

博士論文

シロイヌナズナにおけるジベレリン受容体 AtGID1 の解析

平成 18 年度進学 鈴木浩之

指導教員 浅見忠男

目次

図表目次

略語表

第 1 章 序論

1-1 本研究の背景.....	1
1-1-1 はじめに	
1-1-2 ジベレリンの構造活性相関	
1-1-3 活性型ジベレリンの生合成とその制御	
1-1-4 ジベレリンのシグナル伝達	
1-2 受容体同定を起点とする本研究の目的.....	18
1-2-1 ジベレリン受容体	
1-2-2 本研究の目的	

第 2 章 GID1 に関する機能欠損型多重変異体の解析

2-1 緒言.....	35
2-2 各 <i>GID1</i> 機能欠損型変異体の取得.....	37
2-3 <i>GID1</i> 二重欠損変異体の作出および解析.....	41
2-3-1 <i>GID1</i> 二重欠損変異体の作出	
2-3-2 <i>GID1</i> 二重欠損変異体の表現形質	
2-3-3 <i>GID1</i> 二重欠損変異体の GA 応答性	
2-4 <i>GID1</i> 三重欠損変異体の作出および解析.....	54
2-4-1 <i>GID1</i> 三重変異体の作出	
2-4-2 <i>GID1</i> 三重変異体の表現形質	
2-4-3 <i>GID1</i> 三重変異体の GA 非感受性	
2-5 実験の部.....	62

第 3 章 GID1 間の量的差異の検出

3-1 緒言.....	68
3-2 <i>GID1-2KO</i> における <i>GID1</i> ・ <i>DELLA</i> 遺伝子の発現状況の把握.....	70
3-3 <i>GID1-GUS</i> 融合遺伝子発現個体を用いた <i>GID1</i> 分布状況の把握.....	74
3-3-1 <i>pGID1::GID1-GUS</i> 形質転換体の作出	

3-3-2	<i>pGID1::GID1-GUS</i> 発現形質転換体の花茎における GUS 活性の検出	
3-3-3	<i>pGID1::GID1-GUS</i> 発現形質転換体の雄蕊における GUS 活性の検出	
3-4	実験の部.....	85
第 4 章 GID1 間の質的差異の検出		
4-1	緒言.....	93
4-2	特定の GID1-DELLA 間で生ずる優先的相互作用の検出.....	95
	4-2-1 GID1 二種と DELLA 一種で構成された酵母 three-hybrid 系の構築	
	4-2-2 酵母の生育状況を指標とする GID1-DELLA 間の親和性評価	
4-3	総合考察.....	107
4-4	実験の部.....	110
	本論文の要旨.....	116
	参考文献.....	120
	謝辞.....	128

図表目次

図 1-1	ジベレリンの化学構造.....	3
図 1-2	高等植物において一般的に確認されるジベレリンの生合成経路.....	4
図 1-3	DELLA タンパク質のアミノ酸配列と機能ドメイン.....	8
図 1-4	DELLA 因子 loss-of-function 変異体で認められる花茎の表現形質... ..	11
図 1-5	花器官における DELLA 因子 loss-of-function 変異の効果.....	12
図 1-6	種子発芽における DELLA 因子 loss-of-function 変異の効果.....	14
図 1-7	DELLA 遺伝子の時期別・器官別の発現状況.....	15
図 1-8	イネ GA 受容体欠損変異体 <i>gibberellin insensitive dwarf1(gid1)</i> の表現型.....	19
図 1-9	<i>gid1</i> 変異体の GA 非感受性.....	20
図 1-10	イネ GID1 リコンビナントタンパク質の GA 結合能.....	21
図 1-11	<i>slr1 gid1</i> 二重変異体の表現型.....	23
図 1-12	イネ GID1 と SLR1 の GA 依存的相互作用.....	24
図 1-13	イネ GID1 の推定アミノ酸配列.....	25
図 1-14	予想される GA 受容伝達機構.....	27
図 1-15	シロイヌナズナの GA 受容体およびその類縁タンパク質の推定アミノ 酸配列.....	28
図 1-16	イネ <i>gid1</i> 変異体を用いたシロイヌナズナ GA 受容体の機能確認... ..	30
図 1-17	3種のシロイヌナズナ GID1 リコンビナントタンパク質における GA 結 合能の検出.....	31
図 1-18	3種の GID1 と 5種の DELLA 間で認められた GA 依存的相互作用. 33	
表 1-1	OsGID1 との結合に関する GA 構造要求性.....	22
表 1-2	3種のシロイヌナズナ GID1 との結合に関する GA 構造要求性.....	32
図 2-1	各 <i>GID1</i> 変異体ラインにおける <i>GID1</i> 遺伝子の発現状況および Ds エレ メント, T-DNA 挿入位置.....	38
図 2-2	各 <i>GID1</i> 変異体の成熟個体.....	40
図 2-3	<i>GID1</i> 多重変異体作出の経緯.....	42
図 2-4	各 <i>GID1</i> 二重変異体の芽生えおよび成熟個体.....	43
図 2-5	各 <i>GID1</i> 二重変異体の経時的な花茎の伸長.....	44
図 2-6	<i>gid1a-1 gid1b-1</i> 二重変異体の長角果の様子と人工的な受粉処理 の効果.....	46
図 2-7	各 <i>GID1</i> 二重変異体における種子収穫量.....	47
図 2-8	<i>gid1a-1 gid1b-1</i> 二重変異体の花器官の様子.....	48

図 2-9	各 <i>GID1</i> 二重変異体の完熟種子表面構造.....	49
図 2-10	各 <i>GID1</i> 二重変異体の花茎における GA 応答性遺伝子の発現解析..	51
図 2-11	各 <i>GID1</i> 二重変異体の芽生えにおける GA 応答性遺伝子の発現解析	53
図 2-12	<i>GID1a/gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1</i> 変異体後代種子の遺伝子型と発芽状況 の関連性.....	55
図 2-13	<i>GID1</i> 三重変異体の極矮性形質.....	57
図 2-14	<i>GID1</i> 三重変異体の芽生えにおける GA 投与の効果.....	59
図 2-15	<i>GID1</i> 三重変異体の芽生えにおける GA 応答性遺伝子の発現解析...	60
図 3-1	<i>GID1</i> 二重変異体における <i>GID1</i> および <i>DELLA</i> 遺伝子の発現状況...	71
図 3-2	<i>GID1</i> 分布状況解析の為に構築した植物発現用ベクター.....	75
図 3-3	各 <i>pGID1::GID1-GUS</i> 発現個体花茎における <i>GID1-GUS</i> 発現量と翻訳産 物の存在状況.....	77
図 3-4	基部付近の花茎における <i>GID1a-GUS</i> の組織的局在.....	80
図 3-5	各 <i>pGID1::GID1-GUS</i> 発現個体芽生えにおける <i>GID1-GUS</i> 存在状況.	81
図 3-6	各 <i>pGID1::GID1-GUS</i> 発現個体花器官における <i>GID1-GUS</i> 発現量と翻訳 産物の存在状況.....	83
図 4-1	構築した酵母 three-hybrid 系の模式図.....	96
図 4-2	three-hybrid 系酵母の非選択培地における生育状況.....	98
図 4-3	^{2nd} <i>GID1</i> 非存在下における three-hybrid 系酵母の生育状況.....	99
図 4-4	<i>GID1</i> 二種、 <i>DELLA</i> 一種を発現させる three-hybrid 系酵母 の生育状況.....	101
図 4-5	three-hybrid 系酵母における ^{2nd} <i>GID1</i> の存在状況の把握.....	103
図 4-6	<i>GID1-DELLA</i> 間の親和性の差異.....	104

略語表

3-AT	3-aminotriazol
ABA	abscisic acid
AD	<i>trans</i> -activation domain
Amp	ampicillin
APS	ammonium persulfate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
BAP	bacterial alkaline phosphatase
BD	DNA binding domain
β-gal	β-galactosidase
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CPS	copalyl diphosphate synthase
Ct	cycle threshold
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
dNTP	deoxyribonucleoside 5'-triphosphates
DTT	dithiothreitol
DW	distilled water
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
GA	gibberellin
GA2ox	gibberellin 2-oxidase
GA20ox	gibberellin 20-oxidase
GA3ox	gibberellin 3-oxidase
GAMT	gibberellin methyl transferase
GA _x	gibberellin A _x
GGDP	geranylgeranyl diphosphate
GST	gluthathione-S-transferase
GUS	β-glucuronidase
HSL	hormone sensitive lipase
HRP	horseradish peroxidase
IAA	indole-3-acetic acid

IPTG	isopropyl- β - <u>D</u> -thiogalactoside
KAO	<i>ent</i> -kaurenoic acid oxidase
kDa	kilodalton
Km	kanamycin
KO	<i>ent</i> -kaurene oxidase
KS	<i>ent</i> -kaurene synthase
Leu	<u>L</u> -leucine
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
mRNA	messenger ribonucleic acid
NLS	nuclear localization signal
NOS	nopaline synthase
PAC	paclobutrazol
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
SDS	sodium dodecyl sulfate
sDW	sterilized distilled water
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Trp	<u>L</u> -tryptophan
Uni	uniconazol-P
Ura	uracil
UTR	untranslated region
X-Gal	5-bromo 4-chloro 3-indolyl β - <u>D</u> -galactoside
X-Gluc	5-bromo 4-chloro 3-indolyl β - <u>D</u> -glucuronide

第 1 章 序論

1-1 本研究の背景

1-1-1 はじめに

狭義の植物ホルモン(phytohormone)とは、「植物が自身の生理機能調節のために生産する低分子化合物で、低濃度で作用を示し、様々な植物種にまたがってその存在と生理機能が保存されているもの」を指す。現在までにこの定義を満たすものとして、オーキシシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン、ブラシノステロイド、ジャスモン酸などが知られ、最近になって植物地上部の枝分かれ抑制因子としてストリゴラクトンが新たな植物ホルモンとして報告されている(Umehara *et al.*, 2008; Gomez-Roldan *et al.*, 2008)。また、これらとは別に、ファイトスルホカインや CLE ペプチドなど内生のペプチド系生理活性物質(Davies, 2004)も植物の生長制御に重要な機能を果たすことが明らかとなり、植物ホルモンの再定義の必要性が議論されている。

その中であってジベレリンは、その発見から天然に存在する多様な同族体の構造決定、その生合成経路と関与する酵素遺伝子の同定、そして、シグナル伝達に関わる因子の特定に至るまで重要な発見に多くの日本人研究者の関与が際だつ代表例の一つである。筆者の所属する研究室においても、これまでその多くの部分に関与してきた歴史的経緯がある。そこで、本研究着手に至った経緯を説明する前に、ジベレリンの構造活性相関(1-1-2 項)、生合成とその制御機構(1-1-3 項)、シグナル伝達に関する知見(1-1-4 項)など、周辺の事情を先に述べる。

1-1-2 ジベレリンの構造活性相関

ジベレリン(以下、GA と表記)とは、*ent*-ジベレラン骨格を母核とするジテルペン化合物の総称で、糸状菌などの真菌および植物からこれまでに 130 種以上に及ぶ多様な同族体が同定されている。ジベレリンがイネ馬鹿苗病の原因毒素として最初に報告され、その後に植物自身も生産することが判明し、種子の発芽過程や茎部の伸長、花器官の分化・誘導など様々な生理現象に深く関与することが既に周知の事実となっている(Davies, 2004)。

種々の生物活性試験から集約された情報として、GA が生理的な活性を示すために必要な構造的特徴として、「3 β 位水酸基、4 位から 10 位へ架橋された γ -ラクトン構造、遊離状態の 6 位カルボキシル基を有し、2 β 位に水酸基を有しない炭素数 19 の GA」とされている(図 1-1)。従って、これらの条件のいずれかを欠く GA は全く生理活性を示さないか、示しても微弱な活性しか有していないため、このような不活性型の GA は生合成経路上の中間体や主要経路からの分岐産物、あるいは、活性型が代謝された産物と考えられている。上記の活性に必要な構造的条件をすべて満たす活性型 GA としては、gibberellin A₁ (GA₁)をはじめとして、GA₃, GA₄, GA₇ など数種に限られる(図 1-1)。

1-1-3 活性型ジベレリンの生合成とその制御

高等植物で一般的に認められる *ent*-カウレンから活性型 GA に至るまでの生合成経路を図 1-2 に示す。遺伝子改変株の作出が可能なモデル植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)やイネ(*Oryza sativa*)においては全ゲノム配列情報の公開が加速的にはたらき、経路上で機能する酵素遺伝子群の同定はほぼ完了した状況にある。経路上流から概説すると、まず出発物質で

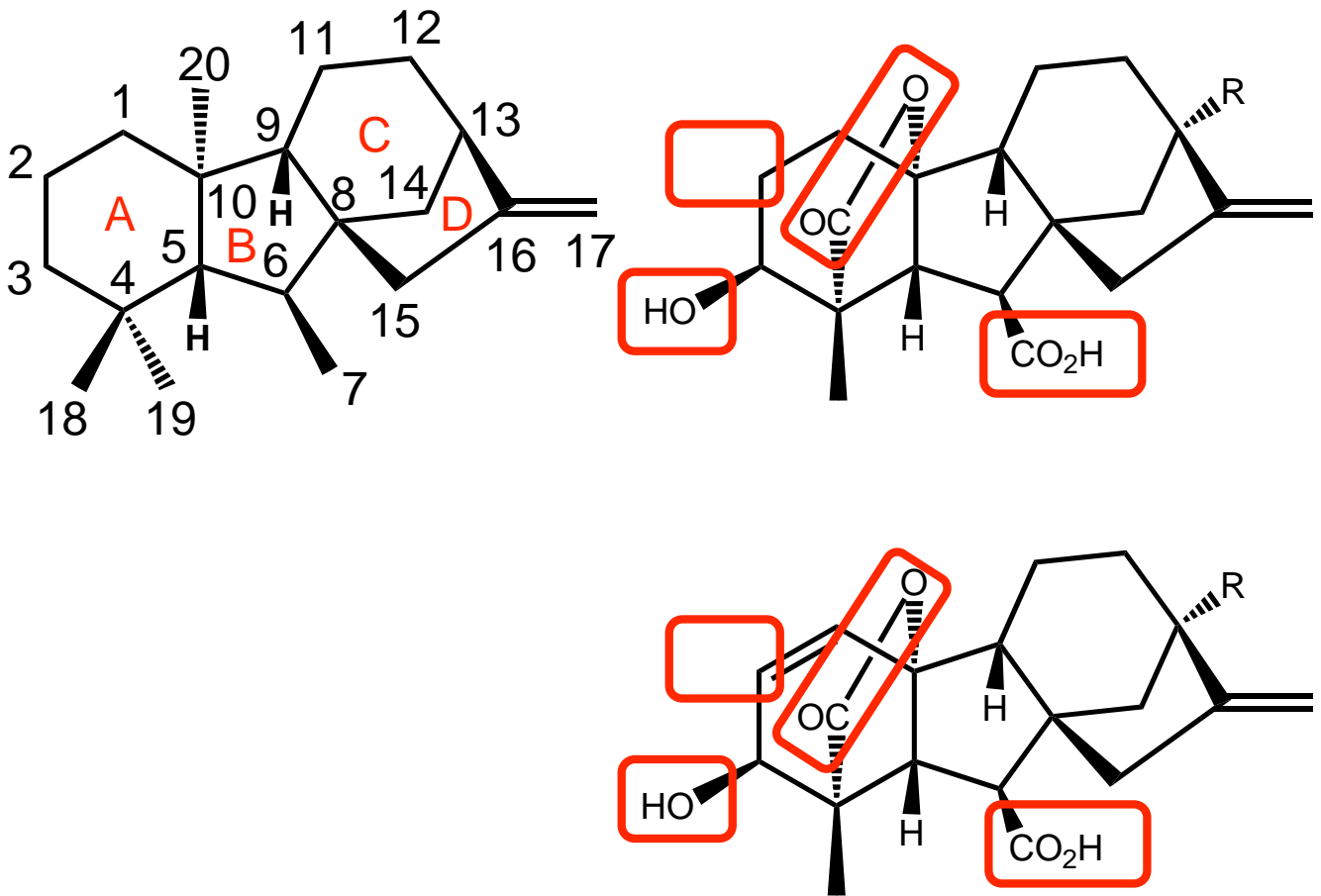


図1-1. ジベレリンの化学構造

左図： *ent*-ジベレラン骨格の化学構造。数字は炭素番号を示し、アルファベットは各環構造の慣用的な名称を示す。

右図： 代表的な活性型ジベレリンの化学構造。赤線部分はGAとしての活性維持に必要とされている部分構造。上段： GA₁ (R=OH) および GA₄ (R=H)。下段： GA₃ (R=OH) および GA₇ (R=H)。

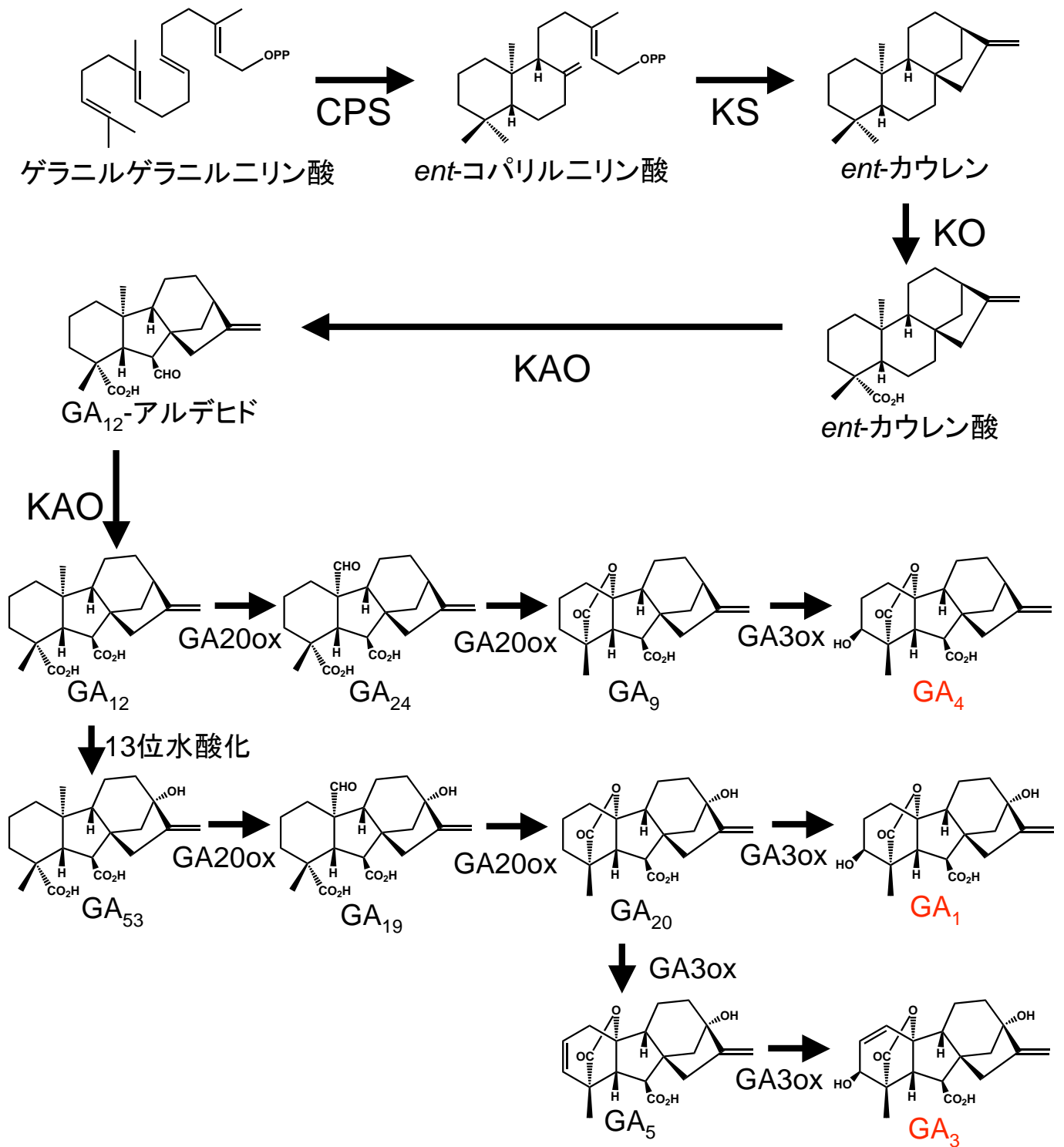


図1-2. 高等植物において一般的に確認されるジベレリンの生合成経路

ジベレリン生合成中間体および各反応を触媒する酵素名を記したものの。赤文字の*GA*₁, *GA*₄, *GA*₃が活性型*GA*である。13位水酸化酵素は現時点で同定されていない。また、活性型*GA*₇はおそらく*GA*₉より*GA3ox*の触媒により生成されると考えられているが、原著論文による報告はない。

あるゲラニルゲラニルニリン酸(GGDP)が 2 種のジテルペン環化酵素(CPS, KS)により *ent*-カウレンとなり(Sun *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1998b; Sakamoto *et al.*, 2004)、2 種のシトクロム P450 酸化酵素(KO, KAO)の働きによって炭素数 20 の GA_{12} が生成する(Helliwell *et al.*, 1998; Helliwell *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2004)。 GA_{12} は 2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素である GA 20-oxidase ($GA_{20}ox$)によって $GA_{12} \rightarrow GA_{15} \rightarrow GA_{24} \rightarrow GA_9$ の 3 段階の反応を経て活性型 GA_4 の直接の前駆体である GA_9 が生成する(Phillips *et al.*, 1995; Toyomasu *et al.*, 1997; Spielmeier *et al.*, 2002)。同じく 2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素である GA 3-oxidase ($GA_{3}ox$)により活性発現に重要な 3 β 位の水酸基が導入されて活性型 GA_4 が生成する(Chiang *et al.*, 1995; Yamaguchi *et al.*, 1998a; Itoh *et al.*, 2001)。この経路の GA はいずれも 13 位(図 1-1)に水酸基を持たないため 13 位非水酸化経路と呼ばれている。これに対して、13 位が水酸化された GA_{12} (GA_{53} と呼ばれる)が起点となった経路も早期 13 位水酸化経路として知られ、同酵素群の触媒反応を経由することで $GA_{53} \rightarrow GA_{44} \rightarrow GA_{19} \rightarrow GA_{20} \rightarrow GA_1$ の順で、最終的に活性型 GA_1 を生成する。植物生長調節剤として市販されている GA の大半は GA_3 である。 GA_3 は早期 13 位水酸化経路上の中間産物 GA_{20} から分岐して $GA_{20} \rightarrow GA_5 \rightarrow GA_3$ の経路により生合成され、同様に GA_7 (GA_3 と比較して 13 位に水酸基を持たない活性型 GA) も GA_9 から同様の経路で生成すると考えられるが原著論文としての報告例はみつからない。

GA_1 や GA_4 などの活性型の存在量は、生合成の速度だけでなくそれらの代謝速度とのバランスによって決まる。すなわち、不活性化に向けた代謝反応も存在量の重要な制御点である。GA の代謝経路のうち最も主要な経路は、 $GA_{20}ox$ や $GA_{3}ox$ と同様に 2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素 GA

2-oxidase (GA2ox)が関与する 2 β 位の水酸化反応である(Thomas *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2003; Schomburg *et al.*, 2003)。加えて、イネの出穂期に GA₄ や GA₉ など 13 位に水酸基を持たない活性型および生合成前駆体の GA のみを基質として、16, 17 位へのエポキシ化反応を触媒するシトクロム P450 酸化酵素 EUI が同定されている(Zhu *et al.*, 2006)。このエポキシ化反応を経由した代謝産物、ジオール体および 17 位配糖体(Hasegawa *et al.*, 1994)が見つかり、いずれも生理活性を示さないことから、EUI は GA2ox と異なる様式の不活性化に寄与している。同様に、6 位カルボキシル基のメチルエステル化反応に関与する GA メチル化酵素 GAMT1, 2 がシロイヌナズナより同定され(Varbanova *et al.*, 2007)、活性型 GA のメチルエステル体はいずれも低い生理活性しか示さないことから第 3 の不活性化経路であると言える。また、酵素本体は未同定ながら、グルコシルエステル結合型や 3 位水酸基を介した O-グルコシルエーテル結合型の GA 配糖体が高等植物から同定されており(Yokota *et al.*, 1971; Yamaguchi *et al.*, 1982)、GA 配糖体化酵素も代謝に関わると考えられる。

これら GA の生合成・代謝に関わる酵素遺伝子の発現は、極めて巧妙に制御されている。例えば、シロイヌナズナの GA 生合成経路上後半で機能する *AtGA20ox1*, *AtGA3ox1* の両遺伝子の発現量は生合成上の酵素遺伝子の変異によって GA が欠乏状態にある変異体では総じて高い発現量を示す(Chiang *et al.*, 1995; Phillips *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1999)。そして、それら GA 欠損変異体に対して活性型 GA を投与すると、速やかに発現量は減少する。これは最終的に生合成された活性型 GA によって伝達されたシグナル自体が GA 生合成遺伝子の発現を抑制することにより自らのシグナル伝達にブレーキをかける「フィードバック制御」として知られる。逆に、代謝酵素を

コードする *AtGA2ox1*, *AtGA2ox2* の発現は活性型 GA の投与により増加する (Thomas *et al.*, 1999)。これも *AtGA20ox1* や *AtGA3ox1* の発現制御機構と同様に、GA からのシグナルが自らの代謝を促進することによってシグナル量を抑制する仕組みであり、「フィードフォワード制御」と言われている。いずれもが GA の内生量やシグナル伝達量に関する恒常性の維持に寄与するメカニズムと考えられている。

1-1-4 ジベレリンのシグナル伝達

生合成された活性型 GA はそのシグナル受容に関わる分子と結合することが種々の GA 応答の端緒となる。GA 受容体については本研究に深く関与するため後述する。ここでは、GA シグナルの伝達に関わる因子として GA 受容体同定以前から明らかになっていたものについて最近の知見も交え概述する。すなわち、後に GA 受容体の直下に位置することが判明する負の制御因子 DELLA (1-1-4-1 項)、その DELLA 因子の分解に関わるユビキチン化・プロテアソーム分解系 (1-1-4-2 項)、そしてそれら主要伝達経路にどのように関与しているのか判然としていないものの、GA シグナルの伝達に影響を与えることが判明している因子をまとめて紹介する (1-1-4-3 項)。

1-1-4-1 負の制御因子 DELLA

DELLA 因子は C 末端側に植物特有の転写制御への関与が示唆される機能性領域があり、GRAS ファミリーと総称されるグループに属する (Pysh *et al.*, 1999)。その中で DELLA 因子は 1 つのクレードを形成しており、図 1-3 に示すように N 末端側に D-E-L-L-A および V-H-Y-N-P のアミノ酸配列がコア領域として高度に保存されていることから (Thomas and Sun, 2004; Fleet

SLR1	1	MKREYQE--AGG-SSGGSSADMGCKDK--VMAGAAGEEED-V-DELLAALGYKVRSSD	53
GAI	1	-----MKRDHHHHHQDKTMMNEEDDNG-M-DELLAVLGYKVRSSSE	42
RGA	1	MKRDHHQ-FQGRLSNHGTSSSSSSISKOKM-MMVKKEEDGGNMDELLAVLGYKVRSSSE	58
RGL1	1	-----MKREHNHRESSAGEGGSSMTTVIKKEAAGV-DELLVVLGYKVRSSD	46
RGL2	1	MKRGYGETWPPPKPLPASRSGEGPSMAOK-KKAD-DDNNNSNMDELLAVLGYKVRSSSE	58
RGL3	1	-----MKRSHQETSVEEAPSMEVK-LENGCGGGDDNM-DEFLAVLGYKVRSSD	48
SLR1	54	MAEVAQKLEQLEMAMGMGGVSAPGAADGFFVSHLATDTVHYNPSDLSWVESMSELNAP	113
GAI	43	MAEVAQKLEQLEM-M-MSNV-Q----EDDL-SQLATETVHYNPS	77
RGA	59	MAEVAQKLEQLET-M-MSNV-Q----EDGL-SHLATDTVHYNPSSELYSWLDNMLSELN-P	109
RGL1	47	MAEVAQKLEQLEM-V-LG-----DGI-SNLSDETIVHYNPS	77
RGL2	59	MAEVAQKLEQLEM-V-LSN--D----DVGST-VLN-DSVHYNPS	91
RGL3	49	MAEVAQKLEQLEM-V-LSN--D----IASSNFAFN-DTVHYNPS	82
SLR1	114	LPPIPPAPPAARHASTSSTVTGGGGSGFFELPAAADSSSSYALRPISLPVVATADPSAA	173
GAI	78	---AEYLWLDMLDNLNPPS-S-NAEYDL-KAIPGDAI-LN-Q-F--AT--DSA-SS-	121
RGA	110	-PPLPASSNGLDPVLPSPETCGFP-ASDYDL-KVIPGNAT-Y--Q-F-PAT--DSS-SS-	157
RGL1	78	-----S-DLSGWVES-ML-S-D-LDP--TRI--Q-	97
RGL2	92	-----SDL-SNWVES-MLSELNPN-AS-S-D-LDT--TRS-CV-	120
RGL3	83	-----SDL-SGWAQS-MLSOLNY--YP---D-LDP--NRI-C--	108
SLR1	174	DSARDTKRMITGGGSTSSSSSSSSSLGGGASRGVVEAAPPATQGAANAAPVPPVVVD	233
GAI	122	SN-QG---G-GG-DTYTNRKL---KCSN--GV-VETTT-AT--A--ESTRHV-VLV-D	161
RGA	158	SNNQNKRLKSCSSPDSMTSTSTGT-QIGGVIGTTVTTTT-TTTTAAGESTRSV-ILV-D	213
RGL1	98	EKPDSEYDLRAIPGSVAVYPRDEHV--TRR--S-KRTRIES---E-LS--STRSV-VVL-D	144
RGL2	121	DRSE--YDLRAIPGLSAPFKEEVF-DEEASS-KRIRLGS-WCES-DESTRSV-VLV-D	172
RGL3	109	D-----LR--P-ITO---DDECC-SSNSNSNKRIKLP-WCOSVTSSESTRSV-VLTI-E	151
SLR1	234	TEAGTIRLVHALACAEAVQENFAAEALVKQIPTLAASQGGAMRKVAIFYAEALARRV	293
GAI	162	SENGVRLVHALACAEAVQENITVAEALVKQIGFLAVSQIGAMRKVAIFYAEALARRI	221
RGA	214	SENGVRLVHALACAEAIQQNNTIAEALVKQIGGLAVSQGGAMRKVAIFYAEALARRI	273
RGL1	145	SEETGRLVHALACAEAVQNNKIALDALVKHVGLLAASQGGAMRKVAIFYAEALARRI	204
RGL2	173	SEETGRLVHALACAEATHQENLIALDALVKRVGLLAGSQGGAMRKVAIFYAEALARRI	232
RGL3	152	--ETGRLVHALACAEAVQENLIALDALVKRVGLLAGSQGGAMRKVAIFYAEALARRI	209
SLR1	294	YR-FR-PADS-TLLDAAFADLLHAFYESCPYLKFAHFTANQAILEAFAGCHRHHVVDLG	350
GAI	222	YRL-S-PSQS-P-IDHLSLDTLQMFYETCPYLKFAHFTANQAILEAFQGKRRHHVIDFS	277
RGA	274	YRL-S-PPQN-Q-IDHCLSDTLQMFYETCPYLKFAHFTANQAILEAFEGKRRHHVIDFS	329
RGL1	205	YRIYP-RDDV-A-L-SFSLDTLQIHFYESCPYLKFAHFTANQAILEVFATAEKHHVIDLG	260
RGL2	233	YRDTAETDVCAAVNPSFEVLEMFYESCPYLKFAHFTANQAILEAVTTARRHHVIDLG	292
RGL3	210	YR--I-HPSA-AATDPSFEETLQMFYDSCPYLKFAHFTANQAILEAVTTSRVHHVIDLG	265
SLR1	351	IKRGMQWPALQALALRPGPPSFRLTGVGPPQPDETDALQQVG-WKLAQFAHTTRVDFQ	409
GAI	278	MSQGLQWPALQALALRPGPPVFRLTGTGPPAPDNFDYLHEVGC-KLAHLAEATHVEFE	336
RGA	330	MNOGLQWPALQALALRPGPPITFRLTGTGPPAPDNDHLEHVEGC-KLAQLAEATHVEFE	388
RGL1	261	LNHGLQWPALQALALRPGPPDFRLTGTGYSYSL--D-IQEVG-WKLGQLASTIGVNF	315
RGL2	293	LNQGMQWPALQALALRPGPPSFRLTGTGPPQTESDLSLQQLG-WKLAQFAQNMVBEFE	351
RGL3	266	LNQGMQWPALQALALRPGPPSFRLTGVGNP-S-NREGIQELG-WKLAQLAQAATGVBEFK	322
SLR1	410	YRGLVAATLADLERFLLQPEGEADANEPEVIAVNSVFELHRLLAQPGALEKVLGTVHAV	469
GAI	337	YRGFVANTLADLDASML--E--LRPSE-IESVAVNSVFELHKLGRPGAIKVLGVVNOI	391
RGA	389	YRGFVANSADLDASML--E--LRPST-TEAVAVNSVFELHKLGRPGGIEKVLGVVKQI	443
RGL1	316	FKSIALNNLSDLKPEML--D--TRP-G-LESVAVNSVFELHRLLAHPSIDKFLSTIKSI	369
RGL2	352	FKGLAAESLSDLEPEMF--E--TRP-E-SETLVNSVFELHRLARSSTIEKLLNTVKAI	405
RGL3	323	FNGLTTERLSOLEPDMF--E--TRT-E-SETLVNSVFELHPVLSQPGSTIEKLLATVKAV	376
SLR1	470	RPRITVVEQENHNHSGFLDRFTEALHYYSITMFDLSLEGGSSGQAELESPPAAGGGGTQ	529
GAI	392	KPEITVVEQESNHNSPIFLDRFTEALHYYSITMFDLSLE-GVP-SGQ-DKVMSEVYLKQ-Q	447
RGA	444	KPVITVVEQESNHNGPVFLDRFTEALHYYSITMFDLSLE-GVP-NSQ-DKVMSEVYLKQ-Q	499
RGL1	370	RPDITVVEQENHNGTIVFLDRFTEALHYYSITMFDLSLE-G-P-PSQ-DRVMSEVYLGR-Q	424
RGL2	406	KPSITVVEQENHNGIVFLDRFTEALHYYSITMFDLSLEDSYSLPSQ-DRVMSEVYLGR-Q	463
RGL3	377	KPGLTVVEQENHNGDVFLDRFTEALHYYSITMFDLSLEGVVIPSQ-DRVMSEVYLGR-Q	434
SLR1	530	VMSEV-YLGRQICNVACEG-AERTERHETLGQWRN-RLGRAGFEPVHLGSNAYKQASTL	586
GAI	448	ICNVVACDGPD--RVERHETLSQWRNRFSGAG-FAAAHIGSNAFKQASMLLALFNGGEGY	504
RGA	500	ICNLVACEGPD--RVERHETLSQWRNRFSGSG-LAPAHIGSNAFKQASMLLSVFNSSQGY	556
RGL1	425	ILNLVACEGED--RVERHETLNQWRNRFGLGG-FKPVSTIGSNAYKQASMLLALYAGADGY	481
RGL2	464	ILNVVAAEGSD--RVERHETAAQWRIRKMSAG-FDPITHIGSNAFKQASMLLSLYATGDGY	520
RGL3	435	ILNLVATEGSD--RIERHETLAQWRKRMGSAG-FDPVNLIGSDAFKQASMLLALSGGGDY	491
SLR1	587	LALFAGGDDY-RVE-EKEGCL-TLG-THTRPLIATSAWRVAAA	625
GAI	505	-RV-EESDGLMLGWHTRP-LIATSAJ--K-L-STN-----	533
RGA	557	-RV-EESNGCLMLGWHTRP-LIATSAJ--K-L-STAAAY----	587
RGL1	482	-NV-EENEGCLLLGWQTRP-LIATSAJ--R-I-NRVE-----	511
RGL2	521	-RV-EENDGCLMIGWQTRP-LIATSAJ--K-L-A-----	547
RGL3	492	-RV-EENDGSLMLAQTKP-LIATSAJ--K-L-AAELRR----	523

図1-3. DELLAタンパク質のアミノ酸配列と機能ドメイン

イネのDELLAタンパク質SLR1およびシロイヌナズナの5種のDELLAタンパク質のアミノ酸配列の相同性を示す。黒色のカラムは全てのクローンで一致するアミノ酸領域、灰色のカラムは60%以上のクローンで一致するアミノ酸領域を示す。また赤線部はN末端側で高度に保存されているD-E-L-L-A配列およびV-H-Y-N-P配列を示す。青線部は核移行シグナル(NLS)を示しており、NLSを含むC末端側の高度に保存されている領域はGRAS領域と呼ばれている。

and Sun, 2005)、DELLA 因子と呼ばれる。この N 末端側保存領域は GA からシグナルの受け取りに関与している。このような配列上の特徴を有する DELLA 因子をコードする遺伝子として、イネの *Slender Rice1 (SLR1)*、シロイヌナズナにおいては *GA-INSENSITIVE (GAI)*、*Repressor of ga1-3 (RGA)*、*RGA-LIKE1 (RGL1)*、*RGL2*、*RGL3* の 5 種、オオムギ(*Hordeum vulgare*)の *Slender1 (SLN1)*、トウモロコシ(*Zea mays*)の *D8* などが知られている。

イネでは DELLA 因子として GA シグナル伝達に寄与する分子は SLR1 のみであるため、その制御様式は明快である。すなわち、SLR1 分子 C 末端側のいわゆる機能性領域内に変異を来した場合は徒長形質(GA シグナルの恒常的応答に類似する)を示し(Itoh *et al.*, 2002)、逆に N 末端側 DELLA 領域を欠損した変異体では GA 非感受性の矮性形質が現れた(Ikeda *et al.*, 2001)。これにより、DELLA 因子内の C 末端側領域に GA シグナルを常時負に制御する機能が存在し、N 末端側は GA から伝わるシグナルを受け取る領域と考えられた。このような変異はそれぞれ、loss-of-function 変異(機能欠失型変異)、および gain-of-function 変異(機能恒常型変異)と呼ばれる。さらに *DELLA* 遺伝子に関する各種デリーションクローンの解析によって、*DELLA* 領域および *VHYNP* 領域付近が GA シグナルの受容に、C 末端側 *GRAS* 領域が機能領域であることが明らかとなっている(Itoh *et al.*, 2002)。

これに対してシロイヌナズナゲノム中には 5 種の *DELLA* 因子がコードされていることから、イネよりも複雑な制御機構の存在が示唆されてきた。複数の研究グループが先を争って報告が相次ぐ中で、必ずしも情報が一致しない箇所も見受けられるが本研究とも深く関与する部分であるため紙面を割いて詳述する。*DELLA* 因子の変異に 2 種あって、loss-of-function 変異(機能欠失型変異)と gain-of-function 変異(機能恒常型変異)が存在することは既に

触れた。このうち gain-of-function 変異の場合には、GAI の N 末端側変異体 *gai* に代表されるように 1 種のみの変異によって形質はしばしば認められるようである(Peng *et al.*, 1997)。しかし、loss-of-function 変異の場合、5 種ある DELLA 因子のうちいずれか 1 種のみの変異だけでは互いの機能的重複が存在する場合が多く、形質が現れる器官と現れにくい器官に分かれる。すなわち、器官ごとに主導的に機能する DELLA 因子が異なっている可能性が窺える。現在までに蓄積されている情報を元に、『一般的な植物の茎に相当する「花茎」の伸長過程、花器官の発達過程、種子の発芽過程』の 3 つの器官に着目して情報を整理しておく。花茎の伸長過程においては、1 種のみ loss-of-function 変異では明瞭な形質は認められていないが、GA 欠損により極矮性の形質を示す GA 生合成欠損変異体 *ga1-3* に RGA と GAI の二重 loss-of-function 変異を導入した場合、他の組み合わせと比較して最も明瞭にほぼ野生型と同等の背丈にまで回復が認められる(図 1-4) (Silverstone *et al.*, 1997b; Dill and Sun, 2001)。従って、シロイヌナズナの花茎伸長制御にはこれら RGA と GAI が最も大きく寄与していることが示唆される。花器官の発達過程として GA は雄蕊(おしべ)の伸長制御に関与する。前出の GA 生合成欠損変異体 *ga1-3* では雄蕊の伸長が抑制されており、これに DELLA 因子の loss-of-function 変異を導入して伸長抑制解除効果を比較した場合、2 つの研究室からの報告にある程度の差異は見られるものの、RGA、RGL2 が同時に変異している場合に回復の効果が大きく見られ、さらに RGL1 を加えた三重変異で効果が高まり、それに伴って稔実率の回復も報告されている(図 1-5) (Tyler *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2004)。すなわち、花器官ではこれら 3 種の DELLA 因子が大きく寄与していると考えられる。同様に、発芽過程では、通常シロイヌナズナ種子の発芽に GA は必須であるため、GA 生合成阻害剤の



(Dill and Sun, 2001)

図1-4. DELLA因子loss-of-function変異体で認められる 花茎の表現形質

野生型株および矮性形質を示すGA生合成欠損変異体 $ga1-3$ に対してDELLA因子のloss-of-function変異を導入して花茎の伸長に与える影響を解析した結果。

