

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻  
平成 24 年度博士課程進学  
氏名 亀岡啓  
指導教員名 経塚淳子

論文題目 *Analysis of DWARF14, a strigolactone receptor, and its homologs*  
(ストリゴラクトン受容体をコードする *DWARF14* 遺伝子とそのホモログの解析)

植物は固着性の生活様式をとるため、周囲の環境に応じてその形態や生理状態を変化させる必要がある。この様な応答において、植物ホルモンとその受容体が中心的な役割を担う。植物ホルモンは合成や輸送を環境からの刺激に制御されて細胞間を移行する。そして、受容体が応答に必要な細胞で植物ホルモンと結合することで、個体として協調的な反応が誘導される。

ストリゴラクトンは腋芽伸長の抑制を始め様々な生理作用をもつ植物ホルモンであり、その受容体は *DWARF14* (*D14*) であると推定されている。*D14* がストリゴラクトンと結合すると *D14*, *DWARF3* (*D3*), *DWARF53* (*D53*) の三者が相互作用し、*D53* が分解されることによって下流の応答が誘導される。*D14* とそのホモログは *D14* ファミリーと呼ばれる小さな遺伝子ファミリーを形成する。イネは *D14*, *D14LIKE* (*D14L*), *D14 LIKE2a* (*D14L2a*), *D14 LIKE2b* (*D14L2b*) の 4 遺伝子をもつが、これまでに報告されている研究から、*D14* ファミリーの遺伝子はそれぞれ興味深い特徴をもつことが示唆されている。そこで本研究では、*D14* ファミリー一遺伝子について機能解析を行った。

***DWARF14* (*D14*)タンパク質は師管輸送される**

プロテオーム解析により、*D14* タンパク質がイネの師管液から検出されることが報告され

た。この結果は、D14 タンパク質が師管を輸送される可能性を示唆している。近年、タンパク質の細胞間輸送が植物の形態形成において重要な役割を担うことが明らかになってきたが、植物ホルモンの信号伝達経路で働くタンパク質が細胞間を輸送される例は知られていない。そこで、D14 タンパク質の師管輸送について解析した。

まず、mRNA の発現パターンを調べた。D14 mRNA は維管束と葉原基で発現しており、腋芽メリステムでは発現がみられなかった。また、維管束内では師部伴細胞と木部柔組織で発現していた。次に、師管に D14 タンパク質があるか検証するために、D14 プロモーターの制御下で D14:GFP 融合タンパク質を導入した系統(*pD14::D14:GFP* 系統)を用いて師部を観察した。すると、mRNA が発現している伴細胞に加え、師管でも D14 タンパク質のシグナルが検出された。さらに、この系統では、mRNA の発現がみられなかった腋芽メリステムでも GFP 蛍光が観察された。これは、D14:GFP 融合タンパク質が腋芽メリステムへ輸送されたためである可能性が考えられる。そこで、同じプロモーターで D14 と 3 つの GFP が繋がれたタンパク質を導入した系統(*pD14::D14:3xGFP* 系統)を作成した。D14:3xGFP 融合タンパク質は分子量が大きいため、細胞間を輸送されない。この系統では腋芽メリステムに GFP 蛍光がみられなかったことから、*pD14::D14:GFP* 系統の腋芽メリステムで観察された D14:GFP 融合タンパク質は、細胞間を輸送されてきたものであることが確認された。これらの結果から、D14 タンパク質は師管を通り腋芽へ輸送されることが明らかとなった。また、ストリゴラクトン欠損変異体背景の *pD14::D14:GFP* 系統でも、腋芽メリステムに GFP 蛍光が観察された。このことから、ストリゴラクトンは D14 輸送に必要なことも示された。

さらに、D14 輸送が腋芽伸長を制御するか検証するため、*d14* 変異体背景の *pD14::D14:3xGFP* 系統の表現型を解析した。この系統では、腋芽伸長が野生型植物と同程度に抑制されていたため、D14 輸送は腋芽伸長の抑制に必須ではないことが示された。また、光による腋芽伸長の調節への寄与を検証したが、D14 輸送はこの現象にも関与していなかった。

しかし、エンドウを用いた接ぎ木実験では、エンドウの D14 ホモログ変異体である *rms3* 変異体の腋芽は、野生型台木を接ぎ木されることによって抑制されることが報告された。この結果は、接ぎ木間を輸送された D14 タンパク質が腋芽伸長を抑制した可能性を示唆する。

以上の結果から、D14 は師管を介して腋芽に輸送されることが明らかとなった。また、D14 輸送は腋芽伸長抑制に必須ではないが、腋芽伸長を制御するポテンシャルをもつことも示唆された。

