博士（理　学）　今　井　章　裕

学位論文題名

Molecular and Genetic Studies on the Function of the *Arabidopsis thaliana ACL5* Gene in the Stem Elongation

（シロイヌナズナの花茎伸長における
ACL5 遺伝子の機能についての分子遺伝学的研究）

学位論文内容の要旨

シロイヌナズナの *acaulis5* (*acl5*) 変異体は、これまでに知られる植物ホルモンの生合成もしくはシグナル伝達に欠損を持つ矮性変異体とは異なり、生殖成長期への移行に伴う花茎伸長に特異的な欠損を示し、その原因遺伝子 *ACL5* はスペルミン合成酵素をコードしている。スペルミンをはじめとする一連のポリアミンは幅広い生物の細胞内に存在し、核酸やタンパク質などに結合してその安定性を高めており、細胞分裂過程に特に必要とされることが古くからの研究によって明らかにされている。その一方で近年、これらポリアミンの植物の形態形成や環境適応、および病原抵抗性への寄与を示す例が多数報告されてきている。しかし、その具体的な作用機構に関してはほとんど明らかにされておらず、*ACL5* 遺伝子がどのように花茎伸長とつながっているのかも未だ謎のままである。申請者は、博士課程における研究において、スペルミン合成酵素遺伝子の欠損変異体またはその復帰変異体を用いて、ポリアミンと植物の発生との関わりを分子遺伝学的な手法によって明らかにすることを目指した。

まず、植物生体内におけるスペルミン含量と花茎伸長との関係およびスペルミンの植物の発生における必要性を明らかにすべく、シロイヌナズナが持つもうひとつのスペルミン合成酵素遺伝子 *SPMS* のノックアウト変異体（*spms-1*）を単離し、*acl5-1* および *acl5-1* との二重変異体（*acl5-1 spms-1*）とともに各々の形態や細胞内のスペルミン含量の比較を行った。すると興味深いことに、花茎伸長に欠損が見られる *acl5-1* のスペルミン含量は野生型とほとんど変わらなかったのに対し、野生型と同様に生育する *spms-1* ではスペルミン含量が極端に減少していた。そして *acl5-1 spms-1* 二重変異体においてはスペルミンが全く検出されなかったにもかかわらず、*acl5-1* で見られたのと同程度の花茎伸長欠損のみという表現型を示した。これらのことから申請者は、1) 細胞内におけるスペルミン合成に関しては ACL5 に比べて SPMS の方がより主要な酵素として機能している、2) *acl5* で見られる花茎伸長の欠損は生体内における単なる遊離型もしくは接合型のスペルミン含量の減少が原因ではない、3) 通常条件下におけるシロイヌナズナの生存にとってスペルミンは必須な物質ではない、以上の 3 点の結論を導いた。さらに、2) から ACL5 には SPMS にない特異的な機能が備わっていることは間違いない。ACL5 が他の未知なる因子と相互作用してスペルミンの細胞内における特異的な局在を決定している可能性などが考えられた。

他方、「*ACL5* と花茎伸長との関わり」の解明を目指し、申請者はこれまでに *suppressor of acaulis* (*sac*) *51-d*〜*54-d* と名付けた *acl5-1* の花茎伸長欠損に対する 4 種類の優性あるいは半優性の抑圧変異体を単離していた。博士課程における研究においては、まずこ

れら *sac-d* 変異の回復効果について調べた。*sac-d* 変異が植物ホルモン由来の矮性形質を回復させるかどうかを調べるために、オーキシン、ジベレリン、ブラシノステロイドの生合成欠損変異体あるいは情報伝達異常変異体に *sac-d* 変異を導入したところ、いずれにおいても花茎伸長の回復は見られなかった。この結果から、*sac-d* 変異の回復効果は *acl5* の表現型に比較的特異的であると考えられた。また、SPMS により合成されたスペルミンが *sac-d* 変異による花茎伸長の回復に利用されている可能性があることから、スペルミンを全く合成しない *sac-d acl5-1 spms-1* 三重変異体を作成してその花茎の長さを測定した。しかしながら、*sac-d* 変異の回復効果は三重変異体においても変わらず維持されていたことから、それらの変異の回復作用にはスペルミンを全く必要としないことが明らかになった。

