

学位論文題名

Molecular and Genetic Analyses
of the *Arabidopsis* *ACAULIS5* gene.

(シロイヌナズナの *ACAULIS5* 遺伝子に関する分子遺伝学的解析)

学位論文内容の要旨

ロゼット植物であるシロイヌナズナは、栄養成長期においてはロゼット状に平らに葉を展開し、ほとんど節間成長を行わないが、生殖成長期へ移行後、花芽の形成に伴って急速に花茎を伸長させる。このように植物の花序の全体的な形態は、いつ・どこの節間の茎が・どの程度伸長するかによって決定されている。本研究では、植物の花序形成機構を理解するために、花茎の伸長に特異的に欠損を持つ *acaulis(acl)5* 変異株の解析を行うと共に、染色体歩行によってその原因遺伝子を単離した。

acl5 変異株は栄養成長期においては野生型株との形態的差異はほとんど見られないが、生殖成長期に移行した後の花茎伸長に特異的に著しい欠損が観察された。花茎の細胞切片の観察から、茎の長さに比例して細胞が短くなっていることが明らかになった。また、細胞伸長にかかわると予想されており細胞壁構造変化に関与するエンド型キシログルカン転移酵素、*EXT A-1* と液胞膜の水チャネルタンパク質、*gTIP* の *acl5* の茎における mRNA 量は著しく低いことが示された。これらのことから、*ACL5* 遺伝子は花茎の細胞伸長に関与する機能を持つと予想された。一方、ジベレリンやブラシノライド等の植物ホルモン添加によって表現型の回復は見られなかった。このように *acl5* は新規のグループに属する矮小変異株と考えられた。

そこで *ACL5* 遺伝子の機能を解明するために、染色体歩行による遺伝子単離を目指して、染色体座位を決定したところ、5番染色体上腕のマーカー、*nga106* の近傍に位置することが示された。この点から YAC クローンを用いて染色体歩行を開始し、1つの YAC 上の約 400Kb 内に存在することが示された。続いてこの領域を P1 クローンを用いた染色体歩行によって contig を作成し、*ACL5* の存在領域を 1つの P1 クローン、約 80Kb に絞り込んだ。そこでまずこの P1 のミニ・ライブラリを λ フェージベクターを用いて作成し、この 80Kb 領域のゲノミック DNA フェージクローンによる contig をつなげた。続いてこの領域内に制限酵素多型を検出する PCR マーカーを多数見つけてさらに存在範囲の絞り込みを目指した。その結果最終的に 5つの λ クローンにわたる約 5.4 Kb に狭めることができた。しかしなが

らこの領域は、シロイヌナズナゲノムプロジェクトによる塩基配列解読がまだ進められていないため、さらに2-3Kbのサブクローンを作成して全体を網羅し、この領域の全塩基配列を決定した。

この塩基配列を解析した結果、少なくとも11個の遺伝子が存在することが明らかになり、続いてこれらの中からACL5の候補となる遺伝子を探索した。はじめにこれらの遺伝子の発現器官をノーザン解析により明らかにし、花序・花茎で発現の見られる6個の遺伝子をACL5候補遺伝子とした。さらにこれらの遺伝子のacl5変異株における塩基配列を決定し、野生型株との比較からacl5変異の原因となる塩基配列突然変異を持つ遺伝子を探索した。その結果、1個の遺伝子に突然変異部位が見つかった。この遺伝子は予想されるアミノ酸配列からこれまで動物や植物、酵母、大腸菌などに広く見つかっているポリアミン合成酵素の一つ、スペルミジン合成酵素と高い相同性が見られた。ポリアミンは動物では核酸に結合し、核酸の安定化やタンパク質の翻訳などに関与していること、生理活性としては細胞増殖・分化を促進する成長調節物質であることが示されている。植物でも古くから細胞増殖などの生理活性を持つことが示唆されているが、その役割はよくわかっておらず、大変興味深い。また発見された突然変異部位は、スペルミジン合成酵素のco-factorである脱炭酸型S-アデノシルメチオニンの結合部位と予想されているよく保存された領域に存在することが明らかになった。

そこでこの遺伝子を最重要ACL5候補遺伝子と考え、この遺伝子領域と上流約1.5kbを含むゲノム断片をacl5変異株へ遺伝子導入し、相補性検定を行った。その結果、8個体の形質転換株が得られ、そのうち7個体がT1世代においてacl5表現型を完全に相補し野生型表現型を示した。ノーザン解析により発現部位を調べると、花茎で特に強い発現が見られた。この結果はacl5表現型とよく一致する。さらに、acl5変異株における発現量は、野生型株の約20倍に上昇していることが明らかになった。このことから、通常この遺伝子の発現は負のフィードバック調節を受けていることが示唆された。以上のことから、このスペルミジン合成酵素と高い相同性を示す遺伝子がACL5遺伝子そのものであることが確認された。

