

# 学 位 論 文 の 要 旨

帝京大学大学院理工学研究科 総合理工学専攻

2020 年度博士課程進学

氏 名 稲垣 秀生

指導教員 宮本 皓司

## 論文題名

植物におけるジャスモン酸類の受容体 COI-JAZ に関する研究

Studies on jasmonate receptor COI-JAZ in plants

## 研究の背景

植物は動物とは異なり自ら移動することができず、様々なストレスに対して独自の防御機構を獲得してきた。ジャスモン酸 (JA) は維管束植物において生長と防御応答を調節する植物ホルモンとして知られている。JA の活性型分子である(+)-7-*iso* ジャスモノイルイソロイシン (JA-Ile) の蓄積量が増加することで、受容体 COI1 に JA-Ile が受容される。すると、定常時はリプレッサーと MYC2 などの転写因子の機能を抑制していた JAZ と受容体複合体を形成する。そして、JAZ が分解されることで下流の転写因子が活性化し、JA 応答性遺伝子の転写が誘導される (Fig.1)。受容体である COI1 は、モデル植物であるシロイヌナズナでは 1 種のみがゲノムにコードされているが、主要穀物の 1 つであるイネ (*Oryza sativa*) では 3 種の COI ホモログ (*OsCOI1a*, *OsCOI1b*, *OsCOI2*) が存在する。しかし、イネにおける 3 種の COI の生理機能は詳細には解析されていない。そこで、本研究ではイネにおける COI-JAZ 受容体の機能解析を行った。

また、陸上植物の基部で分岐したコケ植物である苔類のゼニゴケにおいては JA の前駆体である 12-オキソ-*cis*-10,15-フィトジエン酸 (OPDA) とその類縁体が活性分子として機能することが知られている。一方、コケ植物の蘚類においては COI-JAZ の下流のシグナル伝達機構の知見は少ない。そこで、イネと同じ抗菌性二次代謝産物の生産能を持つ蘚類ハイゴケ (*Calohyphnum plumiforme*) に注目して、JAZ-MYC2 間の相互作用解析を行った。

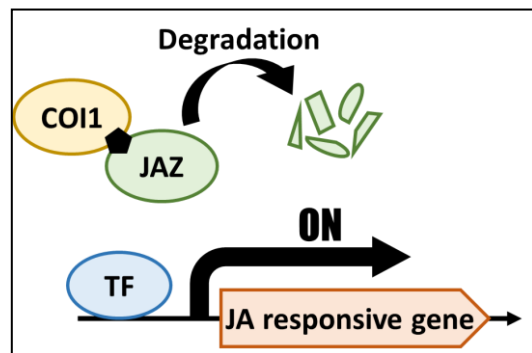


Fig.1 ジャスモン酸シグナル伝達のモデル

## 方法

### イネ COI の生理機能の解析

アグロバクテリウム法を用いた CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集によって、日本晴野生型をバックグラウンドとして *oscoi1a* 変異株、*oscoi1b* 変異株、*oscoi2* 変異株を作出した。これら変異株をガラス温室において自然光で生育させて自殖させ、稔実率の測定を行った。次に、各変異株のリーフディスクに 500  $\mu$ M ジャスモン酸メチル (MeJA) で 72 時間処理を行った。その後、抗菌性二次代謝産物であるファイトアレキシンを 80%メタノールで抽出し、その蓄積量を LC-MS/MS で定量した。また、JA を含む寒天培地に各変異株の種子を播種し、10 日間生育させた後の根と第二葉鞘の長さを測定することで伸長生長の抑制の評価を行った。

### 活性型 JA-Ile の精製と COI-JAZ 相互作用解析

Fonseca et al. (2009) と Takaoka et al. (2019) の方法を参考にして<sup>[1][2]</sup>、4 種の構造異性体を含む JA-Ile から ODS カラムを用いた逆相 HPLC とシリカゲルカラムを用いた順相 HPLC によって、活性型である(+)-7-*iso*-JA-Ile を精製した。これをリガンドに用い、昆虫細胞で発現させた GST-OsCOI と人工合成した fluorescein (Fl) -OsJAZ ペプチドを混和して共免疫沈降した。このサンプルを SDS-PAGE でタンパク質を分離し、ウエスタンブロッティングに供して GST-OsCOI の化学発光を検出した。

### OsJAZ2 および OsJAZ5 の生理機能の解析

トウモロコシユビキチンプロモーターの下流に OsJAZ2 および OsJAZ5 をそれぞれクローニングして、過剰発現用ベクターとした。これをアグロバクテリウム法によってイネへ導入し、過剰発現株を作出した。この植物体を用いて 500  $\mu$ M MeJA を 72 時間連続白色光下で処理した際のファイトアレキシン蓄積量の定量を行った。

