

イネの最上位節間におけるジベレリン不活性化機構に関する研究

2025

石田 俊晃

目次

略語表

序論	1
第一章 イネの最上位節間における EUI2 の機能解析	
1-1. 緒言	15
1-2. 結果	16
1-3. 考察	29
第二章 16,17 位が化学修飾されたジベレリンの活性評価	
2-1. 緒言	34
2-2. 結果	35
2-3. 考察	43
3. 総括	47
4. 実験の部	48
参考文献	64
謝辞	71
投稿論文一覧	72

略語表

2OGD	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase
ABA	abscisic acid
CPS	<i>ent</i> -copalyl diphosphate synthase
DSF	differential scanning fluorimetry
ESI	electrospray ionization
EUI	ELONGATED UPPERMOST INTERNODE
EUI2	ELONGATED UPPERMOST INTERNODE2
FW	fresh weight
GA	gibberellin
GA13ox	gibberellin 13-oxidase
GA20ox	gibberellin 20-oxidase
GA2ox	gibberellin 2-oxidase
GA3ox	gibberellin 3-oxidase
GAI	GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE
GAMT	gibberellin methyltransferase
GAS2	gain of function in ABA-modulated seed germination 2
GGDP	geranylgeranyl diphosphate
GID1	GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1
GID2	GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2
ITC	isothermal titration calorimetry
KAO	<i>ent</i> -kaurenoic acid oxidase
KO	<i>ent</i> -kaurene oxidase
KS	<i>ent</i> -kaurene synthase
LC-MS/MS	liquid chromatograph-tandem mass spectrometry
MEP	2- <i>C</i> -methyl-D-erythritol-4-phosphate
P450	cytochrome P450 monooxygenase
RGA	REPRESSOR OF <i>gal-3</i>
SLR1	SLENDER RICE1
SLY1	SLEEPY1
TPS	terpene synthase
WT	wild type

序論

植物の成長や形態形成の制御、環境応答などにおいて、植物ホルモンと呼ばれる内生の微量物質が大きな役割を担っている。その一つであるジベレリン (gibberellin: GA) は、*ent*-ジベレラン骨格あるいは *ent*-20-ノルジベレラン骨格を有する四環性ジテルペン化合物の総称であり (図 1)、種子発芽や茎葉部伸長の促進、花芽形成誘導など多様な局面で植物の成長や分化を制御している。GA は、イネ (*Oryza sativa*) の病害の一つである馬鹿苗病の原因物質として発見された。イネ馬鹿苗病は、糸状菌の一種である *Fusarium fujikuroi* (*Gibberella fujikuroi*) の感染によって引き起こされ、苗が異常徒長や黄化を示し貧弱になることから 20 世紀初期の日本や台湾における農業上の大きな問題であった。*F. fujikuroi* の培養濾液を用いてもイネ馬鹿苗と同様の病徴が観察されたことから、イネ馬鹿苗病の原因毒素は、*F. fujikuroi* が生産して培養液へと分泌される化学物質であることが推測された。そこで、この毒素の同定に向けた研究が進められ、薮田と住木によって 2 種類の結晶が単離され、それぞれ gibberellin A、gibberellin B と名付けられた (Yabuta and Sumiki, 1938)。その後、高橋らが gibberellin A をさらに精製して 3 種類の化合物を単離し、それぞれを gibberellin A₁、gibberellin A₂、gibberellin A₃ と名付けた (Takahashi et al., 1955)。

このように、GA はイネ馬鹿苗菌が生産するものだと考えられていたが、ベニバナインゲン (*Phaseolus coccineus*) の未熟種子から gibberellin A₁ が単離・同定されたことから (MacMillan and Suter, 1958)、植物自身も GA を生産していることが明らかとなった。その後様々な GA が次々と単離・同定され、gibberellin A_x を GA_x と表記するのが一般的となった。現在までに 136 種の GA が植物や糸状菌、バクテリアから同定されているが (Hedden, 2020)、その中でも GA 受容体に結合し生体内で生理活性を発現する活性型 GA は、種子植物では GA₁ や GA₃、GA₄、GA₇ など数種類に限られている。これら活性型 GA は、「3β 位の水酸基、6 位のカルボキシ基、4 位から 10 位へ架橋されたラクトン環」という共通の化学構造を持つことが知られている (図 2) (Yamaguchi, 2008)。すなわち、これまでに同定されている GA のほとんどは活性型 GA の生合成中間体や代謝物である。

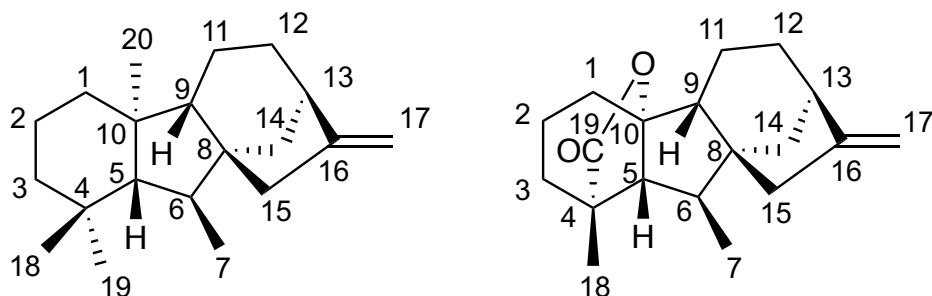


図 1. ジベレリンの基本骨格の化学構造

ent-ジベレラン骨格の化学構造 (左) と *ent*-20-ノルジベレラン骨格の化学構造 (右) を示す。図中の数字は炭素番号を示す。

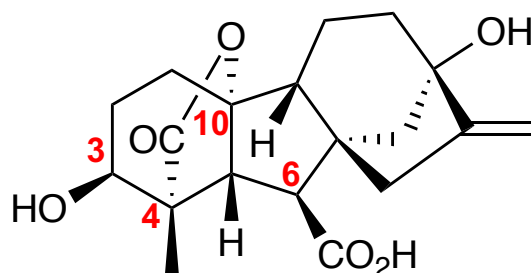


図 2. 活性型 GA の一つである GA₁ の構造

図中の数字は、生理活性の維持に要求される構造に関わる炭素番号を示す。

種子植物における GA の生合成経路は、図 3 に示すとおりであり、触媒する酵素の性質の違いから、①テルペン合成酵素 (terpene synthase: TPS) が関与する経路、②シトクロム P450 一原子酸素添加酵素 (cytochrome P450 monooxygenase: P450) が関与する経路、③主に 2-オキソグルタル酸依存性二原子酸素添加酵素 (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase: 2OGD) が関与する経路の 3 つに大別することができる。

まず、①の経路はゲラニルゲラニル二リン酸 (geranylgeranyl diphosphate: GGDP) から、*ent*-カウレンまでが生合成される経路を指す。種子植物では、2-*C*-メチル-D-エリスリトール-4-リン酸 (2-*C*-methyl-D-erythritol-4-phosphate: MEP) を中間体とする MEP 経路を主経路として生合成された GGDP が、プラスチドに局在する TPS であるコパリル二リン酸合成酵素 (*ent*-copalyl diphosphate synthase: CPS) と *ent*-カウレン合成酵素 (*ent*-kaurene synthase: KS) により *ent*-カウレンへと変換されることが明らかとなっている (Fall and West, 1971; Sun and Kamiya, 1994; Aach et al., 1997; Kasahara et al., 2002)。

次に、②の経路は *ent*-カウレンから GA₁₂ が生合成される過程を指す。この過程では、2 種類の P450 が関与し、*ent*-カウレンから *ent*-カウレン酸までは *ent*-カウレン酸化酵素 (*ent*-kaurene oxidase: KO/CYP701A) が、*ent*-カウレン酸から GA₁₂ までは *ent*-カウレン酸酸化酵素 (*ent*-kaurenoic acid oxidase: KAO/CYP88A) がそれぞれの反応を触媒することが示されている (Helliwell et al., 1998; Helliwell et al., 2001)。

最後に、③の経路は GA₁₂ から活性型 GA を含む種々の GA が生合成される経路を指す。この過程では主に 2OGD に属する酵素が反応を触媒する。図 3 に示したように、GA₁₂ が GA20 位酸化酵素 (GA 20-oxidase: GA20ox) による 3 段階の反応を経て GA₉ に変換され、さらに GA3 位酸化酵素 (GA 3-oxidase: GA3ox) による 3β 位の水酸化を受けて、活性型 GA の一つである GA₄ が生合成される。また、GA13 位酸化酵素 (GA 13-oxidase: GA13ox) の働きにより、同じく活性型 GA の一つである GA₁ が生合成される経路も知られている。イネでは GA13ox として CYP714B1 および B2 が同定されており、GA₁₂ を GA₅₃ に代謝する機能を持つ (Magome et al., 2013)。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、主に

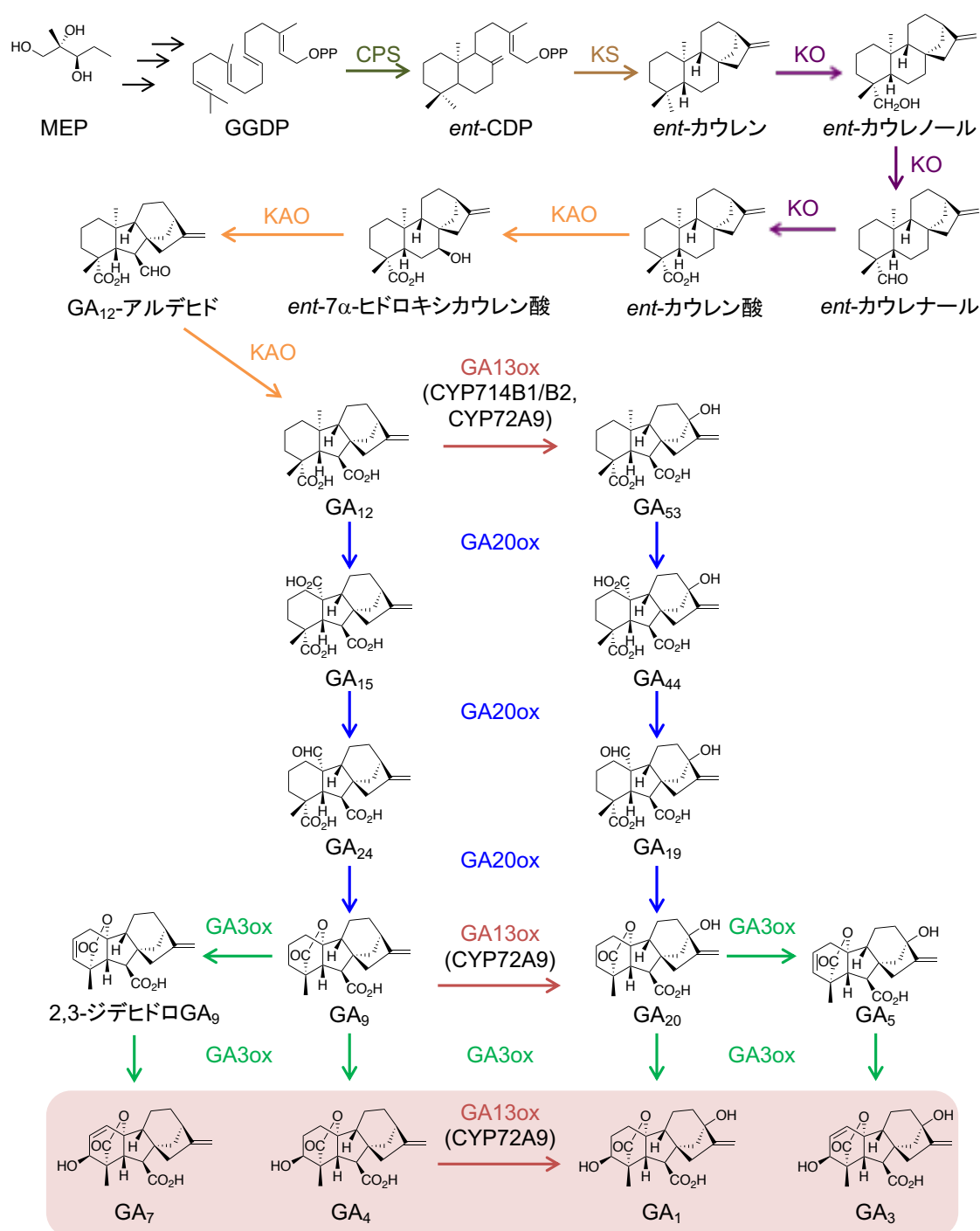


図 3. 種子植物における GA 生合成経路

MEP: 2-*C*メチル-D-エリスリトール-4-リン酸、GGDP: グラニルグラニルニリン酸、*ent*-CDP: *ent*-コパリルニリン酸、CPS: コパリルニリン酸合成酵素、KS: *ent*-カウレン合成酵素、KO: *ent*-カウレン酸化酵素、KAO: *ent*-カウレン酸酸化酵素、GA20ox: GA20 位水酸化酵素、GA13ox: GA13 位水酸化酵素、GA3ox: GA3 位水酸化酵素。CYP714B1/B2 と CYP72A9 はそれぞれイネとシロイヌナズナの酵素であり、赤の塗りつぶしは活性型 GA を示す。

CYP72A9 が GA13ox として機能し、GA₁₂、GA₉、GA₄ を水酸化し、GA₅₃、GA₂₀、GA₁ へとそれぞれ変換することが報告されている (He et al., 2019)。つまり、種子植物における GA₁₂ 以降の生合成経路は、GA13ox による 13 位の水酸化を経る「早期 13 位水酸化経路」と、水酸化を経ない「13 位非水酸化経路」の二つに分けることができる。早期 13 位水酸化経路上の GA は 13 位水酸化 GA、13 位非水酸化経路上のものは 13 位非水酸化 GA と呼ばれている。また、イネの OsGA3ox1 と OsGA3ox2 の酵素機能解析の結果から、OsGA3ox1 は GA₂₀ を GA₁ に代謝することに加え、GA₂₀ の 2,3 位の不飽和化を経由して GA₃ に変換することが明らかとなった (Itoh et al., 2001)。加えて、GA₉ に対しても同様に、GA₄ と GA₇ に変換する活性を示した。しかし、一般的に GA₃ や GA₇ の内生量は GA₁ や GA₄ よりも少ないことが知られており、GA₃ と GA₇ が生合成される経路は非主要経路であると考えられている (Hedden, 2020)。

GA の生合成経路に限らずシグナル伝達機構に関しても盛んに研究が行われており、受容体の他に DELLA タンパク質と F-box タンパク質も GA シグナル伝達の重要な因子であることが明らかとなっている。これらの研究は、主に外部投与された GA に応答しない「GA 非感受性変異体」の解析により進められてきた。

DELLA タンパク質は N 末端側にそのアミノ酸配列に由来して命名された DELLA ドメイン、C 末側に GRAS ドメインを有する。シロイヌナズナの GA シグナル伝達に関与する DELLA タンパク質は GIBBERELIC ACID INSENSITIVE (GAI)、REPRESSOR of *ga1-3* (RGA)、RGA-LIKE (RGL) 1、RGL2、RGL3 の 5 種が報告されている (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1997; Dill and Sun, 2001; Lee et al., 2002; Wen and Chang, 2002)。一方、イネにおける DELLA タンパク質は SLENDER RICE1 (SLR1) のみである (Ikeda et al., 2001)。SLR1 の DELLA ドメインに変異が生じたイネは矮性形質を示すのに対し、GRAS ドメインに変異が生じた際には徒長形質を示す (Ikeda et al., 2001; Itoh et al., 2002)。また、蛍光タンパク質である GFP 融合型の SLR1 や RGA を発現させた植物に GA₃ を投与すると、GFP 蛍光の減少がみられた (Dill et al., 2001; Itoh et al., 2002)。一方、DELLA ドメインに変異が生じた SLR1 や RGA の GFP 融合型タンパク質を発現した植物では、GA₃ を投与しても GFP 蛍光の消失は見られなかった (Dill et al., 2001; Itoh et al., 2002)。これらのことから、DELLA タンパク質は GRAS ドメインを介して GA シグナルを抑制する機能を持ち、DELLA ドメインは GA シグナルによる DELLA タンパク質の分解に重要であると考えられた。つまり、DELLA タンパク質は GA シグナル伝達における「負の制御因子」であり、DELLA ドメインと GRAS ドメインは、それぞれ GA シグナル受容と GA シグナル抑制活性を担うと考えられている。

イネとシロイヌナズナの GA 非感受性変異体 *gid2* (*gibberellin insensitive dwarf2*) と *sly1* (*sleepy1*) の原因遺伝子が共に F-box タンパク質をコードすることから、これらの F-box タンパク質も GA シグナル伝達に関与することが推測された (Steber et al., 1998; McGinnis et al., 2003; Sasaki et al., 2003)。これらの変異体は GA のシグナル伝達が滞るとともに矮

性の表現型を示したことから、GID2 や SLY1 は GA シグナル伝達における「正の制御因子」であると考えられた。F-box タンパク質は、プロテアソーム依存的なタンパク質分解を制御する SCF ユビキチン E3 リガーゼ複合体を構成するサブユニットの一部である。*gid2* や *sly1* で DALLA タンパク質が蓄積していることに加え (McGinnis et al., 2003; Sasaki et al., 2003)、GFP 融合型の SLR1 を発現した *gid2* に GA₃ を投与しても GFP 蛍光の減少が見られなかったことから (Gomi et al., 2004)、GID2 や SLY1 はプロテアソームを介した DELLA タンパク質の分解に関与することが示唆された。

イネの GA 非感受性矮性変異体 *gid1* (*gibberellin insensitive dwarf1*) の解析により、この変異体の原因遺伝子がコードする GID1 が GA 受容体として同定された (Ueguchi-Tanaka et al., 2005)。GID1 は α/β -加水分解酵素ファミリーに属する可溶性タンパク質である。しかし、加水分解活性に必要な触媒三つ組残基 (セリン、アスパラギン酸、ヒスチジン) のうちヒスチジンがバリニンに置換されているため、GID1 は加水分解能を持たない (Ueguchi-Tanaka et al., 2005)。シロイヌナズナからは3つの *GID1* ホモログ遺伝子 (*GID1a*, *GID1b*, *GID1c*) が同定されており、これらがコードするタンパク質が機能的に重複して GA 受容の役割を果たすと考えられている (Griffiths et al., 2006; Nakajima et al., 2006; Iuchi et al., 2007)。また、イネとシロイヌナズナの GID1 ファミリーに対する GA の親和性は、GA₁ に比べて GA₄ の方が高いことが明らかとなった (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Nakajima et al., 2006)。さらに、X 線結晶構造解析の結果、GID1 は GA と結合すると N 末端に存在する「リッド」と呼ばれるドメインが蓋をするように構造変化し、DELLA タンパク質との相互作用が誘導されることが示された (Murase et al., 2008; Shimada et al., 2008)。また、酵母を用いたタンパク質間相互作用解析により、DELLA タンパク質は活性型 GA を受容した GID1 と相互作用し、さらに F-box タンパク質も結合することで 3 者複合体を形成することが示唆された (Griffiths et al., 2006; Hirano et al., 2010)。

以上のことから、活性型 GA 非存在下では DELLA タンパク質により GA のシグナルは抑制されるが、活性型 GA 存在下では「GID1-GA-DELLA-F-box」の複合体が形成され、DELLA タンパク質がプロテアソーム分解系を介して分解されることにより GA シグナルの抑制が解除される、という機構が明らかとなった (図 4)。

多様な生理作用を持つ GA の内生量変化は植物の成長や形態形成に大きな影響を与えるが、GA 代謝関連遺伝子の発現が精巧に制御されることで、その恒常性が維持されている。シロイヌナズナの GA 生合成酵素遺伝子である *AtGA20ox1* や *AtGA3ox1* の発現は、GA 欠損変異体で上昇するが、逆に活性型 GA が投与されると減少する (Chiang et al., 1995; Phillips et al., 1995; Xu et al., 1999)。イネにおいても同様であり、*OsGA20ox2* や *OsGA3ox2* の発現は GA 生合成阻害剤の投与によって上昇し、GA₃ の外部投与によって減少する (Itoh et al., 2001; Ashikari et al., 2002)。これらは「フィードバック制御」として知られる機構である。一方、GA の不活性化酵素をコードする遺伝子である *AtGA2ox1* と *AtGA2ox2* の発現は GA₃ の投与によって上昇する (Thomas et al., 1999)。同様に、イネの

<GA非存在下>



<GA存在下>

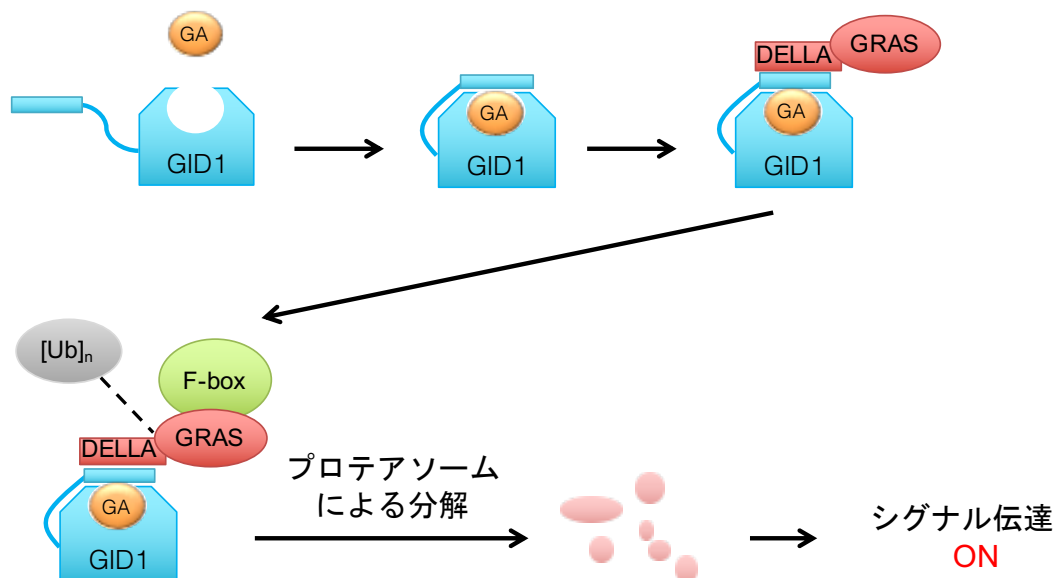


図 4. GA のシグナル伝達機構

GA の非存在下（上段）では、DELLA タンパク質によりシグナル伝達は抑制される。一方、GID1 に GA が結合すると（下段）、GID1 のリッドドメインが結合ポケットに蓋をするような立体構造変化が生じる。このリッドドメインと DELLA タンパク質中の DELLA ドメインが相互作用し、「GID1-GA-DELLA-F-box」の複合体が形成される。これにより、DELLA タンパク質がユビキチン (Ub) 化され、プロテアソームにより DELLA タンパク質が分解されることで下流の因子へと GA のシグナルが伝達される。

GA 不活性化遺伝子である *GA2ox3* も GA_3 の投与によって発現量が上昇することが報告されている (Sakai et al., 2003)。これらの機構は「フィードフォワード制御」と呼ばれている。すなわち、GA の内生量の恒常性維持には、生合成と不活性化の双方による調節機構が重要であることが知られている。

GA 不活性化にはいくつかのメカニズムが存在し、その中でも最もよく知られているのは、GA2 位酸化酵素 (GA 2-oxidase: *GA2ox*) による 2 β 位の水酸化である (図 5)。Thomas らは、*GA2ox* の活性が強いことで知られていたベニバナインゲンの未成熟種子から *GA2ox* のクローニングに成功した (Thomas et al., 1999)。さらに彼らは、ベニバナインゲンの *GA2ox* のアミノ酸配列情報を用いて、シロイネナズナから 3 種の *GA2ox* (*GA2ox1-3*) を同定し、これらがコードするタンパク質は炭素数 19 からなる GA (C_{19} -GA) の 2 β 水酸化を触媒する酵素であることを明らかにした (Thomas et al., 1999)。その後、*GA2ox* がイネやエンドウ (*Pisum sativum*) から同定され、それらも同様に C_{19} -GA の 2 β 水酸化を担う酵素タンパク質をコードすることが報告された (Martin et al., 1999; Sakamoto et al., 2001; Sakai et al., 2003)。加えて、 C_{20} -GA を基質にする *GA2ox* もシロイネナズナやホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) から同定されており、これらは GA_{12} や GA_{53} などの内生量の調節に関与すると考えられている (Schomburg et al., 2003; Lee and Zeevaart, 2005)。*GA2ox* は系統解析により 3 つのクレード (クラス I-III) に分けられ (Lee and Zeevaart, 2005)、主に C_{19} -GA を基質にするものはクラス I とクラス II に、 C_{20} -GA を水酸化するものはクラス III にそれぞれ分類されている。

