

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 理 学 )	氏名	渡 邊 俊 介
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
<p>Molecular Physiological Studies on the Role of Purine Ring Catabolism in Stress Acclimation of Plants</p> <p>(植物のストレス適応におけるプリン環分解の役割に関する分子生理学的研究)</p>			
論文審査担当者			
	主 査	教 授	坂 本 敦
	審査委員	教 授	井 出 博
	審査委員	教 授	山 本 卓
	審査委員	准教授	島 田 裕 士
〔論文審査の要旨〕			
<p>植物は固着性であるが故に、変動環境への適応や過酷環境下の生存に、代謝が担う役割は極めて大きい。動物と比較して、植物のメタボロームが桁違いに大規模である事実は、その端的な反映であるが、これは主として「代謝の多様性」の所産である。他方、単一の代謝系が、生育環境の変化に応じて異なる生理機能を発揮する「代謝の多機能性」の事例は余り知られていない。代謝が具える生理学的な多機能性は、機敏にその役割を変換することで吃緊の環境変動に高い即応性をもたらすなど、植物のストレス適応に実効的に機能していると考えられる。本研究は、そのような植物代謝の例証を企図したものである。</p> <p>植物の成長は、光に依存した同化作用のみならず、異化作用を介した同化栄養のリサイクル機構が間断なく働くことで維持されている。このため、窒素に富む核酸塩基の代謝、特に4モル当量の窒素(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)を放出するプリン環の分解は、外部環境で枯渇しがちな多量必須元素の体内リサイクルに一翼を担う。しかし、申請者らは先行研究において、プリン環の分解機能を喪失したシロイヌナズナ変異株が、ストレス感受性を著しく亢進することから、この分解代謝がストレス適応にも機能することを示唆した。また、プリン環分解の初期代謝産物を変異株に投与することで、そのストレス耐性が回復することから、ストレス適応に有効な代謝中間体の存在を想定した。以上の経緯を踏まえて本研究は、想定される代謝中間体を同定し、ストレス適応機構におけるその役割を明らかにすることで、植物栄養リサイクルとは峻別されるプリン環分解の新規生理機能を示すことを目的とした。</p> <p>複数のオルガネラに跨がり、高等生物のなかでは最も複雑な植物のプリン環分解は、その過程で8種類の代謝中間体を生じるが、申請者は特にアラントインに着目した。その理由として、生理学的意義は不明であるものの、シロイヌナズナを含む様々な植物が、ストレスに応答して一過的にアラントインを蓄積する現象を挙げている。申請者は、アラントインがストレス適応に関与するならば、その蓄積は植物のストレス耐性を向上させると考え、先ずその仮説を検証した。シロイヌナズナの <i>aln</i> 株は、アラントイン分解酵素(ALN)の遺伝子破壊により、恒常的にアラントインを蓄積する。そこで、本変異株と野生株のストレス耐性が比較された。その結果、水が生重量の大半を占める植物にとって脅威となる</p>			

乾燥や浸透圧ストレスに対して、*aln* 株は野生株よりも高い耐性を獲得していることが示された。また、観察されたストレス耐性表現型が、*aln* 変異に起因することが遺伝子相補実験により確認された。*aln* 変異はアラントインの蓄積をもたらすと同時に、プリン環分解の進行を途中で阻害する。しかし、ALN の上流や下流で働く酵素の遺伝子破壊によって、プリン環分解を阻害したシロイヌナズナでは、ストレス耐性表現型は生じなかった。以上の結果から、アラントインがストレス適応に実質的に貢献することが示された。

ストレス耐性の発現はゲノムワイドな遺伝子発現の変動を伴う。そこで、主に転写応答に焦点をあて、アラントインの蓄積に端を発するストレス耐性の分子機構が調査された。その結果、通常生育条件下でも多数のストレス関連遺伝子の発現が惹起するなど、*aln* 株のトランスクリプトームは、野生株と比較して劇的に変動していることが示された。特に、植物のストレス応答を制御するアブシジン酸 (ABA) に関連する遺伝子の発現惹起が顕著であったが、この特異な *aln* 株の遺伝子発現様相は、アラントインを投与した野生株でも再現された。以上の解析から、アラントインが ABA の内生量或いはシグナル伝達を亢進する可能性が考えられたため、*aln* 株と野生株の ABA 含量および ABA 応答が比較された。その結果、*aln* 株は野生株よりも有意に ABA 含量を高めていたが、外因性 ABA に対する両株の応答には差がないことが示された。従って、アラントインは ABA 内生量を亢進し、ストレス応答を遺伝子レベルで惹起することで、ストレス耐性を高めることが示唆された。

ABA 内生量の制御にアラントインが関与する可能性が示されたことから、ABA 生成系に対するアラントインの潜在的な生理作用が調査された。ストレスに応答した ABA 生成には、二つの代謝経路（新生および再生経路）が関わる。新生経路の活性化は、律速酵素 NCED3 の転写レベルで制御されているが、再生経路の活性化は、ABA 配糖体から生理活性な ABA の遊離反応を触媒する BG1 の多量体化に依存する。*aln* 株では、通常生育条件下にも関わらず、NCED3 遺伝子の転写活性が増大し、BG1 が多量体を形成していたが、このような非ストレス条件下での ABA 生成経路の活性化は、アラントインを投与した野生株でも再現された。さらに、アラントインの投与は野生株の ABA 内生量を亢進したが、ABA の新生経路や再生経路を欠損する変異株では、その効果は消失し、ストレス応答遺伝子の発現も惹起されなかった。以上の結果から、アラントインは ABA 生成を担う二つの代謝経路を協調的に活性化することで ABA 内生量を亢進すること、また、そのストレス応答遺伝子に対する発現惹起作用は ABA に依存することが示された。

本研究は、ストレスに応答して蓄積する代謝中間体アラントインの生理作用の解明を通じて、プリン環分解が窒素栄養のリサイクルのみならず、ストレス適応にも関与することを示したものである。生理活性な代謝中間体を一時的に蓄積し、その作用を巧みに利用するストレス適応戦略は、環境変動への迅速な適応応答を可能にすると同時に、ストレス条件下で無駄な代謝コストを抑える点などで重要な意義を持つと考えられる。プリン環分解とストレスホルモンの予期せぬ生理学的連関を具体的に明らかにし、代謝の多機能性に基づくこのようなストレス適応機構の存在を示唆するなど、本研究で得られた成果は、自律的に移動できない植物が獲得した巧妙なストレス適応戦略を解明するうえで、重要な知見を与えるものと考えられる。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士（理学）の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

#### 公表論文

**Watanabe, S., Matsumoto, M., Hakomori, Y., Takagi, H., Shimada, H. and Sakamoto, A.** (2013) The purine metabolite allantoin enhances abiotic stress tolerance through synergistic activation of abscisic acid metabolism. *Plant, Cell & Environment*, in press (DOI: 10.1111/pce.12218).

#### 参考論文

- (1) **Watanabe, S., Nakagawa, A., Izumi, S., Shimada, H. and Sakamoto, A.** (2010) RNA interference-mediated suppression of xanthine dehydrogenase reveals the role of purine metabolism in drought tolerance in Arabidopsis. *FEBS Letters* **584**: 1181–1186.
- (2) **Muranaka, A., Watanabe, S., Sakamoto, A. and Shimada, H.** (2012) Arabidopsis cotyledon chloroplast biogenesis factor CYO1 uses glutathione as an electron donor and interacts with PSI (A1 and A2) and PSII (CP43 and CP47) subunits. *Journal of Plant Physiology* **169**: 1212–1215.