T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報 Article / Book Information

題目(和文)	ジャスモン酸類に早期応答する遺伝子JAM1,2,3 とGTR1 の機能に関す る研究
Title(English)	
著者(和文)	斉藤洸
Author(English)	Hikaru Saitou
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9726号, 授与年月日:2015年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:太田 啓之,駒田 雅之,中村 信大,久堀 徹,増田 真二
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9726号, Conferred date:2015/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
 学位種別(和文)	
Type(English)	Doctoral Thesis

平成26年度 博士論文

ジャスモン酸類に早期応答する遺伝子 JAM1, 2, 3 と GTR1の機能に関する研究

斉藤洸

指導教員 太田啓之

副指導教員 增田真二

目次

第1章 序論

1.1	序;本研究の背景	1
1.2	ジャスモン酸類の構造と生合成経路	1
1.3	ジャスモン酸類の生理作用	5
1.4	ジャスモン酸類による遺伝子発現誘導とその情報伝達	6

第2章	ジャスモン酸情報伝達を負に制御する bHLH 型転写因子と
	JAZ ファミリータンパク質の相互作用

2.1 序		9
2.2 実験材	料と方法	
2.2.1	酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニング	10
2.2.2	酵母ツーハイブリッドアッセイ	10
2.2.3	JAM1、JAM2、JAM3、MYC2、MYC3、MYC4の	
	アミノ酸配列アラインメント作成	11
2.2.4	GeneChip dataの統計学的解析	11
2.2.5	定量RT-PCR解析	11
2.3 結果		
2.3.1	J AM転写因子と相互作用する因子の特定	14
2.3.2	<i>j am×3</i> 変異体におけるJAZ遺伝子の発現解析	17

第3章 ジャスモン酸応答性 NPF タンパク質 GTR1 による ジャスモン酸情報伝達の制御

3.1 序		19
3.2 実験标	材料と方法	
3.2.1	定量RT-PCR	20
3.2.2	T−DNA挿入変異体の遺伝型決定と発現解析	21
3.2.3	植物体育成条件	22
3.2.4	GUSレポーターによる局在解析	23
3.2.5	<i>in vitro</i> における花粉の発芽実験	24
3.3 結果		
3.3.1	GTR1の特定	24
3.3.2	GTR1のジャスモン酸応答性と変異体でのジャスモン酸関連	
	遺伝子の発現	28
3.3.3	<i>g t r</i> 1 変異体のジャスモン酸感受性	33
3.3.4	g t r 1 変異体における雄ずいの発達	35

第4章 ジャスモン酸応答性 NPF タンパク質 GTR1 による 雄ずい発達の制御

4 1 臣		20
4.1 厅		39
4.2 実際	険材料と方法	
4.2.	1 定量RT-PCR	40
4.2.	2 試薬	41
4.2.	3 植物体育成条件	41
4.2.	4 GUSレポーターによる局在解析	41
4.2.	5 アフリカツメガエル卵母細胞を用いたGTR1の	
	輸送活性測定	42
4.2.	6 EGFP結合タンパク質を用いたGTR1の細胞内局在解析	43
4.2.	7 植物ホルモン含量の定量	43
4.3 結果	果	
4.3.	1 GTR1によるジャスモン酸イソロイシンとジベレリンの輸送	44
4.3.	2 g t r 1 の 稔性低下 に 対 す る ジ ベ レ リ ン 処 理 の 効 果	50
4.3.	3 GTR1のジベレリン類に対する特異性とジベレリン-ジャスモン酸	夋
	情報伝達のクロストークにおける意義	54

ii

第5章 結論と展望	57
文献	73
報文目録	84
謝辞	85

目次

第1章 序論

1.1 序; 本研究の背景

ジャスモン酸(jasmonic acid:JA)は幅広い生理活性を持つ植物ホルモンの一つ である。そのメチルエステルであるメチルジャスモン酸(methyl jasmonate:MeJA) が花の香り成分として古くから知られていたが、1980年前後の研究によって植物か ら単離したジャスモン酸が植物の生育を阻害する作用や老化を促進する作用を持つ 事が明らかになった (Ueda and Kato, 1980)。その後ジャスモン酸合成経路の解析 が進み(Vick and Zimmerman, 1983)、またJA 構造類縁体であるチュベロン酸 (tuberonic acid: TA)がジャガイモの塊茎形成誘導物質として同定された (Yoshihara et al., 1989; Pelacho and Mingo-Castel, 1991)。さらに、JA がストレ スや病傷害応答にも寄与する事が明らかになるなど(Mason and Mullet, 1990; Farmer and Ryan, 1992)、急速に研究が進んだ。加えて、シロイヌナズナにおいて ジャスモン酸が稔性に必須のホルモンである事が明らかになり(McConn and Browse, 1996)、また発芽初期の植物体中の細胞分裂が盛んな部分や花芽でのジャ スモン酸類の濃度が高い事から(Ishiguro et al., 2001)、ストレス応答シグナルだ けでなく形態形成に必須の因子として広く認識されるようになった。

1.2 ジャスモン酸類の構造と生合成経路

ジャスモン酸は 5 員環ケトンを持ち、2つの炭素鎖の立体的な配置によって cis 型((+)-7-イソジャスモン酸)と trans 型((-)-ジャスモン酸)が存在する(図1-2-1)。近年の研究により JA とイソロイシンのアミド結合体ジャスモン酸イソロイ シン (JA-Ile)のうち、ジアステレオマー((+)-7-イソジャスモン酸イソロイシン) が真の活性型誘導体である事が明らかとなった(Fonseca et al., 2009)。また、(+)-7-イソジャスモン酸イソロイシンの12位が水酸化された12-オキソジャスモン酸イソ ロイシンがジャスモン酸イソロイシンの不活性型である事も示された(Koo et al., 2011)。ジャスモン酸(ソロイシンの不活性型である事も示された(Koo et al., 2011)。ジャスモン酸の cis 型は不安定であり、溶液中では容易に trans 型に転換 すると言われている。一方、(+)-7-イソジャスモン酸と同じ立体配置をもった生合成 前駆体 12-オキソフィトジエン酸(12-oxo-phytodienoic acid: OPDA)が有機合成 されているが、この化合物は室温でも1ヵ月以上安定である(Ainai et al., 2003)。 植物にはジャスモン酸やメチルジャスモン酸、ジャスモン酸イソロイシン、OPDA 以外にも様々な類縁化合物が存在する事が知られている(図1-2-1)。また、近 年の研究から植物中に存在するジャスモン酸の種々の構造類縁体がジャスモン酸と は異なる機能を持つ事も明らかになってきた(Gidda et al., 2003; Staswick and Tiryaki, 2004)。

ジャスモン酸は葉緑体の膜に多量に存在するリノレン酸より合成される。葉緑体 膜から切り出されたリノレン酸はリポキシゲナーゼにより過酸化されアレンオキシ ド合成酵素、アレンオキシドシクラーゼの作用によって 5 員環が形成され OPDA が合成される。葉緑体で合成された OPDA はペルオキシソームに運搬され、OPR3 による還元と3回の8酸化を経てジャスモン酸が生成される。ジャスモン酸はメチ ル化酵素 JMT によってメチルジャスモン酸へ、JAR1 によって生理活性型であるジ ャスモン酸イソロイシンに変換されるなど様々なジャスモン酸類が生成される (Acosta et al., 2010) (図1-2-2)。



図1-2-1 ジャスモン酸類の構造

(太田啓之・関本(佐々木)結子 植物ホルモンの分子生物学 2006年 より引用)



1.3 ジャスモン酸の生理作用

通常、ジャスモン酸やメチルジャスモン酸は植物中に生重量 1g あたり 0.01-3.0µg 程度存在するが、傷害、菌の感染、水欠乏、オゾン暴露などのストレスにさらされ ると内在量が数倍から数十倍に一過的に増大する。傷害応答でのジャスモン酸の役 割については多くの事が分かっているが、近年病原菌に対する防御応答での重要性 に関しても研究が進展してきた。害虫、草食動物の攻撃、ときには他の植物との接 触によって生じる傷害により JA の生合成が活性化され、害虫による摂食を押さえ るためのプロテアーゼインヒビターや病原菌の感染を防ぐための様々な塩基性感染 特異的タンパク質が全身的に誘導される。シロイヌナズナでは JA が直接誘導され て全身にシグナルが伝わると考えられてきたが、最近の研究によりグルタミン酸受 容体様タンパク質を介して電気信号を伝達し、傷害部位から離れた部位でも JA 合 成を誘導し全身的な抵抗性獲得に寄与する事が分かった(Mousavi et al., 2013)。

一方、病害応答において JA は基礎抵抗性に機能して、植物細胞を殺傷すること によって増殖する病原菌に対する抵抗性発現で働いていると考えられている

(McDowell & Dangl, 2000; Pozo et al., 2004)。JA 関連変異株を用いた研究では、 生合成欠損株である *jar1 や fad3fad7fad8*では本来は病原性の無い *Pythium*の感染 が認められ (Staswick et al., 1998)、同じく JA 受容体に変異を持つ *coi1* でも *Erwinia carotovora、Altanaria brassicola、Botrytis cinerea*の羅病性が促進され ていた (Norman-Setterblad, C. et al., 2000; Thomma, B. P. et al., 1998)。また、 JA シグナルが常に活性化されている *cev1* 変異株ではさまざまな病原菌に対する抵 抗性が増強されていた (Ellis, C. et al., 2002)。しかし、一方では JA シグナルに欠 損を持つ*coi1、mpk4*変異株では *Pseudomonas syringae*の羅病性が減少している。 これは *P. syringae* が産生するコロナチンがジャスモン酸イソロイシンを模した毒 素であり、コロナチンは JA 経路を通じて作用しホスト植物を侵食することが示唆 されている。傷害応答の活性化は病原菌に対する防御を犠牲にすると考えられ、JA 傷害応答経路が活性化されると *P. syringae* はホストの免疫システムからの攻撃を かわすことができ、より効果的に感染することができる (Zhao, Y. et al., 2003)。

ジャスモン酸は花器官の形成にも不可欠な役割を果たしている事が知られている。 ジャスモン酸生合成ができない変異体 *aos や opr3* は雄性不稔であり、花器官への ジャスモン酸処理によって稔性は回復する(Stintzi et al., 2000; Park et al., 2002)。 実際、ジャスモン酸類は開花前後の特定のステージにおいて、雄ずいの花糸形成、 葯の裂開、花粉の成熟を制御する(Thines et al., 2013)。

病傷害応答、花器官の形成以外にもジャスモン酸にはトリコームの分化(Qi et al., 2011)、クロロフィル分解(Tsuchiya et al., 1999; Almeida et al., 2014)、老化(Jiang

et al., 2014) 、酸化ストレスの抑制(Sasaki-Sekimoto et al., 2005)など幅広い生理 作用が知られている。

1. 4 ジャスモン酸類による遺伝子発現誘導とその情報伝達

植物が病原菌感染等による生物学的なストレス、もしくは傷害、昆虫による食害 等による物理的なストレスを受けるとジャスモン酸の生合成が活性化される (Wasternack, 2007; Gfeller et al., 2010)。 蓄積したジャスモン酸から jasmonoyl-l-isoleucine (JA-Ile)が生成され、受容体である CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1)-JASMONATE ZIM DOMAIN (JAZ)複合体に認識される (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Sheard et al., 2010)。その後、SCF-type E3 ユビキチンリガーゼ複合体(SCF^{COII})によって JAZ ファミリータンパク質はポリユ ビキチン化され、26S プロテアソームを介した経路によって分解される(Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Staswick, 2008)。ジャスモン酸情報伝達を制御する中心 的な basic helix-loop-helix (bHLH)型転写因子である MYC2 は普段 JAZ ファミリ ータンパク質と相互作用する事でその転写活性を抑制されている。ジャスモン酸イ ソロイシンが引き金となって JAZ ファミリータンパク質が分解される事で MYC2 はその転写活性によって下流の遺伝子発現を調節する (Lorenzo et al., 2004, Chico et al., 2008; Katsir et al., 2008) (図 1-4)。MYC2 ホモログである MYC3、MYC4 はともに JAZ のターゲット因子であり、MYC2 の機能を相乗的に制御することが 知られている。これら bHLH 型転写因子は *VSP2* と *PDF1.2* の 2 つのジャスモン 酸誘導性の遺伝子発現パターンを異なる形で制御する事が知られている(Lorenzo et al., 2004; Fernandez-Calvo et al., 2011; Niu et al., 2011). MYC2 $\bowtie PDF1.2 \bigcirc$ 発現を負に制御するが、VSP2の発現は正に制御する(Lorenzo et al., 2004)。MYC2 は VSP2 発現の正の制御因子である ANAC019 のプロモーター領域に直接結合す る(Bu et al., 2008; Zheng et al., 2012)。逆に、PDF1.2の発現は ERF1 とそのホモ ログである ORA59によって正に制御されるが、それら遺伝子の発現は MYC2によ って負に制御される(Solano et al., 1998; Dombrecht et al., 2007; Pre et al., 2008; Zarei et al., 2011)。さらに、佐々木らはジャスモン酸応答性遺伝子の発現プロファ イルを用いた遺伝子ネットワーク解析を用いて MYC2 ホモログであり、各ジャスモ ン酸応答性遺伝子と共発現する bHLH 型転写因子 JASMONATE ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1)、JAM2、JAM3 を特定した (Sasaki-Sekimoto et al., 2013)。 そして、jam1jam2jam3三重変異体が myc2とは異なり、ジャスモン酸応答が促進 されている事を発見した。さらに、jam1jam2jam3の変異が myc2の表現型を弱め ることが明らかとなった。このことから、これら JAM 転写因子は MYC2のジャス

モン酸情報伝達における機能の負の制御因子である事が示唆された (Sasaki-Sekimoto et al., 2013; Nakata et al., 2013 A)。しかし、これらJAM 転 写因子が作用する分子機構の詳細は未だ不明であった。そこで、私はJAM 転写因 子がJAZ ファミリータンパク質の直接の相互作用因子と予想し、JAM-JAZ 間のタ ンパク質間相互作用解析を行ったので第2章にその詳細を記述した。また、ジャス モン酸に早期応答する遺伝子の解析がジャスモン酸情報伝達の解明に有効であるこ とが明らかとなったので、ジャスモン酸早期応答性遺伝子として新たに *GTR1* に着 目し、その機能を明らかにした。その成果を第3章、第4章で述べる。



図1-4 ジャスモン酸情報伝達の模式図

MYC2 は普段 JAZ ファミリータンパク質によってその転写活性を抑制されている。ジャスモン酸イソロイシンの受容が引き金となって JAZ ファミリータンパク質がポリユビキチン化され、26S プロテアソームによって分解される事で MYC2 はその転写活性によって下流の遺伝子発現を調節する。

8

第2章 ジャスモン酸情報伝達を負に制御する

bHLH型転写因子とJAZファミリータンパク質の

相互作用

2.1 序

ジャスモン酸類の生合成は傷害や病原菌の感染、昆虫による食害といった外的な刺激によって早期に活性化される(Schilmiller et al., 2005; Browse et al., 2008; Browse et al., 2009)。これらストレスや外生のジャスモン酸処理は互いに似た組み合わせのジャスモン酸応答性遺伝子の発現を誘導する事が知られている。これら遺伝子セットには防御関連代謝に関わる遺伝子が含まれる(Sasaki et al., 2001; Devoto et al., 2005; Sasaki-Sekimoto et al., 2005; Taki et al., 2005; Dombrecht et al., 2007; Pauwels et al., 2008)。

ジャスモン酸イソロイシンはジャスモン酸類の生理活性型であり (Wasternacl et al., 2007; Gfeller et al., 2010)、その受容体であるCOI1 とJAZファミリータンパク質間の相互作用を促進する。そして、JAZ ファ ミリータンパク質はポリユビキチン化され、26Sプロテアソームによって 分解される(Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Staswick, 2008)。 MYC2とそれに非常に近いホモログであるMYC3やMYC4はジャスモン酸 情報伝達における中心的な転写調節因子であり、JAZファミリータンパク 質と相互作用する事によってその機能は負に制御されている。JAZが分解 される事によってMYC2転写因子の転写抑制が解除され、下流のジャスモ ン酸応答性遺伝子の転写が活性化される (Lorenzo et al., 2004; Chico et al., 2008; Katsir et al., 2008; Fernandez et al., 2011; Cheng et al., 2011; Niu et al., 2011)。MYC2やMYC3のN末端部位とJAZファミリータンパク 質が相互作用する事が知られているFernandez et al., 2011)。加えてMYC 転写因子はホモ、もしくはヘテロダイマーを形成することから(Fernandez et al., 2011)、これら転写因子間の相互作用はジャスモン酸情報伝達経路 において重要な役割を担っている事が示唆される。

佐々木らや中田らの研究により、JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE 1 (JAM1)とJAM2、JAM3はいずれもMYC2ホモログであり、これら転写因子

