

博士論文(要約)

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

平成 22 年度進学 宮地朋子

指導教官 浅見忠男



Tokyo, 2013

目次	- i -
図表目次	- iii -
略語表	- vi -
第1章 序論	
1-1 ブラシノステロイド	-1-
1-2 ブラシノステロイド生合成経路と生合成変異体	-2-
1-3 ブラシノステロイド情報伝達経路	-6-
1-4 ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz による化学生物学解析	-9-
1-5 ブラシノステロイドにおける化学生物学的研究とその 応用展開	-11-
2章 ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz 耐性突然変異体 <i>bil7-1D</i> の解析	
2章 緒言	-13-
2-1 FOX ラインからの <i>bil 7-1D</i> 変異体の選抜と機能解析	-16-
2-2 <i>bil7-1D</i> 原因遺伝子の単離	-29-
2-3 <i>BIL7</i> 遺伝子の植物体における分子機能の解析	-46-
2-4 <i>BIL7</i> 遺伝子のブラシノステロイド情報伝達における機能解析	-66-
2章 考察	-81-
2章 実験方法	-85-
第3章 ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz 耐性突然変異体 <i>bil1-1D/bzr 1-1D</i> の虫害耐性機能の解析	
3章 緒言	-104-

3-1	<i>bill-1D/bzr1-1D</i> のネギアザミウマ食害耐性評価	-105-
3-2	ミヤコグサのアラビドプシス <i>bill/bzr1</i> 遺伝子高発現体の 作製	-106-
3-3	Lj- <i>bill/bzr1-0X</i> のネギアザミウマ食害耐性評価	-107-
3-4	<i>bill/bzr1</i> のアザミウマ食害耐性における葉の表面構造の 検討	-108-
3-5	<i>bill/bzr1</i> のアザミウマ食害耐性におけるジャスモン酸応答 遺伝子の検討	-108-
3 章	考察	-110-
3 章	図表	-114-
3 章	実験方法	-121-
第 4 章	結論	-125-
	本論文の要旨	-126-
	参考文献	-131-
	謝辞	-145-

Figure

- 3-2 シロイヌナズナ *bill-1D/bzr1-1D* 変異体はアザミウマ食害耐性を示す ---115
- 3-3 ミヤコグサの暗所胚軸伸長は Brz により抑制され、BL により回復する ---116
- 3-4. ミヤコグサ *bill/bzr1* 形質転換体 ( *Lj-bill/bzr1-0X* ) は暗所胚軸伸長において Brz 耐性を示す ---117
- 3-5 ミヤコグサ *bill/bzr1* 形質転換体 ( *Lj-bill/bzr1-0X* ) はアザミウマ食害耐性を示す -118
- 3-6 変異 *bill/bzr* および *bill/bzr1* 過剰発現はアラビドプシスおよびミヤコグサにおいて葉の表皮細胞とトライコームの形状に変化を及ぼさない ---119
- 3-7 JA およびアザミウマ食害のマーカー遺伝子の *bill-1D/bzr1-1d* および *Lj-bill/bzr1-0X* での発現 ---120

## 略語表

AD	Activation domain
<i>AOC2</i>	<i>alle oxide cyclase 2</i>
<i>AOS</i>	<i>allene oxide synthase</i>
BAK1	BRI1-Assosiated Receptor Kinase 1
BD	DNA binding domain
BES1	BRI1-EMS SUPRESSOR 1
BGL2	<i><math>\beta</math>-1, 3-glucanase-encoding PR gene;</i>
BiFC	Bimolecular fluorecence complementation
<i>bil</i>	<i>Brz-insensitive-long hypocotyl</i>
BIL1/BZR1	BRZ-INSENSITIVE-LOMG HYPOCOTYL 1/BRASSINAZOLE RESISTANT 1
BIL7	Brz-insensitive-long hypocotyl 7
BIL7-OX	<i>BIL7 overexpression</i>
BIN2	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2
BKI1	BRI1-KINASE INHIBITOR
BL	brassinolide
BR	brassinosteroid
Brz	Brz220
<i>bri1</i>	<i>brassinosteroid insensitive</i>
BSK1	BR SIGNALING KINASE 1
BSU1	BRI1-SUPPRESSOR 1
CaMV	Cauliflower mosaic virus
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CGD1	constitive differential growth 1
chi $\beta$	<i><math>\beta</math>-chitinase</i>

<i>cpd</i>	<i>constitutive photomorphogenesis and dwarfism</i>
CS	castasterone
<i>det2</i>	<i>de-etiolated-2</i>
<i>dwf4</i>	<i>dwarf4</i>
DMSO	dimethylsulfoxide
D. W.	distilled water
ET	ethylene
FOX	Full-length cDNA Over-expressing gene
GFP	green fluorescent protein
<i>GUS</i>	<i><math>\beta</math>-glucuronidase</i>
JA	jasmonic acid
kDa	kilodalton
<i>LOX2</i>	<i>lipoxygenase 2</i>
MS	Murashige & Skoog
<i>NOS</i>	nopaline synthase
<i>PDF1.2</i>	<i>plant defensin 1.2</i>
PP2A	protein phosphatase 2A
RNAi	RNA interference
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
SA	salicylic acid
<i>VSP2</i>	<i>vegetative strage protein 2</i>
YFP	Yellow Fluorescent Protein

## 第1章 序論

### 1-1 ブラシノステロイド

ステロイドホルモンは、哺乳類において男性ホルモンや女性ホルモン、副腎臓皮質ホルモンなどとして、昆虫においては甲殻類の脱皮ホルモン、エクジソンとして長く知られていた。植物においては、1970年代にセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) の花粉から植物生長促進物質としてブラシノライド (BL) が単離され、その存在が明らかとなった (Grove *et al.* 1979)。BL は現在 70 種を超える類縁体が多く植物から単離され、ブラシノステロイド (BR) と総称されている (Zhao and Li 2012)。

BR は植物界に広く分布しており、その作用は細胞伸長や細胞分裂の促進、病害等のストレス応答など多岐に渡る。また BR 欠損は発芽時の暗所光形態形成や栄養生長期の葉や茎の矮性形質などを示し、植物の生育の多様な面において重要な役割を果たしていることが明らかにされている。

BR 欠損による植物の矮化形態は、その耐倒伏性から栽培作物に有用な形質とされ、昔から利用されてきた。日本古来のオオムギ品種「渦」は、半矮性の形質であることから有効な育種性質として重用されてきたが、その原因遺伝子が BR 受容体の相同性遺伝子であることが明らかとなった (Chono *et al.* 2003)。その他にも、エンドウやアサガオなどの矮性品種が、近年になり BR 欠損変異体であることが示され、BR による形態の制御は身近なところで利用されてきたことが明らかとなった。

## 1-2 ブラシノステロイド生合成経路と生合成変異体

BR は発見当初から生長促進作用が認められていたが、その多面的な生理作用のため、長い間植物ホルモンとして認識されなかった。しかし、1990年代にアラビドプシスにおいて暗所光形態形成を示す矮性変異体 *de-etiolated-2(det2)* が単離され (Chory *et al.* 1991)、この変異体が BR 生合成欠損を原因とすることが明らかとなった (Fujioka *et al.* 1997, Li *et al.* 1997)。この発見を契機として、存在が知られていた矮性変異体の多くは BR 生合成欠損が原因であることが明らかとなった。その結果、BR は 6 番目の植物ホルモンとして認識されるようになり、BR 生合成経路の解明も進んでいった。

*det2* は内生 BR の減少が酵素活性の欠損と直接リンクしていることが示された最初の変異体であったために (Chory *et al.* 1991, Fujioka *et al.* 1997, Li *et al.* 1997)、BR 生合成欠損変異体の多くは *det2* 変異体の形態を指標に単離されてきた。BR 生合成欠損変異体を明所で生育した場合に認められる形質として、矮化、葉の暗緑色化、頂芽優性の減少、稔性の低下などを挙げるができる (Fig. 1-1)。暗所での生育では、通常のいわゆる「もやし様形態 (etiolation)」が見られず、胚軸の伸長抑制や子葉の展開などの暗所光形態形成を示し、これらの形態は BR を与えることにより野生型の形態へと回復する (Chory *et al.* 1991, Clouse and Sasse 1998, Szekeres *et al.* 1996)。同じ様に *constitutive photomorphogenesis and dwarfism(cpd)* (Szekeres *et al.* 1996) や *dwarf4(dwf4)* (Azpiroz *et al.* 1998, Choe *et al.* 1998, Choe *et al.* 2001) も BR 生合成遺伝子 *CPD*、*DWF4* の欠損変異体であり、矮化形態を示す。*DWF4* は BR 生合成経路における律速酵素である (Fujita *et al.* 2006)。

以下、BR の生合成経路について述べる (Fig. 1-2)。BR 生合成経路では生合成前駆体 campesterol (CR) は campestanol (CN) に変換されるが、ここから早期 C6 酸化経路と後期 C6 酸化経路という 2 つの経路により BL に変換されることが知



られている。早期 C6 酸化経路では、CN は主に 6-oxocampestanol (6-oxoCN) に、そして cathasterone (CT)、teasterone (TE)、3-dehydroteasterone (3DT)、typhasterol (TY)、castasterone (CS) へとそれぞれ変換される。後期 C6 酸化経路では CN から 6-deoxo-TE、6-deoxo-TY を経て CS へと変換され、両経路で生成された CS はその後 1 つの経路により最終的に BL へと変換される。この両経路について生体内での機能を比較することにより、現在では後期 C6 酸化経路が主経路であると考えられている (Nomura *et al.* 2001)。また、早期 C22 酸化経路は上述の CN を経路せず、CR 等の前駆体が C22 位の酸化を経て 6-deoxoTY へ至る経路であり、BR 上流生合成経路では主経路であると考えられている (Fujioka *et al.* 2002, Ohnishi *et al.* 2012)。また近年、生化学的手法を用いた P450 の解析により新規ショートカット経路が提唱されている (Ohnishi *et al.* 2006)。

