

氏名	鳥日娜
授与した学位	博士
専攻分野の名称	理学
学位授与番号	博甲第5051号
学位授与の日付	平成26年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	A molecular and genetic study of the response to polyamines in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナにおけるポリアミンに対する応答の分子遺伝学的解析)
論文審査委員	教授 高橋 卓                      教授 高橋裕一郎                      准教授 中越 英樹

### 学位論文内容の要旨

シロイヌナズナのスペルミン合成欠損変異株は、乾燥や塩ストレスに弱く、防御応答への関与が示唆されている。サーモスペルミンはスペルミンの構造異性体で、シロイヌナズナのサーモスペルミン合成酵素遺伝子 *ACAULIS5 (ACL5)* の欠損変異は、木部組織の過剰な分化と著しい茎の伸長阻害を示す。*acl5* 変異株にサーモスペルミンを与えると、木部分化が抑制され、茎の伸長がある程度回復する。しかし、どうしてサーモスペルミンにそのような効果があるのか、分子レベルでは明らかでない。一方、植物におけるポリアミンの代謝、取り込み、輸送に関しては、ポリアミン分解酵素が同定され、また、根のポリアミン吸収輸送タンパクが最近見つかったが、組織間の輸送や恒常性の維持機構はよくわかっていない。本研究では、植物細胞のポリアミン応答に関するこれらの問題を解明するために、以下の解析をすすめた。

サーモスペルミンの遺伝子発現への影響を調べるために、*acl5* 変異株を用いたマイクロアレイ解析とリアルタイム RT-PCR の実験を行った。その結果、維管束分化の誘導に関わる多くの転写因子やオーキシン合成酵素、オーキシン応答調節因子 *MONOPTEROS (MP)* などの遺伝子発現が、*acl5* 変異株において上昇していることがわかった。これらの発現は、外からのサーモスペルミン、または遺伝子導入植物における *ACL5* の誘導発現によって低下した。*MP* はオーキシンで誘導される維管束分化の鍵遺伝子である。*mp* 変異芽生えにおける *ACL5* の発現を調べたところ、ほとんど発現が認められなかった。*ACL5* は、通常、維管束の木部前駆細胞で発現する。これらの結果、オーキシンが *MP* を介して維管束分化の関連遺伝子の発現と木部前駆細胞の形成を誘導すると、*ACL5* の発現によりサーモスペルミンが合成され、サーモスペルミンは木部の分化が過剰にならないよう、オーキシンの合成や *MP* の発現を抑制するという、負のフィードバック機構が働いていることが明らかになった。サーモスペルミンは転写因子をコードする *SAC51* の mRNA の翻訳を促進することが示されており、*SAC51* の機能を介して *MP* の発現や木部分化が抑えられると想定された。

一方、以前に単離された高濃度のスペルミンに耐性を示す変異株の1つ、*sper3-1* について解析をすすめ、*sper3-1* は、野生型とかけ合わせたF1植物でも中間的な耐性を示したため、半優性変異と判断された。次世代シーケンサー解析により、変異の原因として硝酸輸送タンパクをコードする *NRT1.3* 遺伝子に塩基置換が見つかった。*NRT1.3* と高い相同性を示す *NRT1.1*、*NRT1.4* や *NRT1.2* の遺伝子欠損変異はスペルミン耐性を示さなかった。*NRT1.3* プロモーター-GUS融合遺伝子を導入した植物のGUS染色から、*NRT1.3* は葉肉細胞や茎の皮層など、光合成の盛んな組織で特異的に発現していることがわかった。また、*NRT1.3-GFP* 融合遺伝子を用いた解析から、*NRT1.3* の細胞膜への局在が確認された。各変異株の硝酸耐性を調べたところ、*sper3-1* や *sper3-2* 変異は高濃度の硝酸塩に高い感受性を示し、根から吸収された硝酸が正常に代謝されず、根や地上部の細胞外に過剰に蓄積していると考えられる。また、*sper3-1* が半優性なのに対し、*sper3-2* は劣性の表現型を示したことから、*NRT1.3* は *NRT1.1* 同様の二量体を形成し、アミノ酸が置換された *sper3-1* は遺伝子産物が阻害的に機能する一方、*sper3-2* は機能欠損を引き起こしていると予想された。これらの結果から、高濃度の硝酸塩はポリアミンの取り込みを抑制していることが示唆された。この変異を用いた今後の解析により、ポリアミンと硝酸の取り込みの平衡に関する重要な調節機構の解明が期待される。

## 論文審査結果の要旨

ポリアミン（主にプトレシン、スペルミジン、スペルミン）は、あらゆる生き物が持つ低分子塩基性物質で多様な生理活性を持つ。サーモスペルミンはスペルミンの構造異性体で、シロイヌナズナのサーモスペルミン合成酵素遺伝子 *ACL5* の欠損変異株は、木部組織の過剰な分化と著しい矮化を示す。*acl5* 変異株にサーモスペルミンを与えると表現型がある程度回復する。一方、植物におけるポリアミンの取込みに関しては、根のポリアミン吸収輸送タンパクが最近見つかったが、組織間の輸送や恒常性維持の機構はよくわかっていない。本研究では、植物のポリアミン応答に関するこれらの問題を解明するために、以下の解析がすすめられた。

サーモスペルミンの遺伝子発現への影響を調べるため、*acl5* 変異株を用いたマイクロアレイと PCR による発現解析が行われた。その結果、維管束分化の誘導に関わる多くの転写因子やオーキシン合成酵素、オーキシン応答調節因子 *MP* などの遺伝子発現が、*acl5* 変異株で上昇していることがわかった。これらの発現は、サーモスペルミン処理により低下した。*MP* はオーキシンで誘導される維管束分化の鍵遺伝子である。*ACL5* は、通常、維管束の木部前駆細胞で発現する。これらの結果から、オーキシンが *MP* を介して維管束分化や木部前駆細胞の形成を誘導すると、*ACL5* の発現によりサーモスペルミンが合成され、サーモスペルミンは木部組織が過剰にならないよう、オーキシンの合成や *MP* の発現を抑制するという、負のフィードバックが働いていることが明らかになった。

一方、高濃度のスペルミンに耐性を示す変異株 *sper3* の解析から、変異の原因遺伝子として硝酸輸送タンパクをコードする *NRT1.3* が見つかった。GUS 染色や GFP を用いた解析から、*NRT1.3* は葉肉細胞や茎の皮層などの柔組織で特異的に発現し、*NRT1.3* タンパクは細胞膜に局在することがわかった。*sper3* 変異は高濃度の硝酸塩に感受性を示すことから、根から吸収された硝酸が地上部に運ばれず根に過剰に蓄積していると考えられ、スペルミンは窒素源として転用されていることが示唆された。

本研究成果は、サーモスペルミンの作用機構、およびポリアミンと硝酸の取込みに関する調節機構の解明につながる重要な知見を含み、博士の学位に値すると判断した。