

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)	博士論文
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

齊藤 洸

指導教員 太田啓之

副指導教員 増田真二

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	JAM転写因子と相互作用する因子の特定	14
2.3.2	<i>j a m</i> × 3変異体における J A Z 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>gtr1</i> 変異体のジャスモン酸感受性	33
3.3.4	<i>gtr1</i> 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	序	39
4.2	実験材料と方法	
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	
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	<i>gtr1</i> 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 情報伝達のクロストークにおける意義	54

第5章 結論と展望

57

文献

73

報文目録

84

謝辞

85

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 ヶ月以上安定である (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 β 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)。

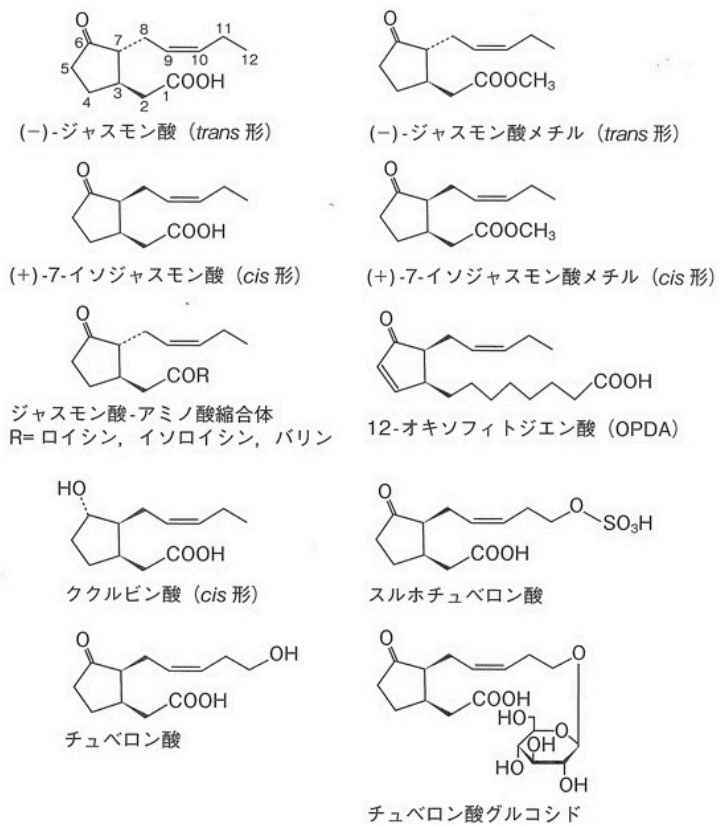


図1-2-1 ジャスモン酸類の構造

(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)

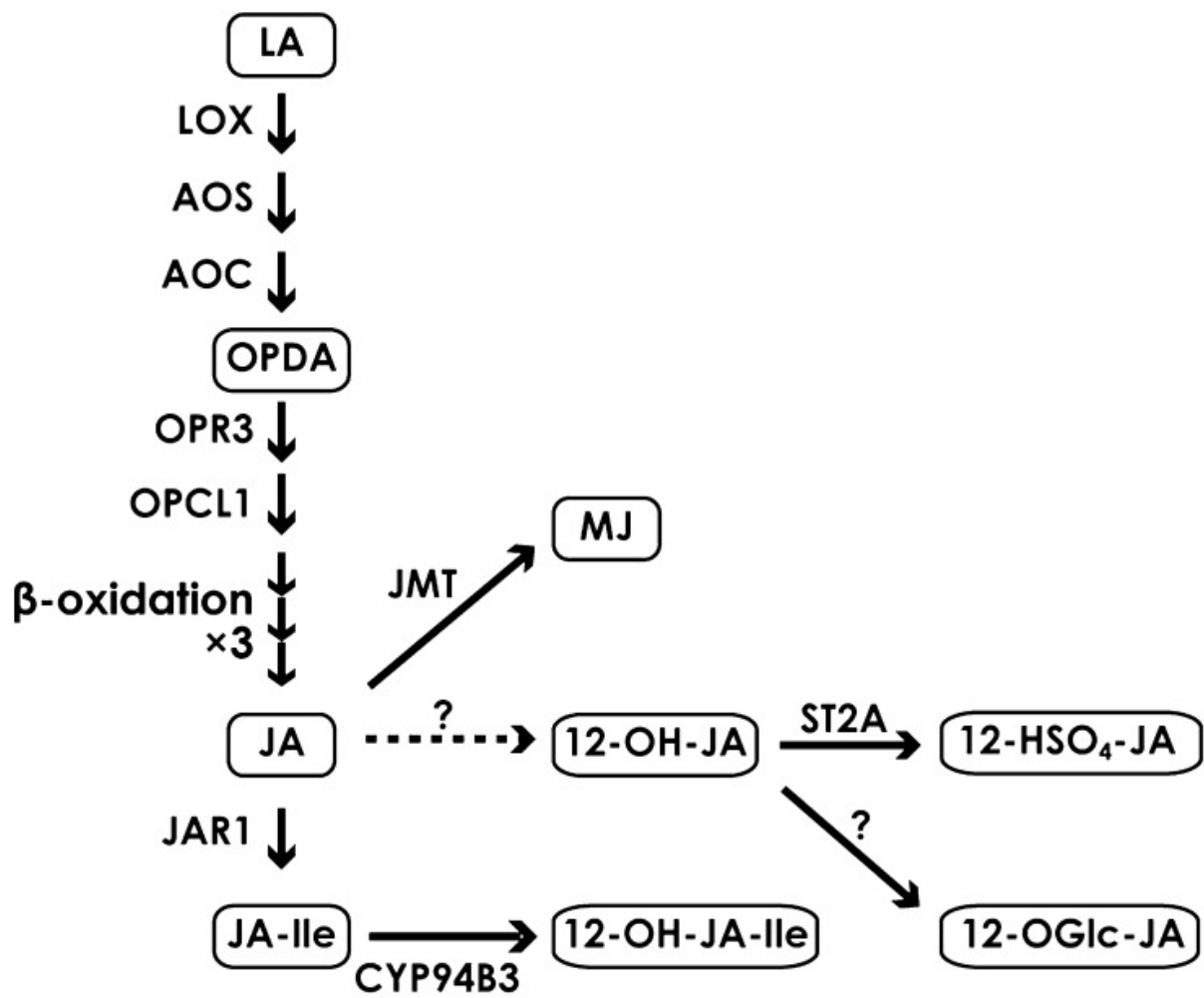


図1-2-2 ジャスモン酸生合成経路
(Sasaki-Sekimoto et al., 2013)

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0.01-3.0 μ g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* の罹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* の罹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宿主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^{COI1})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 は *PDF1.2* の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。

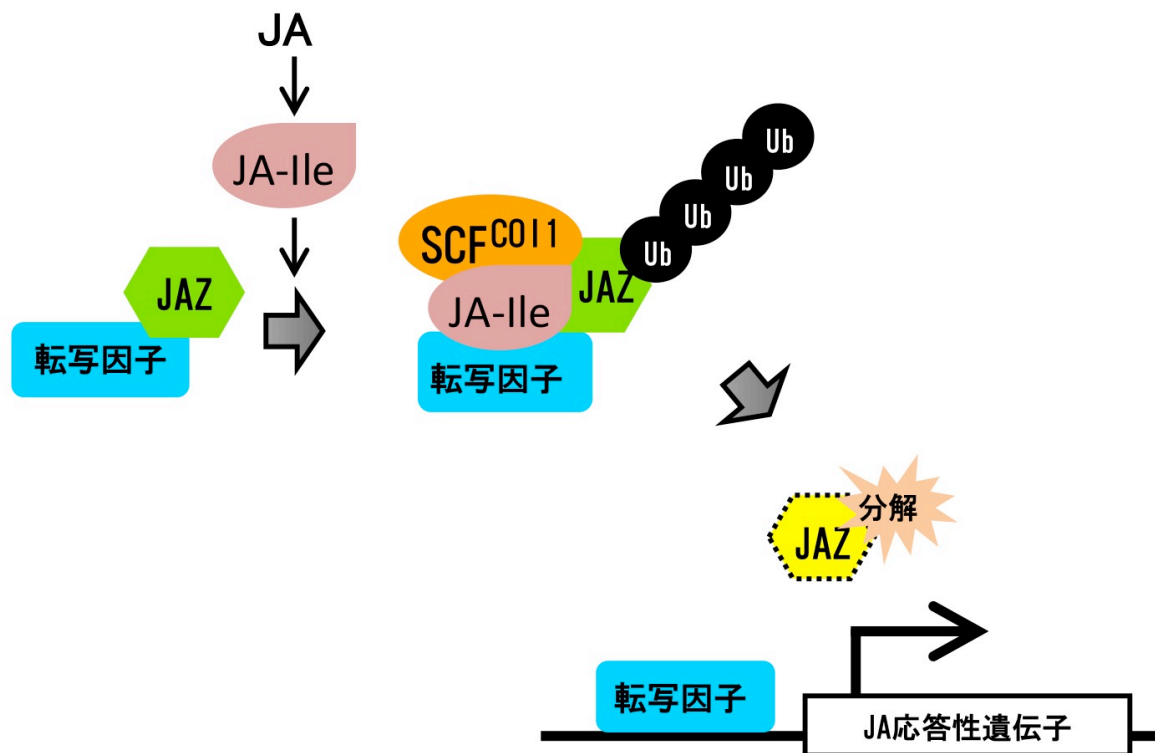


図1-4 ジャスモン酸情報伝達の模式図

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。

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

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*×3)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℃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)(Kosugi 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 ΔN F	AAAAAGCAGGCTGCGGTCTGGGAGGTG
JAM1 ΔN R	AGAAAGCTGGGTATATATCACCAGAGACC
JAM1 ΔC F	AAAAAGCAGGCTTGAATATGAGTGATTTA
JAM1 ΔC R	AGAAAGCTGGGTGTGTGTAACCAAATGTTGG
JAM2 F	AAAAAGCAGGCTTGAATATTGGTCGCCTAGT
JAM2 R	AGAAAGCTGGGTATCTACCTGATGATGTTCTT
JAM3 F	AAAAAGCAGGCTTGGGTCAAAGTTTGGGA
JAM3 R	AGAAAGCTGGGTAAGTGTGATAGAGAGGCAAG
MYC2 F	AAAAAGCAGGCTTGACTGATTACCGGCTAC
MYC2 R	AGAAAGCTGGGTAACCGATTTTGAATCAAAC
JAZ1 F	AAAAAGCAGGCTTGTGCGAGTTCTATGGAATGT
JAZ1 R	AGAAAGCTGGGTATATTTACAGCTGCTAAACCG
JAZ2 F	AAAAAGCAGGCTTGTGCGAGTTTCTGCCGA
JAZ2 R	AGAAAGCTGGGTACCGTGAAGTGAAGCAAG
JAZ3 F	AAAAAGCAGGCTTGTCACTCACTTCTATATC
JAZ3 R	AGAAAGCTGGGTAGTATGCTCTTTGAACATAA
JAZ4 F	AAAAAGCAGGCTTGGATTGGTCATTCTCAAG
JAZ4 R	AGAAAGCTGGGTAGTGCAGATGATGAGCTG
JAZ5 F	AAAAAGCAGGCTTGTGCGTCAAGCAATGAAAAT
JAZ5 R	AGAAAGCTGGGTATAGCCTTAGATCGAGATC
JAZ6 F	AAAAAGCAGGCTTGTCAACGGGACAAGCG
JAZ6 R	AGAAAGCTGGGTAAAGCTTGAGTTCAAGGTTT
JAZ7 F	AAAAAGCAGGCTTGATCATCATCAAAAAC
JAZ7 R	AGAAAGCTGGGTATCGGTAACGGTGGTAAG
JAZ8 F	AAAAAGCAGGCTTGAAGCTACAGCAAAATTGT
JAZ8 R	AGAAAGCTGGGTATCGTCTGAATGGTACG
JAZ9 F	AAAAAGCAGGCTTGGAAAGAGATTTCTGGG
JAZ9 R	AGAAAGCTGGGTTAAGCCTCTCTTTCGCTT
JAZ10 F	AAAAAGCAGGCTTGTGCGAAAGCTACCATAGAA
JAZ10 R	AGAAAGCTGGGTATGTCACAATGGGGCTGG
JAZ11 F	AAAAAGCAGGCTTGGCTGAGGTAACGGAG
JAZ11 R	AGAAAGCTGGGTATGTCACAATGGGGCTGG
JAZ12 F	AAAAAGCAGGCTTGAAGTAAAGGTAAGATGAG
JAZ12 R	AGAAAGCTGGGTAAGCAGTTGGAAATTCCTC
For qRT-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