9

が重複してジャスモン酸情報伝達を負に制御する事が明らかとなった。 jam1jam3jam3三重変異体 $(jam\times3)$ はジャスモン酸類に対する応答が促進 され、さらにJAMはホモ、もしくはヘテロダイマーを形成し、それぞれ抑 制活性を持つ(Sasaki-Sekimoto et al., 2013; Song et al., 2013; Nakata et al., 2013 A; Nakata et al., 2013 B)。

本研究ではJAM1が相互作用する因子のスクリーニングを行い、 さらに JAM1 とJAM2は複数のJAZと相互作用するが、JAM3はいずれのJAZとも 相互作用しないことを明らかにした。以上の結果からJAZがJAM1とJAM2 転写因子の制御因子であると示唆された。

2.2 材料と方法

2.2.1 酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニング

JAMをコードした塩基配列をPrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa, R010A)とGatewayに適合したプライマーを用いてPCRによって増幅した (表 2-2-1)。PCR産物をpDONR/Zeo へGateway BP Clonase II enzyme mix (Invitrogen)を用いてクローニングし、シーケンシングによって配列 を確認した。JAM1の配列を低コピー数の酵母発現用ベクターpDEST32 (GAL4 DNA binding domain [BD]を含む)へGateway LR Clonase enzyme mix (Invitrogen)を用いて組み込み、シーケンシングを行って配列を確認 した。pDEST32-JAM1プラスミドを酵母株AH109へ形質転換した。プレイ としてcDNAライブラリMate and Plate Library - Universal Arabidopsis (Clontech, 630487)を用意し、プラスミドpGADT7-Recを酵母株Y187へ形 質転換した。形質転換したAH109とY187をそれぞれ培養し、混合したのち に、45 mlの2×YPDA中で30 \mathbb{C} 一晩培養した。培養した酵母を4日間 His、 Leu、Trp、adenine (Ade)を除いたSD培地上で培養した。JAM1の相互作 用因子としての候補である陽性コロニーを単離し、遺伝子配列を解析した。

2.2.2 酵母ツーハイブリッドアッセイ

bHLH型転写因子(JAM1、JAM2、JAM3、MYC2)とN末端もしくはC 末端を削除したJAM1、12の完全長のJAZをコードしたcDNAクローンを PrimeSTAR HS DNA Polymeraseと Gateway-compatible primers (BP Gateway cloning、表 2-2-1)を用いて増幅した。これらcDNAクローン を酵母発現用低コピー数ベクターであるpDEST22 (Gal4 activation domain [AD]を含む)とpDEST32にクローニングした。JAM1を削除したコ ンストラクトはpDEST32にクローニングした。全てのコンストラクトの配 列をシーケンシングによって確定した。タンパク質間相互作用を解析する ために、これらプラスミドをSaccharomyces cerevisiae AH109へ標準的 なヒートショック法を用いて形質転換した(Chini et al., 2009)。形質転換 したコロニーをSD-Leu、Trp培地上で3日間育成した。その後、5 mM 3-aminotriazole を加えたSD-Leu、-Trp、-His培地上でコロニーを4日間 培養する事でタンパク質間相互作用を解析した。pDEST22とpDEST32の 空ベクターをネガティブコントロールとして用いた。

2.2.3 JAM1、JAM2、JAM3、MYC2、MYC3、MYC4のアミノ酸配列アラインメント作成

JAM1とその関連bHLH転写因子のアミノ酸配列をClustalW program (http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/)(Thompson et al., 1994) を用いてアライ ンメントした。GeneDoc ver 2.7 (http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/)を用 いて共通、もしくは類似のアミノ酸配列をそれぞれ黒と灰色の四角で表わ した。 核局在シグナルはcNLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio. ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)(Kosu-gi et al., 2009)を用いて予測 した。

2.2.4 GeneChip dataの統計学的解析

GeneChip dataから、それぞれWTのMJ (MeJA)/mock ratioとjam×3、 mockもしくはMeJA処理の jam×3/WT ratioについてJAZ11を除いたすべ てのJAZの値で正規化した(Sasaki-Sekimoto et al., 2013)。そして、正規 化したデータに対してTukey-Kramersの多重検定を行い、p値を算出した。

2.2.5 定量RT-PCR解析

発芽後 7 日のシロイヌナズナ植物体から RNA を抽出した (Sasaki-Sekimoto et al., 2013)。ReverTra Ace qRT-PCR RT Master Mix (TOYOBO, FSQ-201)を用いて cDNA を合成し、定量 RT-PCR の鋳型とし て用いた。THUNDERBIRD SYBR qRT-PCR Mix (TOYOBO, QPS-201)を 用いてメーカー指定のプロトコルに従った。*ACTIN2*と *JAZ1*の遺伝子特 異的プライマー配列は表 2-2-1 に示す。

表 2-2-1 定量RT-PCRに使用したプライマーの配列

(Sasaki-Sekimoto et al., 2014)

Primer	Sequence (5'-3')
For BP Gateway cloning:	
JAM1 F	AAAAAGCAGGCTTGAATATGAGTGATTTA
JAM1 R	AGAAAGCTGGGTATATATCACCAGAGACC
JAM1 AN F	AAAAAGCAGGCTGCGGTCCTGGGAGGTG
JAM1 AN R	AGAAAGCTGGGTATATATCACCAGAGACC
JAM1 AC F	AAAAAGCAGGCTTGAATATGAGTGATTTA
JAM1 AC R	AGAAAGCTGGGTGTGTGTAACCAAATGTTGG
JAM2 F	AAAAAGCAGGCTTGAATATTGGTCGCCTAGT
JAM2 R	AGAAAGCTGGGTATCTACCTGATGATGTTCTT
JAM3 F	AAAAAGCAGGCTTGGGTCAAAAGTTTTGGGA
JAM3 R	AGAAAGCTGGGTACTGTGATAGAGAGGCAAG
MYC2 F	AAAAAGCAGGCTTGACTGATTACCGGCTAC
MYC2 R	AGAAAGCTGGGTAACCGATTTTTGAAATCAAAC
JAZ1 F	AAAAAGCAGGCTTGTCGAGTTCTATGGAATGT
JAZ1 R	AGAAAGCTGGGTATATTTCAGCTGCTAAACCG
JAZ2 F	AAAAAGCAGGCTTGTCGAGTTTTTCTGCCGA
JAZ2 R	AGAAAGCTGGGTACCGTGAACTGAGCCAAG
JAZ3 F	AAAAAGCAGGCTTGTCATCACTTCTCTATATC
JAZ3 R	AGAAAGCTGGGTAGTATGCTCTTTTGAACATAA
JAZ4 F	AAAAAGCAGGCTTGGATTGGTCATTCTCAAG
JAZ4 R	AGAAAGCTGGGTAGTGCAGATGATGAGCTG
JAZ5 F	AAAAAGCAGGCTTGTCGTCGAGCAATGAAAAT
JAZ5 R	AGAAAGCTGGGTATAGCCTTAGATCGAGATC
JAZ6 F	AAAAAGCAGGCTTGTCAACGGGACAAGCG
JAZ6 R	AGAAAGCTGGGTAAAGCTTGAGTTCAAGGTTT
JAZ7 F	AAAAAGCAGGCTTGATCATCATCATCAAAAACT
JAZ7 R	AGAAAGCTGGGTATCGGTAACGGTGGTAAG
JAZ8 F	AAAAAGCAGGCTTGAAGCTACAGCAAAATTGT
JAZ8 R	AGAAAGCTGGGTATCGTCGTGAATGGTACG
JAZ9 F	AAAAAGCAGGCTTGGAAAGAGATTTTCTGGG
JAZ9 R	AGAAAGCTGGGTTAAGCCTCTCTTTGCGCTT
JAZ10 F	AAAAAGCAGGCTTGTCGAAAGCTACCATAGAA
JAZ10 R	AGAAAGCTGGGTATGTCACAATGGGGCTGG
JAZ11 F	AAAAAGCAGGCTTGGCTGAGGTAAACGGAG
JAZ11 R	AGAAAGCTGGGTATGTCACAATGGGGCTGG
JAZ12 F	AAAAAGCAGGCTTGACTAAGGTGAAAGATGAG
JAZ12 R	AGAAAGCTGGGTAAGCAGTTGGAAATTCCTC
For gRT-PCR analysis:	
ACTIN2 F	AGTGGTCGTACAACCGGTATTGT
ACTIN2 R	GATGGCATGAGGAAGAGAGAAAC
JAZ1 F	GAGCAAAGGCACCGCTAATA
JAZ1 R	TGCGATAGTAGCGATGTTGC

2.3 結果

2.3.1 JAM転写因子と相互作用する因子の特定

JAM1をベイトとし、酵母ツーハイブリッド法を用いた相互作用因子の スクリーニングを行った。その結果12の陽性クローンが得られたので、そ れぞれの遺伝子配列を特定した。12の陽性クローンの内、10がJAZファミ リータンパク質であった。JAZ1 (At1g19180、2クローン)、JAZ2 (At1g74950)、JAZ3 (At3g17860、4クローン)、JAZ9 (At1g70700)、JAZ10 (At5g13220)、JAZ12 (At5g20900)の他に、JAM3とHY1 (heme oxygenase、 At2g26670)が得られた。JAM1が特異的にその他のJAZと相互作用するか どうかを調べるために酵母ツーハイブリッド法を用いてすべての組み合わ せでJAM1とJAZファミリータンパク質の相互作用解析を行った。さらに、 JAM2、JAM3に関しても同様にすべてのJAZとの相互作用を解析した。 BD-JAM1から BD-JAM3 、BD-MYC2をベイトとし、AD-JAZ1から AD-JAZ12 をプレイとした。加えて、逆の組み合わせ(BD-JAZ をベイト とし、AD-bHLH型転写因子をプレイとした)についても解析を行った(図 2-3-1A, B)。その結果、JAM1はJAZ3とJAZ12、JAM2はJAZ12と両 方の組み合わせで相互作用した。JAM3はこの実験系ではいずれのJAZとも 相互作用しなかった(図2-3-1)。先行研究の通り、MYC2はJAZ4を除 いて複数のJAZファミリータンパク質と相互作用した(Fernandez et al., 2011; Chini et al., 2009) (図 2-3-1)。次に、JAM1と12のJAZとの間 の相互作用を定量するために、これらタンパク質を発現させた細胞懸濁液 の B-galactosidase活性を測定した。細胞懸濁液における B-galactosidase 活性はBD-JAM1とAD-JAZ3の組み合わせで検出され(図 2 - 3 - 1 C)、さら にBD-JAZ1、-JAZ3、-JAZ9とAD-JAM1の組み合わせでも検出され(図 2-3-1D)、これら組み合わせにおいて酵母の系で相互作用がみられる事が 分かった。次にJAM1のN末端部位、もしくはC末端部位を部分的に削除し たコンストラクトを作成し、完全長JAZ3との相互作用を解析した。その結 果、JAM1ΔCとJAZ3は相互作用が見られたが、JAM1ΔNとJAZ3との間に は相互作用が無かった事からJAM1とJAZ3が相互作用するにはJAM1のN 末端部位が必要である事が分かった(図2-3-1E)。この結果は、MYC2、 MYC3とJAZの相互作用にはMYC転写因子のN末端部位が必要であるとの 報告と一致する(Fernandez et al., 2011)。

for the second	~	ه جارب
<u> </u>	• >	
	1.	
~1.7	_	

A	١
В	D

BD		JAZ1	JAZ2	JAZ3	JAZ4	JAZ5	JAZ6	JAZ7	JAZ8	JAZ9	JAZ10	JAZ11	JAZ12
	MYC2	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	-
	JAM1	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	JAM2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	JAM3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

B BD													
		JAZ1	JAZ2	JAZ3	JAZ4	JAZ5	JAZ6	JAZ7	JAZ8	JAZ9	JAZ10	JAZ11	JAZ12
AD	MYC2	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	JAM1	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
	JAM2	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
	JAM3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-







図2-3-1; bHLH型転写因子とJAZファミリータンパク質間の相互作用 を酵母ツーハイブリッド法を用いて解析した結果の概要を示す。

A: bHLH型転写因子をベイトとし、JAZファミリータンパク質をプレイと した結果。

B: JAZファミリータンパク質をベイトとし、bHLH型転写因子をプレイとした結果。

ADはDNA活性ドメイン、BDはDNA結合ドメインを示す。コロニー形成数 を指標に相互作用の強さを強(+++)、中(++)、弱(+)、非検出(-)とした。 C, D: o-nitrophenyl-B-d-galactopyranose を基質としてB-galactosidase 活性を測定し、JAMとJAZの相互作用を解析した(±SD、n=3)。 E: N末端領域もしくはC末端領域を削除したJAM1と完全長 JAZ3の相互 作用を解析した。

F: JAM1、JAM2、JAM3、MYC2、MYC3、MYC4のアミノ酸配列のアライ ンメント。共通したアミノ酸と類縁アミノ酸は黒と灰色の四角で表わされ ている。赤い四角は核局在のシグナル配列を示す。オレンジの線はMYC2、 MYC3のJAZとの相互作用部位を示す(Fernandez-Calvo et al., 2011)。水 色の線はJAZ相互作用ドメインの保存された配列を示す。これはJAM3のみ 保存されていなかった。

(Sasaki-Sekimoto et al., 2014)

2.3.2 *jam*×3変異体におけるJAZ遺伝子の発現解析

JAM転写因子はジャスモン酸応答性遺伝子を負に制御することから (Sasaki-Sekimoto et al., 2013; Song et al., 2013; Nakata et al., 2013)、 JAM1、JAM2、JAM3の機能を失った $jam \times 3$ 変異体におけるJAZ遺伝子の 発現量を解析した。図2-3-2AにGeneChip解析で得られたJAZ遺伝子の 発現量の概要を示した。JAZ4を除いたすべてのJAZ遺伝子において野生型、 $jam \times 3$ 変異体共にメチルジャスモン酸(MeJA)処理で発現が誘導された。 MeJA処理、Mock処理共にJAZ3を除いてすべてのJAZの発現量が野生型、 $jam \times 3$ 変異体間で同等であった(図2-3-2A)。この結果から、MeJA存在 下、非存在下にかかわらず、JAZ遺伝子の発現量はおおむね野生型と $jam \times 3$ 変異体間で変わらなかった。次に、野生型、jam1jam2、 $jam \times 3$ においてJAZ1 の発現量を定量RT-PCRを用いて詳細に解析した(図2-3-2B)。 jam1jam2、 $jam \times 3$ におけるJAZ1の発現量は野生型の1.5倍にとどまった。 JAZ1の発現量がjam1jam2と $jam \times 3$ の間で同等であった事から、JAZ1の発 現し対する抑制的な効果はJAM1とJAM2によってのみもたらされ、かつそ の効果は限られたものであることが分かった。

					Fold-Change I	nformation			
		Col (M	J/mock)	jam x3 (MJ/mock)	mock (j	am x3/Col)	MJ (jar	n x3/Col)
Locus ID	Gene name	ratio	significance	ratio	significance	ratio	significance	ratio	significance
At1g19180	JAZ1	30.8		11.0	**	3.2	ns	1.1	ns
At1g74950	JAZ2	20.8		22.1		1.1	ns	1.1	ns
At3g17860	JAZ3	8.3		4.0	**	2.5		1.2	ns
At1g48500	JAZ4	1.1	ns	1.1	ns	1.1	ns	1.0	ns
At1g17380	JAZ5	108.7		85.2	**	1.8	ns	1.4	ns
At1g72450	JAZ6	15.9		11.0	**	1.5	ns	1.1	ns
At2g34600	JAZ7	368.8		573.2	**	0.7	ns	1.2	ns
At1g30135	JAZ8	216.9		274.5	**	1.1	ns	1.4	ns
At1g70700	JAZ9	24.1		16.2	**	1.9	ns	1.3	ns
At5g13220	JAZ10	298.9		99.9	**	3.9	ns	1.3	ns
At5a20900	JAZ12	2.6	**	3.0	**	1.2	ns	1.4	ns

В



図 2-3-2 *jam*×3変異体における *JAZ*遺伝子の発現解析

(A) JAZ発現量の変化情報と統計学的解析の概要を示した。GeneChip解析から得られたJAZ遺伝子発現の正規化強度をもとに算出した。** P < 0.01、
* P < 0.05、 NS = not significant (P < 0.05); Tukey-Kramerの多重検定による。

(B) 1% スクロースを加えたGM液体培地中7日間培養した植物体にMock
 (白)もしくは50 µM MeJA(黒)を1時間処理し、RNAを抽出した(±SE、
 n = 3)。

(Sasaki-Sekimoto et al., 2014)

