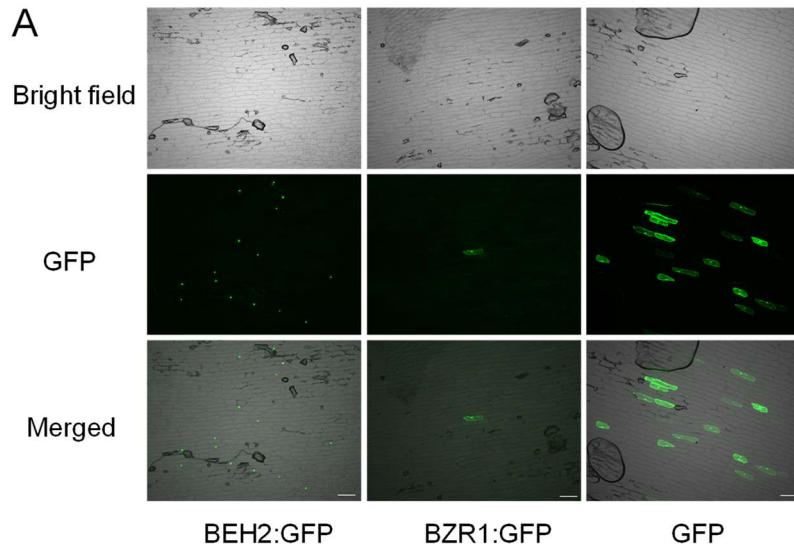


Figure 12. Effects of bikinin and *bes1/bzr1* mutations on *BEH2* expression. (A) 14-day-old *Arabidopsis* WT (a; Col-0) and T-DNA insertion mutants for *bes1*(b; SALK_098634, c; SALK_091133) and *bzr1* (d; GK-857E04) were treated with either BL or bikinin for 4 and 24 h, and subjected to semi qRT-PCR for evaluating *BEH2* mRNA level. (B) 14-day-old seedlings (three seedlings of each mutant) of the dominant mutants *bes1-D* and *bzr1-1D* were directly subjected to semi qRT-PCR for evaluating mRNA levels of *BEH2* (a, b) and *DWF4* (c, d). Presentation styles in the graphs follow those in Figure 11. Statistical analysis was performed by ANOVA with Tukey's test ($p < 0.05$).



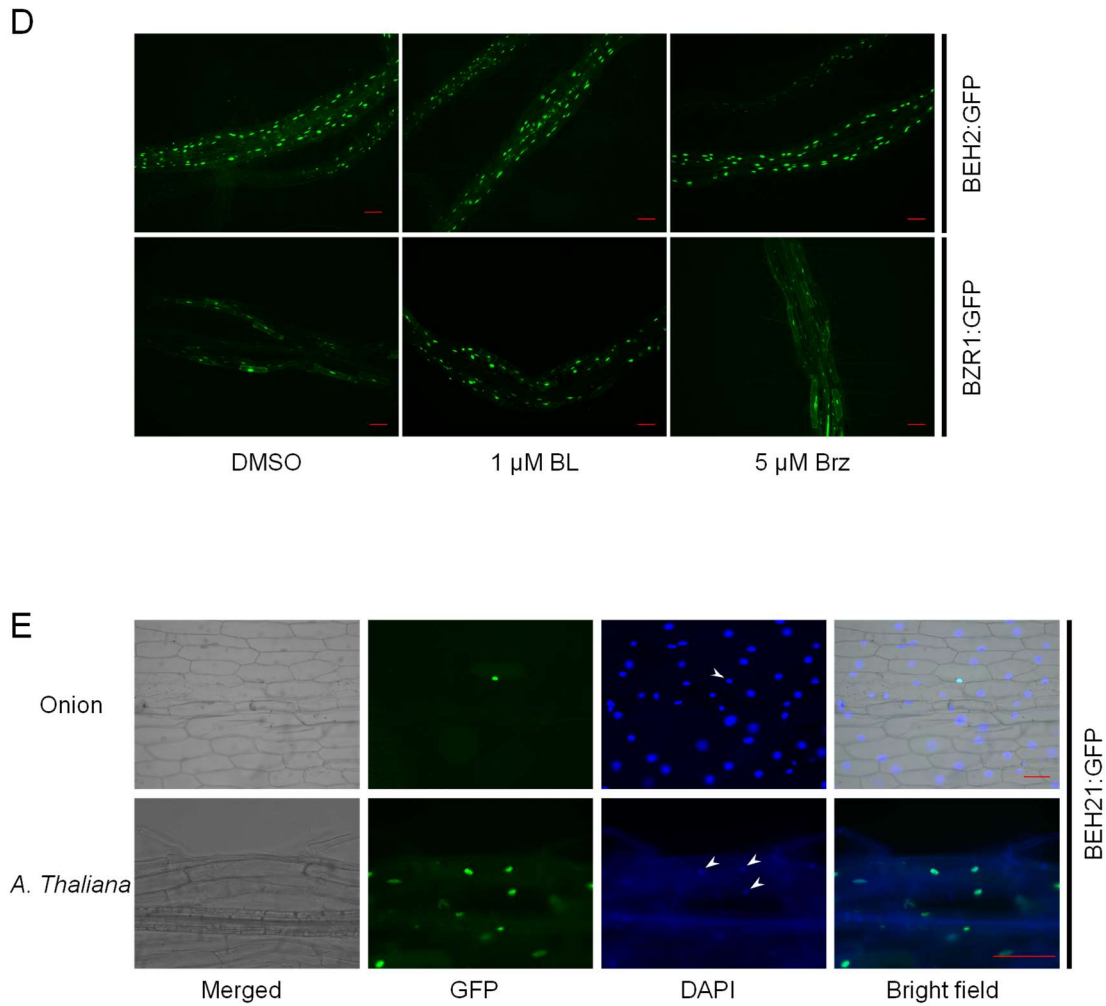


Figure 13. Subcellular localization of BEH2 protein. Plasmid DNA carrying either *35S::BEH2:GFP*, *35S::BZR1:GFP* or *35S::GFP* was biolistically bombarded into onion epidermal tissues, and the tissues were cultured in dark for 1 day on 1/2 MS solidified medium without (A) or with chemicals (B and C). Seven-day-old seedlings of *Arabidopsis* harboring *35S::BEH2:GFP* or *35S::BZR1:GFP* were cultured in continuous light for 1 day in 1/2 MS liquid medium containing BL or Brz (D); next, the roots were excised for microscopic observation. The onion peels and *Arabidopsis* roots producing BEH2:GFP proteins were stained with DAPI to determine the position of nucleus (E). Red and white scalebars represent 100 and 300 μ m, respectively. White arrowheads in (E) indicate the position of DAPI signal in GFP expressing cells.