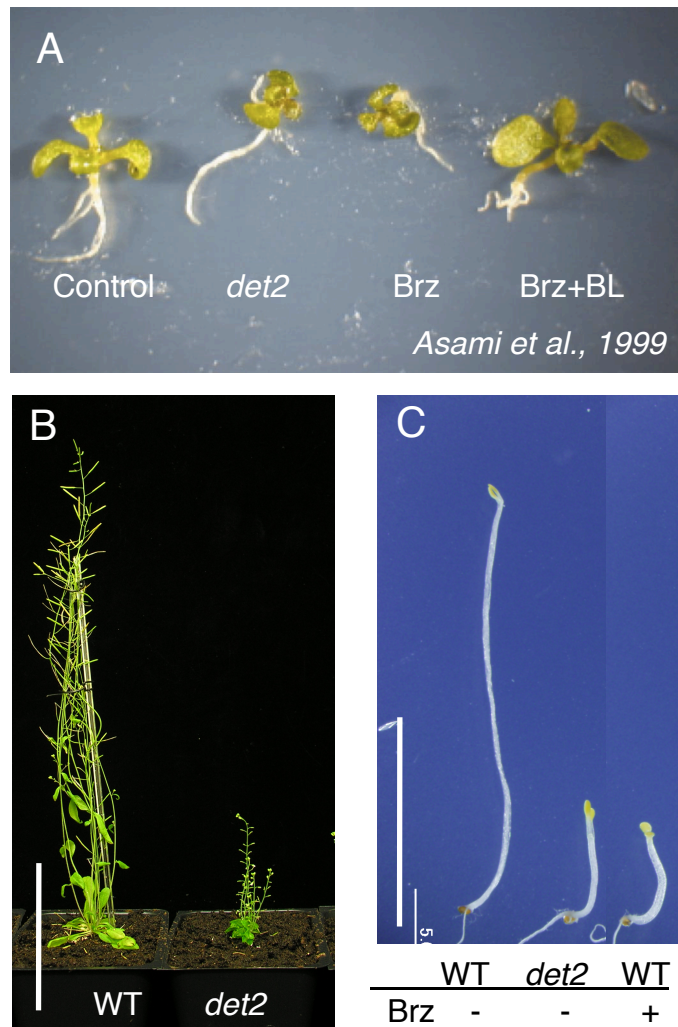
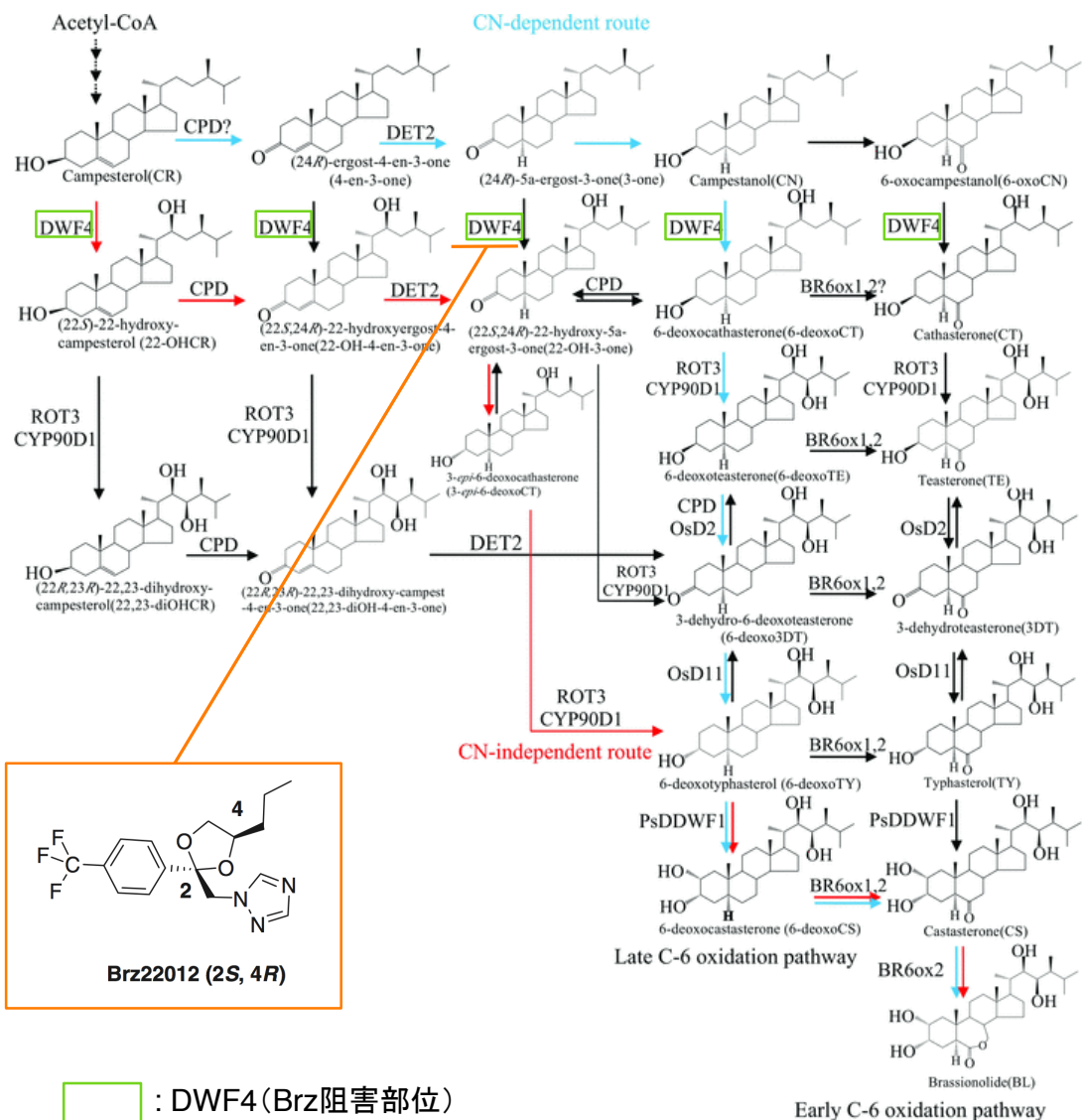


Fig. 1-1. BR生合成欠損変異体*det2*とBR生合成阻害剤Brz処理植物体

BR欠損変異体*det2*およびBrz処理植物体は、明所生育では矮性形態を示し、暗所発芽では胚軸が短化し、子葉が展開する暗所光形態形成を示す

- A. 8日目植物体、左より 野生型無処理、*det2* 無処理、野生型 Brz 1  $\mu$ M処理、野生型 Brz 1  $\mu$ M+BL 10 nM処理
- B. 60日目植物体、Scale bars = 10 cm
- C. 暗所7日目植物体、Brz 3  $\mu$ M、Scale bars = 5 mm



Zhao and Li (2012) *J Integr Plant Biol.*

Fig. 1-2 BR生合成経路とBrzの阻害部位

BR生合成経路では後期C6酸化経路および早期C22酸化経路が主経路であると考えられている。

BR生合成阻害剤BrzはチトクロームP450酸化酵素であるDWF4に作用し、DWF4の触媒する側鎖22位の水酸化反応を阻害する。

### 1-3 ブラシノステロイド情報伝達経路

BR 欠損による形態が明らかになったことから、BR 生合成欠損変異体と類似した矮化した形態を示しながら、その形態が BR の投与によって回復しない変異体は BR 情報伝達遺伝子に欠損を持つことが予測された。この考えに基づき、BR 情報伝達欠損変異体の探索が 1990 年代後半に幾つかのグループによって行われ、1996 年に *bril* (*brassinosteroid insensitive 1*) が単離された (Clouse *et al.* 1996)。同定の結果、この変異原因遺伝子はロイシンリッチリピート (LRR) 配列と膜貫通ドメインを持つ受容体型セリン/スレオニンキナーゼ (リン酸化酵素) をコードしていることが明らかになった (Li and Chory 1997)。その後、BR との直接的な結合性が証明され、BRI1 が細胞膜上の BR 受容体であることが確認された (Kinoshita *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005)。

BR 情報伝達は、細胞膜上の受容体 BRI1 で BR が受容された後、核において転写が活性化されるまでの経路が現在までに徐々に明らかにされつつある。以下、現在提唱されている BR 情報伝達経路について述べる (Fig. 1-3)。BR が BRI1 (Kinoshita *et al.* 2005) に結合すると、BRI1 は自己リン酸化し、細胞膜局在の抑制型因子 BRI1-KINASE INHIBITOR 1 (BKI1) (Wang and Chory 2006) が細胞膜から解離する。BKI1 の解離により BRI1 は共受容体である BRI1-Associated Receptor Kinase 1 (BAK1) (Li *et al.* 2002, Nam and Li 2002) と相互作用できるようになり、BAK1 と細胞膜局在の活性化型キナーゼ BR SIGNALING KINASE 1 (BSK1) (Tang *et al.* 2008) をリン酸化して活性化させる。活性化した BSK1 は続いて、細胞質の BR 情報伝達活性化型フォスファターゼ BRI1-SUPPRESSOR 1 (BSU1) (Mora-Garcia *et al.* 2004) をリン酸化し活性化させる。活性化した BSU1 は BR 情報伝達抑制型キナーゼ BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2) (Kim *et al.* 2009, Li and Nam 2002) を脱リン酸化し、脱リン酸化された BIN2 はプロテアソームにより分解される (Kim *et al.* 2009, Li and Nam 2002, Peng *et al.* 2008)。

通常、内生 BR が低濃度の BR 情報伝達抑制条件においては、転写因子 BRZ-INSENSITIVE-LOMG HYPOCOTYL 1/BRASSINAZOLE RESISTANT 1 (BIL1/BZR1) (Asami *et al.* 2005, He *et al.* 2005, Wang *et al.* 2002) および そのホモログ BRI1-EMS SUPPRESSOR 1 (BES1) (Yin *et al.* 2005, Yin *et al.* 2002) は BIN2 によってリン酸化されることで低活性状態に保たれている。一方、内生 BR が高濃度の BR 情報伝達活性化条件においては、上記 BIL1/BZR1 および BES1 は BR 情報伝達活性化型フォスファターゼ protein phosphatase 2A (PP2A) (Tang *et al.* 2010) により脱リン酸化され、活性型となる。そして脱リン酸化された活性型 BIL1/BZR1 と BES1 は核内へ移行し、BR 応答遺伝子の発現を誘導する。また BR 情報伝達抑制因子 14-3-3 (Gampala *et al.* 2007) は BR 情報伝達抑制時に BIL1/BZR1 および BES1 に結合して、細胞質に保持することによって、BIL1/BZR1 および BES1 の核内への移行を抑制する。

上記のようにこれまでに多くの BR 情報伝達因子が単離、解析されているが、主要経路においても、PP2A の活性化機構や BIN2 と BIL1/BZR1 の相互作用の細胞内局在、BIL1/BZR1 の核移行促進に関わる動力源因子が未同定であるなど、詳細メカニズムについては、不明な点が未だに多く残っている。

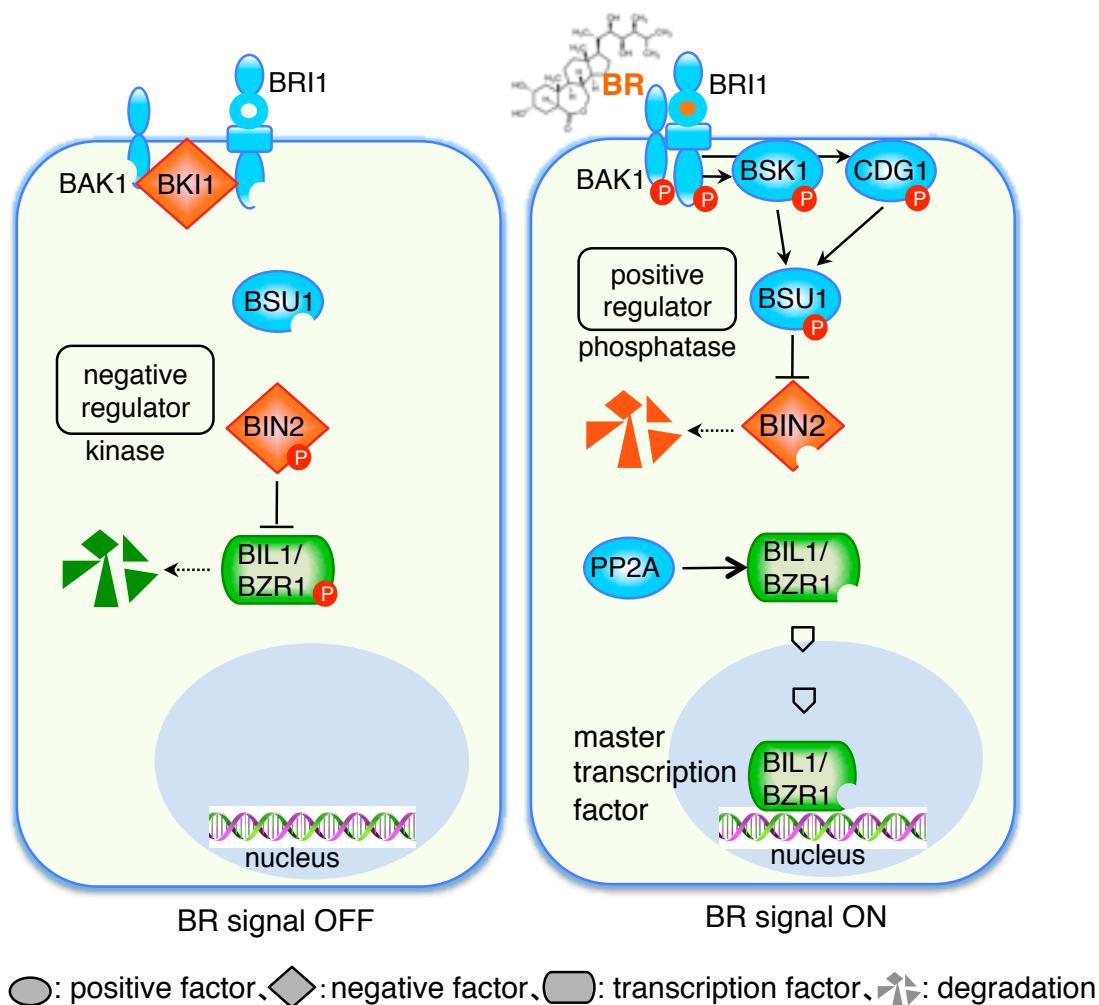


Fig. 1-3 本研究以前のBR情報伝達機構のモデル図

<BR情報伝達抑制化状態>

BIL1/BNZR1はBIN2によりリン酸化され、分解される。

<BR情報伝達活性化状態>

BIL1/BZR1はPP2Aにより脱リン酸化され活性化型となり、核内へと移行することによりBR応答遺伝子の発現が誘導される。

#### 1-4 ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz による化学生物学 (ケミカルバイオロジー) 的解析

Brz は 1999 年に創製された (Asami *et al.* 2000, Asami *et al.* 2001)。Brz は BR 生合成に特異的な阻害剤であり、トリアゾール環とシトクロム P450 が内包するヘムとの親和性によって、シトクロム P450 酵素である DWF4 に結合し、DWF4 の触媒する側鎖 22 位水酸化反応を阻害する (Fig. 1-2) (Sekimata *et al.* 2008)。この化合物により活性型 BR である BL の生成を抑えることが可能となり、容易に BR 欠損状態の植物が作り出せるようになった。