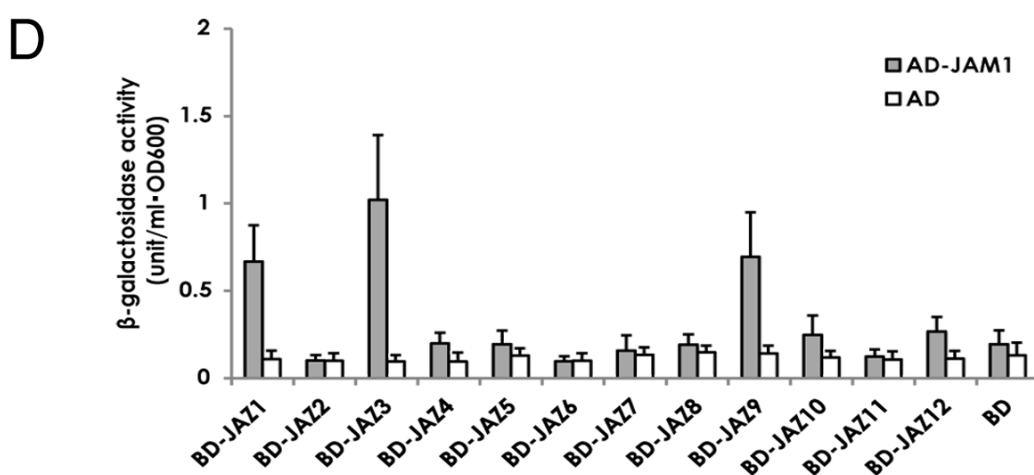
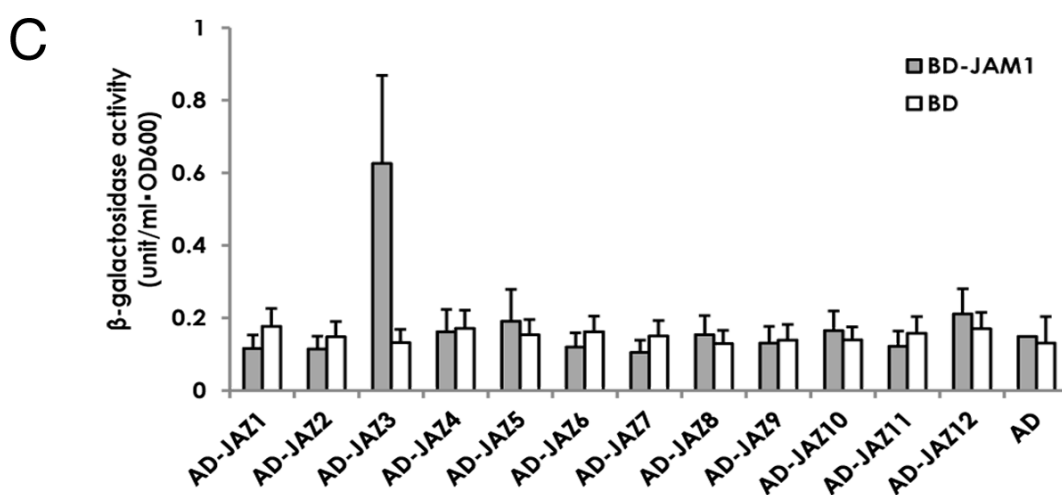
JAM1をベイトとし、酵母ツーハイブリッド法を用いた相互作用因子のスクリーニングを行った。その結果12の陽性クローンが得られたので、それぞれの遺伝子配列を特定した。12の陽性クローンの内、10がJAZファミリータンパク質であった。JAZ1 (At1g19180、2クローン)、JAZ2 (At1g74950)、JAZ3 (At3g17860、4クローン)、JAZ9 (At1g70700)、JAZ10 (At5g13220)、JAZ12 (At5g20900)の他に、JAM3とHY1 (heme oxygenase、At2g26670)が得られた。JAM1が特異的にその他のJAZと相互作用するかど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2-3-1 A, 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 β -galactosidase活性を測定した。細胞懸濁液における β -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2-3-1 D)、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、JAM1 Δ CとJAZ3は相互作用が見られたが、JAM1 Δ NとJAZ3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2-3-1 E)。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)。

A **AD**

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

B **BD**

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



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*×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*×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*×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*×3変異体間で変わらなかった。次に、野生型、*jam1jam2*、*jam*×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*×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*×3の間で同等であったことから、JAZ1の発現に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。

A

		Fold-Change Information							
		Col (MJ/mock)		<i>jam</i> x3 (MJ/mock)		mock (<i>jam</i> x3/Col)		MJ (<i>jam</i> 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
At5g20900	JAZ12	2.6	**	3.0	**	1.2	ns	1.4	ns

B

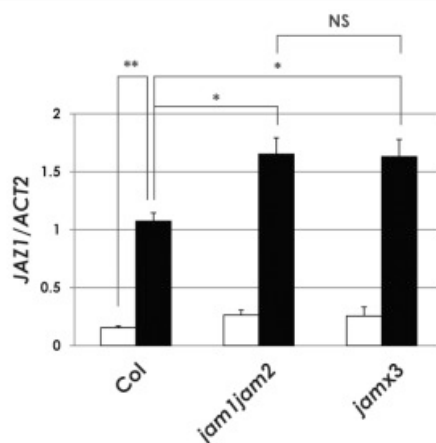


図 2-3-2 *jam*×3変異体における *JAZ* 遺伝子の発現解析

(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 $50 \mu\text{M}$ MeJA (黒) を1時間処理し、RNAを抽出した (\pm 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(Kretschmar 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 α -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

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、蒴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。*GTR 1* 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、GTR 1 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 μ l 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'-CTCGCCACCAAACAACAAA-3'
DAD1(AT2G44810) forward 5'-GTGAAGACGAAGAAGAAGAGCAATC-3'
 reverse 5'-GTGAAGACAGCGAAAACGACATAC-3'
OPR3(AT2G06050) forward 5'-TTGGACGCAACTGATTCTGAC-3'
 reverse 5'-GTAGGCGTGGTAGCGAGGTT-3'
SEN4(AT4G30270) forward 5'-GACTCTTCTCGTGGCGGCGT-3'
 reverse 5'-CCCACGGCCATTTCCCAAGC-3'
SAG12(AT5G45890) forward 5'-GGCGTTTTTCAGCGGTTGCGG-3'
 reverse 5'-CCGCCTTCGCAGCCAAAATCG-3'
SAG18(AT1G71190) forward 5'-GTTTGCAGAGGTGAGAAAATAGGA-3'
 reverse 5'-AGAGTAGCATCGTTTGGGTGAAG-3'
SAG20(AT3G10985) forward 5'-TCGGTAACGTTGTTGCTGGA-3'
 reverse 5'-ACCAAACCTCTTTCAAATCGCCA-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'-ATGGAGAGAAAGCCTCTTG-3'

reverse 5'-TCAGACAGAGTTCTTGTCT-3'

LB3 :5'-TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGA-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'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACACC-3

reverse 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGA-

CAGAGTTCTTGTCT-3

PCR 産物を Gateway BP II kit (Life Technologies, MD, USA)を用いてプラスミドベクター pDONR/Zeo へクローニングし、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'-ATGGAGAGAAAGCCTCTTG-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 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光を当てて 130 rpm で巡回培養した。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 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 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、ソフトウェア 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 へクローニングした。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- β -D-glucuronide)、0.5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、0.5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、0.3% (v/v) Tween20、50 mM NaPO_4 (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	annoation
	At2g44810	DEFECTIVE IN ANTHR DEHISCENCE 1 (DAD1)
1	At1g62210	unknown protein
2	At1g31670	Copper amine oxidase family protein
3	At3g04170	RmlC-like cupins superfamily protein
4	At3g04200	RmlC-like cupins superfamily protein
5	At3g29260	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
6	At1g68380	Core-2/1-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
7	At1g66720	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
8	At3g04150	RmlC-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	At3g24680	transposable element gene

Mutual Rank	Locus	annoation
	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	annoation
	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	annoation
	At5g42650	ALLENE OXIDE SYNTHASE
1	At2g06050	12- <i>oxo</i> -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	At2g46510	ABA-inducible BHLH-type transcription factor/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1)

Mutual Rank	Locus	annoation
	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- <i>oxo</i> -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	annoation
	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	annoation
	At2g06050	12-oxo-PHYTODIENOATE REDUCTASE 3 (OPR3)
1	At1g20510	<i>OPC-8:0 CoA LIGASE 1 (OPCL1)</i>
2	At3g51450	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
3	At5g42650	<i>ALLENE OXIDE SYNTHASE</i>
4	At1g17420	<i>LIPOXYGENASE 3 (LOX3)</i>
5	At1g17380	<i>JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 5 (JAZ5)</i>
6	At1g32640	Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding family protein
7	At3g25780	<i>ALLENE OXIDE CYCLASE 3 (AOC3)</i>
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	<i>JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 10 (JAZ10)</i>
12	At5g47240	nudix hydrolase homolog 8
13	At1g72450	<i>JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 6 (JAZ6)</i>
14	At5g05600	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
15	At2g46510	<i>ABA-inducible BHLH-type transcription factor/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1)</i>
16	At5g53050	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
17	At2g34930	disease resistance family protein / LRR family protein
18	At1g19180	<i>JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1 (JAZ1)</i>
19	At1g70700	TIFY domain/Divergent CCT motif family protein
20	At1g73080	PEP1 receptor 1

Mutual Rank	Locus	annoation
	At1g20510	OPC-8:0 CoA LIGASE 1 (OPCL1)
1	At1g72520	<i>LIPOXYGENASE 4 (LOX4)</i>
2	At2g06050	<i>12-oxo-PHYTODIENOATE REDUCTASE 3 (OPR3)</i>
3	At1g17420	<i>LIPOXYGENASE 3 (LOX3)</i>
4	At1g32640	Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding family protein
5	At1g17380	<i>JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 5 (JAZ5)</i>
6	At3g25780	<i>ALLEME OXIDE CYCLASE 3 (AOC3)</i>
7	At1g19180	<i>JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1 (JAZ1)</i>
8	At3g51450	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
9	At1g74950	TIFY domain/Divergent CCT motif family protein
10	At5g42650	<i>ALLENE OXIDE SYNTHASE</i>
11	At4g14680	Pseudouridine synthase/archaeosine transglycosylase-like family protein
12	At5g47220	ethylene responsive element binding factor 2
13	At1g27770	autoinhibited Ca ²⁺ -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	<i>JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 6 (JAZ6)</i>
19	At5g66210	calcium-dependent protein kinase 28
20	At2g46510	<i>ABA-inducible BHLH-type transcription factor/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1)</i>