第3章 ジャスモン酸応答性 NPF タンパク質 GTR1 による ジャスモン酸情報伝達の制御

3.1 序

植物ホルモンは極微量で幅広い生理現象を引き起こす情報伝達物質である。 細胞膜を介した植物ホルモンの取り込みと排出は細胞内外で引き起こされる 様々な現象の引き金として重要なプロセスである。細胞膜を介したホルモン輸 送は、一般的に単なる拡散ではなく輸送タンパク質によって引き起こされる。 植物ではホルモン輸送は様々な生理的反応を制御するのに重要である。近年の 研究によって、数種類のホルモンの輸送タンパク質が特定された。オーキシン 輸送体は組織発達異常や外生のオーキシンおよび環境刺激に対する異常応答を 示す変異体解析によって特定された(Petrasek et al., 2009)。さらに、もう一つ の異なるオーキシン輸送体である硝酸/ペプチド輸送体ファミリー (NPF)タ ンパク質である NRT1.1/ NPF6.3 も特定された(Leran et al., 2013; Krouk et al., 2010)。NRT1.1/NPF6.3 はオーキシンの細胞内への取り込みを促進し、硝 酸はこの NPF6.3 によるオーキシン取り込みを阻害する(Krouk et al., 2010)。 さらに、2つの ABC トランスポーターがアブシジン酸(ABA) 輸送体として 特定された。AtABCG25 は ABA の細胞外への排出を行い、AtABCG40 は ABA の取り込みを行う(Kang et al., 2010; Kuromori et al., 2010)。酵母ツーハイブ リッド法を改変した手法を用いて NPF ファミリーに属するもう一つの ABA 輸 送体 AIT1/NPF4.6 が特定された。AIT1/NPF4.6 変異体は外生の ABA に対して 発芽時と発芽後の成長時における感受性が低下する(Kanno et al., 2012)。 MATE ファミリーに属する AtDTX50 は ABA 排出輸送体として機能する事も 報告されている(Zhang et al., 2014B)。シロイヌナズナにおける ABC トランス ポーターの AtABCG14 は根で合成されたサイトカイニンの輸送に必要不可欠 である(Ko et al., 2014; Zhang et al., 2014A)。また、ペチュニアにおける ABC トランスポーターである PDR1 はストリゴラクトンの排出輸送体として機能し、 アーバスキュラー菌根菌の発生と葉腋の枝分かれに関与する主要な調節因子と して機能する(Kretzschmar et al., 2012)。しかし、依然としてジャスモン酸類 に対する輸送活性を持つタンパク質は報告されていない。

ジャスモン酸は a-linolenic acid 由来の植物ホルモンとして知られ、花粉や 雄ずいの成熟、老化、病傷害等に対する防御応答といった幅広いプロセスの調

19

節因子である(Acosta et al., 2010; Wasternack et al., 2013; Schimiller et al., 2005)。特に、ジャスモン酸イソロイシン(JA-Ile) はジャスモン酸の生理活 性型であり、様々な生理的応答に関与する事が知られている(Acosta et al., 2012)。ジャスモン酸が合成できないシロイヌナズナの変異体は花糸の伸長や 花粉の成熟、葯の裂開に異常がみられ、雄性不稔である(Browse et al., 2009; Thines et al., 2013)。

遺伝子ネットワーク解析は機能的に相関する遺伝子の組み合わせを見つける のに有効な手法である(Obayashi & Kinoshita 2010; Sasaki-Sekimoto et al., 2013)。本研究で、私はジャスモン酸応答性の硝酸・ペプチド輸送体 NPF フ ァミリータンパク質である GTR1/NPF2.10 をジャスモン酸応答性遺伝子の共 発現解析によって見出した。GTR1はジャスモン酸に対して早期応答性の因子 であり、gtr1 欠損体はジャスモン酸に対して高感受性であった。gtr1 では老化 マーカー遺伝子が高発現しており、ジャスモン酸処理によって葉における老化 が促進される事が示唆された。さらに雄ずいの発達不全によって稔性が低下し ていることを明らかにした。ジャスモン酸関連の表現型が gtr1において多数見 られる事から、GTR1 がジャスモン酸類を輸送する事によって、老化や雄ずい の発達を制御している事が示唆された。

3.2 材料と方法

3.2.1 定量 RT-PCR

植物組織から RNA を SV Total RNA Isolation System (Promega KK, Tokyo, Japan)を用いて抽出した。PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis kit (TaKaRa, Shiga, Japan)のプロトコルに従って、PrimeScript RT Enzyme Mix I、Oligo dT Primers、Random 6-mers を用いて 400 ngの RNA を鋳型に cDNA 合成を行った。SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa, Shiga, Japan)のプロトコル に従って、8.0 ng cDNA を用いて最終液量が 20 µl となるように調整した。定量 RT-PCR は Thermal Cycler Dice Real Time System II (TaKaRa, Shiga, Japan)を用いて行った。得られたデータを野生型の Mock 処理の値を用いて標準化した。ポリユビキチン遺伝子である UBQ10 (At4g05320) (Czechowski et al., 2005)をリファレンス遺伝子として用いた。PCR のプログラムは、はじめに 95 °C で 30 秒の後 95 °C で 5 秒、60 °C で 30 秒を 40 サイクル行った。 用いたプライマー配列:

UBQ10(At4g05320) forward 5'-GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG-3' reverse 5'-AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT-3' GTR1(At3g47960) forward 5'-GTCCATTGGCTGGTATTGCT-3' reverse 5'-ACTTGCTGCAACGTGCATAG-3' PDF1.2(AT5G44420) forward 5'-TTTGCTGCTTTCGACGCAC-3' reverse 5'-CGCAAACCCCTGACCATG-3' MYC2(AT1G32640) forward 5'-CGGCTACAACCAACGATGAA-3' reverse 5'-CCGGAGGCCATAAAGTTGAG-3' ERF1(AT3G23240) forward 5'-ACGATCCCTAACCGAAAACAGA-3' reverse 5'-GTGAGAAGCCGGAGAATGG-3' ORA59(AT1G06160) forward 5'-GGCTCTCGCTTATGATCAGG-3' reverse 5'-CCGGAGAGATTCTTCAACGA-3' LOX3(AT1G17420) forward 5'-CACTGCAATTCACAAGCAACC-3' reverse 5'-CAAAGGAGGAATCGGAGAAGC-3' AOS(AT5G42650) forward 5'-GCGACGAGAGATCCGAAGA-3' reverse 5'-CTCGCCACCAAAACAACAACAA'3' DAD1(AT2G44810) forward 5'-GTGAAGACGAAGAAGAAGAAGAAGAACAATC-3' reverse 5'-GTGAAGACAGCGAAAACGACATAC-3' OPR3(AT2G06050) forward 5'-TTGGACGCAACTGATTCTGAC-3' reverse 5'-GTAGGCGTGGTAGCGAGGTT-3' SEN4(AT4G30270) forward 5'-GACTCTTCTCGTGGCGGCGT-3' reverse 5'-CCCACGGCCATTTCCCCCAAGC-3' SAG12(AT5G45890) forward 5'-GGCGTTTTCAGCGGTTGCGG-3' reverse 5'-CCGCCTTCGCAGCCAAAATCG-3' SAG18(AT1G71190) forward 5'-GTTTGCGAGGTGAGAAAATAGGA-3' reverse 5'-AGAGTAGCATCGTTTGGGTGAAG-3' SAG20(AT3G10985) forward 5'-TCGGTAACGTTGTTGCTGGA-3' reverse 5'-ACCAAACTCTTTCAAATCGCCA-3'

3.2.2 **T-DNA** 挿入変異体の遺伝型決定と発現解析

Col-0 に T-DNA が挿入された変異体 *gtr1*(CS879742)を The Arabidopsis Biological Resource Center から取り寄せた。PCR によって遺伝型解析を行っ

た。

用いたプライマー:

GTR: forward 5'-ATGGAGAGAGAAAGCCTCTTG-3'

reverse 5'-TCAGACAGAGTTCTTGTCT-3'

LB3 :5'-TAGCATCTGAATTTCATAACCAATCTCGA-3'

*35S:GTR1/gtr1*植物体を作製するために、まず *GTR1*の配列を RNA PCR Kit (TaKaRa, Shiga, Japan)を用いて作製した cDNA を鋳型に PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa, Shiga, Japan)を用いて増幅した。プライマーは Gateway によるクローニングに適合した以下のものを用いた。

forward 5'-GGGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACACC-3 reverse 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGA-CAGAGTTCTTGTCT-3

PCR 産物を Gateway BPII kit (Life Technologies, MD, USA)を用いてプラ スミドベクターpDONR/Zeo ヘクローニングし、配列を確認した。さらに、 Gateway (Life Technologies, MD, USA) LR reactions を用いて発現用ベクタ ーpGWB2 (Nakagawa et al., 2007)に *GTR1*をクローニングし、配列を確認し た。このコンストラクトを Agrobacterium tumefaciens を用いた手法 (Berberich et al., 2008)により gtr1 へ形質転換した。

得られた植物体に対する発現解析を半定量 RT-PCR により行った。SV Total RNA Isolation System (Promega KK, Tokyo, Japan)を用いて RNA を抽出し、 得られた RNA を鋳型に RNA PCR kit (TaKaRa, Shiga, Japan)を用いて cDNA 合成し、PCR を行った。*Actin2*(At3g18780)をリファレンス遺伝子(Czechowski et al., 2005)として用いた。

プライマー配列:

GTR1 (At3g47960) forward 5'-ATGGAGAGAGAGAGACCTCTTG-3'

reverse 5'-TCAGACAGAGTTCTTGTCT-3'

Actin2 (AT3G18780) forward 5'-ACATTGTGCTCAGTGGTGGA-3'

reverse 5'-TCATACTCGGCCTTGGAGAT-3'

3.2.3 植物体育成条件

遺伝子発現解析用には発芽後10日目の植物体を用いた。10~15個の種子を

30 ml の 1%スクロースが含まれた MS 培地入り 100 ml フラスコ中で 20-36 µmol m-2s-1 の光を当てて 130 rpm で旋回培養した。植物体を 20 µM MeJA で処理し、それぞれの期間培養した後にサンプリングした。シクロヘキシミド (CHX)はホルモン処理を行う 1 時間前に 100 µM を処理した。サンプリングした植物体は解析に用いるまで液体窒素で凍結したのちに-80 °C で保存した。ジャスモン酸感受性実験では発芽後 4 週間 50 µM MeJA、0.8%アガー、1% スクロースを含んだ MS 培地上で 30-55 µmol m-2s-1の強さの光を与えて育成した。 根の伸長測定実験では 20 µM の MeJA を処理し、プレートを垂直に立てて育成した。 写真を撮影後、ソフトウエア ImageJ (http://rsbweb.nih.gov/ij) (Abramoff et al., 2004) を用いて根の長さを測定した。成熟した植物体は 0.8% アガーを含んだ MS 培地上で育成後土壌に移し、成熟するまで 22 °C で光を当て続けて育成した。

3.2.4 GUS レポーターによる局在解析

*GTR1*の開始コドン直後から 2000 bp のゲノム配列を以下のプライマーを用いて増幅した。

forward 5'-TGATTACGCCAAGCTTGGTTCTTAGACTGGCGAG-3'

reverse 5'-ACCTGCAGCCAAGCTTGTCAAGCTTCTCCGCTC-3'

その後、プラスミドベクターpCambia1391Z ヘクローニングした。作製した コンストラクトを Columbia-0 へ Agrobacterium tumefaciens を用いた手法で 形質 転換 した (Berberich et al., 2008)。 GUS 染色は 2 mM X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-8-D-glucuronide)、 0.5 mM K₄Fe(CN)₆、 0.5 mM K₃Fe(CN)₆、 0.3% (v/v) Tween20、 50 mM NaPO₄ (pH 7.4)を用いて 16 時間行 った。反応を停止後、70% ethanol で脱染色した(Jefferson et al., 1987)。組織 断片を作製するために、GUS 染色した花器官を FAA solution (5% v/v formalin、 5% v/v acetic acid、45% v/v ethanol)中で一晩 4°C で培養した。サンプル処理 は先行研究に変更を加えて行った(Adachi et al., 2009)。サンプルをエタノール を用いて脱水し、その後エタノールを Technovit 7100 solution (Heraeus Kulzer, Tokyo, Japan)と hardener I (Heraeus Kulzer, Tokyo, Japan)へ置換 した。そして、hardener II solution (Heraeus Kulzer, Tokyo, Japan)、 Technovit 7100 solution、hardener I の混合液中に浸した。サンプルは 6 µm の厚さになるように切片を作製した。切片の顕微鏡写真の色バランスをソフト ウェア ImageJ(http://rsbweb.nih.gov/ij)(Abramoff et al., 2004)を用いて調節 した。

3.2.5 *in vitro* における花粉の発芽実験

花粉の発芽実験は先行研究を改変して行った(Fan et al., 2001)。野生型と gtr1 におけるステージ 14 の花をそれぞれの植物体から採取した。各実験ごと に花粉はそれぞれ 3 個の花から採取した。花粉発芽用の培地(5 mM MES-Tris (pH 5.8)、1 mM KCl、0.8 mM MgSO₄、1.5 mM boric acid、10 mM CaCl₂、 16% (w/v) sucrose、0.5% (w/v) INA agar)上で 23 °C、24 時間明条件(30 µmol m-2s-1)で高湿度を維持しながら培養し、発芽した花粉の数を測定した。

3.3 結果

3.3.1 ジャスモン酸早期応答性トランスポーターGTR1の特定

ジャスモン酸情報伝達における新規の調節因子を特定するために 私は9つ のジャスモン酸合成遺伝子と共発現する遺伝子を ATTED-II CoExSearch ver. c4.1. (http://atted.jp) (Obayashi et al., 2011)を用いて探索した。ジャス モン酸合成遺伝子と共発現する遺伝子をピアソン積率相関係数の上位20位の 中から選択した(Obayashi et al., 2009) (表 3-3-1)。その結果、JAZ ファミ リーやジャスモン酸応答性転写因子に加えて複数の輸送体がジャスモン酸生合 成遺伝子と共発現していることが分かった。その中でも NPF ファミリーに属 しており、グルコシノレート輸送体をコードする AT3G47960/GTR1/NPF2.10 (Nour-Eldin et al., 2012) が LOX3、AOS、OPR3、JAR1 といったジャスモン 酸生合成遺伝子と強く共発現していることが分かった。近年の研究により、 GTR1 と同じ輸送体ファミリーに属する NRT1.1/NPF6.3 がオーキシン輸送体 として特定された Krouk et al., 2010)。さらに、AIT1/NPF4.6 は ABA 輸送体 として特定されている(Kanno et al., 2012)。この研究ではもう一つの NPF 輸 送体である AIT3/NPF4.1 が ABA とジベレリンの輸送活性を有する事も示して いることから、GTR1/NPF2.10 がジャスモン酸類やその他の植物ホルモンを輸 送する事が示唆された。

表 3-3-1

ジャスモン酸生合成遺伝子と共発現する遺伝子をピアソン相関係数上位20 位まで挙げた。輸送体は太字で表されている。ジャスモン酸生合成遺伝子とそ の関連遺伝子は斜字体で表した。

(Saito et al., 2014)

Mutual Rank	Locus	annoattion
	At2g44810	DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCIENCE 1 (DAD1)
1	At1g62210	unknown protein
2	At1g31670	Copper amine oxidase family protein
3	At3g04170	RmIC-like cupins superfamily protein
4	At3g04200	RmIC-like cupins superfamily protein
5	At3g29260	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
6	At1g68380	Core-2/I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
7	At1g66720	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
8	At3g04150	RmIC-like cupins superfamily protein
9	At2g07230	transposable element gene
10	At1g65670	cytochrome P450, family 702, subfamily A, polypeptide 1
11	At4g07750	transposable element gene
12	At1g27080	nitrate transporter 1.6 (NRT1.6)
13	At1g43570	transposable element gene
14	At2g13230	transposable element gene
15	At5g01860	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein
16	At5g50750	reversibly glycosylated polypeptide 4
17	At5g56880	unknown protein
18	At5g26640	unknown protein
19	At5g49050	unknown protein
20	At3a24680	transposable element gene

Mutual Rank	Locus	annoattion			
	At1g17420	LIPOXYGENASE 3 (LOX3)			
1	At1g72520	LIPOXYGENASE 4 (LOX4)			
2	At1g17380	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 5 (JAZ5)			
3	At3g25780	ALLENE OXIDE CYCLASE 3 (AOC3)			
4	At1g20510	OPC-8:0 CoA LIGASE 1 (OPCL1)			
5	At1g61890	MATE efflux family protein			
6	At2g06050	12-oxo-PHYTODIENOATE REDUCTASE 3 (OPR3)			
7	At1g73080	PEP1 receptor 1			
8	At2g34930	disease resistance family protein / LRR family protein			
9	At1g30135	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 8 (JAZ8)			
10	At5g42650	ALLENE OXIDE SYNTHASE			
11	At3g47960	GLUCOSINOLATE TRANSPORTER 1 (GTR1)			
12	At5g13220	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 10 (JAZ10)			
13	At3g51450	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein			
14	At2g46510	ABA-inducible BHLH-type transcription factor/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1)			
15	At2g34600	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 7 (JAZ7)			
16	At3g25180	cytochrome P450, family 82, subfamily G, polypeptide 1			
17	At3g48520	cytochrome P450, family 94, subfamily B, polypeptide 3			
18	At5g14700	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein			
19	At5g54170	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein			
20	At4g34410	redox responsive transcription factor 1			

