

学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	自然科学研究科
専攻 Division	バイオサイエンス専攻
学生番号 Student No.	5 1 4 2 3 4 0 4
氏名 Name	烏日娜 (ウリナ)

学位論文題目 Title of Thesis (学位論文題目が英語の場合は和訳を付記)

A molecular and genetic study of the response to polyamines in *Arabidopsis thaliana*
(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)

学位論文の要旨 Abstract of Thesis

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化合物で、遺伝子の翻訳調節やタンパク質の活性調節など多面的な生理活性を持つことが知られる。植物では、器官形成の促進や環境ストレス応答などに関与することが示されている。プトレシンは、アルギニンからアルギニン脱炭酸酵素 ADC、またはオルニチンからオルニチン脱炭酸酵素 ODC に触媒される経路を経て合成される。スペルミジンは、スペルミジン合成酵素 SPDS により、脱炭酸 S-アデノシルメチオニン由来のアミノプロピル基がプトレシンに転移して合成される。プトレシンやスペルミジンの生合成酵素遺伝子欠損変異株の解析から、この二つのポリアミンはあらゆる生き物の生育に必須であることが示されている。スペルミンは、スペルミン合成酵素 SPMS によってスペルミジンから合成される。シロイヌナズナでは、スペルミン合成酵素遺伝子 SPMS の欠損変異株に形態異常は認められないが、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、植物と一部の細菌でスペルミジンから合成される。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もたらす。変異株にサーモスペルミンを外から加えると、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、あるいは取り込み、輸送に関しては、ポリアミン分解酵素が同定され、また、シロイヌナズナの除草剤 (パラコート) 耐性変異が高濃度のポリアミンにも耐性を示し、その原因遺伝子から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、シロイヌナズナの芽生えを用いて、外的なサーモスペルミンに対する遺伝子発現への影響を調べた。さらに、高濃度のスペルミンに耐性を示す突然変異株 *sper3* について、原因遺伝子の同定と特徴づけを行った。

1) シロイヌナズナにおけるサーモスペルミンに対する応答

シロイヌナズナのサーモスペルミン合成酵素遺伝子の欠損突然変異株 *acl5* と野生型株を用いたマイクロアレイ解析とリアルタイム RT-PCR による確認実験から、維管束分化の誘導に関わる多くの転写因子

VND6、VND7やATHB8、道管形成時の細胞死に関わるプロテアーゼ SBT5.2、道管と師管の分化の調節に関わる受容体型キナーゼ TDR やオーキシン応答調節因子 MONOPTEROS (MP)、オーキシン合成酵素遺伝子 YUC2 などの発現が、*acl5* 変異株において上昇していることがわかった。これらの遺伝子の発現は、外からのサーモスペルミン、または遺伝子組換え植物における *ACL5* の誘導発現によって低下することが確認された。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ことから、*mp* 変異株芽生えにおける *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、維管束の基部前駆細胞で発現している。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基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基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。サーモスペルミンに応答して発現が顕著に増加する遺伝子は見つけられなかったが、サーモスペルミンは転写因子をコードする *SAC51* 遺伝子の 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ていると想定された。

2) シロイヌナズナにおけるポリアミン耐性変異株の解析

以前の研究で、高濃度のスペルミンに耐性を示す変異株が3つ(*sper1*~*sper3*)単離されており、本研究では *sper3* について解析をすすめた。*sper3* 変異株は、野生型芽生えの葉が退緑を示すスペルミン 3 mM に加えて、スペルミジン 5 mM、プトレシン 25 mM の濃度に対しても耐性を示すことがわかった。塩基性アミノ酸であるリジンとアルギニンに対する耐性は、野生型と変わらなかった。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ことから半優性変異と判断された。詳細なマッピングと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り、46番目のグルタミンがリジンに置換される点突然変異であることがわかった。*NRT1.3* の T-DNA 挿入変異も高濃度のスペルミンに耐性を示したことから *sper3-2* とし、点変異のアレルを *sper3-1* とした。

NRT1.3 は *NRT1* (PTR) ファミリーに属し、*NRT1.1* (*CHL1*)、*NRT1.4* や *NRT1.2* と高い相同性を示す。これらの遺伝子の欠失変異や T-DNA 挿入変異は、スペルミンに耐性を示さなかった。また、*NRT1.1* のみ硝酸濃度に応じた両親和性の硝酸輸送体であり、*NRT1.1* と *NRT1.2* は根で硝酸の吸収に機能していること、*NRT1.4* は葉柄で働くことが示唆されている。*NRT1.3* プロモーター-GUS 融合遺伝子を作成し、形質転換植物における GUS 染色を調べた結果、*NRT1.3* は地上部器官の表皮や根では発現せず、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* は細胞膜に局在していることが確認された。各変異株の硝酸塩に対する耐性を調べたところ、*sper3-1* や *sper3-2* 変異株は野生型や他の変異に比べて、高濃度の硝酸塩 (100 mM) に高い感受性を示したことから、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* 変異が半優性なのに対し、*sper3-2* 変異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* 変異は遺伝子産物が阻害的に機能する一方、*sper3-2* 変異は機能欠損を引き起こしていると考えられた。これらの変異がスペルミンに耐性を示したのは窒素源として転用されたためと考えられる。ただし、HPLC 解析では、*sper3-1*、*sper3-2* 変異株と野生型との間に、植物全体のポリアミンの取り込み効率に違いは認められなかった。ポリアミンは、硝酸と異なりカチオンであることから、*NRT1.3* がポリアミン輸送体であることは考え難い。

以上の研究から、*NRT1.3* は地上部柔組織で働く硝酸輸送体であることが示唆され、*sper3* 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。