Mutual Rank	Locus	annoation
	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-dehydroquinase 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 10 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 20 μ M 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 3-3-2-1 a)。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 3-3-2-1 a)。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* の誘導が促進されたことが示唆された。次に、ジャスモン酸応答における *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 3-3-2-2 a)。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 3-3-2-2 b)。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 3-3-2-1 b)。*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。

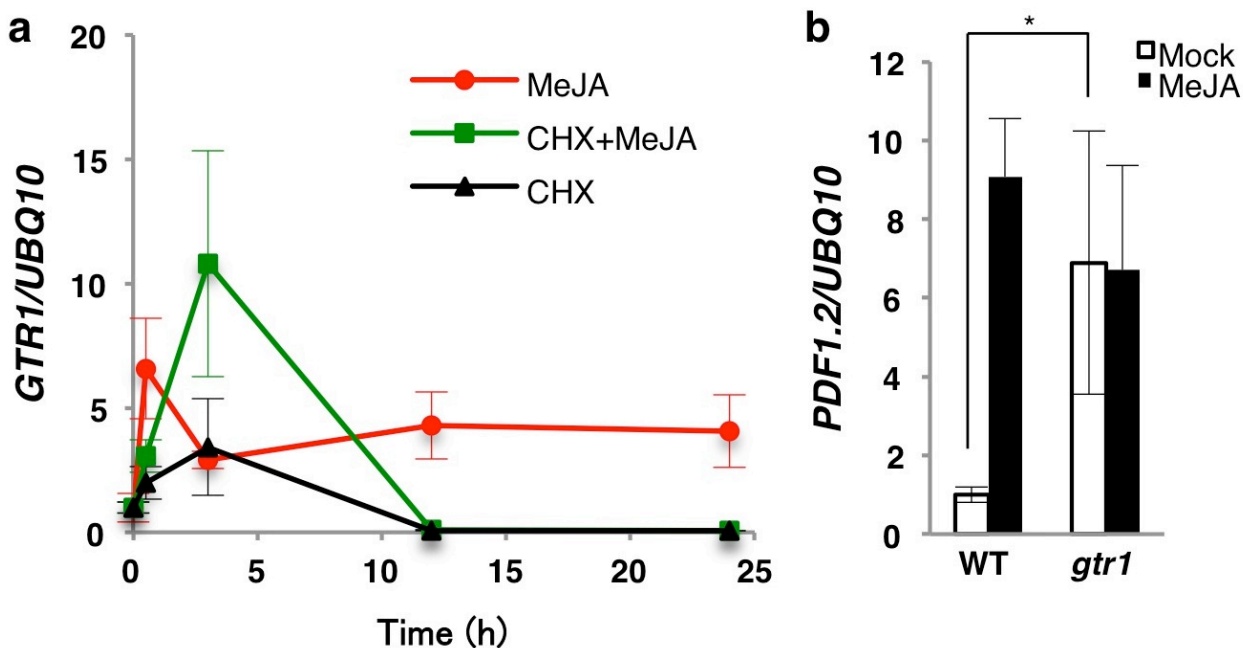
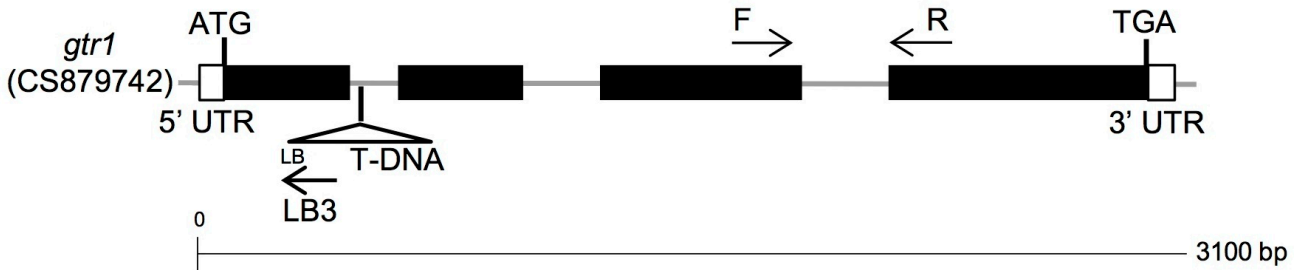


図 3-3-2-1 *GTR1* はジャスモン酸によって誘導され、ジャスモン酸関連遺伝子を制御する。

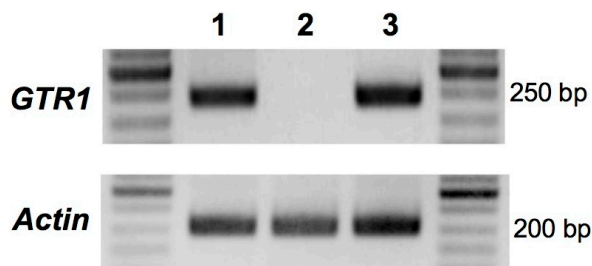
(a) MeJA による発現誘導における CHX の効果を解析した。発芽後 10 日間液体 MS 培地中で旋回培養したシロイヌナズナ野生型を 20 μ M MeJA で処理する 1 時間前に 100 μ M CHX で処理した。その後、定量 RT-PCR を用いて *GTR1* の転写量を解析した。*UBQ10* をリファレンス遺伝子として用い、野生型の 0 時間 mock 処理の値で標準化した (\pm SD、n=3)。

(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 μ M 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 (\pm SD、n=3)。* $p < 0.05$ 、Tukey-Kramer 多重検定による。

a



b



c

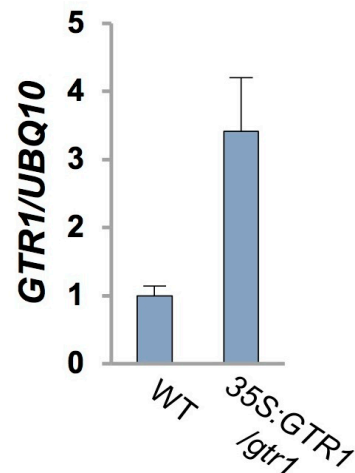


図 3-3-2-2 本研究で用いたシロイヌナズナ変異体の発現解析

(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日間巡回培養した野生型（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)

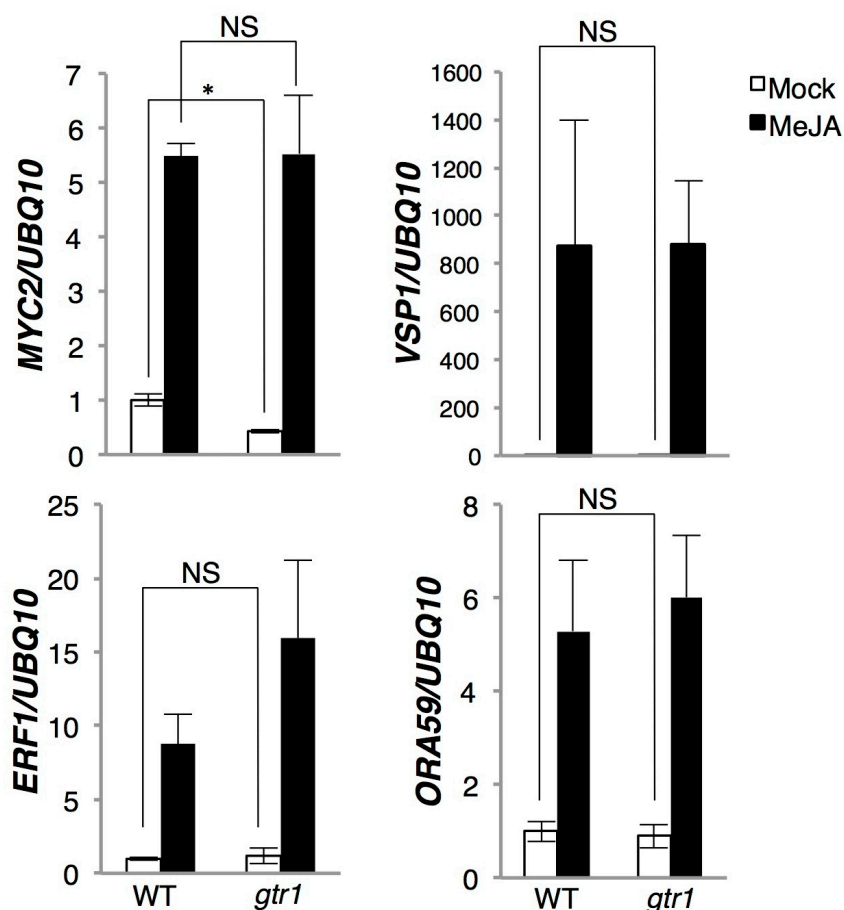


図 3-3-2-3 *gtr1* におけるジャスモン酸応答遺伝子の発現解析

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 μ M 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 (\pm 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)

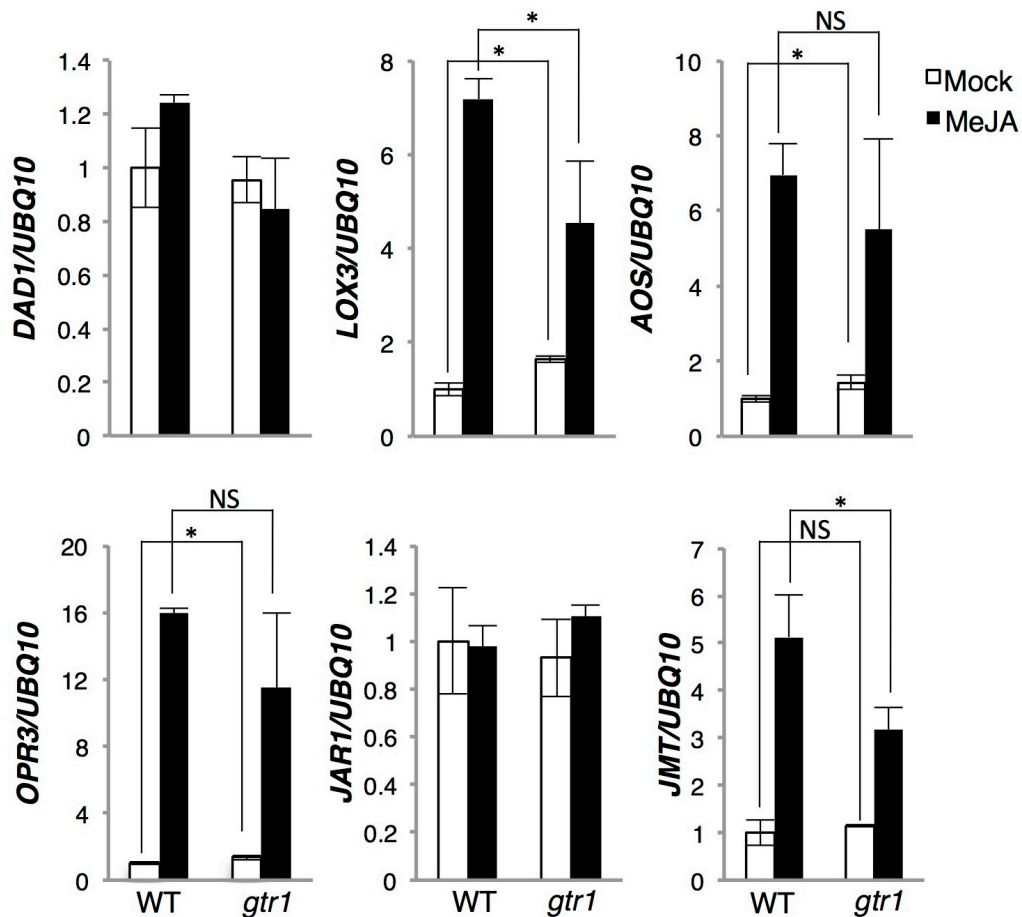


図 3-3-2-4 *gtr1* におけるジャスモン酸合成遺伝子の発現解析
 発芽後 10 日間液体 MS 培地中で旋回培養したシロイヌナズナ野生型、*gtr1* を 0.02% エタノール (白) もしくは 20 μ M MeJA (黒) で 30 分処理し、定量 RT-PCR に用いた。*UBQ10* をリファレンス遺伝子として用い、野生型の mock 処理 0 時間の値で標準化した (\pm SD、 $n=3$)。 $p < 0.05$ 、 NS = not significant ($p > 0.05$) Tukey-Kramer の多重検定による。