Mutual Rank	Locus	annoattion
	At1g72520	LIPOXYGENASE 4 (LOX4)
1	At1g17420	LIPOXYGENASE 3 (LOX3)
2	At1g20510	OPC-8:0 CoA LIGASE 1 (OPCL1)
3	At1g17380	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 5 (JAZ5)
4	At1g80840	WRKY DNA-binding protein 40
5	At3g16860	COBRA-like protein 8 precursor
6	At4g24380	unknown protein
7	At3g25780	ALLENE OXIDE CYCLASE 3 (AOC3)
8	At2g44840	ethylene-responsive element binding factor 13
9	At4g31800	WRKY DNA-binding protein 18
10	At3g02840	ARM repeat superfamily protein
11	At1g28370	ERF domain protein 11
12	At3g01830	Calcium-binding EF-hand family protein
13	At5g14700	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
14	At2g24600	Ankyrin repeat family protein
15	At5g59730	exocyst subunit exo70 family protein H7
16	At2g32140	transmembrane receptors
17	At5g64870	SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family
18	At1g73080	PEP1 receptor 1
	At5g47910	respiratory burst oxidase homologue D
20	At4g34410	redox responsive transcription factor 1

Mutual Rank	Locus	annoattion				
	At5g42650	ALLENE OXIDE SYNTHASE				
1	At2g06050	12-oxo-PHYTODIENOATE REDUCTASE 3 (OPR3)				
2	At5g44050	MATE efflux family protein				
3	At1g19670	chlorophyllase 1				
4	At4g23600	Tyrosine transaminase family protein				
5	At4g24350	Phosphorylase superfamily protein				
6	At3g51450	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein				
7	At1g17420	LIPOXYGENASE 3 (LOX3)				
8	At3g47960	GLUCOSINOLATE TRANSPORTER 1 (GTR1)				
9	At5g58670	phospholipase C1				
10	At5g47240	nudix hydrolase homolog 8				
11	At1g44350	IAA-leucine resistant (ILR)-like gene 6				
12	At1g32640	Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding family protein				
13	At4g14680	Pseudouridine synthase/archaeosine transglycosylase-like family protein				
14	At1g20510	OPC-8:0 CoA LIGASE 1 (OPCL1)				
15	At1g72450	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 6 (JAZ6)				
16	At4g30530	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein				
17	At1g70700	TIFY domain/Divergent CCT motif family protein				
18	At3g45140	LIPOXYGENASE 2 (LOX2)				
19	At1g52000	Mannose-binding lectin superfamily protein				
20	At2q46510	ABA-inducible BHLH-type transcription factor/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1)				

Mutual Rank	Locus	annoattion
	At3g25780	ALLENE OXIDE CYCLASE 3 (AOC3)
1	At1g17380	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 5 (JAZ5)
2	At1g19180	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1 (JAZ1)
3	At1g17420	LIPOXYGENASE 3 (LOX3)
4	At1g20510	OPC-8:0 CoA LIGASE 1 (OPCL1)
5	At1g72520	LIPOXYGENASE 4 (LOX4)
6	At2g29440	glutathione S-transferase tau 6
7	At3g23250	myb domain protein 15
8	At1g30135	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 8 (JAZ8)
9	At2g06050	12-oxo-PHYTODIENOATE REDUCTASE 3 (OPR3)
10	At2g22500	uncoupling protein 5
11	At2g39420	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
12	At5g13220	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 10 (JAZ10)
13	At1g26730	EXS (ERD1/XPR1/SYG1) family protein
14	At3g09940	monodehydroascorbate reductase
15	At3g50760	galacturonosyltransferase-like 2
16	At2g34930	disease resistance family protein / LRR family protein
17	At3g51450	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
18	At2g27690	cytochrome P450, family 94, subfamily C, polypeptide 1
19	At1g06620	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
20	At1g61890	MATE efflux family protein

Mutual Rank	Locus	annoattion		
	At1g13280	ALLENE OXIDE CYCLASE 4 (AOC4)		
1	At5g65020	annexin 2		
2	At3g10260	Reticulon family protein		
3	At1g66350	RGA-like 1		
4	At3g12610	Leucine-rich repeat (LRR) family protein		
5	At2g01150	RING-H2 finger protein 2B		
6	At5g09980	elicitor peptide 4 precursor		
7	At4g12880	early nodulin-like protein 19		
8	At5g50375	cyclopropyl isomerase		
9	At1g48330	unknown protein		
10	At5g50180	Protein kinase superfamily protein		
11	At1g54030	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein		
12	At1g78660	gamma-glutamyl hydrolase 1		
13	At5g15230	GAST1 protein homolog 4		
14	At2g34470	urease accessory protein G		
15	At5g65640	beta HLH protein 93		
16	At3g19820	cell elongation protein / DWARF1 / DIMINUTO (DIM)		
17	At3g59760	O-acetylserine (thiol) lyase isoform C		
18	At1g05620	uridine-ribohydrolase 2		
19	At2g47320	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein		
20	At3g45310	Cysteine proteinases superfamily protein		

Mutual Rank	Locus	annoattion
	At2g06050	12-oxo-PHYTODIENOATE REDUCTASE 3 (OPR3)
1	At1g20510	OPC-8:0 CoA LIGASE 1 (OPCL1)
2	At3g51450	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
3	At5g42650	ALLENE OXIDE SYNTHASE
4	At1g17420	LIPOXYGENASE 3 (LOX3)
5	At1g17380	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 5 (JAZ5)
6	At1g32640	Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding family protein
7	At3g25780	ALLENE OXIDE CYCLASE 3 (AOC3)
8	At3g47960	GLUCOSINOLATE TRANSPORTER 1 (GTR1)
9	At1g74950	TIFY domain/Divergent CCT motif family protein
10	At1g44350	IAA-leucine resistant (ILR)-like gene 6
11	At5g13220	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 10 (JAZ10)
12	At5g47240	nudix hydrolase homolog 8
13	At1g72450	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 6 (JAZ6)
14	At5g05600	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
15	At2g46510	ABA-inducible BHLH-type transcription factor/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1)
16	At5g53050	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
17	At2g34930	disease resistance family protein / LRR family protein
18	At1g19180	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1 (JAZ1)
19	At1g70700	TIFY domain/Divergent CCT motif family protein
20	At1a73080	PEP1 receptor 1

Mutual Rank	Locus	annoattion
	At1g20510	OPC-8:0 CoA LIGASE 1 (OPCL1)
1	At1g72520	LIPOXYGENASE 4 (LOX4)
2	At2g06050	12-oxo-PHYTODIENOATE REDUCTASE 3 (OPR3)
3	At1g17420	LIPOXYGENASE 3 (LOX3)
4	At1g32640	Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding family protein
5	At1g17380	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 5 (JAZ5)
6	At3g25780	ALLEME OXIDE CYCLASE 3 (AOC3)
7	At1g19180	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1 (JAZ1)
8	At3g51450	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
9	At1g74950	TIFY domain/Divergent CCT motif family protein
10	At5g42650	ALLENE OXIDE SYNTHASE
11	At4g14680	Pseudouridine synthase/archaeosine transglycosylase-like family protein
12	At5g47220	ethylene responsive element binding factor 2
13	At1g27770	autoinhibited Ca2+-ATPase 1
14	At2g42760	unknown protein
15	At5g47910	respiratory burst oxidase homologue D
16	At5g59730	exocyst subunit exo70 family protein H7
17	At4g24380	unknown protein
18	At1g72450	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 6 (JAZ6)
19	At5g66210	calcium-dependent protein kinase 28
20	At2g46510	ABA-inducible BHLH-type transcription factor/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1)

Mutual Rank	Locus	annoattion			
	At2g46370	JASMONATE RESISTANT 1 (JAR1)			
1	At4g30530	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein			
2	At1g53310	phosphoenolpyruvate carboxylase 1			
3	At5g22630	arogenate dehydratase 5			
4	At3g47960	GLUCOSINOLATE TRANSPORTER 1 (GTR1)			
5	At5g53760	Seven transmembrane MLO family protein			
6	At5g12010	unknown protein			
7	At4g34230	cinnamyl alcohol dehydrogenase 5			
8	At3g54140	peptide transporter 1			
9	At5g03630	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein			
10	At1g02270	Calcium-binding endonuclease/exonuclease/phosphatase family			
11	At1g08800	Protein of unknown function, DUF593			
12	At4g26080	Protein phosphatase 2C family protein			
13	At3g20500	purple acid phosphatase 18			
14	At1g74100	sulfotransferase 16			
15	At2g46080	BYPASS2			
16	At5g60360	aleurain-like protease			
17	At3g11660	NDR1/HIN1-like 1			
18	At5g52510	SCARECROW-like 8			
19	At3g52470	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family			
20	At5g66120	3-dehydroquinate synthase, putative			

3.3.2 *GTR1*のジャスモン酸応答性と変異体でのジャスモン酸関連 遺伝子の発現

*GTR1*のジャスモン酸類に対する応答性を詳細に解析するために、発芽後1 0日目の液体旋回培養を行ったシロイヌナズナ植物体に対して20µMのMeJA を処理し、定量 RT-PCRによって *GTR1*の転写量を解析した。先行研究により、 *MYC2* や *JAZ* ファミリーは MeJA に対して早期に応答する事が知られている

(Lorenzo et al., 2004; Thines et al., 2007; Chini et al., 2007; Yan et al., 2007)。*GTR1*の発現は MeJA に応答して 30 分以内に発現が上昇し、高い発現レベルが処理後24時間後も維持される(図3-3-2-1a)。さらに、この発現応答がタンパク質合成に依存するかどうかを調べるために CHX を処理して*GTR1*の発現を解析した。その結果、CHX と MeJA の同時処理で MeJA 単独処理に比べて *GTR1* は高く誘導され、さらに応答に要する時間は遅くなった。この応答は CHX 単独処理と比較しても高いレベルで引き起こされた(図3-3-2-1a)。これら結果により、一過的な *GTR1* の発現は早期応答性の転写抑制因子によって制御され、CHX 処理を行う事によって抑制が解除され *GTR1* の機能を明らかにするために、*GTR1* の第1 イントロンに T-DNA が挿入された植物体を入手し、PCR と塩基配列の解析を行う事によって具体的な挿入個所を特定した(図3-3-2-2a)。この *gtr1* 変異体には *GTR1* のコード領域の発現が見られないことを確認した (図3-3-2-2b)。そこでこの *gtr1*を欠損体として以下の解析に用いた。

ジャスモン酸情報伝達において GTR1の機能を明らかにするために、ジャス モン酸応答遺伝子の発現解析を行った。gtr1 欠損体ではジャスモン酸応答のマ ーカー遺伝子である PDF1.2 が MeJA 未処理で高発現しており、MeJA を処理 しても処理後24時間まで応答は見られなかった。一方、野生型は MeJA によ る PDF1.2 の発現誘導が見られた(図3-3-2-1b)。MYC2の Mock 処理時の 発現は野生型と比較して gtr1 では約半分の発現量であったが、その他のジャス モン酸応答遺伝子である VSP1、 ERF1、ORA59 の発現は野生型と gtr1 の間 で差は見られなかった(図3-3-2-3)。さらに、gtr1 におけるジャスモン酸 生合成遺伝子の発現を解析したところ、LOX3 と JMT を除いて野生型と gtr1 の間で差は見られなかった(図3-3-2-4)。これら結果により、gtr1 はジャ スモン酸情報伝達の一部が破壊されている事が示唆された。



図 3-3-2-1 *GTR1* はジャスモン酸によって誘導され、ジャスモン酸関連 遺伝子を制御する。

(a) MeJA よる発現誘導における CHX の効果を解析した。発芽後 10 日間液体 MS 培地中で旋回培養したシロイヌナズナ野生型を 20 μM MeJA で処理する 1 時間前に 100 μMCHX で処理した。その後、定量 RT-PCR を用いて *GTR1* の転 写量を解析した。*UBQ10* をリファレンス遺伝子として用い、野生型の 0 時間 mock 処理の値で標準化した(±SD、n=3)。

(b) gtr1 における PDF1.2の発現解析を行った。発芽後 10 日間液体 MS 培地中 で旋回培養したシロイヌナズナ野生型、gtr1 を 0.02% エタノール(白)もし くは 20 µM MeJA (黒)で 24 時間処理し、定量 RT-PCR に用いた。UBQ10をリ ファレンス遺伝子として用いた。相対発現量を野生型の 0.02% エタノール処理 の値で標準化した (± SD、n=3)。*p < 0.05、 Tukey-Kramer 多重検定による。</p>

29



Actin



200 bp

1

0

hy

35S.GTR7 図3-3-2-2 本研究で用いたシロイヌナズナ変異体の発現解析 (a) gtr1変異体におけるT-DNA挿入位置を示した。この変異体はGTR1の第1イ ントロンにT-DNA挿入が存在した。黒い四角はコード領域を示す。白い四角は UTRを示す。FとRはRT-PCRで用いたプライマーの位置を表す。LBはT-DNA のleft border プライマーを表す。

(b) この変異体におけるGTR1の発現を示す。液体培地中で10日間旋回培養した 野生型(左のレーン)、gtr1(真ん中のレーン)、35S:GTR1/gtr1(右のレー ン)をRT-PCRで解析した。Actinをコントロールとして用いた。全ての遺伝子 は35サイクルのPCRによって増幅した。外側のレーンは分子量マーカーを示す。 (c) 野生型と35S:GTR1/gtr1におけるGTR1の転写量を定量RT-PCRで解析した。 \pm SD、n = 3。 UBQ10をリファレンス遺伝子として用いた。

(Saito et al., 2014)



図 3-3-2-3 gtr1 におけるジャスモン酸応答遺伝子の発現解析

発芽後 10 日間液体 MS 培地中で旋回培養したシロイヌナズナ野生型、gtr1 を 0.02% エタノール(白)もしくは 20 µM MeJA(黒)で 24 時間(MYC2、 VSP1)もしくは 30 分(ERF1、ORA59)処理し、定量 RT-PCR に用いた。UBQ10 をリファレンス遺伝子として用い、野生型の mock 処理 0 時間の値で標準化し た(±SD、n=3)。p < 0.05、 NS = not significant (p > 0.05) Tukey-Kramer の多重検定による。

(Saito et al., 2014)


図 3-3-2-4 gtr1 におけるジャスモン酸生合成遺伝子の発現解析 発芽後 10 日間液体 MS 培地中で旋回培養したシロイヌナズナ野生型、gtr1 を 0.02% エタノール(白)もしくは 20 μ M MeJA(黒)で 30 分処理し、定量 RT-PCR に用いた。UBQ10をリファレンス遺伝子として用い、野生型の mock 処理 0 時間の値で標準化した(±SD、n=3)。p < 0.05、 NS = not significant (p > 0.05) Tukey-Kramer の多重検定による。

(Saito et al., 2014)

第3章

3.3.3 gtr1 変異体のジャスモン酸感受性

gtr1 バックグラウンドで 35S プロモーターによって GTR1 を発現した植物 体 35S:GTR1/gtr1 を作製した。定量 RT-PCR によって GTR1の発現が相補さ れている事を確認した(図 3-3-2-2 c)。MeJA に対する感受性を解析するた めに、50 μM の MeJA が含まれた MS 培地上で 4 週間植物体を育成した。その 結果、gtr1 欠損体は褐色に変化したのに比べ、野生型では緑色を保っていた。 35S:GTR1/gtr1 相補体は gtr1の褐色化する表現型を相補した(図3-3-3a)。 通常の MS 培地上で育てた植物体は野生型、gtr1、35S:GTR1/gtr1 相補体の間 で生育に違いは見られなかった(図 3-3-3 a)。次に、gtr1 欠損体の緑色が失 われる表現型は葉の老化が促進された結果かを確かめるために、gtr1において 老化マーカー遺伝子(Weaver et al., 1998)の発現解析を行った。SAG12はジャ スモン酸を処理した gtr1 欠損体において野生型と比較して高く発現していた が、Mock 処理の gtr1 では SAG12 の発現に変化はなかった。もう一つの老化 マーカー遺伝子である SAG12 は MeJA 処理をした植物体では野生型と変異体 の間で違いは見られなかったが、Mock処理のgtr1では有意に発現が上昇して いた(図 3 - 3 - 3 b)。SEN4 と SAG18 の gtr1 における発現は Mock 処理、MeJA 処理共に野生型と同等であった。gtr1 において MeJA 処理後の SAG20 の高発 現が見られたため、gtr1において緑色が失われる表現型はジャスモン酸誘導性 の葉の老化促進によるものと示唆された。



図 3-3-3 gtr1 はジャスモン酸に対して高感受性である。

(a) 発芽後 30 日目の植物体の表現型を示した。植物体を MeJA (50 µM)入りの MS 培地で育てた(中段)。上段の植物体は MeJA を含まない MS 培地上で育成 した。下段は中段の植物体を拡大した写真を示す。スケールバー= 10 mm (上 段、中段)、1 mm (下段)。

(b)老化マーカー遺伝子の発現を解析した。発芽後 10 日間液体 MS 培地中で旋回培養したシロイヌナズナ野生型と gtr1 を 0.02% エタノール(白)もしくは20 µM MeJA(黒)で72時間処理し、定量 RT-PCR に用いた。UBQ10をリファレンス遺伝子として用い、野生型の mock 処理 0 時間の値で標準化した(±SD、n=3)。p < 0.05、 NS = not significant (p > 0.05)、Student の t 検定による。(Saito et al., 2014)

