

平成23年5月30日現在

機関番号： 82401  
研究種目： 基盤研究(C)  
研究期間： 2008～2010  
課題番号： 20570049  
研究課題名（和文）  
ジベレリンを介した光種子発芽誘導機構の解析  
研究課題名（英文） Studies on gibberellin-dependent light-induced seed germination

## 研究代表者

山口 信次郎 (YAMAGUCHI SHINJIRO)  
独立行政法人理化学研究所・促進制御研究チーム・チームリーダー  
研究者番号： 10332298

## 研究成果の概要（和文）：

シロイヌナズナの種子発芽は、光受容体フィトクロムを介して光によって制御される。これまでの研究から、フィトクロムによって受容された光シグナルは PIL5 と呼ばれるフィトクロム結合タンパク質に伝達され、ジベレリンやアブシジン酸といった植物ホルモンのバランスの変化を引き起こすと考えられている。本研究では、光発芽の分子機構をより詳細に明らかにするため、PIL5 の下流遺伝子の網羅的探索、および新規ジベレリン関連遺伝子の機能解析を行なった。

## 研究成果の概要（英文）：

Germination of Arabidopsis seeds is regulated by light through the photoreceptor phytochrome. Previous studies have shown that PIL5, a phytochrome-interacting protein, plays a role in modulating the levels of plant hormones, such as gibberellin and abscisic acid, in imbibed seeds. To better understand the molecular mechanisms for light-dependent seed germination, we have identified target genes of PIL5 and characterized new gibberellin-related genes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：種子発芽、シロイヌナズナ、植物ホルモン、ジベレリン、フィトクロム、光シグナル、マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナの種子発芽は、光受容体であるフィトクロムを介して光によって制御される。以前の研究から、フィトクロムを起点とする光シグナルは、発芽を正に制御するジベレリン(GA)や発芽を抑制するアブシジン酸(ABA)などの植物ホルモンの内生量、およびこれらのホルモンに対する応答性(感受性)を変化させることが示された。例えば、シロイヌナズナの発芽種子においては、光により活性化されたフィトクロムは GA 生合成遺伝子 *GA3ox* の発現を誘導し、不活性化酵素遺伝子 *GA2ox* の発現を抑制する<sup>1)-3)</sup>。その結果、GA<sub>4</sub>(シロイヌナズナの発芽を誘導する主要な活性型 GA)の内生量が上昇し、発芽が促進される。この制御には、フィトクロム結合タンパク質の一種で bHLH 型転写因子である PIL5 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR-LIKE 5)が関与する<sup>4), 5)</sup>。PIL5 タンパク質は暗所で安定であり、*GA3ox* の発現を抑制し *GA2ox* の発現を活性化する。赤色光照射によりフィトクロムが活性化されると、PIL5 タンパク質は分解される。PIL5 が消失することにより、*GA3ox* の発現量の増大と *GA2ox* の発現抑制が引き起こされる。クロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイの結果、PIL5 は *GA3ox* や *GA2ox* のプロモーターには直接結合しないことから、PIL5 による GA 代謝酵素遺伝子の制御には未知の因子が関わっていることが示唆された。その後の研究により、CCCH 型 Zn フィンガータンパク質である SOMNUS (SOM)が、PIL5 により GA 内生量の制御に関わることが明らかになった<sup>6)</sup>。

一方、PIL5 は GA 応答の抑制因子である DELLA タンパク質をコードする遺伝子の調節領域に結合し、その発現を活性化する<sup>5)</sup>。したがって、赤色光照射により PIL5 タンパク質が分解されると、DELLA タンパク質遺伝子の発現が抑制され、GA 感受性が増大する。以上のように、PIL5 は光発芽時にフィトクロムを介して GA の内生量と感受性の双方を協調的に制御する鍵因子であることが明らかになった。また、PIL5 はフィトクロムによる ABA 量の調節にも関与する。したがって、PIL5 は種子中の GA 含量と ABA 含量を相反的に制御する因子としても機能する。以上のように、PIL5 はシロイヌナズナの種子中の光依存的なホルモンバランスの変化を引き起こす鍵因子であると考えられるが、PIL5 による発芽

