

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	高 木 紘
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 genetic and physiological studies on the dual role of purine catabolism in plant growth and stress response</p> <p>(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および生理学的研究)</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	教 授	太 田 啓 之	(東京工業大学)
審査委員	准教授	島 田 裕 士	
〔論文審査の要旨〕			
<p>固着生活を営む植物の成長生存戦略において、代謝の多様性は極めて重要であるが、近年、単一の代謝系が外的・内的環境の変動に応じて本来とは異なる生理機能を担う事例が見出されつつある。このような第二の機能は、一過的に蓄積する生理活性な代謝中間体を介して発揮されると考えられるが、その利点として、代謝中間体の作用を利用した新奇機能の獲得による適応性の拡充や、代謝制御による緊切の環境変動への即応性などが挙げられる。本研究は、このような二元的な生理機能を備えた植物代謝について具体的な存在証明を図ったものである。</p> <p>老化器官（ソース）で不要になった高分子窒素化合物を分解し、新生器官や生殖器官（シンク）に転流・再利用する窒素リサイクルは、限られた土壌窒素資源の下での成長を補償する植物の巧妙な生存戦略の一環である。核酸やヌクレオチドの主成分であり、格段に高い窒素含量を誇るプリン塩基の分解は、ウレイド化合物（アラントイン、アラントイン酸）を経てアンモニアを生じるため、このような窒素再利用系の一環とされている。しかし、プリン分解がその役割を担うことを具体的に証明した例はなく、蛋白質の分解と比較してその貢献も不明である。一方、先行研究において申請者は、ストレス条件下で蓄積するプリン分解の代謝中間体であるアラントインが、シロイヌナズナのストレス耐性を高めることを見出した。その分子機構として、アラントインがストレスホルモンであるアブシジン酸 (ABA) の生成を活性化し、ABA を介したストレス応答を誘導することを報告している。以上を踏まえて申請者は、プリン分解が通常条件下では窒素再利用系として植物成長を支え、劣悪環境下では代謝中間体の生理作用によりストレス応答や環境適応に働く二元的な生理機能を担うと考えた。</p> <p>第 1 章では、窒素再利用系としてのプリン分解の植物成長への実質的貢献が検証されている。プリン塩基由来の窒素が効率的に再利用されるには、代謝中間体であるウレイド化合物が分解されて、アミノ酸の合成基質であるアンモニアが放出される必要がある。申請者はこの点に着目し、アラントインやアラントイン酸の分解酵素がそれぞれ遺伝子破壊されたシロイヌナズナの変異株の表現型を詳細に調査した。その結果、これらのウレイド分</p>			

解変異株は、窒素再利用系の重要性が増す花芽形成・抽臺以降の成長が野生株に劣り、窒素欠乏をきたした植物に酷似した表現型を示した。この変異表現型と一致して、これらの変異株では窒素利用効率が低下し、その成長が野生株よりも低窒素条件で影響を受け易いことも示された。植物成長において窒素栄養が有効に再利用されるには、転流態窒素がソースからシンクに効率的に輸送されることも重要であるが、プリン由来の窒素転流体はウレイド化合物と考えられている。そこでウレイド輸送体の遺伝子破壊の影響が精査され、ウレイド輸送変異株がウレイド分解変異株と同様に、シンクにおける窒素要求度が高まる生殖成長期において、窒素欠乏様の表現型を生じることが示された。さらに申請者は、栄養成長期と生殖成長期におけるソース・シンク別のウレイド含量の比較や、ウレイドの合成・分解および輸送系の遺伝子発現解析から、アラントイン酸がソースからシンクに転流される可能性を言及している。以上のように、プリン由来の窒素再利用における鍵プロセスであるウレイドの分解系と輸送系を標的とした逆遺伝学的解析から、申請者は植物成長におけるプリン分解の生理学的重要性を強く示唆する結果を提示している。