3.3.4 gtr1 変異体における雄ずいの発達

gtr1はさやが小さく稔性が低下しているが、35S:GTR1/gtr1では部分的にその表現型が相補された(図3-3-4-1a)。gtr1は花糸が野生型と比較して短く、さらに葯の開裂に異常が見られた(図3-3-4-1b)。gtr1の柱頭に野生型の花粉を受粉したところ(WT*gtr1)、完全に成熟したさやをつけ、そのさやは野生型(WT)のものと比較して若干長かった(WT*gtr1: 12.50±1.56 mm、WT:10.50±0.85 mm)。さらに、種子の数を解析したところ、WT*gtr1は野生型と同等の数の種子をつけた。(WT*gtr1: 34±11.2、WT: 40.3±5.9)。

成熟した花粉の生存率を解析するために、花粉の発芽率を計測した。その結果、gtr1 と野生型の間で花粉の発芽率に違いは見られなかった(図3-3-4-2)。これら結果から、gtr1 では雄ずいの発達が不十分なため柱頭への受粉が 行われにくくなり、結果として稔性が低下している事が示唆された。ジャスモ ン酸は花器官の発達における特異的なステージにおいて花糸の伸長、葯の開裂、 花粉の成熟を制御していることから(Wasternack et al., 2013; Thines et al., 2013)、GTR1 はジャスモン酸情報伝達経路を介して雄ずいの発達を制御してい ると考えられた。実際、ProGTR1:8-glucuronidase(GUS)植物体による解析に よって、葯、花糸および花糸の基部で GUS 染色が見られることから、GTR1 はこれら花器官で発現していた(図3-3-4-3a)。また、GUS 染色はステージ 12 の花において花粉でみられ、維管束においても弱いながら染色が見られた (図3-3-4-3b, e)。ステージ 13-14 は花糸の伸長が起きる期間であるが、花 糸の維管束で明確な GUS 染色が見られた(図3-3-4-3c, d, f)。





図 3-3-4-1 花器官における gtr1の表現型

(a) *gtr1* では種子の数が減少していた。上段は地上部の写真で下段はさやを拡大した。スケールバー = 10 mm。

(b) 花器官における表現型を示す。スケールバー=1mm(上段)、0.5mm(下段)。
(c) 野生型の花粉を受粉した gtr1のさや。スケールバー=10mm。



図 3-3-4-2 *in vitro* における花粉の発芽

野生型(a) と gtr1(b)における花粉の写真を示す。花粉は 23°C で 24 時間培養 した。スケールバー= 200 µm。

(c) *in vitro* における花粉の発芽率。3 個の花からそれぞれ花粉を採取し、発芽率の平均を算出した(±SD)。NS = not significant (p > 0.05)、Studentのt 検定による。







図 3-3-4-3 花器官における GTR1 の局在

 (a) GUS レポーターを用いた GTR1の局在解析。GTR1は雄ずいの花糸(左段)、 花糸の基部(中段)、そして、葯(右段)で発現が見られた。スケールバー=1mm
 (左段)、100 µm(中段、右段)。

(b) stage 12 における花器官の垂直断面。fi =花糸。スケールバー= 100 μm。
(c) stage 13 における横断面。 pi =柱頭、st =口辺細胞、v =維管束。スケールバー = 100μm。

(d) stage 14 における垂直断面。スケールバー= 100µm。

- (e) stage 12 における横断面。スケールバー= 100µm。
- (f) stage 13 における横断面。スケールバー= 20 µm。

第4章 ジャスモン酸応答性 NPF タンパク質 GTR1 による 雄ずい発達の制御

4.1 序

ジベレリンとジャスモン酸の輸送は種子の発芽や花器官の形成、成長といっ た様々な生理現象にとって重要である(Peng et al., 2009; Sun et al., 2010; Swain et al., 2005; Acosta et al., 2010; Wasternack et al., 2013; Schimiller et al., 2005; Browse et al., 2009; Thines et al., 2013; Koornneef et al., 1980)。 しかし、これら植物ホルモンの輸送体は AIT3/NPF4.16 の *in vitro* における GA の輸送活性を除いていまだ報告されていない。

ジャスモン酸が合成できないシロイヌナズナの変異体は花糸の伸長や花粉の 成熟、葯の裂開に異常がみられ、雄性不稔である(Browse et al., 2009; Thines et al., 2013)。一方、ジベレリンは種子の発芽や地上部・根の成長、果実部や種子 の発達などを制御することが知られているホルモンであるが、ジベレリンによ っても雄ずいの発達は促進される(Peng et al., 2009; Sun et al., 2010; Swain et al., 2005)。ジベレリンが合成できない変異体である ga1-3 は雄性不稔かつ 矮小であり、その表現型は外生のジベレリン処理によって野生型まで回復する (Koornneef et al., 1980; Sun et al., 1992;Sun et al., 2008)。解剖学的解析に よってこの変異体の雄性不稔の表現型は花糸の細胞伸長不全と花粉の成熟不全 が原因であることが明らかとなった(Cheng et al., 2004)。これら発見はジャス モン酸とジベレリンが共に花器官と種子の発達に重要であることを示している。

近年、いくつかのジャスモン酸・ジベレリンクロストークの詳細が報告され、 これらホルモン間の相互作用が成長や防御応答を制御する事が明らかとなった (Hou et al., 2010; Hong et al., 2012; Yang et al., 2012)。DELLA タンパク質 はジベレリン情報伝達の負の制御因子であるが、ジャスモン酸応答性転写因子 MYC2 の負の制御因子である JAZ (jasmonate ZIM-domain)ファミリータンパ ク質と直接相互作用し、DELLA が MYC2 と競合的に JAZ と相互作用し、ジ ャスモン酸情報伝達を制御している事が示唆されている(Cheng et al., 2004)。 さらに、セスキテルペン合成遺伝子がジャスモン酸とジベレリンの両方によっ て協調的に茎において誘導されるが、DELLA がセスキテルペン合成遺伝子の 転写を活性化する MYC2 と直接相互作用する事が明らかとなった。ジャスモン 酸とジベレリンが MYC2 の負の制御因子である JAZ と DELLA を分解し、セ スキテルペン合成遺伝子の発現が誘導されることが示唆された(Hong et al., 2012)。ジャスモン酸、ジベレリン共に様々な成長プロセスにとって重要である事が知られ、ジャスモン酸-ジベレリン間の情報伝達経路におけるクロスト ークの存在を示す証拠も蓄積しつつある。しかし、特定の成長ステージにおける機能的なジャスモン酸とジベレリンの相互作用については未だ明らかとなっていない。

第3章において、GTR1 が花糸の伸長や葯の裂開といった雄ずいの発達を促 進する事を報告した。GTR1 は花器官の発達を促進する植物ホルモンであるジ ャスモン酸類やジベレリン類を輸送する事が示唆された事から、GTR1 による これらホルモンの輸送活性を解析した。その結果、GTR1 は GA₃ と JA-Ile の両 方に対して輸送活性をもち、gtr1 欠損体は雄ずいの発達不全によって稔性が低 下していることを明らかにした。しかし、生理活性型の GA₃を花器官形成時に 処理する事でその表現型は完全に野生型まで回復した。これら結果により、 GTR1/NPF2.10 がジベレリンの供給を介して雄ずいの発達を制御しているこ とを示した。

4.2 材料と方法

4.2.1 定量 RT-PCR

植物組織から RNA を SV Total RNA Isolation System (Promega KK, Tokyo, Japan)を用いて抽出した。PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis kit (TaKaRa, Shiga, Japan)のプロトコルに従って、PrimeScript RT Enzyme Mix I、Oligo dT Primers、Random 6-mers を用いて 400 ngの RNA を鋳型に cDNA 合成を行った。SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa, Shiga, Japan)のプロトコル に従って、8.0 ng cDNA を用いて最終液量が 20 µl となるように調整した。定 量 RT-PCR は Thermal Cycler Dice Real Time System II (TaKaRa, Shiga, Japan)を用いて行った。得られたデータを野生型の Mock 処理の値を用いて標 準化した。ポリユビキチン遺伝子である UBQ10 (At4g05320) (Czechowski et al., 2005)をリファレンス遺伝子として用いた。PCR のプログラムは、はじめ に 95 °C で 30 秒の後 95 °C で 5 秒、60 °C で 30 秒を 40 サイクル行った。 用いたプライマー配列:

UBQ10(At4g05320) forward 5'-GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG-3' reverse 5'-AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT-3'

PDF1.2(AT5G44420) forward 5'-TTTGCTGCTTTCGACGCAC-3' reverse 5'-CGCAAACCCCTGACCATG-3'

4.2.2 試薬

チュベロン酸は先行研究に従い合成した(Kiyota et al., 2001; Asamitsu et al., 2006; Nakamura et al., 2008)。JA-Ile についても先行研究に従い合成した(Kramell et al., 1988)。(±)-JA、MeJA、ABA、GA₃は Wako(Osaka, Japan)から購入した。4-Methylthiobutylglucosinolate(ChromaDex, CA, USA)、GA₁、GA₄、GA₈、GA₉、GA₂₀(Olchemim, Olomouc, Czech Republic) についても市販品を用いた。

4.2.3 植物体育成条件

遺伝子発現解析用には発芽後 10 日目の植物体を用いた。10~15 個の種を 30 ml の 1%スクロースが含まれた MS 培地が入った 100 ml フラスコ中で 20-36 µmol m-2s-1の光を当てて 130 rpm で旋回培養した。植物体を 20 µM MeJA もしくは 20 µM GA₃ で処理し、それぞれの期間培養した後にサンプリングした。 サンプリングした植物体は解析に用いるまで液体窒素で凍結したのちに-80 °C で保存した。ジャスモン酸感受性実験では発芽後 4 週間 50 µM MeJA、0.8%ア ガー、1% スクロースを含んだ MS 培地上で 30-55 µmol m-2s-1 の強さの光を 与えて育成した。成熟した植物体は 0.8%アガーを含んだ MS 培地上で育成後土 壤に移し、成熟するまで 22 °C で光を当て続けて育成した。花芽へのホルモン 処理実験では、成熟した植物体の花芽に 50 µM GAs、50 µM MeJA、50 µM JA-Ile を 2 日おきに 2 週間処理し続けた。

4.2.4 GUS レポーターによる局在解析

GTR1の開始コドン直後から 2000 bp のゲノム配列を以下のプライマーを用いて増幅した。

forward 5'-TGATTACGCCAAGCTTGGTTCTTAGACTGGCGAG-3' reverse 5'-ACCTGCAGCCAAGCTTGTCAAGCTTCTCCGCTC-3'

その後、プラスミドベクターpCambia1391Z ヘクローニングした。作製した コンストラクトを Columbia-0 \land Agrobacterium tumefaciens を用いた手法で 形質転換した (Berberich et al., 2008)。GUS 染色は 2 mM X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-glucuronide)、0.5 mM K₄Fe(CN)₆、0.5 mM K₃Fe(CN)₆、0.3% (v/v) Tween20、50 mM NaPO₄ (pH 7.4)を用いて 16 時間行 った。反応を停止後、70% ethanol で脱染色した (Jefferson et al., 1987)。ホル モン応答の解析には染色を始める 3 時間前に 20 μ M MeJA を処理した。

4.2.5 アフリカツメガエル卵母細胞を用いた GTR1 の輸送活性測 定

GTR1の塩基配列を以下のプライマーを用いて増幅した。

forward 5'- TATTAAGCTTGAATTCATGAAGAGCAGAGTCATTCT -3' reverse 5'- CGACCCCGGGGGAATTCTCAGACAGAGTTCTTGTCT -3' そして、プラスミドベクターAtHKT1(Uozumi et al., 2000)の EcoRI 認識部 位へクローニングした。*GTR2* は以下のプライマーを用いて増幅した。

forward 5'-AAGCTTGAATTCCCCCGGGATGGAGAGAAAGCCTCTTG-3' reverse 5'-GGATCCGTCGACCCCGGGTCAGGCAACGTTCTTGTCT-3' そして、Smal 認識部位へクローニングした。NPF4.1 は以下のプライマー

を用いて増幅した。

forward 5'-AAGCTTGAATTCCCCCGGGATGCAGATTGAGATGGAAG-3' reverse 5'-GGATCCGTCGACCCCGGGCTAATATCTTTTCGCCCAG-3'

そして、SmaI 認識部位へクローニングした。それぞれの遺伝子の cRNA を mMESSAGE mMACHINE kit (Life Technologies, MD, USA)を用いて合成し た。卵母細胞の準備と cRNA の注入は先行研究の通り行った(Uozumi et al., 2000)。それぞれの卵母細胞へ 500 ng の cRNA を注入した。24 時間もしくは 48 時間の培養の後、緩衝液をそれぞれの基質を含んだ kulori-based solution(Uozumi et al., 2000) (90 mM sodium gluconate、1 mM potassium gluconate、1 mM calcium gluconate、1 mM magnesium gluconate、1 mM LaCl₃、10 mM MES, pH 5)へ置換し、卵母細胞をさらに 24 時間培養した。Km 値を算出するために、2 個の卵母細胞を cRNA 注入後 24 時間培養したのちに GA₃ (1、10、30、60、100、300、1000、2000 µM)を含んだ Kulori-based buffer (pH 5)で処理し、17 °C で 24 時間培養した。その後、卵母細胞を 200 mM sorbitol solution で 2 回洗浄し、40 µl extract buffer (28% methanol, 0.05% acetic acid)でホモジェナイズし、4 °C で 24 時間培養した。室温で 20 分間遠 心分離(20,000 × g)したのちに 10 µl のサンプルを UPLC/TOFMS による質量分 析 (Saito et al., 2014) に用いた。

4.2.6 EGFP 結合タンパク質を用いた GTR1 の細胞内局在解析

GTR1の終止コドンを改変し、Sall 認識配列を付与したプライマーを用いて 増幅した。

forward 5'-TACAATTACAGTCGACATGAAGAGCAGAGTCATTCT-3' reverse 5'-ATCCTCTAGAGTCGACGACAGAGTTCTTGTCT-3'

この認識部位は *GTR1-EGFP*結合コンストラクトのコドンフレームが合うよ うに設計されている。作製したコンストラクト(*35S:GTR1-EGFP*-pUC18)と 空ベクター *35S:EGFP*-pUC18 をタマネギ表皮細胞にパーティクルガン (PDS-1000/He; Bio-Rad, CA, USA)でうちこみ、このコンストラクトを発現さ せた。22 °C で 12 時間暗条件で培養したのちに GFP による蛍光を共焦点顕微 鏡(Leica; DM2500)を用いて観察した。

4.2.7 植物ホルモン含量の定量

花器官の成長ステージは先行研究を参照した(Smyth et al., 1990)。花器官を 3 種類のステージ(12-14)に分け、4~6週間土壌で育成した植物体から 3 日おき に花器官を採取した。採取したそれぞれのステージにおける花器官サンプル (>500 mg 新鮮重)を液体窒素で凍結し、解析まで-80 °C で保管した。先行 研究の通り、サンプルを凍結乾燥し、1 % (v/v) acetic acid を含んだ 80% (v/v) アセトンを用いてジベレリン類を抽出し、LC-MS/MS による解析に用いた (Yamaguchi et al., 2014)。

4.3 結果

4.3.1 GTR1によるジャスモン酸イソロイシンとジベレリンの輸送

先行研究によって GTR1/NPF2.10 とそのホモログである GTR2/NPF2.11 が シロイヌナズナにおける主要な防御物質であるグルコシノレートに対して取り 込み活性を有するという事がアフリカツメガエル卵母細胞を用いた解析によっ て示された(Nour-Eldin et al., 2012)。さらに、gtr1gtr2二重変異体は種子に おけるグルコシノレート蓄積が起こらず、葉やさやなどの供給源の組織におい て過剰にグルコシノレートの蓄積が起こることが報告されている(Nour-Eldin et al., 2012)。しかし、これまで示した gtr1 における様々な表現型はグルコシ ノレート輸送活性が失われた事だけでは説明ができない。近年の研究により、 GTR1/NPF2.10 と同じ輸送体ファミリー(NRT1/PTR Family, NPF)に属する NRT1.1/ NPF6.3 がオーキシンのトランスポーターであることが示された (Krouk et al., 2010)。さらに、同じく NPF ファミリーに属する AIT1/NPF4.6 がアブシジン酸輸送体であることも明らかとなった(Kanno et al., 2012)。この 研究では、もう一つの NPF タンパク質である AIT3/NPF4.1 がアブシジン酸と ジベレリンを輸送する活性を有する事も報告されている。これら先行研究から、 GTR1/NPF2.10 が局在する細胞膜において何らかの植物ホルモンを輸送する 事が予測された(図 4-3-1-1)。加えて、gtr1 が雄ずいの発達に異常がみられ 稔性が低下していたことから(図 3-3-4-1 b)、雄ずいの発達を制御する植物 ホルモンであるジャスモン酸、もしくはジベレリンを GTR1 が輸送する事が示 唆された(Peng et al., 2009; Wasternack et al., 2013; Thines et al., 2013)。そ こで、私はアフリカツメガエルの系を用いて複数の植物ホルモンに対する GTR1 の取り込み活性を解析した(図 4-3-1-2)。JA、GA₃、ABA、JA-Ile、 TA(Wasternack et al., 2013)を GTR1 を発現させた卵母細胞の外側に同時に加 えたところ、GA3と JA-Ile が細胞内に蓄積したが、その他のホルモンの蓄積は 見られなかった(図 4-3-1-2 a)。GA3 は AIT3/NPF4.1 を発現させた卵母細胞 にも蓄積し(図 4-3-1-3 a)、菅野らによる報告と一致した(Kanno et al., 2012)。GTR1 による基質の取り込みを GA3 濃度の飽和曲線としてプロットし たところ、Michaelis-Mentenの式と合致し、結合定数は 301.25 ± 225.46 µM であった(図 4-3-1-4)。さらに、GTR1 と高い親和性が報告されているグル コシノレートの一つ 4-methylthiobutyl glucosinolate (4MTB)(Nour-Eldin et

