

主論文の内容の要旨

学位申請者 氏名	齋藤 彩	ローマ字 氏名	SAITO AYA
-------------	------	------------	-----------

論文題名

シロイヌナズナ ZEITLUPE による胚軸伸長制御機構の解明

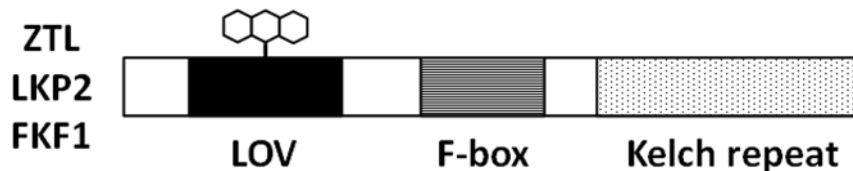
A study on the mechanism of ZEITLUPE regulated hypocotyl elongation
in *Arabidopsis thaliana*

内容の要旨

<序論>

植物の光形態形成反応は、光情報が光受容体によって受け取られ、その情報が化学情報に変換されて細胞内に伝えられることで誘起される。植物の光受容体には、主に赤色光、遠赤色光の受容に関与するフィトクロム、青色光の受容に関与するクリプトクロムやフォトトロピン、ZTL (ZEITLUPE) / LKP2 (LOV KELCH PROTEIN 2) / FKF1 (FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1) ファミリータンパク質などがある。

シロイヌナズナの ZTL、LKP2、FKF1 は、LOV ドメイン、Kelch リピート、F-box モチーフの3つの機能領域を有する青色光受容体 (図 1) で、SCF 複合体 (Skp1, Cullin1, F-box containing complex) の構成要素としてはたらき、標的タンパク質の青色光に依存したユビキチン化に関与するとされている。



<図 1> ZTL/LKP2/FKF1 ファミリータンパク質の構造

ZTL は胚軸伸長制御に関与することが報告されており、ZTL 過剰発現体は連続明条件下で長胚軸となり (Nelson et al. 2000)、T-DNA 挿入により機能が欠損した変異体 (*ztl* 変異体) は短胚軸となる (Miyazaki et al. 2015)。しかし、ZTL がどのようにして胚軸長を制御しているのかはまだ明らかにされていない部分も多い。本研究では、ZTL による胚軸伸長制御機構を明ら

かにすることを目的に実験を行った。

<結果・考察 1 *ZTL* 過剰発現体の遺伝子発現解析>

22°C・連続白色光下で8日間育てた野生型と *ZTL* 過剰発現体の実生から単離した RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、野生型と *ZTL* 過剰発現体の遺伝子発現について網羅的に調べた。*ZTL* 過剰発現体の2つのラインで共通して野生型よりも発現量が2倍以上に増加していた遺伝子は106個あり、1/2以下に減少していた遺伝子は146個あった。これらの遺伝子をクラスタリング解析すると、過剰発現体で発現量が増加していた遺伝子の中には、オーキシン応答性の遺伝子が20個含まれていた。3つのオーキシン応答性の遺伝子 (*SAUR22*, *SAUR23*, *IAA29*) について qRT-PCR で解析した結果、何れも野生型よりも過剰発現体の胚軸で発現量が有意に増加していることがわかった。これらのことから、過剰発現体の胚軸では、オーキシン含量が増加しているか、オーキシンに対する感受性が増加していることが示唆された。また、オーキシンの極性輸送を阻害する N-1-naphthylphthalamic acid (NPA)、オーキシンアンタゴニストの α -(phenyl ethyl-2-one)-indole-3-acetic acid (PEO-IAA)、オーキシン合成阻害剤 Yucasin を処理し胚軸長を測定した結果、いずれの阻害剤でも *ZTL* 過剰発現体と野生型の胚軸長の有意な差がなくなった。阻害剤を用いた実験によっても *ZTL* による胚軸伸長制御へのオーキシンの関与が確かめられた。

