

学位論文要旨

Analysis of a novel gibberellin signaling pathway through calcium ion

(カルシウムイオンを介する新しいジベレリン信号伝達経路の解析)

岡田 佳那子

ジベレリン(GA)は種子の発芽、茎部の伸長成長、花芽形成などを促進する植物ホルモンである。GA シグナル伝達経路において中心的な役割を果たしていると考えられているのが、DELLA タンパク質である。GA が存在しない時、DELLA は核内で GA 応答を抑制している。GA 受容体の GID1 が GA と結合すると GID1 は DELLA と複合体を形成する。この複合体がユビキチンリガーゼの F-Box タンパク質により認識され、DELLA はユビキチン-26S プロテアソーム系で分解される。その結果、植物は GA に応答する。シロイヌナズナには機能的に重複した GAI、RGA、RGL1、RGL2、RGL3 の 5 つの DELLA が存在している。これまで GA 信号伝達のほとんどが DELLA を介した経路によって説明されてきた。しかし、DELLA に依存しない GA 信号伝達経路も報告されている。GA 生合成酵素遺伝子の発現を制御するタバコの転写因子 REPRESSION OF SHOOT GROWTH (RSG)の細胞内局在はカルシウム依存性タンパク質キナーゼ NtCDPK1 により制御される。このことから GA の信号伝達にはカルシウムイオン(Ca²⁺)依存的な経路があるのではないかと考えられた。Ca²⁺ は動植物に共通する二次メッセンジャーである。植物が風、重力、接触、浸透圧変化などの物理的的刺激を感知すると細胞質 Ca²⁺ 濃度([Ca²⁺]_{cyt})が上昇する事が知られている。その他にもオーキシンやアブシシン酸等の植物ホルモン、環境ストレス、病原体の感染に対する応答などにおいて Ca²⁺ が二次メッセンジャーとして関与する事が示唆されている。

GA 信号伝達においても Ca²⁺ の関与が示唆されていた。オオムギの糊粉層細胞のプロトプラストにおいて蛍光 Ca²⁺ 指示薬により [Ca²⁺]_{cyt} を測定すると、GA 投与後 5 時間で Ca²⁺ の上昇が起こると報告された。しかし、これは他の Ca²⁺シグナリングに比べてあまりにも遅く、Ca²⁺ が GA の信号伝達に関与しているのか疑問であった。そこで本研究では GA と Ca²⁺ の関係を精密に再検討する事を目的とした。さらに GA による [Ca²⁺]_{cyt} の上昇が DELLA と GID1 に依存するかを調べた。

発光タンパク質エクオリンは発光基質と複合体を形成することで Ca²⁺ に反応して青色光を発する性質をもつ。エクオリンを発現するシロイヌナズナ形質転換体を作成し、[Ca²⁺]_{cyt} の変動を植物体で調べた。その結果、活性型 GA の投与後 5 分以内に [Ca²⁺]_{cyt} が 300 nM 以上に一過的に上昇した。不活性型 GA である GA₉-Me と GA₈ の投与では [Ca²⁺]_{cyt} の上昇は観察されなかった。このことから [Ca²⁺]_{cyt} の上昇は活性型 GA 特異的であることが明らかになった。

[Ca²⁺]_{cyt} の変動には Ca²⁺ チャネルが関与することが知られている。そこで GA による

[Ca²⁺]_{cyt}の上昇が植物細胞のCa²⁺チャンネルを介するか調べるためにCa²⁺チャンネル阻害剤(Co²⁺, La³⁺)を用いて[Ca²⁺]_{cyt}の変化を調べた。Co²⁺とLa³⁺はカルシウムキレーターと同様に活性型GAによる[Ca²⁺]_{cyt}の上昇を完全に抑制した。活性型GAはCa²⁺チャンネルを介して[Ca²⁺]_{cyt}の上昇を引き起こしていると考えられた。

本研究で見出したGAによる[Ca²⁺]_{cyt}の上昇は5分以内に起こる早い反応である。一方、GA信号伝達でスイッチの役割を果たすDELLAの分解はGAの投与後30分で観察される。[Ca²⁺]_{cyt}の上昇はDELLAの分解に先行しているのである。したがってDELLAの分解をスイッチとするGA信号伝達経路とは独立な未知の経路の存在が示唆された。そこで[Ca²⁺]_{cyt}の上昇とDELLAの分解の関係を調べるため、非分解型DELLA(RGAΔ17)の発現が誘導可能な形質転換体(*GVG::TAP-RGAΔ17*)とシロイヌナズナのDELLAをすべて欠損させた変異体(*dellaP*)を用いて解析した。RGAΔ17はN末端側の17アミノ酸が欠損しているため、GA刺激を受けても分解されずGA信号伝達を抑制し続ける。逆に*dellaP*はシロイヌナズナの5つのDELLA遺伝子すべてを欠失しているため、DELLAによるGA信号伝達の抑制が常に解除された状態になっている。エクオリンを発現させた*GVG::TAP-RGAΔ17*と*dellaP*の植物体にGAを投与したところ、何れも5分以内に[Ca²⁺]_{cyt}の上昇が観察された。このことからGAによる[Ca²⁺]_{cyt}の上昇はDELLAに依存しないことが示された。次にDELLAの分解に[Ca²⁺]_{cyt}の上昇が必要であるのかを調べた。RGAと蛍光タンパク質GFPの融合タンパク質を発現する形質転換体を用いて実験を行った。Co²⁺とLa³⁺により[Ca²⁺]_{cyt}の上昇を抑制した状態でGAを投与し、RGA-GFPが分解されるかを調べた。その結果、Co²⁺とLa³⁺の有無にかかわらずRGA-GFPの分解はGA添加後30分後に観察された。したがってGAによる[Ca²⁺]_{cyt}の上昇とDELLAの分解は独立であることが明らかになった。

GID1は現在のところGAの受容体として報告されている唯一のタンパク質である。シロイヌナズナのGID1は*GID1A*, *GID1B*, *GID1C*の3つの遺伝子によりコードされている。本研究で明らかにされたDELLAを介さないGAによる[Ca²⁺]_{cyt}の上昇がGID1に依存するかどうかを調べた。GID1の3重変異体は通常発芽しない。しかし、人工的に種皮を剥ぐと生育し極端な矮性を示す。エクオリンを発現させたGID1の3重変異体にGAを添加すると5分以内に[Ca²⁺]_{cyt}の上昇が観察された。このことはGAがGID1以外の受容体に認識されて[Ca²⁺]_{cyt}の上昇を引き起こすことを示唆する。

本研究で見いだされたGID1やDELLAを介さないGA特異的な[Ca²⁺]_{cyt}の変動は未知のGA信号伝達経路の存在を示唆する。それにはCo²⁺とLa³⁺で抑制されるCa²⁺チャンネルがGA特異的な[Ca²⁺]_{cyt}の上昇に関与していると考えられる。イオンチャンネルはイオンを通過させるだけでなく、受容体として機能する例がある。今後、GA特異的な[Ca²⁺]_{cyt}の一過の上昇を担うチャンネルの同定ができれば、唯一のGA受容体とされるGID1を介さないGA信号伝達経路の解明に結び付くと期待される。