制御メカニズムの全体像は不明であった。

ジベレリンの生合成・代謝経路は古くから研究されており、その主要経路に関わる多くの酵素遺伝子がこれまでに同定されている<sup>7)</sup>。一方、GA 応答性が変化した突然変異体の解析から、受容体 GID1 や GA 応答の負の制御因子である DELLA タンパク質など、受容・信号伝達経路における重要遺伝子が単離されている<sup>8)</sup>。しかしながら、GA 内生量の調節機構や GA 信号伝達経路の全体像を明らかにするには、更なる新規遺伝子の機能を明らかにしていく必要がある。

## (参考文献)

- 1) Yamaguchi et al. (1998) *Plant Cell*, 10: 2115-2126
- 2) Seo et al. (2006) *Plant J*, 48: 354-366
- 3) Yamauchi et al. (2007) *Plant Cell Physiol*, 48: 555-561
- 4) Oh et al. (2006) *Plant J*, 47: 124-139
- 5) Oh and Yamaguchi et al. (2007) *Plant Cell*, 19: 1192-1208
- 6) Kim et al. (2008) *Plant Cell*, 20: 1260-1277
- 7) Yamaguchi (2008) *Annu Rev Plant Biol*, 59:225-251.
- 8) Ueguchi-Tanaka et al. (2007) *Annu Rev Plant Biol*, 58: 183-198

## 2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナ種子が光依存的に発芽する分子メカニズムを、特に植物ホルモンとの関連から明らかにすることを目標に実施した。特に、フィトクロム依存的な光発芽制御に関わる bHLH 型転写因子である PIL5 とその下流で働く機能未知の制御因子 SOM と植物ホルモンとの関連に着目して研究を行なった。また、GA 生合成の調節機構に関する新たな知見を得るため、シロイヌナズナの GA 欠損型半矮性変異体 *gsd1-1* の解析を行なった。また、GA による種子発芽誘導メカニズムに関する新たな知見を得るため、GA 応答遺伝子として代表者らが以前に同定した *SCARECROW-LIKE3 (SCL3)* 遺伝子の GA 応答経路における役割を追究した。

## (参考文献)

- 9) Soh et al. (2006) *J Plant Biol*, 49: 160-166
- 10) Ogawa et al. (2003) *Plant Cell*, 15:1591-1604.

### 3. 研究の方法

#### (1) PIL5 により制御される遺伝子群の解析

光発芽時に PIL5 により制御される遺伝子群を網羅的に同定するため、ジーンチップ (ATH1) を用いたトランスクリプトーム解析を行なった。野生型および *pil5* 変異体種子を暗所で吸水後、遠赤色光のみ (FR) または遠赤色光 + 赤色光 (FR+R) のパルス照射を行なった。この条件では、FR パルスのみを照射した種子は発芽しないが、FR+R 処理後の種子は発芽する。光処理後 12 時間の種子から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析に用いた。

次に、PIL5 によって直接的に制御される遺伝子群を網羅的に探索するため、クロマチン免疫沈降-チップ解析 (ChIP-chip 解析) を実施した。材料には、暗所で吸水後に遠赤色光照射した *PIL5* 過剰発現体の種子を用いた。当研究は、Giltso Choi 教授 (KAIST、韓国) との共同研究として行ない、トランスクリプトーム解析は研究代表者が、ChIP-chip 解析は Choi 教授の研究室が中心に行なった。次に、PIL5 の標的遺伝子として同定された遺伝子のうち、低分子基質の代謝酵素をコードするもの選定して挿入変異体を各種リソースから取得し、光発芽時の表現型を観察した。