単離されたACL5遺伝子がスペルミジン合成酵素活性を保持しているかどうか確認するために、タンパク質発現ベクターに導入し、大腸菌内で活性の測定を試みた。しかしながら融合タンパク質を誘導すると、スペルミジンではなく、スペルミジンを基質として生成されるスペルミンのスポットが新たに検出され、逆にスペルミジン量は大きく低下していた。この結果から、ACL5遺伝子はスペルミン合成酵素活性を持つ可能性が示唆された。植物ではスペルミジン合成酵素を含むその他のポリアミン合成酵素は複数単離されているが、スペルミン合成酵素は植物で初めて単離された。さらに、植物においてポリアミン合成遺伝子の欠損が成長・分化にもたらす影響に関する報告は未だ見られず、本研究によって初めて形態形成にポリアミンが関与していることが遺伝子レベルで直接的に示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 米 田 好 文
副 査 教 授 落 合 廣
副 査 助 教 授 加 藤 敦 之

学 位 論 文 題 名

Molecular and Genetic Analyses of the *Arabidopsis* *ACAULIS5* gene.

(シロイヌナズナの *ACAULIS5* 遺伝子に関する分子遺伝学的解析)

植物の花序形成機構を理解するために、花茎の伸長に特異的に欠損を持つ *acaulis(ac1)5* 変異株の解析を行うと共に、染色体歩行によってその原因遺伝子を単離した。

ac15 変異株は栄養成長期においては野生型株との形態的差異はほとんど見られないが、生殖成長期に移行した後の花茎伸長に特異的に著しい欠損が観察された。花茎の細胞切片の観察から、茎の長さに比例して細胞が短くなっていることが明らかになった。また、細胞伸長にかかわると予想されており細胞壁構造変化に関与するエンド型キシログルカン転移酵素、*EXT A-1* と液胞膜の水チャネルタンパク質、*gTIP* の *ac15* の茎における mRNA 量は著しく低いことが示された。これらのことから、*ACL5* 遺伝子は花茎の細胞伸長に関与する機能を持つと予想された。一方、ジベレリンやブラシノライド等の植物ホルモン添加によって表現型の回復は見られなかった。このように *ac15* は新規のグループに属する矮小変異株と考えられた。

そこで *ACL5* 遺伝子の染色体座位を決定したところ、5番染色体上腕のマーカー、*nga106* の近傍に位置することが示された。この点から YAC クローンを用いて染色体歩行を開始し、1つの YAC 上の約 400Kb 内に存在することが示された。続いてこの領域を P1 クローンを用いた染色体歩行によって contig を作成し、*ACL5* の存在領域を 1つの P1 クローン、約 80Kb に絞り込んだ。そこでまずこの P1 のミニ・ライブラリを λ フェージベクターを用いて作成し、この 80Kb 領域のゲノミック DNA フェージクローンによる contig をつなげた。続いてこの領域内に制限酵素多型を検出する PCR マーカーを多数見つけてさらに存在範囲の絞り込みを目指した。その結果最終的に 5つの λ クローンにわたる約 5.4Kb に狭めることができた。さらに 2-3Kb のサブクローンを作成して全体を網羅し、この領域の全塩基配列を決定した。

少なくとも11個の遺伝子が存在することが明らかになり、これらの遺伝子の発現器官をノーザン解析により明らかにし、花序・花茎で発現の見られる6個の遺伝子をACL5候補遺伝子とした。その結果、1個の遺伝子に突然変異部位が見つかった。この遺伝子は予想されるアミノ酸配列からこれまで動物や植物、酵母、大腸菌などに広く見つかったポリアミン合成酵素の一つ、スペルミジン合成酵素と高い相同性が見られた。

そこでこの遺伝子を最重要ACL5候補遺伝子と考え、この遺伝子領域と上流約1.5kbを含むゲノム断片をacl5変異株へ遺伝子導入し、相補性検定を行った。その結果、8個体の形質転換株が得られ、そのうち7個体がT1世代においてacl5表現型を完全に相補し野生型表現型を示した。ノーザン解析により発現部位を調べると、花茎で特に強い発現が見られた。この結果はacl5表現型とよく一致する。さらに、acl5変異株における発現量は、野生型株の約20倍に上昇していることが明らかになった。このことから、通常この遺伝子の発現は負のフィードバック調節を受けていることが示唆された。以上のことから、このスペルミジン合成酵素と高い相同性を示す遺伝子がACL5遺伝子そのものであることが確認された。

単離されたACL5遺伝子がスペルミジン合成酵素活性を保持しているかどうか確認するために、タンパク質発現ベクターに導入し、大腸菌内で活性の測定を試みた。しかしながら融合タンパク質を誘導すると、スペルミジンではなく、スペルミジンを基質として生成されるスペルミンのスポットが新たに検出され、逆にスペルミジン量は大きく低下していた。この結果から、ACL5遺伝子はスペルミン合成酵素活性を持つ可能性が示唆された。植物ではスペルミジン合成酵素を含むその他のポリアミン合成酵素は複数単離されているが、スペルミン合成酵素は植物で初めて単離された。さらに、植物においてポリアミン合成遺伝子の欠損が成長・分化にもたらす影響に関する報告は未だ見られず、本研究によって初めて形態形成にポリアミンが関与していることが遺伝子レベルで直接的に示された。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。