Brz 処理により、植物体は BR 生合成や情報伝達の欠損変異体と同様に、明所発芽においては葉が濃緑色となり極端な矮化を示し、暗所発芽においては本来の形態である胚軸が伸長した「もやし形態」を示さずに、胚軸が短化し子葉が展開する暗所光形態形成を示す (Fig. 1-1)。そこで、この暗所 Brz 存在下にもかかわらず、胚軸が伸長する変異体が得られれば、それは BR 情報伝達が活性化した変異体であるという着想に基づき (Fig. 1-4)、EMS 突然変異体種子 20 万粒の中から 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 *bil* (*Brz-insensitive-long hypocotyl*) 変異体 *bil1-1D/bzr1-1D* が単離された (Asami *et al.* 2003)。その後の変異体原因遺伝子の解析によって BIL1/BZR1 は BR 情報伝達のマスター転写因子であることが明らかとなった (He *et al.* 2005)。同様の *bil* 変異体選抜手法によりアクティベーションタギングラインより BR 情報伝達活性化因子として 7 回膜貫通型タンパク質 *Brz-insensitive-long hypocotyl 4* (*BIL4*) (Yamagami *et al.* 2009) やミトコンドリア局在性の DnaJ 相同遺伝子 *Brz-insensitive-long hypocotyl 2* (*BIL2*) (Bekh-Ochir *et al.* 2013) が単離、同定された。また、明所 Brz 存在下でも葉が濃緑色を示さない形態を指標とした選抜によって、葉緑体制御因子で

ある葉緑体局在性の GTP 結合型タンパク質 *Brz-insensitive-pale green 2(BPG2)* が同定されている (Komatsu *et al.* 2010)。



*bil* (*Brz-insensitive-long hypocotyl*)

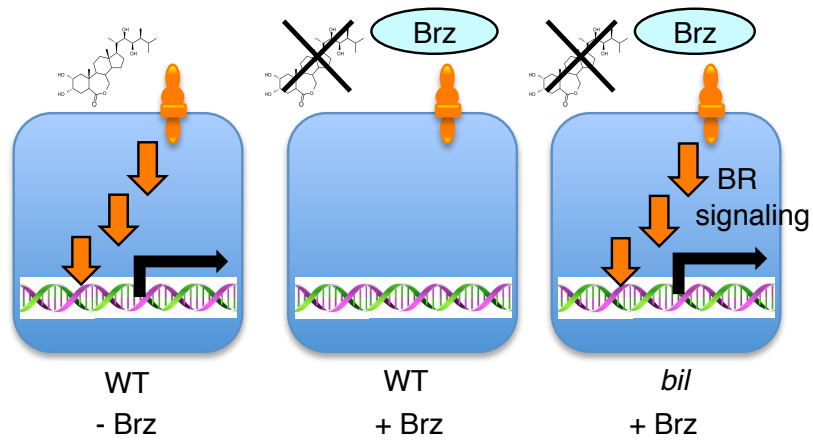
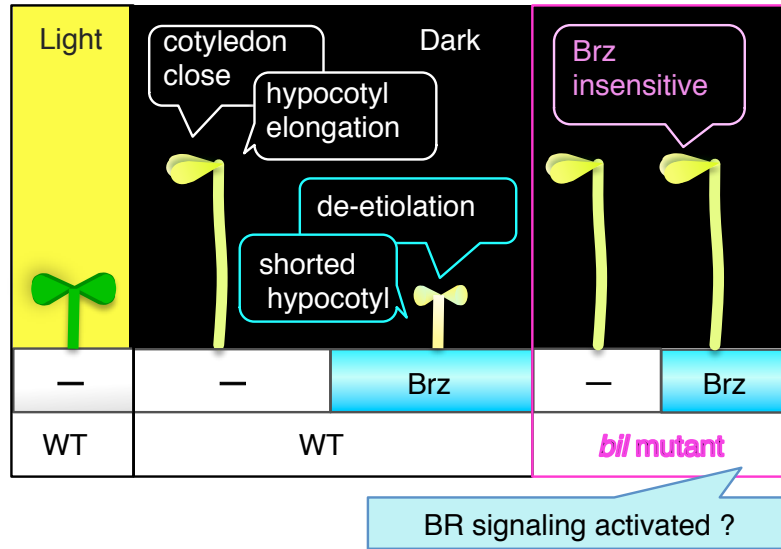


Fig. 1-4 *bil* (*Brz-insensitive-long hypocotyl*) 変異体選抜の原理

Brz : Brassinosteroid biosynthesis inhibitor

## 1-5 ブラシノステロイドにおける化学生物学的研究とその応用展開

本研究の第2章では、BR 情報伝達機構解明のため阻害剤 Brz を用いた選抜により実験植物アラビドプシスの突然変異体 *bil7-1D*(*Brz-insensitive-long hypocotyl 7*)を単離し、その原因遺伝子の機能解析を行う化学生物学的研究(ケミカルバイオロジー)を行った。BR における生合成や情報伝達経路の解明研究では、前述のように主に機能欠損型突然変異体の解析が行われてきた。しかし BR 機能欠損型変異体の解析だけでは未解明の部分が多く残されていた。Brz を用いた *bil* 変異体の選抜は、BR 機能欠損変異からの復帰変異体の探索に比べて、BR 機能獲得型変異体の単離を比較的簡便に行える点、さらに既存の変異体ライン群をそのままスクリーニングに利用出来る点で有利である。

BR は植物の生長に多くの局面で促進的に働くことが知られているが、BR とその類縁体は合成が困難なことから高価であり、農業現場においては BR 自身やその類縁体の成長促進剤としての使用は困難である。日本では未だ、遺伝子組み換え植物の商業利用は行われていないが、遺伝子組み換え植物が消費者に認められる将来を想定した場合、BR 情報伝達因子を用いて BR 活性を高めた植物を育種することは、それらの因子によって生育促進やストレス耐性の向上などの形質を持たせることが期待できるために農業上有益であると考えられる。そこで将来を念頭においた先行研究が必要であると考え、本研究の第3章では、Brz を用いた選抜方法により最初に同定された *BIL1/BZR1* について、その遺伝子の特性を利用した有用形質の探索を行った。つまり、広い目で見たと化学生物学的研究(ケミカルバイオロジー)の農業利用への応用展開の可能性の検討を行った。

## 第2章 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

本章の内容は、学術論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

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

#### 3 章 緒言

BR は植物の生育に促進的に働く植物ホルモンであるが、生物学的および非生物学的なストレス応答にも深く関わっている (Bajguz and Hayat 2009)。BR は細胞膜上の受容体 BRI1 に受容された後、幾つかのリン酸化カスケードを経て、転写因子 BIL1/BZR1 および、そのホモログである BES1 を活性化する。*bil1-1D/bzr1-1D* は、1 アミノ酸置換変異により BIL1/BZR1 タンパク質が安定化して核に蓄積した優性変異体であり、BR 生合成阻害剤 Brz を用いたケミカルバイオロジー手法により選抜された。BIL1/BZR1 は約 3500 種類の BR 応答遺伝子を制御している事から、BR 情報伝達のマスター転写因子であると考えられている (Sun *et al.* 2010)。*bil1-1D/bzr1-1D* は暗所 Brz 存在下で非常に強い胚軸伸長を示し (Bekh-Ochir *et al.* 2013, Yamagami *et al.* 2009)、BR 非感受性変異体 *bri1* や *bin2* の胚軸短化形態を回復させる (He *et al.* 2005, Wang *et al.* 2002)。近年の研究では、BIL1/BZR1 が生育以外にも、光やストレス、そしてオーキシシン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン (ET)、サイトカイニン (SA)、ジャスモン酸 (JA) といった他の植物ホルモン応答にも関わっていることが明らかとなってきている (Sun *et al.* 2010)。

BR 情報伝達は植物の自然免疫にも関わっており、BL 処理はシュードモナスなどの植物病原菌に対する抵抗性を増加させる (Nakashita *et al.* 2003)。また、BRI1 の共受容体である BAK1 と BR 情報伝達の活性化型因子である BSK1 は pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) の受容体 FLAGELLIN SENSING2 (FLS2) と相互作用し、病原体感染の抵抗性を引き起こす (Chinchilla *et al.* 2007) (Schulze *et al.* 2010) (Shi *et al.* 2013)。このように、BR と

病原菌抵抗性との関連はよく研究されているが、病原菌と同様に植物にとって重大な生物学的ストレスである虫害との関連性について明らかにされていない。

虫による食害は植物の生育を阻害し、作物生産に大きな打撃を与える。中でもアザミウマは、果物、野菜、花そして農業作物と広範囲の食性を持ち、多くの国において重大な害虫となっている (Diaz-Montano *et al.* 2011)。また、アザミウマは食害により直接的に及ぼす害のみで無く、ウィルス等を媒介して深刻な病害を引き起こすことも知られている (Hogenhout *et al.* 2008)。アザミウマには多くの種類があるが、その中でもミナミキイロアザミウマ (*Frankliniella occidentalis*) とネギアザミウマ (*Thrips tabaci*) は特に広い範囲の作物を食害する (Hogenhout *et al.* 2008)。現在、アザミウマの防除方法としては農薬散布が一般的であるが、度々農薬耐性のアザミウマが出現する。その為、害虫による食害に抵抗性を持つ作物を新しく作出するなどの新しい戦略が有効であると思われる。

第 3 章では、ケミカルバイオロジーの農業への応用展開を目指し、Brz 耐性変異体として最初に得られた変異体の原因遺伝子であるアラビドプシスの BIL1/BZR1 とネギアザミウマの食害との関連について解析した。アラビドプシスの *bill-1D/bzr1-1D* 変異体および、ミヤコグサにアラビドプシスの *bill/bzr* を高発現させた変異体について、ネギアザミウマの食害の影響を解析し、BIL1/BZR1 が食害抵抗性にポジティブに働く事を明らかにし、そのメカニズムについて検討を行った。

### 3-1 *bill-1D/bzr1-1D* のネギアザミウマ食害耐性評価

BR 情報伝達が虫の食害に及ぼす影響を解析するため、アラビドプシス BR 受容体 BRI1 の高発現体 *BRI1-OX*、および BRI1 欠損変異体 *bri1-5*、そしてマスター転写因子 *bill-1D/bzr1-1D* 変異体について、ネギアザミウマ食害解析を行っ

た。その結果、*bill-1D/bzr1-1D* のみが野生型に比べて食害の程度が少なく、他は野生型と同程度だった (Fig. 3-1)。そこで、*bill-1D/bzr1-1D* のアザミウマ食害耐性について詳しく解析することとした。

発芽後約 2 週間の植物体を、2 週間アザミウマ存在下で育成した後、1 植物体当たりの食害痕数を解析した。その結果、食害痕が 1 つも認められなかった個体の割合が、*bill-1D/bzr1-1D* では野生型の約 2 倍となり、また、食害痕が 20 以上の個体が、野生型では全体の約 15% であったのに対し、*bill-1D/bzr1-1D* では 0% であった (Fig. 3-2A、B)。これらの結果より、*bill-1D/bzr1-1D* 変異体における BIL1-BZR タンパク質の安定化はアラビドプシスでのアザミウマの食害に耐性を示すことが示唆された。

