

氏名(本籍)	新沼協 (北海道)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第4683号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Studies on the Mechanisms Controlling Organ Elongation and Flowering by Circadian Clock through SVP and BZR1 in <i>Arabidopsis</i> (シロイヌナズナにおける SVP と BZR1 を介した概日時計による器官伸長および花成の制御機構に関する研究)
主査	筑波大学教授 理学博士 鎌田 博
副査	筑波大学教授 理学博士 白岩 善博
副査	筑波大学准教授 博士(理学) 森口 剛
副査	筑波大学教授 理学博士 佐藤 忍

論文の内容の要旨

あらゆる生物は、地球の自転や公転による昼夜や四季等の外部環境の周期的変化にさらされている。ほぼ全ての生物は自己体内に内因性の計時機構(概日時計)を持ち、このような環境変化に単に従属するのではなく、これを予測し、効率的に生存している。植物は他の生物と異なり、移動手段を持たず、環境に高度に適応し、光合成を有利に行うための優れた能力を持っている。一方、植物特有の現象である花成は栄養成長から生殖成長への発生プログラムの切り替えであり、適した時期に花成を誘導することは繁殖戦略上非常に重要である。

概日時計および器官伸長・形態形成のメカニズムは古くから研究され、それぞれに関わる多くの因子が見いだされている一方で、概日時計による器官伸長制御の機構は未解明である。また、光周性花成の制御機構についてはその一部が既に解明されている。所属研究室の先行研究において、シロイヌナズナの概日時計関連遺伝子 *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* および *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* 遺伝子の二重機能欠損変異体 *lhy;cca1* は、長日条件および短日条件下で早咲きであるにも関わらず、恒明条件下では遅咲きとなることが示されている。この花成遅延の抑圧因子として SVP (SHORT VEGETATIVE PHASE) と FLC (FLOWERING LOCUS C) が同定され、SVP と FLC は概日時計の制御下で花成に関わる可能性が生化学的解析からも支持されている。

概日時計による器官伸長および花成制御機構の解明をめざし、本研究では、1)「概日時計の中心因子 *lhy;cca1* 二重機能欠損変異体の器官長形質」、および、2)「概日時計の中心因子 *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 9 (PRR9)*, *PRR7*, *PRR5* 遺伝子の三重機能欠損変異体の器官長と花成形質」に着目し、遺伝学的・分子生物学的な手法を用いて研究を行った。

上記1)に関する研究では、*lhy;cca1* が短葉柄・短胚軸・暗緑色葉となること、さらに、*svp* 変異が *lhy;cca1* の恒明条件における花成異常だけでなく器官長異常も同時に抑圧すること、FLC 過剰発現体が短葉柄・短胚軸・暗緑色葉を示すことを見いだした。

1hy;cca1 の上述の器官形質は、植物ホルモンの一種であるブラシノステロイド (BR) 関連遺伝子の変異体と類似していることから、SVP と FLC が概日時計の器官長制御に関わり、さらに、これらは BR の経路に関わると予測された。BR はステロイド骨格を持つ一群の化合物で、茎の伸長や葉の拡大等において重要な役割を果たし、関連遺伝子の欠損変異体は矮化や花成遅延等を示す。また、BR 生合成量と BR 生合成関連遺伝子の一部はその発現が概日リズムを示す。SVP および FLC が BR の経路に関連することを調べるため、BR 生合成阻害剤 (ブラシナゾール: Brz) に対する感受性試験を行った。Brz に対して、SVP 過剰発現体は高感受性、*svp* 欠損変異体は低感受性であり、SVP が BR の経路に関連する可能性が示された。さらに、BR 関連因子と SVP は転写因子であり、核に移行することが報告されているため、BR シグナリング関連因子との Yeast two hybrid assay を行い、BR シグナリングの正の制御因子である BZR1 (BRASSINAZOLE-RESISTANT 1) が SVP と物理的に相互作用することを明らかにした。BZR1 は BR 応答性遺伝子群の発現を調節する転写因子であり、一部の BR 生合成遺伝子のプロモーターに直接結合し、BR 生合成のフィードバック制御も行う。SVP は、先行研究により、CCA1 や ELF3 との結合を介して概日時計の制御下にあることが想定されており、また、BZR1 も概日時計による BR 量の制御を介して概日時計の制御下にある。*svp* 変異体、SVP 過剰発現体、*bzr1-1D* 機能活性型変異体、*1hy;cca1* 変異体の器官長形質は、SVP と BZR1 がその結合によって互いを抑制すると考えると説明可能である。本研究は、「SVP と BZR1 を介した概日時計による器官伸長および花成制御機構モデル」を提案しており、このモデルは変異体の器官伸長および花成の表現形質を説明するものである。