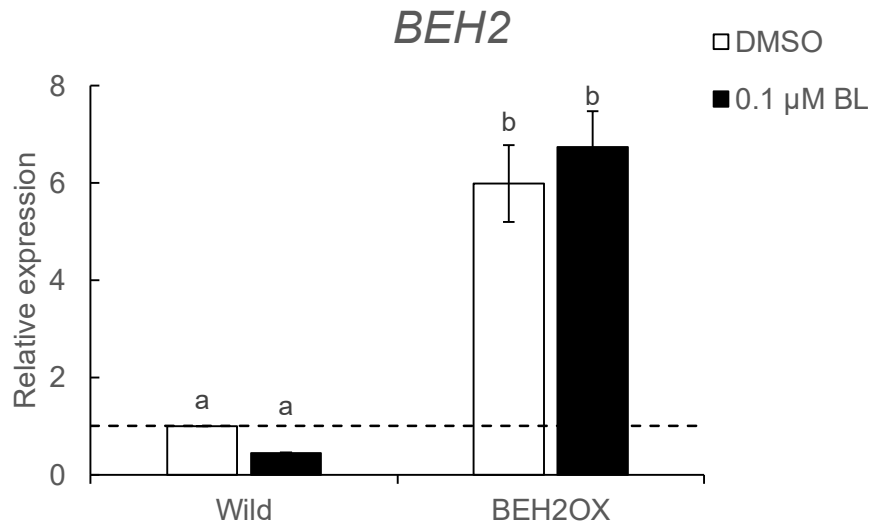


Figure 14. Fluctuation of *BEH2* mRNA level by BL in WT and *BEH2* overexpressing plants. 14-day-old *Arabidopsis* WT (Col-0) and *BEH2* overexpressing plants (Col-0 background) were treated with either BL or DMSO for 4 h and subjected to quantitative RT-PCR for evaluating *BEH2* mRNA level. Two sets of primers (5'-CGATGGCACCACCTTATCGCA-3' / 5'-GTGGTACGAAGGTGCAGGAC-3' and 5'-GCCATCCAAGCTGTTCTCTC-3' / 5'-CCCTCGTAGATTGGCACAGT-3') were used to amplify mRNAs of *BEH2* and *ACT2* as a control, respectively. The primer set for *BEH2* was designed to amplify both endogenous and introduced *BEH2* genes. Presentation styles in the graphs follow those in Figure 11. Statistical analysis was performed by ANOVA with Tukey's test ($p < 0.01$).

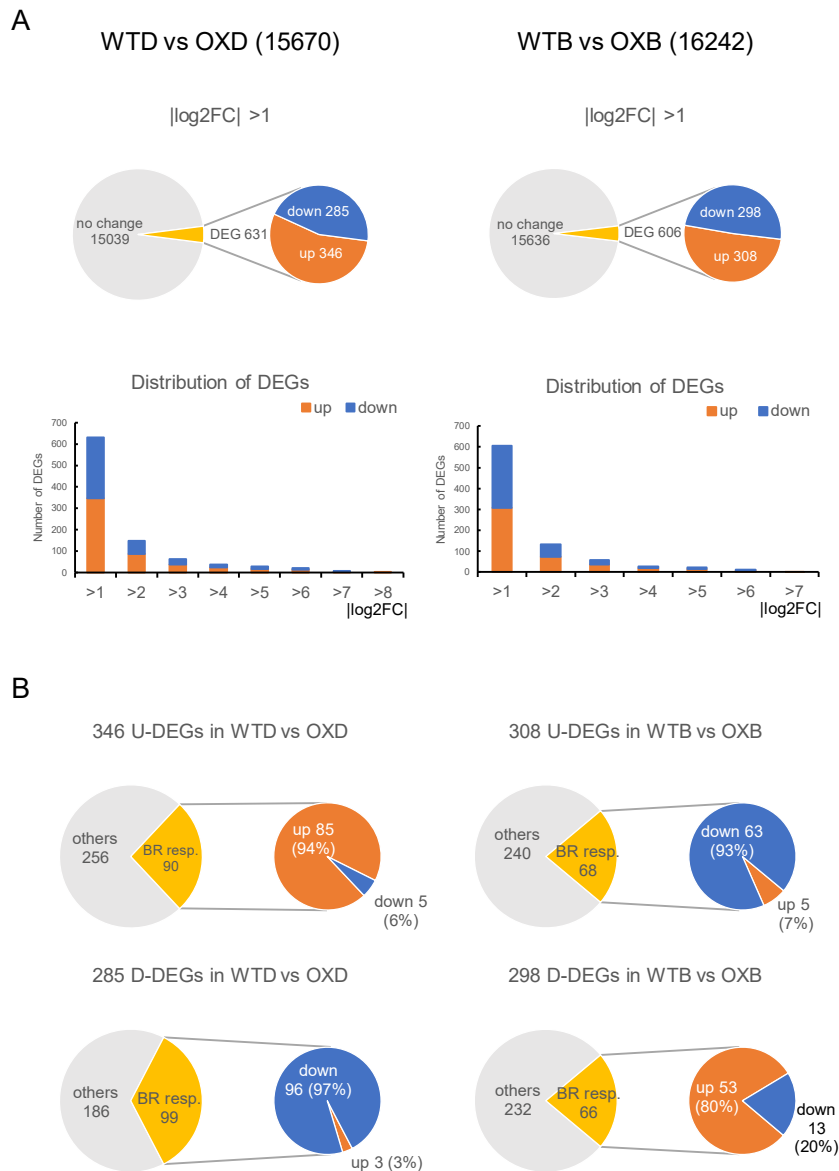


Figure 15. Transcriptome profiling of BEH2-regulated genes. (A) Pie charts indicating the proportion of differentially expressed genes (DEGs) with $|\log_2FC| > 1$ among the total genes (15,670 and 16,242) used for comparison between WT and BEH2OX grown in the absence (WTD vs OXD) or presence of BL (WTB vs OXB). Bar graphs presenting the ratio of DEGs with different $|\log_2FC|$ values. Note that approximately three-quarters of DEGs have $|\log_2FC| \leq 2$. “Up” and “down” mean upregulated and downregulated genes in BEH2OX seedlings, respectively. (B) Pie charts presenting the proportion of BR-responsive genes in upregulated DEGs (U-DEGs) and downregulated DEGs (D-DEGs) in individual comparisons (WTD vs OXD, WTB vs OXB).

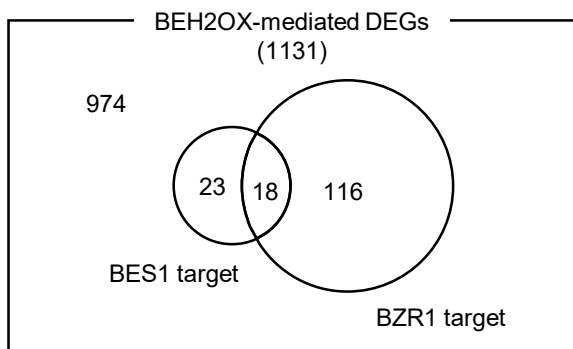


Figure 16. BES1- and BZR1-targets in a pool of BEH2OX-mediated DEGs. Venn diagram shows the number and overlap of BES1- (Yu et al., 2011) and BZR1-target genes (Sun et al., 2010) found in a pool of BEH2OX-mediated DEGs (1131).