(Saito et al., 2014)

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 μ M 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 3-3-3 a)。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認するために、*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。

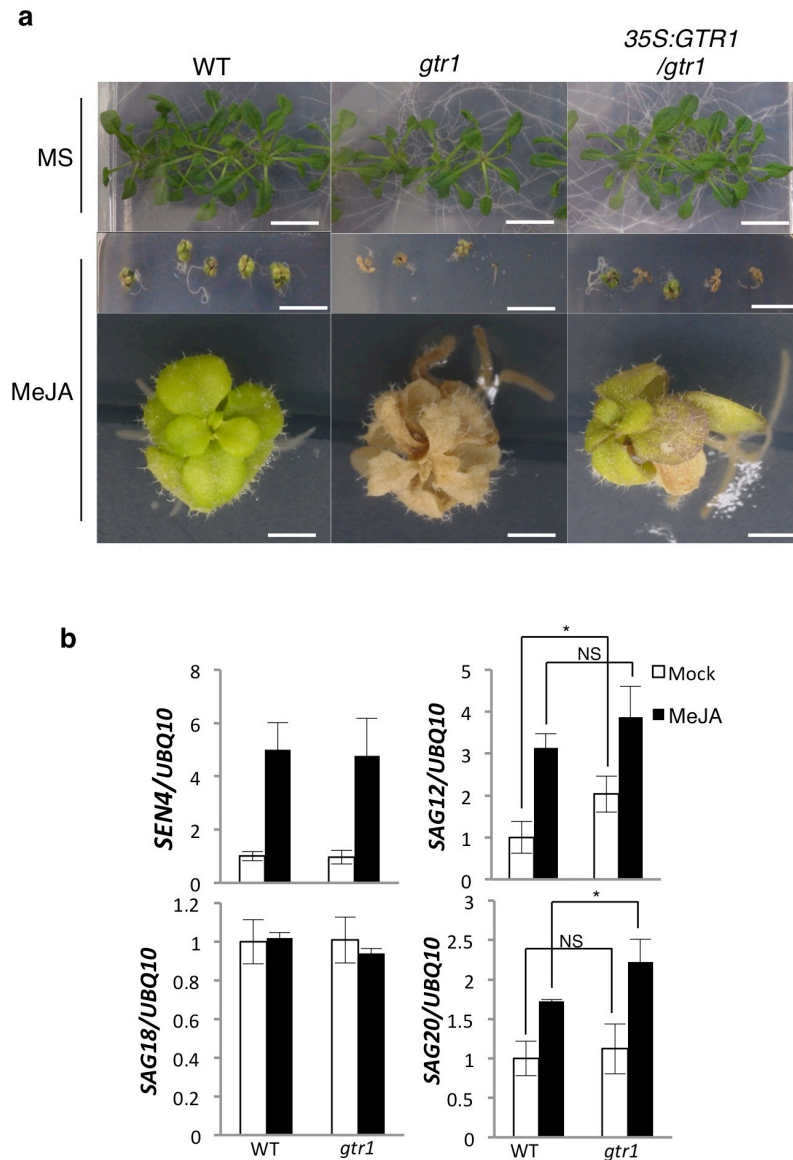


図 3-3-3 *gtr1* はジャスモン酸に対して高感受性である。

(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 μ M) 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 培地中で巡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 μ M 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 (\pm 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 3-3-4-1 a)。*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 3-3-4-1 b)。*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:β-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 3-3-4-3 a)。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 3-3-4-3 b, 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 3-3-4-3 c, d, f)。

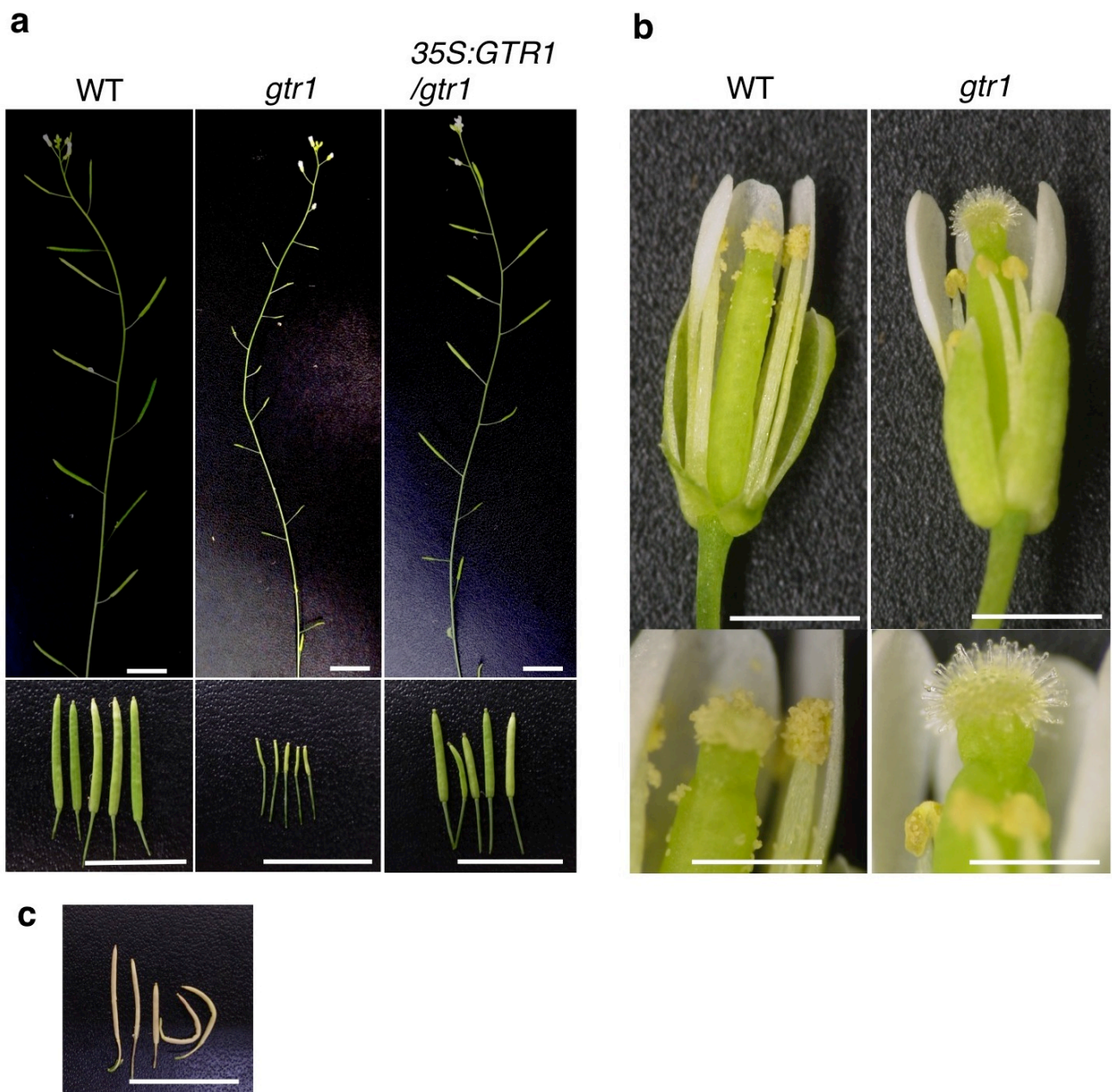


図 3-3-4-1 花器官における *gtr1* の表現型

(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 = 1 mm (上段)、0.5 mm (下段)。

(c) 野生型の花粉を受粉した *gtr1* のさや。スケールバー = 10 mm。

(Saito et al., 2014)

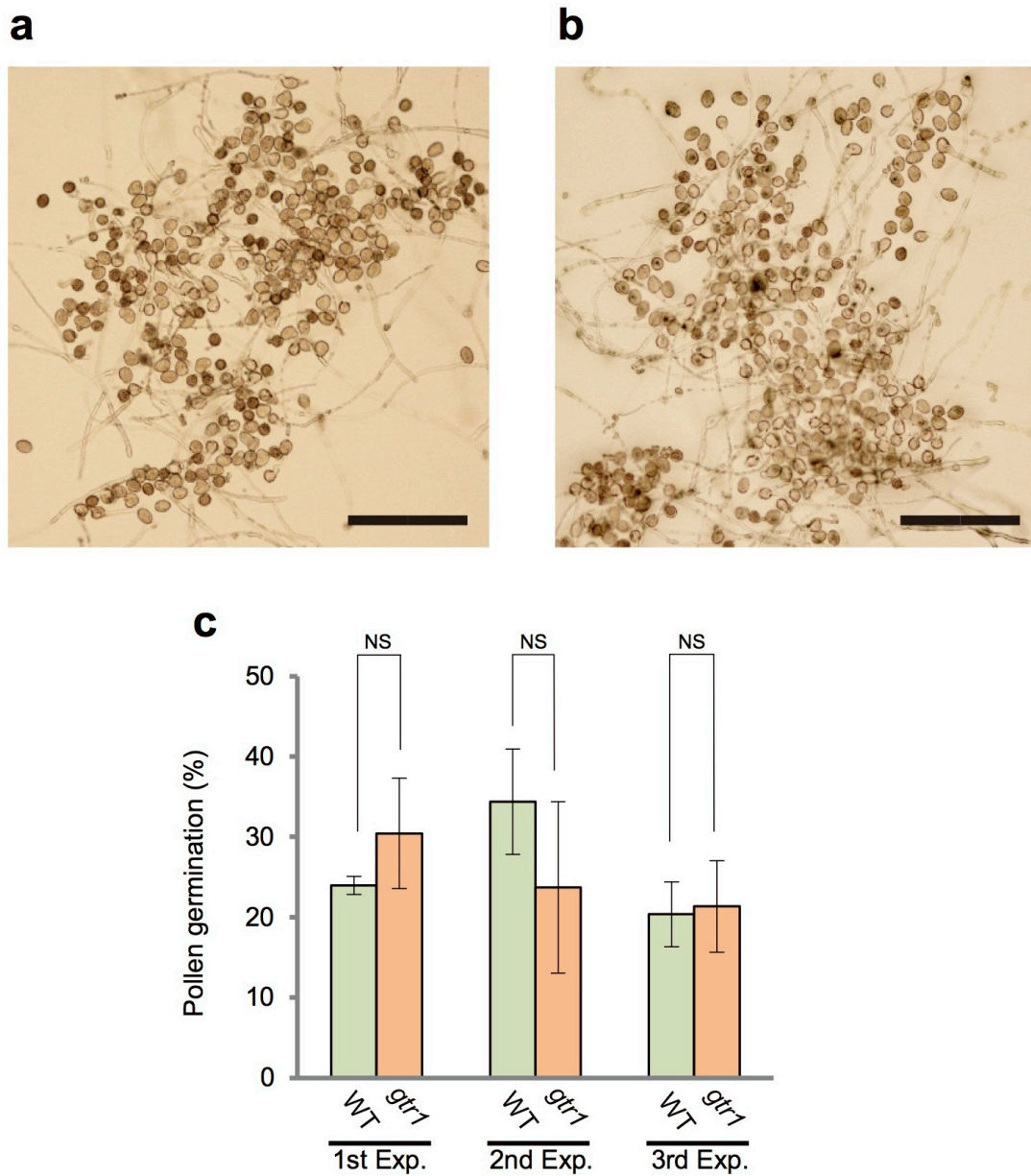


図 3-3-4-2 *in vitro* における花粉の発芽

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 μ m。

(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 (\pm SD)。NS = not significant ($p > 0.05$)、Student の t 検定による。