### ハイゴケ JAZ-MYC2 の相互作用解析

コムギ胚芽無細胞系によって発現させた FLAZ-CpJAZ と GST-CpMYC2 を用いて、「COI-JAZ 相互作用解析」と同様の手法で共免疫沈降と SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングを行った。

## 結果と考察

### イネ COI の生理機能の解析

ゲノム編集によって作出した変異株について、T1 および T2 世代で変異がホモに導入されており、かつゲノム編集用に導入した外来遺伝子が脱落した個体の選抜を試みた。その結果、各ラインにおいてそれぞれ異なる変異が導入されたものが、*oscoi1a* 変異株では 2 ライン、*oscoi1b* 変異株では 3 ライン、*oscoi2* 変異株では 2 ライン取得しでき、これら植物体を用いて以降の解析を行った。

イネ *coi* 変異株における稔実率は、*oscoi2* 変異株でのみ顕著な低下を示した。*oscoi2* 変異

株における葯について卓上型電子走査顕微鏡によって観察を行うと、開花後に葯の開裂が起こっておらず、花粉が外へ放出されないことが分かった。次に、変異株のリーフディスクに MeJA 処理を行うと、*oscoi2* 変異株でのみファイトアレキシンの蓄積は顕著に抑制された (Fig.2)。JA を添加した培地にて変異株の種子を播種して生育させると、*oscoi2* 変異株では根の伸長生長の抑制が緩和したが、地上部の伸長生長は全ての変異株で抑制された。これらのことから、OsCOI2 は稔性と防御応答、地下部の伸長生長の抑制に関与することが分かった<sup>[3]</sup>。一方で、3 つの COI すべてが地上部の伸長抑制に冗長的に関与し、地上部と地下部での抑制メカニズムが異なっていると共に、受容体の機能に差異があることも示された。

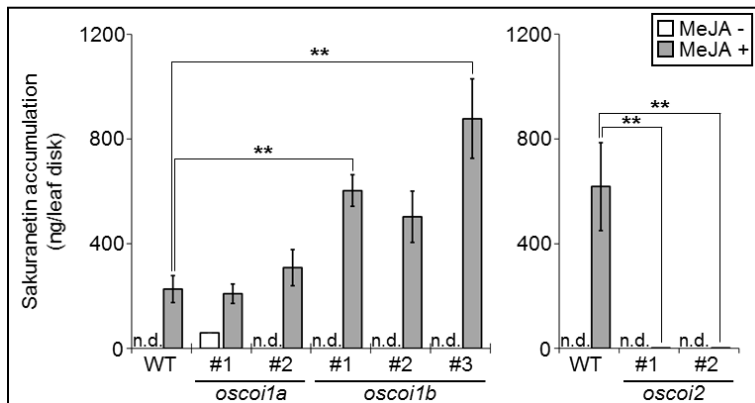


Fig.2 イネ *coi* 変異株のファイトアレキシンの蓄積量

#### 活性型 JA-Ile の精製と COI-JAZ 相互作用解析

(+)-7-*iso*-JA-Ile をリガンドとし、OsJAZ2 と OsJAZ4、OsJAZ5 のペプチドとイネ COI との相互作用解析を行った。その結果、OsJAZ2 と OsJAZ5 は JA-Ile を介して OsCOI2 とのみ相互作用した (Fig.3)<sup>[3]</sup>。一方、OsJAZ4 はすべての COI1 と相互作用することが分かった。OsJAZ2 と OsJAZ5 は、その他の JAZ と比較して COI1 結合ドメイン (Jas) のアミノ酸配列の保存性が低く、divergent Jas と呼ばれるドメインをもつ。Jas ドメインの構造の違いが COI1 との相互作用の選択性に関与することが考えられた。

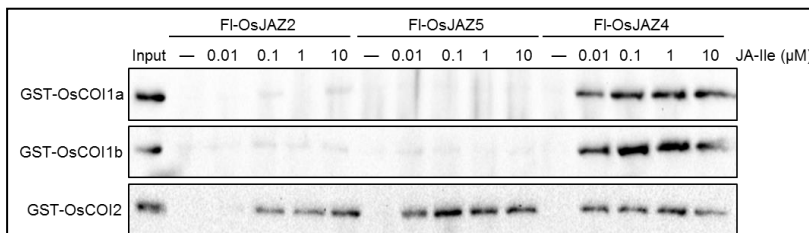


Fig.3 イネの COI1-JAZ 相互作用解析

#### OsJAZ2 および OsJAZ5 の生理機能の解析

過剰発現用ベクターへ OsJAZ2 と OsJAZ5 をクローニングし、それをアグロバクテリウム法により、日本晴野生型へと導入した。導入した *JAZ* 遺伝子が過剰発現していた植物体を用いて、MeJA 処理をした。その結果、*OsJAZ2* 過剰発現株ではファイトアレキシンの蓄積量は検出限界以下だった (Fig.4)。このことから、OsJAZ2 はファイトアレキシンの生産の抑制に関与