WTD vs WTB (15893)

$|\log_2FC| > 1$

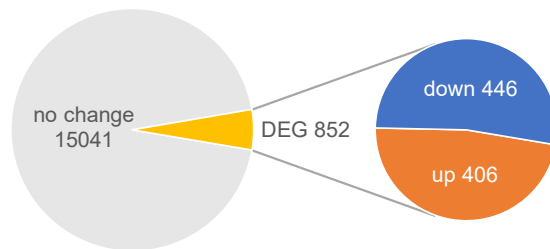


Figure 17. DEGs found in comparison of WTD with WTB. Pie charts shows the number and proportion of DEGs with $|\log_2FC| > 1$ among the total genes (15893) used for comparison between WT plants grown in the absence and presence of BL (WTD vs WTB).

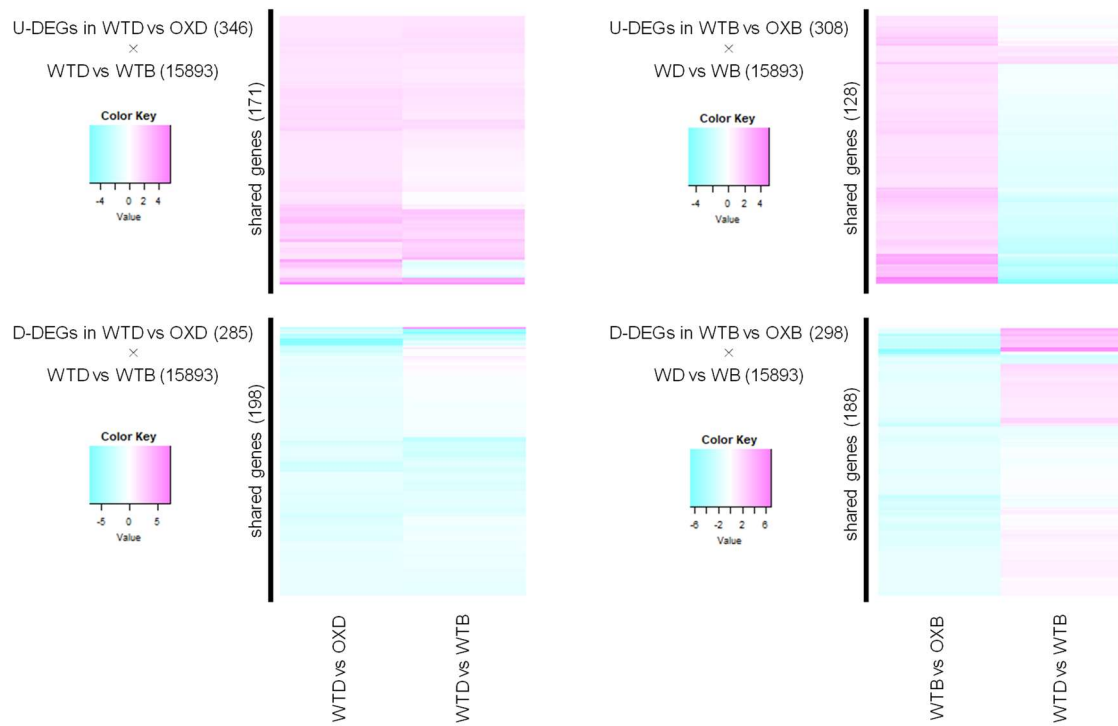


Figure 18. Heatmap comparison between BEH2OX-mediated DEGs and BR-regulated genes. The shared genes (171, 198, 128, and 188 for each pool) obtained by a paired comparison between each of four pools of BEH2OX-mediated DEGs (U-DEGs and D-DEGs in WTD vs OXD; U-DEGs and D-DEGs in WTB vs OXB) and 15893 genes employed to select BR-regulated DEGs in WTD vs WTB, were used to produce the heatmap using logFC value.

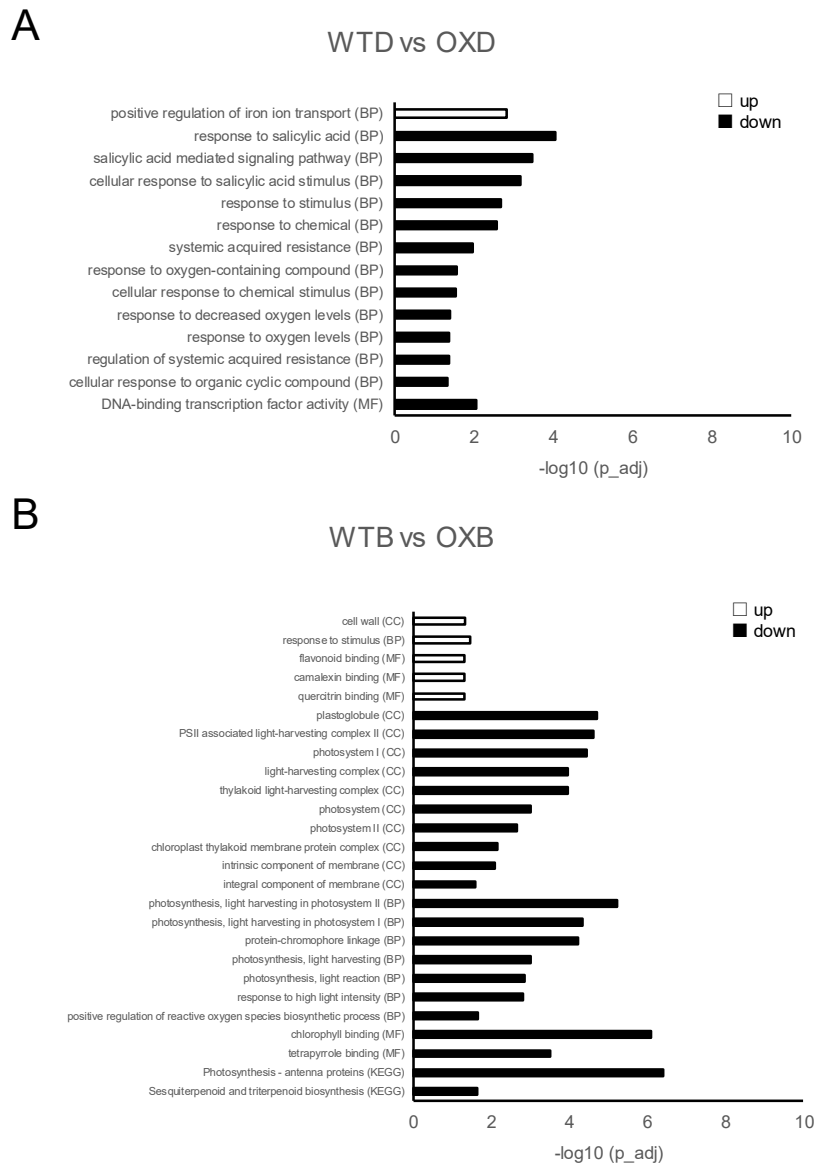


Figure 19. GO and KEGG enrichment analysis of BEH2OX-mediated DEGs. Enrichment analysis conducted separately for U-DEGs (open bar) and D-DEGs (closed bar) in individual comparisons (a, WTD vs OXD; b, WTB vs OXB). The terms were defined by adjusted p-value < 0.05 after multiple testing corrections using the default g:SCS algorithm. In the graphs, the adjusted p-values (p_{adj}) of each term are shown in negative log 10 scale. GO, Gene Ontology; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; BP, Biological Processes; CC, Cellular Components; MF, Molecular Functions.