最も花茎伸長の回復の度合いが高い *sac51-d* 変異体について、*At5g64340* 遺伝子内に一塩基の置換があることを申請者は修士課程における研究で見いだしていた。そこで、本当にこの変異が *sac51-d* 変異体の表現型の原因であるかを確かめるため、*sac51-d* 変異を含む同遺伝子の転写開始点上流 990bp を含むゲノム断片を *acl5-1* に導入した。すると *sac51-d* 表現型が再現されたことにより、この変異を *sac51-d* 変異と断定し、*At5g64340* 遺伝子が *SAC51* であると確認した。*SAC51* は bHLH 型の転写因子をコードしており、*sac51-d* 変異はその uORF 内にある。uORF は下流 ORF の翻訳に対して抑制的に働くことが知られているため、野生型および *sac51-d* 変異型の *SAC51* にレポーター遺伝子を融合させたコンストラクトを導入した形質転換植物を作成した。すると、*sac51-d* 変異型のコンストラクトを導入した植物では、下流 ORF の翻訳効率が上昇している事が明らかになった。さらに *ACL5* と *SAC51* の関係について追求し、野生型の *SAC51* レポーター融合遺伝子を *acl5-1* および *sac51-d acl5-1* に導入したところ、両変異体におけるレポーター遺伝子の翻訳効率は野生型におけるそれと比べ約半分程度に減少している事が分かった。このことにより、*ACL5* が、uORF による翻訳制御を介してあるいはそれとは独立な形で、*SAC51* の翻訳制御に関与する事が示された。

さらに、*ACL5* および *SAC51* の下流で花茎伸長を制御する遺伝子を同定することを目指し、野生型、*acl5-1*、*sac51-d acl5-1* の芽生えを用いて cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現比較解析を行った。それぞれの植物における発現の変動パターンから各遺伝子を6つのタイプに分類し、リアルタイム RT-PCR によってその再現性を確認した。*acl5-1* 変異で発現が上昇し、*sac51-d* 変異によってそれが回復するタイプの遺伝子群には、維管束細胞の分化誘導に関わると考えられる HD-ZIP III 遺伝子群や *VND* 遺伝子群に属する遺伝子が含まれた。HD-ZIP III 遺伝子群のメンバーには過剰発現することによって花茎伸長に阻害が起きるという報告があることから、これらの遺伝子の過剰発現による維管束のパターン形成異常が *acl5* で見られる花茎伸長欠損の原因である可能性が強く支持された。また、野生型に比べ *acl5-1*、*sac51-d acl5-1* で共に発現が減少していたタイプの遺伝子として hAT-like transposase をコードする遺伝子が、*sac51-d* 変異によって発現が上昇するタイプの遺伝子としてゲノム上で逆方向に隣接した *AtMRU1* と *At5g35480* の二つの遺伝子が同定された。これらの遺伝子は *ACL5* を介する花茎伸長制御経路において働く候補遺伝子であると考えられる。

以上の研究から、シロイヌナズナが持つ二つのスペルミン合成酵素遺伝子はその機能・役割が特異的に分化しており、花茎伸長には *ACL5* の方が必要であるということが明らかになり、その一方で *ACL5* を介した花茎伸長制御には uORF を持つ遺伝子の翻訳調節メカニズムが関わることが示された。

学位論文審査の要旨

主査　教授　山本興太朗
副査　教授　山口淳二
副査　教授　加藤敦之

学位論文題名

Molecular and Genetic Studies on the Function of the *Arabidopsis thaliana ACL5* Gene in the Stem Elongation

（シロイヌナズナの花茎伸長における *ACL5* 遺伝子の機能についての分子遺伝学的研究）

シロイヌナズナの *acaulis5* (*acl5*)変異体は、植物ホルモンの生合成やシグナル伝達に欠損を持つ矮性変異体とは異なり、生殖成長期への移行に伴う花茎伸長に特異的な欠損を示し、その原因遺伝子 *ACL5* はスペルミン合成酵素をコードしている。スペルミンをはじめとする一連のポリアミンは幅広い生物の細胞内に存在し、核酸やタンパク質などに結合してその安定性を高めていて、細胞分裂過程に特に必要であることが古くより明らかにされている。一方、これらポリアミンの植物の形態形成や環境適応、病原抵抗性への寄与を示す例が近年多数報告されてきているが、その作用機構に関してはほとんど不明で、*ACL5* 遺伝子がどのように花茎伸長とつながっているのかも、未だ謎のままである。著者は、スペルミン合成酵素遺伝子の欠損変異体やその復帰変異体を用いて、ポリアミンと植物の発生との関係を分子遺伝学的な手法によって明らかにする研究をおこなった。