### 3-2 ミヤコグサのアラビドプシス *bill/bzr1* 遺伝子高発現体の作製

アザミウマの食害における BIL1/BZR1 の有用形質を実用化植物に導入することを目指し、変異 *bill/bzr1* 遺伝子を導入したミヤコグサ形質転換体を作製し、解析した。ミヤコグサの形質転換体でアラビドプシス変異 *bill/bzr1* が正しく機能しているかの判断基準として、BR 生合成阻害剤 Brz 処理化の胚軸伸長を解析した。

アラビドプシスの野生型では、暗所での発芽時に胚軸が伸長する。しかし、BR 生合成阻害剤 Brz 存在下の暗所発芽では胚軸は短化し、その現象は BL 添加により回復する (Asami *et al.* 2000, Asami *et al.* 2001)。ミヤコグサは主要なマメ科のモデル植物であるが、Brz および BL 処理時の胚軸伸長についてはこれまで報告が無かった。そこで、この暗所胚軸について解析した結果、ミヤコグサでもアラビドプシスと同様に Brz 処理により胚軸が濃度依存的に短化し、BL 添加により回復する結果が得られた (Fig. 3-3 A、B)。この結果より、ミヤコグサにおいても、暗所 Brz 下の胚軸伸長が、BR 応答性の判断基準として用い

ることが出来ると判断した。

ミヤコグサ形質転換体は、アラビドプシス変異 *bill/bzr1* 遺伝子を 35S プロモーター下流に接続したベクターを作製し、ミヤコグサ野生型 Gifu に形質転換した。作製した *Lj-bill/bzr1-0X* 形質転換体について Real-time PCR によって *bill/bzr1* 遺伝子の発現を解析した結果、*bill/bzr1* mRNA の高い発現が認められた (Fig. 3-4A)。アラビドプシス *bill-1D/bzr-1D* 変異体は、暗所 Brz 存在化において野生型より胚軸が伸長する現象が見られる (He *et al.* 2005, Wang *et al.* 2002)。 *Lj-bill/bzr1-0X* の暗所での胚軸伸長を解析した結果、アラビドプシスの場合と同様に、無処理では野生型と同程度の長さであるが、 $0.5\ \mu\text{M}$  および  $1\ \mu\text{M}$  の Brz 存在下では、野生型より胚軸が伸長することが明らかとなった (Fig. 3-4 B, C)。これらの結果から、アラビドプシスの変異 *bill/bzr1* 遺伝子は、ミヤコグサにおいても同等の機能を持ち得ると考察された。

### 3-3 *Lj-bill/bzr1-0X* のネギアザミウマ食害耐性評価

ミヤコグサでの *bill/bzr1* 遺伝子の発現が、アザミウマの食害に及ぼす影響について解析するため、発芽 2 週間後の *Lj-bill/bzr1-0X* と野生型を 2 週間アザミウマ共存下で育成し、1 個体あたりの食害痕を計測した。その結果 *Lj-bill/bzr1-0X* では、食害痕が 6 ヶ所以下の個体の割合が、野生型に比べ約 2 倍高くなっていった。また、食害痕が 20 カ所以上の個体の割合が野生型では 14% であったのに対し、*Lj-bill/bzr1-0X* では 0% であった (Fig. 3-5A, B)。解析は 2 回行い、同様に *Lj-bill/bzr1-0X* において食害痕の減少が確認された。この結果より、アラビドプシスの変異 *bill/bzr1* がミヤコグサにおいて、アザミウマ食害に対して耐性を示す機能を果たしていると考察された。

### 3-4 *bill/bzr1* のアザミウマ食害耐性における葉の表面構造の検討

虫による食害は、まず虫の口が植物の葉表面に接することから始まる。もし、変異体や形質転換体で葉の構造が変化していれば、虫の食害に影響を与えると考えられる。そこで、まず食害耐性メカニズム解明の試みとして、*bill/bzr1* 変異が葉の物理的な構造に変化を与えている可能性について解析するため、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて葉の表皮細胞を観察した。その結果、アラビドプシス *bill-1D/bzr-1D* 変異体およびミヤコグサ *Lj-bill/bzr1-0X* 形質転換体、どちらにおいても、野生型と比べ葉の表面細胞に大きな違いは無かった (Fig. 3-6A, B)。また、多くの昆虫において、トライコームは防御の機能を果たす役割があるため (War *et al.* 2012)、実体顕微鏡を用いて、アラビドプシス *bill-1D/bzr-1D* 変異体の観察をおこなったが、その密度や大きさに野生型と大きな差は認められなかった (Fig. 3-6C)。これら観察の結果から、*bill/bzr1* 変異のアザミウマ食害耐性は、葉の表面構造に由来するものでは無いと考察された。

### 3-5 *bill/bzr1* のアザミウマ食害耐性におけるジャスモン酸応答遺伝子の検討

JA の生合成および情報伝達は、傷害や虫による食害によって誘導され、その下流で応答する遺伝子の幾つかは傷害修復や虫害耐性に関わることが知られている (Howe and Jander 2008)。BIL1/BZR1 は bHLH 型転写因子であることから、BIL1/BZR1 の発現が、JA 応答遺伝子の発現に影響を与えている可能性を検討した。アラビドプシスでは、JA によって誘導される遺伝子である、*vegetative strage protein 2 (VSP2)* および *lipoxygenase 2 (LOX2)* は、アザミウマ食害によっても誘導される (Abe *et al.* 2008a, Lorenzo and Solano 2005)。そこで、食



害を受けていないアラビドプシス *bill-1D/bzr-1D* 変異体について、これらの遺伝子発現について解析した結果、野生型に比べ、*VSP2* は約 3 倍、*LOX2* は約 1.4 倍に発現が増加していることが明らかとなった (Fig. 3-7A)。続いて、アラビドプシス *bill-1D/bzr-1D* 変異体において、JA/ET 経路応答遺伝子であり、さらにアザミウマ食害で誘導される  $\beta$ -chitinase(*chiB*) や *plant defensin* (*PDF1.2*) (Abe *et al.* 2008a, Lorenzo and Solano 2005) の発現について解析した結果、*chiB* の発現は野生型より減少しており、*PDF1.2* の発現は野生型と同程度であることが明らかとなった。また、SA およびアザミウマ食害で誘導される  $\beta$ -1,3-glucanase-encoding PR gene(*BGL2*) (Abe *et al.* 2008a) の発現も *bill-1D/bzr-1D* 変異体では野生型より発現が減少していた。SA は虫害においても JA に拮抗的に働くことが知られている (War *et al.* 2012)。以上の解析は 2 回以上行い、同様の傾向である結果が得られた。これらの結果より、*bill/bzr1* のアザミウマ耐性には JA の関与が示唆された。

*bill/bzr1* 変異による JA 生合成の誘導の可能性を検討するため、JA 生合成遺伝子 *allene oxide synthase* (*AOS*) および *allene oxide cyclase 2* (*AOC2*) (Delker *et al.* 2006) の遺伝子発現について解析を行った。その結果、アラビドプシス *bill-1D/bzr-1D* 変異体では、野生型に比べ *AOS* の発現は同程度であり、*AOC2* の発現は減少していた。解析は 2 回行い、同様の傾向である結果が得られた。JA 内生量については解析していないが、生合成遺伝子の発現から *bill-1D/bzr-1D* 変異体では JA 内生量は増加していないと考察された。

ミヤコグサでは、アラビドプシスの *VSP1*、*PDF1.2* と最もアミノ酸に配列が近い遺伝子として、*LjVSP1b* および *LjPDF1.2* がそれぞれ存在しており、これら遺伝子は MeJA 処理によって発現が誘導される (Suzuki *et al.* 2011)。アラビドプシス *VSP1* と *VSP2* は、アミノ酸配列において非常に相同性の高い遺伝子であり、共に MeJA により発現が誘導される。そこで、ミヤコグサ *Lj-bill/bzr1-0X* 形質転換体において、*LjVSP1b* および *LjPDF1.2* の発現について解析を行った。その

結果、ミヤコグサ *Lj-bill/bzr1-0X* 形質転換体において、野生型と比べ *LjVSP1b* が約 3 倍に増加しており、*LjPDF1.2* は同程度であった。解析は 2 回行い、同様の傾向である結果が得られた。これらの結果から、アラビドプシス変異 *bill/bzr1* 遺伝子によるアザミウマ食害耐性は、JA 応答遺伝子の発現、特に *VSP* 遺伝子の発現によって引き起こされている可能性が考察された。

### 3 章 考察

植物の生育に関して、BR の機能や分子メカニズムは多くの部分が明らかにされてきた。また、BR と病害耐性についても解析が進んでいるが、虫による食害耐性における BR の影響については研究例が未だに少ない。我々は、本研究において、BR 情報伝達と虫害耐性の関係について解析を試みた。BIL1/BZR1 は BR 情報伝達におけるマスター転写因子であり、BR による植物生育という役割において、アラビドプシスでは約 3,500 の遺伝子発現を調節している (Wang *et al.* 2002) (Sun *et al.* 2010)。*bill-1D/bzr1-1D* は、アミノ酸 1 塩基置換により高い安定性が引き起こされた機能獲得型変異体である。

BR と虫害耐性については、2 つの研究報告がある。Campos らは、トマトの BR 生合成欠損変異体 *dpy* では、野生型に比べトライコームの密度と防御関連の代謝物の蓄積が増加し、*Tuna absolut* 幼虫の死亡率が高くなったと報告している (Campos *et al.* 2009)。また Yang らは、タバコにおいて *Manduca sexta* の食害により誘導される JA 蓄積が、BAK1 の発現抑制により抑制されるとしているが、食害耐性については解析されていない (Yang *et al.* 2010)。これらの報告は BR が植物における虫害防御応答に関連していることを示唆しているが、詳細な分子メカニズムについては明らかにされていないことを同時に示している。我々は、本研究において BIL1/BZR1 がアザミウマ食害耐性に機能していることを明らかにした (Fig. 2-2A、B)。

第一に行った解析においてはBR受容体のBRI1過剰発現体 *BRI1-OX* や、BRI1欠損変異体 *bri1-5* は、アザミウマ食害耐性においては野生型と同程度であった (Fig. 2-1)。BR情報伝達活性化変異の *bill1-1D/bzr1-1D* は強い花成遅延形質を示し、*FLOWERING LOCUS D (FLD)* の発現を抑制していると考えられるが、BR受容体およびBRI1共受容体BAK1の欠損型変異体、*bri1* および *bak1* も同様に花成遅延形質を示す。これらのことはBIL1/BZR1とBRI1は異なるメカニズムにより花成を調節していると思われる (Zhang *et al.* 2013)。また、*bill1-1D/bzr1-1D* は暗所Brz下で *BRI1-OX* より強い胚軸伸長を示すことや、BL処理によるVSP2発現の増加は認められなかった (データ不掲載) ことなどから、変異により安定化した *bill/bzr1* タンパク質は、遺伝子発現の調節において異所的または特異的な機能を持っているのかもしれないと考察される。

マメ科は人間の食料としてだけでなく、窒素固定という点からも大変重要である。ミヤコグサはゲノム研究が進められており、マメ科研究の重要なモデル植物である (Udvardi *et al.* 2005)。しかし、多くのマメ科植物は形質転換が困難であるが、ミヤコグサはアグロバクテリウムによる形質転換系が利用できる。

エンドウ (*Pisum sativum*) の変異体 *lka* は、シロイヌナズナBRI1のエンドウでのホモログ *PsBRI1* に変異を持ち、その形態は矮性を示す (Nomura *et al.* 2003)。このことより、BRはマメ科において重要な働きを持っていると思われるが、ミヤコグサにおけるBLやBrz処理時の形態的な反応については明らかにされていなかった。第3章の研究では、ミヤコグサが暗所において、Brz処理により胚軸が短化し、BL処理により回復することを示した (Fig. 3-3A、B)。アラビドプシスの変異 *bill1/bzr1* をミヤコグサで高発現させた形質転体 *Lj-bill1/bzr1-OX* は、アラビドプシス *bill1-1D/bzr1-1D* 変異体と同様に、暗所Brz下で野生型と比べ胚軸が伸長した (Fig. 3-4B、C)。これらの結果から、変異 *bill1/bzr1* 遺伝子はアラビドプシスとミヤコグサにおいて同様の機能として働いていると考察される。さらに、*Lj-bill1/bzr1-OX* はアラビドプシス *bill1-1D/bzr1-1D* 変異体

