

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 22 年度博士課程 入学
氏 名 宮地 朋子
指導教員名 浅見 忠男

論文題目

ブラシノステロイド情報伝達遺伝子 *BIL7* および *BIL1* に関する化学生物学的研究

1. 背景と目的

ブラシノステロイド (BR) は細胞の伸長や分裂、光形態形成、葉緑体制御などの生理活性をもつ、植物の生理・生長に非常に重要な植物ホルモンである。その生合成経路は相当部分が解明されてきているが、情報伝達経路については細胞膜上の受容体 BRI 1 以降の因子は未解明な部分が多かった。しかし 1999 年に BR 生合成阻害剤 Brz が創製され、様々な植物に BR 欠損状態を作り出せるようになった。シロイヌナズナは暗所発芽条件下において、野生型は胚軸が伸長したもやし様の形態を示すが、BR 阻害剤 Brz 存在下では、暗所にもかかわらず胚軸が短化し子葉が開いた暗所光形態形成を示す。この暗所 Brz 存在下にもかかわらず、胚軸が徒長する変異体を得られれば、それは BR 情報伝達が活性化した変異体であると考えられた。この着想に基づき、Brz 耐性を示す変異体のスクリーニングが行われ、Brz 存在暗所下で胚軸伸長を示す数種類の *bil* (*Brz-insensitive-long hypocotyls*) 変異体が単離され解析が進められた。その中で最初に得られた *bil1-1D/bzr1-1D* は原因遺伝子が同定され、通常は細胞質に局在し、BR 刺激によって細胞核に移動する転写因子 BIL1/BZR1 であることが明らかになった。同様の

手法により、BR 受容体 BRI 1 から核移行型転写因子 BIL1/BZR1 の間の情報伝達経路に関わる因子が探索され、EMS 法やアクティベーションタギング法などの変異誘発法により幾つかの *bil* 変異体が単離され、原因遺伝子の確定と機能解析が進められている。

BR 情報伝達経路は研究が進むにつれ、より複雑なシステムであることが明らかになりつつあり、その詳細な制御機構の解明のためには、新たな BR 情報伝達因子の存在が予測される。それらの単離の為に、新たな変異源誘発法として構築された FOX ハンティングシステムによる変異体群を用いることにより、新規な BR 機能獲得型変異体の探索が可能になると考えた。本研究では FOX ラインより、これまで得られてこなかった新たな *bil* 変異体をケミカルバイオロジーにより選抜し、その原因遺伝子の確定と機能解析を行うとともに、ケミカルバイオロジーの応用的展開として BIL1/BZR1 の新たな虫害耐性作用の解析を行い、BR 情報伝達機構のさらなる解明を目的とした。

2. ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz 耐性変異体 *bil7-1D* の解析

約 8,000 ラインの FOX 変異種子より、暗所 Brz 下で最も胚軸伸長を示す *bil7-1D* を選抜した。解析の結果、*bil7-1D* は新規機能未知タンパク質をコードする遺伝子 *BIL7* の高発現体であった。*BIL7* 遺伝子はその配列に既知の機能ドメインの存在が認められないが、イネやヒメツリガネコケなど広い植物種において相同性の高い遺伝子が存在すると共に、それらの間には高度に保存される未知のドメインが存在し、植物において重要な機能を持つ遺伝子であると推測された。

bil7-1D は成熟時に野生型に比べ花茎が約 1.5 倍長くなる形態的特徴を示した。この花茎伸長は *BIL7* 高発現体 (*BIL7-OX*) でも再現され、*BIL7* 低発現体 (*BIL7-RNAi*) ラインでは野生型より花茎長が短化していた。また *bil7-1D* および *BIL7-OX* では、BR 情報伝達活性化時にフィードバック機能により抑制される BR 生合成遺伝子 *DWF4* と *CPD* の発現量の低下が認められ、さらに BR 生合成中間体内生量および活性化型 BR 内生量が低下していることが明らかとなった。また *BIL7pro::GUS* による器官別発現解析で、*BIL7* は発芽初期の胚軸や茎頂、初期花茎など細胞伸長および分化初期部位に特異的に発現が高い傾向を示した。これらの結果から *BIL7* タンパク質は、植物の生育に関与し、胚軸や花茎の伸長を BR 情報伝達の活性を通して促進する機能を持つと考えられた。

35S::BIL7-GFP 形質転換体による局在解析では、*BIL7* は通常、主に細胞膜のみに局在するものの、発芽初期や根の伸長領域など生育が活発な場所では核にも局在していることが観察され、*BIL7* は生育の状況に応じて局在が制御されていると

推察された。またこの BIL7 の局在は細胞膜のみの場合でも、ブラシノライド (BL) 処理により核局在への変化が促進されることが確認された。

以上のことから、BIL7 は BR 情報伝達を活性化し、植物の生育を促進させる機能をもつ新規因子であると推察された。

3. ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz 耐性変異体 *bil1-1D/bzr1-1D* の虫害耐性機能の解析

BR 研究において BR が病害抵抗性の向上に促進的機能を持つ事が知られていたが、昆虫による食害への効果については未解明であった。本研究では、Brz を用いたケミカルバイオロジー研究によって第一に同定された因子であると共に、2 章での研究によって BIL7 により活性化され核移行することが示されたシロイヌナズナ BR 情報伝達におけるマスター転写因子である BIL1/BZR1 とネギアザミウマの食害との関連について解析を試みた。解析の結果、シロイヌナズナ BIL1/BZR1 の機能獲得型変異体 *bil1-1D/bzr1-1D* は、野生型に比べ明瞭にアザミウマの摂食食害に対する耐性を示した。続いて、マメ科のモデル植物であるミヤコグサにシロイヌナズナの *bil1/bzr1* 変異遺伝子の導入を行った。シロイヌナズナ *bil1/bzr1* を形質転換したミヤコグサ *Lj-bil/bzr1-0X* は、その暗所発芽において、Brz 耐性の胚軸伸長を示し、導入した *bil1/bzr1* 変異遺伝子による形質がミヤコグサにおいても再現されていることが明らかとなった。続いて、この *Lj-bil/bzr1-0X* についてアザミウマの摂食試験を行ったところ、形質転換体において摂食食害耐性が確認された。これらの結果から、シロイヌナズナ *bil1/bzr1* 変異遺伝子が、植物種間を越えてアザミウマ耐性遺伝子として機能することが推測された。さらに、このシロイヌナズナ *bil1/bzr1* 変異遺伝子によるアザミウマ耐性の分子機構について解明する為、傷害応答性の植物生理活性物質であるジャスモン酸 (JA) 関連遺伝子の遺伝子発現について解析した所、JA 酸応答性遺伝子である *VSP2* の発現がシロイヌナズナ *bil1/bzr1* 変異体において、ミヤコグサ *LjVSP1b* の発現がミヤコグサ *Lj-bil/bzr1-0X* において、野生型株より高くなっていることが確認された。これらのことから、シロイヌナズナ *bil1/bzr1* 変異遺伝子が JA シグナル伝達経路を活性化することによって、摂食虫害耐性を誘導している可能性が考察された。

以上のことから、ケミカルバイオロジーで単離された因子の農業利用としての応用展開の可能性が示された。ケミカルバイオロジー研究は、基礎研究のみならず、応用研究への広がりへの貢献も期待されると考えられる。