まず、シロイヌナズナが持つもうひとつのスペルミン合成酵素遺伝子 *SPMS* のノックアウト変異体(*spms-1*)を単離し、*acl5-1* および *acl5-1* との二重変異体(*acl5-1 spms-1*)とともに細胞内のスペルミン含量の比較を行った。その結果、1)細胞内におけるスペルミン合成に関しては ACL5 より SPMS の方がより主要な酵素として機能している、2) *acl5* の花茎伸長欠損は生体内における単なるスペルミン含量の減少が原因ではない、3)通常条件下におけるシロイヌナズナの生存にとってスペルミンは必須物質ではない、という 3 点の結論を得た。さらに、2)から ACL5 には SPMS にない特異的な機能が備わっていると考えられる。

一方、著者はこれまでに *suppressor of acaulis (sac) 51-d*～*54-d* と名付けた *acl5-1* の花茎伸長欠損に対する 4 種類の優性または半優性抑圧変異体を単離していて、最も花茎伸長の回復の度合いが高い *sac51-d* 変異体について、*At5g64340* 遺伝子内に一塩基の置換があることを以前の研究で見いだしていた。そこで、本当にこの変異が *sac51-d* 変異体の表現型の原因であるか確かめるため、*sac51-d* 変異を含む同遺伝子の転写開始点上流 990bp を含むゲノム断片を *acl5-1* に導入したところ、*sac51-d* 表現型が再現されたことにより、この変異を *sac51-d* 変異と断定た。*SAC51* は bHLH 型の転写因子をコードしており、*sac51-d* 変異はその uORF 内にある。uORF は下流 ORF の翻訳に対して抑制的に働くことが知られているため、野生型および *sac51-d* 変異型 *SAC51* にレポーター遺伝子を融合させたコンスト

ラクトを導入した形質転換植物を作成したところ、*sac51-d*変異型コンストラクトを導入した植物では、下流ORFの翻訳効率が上昇している事が分かった。さらに、野生型の*SAC51*レポーター融合遺伝子を*acl5-1*および*sac51-d acl5-1*に導入したところ、両変異体におけるレポーター遺伝子の翻訳効率は野生型におけるそれと比べ約半分程度に減少している事が分かったので、*ACL5*がuORFによる翻訳制御を介して、あるいはそれとは独立な形で、*SAC51*の翻訳制御に関与する事が示された。

さらに、*ACL5*および*SAC51*の下流で花茎伸長を制御する遺伝子を同定することを目指し、cDNAマイクロアレイによる遺伝子発現比較解析を行い、リアルタイムRT-PCRによってその再現性を確認した。*acl5-1*変異で発現が上昇し、*sac51-d*変異によってそれが回復するタイプの遺伝子群には、維管束細胞の分化誘導に関わると考えられるHD-ZIP III遺伝子群や*VND*遺伝子群に属する遺伝子が含まれた。前者の遺伝子群メンバーには過剰発現することによって花茎伸長に阻害が起きるという報告があることから、これらの遺伝子の過剰発現による維管束のパターン形成異常が*acl5*で見られる花茎伸長欠損の原因である可能性が支持された。また、この他、*ACL5*を介する花茎伸長制御経路において働く候補遺伝子として3種の遺伝子が得られた。

以上の研究から、シロイヌナズナが持つ二つのスペルミン合成酵素遺伝子はその機能・役割が特異的に分化しており、花茎伸長には*ACL5*の方が必要であるということが明らかになり、その一方で*ACL5*を介した花茎伸長制御にはuORFを持つ遺伝子の翻訳調節メカニズムが関わることが示された。これを要するに、著者は、スペルミン合成酵素遺伝子について、植物の成長に関する新知見を得たものであり、植物科学の発展に対して分子遺伝学的に貢献するところ大なるものがある。

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あるものと認める。