44

al., 2012)と複数の植物ホルモンを同時に GTR1 を発現させた卵母細胞に処理 し、それらの取り込み活性を定量した。その結果、卵母細胞に対して 4MTB の 特異的な取り込みが見られた(図 4-3-1-2 b)。これら結果から、GTR1 はグ ルコシノレート非存在下において GA₃ と JA-Ile を細胞内に取り込むが、これ らホルモンと比較して 4MTB は優先的に輸送される事が示された。



図 4-3-1-1 GTR1の細胞内局在

タマネギ表皮細胞中で GTR1-EGFP 結合タンパク質もしくは EGFP のみを一 過的に発現させ、0.8 M mannitol を処理して原形質分離を誘導し、共焦点顕微 鏡を用いてその蛍光を撮影した。GTR1-EGFP 結合タンパク質を発現した表皮 細胞の蛍光像(a)と明視野像(c)を示した。EGFP のみを発現した表皮細胞をコン トロールとして用いた(b、d)。スケールバー= 100 μ m。



図4-3-1-2 アフリカツメガエル卵母細胞を用いたGTR1による植物ホル モン輸送活性の測定。

(a)GTR1を介した植物ホルモンの輸送。cRNA注入後24時間培養した卵母細胞 を100 μ M JA、100 μ M TA、100 μ M JA-IIe、100 μ M ABA、100 μ M GA₃を 含んだkulori-based buffer (pH 5.0)で処理し、17 °Cで24時間培養した。卵母 細胞をsorbitol solutionで洗浄した後に抽出培地中でホモジェナイズし、4 °C で24時間培養した。遠心分離後、上清をUPLC/TOFMSで解析した。卵母細胞 に水のみを注入した卵母細胞をControlとした(± SD、n=8 (control)、 n=9(GTR1))。*p < 0.05、Studentのt検定による。

(b) 100 μ Mの4MTB存在下におけるGTR1の輸送活性(±SD、n=17)。*p < 0.05、
 NS = not significant (p > 0.05)、Studentのt検定による。



図 4-3-1-3 アフリカツメガエル卵母細胞を用いたNPF4.1とGTR1による 植物ホルモン輸送活性の測定。

(a) cRNA注入後24時間培養した卵母細胞を100 μ M GA₃を含んだkulori-based buffer (pH 5.0)で処理し、17°Cで24時間培養した。卵母細胞をsorbitol solutionで洗浄した後に抽出培地中でホモジェナイズし、4°Cで24時間培養し た。遠心分離後、上清をUPLC/TOFMSで解析した。卵母細胞に水のみを注入 した卵母細胞をControlとした(± SD、n=5)。*p < 0.05、Studentのt検定に よる。

(b) cRNA注入後24時間培養した卵母細胞を100 μ M GA₁、100 μ M GA₃、100 μ M GA₄、100 μ M GA₈、100 μ M GA₉、100 μ M GA₂₀を含んだkulori-based buffer (pH 5.0)で処理し、17 ° Cで24時間培養した。卵母細胞をsorbitol solutionで 洗浄した後に抽出培地中でホモジェナイズし、4 ° Cで24時間培養した。遠心 分離後、上清をUPLC/TOFMSで解析した。卵母細胞に水のみを注入した卵母 細胞をControlとした(± SD、n=5)。n.d. = not detected。*p < 0.05、NS = not significant (p > 0.05)、Studentのt検定による。



図4-3-1-4 GTR1による GA3輸送の動態学的解析
 pH 5.0における基質取り込み量を GA3を変化させて測定した。飽和曲線は
 Michaelis-Mentenの式に適合した(± SD、n=5)。

4.3.2 gtr1の稔性低下に対するジベレリンの効果

私は GTR1 が生理活性型のジベレリンあるいはジャスモン酸を雄ずいの発達 する期間において輸送すると予測した。しかし、この輸送体の雄ずい発達期間 における真の基質はいまだ不明であった。そこで、gtr1の花芽に 50 µM の GA₃、 JA-Ile、MeJA を処理する事によって稔性の低下を回復させることを試みた。 その結果、JA-Ile、もしくは MeJA を処理しても稔性の回復は見られなかった。 しかし、GA₃を処理したところ明らかにさやの成長がみられ、その結果低下し ていた稔性も回復した(図4-3-2-1 a)。さらに、2 種類のホルモンを組み合 わせて同時処理(MeJA + GA₃ もしくは JA-Ile + GA₃)したが、GA₃のみを処理 した植物体と比較してさやの長さに明確な違いは見られなかった(表 4-3-2-1)。しかし、種子の数に関しては MeJA + GA₃ と JA-Ile + GA₃ の組み合わ せで GA₃ 単独処理に比べて増加した(表 4-3-2-2)。これら結果から、GA₃ は花糸の伸長と葯の開裂を回復するが、JA-Ile や MeJA 単独では gtr1の表現 型に影響はない事が示された(図 4-3-2-1 b)。



図 4-3-2-1 gtr1 の 稔性低下に対する ジベレリンの 効果

(a) *gtr1*の花芽に 50 μ M GA₃、JA-Ile、MeJA をそれぞれ処理した。上段の写 真は地上部を示す。下段はそれぞれのさやを示す。*は表現型が相補されたさや を示す。スケールバー = 10 mm。

(b) ホルモン処理後の gtr1 花器官の表現型。スケールバー = 1 mm (上段)、0.5 mm (下段)。

(c) 50μ M GA₁、GA₄、GA₈を処理した *gtr1* 花器官の表現型。上段は地上部を示す。下段はそれぞれのさやを示す。*は表現型が相補されたさやを示す。スケールバー = 10 mm。

表4-3-2-1 ホルモン処理のさやの長さへの影響

成熟したさやの長さ(mm)を示した。花芽を 50 μ M ジベレリン類、もしくは ジャスモン酸類で処理した。(± SD、n=10)。有意差を表すアルファベットを 示した(p <0.05)。データは Tukey-Kramer の多重検定を用いて解析した。WT * gtr1 は野生型で受粉した gtr1 のさやを示す。

								MeJA	JA-Ile	
treatment	mock	GA ₃	MeJA	JA-Ile	GA ₁	GA ₄	GA ₈	+	+	untreated
								GA ₃	GA ₃	
WT	$10.50 \pm 0.85a$	9.30 ± 0.86	9.95 ± 1.28	10.00 ± 0.91	9.25 ± 1.03	9.50 ± 0.97	9.30 ± 1.01	9.75 ± 0.75	9.45 ± 1.04	-
gtr1	$3.25 \pm 0.63b$	$9.20 \pm 1.23a$	3.30 ± 1.32	3.75 ± 1.55	$8.25 \pm 1.4d$	$11.35 \pm 1.18a$	3.35 ± 0.85	10.45 ± 1.61a	9.70 ± 1.18a	-
aos	2.80 ± 0.26	7.75 ± 1.98	12.05 ± 1.66	-	-	-	-	-	-	-
opr3	3.05 ± 0.37	8.65 ± 0.91	10.25 ± 1.78	-1	-	-	-	-	-	-
WT * gtr1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$12.50 \pm 1.56c$

表4-3-2-2 ホルモン処理の種子の個数への影響

成熟したさやに含まれる種子の個数を示した。花芽を 50 μ M ジベレリン類、 もしくはジャスモン酸類で処理した。(± SD、n=10)。有意差を表すアルファ ベットを示した(p <0.05)。データは Tukey-Kramer の多重検定を用いて解析し た。 WT * gtr1 は野生型で受粉した gtr1 のさやを示す。

								MeJA	JA-Ile	
treatment	mock	GA_3	MeJA	JA-Ile	GA ₁	GA ₄	GA ₈	+	+	untreated
								GA ₃	GA ₃	
WT	$40.3\pm5.9a$	30.5 ± 7.9	29.0 ± 9.7	27.2 ± 8.6	30.8 ± 7.8	28.9± 8.4	30.3 ± 5.5	27.9 ± 4.5	27.3 ± 6.1	-
gtr1	4.6 ± 4.6b	16.1 ± 7.4b	$0.7 \pm 2.2b$	1.0 ± 1.7b	15.5 ± 8.7b	38.9 ± 11.2a	$0.8 \pm 1.8b$	24.1 ±11.4c	$20.5 \pm 6.9c$	-
aos	0 ± 0	0 ± 0	36.9 ± 11.7	-	-	-	-	-	-	-
opr3	0 ± 0	0 ± 0	20.8 ± 10.8	-	-	-	-	-	-	-
WT * gtr1	-	-	-	_	-	-	-	-	_	34 ± 11.2a

4.3.3 GTR1のジベレリン類に対する特異性とジベレリン-ジャス モン酸情報伝達のクロストークにおける意義

GTR1の生理活性型 GA と不活性型 GA に対する特異性を解析した。gtr1の 花芽に対して生理活性型 GA である 50 μ M GA1 と GA4、加えてネガティブコ ントロールとして不活性型 GA である GAsを処理する事によって稔性の回復を 試みた。GA1と GA4の両方が稔性低下を回復させたことから(図4-3-2-1c)、 この輸送体による生理活性型 GA の輸送が雄ずいの発達に対して不可欠な役割 を果たしている事が示唆された。さらに、ジベレリン類の GTR1 輸送活性に対 する特異性をアフリカツメガエル卵母細胞の系を用いて解析した。GTR1 は GA3 のみに輸送活性を有する事が分かった(図4-3-1-2、図4-3-1-3)。 これら結果から GTR1 は生理活性型 GA を輸送する事で雄ずいの発達を促進す る事が示唆された。

さらに、ステージ 12-14 における花器官の GA₁ と GA₄ の含量を定量した。 GA₁ と GA₄ はそれぞれ野生型と *gtr1* において花器官の発達が進むにつれて含 量が低下したが、それぞれのステージにおける *gtr1*の GA 含量は野生型と比 較して有意に低かった(図 4-3-3-1)。このことから、生理活性型 GA の供給 が *gtr1* において損なわれている事が示された。

GTR1 の発現が MeJA によって早期に誘導されたことから(図 3-3-2-1)、 雄ずいの発達においてジャスモン酸情報伝達がジベレリン情報伝達の上流にあ る事が示唆された。花器官の発達期間においてジベレリンとジャスモン酸の関 係性を明らかにするために、JA 合成が失われた変異体である aos と opr3 に GA3を処理する事によって雄性不稔を回復させることを試みた。これら変異体 の雄性不稔の表現型は MeJAを処理する事によって回復する事が報告されてい る(Thines et al., 2013)。その結果、GA3処理を行った aos と opr3のさやは次 第に膨らんだが、さやの中には成熟した種子は見られなかった(図 4-3-3-2)。 これら結果から、ジャスモン酸情報伝達経路は雄ずいの発達にとって必要であ り、GA3は部分的に花器官の発達における失われたジャスモン酸の機能を回復 させたものの、予想される GA 情報伝達経路は JA 情報伝達経路とは独立した ものである事が示された。



図 4-3-3-1 gtr1 の花器官における GA₄と GA₁の定量

WT と変異体の花器官をそれぞれ特定のステージにおいて採取した。平均した定量結果を示した(\pm SD)。*p < 0.05、NS = not significant (p > 0.05)、Studentのt-testによる。



図 4-3-3-2 ジャスモン酸生合成変異体におけるジベレリンとジャスモン 酸の効果

(a) aos の花芽に 0.02% エタノール(mock)、もしくは 50 μ M MeJA、50 μ M GA₃ を処理した。上段の写真は地上部を示す。下段はそれぞれのさやを示す。*は表 現型が相補されたさやを示す。スケールバー = 10 mm。

(b) *opr3*の花芽に 0.02% エタノール(mock)、もしくは 50μ M MeJA、 50μ M GA₃を処理した。上段の写真は地上部を示す。下段はそれぞれのさやを示す。* は表現型が相補されたさやを示す。スケールバー = 10 mm。

(c) ホルモン処理によって相補された aos のさや。*は表現型が相補されたさや を示す。スケールバー = 1 mm。

第5章 結論と展望

第2章の研究による酵母ツーハイブリッド法を用いた解析によってJAM1 がJAZファミリータンパク質と相互作用する事が示された(図2-3-1)。JAM1 のN末端領域とJAZ3が相互作用したことから(図2-3-1E)、この領域中に JAZが相互作用するモチーフが含まれる事が分かった。MYC2のN末端領域(Y⁹³ からE¹⁶⁰)はMYC2とJAZファミリータンパク質の相互作用に必要である(図2 -3-1F)(Fernandez-Calvo et al., 2011)。この領域はMYC2からMYC4、さら にJAM1とJAM2にも保存された複数のアミノ酸残基を含むが、JAM3には含ま れなかった(図2-3-1F)。酵母ツーハイブリッド法を用いた解析によって JAM3はいずれのJAZとも相互作用しなかったことからこれらアミノ酸残基が JAZファミリータンパク質とJAM転写因子の相互作用にかかわっている事が示 唆された。

JAZファミリータンパク質はJasモチーフを含むC末端領域を介してbHLHと 相互作用し、さらにこの領域はCOI1とも相互作用する(Song et al., 2013; Chini et al., 2009; Melotto et al., 2008; Katsir et al., 2008)。JA-Ileに依存してCOI1 とJAZは複合体を形成し、やがてJAZファミリータンパク質は分解される。し たがってCOI1と相互作用する領域を除いたJAZは安定に存在する事ができ、そ れゆえジャスモン酸応答性遺伝子の発現を抑制し、MYC2などの転写活性をブ ロックする事でジャスモン酸応答も抑制すると考えられる(Chini et al., 2007; Thines et al., 2007)。複数のJAZファミリータンパク質がJAM1やJAM2と相互 作用したことから(図2-3-1)、JAZとJAMが物理的に相互作用する事でJAM の転写抑制因子としての機能を阻害している事が示唆された。JAMとJAZファ ミリータンパク質が同じ細胞に共局在するかどうかは明らかになっていない。 よって、今後これらタンパク質間の相互作用を*in vivo*で行う必要がある。

JAZ遺伝子の発現はMYC2、MYC3、MYC4によって誘導され、JAM遺伝子の 発現は部分的にMYC2依存である(Chini et al., 2007; Fernandez-Calvo et al.,2011; Sasaki-Sekimoto et al., 2013)。JAM転写因子はジャスモン酸応答遺 伝子の発現を負に制御するにもかかわらず、この効果はJAZ遺伝子に対しては 比較的弱かった(図2-3-2)。MYC2はJAZとJAM遺伝子の発現を同時に誘導 するが、新規に合成されたJAZやJAMはジャスモン酸情報伝達を負に制御する。 3つのJAM転写因子が相乗的な効果を持っているにもかかわらず、JAM3は JAM1、JAM2と異なっていずれのJAZとも相互作用せず、ジャスモン酸処理後 の発現プロファイルも異なっていた(図2-3-1, Sasaki-Sekimoto et al., 2013)。JAM3のジャスモン酸応答性遺伝子を負に制御する転写活性はJAZファ ミリータンパク質との相互作用ではなく、JAM3自身の転写量によって制御さ れている事が示唆された。

本研究では酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングを行い、JAM1が JAM3と相互作用する事が明らかとなった。一つの可能性として、JAM3の JAM1やJAM2とのヘテロ2量体がJAM3の転写活性を調節している事があげら れる。JAM3は安定的にほとんどの組織で発現していることから (Genevestigator,https://www.genevestigator.com/gv/)(Hruz et al., 2008)、 JAM3タンパク質はJA-Ileの蓄積が起こるストレス因子の存在下、あるいは非 存在下でも安定である事が示唆された。

JAM1とJAM2の発現はMeJA処理によって早期に誘導されることから (Sasaki-Sekimoto et al., 2013)、新規に合成されたJAM1やJAM2がそれぞれ JAM3とヘテロ2量体を形成し、この相互作用がJAMタンパク質複合体の転写不 活性化因子としての機能を促進している事が示唆された。