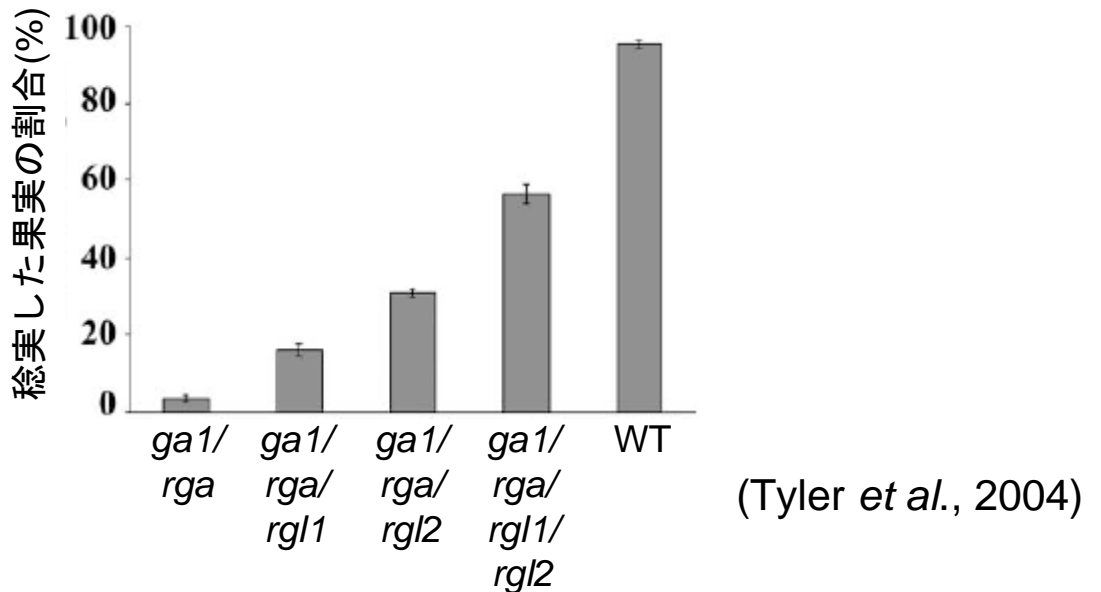
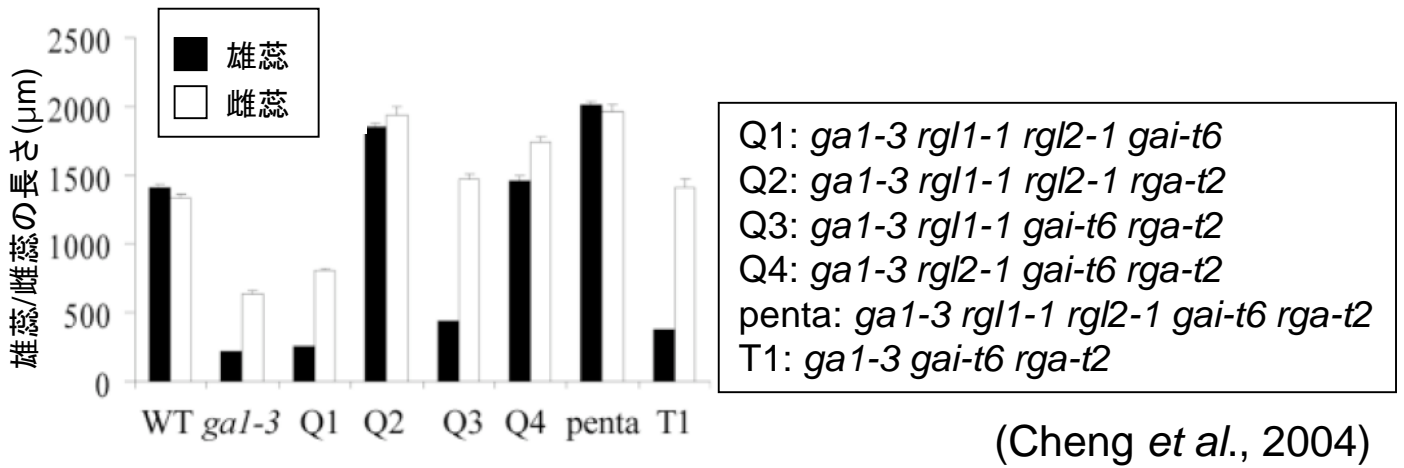


図1-5. 花器官におけるDELLA因子loss-of-function変異の効果

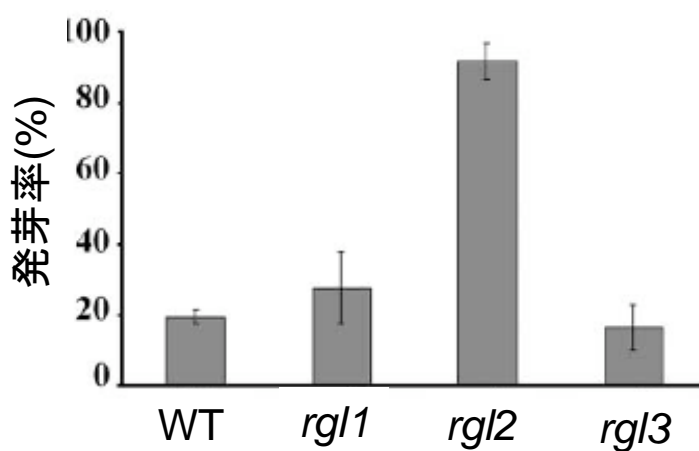
上図：GA生合成欠損変異体*ga1-3*に様々な組み合わせのDELLA因子loss-of-function変異を導入した変異体における雄蕊、雌蕊の長さをグラフ化したもの。

中図：GA生合成欠損変異体*ga1-3*に様々な組み合わせのDELLA因子loss-of-function変異を導入した変異体および野生型株の花器官の写真。

下図：GA生合成欠損変異体*ga1-3*に様々な組み合わせのDELLA因子loss-of-function変異を導入した変異体および野生型株において開花後に稔実した果実の割合をグラフ化したもの。

投与により発芽率は大きく低下する。GA 生合成阻害剤であるパクロブトラゾール(PAC)の共存により野生型種子の発芽率が約 20%程度まで低下する条件下、RGL2 単独の loss-of-function 変異を導入した場合に限り他と比較して高い発芽率(約 90%)が認められ(図 1-6) (Tyler *et al.*, 2004)、発芽の制御に RGL2 が大きく寄与することが示唆される。こうした器官別に異なる DELLA 因子が寄与する傾向は、各 DELLA 遺伝子の器官毎の発現量が違うこと(図 1-7)が大きく関係すると考えられており、互いに似ている当該因子をタンパク質レベルで区別して定量化することが困難であるために実証は難しいが、その器官ごとに主要に存在する DELLA 因子のうちの 1 つ、あるいは 2 つ以上の因子が複合的に関与することがこの制御システムの本質のかなりの部分を占めるのではないかと予想される。

その他、DELLA 因子に関する知見に触れておく。DELLA 因子は核移行シグナル(NLS)を有しており、GFP との融合産物は核への局在が認められる (Olszewski *et al.*, 2002)。この GFP-DELLA は GA の投与によって短時間で分解される(Dill *et al.*, 2001; Gubler *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2002)が、上述した GA からのシグナル受容に関与する領域(DELLA 領域および VHYNP 領域)に点変異を加えて発現させた場合、GA による分解は生じないことから「GA シグナルの伝達状況と DELLA 因子の分解状況」との間に関連性が指摘された。DELLA 因子の具体的な機能には不明な点が多いが、イネの DELLA 因子 SLR1 については酵母を用いた系で転写活性が認められていたり(Ogawa *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2001; Fleet and Sun, 2005)、リン酸化や糖鎖修飾等の翻訳後修飾が機能調節に関わっているとする報告もある(Sasaki *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2004; Gomi *et al.*, 2004; Itoh *et al.*, 2005)。それらの観点については情報の確定に向け、今後の研究の進展を待たねばならない。



(Tyler *et al.*, 2004)

図1-6. 種子発芽におけるDELLA因子loss-of-function変異の効果

GA生合成阻害剤のパクロトラゾール(PAC, 120 mM)存在下における各種DELLA因子loss-of-function変異体の発芽率を比較したもの。

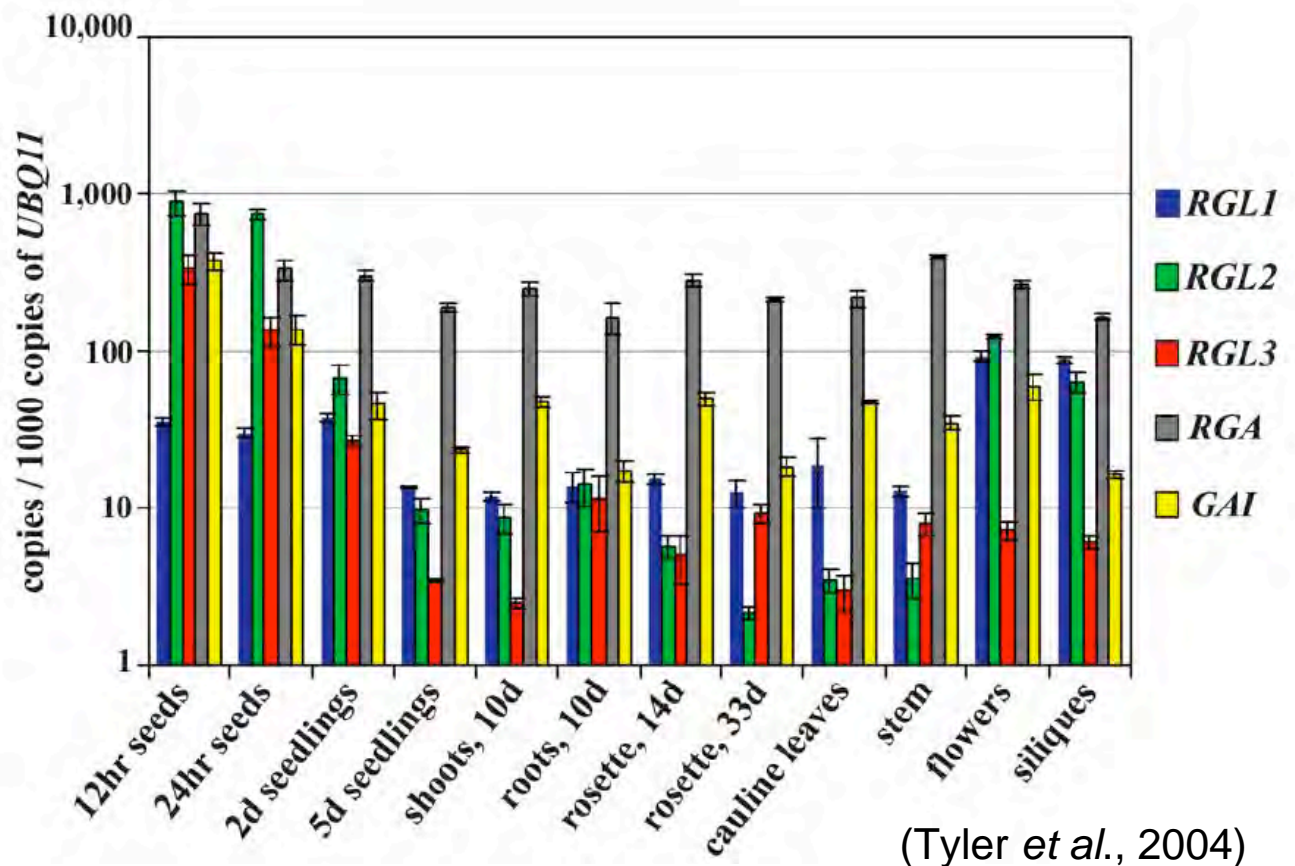


図1-7. *DELLA*遺伝子の時期別・器官別の発現状況

シロイヌナズナにおける5種の*DELLA*遺伝子の発現状況を絶対定量法により時期別・器官別に解析した結果。

1-1-4-2 DELLA 因子の分解機構

プロテアソームによるタンパク質の分解過程は種々の生物において重要であり、広く保存されているシステムである。その分解の前段階では分解の標的とするタンパク質にユビキチンと呼ばれる小タンパク質が鎖状に付加される(ポリユビキチン化)。標的の決定に関して、例えば酵母では *Skp1*, *Cullin-1*, *E-box* の 3 因子からなる SCF 複合体が介在する。そして、中でも F-box 因子が標的の特異性に関わるとされている。

シロイヌナズナの GA 非感受性矮性変異体 *sleepy1 (sly1)*、および、イネの GA 非感受性矮性変異体 *gibberellin insensitive dwarf2 (gid2)* の原因遺伝子はどちらも F-box 因子をコードする事が判明した(Steber *et al.*, 1998; McGinnis *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2003)。ともに変異によって GA シグナルが伝わりにくくなることから正の制御因子である。加えて、両変異体ともに過剰量の DELLA 因子の蓄積が認められたが、GFP 融合産物の挙動として前述したとおり通常であれば GA 投与によって速やかに分解されるはずが変異体においては減少しないことから、DELLA 因子の分解過程に関与する F-box 因子と結論づけられた(Sasaki *et al.*, 2003; Dill *et al.*, 2004)。プロテアソームの阻害剤投与により、イネ野生株ではポリユビキチン化された SLR1 の蓄積が認められるのに対して *gid2* 変異体では確認されないこと(Sasaki *et al.*, 2003)、酵母や *in vitro* アッセイ系において SLY1 および GID2 と DELLA 因子間で相互作用が認められること(Fu *et al.*, 2004; Gomi *et al.*, 2004)、*sly1 · gid2* 両変異体にみられる矮性形質はそれぞれ GAI と RGA の二重 loss-of-function 変異・SLR1 の loss-of-function 変異の導入によって抑制されること(McGinnis *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2004; Dill *et al.*, 2004)などが有力な根拠として報告されている。以上のことから、DELLA 因子は SLY1 や GID2 な

ど特定の F-box タンパク質によって認識され、ポリユビキチン化修飾を受け、結果としてプロテアソームによる分解を受けることにより GA シグナルが下流に伝わるとするシグナル伝達のモデル図が提唱された(Thomas and Sun, 2004)。なお、シロイヌナズナには SLY1 と相同性の高い F-box 因子 SNEEZY (SNE)も DELLA 因子の分解に関与するが、主に機能するのは SLY1 であって SNE は補佐的役割とする報告もある(Strander *et al.*, 2004)。

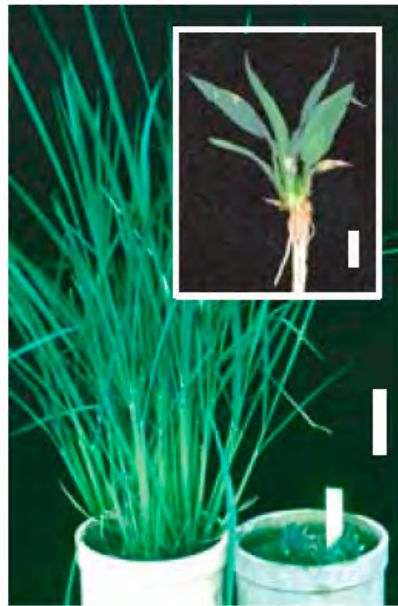
1-1-4-3 その他関連因子

DELLA 因子の翻訳後修飾のうち、リン酸化に関わるキナーゼは現在までに同定されていない。一方、糖鎖修飾については O 結合型 β -N-アセチルグルコサミン転移酵素をコードする *SPINDLY* (*SPY*)の異常により、シロイヌナズナ種子の発芽が通常生じないはずの GA 生合成阻害剤存在条件下においても生じ(Jacobsen and Olszewski, 1993)、さらに、この *spy* 変異体を RGA の gain-of-function 変異を導入すると、矮性形質や花器官の発達遅延をある程度回復させたことから(Silverstone *et al.*, 2007)、*SPY* が通常は GA シグナルを負に制御する因子と考えられている。ただし、*SPY* の基質が DELLA 因子であるか、糖鎖修飾の有無による DELLA 因子の安定性、糖鎖修飾されるとしてリン酸化部位との関係など不明な点が多く、今後の研究の進展が待たれる。

1-2 受容体同定を起点とする本研究の目的

1-2-1 ジベレリン受容体

イネの GA 非感受性矮性変異体 *gibberellin insensitive dwarf1 (gid1)* の原因遺伝子 *GID1* は GA に対する受容体をコードする(図 1-8) (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005)。次に列挙する実験結果がその根拠となっている。① *gid1* 変異体において GA 投与で通常認められる GA 生合成酵素遺伝子の発現に関するフィードバック制御や種子における α -アミラーゼ遺伝子の発現誘導など典型的な GA 応答が全く認められなかった(GA 非感受性) (図 1-9)、② *gid1* 変異体では活性型 GA_1 量が、野生型正常個体と比較して約 100 倍高かった(図 1-8)、③原因遺伝子 *GID1* は可溶性タンパク質をコードしており、大腸菌発現系を用いて調製した翻訳産物は活性型 GA 選択的に親和性を示した(図 1-10, 表 1-1)、④GA 非感受性を呈する各 *gid1* 変異体に認められたものと同じ変異を導入した *gid1* 変異タンパク質は全て GA 結合能が消失していた(図 1-10)、⑤ DELLA 因子 *SLR1* の loss-of-function 変異と *gid1* 変異との二重変異体は *slr1* が呈する徒長形質を示したことから、遺伝的に *OsGID1* は *SLR1* の上位(シグナル伝達経路上では *SLR1* が *GID1* の下位)に位置することが示された(図 1-11)、⑥酵母 two-hybrid 系を用いた解析から、*GID1* は DELLA 因子 *SLR1* と GA 依存的に相互作用を示した(図 1-12)。これらの知見を統合することによって、*GID1* 遺伝子は GA 受容体をコードすると結論付けられた (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005)。*GID1* のアミノ酸配列を図 1-13 に示す。*GID1* は微生物から動物、植物まで幅広い種間で保存されている hormone sensitive lipase (HSL) と相溶性が高い。HSL には酵素として機能する際の活性中心である 3 アミノ酸が高度に保存されているが(Osterlund, 2001)、*GID1* ではそのうちの一つ、ヒスチジン残基(H)がバリン残基(V)に置換されていた。それが



WT *gid1-1*

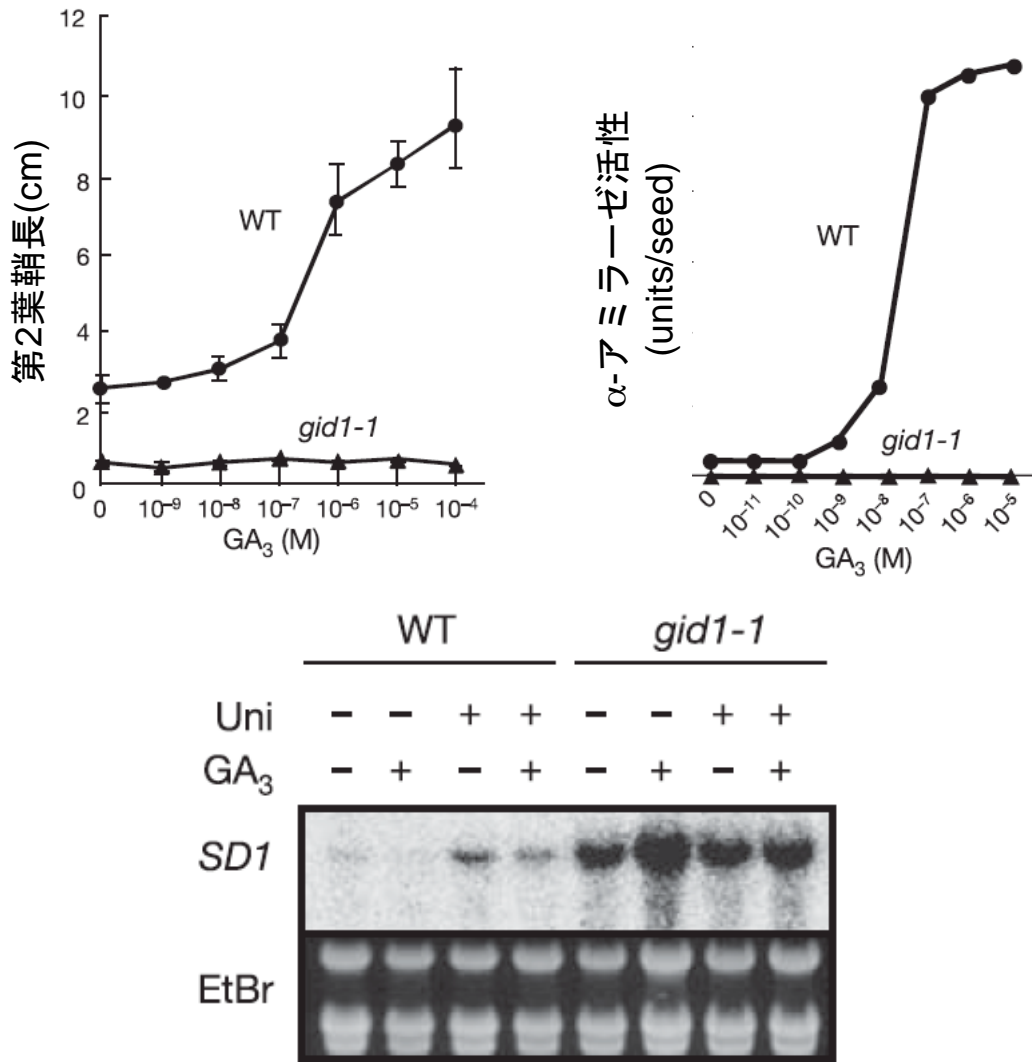
	GA ₅₃	→	GA ₄₄	→	GA ₁₉	→	GA ₂₀	→	GA ₁	→	GA ₈
<i>gid1-1</i>	2.79		2.38		9.81		2.04		77.00		0.26
WT	2.04		2.41		7.35		0.57		0.61		0.47

(ng / g新鮮重)
(Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005)

図1-8. イネGA受容体欠損変異体 *gibberellin insensitive dwarf1(gid1)*の表現型

上図：GA受容体欠損変異体 *gibberellin insensitive dwarf1-1(gid1-1)*の成熟個体写真。バーは10 cm。右上は拡大図(バーは1 cm)。

下図：*gid1-1*および野生型におけるGA₁および生合成中間体の内生量。



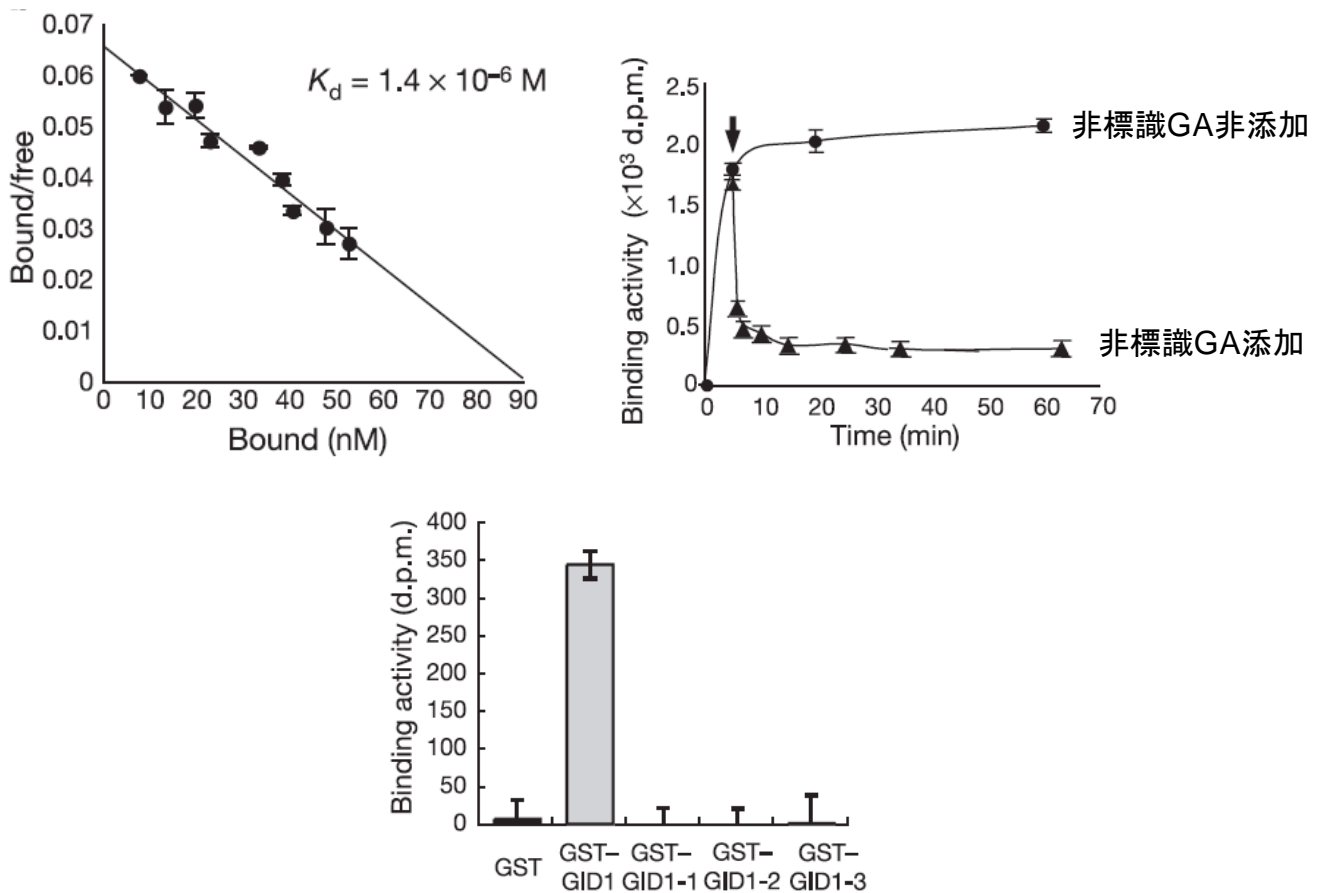
(Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005)

図1-9. *gid1*変異体のGA非感受性

上左図： *gid1-1*変異体および野生型株を様々なGA₃濃度の寒天培地に播種し、連続光下30°Cで6日間栽培後の第2葉鞘の長さを測定したもの。

上右図： 半分に切断し胚を除去した*gid1-1*変異体および野生型株の種子を様々なGA₃濃度の寒天培地にて暗黒下30°Cで4日間培養し、デンプンの消化を指標にしてα-アミラーゼ活性を測定したもの。

下図： GAによるフィードバック制御が確認されているSD1 (*OsGA20ox2*) 遺伝子のGA応答性を播種後2週間の*gid1-1*変異体および野生型株の芽生えを用いて解析したもの。Uniは10⁻⁶ Mのウニコナゾール-P処理、GA₃は10⁻⁵ MのGA₃処理を示す。



(Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005)

図1-10. イネGID1リコンビナントタンパク質のGA結合能

上左図：大腸菌発現系にて調製したリコンビナントGST-OsGID1タンパク質の標識GA ([1,2,16,17-³H₄]16,17-dihydroGA₄)に対する結合活性を様々な濃度下で測定し、Scatchard plotしたものの。これにより解離定数 $K_d=1.4 \times 10^{-6}$ Mと算出された。

上右図：GST-OsGID1タンパク質の標識GAに対する結合活性を経時的に解析したもの。▲印のプロットは矢印の時間において非標識GA₄を過剰量添加した場合。

下図：GST-GID1およびGID1変異タンパク質のGA結合能を解析したもの。GST-GID1-1, 2, 3の3種はGA非感受性を呈する各gid1変異体に認められたものと同じ変異を導入した変異タンパク質を示す。

表1-1. OsGID1との結合に関するGA構造要求性

GAs	IC ₅₀	Relative percentage
Biologically active GAs*		
GA ₄	2 × 10 ⁻⁷ M	100
H ₂ -GA ₄	1 × 10 ⁻⁶ M	20
GA ₁	4 × 10 ⁻⁶ M	5
GA ₃	4 × 10 ⁻⁶ M	5
Weakly biologically active GAs*		
GA ₃₅	1 × 10 ⁻⁵ M	2
GA ₃₇	2 × 10 ⁻⁵ M	1
Biologically inactive GAs*		
GA ₄ -Me	3 × 10 ⁻⁵ M	0.6
GA ₉	2 × 10 ⁻⁴ M	0.1
GA ₅₁	>2 × 10 ⁻⁴ M	<0.1
3- <i>epi</i> -GA ₄	>2 × 10 ⁻⁴ M	<0.1

H₂-GA₄, 16,17-dihydro-GA₄; GA₄-Me, GA₄ methyl ester.

リコンビナントOsGID1と³H₄-16,17-dihydroGA₄との結合を50%阻害する各非標識GAの濃度(IC₅₀ (M))を用いて各GAとの親和性を相対的に評価した。

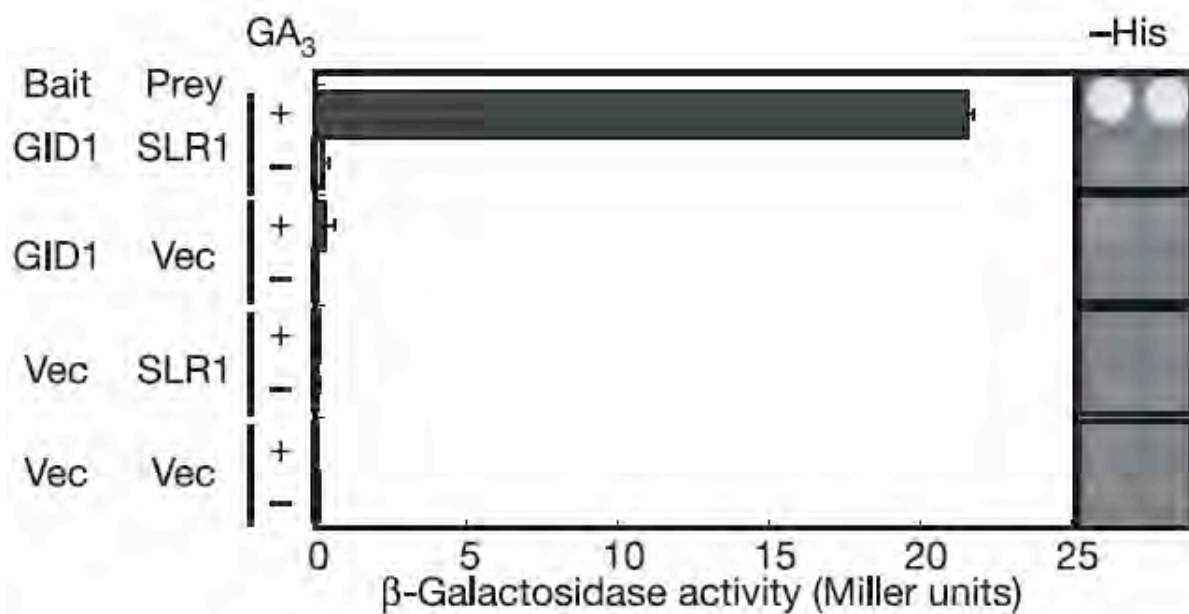
(Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005)



(Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005)

図1-11. *slr1 gid1*二重変異体の表現型

イネDELLA因子のloss-of-function変異体*slr1-1*, GA受容体欠損変異体*gid1-1*およびその二重変異体の表現形質を示したもの。バーは10 cm。



(Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005)

図1-12. イネGID1とSLR1のGA依存的相互作用

baitタンパク質としてイネGID1をpreyタンパク質としてSLR1を用い、2分子が相互作用した場合に限りレポーター遺伝子が発現する酵母two-hybrid系を用いて相互作用を解析したもの。図中のグラフはレポーター遺伝子としてβ-galactosidaseをコードする遺伝子を用いた結果。右の部分は2分子間の相互作用が成立した場合のみ生育が許される制限培地における酵母の生育状況。GA処理区では終濃度 10^{-4} MになるようにGA₃を培地に添加した。

OsGID1	1	MAGSDEVNRNECKT V WPLHTW L I S NFKLSY N I L RRADGT F FERDLGEY L DRRV P ANAR P L	60
HSL	1	-----	1
OsGID1	61	EGVSSFDHI I DQSVGLEV R IYRAAREGDAEEGAAAVTR P I L EFLT D -AP A REP F P V I I FF	119
HSL	1	-----PWRVYR P D R K A A T A- P W L V L	21
OsGID1	120	H GGSFV H SSAS T I V DS L CR F FKLSK G W W SW N WR A PE H RV D CA V DD G WT A L K W M SQ	179
HSL	22	H GGYV L GS L R- T H D A W R L A A A AG A W W SW D W L A- E H P F A AL E D A Y A Y R A L R A N	78
OsGID1	180	PFMRSGGDAQ A RV F LS D SS G NI A HHVAVR A DE G W K V-C G NI L NAM F GGT E R T ES E R	238
HSL	79	A-AEL G I D P-S R I A V A GS A GG H L L A L A L A A RD G L P L P AA Q V I S P LL D L T SS A AS L P	136
OsGID1	239	RL-DGKYFVTLQ D RD N Y K K A YL P E D A D RD H P A C N P F G P N G R A L G L P F A K S L I I V S G L D -	296
HSL	137	GYGEADLLD A A I L A N F AD L Y L GA R P D RED P E A S P L A S D D-- L S G L P - P - T L I Q T A E F D P	192
OsGID1	297	L T C D R Q L A W A D A L R E D S H H K V-W D CEN A T V G F Y L L P N T V H Y H E V M E E I S D F L N A N L Y Y	354
HSL	193	L R - D E G E R V A E R T A A R S V P V E L R V - Y P G M I H S F D L T F P - E A R S A L R Q L A A F L R A A---	245

図1-13. イネGID1の推定アミノ酸配列

イネGID1の推定アミノ酸配列とhormone sensitive lipase (HSL)に高度に保存されている配列の相同性を示したものの。黒色のカラムは一致しているアミノ酸領域を示す。3カ所のアスタリスクはHSLが酵素として機能する際の活性中心であるアミノ酸残基を示す。イネGID1においては2カ所の活性中心は保存されているが、ヒスチジン残基(H)のみバリン残基(V)に置換されており、リパーゼ活性は確認されていない。

主な原因であるためか、リパーゼ活性は検出されていない。また、*GID1* は *GFP* との融合状態で植物に発現させた場合、その翻訳産物の大部分は核への局在が報告されている (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005)。ただし、上述の DELLA とは異なり、*GID1* 分子内に核移行シグナル(NLS)は認められず、既知の機能ドメイン様の配列も認められない。*GID1* の発見により、それ以前に蓄積された情報を統合して GA のシグナル伝達経路の概要は以下のような説明が付けられるようになった(図 1-14)。すなわち、DELLA 因子は通常核内にて GA シグナル伝達を抑制しているが、ひとたび受容体 *GID1* が GA を受容すると、*GID1*-GA 複合体は DELLA 因子との親和性を生じ、結果として *GID1*-GA-DELLA 因子から成る 3 分子複合体を形成する。この複合体形成が引き金となって DELLA 因子は F-box 因子に認識されてポリユビキチン化の修飾を受ける。そして、最終的にプロテアソームによる分解を受けて消滅する。シグナル伝達の抑制因子の消滅により、GA シグナルが下流へと伝達され始めて本来 GA に応答して開始されるべきイベントが一斉に始まる、とするモデルである。

イネの GA 受容体 *GID1* の同定から程なく、筆者の所属する研究室が中心となってシロイヌナズナの GA 受容体遺伝子特定を報告した (Nakajima *et al.*, 2006)。図 1-15 に示すとおり、イネ *GID1* 遺伝子と配列相同性を示す遺伝子はゲノム中に複数存在していたが、イネ *GID1* 分子内の HSL 様活性中心のうちの一つで認められた「ヒスチジン残基から疎水性アミノ酸への変異」が保存されていたのは 3 遺伝子のみであった。そこで、その 3 種に加えて相同性の高い上位数種の遺伝子について大腸菌発現系によりリコンビナントタンパク質を調製し、予想どおり当該 3 種のみが GA との結合能を有することを明らかにした。順に、*AtGID1a* (At3g05120)、*AtGID1b* (At3g63010)、*AtGID1c*

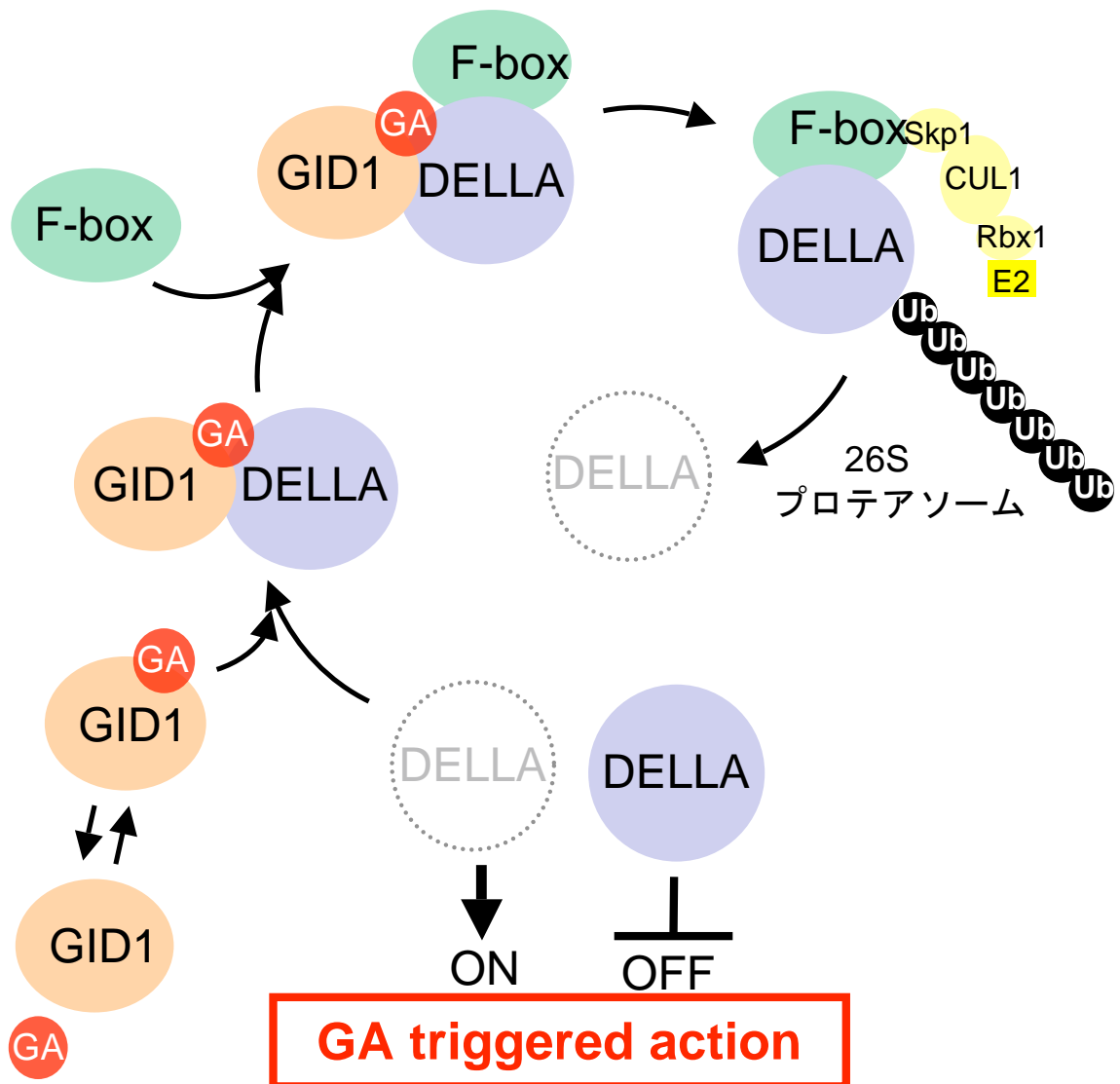


図1-14. 予想されるGA受容伝達機構

GID1の発見により予想されたGA受容伝達機構のモデル図。核内に存在するDELLA因子によりGAシグナルは通常抑制されているが、GID1がGAを受容すると、DELLAとの親和性が生じ、GID1-GA-DELLA複合体を形成する。これにより、抑制されていたGAシグナルが下流へと伝達される。また、3者複合体形成後はDELLAがF-box因子に認識されるようになり、ポリユビキチン化の修飾を受けて、最終的に26Sプロテアソームにより分解される。

```

OsGID1      ---MAGSDEVNRNECKTVVPLHTWVLSNFKLSYNILRRADGTFERDLGEYLDRRVSPANARPLEGVSSFDHIIQDSVGL
AtGID1a    ---MAASDEVNLESRTVPLNTWVLSNFKVAYNILRRPDGTFNRHLAEYLDKRVATANANPVDGVVDFVLDIDRRINLL
AtGID1b    ---MAGNEVNLNECKRIVPLNTWVLSNFKLAYKVLRRPDGTFNRHLAEFLDRKVPANSPFLDGVVDFVLDIDRQNTLL
AtGID1c    ---MAGSEEVNLESKTVVPLNTWVLSNFKLAYNLLRRPDGTFNRHLAEFLDRKVPANANPVNGVDFVLDIDRQNTLL
5g23530-D ---MATDSQPNQKLTPLKTRIALTVISTMTDQAQRPDGTFINRRFLRLDFDRAPPNPKPVNIIVSTDFVVDQSRDLW
5g06570-E -----MGSLEGEQVAEDCMGLLQLLSNGTVLRSEIDLITQQIPFKN-NQTVLFKDSIYHKPNNLH
5g62180-F -----MSEPSIADPYAYLNIIVNPDGSTRDLNFPCTAATPDPSPLNPAVSKDLVQNLKSTW
3g48700-G -----MDSEIAADYSPMLIIYKSGRIER---LVGETVPPSSNQGVVSKDQVYVSPDNL
1g47480-H -----MESTKKQVSLLELLPWLWHVDGTVR---LAGTEVCPGLDPIITGVFVKDIIIEPKTGLS
5g16080-I MATISFSHNQSDNRRGGSHHRRHGVPVVEIEGLIKVFNDSGCVR---PPIVIVSPTIHPSSKATAFDIKLSNDT--W
1g68620-J MGGTKLTHVTTTNP-----NSNIHGVPVDEVEGLIKVYKDGHVVER---SQLPCVDPSPLELGVTCSDVVIDKLTNW

OsGID1      VRIYRAAAEGDAEEGAAAVTRPILEFLTDAPAAEPFVPIIFHGGSFVHSSASSTIYDLCRRFVKLSKGVVSVNYRRA
AtGID1a    SRVYRPAYADQEQPSSILDLEKPVDG-----DIVPVILFHGGSFAHSSANSIYDLCRRLVGLCKCVVSVNYRRA
AtGID1b    TRYYPASLHQTRHGTLELTKPLSTT-----EIVPVILFHGGSFTHSSANSIYDTCRRLVTICGVVSVNYRRA
AtGID1c    SRVYRPADAG--TSPSITDLQNPVDG-----EIVPVIVFHGGSFAHSSANSIYDTCRRLVGLCGAVVSVNYRRA
5g23530-D FRLYTPHVSQD-----KIPVVVFHGGSFAFLSPNAYPYDNVCRFRARKLPAYVISVNYRRA
5g06570-E LRLYKPIASASNT-----ALPVVVFHGGSFCGSRSPHFNHFLTLASSNALVSPDYRRA
5g62180-F LRLYLPSAVNEGNVS-----SQKLPVIVYHGGSFVILCSVDMQLFHDVSEVARDLNAIVVSPYRRA
3g48700-G LRIYLPEKAATAETE-----ASVKLPLLYVHGGSFLVETAFSPYHFTLTAASVSDCVAVSVYRRA
1g47480-H ARIYRPFSIQPGQ-----KIPLMLYHGGSFLISSTSFPSYHTLKNKIVNQANVIAVSVNYRRA
5g16080-I TRVYIPDAAAASP-----SVTLPLLYVHGGSFCVGSAAWSCYHDFLTSLAVKARCVCIVSVNYRRA
1g68620-J ARLYVPMTTTKSS-----VSKLPLIVYHGGSFCVGSASWLCYHEFLARLSARSRLVMSVNYRRA

OsGID1      PEHRYPCAYDDGWTALKWVMSQ-----PFMRSGDAQARVFLSGDSSGGNIAHNVAVRAAEG-----VKVCGN
AtGID1a    PENPYPCAYDDGWTALNWVNSR-----SWLSKSKDKSVHIFLAGDSSGGNIAHNVAVRAGEG-----IDVLDGN
AtGID1b    PEHRYPCAYDDGWTALNWVNSR-----VWLQSGKDSNVYVYLAGDSSGGNIAHNVAVRATNEG-----VKVLDGN
AtGID1c    PENRYPCAYDDGWTALWVNS-----SWLSKSKDKSVRTIFLAGDSSGGNIVHNVAVRAVESR-----IDVLDGN
5g23530-D PEHRYPAQYDDGFDALKYIEEN-----HGSILPANADLSRCFFAGDSAGGNIHNVAVRICEPRSS--SFTAVKILGL
5g06570-E PEHRLPAAFEDAEAVLWLDQAVSDGVNHWFEEDGTVDFDRVVFVGGDSSGGNIAHQAVRFGSGS---IELTPVVRVGY
5g62180-F PEHRLPAAYDDGVEALDWIKTS-----DDEWIKSHADFSNVFLMGTSSAGGLAYNVGLRSVDSVS---DLSPLQIRGL
3g48700-G PEHPIPTSYDD-SWTALKWVFSHIAGSG-SEDWLNKHADFSKVFAGDSAGANITHMTMKAADKLSPELNESESGISGI
1g47480-H PEHPLPTAYED-SWTALKNIQ-----AI-NEPWINDYADLDSLFLVGDAGANISHHLAFRAKQSDQ-----TLKIKGI
5g16080-I PEHRLPAAYDDGVNVVSWLVKQISTGG-GYPSWLSKCNLSNVFLAGDSAGANIAYQVAVRIMASGK---YANTLHLKGI
1g68620-J PENPLPAAYEDGVNAILWLNKARNND-----LWAKQCDFGRIFLAGDSAGGNIQQVAARLASP-----EDLALKIEGT

OsGID1      ILLNAMFGGTERTESEKRLDGYFVTIQ--DRDWWYKAYLPEDADRDHPACNPFPGNRRLGGLPFKSLIIVSGLDLTC
AtGID1a    ILLNPMFGGNERTESEKSLDGYFVTIR--DRDWWYKAYLPEDGEDRHPACNPFSPRGKSLGVSFPKSLVAVAGLDLIR
AtGID1b    ILLHMPFGGQERTQSEKTLDGYFVTIQ--DRDWWYRAYLPEGEDRDHPACNPFGRGQSLKGVNFKSLVAVAGLDLVQ
AtGID1c    ILLNPMFGGTERTESEKRLDGYFVTIR--DRDWWYRAYLPEGEDRHPACNPFGRGKSLGVSFPKSLVAVAGLDLIQ
5g23530-D ISIQPFVGGERTAEKQLVGAPLVSPD--RTDWCWKAM---GLNRDHEAVNVGGPNAVDISGLDYPETMVMVAVAGDPLK
5g06570-E VLMGPFVGGERTNSENGPSEALLSLDL---LDKFWRLSLPHGATRDHMANPFGPTSPTELESISLEPLMIVVGGSELLR
5g62180-F ILHHPFVGGERTSEIRLMNDQVCPPIV--TDVMDLSLPGVDRDHEYSNPTVGDGSEKLEKIGRLRWKVMVIMIGGEDD
3g48700-G ILVHPYFWSKTPVDDKETTDAVIRTWIESVNTLASPNKSDGSDPFINVVQSEVSDLSG-LGCGRVMTVAEKDILVRQG
1g47480-H GMIHPYFWGTQPIG-AEIKDEARKQVMDGWNVEVFCPSEK-GSDDPWINPFDGSPDLGG-LGCGRVMTVAEKDILNERG
5g16080-I ILIHPPFVGGERTSEKQHHKSSALTSASDAYWRLALPRGASRDHPWCNPLMSAG-AKLPTMVMVAVAGDPLKERN
1g68620-J ILIQPFVSGERTSERRVDGNDKTAVLTASSDAWWRMSLPRGANREHPYCKPVKMIKSTVTRTLVCAEMDMLDMSN

OsGID1      DRQLAYADALREDG-HHVKVQCENATVGFYLLPNT---VHYHEVMEEISDFLNANLY-----
AtGID1a    DWQLAYAEGLKKAG-QEVKLMHLEKATVGFYLLPNN---NHFNVMDEISAFVNAEC-----
AtGID1b    DWQLAYVDGLKKTG-LEVNLLYLKQATIGFYLLPNN---DHFHCLMEELNKFVHSIEDSQSKSSPVLPTP
AtGID1c    DWQLKAYAEGLKKAG-QEVKLLYLEQATIGFYLLPNN---NHFTVMDEIAAFVNAECQ-----
5g23530-D DWQRSYYEWLKCG-KKATLIEYPMFHFAYIFPELP---EAGQLIMRDKDFVDERVASLSA-----
5g06570-E DRAKEYAYLKKMGKGRVDYIEFENKEHGFYSNYPSS---EAAEQVLRIGDFMNNLS-----
5g62180-F PMIDLQKDVAKLKKMGKGVVEHYTGGHVHGAERDP---SKRKTFLSINKFIFSVL-----
3g48700-G WGYWEKLGKSRWNG-EVLDVVTKEGEGHVFHLRDPN---SEKAHELVRHFAFGIKGDK-----
1g47480-H KMYYERLVKSEWKG--KVEIMETKEKDHVFHIFEPD---CDEAMEMVRCLALFINQVEA-----
5g16080-I ---LEMCKVMRSHG-KRVEGIVHGGVGHAFHILDNSSVSRDRITHDMCRLHNFHIPS-----
1g68620-J ---MEMCDGNE---DVIKRVLHKGVGHAFHILGKSLAHTTLEMLCQIDAFIHHYDPLN-----