<結果・考察 2 *ztl* 変異体の遺伝子発現解析>

野生型と *ztl* 変異体の胚軸長の差は、22°Cよりも28°Cで顕著になる (Miyazaki et al. 2015)。そこで、28°C・連続白色光下で8日間育てた野生型と *ztl* 変異体の実生を用いて、DNA マイクロアレイ解析を行った。2つの *ztl* 変異体で共通して野生型よりも発現量が2倍以上に増加していた遺伝子は133個あり、1/2以下に減少していた遺伝子は199個あった。これらの遺伝子をクラスタリング解析すると、*ztl* 変異体で発現が減少していた遺伝子の中には、オーキシン応答性の遺伝子が16個含まれていた。これらのオーキシン応答性の遺伝子の中の3つ (*SAUR22*, *SAUR23*, *IAA29*) について qRT-PCR で解析し、何れも野生型よりも *ztl* 変異体の胚軸で発現量が有意に減少していることが分かった。また、*ztl* 変異体でも3種類のオーキシン阻害剤を加えた場合の胚軸長を調べ、いずれの処理区でも *ztl* 変異体と野生型の胚軸長に有意な差が認められなかったことから、*ZTL* による胚軸伸長制御へのオーキシンの関与が裏付けられた。

<結果・考察 3 *ztl* 変異体の部位別遺伝子発現解析

レポーター遺伝子を用いた解析及び遺伝学的解析>

オーキシンは特定の場所で合成され、合成されたオーキシンは極性輸送によって作用部位へ

運ばれることが知られている (Keuskamp et al. 2010; Kohnen et al. 2016)。実生の大部分は子葉であるため、これまでのマイクロアレイ解析では、主に子葉で発現が変化した遺伝子に注目している可能性がある。そこで、胚軸での遺伝子発現を詳細に調べるため、実生を胚軸と胚軸より上部にわけてマイクロアレイ解析を行った。

胚軸のマイクロアレイ解析において、2 つの *ztl* 変異体で共通して野生型よりも発現量が 2 倍以上に増加していた遺伝子は 638 個あり、1/2 以下に減少していた遺伝子は 1062 個あった。これらの遺伝子をクラスタリング解析すると、*ztl* 変異体で発現量が減少していた最も有意なクラスターは細胞壁修飾に関わるもので 14 個の遺伝子が含まれていた。しかし、実生のクラスタリング解析で上位にみられたオーキシン応答性遺伝子が、胚軸のクラスタリング解析ではみられなかった。一方、胚軸より上部のマイクロアレイ解析では、2 つの *ztl* 変異体で共通して野生型よりも発現量が 2 倍以上に増加していた遺伝子は 469 個あり、1/2 以下に減少していた遺伝子は 1038 個あった。これらの遺伝子をクラスタリング解析すると、*ztl* 変異体で発現量が減少していた最も有意なクラスターは、“Response to endogenous stimulus” であり、61 個の遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子の中には、16 個の *SAUR* と 7 個の *AUX/IAA* が含まれていた。続いて、2 番目に有意であったクラスターは、転写因子遺伝子 *PIF4*, *PIF5* が含まれていた。*PIF4*, *PIF5* は、オーキシン合成酵素遺伝子 *YUC8* の転写を促進することが知られている (Franklin et al. 2011; Sun et al. 2012; Hornitshek et al. 2012)。そこで、オーキシン合成酵素遺伝子に注目すると、胚軸より上部では、*TAR3*, *YUC3*, *YUC8*, *YUC9* の発現量が野生型よりも 2 つの変異体で 1/2 以下に減少していることが分かった。次にオーキシン合成酵素遺伝子やオーキシン応答性遺伝子の発現量が、*ztl* 変異体において減少していたことから、それらのプロモーター活性が低下している可能性を考え、2 種類のレポーター遺伝子 (*pYUC8:GUS*, *pDR5:GUS*) を用いて検証した。その結果、どちらのレポーター遺伝子でも *GUS* 遺伝子発現、および *GUS* 活性は野生型よりも *ztl* 変異体で低下していた。また野生型背景の *pYUC8:GUS* は子葉の先端で、*pDR5:GUS* は葉と胚軸で *GUS* の染色が見られたが、それらの染色は *ztl* 変異体ではみられなかった。これらのことから、*ztl* 変異体ではオーキシン合成酵素遺伝子とオーキシン応答性遺伝子のプロモーター活性が低下していることが示唆された。

続いて、*ztl* 変異体におけるオーキシン応答性遺伝子の発現を継時的に調べるため *pIAA19:ELuc-PEST* を用いた実験を行った。野生型と *ztl* 変異体との間で、ルシフェラーゼ活性の周期に有意な差はみられなかったが、振幅及びピーク値は一貫して *ztl* 変異体で減少していた。従って *ZTL* はオーキシン応答性遺伝子の発現周期ではなく発現量に影響を与えることが示唆された。