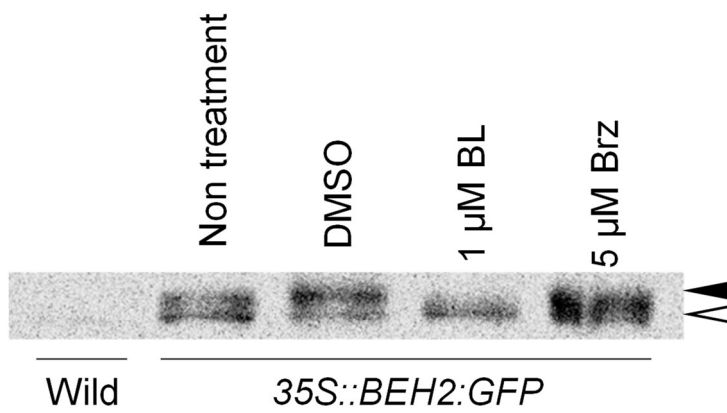


Figure 20. BR-dependent phosphorylation status of BEH2:GFP fusion proteins. 14-day-old *35S::BEH2:GFP* plants were cultured for 1 day in 1/2 MS liquid medium containing BL or Brz, and then subjected to immunoblot analysis using anti-GFP antibody. Closed- and open arrowhead showing the phosphorylated and dephosphorylated BEH2:GFP, respectively.

第4章 総合考察

筆者は、BR シグナル伝達経路の下流で働く必須の転写因子 *BES1*・*BZR1* の類似タンパク質でありながら、これまで研究が遅れていた *BEH1-4* ホモログに着目し、発現様式をはじめとして分子水準の性格付けを行った。得られた結果は、以下に示す6つのカテゴリーに分類される。本稿では、これらの結果に基づき *BEH* ホモログの(生理)機能について重要度の高い3点について考察する。

- 1) 成長段階別の発現：4つの *BEH* ホモログを含め、全ての *BES1/BZR1* ファミリー遺伝子は1-4週齢のいずれの時期においても発現していた (Figure 4)。また、6遺伝子の発現は、栄養成長期にある生育前期(生育1、2週目)と比較して、生殖成長期にある生育後期(生育3、4週目)で高い傾向がみられた。
- 2) 部位特異的発現1(器官水準)：6つの *BES1/BZR1* ファミリー遺伝子は、調査した全ての器官で発現していたが、それぞれの器官における発現量や発現パターンは遺伝子ごとに大きく異なっていた (Figure 6)。
- 3) 部位特異的発現2(組織水準)：GUS レポーターを用いた解析から、*BEH4* と *BEH2* の発現様式は組織水準で全く異なることが明らかになった。*BEH4* の発現は概ね構成的であり、生活環を通してほとんどの器官の全体で発現していた (Figure 9)。一方、*BEH2* の発現は、組織水準で限定的・特異的であり、根や鋸歯、水孔を含めた葉の周縁部で強く発現していた (Figure 11)。
- 4) 植物ホルモン応答性：4つの *BEH* ホモログを含む *BES1/BZR1* ファミリーの全遺伝子は、調査に用いた7植物ホルモン(BRを除く)の影響を大きく受けることはなかった。一方、BR(活性型のBL)は、*BEH2* 及び *BEH1* の発現を有意に低下させ、*BES1* の発現を僅かに増加させた (Figure 7)。*BEH2* の発現は *BEH1* と比較して急速

かつ大きく低下した。また、Brz は *BEH2* の発現を増加させたが、*BEH1* の発現には影響しなかった。

- 5) *BEH4* の発現様式：上述の通り、*BEH4* の発現は概ね構成的と考えられたが、一部の組織では特異的な発現も認められた。例えば、葉の表皮細胞においては生育段階に関わらず *BEH4* の発現は孔辺細胞とその周辺の敷石細胞に限られていた (Figure 9D)。加えて、*BEH4* の発現は種子発芽時やそれに続く実生の確立の間に劇的に変化した (Figure 9C)。
- 6) *BEH2* の発現制御及び機能について：BL による *BEH2* 発現の下方制御は転写水準で制御されること、また、BIN2 を含む ASK キナーゼと BES1・BZR1 転写因子から構成される正規 (canonical) の BR シグナル伝達経路の支配下に起こることが明らかになった (Figure 11, 12)。この中で BZR1 に比べて BES1 転写因子の方が *BEH2* の発現低下に対する寄与度が高いことが明らかになった (Figure 12)。また、*BEH2*:GFP 融合タンパク質は BL や Brz の処理に関わらず、常に核に存在した (Figure 13)。さらに、RNA-seq のデータを用いた GO/KEGG エンリッチメント解析では、*BEH2* の過剰発現により、ストレス応答 (stress response) と光合成 (photosynthesis) に関する複数の GO term が濃縮された (Figure 19, Table 5, 6)。この結果は *BEH2* がこれらの生理現象に関わることを示唆する。

BES1/BZR1 ファミリー因子の機能的冗長性と個別の生理機能 (カテゴリー1~3)

BR シグナル伝達経路内の複数の反応過程の頑強性 (robustness) はホモログタンパク質によって達成されると考えられている。例えば BR 受容体 (Caño-Delgado et al., 2004; BRI1, BRL1, BRL3)、共受容体 (Ma et al., 2016; SERK1, SERK3/BAK1, SERK4,

SERK5)、そして GSK3 様キナーゼ (Vert & Chory, 2006; BIN2, ASK1, ASK2) などである。BES1 と BZR1 も 4 つの BEH ホモログと共に BR に応じた転写制御の確実性を担保していると考えられる。実際に筆者も、BES1 と BZR1 の機能欠損型の変異体である *bes1* (SALK_098634, SALK_091133) と *bzr1* (GK-857E04) における、ビキニンや BL による *BEH2* mRNA 量の減少は野生型植物体と同程度であることを確認した (Figure 12A)。こういった事象は一般的に機能的冗長性 (或いは遺伝的冗長性) と呼ばれ、たとえ一部の因子が破損してもシグナルの滞りを避けることができるので、BR のような必須ホルモンのシグナル伝達の頑強性を維持するためには有効な機構となる。*BES1/BZR1* ファミリー遺伝子の発現様式は互いにある程度重なっていた。このことは、*BES1/BZR1* ファミリータンパク質同士の高い相同性 (Zhao et al., 2002) と共に、発現部位や発現時期を同期させることでさらに機能的冗長性を高めているのかもしれない。しかしながら、各器官における発現強度が因子ごとに異なることや、*BEH4*・*BEH2* で確認された遺伝子特異的な発現様式は、*BES1/BZR1* ファミリー間でよく似た機能 (分子機能) を担うことに加えて、個々の因子が器官水準や発生段階別、或いは組織水準で発現様式を切り変えることで部分的に特有・固有の生理学的機能を発揮していることを示唆する。

