

学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	自然科学研究科
専攻 Division	地球生命物質科学専攻
学生番号 Student No.	51424210
氏名 Name	吉本 香織

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 chemical biology analysis of the action of thermospermine in xylem differentiation of *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナの木部分化におけるサーモスペルミンの作用に関するケミカルバイオロジー解析)

学位論文の要旨 Abstract of Thesis

維管束植物において木部は、水や養分、シグナル分子を輸送する重要な組織系であるとともに、植物体の物理的な支持という機能も併せ持っており、陸上植物の進化と繁栄に不可欠であったと考えられる。木部の発生過程において、隣り合う細胞が順に木部構成細胞へと分化することにより、途切れることのない複雑なネットワークが植物体内に形成される。植物ホルモンのオーキシンは、維管束幹細胞の維持や木部分化に必要な転写制御因子の発現を誘導する。また、サイトカイニンやブラシノステロイド、ペプチド性の植物ホルモンが相互にクロストークし、維管束を構成する各細胞の増殖や分化を制御している。

一方、あらゆる生物の細胞内に低分子塩基性化合物のポリアミンが存在する。ポリアミンは、mRNAの安定化や翻訳促進、タンパク質の活性化など多面的な生理活性を持ち、植物では、器官の成長や環境ストレス応答に関与することが示されている。代表的なものにプトレシン、スペルミジン、スペルミンがある。スペルミンの構造異性体であるサーモスペルミンは、高度好熱菌から発見されたが、その機能はわかっていなかった。その後、植物においても検出され、木部が過剰に分化することによって茎の伸長欠損を示すシロイヌナズナの矮性変異株 *acl5* の解析から、*ACL5* 遺伝子がサーモスペルミン合成酵素をコードすることが示され、サーモスペルミンを *acl5* 変異株に投与すると変異株の茎の伸長が回復することが実証された。すなわち、*ACL5* により生合成されたサーモスペルミンは、木部分化の抑制因子として働き、茎の伸長に必要であることが明らかになった。さらに、サーモスペルミンの具体的な作用機構を明らかにする目的で、*acl5* 変異株の種子を変異誘発剤で処理し、茎伸長が回復したサプレッサー変異株が単離された。その一つ、*sac51-d* の解析から、bHLH 型転写因子をコードする *SAC51* 遺伝子の 5'リーダー配列には短い upstream ORF (uORF) が存在し、サーモスペルミンは uORF による *SAC51* の翻訳抑制を解消する働きがあることが示唆されている。従って、サーモスペルミンによる転写因子 *SAC51* の翻訳促進を介して、木部分化が抑制されていると予想される。しかし、他の植物ホルモンとの相互作用や機能の階層性は、全く調べられていない。

本研究では、シロイヌナズナの木部分化における生理活性物質としてサーモスペルミンの機能に着目し、その作用機構の解明を目指して、ケミカルバイオロジー手法を用いた解析を行った。

1) *acl5* 変異株の木部分化に影響を与える生理活性物質の探索

サーモスペルミンによる木部分化の抑制の詳細な分子機構を明らかにするため、木部分化制御因子の探索を行った。約 2000 種からなる化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより、*acl5* 変異株の過剰な木部分化をさらに亢進または抑制する生理活性物質の単離を試みた結果、2,4-D イソオクチルエステル(2,4-D IOE)が *acl5* 変異株の子葉に見られる過剰な木部分化を亢進することがわかった。オーキシニンに応答する DR5 プロモーター:レポーター遺伝子を導入した幼植物に 2,4-D IOE 添加処理したところ、レポーターの発現が顕著に促進された。従って、2,4-D IOE にはオーキシニンとしての活性があり、IOE が分解されて 2,4-D を遊離するオーキシニン前駆体として働くことが示唆された。天然オーキシニンであるインドール酢酸(IAA)では、木部分化の亢進が見られなかったが、代謝されにくい IAA の類縁体である 4-Cl-IAA では木部分化の亢進効果が見られた。このことを考え合わせると、2,4-D IOE は細胞に取り込まれても代謝されにくい、あるいは細胞外に排出されにくいいため、木部分化を誘導する効果が持続したと予想される。木部分化の亢進効果は野生株ではほとんど見られなかった。また、*acl5* 変異株において、サーモスペルミンと 2,4-D IOE の同時添加の効果を見たところ、2,4-D IOE による過剰な木部分化を亢進する効果はサーモスペルミンによって打ち消された。さらに、*acl5* 変異株の表現型を抑圧する *sac51-d* 変異株の幼植物を 2,4-D IOE 添加培地で培養したところ、2,4-D IOE による木部分化を亢進する効果は見られなかった。ACL5 遺伝子は前形成層や木部前駆細胞で発現し、2,4-D や IAA によっても誘導されることから、維管束植物におけるサーモスペルミンの働きは、オーキシニンの木部分化誘導活性に対する負のフィードバック機構の一端として、オーキシニンの活性を抑制することであると結論づけられた。

2) ザイレミンを用いた木部分化の制御機構の解析

1)より、木部分化の制御におけるオーキシニンとサーモスペルミンの拮抗作用が示されたが、まだサーモスペルミンの詳細な作用機構については解明されていない。そこで、サーモスペルミンの作用機構の解明を目的として、サーモスペルミンの合成阻害剤プロピルプトレシンを開発し、解析を行った。プロピルプトレシンは、スペルミジンの C3 構造 (プロピレン基) の末端にアミノ基が付いていない構造をしているため、スペルミジンのアンタゴニストとしてサーモスペルミン合成酵素の基質として認識されても、アミノプロピル基が結合できずサーモスペルミンが合成できないと予想した。これを含む培地でシロイヌナズナの幼植物を育てたところ、サーモスペルミンの合成が阻害されていることが確かめられた。また、木部の過剰な分化が誘導されたことから、*xylem inducer* を略してザイレミンと名付けた。さらに、シロイヌナズナ野生株の茎頂にザイレミンを投与し続けると茎の伸長が抑制された。一方、ザイレミンを添加した培地で生育したシロイヌナズナ野生株において、主根の伸長と側根数の増加、子葉の大きさの増大が観察された。培地にザイレミンとサーモスペルミンを同時に添加すると、外的なサーモスペルミンにより、木部分化の抑制が観察された。2,4-D IOE とザイレミンを同時添加すると、2,4-D IOE による顕著な木部分化促進効果がザイレミン処理によりさらに増強した。ザイレミンによりサーモスペルミンの合成が阻害されたため、2,4-D IOE のオーキシニンとしての効果が抑制できずに木部分化が増強されたと考えられる。さらに、リグニンの蓄積の増加も確認できた。サーモスペルミンを合成しない *acl5* 変異株とサプレッサー変異株 *sac51-d* に同様の処理を行ったところ、木部分化の促進効果は見られなかった。木部分化を促進するザイレミンの効果は、タバコにおいても示された。以上の結果より、ザイレミンがサーモスペルミンの合成阻害剤として利用できることを明らかにした。サーモスペルミンによる木部分化制御機構の解明の手がかりとなる一方、木質バイオマスの制御にも応用できると期待される。