

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	查干扎那
論文題目	新規BIL8タンパク質のブラシノステロイドシグナル伝達を介した植物成長制御機構の分子生物学研究		
(論文内容の要旨)			
<p>植物ホルモン・ブラシノステロイド (Brassinosteroid ; BR) は、植物に広く存在し、器官伸長、光形態形成、葉緑体発達の制御など、広範で重要な生理的な機能を担うことが明らかにされている。BR シグナル伝達経路は、細胞膜上の BR 受容体 BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 (BRI1) から始まり、下流の BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2 (BIN2)キナーゼを介して、BRZ-INSENSITIVE-LONG HYPOCOTYL1/BRASSINAZOLE-RESISTANT1 (BIL1/BZR1)へ伝わる事が明らかとなっている。また、この BIL1/BZR1 は約 3000 種の遺伝子発現を制御することから BR シグナル伝達のマスター転写因子であると考えられている。BIL1/BZR1 は BIN2 による直接的なリン酸化によって活性型 (脱リン酸化型) から不活性型 (リン酸化型)へ転換されることが明らかとなっている。このような重要な機能を持つ BIN2 の制御機構の解明は、BR による植物成長の制御機構の理解において重要と考えられるが、未解明な点が多く残されている。そこで、本研究では新規 BR シグナル伝達因子を単離することにより、BR シグナル伝達の詳細な制御機構の解明を試みた。</p> <p>植物は暗所発芽時に胚軸が伸長し、もやし状の形態を形成する。これに対して、BR 生合成阻害剤 Brz 存在下で暗所発芽した植物は、BR 生合成阻害と、それに続くシグナル伝達の抑制が生じ、胚軸伸長抑制や子葉展開など、光条件下の発芽植物様の形態を示す。この暗所 Brz 条件下で胚軸伸長を示す突然変異体の探索によって BR シグナル伝達が活性化された変異体を単離することが出来ると着想したこれまでの当研究室の研究によって、約 10,000 系統のシロイヌナズナ FOX (full-length cDNA overexpressing)形質転換体からのスクリーニングが行われ、Brz 耐性の胚軸徒長形態を示す <i>Brz-INSENSITIVE-LONG HYPOCOTYL8-FOX (BIL8-FOX)</i> 形質転換体が単離された。さらに、この植物の示す胚軸徒長形質の原因遺伝子として同定された <i>BIL8</i> は、機能未知な新規遺伝子であることがこれまでの研究により明らかとなっている。また、<i>BIL8</i> 高発現形質転換体 <i>BIL8-OX</i> は <i>BIL8-FOX</i> 形質転換体と同様に Brz 暗所条件において野生型に比べ胚軸伸長形態を示すこと、<i>BIL8-FOX</i> 及び <i>BIL8-OX</i> 高発現株においては葉面積拡大傾向が観察され、<i>BIL8</i> は葉成長の促進活性を持っていることもこれまでに明らかとなっている。</p> <p>そこで本研究では、<i>BIL8</i> の BR シグナル伝達における役割を明らかにすることを目指した。最初に <i>BIL8-GFP</i> シグナルの核局在が観察されたことより、<i>BIL8</i> 高発現植物におけるマスター転写因子 <i>BIL1/BZR1</i> のウェスタンブロット解析を行なった。その結果、<i>BIL1/BZR1</i> は脱リン酸化、すなわち活性化された状態で蓄積していることが明らかとなった。しかし、<i>BIL8</i> の <i>BZR1/BIL1</i> に対する直接的な結合能は Y2H 法では確認できなかった。そこで、<i>BIN2</i> の機能獲得型変異体 <i>bin2-1</i> 背景において <i>BIL8</i> 遺伝子を高発現する植物を作出したところ、<i>bin2-1</i> の矮性形態の回復が認められ、<i>BIL8</i> は <i>BIN2</i> タンパク質の上流で機能していると考察された。そこで、Y2H 法、BiFC 法、Co-IP 法を用いて解析を行った結果、<i>BIL8</i> は <i>BIN2</i> と細胞膜と核において強い結合を示すことが明らかとなった。続いて、大腸菌由来の遺伝子組み換えタンパク質を用いた <i>in vitro</i> リン酸化アッセイ系において、<i>BIL8</i> タンパク質の添加で <i>BIN2</i> による <i>BIL1/BZR1</i> のリン酸化が抑制されることが明らかとなった。さらに、<i>BIN2</i> のリン酸化活性により <i>BIL1/BZR1</i> の細胞質局在が誘導されることが知られているが、<i>BIL8</i> と <i>BIN2</i> および <i>BIL1/BZR1</i> 共発現条件において <i>BIL1/BZR1</i> の核局在が促進されることが明らかとなった。以上より、<i>BIL8</i> は <i>BIN2</i> キナーゼの活性阻害により、<i>BIL1/BZR1</i> を活性化し、BR シグナル伝達を正に制御することで、胚軸や葉の成長促進制御を行う機能を持っていると考察された。</p> <p>本研究は、<i>BIN2-BIL1/BZR1</i> 制御のさらに上流に <i>BIL8</i> による制御機構が存在することを明らかにし、BR シグナル伝達による植物成長制御の分子機構における新たな知見を得たものである。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ステロイドホルモンは、生物種を越えて広く保存される生理活性化合物であり、植物ではブラシノステロイド(BR)と総称される化合物が知られている。ステロイドホルモンは、各生物種において細胞の伸長や分裂を制御することにより、器官の形態形成に関わることが明らかとなっているが、植物のブラシノステロイドも同様に胚軸や葉などの器官伸長に促進的に働くことが知られている。このBRの生合成酵素と受容体については、遺伝子欠損変異体の示す矮性形態を指標に数多く単離されてきたが、受容体下流のBRシグナル伝達因子については遺伝子欠損変異体の探索のみでは研究が進まず、機能獲得型変異体から新規因子が得られる例が増えている。当研究室の先行研究により、BR生合成阻害剤Brz存在下の暗所発芽時に野生型のように胚軸短化を示さず伸長形態を示す植物がFOX (full-length cDNA overexpressing)形質転換体種子群から単離され、その植物の示す形質の原因遺伝子として新規なBRZ-INSENSITIVE-LONG HYPOCOTYL8 (BIL8)が同定されていた。本論文は、BIL8タンパク質のBRシグナル伝達における機能解明を目指したものである。