本研究により、JAZファミリータンパク質がJAM転写因子の負の制御因子で ある事が示唆された。MYC2やMYC3、MYC4とは異なり、JAM転写因子は転 写不活性化因子である(Nakata et al., 2013 A; Nakata et al., 2013 B)。それゆ え転写不活性化因子としてのJAM転写因子とJAZファミリータンパク質との相 互作用による効果を明らかにすべきである。JAM転写因子によって制御される ジャスモン酸情報伝達経路の詳細な分子メカニズムを理解するためには、さら なるJAMとの相互作用因子探索が必要である。

第3章、第4章の研究により、gtr1 は GTR1/NPF2.10 の欠損体であり、ジャスモン酸とジベレリンの機能に関連した様々な表現型が特に雄ずいの発達過

程においてみられる事が明らかとなった。これら証拠に基づいて、私は GTR1 が雄ずいの発達を誘導する生理的に重要な物質を輸送する事によって、花糸の 伸長や葯の開裂を正に制御していると予想した。GTR1 は先にグルコシノレー トの輸送体として特定された(Nour-Eldin et al., 2012)。しかし、主要なグルコ シノレートである 4MTB を gtr1 の花芽に処理しても稔性の低下は相補できな かった(表 5-1、表 5-2)。さらに、GA3 や MeJA と 4MTB を同時に処理して も gtr1 の稔性に 4MTB の効果は見られなかった(表 5-1、表 5-2)。このこ とから、gtr1 の雄ずいにおける表現型はグルコシノレートの輸送が失われたこ とによるものではなく、ホルモンの輸送が失われたため見られたことが示唆さ れた。 表 5-1 グルコシノレート及びホルモン処理のさやの長さへの影響

成熟したさやの長さ(mm)を示した。花芽を 50µM 4MTB、50µM ジベレリン 類、もしくはジャスモン酸類で処理した。(±SD、n=10)。有意差を表すアルフ アベットを示した(p <0.05)。データは Tukey-Kramer の多重検定を用いて解析 した。

treatment	mock	4MTB	$4MTB + GA_3$	4MTB + MeJA	4 MTB + MeJA + GA $_3$
WT	10.50 ± 0.85a	9.40 ± 3.30a	9.20 ± 1.23a	9.40 ± 1.02a	9.40 ± 0.94a
gtr1	3.25 ± 0.63b	3.10 ± 1.5b	9.85 ± 1.06a	3.15 ± 1.38b	9.75 ± 1.55a

表 5-2 グルコシノレート及びホルモン処理の種子の個数への影響

さやに含まれる種子の個数を示した。花芽を 50µM 4MTB、50µM ジベレリン類、もしくはジャスモン酸類で処理した。(±SD、n=10)。有意差を表すアルファベットを示した(p <0.05)。データは Tukey-Kramer の多重検定を用いて解析した。

treatment	mock	4MTB	$4MTB + GA_3$	4MTB + MeJA	$4MTB + MeJA + GA_3$
WT	40.3 ± 5.9a	38.6 ± 3.3a	34.4 ± 4.0a	38.0 ± 4.3a	34.1 ± 5.2a
gtr1	$4.6 \pm 4.6b$	2.8 ± 3.2b	20.7 ± 7.9c	2.2 ± 3.2b	30.8 ± 7.8d

生理活性型と不活性型のジャスモン酸両方について GTR1 による細胞内取り 込み活性を定量したが、生理活性型である JA-Ile のみに取り込み活性が見られ た(図 4 - 3 - 1 - 2 a)。しかし、gtr1 の花芽に JA-Ile を処理したが、低下した 稔性は回復しなかった(図4-3-2-1 a)。GTR1 はジベレリン類に関しては生 理活性型である GA3のみを輸送するが(図 4 - 3 - 1 - 3 b)、GA3に加えて他の生 理活性型である GA₁や GA₄も gtr1の表現型を回復させた(図 4-3-2-1)。特 に GA4 は完全に低下していた稔性を回復させた(表 4 - 3 - 2 - 1、表 4 - 3 - 2 -2)。in vivoにおける GTR1 の基質は未だ不明であると考えられる。アフリカ ツメガエル卵母細胞において GTR1 は GA3 のみを有意に輸送したが、GA4 は GTR1の発現が無くても卵母細胞に取り込まれた(図4-3-1-3b)。GA4は他 のジベレリン類と比較して疎水的であり、細胞膜を通して単なる拡散によって 卵母細胞に取り込まれた事が考えられた。加えて、受動的な拡散の影響がアフ リカツメガエル卵母細胞では大きく、輸送体依存の GA4 取り込みが見掛け上検 出できなかった事が示唆された。最近の研究により、転写後の修飾が硝酸輸送 体の基質特異性を変化させることが明らかになった(Liu et al., 2003)。このよ うな修飾は in vivo において GTR1 の基質特異性を変化させている可能性があ る。GTR1 が GA3 や JA-Ile を卵母細胞中で輸送する事が明らかとなったが、 gtr1の稔性異常との関係性は未だ不明な点が多い。花器官の発達期間における GTR1の in vivoでの基質を今後の研究により特定することが重要である。

生理活性型ジベレリンの合成は花芽形成の期間に合成される(Plackett et al., 2011)。花器官の形成がステージ 7 まで進行したのちに、活性型ジベレリンの 重要な合成酵素である GA3ox が雄ずいにおいて発現する(Plackett et al., 2011)。非常に高濃度の活性型ジベレリンがイネの葯に存在するが、その他の 花器官では高濃度の活性型ジベレリンは検出されない(Hirano et al., 2008; Kanno et al., 2010)。このことから、葯のタペート組織が花におけるジベレリ ン類の供給源として機能する事が示唆された。私の解析により、GA1と GA4の 含量は花器官形成のステージ 12 から 14 にかけて野生型、gtr1ともに減少する 事が明らかとなった(図4-3-3-1)。ジベレリン不活性化経路は成長シグナル によって厳密に制御されており(Yamaguchi et al., 2008)、葯において蓄積した 活性型ジベレリンは花器官発達のステージが進行するにつれて不活性化され、 その結果花器官全体の活性型 GA の低下をもたらしたと考えられる。GTR1 は ステージ 14 の花糸において発現していたが(図3-3-4-3)、GTR1 は活性型 GA を葯から花糸をはじめとしたその他花器官組織へ輸送する事が示唆される。 私は活性型 GA の輸送は gtr1 において損なわれており、活性型 GA は通常より 素早く gtr1 の葯において不活性化され、花器官全体における生理活性型 GA 含 量が野生型と比較して減少したと考えた(図4-3-3-1)。

 GA_4 (もしくは GA_1)がシロイヌナズナにおける GTR1の真の基質であると 考えられ、実際 GA_4 が主に機能する組織と考えられるステージ 13-14の花糸(図 3-3-4-3)へのホルモン供給が減少したことにより花糸の伸長に異常が起 こったと示唆された。しかし、花器官形成時の生理活性型 GAの局在は今後解 析する必要がある。 GA_1 と GA_4 はシロイヌナズナにおいて主要な活性型 GAで あることから(Plackett et al., 2011)、gtr1の雄ずいにおける表現型は葯などの 供給源から GA_1 や GA_4 の供給が特異的に損なわれた事によるものであると考 えられた。

GTR1 は活性型 GA を輸送したが、gtr1 の表現型は稔性に関するものを除い て野生型とほぼ同等であったことから、その他のジベレリン輸送体が存在する と考えられる。GTR2 /NPF2.11 は GTR1 に一番近いホモログであるが、これ も GA₃を細胞内に輸送する活性があった(図 5-3)。この結果と、AIT3/NPF4.1 が高い GA 輸送活性を持つことから、NPF2.11 と NPF4.1 を含めた複数の NPF タンパク質(Leran et al., 2013)が花器官形成以外の成長過程においてジベレリ ンを輸送していると考えられ、そのため gtr1gtr2 の二重変異体において重大な 成長異常が見られなかったと考えられる(Nour-Eldin et al., 2012)。一方で、花 器官において GTR1 が特異的に発現することで(図 3-3-4-3)、雄ずいの発 達過程において GTR1 の限定的な機能をもたらす。ジャスモン酸とジベレリン の効果は種子の形成においては相乗的であると考えられる(表4-3-2-2)。 JA 合成が破壊された変異体である aos や opr3 は花芽への GA₃ 処理によってさ やの肥大化が誘導されたが、成熟した種子は得られなかった(図4-3-3-2a, b, c)。それゆえジベレリンとジャスモン酸は花器官発達過程におけるそれぞれ の機能のみを限定的に相補し、ジベレリン情報伝達は単にジャスモン酸情報伝 達の下流で機能している訳ではないと考えられる。むしろ、これら2つの情報 伝達の機能は並行して存在し、花器官の発達過程において協調的に機能する。 GTR1は花糸において発現し、特にステージ13-14で維管束において発現して いることから(図 4-3-3-2 d·f)、GTR1 はジベレリンを維管束から細胞内へ

63

輸送する事が示唆された。それゆえ、取り込まれたジベレリンは細胞の肥大化 を促進する事でステージ 13-14 における花糸の伸長をもたらすと考えられた。 一方で、GTR1 はタペートやその周辺部といった葯が開裂する際に力学的圧力 をもたらす組織において発現が低下していた。花糸の伸長はジベレリンによっ て制御され、葯の開裂は主にジャスモン酸によって制御されていると考えられ る。これら知見から、私は GTR1 が花糸へジベレリンを供給する事により雄ず いの発達を促進していると結論付けた。



図 5-3 アフリカツメガエル卵母細胞を用いた GTR2 による植物ホルモン輸送活性の測定。

(a) cRNA 注入後 24 時間培養した卵母細胞を 100µM 4MTB、100µM JA、100µM TA、100µM JA-Ile、100µM ABA、100µM GA₃を含んだ kulori-based buffer (pH 5.0)で処理し、17°C で 24 時間培養した。卵母細胞を sorbitol solution で洗浄した後に抽出培地中でホモジェナイズし、4°C で 24 時間培養した。遠心分離後、上清を UPLC/TOFMS で解析した。卵母細胞に水のみを注入した卵母細胞を Control とした (± SD、n=6)。*p < 0.05、Student の t 検定による。

GTR1のGA輸送機能に加えて、GTR1はグルコシノレート(Nour-Eldin et al., 2012)、JA-Ile を含めた複数の分子を輸送し、様々な生理現象において機能していると考えられる。明らかに、GTR1 はジャスモン酸情報伝達においても機能している(図3-3-2-1、図3-3-3、図3-3-2-3、図5-4)。gtr1の変異はジャスモン酸応答の指標である根の伸長を MeJA 処理時に促進している(図5-4)。SAG20は gtr1において、MeJA 処理時に野生型と比較して高い発現を示した(図3-3-3)。gtr1の葉においては GTR1 依存のホルモン輸送が損なわれており、ストレス誘導性の老化が促進され、褐色化する表現型がみられたと考えられた。SAG12の発現がジャスモン酸未処理の葉において誘導されていた事は原因が分からないが、gtr1における内生のホルモンレベルの制御異常によって老化が誘導された事が示唆された。





図 5-4 MeJA処理後の野生型とgtr1における根の伸長

(a)植物体を1% スクロースと0.02%エタノールを含んだMS培地上で7日間育成 した。スケールバー = 10 mm。

(b) 植物体を1% スクロースと20µMMeJAを含んだMS培地上で7日間育成した。 スケールバー = 10 mm。

(c)野生型と gtr1 の根の長さを示す。mock (0.02% ethanol) もしくは 20µM MeJA を含んだ MS 培地上で 7 週間育成後に主根の長さを測定し、その平均値 を算出した (± SD、n = 10)。NS = not significant (p > 0.05)、*p < 0.05、 Student の t 検定による。
ジベレリンは野生型において単独で PDF1.2の発現を誘導したが、gtr1では この誘導が見られなかった(図5-5)。gtr1の変異が PDF1.2の発現にもたら す影響をジベレリン、もしくはジャスモン酸を処理して比較したところ、野生 型において GA3は MeJAよりも強く PDF1.2の発現を誘導したが、gtr1におい てはこの発現誘導が見られなかった。このことから、gtr1では標準的な葉にお けるジベレリン輸送が損なわれており、ジベレリンの供給が行われない事で PDF1.2の発現誘導が見られなかったと考えられた。

第5章



図 5-5 gtr1 における PDF1.2 の発現

発芽後 10日間液体 MS 培地中で旋回培養したシロイヌナズナ野生型、gtr1 を 0.02% ethanol (mock)、20 μ M MeJA、もしくは 20 μ M GA₃ で 24 時間処理 し、定量 RT-PCR に用いた。UBQ10 をリファレンス遺伝子として用い、野生 型の mock 処理 0 時間の値で標準化した (± SD、n=3)。p < 0.05、 NS = not significant (p > 0.05) Tukey-Kramer の多重検定による。

(Saito	et	al.,	2014)

69

ジベレリン輸送の損失はジャスモン酸誘導性の老化に関する表現型にも影響 していると考えられる。実際、ジベレリン情報伝達が損なわれた pif 四重変異 体はジャスモン酸応答に異常がみられることから(Yang et al., 2012)、gtr1の ジャスモン酸高感受性の表現型はジベレリン輸送が損なわれたことによっても たらされたと考えられ、ジベレリン-ジャスモン酸の情報伝達ネットワーク間 のクロストークに影響している事が示唆された(Hou et al., 2010; Hong et al., 2012; Yang et al., 2012)。しかし、GTR1 が介在する JA-Ile 輸送はこれらジャ スモン酸関連の機能において根本的に重要であると考えられる。GTR1 は地上 部、根、成長点で見られ(図 5-6)、先行研究では GTR1 は老化した葉で発現 し、GTR1の主要な基質であるグルコシノレートが老化した葉から種子へ輸送 される事が報告されている(Nour-Eldin et al., 2012)。それゆえ、GTR1 はホル モン輸送を行う事によって葉において老化プロセスを制御しているかもしれな い。本研究により、GTR1/NPF2.10が構造的・機能的に異なる複数の基質を輸 送する複合的機能を有する輸送体である事を示した。雄ずいの発達と雄性稔性 はジャスモン酸とジベレリンによって厳密に制御されているが、このプロセス において GTR1 はジベレリンを供給する重要な役割を担っている事が本研究に より明らかとなった。この結果は、基質の分配はこの複合的機能を有する輸送 体の活性において重要な因子であり、GTR1 が栄養組織においてもホルモンを 輸送する機能を有する事が示唆された。



図 5-6 GUS レポーターを用いた GTR1 の局在解析

ProGTR1:GUS 遺伝子を形質転換した植物体を MS 培地上でそれぞれの期間培養し、GUS 染色を行う 3 時間前に 20µMMeJA で処理した。

スケールバー = 1 mm (3 days (d)、5 d)、10 mm (7 d、10 d)。

(Saito et al., 2014)

上述したとおり本研究ではジャスモン酸の早期応答性遺伝子に着目し、まず 早期応答性の転写因子 JAM1・JAM2 と JAZ タンパク質の相互作用を明らかに した。JAZ タンパク質が MYC2 の転写活性を抑制するのと同様に JAM1 と JAM2 に関してもタンパク質間相互作用を介してそれらの転写活性を抑制する と考えられた。JAZ・bHLH型転写因子間、また bHLH型転写因子間の相互作用 状況の把握などジャスモン酸情報伝達の分子メカニズムの全容解明に向けて未 だ検証されるべき事は多々残っているが、それら制御機構に関する研究が本研 究をもとにより進展する事を期待する。次に、ジャスモン酸早期応答性 NPF タンパク質である GTR1 が構造的に異なる基質であるグルコシノレート、ジャ スモン酸イソロイシン、ジベレリンを輸送する複合的機能を有する輸送体であ ることを特定し、その中でもジベレリンの供給を介して雄ずいの発達を促進す る事を明らかにした。花器官形成において協調的な役割を果たすジベレリンー ジャスモン酸の情報伝達クロストークの詳細解明、GTR1 が JA・IIe を輸送する 活性を持つ事から花器官以外における GTR1 のジャスモン酸供給因子としての 機能解析が、本研究を基盤としてより進展する事を期待する。 Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J. & Ram, S.J. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11, 36-42 (2004).

Acosta, I. F. & Farmer, E. E. Jasmonates. *The Arabidopsis book* (eds Somerville, C. R & Meyerowitz, E.M.) doi: 10.1199-tab.0129 (American society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, 2010).

Adachi, S., Nobusawa, T. & Umeda, M. Quantitative and cell type-specific transcriptional regulation of A-type cyclin-dependent kinase in Arabidopsis thaliana. *Dev. Biol.* 329, 306-314 (2009).

Ainai, T., Matsuumi, M., & Kobayashi, Y. Efficient total synthesis of 12-oxo-PDA and OPC-8: 0. *J Org Chem.* 68(20), 7825-7832 (2003).

Almeida, J. *et al.* Fruits from ripening impaired, chlorophyll degraded and jasmonate insensitive tomato mutants have altered tocopherol content and composition. *Phytochemistry* (2014) [Epub ahead of print].

Asamitsu, Y., Nakamura, Y., Ueda, M., Kuwahara, S., & Kiyota, H. Synthesis and odor description of both enantiomers of methyl 4,5-didehydro- jasmonate, a component of jasmin absolute. *Chem. Biodivers.* 3, 654–659 (2006).