また、2 位の水酸化以外にも GA の不活性化機構はいくつか知られており、それらの中でも主な機構を図 6 にまとめた。シロイネナズナには、GA の 6 位カルボキシ基のメチル化による不活性化機構が存在する (Varbanova et al., 2007)。このメチル化酵素は GA メチル基転移酵素 (GA methyltransferase: *GAMT*) と呼ばれ、*S*-アデノシル-L-メチオニンをメチル基供与体とし、活性型 GA だけでなく様々な GA を基質としてメチル化を行う。これまでにシロイネナズナから 2 つの *GAMT* 遺伝子 (*GAMT1*, *GAMT2*) が同定されている。これらの機能喪失型二重変異体である *gamt1 gamt2* の未成熟種子では活性型 GA の内生量が増加し、GA 生合成阻害剤への抵抗性も上昇することから、*GAMT* はシロイネナズナの種子における GA 不活性化に重要な遺伝子であるとされている (Varbanova et al., 2007)。加えて、シロイネナズナの *CYP714A1/A2* も GA 不活性化酵素として機能することが示されている。酵母ミクロソームを用いた組換えタンパク質の酵素試験の結果 (Nomura et al., 2013)、*CYP714A1* は GA_{12} を主に 16 α -カルボキシ-17-ノル GA_{12} に酸化することが明らかとなった。一方、*CYP714A2* は *ent*-カウレン酸と *ent*-7 α -ヒドロキシカウレン酸の 13 位を水酸化したのに加え、 GA_{12} -アルデヒドと GA_{12} の 12 位を水酸化する酵素活性を示した。また、*CYP714A1/A2* は主に未熟種子や長角果、根で高発現し、*CYP714A1* と *CYP714A2* を過剰発現したシロイネナズナはそれぞれ、矮性と半矮性の表現型を示した (Nomura et al., 2013)。*cyp714a1* および *cyp714a2* 各単独変異体は、GA 生合成阻害剤であるパクロブトラ

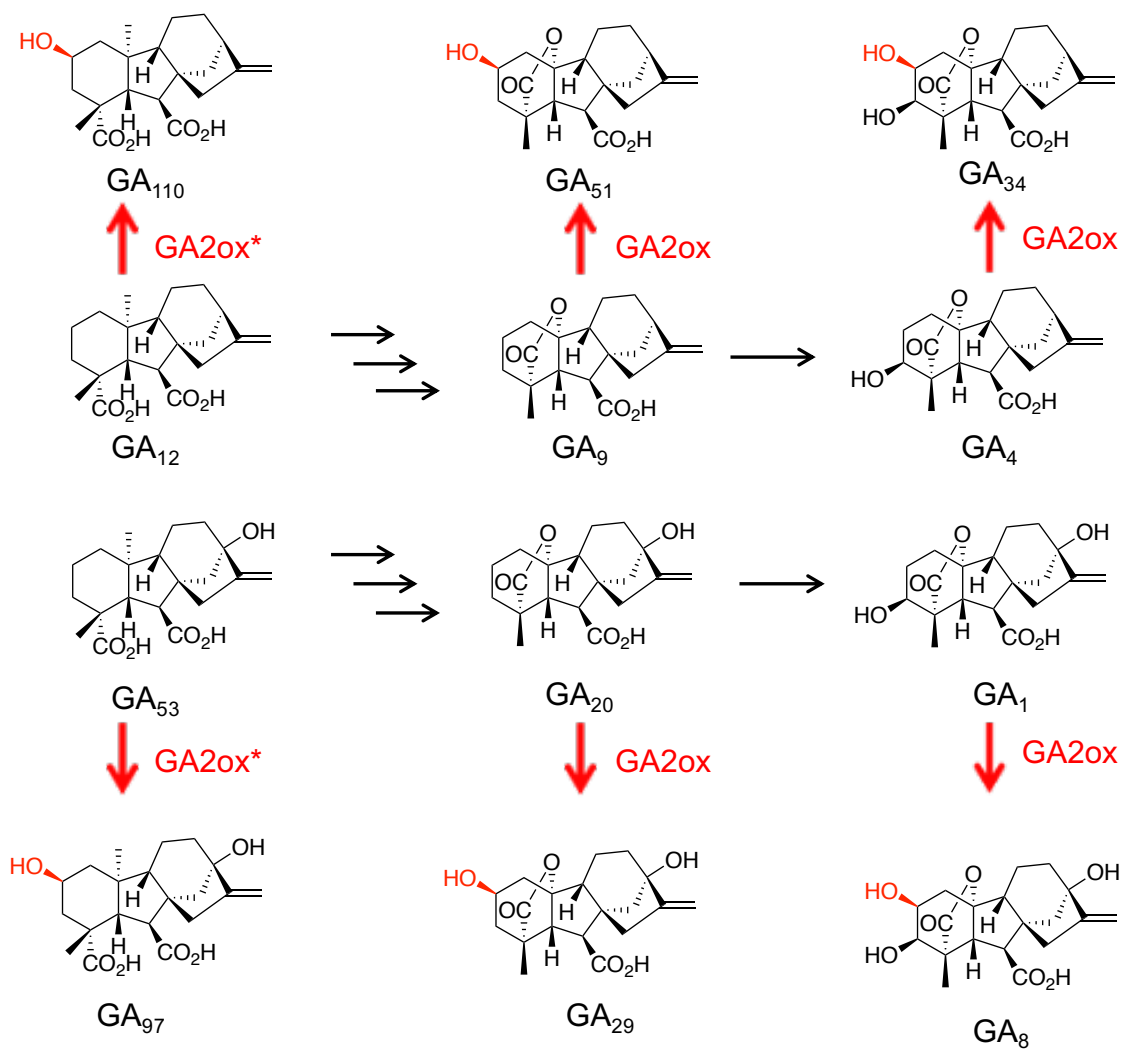


図 5. 2β位の水酸化による GA の不活性化機構

GA2ox : GA2 位水酸化酵素 (クラス I、II)、GA2ox* : GA2 位水酸化酵素 (クラス III)

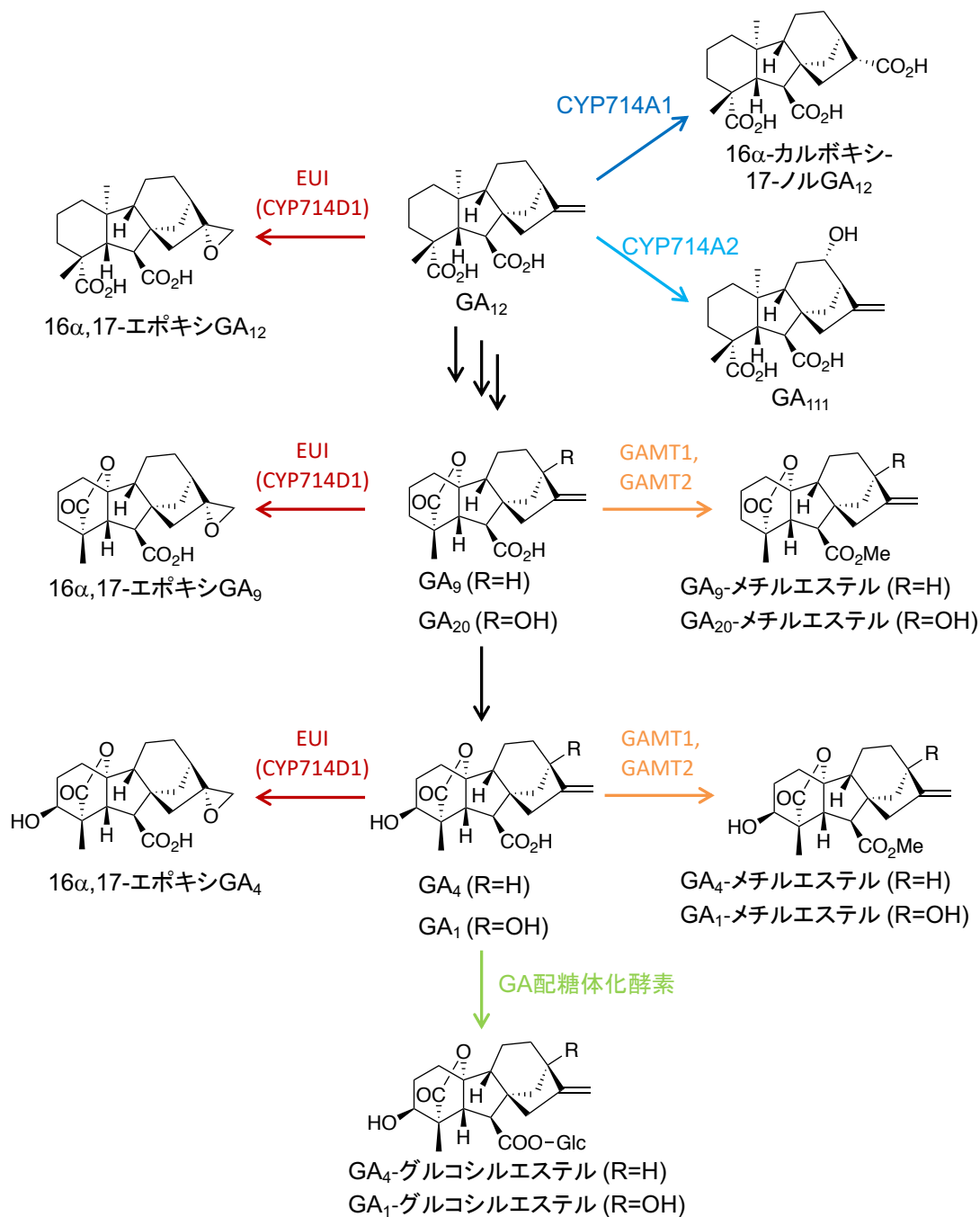


図 6. 2β位の水酸化以外の主な GA 不活性化機構

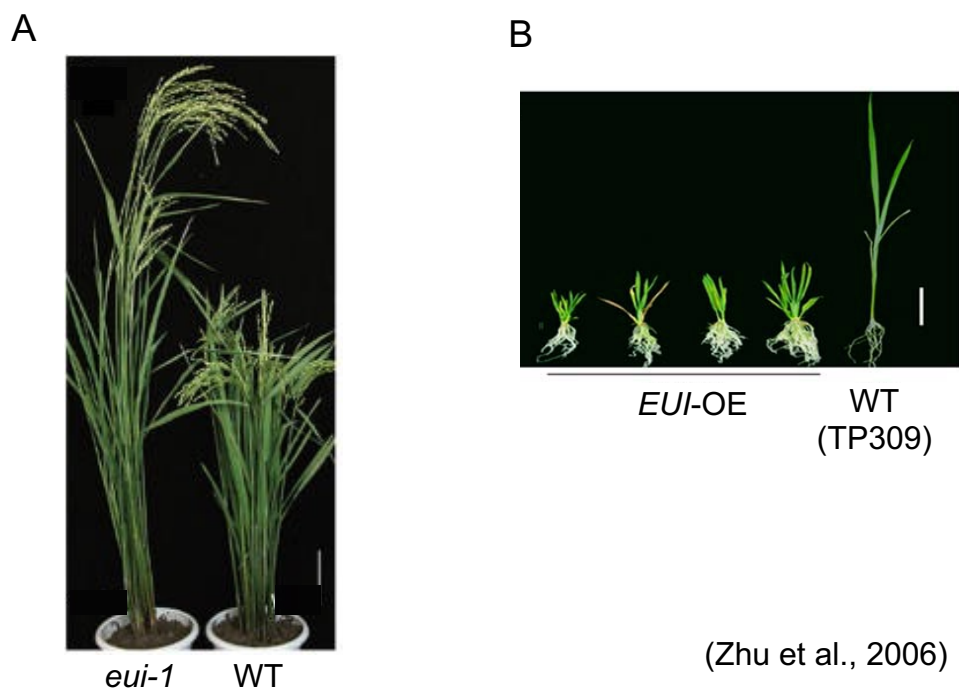
EUI: ELONGATED UPPERMOST INTERNODE、GAMT: GA メチル基転移酵素。EUI はイネの酵素であり、CYP714A1 と CYP714A2、GAMT1、GAMT2 はシロイヌナズナの酵素である。また、反応を触媒する酵素は未同定であるが、GA は配糖体として生体内に存在する。

ゾールによる発芽抑制に対する抵抗性は上昇したものの、それ以外に目立った形態変化は観察されなかった (Nomura et al., 2013)。一方、*CYP714A1*-RNAi (*CYP714A1* の RNAi による発現抑制株) と *cyp714a2* の二重変異体 *CYP714A1*-RNAi/*cyp714a2* は、野生型 (wild type: WT) と比較して GA₄ の内生量が増加し、地上部の植物重量の増加や早期開花といった表現型を示した (Zhang et al., 2011)。したがって、*CYP714A1* と *CYP714A2* はシロイヌナズナの地上部における GA 代謝を介した成長調節に関与していることが考えられるが、これらの詳細な役割は明らかとなっていない。

GA は抱合体としても植物体内に存在する。その中でも GA のグルコース配糖体が数多く同定されており、不活性型もしくは貯蔵型の GA 代謝物であると考えられている (Schneider and Schliemann, 1994)。GA のグルコース配糖体は、GA の水酸基を介したグリコシド結合により抱合されたものと、GA の 6 位カルボキシ基を介したグリコシルエステル結合により抱合されたものが同定されている (Schneider et al., 1992)。しかし、配糖体化反応を触媒する酵素は未だ見つかっておらず、GA 配糖体化の生理的意義は未だ明らかとなっていない。

イネには ELONGATED UPPERMOST INTERNODE (EUI) による 16,17 位二重結合のエポキシ化を介した GA 不活性化機構が存在する。この不活性化機構は出穂期のイネの最上位節間において特徴的であり、最上位節間が異常徒長する変異体である *eui* (Rutger and Carnahan, 1981) (図 7A) の研究により明らかとなった。2006 年に Zhu らは、*eui* の原因遺伝子である *EUI* は出穂期の葍や最上位節で発現が高く、*CYP714D1* に分類される P450 をコードすることを突きとめた (Zhu et al., 2006)。Zhu らはさらに、EUI が 13 位非水酸化 GA の 16,17 位の二重結合をエポキシ化する酵素機能を持ち、イネの最上位節間における GA 不活性化に大きく寄与することを以下の実験結果から明らかにした。

まず、*EUI* の過剰発現体 (*EUI*-OE) は矮性形質を示し (図 7B)、*eui* の最上位節間では GA の生合成遺伝子 *GA20ox* と *GA3ox* の発現量が減少、*GA20ox* の発現量が増加しているにも関わらず、WT と比較して活性型 GA である GA₁ と GA₄ が顕著に蓄積していた (図 8)。次に、*EUI* を発現させた酵母のミクロソームを用いた酵素反応試験により、*EUI* は GA₁₂ や GA₉、GA₄ といった 13 位非水酸化 GA を基質として 16,17-ジヒドロ-16 α ,17-エポキシ GA (以下、16 α ,17-エポキシ GA) を生成することが明らかとなった。また、酵素反応によって調製した 16 α ,17-エポキシ GA₄ をイネの実生に投与した結果、GA₄ に見られるような茎葉部伸長作用が観察されなかった。精製が困難な 16 α ,17-エポキシ GA を酸性条件下で 16,17-ジヒドロ-16 α ,17-ジヒドロキシ GA (以下、16 α ,17-ジヒドロキシ GA) へと非酵素的に変換して 16 α ,17-エポキシ GA の内生量を間接的に定量した結果、*EUI*-OE では 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₁₂ と 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₉ の内生量が WT と比較して顕著に増加していることが推察された。また、*EUI*-OE では GA₁₂ や GA₉ の内生量が WT よりも少ないことが明らかとなった。以上の結果から、*EUI* が生体内でも 13 位非水酸化 GA のエポキシ化を行っていることが示唆された (Zhu et al., 2006)。



(Zhu et al., 2006)

図 7. イネの *eui* および *EUI-OE* の表現型

A) 出穂後 10 日目の WT (cv. ZS97) と *eui-1* の表現型を示し、スケールバーは 10 cm を表す。Zhu et al. (2006) の図を転載利用した。B) 2 週齢の WT (cv. TP309) と 2 ヶ月齢の *EUI-OE* の表現型を示し、スケールバーは 5 cm を表す。Zhu et al. (2006) の図を転載利用した。

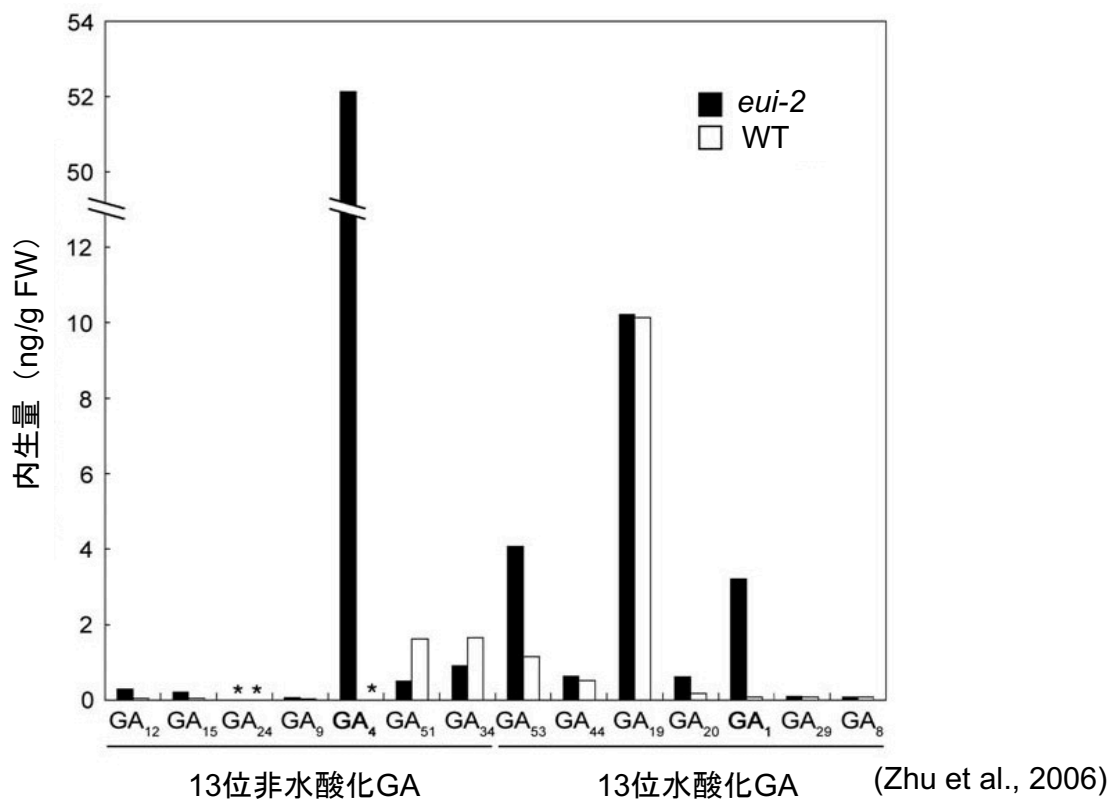


図 8. *eui* 及び WT における GA の内生量
eui-2 および WT の最上位節間における GA の内生量を示す。グラフ中のアスタリスクは検出できなかったことを表す。Zhu et al. (2006) の図を転載利用した。

eui と同様に最上位節間が伸長するがその表現型が弱い *eui2* と呼ばれる変異体も発見されているが (Guan et al., 2011)、原因遺伝子 *EUI2* がコードする EUI2 タンパク質の機能は不明であるため本変異体の表現型の原因は明らかにされてこなかった (図 9A)。EUI2 は α/β -加水分解酵素ファミリーの中でもエポキシド加水分解酵素ファミリーに属すると推定されている。加えて、*eui eui2* 二重変異体は *eui* と同様の表現型を示す (図 9B)。これらのことから、EUI2 は EUI の下流で機能し、16 α ,17-エポキシ GA を加水分解することが予想された。また、*eui2* で EUI を過剰発現させた *EUI-OE/eui2* は *EUI-OE* よりも草丈が大きくなる。もし EUI2 が 16 α ,17-エポキシ GA₄ を加水分解する機能を持つとすると、この徒長の差は *EUI-OE/eui2* における 16 α ,17-エポキシ GA₄ の蓄積であることが推測された。すなわち、Zhu らの投与実験では活性が無いと考えられた 16 α ,17-エポキシ GA₄ が GA としての生理活性を有する可能性が考えられた。仮に 16 α ,17-エポキシ GA₄ が弱いながらも生理活性を有していると考えたと、*eui2* が弱い徒長形質を示すのは 16 α ,17-エポキシ GA₄ の蓄積に起因すると考えることも可能である。

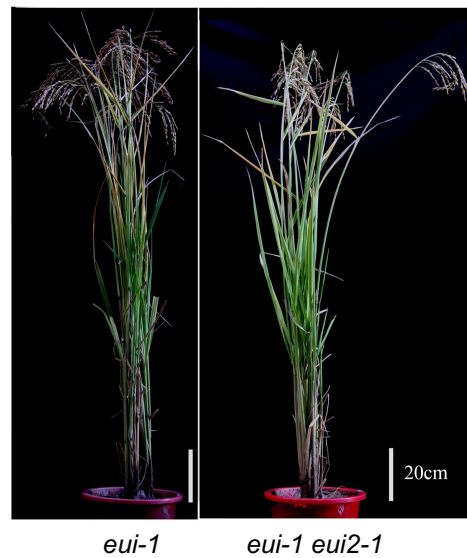
イネは最上位節間が十分に伸長することで出穂して種子を作るため、節間伸長はイネにとって非常に重要である。また、*eui* や *eui2* は、ハイブリッドライスと呼ばれる雑種米の開発に利用されている (Yang et al., 2002; Liu et al., 2004; Yang and Hwa, 2008)。ハイブリッドライスは、雑種強勢により収量や病害耐性などに優れた形質を示すように育種される雑種第一代の品種であり、中国を中心に開発が進められている。一方、イネは自家受粉を行う植物であるため、雑種交配を行うためには、雄性不稔株の利用が必須である。しかし、雄性不稔株は一般的に節間が伸長しにくく、それにより出穂しにくい。そこで、この難点を解決するために、最上位節間が特徴的に長く伸長する *eui* や *eui2* が利用されている。

以上の背景のもと、筆者はイネの最上位節間における GA の不活性化機構に着目し、「EUI による GA₄ のエポキシ化では不活性化は不完全であり、これに続く EUI2 による加水分解反応によって GA₄ はさらに不活性化される」という仮説を立てた。本博士論文研究ではこの仮説を検証するべく、まず第一章では EUI2 の酵素機能解析を行った。次に、質量分析による 16 α ,17-エポキシ GA₄ の分析法確立および内生量分析、既知の内生 GA の定量分析などを行った。加えて第二章では、16 α ,17-エポキシ GA₄ の生理活性を明らかにするために、イネへの投与試験および GID1 との相互作用解析を行った。さらに、16 α ,17-エポキシ GA₄ や 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ などのような、GA の 16,17 位の化学修飾が生理活性に与える影響について知見を深めるために、化学合成された 16 α ,17-エポキシ GA₄ や 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ などの類縁化合物を用いた構造活性相関も検討した。

A



B



(中国科学院 He教授より提供)

図 9. イネの *eui2* および *eui eui2* の表現型

A) 左から順に、出穂後のイネの *eui-1*、*eui2-1*、WT (cv. ZS97) の表現型を示す。B) 出穂後のイネの表現型を示し、左と右はそれぞれ、*eui-1* と *eui-1 eui2-1* を示す。スケールバーは 20 cm を示す。中国科学院 He 教授より提供された図を転載利用した。

第一章 イネの最上位節間における EUI2 の機能解析

1-1. 緒言

「EUI による GA₄ のエポキシ化では不活性化は不完全であり、これに続く EUI2 による加水分解反応によって GA₄ はさらに不活性化される」という仮説の検証に向け、まず EUI2 の組換えタンパク質を大腸菌によって発現し、16 α ,17-エポキシ GA₄ との酵素試験を行った。さらに、16 α ,17-エポキシ GA₄ 以外の 16,17-エポキシ GA も基質として同様の酵素試験を行い、EUI2 の基質特異性について調べた。

次に、EUI2 のイネ生体内での機能を明らかにするために、最上位節間における 16 α ,17-エポキシ GA₄ および、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の内生量分析を行うこととした。しかし、16 α ,17-エポキシ GA₄ は植物体から未同定の化合物だったため、まずは本化合物の分析法の確立を試みた。GA は弱酸性化合物であるため、植物体から精製する際には酸性溶媒を使用するのが一般的である。しかし、16 α ,17-エポキシ GA₄ のエポキシ基は非常に加水分解されやすいため、酸性溶媒を使用した精製では非酵素的に 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ へと変換されてしまう (Zhu et al., 2006)。カルボキシ基を持つ酸性化合物の中性化合物への誘導體化法として代表的なものの一つに、ジアゾメタンによるメチルエステル誘導體化が挙げられる。しかし、GA の不活性化機構には GAMT によるメチル化がある (Varbanova et al., 2007)。これはシロイヌナズナで報告されている機構であるが、イネにも GAMT が属するメチル化酵素ファミリーが存在し、基質未知のメチル化酵素が多く存在する。したがって、筆者はイネに 16 α ,17-エポキシ GA のメチルエステル体が内在する可能性を考慮し、エチルエステル体への誘導體化による 16 α ,17-エポキシ GA₄ の同定を試みることにした。加えて、*eui2* の最上位節間に含まれる 4 種の活性型 GA (GA₁, GA₃, GA₄, GA₇) の内生量を測定することで、*eui2* が WT よりも徒長することの原因に迫ることとした。