**DWARF14 LIKE (D14L)**はストリゴラクトン信号伝達以外の経路で暗黒条件下のメソコチル伸長を抑制する

ストリゴラクトンはイネで暗所形態形成に関与し、暗黒条件下でメソコチル伸長を抑制

する。そのため、ストリゴラクトン関連遺伝子の変異体では、暗所で野生型植物に比べてメソコチルが長くなる。これらの変異体の中で、*d3* 変異体は他の変異体に比べて顕著に強い表現型を示す。これは、*D3* がストリゴラクトン経路以外でも働くことを示唆している。シロイヌナズナの *D14L* オーソログである *KAI2* は、*D3* と共にストリゴラクトン信号伝達以外の経路で光形態形成を制御することが示されていることから、メソコチルの伸長制御においても *D14L* が関与しているのではないかと考えた。

そこで、RNAi 法により *D14L* をノックダウンした系統(*D14L* RNAi 系統)を作成し、メソコチルの表現型を観察した。この系統では、他のストリゴラクトン関連遺伝子の変異体と同様に、明所ではメソコチルの表現型はみられなかったのに対し、暗所でメソコチル伸長の促進が観察された。また、*d14* 変異体のメソコチル伸長はストリゴラクトン合成アナログの投与により抑制されず、*D14L* RNAi 系統では抑制されたことから、*D14L* はストリゴラクトン信号伝達以外の経路でメソコチル伸長を制御することが示された。また、*d14* 変異体背景で *D14L* をノックダウンした系統のメソコチルは、*d14* 変異体のメソコチルに比べて有意に長かった。これは、*D14* と *D14L* がメソコチル伸長抑制に対して相加的に働いていることを示し、また、*d3* 変異体でのみ観察される強いメソコチル伸長促進の表現型が、*D14L* の機能によることを示唆している。

以上の結果から、*D14* がストリゴラクトン経路で働くのに対し、*D14L* は別経路で働くことが示された。*D14* がストリゴラクトンの受容体であると推定されていることから、*D14L* も未知の植物ホルモンの受容体である可能性も考えられる。

#### *DWARF14 LIKE2 (D14L2)* はアーバスキュラー菌根菌(AM 菌)によって発現誘導される

ストリゴラクトンは植物ホルモンとしての作用以外に、AM 菌の菌糸分岐を促進する活性をもつ。そのため、ストリゴラクトンの合成経路で働く遺伝子の変異体では共生が抑制される。逆に、*d14* 変異体では、フィードバックによって野生型植物より多くストリゴラクトンを合成、分泌しているため、共生率が上昇する。しかし、*d3* 変異体では、*d14* 変異体同様にストリゴラクトンを多く分泌しているにも関わらず、共生は著しく抑制された。これは *D3* が *D14* とストリゴラクトン信号伝達以外の経路で AM 菌感染を制御しているためだと考えられる。

そこで、ストリゴラクトン信号伝達以外の経路で働くことが示された *D14L* がこの現象にも寄与しているのではないかと考え、*D14L* RNAi 系統での AM 菌共生の表現型を観察した。しかし、野生型植物と *D14L* RNAi 系統の間で有意な共生率の差はみられなかった。また、*D14* と *D14L* が冗長的に働いている可能性も考えられるため、*d14* 変異体背景の *D14L* RNAi 系統でも表現型を観察したが、この系統では、*d14* 変異体と同様の高い共生率を示した。これらの結果から、*D14L* は AM 菌共生の制御に寄与していないことが示された。

一方、トランスクリプトーム解析から、AM 菌によって *D14L2* の発現が誘導されること

が報告された。そこで、AM 菌共生における *D14L2* の機能を解明するための第一歩として、この発現誘導を詳細に観察した。

まず、*D14L2a* プロモーターの制御下で YFP を発現する系統を作製し、AM 菌接種時の *D14L2a* mRNA の発現パターンを観察した。*D14L2a* の発現は AM 菌共生の早い段階から誘導されており、菌糸が根に侵入する前の段階でも発現がみられた。

次に、*D14L2* 発現誘導と、既知の AM 菌共生に必要な遺伝子との関係を調べた。植物は共通感染経路と呼ばれる一群の遺伝子によって AM 菌を感知し、下流の共生特異的な遺伝子発現を誘導することが知られている。しかし、*D14L2* の発現は共通感染経路で働く遺伝子の変異体でも野生型植物と同様に誘導された。それに対して、*d3* 変異体では *D14L2* の発現誘導はみられなかった。これらの結果は、*D3* が共通感染経路とは独立して働き、AM 菌共生を制御していることを示唆する。

*D3* は様々な形質の制御において *D14* ファミリー遺伝子と共に働くことが知られている。本研究において *D3* による AM 菌共生制御に *D14* と *D14L* が関与しないこと、下流で *D14L2* が発現誘導されることが示されたことから、*D14L2* が *D3* と共に AM 菌共生を制御している可能性も考えられる。

以上のように、本研究では *D14* ファミリー遺伝子について、新たな機能や特徴を明らかにした。植物ホルモン受容体による応答制御の仕組みとして、受容体タンパク質が細胞間を輸送されることが示されたことや、ホモログ間で別個のリガンドを受容して信号伝達を行っている可能性が示唆されたことは興味深い。これらの現象の全容を明らかにすることで、植物の環境に柔軟に適応する能力の理解に繋がると考えられる。