と同様に、アザミウマ食害耐性も示した (Fig. 3-5A, B)。これらの結果から、変異 *bill/bzr1* 遺伝子は様々な植物種において、アザミウマ耐性として機能する可能性が考えられ、変異 *bill/bzr1* の活用は有用作物のアザミウマからの防御技術として有効である可能性が示されたと考えられる。

第3章において、我々は変異 *bill/bzr1* タンパク質のアザミウマ食害耐性の分子メカニズムの解明を試みた。最初に *bill-1D/bzr1-1D* 変異体と *Lj-bill/bzr1-0X* 形質転換体の葉の表皮細胞について解析を行った。その結果、*bill-1D/bzr1-1D* 変異体および *Lj-bill/bzr1-0X* 形質転換体はそれぞれの野生型と比べ、葉の表皮細胞の構造において、特に大きな違いは認められなかった (Fig. 3-6A, B, C)。これらの結果から、変異 *bill/bzr1* によるアザミウマ耐性は、葉表皮の構造的な変化によるものではないと考察された。

次に、BIL1/BZR1 は転写因子であることから、BIL1/BZR1 高発現植物においてアザミウマ食害によって誘導される遺伝子の発現について解析した (Fig. 2-7A, B, C)。植物での虫害防御では、JA、SA および ET の情報伝達ネットワークが重要な役割を果たしている (War *et al.* 2012)。安部らは (Abe *et al.* 2008a, Abe *et al.* 2008b)、アラビドプシスの JA 経路マーカー遺伝子の *VSP2* および *LOX2*、JA/ET 経路マーカー遺伝子の *BGL2*、そして SA 経路マーカー遺伝子の *chiB* および *PDF1.2* 遺伝子の発現は、アザミウマ食害によって誘導され、それぞれの変異体、JA 非感受性変異体 *coronatin-insensitive1-1(coi1-1)*、ET 非感受性変異体 *ethylene-insensitive2-1(ein2-1)* および *ethylene-insensitive3-1(ein3-1)*、および SA 欠損変異体 *enhanced disease susceptibility16-1(eds16-1)* を用いた解析から、アザミウマ食害耐性には JA が重要な役割として働いていると報告している。そこで、食害を受けていない *bill-1D/bzr1-1D* 変異体でのこれらマーカー遺伝子の発現について解析した。その結果、野生型と比較して *VSP2* および *LOX2* の発現上昇が見られることが明らかとなった。一方、野生型に比べ *PDF1.2* の発現は同程度であり、*chiB* およ

び *BGL2* の発現は減少していることが明らかとなった。さらに、食害を受けていないミヤコグサ *Lj-bil1/bzr1-0X* 形質転換体において、野生型と比較して *LjVSP1b* の発現が上昇し、*LjPDF1.2* は同程度の発現であることが明らかになった。これらの結果より、変異 *bil1/bzr1* のアザミウマ耐性は、JA 情報伝達に関係している可能性が示唆された。*VSP* 遺伝子はフォスファターゼをコードしており、アラビドプシス *VSP2* 組換え体は昆虫の生育を著しく遅らせ、死亡率を増加させる (Liu *et al.* 2005)。そのため、*VSP* は食害害虫に対する防御タンパク質として機能していると考えられる (Liu *et al.* 2005, War *et al.* 2012)。以上の結果は、*BIL1/BZR1* のアザミウマ食害耐性の機能は JA マーカー遺伝子の *VSP* 遺伝子の機能に特に関連している可能性が高いことを示唆している。

野生型では、アザミウマの食害により、JA 生合成と JA 情報伝達の活性化が誘導される (Abe *et al.* 2008a)。そして、JA 処理した植物体は無処理時と比べ高い食害耐性を示す (Abe *et al.* 2008a)。しかし、*bil1-1D/bzr1-1D* 変異体では JA 生合成遺伝子 *AOS* および *AOC2* の発現は野生型と比べ増加していないことが明らかとなった。これらの結果により変異 *bil1/bzr1* 遺伝子による *BIL1/BZR1* タンパク質の恒常的な活性化は、アザミウマの食害を受けない状況下においても、JA 生合成ではなく JA 情報伝達のみを活性化しているのではないかと考察した。

JA 処理による根の伸長阻害は JA 受容体変異体 *coi1* では非感受であるが、BR 生合成遺伝子 *DWF4* の弱い変異により、その非感受は一部抑制される (Ren *et al.* 2009)。また、*DWF4* を過剰発現させた形質転換体は、JA 処理による根の伸長阻害に耐性を示す (Kim *et al.* 2013)。これらのことから、BR は JA 情報伝達に関わっていると推測され、今後、さらなる研究により BR 情報伝達と JA 情報伝達のクロストーク機構が解明されると思われる。

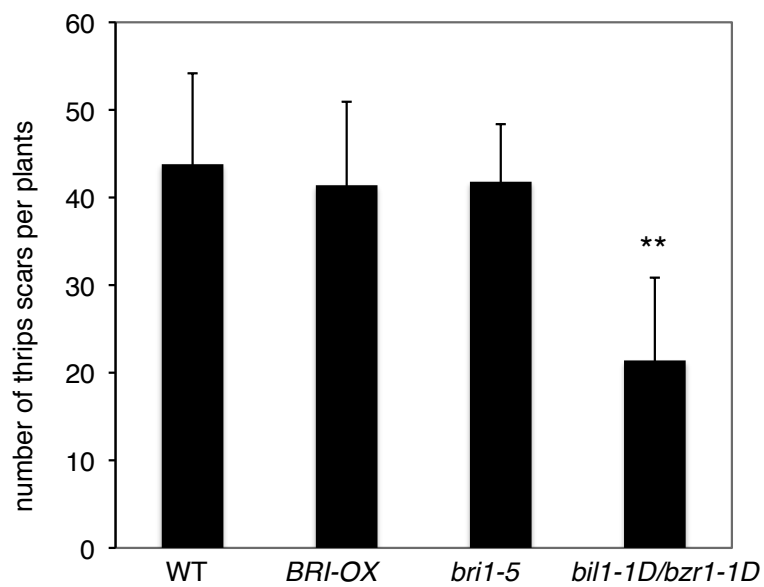


Fig. 3-1. アラビドプシス *bil1-1D/bzr1-1D* 変異体はアザミウマ耐性を示すが、BRI1-OXは示さない。

ネギアザミウマ食害試験3週間目の1個体当たりの食害痕数

n = 5

Error bar = S.D.

\*\* : P < 0.01、Student t test relative to WT

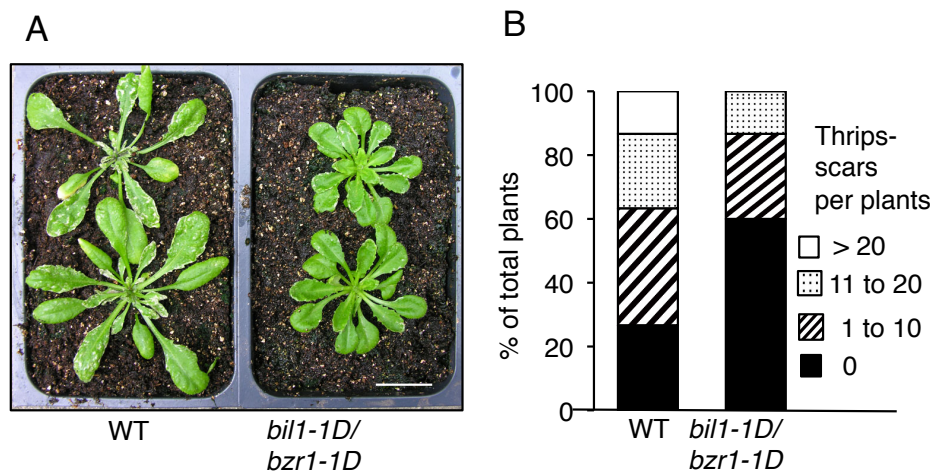


Fig. 3-2 アラビドプシス*bil1-1D/bzr1-1D*変異体はアザミウマ食害耐性を示す

A. ネギアザミウマ食害試験2週間目の植物体

B. ネギアザミウマ食害試験2週間目の1個体当たりの食害痕数割合

n = 30

Scale bar = 2 cm

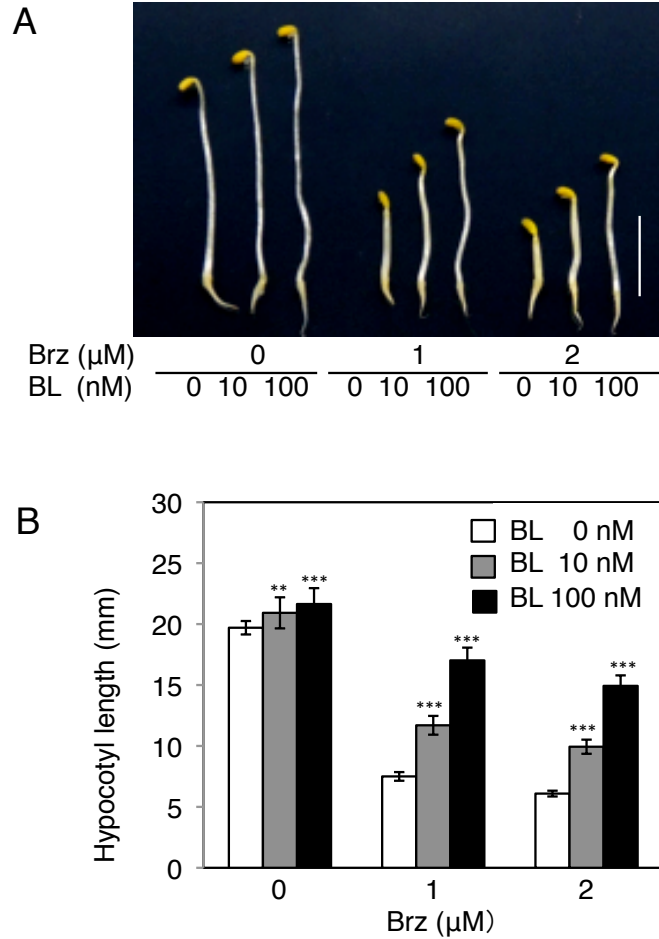


Fig. 3-3 ミヤコグサの暗所胚軸伸長はBrzにより抑制され、BLにより回復する

- A. 暗所7日目、Brz 0、1、3  $\mu\text{M}$  および BL 0、10、100 nM 条件におけるミヤコグサ野生型植物の胚軸の観察  
 B. 暗所7日目、Brz 0、1、3  $\mu\text{M}$  および BL 0、10、100 nM 条件におけるミヤコグサ野生型植物の胚軸の計測

N = 17

Scale bar = 10 mm

Error bar = S.E.