#### (2) 新たな GA 生合成変異体 *gsd1* の解析

優性の半矮性変異体である *gsd1-1* において内生 GA 量が低下している原因を明らかにするため、GA 関連代謝産物の分析、GA 前駆体の投与実験、およびマイクロアレイ解析を行なった。GA 関連代謝産物の定性・定量分析は、液体クロマトグラフ-質量分析装置またはガスクロマトグラフ-質量分析装置を用いて実施した。当研究の一部は、Moon-Soo Soh 博士 (Sejong University、韓国) との共同研究として行なった。

#### (3) GRAS ファミリータンパク質である SCL3 の GA 応答経路における機能

*SCL3* 遺伝子は、シロイヌナズナの種子発芽過程において、GA 処理により発現量が顕著に低下する遺伝子として以前の研究において同定された。その後、DELLA タンパク質の標的遺伝子として、ChIP アッセイにより同定された。本研究では、*SCL3* の GA 応答経路における役割を明らかにするため、*scl3* 変異体と *SCL3* 過剰発現体

の表現型を詳細に観察した。また、*SCL3* が GA 生合成・代謝経路に及ぼす影響を明らかにするため、野生型と *scl3* 変異体における GA 生合成、代謝酵素遺伝子の発現量と内生 GA の定量分析を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) PIL5 により制御される遺伝子群の解析

PIL5 依存的に赤色光によって制御される遺伝子群を同定するため、FR (遠赤色光) または FR+R (遠赤色光後に赤色光) 照射後の野生型および *pil5* 変異体種子を用いてマイクロアレイ解析を行なった。まず、野生型種子において発芽を誘導する赤色光処理にตอบสนองする遺伝子群の同定を試みた。その結果、赤色光により発現量が増大する遺伝子を約 1000 個、減少する遺伝子を約 1000 個同定することができた。

一方、*pil5* 変異体種子は、野生型種子が発芽しない FR 照射後も発芽する。マイクロアレイ解析の結果、野生型において同定された赤色光応答遺伝子のほとんどは、*pil5* 種子においては有意な赤色光応答性を示さないことが明らかになった。すなわち、FR 照射後の *pil5* 変異体種子と FR+R 照射後の野生型種子におけるトランスクリプトームはほとんど一致していた。以上の結果は、PIL5 がシロイヌナズナの赤色光応答に主要な役割を果たしていることを示している (雑誌論文①)。

次に、クロマチン免疫沈降-チップ解析 (ChIP-chip 解析) を実施し、PIL5 により直接的に制御されると推定される約 750 の遺伝子群を同定した。これらには、これまでに PIL5 の標的遺伝子として同定されている *SOM* や *RGA* を含んでいた。また、マイクロアレイにより選抜された *PIL5* 応答遺伝子群と比較することにより、PIL5 により直接的に転写産物量が制御される 166 の遺伝子群が同定された。これらの遺伝子群には、ブラスチステロイド、サイトカイニン、オーキシシン、ジャスモン酸など GA、ABA 以外のホルモン応答に関わる転写調節遺伝子が含まれていた (雑誌論文①)。

PIL5 の標的遺伝子のうち、機能未知の代謝酵素関連遺伝子の挿入変異体の解析を行ない、光発芽を正に制御する新たな因子の候補を得た。

#### (2) 新たな GA 生合成変異体 *gsd1* の解析

*gsd1-1* 変異体の半矮性は、ある濃度以上の  $GA_4$  の存在下で完全に相補されるが、既知の GA 生合成変異体の矮性を相補できるぎりぎりの濃度の  $GA_4$  (低濃度の  $GA_4$ ) に対しては応答性が悪かった。また、各種 GA や GA 前駆体の定量分析の結果、特定の中間体