```

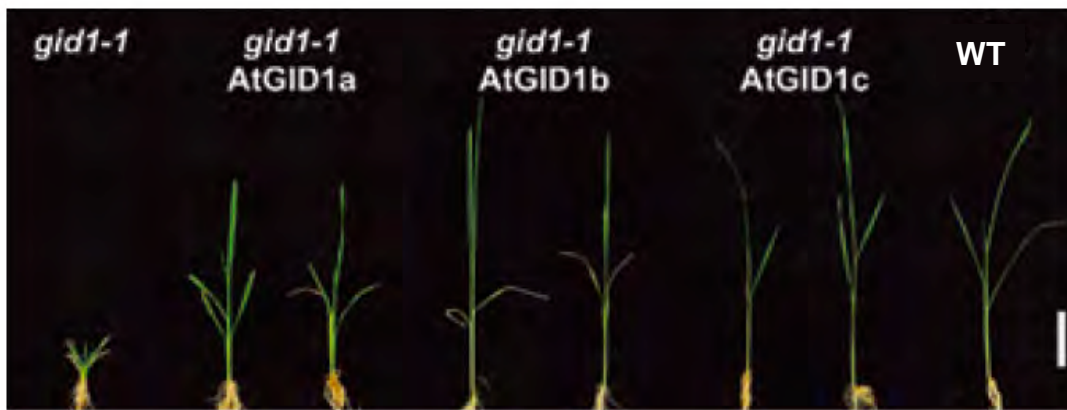
図1-15. シロイヌナズナのGA受容体およびその類縁タンパク質の推定アミノ酸配列

シロイヌナズナにおけるイネGID1(OsGID1)と配列相同性の高いクローンの配列相同性を示した。灰色部分はイネのGA受容体欠損変異体*gid1*、およびリコンビナントの変異GID1タンパク質のGA結合活性試験により、GAとの結合に必須と考えられたアミノ酸残基を示す。また、3カ所のアスタリスクは hormone sensitive lipase (HSL)の酵素活性中心のアミノ酸残基。GA結合試験の結果、AtGID1a, AtGID1b, AtGID1cの3種のみGA結合活性が認められた。

(At5g27320)と名付けた。なお本論文中ではこれ以降、特に断らない限り単に GID1a, GID1b, GID1c と表記することとし、イネ GA 受容体については OsGID1 と記す。3 種のシロイヌナズナ GID1 にはイネ GA 受容変異体 *gid1-1* 内で強発現させた場合に、いずれも矮性形質の回復が認められたことから少なくともイネにおいて GA 受容体として機能することが示された(図 1-16) (Nakajima *et al.*, 2006)。また、各リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* 解析により、リガンド選択性は互いに似通った傾向を示すものの、GID1b のみ他と比較して GA との親和性が高い(解離定数が 1 オーダー低い)ことが判明した(図 1-17, 表 1-2)。また、酵母 2-hybrid 系を用いて 3 種の GID1 と 5 種の DELLA 因子との相互作用を解析した結果、15 通りの全組み合わせで GA 依存的な相互作用が確認された(図 1-18)。DELLA 因子に関する機能的な分担制御の可能性については 1-1-4-1 項中段で触れたとおりであるが、GID1 についてもなぜ 3 種も存在するのか、それらに機能的な分担制御を合わせる仕組みが存在するかについて、リガンド選択性や DELLA 因子との相互作用の観点からは情報が得られなかった。

1-2-2 本研究の目的

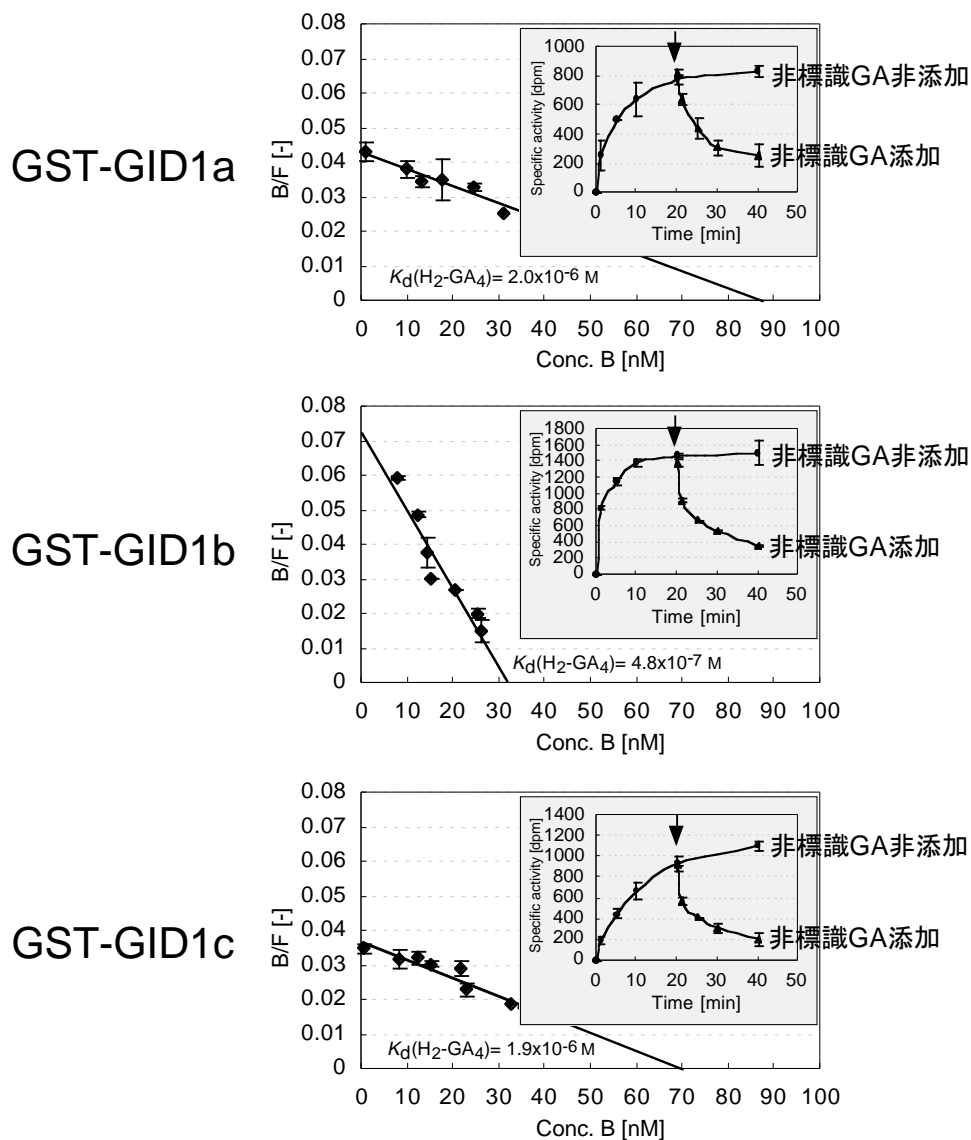
そこで、博士論文研究として筆者がシロイヌナズナ GA 受容体の研究に着手する時点において、DELLA の研究例に倣い複数存在する GA 受容体 GID1 に関する loss-of-function 変異の導入と表現形質の関係をまずは調べることを計画した。その上で、1 変異での形質が不明瞭であれば多重変異体を順次作出して、3 種の GID1 間で機能的な差異、分担制御する傾向があるか明確にすることを狙った。多重変異体の解析から、3 種のうち特定の 2 種の GID1 に関する多重 loss-of-function 変異体においてのみ特定の器官で異常形質が



(Nakajima *et al.*, 2006)

図1-16. イネ*gid1*変異体を用いたシロイヌナズナGA受容体の機能確認

シロイヌナズナの3種の*GID1*遺伝子をそれぞれイネ*Actin1*遺伝子プロモーター制御下でイネGA受容体欠損変異体*gid1-1*に過剰発現させた個体。バーは5 cm。



(Nakajima *et al.*, 2006)

図1-17. 3種のシロイヌナズナGID1リコンビナントタンパク質におけるGA結合能の検出

大腸菌発現系を用いて調製した各リコンビナントGST-GID1タンパク質の標識GA ([1,2,16,17- $^3\text{H}_4$]16,17-dihydroGA₄)に対する結合活性を解析したもの。図1-10と同様にScatchard plotにより解離定数 K_d を算出した。また、各々における右上のグラフは標識GAに対する経時的な結合曲線であり、矢印は過剰量の非標識GAを添加したタイミングを示す。

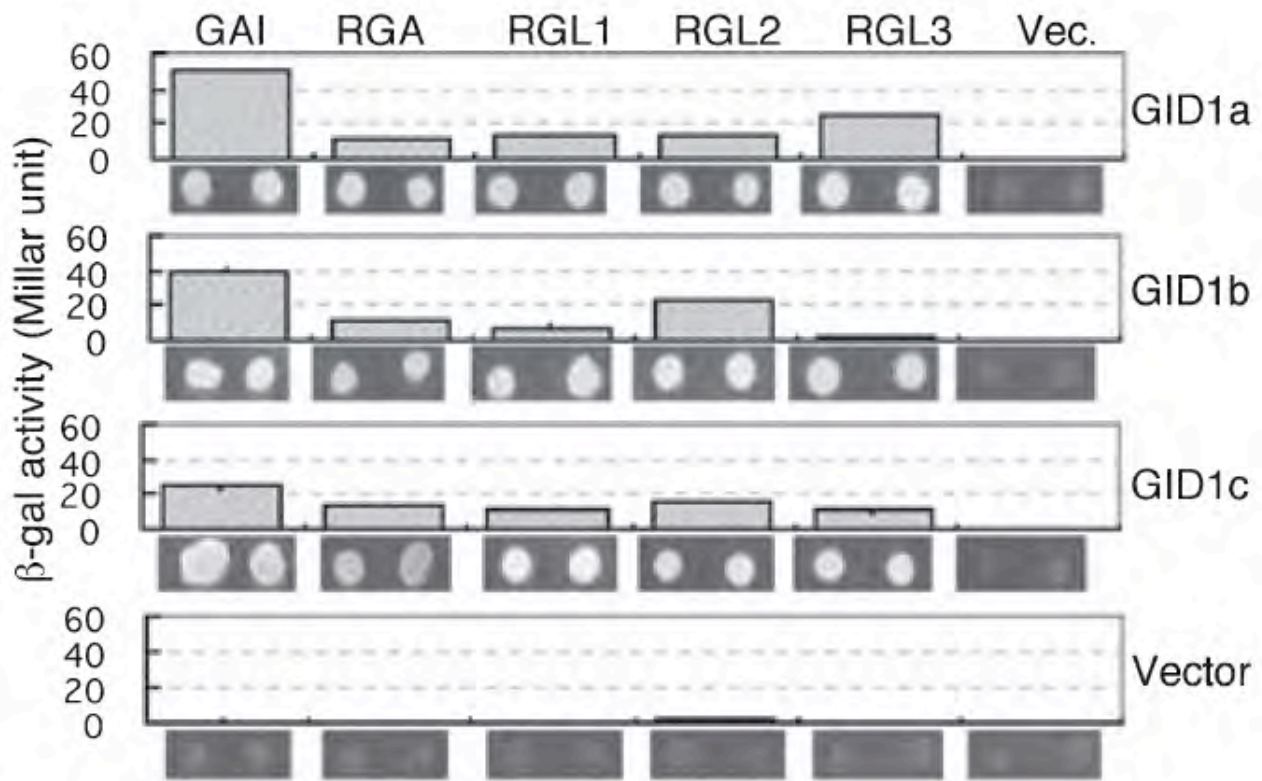
表1-2. 3種のシロイヌナズナGID1との結合に関するGA構造要求性

		AtGID1a	AtGID1b	AtGID1c
活性型 GA	GA ₄	3×10^{-7} (100)	3×10^{-8} (100)	3×10^{-7} (100)
	H ₂ -GA ₄	4×10^{-6} (8)	4×10^{-7} (8)	5×10^{-6} (6)
	GA ₃	3×10^{-5} (1)	2×10^{-6} (2)	3×10^{-5} (1)
	GA ₁	3×10^{-5} (1)	4×10^{-6} (1)	3×10^{-5} (1)
弱活性 GA	GA ₃₅	3×10^{-5} (1)	4×10^{-6} (1)	5×10^{-5} (0.6)
	GA ₃₇	7×10^{-5} (0.4)	9×10^{-6} (0.3)	8×10^{-5} (0.4)
不活性 GA	GA ₄ -Me	3×10^{-4} (0.1)	9×10^{-6} (0.3)	9×10^{-5} (0.3)
	GA ₉	$>3 \times 10^{-4}$ (<0.1)	9×10^{-5} (<0.1)	$>3 \times 10^{-4}$ (<0.1)
	GA ₅₁	$>3 \times 10^{-4}$ (<0.1)	4×10^{-5} (<0.1)	$>3 \times 10^{-4}$ (<0.1)
	3- <i>epi</i> -GA ₄	$>3 \times 10^{-4}$ (<0.1)	1×10^{-4} (<0.1)	$>3 \times 10^{-4}$ (<0.1)

各数値は IC_{50} (M)の値。括弧内はGA₄を100とした相対比活性

表1-1と同様、各リコンビナントGID1と³H₄-16,17-dihydroGA₄との結合を50%阻害する各非標識GAの濃度(IC_{50} (M))を用いて各GAとの親和性を相対的に評価した。

(Nakajima *et al.*, 2006)



(Nakajima *et al.*, 2006)

図1-18. 3種のGID1と5種のDELLA間で認められたGA依存的相互作用

図1-12と同様にbaitタンパク質としてGID1をpreyタンパク質としてDELLAを用い、2分子が相互作用した場合に限りレポーター遺伝子が発現する酵母two-hybrid系を用いて相互作用を解析したもの。示した図はGA添加条件における結果であり、各上段はレポーター遺伝子として β -galactosidaseをコードする遺伝子を用いた系の結果。各下段は2分子間の相互作用が成立した場合のみ生育が許される制限培地における酵母の生育状況を示す。

現れることを見出し、この原因の解明こそが複数の分子種が存在するシロイヌナズナ GA 受容体間の、あるいは DELLA 因子間にまで至って、機能の分担制御の本質に迫り得るアプローチになるのではと期待して、遺伝子の発現状況や GID1-DELLA 間の相互作用状況の精査を展開した。従って、本論文研究の構成としては、まず次章において GID1 の機能欠損変異体の作出およびその表現型の解析を行った。続いて第 3 章において、レポーター遺伝子発現ラインの作出とそれを用いての *GID1* 遺伝子および各 GID1 翻訳産物に関する植物体内における分布状況を把握して、異常形質が認められる多重変異体の当該部位における GID1 の存在状況を把握した。そして第 4 章では、GID1 も DELLA も欠乏する状況にはない部位にもかかわらず異常形質が現れるケースに焦点を絞り、その部位で存在する GID1-DELLA 間の相互作用に何らかの問題があるとの視点に立って、両分子間の相互作用に関する親和性を評価するための系の整備と、その評価系を用いての各 GID1-DELLA 間の組み合わせにおける親和性評価を行って見通しの妥当性について検証した。以下、詳述する。

第2章 GID1に関する機能欠損型多重変異体の解析

2-1 緒言

ある遺伝子産物の生体内における機能を理解する際に、機能欠損型変異体を作成あるいは入手して用いる解析は有力な手法である。ただし、同じ機能を有する遺伝子が存在する場合、例えば複数の受容体が同時に存在する場合にはその中の1つの機能を欠損させても、残る正常な受容体が機能的に相補して形質に変化が認められない場合があることが報告されている。以下複数存在する受容体の機能重複についての報告を2例紹介する。エチレンの受容体遺伝子 *ETR1* はその応答変異体の原因遺伝子として植物ホルモンの範疇の中では最初に特定されたものであるが、シロイヌナズナにはその他に4種 (*ERS1*, *ETR2*, *ERS2*, *EIN4*) 存在しており、各々単独の機能欠損変異体では形質が現れない。ところが、5種のうちで二重、三重と多重の機能欠損変異体を作成することによって、エチレン応答性の段階的低下が報告されている (Hua and Meyerowitz, 1998)。同様に、サイトカイニンについても3種の受容体遺伝子 (*CRE1/WOL/AHK4*, *AHK2*, *AHK3*) が特定されており、*CRE1/WOL/AHK4* の欠損によりサイトカイニン応答性の低下を引き起こし、さらに三重の機能欠損変異によりサイトカイニン応答性は完全に消失することが報告されている (Nishimura *et al.*, 2004; Higuchi *et al.*, 2004)。

シロイヌナズナに複数存在する GA 受容体の場合も同様のことが予想される。双子葉植物として代表的モデル植物であるシロイヌナズナは、各種変異体ライブラリーが整備されており、その中からの GA 受容変異体探索がいくつかの研究拠点で展開されていたものと予想しているが、そのアプローチ

による成功報告はなかった。1種のGA受容体しか存在しないイネと異なり、3種のGID1がシロイヌナズナに存在する事実と、変異体スクリーニングからGA受容変異体が見つからない歴史的経緯を統合すれば、シロイヌナズナにおいて3種のGID1のうち1種の機能に異常が生じても目視で識別できるほど明瞭な形質は現れてこないことが容易に想像できる。この状況から、本研究を開始するにあたり最初に各GID1遺伝子の機能欠損変異体の入手を行い、1遺伝子の変異導入で明瞭な形質が現れないことを確認した上で、多重欠損変異体を作成し、3種のGID1に機能の差異が確認されるか解析を行った。加えて、3種のGID1がシロイヌナズナのGA受容を全て担うかについても結論を下すべく、全てのGID1が機能欠損した三重変異体を作成した。以下詳述する。

2-2 各 *GID1* 機能欠損型変異体の取得

各 *GID1* 遺伝子の発現異常が予想される変異体候補種子をストックセンターより取り寄せ、常法に従い生育させてその植物体ロゼット葉より調製した RNA を用いて RT-PCR による *GID1* 遺伝子の発現強度の把握を行った。その結果、図 2-1 上段に示すように各対象に据えた *GID1* 遺伝子に関する転写産物の存在はいずれにおいても認められず、予想どおり機能欠損状態であることが判明した。

3 種の *GID1* 機能欠損型変異体のうち、*GID1a* に関するものとして 2 ラインの入手が可能であった。1 つは Nossen (Nos) と呼ばれる野生型を親株とする Ds エlement 挿入型変異体[理研バイオリソースセンター(RIKEN BRC), 登録番号 Ds13-1770-1]で、*gid1a-1* と命名した。もう一つは野生型 Columbia (Col) を親株とする T-DNA 配列型変異体[Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), SALK_044317]で、*gid1a-2* と命名した。*GID1b* に関するものとしては Nossen を親株とする Ds エlement 挿入型 1 ライン(RIKEN BRC, Ds11-3970-1) のみの入手が可能であり、*gid1b-1* と命名した。同様に *GID1c* に関しても 1 ラインのみ、Columbia を親株とする T-DNA 配列挿入型(ABRC, SALK_023529) の入手が可能であり、*gid1c-1* と命名した。但し、他のグループ(Griffiths *et al.*, 2006)により一部重複して命名されたことが後に判明し、ABRC の要請に従い Ds13-1770-1 を *gid1a-3*、Ds11-3970-1 を *gid1b1-2* と名称変更したが、本論文中に限り当初の命名どおり各々を *gid1a-1* および *gid1b-1* と記す。各 Ds エlement および T-DNA 配列の挿入位置を図 2-1 下段に示す。これによると、*gid1a-1*、*gid1b-1*、*gid1a-2* では第 2 エキソン内に、また、*gid1c-1* ではイントロン内に各配列の挿入が生じていた。

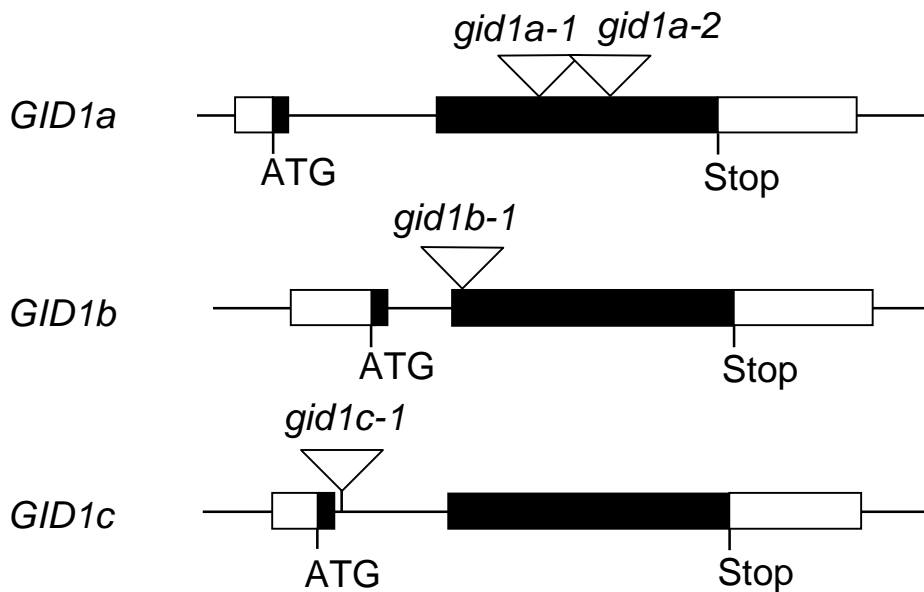
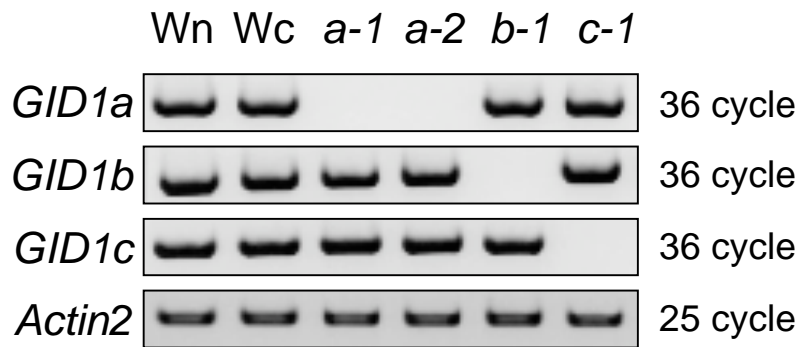


図2-1.各GID1変異体ラインにおけるGID1遺伝子の発現状況
およびDsエレメント, T-DNA挿入位置

上図：各GID1変異体および野生型親株のロゼット葉より全RNAを抽出し、GID1遺伝子の発現状況を半定量的RT-PCRにより解析した。Actin2遺伝子の発現状況は各サンプル間での全RNA量の標準化に用いた。Wn, 野生型Nossen (Nos); Wc: 野生型Columbia(Col); a-1, *gid1a-1*(Nos); a-2, *gid1a-2*(Col); b-1, *gid1b-1*(Nos); c-1, *gid1c-1*(Col)。

下図：各GID1変異体におけるDsエレメント、T-DNA挿入位置を示した。*gid1a-1*, *gid1a-2*ではGID1aの第2エクソン内にそれぞれDsエレメント、T-DNAが、*gid1b-1*ではGID1bの第2エクソン内にDsエレメントが、*gid1c-1*ではGID1cの第1イントロン内にT-DNAが挿入されていた。

各ラインを連続光下、通常の生育条件(23℃, 湿度約 60%)で生育を継続し、後代種子取得に至るまでその後の成長を観察した。抽だい後の花茎の伸長には GA が必須な要因であることが知られているが、図 2-2 に示すとおり各ラインおよびそれぞれの野生型親株のあいだで有意な差は確認されず、加えて、後代種子を用いて解析した発芽率や稔実率についても大きな差は認められなかった。以上の結果から当初予想した通り、シロイヌナズナの 3 種の GID1 は機能的に重複しており、1 種だけの機能が欠損した場合には GA シグナルの伝達に関して滞りを生じないことが判明した。

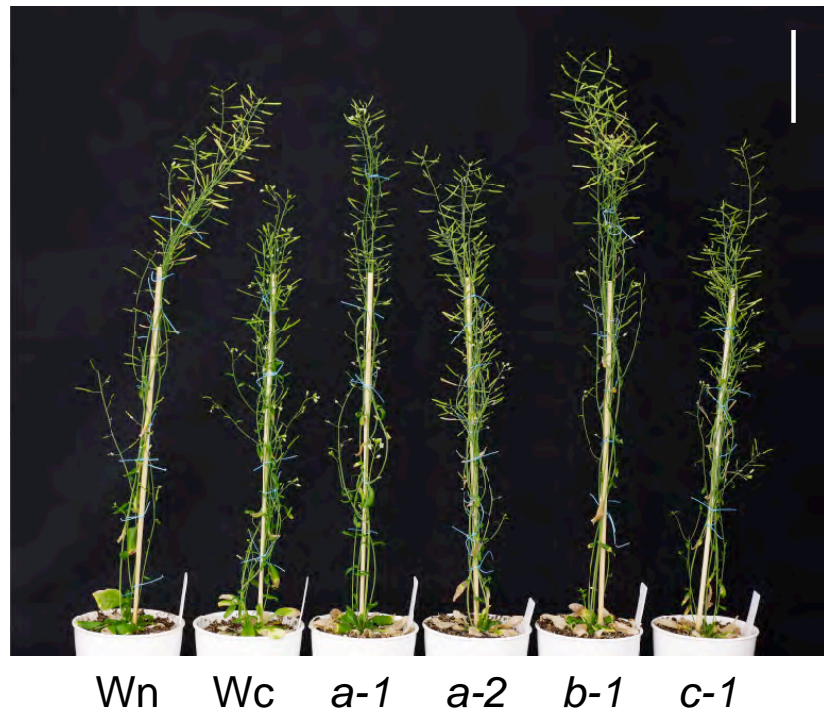


図2-2. 各*GID1*変異体の成熟個体

各*GID1*変異体と野生型親株の播種後50日目の様子を比較したもの。バーは5 cm。Wn, 野生型Nossen (Nos); Wc: 野生型Columbia(Col); a-1, *gid1a-1*(Nos); a-2, *gid1a-2*(Col); b-1, *gid1b-1*(Nos); c-1, *gid1c-1*(Col)。

2-3 *GID1* 二重欠損変異体の作出および解析

2-3-1 *GID1* 二重欠損変異体の作出

各機能欠損変異体を全組み合わせで掛け合わせを行い、次世代植物体 (T_1)から自家受粉によって後代種子(T_2)を得た。 T_2 世代を複数個体生育して、各個体よりゲノム DNA の抽出を行い、それらを鋳型とした PCR により遺伝型を決定した。2種の *GID1* 遺伝子ともにホモ欠損状態の T_2 個体のみを選抜して、自家受粉による T_3 種子を得て以下の解析に用いた。図 2-3 に各二重欠損変異体の作出経緯をまとめた。

2-3-2 *GID1* 二重欠損変異体の表現形質

図 2-4 に各二重欠損変異体の典型的な芽生えおよび成熟個体の形質を示す。Col ベースの *gid1a-2 gid1c-1* 二重変異体(以降、*gid1a gid1c-2KO* と記述)は野生型と比較して花茎の伸長が抑制され、矮性の形質を示した。花茎と同様に GA が関与する芽生え胚軸部の伸長についても、*gid1a gid1c-2KO* では同時期の他の二重変異体や野生型と比較してより背丈が低い傾向を示した。各変異体および野生型の花茎の伸長状況を経時的に測定した結果について、図 2-5 に示す。これによると、*gid1a gid1c-2KO* の抽だい時期、すなわち栄養成長から生殖成長へ切り替わる時期について野生型と比較した結果、時期切り替えの有意な遅延は特に認められなかった。それゆえ、*gid1a gid1c-2KO* は生殖成長に移行した後の花茎伸長にのみ異常をきたしていると考えられた。*gid1a gid1b-2KO*、*gid1b gid1c-2KO* では各々 *GID1c*、*GID1a* が正常に機能しているために花茎伸長の変化は観察されなかったと考えている。一方 *gid1a gid1c-2KO* では *GID1b* が正常に機能しているにもかかわらず矮化した。以上

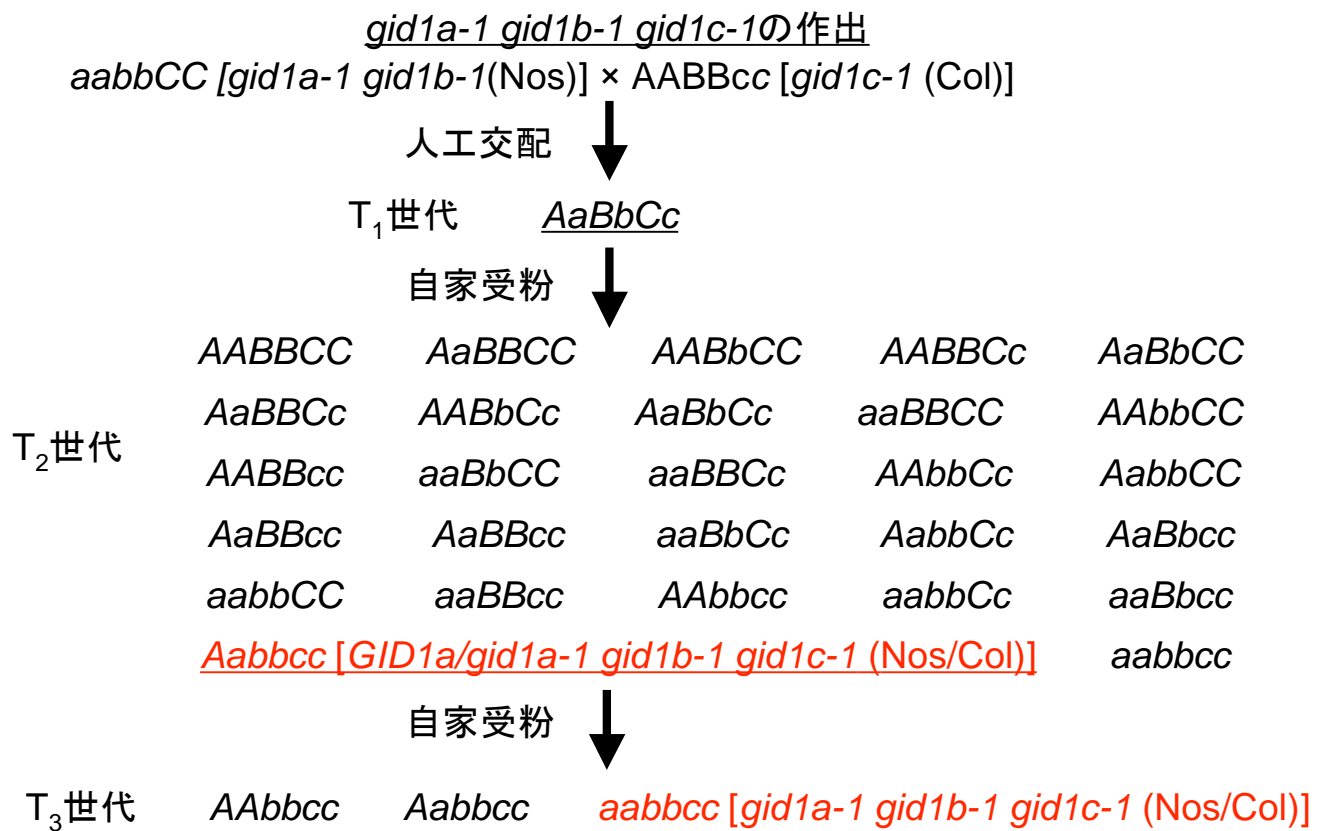
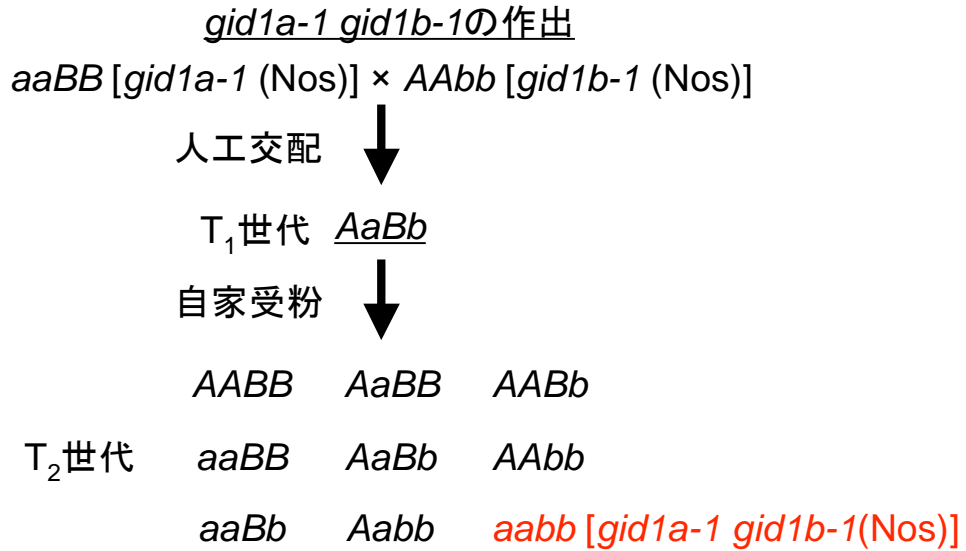


図2-3. *GID1*多重変異体作出の経緯

上図： *GID1*変異体間の人工交配、その後の自家受粉により各 *GID1*二重変異体を作成した手順を示す。ここでは *gid1a-1 gid1b-1* (Nos)の作出例のみ示す。*gid1a-2* (Col)と *gid1c-1* (Col)からの *gid1a-2 gid1c-1* (Col)の作出、および *gid1b-1* (Nos)と *gid1c-1* (Col)からの *gid1b-1 gid1c-1* (Nos/Col)の作出もこの例に従って作出した。

下図： *gid1-a gid1b-1*と *gid1c-1*の人工交配、その後の自家受粉により *GID1*三重変異体を作成した手順を示す。なお、T₂世代中にも三重変異体は存在するが、出現頻度がとても低いため、より安定的な供給に向けてT₃世代での取得を試みた。



Wn Wc ab ac bc



Wn Wc ab ac bc

図2-4. 各 *GID1* 二重変異体の芽生えおよび成熟個体

上図: 各 *GID1* 二重変異体および野生型親株の播種後7日目の様子。バーは1 cm。

下図: 各 *GID1* 二重変異体および野生型親株の播種後50日目の様子。バーは5 cm。

両図ともに、Wn, 野生型Nossen (Nos); Wc: 野生型Columbia(Col); ab, *gid1a-1 gid1b-1* (Nos); ac, *gid1a-2 gid1c-1* (Col); bc, *gid1b-1 gid1c-1* (Nos/Col)。

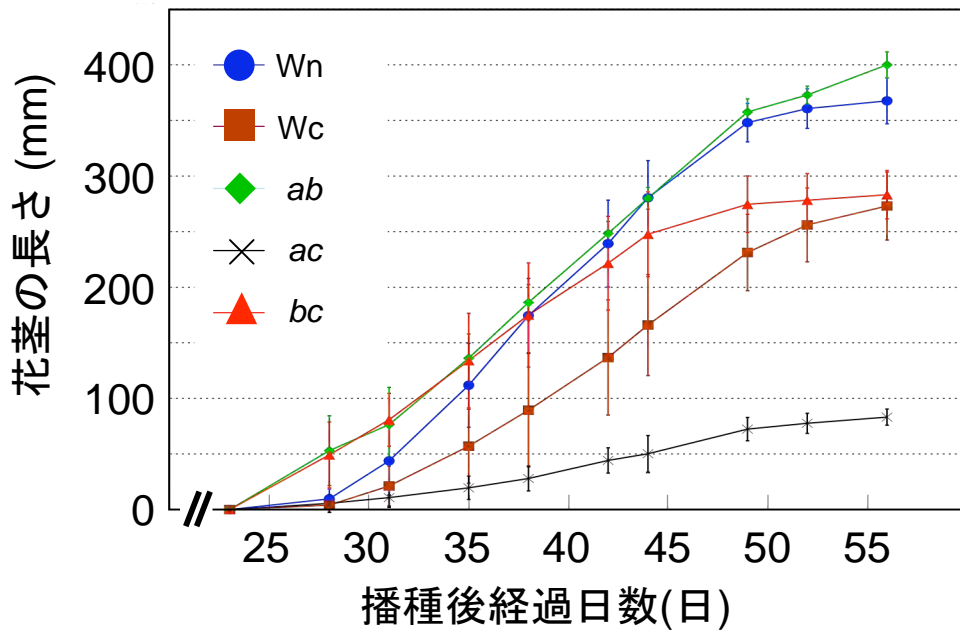


図2-5. 各GID1二重変異体の経時的な花茎の伸長

各GID1二重変異体および野生型親株の花茎の長さを各5個体ずつ無作為に選択して経時的に測定し、グラフ化した。Wn, 野生型Nossen (Nos); Wc: 野生型Columbia(Col); ab, *gid1a-1 gid1b-1* (Nos); ac, *gid1a-2 gid1c-1* (Col); bc, *gid1b-1 gid1c-1* (Nos/Col)。