Berberich, T., Takahashi, Y., Saitoh, H. & Terauchi, R. *The Handbook of Plant Functional Genomics* Ch. 6 (eds Kahl, G. & Meksem K.) 113-136 (Wiley, 2008).

Browse, J. & Howe, G. A. New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiol.* 146, 832–8 (2008).

Browse, J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 183-205 (2009).

Cheng, Z. *et al.* The bHLH transcription factor MYC3 interacts with the Jasmonate ZIM-domain proteins to mediate jasmonate response in Arabidopsis. *Mol Plant.* 4, 279-88 (2011).

Cheng, H. *et al.* Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* 131, 1055-1064 (2004).

Chico, J. M., Chini, A., Fonseca, S. & Solano, R. JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Curr Opin Plant Biol.* 11, 486–94 (2008).

Chini, A., Fonseca, S., Chico, J. M., Fernández-Calvo, P. & Solano, R. The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. *Plant J.* 59, 77–87 (2009).

Chini, A. *et al.* The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666-671 (2007).

Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K. & Scheible, W. R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139, 5-17 (2005).

Devoto, A. *et al.* Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol.* 58, 497–513 (2005).

Dombrecht, B. *et al.* MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 2225–45 (2007).

Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., & Turner, J. G.. The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* 14(7), 1557-1566 (2002).

Fan, L. M., Wang, Y. F., Wang, H. & Wu, W. H. In vitro Arabidopsis pollen germination and characterization of the inward potassium currents in Arabidopsis pollen grain protoplasts. *J. Exp. Bot.* 52, 1603-1614 (2001). Farmer, E. E., & Ryan, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4(2), 129-134 (1992).

Fernández-Calvo, P. *et al.* The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* 23, 701–15 (2011).

Fonseca, S., *et al.* (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem Biol.* 5(5), 344-350 (2009).

Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R. & Farmer, E. E. Jasmonate biochemical pathway. *Sci Signal* 3, cm3 (2010).

Gidda, S. K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C., & Varin, L. Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem.* 278(20), 17895-17900 (2003).

Hirano, K. et al. Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice. *Plant Cell Physiol.* 49, 1429-1450 (2008).

Hong, G. J., Xue, X. Y., Mao, Y. B., Wang, L. J. & Chen, X. Y. Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. *Plant Cell* 24, 2635-2648 (2012).

Hou, X., Lee, L. Y., Xia, K., Yan, Y. & Yu, H. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev. Cell* 19, 884-894 (2010).

Hruz, T. *et al.* Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinforma* 420747 (2008).

Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., & Okada, K. The DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell* 13(10), 2191-2209 (2001).

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. & Bevan, M. W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 20, 3901-3907 (1987).

Jiang, Y., Liang, G., Yang, S. & Yu, D. Arabidopsis WRKY57 functions as a node of convergence for jasmonic acid- and auxin-mediated signaling in jasmonic acid-induced leaf senescence. *Plant Cell* 26(1), 230-45 (2014).

Kang, J. *et al.* PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 2355-2360 (2010).

Kanno, Y. *et al.* Comprehensive hormone profiling in developing Arabidopsis seeds: examination of the site of ABA biosynthesis, ABA transport and hormone interactions. *Plant Cell Physiol.* 51, 1988-2001 (2010).

Kanno, Y. *et al.* Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 9653-9658 (2012).

Katsir, L., Chung, H. S., Koo, A. J. K. & Howe, G. A. Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Curr Opin Plant Biol.* 11, 428–35 (2008 A).

Katsir, L., Schilmiller, A. L., Staswick, P. E., He, S. Y. & Howe, G. A. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 7100–5 (2008 B).

Kiyota, H., Higashi, E., Koike, T. & Oritani, T. Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate. *Tetrahedron Asymmetry* 12, 1035-1038 (2001).

Ko, D. *et al.* Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111, 7150-7155 (2014).

Koornneef, M. & Van Der Veen, J. H. Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in Arabidopsis thaliana (L.) *Heynh. Theor. Appl. Genet.* 58, 257-263 (1980).

Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M. & Yanagawa, H. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 10171–6 (2009).

Kramell, R., Schmidt, J., Schneider, G., Sembdner, G., & Schreiber, K. Synthesis of N-(jasmonoyl) amino acid conjugates. *Tetrahedron* 44, 5791–5807 (1988).

Kretzschmar, T. *et al.* A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* 483, 341-344 (2012).

Krouk, G. *et al.* Nitrate-regulated auxin transport by NRT1. 1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev. Cell* 18, 927-937 (2010).

Kuromori, T. *et al.* ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 2361-2366 (2010).

Léran, S. *et al.* A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends Plant Sci.* 19, 5-9 (2013).

Liu, K. H., & Tsay, Y. F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J.* 22, 1005-1013 (2003).

Lorenzo, O., Chico, J. M., Sánchez-Serrano, J. J. & Solano, R. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 1938-1950 (2004).

Mason, H. S., & Mullet, J. E.. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. *Plant Cell* 2(6), 569-579 (1990).

McConn, M & Browse, J. (1996). The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an Arabidopsis mutant. *Plant Cell* 8(3), 403-416.

McDowell, J. M., & Dangl, J. L. (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem Sci.* 25(2), 79-82.

Melotto M, Mecey C, Niu Y, Chung HS, Katsir L, Yao J, Zeng W, Thines B, Staswick P, Browse J, et al. A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant J.* 55, 979–88(2008).

Mousavi, S. A., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., & Farmer, E. E. GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500(7463), 422-426 (2013).

Nakagawa, T. *et al.* Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 31-41 (2007).

Nakamura, Y., Miyatake, R., Inomata, S. & Ueda, M. Synthesis and bioactivity of potassium b-D-glucopyranosyl 12-hydroxy jasmonate and related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72, 2867–2876 (2008).

Nakata, M. *et al.* A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in arabidopsis. *Plant Cell* 25, 1641–56 (2013 A).

Nakata, M. & Ohme-Takagi, M. Two bHLH-type transcription factors, JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE2 and JAM3, are transcriptional repressors and affect male fertility. *Plant Signal Behav.* 8, e26473 (2013 B).

Niu, Y., Figueroa, P., Browse, J. Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in Arabidopsis. *J Exp Bot.* 62, 2143–54 (2011).

Norman-Setterblad, C., Vidal, S., & Palva, E. T. Interacting signal pathways control defense gene expression in Arabidopsis in response to cell wall-degrading enzymes from Erwinia carotovora. *Mol Plant Microbe Interact.* 13(4), 430-438 (2000).

Nour-Eldin, H. H. *et al.* NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature* 488, 531-534 (2012).

Obayashi, T. & Kinoshita, K. Coexpression landscape in ATTED-II: usage of gene list and gene network for various types of pathways. *J Plant Res.* 123 (3), 311-319 (2010).

Obayashi, T. & Kinoshita, K. Rank of correlation coefficient as a comparable measure for biological significance of gene coexpression. *DNA Res.* 16, 249-260 (2009).

Obayashi, T., Nishida, K., Kasahara, K. & Kinoshita, K. ATTED-II updates: condition-specific gene coexpression to extend coexpression analyses and applications to a broad range of flowering plants. *Plant Cell Physiol.* 52, 213-219 (2011).

Park, J. H. *et al.* knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in Arabidopsis due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J.* 31(1), 1-12 (2002).

Pauwels, L. *et al.* Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 1380-5 (2008).

Pelacho, A. M., & Mingo-Castel, A. M.. Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol*. 97(3), 1253-1255 (1991).

Peng, J. Gibberellin and jasmonate crosstalk during stamen development. *J. Int. Plant Biol.* 51, 1064-1070 (2009).

Petrásek, J. & Friml, J. Auxin transport routes in plant development. *Development* 136, 2675-2688 (2009).

Plackett, A. R., Thomas, S. G., Wilson, Z. A. & Hedden, P. Gibberellin control of stamen development: a fertile field. *Trends Plant Sci.* 16, 568-578 (2011).

Pozo, M. J., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. Jasmonates-signals in plant-microbe interactions. *J Plant Growth Regul.* 23(3), 211-222 (2004).

Pré, M. et al. The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol.* 147, 1347-1357 (2008).

Saito, H. *et al.* The jasmonate-responsive GTR1 transporter is required for gibberellin-mediated stamen development in *Arabidopsis. Nat. commun.* (in press).

Sasaki, Y. *et al.* Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Res.* 8, 153–61 (2001).

Sasaki-Sekimoto, Y., Saito, H., Masuda, S., Shirasu, K. & Ohta, H. Comprehensive analysis of protein interactions between JAZ proteins and bHLH transcription factors that negatively regulate jasmonate signaling. *Plant Signal Behav.*9 (1), e27639 (2014).

Sasaki-Sekimoto, Y. *et al.* Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in Arabidopsis. *Plant J.* 44, 653–68 (2005).

Sasaki-Sekimoto, Y. *et al.* Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 163, 291-304 (2013).

Schilmiller, A. L. & Howe, G. A. Systemic signaling in the wound response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 369-377 (2005).

Smyth, D. R., Bowman, J. L., & Meyerowitz, E. M. Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* 2, 755-767 (1990).

Song, S. *et al.* The bHLH subgroup IIId factors negatively regulate jasmonate-mediated plant defense and development. *PLoS Genet.* 9, e1003653 (2013). Staswick, P. E. JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci.* 13, 66–71 (2008).

Staswick, P. E., & Tiryaki, I. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* 16(8), 2117-2127 (2004).

Staswick, P. E., Yuen, G. Y., & Lehman, C. C. Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus Pythium irregulare. *Plant J.* 15(6), 747-754 (1998).

Stintzi & Browse. The Arabidopsis male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97(19), 10625-10630 (2000).

Sun, T. P. Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in Arabidopsis. *The Arabidopsis book* (eds Somerville, C. R & Meyerowitz, E.M.) doi: 10.1199-tab.0103 (American society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, 2008).

Sun, T. P. Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiol.* 154, 567-570 (2010).

Sun, T. P., Goodman, H. M. & Ausubel, F. M. Cloning the Arabidopsis GA1 locus by genomic subtraction. *Plant Cell* 4, 119-128 (1992).

Swain, S. M. & Singh, D. P. Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. *Trends Plant Sci.* 10, 123-129 (2005).

Taki, N. *et al.* 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139, 1268-83 (2005).

Qi, T. *et al.* The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 23(5), 1795-814 (2011).

Thines, B. *et al.* JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOI1 complex during jasmonate signalling. *Nature* 448, 661-665 (2007).

Thines, B., Mandaokar, A. & Browse, J. Characterizing Jasmonate Regulation of Male Fertility in Arabidopsis. *Methods Mol. Biol.* 1011, 13-23 (2013).

Thomma, B. P., Eggermont, K., Penninckx, I. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95(25), 15107-15111 (1998).

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–80 (1994).

Tsuchiya, T. *et al.* Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96(26), 15362-15367 (1999).

Ueda, J., & Kato, J. Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (Artemisia absinthium L.). *Plant Physiol.* 66(2), 246-249 (1980).

Uozumi, N. *et al.* The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na(+) currents in xenopus laevis oocytes and Na(+) uptake in Saccharomyces cerevisiae. *Plant Physiol.* 122, 1249-1259 (2000).

Vick, B. A., & Zimmerman, D. C. The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 111(2), 470-477 (1983).

Wasternack, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot.* 100, 681–97 (2007).

Wasternack, C., Forner, S., Strnad, M. & Hause, B. Jasmonates in flower and seed development. *Biochimie* 95, 79-85 (2013).

Weaver, L. M., Gan, S., Quirino, B., & Amasino, R. M. A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.* 37, 455-469 (1998).

82

Yamagishi, K. *et al.* Jasmonic acid-inducible gene expression of a Kunitz-type proteinase inhibitor in potato tuber disks. *Plant Mol. Biol.* 21(3), 539-541 (1993).

Yamaguchi, N. *et al.* Gibberellin acts positively then negatively to control onset of flower formation in Arabidopsis. *Science* 344, 638-641 (2014).

Yamaguchi, S. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*, 59, 225-251 (2008).

Yan, Y. *et al.* A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* 19, 2470-83 (2007).

Yang, D. *et al.* Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, E1192-1200 (2012).

Yoshihara, T. et al. Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum L.*). *Agric Boil Chem.* 53(10), 2835-2837 (1989).

Zhang, H. *et al.* A DTX/MATE-type Transporter Facilitates Abscisic Acid Efflux and Modulates ABA Sensitivity and Drought Tolerance in Arabidopsis. *Mol. Plant.* (2014).

Zhang, K. *et al.* Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nat. Commun.* 5, 3274 (2014).

Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C. L., Schaller, A., He, S. Y., & Howe, G. A. Virulence systems of Pseudomonas syringae pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J.* 36(4), 485-499 (2003).

関本(佐々木)結子,太田啓之(2006)植物ホルモンの分子生物学 講談社サイエンティフィク 第1章7:89-100.

報文目録

Sasaki-Sekimoto, Y., Jikumaru, Y., Obayashi, T., <u>Saito, H.</u>, Masuda, S., Kamiya, Y., Ohta, H. & Shirasu, K. Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* 163(1), 291-304 (2013).

*Sasaki-Sekimoto, Y., *<u>Saito, H.</u>, Masuda, S., Shirasu, K. & Ohta, H. Comprehensive analysis of protein interactions between JAZ proteins and bHLH transcription factors that negatively regulate jasmonate signaling. *Plant Signaling & Behavior* 9(1), e27639 (2014).

*These authors contributed equally to this article.

Hori, K., Maruyama, F., Fujisawa, T., Togashi, T., Yamamoto, N., Seo, M., Sato, S.,
Yamada, T., Mori, H., Tajima, N., Moriyama, T., Ikeuchi, M., Watanabe, M., Wada, H.,
Kobayashi, K., Saito, M., Masuda, T., Sasaki-Sekimoto, Y., Mashiguchi, K., Awai, K.,
Shimojima, M., Masuda, S., Iwai, M., Nobusawa, T., Narise, T., Kondo, S., <u>Saito, H.,</u>
Sato, R. Murakawa, M., Ihara, Y., Oshima-Yamada, Y., Ohtaka, K., Satoh, M., Sonobe,
K., Ishii, M., Ohtani, R., Kanamori-Sato, M., Honoki, R., Miyazaki, D., Mochizuki, H.,
Umetsu, J., Higashi, K., Shibata, D., Kamiya, Y., Sato, N., Nakamura, Y., Tabata, S.,
Ida, S., Kurokawa, K. & Ohta, H. *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary
factors for plant terrestrial adaptation. *Nature Communications* 5 (2014).

<u>Saito, H.</u>, Oikawa, T., Hamamoto, S., Ishimaru, Y., Kanamori-Sato, M., Sasaki-Sekimoto, Y., Utsumi, T., Chen, J., Kanno, Y., Masuda, S., Kamiya, Y., Seo, M., Uozumi, N., Ueda, M. & Ohta, H. The jasmonate-responsive GTR1 transporter is required for gibberellin-mediated stamen development in *Arabidopsis*. *Nature Communications* (in press). 本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました指導教 員である太田啓之教授に深く感謝しております。辛抱強く、時に厳しくご指導いただき、ま たあたたかく励ましてくださり、辛くも学位論文をまとめる事が出来ました。研究室で学ん だ事を今後の糧にしていきます。研究室所属時から実験の手ほどきをしていただき、研究全 般にわたる多大なるご支援、ご指導を賜りました副指導教員である増田真二准教授に深く感 謝しております。また、本研究を遂行するにあたり終始適切な助言とご指導を賜りました下 嶋美恵助教には深く感謝しております。本論文作成にあたり、審査委員として多くのご助言 をいただきました駒田雅之教授、中村信大准教授、久堀徹教授、には深く感謝いたします。

植物ホルモンの輸送活性測定においては多くのご支援とご指導、貴重なご意見を賜りました東北大学大学院理学研究科化学専攻の上田実教授、石丸泰寛助教、及川貴也さん、東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻の魚住信之教授、浜本晋助教に深く感謝しております。

ジベレリンの定量においては多くのご支援とご指導、貴重なご意見を賜りました理化学研 究所適応制御研究ユニット 瀬尾光範ユニットリーダーには深く感謝しております。

また、研究面・生活面で多大なるサポートをいただいた東京工業大学・東京大学 グロー バル COE プログラムと東京工業大学 博士一貫教育プログラムに深く感謝しております。

本研究を遂行するにあたり多くのご支援とご指導を賜り、多くのディスカッションをして いただきました関本(佐々木)結子 ELSI 特任助教と金森(佐藤)美有さんを始め、太田・ 増田研究室に関係する皆様には深く感謝しております。

スイス・ローザンヌで研究の機会を与えてくださり、英語が不自由な中でも温かく、丁寧 にご指導賜りましたローザンヌ大学植物分子生物学研究科 Edward Farmer 教授と Jorge Loscos 博士をはじめとした研究室の皆様、そして外国での生活をサポートしていただいた 現地在住の皆様には心から感謝しております。

最後に、私を応援してくれた両親、本論文を作成する中私を励ましてくれた妻 朋美、この世に産まれてきたばかりの娘 雅妃に心から感謝の意を表して謝辞といたします。

謝辞