\*\* : P < 0.01、\*\*\* : P < 0.01、Student *t* test relative to BL 0  $\mu\text{M}$



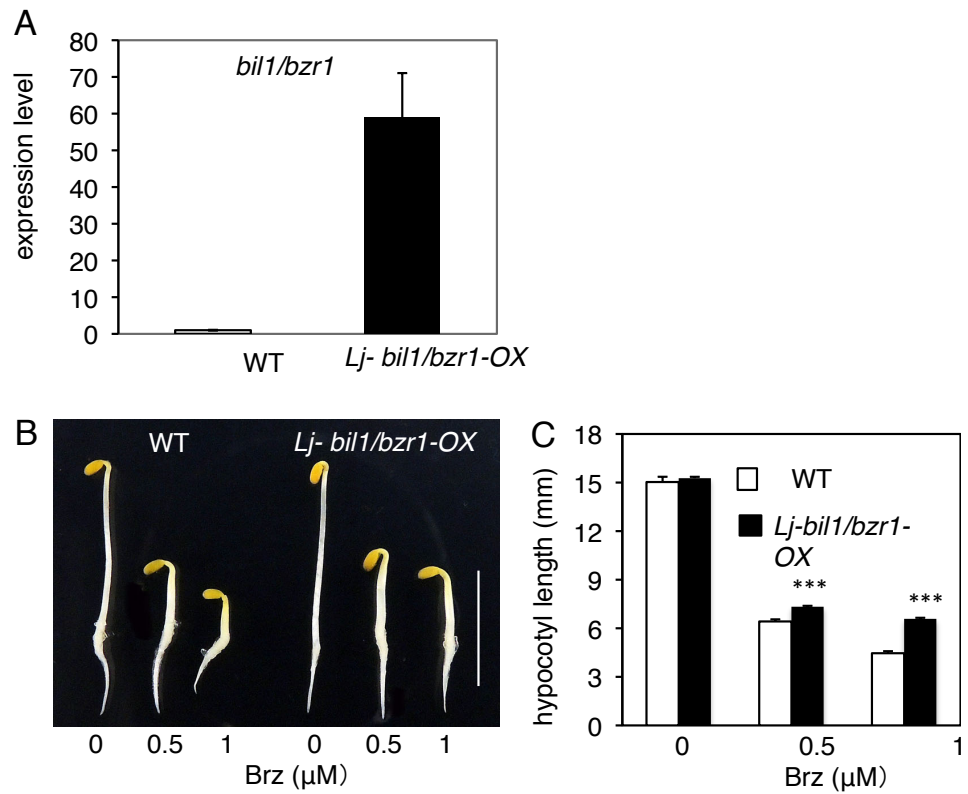


Fig. 3-4. ミヤコグサ *bil1/bzr1* 形質転換体 (*Lj-bil1/bzr1-OX*) は暗所胚軸伸長において Brz 耐性を示す

- A. 23日目のミヤコグサ野生型および *Lj-bil1/bzr1-OX* の *bil1/bzr1* 発現量
- B. 暗所7日目、Brz 0、0.5、1  $\mu\text{M}$  条件におけるミヤコグサ野生型および *Lj-bil1/bzr1-OX* の胚軸観察
- C. 暗所7日目、Brz 0、0.5、1  $\mu\text{M}$  条件におけるミヤコグサ野生型および *Lj-bil1/bzr1-OX* の胚軸伸長

N = 20

Scale bar = 10 mm

Error bar = S.E.

\*\*\* : P < 0.01、Student *t* test relative to WT

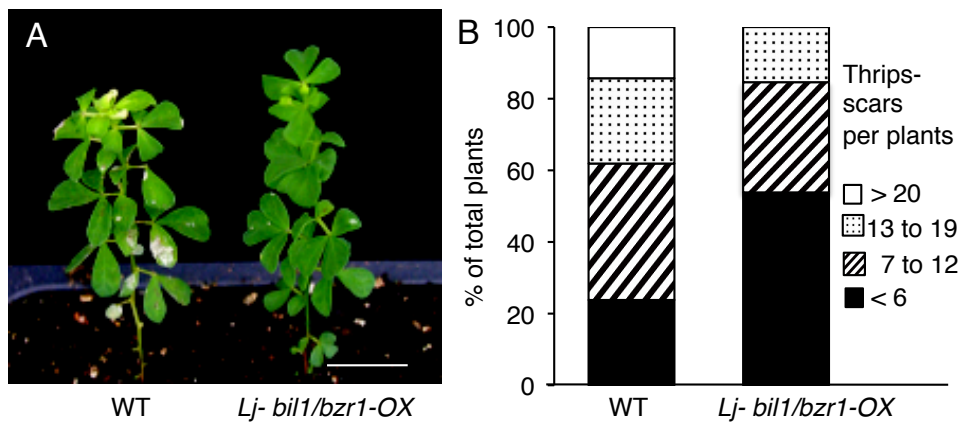


Fig. 3-5 ミヤコグサ *bil1/bzr1* 形質転換体 (*Lj-bil1/bzr1-OX*) はアザミウマ食害耐性を示す

- A. ネギアザミウマ食害試験2週間目の植物体  
 B. ネギアザミウマ食害試験2週間目の1個体当たりの食害痕数割合

n = 16  
 Scale bar = 2 cm

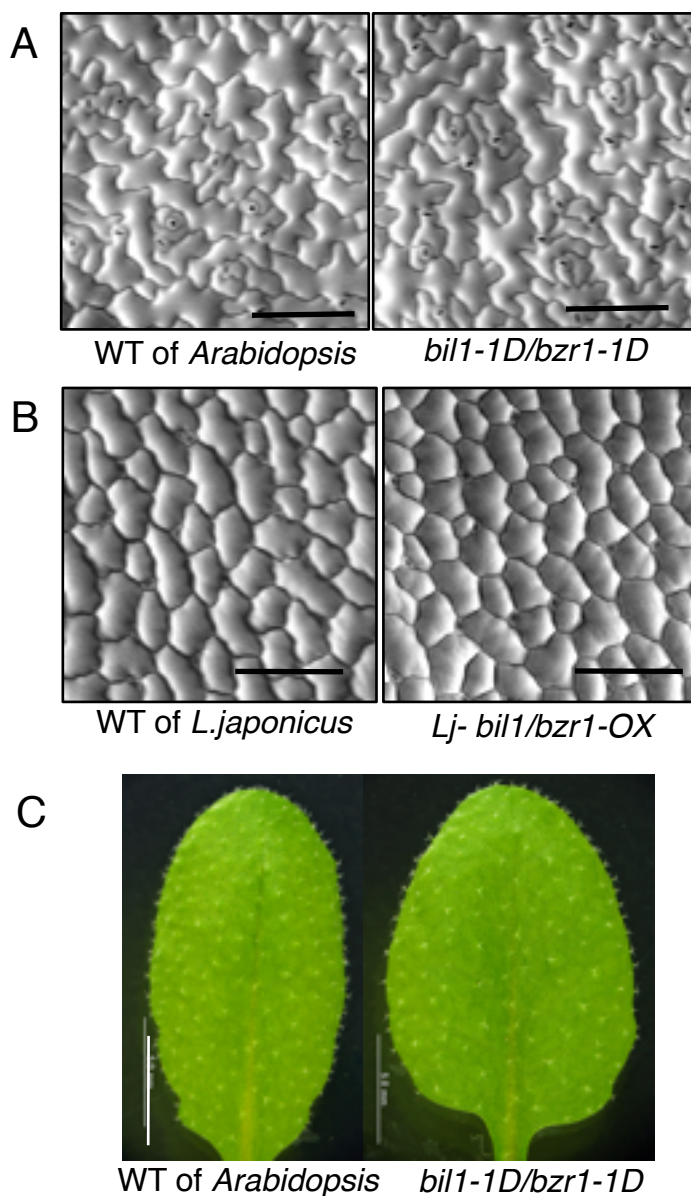


Fig. 3-6 変異*bil1/bzr*および*bil1/bzr1*過剰発現はアラビドプシスおよびミヤコグサにおいて葉の表皮細胞とトライコームの形状に変化を及ぼさない

- A. 30日目アラビドプシスの野生型および*bil1-1D/bzr1-1D*のロゼッタ葉表皮細胞のSEMによる観察
- B. 50日目の野生型および*bil1-1D/bzr1-1D*の葉表皮細胞のSEMによる観察
- C. 3週間目アラビドプシスの野生型および*bil1-1D/bzr1-1D*のロゼッタ葉表皮のトライコームの観察

Scale bar = A、B : 100  $\mu$ m、C : 5 mm

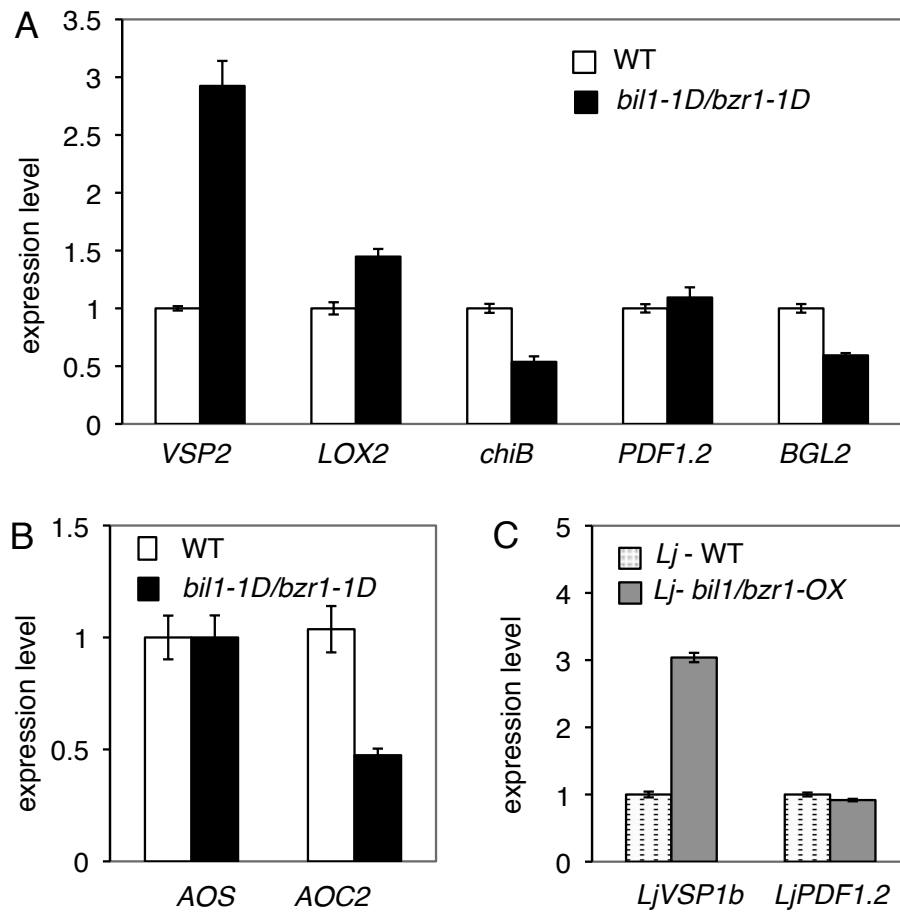


Fig. 3-7 JAおよびアザミウマ食害のマーカージン遺伝子の *bil1-1D/bzr1-1d* および *Lj-bil1/bzr1-OX* での発現

- A. 30日目のアラビドプシス野生型および *bil1-1D/bzr1-1D* における JA、ETおよびSAとアザミウマ食害のマーカージン遺伝子の発現解析  
*VSP2*、*LOX2*: JA情報伝達マーカージン遺伝子  
*chiB*、*PDF1.2*: JA/ET情報伝達マーカージン遺伝子  
*BGL2*: SA情報伝達マーカージン遺伝子
- B. 30日目のアラビドプシス野生型および *bil1-1D/bzr1-1D* における JA生合成遺伝子の発現解析
- C. 28日目のミヤコグサ野生型および *Lj-bil1/bzr1-OX* における JAまたはETとアザミウマ食害のマーカージン遺伝子の発現解析

### 3章 実験方法

#### <植物材料および生育条件>

アラビドプシス (*Arabidopsis thaliana*) は、Columbia-0 (Col-0) を野生型として用いた。変異体は *bill-1D/bzr1-1D* (Background ecotype: Columbia) (Wang *et al.* 2002) を用いた。播種および生育は第1章と同様の方法でおこなった。

ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) は、Gifu B-129 を野生型として用いた。

#### ミヤコグサの播種および生育

- (1) サンドペーパーで種皮表面に軽く傷をつけた。
- (2) 種子を、滅菌溶液 (2% (v/v) 次亜塩素酸、0.02% (v/v) Tween 20) に浸漬し、シーソー式シェーカー上で10分間滅菌処理した。
- (3) 滅菌処理後、すぐに滅菌溶液を捨て滅菌蒸留水での洗浄を2回行い、その後シーソー式シェーカー上で混和しながら20~30分ごとに新しい蒸留水と交換した。その後、1晩吸水させた。
- (4) 吸水させた種子の種皮をピンセットで剥ぎ取り、0.8% phytoagar (Duchefa) に播種した。
- (5) 暗所、4°C で2~3日低温処理を行った。
- (6) 長日条件 (16h 明所/8h 暗所)、25°C で約1週間生育させた。
- (7) 土に植え替え、長日条件 (16h 明所/8h 暗所)、25°C で生育させた。

#### <ミヤコグサ *Lj-bill/bzr1-OX* 形質転換体の作製>

#### ベクターの作製

PCR反応による *bill/bzr1* の増幅は、*bill-1D/bzr1-1D* から抽出したゲノムDNAより合成したcDNAをテンプレートにして、以下のプライマーセットにより *bill/bzr1* 全長