(Saito et al., 2014)

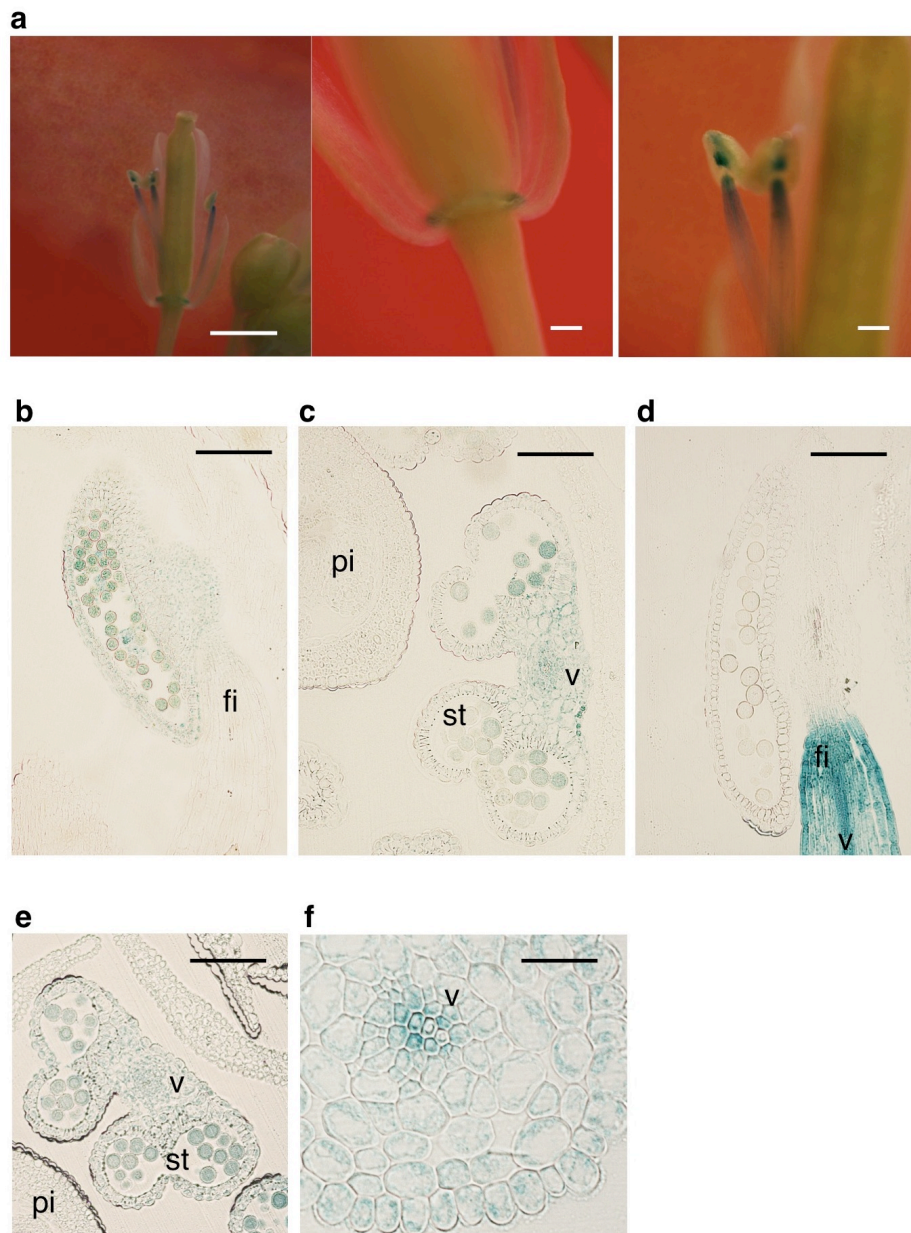


図 3-3-4-3 花器官における GTR1 の局在

(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= 1 mm (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 = 100 μm 。

(d) stage 14 における垂直断面。スケールバー= 100 μm 。

(e) stage 12 における横断面。スケールバー= 100 μm 。

(f) stage 13 における横断面。スケールバー= 20 μm 。

(Saito et al., 2014)

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; Schimmler 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'-TTTGCTGCTTTTCGACGCAC-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 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光を当てて130 rpmで巡回培養した。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 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 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培地上で育成後土壌に移し、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へクローニングした。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- β -D-glucuronide)、0.5 mM $K_4Fe(CN)_6$ 、0.5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 、0.3% (v/v) Tween20、50 mM $NaPO_4$ (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'- CGACCCCGGGGAATTCTCAGACAGAGTTCTTGTCT -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'-AAGCTTGAATTCCCCGGGATGGAGAGAAAGCCTCTTG-3'

reverse 5'-GGATCCGTCGACCCCGGGTCAGGCAACGTTCTTGTCT-3'

そして、SmaI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'-AAGCTTGAATTCCCCGGGATGCAGATTGAGATGGAAG-3'

reverse 5'-GGATCCGTCGACCCCGGGCTAATATCTTTTCGCCAG-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 $LaCl_3$, 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 GA_3 (1, 10, 30, 60, 100, 300, 1000, 2000 μ M)を含んだKulori-based buffer (pH 5)で処理し、17 $^{\circ}C$ 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 μ l extract buffer (28% methanol, 0.05% acetic acid) でホモジェナイズし、4 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。室温で 20 分間遠心分離 (20,000 \times g) したのちに 10 μ l 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 の終止コドンを変更し、SalI 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $301.25 \pm 225.46 \mu\text{M}$ 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

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。

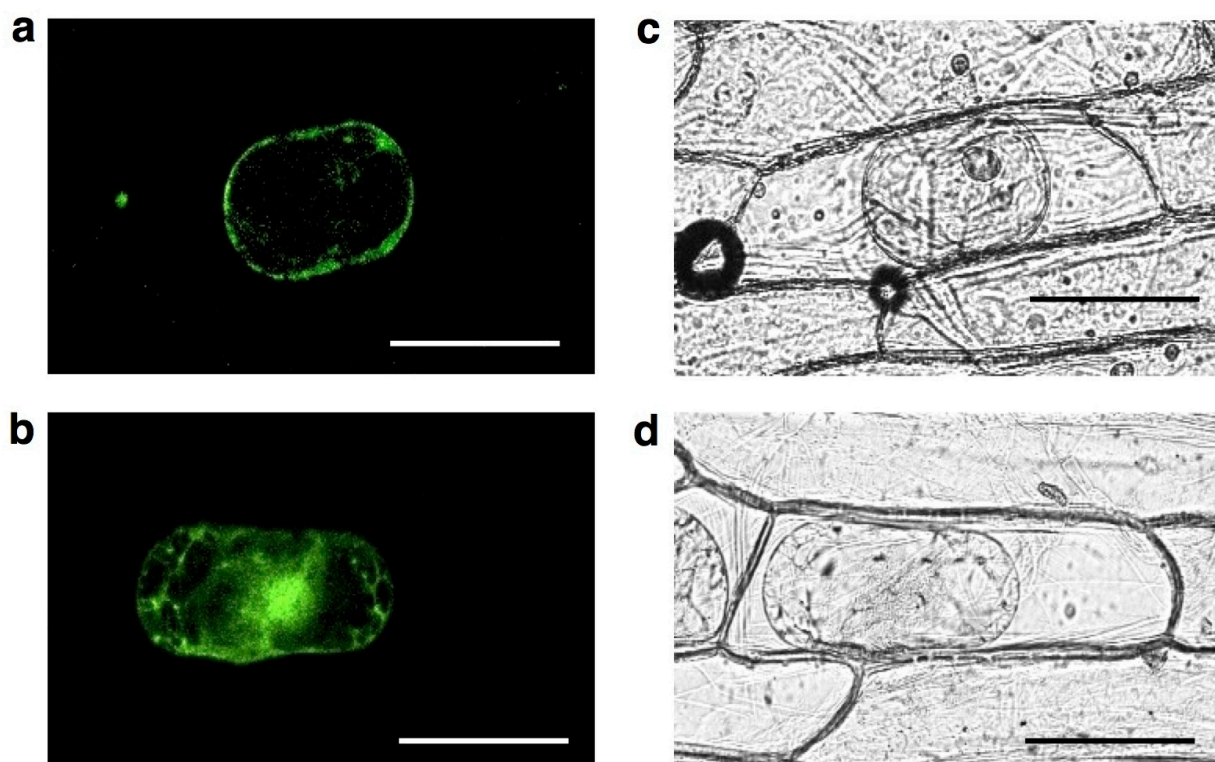


図 4-3-1-1 GTR1の細胞内局在

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。

(Saito et al., 2014)