より、GID1a や GID1c と比較すると花茎伸長に必須なシグナル伝達における GID1b の寄与は小さいことが示唆された。

同様に、花器官の分化・発達に着目して形質を比較した。その結果、図 2-6 に示すとおり、Nos ベースの *gid1a-1 gid1b-1* 二重変異体(以降、*gid1a gid1b-2KO* と記述)では花が咲いた後に長角果(silique)が成熟せず、その結果として結実しないケースが多く認められた。野生型と各変異体における 1 個体あたりの平均種子収穫量を計測した結果、図 2-7 に示すように *gid1a gid1b-2KO* では明確に稔実率の低下が認められた。この原因を探るべく光学顕微鏡を用いて各花器官の観察を行ったところ、野生型と比較して *gid1a gid1b-2KO* では雄蕊(おしべ)の伸長が不十分で、その結果、花粉が雌蕊の柱頭より下の側壁に付着しているケースが多く認められた(図 2-8)。そこで、*gid1a gid1b-2KO* 個体の開花後、綿棒を用いて自家受粉処理を行ったところ、高い確率で長角果が成熟し、種子形成の回復が認められた(図 2-6)。従って、*gid1a gid1b-2KO* の花粉は機能的に異常なく分化・発達しているものの、雄蕊の伸長不足により花粉が柱頭に付着しづらくなった結果、稔実率の低下が生じていると結論した。これにより、*gid1a gid1b-2KO* において正常に存在するはずの GID1c が他 2 つの GID1 と比較して雄蕊の伸長に対して寄与が小さいことが明らかとなった。

この他、以前に GA 生合成欠損変異体 *GA3ox4-KO* 個体では完熟種子表面の紋様の乱れを生ずるとする報告があることから(Kim *et al.*, 2005)、各二重変異体の種子表面構造についても走査型電子顕微鏡を用いて解析した。その結果、図 2-9 に示すように *gid1a gid1b-2KO* のみ模様の乱れが確認された。ただし、後述(2-4-2 項)のとおり、紋様の乱れが GID1a・GID1b 双方の機能異常と常に連動する訳でないと判明したことから、これ以上の検討を中止し

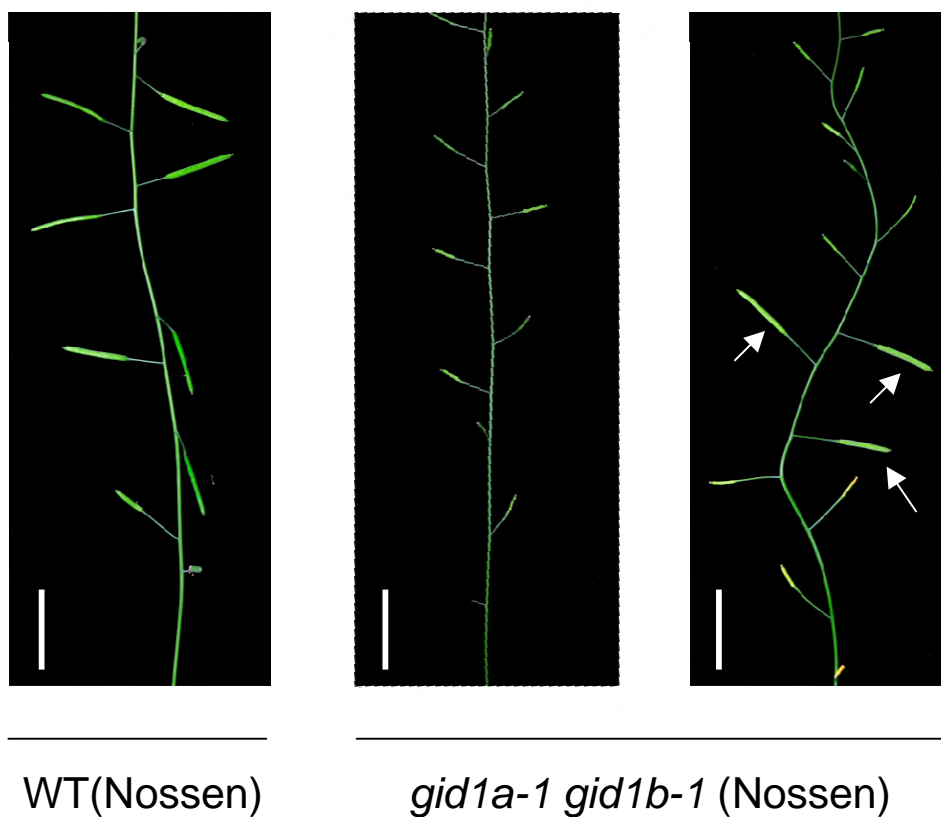


図2-6. *gid1a-1 gid1b-1*二重変異体の長角果の様子と人工的な受粉処理の効果

*gid1a-1 gid1b-1*二重変異体(中)および対応する野生型Nossen個体(左)における長角果の成熟の様子。なお、右図中の矢印は、綿棒を用いて自家受粉処理を施した場合の長角果。バーはいずれも1 cm。

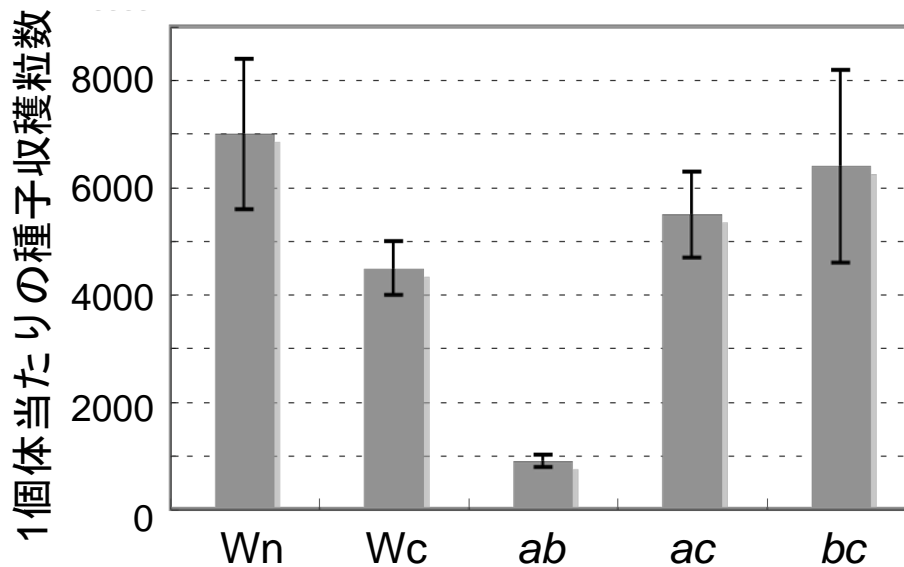
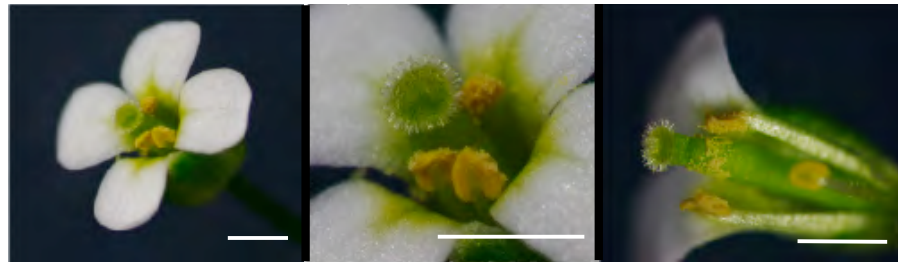


図2-7. 各GID1二重変異体における種子収穫量

各GID1二重変異体および野生型親株における1個体当たりの種子収穫粒数を示した。収穫粒数は種子400粒の重量を元に算出し、各ライン毎に無作為に5個体ずつ計測した結果をグラフ化した。Wn, 野生型 Nossen (Nos); Wc: 野生型Columbia(Col); ab, *gid1a-1 gid1b-1* (Nos); ac, *gid1a-2 gid1c-1* (Col); bc, *gid1b-1 gid1c-1* (Nos/Col)。

gid1a-1 gid1b-1
(Nossen)



WT (Nossen)



図2-8. *gid1a-1 gid1b-1*二重変異体の花器官の様子

*gid1a-1 gid1b-1*二重変異体(上)および対応する野生型Nossen(下)の花器官を光学顕微鏡で観察したもの。バーは全て1 mm。

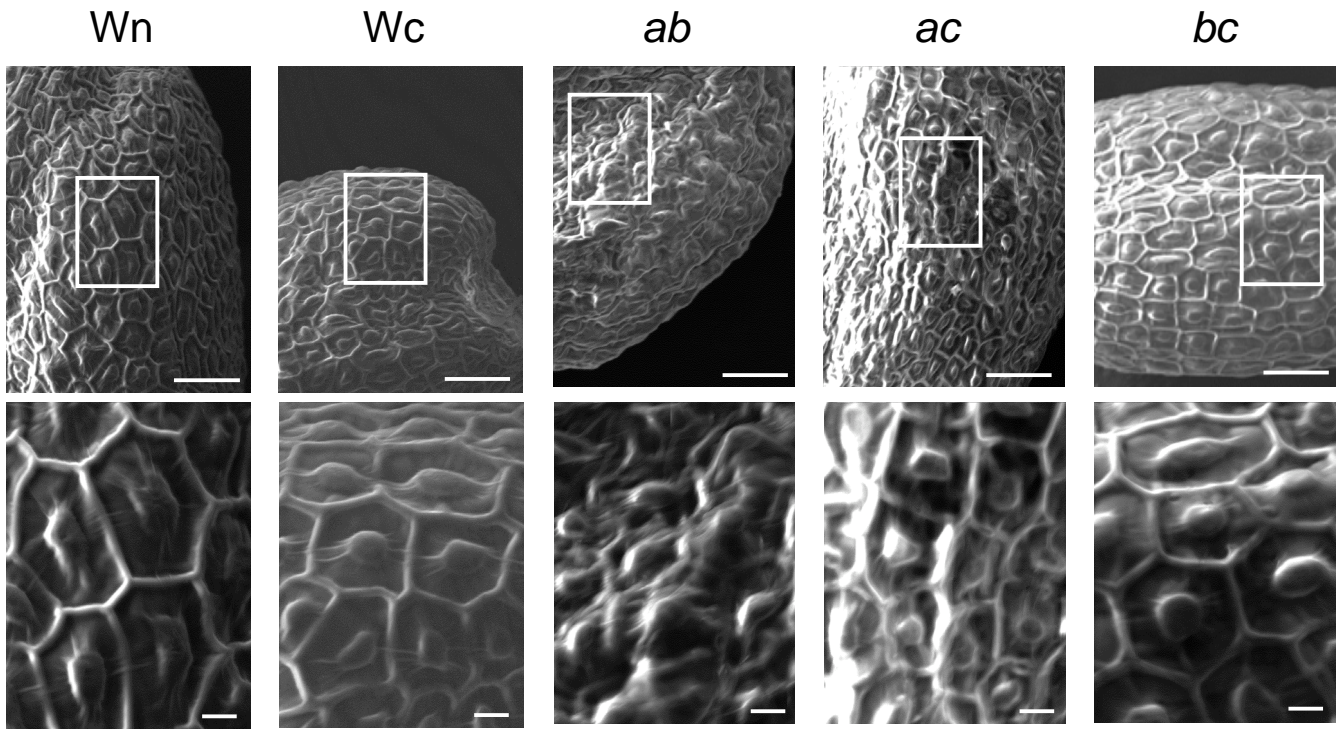


図2-9. 各*GID1*二重変異体の完熟種子表面構造

各*GID1*二重変異体および野生型親株の完熟種子表面を走査型電子顕微鏡で観察したもの。バーは50 μm (上段)。下段は上段図の四角部分の拡大図。バーは10 μm 。Wn, 野生型Nossen (Nos); Wc: 野生型Columbia(Col); *ab*, *gid1a-1 gid1b-1* (Nos); *ac*, *gid1a-2 gid1c-1* (Col); *bc*, *gid1b-1 gid1c-1* (Nos/Col)。

た。

2-3-3 GID1 二重欠損変異体の GA 応答性

gid1a gid1c-2KO において異常を認めた花茎および胚軸、に着目して GA 応答性の変化について解析した。形質の現れたもう一つの器官である *gid1a gid1b-2KO* において異常を認めた雄蕊については他の花器官から分離して検討に用いることは極めて困難を伴うため、やむをえず検討から除外した。実験には以下の方法を用いた。まず各二重変異体および野生型の花茎に GA 生合成阻害剤ウニコナゾール-P (Uni)水溶液を処理しておき、続いて 24 時間経過後に GA 溶液あるいはその mock 液を投与して、12 時間後に収穫して直ちに全 RNA を調製した。続いて通常、GA 投与による発現応答が明瞭な *AtEXP1* 遺伝子に着目して発現状況を real-time PCR で解析した。その結果、図 2-10 に示すように *gid1a gid1c-2KO* の花茎のみ当該遺伝子は発現応答を示さず、この器官において GA シグナルの伝達に障害が生じていること、言い換えれば残る正常な GA 受容体 GID1b が *gid1a gid1c-2KO* 花茎において十分に機能していないことが GA 誘導性遺伝子の発現レベルでも確認された。なお、当初は GA 応答性遺伝子として上記 *AtEXP1* 以外にも GA の生合成に関わる *GA3ox* 遺伝子や *GA20ox* 遺伝子も解析対象に加え検討していたが、用いたプライマーに問題があり蓄積したデータを棄却して、現在、再試中である。但し、他の研究グループの報告(Griffiths *et al.*, 2006)によっても、*gid1a gid1c-2KO* の矮性形質が GA 処理では回復しないと記述されており、上記結論を支持する。

一方、胚軸を対象とした GA 応答性の解析では、小さいゆえに胚軸のみを集めることが困難なことから、播種後 1 週間目の芽生えを収穫して上記方

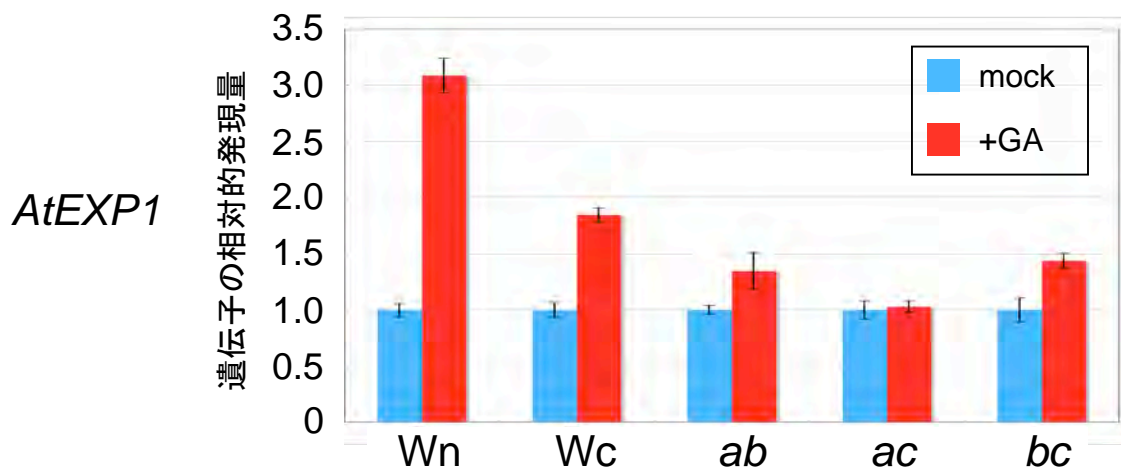


図2-10. 各*GID1*二重変異体の花茎におけるGA応答性遺伝子の発現解析

各*GID1*二重変異体および野生型親株の播種後40日後の個体に50 μ M ウニコナゾール-P水溶液(0.2 % v/v DMSO)をスプレーして24時間後、さらに50 μ M ウニコナゾール-P水溶液(0.4 % v/v DMSO) (mock区)、あるいは50 μ M ウニコナゾール-P + 10 μ M GA₄水溶液(0.4 % v/v DMSO) (+GA区)をスプレーし、12時間後の各2個体より全RNAを抽出して、*AtEXP1*遺伝子の発現状況をreal-time PCRを用いて解析した。*Actin2*遺伝子発現量を基準として各RNA量の標準化を行い、mock区の発現量を1.0とする相対的発現量を示した。Wn, 野生型Nossen (Nos); Wc: 野生型Columbia(Col); ab, *gid1a-1 gid1b-1* (Nos); ac, *gid1a-2 gid1c-1* (Col); bc, *gid1b-1 gid1c-1* (Nos/Col)。

法と同様の処理を行い全 RNA を調製した。AtEXP1・GA3ox1 両遺伝子の発現状況を半定量的な RT-PCR で解析した結果を図 2-11 に示す。これによると、先の花茎を用いた場合とは異なりいずれの 2KO とも明瞭に GA 処理による発現応答が確認された。この原因として、形質の現れる *gid1a gid1c*-2KO 胚軸部では GA に対する応答は弱いと予想されるが、胚軸全体を用いたために他に GID1b が機能する部位があつて、それらを含めて検討のためのサンプルに供したからではないかと推察した。これについては、次章(3-3-2 項)において再度検証する。

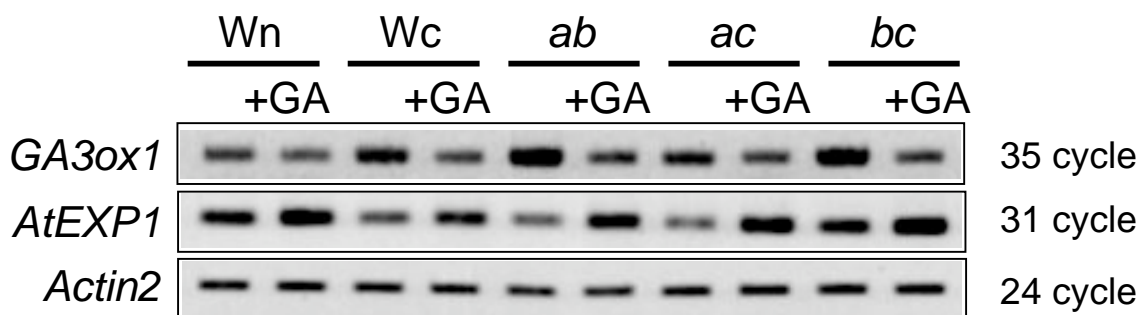


図2-11. 各*GID1*二重変異体の芽生えにおけるGA応答性遺伝子の発現解析

各*GID1*二重変異体および野生型親株の播種後7日後の芽生えを50 μ M ウニコナゾール-P水溶液(0.2 % v/v DMSO)に3日間浸した後、さらに50 μ M ウニコナゾール-P水溶液(0.4 % v/v DMSO)に12時間(各左レーン)、あるいは50 μ M ウニコナゾール-P + 10 μ M GA₄水溶液(0.4 % v/v DMSO)に12時間(各「+GA」と記した右レーン)静置し、各10個体より全RNAを抽出して、遺伝子の発現状況を半定量的RT-PCRを用いて解析した。Wn, 野生型 Nossen (Nos); Wc: 野生型 Columbia(Col); ab, *gid1a-1 gid1b-1* (Nos); ac, *gid1a-2 gid1c-1* (Col); bc, *gid1b-1 gid1c-1* (Nos/Col)。

2-4 *GID1* 三重欠損変異体の作出および解析

2-4-1 *GID1* 三重変異体の作出

図 2-3 に示すとおり、*GID1* 三重変異体の作出のために *gid1a-1 gid1b-1* 2KO と *gid1c-1* 1KO との掛け合わせによって後代種子(T₁)を得た。さらにこの T₁ 個体の自家受粉による T₂ 種子を得た。T₂ 個体の一部からゲノム DNA を抽出してそれを鋳型とする PCR により遺伝型を決定した。その結果、*GID1a* 遺伝子のみ正常な GA 受容体遺伝子として唯一ヘテロで残存する *GID1a/gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1* 2KO (以降、*Aabbcc* と記述)変異体を見出し、この変異体から自家受粉により後代種子(T₃)を得た。従って、約 1/4 の確率で T₃ 個体中に *GID1* 三重変異体(以降、*aabbcc* と記述)が存在すると期待して以下の解析を行った。

2-4-2 *GID1* 三重変異体の表現形質

T₃ 種子 60 粒を通常 conditions で発芽させたところ、約 30%の種子が発芽しなかった。そこで、発芽した種子と発芽しなかった種子に分別し、各個体ごとにゲノム DNA を抽出し、nested-PCR によって遺伝型を決定した結果、発芽した種子中には *aabbcc* の遺伝型を持つ物は全く存在せず、発芽しなかった種子の大半が *aabbcc* であることが判明した(図 2-12)。また、通常 conditions の種子であれば発芽促進に極めて有効な「低温処理段階からの GA₄ 共存環境の維持」を T₃ 種子に施しても、発芽率の向上は全く認められず(図 2-12)、GA 処理に応答した発芽促進が *aabbcc* 変異体には認められない気配が覗えた。

シビアな形質を有する GA 生合成欠損変異体は、GA 投与がなければ自発的に発芽することはないが、種皮を除去することによって極矮性の植物体

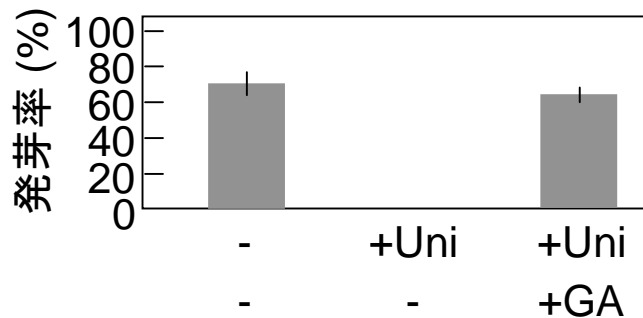
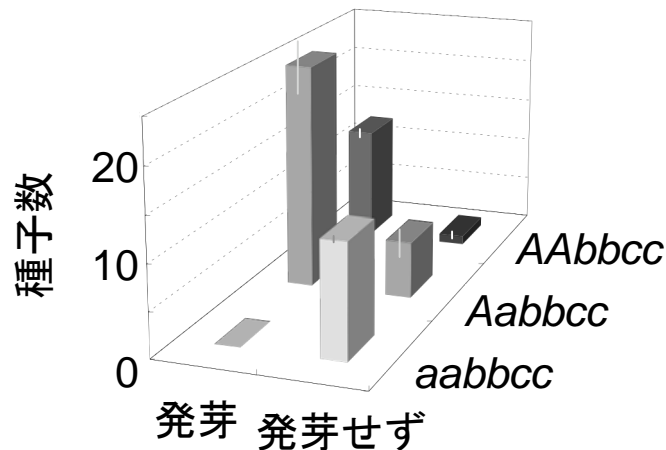


図2-12. *GID1a/gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1*変異体後代種子の遺伝子型と発芽状況の関連性

上図： *Aabbcc*二重変異体(*GID1a/gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1*)後代種子を約60粒無作為に選び、通常条件下で播種し、発芽の有無、nested-PCRによる遺伝型の決定によって6種に分類した。試験は3回繰り返し、グラフ化した。*AAbbcc, GID1a gid1b-1 gid1c-1; Aabbcc, GID1a/gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1; aabbcc, gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1*。

下図： *Aabbcc*二重変異体(*GID1a/gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1*)後代種子を約40粒無作為に選び、50 μ M ウニコナゾール-P水溶液中(0.4 % v/v DMSO) (+Uni区)、あるいは50 μ M ウニコナゾール-P + 10 μ M GA₄水溶液中(0.4 % v/v DMSO)(+Uni+GA区)にて3日間4°Cで静置した後、3日間22°Cで培養した時の発芽率を示した。試験を3回繰り返し、グラフ化した。

として生長することが報告されている(Baskin and Baskin, 1971; Debeaujon and Koornneef, 2000)。そこで、*aabbcc* 変異体についても種皮の除去処理によって植物体になるか検討した。すなわち、発芽しなかった種子について顕微鏡下で人工的に種皮を除去し、寒天培地上で胚を培養した。その結果、*Aabbcc* 個体と比較して極矮性の植物体として成長し、GA 生合成欠損変異体とも非常に似た形質を示すことが明らかとなった(図 2-13)。*aabbcc* 個体はロゼット葉の葉柄部分がほとんど伸長しないために葉が展開せず、葉が次々と覆いかぶさった形態を示した。なお、これら極矮性の植物体についてはその一部よりゲノム DNA を調製し、先述の要領によっていずれも *aabbcc* の遺伝型を持つことを確かめた。

ところで、*aabbcc* 個体の抽だいは 2 ヶ月以上経過しても確認できなかった。栄養成長から生殖成長への移行に 1 ヶ月以上の低温処理、いわゆる春化処理が有効とされることから(Michaels and Amasino, 1999)、*aabbcc* 個体および GA 生合成欠損変異体 *ga1-3* について寒天培地上で 1 ヶ月培養して植物体とした後、1 ヶ月間 4°C 環境下に置いて、再び通常条件で 40 日程度栽培したが共に抽だいを確認することはできなかった。Michaels and Amasino の報告によると、*ga1-3* ではこの春化処理により抽だいが確認されたとの事なので、記述情報以外の環境条件が異なるために本検討ではうまく抽だいを誘導できなかったのかもしれないと解釈して、「*aabbcc* 個体は抽だいですか」についての結論を保留した。

2-3-2 項で少し触れたが、*gid1a gid1b-2KO* では完熟種子表面の模様になんが認められた(図 2-9)。このことから、*Aabbcc*, *Aabbcc*, *aabbcc* の 3 つの遺伝型が混在する T₃ 種子から GID1a および GID1b が共に機能的に欠損している *aabbcc* 種子だけを種皮の除去処理せずとも選抜できる可能性を示唆し

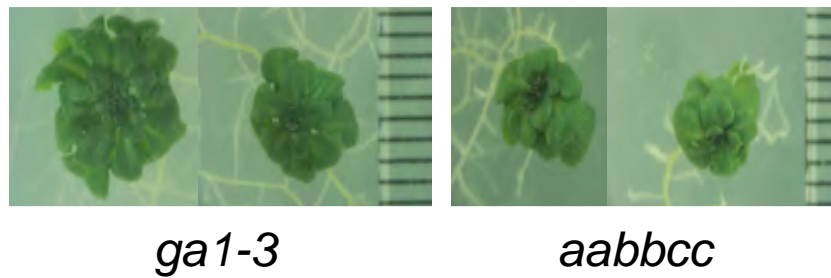
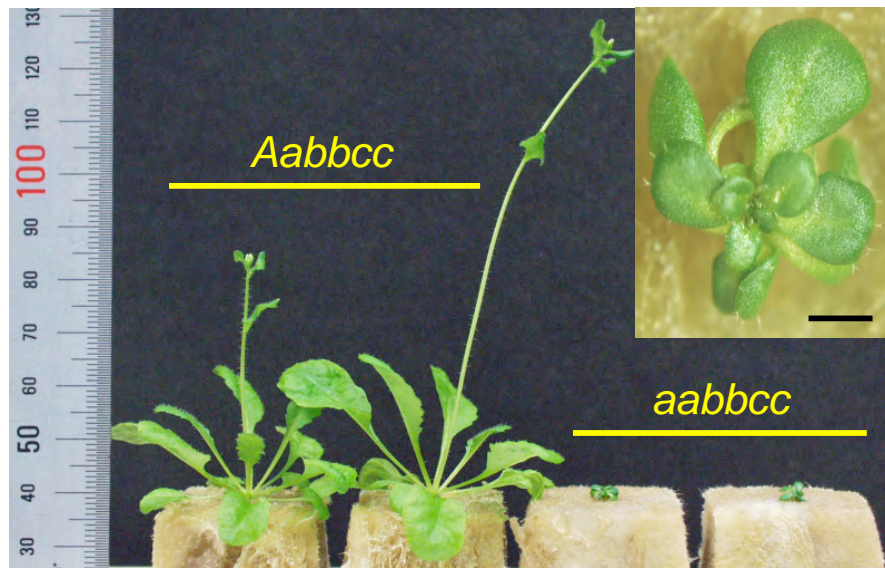


図2-13. *GID1*三重変異体の極矮性形質

上図： *GID1*三重変異体 *aabbcc*(右)および *Aabbcc*二重変異体 (*GID1a/gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1*) (左)の種皮を除去後34日目の個体を比較した。右上の枠内は *GID1*三重変異体の拡大図(バーは1 mm)。

下図： *GID1*三重変異体 *aabbcc*(右)およびGA生合成欠損変異体 *ga1-3* (左)の種皮を除去後50日目の個体を比較した。目盛りは1 mm。
Aabbcc, *GID1a/gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1*; *aabbcc*, *gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1*。

ていると考えた。そこで、T₃種子約 120 粒を無作為に抽出して、低真空走査型電子顕微鏡を用いて 1 つずつ種子表面の紋様の乱れの有無を判定した後、ゲノム DNA を調製して遺伝子型を調べた。その結果、*AAbbcc*, *Aabbcc* の遺伝子型を持つものでも紋様の乱れが認められたり、逆に *aabbcc* の遺伝子型を持つものでも紋様に乱れがないものが存在したため、遺伝子型の判定には使えないことが判明した。

2-4-3 *GID1* 三重変異体の GA 非感受性

GID1 二重変異体に関する解析に倣い、*aabbcc* 個体は GA 応答性を完全に失っているか、すなわち、シロイヌナズナにおける GA の受容に関して 3 種の *GID1* が支配的に機能しているのか結論を下すべく、*aabbcc* 個体の GA 応答性を調べた。すでに、発芽時の GA 投与効果が認められないことは前項で述べた。そこで、種皮を外して胚を取り出し培養後、芽生えに対する GA 処理を試みたが、図 2-14 に示すように *gid1b gid1c*-2KO (*AAbbcc*) では GA 投与による葉柄や根の伸長促進が確認される状況下で *aabbcc* 個体の形質回復は確認されなかった。さらに、GA 応答性遺伝子 *AtEXP1*・*GA3ox1* の GA 投与後の発現量変化を調べた。その結果、図 2-15 に示すように *AAbbcc* および *Aabbcc* 個体では野生型と同様な *AtEXP1* 遺伝子の発現誘導および *GA3ox1* 遺伝子の発現抑制が確認されたのに対して、*aabbcc* 個体ではほとんど変動しなかった。また、*AAbbcc* および *Aabbcc* 個体において、*GID1a* 遺伝子の発現は GA 投与により減少が確認され、GA シグナルの伝達に伴い自らのシグナルにブレーキをかけるフィードバック制御を行うことが確認された。こうした制御機構は *GID1a* 遺伝子だけではなく、*GID1b* 遺伝子にも影響することが他のグループにより報告されている(Griffiths *et al.*, 2006)。以上の

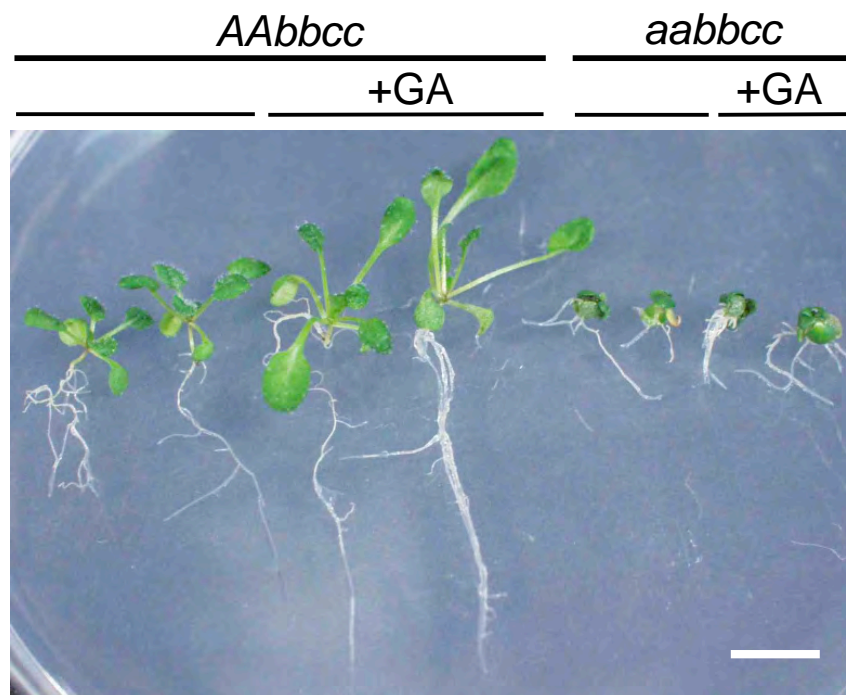


図2-14. *GID1*三重変異体の芽生えにおけるGA投与の効果

種皮を除いて7日間成長させた*GID*三重変異体*aabbcc*(右)および*AAbbcc*二重変異体(*GID1a gid1b-1 gid1c-1*)に対して0.2 % v/v DMSO水溶液あるいは10 μ M GA_4 水溶液(0.2 % v/v DMSO) (+GA区)をスプレーで処理し、7日後の各植物個体の様子を示す。*AAbbcc*, *GID1a gid1b-1 gid1c-1*; *aabbcc*, *gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1*。

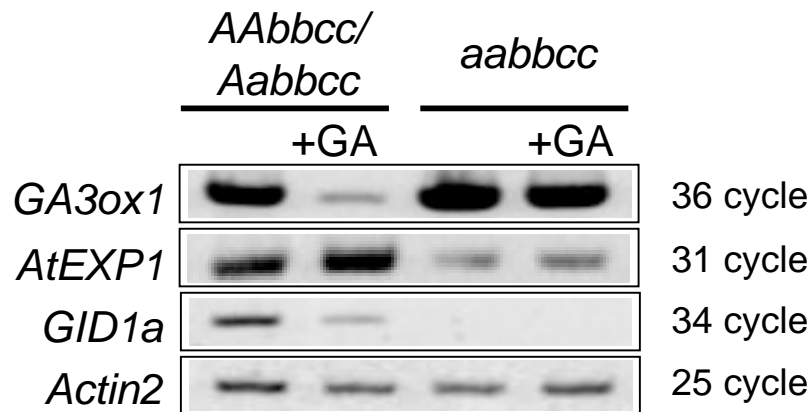


図2-15. *GID1*三重変異体の芽生えにおける
GA応答性遺伝子の発現解析

*Aabbcc*二重変異体(*GID1a/gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1*)後代種子を通常条件下で播種し、発芽した個体、発芽しなかった個体に分別し、発芽しなかった個体は種皮を除去して成長させ、播種後7日後の芽生えを50 μ M ウニコナゾール-P水溶液(0.2 % v/v DMSO)に3日間浸した後、さらに50 μ M ウニコナゾール-P水溶液(0.4 % v/v DMSO)に12時間(各左レーン)、あるいは50 μ M ウニコナゾール-P + 10 μ M GA₄水溶液(0.4 % v/v DMSO)に12時間(各「+GA」と記した右レーン)静置した。各10個体より全RNAを抽出し、各遺伝子の発現状況を半定量的RT-PCRを用いて解析した。図中、*AAbbcc*, *GID1a gid1b-1 gid1c-1*; *Aabbcc*, *GID1a/gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1*; *aabbcc*, *gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1*。

結果から、*aabbcc* 個体の GA 非感受性・極矮性の形質はイネの GA 受容体欠損変異体 *gid1* と互いに類似しており、3 種の GID1 がシロイヌナズナにおいて支配的に機能する GA 受容体と結論した。

上述の通り本章では、機能的に欠損させる GID1 の組み合わせによって、二重変異体の複数の器官で形質が現れたり現れなかったりすることを確認した。すなわち、3 種の GID1 はかなり機能的に重複しているが、部分的に機能に違いがあることが示唆される。そこで、その機能分担を制御する本質は何か明らかにすべく、次章以降は主に 2 つのアプローチを用いて究明した研究結果を述べる。

2-5 実験の部

2-5-1 シロイヌナズナ植物体の調製およびその観察

育成用の培地は以下のように調製した。**1/2MS 固形培地**: Murashige & Skoog Salt Mixture (日本製薬) 2.3 g, スクロース 30 g, myo-イノシトール 0.1 g, 1000×ビタミンストック(100 mgの蒸留水にニコチン酸 50 mg, ピリドキシン塩酸塩 50 mg, チアミン塩酸塩 20 mg, グリシン 200 mg, ビオチン 5 mg, 葉酸 50 mg を溶解したもの) 1 mL, DW 0.9 L を混合し、1 N NaOH 水溶液を用いて pH 5.7 を合わせた後、1 L にメスアップして寒天末(ナカライテスク) 8 g を加えオートクレーブ。最後にプレートに分注して冷却し固めたもの。**1/2MS 固形 Km 選択培地**: オートクレーブした 1/2MS 固形培地 1 L に対し、1 mL の 100 mg/mL カナマイシン (Km) 水溶液を添加して攪拌し、プレートに分注して固めたもの。

シロイヌナズナ種子は 1.5 mL 容マイクロチューブに取り、70% (v/v) エタノールに浸した後、種子殺菌液(次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素 2.0 %以上), 0.1% (v/v) Tween 20) に 5 分間浸し、sDW で 4 回洗浄した。sDW 中にて 4°C・暗闇下で 3 日間以上静置した後、オートクレーブ済みの 0.1% (w/v) アガロースを加えて 1/2MS 固形培地に播種し、1 時間程度クリーンベンチ内で乾燥させた後、22.5±1.0°C・連続光下(18.2~46.5 mmol/m²・sec)で生育させた。また、ヘテロ変異体の親より得られた後代種子より変異体を選抜する場合は、1/2MS 固形 Km 選択培地に播種し、12 日間後の生育状況からカナマイシン耐性個体を判定した。

また大きく育成させたい場合は、1/2MS 固形培地で 12 日間生育後、植物体をロックファイバーミニポット(日東紡)に移植し、1000 倍希釈(v/v)ハイポネックス(ハイポネックス)溶液にて 22.5±1.0°C・連続光下(18.2~46.5 mmol/m²・sec)で育成した。

発芽率の測定および花器官などの微細な器官の観察には光学実体顕微鏡(SZX12, Olympus)を用いた。

2-5-2 各種 *GID1* 変異体の遺伝型の判定

約 100 mg 新鮮重の植物サンプルを液体窒素で冷却しながら乳棒、乳鉢を用いて粉末状になるまで破砕し、以後は DNeasy Plant Kits (Qiagen)を用いてマニュアルに従い、ゲノム DNA を抽出した。各ゲノム DNA 溶液をテンプレートとして PCR を行い、各個体の遺伝型を解析した。PCR 反応液は以下の通り。sDW 35 μL, 10×PCR buffer 5 μL, dNTP mixture (TaKaRa) 5 μL, 各ゲノム DNA 溶液 2 μL, 50 μM 5'プライマー 1 μL, 50 μM 3'プライマー 1 μL, Advantage cDNA polymerase (Clontech) 1 μL。PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa)もしくは Gene Amp PCR system (Applied Biosystems)を用いて PCR 反応を行った。反応条件は、まず 94°C で 3 分間保った後、[94°C, 30 秒→55°C, 30 秒→72°C, 1 分]のサイクルを 36 回繰り返し、72°C で 5 分維持した後、4°C に保った。電気泳動用緩衝液として TAE 緩衝液(40 mM Tris-HCl, 1 M 酢酸, 1 mM EDTA (pH 8.0))を用い(以下アガロースゲル電気泳動では当該緩衝液を用いた)、1% (w/v)アガロースゲルにて電気泳動(100 V, 定電圧)を行い、増幅された DNA 断片のパターンよ

り、各個体においてどの *GID1* 遺伝子が欠損しているか、欠損状態はホモであるかヘテロであるかの判定を行った。用いたプライマーの配列情報は以下に示す通り。

(*GID1a* 用プライマーセット)

Ds エlement上 5'プライマー : 5'-TACCTCGGGTTCGAAATCGAT-3'

T-DNA 配列上 5'プライマー : 5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'

第一イントロン上 5'プライマー : 5'-ATTGGTGTCTTTCTGGGTTTGATGCAG-3'

第二エクソン上 3'プライマー : 5'-CATTCCGCGTTTACAAACGCC-3'

(*GID1b* 用プライマーセット)

Ds エlement上 5'プライマー : 5'-TACCTCGGGTTCGAAATCGAT-3'

第一イントロン上 5'プライマー : 5'-GAAGAGGAAATCTAAGACGTCCCATC-3'

第二エクソン上 3'プライマー : 5'-CCAGACTCTGGACTTGACCCAG-3'

(*GID1c* 用プライマーセット)

T-DNA 配列上 5'プライマー : 5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'

第一エクソン上 5'プライマー : 5'-ATGGCTGGAAGTGAAGAAGAAGTTAATC-3'

第一イントロン上 3'プライマー : 5'-TCAGAGAACCTTCAAACACAAAACC-3'

また、*Aabbcc* の後代の種子一粒からの遺伝型の判定には、サンプルが極少量であることから、植物溶解液を用いた直接 PCR 法と nested-PCR 法を併用して用いた。種子を 20 μ L の溶解液(20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.3% (w/v) SDS)に浸し、ホモジナイザーペッスル(アズワン)を用いてすり潰した後、50°Cにて一晩静置した。この溶解液 0.5 μ L に対し、8 μ L の sDW , 10 μ L の 2 \times Ampdirect plus (島津製作所), 0.1 μ L の Nova Taq (Merck), 1 μ L の 5'プライマー#1 溶液(50 μ M), 1 μ L の 3'プライマー#1 溶液(50 μ M)を加えて PCR Thermal Cycler Dice TP600 もしくは Gene Amp PCR system を用いて PCR 反応を行った。反応条件は、まず 94°Cで 10 分間保った後、[94°C, 30 秒→55°C, 30 秒→72°C, 1 分 30 秒]のサイクルを 40 サイクル繰り返し、72°Cで 5 分維持した後、4°Cに保った。この PCR 反応溶液 0.5 μ L に対し、8 μ L の sDW , 10 μ L の 2 \times Ampdirect plus (島津製作所), 0.1 μ L の Nova Taq (Merck), 1 μ L の 5'プライマー#2 溶液(50 μ M), 1 μ L の 3'プライマー#2 溶液(50 μ M)を加えて再度同様のプログラムで PCR を行った。1% (w/v)アガロースゲルにて電気泳動(100 V, 定電圧)を行い、増幅された DNA 断片のパターンより *GID1a* 遺伝子が欠損しているか、欠損状態はホモであるかヘテロであるかの判定を行った。用いたプライマーの配列情報は以下に示す通り。

(ゲノム上の正常な *GID1a* を検出するプライマーセット)

5'プライマー#1 : 5'-TCTGGGTTTGATGCAGACAG-3'

3'プライマー#1 : 5'-CGTTTCAGAATCCAGCGTTT-3'