1-2. 結果

1-2-1. EUI2 タンパク質を用いた酵素活性試験

EUI2 の酵素機能を明らかにするために、大腸菌で発現させたマルトース結合タンパク質 (maltose binding protein: MBP) および (His)₆ タグ融合型の EUI2 組換えタンパク質を精製し、16 α ,17-エポキシ GA₄ とインキュベートした。加えて、EUI2 の触媒三つ組残基のうち、104 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異型 EUI2 (EUI2^{D104A}) をネガティブコントロールとして同様の酵素反応に供した。その結果、EUI2 は 16 α ,17-エポキシ GA₄ から 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ への加水分解反応を触媒したが、EUI2^{D104A} は 16 α ,17-エポキシ GA₄ の加水分解活性を示さなかった (図 10)。また、EUI2 は 16 α ,17-エポキシ GA₉ に対しても同様のエポキシド加水分解活性を示した (図 11)。加えて、16 位ヒドロキシ基の立体異性体を用いた比較分析から、これら EUI2 酵素反応産物の 16 位ヒドロキシ基の立体配置は、どちらも α 型であることが確認された (図 12)。さらに、EUI2 の基質特異性をより詳しく調べるために、化学合成によって調製した 16 α ,17-エポキシ GA₁ と 16 β ,17-エポキシ GA₄ に対する酵素試験も行った。その結果、EUI2 は 16 α ,17-エポキシ GA₁ を基質として加水分解したのに対し、16 β ,17-エポキシ GA₄ には活性を示さなかった (図 13)。これらの結果から、EUI2 は 16 α ,17-エポキシ GA の加水分解反応を触媒することが明らかとなった。また、13 位非水酸化 GA のみを基質とする EUI とは異なり、EUI2 は 13 位に水酸化を持つ化合物も基質とすることが示された。

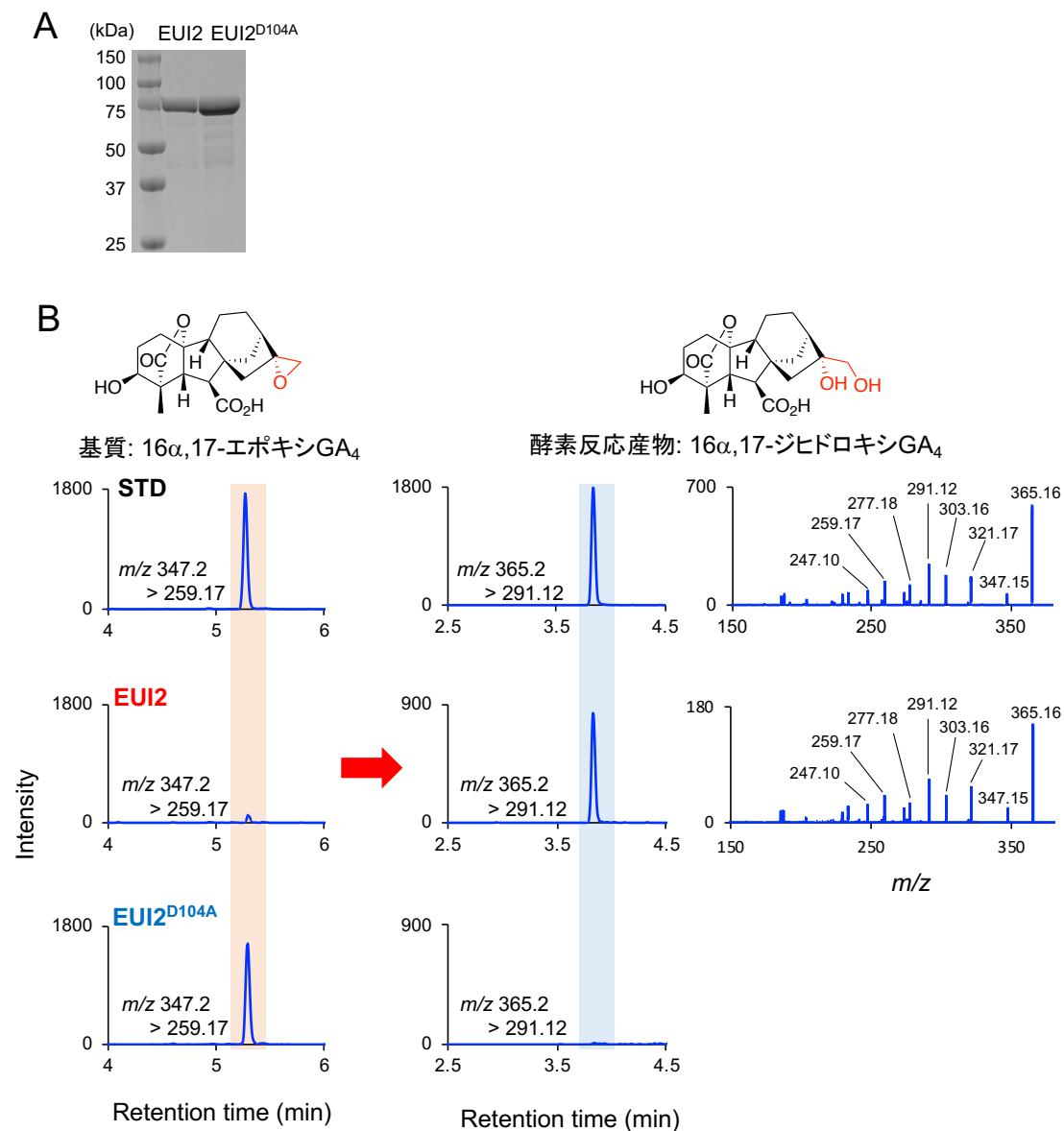


図 10. EUI2 と 16 α ,17-エポキシ GA₄ の酵素試験

A) 酵素試験に用いた MBP および(His)₆ タグ融合型 EUI2 の大腸菌による組換えタンパク質の SDS-PAGE の結果。一番左のレーンは分子量マーカを示し、中央に EUI2 を 2 μ g、右にネガティブコントロールとして用いた変異型 EUI2 (EUI^{D104A}) を 2 μ g 泳動した結果を示す。B) 酵素反応液の LC-MS/MS 分析結果。左から順に、基質として用いた 16 α ,17-エポキシ GA₄ の抽出クロマトグラム (m/z 349.2 > 259.15)、酵素反応産物である 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の抽出クロマトグラム (m/z 365.2 > 291.12) とそのプロダクトイオンスキャンの結果を示す。また、上から順に、各化合物の標品 (STD)、EUI2 と 16 α ,17-エポキシ GA₄ の反応溶液、EUI2^{D104A} と 16 α ,17-エポキシ GA₄ の反応溶液の分析結果をそれぞれ示す。

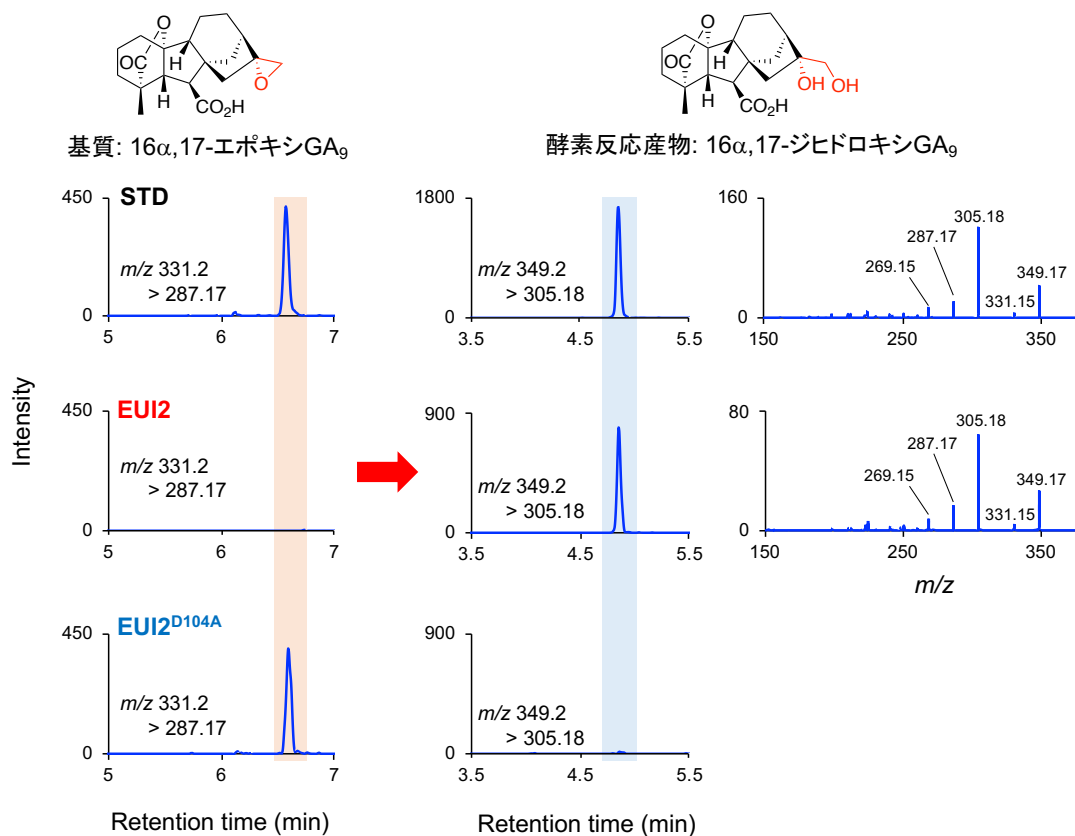


図 11. EUI2 と 16 α ,17-エポキシ GA₉ の酵素反応後の LC-MS/MS 分析結果

左から順に、基質として用いた 16 α ,17-エポキシ GA₉ の抽出クロマトグラム (m/z 331.2 > 287.17)、酵素反応産物である 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₉ の抽出クロマトグラム (m/z 349.2 > 305.18) とそのプロダクトイオンスキャンの結果を示す。また、上から順に、各化合物の標品 (STD)、EUI2 と 16 α ,17-エポキシ GA₉ の反応溶液、ネガティブコントロールとして用いた EUI2^{D104A} と 16 α ,17-エポキシ GA₉ の反応溶液の分析結果をそれぞれ示す。

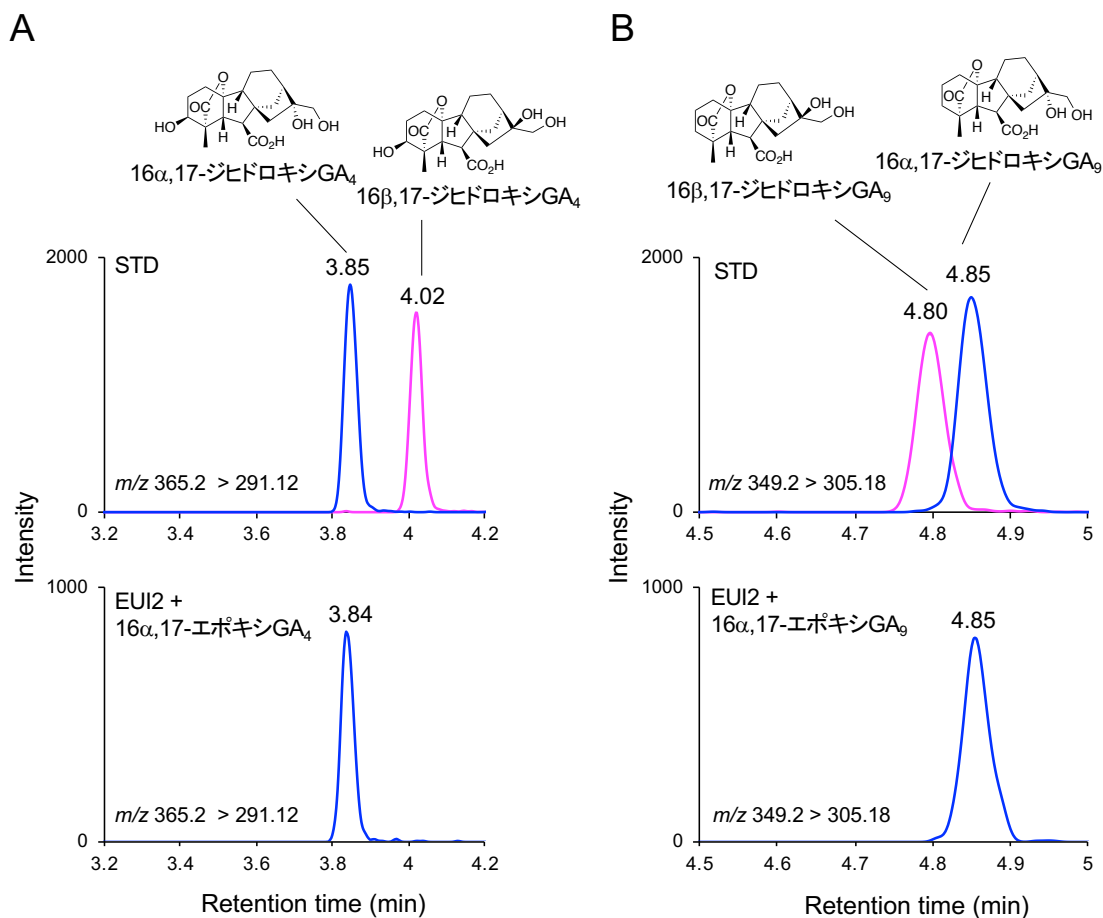


図 12. EUI2 酵素反応産物の立体構造の確認

A) EUI2 と 16 α ,17-エポキシ GA₄ 反応後の LC-MS/MS 分析結果として、 m/z 365.2 のプレカーサーイオンを m/z 291.12 で抽出したクロマトグラムを示す。上段は 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ と 16 β ,17-ジヒドロキシ GA₄ の標品の結果 (STD) を示し、下段に EUI2 と 16 α ,17-エポキシ GA₄ の反応溶液の結果を示す。B) EUI2 と 16 α ,17-エポキシ GA₉ 反応後の LC-MS/MS 分析結果として、 m/z 349.2 のプレカーサーイオンを m/z 305.18 で抽出したクロマトグラムを示す。上段は 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₉ と 16 β ,17-ジヒドロキシ GA₉ の標品の結果 (STD) を示し、下段に EUI2 と 16 α ,17-エポキシ GA₉ の反応溶液の結果を示す。

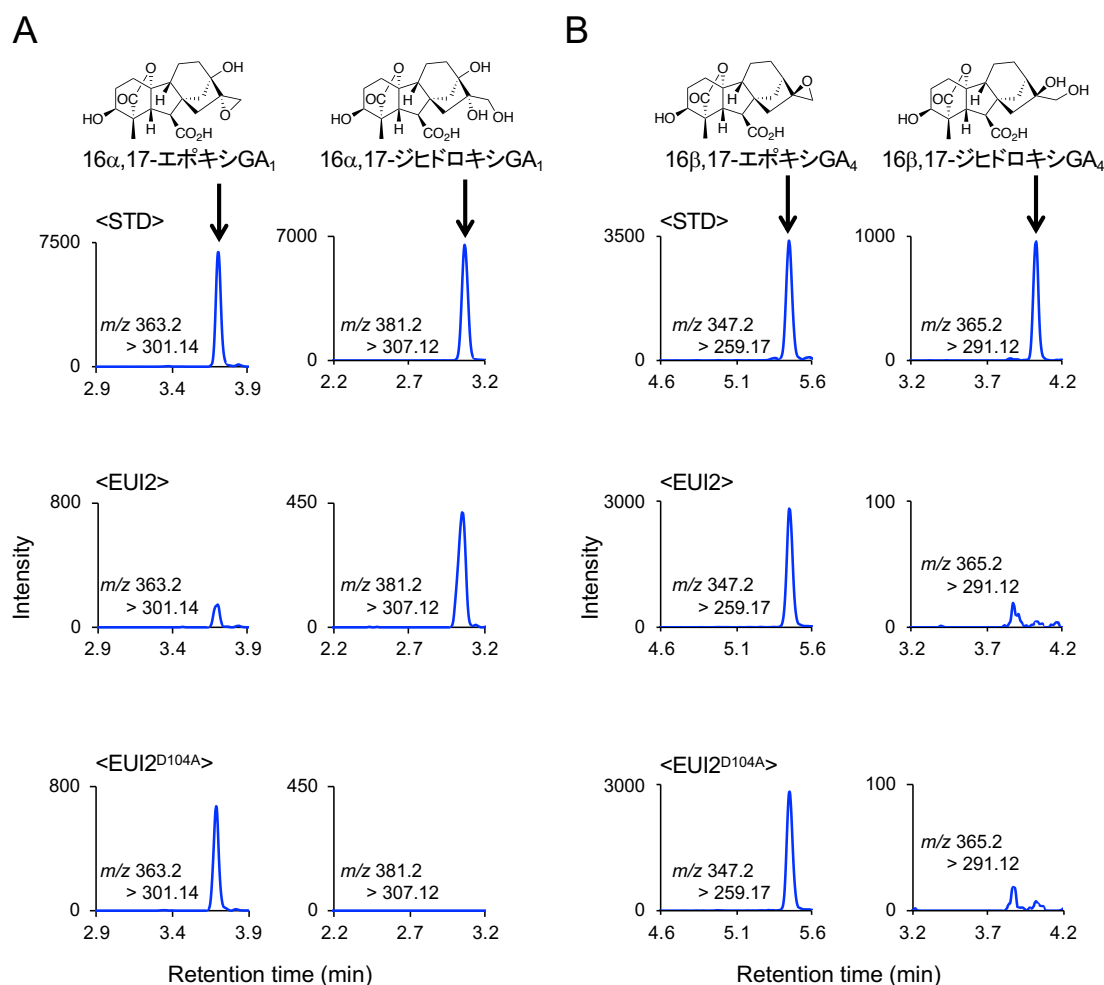


図 13. 16 α ,17-エポキシ GA₁ または 16 β ,17-エポキシ GA₄ に対する EUI2 の酵素試験
A) EUI2 と 16 α ,17-エポキシ GA₁ 反応後の LC-MS/MS 分析結果。左側に 16 α ,17-エポキシ GA₁、右側に 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₁ の抽出クロマトグラム（それぞれ m/z 363.2 > 301.14、381.2 > 307.12）を示す。上段にそれぞれの標準品 (STD) の分析結果を示し、中段と下段にはそれぞれ、EUI2 または EUI2^{D104A} を酵素として用いた結果を示す。B) EUI2 と 16 β ,17-エポキシ GA₄ 反応後の LC-MS/MS 分析結果。左側に 16 β ,17-エポキシ GA₄、右側に 16 β ,17-ジヒドロキシ GA₄ の抽出クロマトグラム（それぞれ m/z 347.2 > 259.17、365.2 > 291.12）を示す。上段にそれぞれの標準品 (STD) の分析結果を示し、中段と下段にはそれぞれ、EUI2 または EUI2^{D104A} を酵素として用いた結果を示す。

1-2-2. 16 α ,17-エポキシ GA₄の同定および内生量分析

*in vitro*の酵素試験で得られた EUI2 の酵素機能がイネの生体内でも同様であるかを調べるために、16 α ,17-エポキシ GA₄ の内生量分析を行うこととした。しかし、16 α ,17-エポキシ GA₄ は植物体から未同定であり、特に通常の GA 分析に用いられる精製方法では、酸性条件下で非酵素的に 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ が生成される問題点があった (Zhu et al., 2006)。そこで、16 α ,17-エポキシ GA₄ を中性化合物であるエチルエステル体 (16 α ,17-エポキシ GA₄-Et) に誘導体化して精製することを試みた。まず、16 α ,17-エポキシ GA₄-Et が内生物質としてイネに存在するかどうかを調べるために、出穂期の WT と *eui2* それぞれの最上位節間 (約 1 g) のアセトン抽出液を前処理後に LC-MS/MS 分析に供した。その結果、内部標準物質として抽出液に 300 pg 相当量加えた [²H₂]-16 α ,17-エポキシ GA₄-Et が検出されたのに対し、16 α ,17-エポキシ GA₄-Et は検出されなかった。したがって、16 α ,17-エポキシ GA₄-Et はイネの最上位節間に内在しないか、あるいは内在してもその内生量は限りなく少ないことが示された。そこで次に、*eui2* 最上位節間抽出液にエチル化試薬としてジアゾエタンを添加し、同様の精製操作を行い LC-MS/MS 分析に供した。その結果、16 α ,17-エポキシ GA₄-Et の標品と比較して LC での保持時間および、MS/MS でのフラグメントパターンが一致するピークが *eui2* 最上位節間の抽出液から検出された (図 14)。このことから、16 α ,17-エポキシ GA₄ をエチルエステル誘導体としてイネから同定した。

次に、EUI の酵素反応により生成した [²H₂]-16 α ,17-エポキシ GA₄ を内部標準物質として用いることで、最上位節間に含まれる 16 α ,17-エポキシ GA₄ の内生量をエチルエステル誘導体として測定した。その結果、16 α ,17-エポキシ GA₄ は WT の最上位節間からは検出限界以下であったのに対し、*eui2-1* および *eui2-2* には蓄積していることが示された (図 15)。このことから、EUI2 はイネの生体内でも 16 α ,17-エポキシ GA₄ を基質としていることが示唆された。一方、予想外なことに、16 α ,17-エポキシ GA₄ は WT と比べて *eui-1 eui2-1* でも増加していることが明らかとなった (図 15)。このことから、EUI とは異なる GA エポキシ化酵素がイネに存在する可能性が考えられた。また、*EUI-OE/eui2-2* でも WT と比較して 16 α ,17-エポキシ GA₄ が蓄積していたが、*eui2-2* との間に有意な内生量差は認められなかった。これは、*EUI* を過剰発現したことにより、GA₁₂ や GA₉ など、GA₄ よりも上流の化合物が積極的にエポキシ化されたのが理由の一つではないかと考えられる。

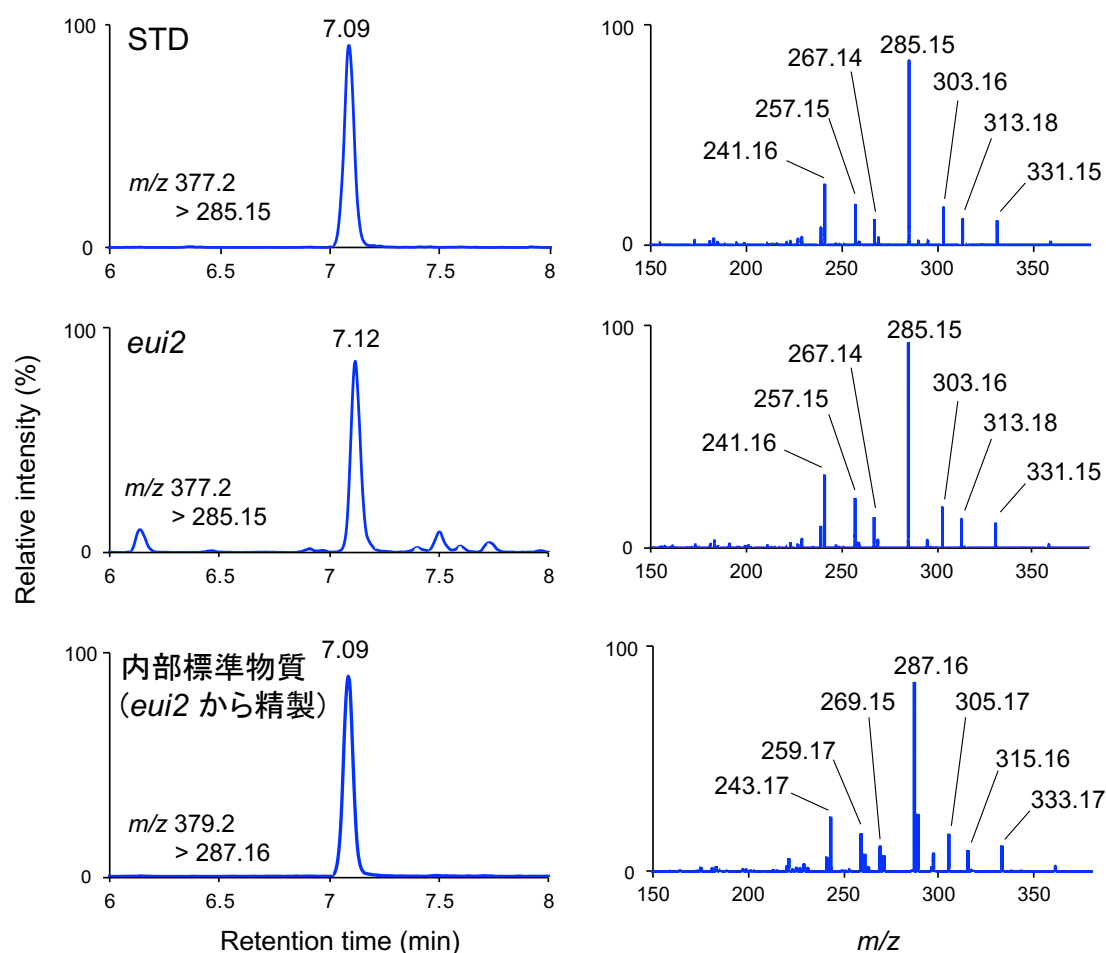
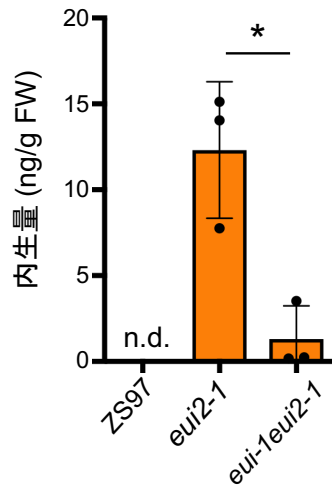