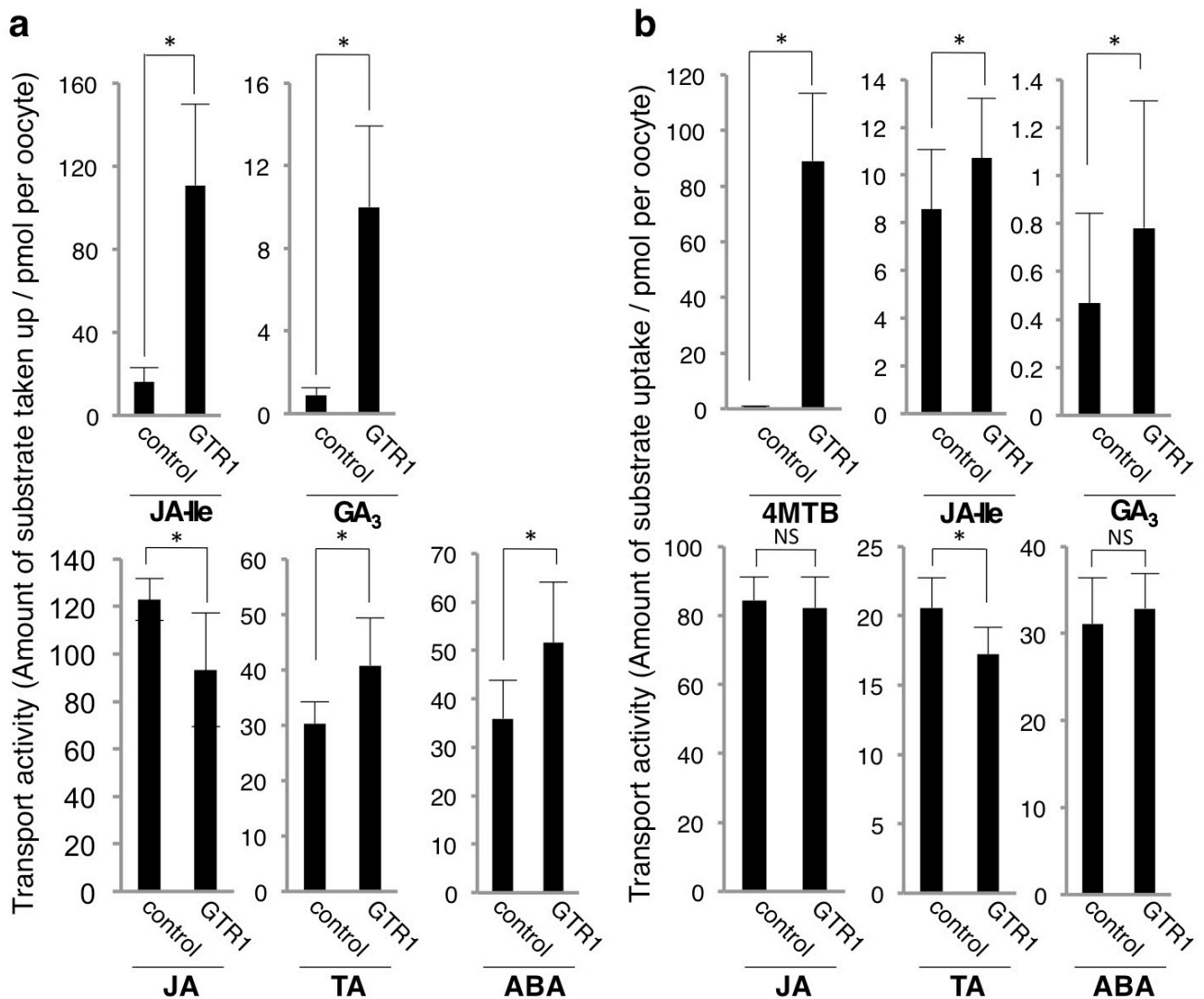


図4-3-1-2 アフリカツメガエル卵母細胞を用いたGTR1による植物ホルモン輸送活性の測定。

(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 $100\ \mu\text{M}$ JA、 $100\ \mu\text{M}$ TA、 $100\ \mu\text{M}$ JA-Ile、 $100\ \mu\text{M}$ ABA、 $100\ \mu\text{M}$ GA₃を含んだkulori-based buffer (pH 5.0)で処理し、 $17\ ^\circ\text{C}$ 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、 $4\ ^\circ\text{C}$ 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 (\pm SD、 $n=8$ (control)、 $n=9$ (GTR1))。* $p < 0.05$ 、Studentのt検定による。

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

(Saito et al., 2014)

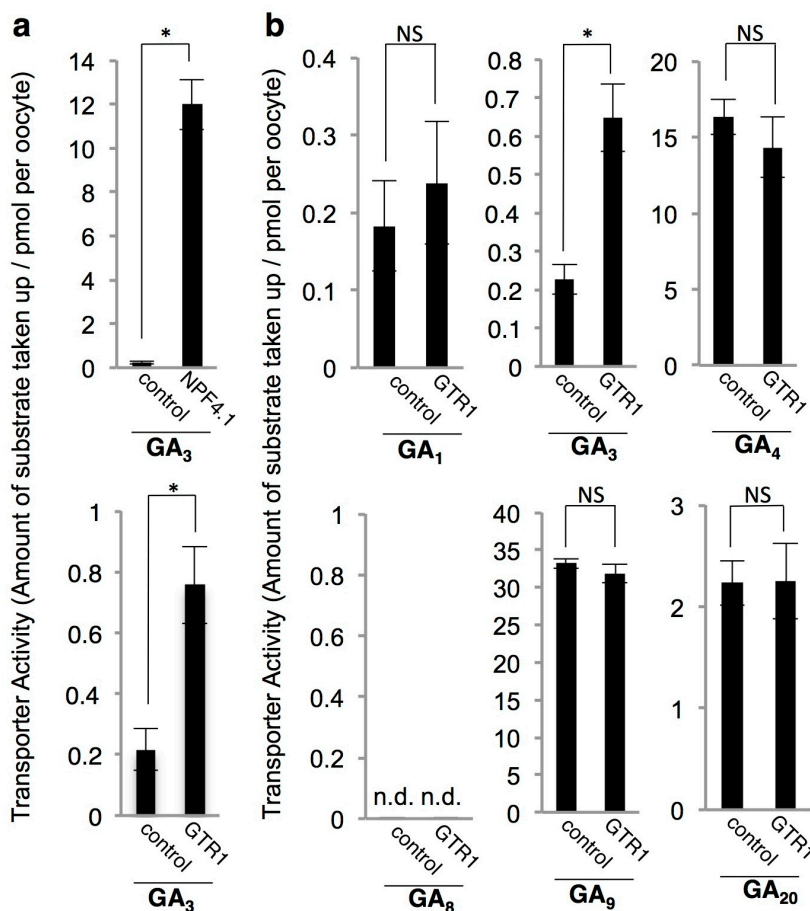


図4-3-1-3 アフリカツメガエル卵母細胞を用いたNPF4.1とGTR1による植物ホルモン輸送活性の測定。

(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 (\pm 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 (\pm SD、n=5)。n.d. = not detected。*p < 0.05、NS = not significant (p > 0.05)、Studentのt検定による。

(Saito et al., 2014)

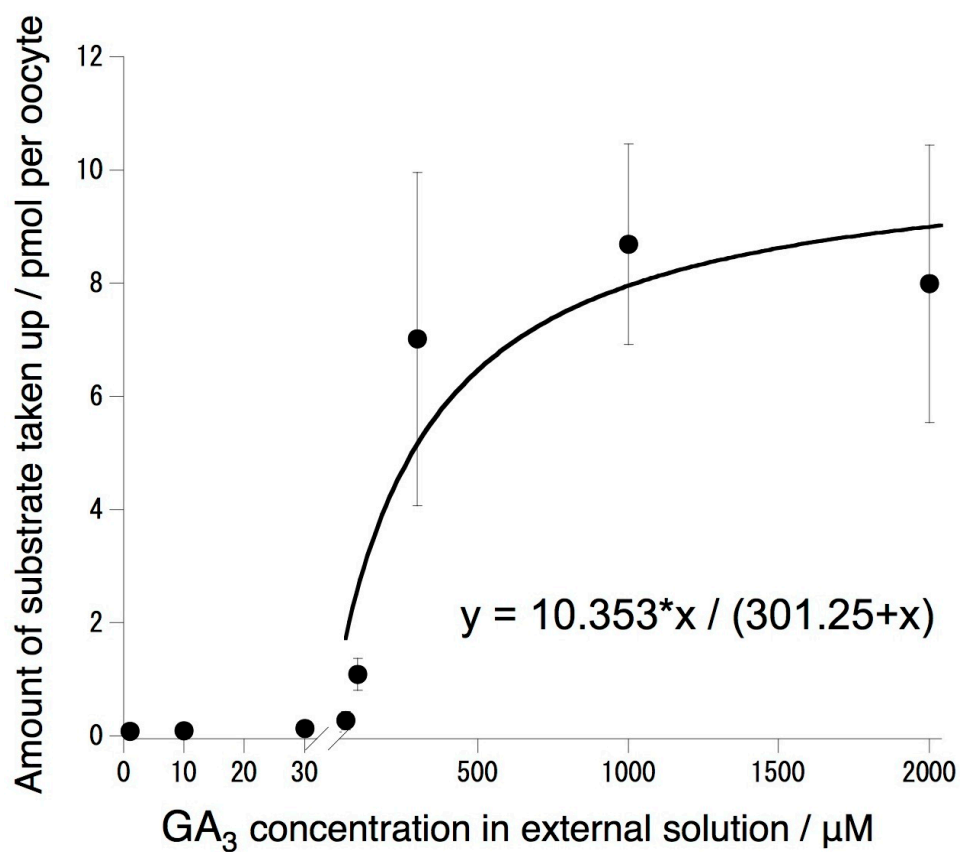


図 4-3-1-4 GTR1 による GA₃ 輸送の動態学的解析

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)。

(Saito et al., 2014)

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 μ M 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ることで同時処理(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)。

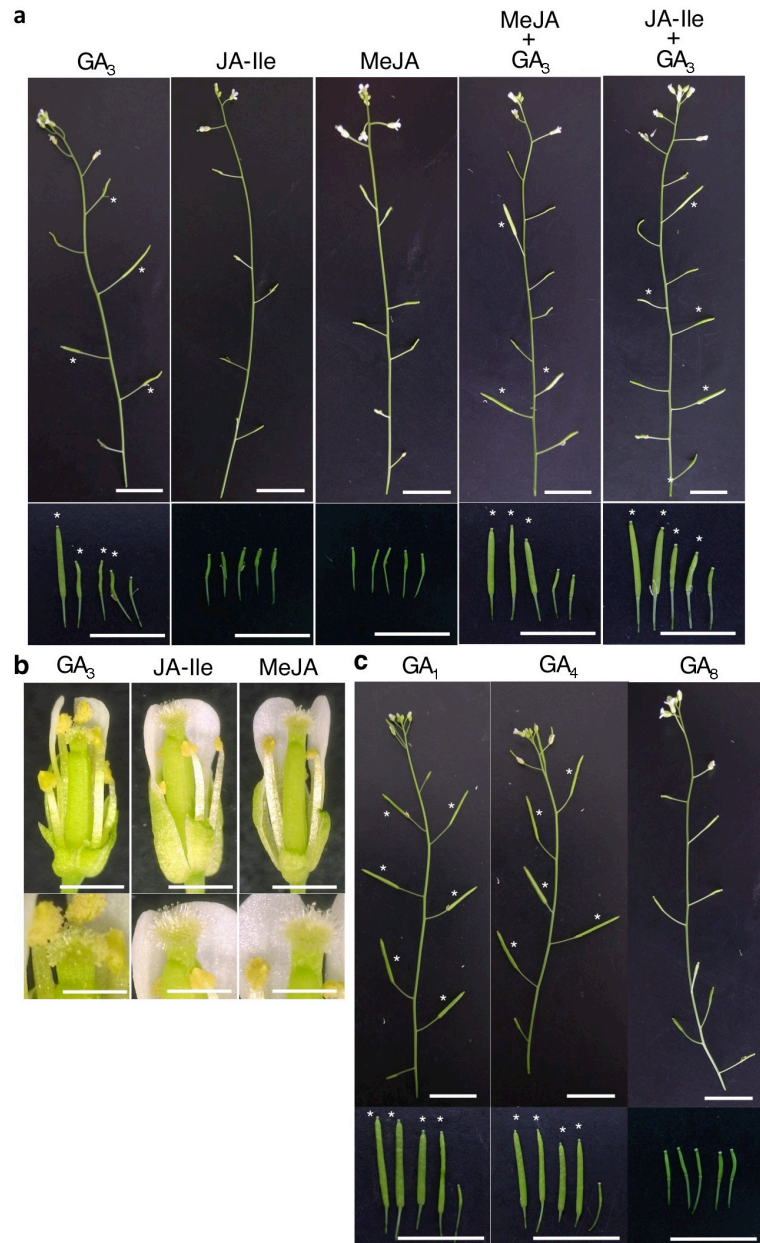


図 4-3-2-1 *gtr1* の稔性低下に対するジベレリンの効果

(a) *gtr1* の花芽に $50 \mu\text{M}$ 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) $50 \mu\text{M}$ 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。