5'プライマー#2 : 5'-CCTCTCAATACATGGGTTTTAATATCCAAC-3'

3'プライマー#2 : 5'-CATTCCGCGTTTACAAACGCC-3'

(ゲノム上の Ds エlementが挿入された *GID1a* を検出するプライマーセット)

5'プライマー#1 : 5'-TACCTCGGGTTCGAAATCGAT-3'

3'プライマー#1 : 5'-CGTTTCAGAATCCAGCGTTT-3'

5'プライマー#2 : 5'-TACCTCGGGTTCGAAATCGAT-3'

3'プライマー#2 : 5'-CATTCCGCGTTTACAAACGCC-3'

2-5-3 走査型電子顕微鏡を用いた完熟種子表面構造の解析

試料台に carbon conductive tape (Ted Pella)にて完熟乾燥種子を貼り付け、走査型電子顕微鏡(JSM 5410LV, JEOL)にて表面構造を観察した。解析条件: 加速電圧, 15 kV; 真空度, 0 Pa; 試料照射電流, 52 μ A。

2-5-4 植物への GA 生合成阻害剤、GA 処理

植物への処理にはそれぞれ GA 生合成阻害剤としてウニコナゾール-P (住友化学)、活性型 GA として GA₄を用いた。芽生えにおける処理では、2-5-1 項と同様の手順で種子の殺菌を行った後、sDW 中にて 4°C, 暗闇下で 3 日間以上静置した後、sDW で湿らせたオートクレーブ済みのろ紙上に播種し、滅菌シャーレ(IWAKI)内にて 22.5 \pm 1.0°C・連続光下(18.2~46.5 mmol/m² sec)で 7 日間生育させた。また、*GID1* 三重変異体個体については播種後 3 日後に発芽しない種子を光学実体顕微鏡(SZX12, Olympus)下でピンセットと注射針(31G short, Heraeus KULZER)を用いて中の胚を取り出し、再度 sDW で湿らせたろ紙上で 7 日間生育させた。これらの個体を次に 50 μ M ウニコナゾール-P (0.2% (v/v) DMSO)水溶液で湿らせたろ紙上で 3 日間静置後、さらに 50 μ M ウニコナゾール-P (0.4% (v/v) DMSO)水溶液で湿らせたろ紙上(mock 区)、あるいは 50 μ M ウニコナゾール-P + 10 μ M GA₄ (0.4% (v/v) DMSO)水溶液で湿らせたろ紙上(+GA 区)で 12 時間静置した。

GID1 三重変異体個体の芽生えの矮性形質に対する GA 効果を解析する実験では 2-5-1 項と同様の手順で種子の殺菌を行った後、直ちに光学実体顕微鏡下で 30 粒の種子より胚を取り出し、1/2MS 固形培地に移して 7 日間無菌状態で生育させた。これら個体に対して、0.2% (v/v) DMSO 水溶液(mock 区)、あるいは 10 μ M GA₄ (0.2% (v/v) DMSO)水溶液(+GA 区)をクリーンベンチ内で無菌的にスプレー処理し、更に 7 日間無菌状態で生育させた。

花茎における処理では、ロックウールで成長させた播種後 40 日目の個体に対して 50 μ M ウニコナゾール-P (0.2% (v/v) DMSO)水溶液をスプレーして 24 時間後、さらに 50 μ M ウニコナゾール-P (0.4% (v/v) DMSO) 水溶液(mock 区)、あるいは 50 μ M ウニコナゾール-P + 10 μ M GA₄ (0.4% (v/v) DMSO)水溶液 (+GA 区)をスプレーして 12 時間静置した。

2-5-5 半定量的 RT-PCR または real-time PCR による遺伝子発現量の解析

(1) 植物体からの全 RNA の抽出

操作時は全てポリエチレン製手袋(サニメント手袋, 井内)を着用した。予め液体窒素で冷却した乳鉢に凍結種子を入れ、液体窒素を加え乳鉢で粉末状になるまで破碎した。粉末を 50 mL 容滅菌済み遠心チューブ(Oak Ridge Centrifuge Tube, PPCD, NALGENE, 以下 50 mL 容チ

ューブと呼ぶ)に移し、種子重量の 2~3 倍量(v/w)の抽出バッファー(100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM LiCl, 1% (w/v) SDS)と等量(v/w)の TE 飽和フェノール(和光純薬)を加えてよく攪拌した後、さらにクロロホルム:イソアミルアルコール(関東化学)=24:1 (v/v)の組成からなる等量(v/v)の混合液を加えて攪拌し、遠心分離[12,000 rpm (17,300 × g), 10 分, 4°C, himac CR21, Hitachi]した。上層(水層)を別の 50 mL 容チューブに移し等量(v/v)の TE 飽和フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1 (v/v/v)の組成からなる混合溶液(以下フェノクロ溶液と呼ぶ)を加えて再度よく攪拌した後、遠心分離[12,000 rpm (17,300 × g), 10 分, 4°C]を行った。上層を別の 50 mL 容チューブに移して 0.3 倍量(v/v)の 10 M 塩化リチウム水溶液を加えて混和後、-20°Cで一晩静置した。遠心分離[15,000 rpm (27,000 × g), 30 分, 4°C]後、デカンテーションにて上清を除去し、沈殿に 5 mL の 2 M 塩化リチウム水溶液(2 M LiCl, 50 mM EDTA (pH 8.0))を加えてよく懸濁した後、遠心分離[15,000 rpm (27,000 × g), 15 分, 4°C]した。再度上清の除去、5 mL の 2 M 塩化リチウム水溶液への懸濁、遠心分離を行った後、400 μL の TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)に沈殿を溶かし、2.0 mL 容マイクロチューブ(Quality Scientific Plastics)に移した。等量(v/v)のフェノクロ溶液を加えてよく攪拌し、遠心分離[15,000 rpm (21,800 × g), 10 分, 4°C, himac CF15D2, Hitachi]した後、0.1 倍量(v/v)の 3 M 酢酸ナトリウム水溶液(pH 5.2)および 2.5 倍量(v/v)のエタノール(99.5%, 関東化学)を加えて混合し、遠心分離[15,000 rpm (21,800 × g), 10 分, 4°C]を行った。上清を捨て、80% (v/v)エタノール 700 μL をゆっくり加えて沈殿を洗浄し、遠心分離[15,000 rpm (21,800 × g), 5 分, 4°C]した。沈殿を室温で 20 分静置して乾燥させ、50 μL の 0.1% (v/v) DEPC 処理水に溶かして total RNA 溶液を得た。この内、24.5 μL の溶液に対して 3 μL の DNase buffer, 0.5 μL の RNase Inhibitor (TOYOBO), 2 μL の DNase I (TaKaRa)を加えて混合し、37°Cで 40 分間 DNase 処理を行った。20 μL の sDW を加えた後、50 μL のフェノクロ溶液を加えて再度よく攪拌し、遠心分離[15,000 rpm (21,800 × g), 5 分, 25°C, himac CF15D2, Hitachi]を行い、上層を別の 1.5 mL 容マイクロチューブ(Quality Scientific Plastics)に移した。50 μL のクロロホルム溶液を加えて再度よく攪拌し、遠心分離[15,000 rpm (21,800 × g), 5 分, 25°C]を行い、上層を別の 1.5 mL 容マイクロチューブ(Quality Scientific Plastics)に移した。0.1 倍量(v/v)の 3 M 酢酸ナトリウム水溶液(pH 5.2)および 2.5 倍量(v/v)のエタノール(99.5%, 関東化学)を加えて混合し、遠心分離 [15,000 rpm (21,800 × g), 20 分, 4°C]を行った。上清を捨て、80% (v/v)エタノール 300 μL をゆっくり加えて沈殿を洗浄し、遠心分離[15,000 rpm (21,800 × g), 2 分, 4°C]した。沈殿を室温で 20 分静置して乾燥させ、15 μL の 0.1% (v/v) DEPC 処理水に溶かして RNA 溶液を得た。

(2) cDNA の合成

得られた RNA 溶液について吸光度計(DU 640, BECKMAN, USA)により RNA 濃度を定量した後、RNA 2 μg 分の溶液に対して sDW を加えて合計 10.5 μL にし、70°Cで 5 分間静置後、氷上にて急激に冷却した。この RNA 溶液に対し、4 μL の 5 × first strand buffer, 2 μL の 0.1 M DTT, 1 μL の 2.5 mM dNTP mixture, 0.5 μL の RNase Inhibitor, 1 μL の M-MLV RTase (Invitrogen), 1 μL の Oligo dT primer (Invitrogen)を混合し、37°Cで 90 分逆転写反応を行った。

反応後、90°Cで5分間インキュベートして酵素を失活させ、冷却後に20 µLのsDWを加えてcDNA溶液を得た。また、cDNA溶液はこの後必要に応じて適宜希釈してPCR反応に用いた。

(3) 半定量的 RT-PCR による遺伝子発現量の解析

PCR反応チューブ1本当たり以下の混合溶液を加えた。sDW 35 µL, 10×PCR buffer 5 µL, dNTP mixture 5 µL, cDNA 溶液 2 µL, 50 µM 5'プライマー 1 µL, 50 µM 3'プライマー 1 µL, Advantage cDNA polymerase 1 µL。上記の混合溶液に対し、PCR Thermal Cycler Dice TP600もしくはGene Amp PCR systemを用いてPCR反応を行った。反応条件は、まず94°Cで3分間保った後、[94°C, 30秒→55°C, 30秒→72°C, 2分]のサイクルを繰り返し、72°Cで5分維持した後、4°Cに保った。なお、サイクル数は遺伝子毎に試行錯誤の上、最適化した。1% (w/v) アガロースゲルにて電気泳動(100 V, 定電圧)を行い、FMBIO II (Hitachi)を用いて増幅したDNA断片を画像化した。用いたプライマーは以下の通り。

GA3ox1 の5'プライマー : 5'-CATCCCATTCACCTCCACACTCTCAC-3'

GA3ox1 の3'プライマー : 5'-CGATTCAACGGGACTAACCAGCTTC-3'

AtEXP1 の5'プライマー : 5'-GACGTCACATGTCAATGGTTACGC-3'

AtEXP1 の3'プライマー : 5'-GTTGTAACCTTTGAATGAGAGAGATTGTCCG-3'

GID1a の5'プライマー : 5'-CAGATCAAGAGCAACCTCCTAG-3'

GID1a の3'プライマー : 5'-CCACAGGCAATACATTACCTGTGTG-3'

GID1b の5'プライマー : 5'-GAACCCTCGAGCTAACCAAACCTCTC-3'

GID1b の3'プライマー : 5'-GGAGTAAGAAGCACAGGACTTGACTTGC-3'

GID1c の5'プライマー : 5'-CTGGCACTTCACCAAGTATTACTG-3'

GID1c の3'プライマー : 5'-GCCAATAGTGGCTTGCTCCAAG-3'

Actin2 の5'プライマー : 5'-CGTGTGTGACAATGGTACCGGTATGG-3'

Actin2 の3'プライマー : 5'-CTGTGAACGATTCTGACCTGCCTC-3'

(4) real-time PCR を用いた遺伝子発現量の解析

real-time PCRはThermal Cycler Dice RealTime System TP800 (TaKaRa)を用いた。任意のcDNA溶液の2倍希釈(v/v)液, 4倍希釈(v/v)液, 8倍希釈(v/v)液の希釈系列を調製して検量線作製に用いた。検量線作製用サンプルは2連で、解析サンプルは3連でPCRを行い、1チューブ当たりの反応溶液は、sDW 9.5 µL, SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 12.5 µL, 10 µM 5'プライマー 0.5 µL, 10 µM 3'プライマー 0.5 µL, cDNA テンプレート 2 µLとした。反応条件は、まず95°Cで10秒間保った後、[95°C, 5秒→60°C, 30秒]のサイクルを40回繰り返した。各反応チューブにおけるCt値, 最終的な相対定量値は付属ソフトウェアを用いて算出した。用いたプライマーは以下の通り。

AtEXP1 の5'プライマー : 5'-AACGCACACGCCACATTCTAC-3'

AtEXP1 の3'プライマー : 5'-TTTCCGTATCCACAAGCACCTC-3'

Actin2 の5'プライマー : 5'-CGCCATCCAAGCTGTTCTC-3'

Actin2 の 3'プライマー : 5'-TCACGTCCAGCAAGGTCAAG-3'

第3章 GID1 間の量的差異の検出

3-1 緒言

前章で述べたように、シロイヌナズナの GA 受容体 GID1 に関する機能欠失型二重変異体の中で、機能を失った 2 種の GID1 の組み合わせに依存してしかも限られた器官でのみ異常な形質が現れることを明らかにした。機能的に重複する複数の分子間で、なぜ形質の現れ方に違いが生ずるかについて筆者は強く興味を持ち、その分子メカニズムを解明したいと考えた。単純に言えば、3 種の GID1 間に何らかの違いがあって、それが発端となり上述のような表現形質の違いに結びつくと考えられる。そのような違いとは、二重変異体中にただ 1 種類だけ残っている正常な GID1 の「量」的な違いであるか、あるいは何らかの「質」的な違いであるか、あるいはその両者が関与するはずである。「質」的な違いに関する検討は次章で触れるとして、本章では「量」的な違いがどの程度関与するか探るべく検討を計画した。

「量」的な違いはどのように調べたら良いか。この点については二重変異体の異常な形質が現れた器官に焦点を当て、GA による生長制御に支障をきたすほど GID1 からのシグナル伝達が不活性化を受ける原因を「受容体発現量」の高低で説明することができるのではないかと考えた。このように考えた理由として近い領域で格好の例を 2 つ紹介する。GA 生合成経路の終盤で機能する酵素として GA 20-oxidase が知られている。これをコードする遺伝子はシロイヌナズナでは 5 種類(GA20ox1-5)存在する。時間・空間別にそれらの発現量を調べたところ、花茎では GA20ox1 遺伝子が優先的に発現しており、それゆえ GA 20-oxidase の機能欠損型変異体の中で GA20ox1 に関

するもののみ明瞭な矮性形質が現れる(Rieu *et al.*, 2008)。この例は、花茎において主要な GA 20-oxidase である GA20ox1 が欠損すると、残る 4 種の GA 20-oxidase だけでは酸化酵素の「量」的充足が図れず、その結果として異常形質に結びついたと考えることができる。もう 1 例は前章で紹介した GA の負の制御因子 DELLA の機能欠失型多重変異体に関するもので、通常、花茎で主に発現する GAI および RGA 両遺伝子を順次欠損させた場合、GA シグナルの抑制効果の解除が相加的に認められる。このことから、GID1 について「量」的な制御機構が存在する可能性は十分に期待される(図 1-4)。

そこで、GA→GID1 へのシグナル伝達の不活性化が GID1 量の低下・不足に起因するとの前提を立て、二重変異体における GID1 遺伝子の発現状況を調べた(3-2 項)。加えて、より詳細な発現パターンの把握と、タンパク質レベルでの GID1 の存在状況に関する情報を得るべく、レポーター発現系の構築も計画した(3-3 項)。以下、詳述する。

3-2 *GID1*-2KO における *GID1*・*DELLA* 遺伝子の発現状況の把握

GID1 の機能欠失型二重変異体のうち、異常形質が認められた花茎(*gid1a gid1c*-2KO)および花器官(*gid1a gid1b*-2KO)に着目して、それら特定の器官では 2 種の *GID1* の機能的欠損に起因して、GA からのシグナル伝達が不活性化するよう「量」的な変化が生じたか、すなわち、「*GID1* 遺伝子発現量が減少したか、あるいは、GA シグナルに対して抑制的にはたたく *DELLA* 因子をコードする遺伝子発現量が増加したか」を検証すべく、real-time PCR を用いた絶対定量法により各器官における両遺伝子の発現状況を解析した。最初に、3 種の *GID1* 遺伝子、5 種の *DELLA* 遺伝子、および RNA 量の標準化のために採用した *Actin2* 遺伝子の各転写領域が挿入されたプラスミド溶液を調製し、260 nm の吸収強度を元に各溶液中のプラスミド存在量を決めた。その希釈系列を調製して、real-time PCR にて「各遺伝子の RNA 量 vs 増幅曲線」に関する検量線を作製した。播種後 60 日目の各二重変異体および野生型親株の花茎および花器官から全 RNA を抽出して逆転写後、real-time PCR に供し、検量線との照合によって各遺伝子発現量を定量した。その結果を図 3-1 に示す。

花茎では、野生型個体において *GID1a* 遺伝子の発現量が他を圧倒して高く、*GID1b*・*GID1c* 両遺伝子の発現量は互いに同程度か、あるいは、*GID1c* が *GID1b* よりも若干高い傾向が覗えた。これに対して、*GID1* の機能欠失型二重変異体では、残る 1 種の正常な *GID1* 遺伝子に関して大幅に発現量が低下するケースは確認されなかった。*GID1* 遺伝子の時期別・器官別の発現解析については他の研究者からも、いずれの時期・器官とも *GID1a* 遺伝子が他を圧倒して存在するという報告がある(Griffiths *et al.*, 2006)。*gid1b gid1c*

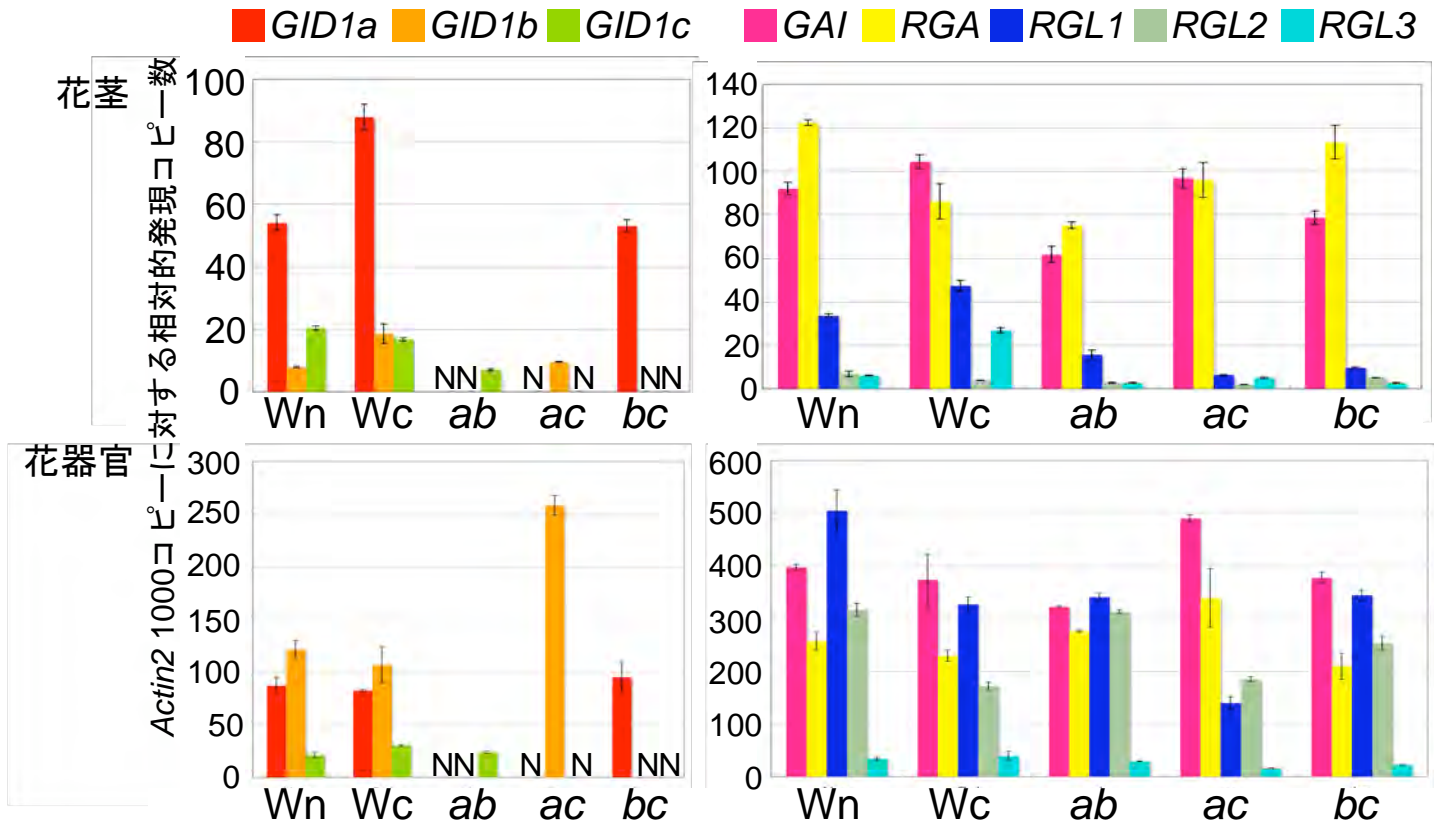


図3-1. *GID1*二重変異体における*GID1*および*DELLA*遺伝子の発現状況

各*GID1*二重変異体および野生型親株の成熟個体、それぞれ3個体ずつ無作為にサンプリングし、花茎(上段)および花器官(下段)より全RNAを抽出し、各遺伝子が挿入された濃度既知のプラスミド溶液を用いて作製した検量線との照合からreal-time PCRにて各*GID1*, *DELLA*遺伝子の発現量を絶対定量した。全ての値は*Actin2*遺伝子1000コピーに対する相対的な遺伝子のコピー数として表す。Nは検出されなかったことを示す。Wn, 野生型Nosesn; Wc, 野生型Columbia; ab, *gid1a-1 gid1b-1* (Nos); ac, *gid1a-2 gid1c-1* (Col); bc, *gid1b-1 gid1c-1* (Nos/Col)。

-2KOで形質が現れなかった原因として、残る *GID1a* 単独で GA からのシグナル伝達に必要な *GID1* 量の充足を図ることが可能だからと考えて矛盾しない。他方、*DELLA* 遺伝子についても同様の検討を行った結果、発現量にある程度の振れ幅を認めたものの、全体として5種のうち *GAI*・*RGA* 両遺伝子がいずれの植物体においても主に発現する傾向に変わりなく、特に二重変異体においてそれら *DELLA* 遺伝子の発現量が総量として増える傾向も認められなかった。

花器官では、野生型個体において *GID1a*・*GID1b* 両遺伝子が同程度に発現しており、*GID1c* は発現量が低い傾向が認められた。そして、二重変異体 *gid1a gid1c-2KO* では *GID1b* 遺伝子の発現量が野生型と比較して倍量以上に増加する傾向が認められたものの、予想した大幅な発現量の低下はいずれの個体においても認められなかった。なお、*GID1b* 遺伝子の発現量増加の傾向に関して、*GID1b* 遺伝子は GA によるフィードバック制御を受けるとする報告(Griffiths *et al.*, 2006)もあることから、形質としては現れないものの *gid1a gid1c-2KO* の花器官において花茎ほどではないものの GA からのシグナル伝達は少し不活性化しているのかもしれない。Griffiths らの報告どおりであれば、形質の現れた *gid1a gid1c-2KO* 花茎においてはより一層の *GID1b* 遺伝子の発現増加が予想できるが、その傾向は認められない。現段階ではそれを議論する手がかりはないが、*GID1b* 遺伝子の転写制御に関して花茎と花器官では違うのかもしれない。元にもどって *DELLA* 遺伝子の発現状況を述べる。全体として *GAI*, *RGA* に加えて *RGL1*, *RGL2* の発現量が高い傾向が野生型・二重変異体いずれの個体においても認められたが、花茎同様にそれらの大幅な増加傾向は認められなかった。

以上の結果から、二重変異体のうちの異常形質が現れた器官において、

GID1 遺伝子および *DELLA* 遺伝子が量的に変動し、それが引き金となって GA からのシグナル伝達が不活性化する状況は認められなかった。すなわち、遺伝子の発現制御の観点から 3 種の *GID1* に関する「量」的差異は生じていないと考えられる結果が一応得られた。ただし、花茎において *GID1b* 遺伝子と *GID1c* 遺伝子の発現量に些少の差しか認められず、「*GID1c* は単独(*gid1a gid1b-2KO*)で花茎の伸長に十分機能するのに対して、*GID1b* は単独(*gid1a gid1c-2KO*)ならば十分には機能できない」という事実をうまく説明できない。また、*gid1a gid1b-2KO* で形質を認めた雄薬は花器官の中の一部であり、雄薬だけを用いての解析はサンプル量の確保が困難な為に計画しづらい。よって、いずれの点においてもより詳細な発現状態に関する情報の入手が議論を進める上で必要不可欠と思われる。

そこで次項において、今回の器官レベルでの発現解析から明らかになった「二重の *GID1* 機能欠損変異を生じても、残る正常な *GID1* 遺伝子の発現量に大きな増減を認めない」点を足がかりとして、二重変異体の花茎や花器官における *GID1* 遺伝子の発現状況はほぼ野生型親株におけるそれらとほぼ同様・同量と考えて、野生型個体を用いてのレポーター遺伝子発現系を構築してより解像度の高い *GID1* 遺伝子の空間的発現状況の把握を計画した。

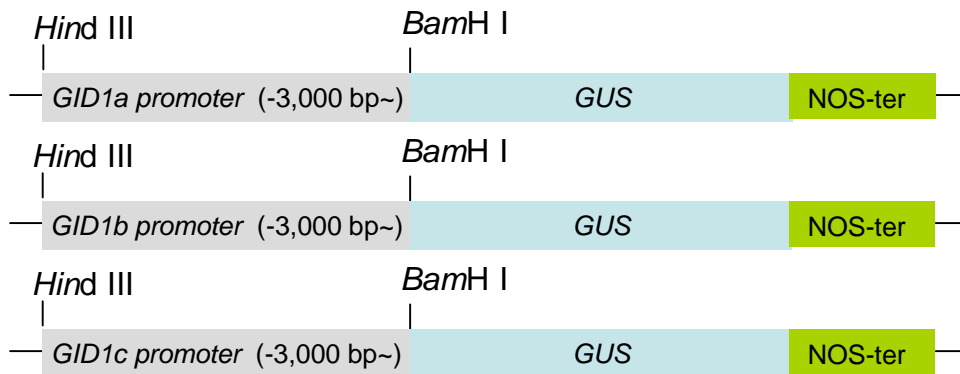
3-3 *GID1-GUS* 融合遺伝子発現個体を用いた *GID1* 分布状況の把握

3-3-1 *pGID1::GID1-GUS* 形質転換体の作出

植物体内におけるある遺伝子の発現状況を調べる目的で、プロモーター領域とレポーター遺伝子を融合させて植物内で発現させるアプローチは、極めて有効な方法である。そこで各 *GID1* 遺伝子の空間的な発現状況を調べるために、この方法を用いることにした。当初は図 3-2 上段に示すとおり、各 *GID1* 遺伝子のプロモーター領域(約 3 kbp)と β -Glucuronidase(*GUS*)遺伝子の融合物(*pGID1::GUS*)を用いての形質転換体作出を計画した。これらはバイナリーベクター *pBI121* の改変によるもので、カナマイシン(Km)耐性による形質転換個体の選別が可能である。このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* GV3010 に導入し、花序浸し法によりシロイヌナズナの形質転換を行った。形質転換処理を行った個体より後代種子(T_1)を得て、Km 添加の選択培地にて耐性個体の選抜を行い、選抜ラインから自家受粉により後代種子(T_2)を得た。この T_2 個体を Km 選択培地に播種し、耐性個体を *GUS* 解析に供した。結果の詳細は示さないが、得られた形質転換体における *GUS* 活性は既に取得済みの「器官ごとの発現量に関する情報」を反映していなかったことから検討を中止した。

改めて実験計画を変更し、翻訳開始コドン(ATG)以降の配列も転写制御に寄与する報告(Rose and Beliakoff, 2000)を加味し、さらには、翻訳産物の安定性を議論できるように図 3-2 下段に示すベクターセットを構築した。すなわち、各 *GID1* 遺伝子プロモーター領域に、イントロンを含むゲノム *GID1* 翻訳領域とその C 末端側に *GUS* 遺伝子を融合して用いた(*pGID1::GID1-GUS*)。上述の手法に従い、各形質転換ライン後代種子を得た。

pGID1::GUS発現用ベクター



pGID1::GID1-GUS発現用ベクター

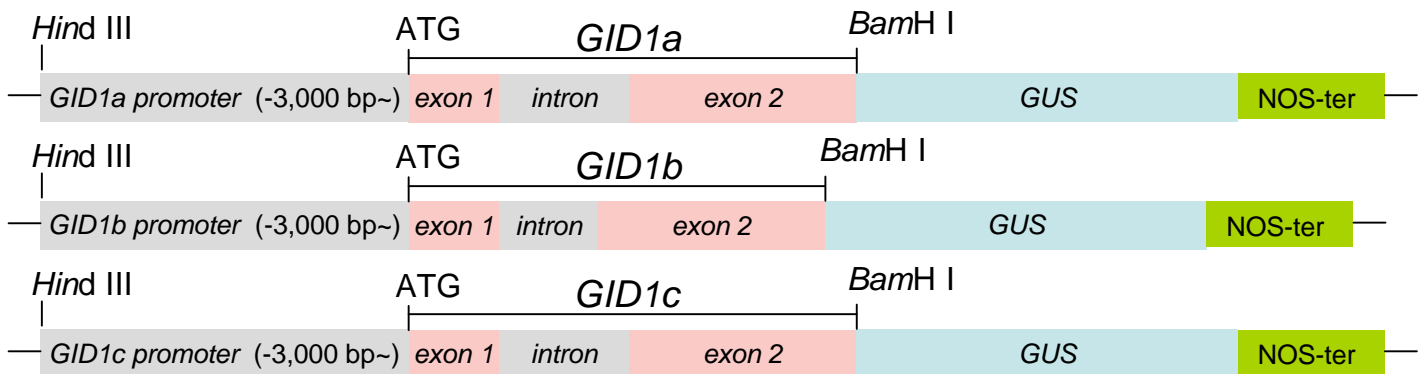


図3-2. GID1分布状況解析用に構築した植物発現用ベクター

レポーター遺伝子としてGUSを発現させる植物発現用ベクターpBI121を改変して構築したGID1分布状況解析用ベクターのGUS遺伝子周辺の模式図。最初は単純にGID1プロモーター領域をGUS遺伝子上流に繋げたものを用いた(上段)。本論文では次に実施したGID1-GUS融合遺伝子を各GID1プロモーター制御下で発現させるベクター(下段)を導入した植物体にて主な解析を行った。GID1 promoter, 各GID1遺伝子プロモーター領域; GUS, β -glucuronidase遺伝子; NOS-ter, ノパリン合成酵素遺伝子の転写終結領域。

各々の *pGID1::GID1-GUS* 発現形質転換体について、注目する花茎(3-3-2 項) および雄薬(3-3-3 項)を中心として、*GID1* 融合型 GUS 酵素の存在状況について、常法に従い発色性特異基質(X-Gluc)を用いて解析した。

3-3-2 *pGID1::GID1-GUS* 発現形質転換体の花茎における GUS 活性の検出

T₂世代において Km 耐性を有し、かつ、GUS タンパク質の存在による着色(以降、GUS 染色と呼ぶ)が認められたものとして、*pGID1a::GID1a-GUS* 発現形質転換体 7 ライン、*pGID1b::GID1b-GUS* 発現形質転換体 2 ライン、*pGID1c::GID1c-GUS* 発現形質転換体 3 ラインを得た。各 2 ラインについて花茎を中心に GUS 染色に供したところ、同じベクターを導入したライン間で染色パターンがほぼ一致したことから、ここでは代表として 1 ラインの結果のみ掲載する。図 3-3 左部分は、播種後 40 日目の各 *pGID1::GID1-GUS* 発現形質転換体に関する花茎、およびリファレンスとして用いた茎頂の GUS 染色状況を示す。花茎は茎頂に近い比較的若い部分と、基部に近い部分の 2 箇所を供した。その結果、茎頂(リファレンス)ではいずれの形質転換体とも染色強度の差は多少あるが、一様に GUS 染色が検出された。これに対して花茎では、*pGID1a::GID1a-GUS* 発現および *pGID1c::GID1c-GUS* 発現の両形質転換体では明瞭に GUS 染色を検出したのに対し、*pGID1b::GID1b-GUS* 発現形質転換体では全く GUS 染色が検出できなかった。すなわち、*GID1b-GUS* 融合遺伝子産物自体は GUS としての酵素活性を有していることから、花茎においては *GID1b-GUS* の存在量が極めて少ないとの判断を下した。

pGID1b::GID1b-GUS 発現形質転換体の花茎における *GID1b-GUS* の極めて少ない存在量の原因として、*GID1b-GUS* 遺伝子の発現量が何らかの要因により、図 3-1 から予想されるような *GID1b* 遺伝子発現量に倣っておらず、

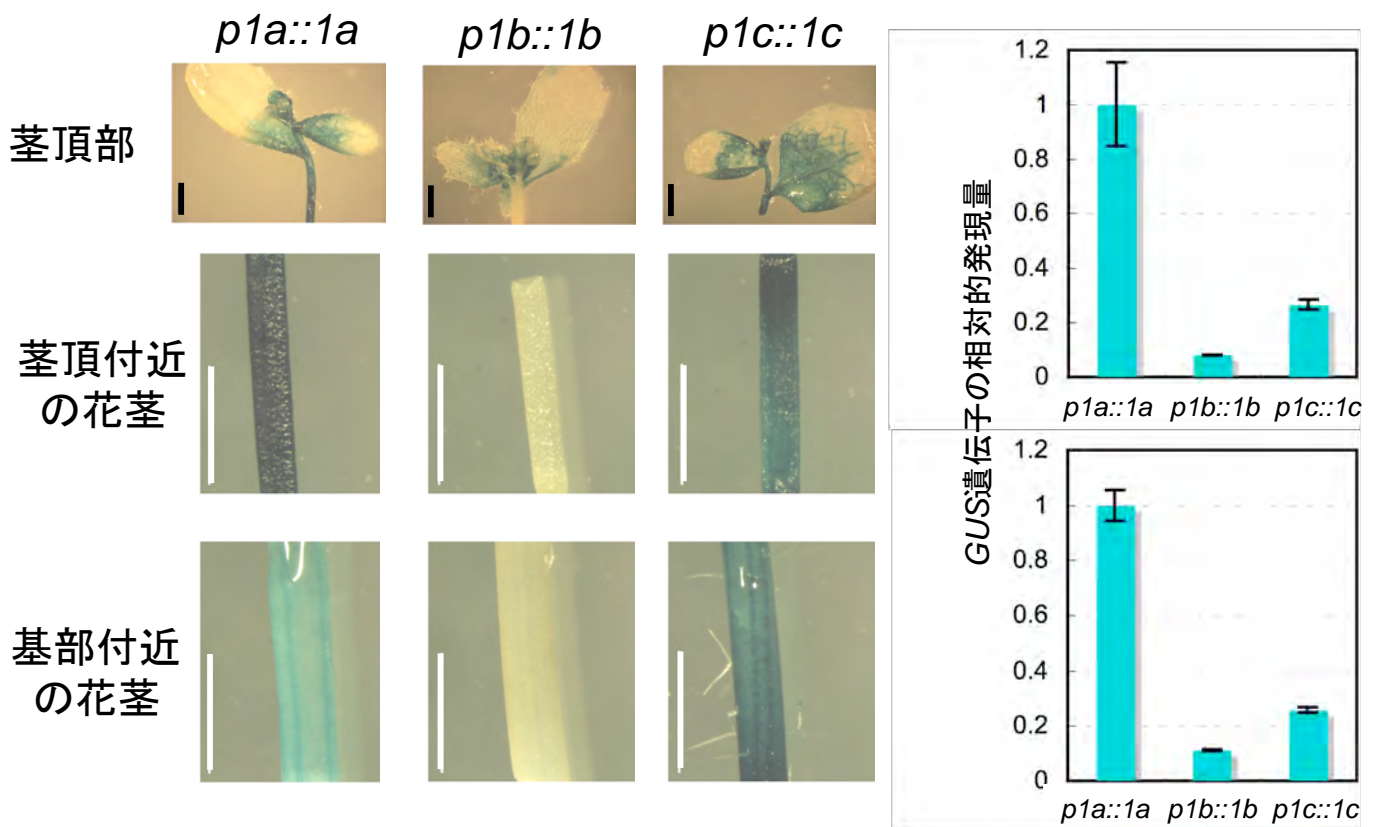


図3-3. 各*pGID1::GID1-GUS*発現個体花茎における*GID1-GUS*発現量と翻訳産物の存在状況

播種後40日目の各*pGID1::GID1-GUS*発現個体の茎頂部(左図上段)、茎頂付近の花茎(中段)、基部付近の花茎(下段)をGUS染色液中に浸して37°C・12時間染色した。バーは全て5 mm。また、染色に供した部分に隣接する花茎部より全RNAを抽出し、*GUS*遺伝子の相対発現量をreal-time PCRで解析した(右図)。上段, 茎頂付近の花茎; 下段, 基部付近の花茎。なお、どちらも*Actin2*遺伝子発現量を基準として各RNA量の標準化を行った。*p1a::1a*, *pGID1a::GID1a-GUS*; *p1b::1b*, *pGID1b::GID1b-GUS*; *p1c::1c*, *pGID1c::GID1c-GUS*。

大幅に減少している可能性が考えられる。そこで、このような可能性を否定すべく、GUS 染色に供した部分に隣接する領域より全 RNA を抽出し、real-time PCR による *GID1-GUS* 遺伝子の定量を計画した。なお、この解析では、各形質転換体間で *GID1-GUS* 遺伝子量を直接比較できるように、*GUS* 遺伝子領域に特異的なプライマーセットを用いた。解析の結果を図 3-3 右部分に示す。これによると、各 *GID1-GUS* 遺伝子の発現状況は、野生型の花茎における各 *GID1* 遺伝子の発現パターン(図 3-1)とほぼ符号するものであり、すなわち、*GID1a-GUS* 遺伝子の発現量が他を圧倒して高く *GID1b-GUS*・*GID1c-GUS* 両遺伝子は *GID1a-GUS* 遺伝子の 10~30%程度であった。にもかかわらず、*pGID1b::GID1b-GUS* 発現形質転換体の花茎における GUS 染色状況は *GID1b-GUS* 遺伝子の発現状況を反映するものではなく、転写と翻訳との間で量的な情報にズレが生じていると判断した。本旨から多少離れるが、逆の場合も見受けられる。すなわち、基部に近い花茎では、遺伝子の発現量として有意に低いはずの *GID1c-GUS* 由来の染色強度が *GID1a-GUS* 由来の染色強度を凌ぐ状況が確認された。このような量的情報のズレの原因として、翻訳産物の安定性の関与が第一に予想される。すなわち、「*GID1b* 遺伝子は花茎において少なからず発現するが、その翻訳産物は何らかの理由により安定して存在できない」と表現できる。そして、この解釈に従えば、*GID1b* しか正常に機能する GA 受容体を持たない *gid1a gid1c-2KO* では、花茎において GA 受容体が量的に欠乏することを意味し、そのことが主な原因となって矮性の形質が生じると考えれば矛盾無く説明することが可能である。これに対して、*GID1b* 遺伝子と同程度にしか発現しない *GID1c* 遺伝子については、その翻訳産物が非常に安定して存在するゆえに *gid1a gid1b-2KO* 花茎での GA 受容体の量的充足が図られ、結果として形質が現れなかったと考えれば

よい。

少し横道に逸れるが、花茎において GUS 染色を認めた *pGID1a::GID1a-GUS* 発現および *pGID1c::GID1c-GUS* 発現の両形質転換体においては、花茎下部で強く縦縞状の着色を認めた。そこで、染色済みの花茎を水平方向に輪切りにして光学顕微鏡で観察した結果を図 3-4 に示す。これによると、維管束の中の篩管組織特異的に染色されている様子が明らかとなった。篩管分化に GA と IAA が関与することは知られているが(Aloni, 1979)、分化後の篩管組織に GID1 が蓄積することにどのような生理的意味があるか現在のところ不明である。ただし *pGID1b::GID1b-GUS* 発現形質転換体においてはこの篩管組織への GID1b-GUS の蓄積も認められなかったことから、*gid1a gid1c-2KO* においても篩管組織周辺で GA 受容体の欠乏により微細な形質が現れている可能性がある。しかし、これ以上の検討は行わず本旨に沿う検討を優先した。関連の検討としてもう 1 点記述する。前章で触れたとおり、*gid1a gid1c-2KO* は矮性形質を有するものの、抽だいの時期は野生型親株と同様であった(図 2-5)。この事は、抽だい時期の *gid1a gid1c-2KO* において、花茎とは事情が異なり GID1b が GA 受容体として量的に充足していると解釈できる。そこでそれを実証すべく、抽だい前の形質転換体を用いて GUS 染色を行い比較した。図 3-5 に播種後 2 週間目の *pGID1::GID1-GUS* 発現形質転換体の GUS 染色結果を示す。これによると、*pGID1b::GID1b-GUS* 形質転換体の GUS 染色強度は他と比較して花茎同様、全体的に弱かったが、抽だいにこれから寄与する茎頂や根端など比較的活発に生長・分裂する領域に限定して明瞭な GUS 染色を認めた。すなわち、GID1b は花茎では安定して蓄積されないが、成長点に限定して蓄積される制御機構の存在が示唆された。前章で触れたように、*gid1a gid1c-2KO* 芽生えに対する GA の投与により、

pGID1a::GID1a-GUS

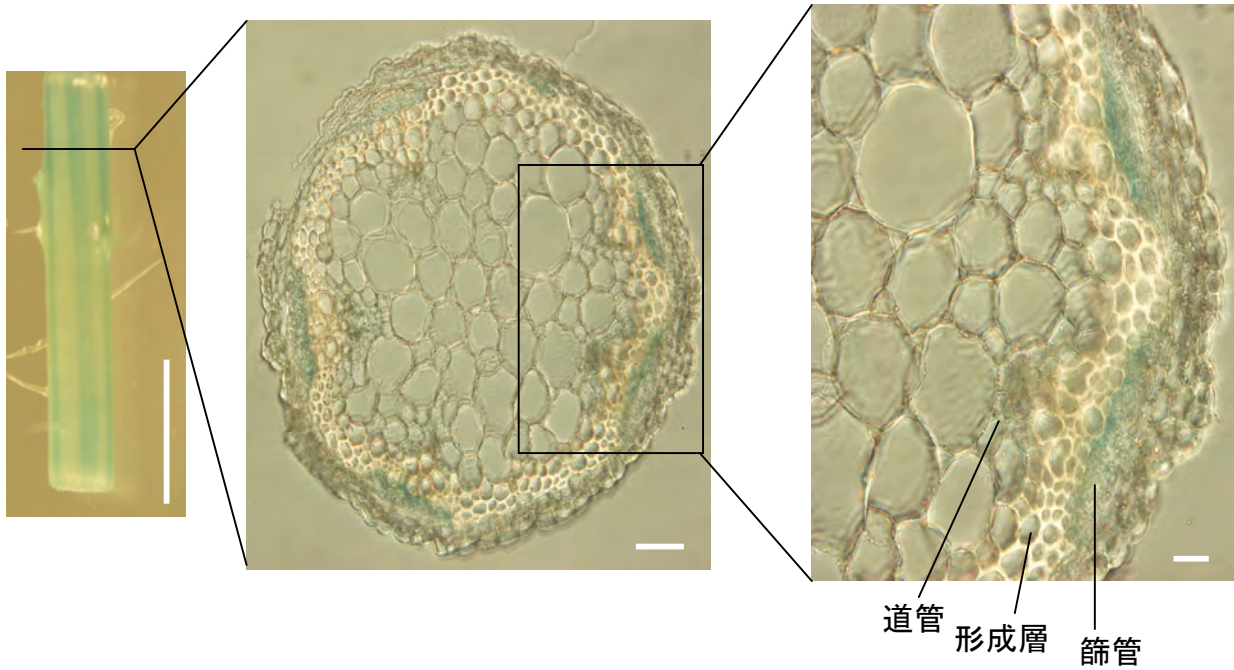


図3-4. 基部付近の花茎におけるGID1a-GUSの組織的局在

*pGID1a::GID1a-GUS*発現個体の基部付近の花茎をGUS染色し、水平方向にスライスして断面を光学顕微鏡観察した。左の花茎全景のバーは1 mm。断面図のバーはともに0.1 mm。