図 14. LC-MS/MS 分析を用いた 16 α ,17-エポキシ GA₄ のエチルエステル誘導体の同定
 左図は m/z 377.2 または 379.2 のプレカーサーイオンを m/z 285.15 または 287.16 で抽出したクロマトグラムを示し、右図は対応する保持時間におけるプロダクトイオンスキャンの結果を示す。上から順に、16 α ,17-エポキシ GA₄ とジアゾエタンにより生成した標品 (STD)、*eui2* 最上位節間抽出物の 16 α ,17-エポキシ GA₄ のエチルエステル誘導体および、内部標準物質として *eui2* 最上位節間抽出物に添加した [²H₂]-16 α ,17-エポキシ GA₄ のエチルエステル誘導体の結果を示す。

A



B

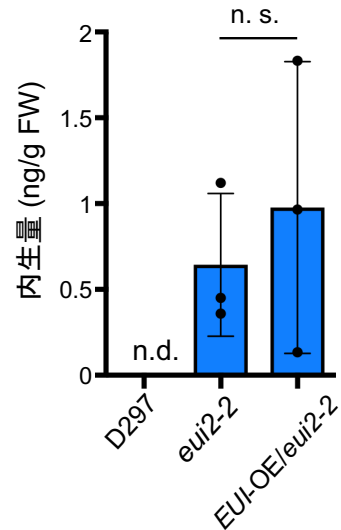


図 15. 16 α ,17-エポキシ GA₄ の定量結果

A) イネ (cv. ZS97) の最上位節間における 16 α ,17-エポキシ GA₄ (エチルエステル誘導体) の内生量分析の結果を示す。平均値 $\pm$ SD ($n = 3$)、n.d.; 検出限界以下 (< 50 pg/g FW)、* $p < 0.05$ (Welch's t test)。 B) イネ (cv. D297) の最上位節間における 16 α ,17-エポキシ GA₄ (エチルエステル誘導体) の内生量分析の結果を示す。平均値 $\pm$ SD ($n = 3$)、n. d.; 検出限界以下 (< 50 pg/g FW)、n. s., 有意差なし (Welch's t test)。

1-2-3. 内生 GA の定量分析

次に、*eui2* の徒長形質の原因についてより詳細な知見を得る目的で、4 種の活性型 GA (GA₁, GA₃, GA₄, GA₇) の内生量分析を行った。その結果、WT と *eui2* の間で、活性型 GA の内生量に有意な差は見られなかった (図 16)。また、これら活性型 GA の前駆体や代謝化合物などの内生 GA の内生量についても、WT と *eui2* の間で顕著な違いは見られなかった (図 17)。これらの定量結果と 16 α ,17-エポキシ GA₄ の定量結果から、WT と *eui2* の間で内生量に大きな違いが見られたのは 16 α ,17-エポキシ GA₄ であり、*eui2* がわずかな徒長形質を示す原因は、*eui2* に蓄積する 16 α ,17-エポキシ GA₄ であることが推測された。

1-2-4. 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の同定および内生量分析

EUI2 の生体内での機能を解明する上で、EUI2 の酵素反応産物である 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の分析も重要であると考え、本化合物の分析を行った。これまでに、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ は配糖体 (17-*O*- β -D-グリコシド) のアグリコンとしてイネの葯から同定されている (Hasegawa et al., 1994)。また、[¹³C, ³H]-GA₄ を投与したイネとトウモロコシ (*Zea mays*) の代謝物の一つとしても報告されている (Kobayashi et al., 1993)。しかし、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ 自身をイネの内生物質として同定した報告はない。そこでまずは、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の同定を試みた。EUI2 の酵素機能から、イネの *EUI2* 過剰発現体 (*EUI2*-OE) により多くの 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ が内在すると予想し、*EUI2*-OE の最上位節間抽出液を精製し、LC-MS/MS 分析に供した。その結果、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の標品の LC における保持時間および、MS/MS 分析におけるフラグメントパターンが一致する化合物が検出されたことから、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ がイネに内在することが示唆された (図 18)。しかし、通常の GA 精製と同様の方法を用いたため、当該ピークは精製過程で加水分解した 16 α ,17-エポキシ GA₄ 由来である可能性も考えられた。そこで、*EUI2*-OE における 16 α ,17-エポキシ GA₄ を定量したところ検出限界以下 (< 50 pg/g FW) だった。したがって、*EUI2*-OE の最上位節間から検出された 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ のピークは内生物質に由来することが確認された。

次に、WT と *EUI2*-OE の最上位節間に含まれる 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ を定量した。その結果、WT では検出限界以下だったのに対し (< 100 pg/g FW)、*EUI2*-OE には蓄積していることが示された (図 19)。この結果と、*eui2* における 16 α ,17-エポキシ GA₄ の定量結果から、EUI2 がイネの生体内で 16 α ,17-エポキシ GA₄ を基質として 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ へと加水分解する機能を持つことが示唆された。

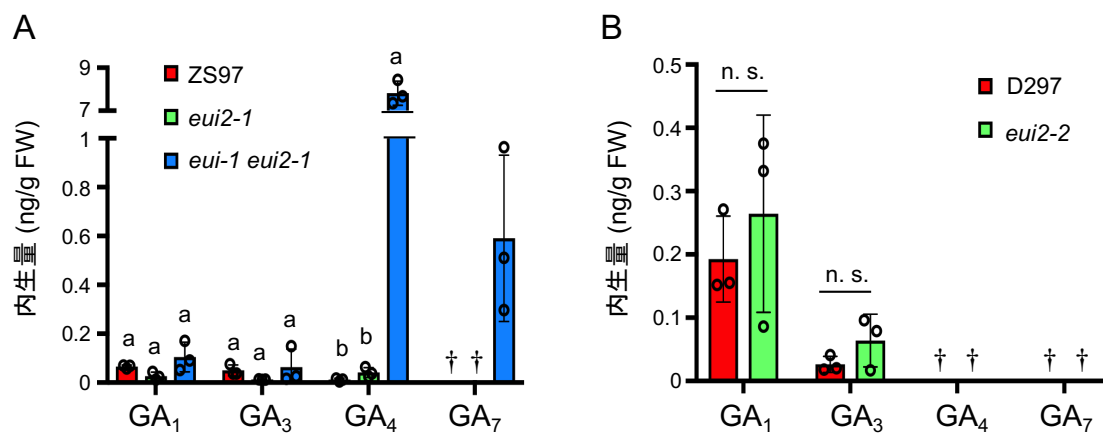


図 16. 活性型 GA の内生量分析の結果

A) イネ (cv. ZS97) の最上位節間における 4 種の活性型 GA の定量結果を示す。平均値 $\pm$ SD ($n=3$)、†, 検出限界以下 (<20 pg/g FW)、異なる文字間に有意差あり ($p<0.05$, Tukey-Kramer test)。 B) イネ (cv. D297) の最上位節間における 4 種の活性型 GA の定量結果を示す。平均値 $\pm$ SD ($n=3$)、†, 検出限界以下 (<20 pg/g FW)、n. s., 有意差なし (Welch's t test)。

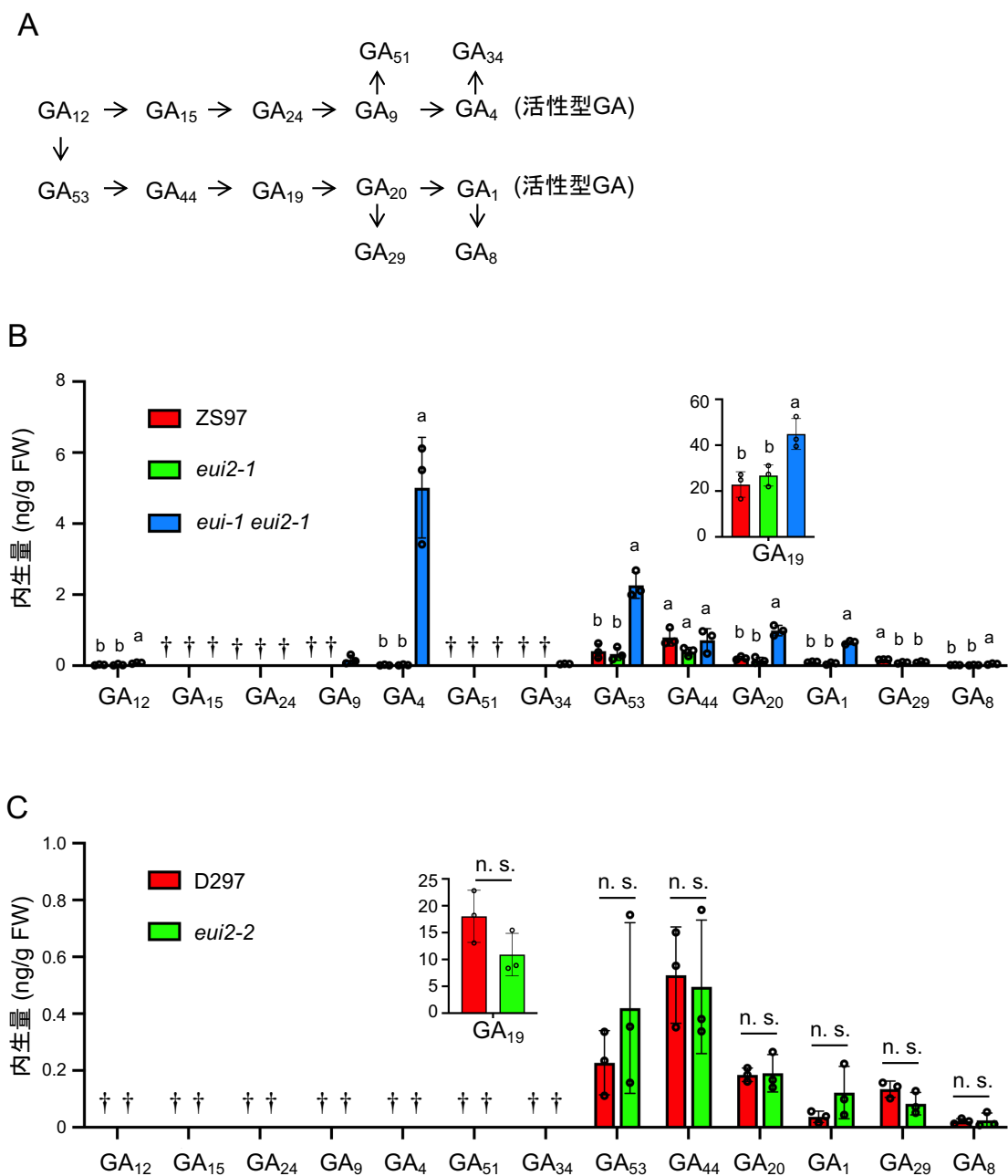


図 17. 最上位節間における GA の内生量分析の結果

A) 分析の対象とした GA の代謝経路。B) イネ (cv. ZS97) の最上位節間における GA の定量結果を示す。平均値±SD ($n = 3$)、†, 検出限界以下 ($< 20 \text{ pg/g FW}$)、異なる文字間に有意差あり ($p < 0.05$, Tukey-Kramer test)。C) イネ (cv. D297) の最上位節間における GA の定量結果を示す。平均値±SD ($n = 3$)、†, 検出限界以下 ($< 20 \text{ pg/g FW}$)、n. s., 有意差なし (Welch's t test)。

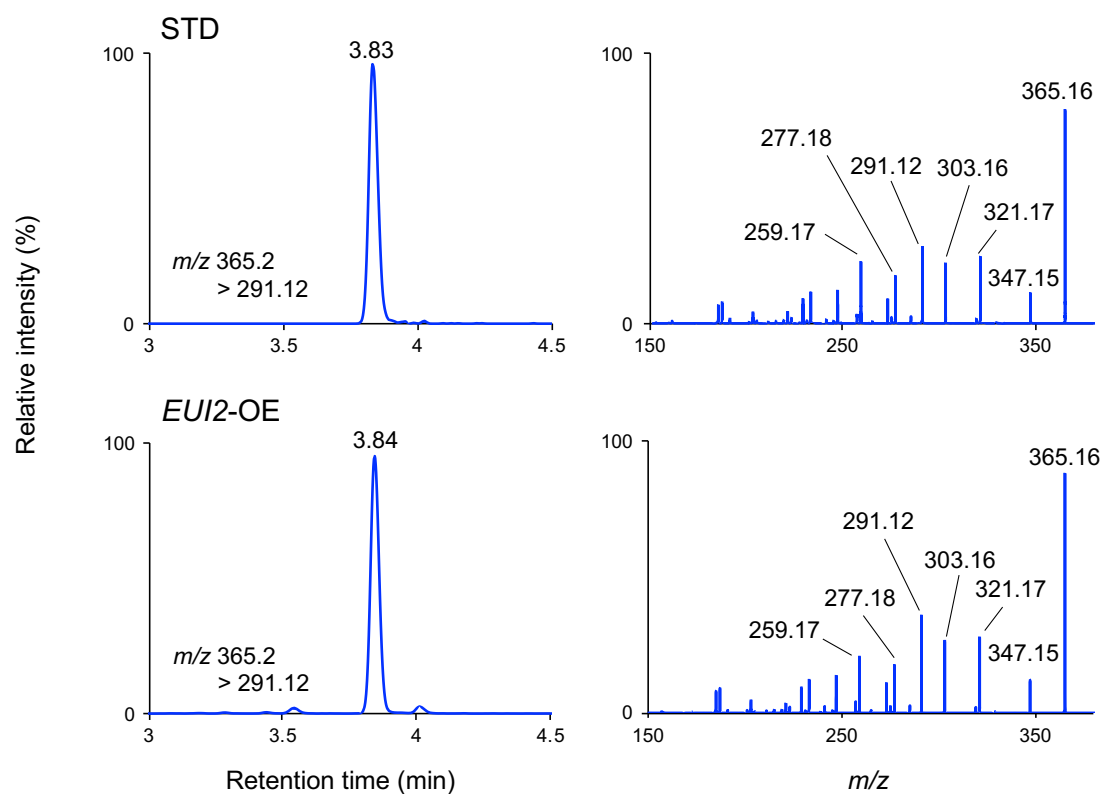


図 18. LC-MS/MS 分析を用いた 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の同定

左図は m/z 365.2 のプレカーサーイオンを m/z 291.12 で抽出したクロマトグラムを示し、右図は対応する保持時間におけるプロダクトイオンスキャンの結果を示す。上から順に 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の標品 (STD)、EUI2-OE の最上位節間抽出物の分析結果をそれぞれ示す。

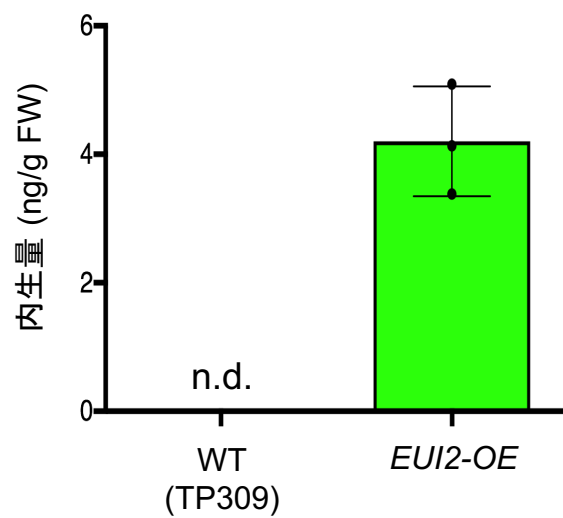


図 19. $16\alpha,17$ -ジヒドロキシ GA_4 の定量結果
イネの最上位節間における $16\alpha,17$ -ジヒドロキシ GA_4 の内生量分析の結果を示す。平均値 $\pm$ SD ($n=3$)、n.d.; 検出限界以下 ($<100\text{pg/g FW}$)。

1-3. 考察

1-3-1. EUI2 の酵素機能解析

eui2 の原因遺伝子である *EUI2* が機能未知のエポキシド加水分解酵素様タンパク質をコードすることに加え、*eui eui2* が *eui* と同程度の徒長形質を示すことから、*EUI2* が 16 α ,17-エポキシ GA を加水分解する機能を持つと予想して酵素反応試験を行った。その結果、予想通り *EUI2* の大腸菌組換えタンパク質は、16 α ,17-エポキシ GA₄ と 16 α ,17-エポキシ GA₉ に対して加水分解活性を示した。このことから、*EUI2* はエポキシド加水分解酵素としての機能を持ち、*EUI* の下流で機能する GA 代謝酵素であることが示唆された。次に、*EUI2* の基質特異性について調べた。*EUI* の基質特異性が 13 位非水酸化 GA に限定されていることから (Zhu et al., 2006)、*EUI2* も同様の基質特異性を持つかを明らかにするために 16 α ,17-エポキシ GA₁ を基質とした酵素試験を行った。その結果、*EUI2* は 16 α ,17-エポキシ GA₁ に対しても同様の加水分解活性を示した。一方、エポキシ基の立体が異なる化合物である 16 β ,17-エポキシ GA₄ は *EUI2* によって加水分解されなかった。これらの結果から、*EUI2* の基質特異性は *EUI* とは異なり、16 位エポキシ基の立体が α 型なことが重要であることが明らかとなった。

エポキシド加水分解酵素は微生物や植物、昆虫、哺乳類など非常に広い生物種に存在し、その機能は異化作用や解毒作用、シグナル分子の制御など多岐に渡り、哺乳類を中心とした研究が多くなされている (Morisseau, 2013)。植物においてはシロイヌナズナの AtEH1 がエポキシ基を持つ炭素数 18 の脂肪酸の加水分解を行うことで、クチクラ構成分子の一つであるクチンの生合成に関与する酵素であることが報告されている (Pineau et al., 2017)。ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) (Stapleton et al., 1994) やダイズ (*Glycine max*) (Arahira et al., 2000) といった植物種からもエポキシド加水分解酵素はクローニングされているが、これらの生理学的機能は明らかとされていない。このように、植物におけるエポキシド加水分解酵素の生理的な役割に関する知見は非常に限定的である (Morisseau, 2013)。本博士論文研究の結果から、イネのエポキシド加水分解酵素である *EUI2* が GA の不活性化酵素として機能することが明らかとなった。すなわち、本研究結果は GA の新規不活性化機構の解明に加え、ほとんど役割が明らかとされていない植物のエポキシド加水分解酵素の機能を明らかにした点においても、意義の大きいものだと考える。

1-3-2. 16 α ,17-エポキシ GA₄ を含む内生 GA および代謝物分析

酸性条件において不安定な 16 α ,17-エポキシ GA₄ をエチルエステル体へと誘導体化することで、中性条件を用いた精製および分析法の確立に成功した。イネの最上位節間における 16 α ,17-エポキシ GA₄ の定量分析の結果、WT では検出限界以下であった 16 α ,17-エポキシ GA₄ が *eui2* では蓄積していることが判明した。このことから、*EUI2* はイネの生体内でも 16 α ,17-エポキシ GA₄ を基質としていることが支持された。これに対して、WT と *eui2* の間で活性型 GA の内生量に有意な差は見られなかった。したがって、WT と *eui2* の徒長差

は 16 α ,17-エポキシ GA₄に起因することが推測された。すなわち、Zhu らの研究結果 (Zhu et al., 2006) から不活性型だと考えられた 16 α ,17-エポキシ GA₄ が、実は生理活性をもつ代謝物である可能性が考えられた。

一方、予想に反して 16 α ,17-エポキシ GA₄ は *eui-1 eui2-1* から検出された。本二重変異体の *EUI*における変異は、レトロトランスポゾンの挿入によるものであり、機能喪失型の変異体である。したがって、*EUI* の機能が残存しているために 16 α ,17-エポキシ GA₄ が検出されたとは考えにくい。それにも関わらず、*eui-1 eui2-1* で 16 α ,17-エポキシ GA₄ が蓄積していたのは、この二重変異体では GA₄ が過剰に蓄積していることに加え (図 16)、*EUI2* の機能喪失により 16 α ,17-エポキシ GA₄ が代謝されないことが原因であると考えられる。つまり、イネの生体内には *EUI* の他にも GA のエポキシ化を行う非特異的な酵素が存在し、*eui-1 eui2-1* では GA₄ が過剰に存在するため、たとえその酵素の基質特異性が低いあるいは、反応速度が遅いとしても 16 α ,17-エポキシ GA₄ がある程度生成されたのではないかと推測される。また、*eui-1 eui2-1* では *EUI2* も欠損しているため、わずかに生成された 16 α ,17-エポキシ GA₄ が代謝されずに蓄積した可能性が考えられる。したがって、*eui-1 eui2-1* で 16 α ,17-エポキシ GA₄ がわずかに蓄積した原因を明らかにする上で、*eui-1* 単独変異体における 16 α ,17-エポキシ GA₄ の内生量分析が重要であると考ええる。

EUFOE/eui2-2 では *EUI2* の変異に加えて *EUI* が過剰発現されることから、*eui2-2* よりも多くの 16 α ,17-エポキシ GA₄ が蓄積することが予想されたが、これらの最上位節間で 16 α ,17-エポキシ GA₄ の内生量に有意な差は見られなかった。序論でも述べたように、*EUFOE/eui2-2* は *EUFOE* よりも背丈が大きい表現型を示す。過去に行われた 16 α ,17-エポキシ GA₄ の内生量分析 (非酵素的な加水分解により 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ として測定した) では、WT と *EUFOE* どちらからも検出されなかった (Zhu et al., 2006)。したがって、*EUFOE/eui2-2* が *EUFOE* よりも背丈が大きくなるのは 16 α ,17-エポキシ GA₄ の内生量の差に起因すると推測される。一方、Zhu らの内生量分析において *EUFOE* では WT よりも 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₁₂ および 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₉ が顕著に蓄積していたことから、*EUI* の過剰発現により GA₁₂ と GA₉ は積極的に 16 α ,17-エポキシ GA₁₂ と 16 α ,17-エポキシ GA₉ へとそれぞれ代謝されることが示唆された (Zhu et al., 2006)。*EUFOE/eui2-2* でも同様のことが起きていることが考えられ、16 α ,17-エポキシ GA₁₂ と 16 α ,17-エポキシ GA₉ が GA20ox や GA3ox によって代謝されないと仮定すると、*EUFOE/eui2-2* におけるこれら 2 化合物の内生量は *eui2-2* における内生量よりも多いことが予想される。しかし、16 α ,17-エポキシ GA に対する GA20ox や GA3ox の基質特異性は不明である。そこで、*EUFOE/eui2-2* と *EUFOE* の表現型の違いを追究するには、16 α ,17-エポキシ GA に対する GA 生合成酵素の機能解析に加え、16 α ,17-エポキシ GA₁₂ や 16 α ,17-エポキシ GA₉ の内生量分析が必要だと考えられる。

さらに、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の同定および内生量分析を行い、*EUI2-OE* には WT よりも多くの 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ が含まれることを明らかとした。この結果と、*eui2*

に WT よりも多くの 16 α ,17-エポキシ GA₄が蓄積していたことから、*in vitro* の酵素試験で得られた EUI2 の酵素機能がイネの生体内においても同様であることが支持された。16 α ,17-ジヒドロキシ GA はイネに限らず、*Lupinus albus* (マメ科) (Gaskin et al., 1992)、*Malus domestica* (バラ科) (Hedden et al., 1993)、*Prunus avium* (バラ科) (Blake et al., 2000) といった様々な植物種からも検出されている。既に述べたとおり、GA₄ の同位体を用いたトレーサー実験から、トウモロコシ (イネ科) でも GA₄ が 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ に代謝されることが示唆された (Kobayashi et al., 1993)。これらのことから、16 α ,17-エポキシ GA と 16 α ,17-ジヒドロキシ GA を経る GA の代謝機構は様々な植物種で保存されていることが推測される。一方、図 20 と図 21 に示したとおり、*EUI(CYP714D1)* の遺伝子の分布はイネ科に特異的であり、*EUI2* はさらに種特異的であることが考えられる。しかし、図 21 に示したほとんどの遺伝子がコードするアミノ酸配列に、*EUI2* の触媒 3 つ組残基が保存されており、これらのタンパク質も *EUI2* と同様の酵素機能を持つ可能性は否定できない。また、シロイヌナズナの CYP714A1 と GA₁₂ の酵素試験では、酵素反応産物の一つに 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₁₂ が微量ながらも検出されており、これは酵素反応によって生じた 16 α ,17-エポキシ GA₁₂ から非酵素的に生成したものだとも考えられている (Nomura et al., 2013)。したがって、図 20 において *EUI*とは異なるクレードに分類されたものの中にも、*EUI*と同様の機能を持つ遺伝子が存在することも考えられる。このように、16 α ,17-エポキシ GA と 16 α ,17-ジヒドロキシ GA を経る GA の代謝機構に関する進化的な議論には、イネ以外の植物種における CYP714 ファミリーおよび、エポキシド加水分解酵素のさらなる機能解析が必要であると考えられる。

