

学位論文要旨

Molecular analysis of regulatory network of leaf senescence involving the phytohormone strigolactone (ストリゴラクトンを介した葉老化制御ネットワークの解析)

氏名 上田 浩晶

植物は不要になった葉を積極的に老化させ、そこに含まれる栄養分を他の組織で再利用するという生長戦略をとっている。植物は必要に応じ葉を積極的に老化するが、不必要な葉老化は適応上デメリットが大きいため、葉老化は厳密に制御されている。植物ホルモンではエチレン、アブシジン酸、ジャスモン酸、サリチル酸などが葉老化を促進し、サイトカイニンが抑制することが知られている。また、暗黒や乾燥・塩ストレスなどの環境ストレスや花成によっても葉老化が誘導される。これらの要因により、老化葉ではクロロフィル分解（黄変）・葉緑体タンパクの分解・葉緑体構造の退化などが起こる。こうした葉老化時に生じる一連の現象を **senescence syndrome** と呼ぶ。

最も新しく発見された植物ホルモンであるストリゴラクトンも葉老化促進に関与することが示唆されている。なぜなら、ストリゴラクトン非感受性の *max2* 突然変異体は元来葉老化が遅延する突然変異体 *ore9* として報告されているためである。ストリゴラクトンはカロテノイドを初発物質とし、AtD27、MAX3、MAX4、MAX1 等の生合成系酵素により合成される。受容体である AtD14 はストリゴラクトン依存的に F-box タンパク質である MAX2 と結合し、その基質を分解することで分枝抑制をはじめとするストリゴラクトン応答を引き起こす。しかし、MAX2 はストリゴラクトン非依存的に光形態形成にも作用することが報告されており、ストリゴラクトンが葉老化促進作用を有するか検証の必要がある。本学位論文では、エチレンとの相互作用を中心にストリゴラクトンを介した葉老化制御ネットワークについて解析した。

第 1 章では、ストリゴラクトン欠損突然変異体を用いた解析を中心に、ストリゴラクトンの葉老化促進作用について述べる。ストリゴラクトン欠損突然変異体 *max1-1*、*max3-9*、*max4-11* および非感受性突然変異体 *max2-4*、*At d14-1* の葉を暗黒処理したところ、野生型が黄変する処理 7 日目でもこれらの突然変異体は緑色を保ち、光合成能の低下も見られなかった。これらの突然変異体に暗黒処理と同時に合成ストリゴラクトンである GR24 を処理すると *max2-4*、*At d14-1* は緑色を保った一方、*max1-1*、*max3-9*、*max4-11* は野生型と同様に黄変した。このことからストリゴラクトンは葉老化促進に関与することが確かめられた。次に暗黒処理時のストリゴラクトン生合成系酵素遺伝子の発現量を調べたところ、MAX3 と MAX4 は処理前の健全葉や暗黒処理 1 日目の葉では発現がほとんど検出されないが、処理 3 日目以降は処理時間に伴い著しい発現誘導が見られた。このことは葉老化過程において葉でストリゴラクトンが合成され、老化を促進する可能性を示唆する。根で合成されたストリゴラクトンは地上部へ輸送され分枝抑制に働くことが知られている。葉老化時のストリゴラクトン合成部位を解析するために、台木植物由来の根を一つ、台木・穂木由来の二つのシュートを持つ接ぎ木個体を作製した。台木を *max4* 突然変異体、穂木を野生型として作られた接ぎ木個体は、根でストリゴラクトンを合成できないことから、葉で合成されたストリゴラクトンについて検討可能である。この接ぎ木個体のそれぞれのシュートから切除した葉を暗黒処理したところ、処理 5 日目でも台木 (*max4-11*) 由来の葉は緑色を保つ一方、穂木 (野生型) 由来の葉は黄変した。したがって、穂木由来のシュートでは葉でストリゴラクトンが合成され