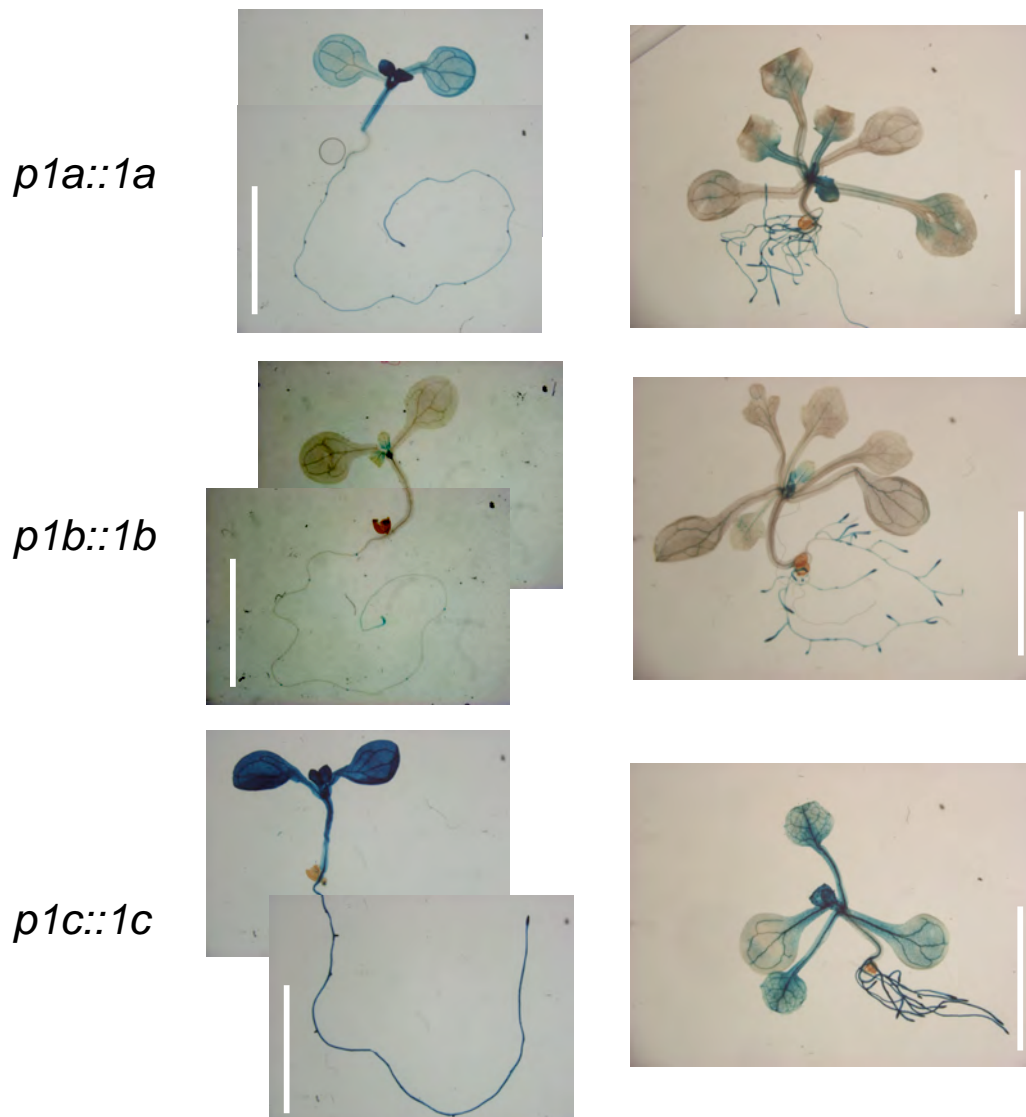


図3-5. 各*pGID1::GID1-GUS*発現個体芽生えにおける
GID1-GUS存在状況

播種後1週間目(左レーン)、2週間目(右レーン)の各*pGID1::GID1-GUS*発現個体をGUS染色液中に浸して37°C・12時間染色を行い、GID1-GUSに由来する染色状況を解析した。バーは全て5 mm。*p1a::1a*, *pGID1a::GID1a-GUS*; *p1b::1b*, *pGID1b::GID1b-GUS*; *p1c::1c*, *pGID1c::GID1c-GUS*。

GA 応答性遺伝子の発現応答がきちんと示されたが(図 2-11)、おそらく芽生えの茎頂などごく一部に局在していた GID1b が機能した結果を捉えたものと解釈している。

以上、*gid1a gid1c-2KO* 花茎に矮性形質が現れる原因として、GID1b の花茎における不安定性が寄与していると考えられる実験的データが得られた。

3-3-3 *pGID1::GID1-GUS* 発現形質転換体の雄薬における GUS 活性の検出

pGID1::GID1-GUS 発現形質転換体の開花直後の花器官を用いて、GUS 染色を行った。図 3-6 に染色結果および *GID1-GUS* 遺伝子の発現状況に関する real time-PCR での定量結果を示す。花茎においては *pGID1b::GID1b-GUS* 形質転換体において GUS 染色はほとんど確認されず、*gid1a gid1c-2KO* の花茎では残存する GID1b が安定的に蓄積されない為に矮性形質が現れると考えられた。一方、*pGID1c::GID1c-GUS* 発現形質転換体の雄薬においては GUS 染色が明瞭に確認された。以上の結果から推測される雄薬の伸長不足が認められた *gid1a gid1b-2KO* の解釈として、上記 *gid1a gid1c-2KO* の花茎における形質の現れ方とは異なる機構に拠ると判断した。ただし、*GID1-GUS* 遺伝子の発現量の比較から、花器官における *GID1c-GUS* 遺伝子は *GID1a-GUS* 遺伝子の発現量を上回っており、図 3-1 で把握した通常発現パターンから多少逸脱する傾向が認められたことから、*pGID1c::GID1c-GUS* 発現形質転換体の花器官では本来存在する GID1c と比べて大幅に GID1c-GUS タンパク質が蓄積される結果、GUS 染色が非常に明瞭に認められた可能性を考慮する必要がある。この *GID1c-GUS* 遺伝子高発現の原因は定かではないが、転写後の *GID1c-GUS* mRNA の安定性に関与するとされる 3'末端側のタンパク質非翻訳領域(3'-UTR)までを本検討では融合して用いなかったことが原因かもし

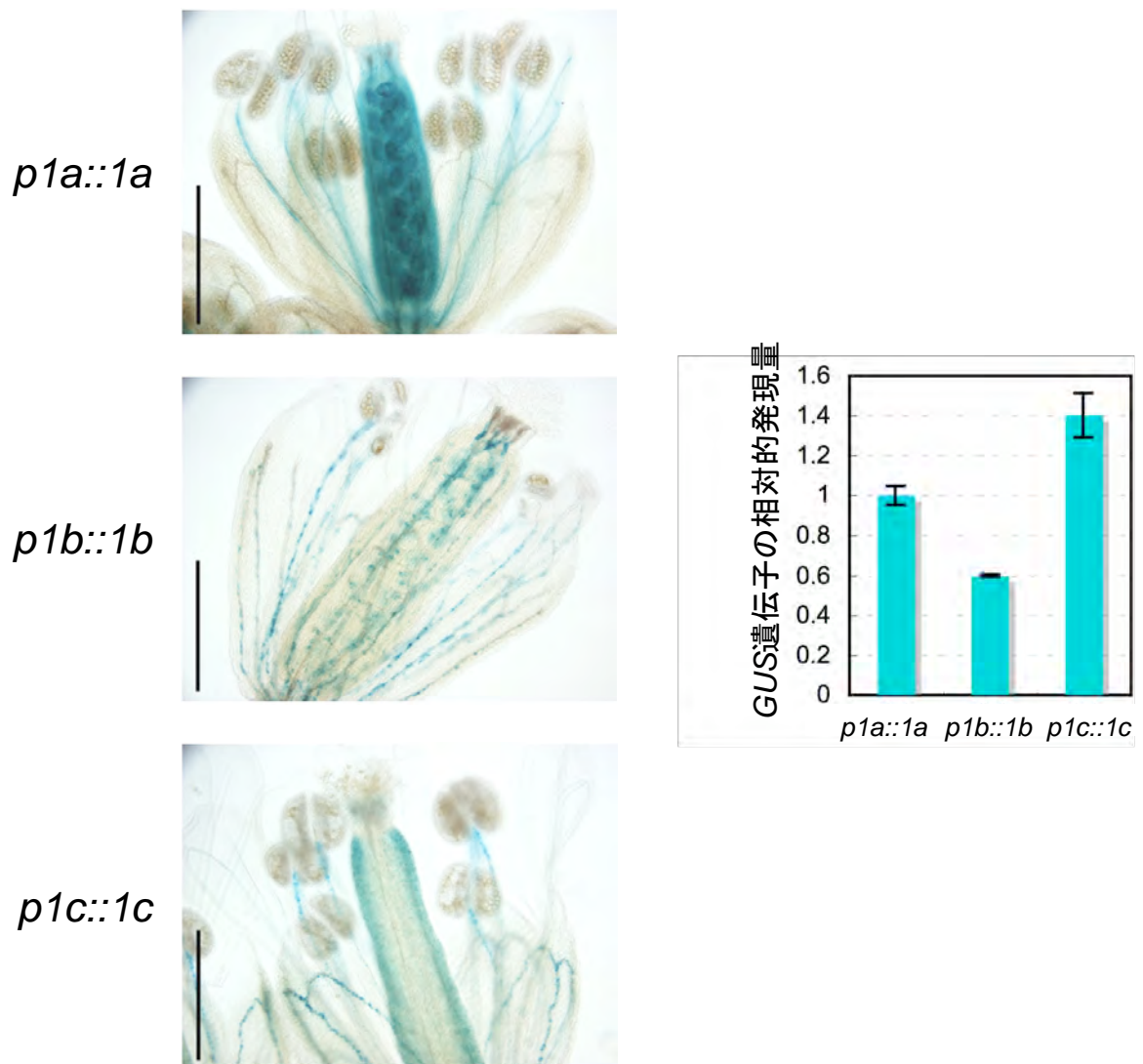


図3-6. 各*pGID1::GID1-GUS*発現個体花器官における*GID1-GUS*発現量と翻訳産物の存在状況

播種後40日目の各*pGID1::GID1-GUS*発現個体の花器官をGUS染色液中にて37°C・12時間染色した(左図)。バーは全て5 mm。また、染色に供したものと同一個体の別の花器官より全RNAを抽出し、*GUS*遺伝子の相対発現量をreal-time PCRで解析した(右図)。なお、*Actin2*遺伝子発現量を基準として各RNA量の標準化を行った。*p1a::1a*, *pGID1a::GID1a-GUS*; *p1b::1b*, *pGID1b::GID1b-GUS*; *p1c::1c*, *pGID1c::GID1c-GUS*。

れない。*GID1* 遺伝子の発現制御について、転写後の調節に関わる可能性は興味深く、今後の解析対象である。

以上をまとめると、少なくとも形質が現れる器官(雄薬)において、翻訳産物が安定して存在できる点で、*gid1a gid1c-2KO* 花茎で生じる GA 受容体の欠乏とは異なる機構により、*gid1a gid1b-2KO* 雄蕊の伸長不足が生ずると考えられる。そこで次章において、*GID1c* に着目して他の *GID1a*・*GID1b* との「質」的差異とは一体何であるか追究することを計画した。

3-5 実験の部

3-5-1 real-time PCR を用いた遺伝子発現量の解析

(1) 絶対定量に用いる検量線作成用の各種ベクターの調製

クローニング用の培地は以下のように調製した。**LB 培地**: Bacto Trypton (DIFCO) 10 g, Bacto Yeast Extract (DIFCO) 5 g, NaCl 5 g, DW 1 L を混合してオートクレーブ滅菌したもの。**LB+Amp(または+Km)固形培地**: 1 L の LB 培地に 15 g の Bacto Agar (DIFCO) を加えてオートクレーブ後、約 60°C に冷ましてから 100 mg/mL のアンピシリン水溶液(または 100 mg/mL のカナマイシン水溶液)を 1 mL 加えて攪拌し、プレートに分注したもの。**LB+Amp(または+Km)液体培地**: オートクレーブした LB 培地 1 L に対し 100 mg/mL のアンピシリン水溶液(または 100 mg/mL のカナマイシン水溶液)を 1 mL 加えたもの。

PCR 反応チューブ 1 本当たり以下の混合溶液を加えた。sDW 35 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, 2.5 mM dNTP mixture (TaKaRa) 5 μ L, cDNA 溶液(2-5-5 で調製したもの) 2 μ L, 50 μ M 5' プライマー 1 μ L, 50 μ M 3' プライマー 1 μ L, Advantage cDNA polymerase (Clontech) 1 μ L。上記の混合溶液に対し、PCR Thermal Cycler Dice TP600 もしくは Gene Amp PCR system を用いて PCR 反応を行った。反応条件は、まず 94°C で 3 分間保った後、[94°C, 30 秒→60°C, 30 秒→72°C, 2 分]のサイクルを 32 回繰り返し、72°C で 5 分維持した後、4°C に保った。なお、用いたプライマーは以下の通り。

AtGID1a の 5' プライマー : 5' -GCGAATTCATGGCTGCGAGCGATGAAGTTAATC-3'

AtGID1a の 3' プライマー : 5' -CCTGCAGTTAACATTCCGCGTTTACAAACGCCG-3'

AtGID1b の 5' プライマー : 5' -GCGAATTCATGGCTGGTGGTAACGAAGTCAAC-3'

AtGID1b の 3' プライマー : 5' -GCCTGCAGCTAAGGAGTAAGAAGCACAGGACTTG-3'

AtGID1c の 5' プライマー :

5' -GCGAATTCATGGCTGGAAGTGAAGAAGTTAATCTTATTGAG-3'

AtGID1c の 3' プライマー : 5' -GCCTGCAGTCATTGGCATTCTGCGTTTACAAATGCAG-3'

GAI の 5' プライマー :

5' -GCGAATTCATGAAGAGAGATCATCATCATCATCATCAAG-3'

GAI の 3' プライマー : 5' -GCCTCGAGCTAATTGGTGGAGAGTTTCCAAGCC-3'

RGA の 5' プライマー : 5' -GCGGATCCGGATGAAGAGAGATCATCACCAATTCCAAGG-3'

RGA の 3' プライマー : 5' -GCCTCGAGTCAGTACGCCGCCGTCG-3'

RGL1 の 5' プライマー : 5' -GCCCCGGGCATGAAGAGAGAGCACAACCACCG-3'

RGL1 の 3' プライマー : 5' -GCGAGCTCTTATTCCACACGATTGATTGATTCGCCACG-3'

RGL2 の 5' プライマー : 5' -GCCCCGGGCATGAAGAGAGGATACGGAGAAACATGG-3'

RGL2 の 3' プライマー : 5' -GCCTCGAGTCAGGCGAGTTTCCACGCC-3'

RGL3 の 5' プライマー : 5' -GCCCCGGGCATGAAACGAAGCCATCAAGAAACGTCTG-3'

RGL3 の 3' プライマー : 5' -GCCTCGAGCTACCGCCGCAACTCCG-3'

Actin2 の 5'プライマー : 5'-CGTGTGTGACAATGGTACCGGTATGG-3'

Actin2 の 3'プライマー : 5'-CTGTGAACGATTCCTGGACCTGCCTC-3'

1% (w/v)アガロースゲルにて PCR 反応液を電気泳動(100 V, 定電圧)し、目的遺伝子の断片を切り出し、1.5 mL 容マイクロチューブに入れ gene clean 処理を行った。Gene clean 処理 : 切り出したゲルに 600 μ L の 6 N ヨウ化ナトリウム(Funakoshi)を加え、ゲルが完全に溶けるまでマイクロチューブを 51°C (Dry Thermo Unit DTU-18、TAITEC) で静置後、5 μ L のガラスミルク(Funakoshi)を加え混合後、常温で 10 分間回転振盪してから遠心分離[12,000 rpm (14,000 \times g), 20 秒, 4°C, himac CF15D2, Hitachi]を行った。上清を除去後、氷冷 80% (v/v) エタノール 300 μ L を加えてピペティングにより沈殿物を懸濁後、再度遠心分離[12,000 rpm (14,000 \times g), 20 秒, 4°C]を行い、上清除去後に氷冷 80% (v/v)エタノールでの洗浄と遠心分離を 2 セット繰り返し、最後のみ 3 分間の遠心分離を行った。上清を可能な限り除去した後、12 μ L の sDW を加え、ボルテックスミキサーでよく混合・溶解した後、65°C (Dry Thermo Unit DTU-18, TAITEC)で 5 分間加温してから、遠心分離[12,000 rpm (14,000 \times g), 1 分, 25°C]を行い上清を回収した。

回収した上清 5 μ L に対して pBluescript SK(-) (TOYOBO)についての制限酵素処理済み断片溶液(予め *EcoR* V で処理後に BAP (TaKaRa)処理による脱リン酸化を行い、1% (w/v)アガロース電気泳動、gene clean 処理を行ったもの) 0.5 μ L を加え、静かに混合後、DNA Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa) I 液を 5.5 μ L 加えて 16°C \cdot 2 時間のライゲーション反応を行った。コンピテントセル(大腸菌 DH5 α もしくは XL10-GOLD)を氷上で溶かし、1.5 mL 容マイクロチューブに 50 μ L 分注し、ライゲーション済み DNA 溶液 5 μ L を加えて静かに混合後、30 分間氷上で静置した。45 秒間 42°C (Dry Thermo Unit DTU-18, TAITEC)でインキュベートし、ただちに氷上に 2 分間静置した。100 mM IPTG 100 μ L, 5% (w/v) X-gal 20 μ L を塗布した LB+Amp 固形培地にコンピテントセル懸濁液を全量塗布し、37°C \cdot 16 時間静置培養した。生じた白色コロニー(Φ1 mm 程度)はようじを用いて、金属キャップ付き試験管に LB+Amp 液体培地 3 mL を入れた中に接種し、37°C \cdot 15 時間振盪培養(200 rpm, 単振動)した。培養液を 1.5 mL 容マイクロチューブに 1 mL 程度入れて遠心分離[8,000 rpm (6,200 \times g), 1 分, 25°C]を行い、上清を除去した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて以下の要領でプラスミドを抽出した。RNaseA 混合済み P1 buffer 250 μ L を加えてボルテックスミキサーにより完全にペレットを懸濁後、P2 buffer 250 μ L を加えて穏やかに転倒・混和した。続いて N3 buffer 350 μ L を加えて穏やかに転倒・混和後、遠心分離[15,000 rpm (21,800 \times g), 10 分, 25°C]した後、上清を QIA prep カラムに入れて遠心分離遠心分離[12,000 rpm (14,000 \times g), 1 分, 25°C]を行い、カラムからの通過液を除去後に PB buffer 500 μ L をカラムに加えて遠心分離[12,000 rpm (14,000 \times g), 1 分, 25°C]した。通過液除去後、PE buffer 750 μ L を加えて再度、遠心分離[12,000 rpm (14,000 \times g), 1 分, 25°C]してから通過液を除去した。空のまま遠心分離[12,000 rpm (14,000 \times g), 1 分, 25°C]して PE buffer 中のエタノールを通過させた後、カ

ラムを別の 1.5 mL 容マイクロチューブ上に設置して sDW 50 μ L を加えて遠心分離[12,000 rpm (14,000 \times g), 1 分, 25°C]することにより通過液を回収した。回収溶液について吸光光度計(DU640, BECKMAN)を用いて DNA の定量を行い、その結果に基づき BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)を用いて自動 DNA シークエンサー(ABI PRISM 310 Genetics Analyzer)により塩基配列の確認を行った。

(2) 植物体からの RNA の抽出と cDNA 作製

操作時は全てポリエチレン製手袋(サニメント手袋, 井内)を着用した。予め液体窒素で冷却したサンプルをオートクレーブ済みの 1.5 mL 容マイクロチューブ内にてホモジェナイザーペッスル、ペッスルモーター(アズワン)を用いて粉末状に破碎した。これに Plant RNA Isolation reagent (Invitrogen)を 0.5 mL 加え、懸濁させて室温で 5 分静置し、遠心分離[15,000 rpm (21,800 \times g), 2 分, 25°C]を行い、上清を新しいオートクレーブ済みの 1.5 mL 容マイクロチューブに回収した。これに 5 M NaCl を 0.1 mL、クロロホルムを 0.3 mL 加えて攪拌し、遠心分離[15,000 rpm (21,800 \times g), 10 分, 4°C]を行い、上層を新しいオートクレーブ済みの 1.5 mL 容マイクロチューブに回収した。これに等量(v/v)のイソプロパノールを加え、攪拌して室温で 10 分静置後、遠心分離[15,000 rpm (21,800 \times g), 10 分, 4°C]をし、溶液を捨てた。チューブに残ったペレットに対して 75% (v/v)エタノールを 1 mL 加えて遠心分離[15,000 rpm (21,800 \times g), 2 分, 4°C]をし、液を捨て、10 分間室温で乾燥後に 100 μ L の sDW に溶解した。これに等量(v/v)のフェノクロ溶液を加えて懸濁後、遠心分離[15,000 rpm (21,800 \times g), 5 分, 25°C]をし、上層を新しいオートクレーブ済みの 1.5 mL 容マイクロチューブに回収した。上層液にクロロホルムを等量(v/v)加えて攪拌し、遠心分離[15,000 rpm (21,800 \times g), 5 分, 25°C]をし、上層を新しいオートクレーブ済みの 1.5 mL 容マイクロチューブに移した後、0.1 倍量(v/v)の 3 M 酢酸ナトリウム水溶液(pH 5.2)と 2.5 倍量(v/v)のエタノールを加えて混合し、室温で 10 分静置した後、遠心分離[15,000 rpm (21,800 \times g), 20 分, 4°C]をし、溶液を捨てた。残ったペレットに対し、75% (v/v)エタノールを 0.5 mL 加えて遠心分離[15,000 rpm (21,800 \times g), 2 分, 4°C]をし、液を捨て、10 分間室温で乾燥後に 24.5 μ L の sDW に溶解した(以上の等量(v/v)のフェノクロ溶液を加えることからの一連の操作をフェノクロ-エタノール沈殿処理と呼ぶ)。

RNA 溶液 24.5 μ L 全量に対して DNase buffer 3 μ L、RNase Inhibitor 0.5 μ L、DNase I (TaKaRa) 2 μ L を加えて 37°C、40 分静置した後、20 μ L の sDW を加えた後、フェノクロ-エタノール沈殿処理を行い、最終的に 11 μ L の sDW に溶解した。得られた RNA 溶液について吸光光度計(DU 640, BECKMAN)により RNA 濃度を定量した後、RNA 1 μ g 分の溶液に対して sDW を加えて合計 10.5 μ L にし、70°Cで 5 分間静置後、氷上にて急激に冷却した。この RNA 溶液に対し 4 μ L の 5 \times first strand buffer, 2 μ L の 0.1 M DTT, 1 μ L の 2.5 mM dNTP mixture, 0.5 μ L の RNase Inhibitor, 1 μ L の M-MLV RTase (Invitrogen), 1 μ L の Oligo dT primer (Invitrogen)を混合し、37°Cで 90 分逆転写反応を行った。反応後、90°Cで 5 分間インキュベートして酵素を失活させ、冷却後に 20 μ L の sDW を加えて cDNA 溶液(25 ng RNA 由来 cDNA

/μL)を得た。

(3) real-time PCR による各種遺伝子発現状況の解析

real-time PCR は Thermal Cycler Dice RealTime System TP800 (TaKaRa)を用いた。相対定量の場合は任意の cDNA 溶液より 10 ngRNA 由来 cDNA /μL, 1 ngRNA 由来 cDNA /μL, 0.1 ngRNA 由来 cDNA /μL の希釈系列を調製して検量線作製に用いた。絶対定量の場合は(1)で作製した各遺伝子毎のベクター溶液より 100 fg/μL, 10 fg/μL, 1 fg/μL の希釈系列を調製して検量線作製に用いた。ただし、*Actin2* 遺伝子の検量線には 1 ng/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL の希釈系列を用いた。解析に供する cDNA はいずれも 5 ngRNA 由来 cDNA /μL の濃度に統一した。検量線作製サンプルは 2 連で、解析サンプルは 3 連で PCR を行い、1 チューブ当たりの反応溶液は、sDW 9.5 μL, SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 12.5 μL, 10 μM 5'プライマー 0.5 μL, 10 μM 3'プライマー 0.5 μL, cDNA テンプレート 2 μL とした。反応条件は、まず 95°C で 10 秒間保った後、[95°C, 5 秒→60°C, 30 秒]のサイクルを 40 回繰り返した。各反応チューブにおける Ct 値、最終的な相対定量値は付属ソフトウェアを用いて算出した。用いたプライマーは以下の通り。

AtGID1a の 5' プライマー : 5'-ATGGCTGCGAGCGATGAA-3'

AtGID1a の 3' プライマー : 5'-GATTGGCGTTTGCAGTGACTTTAC-3'

AtGID1b の 5' プライマー : 5'-TATGGCTGGTGGTAACGAAGTCA-3'

AtGID1b の 3' プライマー : 5'-AGTTGGCGGGAACCTTTACGG-3'

AtGID1c の 5' プライマー : 5'-CGGCTCAAATCTTCGATCTGG-3'

AtGID1c の 3' プライマー : 5'-TTGGCATTTCGAGGGACTTTC-3'

GAI の 5' プライマー : 5'-AGTGACGGCTGTCTCATGTTGG-3'

GAI の 3' プライマー : 5'-TTTGGCTTCGGTCGGAAATCTA-3'

RGA の 5' プライマー : 5'-TGTGCAGAAGCAATCCAGCAG-3'

RGA の 3' プライマー : 5'-GTAGATCCGCCGCGCTAAAG-3'

RGL1 の 5' プライマー : 5'-ACATCTGCGTGGCGAATCAA-3'

RGL1 の 3' プライマー : 5'-ATTGGCCTGACCCTGACGTAATAG-3'

RGL2 の 5' プライマー : 5'-GACCTCCGTCGTTTCGTCTCA-3'

RGL2 の 3' プライマー : 5'-TCGGGTTCAAGATCCGATAAACTC-3'

RGL3 の 5' プライマー : 5'-TCGAGACCCGAACCGAATC-3'

RGL3 の 3' プライマー : 5'-CGCCTTAACCGTCGCTAACA-3'

GUS の 5'プライマー : 5'-GCGCGTTGGCGGTAACAAGAAAGGG-3'

GUS の 3'プライマー : 5'-CCTCCCTGCTGCGGTTTTTCACCG-3'

Actin2 の 5'プライマー : 5'-CGCCATCCAAGCTGTTCTC-3'

Actin2 の 3'プライマー : 5'-TCACGTCCAGCAAGGTCAAG-3'

3-5-2 GUS 解析用形質転換個体の作出

(1) *pGID1::GUS* 導入ベクターの作製

まず各 *GID1* 遺伝子を含むゲノム断片が挿入された 3 種の BAC クローン(*GID1a* 用: F21A20; *GID1b* 用: T12H1; *GID1c* 用: T20O10)を Arabidopsis Biological Resource Center より取り寄せ、BAC クローンを鋳型とした PCR によって必要な DNA 断片を導入した。PCR 反応液は以下の通り。sDW 35 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, 2.5 mM dNTP mixture 5 μ L, BAC クローン溶液 2 μ L, 50 μ M 5'プライマー 1 μ L, 50 μ M 3'プライマー 1 μ L, Advantage cDNA polymerase 1 μ L。反応条件は、まず 94 $^{\circ}$ C で 3 分間保った後、[94 $^{\circ}$ C, 30 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C, 30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 3 分]のサイクルを 25 回繰り返す、72 $^{\circ}$ C で 5 分維持した後、4 $^{\circ}$ C に保った。なお、用いたプライマーと各末端側に付加した制限酵素は以下の通り。

pGID1a::GUS 用 5'プライマー(末端に *Hind* III) :

5'-GCGAAGCTTCGGCGTCTCGCTTCTCAAAG-3'

pGID1a::GUS 用 3'プライマー(末端に *Bam*H I) :

5'-GCGGGATCCTTCTGATAAATCCTTTTTTTTTTTTTTTGTTATTTTAC -3'

pGID1b::GUS 用 5'プライマー(末端に *Hind* III) :

5'-GCGAAGCTTCAACATCGCCACGTTACGATAAG-3'

pGID1b::GUS 用 3'プライマー(末端に *Bam*H I) :

5'-GCGGGATCCAGTCTCCAAAACCCAGCAAAAAGTTATAATC -3'

pGID1c::GUS 用 5'プライマー(末端に *Hind* III) :

5'-GATAAGCTTGAGGGACTTACAAAACATAAAGACCG-3'

pGID1c::GUS 用 3'プライマー(末端に *Bam*H I) :

5'-GCGGGATCCGAAAAAGTTTTTAAAAAGCTTCTTTTTATTACCAATC -3'

1% (w/v)アガロースゲルにて PCR 反応液を電気泳動し、目的遺伝子の断片を切り出し、1.5 mL 容マイクロチューブに入れ gene clean 処理を行い、各 12 μ L の sDW に溶解した。3-5-1 (1)項と同様の手順で pBluescript SK(-)にライゲーション反応を行い、コンピテントセル(大腸菌 DH5 α もしくは XL10-GOLD)に導入した。この後も同様に白色コロニーの培養、プラスミドの抽出を行い、自動 DNA シークエンサーにより塩基配列の確認を行った(調製したプラスミドをそれぞれ pBS-p1a, pBS-p1b, pBS-p1c と命名した)。

植物発現用ベクター pBI121(Clontech) および上記プラスミド (pBS-p1a, pBS-p1b, pBS-p1c)が 1 μ g が溶解した溶液 17 μ L をそれぞれ用意し、10 \times K buffer 2 μ L, 20 U/ μ L *Bam*H I (TaKaRA) 1 μ L を混合し、30 $^{\circ}$ C \cdot 3 時間静置した後、フェノクロ-エタノール沈殿処理を行い、ペレットを 17 μ L の sDW に溶解した。この液に 10 \times M buffer 2 μ L, 20 U/ μ L *Hind* III (TaKaRA) 1 μ L を混合し、37 $^{\circ}$ C \cdot 3 時間静置した後、1% (w/v)アガロースゲルにて PCR 反応液を電気泳動し、目的の DNA 断片を切り出し、1.5 mL 容マイクロチューブに入れ gene clean 処理を行い、各 12 μ L の sDW に溶解した。以上の酵素処理済み pBI121 溶液 1 μ L に対し、各 DNA 断片の溶液 5 μ L および DNA Ligation Kit Ver.2 I 液を 6 μ L 加えて 12 $^{\circ}$ C \cdot 16 時間のライゲーション反応を行った。反応液はフェノクロ-エタノール沈殿処理を行い、ペレットを

12 μL の sDW に溶解した。この溶解液 5 μL に対して大腸菌 *E. coli* DH5 α Electro-Cells (TaKaRa) 18 μL を混合し、エレクトロポレーション法(電気パルス: 1.6 kV)によって大腸菌へベクターを導入した。電気パルスをかけた後すぐに大腸菌を 1 mL の LB 液体培地に懸濁して 37°C・1 時間静置後、全量を LB+Km 固形培地に塗布し、37°C・16 時間静置培養して白色コロニー(Φ1 mm 程度)を得た。コロニーはようじを用いて、金属キャップ付き試験管に LB+Km 液体培地 3 mL を入れた中に接種し、37°C・15 時間振盪培養(200 rpm, 単振動)した。培養液を 1.5 mL 容マイクロチューブに 1 mL 程度入れて遠心分離[8,000 rpm (6,200 \times g), 1 分, 25°C]を行い、上清を除去した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて 3-5-1 (1)項と同様の手順でプラスミドを抽出した(調製したプラスミドをそれぞれ pBI-p1a, pBI-p1b, pBI-p1c と命名した)。

(2) pGID1::GID1-GUS 導入ベクターの作製

(1)で調製した 3 種のベクターに追加で挿入する配列を(1)と同様に BAC クローンより増幅した。PCR 反応液は以下の通り。sDW 35 μL , 10 \times PCR buffer 5 μL , 2.5 mM dNTP mixture 5 μL , BAC クローン溶液 2 μL , 50 μM 5'プライマー 1 μL , 50 μM 3'プライマー 1 μL , Advantage cDNA polymerase 1 μL 。反応条件は、まず 94°Cで 3 分間保った後、[94°C, 30 秒 \rightarrow 60°C, 30 秒 \rightarrow 72°C, 3 分]のサイクルを 25 回繰り返す、72°Cで 5 分維持した後、4°Cに保った。なお、用いたプライマーと各末端側に付加した制限酵素は以下の通り。

pGID1a::GID1a-GUS 用 5'プライマー(末端に *Var91* I) :

5'-TCCACCTCTTGGCGGAATATATATCTTTTTG-3'

pGID1a::GID1a-GUS 用 3'プライマー(末端に *Bam*H I) :

5'-ATGGATCCACATTCCGCGTTTACAAACGC -3'

pGID1b::GID1b-GUS 用 5'プライマー(末端に *Sca* I) :

5'-ATTGTCACGTTCCCTTGCTCTAATTTG -3'

pGID1b::GID1b-GUS 用 3'プライマー(末端に *Bam*H I) :

5'-ATGGATCCAGGAGTAAGAAGCACAGGACTTG -3'

pGID1c::GID1c-GUS 用 5'プライマー(末端に *Spe* I) :

5'-ACACTAGTCGCGTTGGACTTGATGC -3'

pGID1c::GID1c-GUS 用 3'プライマー(末端に *Bam*H I) :

5'-ATGGATCCTTGGCATTCTGCGTTTACAAATGCAG -3'

(1)と同様の手順で pBluescript SK(-)に挿入し、塩基配列の確認を行った(調製したプラスミドをそれぞれ pBS-p1a::1a, pBS-p1b::1b, pBS-p1c::1c と命名した)。 (1)で調製した 3 種のベクター(pBI-p1a, pBI-p1b, pBI-p1c)および上記プラスミド(pBS-p1a::1a, pBS-p1b::1b, pBS-p1c::1c)が 1 μg が溶解した溶液 17 μL をそれぞれ用意し、10 \times K buffer 2 μL , 20 U/ μL *Bam*H I 1 μL を混合し、30°C・3 時間静置した後、フェノクロ-エタノール沈殿処理を行い、ペレットを 17 μL の sDW に溶解した。次に pBI-p1a, pBS-1a::1a に対しては 10 \times K buffer 2 μL , 12 U/ μL *Var91* I (TaKaRa) 1 μL を、pBI-p1b, pBS-p1b::1b に対しては 10 \times H buffer 2 μL , 12

U/μL Sca I (TaKaRa) 1 μL を、pBI-p1c, pBS-p1c::1c に対しては 10 × M buffer 2 μL, 12 U/μL Spe I (TaKaRa) 1 μL を混合し 30°C · 3 時間静置した後、1% (w/v) アガロースゲルにて PCR 反応液を電気泳動し、目的の DNA 断片を切り出し、1.5 mL 容マイクロチューブに入れ gene clean 処理を行い、各 12 μL の sDW に溶解した。それぞれ酵素処理済み pBI-pGID1 溶液 1 μL に対応する挿入 DNA 断片溶液 5 μL および DNA Ligation Kit Ver.2 I 液を 6 μL 加えて 12°C · 16 時間のライゲーション反応を行った。反応液はフェノクロ-エタノール沈殿処理を行い、ペレットを 12 μL の sDW に溶解した。この溶解液 5 μL に対して大腸菌 *E. coli* DH5α Electro-Cells 18 μL を混合し、エレクトロポレーション法(電気パルス: 1.6 kV)によって大腸菌へベクターを導入した。電気パルスをかけた後すぐに大腸菌を 1 mL の LB 培地に懸濁して 37°C · 1 時間静置後、全量を LB+Km 固形培地に塗布し、37°C · 16 時間静置培養して白色コロニー(Φ 1 mm 程度)を得た(作製したベクターをそれぞれ pBI-p1a::1a, pBI-p1b::1b, pBI-p1c::1c と命名した)。

(3) シロイヌナズナへの形質転換

形質転換に用いるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* ecotype:Columbia)は 2-5-1 項と同様の手順で生育させ、播種後 40 日前後の約 30 個体を一つの形質転換に用いた。形質転換作業の 1 週間前に着果した長角果や花器官を全て切除した。

(1) (2)で調製した植物発現用ベクターを以下に示す Triparental mating 法(Bevan, 1984)にてアグロバクテリウムに導入した。pBI-p1a, pBI-p1b, pBI-p1c および pBI-p1a::1a, pBI-p1b::1b, pBI-p1c::1c を導入した大腸菌、および pRK 2013 ベクターを保有する大腸菌をそれぞれ金属キャップ付き試験管に LB+Km 液体培地 3 mL を入れた中に接種し、37°C · 15 時間振盪培養(200 rpm, 単振動)した。また、アグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens* GV3010)は金属キャップ付き試験管にアグロバクテリウム用液体培地(20 μM MgSO₄, 100 μg/mL rifampicin (sigma), 40 μg/mL gentamicin (sigma)を含む LB 液体培地) 3 mL を入れた中に接種し、30°C · 48 時間振盪培養(200 rpm, 単振動)した。それぞれの培養液を 2.0 mL 容マイクロチューブに移して遠心分離[8,000 rpm (6,200 × g), 2 分, 25°C, himac CF15D2, Hitachi]を行ってペレットを回収した後、1 mL のオートクレーブ済み 10 mM MgSO₄に懸濁し、遠心分離[8,000 rpm (6,200 × g), 2 分, 25°C]を行い、上清を捨てた。再度 1 mL の 10 mM MgSO₄に懸濁し、遠心分離[8,000 rpm (6,200 × g), 2 分, 25°C]を行い、大部分の上清を捨て、残りの少量の上清にペレットを再懸濁した。薬剤を全く含まない LB 固形培地を用意して 30 μL のアグロバクテリウム懸濁液を滴下し、同一位置に 30 μL の植物発現用ベクターを保有する大腸菌懸濁液、30 μL の pRK 2013 ベクターを保有する大腸菌懸濁液の順に滴下してよく乾燥させた後、30°C · 24 時間静置培養した。培養した菌のコロニーを 2 mL の 10 mM MgSO₄に懸濁して回収し(10⁰)、更に 10 mM MgSO₄を用いて 1 万倍希釈(v/v)区(10⁻⁴)、10 万倍希釈(v/v)区(10⁻⁵)を調製し、10⁻⁴、10⁻⁵区をそれぞれ 100 μL ずつ 100 μg/mL カナマイシン入りアグロバクテリウム用固形培地に塗布し、30°C · 3 日間静置培養し、コロニーを得た。

シロイヌナズナには以下に示す花序浸し法(Clough and Bent, 1998)にて植物発現用ベクターを導入した。1形質転換当たり500 mL坂口フラスコに200 mLの100 µg/mLカナマイシン入りアグロバクテリウム用液体培地を入れたものを4本用意し、調製した植物発現用ベクター導入済みアグロバクテリウムを接種し、30°C・3日間振盪培養(200 rpm, 単振動)した。培養液は500 mL容遠沈管(Hitachi)に移して遠心分離[4,000 rpm (3,000×g), 10分, 25°C; himac CR 21, Hitachi]を行い、回収したペレットは約250 mLの形質転換用懸濁液(100 gスクロース, 0.5 g MESをDWに溶解し、1 M KOHでpH 5.7に調整して1 Lにメスアップし、オートクレーブ後に1 mg/mLベンジルアデニン(WAKO)エタノール溶液を10 µL, Tween 80を0.5 mL加えてよく攪拌したものに懸濁した。シロイヌナズナは開花した花を切除した後、地上部をアグロバクテリウム懸濁液に浸して2分静置し、その後は高湿度(80-90%)条件下で2日間置いた後、通常条件下で生育させ、後代種子(T₁世代)を得た。T₁世代種子は2-5-1項と同様の手順で殺菌して1/2MS固形Km選択培地に播種し、12日間後の生育状況からカナマイシン耐性個体を判定した。耐性個体はロックファイバーミニポット(日東紡)に移植し、1000倍希釈(v/v)ハイポネックス(ハイポネックス)溶液にて育成し、自家受粉にて後代種子(T₂世代)を得た。

3-5-3 GUS染色による解析

GUS染色液の組成は100 mMリン酸緩衝液(pH 6.9), 10 mM EDTA, 2 mM K₃[Fe(CN)₆], 2 mM K₄[Fe(CN)₆], 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.5 mg/mL X-Glucであり、使用直前に調製した。染色に供する形質転換個体のサンプルを氷冷90% (v/v)アセトン中で20分静置した後、アセトンを除き100 mMリン酸緩衝液(pH 6.9)で洗浄し、GUS染色液に浸した。バルブ付き耐圧デシケーターに入れて真空ポンプにて減圧状態(約-0.08 MPa)にし、20分静置した後、37°C・12時間静置し染色反応を行った。染色終了後染色液を除き、70% (v/v)エタノールを加えた後、エタノールを除いて脱色液(エタノール:酢酸=6:1 (v/v))を加えて、室温・2時間脱色をし、液を除いて再度70% (v/v)エタノールを加えた。染色サンプルは直接、あるいはスライドガラス上にて抱水クロール溶液(8 g抱水クロール(ナカライテスク), 1 mLグリセロール(関東化学), 2 mL DWを混合したもの)を滴下してカバーガラスをかけた状態にて光学顕微鏡(SZX12, Olympus; BX60, Olympus)で観察した。

