

学位論文題名

Genetic and physiological studies on auxin-insensitive mutants of
Arabidopsis thaliana with a new organ specificity

(新しい器官特異性を示すシロイヌナズナの
オーキシン非感受性突然変異体の遺伝学的、生理学的研究)

学位論文内容の要旨

オーキシンは植物の伸長成長を促進する成長調節物質として1930年代に単離された植物ホルモンである。伸長成長以外にも植物細胞の分裂、成長に多面的な影響を及ぼしており、植物における生命現象の理解にはオーキシンの作用機構を明らかにすることが欠かせない。近年最も遺伝学的解析の進んでいる高等植物の一つであるシロイヌナズナを用いてオーキシン作用の分子遺伝学的研究が盛んに行われるようになった。ここで研究されている突然変異体は、比較的高濃度のオーキシンが成長を阻害する性質に着目して単離されたもので、高濃度のオーキシンによっても成長がそれほど阻害されないオーキシン耐性の突然変異体である。これら変異体の遺伝子座の幾つかはクローニングされ (Leyser et al., 1993; Bennett et al., 1996)、その研究はオーキシン作用の解明に大きく貢献したが、一方これらの突然変異体はオーキシンの成長阻害に関する変異体であるので、オーキシンの伸長促進作用の解明には限界があると言わざるをえない。理想的にはオーキシンの伸長促進作用に関する突然変異体を単離すべきだが、多数の植物集団について伸長の変化を調べるのは実際的ではない。そこで、申請者は直接伸長成長を観察するのではなく、オーキシンを下胚軸の片面だけに塗ったときに起こる偏差成長を調べることを試みた。オーキシンを茎の片面に与えてその屈曲を調べるのは、機器分析ができなかった時代にオーキシンの生物検定法として広く行われていた方法である。ただしこの生物検定法には主にマカラスムギの子葉鞘が使われていて、シロイヌナズナの下胚軸の太さはその数分の1程しかないためその実行には細心の注意と工夫が必要である。申請者は、シロイヌナズナの生育条件とオーキシン塗布後の条件を最適化することによって、シロイヌナズナ下胚軸で定量的なオーキシンによる屈曲反応を引き起こすことに成功した。そして同反応を利用して、屈曲を起こさない「まっすぐ (*massugu*)」突然変異体、*msg1*、を単離することができた。本研究では、*msg1*のオーキシン反応性と屈曲性、従来から知られているオーキシン耐性突然変異体との2重突然変異体の研究をとおして、オーキシン作用における*msg1*遺伝子座の役割の解明を試みた。

天然オーキシンであるインドール酢酸 (IAA) を塗布しても下胚軸の屈曲が全く起こらない突然変異体をEMSを変異原としたM₂種子4万個体から3個体単離した。それらは同一遺伝子座の劣性突然変異体で、その変異は5番染色体に位置することが判った。近傍には類似した突然変異体の報告がなく新しい変異体であると思われる。この遺伝子座を*msg1*と命名した。

msg 1 変異体の下胚軸は1 μ Mから1 mMの範囲にわたってIAAによる屈曲反応を示さなかったことからIAAに対する感受性を失った変異体であることが判った。*msg 1*の下胚軸はオーキシン非感受性と同時に重力屈性に異常があった。このことはこれまで単離されているオーキシン耐性変異体もすべてオーキシン感受性が変化している部位で重力屈性が異常であることと合わせて、オーキシンが重力屈性の発現に関わっていることを強く示唆している。

培地に加えたオーキシンやエチレン前駆体のACCは根や下胚軸の成長を阻害するが、*msg 1*は下胚軸でのみオーキシン耐性を示し、ACC耐性はまったくなかった。これまでシロイヌナズナで単離されているオーキシン耐性変異体はすべてオーキシンとエチレンの両方に耐性を示す。*msg 1*はオーキシンのみに耐性を示す初めてのオーキシン非感受性変異体である。

オーキシンはエチレン合成を誘導し、エチレンは成長を阻害することが知られている。エチレン合成阻害剤AVGを高濃度のオーキシンと同時に投与したところ、野生型では成長阻害に変化がなかったが、*msg 1*の下胚軸はオーキシンのみを与えたときより阻害が弱くなった。従って、オーキシンによる成長阻害はオーキシンのみの経路が大部分を占めるものの、オーキシンが誘導するエチレンによる阻害の経路も存在すること、そして*msg 1*はオーキシンのみに反応する経路に欠損があることが*msg 1*の発見により判った。

合成オーキシンの2, 4-Dを培地に加えると野生型の葉は白化(chlorosis)を起こす。*msg 1*の葉は2, 4-Dによる白化についても野生型より耐性だった。また、*msg 1-3*の上向きに反り上がった葉は2, 4-Dの濃度に依存して野生型の葉に復帰した。このように*msg 1*の葉はクロロフィル含量に関してオーキシンの影響を受けにくい、下偏成長した葉の展開に関してはオーキシン感受性であった。従って*msg 1*の葉では葉の白化に関する経路に欠損があるものの、すべてのオーキシン作用が失われたわけではないことが判った。

*msg 1*と*axr 1*の二重変異体の下胚軸は*axr 1*や*msg 1*より強いオーキシン耐性を示した。また、二重変異体の形態は両方の親株の表現型を示したのでMSG1とAXR1遺伝子座は異なるオーキシン信号伝達経路に位置していると考えられる。