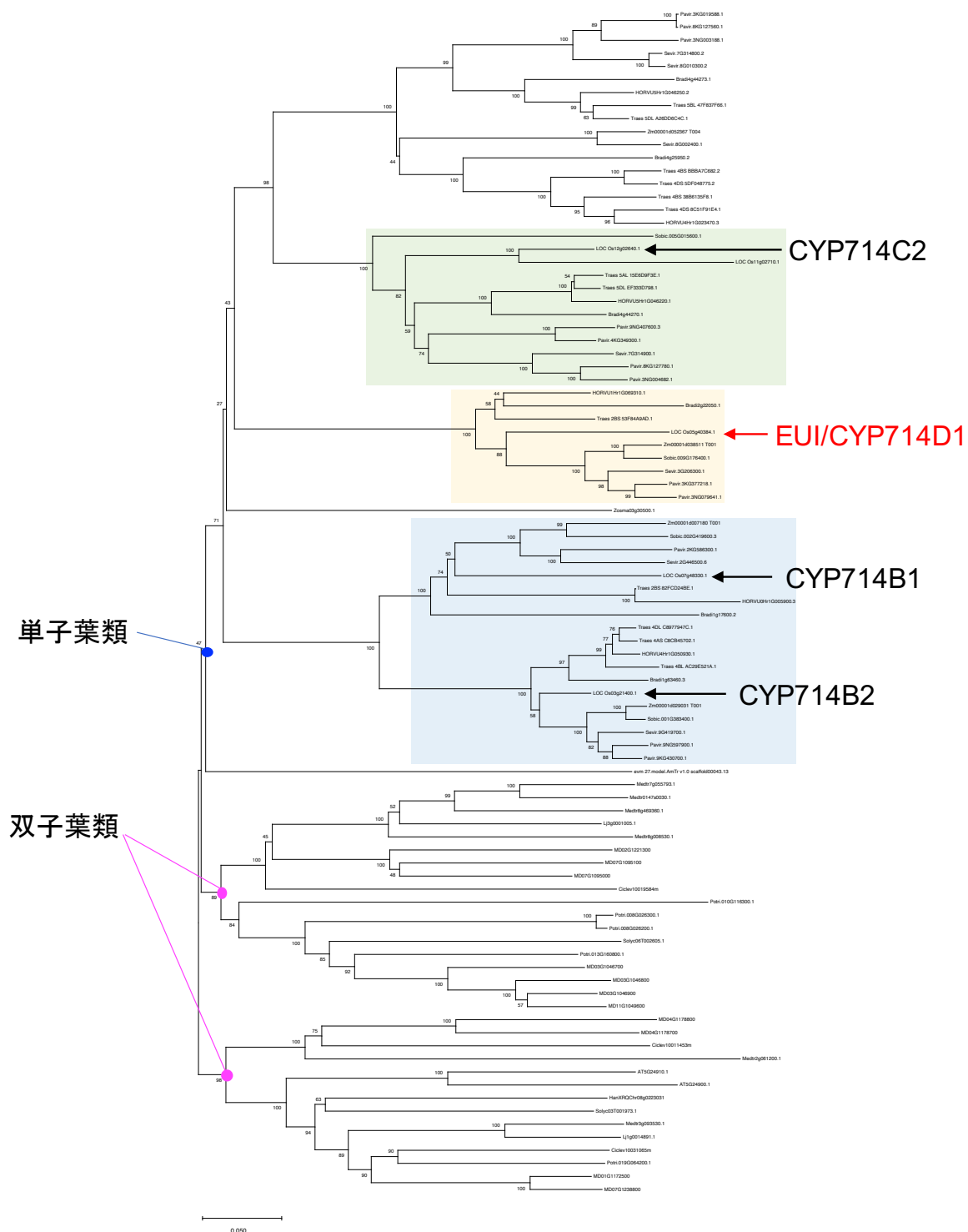


図 20. *EUI* 関連遺伝子の分子系統樹

21 種の植物を対象に *EUI* のアミノ酸配列を BLAST 検索し、 $E\text{-value} < 1.0 \times 10^{-100}$ を示したものに対して neighbor-joining method 法によって作成した分子系統樹を示す。各ノード付近に 1000 回反復に基づくブートストラップ値を示し、スケールバーは各サイトあたりのアミノ酸置換数を示す。外群として *OsGID1* を用いた。

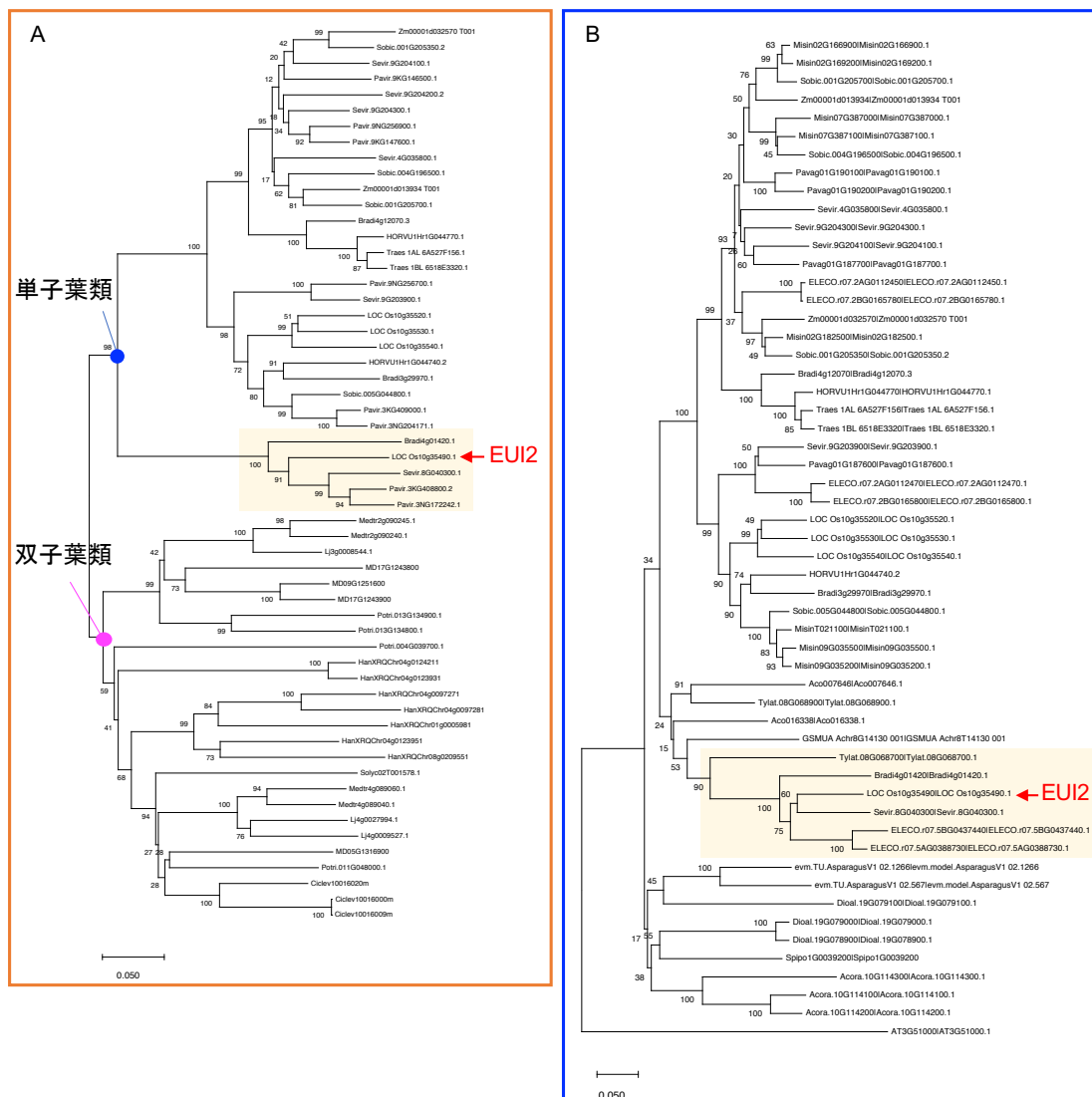


図 21. *EUI2* 関連遺伝子の分子系統樹

A) 21 種の植物を対象に *EUI2* のアミノ酸配列を BLAST 検索し、 $E\text{-value} < 1.0 \times 10^{-100}$ を示したのに対して neighbor-joining method 法によって作成した分子系統樹を示す。各ノード付近に 1000 回反復に基づくブートストラップ値を示し、スケールバーは各サイトあたりのアミノ酸置換数を示す。B) 18 種の単子葉植物を対象に *EUI2* のアミノ酸配列を BLAST 検索し、 $E\text{-value} < 1.0 \times 10^{-100}$ を示したのに対して neighbor-joining method 法によって作成した分子系統樹を示す。各ノード付近に 1000 回反復に基づくブートストラップ値を示し、スケールバーは各サイトあたりのアミノ酸置換数を示す。Arabidopsis thaliana TAIR10 において最も高い相同性を示した AT3G51000 を外群に用いた。

第二章 16,17 位が化学修飾されたジベレリンの活性評価

2-1. 緒言

16 α ,17-エポキシ GA₄ と活性型 GA の内生量分析の結果から、*eui2* の表現型の原因は 16 α ,17-エポキシ GA₄ の蓄積であることが推測された。しかし、既に述べたとおり、Zhu らが行ったイネ実生への投与実験において、16 α ,17-エポキシ GA₄ に有意な生理活性は認められなかった (Zhu et al., 2006)。当該投与実験で用いられた 16 α ,17-エポキシ GA₄ は EUI の酵素反応によって調製されたものであり、反応から精製までの回収率を 100% と見積もって化合物量が算出された (Zhu et al., 2006)。したがって、供試された化合物量が実際には Zhu らの想定よりも少なかった可能性も考えられた。そこで本博士論文では、16 α ,17-エポキシ GA₄ の化学合成品を用いて生理活性を評価することにした。まず、*eui2* の表現型の原因を追究するために、水耕栽培したイネの水耕液から 16 α ,17-エポキシ GA₄ を与え、その後の最上位節間の長さを評価した。次に、16 α ,17-エポキシ GA₄ の生理活性についてより詳しく評価するために、GID1 との相互作用解析を行った。加えて、EUI2 を介した GA 不活性化機構の解明に向けて、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ も同様に GID1 との相互作用解析に供した。また、GA₁ と GA₄ の誘導体を用いた構造活性相関によって、GA の 16,17 位の化学修飾による生理活性への影響について追究することにした。

2-2. 結果

2-2-1. イネの出穂期における 16 α ,17-エポキシ GA₄ の生理活性試験

eui2 の表現型の原因を追究するために、出穂期のイネの WT に GA₄ と 16 α ,17-エポキシ GA₄ を投与して最上位節間の伸長活性を評価した。その結果、GA₄ は終濃度 50 μ M の投与により有意な活性を示し、無処理区である mock と比較して最上位節間が約 1.8 倍長く伸長した (図 22)。16 α ,17-エポキシ GA₄ も同様に終濃度 50 μ M で有意な生理活性を示したが、最上位節間の長さは mock の約 1.5 倍であり、GA₄ よりも生理活性が弱いことが示された。このことから、16 α ,17-エポキシ GA₄ には弱いながらも生理活性が残っており、*eui2* の表現型の原因は 16 α ,17-エポキシ GA₄ の蓄積であるという仮説が支持された。

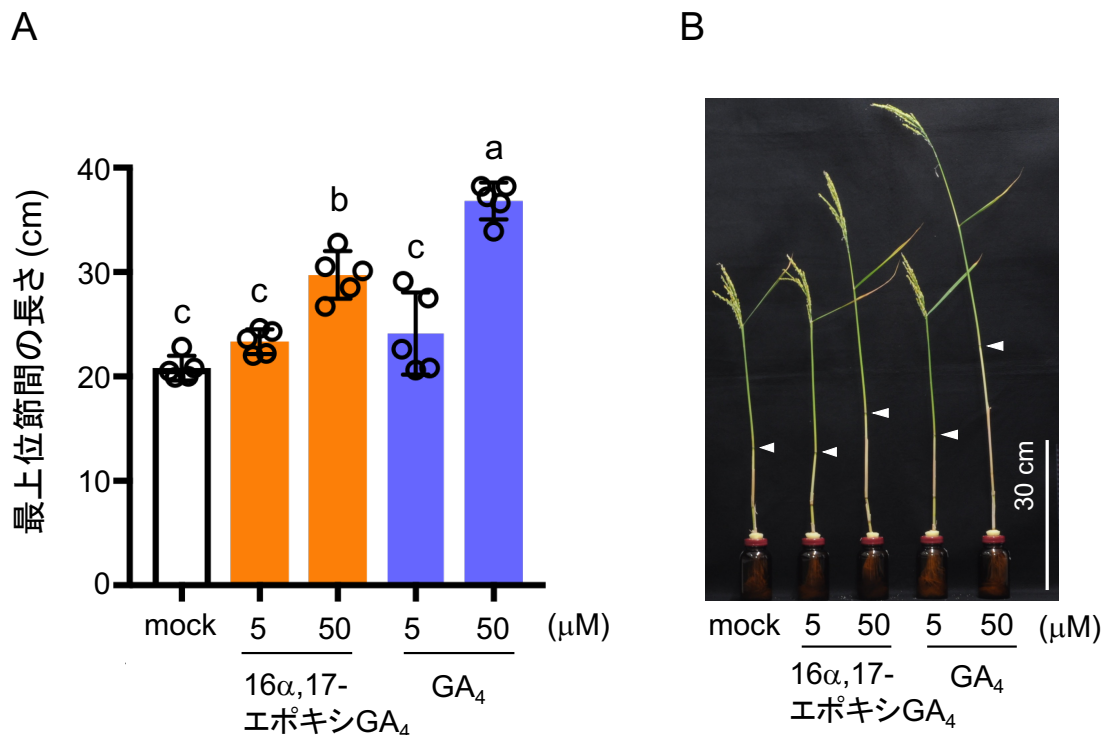


図 22. イネの最上位節間における化合物投与試験の結果

A) 出穂前のイネ (cv. ZS97, 12 週齢) を化合物を添加した水耕液で 2 週間生育させ、その後、さらに 1 週間化合物が添加されていない水耕液で栽培し、出穂した後の最上位節間の長さを示す。mock は無処理区としてエタノールを水耕液に添加したものを指す。平均値 $\pm$ SD ($n=5$)、異なる文字間に有意差あり ($p<0.05$, Tukey-Kramer test)。B) 最上位節間長の測定時におけるイネの表現型。矢尻は最上位節を指し、スケールバーは 30 cm を示す。

2-2-2. GID1 との相互作用解析

16 α ,17-エポキシ GA₄ や 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の活性をより詳細に明らかにするために、イネの GA 受容体である GID1 との相互作用解析を行った。まず、タンパク質の熱変性温度を測定する手法である differential scanning fluorimetry (DSF) を行った。チオレドキシシンおよび (His)₆ タグ融合型 GID1 (Trx-GID1) の組換えタンパク質を大腸菌で発現後に精製し、GA₄、16 α ,17-エポキシ GA₄、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ をそれぞれリガンドとして加えて DSF に供した (図 23)。一般的に、リガンドに結合したタンパク質は安定化することで熱変性温度が上昇することが知られている。実際に、GA₄ の添加では 10 μ M で GID1 の熱変性温度が 6°C 程度上昇し、100 μ M の添加では 10°C 近く変性温度が上昇した。一方、16 α ,17-エポキシ GA₄ を 10 μ M で添加した場合は GID1 の変性温度に大きな変化は見られず、100 μ M で GID1 の熱変性温度を 4°C 程度上昇させた。16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ をリガンドとした場合は、100 μ M でも GID1 の変性温度はほとんど変化しなかった。しかし、500 μ M の添加では GID1 の変性温度が約 4°C 上昇した。このことから、DSF に供したこれら 3 化合物はいずれも GID1 と相互作用可能であるが、その結合親和性は GA₄ が最も高く、16 α ,17-エポキシ GA₄、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の順に低くなることが示唆された。

次に、これらの相互作用の結合親和性を明らかにする目的で、isothermal titration calorimetry (ITC) を行った。ITC は分子間の結合の際に生じる熱量を直接測定する手法であり、解離定数 (K_d) やエンタルピー変化量 (ΔH) といった結合パラメーターを特定することができる。過去に GID1 と GA の相互作用が ITC で解析されており、GID1 に対する結合親和性は 4 種の活性型 GA (GA₁、GA₃、GA₄、GA₇) の中で GA₄ が最も高く、GA₁ が最も大きな ΔH を生じることが示された (Xiang et al., 2011)。ITC はごく微量の熱量でも敏感に検出するため、実験に供するタンパク質には高い純度が求められる。まず、Trx-GID1 を His タグによるアフィニティークラム精製後に GA₄ との ITC に供したが、GID1 と GA₄ による結合熱が得られず、ITC に用いる Trx-GID1 にはさらなる精製が必要であることが考えられた。Xiang らは、Trx-GID1 を His タグによるアフィニティークラム精製後にゲルろ過クロマトグラフィーによってさらに精製したものを ITC に使用した (Xiang et al., 2011)。そこで、同様にゲルろ過クロマトグラフィーで精製した Trx-GID1 を調製した (図 24)。次に、GA₄、16 α ,17-エポキシ GA₄、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ をそれぞれリガンドとして用いて ITC を行った (図 25、表 1)。その結果、供試した 3 化合物のいずれからでも Trx-GID1 との結合熱が生じた。しかし、 K_d は GA₄、16 α ,17-エポキシ GA₄、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の順に低い値を示した。つまり、これら 3 化合物における Trx-GID1 に対する結合親和性は GA₄ が最も高く、16 α ,17-エポキシ GA₄、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の順に低くなることが示された。DSF と ITC の実験結果から、GA₄ は 16,17 位のエポキシ化とその加水分解によって、段階的に GID1 との結合能が低下していくことが明らかとなった。

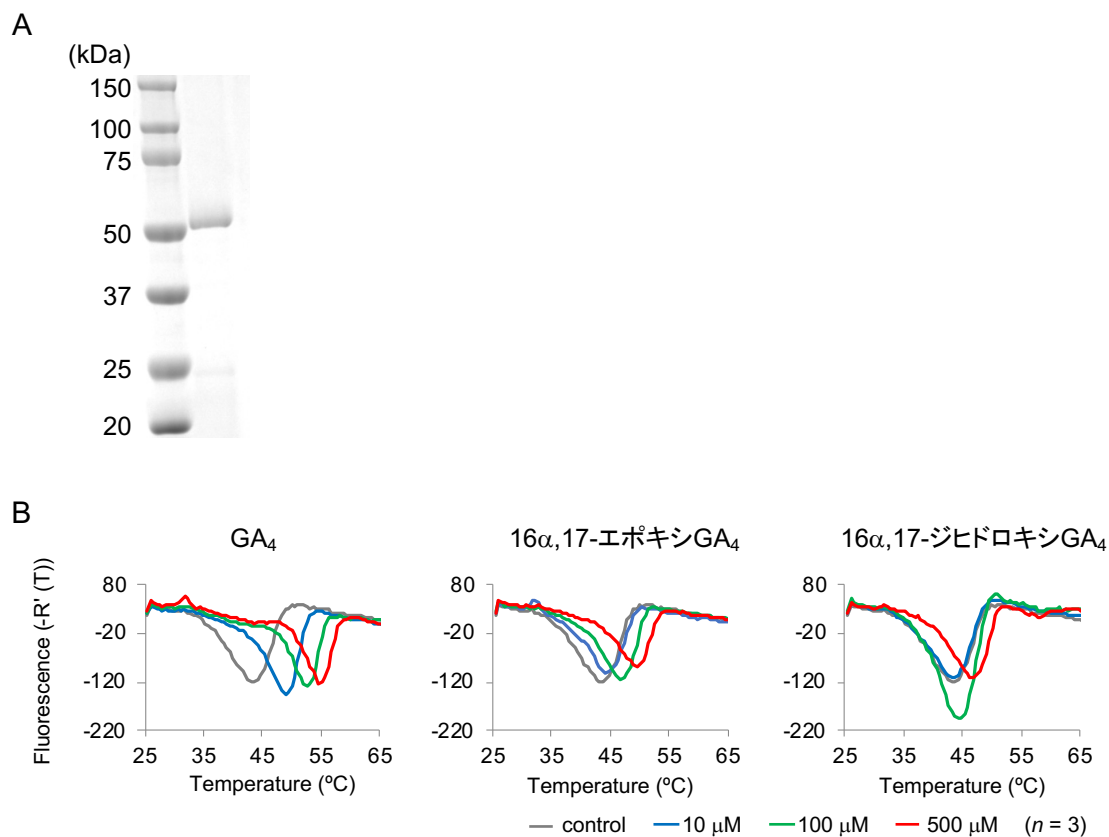
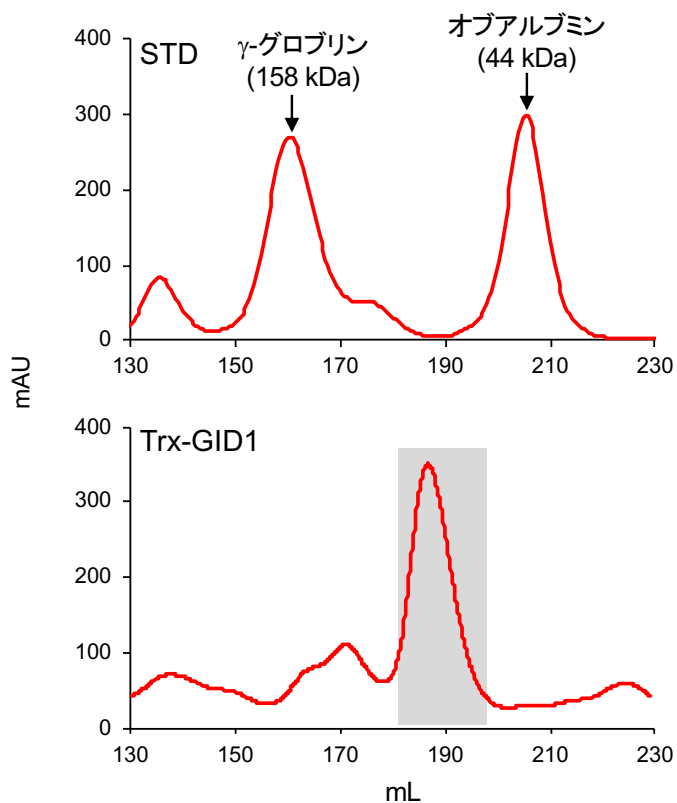


図 23. Trx-GID1 を用いた DSF の結果

A) DSF に用いた Trx-GID1 の SDS-PAGE の結果。左側のレーンに分子量マーカを示し、右側のレーンに His タグによるアフィニティーカラム精製後の Trx-GID1 (60 kDa) を 3 μ g 供した結果を示す。B) 各リガンド添加時の Trx-GID1 の融解温度曲線。左から順に、GA₄、16 α ,17-エポキシ GA₄、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ をそれぞれリガンドとして添加した結果を示す。control には各化合物を溶解したバッファー [150 mM 塩化ナトリウムと 2 mM β -メルカプトエタノールを含む 20 mM ナトリウムリン酸バッファー (pH 7.5)] を添加した (n = 3)。

A



B

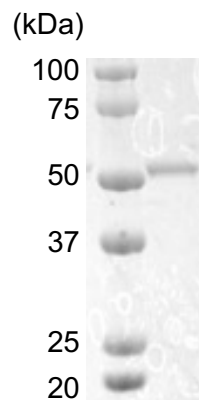


図 24. Trx-GID1 の大腸菌組換えタンパク質の精製

A) ゲルろ過クロマトグラフィーの結果。上段に標品 (STD) として γ -グロブリン (158 kDa) とオブアルブミン (44 kDa) を各 7.5 mg ずつ供した結果を示し、下段に大腸菌で発現した Trx-GID1 (60 kDa) を約 11 mg 供した結果を示す。図中のグレー部は分取した画分を示す。縦軸と横軸はそれぞれ、280 nm における吸光度と溶出体積を示す。B) SDS-PAGE の結果。左側のレーンに分子量マーカーを示し、右側のレーンにゲルろ過精製後の Trx-GID1 を 3 μ g 供した結果を示す。

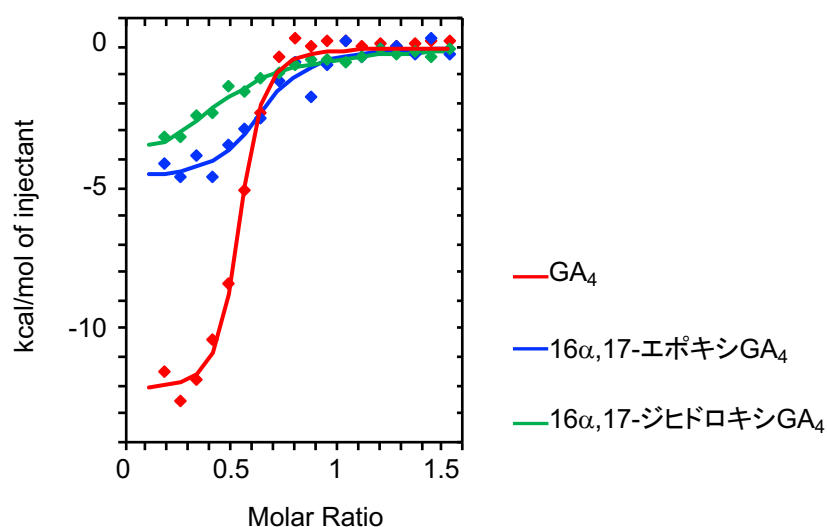


図 25. Trx-GID1 を用いた ITC の結果

Trx-GID1 (50 μM) に対して GA_4 (赤)、16 α ,17-エポキシ GA_4 (青)、16 α ,17-ジヒドロキシ GA_4 (緑) をそれぞれ 500 μM で添加して得られた滴定曲線を示す。縦軸に各化合物の滴下ごとに生じた熱量、横軸にモル比を示し、MicroCal Origin 7.0 を用いて one-set-of-sites モデルによってデータ処理した結果を示す。