花茎の断面を観察する場合には、脱色反応が終わった染色サンプルを約40°Cまで冷却した5% (w/v)低融点アガロース(ナカライテスク)中に抱埋して室温で更に冷却して固化させ、サンプル抱埋部分を切り出した。マイクロスライサー(DTK-1000, DOSAKA EM)にて50 µm厚にスライスしてスライドガラス上に乗せ、DWを滴下してカバーガラスをかけ、光学顕微鏡で観察した。

第 4 章 GID1 間の質的差異の検出

4-1 緒言

前章において「量」的観点からアプローチした結果、機能欠失型二重変異体 *gid1a gid1c-2KO* 花茎の矮性形質は GID1b の欠乏が主たる要因であると結論した。一方、残る *gid1a gid1b-2KO* 雄蘗の伸長不良については GID1c の欠乏によって生じたとは考えにくく、GID1c は雄蘗中で安定して存在するものの GA 受容体としての機能を十分に果たせない可能性が浮上した。これはすなわち、少なくとも他の器官では問題とならない程度に機能する GID1c が、雄蘗においてのみ何らかの理由で機能的に不活性化状態となり、「質」的に他の受容体 2 種の代替えと成り得ていないと解釈できる。そこで、本章では始めにその「質」的な違いを探るため、系の構築を行い、得られた情報を元に *gid1a gid1b-2KO* 雄蘗の伸長不良発生過程を説明できるか検討することを計画した。

受容体 GID1 にとって、GA からのシグナルを次に伝える一連の分子反応における本質は DELLA 因子の捕捉にある(図 1-14)。すなわち、常時 GA シグナルを伝えないようにと抑制的に機能する DELLA 因子は GA と結合した受容体と核内で「GID1-GA-DELLA 三者複合体」を形成することによりその抑制機能を失うと考えられている(Ariizumi *et al.*, 2008)。筆者はこの点を重視し、3 種の GID1 間に「質」的な違いが生ずるとすれば、それは DELLA 因子との三者複合体形成時点に必ず関わりがあるはずで、「GID1-GA 複合体とそこに存在する標的因子 DELLA との間の親和性」に起因するのではないかと予想した。つまり、2 分子間の親和性がある一定のレベルより低ければ、GID1-GA 複合体は DELLA 因子を十分に捕捉し続けることができず、それに

よって DELLA 因子が GA シグナル抑制機能を失わず、結果、シグナルが正常に伝わらないのでは、との見通しを立てた。

当初は、大腸菌発現系を用いて GID1・DELLA 因子のリコンビナントタンパク質を調製し、一方を標識するなどして生化学的な両者間の結合に関する親和性の評価を予定したが、15通りもある GID1-DELLA 間の組み合わせすべてにおいて一様の条件で検討することが難しく断念した。次に、前任者により既に構築されていた酵母内で 2 分子間の相互作用を評価する系に焦点を当てた。この系では、全 15 通りの組み合わせにおいて、GA 依存的な GID1 と DELLA 因子との相互作用が確認されており(図 1-18)、それ自体に GID1 間に潜むであろう「質」的差異を連想させるものは何ら見あたらなかった (Nakajima *et al.*, 2006)。しかし、酵母を用いる系は、対象の 2 分子が相互作用した状態と離れた状態が分離されることなく常に混在しており、相互作用した状態がある程度存在すれば両状態の存在比には大きな影響を受けることなく陽性判定が下される。このため、GID1-DELLA 間の親和性に多少の振幅があるとしても、陽性判定の結果には反映されにくく、両者間の親和性の大小の評価には新たな系の構築が必要と考えた。

そこで本章では、市販のシステムを利用して上記 2 分子間相互作用を酵母を用いて評価する系をベースとして、さらに 1 分子追加して、計 3 分子間での競合的相互作用解析系の構築を計画して実施した。以下、詳述する。

4-2 特定の GID1-DELLA 間で生ずる優先的相互作用の検出

4-2-1 GID1 二種と DELLA 一種で構成された酵母 three-hybrid 系の構築

系構築には two-hybrid 系プラスミドを一部転用し、市販の three-hybrid 系を用いた。図 4-1 にプラスミドの概要を示す。酵母は AH109・Y187 の両株を用い、プラスミドは pBridge および pGADT7(Clontech)を用いた。各プラスミドには酵母の転写因子 GAL4 の DNA 結合領域(DNA binding domain; BD 領域)および転写活性化領域(*trans-activation domain*; AD 領域)をコードする遺伝子配列が含まれ、BD 領域をコードする部分に *GID1* 遺伝子を、AD 領域をコードする部分に *DELLA* 遺伝子を融合した。以下、各翻訳産物を^{BD}GID1(あるいは bait タンパク質)、^{AD}DELLA(pre^y タンパク質)と称す。

ベクター pGBKT7 には栄養要求選択マーカーとして L-トリプトファン生合成関連酵素遺伝子(*TRP1*)が含まれる。他方、pBridge には L-ロイシン生合成関連酵素遺伝子(*LEU2*)が含まれる。また、bait タンパク質と prey タンパク質の相互作用により GAL4 制御下で β -ガラクトシダーゼ酵素遺伝子(*LacZ*)、分泌型 α -ガラクトシダーゼ酵素遺伝子(*MEL1*)がレポーター遺伝子として発現誘導される。加えて、アデニン合成関連酵素遺伝子(*ADE2*)と L-ヒスチジン生合成関連酵素遺伝子(*HIS3*)も発現誘導されることからアデニンと L-ヒスチジンは栄養要求マーカーとして利用可能となっている。これに対して、形質転換用の酵母は上記 *TRP1*, *LEU2*, *ADE2*, *HIS3* の各遺伝子欠損型のため、

「bait・prey 両因子発現用プラスミド(pBridge および pGADT7)が両方とも挿入され、かつ、bait-prey 間の相互作用が生ずる場合」に限り L-トリプトファン、L-ロイシン、アデニン、L-ヒスチジンの各要素を抜いた選択培地上で生育が可能となる。ベクター pBridge 内には bait タンパク質発現用サイト以外にもう 1 つ、L-メチオニン非存在時に下流遺伝子の発現が賦活化される *P_{MET}*

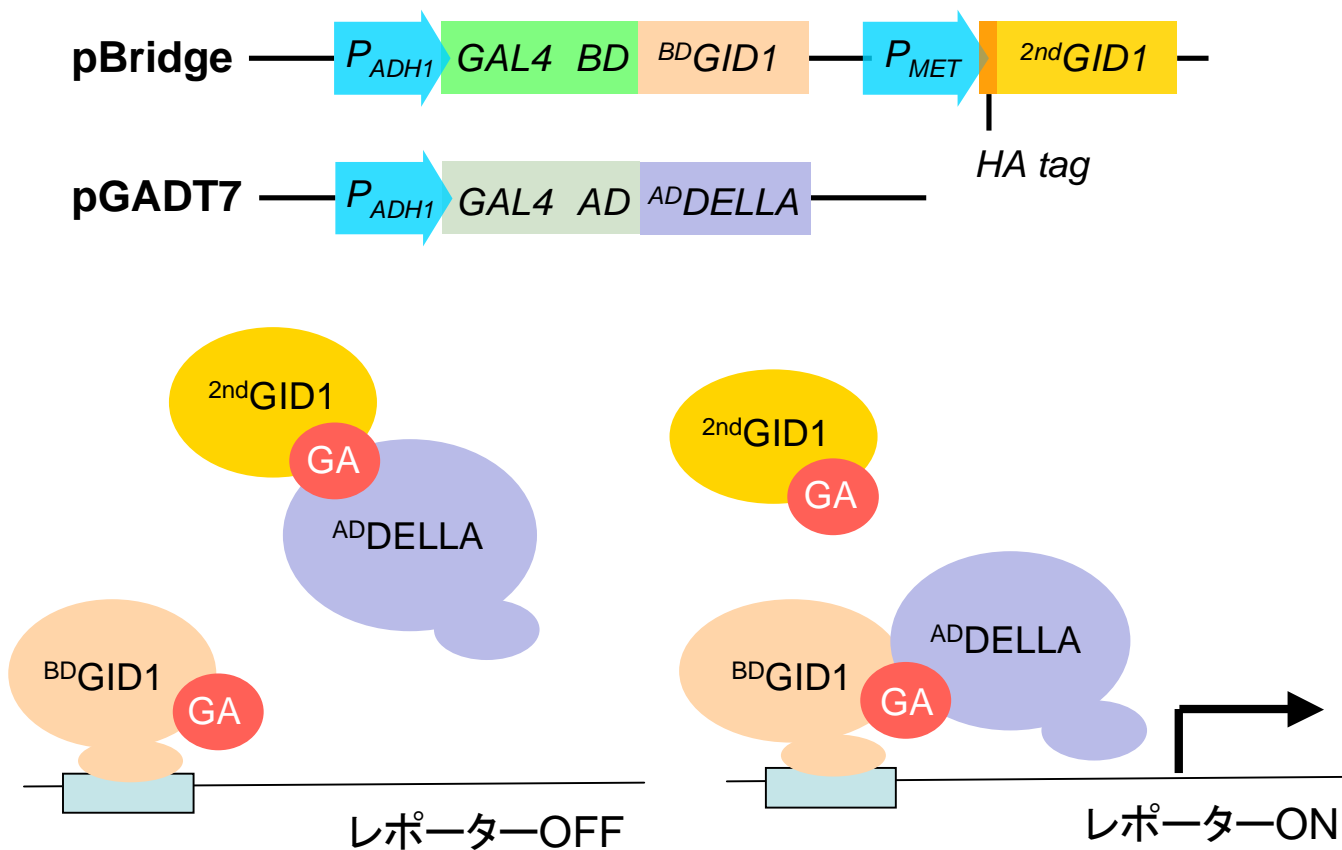


図4-1. 構築した酵母 three-hybrid系の模式図

上図：酵母 three-hybrid系を構築するにあたり、作製したベクターのマルチクロニングサイト周辺の模式図。 P_{ADH1} , $ADH1$ プロモーター; $GAL4 BD$, $GAL4$ DNA結合領域; $GAL4 AD$, $GAL4$ 転写活性化領域; P_{MET} , MET プロモーター。

下図：本酵母 three-hybrid系におけるレポーター遺伝子の発現有無によって、酵母核内にて想定される3者のタンパク質間の相互作用状態。左図, $2^{nd}GID1-ADDELLA$ 間の親和性が $BDGID1-ADDELLA$ 間の親和性よりも高いかほぼ同等の場合; 右図, $2^{nd}GID1-ADDELLA$ 間の親和性が $BDGID1-ADDELLA$ 間の親和性よりも低い場合。

プロモーターによる制御が可能なタンパク質発現用サイトが存在する。そこで、このサイトに^{BD}GID1とは異なるもう1種別のGID1(^{2nd}GID1)をコードする遺伝子を導入した。各ベクター構築後、プラスミド pGADT7 は AH109 株(a型)に、そしてプラスミド pBridge は Y187 株(α 型)に各々導入し、mating によって両ベクターを持つ解析用酵母を調製した。

Three-hybrid 系を用いた解析の前段階として、対照となる系により酵母の生育状況を調べ、系としての妥当性の確認と本系実施に向けて必要な条件設定を行った。初めに、偽陽性の除外に有効とされる 3-アミノトリアゾール (3-AT)の添加について適正濃度を決めた。これは、栄養要求マーカー遺伝子の一つ *HIS3* 遺伝子の発現が、転写因子 GAL4 以外の他の因子によってもわずかに活性化される恐れがあり、その抑制が必要な場合があるために検討した。具体的には、本来 three-hybrid 系で用いる選択培地にアデニンおよび $\underline{\text{L}}$ -ヒスチジンを添加して分子間相互作用が生じなくても生育が可能な環境に設定し、3-AT を添加して酵母の生育自体に影響が出るかを調べた。その結果、図 4-2 に示すとおりいずれの組み合わせに関しても 100 mM の 3-AT 添加に影響されず酵母の生育を認めたことから、最大 100 mM までの添加は許されることを確認した。

次に、three-hybrid 系実施用の選択培地に 100 mM の 3-AT と 10 μ M の GA₄ を添加して、ベクター pBridge 内の ^{2nd}GID1 用サイトが空状態の対照プラスミドを挿入した酵母を用いてその生育状況を調べた。これら対照酵母では ^{BD}GID1 と ^{AD}DELLA のみが存在するため、既に検討済みの two-hybrid 系と同じ状況が再現されると期待した。結果を図 4-3 に示す。これによると、全ての組み合わせで GA 添加時には酵母の生育が確認されたことから three-hybrid 対照系においてきちんと two-hybrid 系が再現されることが確認

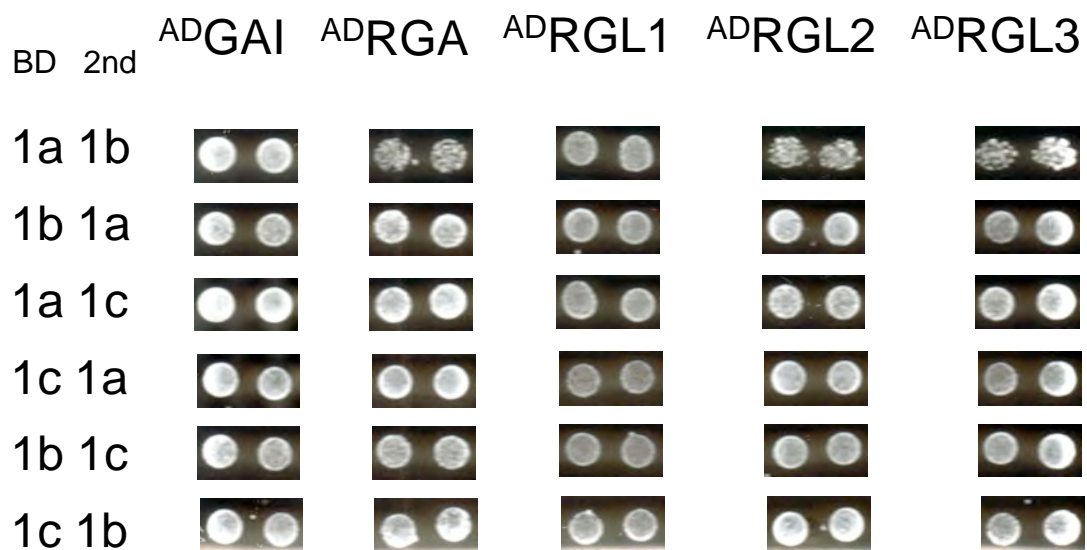


図4-2. three-hybrid系酵母の非選択培地における生育状況

L-ロイシン、L-トリプトファン、ウラシル、L-メチオニンのみを抜き、終濃度100 mMの3-ATを添加した非選択固形培地にて各^{BD}GID1, ^{AD}DELLA, ^{2nd}GID1を発現する形質転換酵母をドットして30°C・7日間培養した。1a, GID1a; 1b, GID1b; 1c, GID1c。

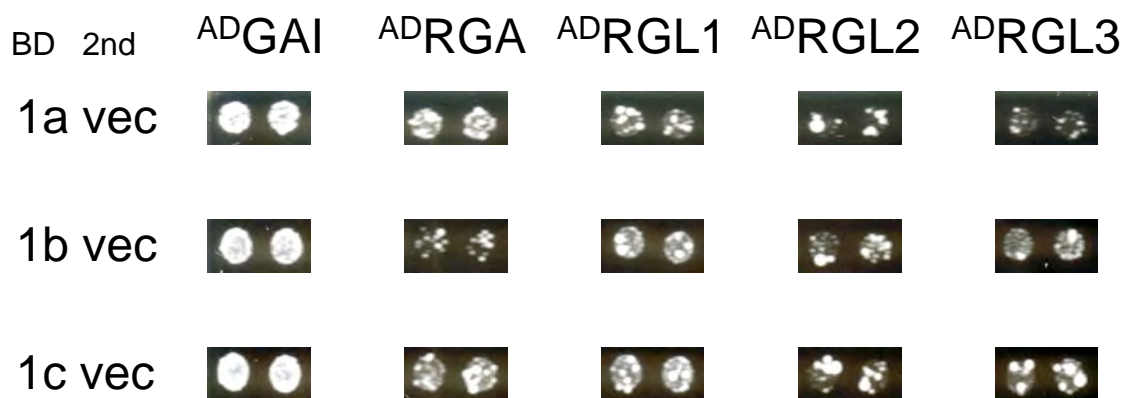


図4-3. ^{2nd}GID1非存在下におけるthree-hybrid系酵母の生育状況

$\underline{\underline{L}}$ -ロイシン、 $\underline{\underline{L}}$ -トリプトファン、ウラシル、 $\underline{\underline{L}}$ -メチオニン、アデニン、 $\underline{\underline{L}}$ -ヒスチジンを抜き、終濃度 100 m Mの 3-AT, 10 μ M の GA₄ を添加した選択固形培地にて各^{BD}GID1, ^{AD}DELLAのみを発現する形質転換酵母をそれぞれドットし 30°C・7 日間培養した。
 1a, GID1a; 1b, GID1b; 1c, GID1c; vec, vector のみ。

され、さらに、^{BD}GID1-^{AD}DELLA 間で相互作用が生ずる状況に対してやはり 100 mM の 3-AT 添加が影響を与えないことを確認した。これにより本試験に必要な準備は整ったと判断した。

4-2-2 酵母の生育状況を指標とする GID1-DELLA 間の親和性評価

Three-hybrid 系における 3 因子の挙動とそれに伴う酵母の生育状況として、以下の予想が可能である。すなわち、図 4-1 に示すとおり ^{2nd}GID1-^{AD}DELLA 間の相互作用に関する親和性が ^{BD}GID1-^{AD}DELLA 間の相互作用に関する親和性よりも高いかほぼ同等の場合、競合関係にある ^{BD}GID1 と ^{2nd}GID1 のうち、^{2nd}GID1 が ^{BD}GID1 から ^{AD}DELLA を奪う頻度が高くなり、そのために ^{BD}GID1-^{AD}DELLA 間の相互作用の成立頻度が低下し、選択培地上で酵母の生育は困難になると予想される。逆に、^{2nd}GID1-^{AD}DELLA 間の相互作用に関する親和性が ^{BD}GID1-^{AD}DELLA 間の相互作用に関する親和性に比べてかなり低く、^{BD}GID1 が優先的に ^{AD}DELLA と相互作用し続けられる場合には、選択培地上で十分に生育が認められると予想される。

そこで、ベクター pBridge 内の ^{2nd}GID1 用サイトにも ^{BD}GID1 とは異なる別の GID1 をコードする遺伝子を挿入し、形質転換した酵母群を用いて three-hybrid 系を実施した。なお、疑陽性判定のため 3-AT は最高 100 mM の添加条件を設定し、比較対照区として 10 mM, 0 mM 添加区も試験に供した。結果について図 4-4 に示す。一瞥して生育する組み合わせと生育しない組み合わせが混在する様子が窺えた。これはすなわち、^{BD}GID1-^{2nd}GID1-^{AD}DELLA の三者間の特定の組み合わせでは、優先的にどちらかの GID1 が ^{AD}DELLA と相互作用することを意味する。より丹念に結果を辿ると興味深い点が浮かび上がった。例えば、^{BD}GID1a-^{2nd}GID1c-^{AD}RGL2 の組み合わせにおいて酵母の

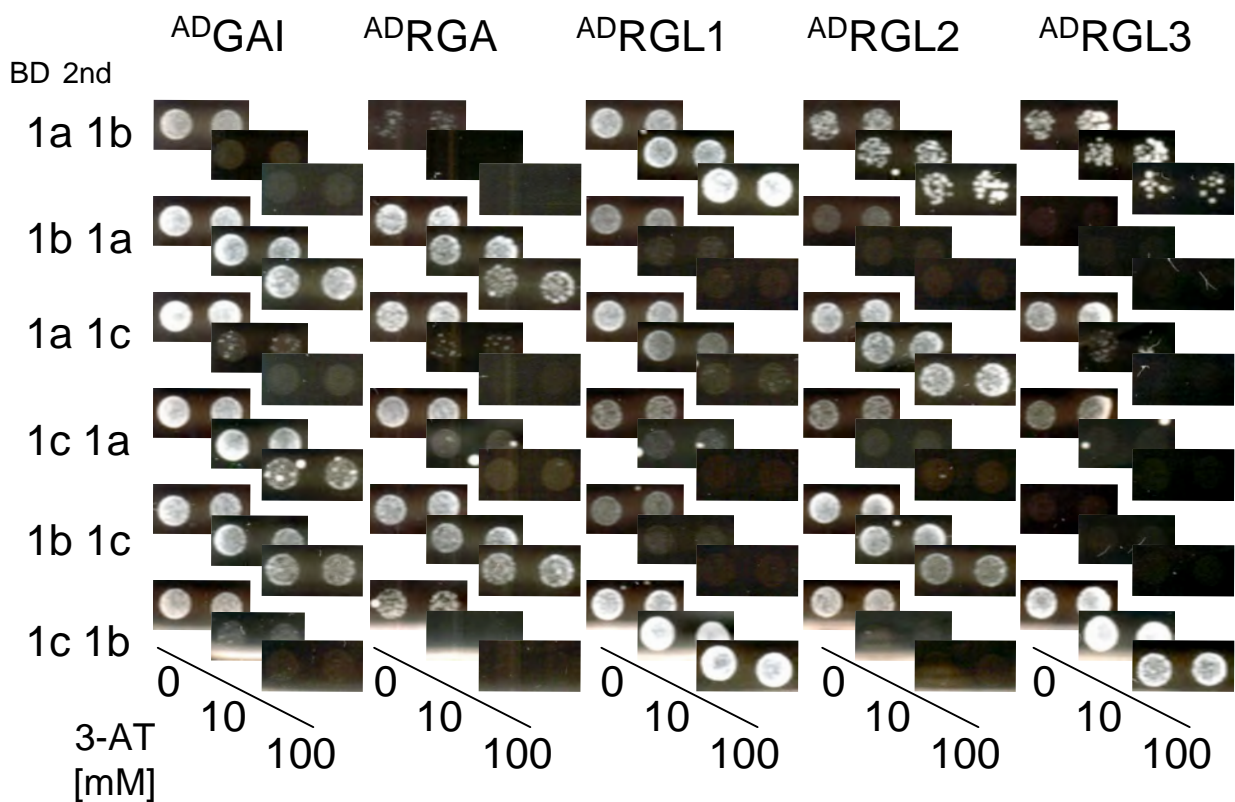


図4-4. GID1二種、DELLA一種を発現させる three-hybrid系酵母の生育状況

$\underline{\underline{L}}$ -ロイシン、 $\underline{\underline{L}}$ -トリプトファン、ウラシル、 $\underline{\underline{L}}$ -メチオニン、アデニン、 $\underline{\underline{L}}$ -ヒスチジンを抜き、終濃度 0, 10, 100 mM の 3-AT, 10 μ M の GA₄ を添加した選択固形培地にて各 ^{BD}GID1, ^{2nd}GID1, ^{AD}DELLA を発現する形質転換酵母をそれぞれドットし 30°C・7 日間培養した。1a, GID1a; 1b, GID1b; 1c, GID1c。

生育は認められたが、対応する $^{BD}GID1c$ - $^{2nd}GID1a$ - $^{AD}RGL2$ の組み合わせでは生育を確認できなかった。つまり、 $GID1a$, $GID1c$, $RGL2$ の三者が混在する場合、 $RGL2$ は選択的に $GID1a$ と相互作用を示す傾向が高く、 $RGL2$ との相互作用に関する親和性として $GID1a > GID1c$ と考えて矛盾しない結果を得た。このように、 $^{BD}GID1x$ - $^{2nd}GID1y$ - $^{AD}DELLA$ および $^{BD}GID1y$ - $^{2nd}GID1x$ - $^{AD}DELLA$ の 2 つの組み合わせのうち片方のみで生育を認め、もう片方では生育が認められない例が大半を占める結果となったが、 $^{BD}GID1a$ - $^{2nd}GID1c$ - ^{AD}RGA および $^{BD}GID1c$ - $^{2nd}GID1a$ - ^{AD}RGA のように双方とも生育しないケースも 3 組ほど確認された。これは、2 種の $GID1$ が $DELLA$ に対してほぼ同程度の親和性を示した結果と解釈している。

なお、前項末尾の対照実験において述べたとおり、ベクター-pBridge 内の $^{2nd}GID1$ 用サイトが空状態の場合、すなわち、 $^{2nd}GID1$ が系内に存在しなければ全ての組み合わせにおいて酵母の生育が認められたことから、何からの事情により three-hybrid 系酵母内の $^{2nd}GID1$ 量が少量しか存在しない場合も競合の程度にかかわらず生育する可能性が懸念されたため、生育を認めた酵母における $^{2nd}GID1$ のウェスタン検出を試みた。全ての $^{2nd}GID1$ は共通して HA タグ配列を有しており、抗タグ抗体を用いて検出した結果を図 4-5 に示す。予想される分子サイズ(約 40 kDa)に明瞭にバンドが検出されたことから決して $^{2nd}GID1$ が少ないために生育したのではなく、結果の解釈を変更する必要は無いと判断した。

Three-hybrid 系の実施により得た情報を元に、 $GID1$ - $DELLA$ 間の相互作用に関する親和性を図 4-6 にまとめた。言うまでもなく酵母を用いて得られた現象に由来するものであるため、そのまま植物に適用可能かという点については今後の検証が必要である。しかし、全ての $GID1/DELLA$ の組み合わせ

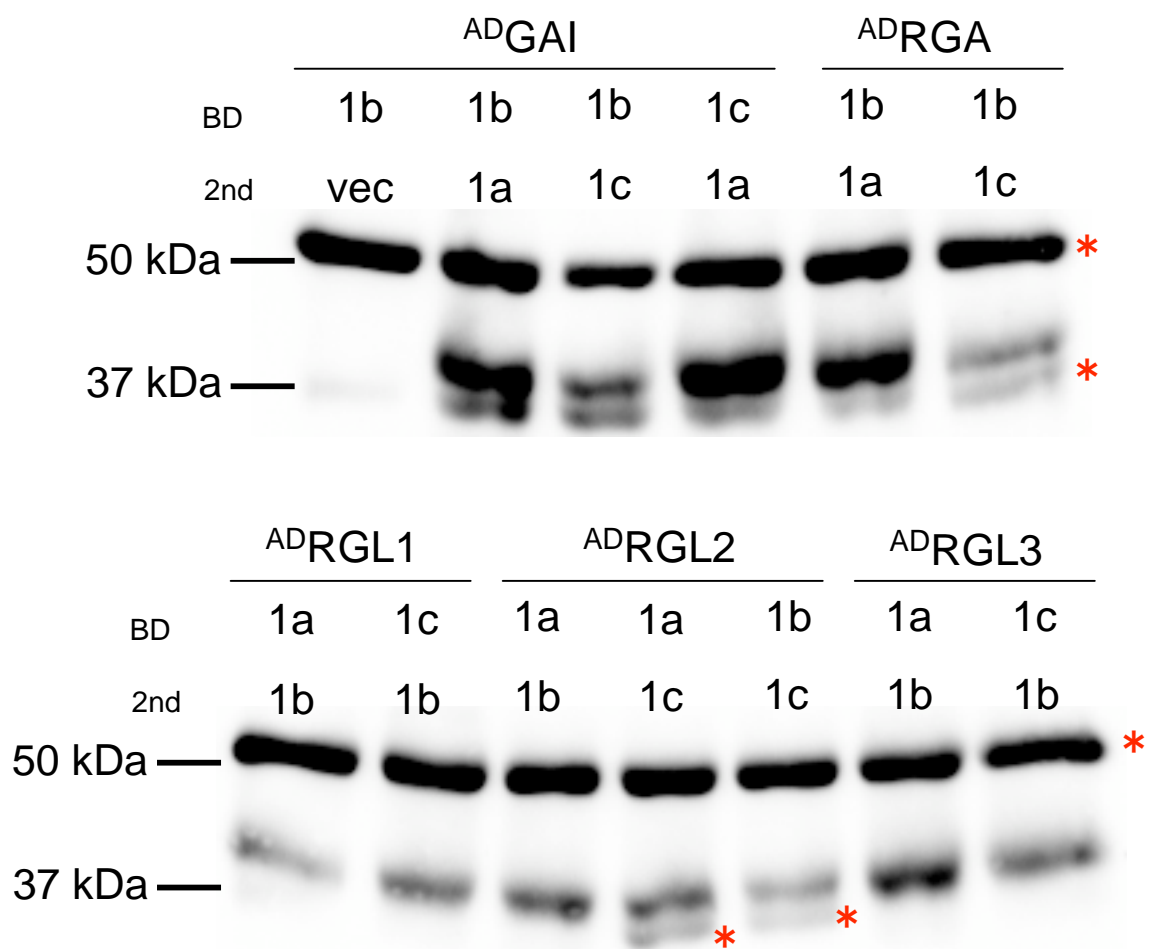


図4-5. three-hybrid系酵母における^{2nd}GID1の存在状況の把握

図4-4にて100 mM 3-AT, 10 μ M GA₄存在下の選択培地で生育が認められた形質添加酵母、および陰性対照区として^{2nd}GID1が空状態(vec)の酵母を非選択培地にて30°C・3日間培養後タンパク質を抽出し、抗HAタグ抗体を用いてウエスタン解析による^{2nd}GID1(約40 kDa)の検出を試みた。なお、アスタリスクは非特異的に検出されたバンドを示す。1a, GID1a; 1b, GID1b; 1c, GID1c; vec, vectorのみ。

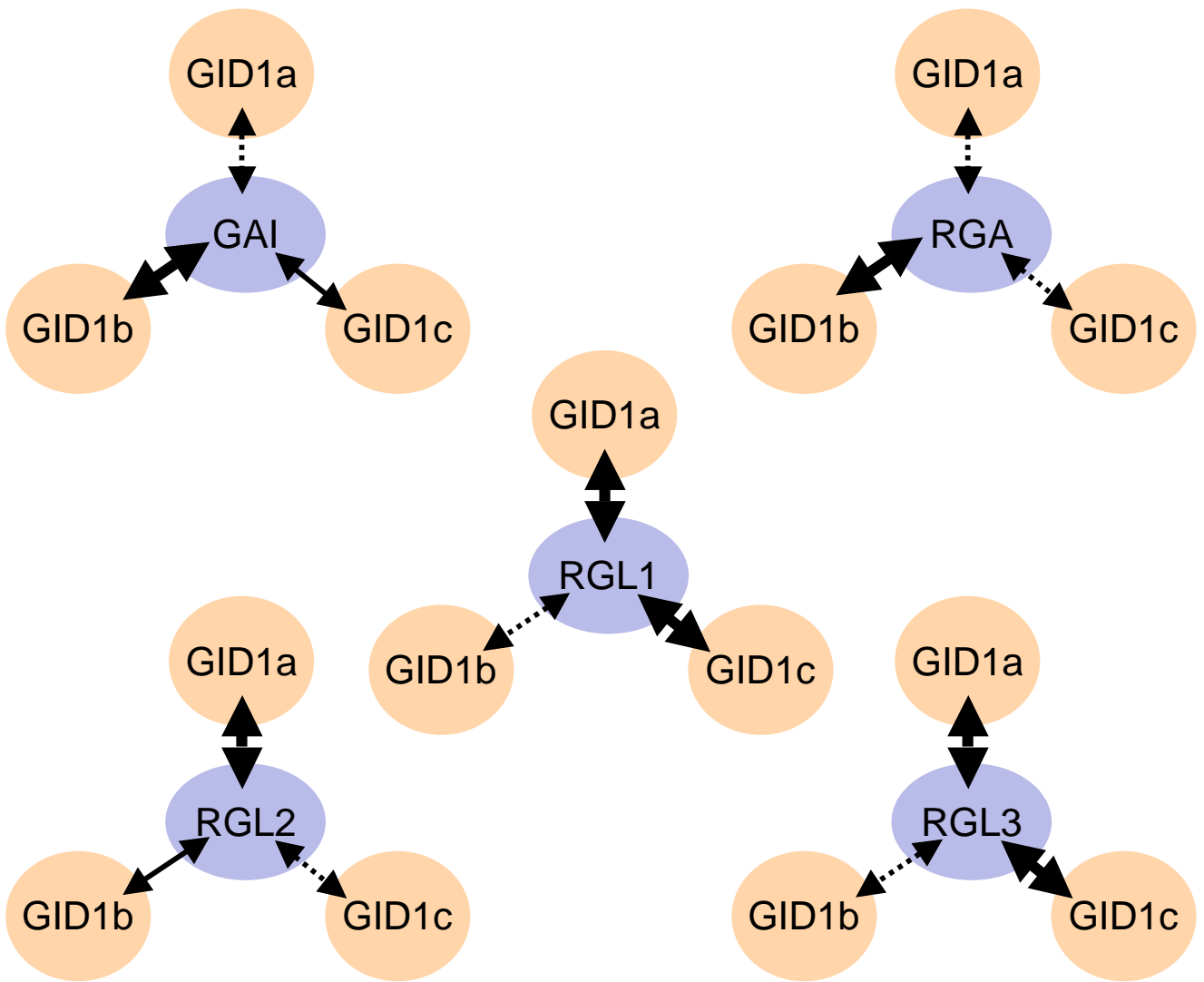


図4-6. GID1-DELLA間の親和性の差異

図4-4の結果により見出されたそれぞれのDELLAに対する3種のGID1の相互作用における親和性の強弱を模式図で示した。各矢印の太さは親和性の強さを示す。

において共通タグ配列を付し、かつ、^{BD}GID1・^{2nd}GID1 の取り得る全組み合わせを試験して導き出した傾向であることから、タグの有無に依存しない結果が得られたものと期待する。そこで、本章の目的に戻り、「*gid1a gid1b*-2KO 雄薬の伸長不良発生機構について GID1-DELLA 間の相互作用に関する親和性の観点から説明できるか」という点について以下に考察する。

すでに前章における検討結果から、GID1 の存在量は転写レベルだけでなく翻訳レベルにおけるタンパク質としての安定性まで加味することが重要と判明しているが、雄薬では花茎で認められたような特定の GID1 が存在できない状況は確認されておらず(図 3-6)、遺伝子の発現レベルを反映してほぼ GID1 存在量が決まると考えられる。雄薬のみを解析対象として量的に確保することが困難であるため、花器官に由来する遺伝子発現の結果(図 3-1)を代用するが、それによると GID1a と GID1b がほぼ同量存在し、GID1c は最も少ないと推察される。また、DELLA についても器官ごとに 5 種の中で主要なものが異なり、DELLA に関する loss-of-function 多重変異体の解析から、花器官においてはやはり RGL2 や RGA が機能的に高い貢献度を呈し、次いで RGL1 が続くとする報告もある(Tyler *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2004)。そこで、*gid1a gid1b*-2KO 雄薬では、GA 受容体として GID1c のみが存在し、RGL2 や RGA が主要 DELLA 因子として存在すると考え、各々の組み合わせ(GID1c-RGL2 や GID1c-RGA)に関する親和性について図 4-6 の情報を照合したところ、GID1c-RGL2 間は GID1a-RGL2 間や GID1b-RGL2 間よりも親和性が低いと考えられ、GID1c-RGA 間についても GID1a-RGA 間や GID1b-RGA 間を圧倒するほどの高親和性を示さないことが判明した。すなわち、それら主要 DELLA 因子に対する GID1c の親和性の弱さが原因となって GID1c のみでは雄薬中の DELLA を捕捉し続けることが難しく、DELLA が

遊離して GA シグナルの抑制機能を復活・維持しやすいために、*gid1a*
gid1b-2KO 雄薬ではシグナル伝達の不活性化が生じる、と考えれば一応は矛盾なく説明することが可能と判明した。

4-3 総合考察

本博士論文研究は、イネ GA 受容体のオルソログとしてシロイヌナズナから同定された 3 種の GID1 タンパク質に関して、「(i) いずれもがシロイヌナズナの GA 受容体として機能するか」「(ii) シロイヌナズナにおける GA 受容体はこの 3 種だけか」「(iii) なぜ 3 種も存在するか」という観点に焦点を当て解析を展開した。すなわち、第 2 章では GID1 に関する機能欠失型の多重変異体を作成してその表現形質を解析した。これにより、3 種のうち 1 種だけ機能的に変異を生じた植物体は何ら形質を現さず、互いの機能の重複を示唆した。しかし意外なことに、3 種のうち 2 種の機能を欠失させた場合、依然として形質が現れないもの(*gid1b gid1c-2KO*)と、形質が現れるが植物全体には及ばず一部の器官に限られるもの(*gid1a gid1c-2KO* 花茎・*gid1a gid1b-2KO* 雄薬)に分かれることが判明した。このような形質の現れ方の違いは、恐らく 3 種の GID1 間に生ずる何らかの違いに由来するはずだが、それは分布状況かもしれず、あるいは、機能的に完全に重複しておらずある器官は特定の GID1 だけが役目を果たすことに拠るのかもしれないと考え、分子レベルでの解明を計画した。ところで、3 種いずれもが機能を欠失した場合は、イネ GA 受容体欠損変異体と同様に極矮性となり GA に対する感受性を失ったことから、この段階で 3 種の GID1 がシロイヌナズナにおいては支配的に機能する GA 受容体と結論づけ、冒頭(i)・(ii)の問いに対しては答えを与えた。

さて、GID1 間の違いを明らかにするため、「量(第 3 章)」と「質(第 4 章)」の 2 つの観点に分けてアプローチを展開した。「量」的な差異として、まずは各転写産物量が一樣でなく、特に形質が現れた器官においてその量が乏しい可能性を real-time PCR により検証した。しかし、いずれの GID1 遺伝子と

も転写産物の欠乏を予想させるほどの低い発現レベルには無く、この方向に解明の対象とする差異は大きくないと判断した。そこで、翻訳産物量が転写産物量を反映しない可能性について検討するため、各 GID1 タンパク質の存在状況の把握を計画した。植物内の GID1 タンパク質は極めて微量で、特異抗体を用いての免疫組織化学的解析では情報を得ることができないと判断し、GID1 遺伝子とレポーター遺伝子の融合物を GID1 プロモーター制御下で発現させる形質転換体の作出を実施した。その結果、GID1b-GUS タンパク質はその転写産物の量に相関せず、花茎においてほとんど存在しないことが明らかとなり、*gid1a gid1c-2KO* 花茎における矮性形質は GID1b の欠乏に起因するとの結論を導き出した。他方、GID1c-GUS は雄薬で存在しないとの確証は得られず、観察した現象に対して「量」的観点に基づいて説明することは難しいと判断した。そこで、これに代わる「質」的観点に基づいた現象への説明を行うために、GA 依存的に生ずる GID1-DELLA 間の複合体形成過程に焦点を当て、「両者の結合に関する親和性が組み合わせにより様々に異なり、その中のいくつか特定の組み合わせでは十分な親和性が示されず継続的な GID1-DELLA 複合体の形成が難しいために GA シグナルがうまく伝わらなくなる」との仮説を立ててこれを酵母 three-hybrid 系を用いて検証した。2 種の GID1 が 1 種の DELLA を競合的に奪い合う本系では比較的明瞭にその傾向の把握ができた。そして、雄薬を含む花器官で主要な DELLA 因子に対して、GID1c は高い親和性を示すことができない性状を有していたことから、*gid1a gid1b-2KO* 雄薬の形質表現のメカニズムとして上記仮説が当てはまることを確認した。これにより、「量」・「質」2 つの制御方式の兼ね合いにより、ある GID1 二重変異体のある特定の器官においてのみ GA シグナルが不活性化するという現象の本質に一応辿り着けたのではないかと考えている。

もちろん、今後様々な角度から上記仮説への検証が必要であり、それに向けて起点となり得る興味深い結果も入手した。例えば「量」的な観点では、*pGID1c::GID1c-GUS*発現形質転換体の花器官において *GID1c-GUS* 遺伝子発現量は通常花器官において認められる *GID1c* 遺伝子の発現量をはるかに超えて高発現状態であった。転写産物の安定性に 3'末端側非翻訳領域(3'-UTR)が関わっていたかもしれず、3'-UTR までを含めた発現個体の再作出が必要かもしれない。また、花茎において *GID1b-GUS* が不安定で極微量しか検出されないことについても、野生型親株や矮化した *gid1a gid1c-2KO* の花茎において高感度かつ定量的な検出法を用いて *GID1b* の量が少ないことを確認できれば、仮説の妥当性を示すことが可能となる。他方、「質」的な観点では、*GID1-DELLA* 間の相互作用に関する親和性を実際に生化学的に評価して、数値として論じることが極めて有効と予想される。しかし、リコンビナントタンパク質の可溶化率、機能の維持率などを揃えて調製することは容易ではなく、信頼できる実験結果を得るにはまだ障害が多い。ところで、最近になって *GA* 受容体の結晶構造が報告された(Shimada *et al.*, 2008; Murase *et al.*, 2008)。これにより、*GID1* と *DELLA* 因子とが *GA* 依存的に親和性を示す機構がアミノ酸残基のレベルで解明され、なぜ組み合わせによって両者間の親和性が変化するかという点について解明が進展するものと予想する。冒頭で述べた「(iii) なぜ3種も存在するか」については、うち1種しか存在しない状況ではシロイヌナズナにとって正常な生育をもたらさないことまでは実験的に示すことができた。1種しか存在しないイネと比べて、生存戦略上分子種を増やすのが得策であったと考えられるが、その生理的意義についてきちんと記述できるよう、*GA* シグナル伝達機構の全容解明に向けて本研究を基盤としてさらに展開していきたい。

4-4 実験の部

4-4-1 酵母 three-hybrid 系に用いるベクターの構築

3-5-1(1)項と同様の手順でシロイヌナズナ由来の cDNA をテンプレートとして PCR を行った後、1% (w/v)アガロースゲルにて PCR 反応液を電気泳動(100 V, 定電圧)し、目的遺伝子の断片を切り出して 1.5 mL 容マイクロチューブに入れ gene clean 処理を行った。pBluescript SK(-) (TOYOBO)にライゲーション反応により挿入して大腸菌 DH5 α もしくは XL10-GOLD に導入した。この大腸菌を培養してプラスミドを抽出し、自動 DNA シークエンサー(ABI PRISM 310 Genetics Analyzer)により塩基配列の確認を行った。用いたプライマーと各末端側に付加した制限酵素は以下の通り。

^{BD}GID1a用5'プライマー(末端にEcoR I)

5'-GCGAATTCATGGCTGCGAGCGATGAAGTTAATC-3'

^{BD}GID1a用3'プライマー(末端にPst I)

5'-GCCTGCAGTTAACATTCCGCGTTTACAAACGCCG-3'

^{BD}GID1b用5'プライマー(末端にEcoR I)

5'-GCGAATTCATGGCTGGTGGTAACGAAGTCAAC-3'

^{BD}GID1b用3'プライマー(末端にPst I)

5'-GCCTGCAGCTAAGGAGTAAGAAGCACAGGACTTG-3'

