

## 学位論文要旨

### Molecular genetic and physiological studies on the dual role of purine catabolism in plant growth and stress response

(植物の成長とストレス応答におけるプリン分解の二元的機能に関する分子遺伝学的および生理学的研究)

氏名 高木 紘

#### 1. 研究の背景と目的

窒素は多量必須元素でありながら、土壌では慢性的に不足する植物栄養である。このため植物は、老化器官(ソース)で不要となった窒素化合物を分解してアミノ酸に再同化し、若い器官(シンク)に転流して利用する機構を働かせている。このような窒素リサイクルは、栄養成長や生殖成長を支える植物の生存戦略の一環であるが、その大半はタンパク質の分解によって賄われると考えられている。しかし、核酸やヌクレオチドの主成分であり、格段に窒素含量が高いプリン塩基の分解もまた、アミノ酸の合成基質であるアンモニアを4分子生じるため、窒素リサイクルの一翼を担うと考えられている。しかし、その実証例はなく、タンパク質分解とは対照的に窒素リサイクルにおける貢献も曖昧である。したがって、植物の成長や生産性に密接に関わる窒素利用代謝であるにもかかわらず、プリン分解は最も理解が遅れた普遍的な植物代謝の一つといえる。

他方、プリン分解の新奇な生理機能として、近年、環境変動に対する応答・適応機構への関わりが示唆されている。その一例として植物では、生物や非生物的要因で生じる多様なストレスに応答して代謝中間体であるアラントインが蓄積することが知られている。この生理現象に着目し、先行研究において、アラントインが植物のストレス応答を制御するアブシジン酸(ABA)のレベルやその応答を亢進し、乾燥や浸透圧ストレスに対するシロイヌナズナの耐性を高めることを示した。ABAをはじめとして、環境適応やストレス応答に与る植物ホルモンの生理機能は、個々のホルモンが単独に発現するというよりは、寧ろホルモン同士の巧妙で複雑なクロストークを介して発揮される場合が多い。このような植物ホルモン間の相互作用を通じて、アラントインは他のストレスホルモンの機能発現の調節や、幅広いストレス応答現象に関与している可能性がある。その実態解明は、環境適応・応答におけるプリン分解の役割や、アラントインによるストレス応答の活性化機構の理解に重要な知見をもたらすものと考えられる。

上記を踏まえ、本研究ではシロイヌナズナを対象とした分子遺伝学および生理学的解析により、植物のプリン分解が窒素利用系として持続的な植物成長を支えるとともに、ストレス応答や環境適応にも働く二元的な生理機能を担うことを示すことを目的とした。

#### 2. 植物成長におけるプリン分解の役割検証(第1章)

プリン分解が窒素リサイクル系として植物の成長に本質的に貢献しているならば、その機能破壊は窒素欠乏の表現型をもたらすと考えた。プリン由来の窒素利用においては、窒素の貯蔵・運搬体であるウレイド化合物(アラントイン、アラントイン酸)の分解が鍵プロセスであるため、その遺伝子破壊株の表現型を詳細に解析した。アラントイン或いはアラントイン酸の分解酵素(それぞれ ALN, AAH)を欠損した変異株(*aln-1*, *aln-2* および *aah*)は、早咲き、老化の促進、成長量・捻性の低下をはじめ、特に窒素リサイクルの重要性が増す抽臺以降の成長が野生株に劣るなど、窒素欠乏条件下にある植物と酷似した表現型を示した。また、これらの変異株の生育は、野生株よりも窒素欠乏に影響を受けやすい傾向が見られ、窒素利用効率(乾物重/窒素含量)も低下していた。以上の結果から、プリン分解が窒素栄養の効率的な利用に関与することが示唆された。

効率的な窒素の利用には、ソースからシンクへの窒素転流も重要な役割を担う。プリン塩基由来の窒素転流体はウレイドと考えられるため、栄養成長期と生殖成長期におけるアラントインとアラントイン酸の器官分布を比較した。その結果、野生株ではアラントイン酸が老化に伴いシンク(花茎や長角果)に蓄積したが、そのレベルは *aah* 変異によってさらに増大したため、このウレイドが転流態窒素として利用されていることが示唆された。そこで、ウレイド膜輸送体(UPS1, UPS2)の遺伝子破壊株(*ups1*, *ups2*)の表現型を解析し、この点の検証をさらにすすめた。その

結果、これらのウレイド膜輸送系遺伝子の欠損は、ウレイド分解系の変異と同様に、早咲きや抽臺後の生育の低下を招いた。しかし、ウレイドの器官分布は、ウレイド分解系変異の場合とは逆に、シンクにおいてアラントイン酸の蓄積量を低下させたことから、これらの変異株ではウレイドのシンク・ソーク間輸送に支障が生じていることが示唆された。以上の結果から、ウレイドの分解や輸送の機能喪失によりプリン由来の窒素が効率的に利用されなくなると、植物の成長に甚大な影響が生じることが考えられた。