(Saito et al., 2014)

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。

(Saito et al., 2014)

treatment	mock	GA ₃	MeJA	JA-Ile	GA ₁	GA ₄	GA ₈	MeJA	JA-Ile	untreated	
								+	+		
								GA ₃	GA ₃		
WT	10.50 ± 0.85 ^a	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	-	
<i>gtr1</i>	3.25 ± 0.63 ^b	9.20 ± 1.23 ^a	3.30 ± 1.32	3.75 ± 1.55	8.25 ± 1.4 ^d	11.35 ± 1.18 ^a	3.35 ± 0.85	10.45 ± 1.61 ^a	9.70 ± 1.18 ^a	-	
<i>aos</i>	2.80 ± 0.26	7.75 ± 1.98	12.05 ± 1.66	-	-	-	-	-	-	-	
<i>opr3</i>	3.05 ± 0.37	8.65 ± 0.91	10.25 ± 1.78	-	-	-	-	-	-	-	
WT * <i>gtr1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.50 ± 1.56 ^c	

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。

(Saito et al., 2014)

treatment	mock	GA ₃	MeJA	JA-Ile	GA ₁	GA ₄	GA ₈	MeJA + GA ₃	JA-Ile + GA ₃	untreated
WT	40.3 ± 5.9a	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	-
<i>gtr1</i>	4.6 ± 4.6b	16.1 ± 7.4b	0.7 ± 2.2b	1.0 ± 1.7b	15.5 ± 8.7b	38.9 ± 11.2a	0.8 ± 1.8b	24.1 ± 11.4c	20.5 ± 6.9c	-
<i>aos</i>	0 ± 0	0 ± 0	36.9 ± 11.7	-	-	-	-	-	-	-
<i>opr3</i>	0 ± 0	0 ± 0	20.8 ± 10.8	-	-	-	-	-	-	-
WT * <i>gtr1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	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GA₈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。

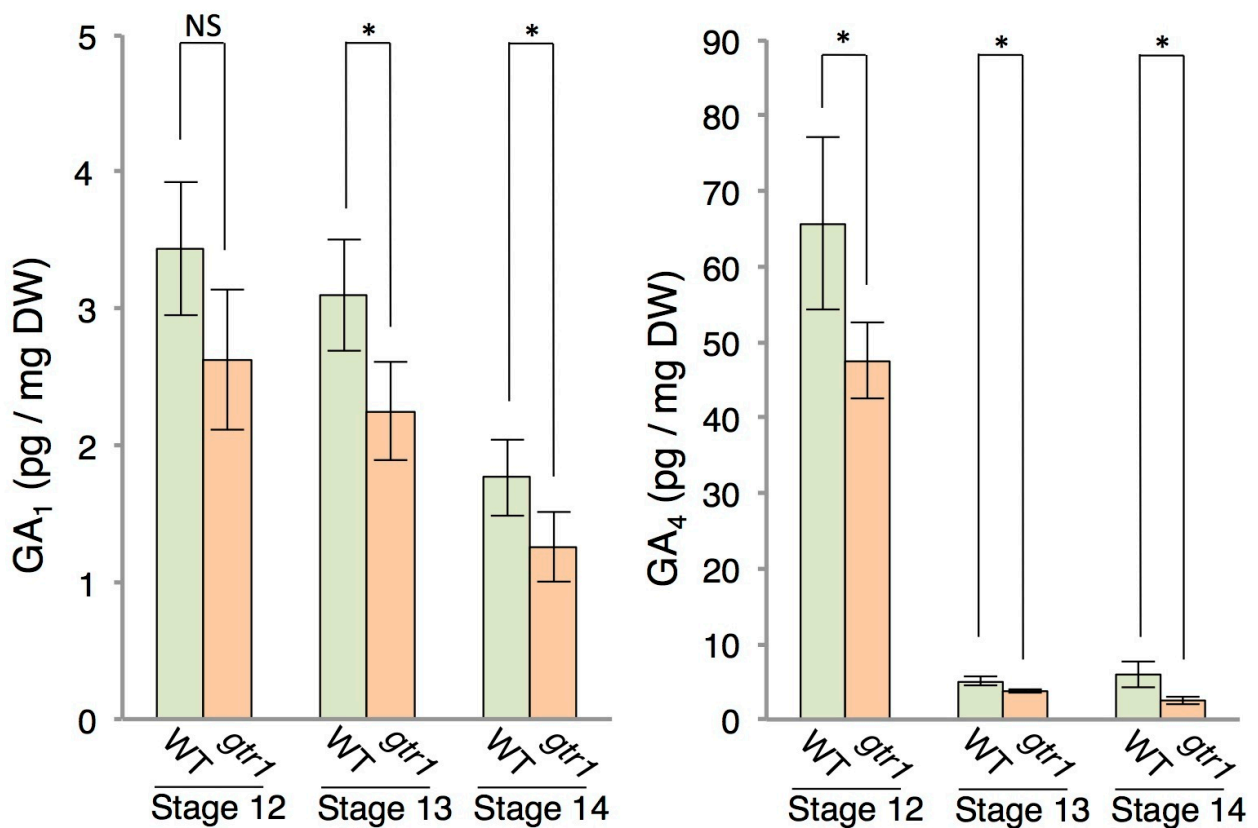


図 4-3-3-1 *gtr1* の花器官における GA₄ と GA₁ の定量

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 (± SD)。* $p < 0.05$ 、NS = not significant ($p > 0.05$)、Student の t-test による。

(Saito et al., 2014)

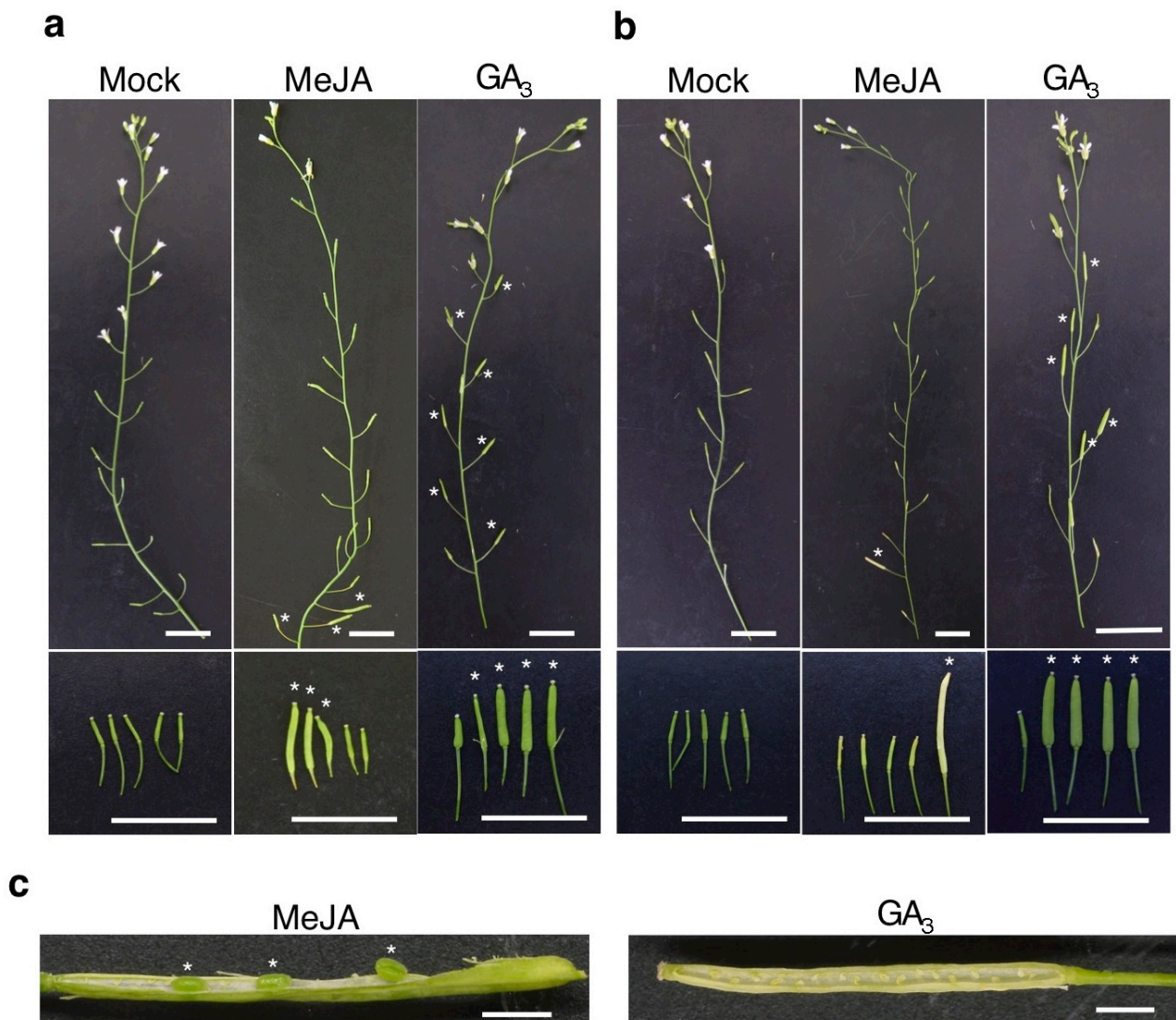


図 4-3-3-2 ジャスモン酸生合成変異体におけるジベレリンとジャスモン酸の効果

(a) *aos* の花芽に 0.02% エタノール(mock)、もしくは $50 \mu\text{M}$ MeJA、 $50 \mu\text{M}$ 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 $50 \mu\text{M}$ MeJA、 $50 \mu\text{M}$ 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。

(Saito et al., 2014)

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2-3-1 E)、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2-3-1 F)(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2-3-1 F)。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 50 μ M 4MTB、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。

(Saito et al., 2014)

treatment	mock	4MTB	4MTB + GA ₃	4MTB + MeJA	4MTB + MeJA + GA ₃
WT	10.50 ± 0.85a	9.40 ± 3.30a	9.20 ± 1.23a	9.40 ± 1.02a	9.40 ± 0.94a
<i>gtr1</i>	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 50 μ M 4MTB、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。

(Saito et al., 2014)

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
<i>gtr1</i>	4.6 ± 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 4-3-1-3 b)。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)。

GA₄ (もしくは GA₁) 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 GA₄ 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。GA₁ と GA₄ 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 GA₁ や GA₄ 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 4-3-3-2 a, 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