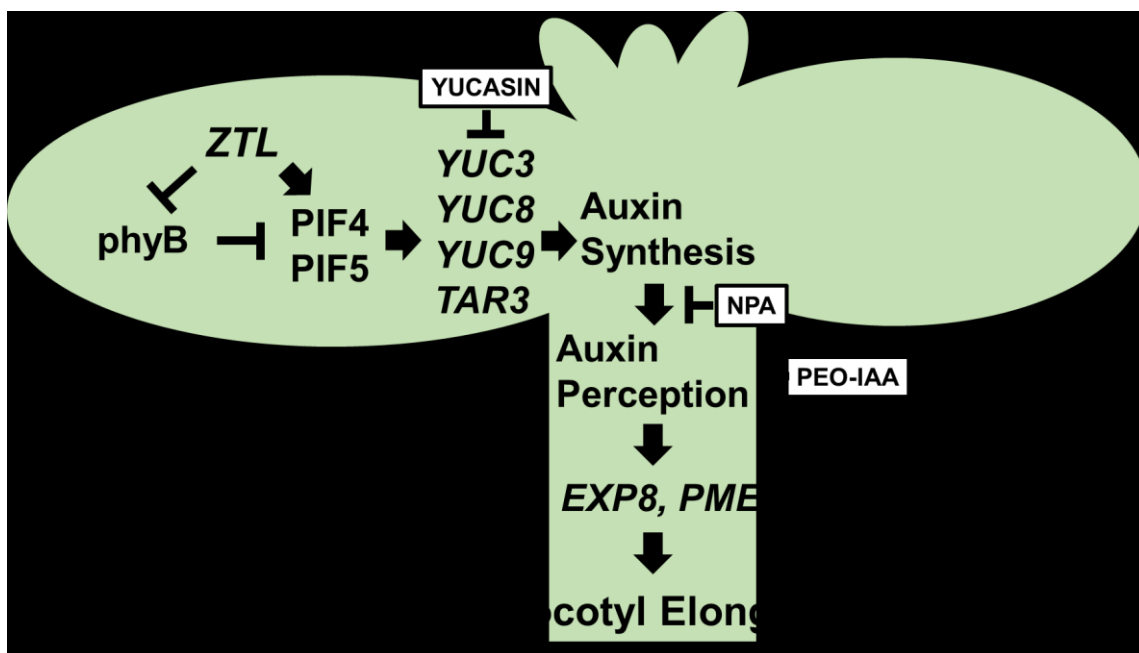
マイクロアレイ解析やレポーター遺伝子を用いた実験により、*ZTL* の下流で *PIF* や *YUC* が働いていることが示唆されたので、それらの遺伝学的な上下関係を調べた。*ztl* 変異体背景の *PIF4* 過剰発現体、*YUC8* 過剰発現体 (*ztl PIF4 ox*, *ztl YUC8 ox*) の胚軸長は、28°C・連続白色光下でそれぞれ野生型背景の *PIF4* 過剰発現体、*YUC8* 過剰発現体と同程度まで長胚軸を示した。このことは、*ZTL* の下流で *PIF4* や *YUC8* が働いていることを示している。

一方 *PIF4* の上流には、赤色光受容体 *phyB* が存在し、*PIF4*, *PIF5* の分解を促進することが

知られている (Lorrain et al. 2008)。ZTL も phyB も PIF4 の上流に存在するので、ZTL と phyB との関係性を調べるために *ztl phyb* を作出し、胚軸長を測定した。その結果、28°C・連続白色光下で *ztl phyb* は *phyb* 変異体と同程度まで長胚軸を示した。このことから、ZTL による胚軸伸長制御への phyB の関与が示された。

<まとめ>

これらの結果をまとめると、ZTL は、胚軸より上部において *PIF4*, *PIF5* の発現上昇を促し、*PIF4*, *PIF5* が *YUC8* 等のオーキシン合成酵素遺伝子の発現を上昇させることで、オーキシン合成を活性化させる。子葉で作られたオーキシンは、極性輸送によって胚軸に流れ、胚軸で細胞壁の伸展を誘導する酵素 *EXP8* 等の発現上昇を促し、胚軸伸長を促進するというモデルが考えられる (図 2)。



<図 2> モデル図