生物が光周性を維持するためには、異なる光周期 (長日, 短日, 恒明条件等) に正しく反応する必要がある。*1hy;cca1* で見られる明暗条件 (長日および短日) と恒明条件での花成形質の逆転のように、ある遺伝子の欠損変異体の表現型が異なる光周期下で逆転する場合、その遺伝子はその光周期下で光周性を維持するために重要な役割を果たしていると考えられる。上記研究 2) では、概日時計関連因子変異体が生ずる異なる光周期間での逆転形質に着目し、概日時計中心因子 *PRR9*, *PRR7*, *PRR5* の単独および多重欠損変異体を用いて解析を行った。特に、*prp9;prp7;prp5* 変異体は *1hy;cca1* と同様、概日リズムを消失することが分かっており、これに着目した。

prp9;prp7;prp5 変異体では、長日条件でも恒明条件でも遅咲きとなり、花成形質の逆転は概日リズムの消失とは関連しないことが示された。器官伸長について調べたところ、*prp9;prp7;prp5* だけが明暗周期下と恒明条件下で異なる胚軸・葉柄長の形質を示し、恒明条件下でのみ野生型に比べて長胚軸でありながら短葉柄となるユニークな形質を持つことを見いだした。また、*prp9;prp7;prp5* 葉柄の細胞は野生型に比べて短く、胚軸の細胞は長くなっており、*prp9;prp7;prp5* が恒明条件下で示す胚軸/葉柄長の逆転は、細胞長の逆転によるものであることが示された。一般的に、概日時計による器官伸長の制御はどの器官でも同様に行われていると考えられている。その理由の一つとして、器官間で逆の伸長形質が見られる変異体が確認されていなかったことが挙げられる。本研究は、胚軸と葉柄は同じ伸長器官でありながら、概日時計によって別の伸長制御を受けることを示した初めての事例である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、モデル植物であるシロイヌナズナを研究材料とし、個体サイズ制御に関する分子メカニズムの一端を明らかにしたものである。シロイヌナズナの概日リズム変異体 *1hy;cca1* を恒明条件下で栽培し、詳細な形態観察を行い、1) *1hy;cca1* の変異形質 (短胚軸長, 短葉柄長, 濃緑色・湾曲葉) がブラシノステロイド (BR) 生合成経路の不全あるいは非感受性による変異形質と類似していたこと、2) MADS box 型転写制御因子 SVP の変異が *1hy;cca1* の変異形質を抑圧したことから、「SVP が概日時計因子の制御下で、BR 情報

伝達系を介して器官伸長を制御する」というモデルの着想に至った。そこで、BR 生合成阻害剤 Brz に対する反応性試験を行い、*svp* 変異体および SVP 過剰発現体がそれぞれ低感受性、高感受性であることを示した。また、既に報告されている BR 情報伝達系因子と SVP との物理的相互作用の有無を、Yeast two-hybrid 法によって検討し、BR 経路の正の転写制御因子である BZR1 と SVP の間にタンパク質間相互作用があることを実証した。花成制御因子としての機能のみが報告されていた SVP について、BR 情報伝達系を介した器官伸長への関与、さらにはその作用点を明らかにした点は高く評価できる。*prp9;prp7;prp5* では *1hy;cca1* とは異なる機構で外部環境に応答して器官長制御がなされていることも示した。本研究は、概日時計因子による器官伸長制御機構の一端をはじめて明らかにしたものであり、生物の個体サイズ制御の分子基盤を明らかにする上で極めて重要な知見を与えるものである。

以上のように、概日時計因子による葉柄長・胚軸長制御において、ブラシノステロイド情報伝達系を介した制御機構が存在することを明らかにした本研究は、植物における器官伸長制御機構を解明する上で重要な基礎的知見を提供するものであり、関連分野の研究の発展に多大な貢献をするものと強く期待される。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。