BEH4 と BEH2 の考える生理機能 (カテゴリー3 と 5)

先述の通り、*BES1/BZR1* ファミリー因子間の機能冗長性から、因子個々の特有の機能を特定することには困難が伴う。しかし、詳細な発現解析は *BEH4* と *BEH2* の生理機能を推測するヒントを与えてくれた。*BEH4* の発現は、器官水準では構成的であったにもかかわらず、組織水準では時に特異的であった。例えば、葉の種類や成長段階を問わず、孔辺細胞で強く発現していた (Figure 9D)。また、孔辺細胞に隣接してい

る敷石細胞でも発現していたが、それら以外の孔辺細胞と接していない敷石細胞では発現していなかった。加えて子葉では、孔辺細胞とは隣接していない小さな細胞でも発現していた。小さな細胞はおそらく気孔の発生系譜、すなわち孔辺細胞の分化途上にある細胞であると推察された。このことから、**BEH4**は、ハウスキーピング様の機能を担うと共に、気孔の形成過程や成熟気孔で何らか役割を果たすと想像された。また、**BEH4**は発芽直後の実生ではほとんど発現していなかったが、時間を追って根を手始めに実生全体で急激に発現が強くなった (Figure 9C) ことから、実生の確立やその時期の成長過程で役割を果たすと考えられる。一方、**BEH2**の発現は、根と鋸歯や水孔を含む葉の周縁部に限定されていた (Figure 11A) ことから、**BEH2**とこれらの組織で起こる機能との関連性が考えられる。また、GO/KEGG エンリッチメント解析から、**BEH2**とストレス応答、及び光合成の関連性が浮かび上がった (Table5、Table6)。根が病原応答を含めた土壌微生物とのコミュニケーションの場であることや、水孔や鋸歯を通してある種の細菌が侵入するとの報告 (Melotto et al., 2008) から、**BEH2**がストレス応答に関連するという結果は大変興味深い。いずれにせよ、上記の推察の真偽をたずためには将来の研究を待たねばならない。

BEH2の機能調節 (カテゴリー4と6)

BR シグナル伝達経路下流で働く鍵転写因子である **BES1** と **BZR1** は、主にタンパク質水準の修飾により分子機能が調節されることが知られている (Gampala et al., 2007; He et al., 2002; Ryu et al., 2010; Vert & Chory, 2006)。例えば、リン酸化の度合いに応じて、核一細胞質移動、プロテアソームを介した分解、標的プロモーターへの結合能の制御を受ける。Yin et al. (2005) は **BEH2** が BL により脱リン酸化することを報告し

ているが、筆者も BEH2 タンパク質の BL による脱リン酸化と Brz によるリン酸化を確認した (Figure 20)。しかし、BR 量に依存した核-細胞質移動制御を確認することはできなかった。すなわち、BL や Brz 存在下でも BEH2:GFP に由来する蛍光が核で検出されたこと (Figure 13) から、BEH2 タンパク質は恒常的に核局在すると考えられた。これまで、BES1 と BZR1 に関する報告から、4つの BEH ホモログも核-細胞質移動制御を受けると信じられていたので、筆者の発見は従前の見解に一石を投じたと考えられる。

上述の通り、BES1・BZR1 の機能調節の多くがタンパク質水準で起きていることは事実であるが、筆者は BEH2 と BEH1 の発現が BL により有意に下方制御を受けること、反対に BES1 の発現が僅かに上方制御を受けることを見出した (Figure 7)。中でも BEH2 発現の下方制御は顕著であった。また、この下方制御は、正規 (canonical) の BR シグナル伝達の下に転写水準で起こり、BZR1 よりも BES1 の寄与度が高いことが分かった (Figure 11, 12)。加えて、BEH2 の過剰発現体では、BR 応答遺伝子の発現が変動することも明らかになった (Figure 15)。これらの結果は、BEH2 と BR シグナル伝達との深い関係性を示すとともに、BEH2 が研究に値する興味深い遺伝子であることを強く示唆する。今後、筆者が所属する研究室で BR シグナル伝達における BEH2 の役割や生理機能の解明が進むことを望む。

結語

筆者は、これまで報告が少なかった BEH ホモログ 4 種に着目して発現様式を詳細に解析し、上述のような結果を得た。特に BEH2 と BEH4 については、発現特性の一端を明らかにすると共に、制御機構の一部を解明した。加えて、BEH2 については、BR シグナル伝達との密接な関係を持つことや、ストレス応答や光合成といった生

理事象と関連性を持つことを指摘した。筆者の成果は微々たるものであるが、BR シグナル伝達経路の解明に幾ばくかは貢献できたように思う。筆者は、BR やその類縁体を植物成長調整剤として利用する、また、BR 関連遺伝子を作物育種に利用するためには、地道な解析を積み重ねることが欠かせないと考え。将来的に BR シグナル伝達機構や BR の生理機能に関する知見が十分に蓄積され、実際に農業現場で BR が利用されることを期待している。

第5章 要旨

ブラシノステロイド (BR) は成長促進型の植物ホルモンであるが、各種ストレスに対する抵抗性を付与することも知られている。加えて、作物の収量増加をもたらすことから BR の農業への利用が期待されてきたが、日本では未だ植物成長調整剤としての登録はない。将来、BR を植物成長調整剤として、また、BR 関連遺伝子を品種改良の標的として農業で利用するためには、BR 作用機序、特に BR シグナル伝達機構の解明が不可欠である。

BR シグナル伝達経路で働く BES1・BZR1 は BR 作用の具現化に必須の転写因子であり、シロイヌナズナでは BES1/BZR1 homolog (BEH) 1-4 ホモログと共に小さなファミリーを構成している。筆者は、BR シグナル伝達の分子機構をさらに解明するために、BES1 や BZR1 と異なり知見が少ない BEH ホモログの性格付けを行い、以下の点を明らかにした。まず、全 6 遺伝子の発現を詳細に調べ、成長段階毎や器官毎の発現様式が互いに大きく異なること、しかし、いくらかはオーバーラップすることが分かった。また、これら遺伝子の発現は、BR 以外の 7 植物ホルモンに殆ど応答しないが、*BEH1* と *BEH2* の発現は活性型 BR・BL によって下方制御を受けることが分かった。このことは、これら 2 遺伝子が BR 機能と関わることを示唆する。さらに、GUS レポーターを用いた解析から、*BEH4* 遺伝子は、器官水準では植物の一生を通じて構成的に発現しているが、組織・細胞水準で見ると特異的発現をする場合があることが分かった。例えば、葉の表皮における発現が孔辺細胞とその周辺に存在する敷石細胞に限定されること、また、発芽直後の実生では成長に伴って発現が誘導されることなどである。このことは、*BEH4* が全体としてユビキタス(普遍的)な発現をするにも関わらず、発生