ることにより老化が正常に進行したと考えられる。これらの結果より、暗黒処理時には葉でストリゴラクトン合成が誘導され、老化が進行することが示唆された。

第 2 章では、エチレンとの相互作用を中心にストリゴラクトンによる葉老化制御機構を解析した。エチレン処理した葉では、明条件下でも老化が促進されることが知られている。暗黒処理時のエチレン放出量を調べたところ、*max1-1*でも野生型と同様に暗黒処理 1 日目（ストリゴラクトン生合成酵素遺伝子の発現が誘導されず *senescence syndrome* が生じない時期）からエチレン放出量が上昇し、それ以降も高いエチレンの放出が観察された。このことは、エチレンはストリゴラクトン合成・葉老化進行非依存的に合成されることを示唆する。ストリゴラクトン欠損突然変異体を明条件下でエチレン処理すると野生型よりも葉老化が遅く生じたことから、ストリゴラクトン欠損突然変異体はエチレン低感受性であると考えられた。また、明条件下で野生型に GR24 処理を行っても非処理に比べて葉老化の促進はほとんど見られなかったが、エチレンも同時に処理すると GR24 濃度に依存して葉老化の進行度合いが強くなった。これらのことから、ストリゴラクトン自体は葉老化を促進せず、エチレンによる老化促進作用を増強することで葉老化を正に制御すると考えられた。また、エチレン非感受性突然変異体 *ein3-1 eil1-1* を暗黒処理したところ、野生型の葉が完全に黄変する処理 7 日目でも緑色を保ち *MAX3* および *MAX4* の発現誘導は抑制されていた。このことはストリゴラクトン合成がエチレンにより制御されていることを示すように見える。しかし、暗黒処理を 16 日目まで続けたところ、*ein3-1 eil1-1* の葉は最終的に老化し、老化誘導性遺伝子である *AtSGR1* と共に *MAX3*・*MAX4* の発現も誘導された。このことは、両遺伝子がエチレンシグナル伝達系以外の経路によっても制御されていることを示唆する。また、*max1-1* と *ein2-5* (エチレン非感受性突然変異体) の二重突然変異体を作成し暗黒処理したところ、*max1-1 ein2-5* はそれぞれの単独突然変異体に比べ葉老化遅延の表現型が強くなった。このことから、ストリゴラクトンはエチレン非依存的な経路にも作用していることを示唆される。*MAX3*、*MAX4* などの発現誘導は暗黒処理以外にもエチレン・アブシジン酸・活性酸素による葉老化誘導時にも観察された。アブシジン酸やエチレン応答性遺伝子は処理直後数時間以内に誘導されることが報告されているが、*MAX3*、*MAX4* の発現誘導は確認されない。アブシジン酸およびエチレンのシグナル伝達系は活性化しているのに対し、両遺伝子の発現誘導が起きないということは、その作用が間接的であることを示すのかもしれない。つまり、これらの刺激による葉老化制御はそれぞれのシグナル伝達系の直接的な作用ではないと考えられる。ストリゴラクトンとエチレンの関係で示唆されるように、葉老化を促進する経路が複雑にクロストークしていること、*senescence syndrome* はどの刺激によっても最終的に引き起こされることを考えると、これらの葉老化促進経路を統合する *senescence signaling* が存在し、その活性化が葉老化を促進することも考えられる。

以上の結果をまとめると、効率的な葉老化促進にはエチレン合成とともにストリゴラクトン合成も必要であるが、エチレン合成とストリゴラクトン合成のタイミングは異なることが示唆された。暗黒による葉老化促進は(1)暗黒処理によるエチレン合成とエチレンとは独立な経路により *senescence signaling* が活性化され始める段階、(2)その結果合成が誘導されるストリゴラクトンによるエチレン依存的及び非依存的な葉老化促進作用増強の 2 段階から成り立つと考えられる。このような 2 段階の制御は、傷害応答などにより一過的にエチレンが合成された時に不必要な葉老化が生じることを防ぎ、適切に葉老化を制御する機構であるのかもしれない。さらに、植物が様々な環境下で葉老化を統合的に制御するネットワークとして *senescence signaling* が働いている可能性が考えられた。