

論文審査の要旨

| | | | |
|--|-------------------|--------|--------|
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (理 学) | 氏名 | 岡田 佳那子 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第① 2 項該当 | | |
| 論文題目 | | | |
| 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) | | | |
| 論文審査担当者 | | | |
| 主 査 | 教 授 | 高橋 陽介 | |
| 審査委員 | 教 授 | 鈴木 克周 | |
| 審査委員 | 教 授 | 山口 富美夫 | |
| 審査委員 | 教 授 | 草場 信 | |
| 審査委員 | 教 授 | 坂本 敦 | |
| 〔論文審査の要旨〕 | | | |
| <p>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 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 (Ca^{2+}) 依存的な経路があるのではないかと考えられた。Ca^{2+} 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刺激を感知すると細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) 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 Ca^{2+} 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。</p> <p>GA 信号伝達においても Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 指示薬により $[Ca^{2+}]_{cyt}$ を測定すると、GA 投与後 5 時間で Ca^{2+} の上昇が起こると報告された。しかし、これは他の Ca^{2+} シグナリングに比べてあまりにも遅く、Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の上昇が DELLA と GID1 に依存するかを調べた。</p> <p>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 Ca^{2+} 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、$[Ca^{2+}]_{cyt}$ 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 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ が</p> | | | |

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⁺ チャネルを介するか調べるために Ca²⁺ チャネル阻害剤 (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 (RGA Δ17) の発現が誘導可能な形質転換体 (*GVG::TAP-RGA Δ17*) 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。RGA Δ17 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-RGA Δ17* 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。

本研究で見いだされた 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} の一過的上昇を担うチャネルの同定ができれば、Ca²⁺ を介する GA 信号伝達経路の解明に結び付くと期待される。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士（理学）の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

Okada, K., Ito, T., Fukazawa, J. and Takahashi, Y. (2017) Gibberellin induces an increase in cytosolic Ca²⁺ via a DELLA-independent signaling pathway. *Plant Physiol.* **175**, 1536-1542.

Ito, T., Okada, K., Fukazawa, J. and Takahashi, Y. (2018) DELLA-dependent and -independent gibberellin signaling. *Plant Signal Behav.* in press.