のある局面においては発現が特異的に制御されることを示している。加えて、BL で発現が下方制御される *BEH2* に焦点を当て研究を進めたところ、以下のことが明らかになった。まず、*BEH4* と異なり、*BEH2* の発現は組織特異性が非常に高く、特に根や鋸歯を含む葉の周縁部で強く発現していた。また、BL による *BEH2* 発現の下方制御は、BIN2 を含む GSK3 様キナーゼや BES1・BZR1 転写因子から構成される正規 (canonical) の BR シグナル伝達経路を通じて制御されること、さらに BZR1 よりも BES1 がこの制御に関与する可能性が高いことが分かった。加えて、*BEH2* タンパク質は BR の有無と無関係に常に核に局在することが分かった。このことは、*BEH2* が BES1 や BZR1 と異なり、内生 BR 量に応じた核—細胞質移動制御を受けないことを示している。さらに、RNA-seq データを用いた GO/KEGG エンリッチメント解析により、*BEH2* がストレス応答や光合成と関わりを持つことが示された。

最後に、本実験で明らかにされた BEH ホモログに関する新知見は、今後の BR シグナル伝達研究の発展や将来的な BR の農業利用、すなわち、植物成長調整剤への登録や BR 関連遺伝子を用いた品種育種に貢献することが期待される。

第 6 章 Summary

Brassinosteroids (BRs) are a class of growth promoting phytohormones, but they are also involved in response to various abiotic and biotic stressors and often confer stress tolerance to numerous crops, leading to the yield increase and market values as well, even in hostile environments. However, BRs have not yet been officially registered as plant growth regulators in Japan. BR action mechanisms, especially for BR signal transduction must be elucidated to utilize their functions effectively in agriculture.

BES1/BZR1 transcription factors are indispensable transcription factors acting in BR signaling pathway and construct a small family with four other BES1/BZR1 homologs (BEH) in *Arabidopsis*. This author molecularly characterized BEH proteins (and genes) to further elucidate the mechanisms underlying BR signaling and made the following findings. First, the author found that the expression of the four *BEH* genes were distinct with each other, regarding growth-stage dependence and organ specificity but exhibited some overlaps as well. Furthermore, their mRNA levels mostly remained unchanged responding to seven non-BR phytohormones. However, *BEH1* and *BEH2* were downregulated by BL, suggesting a close association with the BR function. Additionally, *BEH4* was ubiquitously expressed throughout the life of the plant but displayed some expression preference. For instance, *BEH4* expression was limited to guard cells and the adjacent pavement cells in the leaf epidermis and was induced during growth progression in very young seedlings, suggesting that *BEH4* is specifically regulated in certain contexts, although it is almost constitutively controlled. Moreover, the author proceeded the research on *BEH2* that was downregulated by BL, and made the following findings. *BEH2* was expressed preferentially in

the roots and leaf margins including serrations, which was quite different from another member *BEH4*, and that BRs downregulated *BEH2* through a module containing GSK3-like kinases and BES1/BZR1 TFs, among which BES1, rather than BZR1, contributed to this process. In addition, *BEH2* consistently existed in the nucleus, suggesting that its subcellular localization is not under BR-dependent nuclear-cytoplasmic shuttling control. Furthermore, gene ontology analysis on RNA-seq data indicated that *BEH2* may be implicated in stress response and photosynthesis.

These findings might assist in the future elucidation of the molecular mechanisms underlying BR signaling, and hopefully help the future application of BRs to agriculture through their registration as plant growth regulators as well as the usage of BR-related genes in crop breeding.

謝辞

本研究の実施の機会をいただくと共に、その遂行及び本論文の執筆にあたって始終厳しくも温かいご指導をいただきました、鹿児島大学農学部岡本繁久准教授に心から感謝いたします。そして数々のご助言とご指導を賜りました鹿児島大学農学部の岩井久教授、佐賀大学農学部の鈴木章弘教授に心から感謝の意を表します。また、鹿児島大学農学部の境雅夫教授、吉田理一郎准教授、清水圭一准教授には、研究活動における様々のご助言や励ましのお言葉に加え、ご多忙の中、本論文の審査をしていただきました。ここに深い謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、米国ソーク研究所の Joanne Chory 教授より *BESI* と *BZRI* の機能獲得型変異体である *bes1-D* と *bzr1-ID* をご分与いただきました。また、東京大学大学院農学生命科学研究科の浅見忠男教授よりブラシナゾールとアバミン SG を、岡山理科大学生命科学部の林謙一郎教授よりビキニンをご分与いただきました。そして pTH2 プラスミドは静岡県立農林環境専門職大学生産環境経営学部の丹羽康夫准教授よりご分与いただきました。ここに、深謝の意を表します。

最後に、個々の実験や学生生活において様々な面で協力し支えてくださった鹿児島大学農学部植物生命工学研究室の学生の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- Bai, M. Y., Shang, J. X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., . . . Wang, Z. Y. (2012). Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol*, *14*(8), 810-817. doi:10.1038/ncb2546
- Bai, M. Y., Zhang, L. Y., Gampala, S. S., Zhu, S. W., Song, W. Y., Chong, K., & Wang, Z. Y. (2007). Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(34), 13839-13844. doi:10.1073/pnas.0706386104
- Brumos, J., Robles, L. M., Yun, J., Vu, T. C., Jackson, S., Alonso, J. M., & Stepanova, A. N. (2018). Local auxin biosynthesis is a key regulator of plant development. *Dev Cell*, *47*(3), 306-318.e305. doi:10.1016/j.devcel.2018.09.022
- Caño-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vafeados, D., Mora-García, S., Cheng, J. C., . . . Chory, J. (2004). BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development*, *131*(21), 5341-5351. doi:10.1242/dev.01403
- Chen, L. G., Gao, Z., Zhao, Z., Liu, X., Li, Y., Zhang, Y., . . . Tang, W. (2019a). BZR1 family transcription factors function redundantly and indispensably in BR signaling but exhibit BRI1-independent function in regulating anther development in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, *12*(10), 1408-1415. doi:10.1016/j.molp.2019.06.006
- Chen, W., Lv, M., Wang, Y., Wang, P. A., Cui, Y., Li, M., . . . Li, J. (2019b). BES1 is activated by EMS1-TPD1-SERK1/2-mediated signaling to control tapetum development in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun*, *10*(1), 4164. doi:10.1038/s41467-019-12118-4
- Chono, M., Honda, I., Zeniya, H., Yoneyama, K., Saisho, D., Takeda, K., . . . Watanabe, Y. (2003). A semidwarf phenotype of barley uzu results from a nucleotide substitution in the gene encoding a putative brassinosteroid receptor. *Plant Physiology*, *133*(3), 1209-1219. doi:10.1104/pp.103.026195
- De Rybel, B., Audenaert, D., Vert, G., Rozhon, W., Mayerhofer, J., Peelman, F., . . . Beeckman, T. (2009). Chemical inhibition of a subset of *Arabidopsis thaliana* GSK3-like kinases