表 1. ITC で得られた各パラメーターの一覧。

K_d , ΔH , n はそれぞれ解離定数、エンタルピー変化量、結合モル比を示す。

化合物	K_d (μM)	ΔH (kcal/mol)	n (sites)
GA_4	0.35 ± 0.08	-12.30 ± 0.28	0.409 ± 0.01
16 α ,17-エポキシ GA_4	1.35 ± 0.69	-4.80 ± 0.37	0.526 ± 0.03
16 α ,17-ジヒドロキシ GA_4	6.67 ± 1.78	-4.85 ± 0.68	0.370 ± 0.04

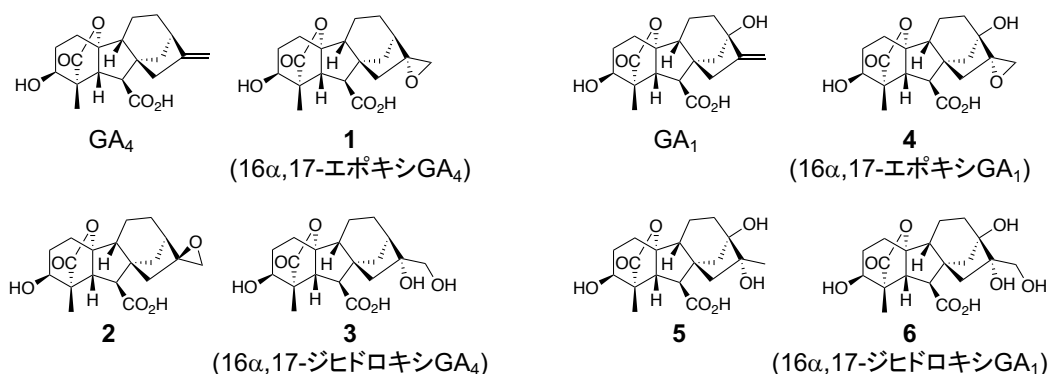
2-2-3. 16,17 位を修飾した GA 誘導体の構造活性相関

以上の実験結果から、GA の 16,17 位における化学修飾は生理活性に影響を与えることが示唆された。既に述べたように GA の活性発現に重要な化学構造は「3 β 位の水酸基、6 位のカルボキシ基、4 位から 10 位へ架橋されたラクトン環」であり、反対に、多くの植物における主要な不活性化機構は 2 β 位の水酸化であることがよく知られている。一方、イネでは EUI による 16,17 位のエポキシ化でも GA₄ は不活性化されると考えられていたが、本博士論文研究により、16,17 位のエポキシ化だけでは GA₄ の不活性化は不完全であることが明らかとなった。また、16,17-エポキシ GA のうち、過去に生理活性が調べられたのは 16 α ,17-エポキシ GA₄ のみであり、当該試験に用いられた化合物は *in vitro* の小スケールでの酵素反応によって調製されたものであった (Zhu et al., 2006)。すなわち、16 α ,17-エポキシ GA₄ のような弱い活性を評価するには、純度の高い化合物の大量調製が重要であることが考えられた。加えて、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の配糖体 (17-*O*- β -D-グリコシド) やモノヒドロキシ体である 16 α ,17-ジヒドロ-17-ヒドロキシ GA₄ がイネの実生に対してほとんど活性を示さなかった報告はあるが (Gaskin et al., 1992; Hasegawa et al., 1994)、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の生理活性は調べられていない。このように、GA の 16 位と 17 位における化学修飾が生理活性に与える影響に関する知見は少ない。

そこで、GA₁ と GA₄ を母核とし、16 位と 17 位を酸化や水酸化した 6 種の誘導体 (図 26A) を用いて生理活性を比較した。これらの生理活性は、イネの実生に対する葉鞘伸長活性に基づく、点滴法 (Nishijima and Katsura, 1989) と呼ばれる方法によって評価した (図 26B、C)。まず、GA₄ と **1** (16 α ,17-エポキシ GA₄) の結果について述べる。16 α ,17-エポキシ GA₄ は 100 pmol で mock と比較して有意な生理活性を示したが、10 pmol の GA₄ と比較してもその活性は弱いことが示された。このことから、イネの実生に対しても 16 α ,17-エポキシ GA₄ は GA₄ より弱いながらも有意な生理活性を示すことが明らかとなった。加えて、100 pmol の **3** (16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄) が同濃度の 16 α ,17-エポキシ GA₄ よりも低活性を示したことから、本生理活性試験においても、GA₄ は 16,17-エポキシ化およびその加水分解によって段階的にホルモン活性が低下することが確認された。また、GA₁ および、**4** (16 α ,17-エポキシ GA₁) と **6** (16 α ,17-ジヒドロキシ GA₁) の比較から、この段階的な GA 活性低下は 13 位水酸化 GA においても同様であることが明らかとなった。しかし、**3** および **6** が 100 pmol の投与では mock と比較して有意な活性を示したことから、16,17-ジヒドロキシ体であっても完全には不活性化されないことが示唆された。また、**1** と **2** の生理活性が同程度だったことから、16 位エポキシ基の立体が β 型の場合も弱い活性を持ち、エポキシ基自体の立体は GA の生理活性にほとんど影響しないことが示唆された。また、**4** と **5** の活性も同等だったことから、16 位のエポキシ化に限らず、16 位が水酸化された場合も同様に生理活性が低下することが明らかとなった。以上の結果から、GA の 16,17 位は生理活性に重要な炭素であり、酸化や水酸化といった化学修飾によってホルモン活性が低下することが明らかとなった。中でも、16,17-ジヒドロキシ体は完全な不活性型ではないものの、大きく GA 活性

が低下していることが示された。

A



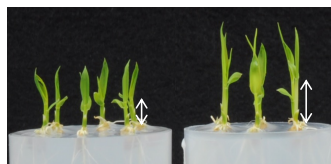
B

短銀坊主
(イネのGA生成変異体)
にGA被検液を1 μ L投与



3日後

第二葉鞘の長さを測定



C

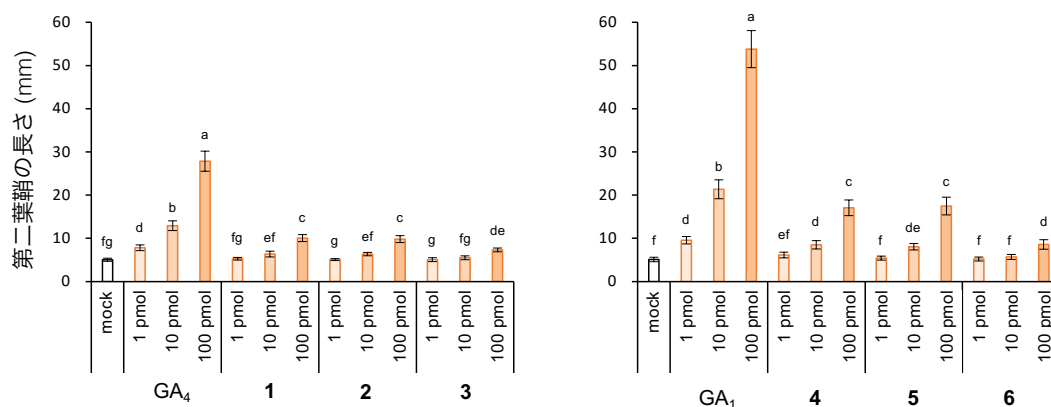


図 26. GA 誘導体を用いた構造活性相関試験

A) GA₄ と GA₁ および、これら GA の誘導体 6 種の化学構造。GA₄ および 1-3 の化合物は 13 位非水酸化型の化合物であり、GA₁ および 4-6 の化合物は 13 位水酸化型の化合物である。B) 点滴法の概要。イネの GA 生成変異体である短銀坊主の実生に、各化合物を含む 50%アセトン水溶液を 1 μ L ずつ滴下し、3 日後に第二葉鞘の長さを測定した。図中の両矢印は第二葉鞘を示す。C) 点滴法による生理活性試験の結果。グラフは GA または GA 誘導体を投与後のイネ第二葉鞘の長さを示し、左と右にそれぞれ、13 位非水酸化型の化合物と 13 位水酸化型の化合物を投与した結果を示す。mock は無処理区として 50%アセトン水溶液を同様に添加したものを指す。平均値 $\pm$ SD ($n = 12$, mock; $n = 6$)、異なる文字間に有意差あり ($p < 0.05$, Tukey-Kramer test)。

2-3. 考察

2-3-1. 16 α ,17-エポキシ GA₄ と 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の活性評価

出穂期のイネへの投与試験および GID1 との相互作用解析を行うことで、EUI2 を介した不活性化機構を追究した。まず、出穂期のイネに水耕液から GA₄ あるいは 16 α ,17-エポキシ GA₄ を与えて、その後の節間伸長活性を評価した。その結果、GA₄ と 16 α ,17-エポキシ GA₄ は終濃度 50 μ M において有意な最上位節間の伸長活性を示した。この時の GA₄ と 16 α ,17-エポキシ GA₄ の活性を比較すると、GA₄ の方が有意に高活性であった。この結果から、16 α ,17-エポキシ GA₄ はイネの最上位節間を伸長する生理活性を持つが、GA₄ と比較するとその活性は弱いことが明らかとなった。したがって、*eui2* の最上位節間が WT よりもやや長く伸長する原因が 16 α ,17-エポキシ GA₄ の蓄積であるとする 1-3-2 における考察が支持された。

しかし、このような投与実験では、生体内に取り込まれた後の代謝物の活性が現れている可能性が否定できない。そこで、イネの GA 受容体である GID1 に対する結合親和性を評価した。まず、DSF を行ったところ、GA₄ と 16 α ,17-エポキシ GA₄、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ はいずれも GID1 と相互作用可能であることが示唆された。しかし、GID1 の熱変性温度を 4°C 近く上昇させるのに必要な化合物の濃度に着目すると、GA₄ (10 μ M) < 16 α ,17-エポキシ GA₄ (100 μ M) < 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ (500 μ M) だったことから、GID1 との結合親和性は GA₄ > 16 α ,17-エポキシ GA₄ > 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の順に高いことが示唆された。また、各化合物を 500 μ M 添加した場合の GID1 の熱変性温度に着目すると、GA₄ (55°C) > 16 α ,17-エポキシ GA₄ (49°C) > 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ (47°C) の順に高い値を示した。これらの熱変性温度の違いは、GA₄ の 16 α ,17-エポキシ化および、その加水分解によって段階的に GID1 に対する結合親和性が低下したことにより、500 μ M で添加した各化合物と結合する GID1 の割合が異なることを示唆している。あるいは、GID1 とこれら 3 化合物の結合後に生じる立体構造の変化が異なる可能性も考えられる。DSF は 2 つの分子間の結合を直接モニターする手法ではないため、次に ITC を行い GID1 と上記 3 化合物の結合親和性を評価した。その結果、生理活性試験や DSF で得られた結果と同様に、GA₄ > 16 α ,17-エポキシ GA₄ > 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の順に GID1 に対して高い結合親和性を示した。また、Xing らが行った ITC の結果と比較すると、16 α ,17-エポキシ GA₄ は GA₁ と同等の K_d 値を示した (表 2)。本研究で 16 α ,17-エポキシ GA₄ は節間伸長活性を示したものの、先行研究 (Zhu et al., 2006) において一度は活性がないと報告された化合物が GA₁ と同等の GA 活性を持つとは考えにくい。このことから、GA₄ や GA₁ といった既知の活性型 GA と比べて、16 α ,17-エポキシ GA₄ や 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ は GID1 に異なる立体構造の変化をもたらすのではないかと推測される。GA₄ と結合した GID1 の X 線結晶構造解析の結果、GA₄ の 17 位は GID1 の 31 番目のチロシン (Tyr 31) と疎水性相互作用することが示された (Shimada et al., 2008)。Tyr 31 は GID1 のリッドドメインを構成するアミノ酸の一つである。したがって、GA₄ は 16 α ,17-エポキシ GA₄ と 16 α ,17-ジヒドロキシ

GA₄に変換されることで、GID1 と結合しにくくなるだけでなく、Tyr 31 を含むリッドドメインの適切な構造変化が起きにくくなることで活性が低下したのではないかと予想される。リッドの構造変化は DELLA との相互作用に重要であることから、今後は化合物存在下での GID1 と DELLA の相互作用解析を行うことでこの詳細が明らかになると考える。

表 2. 本研究で行った GID1 の ITC と先行研究 (Xiang et al., 2011) における GID1 の ITC の結果

本研究での結果		Xiang et al., 2011	
化合物	K_d (μ M)	化合物	K_d (μ M)
GA ₄	0.35 ± 0.08	GA ₄	0.19 ± 0.01
16 α ,17-エポキシGA ₄	1.35 ± 0.69	GA ₇	0.24 ± 0.02
16 α ,17-ジヒドロキシGA ₄	6.67 ± 1.78	GA ₁	1.92 ± 0.07
		GA ₃	3.57 ± 0.08

2-3-2. GA 誘導体の構造活性相関

これまでの実験結果から、GA₄ は 16,17 位のエポキシ化およびその加水分解によって、段階的にホルモン活性が低下することが明らかとなった。また、シロイヌナズナの 2OGD である GAS2 (Gain of Function in ABA-modulated Seed Germination 2) は、GA₁₂ の 16 位二重結合を水和して GA₁₂ 16,17-ジヒドロ-16- α -オール (DHGA₁₂) を生成することが報告されている (Liu et al., 2019)。さらに、Liu らは化学合成した DHGA₁₂ がシロイヌナズナの胚軸伸長活性を示すことに加え、シロイヌナズナの GID1 ファミリーの一つである GID1c に対して結合可能であることを明らかとした。しかし、GAS2 が 2OGD に属するにも関わらず水和反応を触媒したことや、DHGA₁₂ が GA の活性維持に重要な化学構造の条件を満たしていないことに加え、GAS2 の酵素活性の再現性が得られていないなど (Lange and Pimenta Lange, 2020)、いくつか疑問点が残されている。このように、GA の 16,17 位は生理活性の維持や発現に重要であることが示唆されている一方で、2 位や 3 位、6 位の化学修飾に比べてその知見は少ない。

そこで、16,17 位の炭素上における化学修飾が GA の生理活性に与える影響を追究する目的で構造活性相関を行った。GA₁ または GA₄ を母核とした 6 種の誘導体を用いて、イネの実生の葉鞘伸長活性を評価した。その結果、16 α ,17-エポキシ GA₄ は 100 pmol の投与で GA₄ より弱いながらも有意な生理活性を示した。これは Zhu らの結果 (Zhu et al., 2006)

とは一致しない。その原因として化合物の供試量の違いが考えられる。Zhu らは酵素反応で生成した 16 α ,17-エポキシ GA₄ を用いており、酵素反応から固相抽出精製までの回収率を 100%と想定して見積もった 1 ng および 10 ng 相当をイネに投与した (Zhu et al., 2006)。これに対し、本研究では化学合成品であるために純度と量が明らかである 16 α ,17-エポキシ GA₄ を試験に用いた。したがって、Zhu らの試験における 10 ng と本試験における 100 pmol (~ 35 ng) の間では、実際に試験に供した化合物量が大きく異なる可能性がある。また、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ では大きく生理活性が低下したが、100 pmol の投与でわずかながらも有意な生理活性を示した。この結果と GID1 との結合試験の結果から、16 α ,17-エポキシ GA₄ は 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ に加水分解されても完全には不活性化されないことが示唆され、本不活性化機構には 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の配糖体化も重要な役割を担うことが考えられた。

さらに、16,17 位のエポキシ化と加水分解による段階的な不活性化は GA₁ の場合も同様であることが明らかとなった。しかし、13 位水酸基の有無における比較では 13 位水酸化化合物の方が高活性を示した。GID1 との結合親和性が GA₁ に比べて GA₄ の方が高いことに加え (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Nakajima et al., 2006)、イネやシロイヌナズナの *GA13ox* を過剰発現したシロイヌナズナが (半) 矮性の表現型を示したことなどから (Magome et al., 2013; He et al., 2019)、13 位水酸化は GA の活性を低下させる役割をもつことが知られている。この矛盾は、生体内での代謝速度やイネへの取り込まれ方の違いが原因なのではないかと考えられる。例えば、EUI の基質特異性が挙げられる。EUI の実生での発現はそれほど高くないが (Zhu et al., 2006)、13 位水酸化 GA は EUI の基質とならないため EUI による不活性化を受けず、13 位非水酸化型の化合物よりも高活性を示した可能性がある。しかし、16 α ,17-エポキシドや 16 α ,17-ジオールでも同様に GA₁ タイプの方が高活性を示した。加えて、1-2-1 の結果において EUI2 は 16 α ,17-エポキシ GA₁ に対しても加水分解活性を示した。これらのことから、EUI と EUI2 が関与する代謝経路以外にも理由が考えられる。過去に行われたトウモロコシの実生に対する添加実験でも同様に、GA₁ が GA₄ よりも高活性を示した (Kobayashi et al., 1993)。また、シロイヌナズナの実生では、低濃度 (0.1-0.3 μ g) の投与では GA₄ が、高濃度 (1-10 μ g) の投与では GA₁ がそれぞれ高活性を示した (Kobayashi et al., 1993)。このように、イネ以外の植物においても、GID1 への結合親和性と添加実験の活性が必ずしも一致するとはいえない例があり、GA₁ と GA₄ を植物体に添加後の取り込まれ方にも違いがあるのではないかと推測する。

一方、16 位のエポキシ基の立体が異なる化合物同士 (**1** と **2**) は同等の生理活性を示した。また、**4** と **5** の比較においても、これらの生理活性は同程度だった。これらの結果から、16 位のエポキシ化は GA 活性を低下させるがその立体配置は活性に影響せず、16 位が水酸化された場合もエポキシ化と同等のホルモン活性低下につながることが示された。**5** と **6** の比較では **6** の活性が弱かったことに加え、先行研究 (Gaskin et al., 1992) では 17 位が水酸化された GA₄ (16 α ,17-ジヒドロ-17-ヒドロキシ GA₄) がイネの実生に対して目立った生理

活性を示さないことも報告されている。これらのことから、16,17 位の酸化や水酸化の中で、特に 17 位の水酸化は GA の生理活性を大きく低下させる化学修飾であることが示唆された。先でも述べたように、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の配糖体化されることでさらに不活性化されることが考えられる。そこで今後は、16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の配糖体を用いた活性試験および GID1 との相互作用解析が重要になると考える。

3. 総括

本博士論文研究では、イネの最上位節間での GA₄ 不活性化について、「EUI による GA₄ のエポキシ化では不活性化は不完全であり、これに続く EUI2 による加水分解反応を受けて GA₄ はさらに不活性化される」という仮説を立てた。その検証に向けて、EUI2 の酵素機能解析や 16 α ,17-エポキシ GA₄ を含む内生 GA および代謝物分析、16 α ,17-エポキシ GA₄ と 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の活性評価、GA 誘導体の構造活性相関を行った。これらの実験結果から、EUI2 はイネ生体内で 16 α ,17-エポキシ GA₄ を 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ に加水分解する機能を持つことが明らかとなった。さらに、16 α ,17-エポキシ GA₄ は GA₄ よりも弱いながらも生理活性を持つことが明らかとなり、弱い徒長形質を示す *eui2* 変異体では WT と比較して 16 α ,17-エポキシ GA₄ が蓄積していることを示した。加えて、16 α ,17-エポキシ GA₄ は 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ に変換されることでさらに生理活性が低下することが明らかとなった。これらのことから、本博士論文研究における上記の仮説が支持され、イネの最上位節間には EUI と EUI2 によって GA₄ を段階的に不活性化する機構が存在することが明らかとなった。

また、GA₄、16 α ,17-エポキシ GA₄ および 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の WT の最上位節間における内生量は極めて少なかった。一方、*eui eui2* では GA₄ が蓄積し、*eui2* では GA₄ の内生量は WT と同程度だが 16 α ,17-エポキシ GA₄ が蓄積していることが示された。これらのことから、イネでは出穂時に GA₄ が積極的に生合成されるが、EUI と EUI2 によって速やかに代謝されていると考えられる。イネは最上位節間が十分に伸長することで出穂し、それと連動するようにして出穂からまもなく開花する。イネの葯では GA₄ や GA₇ の生合成が盛んに行われ、葯や花粉の正常な発達に重要な役割を果たすことが知られている (Hirano et al., 2008; Kawai et al., 2022)。一方、栄養成長期では GA₁ などの 13 位水酸化 GA が主に生合成される (Kobayashi et al., 1988)。また、既に述べたとおり、GA₄ は GA₁ よりも GID1 に対して高い結合親和性を示す (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Nakajima et al., 2006)。これらのことから、イネは生殖成長時に、より活性の強い 13 位非水酸化 GA を積極的に生合成していると考えられる。イネは生殖成長において精巧な成長調節をできるように、活性の強い GA₄ を EUI と EUI2 によって段階的に不活性化する機構を備えているのではないだろうか。この点については、葯での 16 α ,17-エポキシ GA₄ や 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の内生量分析に加え、GA₇ も同様に EUI と EUI2 によって代謝されるのかといった検証が今後重要だと考える。

4. 実験の部

化合物

4 種の活性型 GA を含む合計 16 種の GA および、その重水素標識体 [$^2\text{H}_2$]-GA は、OlchemIm 社から購入したものを使用した。16 α ,17-エポキシ GA₄ の内生量分析時に内部標準物質として添加した [$^2\text{H}_2$]-16 α ,17-エポキシ GA₄ は、後述の [$^2\text{H}_2$]-GA₄ と EUI の酵素反応により生成した。EUI2 の酵素反応試験に用いた基質のうち、16 α ,17-エポキシ GA₁ と 16 β ,17-エポキシ GA₄、イネへの投与試験や GID1 との相互作用解析に用いた 16 α ,17-エポキシ GA₄ および 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄、構造活性相関に供した 6 種の GA 誘導体は当研究室の渡辺文太 助教（現 東京慈恵会医科大学 准教授）が合成したものを使用した（Ishida et al., 2022）。

植物材料

イネ (*Oryza sativa*) の WT (cv. ZS97B、D297B、TP309)、*eui2-1* (cv. ZS97B)、*eui2-2* (D297B)、*eui-1 eui2-1* (cv. ZS97B)、*EUI-OE/eui2-2* (cv. D297B) 及び、*EUI2-OE* (cv. TP309) は He 教授（中国科学院）から頂いた。これらの種子を用いて、本研究室のグロースチャンバー及び、温室（京都大学生存圏研究所・京都大学生態学研究センター、DASH 植物育成サブシステム）内で栽培したイネを分析用の試料として使用した。また、点滴法に用いたイネの短銀坊主の種子は野村崇人 准教授（宇都宮大学バイオサイエンス教育センター）から頂いたものを使用した。

ジアゾエタンの生成

Berthon-Gelloz らの方法に従い、ジアゾエタンを生成した（Berthon-Gelloz et al., 2009）。1 M の *N*-エチル-*N*-ニトロソウレア（Sigma-Aldrich）のジエチルエーテル溶液に対し、5 モル等量の 40% 水酸化カリウム水溶液 (w/v) を滴下した。反応はジアゾメタン生成装置 (GM-50、宮本理研工業) を用いて氷上で 20 分間行い、発生したジアゾエタンを新たなジエチルエーテル溶液として回収した。

EUI の組み換えタンパク質の調製

EUI-pYeDP60 が形質転換された酵母 WAT11 株 (Zhu et al., 2006) の培養液を野村崇人 准教授から分与して頂き、そのうちの 1 mL を SGI 液体培地 10 mL に植菌した。28°C で一晩振盪培養した培養液から 1 mL を分取し、再度新たな SGI 液体培地 10 mL に接種して同様に一晩培養した。この培養液から 3 mL を SGI 液体培地 165 mL に接種後、28°C で振盪培養をした。10 倍希釈した培養液の OD₆₀₀ 値が 0.4-0.6 に達したところで 20% ガラクトース水溶液 (w/v) 15 mL を添加し、28°C で 16 時間培養を行った。遠心分離 (700 g, 10 min, 16°C) により酵母の菌体を回収し、0.1 M リン酸カリウムバッファー (pH 7.6) に懸濁し約 100 mL とした。フレンチプレス (750-850 bar) により細胞破碎後、遠心分離を行った

(10,000 g, 5 min, 4°C)。上清を回収し、超遠心に供した (100,000 g, 1 hr, 4°C)。ペレットを EUI 含有ミクロソーム画分として回収し、0.1 M リン酸カリウムバッファー (pH 7.6) 2 mL に懸濁後、液体窒素で瞬間凍結後に -80°C で保存した。

[²H₂]-16 α ,17-エポキシ GA₄ の調製

[²H₂]-GA₄ (終濃度 9 μ M) と 50 mM NADPH 2 μ L を含む 0.1M カリウムリン酸バッファー 40 μ L と、EUI ミクロソーム溶液 160 μ L を混合して室温で静置した。この反応溶液の一部を水で希釈し、LC-MS/MS 分析に供した。基質である [²H₂]-GA₄ のピークが消失した時点で酵素反応が完全に進行したと判断し、アセトニトリル、メタノール、水それぞれ 1 mL による活性化および、水 1 mL による平衡化後の HLB カートリッジカラム [Oasis® HLB 3 cc (60 mg), Waters] に酵素反応溶液の全量を供した。水 3 mL でカラムを洗浄後、アセトニトリル 2 mL を溶出画分として遠心減圧濃縮により乾固後、再度アセトニトリル溶液とした。LC-MS/MS 分析で酵素反応の進行を確認した際と同じ濃度になるよう、[²H₂]-16 α ,17-エポキシ GA₄ 溶液を水で希釈し LC-MS/MS 分析に供した。カラム精製前後のピーク面積比を基に [²H₂]-16 α ,17-エポキシ GA₄ 溶液の濃度を算出した。