このようなプリン塩基に由来した窒素転流の可能性を、ウレイド分解・膜輸送系の遺伝子発現の観点から検証した。野生株の地上部では、アラントイン酸の合成に関わるプリン分解系遺伝子やウレイド膜輸送系遺伝子の発現が老化器官で上昇していた。この遺伝子発現プロファイルは、老化によってアラントイン酸の生成と輸送が活性化されることを示唆し、前段で得られた老化に伴うアラントイン酸の器官分布の挙動とよく一致した。以上の結果から、シロイヌナズナはプリン塩基から生成したウレイドをシンクに転流することで、効率的にプリン由来の窒素栄養を利用している可能性が示された。

### 3. ストレス応答におけるプリン分解の作用機序(第2章)

ABA やジャスモン酸 (JA), サリチル酸 (SA) などの植物ホルモンは、協調的あるいは拮抗的な相互作用を通じて、さまざまなストレスに対する植物の適応応答を制御する複雑なシグナル伝達のネットワークを形成している。ABA レベルや ABA 応答を亢進するアラントインの生理作用が、そのようなクロストークを介して他のホルモンに関わるストレス応答にも関与している可能性を、ホルモン応答性のマーカー遺伝子発現を指標に検証した。

ALN の遺伝子破壊によりアラントインを蓄積する *aln-1* 株の網羅的遺伝子発現データを精査した結果、先行研究で見出した ABA 応答のみならず、ゲノムワイドな JA 応答の亢進と SA 応答の低下が明らかとなった。シロイヌナズナにおけるストレスホルモンのクロストークでは、ABA と JA が協調して SA に対して拮抗的に働くことが知られているが、*aln-1* 株の遺伝子発現プロファイルは、それをよく反映するものであった。したがって、アラントインは ABA 応答と JA 応答を亢進するが、SA 応答は抑制する作用をもち、複数のホルモンが関与する多様なストレス応答の制御に関わっている可能性が示された。

JA 応答に焦点を絞って *aln-1* 株の発現プロファイルをさらに詳細に解析した結果、その遺伝子発現が JA 応答を制御するマスター転写因子 MYC2 の影響を強く受けていることが示唆された。そこで、MYC2 の発現や、JA 生合成酵素・JA シグナル伝達因子などの MYC2 の標的の遺伝子発現を定量的に評価したところ、野生株と比較して *aln-1* 株ではこれらの JA 応答遺伝子の発現が有意に亢進するとともに、JA の内生レベルも上昇していることがわかった。さらに *aln-1* 株では、MYC2 によって正に制御される傷害防御応答や外因性 JA による生理応答 (主根の伸長抑制、アントシアニンの蓄積) が増強されていたのに対し、負に制御される病害抵抗性が抑制されていた。以上の結果から、アラントインによる JA 応答の活性化には、JA シグナルの主要制御因子の一つである MYC2 が関与することが示された。

アラントインが MYC2 依存的に JA 応答を亢進する分子機構を明らかにするために、野生株、活性型 JA 欠損変異株および MYC2 欠損変異株にアラントインを投与し、JA 応答遺伝子の発現が亢進するかどうかを調べた。その結果、野生株では *aln-1* 変異株と同様に、MYC2 を含む JA 応答遺伝子の発現が誘導されたが、これらの JA 関連変異株では活性化されなかった。したがって、アラントインは既知の JA シグナル経路を介して MYC2 に依存的な JA 応答を亢進すると考えられた。次に、アラントインによる JA 応答の活性化における ABA の関わりを明らかにするために、ABA 欠損変異株にアラントインを投与して、JA 応答遺伝子の発現が亢進するかどうか調べたところ、その発現は誘導されなかった。さらに、この結果を遺伝学的に確かめるため、JA 欠損株、ABA 欠損株にそれぞれ *aln-1* 変異を導入した二重変異株を作出し、内因的に蓄積させたアラントインに対する JA 応答遺伝子の発現を調べた。その結果、*aln-1* 株で観察された JA 応答遺伝子の発現亢進はどちらの二重変異株においても消失した。以上の結果から、アラントインによる JA 応答の活性化には ABA が上流で働き、ABA と JA のクロストークを介して MYC2 が重要な役割を担うことが示された。

#### まとめ

本研究により、植物のプリン分解がおそらく窒素利用系として植物の成長に貢献するとともに、代謝中間体アラントインの蓄積によりストレスホルモン応答を活性化することを示した。単一代謝系が備えるこのような二元的機能は、環境変動に応じてその機能を切り替えることで、固着生活を営む植物が迅速に環境適応するための成長生存戦略として重要な役割を担うと考えられる。