- activates brassinosteroid signaling. *Chem Biol*, 16(6), 594-604. doi:10.1016/j.chembiol.2009.04.008
- De Vleeschauwer, D., Van Buyten, E., Satoh, K., Balidion, J., Mauleon, R., Choi, I. R., . . . Höfte, M. (2012). Brassinosteroids antagonize gibberellin- and salicylate-mediated root immunity in rice. *Plant Physiol*, 158(4), 1833-1846. doi:10.1104/pp.112.193672
- Divi, U. K., Rahman, T., & Krishna, P. (2010). Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biology*, 10(1), 151. doi:10.1186/1471-2229-10-151
- Dobin, A., & Gingeras, T. R. (2015). Mapping RNA-seq reads with STAR. *Curr Protoc Bioinformatics*, 51, 11.14.11-11.14.19. doi:10.1002/0471250953.bi1114s51
- Fukuta, N., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Fukuta, Y., & Nakayama, M. (2004). 'Rinrei', a brassinosteroid-deficient dwarf mutant of faba bean (*Vicia faba* L.). *Physiologia Plantarum*, 121(3), 506-512. doi:https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00326.x
- Furuya, T., Saito, M., Uchimura, H., Satake, A., Nosaki, S., Miyakawa, T., . . . Kondo, Y. (2021). Gene co-expression network analysis identifies BEH3 as a stabilizer of secondary vascular development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 33(8), 2618-2636. doi:10.1093/plcell/koab151
- Gampala, S. S., Kim, T. W., He, J. X., Tang, W., Deng, Z., Bai, M. Y., . . . Wang, Z. Y. (2007). An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 13(2), 177-189. doi:10.1016/j.devcel.2007.06.009
- Gui, J., Zheng, S., Liu, C., Shen, J., Li, J., & Li, L. (2016). OsREM4.1 interacts with OsSERK1 to coordinate the interlinking between abscisic acid and brassinosteroid signaling in rice. *Dev Cell*, 38(2), 201-213. doi:10.1016/j.devcel.2016.06.011
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., & Maliga, P. (1994). The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol*, 25(6), 989-994. doi:10.1007/bf00014672
- He, J.-X., Gendron, J. M., Yang, Y., Li, J., & Wang, Z.-Y. (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid

- signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), 10185-10190. doi:10.1073/pnas.152342599
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Mol Plant*, 7(8), 1267-1287. doi:10.1093/mp/ssu049
- Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5(4), 387-405. doi:10.1007/BF02667740
- Jiang, J., Zhang, C., & Wang, X. (2015). A recently evolved isoform of the transcription factor BES1 promotes brassinosteroid signaling and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 27(2), 361-374. doi:10.1105/tpc.114.133678
- Jiang, W. B., Huang, H. Y., Hu, Y. W., Zhu, S. W., Wang, Z. Y., & Lin, W. H. (2013). Brassinosteroid regulates seed size and shape in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 162(4), 1965-1977. doi:10.1104/pp.113.217703
- Jonak, C., & Hirt, H. (2002) Glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinases in plants: an emerging family with novel functions. *Trends Plant Sci.* 7(10), 457-61. doi: 10.1016/s1360-1385(02)02331-2.
- Kim, H. B., Kwon, M., Ryu, H., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., . . . Choe, S. (2006). The regulation of *DWARF4* expression is likely a critical mechanism in maintaining the homeostasis of bioactive brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 140(2), 548-557. doi:10.1104/pp.105.067918
- Kim, T. W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J. X., . . . Wang, Z. Y. (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol*, 11(10), 1254-1260. doi:10.1038/ncb1970
- Kim, T. W., Michniewicz, M., Bergmann, D. C., & Wang, Z. Y. (2012). Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature*, 482(7385), 419-422. doi:10.1038/nature10794
- Krueger F. 2015. Trim Galore!: A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files, with some extra functionality for MspI-digested RRBS-type (Reduced Representation Bisulfite-Seq) libraries methylation.

- Available online at: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/
- Lau, O. S., Davies, K. A., Chang, J., Adrian, J., Rowe, M. H., Ballenger, C. E., & Bergmann, D. C. (2014). Direct roles of SPEECHLESS in the specification of stomatal self-renewing cells. *Science*, *345*(6204), 1605-1609. doi:10.1126/science.1256888
- Lee, L. R., & Bergmann, D. C. (2019). The plant stomatal lineage at a glance. *J Cell Sci*, *132*(8). doi:10.1242/jcs.228551
- Li, J., & Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, *90*(5), 929-938. doi:10.1016/s0092-8674(00)80357-8
- Li, J., Wen, J., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F. E., & Walker, J. C. (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, *110*(2), 213-222. doi:10.1016/s0092-8674(02)00812-7
- Li, Q. F., Lu, J., Yu, J. W., Zhang, C. Q., He, J. X., & Liu, Q. Q. (2018). The brassinosteroid-regulated transcription factors BZR1/BES1 function as a coordinator in multisignal-regulated plant growth. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, *1861*(6), 561-571. doi:10.1016/j.bbagr.2018.04.003
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, *30*(7), 923-930. doi:10.1093/bioinformatics/btt656
- Lv, B., Tian, H., Zhang, F., Liu, J., Lu, S., Bai, M., . . . Ding, Z. (2018). Brassinosteroids regulate root growth by controlling reactive oxygen species homeostasis and dual effect on ethylene synthesis in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, *14*(1), e1007144. doi:10.1371/journal.pgen.1007144
- Ma, X., Xu, G., He, P., & Shan, L. (2016). SERKING Coreceptors for Receptors. *Trends Plant Sci*, *21*(12), 1017-1033. doi:10.1016/j.tplants.2016.08.014
- Madeira, F., Tinti, M., Murugesan, G., Berrett, E., Stafford, M., Toth, R., . . . Barton, G. J. (2015). 14-3-3-Pred: improved methods to predict 14-3-3-binding phosphopeptides. *Bioinformatics*, *31*(14), 2276-2283. doi:10.1093/bioinformatics/btv133

- Manghwar, H., Hussain, A., Ali, Q., & Liu, F. (2022). Brassinosteroids (BRs) role in plant development and coping with different stresses. *Int J Mol Sci*, 23(3). doi:10.3390/ijms23031012
- Mao, J., & Li, J. (2020). Regulation of three key kinases of brassinosteroid signaling pathway. *Int J Mol Sci*, 21(12). doi:10.3390/ijms21124340
- Melotto, M., Underwood, W., & He, S. Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu Rev Phytopathol*, 46, 101-122. doi:10.1146/annurev.phyto.121107.104959
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., . . . Yoshida, S. (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J*, 33(5), 887-898. doi:10.1046/j.1365-313x.2003.01675.x
- Nam, K. H., & Li, J. (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*, 110(2), 203-212. doi:10.1016/s0092-8674(02)00814-0
- Narusaka, M., Shiraiishi, T., Iwabuchi, M., & Narusaka, Y. (2010). The floral inoculating protocol: a simplified *Arabidopsis thaliana* transformation method modified from floral dipping. *Plant Biotechnology*, 27(4), 349-351. doi:10.5511/plantbiotechnology.27.349
- Niwa, Y. (2003). A synthetic green fluorescent protein gene for plant biotechnology. *Plant Biotechnology*, 20(1), 11.
- Nosaki, S., Miyakawa, T., Xu, Y., Nakamura, A., Hirabayashi, K., Asami, T., . . . Tanokura, M. (2018). Structural basis for brassinosteroid response by BIL1/BZR1. *Nat Plants*, 4(10), 771-776. doi:10.1038/s41477-018-0255-1
- Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., & Vilo, J. (2019). g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res*, 47(W1), W191-w198. doi:10.1093/nar/gkz369
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616
- Rozhon, W., Mayerhofer, J., Petutschnig, E., Fujioka, S., & Jonak, C. (2010). ASKtheta, a group-