LC-MS/MS 分析における LC での分離条件は表 3 に示したとおりであり、逆相カラム (ACQUITY UPLC® BEH Phenyl ϕ 1.7 μ m 2.1 $\times$ 50 mm Column, Waters) を使用し、カラムの温度と流速をそれぞれ 40°C、0.4 mL/min に設定して分析を行った。また、MS 分析は 4000 QTrap (AB SCIEX) を用い、ESI によるネガティブイオンモードでイオン化し、MRM モードで検出した ([²H₂]-GA₄: m/z 333.2 > 259.1、[²H₂]-16 α ,17-エポキシ GA₄: m/z 349.2 > 261.1)。その他、MS 分析における各パラメーターは以下のとおりである。ion source gas 1 (GS1): 60、ion source gas 2 (GS2): 60、temperature (TEM): 500、declustering potential (DP): -33 ([²H₂]-GA₄)、-31 ([²H₂]-16 α ,17-エポキシ GA₄)、collision energy (CE): -95 ([²H₂]-GA₄)、-100 ([²H₂]-16 α ,17-エポキシ GA₄)。

EUI2 の組換えタンパク質の発現・精製

当研究室の札野が作製した EUI2 および EUI2^{D104A} の発現用プラスミド (pMALHis-EUI2, pMALHis-EUI2^{D104A}) を用いて、MBP-(His)₆ タグ融合型の組換えタンパク質を発現した。各プラスミドを大腸菌 Rosetta-gami 2 (DE3) 株に形質転換し、抗生物質 (アンピシリン 100 μ g/mL, ストレプトマイシン 50 μ g/mL, クロラムフェニコール 37 μ g/mL, テトラサイクリン 12.5 μ g/mL) を含む LB 培地中で 37°C で一晩振盪培養した。培養液のうち 10 mL を同様の LB 培地 1 L に移植し、OD₆₀₀ 値が 0.6-0.7 になるまで 37°C で振盪培養した。IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside, Wako) を終濃度 100 μ M となるよう添加し、16°C で一晩振盪培養した。遠心分離後 (16°C, 5,000 rpm, 20 min) の大腸菌ペレットを 40 mL のバッファー A [20 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl] に懸濁し、超音波で菌体を破碎した。遠心分離 (4°C, 9,000 rpm, 20 min) を 2 度行い、上清を MBPTrap HP (5 cc, Cytiva)

に供した。50 mL のバッファーA でカラムを洗浄後、10 mM マルトースを含むバッファーA 20 mL で溶出した。次いで、His GraviTrap Talon (1 cc, Cytiva) による精製を行った。2 mM イミダゾールを含むバッファーB [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl] 10 mL でカラムを洗浄後、50 mM イミダゾールを含むバッファーB 10 mL で溶出した。Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Device (10k, Merck Millipore) を用いた限外ろ過により1×PBS にバッファー置換し、さらに濃縮を行った。Bradford 法によりタンパク質量を定量後、液体窒素で瞬間凍結後に-80°Cで保存した。

EUI2 の酵素反応および LC-MS/MS 分析

まず、 $[^2\text{H}_2]$ -16 α ,17-エポキシ GA₄ の生成時と同様の操作により、EUI の酵母組換えタンパク質の反応で 16 α ,17-エポキシ GA₄ および、16 α ,17-エポキシ GA₉ を調製した。これらに加えて、当研究室の渡辺文太 助教（現 東京慈恵会医科大学 准教授）が化学合成した 16 β ,17-エポキシ GA₄ と 16 α ,17-エポキシ GA₁ をそれぞれ基質として 1×PBS バッファーに溶解し（終濃度 1 μM ）、EUI2 または EUI2^{D104A} の組換えタンパク質 8 μg （終濃度 2 μM ）を加えて計 50 μL の反応系とした。25°C で 2 時間インキュベート後、アセトニトリル 50 μL と混合して遠心分離し（25°C, 15,000 rpm, 3 min）、上清を LC-MS/MS に供した。

これらの酵素反応溶液の LC-MS/MS 分析条件を表 4 および 5 に示した。化合物の分離には逆相カラム（ACQUITY UPLC® BEH Phenyl ϕ 1.7 μm 2.1×50 mm Column, Waters）を使用し、カラムの温度と流速をそれぞれ 40°C、0.4 mL/min に設定した。MS 分析におけるイオン化は ESI によるネガティブイオンモードで行い、プロダクトインスキャンモードで分析した。

内生 16 α ,17-エポキシ GA₄ の精製および LC-MS/MS 分析

出穂期のイネ最上位節間をサンプリングし、秤量後に液体窒素で凍結させ、使用時まで-80°Cで保存した。精製時は本サンプルにアセトンを加え、EUI の酵素反応によって生成した $[^2\text{H}_2]$ -16 α ,17-エポキシ GA₄ を内部標準物質として添加した。ホモジェナイザーを用いて植物試料を破碎し、綿ろ過後の上清を回収した。窒素気流によりアセトンを留去し、10× PBS バッファー 100 μL と水を加えて 2 mL とした。*n*-ヘキサン 2 mL と混合後に遠心分離（1,000 rpm, 1 min）を行い、ヘキサン層を捨てた。同様の液液分配操作をさらに 2 度行った後、水層に残存するヘキサンを遠心減圧濃縮により除去し、HLB カートリッジカラム [Oasis® HLB 3 cc (60 mg), Waters] に供した。表 6 に示した方法で精製を行い、アセトニトリル 2 mL の溶出画分を遠心減圧濃縮により乾固させた。再度アセトニトリル 200 μL に溶解後、ジアゾエタン 200 μL を加え室温で 10 分間反応させてエチルエステル誘導体化を行った。窒素気流で乾固させたのち、酢酸エチル 2 mL に溶解した。さらに水 1 mL と飽和食塩水 1 mL を加え、攪拌後に有機層を回収した。残った水層に対して同様の酢酸エチル抽出をさらに 2 度行い、有機層を全て合わせて窒素気流により乾固させた。5%酢酸エチル/*n*-

ヘキサン 1 mL に溶解し、表 6 に示した方法でシアノプロピルカートリッジカラム [Sep-Pak® CN 1 cc (100 mg), Waters] によって精製した。20%酢酸エチル/*n*-ヘキサン 3 mL の溶出画分を遠心減圧濃縮により乾固させた。再度 20%酢酸エチル/*n*-ヘキサン 1 mL に溶解してシリカカートリッジカラム [Sep-Pak® Silica 1 cc (100 mg), Waters] に供し、表 6 に示した方法で精製を行った。40%酢酸エチル/*n*-ヘキサン 2 mL の溶出画分を遠心減圧濃縮により乾固させ、50%アセトニトリルに溶解し LC-MS/MS に供した。

16 α ,17-エポキシ GA₄-Et の LC-MS/MS 分析条件を表 7 および 8 に示した。化合物の分離には逆相カラム (ACQUITY UPLC® BEH Phenyl ϕ 1.7 μ m 2.1 $\times$ 50 mm, Waters) を使用し、カラムの温度と流速をそれぞれ 40°C、0.4 mL/min に設定した。また、MS 分析は ESI によるポジティブイオンモードで行い (GS1: 60, GS2: 70, TEM: 350)、プロダクトイonsキャンモード (DP: 60, CE: 25) または、MRM HR モード (表 7) で分析した。

内生 GA 精製および LC-MS/MS 分析

16 α ,17-エポキシ GA₄ の分析時と同様にイネ最上位節間をサンプリングし、秤量および液体窒素による凍結操作を行った。精製時はアセトンおよび、内部標準物質として各 GA の重水素ラベル体を加えた。ホモジェナイザーで破碎し、窒素気流および遠心減圧濃縮によりアセトン抽出液を乾固させた。アセトニトリル 1 mL に溶解し、水 1 mL と *n*-ヘキサン 2 mL を加えて液液分配を行った。水層に再度 *n*-ヘキサン 2 mL を加え、同様の分液操作をさらに 2 回行った。水層に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 1 mL とクロロホルム 2 mL を加えて攪拌後、水層を回収した。残った有機層に対し、再度同様に炭酸水素ナトリウム水溶液による抽出を行った。これらの水層を PVP (Polyvinylpyrrolidone, Tokyo Chemical Industry) を充填したカートリッジカラムに供し、フロースルー画分及び 5%炭酸水素ナトリウム水溶液 1.5 mL の洗浄画分を合わせて回収した。塩酸を加えて pH を 2-3 とし、表 9 に示した方法で HLB カートリッジカラム [Oasis® HLB 3 cc (60 mg), Waters] による精製を行った。80%メタノール (1%酢酸) 2 mL で GA を溶出し、遠心減圧濃縮により乾固させた。メタノール 1 mL に溶解後、DEA カートリッジカラム [Bond Elut DEA 1 cc (100 mg), Agilent Technologies] に供し、表 9 の方法で精製した。メタノール (0.5%酢酸) 3 mL の溶出画分を遠心減圧濃縮により乾固させ、50%酢酸エチル/クロロホルム (2%酢酸) 1 mL に溶解後、表 9 の方法でシリカカートリッジカラム [Sep-Pak® Silica 1 cc (100 mg), Waters] による精製を行った。GA を含むフロースルー画分を遠心減圧濃縮により乾固させ、1%酢酸に溶解後、LC-MS/MS に供した。

4 種の活性型 GA 分析時の LC 条件を表 10 に示した。化合物の分離には逆相カラム (CORTECS® UPLC® C18+ ϕ 1.6 μ m 2.1 $\times$ 100 mm, Waters) を使用し、カラムの温度と流速をそれぞれ 40°C、0.3 mL/min に設定した。MS 分析は ESI によるネガティブイオンモードで行い (GS1: 60, GS2: 70, TEM: 550)、MRM HR モード (表 11) で分析した。GA₃ と GA₇ を除く 14 種の内生 GA の LC-MS/MS 分析における LC 条件を表 12 に示した。化合物

の分離には逆相カラム (ACQUITY UPLC® BEH Phenyl ϕ 1.7 μ m 2.1×50 mm Column, Waters) を使用し、カラムの温度と流速をそれぞれ 40°C、0.4 mL/min に設定した。MS 分析は ESI によるネガティブイオンモードで行い (GS1: 60, GS2: 70, TEM: 550)、MRM HR モード (表 13) で分析した。

イネにおける内生 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ 精製および LC-MS/MS 分析

イネ最上位節間をサンプリングし、秤量および液体窒素による凍結後に -80°C で保存した。精製操作時にはアセトンおよび、内部標準物質として [²H₂]-16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ を加えた。内生 GA 精製時と同様の操作で DEA カートリッジカラムによる精製まで行い、1% 酢酸に溶解後 LC-MS/MS に供した。LC-MS/MS 分析における LC 条件を表 14 および 15 に示した。化合物の分離には逆相カラム (ACQUITY UPLC® BEH Phenyl ϕ 1.7 μ m 2.1×50 mm Column, Waters) を使用し、カラムの温度と流速をそれぞれ 40°C、0.4 mL/min に設定した。MS 分析におけるイオン化は ESI によるネガティブイオンモードで行い、プロダクトインスキャンモード (GS1: 60, GS2: 60, TEM: 450, DP: -130, CE: -35) または、MRM モード (表 16) で測定した。

分子系統解析

まず、Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) を用いて 21 種の植物 [陸上植物 (*Marchantia polymorpha* v3.1, *Physcomitrium patens* v3.3), 維管束植物 (*Selaginella moellendorffii* v1.0), 被子植物 (*Amborella trichopoda* v1.0), 双子葉植物 (*Solanum lycopersicum* ITAG5.0, *Helianthus annuus* r1.2, *Malus domestica* v1.1, *Medicago truncatula* Mt4.0v1, *Lotus japonicus* Lj1.0v1, *Populus trichocarpa* v4.1, *Arabidopsis thaliana* TAIR10, *Citrus clementina* v1.0) および単子葉植物 (*Zostera marina* v3.1, *Hordeum vulgare* r1, *Oryza sativa* v7.0, *Triticum aestivum* v2.2, *Brachypodium distachyon* v3.2, *Panicum virgatum* v5.1, *Setaria viridis* v4.1, *Zea mays* RefGen_V4, *Sorghum bicolor* v5.1)] を対象とし、EUI (LOC_Os05g40384) と EUI2 (LOC_Os10g35490) それぞれのアミノ酸配列をクエリーとした BLAST 検索を行った。加えて、EUI2 の分子系統解析のために、18 種の単子葉植物 [イネ科植物 (*Oryza sativa* v7.0, *Hordeum vulgare* r1, *Triticum aestivum* v2.2, *Brachypodium distachyon* v3.2, *Eleusine coracana* v1.1, *Miscanthus sinensis* v7.1, *Sorghum bicolor* v5.1, *Zea mays* RefGen_V4, *Setaria viridis* v4.1, *Paspalum vaginatum* v3.1) およびその他の単子葉植物 (*Acorus americanus* v1.1, *Zostera marina* v3.1, *Spirodela polyrrhiza* v2, *Dioscorea alata* v2.1, *Asparagus officinalis* V1.1, *Musa acuminata* v1, *Typha latifolia* var. 2019.6 v1.1, *Ananas comosus* v3)] についても BLAST 検索を実施した。得られた結果の中から E-value < 1.0 e⁻¹⁰⁰ を示したものを抽出し、MEGAX を用いてアミノ酸配列のアライメントおよび、分子系統樹の作成を行った。解析法には neighbor-joining 法を用いた。

GID1 組換えタンパク質の発現・精製

イネ *GID1* の CDS 配列が導入された pET49b を鋳型とし、表 17 に示したプライマーを用いて PCR によって増幅した *GID1* 断片を、TOPO®クローニングによって pENTR/D-TOPO® (Thermo Fisher) に組み込んだ。次いで、加藤悦子教授（東洋大学）から分与して頂いた pDEST-trx (Tsunoda et al., 2005) に、LR 反応によって *GID1* 断片を組み込み、発現プラスミドとして pDEST-trx-*GID1* を調製した。発現用大腸菌 Rosetta (DE3) 株に pDEST-trx-*GID1* を形質転換し、Xiang らの方法 (Xiang et al., 2011) に従って大腸菌を培養し Trx-(His)₆ タグ融合型の GID1 (Trx-GID1) を発現した。遠心分離後 (16°C, 5,000 rpm, 10 min) の大腸菌ペレットをソニケーションバッファー [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoethanol] 200 mL に懸濁し、超音波による菌体破碎を行った。遠心分離後 (4°C, 9,000 rpm, 20 min) の上清を HiTrap TALON crude (5 cc, Cytiva) に供した。2 mM イミダゾールを含むソニケーションバッファー 100 mL でカラムを洗浄後、50 mM イミダゾールを含むソニケーションバッファー 20 mL で Trx-GID1 を溶出した。ITC バッファー [20 mM ナトリウムリン酸バッファー (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoethanol] 2L に対して透析を行い (4°C, 13 hr)、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Device (10k, Merck Millipore) を用いて限外ろ過を行った。Bradford 法によりタンパク質量を測定後、液体窒素で瞬間凍結後に -80°C で保存したものを DSF に用いた。また、ITC のために以下の操作を行い、Trx-GID1 をゲルろ過でさらに精製した。透析操作まで同様に調製した Trx-GID1 画分を限外ろ過により 1 mL 程度まで濃縮後、フィルターろ過に供した (Millex®-GP 0.22 μm, Merck Millipore)。HiLoad 26/600 Superdex (200 pg, Cytiva) に供し、ITC バッファーを流速 1 mL/min で送液してゲルろ過精製を行い、Trx-GID1 を含む画分を回収した。再度同様の限外ろ過操作を行い濃縮後、Bradford 法によりタンパク質量を定量し、液体窒素で瞬間凍結後に -80°C で保存して ITC に用いた。

Differential scanning fluorimetry (DSF)

MX3000P (Agilent Technologies) を用いて DSF を行った。Trx-GID1 5 μg (終濃度 12.5 μM) と SYPRO® Orange (Thermo Fisher) 0.015 μL を含む ITC バッファー 10 μL に対し、ITC バッファーに溶解した GA 溶液 10 μL を加えて計 20 μL のサンプルを調製した。また、GA を含まない ITC バッファー 10 μL を添加したサンプルをコントロール試料として用意した。25°C で 10 分間インキュベート後、25°C から 95°C まで直線的な温度変化で加温し、SYPRO® Orange の蛍光強度を連続的に測定した (励起 492 nm/検出 610 nm)。

Isothermal titration calorimetry (ITC)

MicroCal iTC₂₀₀ (Malvern) を用いて ITC を行った。25°C に設定したサンプルセルを 50 μM Trx-GID1 で満たし、300 rpm で攪拌しベースラインの安定化を行った。500 μM の GA

を含む ITC バッファーを装置シリンジで滴下した。まず 0.2 μL を滴下後、1.5 μL ずつ 18 回滴下して滴定を行った。GA を含まない ITC バッファーで同様に滴定した際に生じた熱量を差し引き、MicroCal Origin 7.0 (OriginLab) を用いてデータを解析した。

GA 添加によるイネ節間伸長試験

イネの WT (cv. ZS97) の種子を水に浸漬し、28°C の暗所で 2 日間インキュベートした。Kamachi らの方法 (Kamachi et al., 1991) に従い調製した水耕液 (pH 5.7) にさらに寒天 (0.8%, w/v) を添加した培地上に発芽種子を播種した。25°C の長日条件 (L/D = 16 hr/8 hr) で一週間インキュベート後、5 mM MES を添加した水耕液にイネを移植した。主稈のみを保つように分けつを切除しながら 12 週間生育後、止葉が出現したところで水耕液を 10 mM カリウムリン酸バッファー (pH 7.0) 25 mL に変更した。加えて、この水耕液に GA₄ または 16 α ,17-エポキシ GA₄ のエタノール溶液をそれぞれ 25 μL ずつ添加した。また、コントロールとしてエタノール 25 μL を同様のリン酸バッファー 25 mL に添加したものも用意した。これらの水耕液にイネを移植し、25°C の短日条件 (L/D = 8 hr/16 hr) で生育させた。2 日に 1 回同様の水耕液を入れ替えながら 2 週間生育後、5 mM MES を添加した水耕液に移し替えてさらに 1 週間生育後にイネの節間長を測定した。

GA の点滴法

Nishijima と Katsura の方法に従い、点滴法を行った (Nishijima and Katsura, 1989)。まず、短銀坊主の種子を終濃度 20 μM のウニコナゾールを含む水に浸漬し、28°C の暗所で 24 時間インキュベートした。水による洗浄および水への置換後、さらに 28°C の暗所で 2 日間インキュベートした。次いで、0.8% 水寒天上に発芽種子を播種し 30°C の連続光下で 3 日間生育させた。この実生の幼葉鞘と第一葉の間に、50% アセトンで調製した被験液を 1 μL 添加した。さらに同様の条件で 3 日間生育させた後、第二葉鞘の長さを測定した。

表 3. EUI 酵素反応溶液の LC-MS/MS 分析における LC の分離条件

time (min)	solvent A (%)	solvent B (%)	
0.00	97	3	
0.30	97	3	
3.00	80	20	
8.00	60	40	
8.01	2	98	
10.00	2	98	
10.10	97	3	solvent A: 超純水 (0.05% 酢酸)
12.50	97	3	solvent B: アセトニトリル (0.05% 酢酸)

表 4. EUI2 酵素反応溶液の LC-MS/MS 分析における MS の測定条件 (機種名 : X500R)

compound	precursor ion (<i>m/z</i>)	qualifier ion (<i>m/z</i>)	GS1	GS2	TEM (°C)	DP (V)	CE (V)
16,17-エポキシ GA ₄	347.2	259.17	60	70	350	-125	-30
16,17-ジヒドロキシ GA ₄	365.2	291.12	60	70	350	-130	-35
16 α ,17-エポキシ GA ₉	331.2	287.17	60	70	350	-125	-40
16,17-ジヒドロキシ GA ₉	349.2	305.18	60	70	350	-130	-40
16 α ,17-エポキシ GA ₁	363.2	301.14	60	80	450	-110	-35
16 α ,17-ジヒドロキシ GA ₁	381.2	307.12	60	80	450	-120	-40

表 5. EUI2 酵素反応溶液の LC-MS/MS 分析における LC の分離条件

time (min)	solvent A (%)	solvent B (%)	
0.00	97	3	
0.50	97	3	
3.00	80	20	
8.00	60	40	
8.01	2	98	
10.00	2	98	
10.10	97	3	solvent A: 超純水 (0.05% 酢酸)
12.00	97	3	solvent B: アセトニトリル (0.05% 酢酸)

表 6. 16 α ,17-エポキシ GA₄-Et 精製における各種固相抽出の条件

カラム	活性化	平衡化	ロード	洗浄	溶出
HLB (3 cc)	アセトニトリル メタノール 水 各3 mL	水 3 mL	液液分配後の 水層	水 3 mL	アセトニトリル 2 mL
CN (1 cc)	酢酸エチル <i>n</i> -ヘキサン 各2 mL	5%酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン 1 mL	5%酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン 2 mL	-	20%酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン 3 mL
Silica (1 cc)	酢酸エチル <i>n</i> -ヘキサン 各2 mL	20%酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン 1 mL	20%酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン 3 mL	20%酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン 3 mL	40%酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン 2 mL

表 7. LC-MS/MS による 16 α ,17-エポキシ GA₄-Et の内生量分析における MS の測定条件 (機種名 : X500R)

compound	MRM transition (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE (V)
16 α ,17-エポキシGA ₄ -Et	377.2 > 285.15	50	25
[² H ₂]-16 α ,17-エポキシGA ₄ -Et	379.2 > 287.16	50	25

表 8. 16 α ,17-エポキシ GA₄-Et の LC-MS/MS 分析における LC の分離条件

time (min)	solvent A (%)	solvent B (%)	
0.00	97	3	
0.50	97	3	
3.00	80	20	
8.00	60	40	
8.01	2	98	
10.00	2	98	
10.10	97	3	solvent A: 超純水 (0.05% 酢酸)
12.00	97	3	solvent B: アセトニトリル (0.05% 酢酸)

表 9. 内生 GA 精製における各種固相抽出の条件

カラム	活性化	平衡化	ロード	洗浄	溶出
HLB (3 cc)	アセトニトリル メタノール 水 各3 mL	1%酢酸 3 mL	PVP精製後の溶液 (pH 2-3)	1%酢酸 9 mL	80%メタノール (1%酢酸) 2 mL
DEA (1 cc)	アセトニトリル メタノール 水 各1 mL	メタノール 1 mL	メタノール 1 mL	メタノール 3 mL	メタノール (0.5%酢酸) 3 mL
Silica	酢酸エチル クロロホルム 各2 mL	50%酢酸エチル/ クロロホルム (2%酢酸) 5 mL	-	-	50%酢酸エチル/クロロホルム (2%酢酸) 3 mL

表 10. 4 種の活性型 GA の LC-MS/MS 分析における LC の分離条件

time (min)	solvent A (%)	solvent B (%)	
0.00	90	10	
13.00	90	10	
35.00	45	55	
35.01	2	98	
37.00	2	98	
37.10	90	10	solvent A: 超純水 (0.05% 酢酸)
39.00	90	10	solvent B: アセトニトリル (0.05% 酢酸)

表 11. 4 種の活性型 GA の LC-MS/MS 分析における MS の測定条件 (機種名 : X500R)

compound	MRM transition (m/z)	DP (V)	CE (V)
GA ₁	347.2 > 273.11	-115	-30
[² H ₂]-GA ₁	349.2 > 275.12	-115	-30
GA ₃	345.2 > 143.09	-95	-35
[² H ₂]-GA ₃	347.2 > 143.09	-95	-35
GA ₄	331.2 > 257.12	-95	-30
[² H ₂]-GA ₄	333.2 > 259.13	-95	-30
GA ₇	329.2 > 211.12	-110	-20
[² H ₂]-GA ₇	331.2 > 213.18	-110	-20

表 12. 14 種の内生 GA の LC-MS/MS 分析における LC の分離条件

time (min)	solvent A (%)	solvent B (%)	
0.00	97	3	
0.50	97	3	
3.00	80	20	
8.00	60	40	
11.50	60	40	
11.51	2	98	
13.00	2	98	
13.10	97	3	solvent A: 超純水 (0.05% 酢酸)
15.00	97	3	solvent B: アセトニトリル (0.05% 酢酸)