の蓄積は認められず、分析した全ての前駆体と活性型 GA の内生レベルが低下していた(学会発表①)。これらの結果から、*gsd1-1*の矮化の主要因は、GA 生合成の低下というよりは、GA 不活性化能の増大であると推定された。しかしながら、マイクロアレイ解析の結果、既知の GA 不活性化酵素遺伝子の発現量に顕著な変化は認められず、不活性化産物の蓄積も認められなかった。*gsd1-1*変異は、GA の未知代謝経路の活性化を引き起こしている可能性も考えられる。

### (3) GRASファミリータンパク質である SCL3 の GA 応答経路における機能

*SCL3* 遺伝子の転写産物量は GA により減少することから、*SCL3*は GA 応答経路の負の制御因子であると当初は予想されていた。しかしながら、*scl3* 変異体および *SCL3* 過剰発現体の解析の結果、*SCL3*は GA 応答の正の制御因子として働く可能性が示唆された。まず、*scl3* 変異体は、通常の栽培条件下では顕著な表現型を示さないものの、GA 生合成阻害剤の存在下では、野生型よりも発芽能が低下していた。また、同阻害剤の存在下においては、*scl3* 変異体の胚軸や主根の長さは野生型と比較して短かった。逆に、*SCL3* 過剰発現体においては、特に GA 存在下で胚軸の徒長が認められた(雑誌論文②)。

*scl3*変異体においては GA 20-酸化酵素や GA 3-酸化酵素をコードするいくつかの GA 生合成遺伝子の転写産物量が增大していた。これらの遺伝子は GA によって負に制御される(フィードバック制御を受ける)ことが知られていることから、*scl3* 変異体におけるこれらの遺伝子の発現量の増加は GA 応答が低下した結果であると考えられた。*SCL3*が GA 内生量に及ぼす影響を調べるため、野生型、*scl3*変異体、*SCL3*過剰発現体の芽生えにおける GA<sub>4</sub>の定量分析を行なったが、統計的に有意な内生量の違いは検出するには至らなかった。共同研究者の Tai-ping Sun 教授(デューク大学、アメリカ合衆国)により、*SCL3* は DELLA タンパク質と直接結合し、下流の GA 応答に影響を与えていることが示唆された(雑誌論文②)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ① Zhang ZL<sup>†</sup>, Ogawa M<sup>†</sup>, Fleet CM<sup>†</sup>, Zentella R<sup>†</sup>, Hu J, Heo JO, Lim J, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sun TP: SCARECROW-LIKE3 promotes gibberellin signaling by antagonizing DELLA in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 108: 2160-2165. (2011) 査読有
  - ② Oh E<sup>†</sup>, Kang H<sup>†</sup>, Yamaguchi S<sup>†</sup>, Lim S, Park J, Lee D, Kamiya Y, Choi G.: Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 5 during seed germination in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21: 403-419. (2009) 査読有
- (<sup>†</sup>は貢献度の等しい第一著者を示す)

### 〔学会発表〕(計 1 件)

- ① Ayele B., *gsd1-1d* (*gibberellin sensitive dwarf1-1d*) is a novel mutation that affects gibberellin metabolism: 19<sup>th</sup> International Conference on Arabidopsis Research, 2008 年 7 月 25 日, モントリオール(カナダ)

### 〔図書〕(計 3 件)

- ① 山口信次郎・山根久和、講談社、新しい植物ホルモン科学(第2版)、2010 年、53-71
- ② Yamaguchi I, Cohen JD, Yamaguchi S, Nakajima M, Sakakibara H, Kuroha T, Hirai N, Yokota T, Ohta H, Kobayashi Y, Mori H, Sakagami Y, Elsevier, Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology (vol. 4, Plant Hormones), 2010 年、9-125.
- ③ 山口信次郎、文一総合出版、発芽生物学(種生物学会 編)、2009 年、235-243

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 信次郎 (YAMAGUCHI SHINJIRO)  
独立行政法人理化学研究所・促進制御研究チーム・チームリーダー  
10332298

### (2) 研究分担者：なし

### (3) 連携研究者：なし