

氏 名	懸樋 潤一
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4777号
学位授与の日付	平成25年 3月25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 study on the mode of action of thermospermine in stem elongation of <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナの茎の伸長におけるサーモスペルミンの作用機構の研究)
論文審査委員	教授 高橋 卓 教授 上田 均 准教授 阿保 達彦

学位論文内容の要旨

シロイヌナズナの *acl5* 変異株は著しい茎の伸長欠損を示し、その原因遺伝子 *ACL5* はサーモスペルミン合成酵素をコードする。サーモスペルミンはポリアミンの1つで、スペルミンの構造異性体である。サーモスペルミンの作用機構を解明するため、*acl5* 変異株の茎の伸長を回復させる抑圧変異株 *sac* が複数単離されており、その1つ *sac51-d* 変異の原因遺伝子 *SAC51* は bHLH 型転写因子をコードし、mRNA の 5'リーダー配列に5つの短いコード領域、いわゆる upstream ORF (uORF) をもつことがわかっている。また、変異は uORF の1つに見出され、この変異が下流にコードされている転写因子の翻訳効率の向上と茎の伸長回復をもたらすことが示されていた。また、*sac52-d* では、リボソームタンパク質遺伝子 *RPL10A* に変異が見出されていた。本研究では、生理活性に重要なサーモスペルミンの構造的特徴を明らかにする一方、新たな *sac* 変異の原因遺伝子の同定、機能解析をすすめ、植物の茎の伸長過程におけるサーモスペルミンの作用機構の解明を目指した。

茎の伸長活性をもたないスペルミン（炭素鎖の並び方が C3C4C3）と異なり、サーモスペルミン（C3C3C4）には C3C3 構造が含まれる。ポリアミン添加実験と遺伝子発現解析により、サーモスペルミンと共通の構造をもつノルスペルミン（C3C3C3）がサーモスペルミンと同様の活性をもつことを示した。ノルスペルミジン（C3C3）、ホモカルドペンタミン（C3C3C3C4）では代替する効果が見られなかったことから、C3C3 構造をもち、4つのアミノ基を有する直鎖状のテトラアミンが生理活性に重要であることが示唆された。

一方、*acl5* 変異に対する抑圧変異のうち、*sac56-d* 変異について原因遺伝子の同定を試みた結果、リボソームタンパク質 L4 をコードする遺伝子 *RPL4A* にアミノ酸置換をもたらす変異を見出した。RPL4 は、リボソームにおいて合成された新生ペプチドの出口トンネル付近に位置する。レポーター遺伝子を用いた系により、この変異が *SAC51* 遺伝子の主 ORF の翻訳効率を上昇させることが確かめられた。さらに、*sac53-d* 変異の原因遺伝子が活性型 C キナーゼ受容体 *RACK1* をコードすることを実証した。*RACK1* はリボソーム小サブユニットの構成要素であり、*sac53-d* でも *SAC51* 遺伝子の主 ORF の翻訳量の増加が認められた。*sac52-d* 同様、茎の伸長がリボソームの構成要素の異常によって回復したという事実は、uORF を介した *SAC51* 遺伝子の翻訳制御にリボソームが重要な役割を担っていることを示唆する。*acl5* 変異株における *SAC51* mRNA の安定性をコルディセピン処理により調べた結果、サーモスペルミンの添加、及び *sac52-d*、*sac53-d*、*sac56-d* 変異によって、安定化が認められた。*SAC51* mRNA はナンセンス変異依存的 mRNA 分解機構（NMD）の標的であることが示唆されたことから、NMD に異常がある変異株 *upf1* 及び *upf3* において、*SAC51* mRNA 量を調べた結果、過剰に蓄積していることが示された。以上より、*SAC51* mRNA はサーモスペルミンによる uORF を介した翻訳調節と mRNA 分解機構によって二重に制御されていることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

シロイヌナズナの *acl5* 変異株は著しい茎の伸長欠損を示し、その原因遺伝子 *ACL5* はサーモスペルミン合成酵素をコードする。サーモスペルミンはポリアミンの 1 つで、スペルミンの構造異性体である。その作用機構を解明するため、*acl5* 変異株の茎の伸長を回復させる抑圧変異株 *sac* が単離され、その 1 つの原因遺伝子として同定された *SAC51* の翻訳効率をサーモスペルミンが増加させることによって、茎の伸長がもたらされることが示唆されている。本論文では、サーモスペルミンの生理活性に重要な分子構造を明らかにする一方、新たな *sac* 変異の原因遺伝子の同定、機能解析をすすめ、植物の茎の伸長過程におけるサーモスペルミンの作用機構の解明を目指した。

茎の伸長活性をもたないスペルミン（炭素鎖の並び方が **C3C4C3**）と異なり、サーモスペルミン（**C3C3C4**）には **C3C3** 構造が含まれる。ポリアミン添加実験と遺伝子発現解析により、サーモスペルミンと共通の構造をもつノルスペルミン（**C3C3C3**）がサーモスペルミンと同様の活性をもつことを示した。ノルスペルミジン（**C3C3**）、ホモカルドペンタミン（**C3C3C3C4**）では代替効果が見られなかったことから、**C3C3** 構造をもつテトラアミンが生理活性に重要であることが示唆された。

一方、*acl5* 変異に対する抑圧変異 *sac53-d*, *sac56-d* の原因遺伝子として、それぞれリボソームの構成要素をコードする *RACK1*, *RPL4A* を同定した。また、以前に同定された *RPL10A* が原因遺伝子である *sac52-d* 変異同様、これらリボソームタンパク質の変異が *SAC51* の主 ORF の翻訳効率を増加させることを明らかにした。*acl5* 変異株における *SAC51* mRNA の安定性をコルディセピン処理により調べた結果、サーモスペルミンの添加、及び *sac52-d*, *sac53-d*, *sac56-d* 変異によって、安定化が認められた。*SAC51* mRNA はナンセンス変異依存 mRNA 分解機構（NMD）の標的であると予想されたため、NMD に異常がある変異株 *upf1* 及び *upf3* において、*SAC51* mRNA 量を調べた結果、過剰に蓄積していることが示された。以上より、*SAC51* mRNA はサーモスペルミンによる uORF を介した翻訳調節と mRNA 分解機構によって二重に制御されていることが明らかになった。

本研究成果は、植物の茎の伸長におけるサーモスペルミンの作用機構に関する重要な知見を含み、今後の研究進展に大きく貢献すると評価されることから、博士の学位論文に値すると判定した。