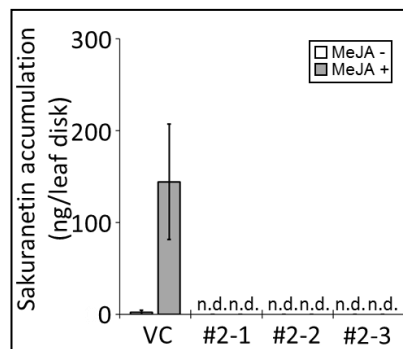


Fig.4 *OsJAZ2* 過剰発現株のファイトアレキシンの蓄積量

することが示唆された。一方で、*OsJAZ5* 過剰発現株を MeJA 処理しても、ファイトアレキシン蓄積量はベクターコントロール (VC) と同等の蓄積量であった。そこで、*OsJAZ5* の Jas ドメインを欠損させた *OsJAZ5* Δ Jas を過剰発現させ、MeJA 処理をした。その結果、ファイトアレキシンの蓄積は顕著に抑制されることが分かった。これらのことから、*OsJAZ2* および *OsJAZ5* は JA 誘導的なファイトアレキシン生産を抑制する機能を持つことが明らかになった。また、*OsJAZ5* の Jas ドメインが *OsJAZ5* の機能の発現に関わることが示唆された。

#### ハイゴケ JAZ-MYC2 の相互作用解析

ハイゴケ JAZ-MYC2 のタンパク質間相互作用の解析を行うと、すべての JAZ と MYC2 の組み合わせで相互作用することが示された<sup>4</sup>。このことから、蘚類であるハイゴケにおいても、COI-JAZ-MYC2 を介したシグナル伝達機構が保存されており、防御応答の誘導において機能している可能性が考えられる。

#### 総括と展望

本博士論文研究においては、イネとハイゴケにおける COI-JAZ を介したシグナル伝達機構の解明を行った。まず、イネでは *OsCOI2*-*OsJAZ2* と *OsCOI2*-*OsJAZ5* の受容体複合体が、JA 誘導的な防御応答や老化に関与することを示した (Fig.5)。また、*OsCOI2* が主要に関与する地下部の伸長抑制と稔性においてもこれらの JAZ が主要に関与し、3 つのイネ COI とその他の JAZ が地上部の伸長抑制に関与すると予想できる。そこで、今後は JAZ 過剰発現株を用いた稔性と地下部の伸長抑制の解析を行うことで、*OsCOI2*-*OsJAZ2* と *OsCOI2*-*OsJAZ5* の受容体複合体の生理機能の全容が明らかになることが期待できる。

次に、ハイゴケの JAZ-MYC2 の相互作用解析から、これらが物理的な相互作用をすることが示され、蘚類においても COI-JAZ-MYC2 を介したシグナル伝達機構が保存されていることが示唆された。今後は、ハイゴケの COI-JAZ のリガンドを同定することで、シグナル伝達機構の解明を進める必要がある。以上のように本博士論文研究は、陸上植物における JA 類の受容体の機能の解明に貢献した。

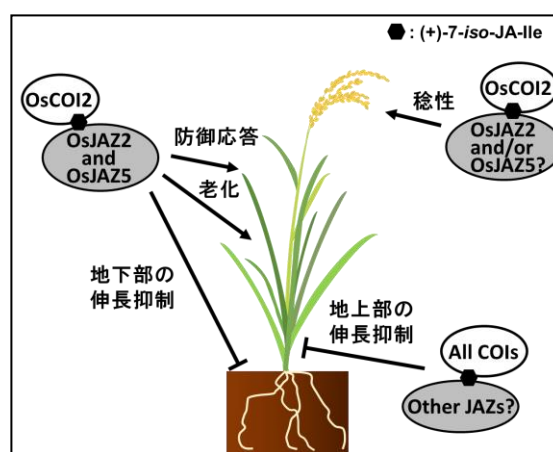


Fig.5 イネにおける JA の生理作用ごとのシグナル伝達機構のモデル

#### 参考文献

- [1] Fonseca et al., *Nature Chemical Biology*, 5:344-350 (2009)
- [2] Takaoka et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 294:5074-5081 (2019)
- [3] Inagaki et al., *Plant & Cell Physiology*, doi:10.1093/pcp/pcac166 in press
- [4] Inagaki et al., *Frontiers in Plant Science*, 12:688565 (2021)