オーキシンによる伸長成長促進作用は遺伝子発現を介していることが知られており、オーキシン誘導性遺伝子がいくつか単離されている。そのような遺伝子の一つ、エンドウのオーキシン誘導性遺伝子PS-1AA4/5のプロモーターとレポーター遺伝子GUSの融合遺伝子はシロイヌナズナの根と下胚軸の伸長領域で発現する。*msg 1*の下胚軸ではオーキシン処理による増強の程度は野生型に比べて低かった。*msg 1*の根では野生型と同程度の発現を示した。従って、MSG1はPS-1AA4/5遺伝子の発現を強める働きを持っており、MSG1遺伝子がオーキシン信号伝達経路の中でPS-1AA4/5遺伝子の上流に位置していることが判った。

さらにmassuguクラスの変異体を単離するために下胚軸で重力屈性を示さない変異体の単離を行った。その結果、3個体の新しい変異体が単離でき、*jyuryoku (jrk)*と命名した。*jrk 0-197*の下胚軸はIAAを塗布すると野生型より弱く屈曲したので新しいmassuguクラスの変異体であると考えられる。*jrk 0-48*は野生型と同程度の屈曲を示し、*jrk 0-59*は*msg 1*の4番目のアレルだった。野生型の花茎は重力に対し負の屈地性を示すが、*jrk 0-48*の花茎は示さなかった。*msg 1*と*jrk 0-197*の花茎は正常だった。

申請者は地上部器官に特異的なオーキシン非感受性変異体*msg 1*をシロイヌナズナから単離した。*msg 1*の外から与えたオーキシンに対する非感受性は下胚軸と本葉に限定され

ており、*PS-1AA4/5* 遺伝子の発現異常も下胚軸にのみ見られた。これまで報告されているオーキシン関連変異体は根のみ、または根と地上部の両方に欠損があるものだけなので、*msg 1* は新しい器官特異性を示すオーキシン非感受性変異体である事が判った。この結果はオーキシン作用の反応経路にはほぼ独立な複数の経路があって、それぞれ器官特異的であることを示している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 興太朗
副 査 教 授 吉 田 静 夫
副 査 教 授 米 田 好 文 (大学院理学研究科)
副 査 助 教 授 奥 山 英 登 志
副 査 助 教 授 小 保 方 潤 一

学 位 論 文 題 名

Genetic and physiological studies on auxin-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* with a new organ specificity

(新しい器官特異性を示すシロイヌナズナの
オーキシシン非感受性突然変異体の遺伝学的、生理学的研究)

オーキシシンは植物の伸長成長を促進する成長調節物質として最初に単離されたが、その後伸長成長以外の植物の発生、生理現象を多面的に制御する植物ホルモンであることが明らかになった。植物における生命現象の理解にはオーキシシンの作用機構を明らかにすることが欠かせないので、近年遺伝学的解析の進んでいるモデル植物シロイヌナズナを用いてオーキシシン作用の分子遺伝学的研究が行なわれている。高濃度のオーキシシンは植物の成長を阻害する。この性質を利用して高濃度のオーキシシンによっても成長がそれほど阻害されないオーキシシン耐性の突然変異体はいくつか単離され現在まで研究されてきた。この研究はオーキシシン作用の解明に大きく貢献したが、一方これら突然変異体はオーキシシンの成長阻害に関する変異体であるので、この研究でオーキシシンの伸長促進作用を解明できるかどうかという点には問題が残る。オーキシシンの伸長成長促進機構の解明には同作用に関する突然変異体を単離して研究するべきだが、多数の植物集団について伸長の変化を調べるのは実際的ではない。そこで、申請者は直接伸長成長を観察するのではなく、オーキシシンを芽生え胚軸の片面だけに塗ったときに起こる偏差成長を調べることを試みた。

オーキシシンを茎の片面に与えてその屈曲を調べる屈曲試験は、機器分析ができなかった時代にオーキシシンの生物検定法として広く行われていた方法である。た

だしこの検定法には主にマカラスムギの子葉鞘が使われていた。シロイヌナズナの胚軸の太さはマカラスムギの数分の1程しかないためシロイヌナズナの胚軸ではオーキシンの屈曲試験は行われたことはなく、その実行には細心の注意と工夫が必要である。申請者は、シロイヌナズナの生育条件とオーキシン塗布後の条件を最適化することによって、シロイヌナズナ胚軸で定量的なオーキシンによる屈曲反応を引き起こすことに成功した。そして同反応を利用して、オーキシンによる屈曲を起こさない「まっすぐ (*massugu*)」突然変異体、*msg1*、を単離することができた。本論文の結果は4章に分かれ、第1章ではオーキシンやその他の植物ホルモンに対する*msg1*の反応性とその屈地性、第2章では*msg1*におけるオーキシン誘導性遺伝子の発現、第3章では従来から知られているオーキシン耐性突然変異体 (*axr1*と*aux1*)と*msg1*との2重突然変異体の分析、第4章では屈地性試験による他の「まっすぐ」突然変異体の単離について述べ、これらの研究をとおしてオーキシン作用における*msg1*遺伝子座の役割の解明を試みている。

*msg1*は5番染色体に位置する劣性突然変異で、胚軸がオーキシンによる屈曲を示さないほか、オーキシン耐性、屈地性、オーキシン誘導性遺伝子の発現の点で異常を示したが、それらの異常は胚軸と葉に限られていた。このことから、オーキシン作用の反応経路にはほぼ独立な複数の経路があって、それぞれ器官特異的であることが分かった。また、*msg1*はエチレン耐性ではなかったのも、オーキシンによる伸長阻害にはエチレンから独立した経路があることが分かった。二重変異体の研究からこれら遺伝子座は異なるオーキシン信号伝達経路に位置していると考えられる。重力屈性を示さない変異体のスクリーニングを行った結果、オーキシンによる屈曲に異常のある突然変異が*msg1*以外にさらに存在することも分かった。

申請者の本論文をまとめるに至る精力的な実験と未知の領域を切り開こうとする意欲を審査員一同は高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位などもあわせ申請者が博士(地球環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。