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。

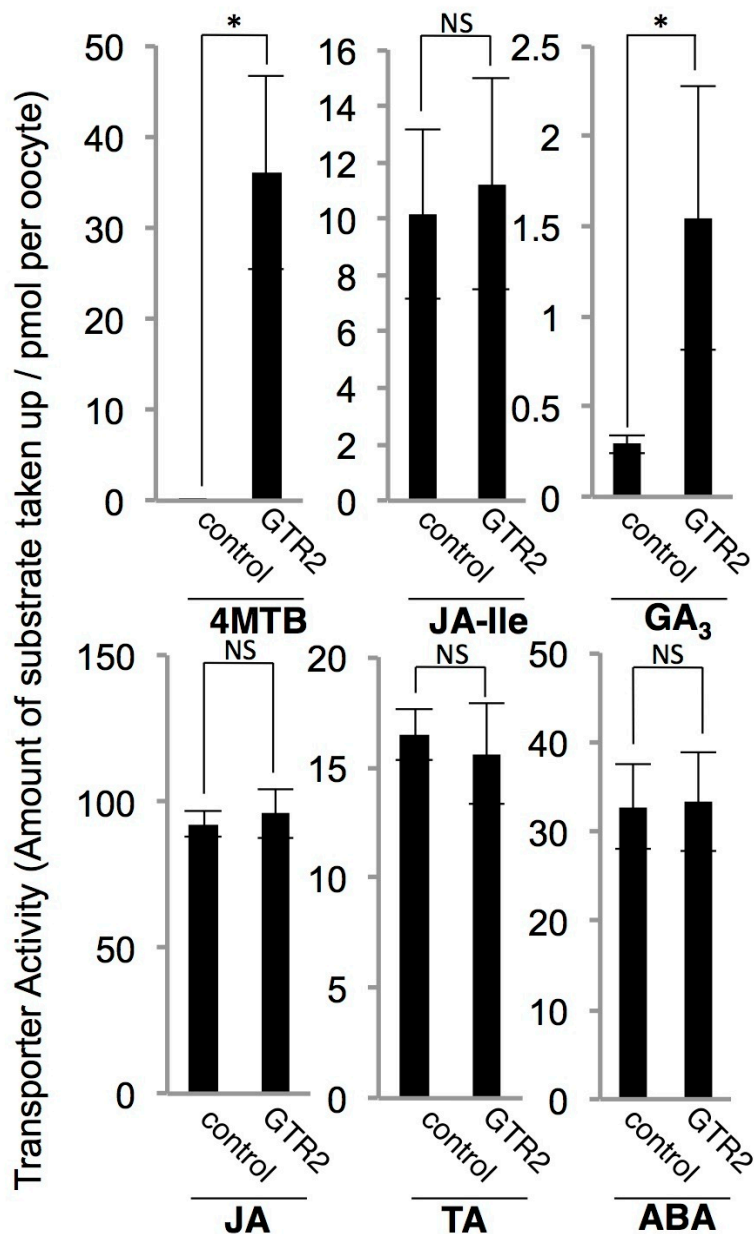


図5-3 アフリカツメガエル卵母細胞を用いた GTR2 による植物ホルモン輸送活性の測定。

(a) cRNA 注入後 24 時間培養した卵母細胞を 100 μ M 4MTB、100 μ M JA、100 μ M TA、100 μ M JA-Ile、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 (\pm SD、n=6)。*p < 0.05、Student の t 検定による。

(Saito et al., 2014)

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。

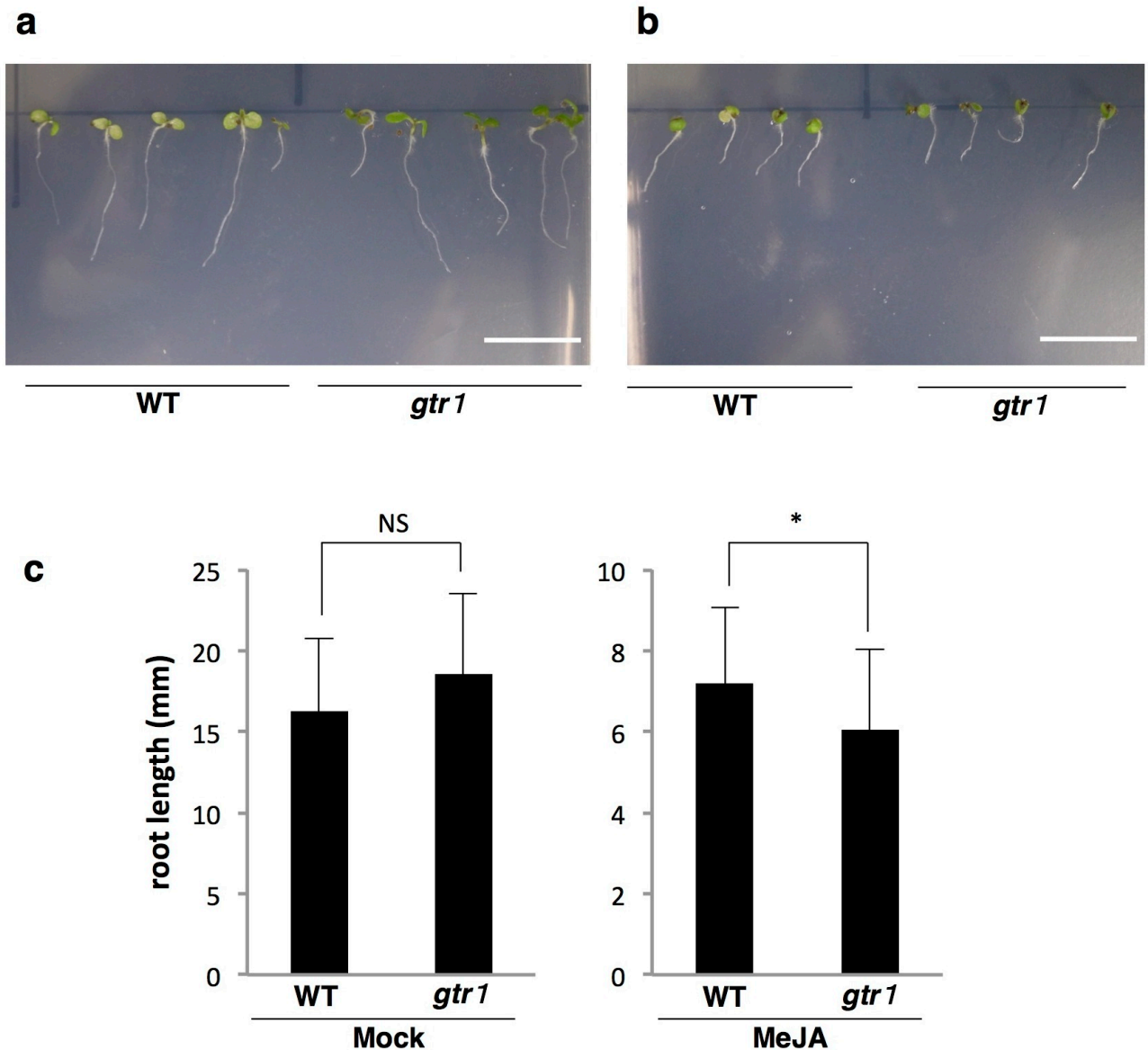


図 5-4 MeJA処理後の野生型と *gtr1*における根の伸長

(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20 μ M MeJA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 20 μ M 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 (\pm SD、n = 10)。NS = not significant (p > 0.05)、*p < 0.05、Student の t 検定による。

(Saito et al., 2014)

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 GA_3 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。

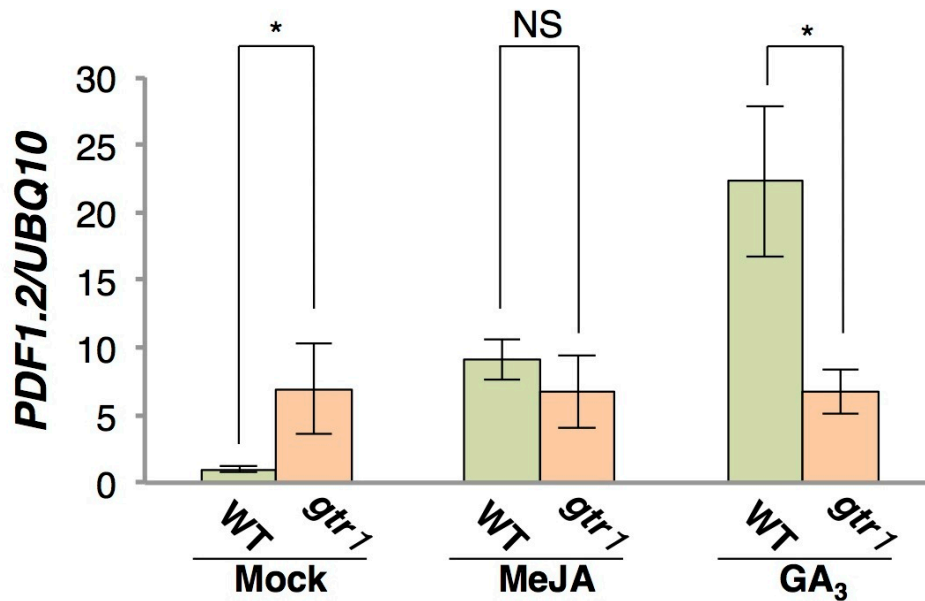


図 5-5 *gtr1* における *PDF1.2* の発現

発芽後 10 日間液体 MS 培地中で巡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 (\pm 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)

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。

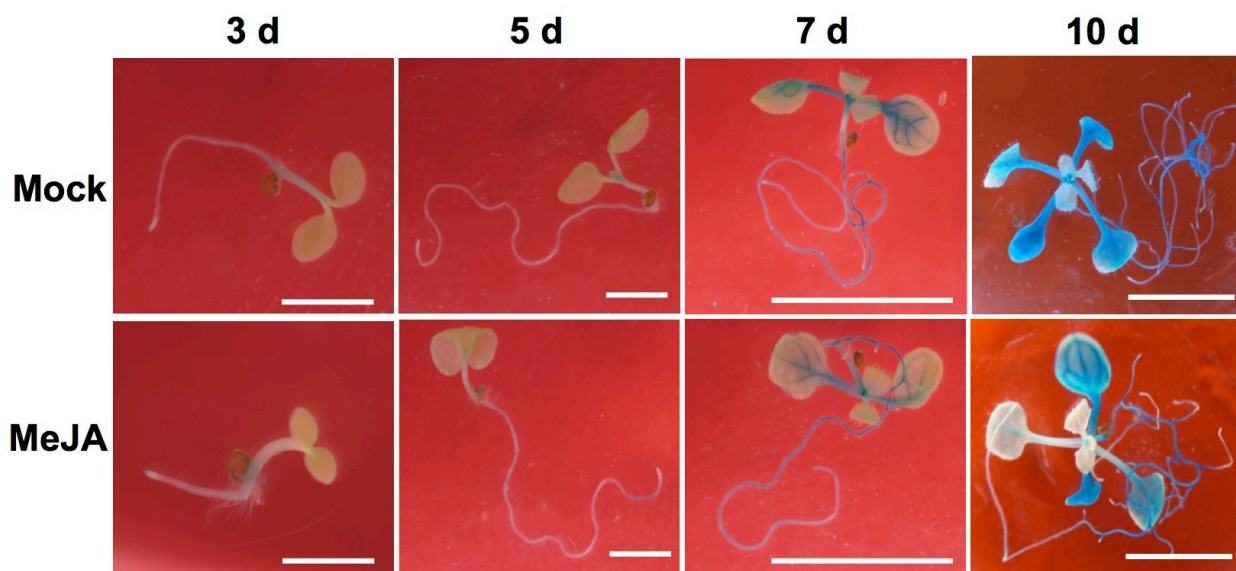


図 5-6 GUS レポーターを用いた GTR1 の局在解析

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 20 μ M MeJA 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-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-Ile 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。

文献

- 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 ANTHHER 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 IIIId 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).

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ック 第1章7 : 89-100.

報文目録

Sasaki-Sekimoto, Y., Jikumaru, Y., Obayashi, T., Saito, H., 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., *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 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., Saito, H., 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).

Saito, H., 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).

謝辞

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。