- III *Arabidopsis* GSK3, functions in the brassinosteroid signalling pathway. *Plant J*, 62(2), 215-223. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04145.x
- Ryu, H., Cho, H., Kim, K., & Hwang, I. (2010). Phosphorylation dependent nucleocytoplasmic shuttling of BES1 is a key regulatory event in brassinosteroid signaling. *Mol Cells*, 29(3), 283-290. doi:10.1007/s10059-010-0035-x
- Ryu, H., Kim, K., Cho, H., Park, J., Choe, S., & Hwang, I. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *Plant Cell*, 19(9), 2749-2762. doi:10.1105/tpc.107.053728
- Saini, S., Sharma, I., & Pati, P. K. (2015). Versatile roles of brassinosteroid in plants in the context of its homeostasis, signaling and crosstalks. *Front Plant Sci*, 6, 950. doi:10.3389/fpls.2015.00950
- Saito, M., Kondo, Y., & Fukuda, H. (2018). BES1 and BZR1 redundantly promote phloem and xylem differentiation. *Plant Cell Physiol*, 59(3), 590-600. doi:10.1093/pcp/pcy012
- Sanford, J. C., Smith, F. D., & Russell, J. A. (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol*, 217, 483-509. doi:10.1016/0076-6879(93)17086-k
- Shang, Y., Dai, C., Lee, M. M., Kwak, J. M., & Nam, K. H. (2016). BRI1-associated receptor kinase 1 regulates guard cell ABA signaling mediated by Open Stomata 1 in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 9(3), 447-460. doi:10.1016/j.molp.2015.12.014
- Shu, K., Liu, X.-d., Xie, Q., & He, Z.-h. (2016). Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Mol Plant*, 9(1), 34-45. doi:https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.010
- Siddiqui, H., Hayat, S., & Bajguz, A. (2018). Regulation of photosynthesis by brassinosteroids in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(3), 59. doi:10.1007/s11738-018-2639-2
- Sun, Y., Fan, X. Y., Cao, D. M., Tang, W., He, K., Zhu, J. Y., . . . Wang, Z. Y. (2010). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 19(5), 765-777. doi:10.1016/j.devcel.2010.10.010
- Tanaka, K., Asami, T., Yoshida, S., Nakamura, Y., Matsuo, T., & Okamoto, S. (2005).

- Brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis* is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism. *Plant Physiol*, 138(2), 1117-1125. doi:10.1104/pp.104.058040
- Tanaka, K., Nakamura, Y., Asami, T., Yoshida, S., Matsuo, T., & Okamoto, S. (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. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22(3), 259-271. doi:10.1007/s00344-003-0119-3
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Oses-Prieto, J. A., . . . Wang, Z. Y. (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol*, 13(2), 124-131. doi:10.1038/ncb2151
- Van Nguyen, T., Park, C. R., Lee, K. H., Lee, S., & Kim, C. S. (2021). BES1/BZR1 Homolog 3 cooperates with E3 ligase AtRZF1 to regulate osmotic stress and brassinosteroid responses in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 72(2), 636-653. doi:10.1093/jxb/eraa458
- Vert, G., & Chory, J. (2006). Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature*, 441(7089), 96-100. doi:10.1038/nature04681
- Wang, S., Liu, J., Zhao, T., Du, C., Nie, S., Zhang, Y., . . . Wang, X. (2019). Modification of Threonine-1050 of SIBRI1 regulates BR signalling and increases fruit yield of tomato. *BMC Plant Biol*, 19(1), 256. doi:10.1186/s12870-019-1869-9
- Wang, Y., Sun, S., Zhu, W., Jia, K., Yang, H., & Wang, X. (2013). Strigolactone/MAX2-induced degradation of brassinosteroid transcriptional effector BES1 regulates shoot branching. *Dev Cell*, 27(6), 681-688. doi:10.1016/j.devcel.2013.11.010
- Wang, Z. Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., . . . Chory, J. (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell*, 2(4), 505-513. doi:10.1016/s1534-5807(02)00153-3
- Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., & Chory, J. (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature*, 410(6826), 380-383.

doi:10.1038/35066597

- Wingett, S. W., & Andrews, S. (2018). FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res*, 7, 1338. doi:10.12688/f1000research.15931.2
- Xia, X. J., Huang, L. F., Zhou, Y. H., Mao, W. H., Shi, K., Wu, J. X., . . . Yu, J. Q. (2009). Brassinosteroids promote photosynthesis and growth by enhancing activation of Rubisco and expression of photosynthetic genes in *Cucumis sativus*. *Planta*, 230(6), 1185-1196. doi:10.1007/s00425-009-1016-1
- Yan, Q., Wang, L., & Li, X. (2018). GmBEHL1, a BES1/BZR1 family protein, negatively regulates soybean nodulation. *Scientific reports*, 8(1), 7614. doi.org/10.1038/s41598-018-25910-x
- Yin, X., Tang, M., Xia, X., & Yu, J. (2021). BRASSINAZOLE RESISTANT 1 mediates brassinosteroid-induced calvin cycle to promote photosynthesis in tomato. *Front Plant Sci*, 12, 811948. doi:10.3389/fpls.2021.811948
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J. (2005). A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell*, 120(2), 249-259. doi:10.1016/j.cell.2004.11.044
- Yin, Y., Wang, Z. Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J. (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*, 109(2), 181-191. doi:10.1016/s0092-8674(02)00721-3
- Yoshimitsu, Y., Tanaka, K., Fukuda, W., Asami, T., Yoshida, S., Hayashi, K., . . . Okamoto, S. (2011). Transcription of *DWARF4* plays a crucial role in auxin-regulated root elongation in addition to brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 6(8), e23851. doi:10.1371/journal.pone.0023851
- Yu, X., Li, L., Zola, J., Aluru, M., Ye, H., Foudree, A., . . . Yin, Y. (2011). A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 65(4), 634-646. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04449.x
- Zhao, J., Peng, P., Schmitz, R. J., Decker, A. D., Tax, F. E., & Li, J. (2002). Two putative BIN2

substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. *Plant Physiol*, 130(3),

1221-1229. doi:10.1104/pp.102.010918

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(6), 12.