の増幅おこなった。ゲノム抽出、cDNA 合成、PCR 条件は、第 1 章と同様の方法でおこなった。

#### プライマーセット

Primer name	Forward primer (5' -3' )	Reverse primer (5' -3' )
<i>bill/bzr1</i>	CACCATGACTTCGGATGGAGCTAC	TCAACCACGAGCCTTCCCAT

*bill/bzr1* の PCR 増幅産物より、第 1 章と同様の方法で、ゲル抽出、pENTER ベクターへのクローニング、pGWB2 ベクターへのクローニング、アグロバクテリウムへの導入を行った。

#### 植物体への形質転換

植物体への形質転換は、25℃、暗所で 7 日間生育させたミヤコグサ野生型の芽生えの胚軸を用い、Murakami ら (Murakami *et al.* 2013) の方法により行った。

#### 形質転換体のホモ化

得られた形質転換体は、T3 世代植物植物を *bill/bzr1* 特異的 PCR によってホモ化の確認を行った。

#### プライマーセット

Primer name	Forward primer (5' -3' )	Reverse primer (5' -3' )
<i>bill/bzr1 gene</i>	CGACACACTTGTCTACTCCA	CCCAACCAGCTTCAACACAA

#### <ネギアザミウマ食害試験>

約 100 匹のネギアザミウマ (*thrips tabaci Lindeman*) 成体を、20~25℃温室内の

メッシュの付いたゲージ内で約2ヶ月間育成した。2週間目のアラビドプシス植物体、および40日目のミヤコグサ植物体をゲージ内に野生型と変異体が交互になるように配置した。試験開始2週間後に、白いスポットとして見えるネギアザミウマ食害痕を黙視により確認し、1植物体当たりの食害痕数を測定した。

#### <葉の表皮観察>

##### 葉の表皮細胞の観察

観察は Scanning Electron Microscope (SEM, JEOL LSM-5600LV, Tokyo, Japan) に行った。シロイヌナズナは、30日目の野生型および変異体の同程度の大きさのロゼッタ葉を用い、ミヤコグサは50日目の野生型および変異体のトップの葉を用いて観察を行った。

##### シロイヌナズナのトライコームの観察

30日目の野生型および変異体の7~8枚目のロゼッタ葉について、実体顕微鏡 (OLYMPUS SZX16) にて観察をおこなった。

#### <リアルタイムPCR>

アラビドプシス、ミヤコグサともに、第2章と同様の方法でおこなった。アラビドプシスは *ACT2* を、ミヤコグサは *ATPsyn* のプライマーセットを補正として用いた。

##### リアルタイムプライマーセット

Primer name	Forward primer (5' -3' )	Reverse primer (5' -3' )
<i>bill/bzr1</i>	CGCCACCAGTTTCATACCC	AGGAGAGGTTGGCACCATAGAG

<i>VSP2</i>	GTTAGGGACCGGAGCATCAA	AACGGTCACTGAGTATGATGGGT
<i>PDF1. 2</i>	CCATCATCACCCCTTATCTTCGC	TGTCCCACTTGGCTTCTCG
<i>LOX2</i>	TTGCTCGCCAGACACTTGC	GGGATCACCATAAACGGCC
<i>AOS</i>	TCTTCTCTTCGCCACGTGC	GGTTATGAACTTGATGACCCGC
<i>AOC2</i>	CGGCAAGAAACCAACAGAGC	GACCTGCCGTGATTCCCAC
<i>chiB</i>	ACGGAAGAGGACCAATGCAA	GTTGGCAACAAGGTCAGGGT
<i>BGL. 2</i>	GCCGACAAGTGGGTTC AAGA	AACCCCCCAACTGAGGGTT
<i>LjVSP1b</i>	TCAAGGCATGGATCATGAAG	CTTAAACAATCCTAATATGGCCTGA
<i>LjPDF1. 2</i>	GTGATCAGAGGTGTAAAGCC	AGTTATCACTGCACTGGAAG
<i>ACT2</i>	CGCCATCCAAGCTGTTCTC	TCACGTCCAGCAAGGTCAAG
<i>LjATPsyn</i>	ACATGCTTGCACCATACC	TCCCCAACTCCAGCAAATAC



## 第4章 結論

本章の内容は、学術論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

## 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 *bill-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 *bill/bzr1* 変異遺伝子の導入を行った。シロイヌナズナ *bill/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 *bill/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 *bill/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 *bill/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 *bill/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 *bill/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。

参考文献

- Grove, M. D., Spencer, G. F., Rohwedder, W. K., Mandava, N., Worley, J. F. and Warhen, J. D. (1979) A unique plant growth promoting steroid from *Brassica napus* pollen. *Nature*, **281**, 216-217.
- Abe, H., Ohnishi, J., Narusaka, M., Seo, S., Narusaka, Y., Tsuda, S. and Kobayashi, M. (2008a) Function of jasmonate in response and tolerance of Arabidopsis to thrip feeding. *Plant Cell Physiol*, **49**, 68-80.
- Abe, H., Ohnishi, J., Narusaka, M., Seo, S., Narusaka, Y., Tsuda, S. and Kobayashi, M. (2008b) Arabidopsis-thrips system for analysis of plant response to insect feeding. *Plant Signal Behav*, **3**, 446-447.
- Asami, T., Min, Y. K., Nagata, N., Yamagishi, K., Takatsuto, S., Fujioka, S., Murofushi, N., Yamaguchi, I. and Yoshida, S. (2000) Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol*, **123**, 93-100.
- Asami, T., Mizutani, M., Fujioka, S., Goda, H., Min, Y. K., Shimada, Y., Nakano, T., Takatsuto, S., Matsuyama, T., Nagata, N., Sakata, K. and Yoshida, S. (2001) Selective interaction of triazole derivatives with DWF4, a cytochrome P450 monooxygenase of the brassinosteroid biosynthetic pathway, correlates with brassinosteroid deficiency in planta. *J Biol Chem*, **276**, 25687-25691.
- Asami, T., Nakano, T. and Fujioka, S. (2005) Plant brassinosteroid

- hormones. *Vitam Horm*, **72**, 479–504.
- Asami, T., Nakano, T., Nakashita, H., Sekimata, K., Shimada, Y. and Yoshida, S. (2003) The Influence of Chemical Genetics on Plant Science: Shedding Light on Functions and Mechanism of Action of Brassinosteroids Using Biosynthesis Inhibitors. *J Plant Growth Regul*, **22**, 336–349.
- Azpiroz, R., Wu, Y., LoCascio, J.C. and Feldmann, K.A. (1998) An Arabidopsis brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell*, **10**, 219–230.
- Bajguz, A. and Hayat, S. (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol Biochem*, **47**, 1–8.
- Behari, J. (2010) The Wnt/beta-catenin signaling pathway in liver biology and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, **4**, 745–756.
- Bekh-Ochir, D., Shimada, S., Yamagami, A., Kanda, S., Ogawa, K., Nakazawa, M., Matsui, M., Sakuta, M., Osada, H., Asami, T. and Nakano, T. (2013) A novel mitochondrial DnaJ/Hsp40 family protein BIL2 promotes plant growth and resistance against environmental stress in brassinosteroid signaling. *Planta*, **237**, 1509–1525.
- Cadigan, K.M. and Nusse, R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, **11**, 3286–3305.
- Caesar, K., Elgass, K., Chen, Z., Huppenberger, P., Witthoft, J., Schleifenbaum, F., Blatt, M.R., Oecking, C. and Harter, K. (2011) A fast brassinolide-regulated response pathway in the plasma membrane of Arabidopsis thaliana. *Plant J*, **66**, 528–540.

- Campos, M.L., de Almeida, M., Rossi, M.L., Martinelli, A.P., Litholdo Junior, C.G., Figueira, A., Rampelotti-Ferreira, F.T., Vendramim, J.D., Benedito, V.A. and Peres, L.E. (2009) Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. *J Exp Bot*, **60**, 4347-4361.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D., Felix, G. and Boller, T. (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, **448**, 497-500.
- Choe, S., Dilkes, B.P., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A. and Feldmann, K.A. (1998) The DWF4 gene of Arabidopsis encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, **10**, 231-243.
- Choe, S., Fujioka, S., Noguchi, T., Takatsuto, S., Yoshida, S. and Feldmann, K.A. (2001) Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in Arabidopsis. *Plant J*, **26**, 573-582.
- Chono, M., Honda, I., Zeniya, H., Yoneyama, K., Saisho, D., Takeda, K., Takatsuto, S., Hoshino, T. and Watanabe, Y. (2003) A semidwarf phenotype of barley uzu results from a nucleotide substitution in the gene encoding a putative brassinosteroid receptor. *Plant Physiol*, **133**, 1209-1219.
- Chory, J., Nagpal, P. and Peto, C.A. (1991) Phenotypic and Genetic Analysis of det2, a New Mutant That Affects Light-Regulated Seedling



- Development in Arabidopsis. *Plant Cell*, **3**, 445-459.
- Chung, Y., Choe, V., Fujioka, S., Takatsuto, S., Han, M., Jeon, J.S., Park, Y.I., Lee, K.O. and Choe, S. (2012) Constitutive activation of brassinosteroid signaling in the Arabidopsis elongated-D/bak1 mutant. *Plant Mol Biol*, **80**, 489-501.
- Clouse, S.D., Langford, M. and McMorris, T.C. (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol*, **111**, 671-678.
- Clouse, S.D. and Sasse, J.M. (1998) BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**, 427-451.
- De Rybel, B., Audenaert, D., Vert, G., Rozhon, W., Mayerhofer, J., Peelman, F., Coutuer, S., Denayer, T., Jansen, L., Nguyen, L., Vanhoutte, I., Beemster, G.T., Vleminckx, K., Jonak, C., Chory, J., Inze, D., Russinova, E. and Beeckman, T. (2009) Chemical inhibition of a subset of Arabidopsis thaliana GSK3-like kinases activates brassinosteroid signaling. *Chem Biol*, **16**, 594-604.
- Delker, C., Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Feussner, I. and Wasternack, C. (2006) Jasmonate biosynthesis in Arabidopsis thaliana--enzymes, products, regulation. *Plant Biol (Stuttg)*, **8**, 297-306.
- Diaz-Montano, J., Fuchs, M., Nault, B.A., Fail, J. and Shelton, A.M. (2011) Onion thrips (Thysanoptera: Thripidae): a global pest of increasing concern in onion. *J Econ Entomol*, **104**, 1-13.

- Fujioka, S., Li, J., Choi, Y.H., Seto, H., Takatsuto, S., Noguchi, T., Watanabe, T., Kuriyama, H., Yokota, T., Chory, J. and Sakurai, A. (1997) The Arabidopsis deetiolated2 mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, **9**, 1951-1962.
- Fujioka, S., Takatsuto, S. and Yoshida, S. (2002) An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway. *Plant Physiol*, **130**, 930-939.
- Fujita, S., Ohnishi, T., Watanabe, B., Yokota, T., Takatsuto, S., Fujioka, S., Yoshida, S., Sakata, K. and Mizutani, M. (2006) Arabidopsis CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C27, C28 and C29 sterols. *Plant J*, **45**, 765-774.
- Gampala, S.S., Kim, T.W., He, J.X., Tang, W., Deng, Z., Bai, M.Y., Guan, S., Lalonde, S., Sun, Y., Gendron, J.M., Chen, H., Shibagaki, N., Ferl, R.J., Ehrhardt, D., Chong, K., Burlingame, A.L. and Wang, Z.Y. (2007) An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis. *Dev Cell*, **13**, 177-189.
- Hayashi, N. and Titani, K. (2010) N-myristoylated proteins, key components in intracellular signal transduction systems enabling rapid and flexible cell responses. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, **86**, 494-508.
- He, J.X., Gendron, J.M., Sun, Y., Gampala, S.S., Gendron, N., Sun, C.Q. and Wang, Z.Y. (2005) BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science*, **307**, 1634-1638.
- He, J.X., Gendron, J.M., Yang, Y., Li, J. and Wang, Z.Y. (2002)

- The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10185–10190.
- Hogenhout, S.A., Ammar el, D., Whitfield, A.E. and Redinbaugh, M.G. (2008) Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu Rev Phytopathol*, **46**, 327–359.
- Howe, G.A. and Jander, G. (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol*, **59**, 41–66.
- Ichikawa, T., Nakazawa, M., Kawashima, M., Iizumi, H., Kuroda, H., Kondou, Y., Tsuchida, Y., Suzuki, K., Ishikawa, A., Seki, M., Fujita, M., Motohashi, R., Nagata, N., Takagi, T., Shinozaki, K. and Matsui, M. (2006) The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant J*, **48**, 974–985.
- Kim, B., Fujioka, S., Kwon, M., Jeon, J. and Choe, S. (2013) Arabidopsis brassinosteroid-overproducing gulliver3-D/dwarf4-D mutants exhibit altered responses to jasmonic acid and pathogen. *Plant Cell Rep*, **32**, 1139–1149.
- Kim, T.W., Guan, S., Burlingame, A.L. and Wang, Z.Y. (2011) The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2. *Mol Cell*, **43**, 561–571.
- Kim, T.W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J.X., Burlingame, A.L. and Wang, Z.Y. (2009) Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol*, **11**, 1254–1260.