第一に、BIL8高発現型植物において、BR処理時に生じるBR応答性遺伝子発現変動などが生じることを示しており、新規遺伝子のBRシグナル伝達と植物成長制御における機能を、妥当な研究手法によって明らかにした点が、評価出来る。第二に、BIL8機能発現の分子機構について、BIL8高発現型植物においてbHLH型のBRシグナル伝達のマスター転写因子BIL1/BZR1が脱リン酸化/活性化状態となり、BIL8-GFPタンパク質が核局在することから、BIL8とBIL1/BZR1の関係性の解析を試みたが、2因子の直接的な相互作用を示す結果は得られていない。そこで、BIL1/BZR1のリン酸化/不活性化機能を持ち哺乳類GSK3キナーゼの相同遺伝子でもあるBIN2とBIL8の関係について着目した結果、BIL8とBIN2が直接的に相互作用することを明らかとした。さらに、BIN2によるBIL1/BZR1タンパク質リン酸化を検出するin vitroキナーゼアッセイ系にBIL8を共存させると、BIL1/BZR1のリン酸化状態が低下することを明らかとしている。続いて、一過的細胞内局在解析によって、既に知られていた通常は細胞核に主に局在するBIL1/BZR1-GFPのBIN2共存条件下における核から細胞質への移行を確認し、その上でBIL1/BZR1-GFPはBIN2に加えてBIL8タンパク質の3因子を同時共存させるとBIL1/BZR1-GFPは再び核局在を示すことを観察している。これらの結果は、BIL8が、BIN2によるBIL1/BZR1のリン酸化とそれに起因するBIL1/BZR1の細胞核から細胞質への移行を、直接的なBIN2との相互作用によって阻害していることを複数の妥当な研究手法で明らかにしたと評価出来る。最後に、暗所Brz条件下において胚軸伸長形態を示す機能獲得型変異体として単離されたbill/bzr1-D背景で、BIL8を高発現する系統を作出したところ、その植物が暗所Brz存在下において既知bil変異体群に比べて最も長い胚軸伸長形態を示すという植物形態形成の観点でも興味深い知見を得ている。

本研究は、新規因子BIL8が、BIN2による転写因子BIL1/BZR1リン酸化の阻害を介して、植物器官伸長を促進する、というこれまで未知であった分子機構を明らかにした。BIN2は進化的保存性の高さに加え、植物生理現象の数々のステップにおいて重要な働きを果たしているという知見が増えつつある注目因子であり、その詳細な制御機構の解明に繋がる手掛かりとなり得る遺伝子候補を示したことは、重要な知見を得たと評価出来る。

本論文は、生命科学に関する幅広い学識、生化学、分子生物学および植物生理学分野における研究能力、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見とそれに基づく作業仮説等が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。公聴会で指摘された図の不備の修正も確認された。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和6年3月7日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日