

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宮地朋子

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が、情報伝達経路については未解明部分が多く残されている。BR 情報伝達経路は現在明らかになっている経路より複雑なシステムを構成す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、その存在が予測される新たな BR 情報伝達因子の同定・解析が必要である。本研究では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から新たな bil 変異体を選抜し、機能解析を行うとともに、成果の応用的展開として BIL1/BZR1 の新たな虫害耐性作用への関わりについて解析を行うことで、BR 情報伝達機構の解明と応用を目指した。本論文は、その研究成果をまとめたもので 4 章からなる。

第1章の序論で現状を概観したのち、第2章では BR 生合成阻害剤 Brz 耐性変異体 bil7-1D の単離と解析結果について試みている。FOX ラインより、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 高発現体(BIL7-OX)を作製し解析した結果、BR 生合成遺伝子発現や BR 生合成内生量の低下から、BIL7 は BR 情報伝達活性化因子であると考えられた。また、BIL7 は特異的に花茎伸長促進作用を持つことも明らかとなった。BIL7 は通常、主に細胞膜のみに局在するが、発芽初期など生育活発な場所では、核にも局在することが観察され、BIL7 は生育状況に応じて局在が制御されていると推察された。また BIL7 の核移行は、ブラシノライド(BL)処理、BR 情報伝達抑制型キナーゼ BIN2 阻害剤 Bikinin 処理、BR 情報伝達活性化型フォスファターゼ BSU1 の酵素活性化を促す Mn イオン処理によっても認められた。また western 解析により、これら BL、Bikinin やマンガンイオン処理により BIL7 タンパク量の増加が認められた。これらの事より、BIL7 は BR 情報伝達が活性化状態となり生育が活発である場合に安定化し、細胞質および核への移行を示すと考察された。BIL7 は、酵母 two-hybrid 法により BSU1、BIN2、BIL1/BZR1 と相互作用することが明らかとなった。さらに BiFC 法解析により、BIL7 は BSU1、BIN2 と細胞質で相互作用していた。そして BIL7 と BIL1/BZR1 の相互作用は無処理条件下において細胞質に、BL 処理条件下において細胞質と核に観察された。BIL7 が BIL1/BZR1 に与える影響を western 法により解析した結果、bil7-1D および BIL7-OX 植物体では、無処理では野生型と大きな違いは無いが、BL 処理により活性化型である脱リン酸化型 BIL1/BZR1 タンパク量が、野生型と比べ顕著に増加することが明らかとなった。以上のことから、BIL7 は BR 情報伝達の活性化の状態により、BSU1 や BIN2 の作用を受けながら、安定化され、細胞膜から細胞質へと移行した後、BIL1/BZR1 と相互作用し、活性化型 BIL1/BZR1 のタンパクの蓄積を促進すると推察され、またこれまで不明であった BIL1/BZR1 の核輸送の促進的因子として機能している可能性が示唆された。

第3章ではBR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について試みた。BRが病害抵抗性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。そこで本研究では、BR情報伝達におけるマスター転写因子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* 変異遺伝子の導入したところ、形質転換体においてもアザミウマの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、分子機構解明の為、傷害応答性の植物生理活性物質であるジャスモン酸(JA)関連の遺伝子発現を解析した所、JA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-bil1/bzr1-OX* 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。

第4章では、本研究の総括と今後のブラシノステロイド情報伝達系の解明と応用に向けた展望がまとめられている。

以上、本研究で申請者はFOXハンティングシステムによる変異体群から新たな *bil* 変異体である *bil17* を選抜し、機能解析を行うとともに、成果の応用的展開としてBIL1/BZR1の新たな虫害耐性作用への関わりについて解析を行うことで、BR情報伝達機構の解明と応用を目指した。ブラシノステロイド情報伝達の研究は植物の成長、発育やストレスへの耐性メカニズムを解明するため重要な研究のひとつであり、そのメカニズム解明研究を通して、植物の成長を調節し、農業生産を引き上げることが可能である。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。