^{BD}GID1c用5'プライマー(末端にEcoR I)

5'-GCGAATTCATGGCTGGAAGTGAAGAAGTTAATCTTATTGAG-3'

^{BD}GID1c用3'プライマー(末端にPst I)

5'-GCCTGCAGTCATTGGCATTCTGCGTTTACAAATGCAG-3'

^{2nd}GID1a用5'プライマー(末端にNot I)

5'-GCGCGGCCGCGATGGCTGCGAGCGATGAAGTTAATC-3'

^{2nd}GID1a用3'プライマー(末端にNot I)

5'-GCGCGGCCGCTTAACATTCCGCGTTTACAAACGCCG-3'

^{2nd}GID1b用5'プライマー(末端にNot I)

5'-GCGCGGCCGCGATGGCTGGTGGTAACGAAGTCAAC-3'

^{2nd}GID1b用3'プライマー(末端にNot I)

5'-GCGCGGCCGCCTAAGGAGTAAGAAGCACAGGACTTG-3'

^{2nd}GID1c用5'プライマー(末端にNot I)

5'-GCGCGGCCGCGATGGCTGGAAGTGAAGAAGTTAATCTTATTGAG-3'

^{2nd}GID1c用3'プライマー(末端にNot I)

5'-GCGCGGCCGCTCATTGGCATTCTGCGTTTACAAATGCAG-3'

^{AD}GAI用5'プライマー(末端にEcoR I)

5'-GCGAATTCATGAAGAGAGATCATCATCATCATCAAG-3'

^{AD}GAI用3'プライマー(末端にXho I)

5'-GCCTCGAGCTAATTGGTGGAGAGTTTCCAAGCC-3'

^{AD}RGAI用5'プライマー(末端にBamH I)

5'-GCGGATCCGGATGAAGAGAGATCATCACCAATTCCAAGG-3'

^{AD}RGAI用3'プライマー(末端にXho I)

5'-GCCTCGAGTCAGTACGCCGCCGTCG-3'

^{AD}RGL1用5'プライマー(末端にSma I)

5'-GCCCCGGGCATGAAGAGAGAGCACAACCACCG-3'

^{AD}RGL1用3'プライマー(末端にSac I)

5'-GCGAGCTCTTATTCCACACGATTGATTTCGCCACG-3'

^{AD}RGL2用5'プライマー(末端にSma I)

5'-GCCCCGGGCATGAAGAGAGGATACGGAGAAACATGG-3'

^{AD}RGL2用3'プライマー(末端にXho I)

5'-GCCTCGAGTCAGGCGAGTTTCCACGCC-3'

^{AD}RGL3用5'プライマー(末端にSma I)

5'-GCCCCGGGCATGAAACGAAGCCATCAAGAAACGTCTG-3'

^{AD}RGL3用3'プライマー(末端にXho I)

5'-GCCTCGAGCTACCGCCGCAACTCCG-3'

各 ^{BD}GID1 挿入プラスミドおよび pBridge ベクターについて 3-5-2(1)項と同じ手順で 37°C・3時間静置による EcoR I (H buffer)処理、フェノクロ-エタノール沈殿処理後 37°C・3時間静置による Pst I (H buffer)処理を順次行い、0.8% (w/v)アガロースゲルを用いた電気泳動をし、目的遺伝子断片を切り出して gene clean 処理を行って 12 μL の sDW に溶解した。以上の酵素処理済み pBridge 溶液 1 μL に対し、各 ^{BD}GID1 断片の溶液 5 μL および DNA Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa) I 液を 6 μL 加えて 16°C・2時間のライゲーション反応を行い、大腸菌 DH5α もしくは XL10-GOLD に導入した。この大腸菌を培養してプラスミドを抽出した(調製したベクターをそれぞれ pBrid-1a-vec, pBrid-1b-vec, pBrid-1c-vec と命名した)。

pBrid-1a-vec, pBrid-1b-vec, pBrid-1c-vec の3種のベクターおよび各 ^{2nd}GID1 挿入プラスミドを 3-5-2(1)項と同じ手順で 37°C・3時間静置による Not I (H buffer, 0.01% (w/v) BSA, 0.01% (v/v) Triton X-100)処理をし、pBridge 由来の3種のベクターのみフェノクロ-エタノール沈殿後全量を 37°C・1時間の BAP (TaKaRa)処理に供した。以上の反応液全てを 0.8% (w/v)アガロースゲルを用いて電気泳動し、目的 DNA 断片を切り出して gene clean 処理を行って 12 μL の sDW に溶解した。以上の酵素処理済み pBridge 由来ベクター溶液 1 μL に対し、各 ^{2nd}GID1 断片の溶液 5 μL および DNA Ligation Kit Ver.2 I 液を 6 μL 加えて 16°C・2時間のライゲーション反応を行い、大腸菌 DH5α もしくは XL10-GOLD に導入した。この大腸菌を培養してプラスミドを抽出し、制限酵素や PCR を用いて正しい向きで ^{2nd}GID1 断片が挿入されているベクターをそれぞれ選抜した。(調製したベクターをそれぞれ pBrid-1a-1b, pBrid-1a-1c, pBrid-1b-1a,

pBrid-1b-1c, pBrid-1c-1a, pBrid-1c-1b と命名した)。

各 ^{AD}DELLA 挿入プラスミドおよび pGADT7 ベクターについて 3-5-2(1)項と同じ手順で 37°C・3 時間静置による制限酵素処理(^{AD}GAI 用, *Eco*R I (H buffer); ^{AD}RGA 用, *Bam*H I(K buffer); ^{AD}RGL1 用, ^{AD}RGL2 用, ^{AD}RGL3 用, *Sma* I (T buffer, 0.01% (w/v) BSA))、フェノクロ-エタノール沈殿処理後 37°C・3 時間静置による制限酵素処理(^{AD}GAI 用, ^{AD}RGA 用, ^{AD}RGL2 用, ^{AD}RGL3 用, *Xho* I (H buffer); ^{AD}RGL1 用, *Sac* I (L buffer))を順次行い、0.8% (w/v)アガロースゲルを用いた電気泳動をし、目的 DNA 断片を切り出して gene clean 処理を行って 12 μL の sDW に溶解した。以上の酵素処理済み pGADT7 溶液 1 μL に対し、各 ^{AD}DELLA 断片の溶液 5 μL および DNA Ligation Kit Ver.2 I 液を 6 μL 加えて 16°C・2 時間のライゲーション反応を行い、大腸菌 DH5α もしくは XL10-GOLD に導入した。この大腸菌を培養してプラスミドを抽出した(調製したベクターをそれぞれ pAD-GAI, pAD-RGA, pAD-RGL1, pAD-RGL2, pAD-RGL3 と命名した)。

4-4-2 酵母 three-hybrid 系に用いる形質転換酵母の調製

(1) 酵母育成用培地の調製

通常の酵母の生育には、Difco Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Becton, Dickinson and Company) 6.6 g, D-グルコース 20.0 g, Synthetic Complete Drop Out Mix 0.83 g, DW 1 L を混合してオートクレーブ滅菌したもの(SD 培地)を使用した。固形培地作製時は、上記の混液に Bacto Agar (Becton, Dickinson and Company) 16.6 g を加えた。なお、Synthetic Complete Drop Out Mix の組成は以下のとおり; adenine hemisulfate 2.0 g, L-arginine HCl 2.0 g, L-histidine 2.0 g, L-isoleucine 2.0 g, L-leucine 4.0 g, L-lysine HCl 2.0 g, L-methionine 2.0 g, L-phenylalanine 3.0 g, L-serine 2.0 g, L-threonine 2.0 g, L-tryptophan 3.0 g, L-tyrosine 2.0 g, uracil 1.2 g, L-valine 9.0 g の混合粉末。また、生育に関する制限条件として必要に応じて Synthetic Complete Drop Out Mix の中から adenine hemisulfate, L-histidine, L-leucine, L-tryptophan, uracil の一部を加えない組成で培地を調製した。一方、特定の成分を後から添加する場合には、以下に示す終濃度になるように各 100 倍濃度のストック溶液を添加した; adenine hemisulfate 5 mg/mL, L-histidine 4 mg/mL, L-leucine 10 mg/mL, L-tryptophan 2 mg/mL, uracil 1 mg/mL。

(2) 酵母の形質転換および酵母接合法による 2 種ベクター挿入株の取得

Two-Hybrid system TRAF0 Protocol (<http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/>)に概ね従い、LiAc/ss-DNA/PEG 法により形質転換を行った。概要のみ示す。予め single-stranded carrier DNA (ss-carrier DNA) (Deoxyribonucleic acid Sodium Salt Type III from Salmon Testes, Sigma)を 2 mg/mL になるよう滅菌済み TE buffer に溶かし、攪拌子を用いて 4°C・2 時間攪拌して完全に溶解させた。-20°C で冷凍保存し、使用直前に熱変性 (95°C、5 分) させてから氷冷しておいた。uracil を抜いた液体選択培地(SD-Ura 培地) 2 mL に酵母(strain AH109 : 遺伝子型 *MATa trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2 ::*

GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2 URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ)を植菌し、30°C・3日間振盪培養(250 rpm, 単振動)した。酵母培養液 500 µL を 1.5 mL 容マイクロチューブに移して遠心分離[15,000 rpm (21,800 × g), 1分, 25°C, himac CF15D2, Hitachi]を行い、上清を除去して集菌した。菌体に 50% (v/v) PEG (MW 3,350) 溶液 240 µL、1 M 酢酸リチウム 36 µL、熱変性処理済み ss-carrier DNA 50 µL、sDW 30 µL、4-4-1 項で構築済みの pGADT7 系ベクター(pAD-GAI, pAD-RGA, pAD-RGL1, pAD-RGL2, pAD-RGL3) 4 µL を上記の順に加え、1分間ボルテックスミキサーで攪拌し、42°C・1時間インキュベートした。遠心分離[15,000 rpm (21,800 × g), 1分, 25°C]した後、上清を除去して集菌し、sDW 50 µL を加えてピペッティングにより菌体を懸濁してからそのうちの 20 µL を採り、uracil および L-leucine を抜いた固形選択培地(SD-Ura-Leu 培地)に塗布した。30°C・3日間静置培養してコロニーを新しい同組成の選択培地に植えつぎ 4°Cで保存した。

4-4-1 項で構築済みの pBridge 系ベクター(pBrid-1a-vec, pBrid-1b-vec, pBrid-1c-vec, pBrid-1a-1b, pBrid-1a-1c, pBrid-1b-1a, pBrid-1b-1c, pBrid-1c-1a, pBrid-1c-1b)を用いた形質転換を行う際には uracil および L-tryptophan および L-leucine を抜いた液体選択培地 (SD-Ura-Trp-Leu 培地)を用いた。別ストレインの酵母 (strain Y187: 遺伝子型 *MAT α ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3 112 gal4 Δ met gal80 Δ URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ*) を形質転換する場合も上記と同一の方法に従った。

以上の操作により取得した pGADT7 系ベクターを保有する酵母 AH109 形質転換株を L-leucine, uracil, L-methionine を抜いた固形制限培地に塗布し、シングルコロニーを拾った。同様に、pBridge 系ベクターを保有する酵母 Y187 形質転換株も L-tryptophan, uracil を抜いた固形制限培地上でシングルコロニーを拾った。いずれも継代後のコロニーをチップ先端につけ、YPD 液体培地 [yeast extract (Difco) 6.6 g, peptone (Difco) 12.0 g, D-グルコース 12.0 g, DW 1 L を混合してオートクレーブ滅菌したもの] 2 mL に共に懸濁して 30°C・3日間振盪(250 rpm, 単振動)培養した。培養液 50 µL を L-leucine, L-tryptophan, uracil, L-methionine を抜いた固形選択培地に塗布し、30°C・3日間静置培養して出現したシングルコロニーについて継代を行い、遮光条件にてプレートのまま冷蔵(4°C)した。

4-4-3 生育状況を指標とする酵母 three-hybrid 系の実施

SD 培地より adenine hemisulfate, L-histidine, L-leucine, L-tryptophan, uracil, L-methionine を抜いた酵母固形選択培地をオートクレーブ後、GA 添加区では終濃度 10 µM となるように 1 mM GA₄ 10%エタノール溶液を、無添加区では終濃度 0.1% (v/v)エタノールを添加し、3-アミノトリアゾール(3-AT)添加区では終濃度 10 mM, 100 mM となるようにフィルター滅菌済みの 100 mM, 1 M 3-AT 水溶液をそれぞれ混合し、滅菌 2号角シャーレ(栄研化学)に 1枚当たり 30 mL 流し込み、室温で冷却して固化させた。陰性対照区として上記栄養素欠損選択培地に adenine hemisulfate, L-histidine を補充した酵母固形非選択培地を作製した。試験は、形質転換酵母のシングルコロニーをチップでつき sDW 100 µL に懸濁したものから 5 µL を 2連でスポ

ットし、30°C・7日間静置培養し、生育状況について観察した。

4-4-4 three-hybrid 系酵母における 2ndGID1 の存在状況の解析

(1) 酵母からのタンパク質抽出および HA タグによる 2ndGID1 の濃縮

SD 培地より $\underline{\text{L}}$ -leucine, $\underline{\text{L}}$ -tryptophan, uracil, $\underline{\text{L}}$ -methionine を抜いた液体非選択培地 10 mL を 50 mL 容遠心チューブに入れ、対象の形質転換酵母を 30°C・3日間振盪(250 rpm, 単振動)培養した後、遠心分離[3,000 rpm (1,600×g), 5分, 4°C, himac CF5RX, Hitachi]し、上清を捨てた。ペレットを-80°C・1時間凍結した後、4°Cに冷却した sDW 1 mL に懸濁して 1.5 mL 容マイクロチューブに移して遠心分離[12,000 rpm (14,000×g), 1分, 4°C, himac CF15D2, Hitachi]し、上清を捨てた。ペレットに抽出 buffer(Y-PER Yeast Protein Extraction Reagent (TaKaRa) 1 mL に対して Protease inhibitor cocktail EDTA-free, 100 倍濃縮 (ナカライテスク) 10 μ L, Benzonase nuclease (Merck) 1 μ L を混合したもの) 約 500 μ L を入れてよく懸濁し、25°C・20分ゆっくりと攪拌を続け、遠心分離[15,000 rpm (21,800×g), 20分, 4°C]をして上清を得た。

EZview Red Anti-HA Affinity Gel (Sigma)をゆっくりと懸濁し、50 μ L を 1.5 mL 容マイクロチューブに移した。750 μ L の Lysis Buffer (Y-PER Yeast Protein Extraction Reagent)を加えてよく懸濁して遠心分離[10,000 rpm (8,200×g), 30秒, 4°C]し、上清を除いた。再度 750 μ L の Lysis Buffer (Y-PER Yeast Protein Extraction Reagent)を加えてよく懸濁して遠心分離[10,000 rpm (8,200×g), 30秒, 4°C]し、上清を除いた後氷上に置いた。このゲルに酵母由来の抽出液を移し、4°C・1時間ゆっくりと攪拌を続けてゲルに HA タグ付きタンパク質を吸着させた。遠心分離[10,000 rpm (8,200×g), 30秒, 4°C]して上清を捨て、Lysis Buffer+PIC (Y-PER Yeast Protein Extraction Reagent 1 mL に対し Protease inhibitor cocktail 10 μ L を混合したもの)を 750 μ L を加えて 4°C・5分ゆっくりと攪拌を続けて遠心分離[10,000 rpm (8,200×g), 30秒, 4°C]して上清を捨てた。以上の Lysis Buffer+PIC による洗浄をさらに 2 回繰り返す、SDS-PAGE サンプルバッファー(2x) (以下の(2)項に組成を記述)を 50 μ L 加えて、95°C・5分加熱した後、よく攪拌して遠心分離[10,000 rpm (8,200×g), 1分, 4°C]して上清を回収し、そのうち 20 μ L を以降のウェスタンブロッティングに供した。

(2) ウェスタンブロッティングによる 2ndGID1 の検出

各溶液の調製は以下のとおり。**30% (w/v)アクリルアミド A-B 溶液** : アクリルアミド 58.4 g、*N,N*-メチレンビスアクリルアミド 1.6 g を全量 200 mL となるように DW に溶かした。**Resolving buffer** : 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)。**Stacking buffer** : 1 M Tris-HCl (pH 6.8)。**SDS-PAGE 泳動用緩衝液(10x)** : Tris 30 g、SDS(ラウリル硫酸ナトリウム) 10 g、グリシン 144 g を加え DW で全量を 1 L とした。**SDS-PAGE サンプルバッファー(2x)** : DW 30 mL, 1 M Tris-HCl (pH 6.8) 10 mL, グリセロール 20 mL, 10% (w/v) SDS 40 mL, ブロモフェノールブルー 10 mg を混合し、サンプル調製時に 1/10 液量(v/v)の 2-メルカプトエタノールを加えた。**1xTTBS バッファー** : 10xTTBS バッファー[Tris 30.3 g, NaCl 87.7 g, Tween 20 10 mL を DW に溶解し 1 M HCl で pH 7.4 に調製して 1 L にフィルアップしたもの]を希釈して調製。

SDS-PAGE の要領は以下のとおり。分離ゲル[Resolving buffer 750 μ L, 30% (v/v)アクリルアミド A-B 溶液 2.0 mL, DW 3.13 mL, 10% (w/v) SDS 60 μ L, 10% (w/v) APS 60 μ L, TEMED 3 μ L]を充填し、DW 少量を重層した。ゲル境界面が明瞭になったら DW を除去して、濃縮ゲル[Stacking buffer 700 μ L, 30% (w/v)アクリルアミド A-B 溶液 600 μ L, DW 3.3 mL, 10% (w/v) SDS 46 μ L, 10% (w/v) APS 80 μ L, TEMED 5 μ L]を重層し、コームを挿して 20 分程度静置した。泳動槽を設置し、SDS-PAGE 泳動用緩衝液(1x)を入れ、各泳動サンプル 20 μ L をウェルに添加し、ゲル 1 枚あたり 30 mA (定電流) で約 1 時間泳動した。

SDS-PAGE を行った後、分離ゲルと同サイズに切り出したニトロセルロースメンブレン (Hybond-ECL, GE healthcare) 1 枚を、ブロットイング用ろ紙(ATTO) 6 枚と共にブロットイングバッファー [SDS-PAGE 泳動用緩衝液(10x) 4 mL, メタノール 10 mL, DW 36 mL を混合して調製]に浸し、セミドライ式ブロットイング装置(ホライズブロット AE-6677、ATTO)の陽極に近い順にろ紙 3 枚、メンブレン、分離ゲル、ろ紙 3 枚を重ねた。気泡の除去を行った後、2.0 mA/cm² 定電流条件で 1 時間の通電によりブロットイングを行った。終了後、ブロッキングバッファー[終濃度 5% (w/v)スキムミルクを 1xTTBS バッファーに溶解して調製]にメンブレンを浸し、1 時間振盪してブロッキング処理を行った後、一次抗体希釈液[マウス Monoclonal 抗 HA 抗体 (COVANCE)をブロッキングバッファーで 1,000 倍(v/v)に希釈]に浸し、室温で 1 時間振盪した。1xTTBS バッファーに浸して 10 分振盪を 3 回繰り返し、二次抗体希釈液[Goat Anti-Mouse IgG-HRP (TaKaRa)をブロッキングバッファーで 5,000 倍(v/v)希釈]に浸し、1 時間振盪した。1xTTBS バッファーに浸して 10 分振盪を 3 回繰り返したものを SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (TaKaRa)を用いて、使用書に従い Light-Capture II (ATTO) で一次抗体と反応するバンドの検出を行った。

論文内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 18 年度博士課程 進学
氏名 鈴木 浩之
指導教員名 浅見 忠男

論文題目

シロイヌナズナにおけるジベレリン受容体 AtGID1 の解析

ジベレリン(GA)は発芽誘導、茎部伸長の促進、花器官の分化・生長など、植物に対して幅広い生理的機能を有し、植物の生長制御に必須の植物ホルモンである。2005 年にイネの GA 非感受性極矮性突然変異体の解析から、Gibberellin Insensitive Dwarf1 (GID1)が GA 受容体として同定され、それまでの知見との統合により GA のシグナル伝達に関する主経路が明瞭となった。すなわち、通常は DELLA と呼ばれるシグナル抑制因子が正常なシグナルの伝達をブロックしているが、ひとたび GA が受容体 GID1 に認識されると、GID1-GA 複合体を形成し、DELLA との親和性が生ずる。GID1-GA 複合体に捕捉された DELLA はシグナル抑制機能を失い、SCF 複合体によるユビキチン修飾およびプロテアソームによる分解を受ける。イネでは GA 受容体と DELLA 因子が各 1 種ずつしか存在しないが、双子葉植物のシロイヌナズナでは GA 受容体 3 種(GID1a, 1b, 1c)、DELLA 因子 5 種(GAI, RGA, RGL1, 2, 3)が存在することから、シロイヌナズナにはイネよりも複雑な GA シグナルの伝達制御機構が存在すると予想された。

そこで本博士論文研究では、まず 3 種の GA 受容体間に潜む機能的な差異を検出すべく、GA 受容体に関する機能欠失型多重変異体の作出を計画した。その解析により、特定の組み合わせで 2 種の受容体がともに機能を失った変

異体では、限定された器官で異常形質が現れた。その表現形質の原因究明こそ多様なシグナル伝達制御を理解する格好の材料と考え、関連遺伝子の発現解析および翻訳産物の植物体内での分布状況の把握を行った。その結果、単に GA 受容体が量的に欠乏していることが主原因と考えられるケースと、それに該当しないケースを見いだした。後者のケースに焦点を絞り、形質が認められた器官に存在する GA 受容体・DELLA 因子間のシグナル伝達に不具合が生じている可能性について検討した。

シロイヌナズナ・GA 受容体の機能欠損型多重変異体の解析

Ds エlement または T-DNA 配列の挿入により発現に異常を来した各 *GID1* 変異体(1KO)を取得した。各 1KO はいずれも野生株と比較して背丈や発芽、稔実率に異常は認められず、機能的に重複する傾向が覗えた。これら 1KO を順次交雑して取得した 2 重変異体(2KO)のうち *gid1b gid1c*-2KO のみ野生株と変わらない生育を示したのに対して、*gid1a gid1c*-2KO では抽台後の花茎の伸長が鈍く矮性を示した。この矮化傾向は発芽から間もない幼胚軸においても確認された。各 2KO 花茎に対して GA 処理を行ない GA 応答性遺伝子の発現応答状況を Real time-PCR により解析した。その結果、他の 2KO と比較して *gid1a gid1c*-2KO では応答性遺伝子の発現量変化が乏しく、GA 応答性が弱まっていることが明らかとなった。*gid1a gid1b*-2KO については後述する。

次に全 *GID1* 遺伝子の機能欠損型変異体(*gid1a gid1b gid1c*-3KO)作出のため、交雑途上で取得したヘテロライン(*GID1a/gid1a gid1b gid1c*-2KO)の自家受粉による後代種子を得た。そのうち約 1/4 は通常の発芽条件、GA 添加による発芽促進条件のいずれも発芽せず、種皮の剥離処理により GA 生合成欠損変異体と形態的に類似する極矮性植物体に生長した。これら植物体のジェノタイプを調べたところいずれも 3KO と判明した。他方、種皮を剥離せずとも発芽した個体中には 3KO が全く含まれなかった。3KO 植物体は GA 投与で形態は変わらず、また GA 応答性遺伝子の発現応答も全く認められなかったことから、GA 非感受性と判断した。これにより、シロイヌナズナでは 3 種の *GID1* が GA 受容体として少なくとも支配的に機能していると結論付けた。なお、*gid1a gid1c*-2KO と比較して 3KO の矮性傾向が著しく強いいため、花茎における *GID1b* の機能は弱いものの皆無ではないことも判明した。

残る組み合わせの *gid1a gid1b*-2KO は他と比較して低い稔実率を有していた。光学顕微鏡を用いて開花直後の花器官を観察したところ、雄蕊の伸長不良および雌蕊側面への花粉の付着を検出した。綿棒を用いて自家受粉処理を施した場合には稔実率が向上したことから、*gid1a gid1b*-2KO 花粉は正常に発達しているが、雄蕊の伸長不良により柱頭に花粉が届かず、稔実率の低下を招いていると結論した。これにより、*gid1a gid1b*-2KO 植物体内で唯一機能するはずの *GID1c* が雄蕊の伸長に対して機能的に弱い可能性を見いだした。

GA 受容体遺伝子の発現状況および受容体タンパク質の存在状況の把握

gid1a gid1c-2KO 花茎の矮性形質、および、*gid1a gid1b*-2KO 雄蘖の伸長不良形質に焦点を絞り、これら異常形質の原因が唯一残る GA 受容体の量的欠乏である可能性を検証すべく、各 2KO の花茎、および、花器官から調製した全 RNA を用いて、3 種の *GID1* 遺伝子の mRNA 量を絶対定量法により測定した。その結果、3 種の *GID1* 遺伝子発現量の大幅な減少はいずれの 2KO においても確認されなかった。そこで、より局所的な *GID1* 遺伝子の発現抑制が生じている可能性を確かめるべく、own プロモーター&レポーター遺伝子発現ラインの作出を計画した。約 3kbp の *GID1* プロモーター制御下で *GID1-GUS* 融合遺伝子が発現する形質転換個体(*pGID1::GID1-GUS*)を作成し、後代植物体を用いて GUS 染色を行い、花茎、および、花器官における *GID1-GUS* 融合タンパク質の分布状況を解析した。その結果、花茎では *GID1a-GUS*、*GID1c-GUS* による発色は明瞭に検出されたが、*GID1b-GUS* による発色をほとんど検出できず、別の器官ではそれによる明瞭な発色を認めたことから花茎における *GID1b-GUS* 量が少ないと結論した。前述の絶対定量法で得た遺伝子発現情報との整合性を問うべく、各 *pGID1::GID1-GUS* ラインの花茎における *GID1-GUS* mRNA を定量した結果、焦点となっている *GID1b-GUS* mRNA を含めて先の結果にほぼ従う量の存在が明らかとなり、「花茎では *GID1b* 遺伝子が少なからず発現するが、その翻訳産物は何らかの理由により安定的に蓄積されず、結果、*GID1b* しか存在しない *gid1a gid1c*-2KO 花茎で GA 受容体が欠乏して矮性形質が現れた」と考えれば矛盾なく説明することが可能と判断した。

同様に花器官に着目した GUS 染色の結果、雄蘖における *GID1c-GUS* による発色は *GID1a-GUS* および *GID1b-GUS* による発色に比肩して明瞭に認められた。ただし、花器官を用いて行った定量結果と照合した場合、*pGID1c::GID1c-GUS* ラインにおける *GID1c-GUS* 遺伝子の発現量はその予想量を超えて高く、*GID1c* プロモーターによる発現制御が本来よりも増強されている可能性を否定できない。しかし、少なくとも形質が現れる器官において翻訳産物が安定的に存在できるという点において、*gid1a gid1c*-2KO 花茎で生ずる GA 受容体の欠乏とは異なる様式により *gid1a gid1b*-2KO 雄蘖の伸長不良は生ずる、と判断した。

GID1-DELLA 間の相互作用に関する親和性評価

GA シグナルが伝わるためには、シグナル抑制因子 DELLA は *GID1-GA* 複合体に捕捉される必要がある。この反応は平衡反応であって、15 通りの *GID1-DELLA* 間の組み合わせ中に「親和性が他に比べて弱いことが主原因となって *GID1-GA* 複合体に捕捉されにくく、そのために DELLA としての機能が残存するケース」があるとの作業仮説を立て、そのケースに *GID1c* と「*gid1a gid1b*-2KO 雄蘖内で存在する DELLA」が該当するか検証を計画した。簡便に *GID1-DELLA* 間の相互作用に関する親和性を評価するため、1 種の DELLA に対して 2 種の *GID1* が競合的に相互作

用する系を酵母内で構築した。すなわち、市販の three-hybrid 系を導入し、競合下にある 2 種の GID1 (^{BD}GID1 と ^{2nd}GID1) のうち、^{2nd}GID1 の ^{AD}DELLA に対する親和性が ^{BD}GID1 と比較して高いか同等の場合、^{2nd}GID1 が ^{BD}GID1 から ^{AD}DELLA を奪うために ^{BD}GID1-^{AD}DELLA 間の相互作用が成立しづらく、結果、制限培地での当該酵母の生育は困難となる。対して、^{2nd}GID1 に比べて圧倒的に ^{BD}GID1 の ^{AD}DELLA に対する親和性が高い場合のみ生育は可能となる。よって、生育の可否を調べることで 2 分子間の親和性評価ができるようになった。

花器官ではその遺伝子発現情報から、5 種の DELLA の中で RGL2、続いて RGA が多く存在しており、他の研究者らによる機能欠損型の多重変異体の解析からもそれを支持する結果が報告されている。そこで上記 three-hybrid 系を用いて、主に RGL2 あるいは RGA と、GID1c との相互作用に焦点を当てながら総当たり解析を行った。結果、^{BD}GID1c-^{AD}RGL2 間の相互作用は ^{2nd}GID1a あるいは ^{2nd}GID1b によって明瞭に阻害されたのに対し、^{BD}GID1a-^{AD}RGL2、^{BD}GID1b-^{AD}RGL2 間の相互作用に対して ^{2nd}GID1c の阻害効果は認められなかったことから、RGL2 にとっては 3 種のうちで GID1c との親和性が最も低いと結論した。^{AD}RGA を用いた解析からも、GID1c が他の GA 受容体を圧倒するほど高い親和性を示す組み合わせに該当しなかったことから、雄薬中の主要 DELLA に対する GID1c の捕捉機能が弱いことが *gid1a gid1b*-2KO 雄薬の伸長不良の原因である可能性を支持する結果が得られた。

上述したとおり本研究の遂行によって、まず 3 種の GID1 がシロイヌナズナにおいて支配的に機能する GA 受容体であることを特定した。その上で、機能欠損型変異体を用いた解析から GID1b および GID1c には特定の器官で GA 受容体として十分に機能できない状況があることを見だし、それらの原因究明を展開した。花茎における GID1b の不安定化制御機構およびその生理的意義に関する解明や、植物体を用いての雄薬レベルにおける GID1c-DELLA 間の相互作用状況の把握など、全容の解明に向けて未だ検証されるべきことは多々残されているが、本研究を基盤としてそれら制御機構に関する理解がより進展することを期待する。

発表論文

- (1) Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M & Yamaguchi I. (2006) Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J.*, **46**, 880-889.
- (2) Iuchi S*, Suzuki H*, Kim YC, Iuchi A, Kuromori T, Ueguchi-Tanaka M, Asami T, Yamaguchi I, Matsuoka M, Kobayashi M & Nakajima M. (2007) Multiple loss-of-function of *Arabidopsis* gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. *Plant J.*, **50**, 958-966. (*equally contribution)
- (3) Suzuki H, Park SH, Okubo K, Kitamura J, Ueguchi-Tanaka M, Iuchi S, Katoh E, Kobayashi M, Yamaguchi I, Matsuoka M, Asami T & Nakajima M. Diversity in gibberellin signal transduction explains phenotypes emerged in *Arabidopsis* multiple KO mutants of its receptors, *submitted*.

参考文献

- Aloni R. (1979) Role of auxin and gibberellin in differentiation of primary phloem fibers. *Plant Physiol.* **63**: 609-14.
- Ariizumi T, Murase K, Sun TP and Steber CM. (2008) Proteolysis-independent downregulation of DELLA repression in *Arabidopsis* by the gibberellin receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1. *Plant Cell* **20**: 2447-59.
- Baskin JM and Baskin CC. (1971) Effect of chilling and gibberellic acid on growth potential of excised embryos of *Ruellia humilis*. *Planta* **100**: 365-9.
- Bevan M. (1984) Binary agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* **12**: 8711-21.
- Cheng H, Qin L, Lee S, Fu X, Richards DE, Cao D, Luo D, Harberd NP and Peng J. (2004) Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**: 1055-64.
- Chiang HH, Hwang I and Goodman HM. (1995) Isolation of the *Arabidopsis* GA4 locus. *Plant Cell* **7**: 195-201.
- Clough SJ and Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735-43.
- Davies, PJ. *Plant Hormones 3rd edition* (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 2004).
- Debeaujon I and Koornneef M. (2000) Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiol.* **122**: 415-24.
- Dill A, Jung HS and Sun TP. (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 14162-7.
- Dill A and Sun TP. (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**: 777-85

- Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM and Sun TP. (2004) The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell*. **16**: 1392-405.
- Fleet CM and Sun TP. (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 77-85.
- Fu X, Richards DE, Fleck B, Xie D, Burton N and Harberd NP. (2004) The Arabidopsis mutant *sleepy1^{gar2-1}* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* **16**: 1406-18.
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Bécard G, Beveridge CA, Rameau C and Rochange SF. (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189-94.
- Gomi K, Sasaki A, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Kitano H and Matsuoka M. (2004) GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J.* **37**: 626-34.
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP and Thomas SG. (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 3399-414.
- Gubler F, Chandler PM, White RG, Llewellyn DJ and Jacobsen JV. (2002) Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol.* **129**: 191-200.
- Hasegawa M, Nakajima M, Takeda K, Yamaguchi I and Murofushi N (1994) A Novel gibberellin glucoside, 16 α ,17-dihydroxy-16,17-dihydrogibberellin A₄-17 -O- β -glucopyranoside, from rice anthers. *Phytochemistry* **37**: 629-34.
- Helliwell CA, Chandler PM, Poole A, Dennis ES and Peacock WJ. (2001) The

- CYP88A cytochrome P450, *ent*-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 2065-70.
- Helliwell CA, Sheldon CC, Olive MR, Walker AR, Zeevaart JA, Peacock WJ and Dennis ES. (1998) Cloning of the Arabidopsis *ent*-kaurene oxidase gene GA3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9019-24.
- Higuchi M, Pischke MS, Mähönen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S, Helariutta Y, Sussman MR and Kakimoto T. (2004) *In planta* functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 8821-6.
- Hua J and Meyerowitz EM. (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis thaliana. *Cell* **94**: 261-71.
- Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M and Yamaguchi J. (2001) *slender rice*, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell* **13**: 999-1010.
- Itoh H, Matsuoka M and Steber CM. (2003) A role for the ubiquitin-26S-proteasome pathway in gibberellin signaling. *Trends Plant Sci.* **8**: 492-7.
- Itoh H, Sasaki A, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Hasegawa Y, Minami E, Ashikari M and Matsuoka M. (2005) Dissection of the phosphorylation of rice DELLA protein, SLENDER RICE1. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1392-9.
- Itoh H, Tatsumi T, Sakamoto T, Otomo K, Toyomasu T, Kitano H, Ashikari M, Ichihara S and Matsuoka M. (2004) A rice semi-dwarf gene, *Tan-Ginbozu (D35)*, encodes the gibberellin biosynthesis enzyme, *ent*-kaurene oxidase. *Plant Mol. Biol.* **54**: 533-47.
- Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sato Y, Ashikari M and Matsuoka M. (2002) The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell* **14**: 57-70.

- Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sentoku N, Kitano H, Matsuoka M and Kobayashi M. (2001) Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 β -hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 8909-14.
- Jacobsen SE and Olszewski NE. (1993) Mutations at the *SPINDLY* locus of Arabidopsis alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* **5**: 887-96.
- Kim YC, Nakajima M, Nakayama A and Yamaguchi I. (2005) Contribution of gibberellins to the formation of Arabidopsis seed coat through starch degradation. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1317-25.
- McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, Sun TP and Steber CM. (2003) The Arabidopsis *SLEEPY1* gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**: 1120-30.
- Michaels SD and Amasino RM. (1999) The gibberellic acid biosynthesis mutant *ga1-3* of Arabidopsis thaliana is responsive to vernalization. *Dev. Genet.* **25**: 194-8.
- Murase K, Hirano Y, Sun TP and Hakoshima T. (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**: 459-63.
- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M and Yamaguchi I. (2006) Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant J.* **46**: 880-9.
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S and Ueguchi C. (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1365-77.
- Ogawa M, Kusano T, Katsumi M and Sano H. (2000) Rice gibberellin-insensitive gene homolog, *OsGAI*, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene* **245**: 21-9.
- Olszewski N, Sun TP and Gubler F. (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis,

- catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **14**: S61-80.
- Osterlund T. (2001) Structure-function relationships of hormone-sensitive lipase. *Eur. J. Biochem.* **268**: 1899–907.
- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP and Harberd NP. (1997) The Arabidopsis *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* **11**: 3194-205.
- Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NE, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE and Hedden P. (1995) Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from Arabidopsis. *Plant Physiol.* **108**: 1049-57.
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D and Benfey PN. (1999) The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes. *Plant J.* **18**: 111-9.
- Rieu I, Ruiz-Rivero O, Fernandez-Garcia N, Griffiths J, Powers SJ, Gong F, Linhartova T, Eriksson S, Nilsson O, Thomas SG, Phillips AL and Hedden P. (2008) The gibberellin biosynthetic genes *AtGA20ox1* and *AtGA20ox2* act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. *Plant J.* **53**: 488-504.
- Rose AB and Beliakoff JA. (2000) Intron-mediated enhancement of gene expression independent of unique intron sequences and splicing. *Plant Physiol.* **122**: 535-42.
- Sakai M, Sakamoto T, Saito T, Matsuoka M, Tanaka H and Kobayashi M. (2003) Expression of novel rice gibberellin 2-oxidase gene is under homeostatic regulation by biologically active gibberellins. *J. Plant Res.* **116**: 161–64.
- Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Takeda S, Abe K, Miyao A, Hirochika H, Kitano H, Ashikari M and Matsuoka M. (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol.* **134**: 1642-53.
- Sasaki A, Itoh H, Gomi K, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Jeong DH,

- An G, Kitano H, Ashikari M and Matsuoka M. (2003) Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* **299**: 1896-8.
- Schomburg FM, Bizzell CM, Lee DJ, Zeevaart JA and Amasino RM. (2003) Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* **15**: 151–63.
- Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H and Matsuoka M. (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor *GID1*. *Nature* **456**: 520-3.
- Silverstone AL, Chang C, Krol E and Sun TP. (1997a) Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene *GA1* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **12**: 9-19.
- Silverstone AL, Mak PY, Martínez EC and Sun TP. (1997b) The new *RGA* locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **146**: 1087-99.
- Silverstone AL, Tseng TS, Swain SM, Dill A, Jeong SY, Olszewski NE and Sun TP. (2007) Functional analysis of *SPINDLY* in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **143**: 987-1000.
- Spielmeyer W, Ellis MH and Chandler PM. (2002) *Semidwarf (sd-1)*, "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 9043-48.
- Steber CM, Cooney SE and McCourt P. (1998) Isolation of the GA-response mutant *sly1* as a suppressor of *ABI1-1* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**: 509-21.
- Strader LC, Ritchie S, Soule JD, McGinnis KM and Steber CM. (2004) Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene *SLEEPY1* are rescued by overexpression of its homologue, *SNEEZY*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 12771-6.
- Sun TP and Kamiya Y. (1994) The *Arabidopsis GA1* locus encodes the cyclase

- ent*-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**: 1509-18.
- Thomas SG, Phillips AL and Hedden P. (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4698–703.
- Thomas SG and Sun TP. (2004) Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiol.* **135**: 668-76.
- Toyomasu T, Kawaide H, Sekimoto H, Numers C, Phillips AL, Hedden P and Kamiya Y. (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding gibberellin 20-oxidase from rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiol. Plantarum* **99**: 111-18.
- Tyler L, Thomas SG, Hu J, Dill A, Alonso JM, Ecker JR and Sun TP. (2004) DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **135**: 1008-19.
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I and Matsuoka M. (2005) *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693-8.
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kozuka J and Yamaguchi S. (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195-200.
- Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, Borochoy R, Yu F, Jikumaru Y, Ross J, Cortes D, Ma CJ, Noel JP, Mander L, Shulaev V, Kamiya Y, Rodermel S, Weiss D and Pichersky E. (2007) Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell.* **19**: 32-45.
- Xu YL, Li L, Gage DA and Zeevaart JA. (1999) Feedback regulation of *GA5* expression and metabolic engineering of gibberellin levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 927-36.

- Yamaguchi I, Fujisawa S and Takahashi N. (1982) Qualitative and semiquantitative analysis of gibberellins. *Phytochemistry* **21**: 2049-55.
- Yamaguchi S, Smith MW, Brown RG, Kamiya Y and Sun TP. (1998a) Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 β -hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* **10**: 2115-26.
- Yamaguchi S, Sun TP, Kawaide H and Kamiya Y. (1998b) The *GA2* locus of *Arabidopsis thaliana* encodes *ent*-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol.* **116**: 1271-78.
- Yokota T, Murofushi N, Takahashi N and Tamura S. (1971) Gibberellins in immature seeds of *Pharbitis nil* Part III. Isolation and structure of gibberellin glucosides. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 583-95.
- Zhu Y, Nomura T, Xu Y, Zhang Y, Peng Y, Mao B, Hanada A, Zhou H, Wang R, Li P, Zhu X, Mander LN, Kamiya Y, Yamaguchi S and He Z. (2006) *ELONGATED UPPERMOST INTERNODE* encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* **18**: 442–56.

謝辞

本研究を行うにあたって、多くの方々にお世話になりました。共同研究者である理化学研究所バイオリソースセンターの小林正智博士、井内聖博士、井内敦子博士、および理化学研究所植物科学研究センターの黒森崇博士には *GID1* 遺伝子の機能欠損型変異体株の取り寄せ、および掛け合わせによる多重変異体の作出にご尽力頂きました。名古屋大学生物機能開発利用研究センターの松岡信教授、上口美弥子准教授、島田麻子博士からは酵母 three-hybrid 系構築の為のベクターのご分与、および数多くの助言を頂きました。また、前橋工科大学の山口五十磨教授には修士課程在籍時より現在に至るまで研究に対しての助言を頂きました。深く感謝申し上げます。

生物制御化学研究室においては、このような素晴らしい研究の場を与えて頂きました浅見忠男先生、研究の方針から手法に至るまで様々な助言をくださいました鈴木義人先生、直接的に研究の計画から立案、実行に至る工程の中で都度様々な助言と叱咤激励をくださった中嶋正敏先生、そしてその他の諸先生方に深く感謝申し上げます。また、生物制御化学研究室室員の皆様には研究ばかりではなく日常生活の面も含めて色々とお世話になりました。この場を借りて深くお礼申し上げます。

経済面では独立行政法人日本学術振興会より研究奨励金として生活に必要な金銭面の援助を、また研究資金として科学研究費補助金を交付して頂きました。深く感謝申し上げます。

最後に、博士課程への進路にご理解頂き、金銭的にも精神的にも支えて下さった父、母、弟、祖父、祖母に、そして友人達に言葉では言い尽くせない感謝と敬愛の念を込めて本論文の締めとさせていただきます。

ありがとうございました。

2009年3月

鈴木浩之