- Kinoshita, T., Cano-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S. and Chory, J. (2005) Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature*, **433**, 167-171.
- Komatsu, T., Kawaide, H., Saito, C., Yamagami, A., Shimada, S., Nakazawa, M., Matsui, M., Nakano, A., Tsujimoto, M., Natsume, M., Abe, H., Asami, T. and Nakano, T. (2010) The chloroplast protein BPG2 functions in brassinosteroid-mediated post-transcriptional accumulation of chloroplast rRNA. *Plant J*, **61**, 409-422.
- Li, J., Biswas, M.G., Chao, A., Russell, D.W. and Chory, J. (1997) Conservation of function between mammalian and plant steroid 5alpha-reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3554-3559.
- Li, J. and Chory, J. (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, **90**, 929-938.
- Li, J. and Nam, K.H. (2002) Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science*, **295**, 1299-1301.
- Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Doke, J.T., Tax, F.E. and Walker, J.C. (2002) BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, **110**, 213-222.
- Liu, Y., Ahn, J.E., Datta, S., Salzman, R.A., Moon, J., Huyghues-Despointes, B., Pittendrigh, B., Murdock, L.L., Koiwa, H. and Zhu-Salzman, K. (2005) Arabidopsis vegetative storage protein is an anti-insect acid phosphatase. *Plant Physiol*,

139, 1545–1556.

- Lorenzo, O. and Solano, R. (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 532–540.
- Moorhead, G.B., Trinkle-Mulcahy, L. and Ulke-Lemee, A. (2007) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 234–244.
- Mora-Garcia, S., Vert, G., Yin, Y., Cano-Delgado, A., Cheong, H. and Chory, J. (2004) Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in Arabidopsis. *Genes Dev*, **18**, 448–460.
- Murakami, Y., Yokoyama, H., Fukui, R. and Kawaguchi, M. (2013) Down-regulation of NSP2 expression in developmentally young regions of *Lotus japonicus* roots in response to rhizobial inoculation. *Plant Cell Physiol*, **54**, 518–527.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. and Kimura, T. (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng*, **104**, 34–41.
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I. and Yoshida, S. (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J*, **33**, 887–898.
- Nam, K.H. and Li, J. (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*, **110**, 203–212.
- Noguchi, T., Fujioka, S., Choe, S., Takatsuto, S., Yoshida, S.,

- Yuan, H., Feldmann, K.A. and Tax, F.E. (1999) Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of Arabidopsis accumulate brassinosteroids. *Plant Physiol*, **121**, 743-752.
- Nomura, T., Bishop, G.J., Kaneta, T., Reid, J.B., Chory, J. and Yokota, T. (2003) The LKA gene is a BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 homolog of pea. *Plant J*, **36**, 291-300.
- Nomura, T., Sato, T., Bishop, G.J., Kamiya, Y., Takatsuto, S. and Yokota, T. (2001) Accumulation of 6-deoxocathasterone and 6-deoxocastasterone in Arabidopsis, pea and tomato is suggestive of common rate-limiting steps in brassinosteroid biosynthesis. *Phytochemistry*, **57**, 171-178.
- Ohnishi, T., Godza, B., Watanabe, B., Fujioka, S., Hategan, L., Ide, K., Shibata, K., Yokota, T., Szekeres, M. and Mizutani, M. (2012) CYP90A1/CPD, a brassinosteroid biosynthetic cytochrome P450 of Arabidopsis, catalyzes C-3 oxidation. *J Biol Chem*, **287**, 31551-31560.
- Ohnishi, T., Szatmari, A.M., Watanabe, B., Fujita, S., Bancos, S., Koncz, C., Lafos, M., Shibata, K., Yokota, T., Sakata, K., Szekeres, M. and Mizutani, M. (2006) C-23 hydroxylation by Arabidopsis CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, **18**, 3275-3288.
- Peng, P., Yan, Z., Zhu, Y. and Li, J. (2008) Regulation of the Arabidopsis GSK3-like kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through proteasome-mediated protein degradation. *Mol Plant*, **1**, 338-346.
- Ren, C., Han, C., Peng, W., Huang, Y., Peng, Z., Xiong, X., Zhu, Q., Gao, B. and Xie, D. (2009) A leaky mutation in DWARF4 reveals

- an antagonistic role of brassinosteroid in the inhibition of root growth by jasmonate in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **151**, 1412–1420.
- Ryu, H., Kim, K., Cho, H., Park, J., Choe, S. and Hwang, I. (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant Cell*, **19**, 2749–2762.
- Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A.K., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., Felix, G. and Chinchilla, D. (2010) Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J Biol Chem*, **285**, 9444–9451.
- Sekimata, K., Ohnishi, T., Mizutani, M., Todoroki, Y., Han, S.Y., Uzawa, J., Fujioka, S., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Takatsuto, S., Sakata, K., Yoshida, S. and Asami, T. (2008) Brz220 interacts with DWF4, a cytochrome P450 monooxygenase in brassinosteroid biosynthesis, and exerts biological activity. *Biosci Biotechnol Biochem*, **72**, 7–12.
- Shi, H., Shen, Q., Qi, Y., Yan, H., Nie, H., Chen, Y., Zhao, T., Katagiri, F. and Tang, D. (2013) BR-Signaling KinaSE1 physically associates with Flagellin Sensing2 and regulates plant innate immunity in Arabidopsis. *Plant Cell*, **25**, 1143–1157.
- Sorek, N., Bloch, D. and Yalovsky, S. (2009) Protein lipid modifications in signaling and subcellular targeting. *Curr Opin Plant Biol*, **12**, 714–720.
- Sun, Y., Fan, X.Y., Cao, D.M., Tang, W., He, K., Zhu, J.Y., He, J.X., Bai, M.Y., Zhu, S., Oh, E., Patil, S., Kim, T.W.,

- Ji, H., Wong, W.H., Rhee, S.Y. and Wang, Z.Y. (2010) Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Dev Cell*, **19**, 765-777.
- Suzuki, A., Suriyagoda, L., Shigeyama, T., Tominaga, A., Sasaki, M., Hiratsuka, Y., Yoshinaga, A., Arima, S., Agarie, S., Sakai, T., Inada, S., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Uchiumi, T., Abe, M., Hashiguchi, M., Akashi, R., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S. and Hirsch, A.M. (2011) Lotus japonicus nodulation is photomorphogenetically controlled by sensing the red/far red (R/FR) ratio through jasmonic acid (JA) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 16837-16842.
- Szekeress, M., Nemeth, K., Koncz-Kalman, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Redei, G.P., Nagy, F., Schell, J. and Koncz, C. (1996) Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis. *Cell*, **85**, 171-182.
- Tang, W., Kim, T.W., Oses-Prieto, J.A., Sun, Y., Deng, Z., Zhu, S., Wang, R., Burlingame, A.L. and Wang, Z.Y. (2008) BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in Arabidopsis. *Science*, **321**, 557-560.
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Oses-Prieto, J.A., Kim, T.W., Zhou, H.W., Deng, Z., Gampala, S.S., Gendron, J.M., Jonassen, E.M., Lillo, C., DeLong, A., Burlingame, A.L., Sun, Y. and Wang, Z.Y. (2010) PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by



- dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol*, **13**, 124-131.
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Oses-Prieto, J.A., Kim, T.W., Zhou, H.W., Deng, Z., Gampala, S.S., Gendron, J.M., Jonassen, E.M., Lillo, C., DeLong, A., Burlingame, A.L., Sun, Y. and Wang, Z.Y. (2011) PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol*, **13**, 124-131.
- Udvardi, M.K., Tabata, S., Parniske, M. and Stougaard, J. (2005) Lotus japonicus: legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci*, **10**, 222-228.
- Vert, G. and Chory, J. (2006) Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature*, **441**, 96-100.
- Wang, X. and Chory, J. (2006) Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science*, **313**, 1118-1122.
- Wang, X., Goshe, M.B., Soderblom, E.J., Phinney, B.S., Kuchar, J.A., Li, J., Asami, T., Yoshida, S., Huber, S.C. and Clouse, S.D. (2005) Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *Plant Cell*, **17**, 1685-1703.
- Wang, Z.Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T. and Chory, J. (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell*, **2**, 505-513.

- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S. and Sharma, H.C. (2012) Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav*, **7**, 1306-1320.
- Yamagami, A., Nakazawa, M., Matsui, M., Tujimoto, M., Sakuta, M., Asami, T. and Nakano, T. (2009) Chemical genetics reveal the novel transmembrane protein BIL4, which mediates plant cell elongation in brassinosteroid signaling. *Biosci Biotechnol Biochem*, **73**, 415-421.
- Yang, D.H., Hettenhausen, C., Baldwin, I.T. and Wu, J. (2010) BAK1 regulates the accumulation of jasmonic acid and the levels of trypsin proteinase inhibitors in *Nicotiana attenuata*'s responses to herbivory. *J Exp Bot*, **62**, 641-652.
- Ye, H., Li, L., Guo, H. and Yin, Y. (2012) MYBL2 is a substrate of GSK3-like kinase BIN2 and acts as a corepressor of BES1 in brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 20142-20147.
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T. and Chory, J. (2005) A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell*, **120**, 249-259.
- Yin, Y., Wang, Z.Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T. and Chory, J. (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*, **109**, 181-191.
- Zhang, Y., Li, B., Xu, Y., Li, H., Li, S., Zhang, D., Mao, Z.,

Guo, S., Yang, C., Weng, Y. and Chong, K. (2013) The cyclophilin CYP20-2 modulates the conformation of BRASSINAZOLE-RESISTANT1, which binds the promoter of FLOWERING LOCUS D to regulate flowering in Arabidopsis. *Plant Cell*, **25**, 2504-2521.

Zhao, B. and Li, J. (2012) Regulation of brassinosteroid biosynthesis and inactivation. *J Integr Plant Biol*, **54**, 746-759.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、非常に恵まれた研究環境で学ぶ機会を与えてくださり、また多大なご指導ご鞭撻をいただきました浅見忠男教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり終始適切な助言を頂き、研究を支えてくださいました中嶋正敏准教授、中村英光特任助教に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、博士課程への進学および研究全般にわたり、直接指導して頂き、終始多大なご支援、多岐にわたる助言をいただきました理化学研究所、中野雄司博士に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、平素より直接的な実験の指導、研究における助言、その他様々なご助力をいただきました理化学研究所、山上あゆみ博士に心より感謝申し上げます。

本研究においてブラシノステロイド内生量を理化学研究所、藤岡昭三博士に解析していただきました。またミヤコグサの解析はお茶の水女子大学、作田正明教授、久米直氏にご指導、ご助力いただきました。心より感謝申し上げます。

本研究において FOX ラインを譲渡していただきました理化学研究所の市川尚斉博士、松井南博士、Gateway ベクターを譲渡していただきました島根大学の中川強博士、BiFC ベクターを譲渡していただきました自然科学研究機構基礎生物学研究所の真野昌二博士に心より感謝申し上げます。

また、経済面では理化学研究所リサーチ・アソシエイト制度に援助をいただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、研究において様々な面において支えていただいた理化学研究所長田抗生物質研究室および東京大学生物制御化学研究室の全ての人々に、また博士課程進路へご理解と多大な支えをいただいた家族に心より感謝申し上げます。

平成 26 年 3 月