表 13. 14 種の内生 GA の LC-MS/MS 分析における MS の測定条件 (機種名 : X500R)

compound	MRM transition (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE (V)
GA ₈	363.2 > 275.17	-125	-20
[² H ₂]-GA ₈	365.2 > 277.18	-125	-20
GA ₂₉	347.2 > 259.17	-115	-20
[² H ₂]-GA ₂₉	349.2 > 261.18	-115	-20
GA ₁	347.2 > 273.11	-115	-30
[² H ₂]-GA ₁	349.2 > 275.12	-115	-30
GA ₁₉	361.2 > 317.18	-110	-30
[² H ₂]-GA ₁₉	363.2 > 317.19	-110	-30
GA ₂₀	331.2 > 287.17	-110	-25
[² H ₂]-GA ₂₀	333.2 > 289.18	-110	-25
GA ₄₄	345.2 > 301.18 or 273.18	-120	-30
[² H ₂]-GA ₄₄	347.2 > 303.19 or 275.19	-120	-30
GA ₃₄	347.2 > 259.17	-110	-20
[² H ₂]-GA ₃₄	349.2 > 261.18	-110	-20
GA ₅₁	331.2 > 287.18	-120	-20
[² H ₂]-GA ₅₁	333.2 > 289.18	-120	-20
GA ₅₃	347.2 > 189.13	-110	-40
[² H ₂]-GA ₅₃	349.2 > 189.13	-110	-40
GA ₄	331.2 > 257.12	-95	-30
[² H ₂]-GA ₄	333.2 > 259.13	-95	-30
GA ₂₄	345.2 > 257.19	-110	-30
[² H ₂]-GA ₂₄	347.2 > 259.20	-110	-30
GA ₉	315.2 > 271.18	-95	-25
[² H ₂]-GA ₉	317.2 > 273.19	-95	-25
GA ₁₅	329.2 > 257.19	-115	-30
[² H ₂]-GA ₁₅	331.2 > 259.20	-115	-30
GA ₁₂	331.2 > 313.18	-100	-35
[² H ₂]-GA ₁₂	333.2 > 315.19	-100	-35

表 14. LC-MS/MS による 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の定性分析における LC の分離条件

time (min)	solvent A (%)	solvent B (%)	
0.00	97	3	
0.50	97	3	
3.00	80	20	
5.00	72	28	
5.01	2	98	
7.00	2	98	
7.10	97	3	solvent A: 超純水 (0.05% 酢酸)
9.00	97	3	solvent B: アセトニトリル (0.05% 酢酸)

表 15. LC-MS/MS による 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の内生量分析における LC の分離条件

time (min)	solvent A (%)	solvent B (%)	
0.00	97	3	
0.50	97	3	
3.00	80	20	
8.00	60	40	
11.50	60	40	
11.51	2	98	
13.00	2	98	
13.10	97	3	solvent A: 超純水 (0.05% 酢酸)
15.00	97	3	solvent B: アセトニトリル (0.05% 酢酸)

表 16. LC-MS/MS による 16 α ,17-ジヒドロキシ GA₄ の内生量分析における MS の分析条件 (機種名 : X500R)

compound	MRM transition (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE (V)
16 α ,17-ジヒドロキシGA ₄	365.2 > 291.12	-130	-35
[² H ₂]-16 α ,17-ジヒドロキシGA ₄	367.2 > 293.13	-130	-35

表 17. pDEST-trx-*GID1* 作製時に使用したプライマー一覧

プライマー名	配列 (5'-3')
OsGID1_CACC_F	CACCTGGTGCCACGCGGTTCTATGGCCGGCAGCGACGAGGTC
OsGID1_R	CTAGTAGTAGAGGTTAGCGTTGAGGAAGTC

使用機器一覧

本研究で使用した機器を以下に示す。

・ LC-MS/MS

LC 部 ExionLC (AB SCIEX)

MS 部 X500R QTOF (AB SCIEX)、4000 QTRAP (AB SCIEX)

逆相カラム

ACQUITY UPLC® BEH Phenyl ϕ 1.7 μ m 2.1×50 mm Column (Waters)

CORTECS® UPLC® C18+ ϕ 1.6 μ m 2.1×100 mm (Waters)

・ カートリッジカラム

Oasis® HLB 3 cc 60 mg (Waters)

Sep-Pak® CN 1 cc 100 mg (Waters)

Sep-Pak® Silica 1 cc 100 mg (Waters)

Bond Elut DEA 1 cc 100 mg (Agilent Technologies)

・ タンパク質精製液体クロマトグラフィーシステム ÄKTAexplorer 10S (Cytiva)

・ フラクションコレクター Frac-900 (Cytiva)

・ ゲルろ過カラム HiLoad 26/600 Superdex 200pg (Cytiva)

・ タンパク質精製用アフィニティーカラム

MBPTrap HP 5 cc (Cytiva)

His GraviTrap Talon 1 cc (Cytiva)

HiTrap TALON crude 5 cc (Cytiva)

・ ペリスタポンプ AC2110 (ATTO)

・ 高速ホモジェナイザー POLYTRON® PT 3100 D (KINEMATICA)

・ 超音波ホモジェナイザー SONIFIER 250D (BRANSON)

・ 高圧ホモジェナイザー Panda PLUS 2000 (GEA Niro Soavi)

・ 遠心減圧濃縮装置 UT-2000 (EYELA)、SPD SpeedVac® SPD111V (Thermo)

・ 高速冷却遠心機 Avanti JXN-26 (Beckman Coulter)

・ 微量高速冷却遠心機 MX-300 (TOMY)

・ フロア型超遠心機 Optima XE-100 (Beckman Coulter)

・ 固定アングルロータ Type 50Ti (Beckman Coulter)

・ 恒温培養器 LTI-601SD (EYELA)、FMU-1331 (福島工業)

・ 恒温振盪培養器 BR-15 (TAITEC)、BR-43FL (TAITEC)

・ ジアゾメタン生成装置 GM-50 (宮本理研工業)

・ サーマルサイクラー GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)

・ リアルタイム PCR 装置 Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies)

・ ポリアクリルアミド電気泳動槽 AE-6530 (ATTO)

・ タンパク質電気泳動用パワーサプライヤー EPS 301 (Cytiva)

- ・アガロースゲル電気泳動装置 Mupid®-2plus (ADVANCE)
- ・人工気象器 LH410S、LH300 (日本医化器械製作所)
- ・ITC 実験装置 MicroCal iTC₂₀₀ (Malvern)

使用した市販キットおよび酵素一覧

本研究で使用した市販キットおよび酵素を以下に示す。

- ・FastGene™ Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics)
- ・FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics)
- ・pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit (Thermo Fisher)
- ・Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Thermo Fisher)
- ・GoTaq® Master Mixes (Promega)

使用試薬一覧

本研究で使用した試薬を以下に示す。

ただし、各種培地の成分は 1 L 当たりの組成を示す。

- ・LB 培地：塩化ナトリウム 10 g (Wako)、Bacto™ Yeast Extract 5 g (Becton, Dickinson and Company: BD)、Bacto™ Tryptone 10 g (BD)
- ・SGI 培地：グルコース 20 g (Wako)、Difco™ Yeast Nitrogen Base without Amino Acid 6.7 g (BD)、Bacto™ Casamino Acid 1 g (BD)、D/L-Tryptophan 40 mg (Wako)
- ・YPGE 培地：Bacto™ Yeast Extract 10 g (BD)、Bacto™ Peptone 10 g (BD)、グルコース 5 g (Wako)、エタノール 30 mL (Wako)
- ・抗生物質：アンピシリン (nacalai tesque)、クロラムフェニコール (Wako)、ストレプトマイシン(nacalai tesque)、テトラサイクリン (Wako)
- ・10×PBS バッファー：1.37 M NaCl (Wako)、27 mM KCl (関東化学)、81 mM Na₂HPO₄ (nacalai tesque)、14.7 mM KH₂PO₄ (Wako)
- ・GA 生合成阻害剤：ウニコナゾール P 標準品 (Wako)

参考文献

- Aach, H., Bode, H., Robinson, D.G., and Graebe, J.E. (1997). *ent*-Kaurene synthase is located in proplastids of meristematic shoot tissues. *Planta* **202**, 211-219.
- Arahira, M., Nong, V.H., Udaka, K., and Fukazawa, C. (2000). Purification, molecular cloning and ethylene-inducible expression of asoluble-type epoxide hydrolase from soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Eur J Biochem* **267**, 2649-2657.
- Ashikari, M., Sasaki, A., Ueguchi-Tanaka, M., Itoh, H., Nishimura, A., Datta, S., Ishiyama, K., Saito, T., Kobayashi, M., Khush, G.S., Kitano, H., and Matsuoka, M. (2002). Loss-of-function of a rice gibberellin biosynthetic gene, *GA20 oxidase* (*GA20ox-2*), led to the rice 'Green revolution'. *Breed Sci* **52**, 143-150.
- Berthon-Gelloz, G., Marchant, M., Straub, B.F., and Marko, I.E. (2009). Palladium-catalyzed cyclopropanation of alkenyl silanes by diazoalkanes: evidence for a Pd(0) mechanism. *Chemistry* **15**, 2923-2931.
- Blake, P.S., Browning, G., Benjamin, L.J., and Mander, L.N. (2000). Gibberellins in seedlings and flowering trees of *Prunus avium* L. *Phytochemistry* **53**, 519-528.
- Chiang, H.H., Hwang, I., and Goodman, H.M. (1995). Isolation of the Arabidopsis GA4 Locus. *Plant Cell* **7**.
- Dill, A., and Sun, T.P. (2001). Synergistic Derepression of Gibberellin Signaling by Removing RGA and GAI Function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**, 777-785.
- Dill, A., Jung, H.S., and Sun, T.P. (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14162-14167.
- Fall, R.R., and West, C.A. (1971). Purification and Properties of Kaurene Synthetase from *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem* **246**, 6913-6928.
- Gaskin, P., Hoad, G.V., MacMillan, J., Makinson, I.K., and Readman, J.E. (1992). Gibberellins A82 and A83 in seed of *Lupinus albus*. *Phytochemistry* **31**, 1869-1877.
- Gomi, K., Sasaki, A., Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Kitano, H., and Matsuoka, M. (2004). GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J* **37**, 626-634.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P., and Thomas, S.G. (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 3399-3414.
- Guan, H.Z., Duan, Y.L., Liu, H.Q., Chen, Z.W., Zhuo, M., Zhuang, L.J., Qi, W.M., Pan, R.S., Mao, D.M., Zhou, Y.C., Wang, F., and Wu, W.R. (2011). Genetic analysis and fine mapping of an enclosed panicle mutant *esp2* in rice (*Oryza sativa* L.). *Chinese*

- Science Bulletin **56**, 1476-1480.
- Hasegawa, M., Nakajima, M., Takeda, K., Yamaguchi, I., and Murofushi, N. (1994). A novel gibberellin glucoside 16 α ,17-dihydroxy-16,17- dihydrogibberellin A4-17-O- β -D-glucopyranoside, from rice anthers. *Phytochemistry* **37**, 629-634.
- He, J., Chen, Q., Xin, P., Yuan, J., Ma, Y., Wang, X., Xu, M., Chu, J., Peters, R.J., and Wang, G. (2019). CYP72A enzymes catalyze 13-hydrolyzation of gibberellins. *Nat Plants* **5**, 1057-1065.
- Hedden, P. (2020). The Current Status of Research on Gibberellin Biosynthesis. *Plant Cell Physiol* **61**, 1832-1849.
- Hedden, P., Hoad, G.V., Gaskin, P., Lewis, M.J., Green, J.R., Furber, M., and Mander, L.N. (1993). Kaurenoids and gibberellins, including the newly characterized gibberellin A88, in developing apple seeds. *Phytochemistry* **32**, 231-237.
- Helliwell, C.A., Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S., and Peacock, W.J. (2001). The CYP88A cytochrome P450, *ent*-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2065-2070.
- Helliwell, C.A., Sheldon, C.C., Olive, M.R., Walker, A.R., Zeevaart, J.A., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (1998). Cloning of the *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase gene *GA3*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9019-9024.
- Hirano, K., Asano, K., Tsuji, H., Kawamura, M., Mori, H., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., and Matsuoka, M. (2010). Characterization of the molecular mechanism underlying gibberellin perception complex formation in rice. *Plant Cell* **22**, 2680-2696.
- Hirano, K., Aya, K., Hobo, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Shim, R.A., Hasegawa, Y., Ueguchi-Tanaka, M., and Matsuoka, M. (2008). Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice. *Plant Cell Physiol* **49**, 1429-1450.
- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., and Yamaguchi, J. (2001). *slender* Rice, a Constitutive Gibberellin Response Mutant, Is Caused by a Null Mutation of the SLR1 Gene, an Ortholog of the Height-Regulating Gene *GA1/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell* **13**, 999-1010.
- Ishida, T., Watanabe, B., Mashiguchi, K., and Yamaguchi, S. (2022). Synthesis and structure–activity relationship of 16,17-modified gibberellin derivatives. *Phytochem Lett* **49**, 162-166.
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M., and Matsuoka, M. (2002). The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell* **14**, 57-70.
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sentoku, N., Kitano, H., Matsuoka, M., and Kobayashi, M.

- (2001). Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 β -hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8909-8914.
- Iuchi, S., Suzuki, H., Kim, Y.C., Iuchi, A., Kuromori, T., Ueguchi-Tanaka, M., Asami, T., Yamaguchi, I., Matsuoka, M., Kobayashi, M., and Nakajima, M.** (2007). Multiple loss-of-function of *Arabidopsis* gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. *Plant J* **50**, 958-966.
- Kamachi, K., Yamaya, T., Mae, T., and Ojima, K.** (1991). A role for glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiol* **96**, 411-417.
- Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S.** (2002). Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**, 45188-45194.
- Kawai, K., Takehara, S., Kashio, T., Morii, M., Sugihara, A., Yoshimura, H., Ito, A., Hattori, M., Toda, Y., Kojima, M., Takebayashi, Y., Furuumi, H., Nonomura, K.I., Mikami, B., Akagi, T., Sakakibara, H., Kitano, H., Matsuoka, M., and Ueguchi-Tanaka, M.** (2022). Evolutionary alterations in gene expression and enzymatic activities of gibberellin 3-oxidase 1 in *Oryza*. *Commun Biol* **5**, 67.
- Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Ota, Y., and Takahashi, N.** (1988). Fluctuation and Localization of Endogenous Gibberellins in Rice. *Agric Biol Chem* **52**, 1189-1194.
- Kobayashi, M., Gaskin, P., Spray, C.R., Suzuki, Y., Phinney, B.O., and MacMillan, J.** (1993). Metabolism and Biological Activity of Gibberellin A, in Vegetative Shoots of Zea mays, Oryza sativa, and Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* **102**, 379-386.
- Lange, T., and Pimenta Lange, M.J.** (2020). The Multifunctional Dioxygenases of Gibberellin Synthesis. *Plant Cell Physiol* **61**, 1869-1879.
- Lee, D.J., and Zeevaart, J.A.** (2005). Molecular cloning of *GA 2-oxidase3* from spinach and its ectopic expression in *Nicotiana glauca*. *Plant Physiol* **138**, 243-254.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., and Peng, J.** (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is upregulated following imbibition. *Genes Dev* **16**, 646-658.
- Liu, H., Guo, S., Lu, M., Zhang, Y., Li, J., Wang, W., Wang, P., Zhang, J., Hu, Z., Li, L., Si, L., Zhang, J., Qi, Q., Jiang, X., Botella, J.R., Wang, H., and Song, C.P.** (2019). Biosynthesis of DHGA12 and its roles in *Arabidopsis* seedling establishment. *Nat Commun* **10**, 1768.

- Liu, L., van Zanten, L., Shu, Q.Y., and Maluszynski, M.** (2004). Officially released mutant varieties in China. *Mutation Breeding Review* **14**, 1-64.
- MacMillan, J., and Suter, P.J.** (1958). The Occurrence of Gibberellin A1 in Higher Plants - Isolation from the Seed of Runner Bean (*Phaseolus multiflorus*). *Naturwissenschaften* **45**, 46.
- Magome, H., Nomura, T., Hanada, A., Takeda-Kamiya, N., Ohnishi, T., Shinma, Y., Katsumata, T., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S.** (2013). *CYP714B1* and *CYP714B2* encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 1947-1952.
- Martin, D.N., Proebsting, W.M., and Hedden, P.** (1999). The *SLENDER* Gene of Pea Encodes a Gibberellin 2-Oxidase. *Plant Physiol* **121**, 775-781.
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., and Steber, C.M.** (2003). The Arabidopsis *SLEEPY1* gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**, 1120-1130.
- Morisseau, C.** (2013). Role of epoxide hydrolases in lipid metabolism. *Biochimie* **95**, 91-95.
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.P., and Hakoshima, T.** (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**, 459-463.
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.C., Park, S.H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M., and Yamaguchi, I.** (2006). Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant J* **46**, 880-889.
- Nishijima, T., and Katsura, N.** (1989). A Modified Micro-Drop Bioassay Using Dwarf Rice for Detection of Femtomol Quantities of Gibberellins. *Plant Cell Physiol* **30**, 623-627.
- Nomura, T., Magome, H., Hanada, A., Takeda-Kamiya, N., Mander, L.N., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S.** (2013). Functional analysis of *Arabidopsis* CYP714A1 and CYP714A2 reveals that they are distinct gibberellin modification enzymes. *Plant Cell Physiol* **54**, 1837-1851.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P.** (1997). The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**, 3194-3205.
- Phillips, A.L., Ward, D.A., Uknes, S., Appleford, N.E., Lange, T., Huttly, A.K., Gaskin, P., Graebe, J.E., and Hedden, P.** (1995). Isolation and Expression of Three Gibberellin 20-Oxidase cDNA Clones from Arabidopsis. *Plant Physiol* **108**.
- Pineau, E., Xu, L., Renault, H., Trolet, A., Navrot, N., Ullmann, P., Legeret, B., Verdier, G., Beisson, F., and Pinot, F.** (2017). *Arabidopsis thaliana* EPOXIDE HYDROLASE1

- (AtEH1) is a cytosolic epoxide hydrolase involved in the synthesis of poly-hydroxylated cutin monomers. *New Phytol* **215**, 173-186.
- Rutger, J.N., and Carnahan, H.L.** (1981). A Fourth Genetic Element to Facilitate Hybrid Cereal Production—A Recessive Tall in Rice. *Crop Sci* **21**, 373-376.
- Sakai, M., Sakamoto, T., Saito, T., Matsuoka, M., Tanaka, H., and Kobayashi, M.** (2003). Expression of novel rice gibberellin 2-oxidase gene is under homeostatic regulation by biologically active gibberellins. *J Plant Res* **116**, 161-164.
- Sakamoto, T., Kobayashi, M., Itoh, H., Tagiri, A., and Kayano, T.** (2001). Expression of a gibberellin 2-oxidase gene around the shoot apex is related to phase transition in rice. *Plant Physiol* **125**, 1508-1516.
- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M., and Matsuoka, M.** (2003). Accumulation of Phosphorylated Repressor for Gibberellin Signaling in an F-box Mutant. *Science* **299**, 1896-1898.
- Schneider, G., and Schliemann, W.** (1994). Gibberellin conjugates: an overview. *Plant Growth Regul* **15**, 247-260.
- Schneider, G., Jensen, E., Spray, C.R., and Phinney, B.O.** (1992). Hydrolysis and reconjugation of gibberellin A20 glucosyl ester by seedlings of *Zea mays* L. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8045-8048.
- Schomburg, F.M., Bizzell, C.M., Lee, D.J., Zeevaart, J.A., and Amasino, R.M.** (2003). Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* **15**, 151-163.
- Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., Kato, H., and Matsuoka, M.** (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* **456**, 520-523.
- Silverstone, A.L., Mark, P.Y., Martinez, E.C., and Sun, T.P.** (1997). The New *RGA* Locus Encodes a Negative Regulator of Gibberellin Response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **146**, 1087-1099.
- Stapleton, A., Beetham, J.K., Pinot, F., Garbarino, J.E., Rockhold, D.R., Friedman, M., Hammock, B.D., and Belknap, W.R.** (1994). Cloning and expression of soluble epoxide hydrolase from potato. *Plant J* **6**, 251-258.
- Steber, C.M., Cooney, S.E., and McCourt, P.** (1998). Isolation of the GA-Response Mutant *slr1* as a Suppressor of *ABI1-1* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**, 509-521.
- Sun, T.P., and Kamiya, Y.** (1994). The *Arabidopsis GAI* Locus Encodes the Cyclase *ent*-Kaurene Synthetase A of Gibberellin Biosynthesis. *Plant Cell* **6**, 1509-1518.
- Takahashi, N., Kitamura, H., Kawarada, A., Seta, Y., Takai, M., Tamura, S., and Sumiki, Y.**

- (1955). Biochemical Studies on “Bakanae” Fungus. Part XXXIV. Isolation of Gibberellins and Their Properties. *Bull Agric Chem Soc Jpn* **19**, 267-277.
- Thomas, S.G., Phillips, A.L., and Hedden, P.** (1999). Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4698-4703.
- Tsunoda, Y., Sakai, N., Kikuchi, K., Katoh, S., Akagi, K., Miura-Ohnuma, J., Tashiro, Y., Murata, K., Shibuya, N., and Katoh, E.** (2005). Improving expression and solubility of rice proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **42**, 268-277.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I., and Matsuoka, M.** (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**, 693-698.
- Varbanova, M., Yamaguchi, S., Yang, Y., McKelvey, K., Hanada, A., Borochoy, R., Yu, F., Jikumaru, Y., Ross, J., Cortes, D., Ma, C.J., Noel, J.P., Mander, L., Shulaev, V., Kamiya, Y., Rodermel, S., Weiss, D., and Pichersky, E.** (2007). Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* **19**, 32-45.
- Wen, C.K., and Chang, C.** (2002). *Arabidopsis* *RGL1* encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* **14**, 87-100.
- Xiang, H., Takeuchi, H., Tsunoda, Y., Nakajima, M., Murata, K., Ueguchi-Tanaka, M., Kidokoro, S., Kezuka, Y., Nonaka, T., Matsuoka, M., and Katoh, E.** (2011). Thermodynamic characterization of OsGID1-gibberellin binding using calorimetry and docking simulations. *J Mol Recognit* **24**, 275-282.
- Xu, Y.L., Li, L., Gage, D.A., and Zeevaart, J.A.** (1999). Feedback Regulation of *GA5* Expression and Metabolic Engineering of Gibberellin Levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**.
- Yabuta, T., and Sumiki, Y.** (1938). Communication to the editor. *J Agric Chem Soc Jpn* **14**, 1526.
- Yamaguchi, S.** (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 225-251.
- Yang, R.C., Zhang, S.B., Huang, R.H., Yang, S.R., and Zhang, Q.Q.** (2002). Breeding Technology of *eur*-hybrids of Rice. *Agricultural Sciences in China* **1**, 359-363.
- Yang, X.C., and Hwa, C.M.** (2008). Genetic modification of plant architecture and variety improvement in rice. *Heredity (Edinb)* **101**, 396-404.
- Zhang, Y., Zhang, B., Yan, D., Dong, W., Yang, W., Li, Q., Zeng, L., Wang, J., Wang, L., Hicks, L.M., and He, Z.** (2011). Two *Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenases,

CYP714A1 and CYP714A2, function redundantly in plant development through gibberellin deactivation. *Plant J* **67**, 342-353.

Zhu, Y., Nomura, T., Xu, Y., Zhang, Y., Peng, Y., Mao, B., Hanada, A., Zhou, H., Wang, R., Li, P., Zhu, X., Mander, L.N., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and He, Z. (2006).

ELONGATED UPPERMOST INTERNODE encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* **18**, 442-456.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、大変多くの方々にお世話になりました。終始丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました、京都大学大学農学研究科および京都大学化学研究所 山口信次郎教授、増口潔 助教、渡辺文太 助教（現 東京慈恵会医科大学 准教授）に感謝の意を表します。

共同研究者である中国科学院 Zuhua He 教授、Yingying Zhang 博士ならびに、福建農林大学 Hongbo Zhu 博士、Shubaio Zhang 博士には種子の分与や研究情報の提供、実験に関する助言をしていただきました。深く感謝申し上げます。

ITC実験装置の貸出およびご指導をしていただいたことにつきまして、京都大学エネルギー理工学研究所 森井孝 名誉教授、中田栄司 教授に感謝の意を表します。

超遠心機の貸出およびご指導をしていただいたことにつきまして、京都大学化学研究所 栗原達夫 教授、小川拓哉 助教に感謝の意を表します。

本論文で使用したベクター (pDEST-trx) を分与していただいた、東洋大学食環境科学部 加藤悦子 教授に感謝の意を表します。

DSFの結果の議論においてご意見とご協力をいただいた、東京大学大学院農学研究科 浅見忠男 名誉教授、Kai Jiang 博士に御礼申し上げます。

本論文で使用した短銀坊主および、EUI発現用組換え酵母を分与していただいた、宇都宮大学バイオサイエンスセンター 野村崇人 准教授に感謝の意を表します。

植物の育成につきまして、京都大学生存圏研究所・京都大学生態学研究センターの持続可能生存圏開拓診断 (DASH) システムを利用いたしました。感謝申し上げます。

また本研究は、京都大学化学研究所 国際共同利用・共同研究プログラムの助成を受けて行ったものです。感謝の意を表します。

投稿論文一覧

1. Toshiaki Ishida*, Yingying Zhang*, Hongbo Zhu*, Shoko Fudano, Yu Peng, Yoshiya Seto, Kiyoshi Mashiguchi, Jiyun Liu, Zuhua He, Shubiao Zhang, Shinjiro Yamaguchi. Stepwise deactivation of gibberellins during rice internode elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 122 (23): e2415835122 (2025).

*These authors contributed equally to this work.

2. Toshiaki Ishida, Bunta Watanabe, Kiyoshi Mashiguchi, Shinjiro Yamaguchi. Synthesis and structure–activity relationship of 16,17-modified gibberellin derivatives. *Phytochemistry Letters*, 49, 162-166 (2022).