第2章では、ストレス応答におけるプリン分解の関与とその作用機序を、代謝中間体アラントインの生理活性に基づき調査している。アラントインは ABA レベルを亢進することでシロイヌナズナのストレス応答を活性化することを以前に申請者は報告したが、ABA はジャスモン酸 (JA) などの植物ホルモンとの相互作用を通じて多様なストレスに対する植物の応答を制御している。申請者は、このような植物ホルモン間のクロストークを紹介してアラントインが ABA のみならず、他の植物ホルモンによって制御されるストレス応答にも関わる可能性を検証した。植物ホルモン応答はトランスクリプトームレベルの発現変動を伴うので、非ストレス条件下でもアラントインを蓄積し、ABA 応答を活性化しているウレイド分解変異株 (*aln* 株) の網羅的遺伝子発現プロファイルが精査された。その結果、*aln* 株では ABA が協調的に相互作用する JA に応答した遺伝子発現が顕著に上昇していることが示された。遺伝子の転写レベルで亢進した JA 応答は、*aln* 株における代謝、生理、および病理応答に実際に反映されていることが確認され、その制御には JA シグナル伝達系のマスター転写因子 MYC2 が関わることを示唆された。申請者は、シロイヌナズナでは *aln* 変異による内因的なアラントインの蓄積のみならず、外因性のアラントインによっても JA 応答遺伝子の発現が誘導されることを見出し、この現象を利用してアラントインによる JA 応答活性化の分子機構を解析した。即ち、JA 欠損株、MYC2 欠損株、および ABA 欠損株において外因性アラントインに対する JA 応答遺伝子の発現が定量評価され、アラントインによる JA 応答の活性化には JA や MYC2 が必要であること、また、JA シグナル伝達系の上流で ABA が機能し、これがアラントインの蓄積に端を発する JA 応答の活性化を媒介することが分子遺伝学的に示された。この結果は、内因的にアラントインを蓄積させる *aln* 変異を上記の JA および ABA 欠損株にそれぞれ導入した二重変異株の解析からも確認された。このように、大規模遺伝子発現解析から示唆されたアラントインによる JA 応答の活性化を実証し、その分子機構の一端を解明したことで、申請者はプリン分解がストレスホルモン間の相互作用を通じて植物の環境応答制御に関与することを提唱している。

本研究は、プリン分解が植物の成長とストレス応答に密接に関わるに二元的な機能を有する可能性を強く示すものであり、その成果は、移動能力を持たない植物が代謝機能を機軸として獲得してきた巧妙な成長生存戦略の理解に貢献するものとして高く評価される。

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

Takagi, H., Ishiga, Y., Watanabe, S., Konishi, T., Egusa, M., Akiyoshi, N., Matsuura, T., Mori, I.C., Hirayama, T., Kaminaka, H., Shimada, H. and Sakamoto, A. (2016) Allantoin, a stress-related purine metabolite, can activate jasmonate signaling in a MYC2-regulated and abscisic acid-dependent manner. *Journal of Experimental Botany* **67**: 2519–2532.

参考論文

1. **Takagi, H. and Yamada, S.** (2013) Roles of enzymes in anti-oxidative response system on three species of chenopodiaceous halophytes under NaCl-stress condition. *Soil Science and Plant Nutrition* **59**: 603–611.
2. **Watanabe, S., Matsumoto, M., Hakomori, Y., Takagi, H., Shimada, H. and Sakamoto, A.** (2014) The purine metabolite allantoin enhances abiotic stress tolerance through synergistic activation of abscisic acid metabolism. *Plant, Cell & Environment* **37**: 1022–1036.
3. **Sakamoto, A., Nishimura, T., Miyaki, Y., Watanabe, S., Takagi, H., Izumi, S. and Shimada, H.** (2015) *In vitro* and *in vivo* evidence for oxalate oxidase activity of a germin-like protein from azalea. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **458**: 536–542.