

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 鵜崎 真妃  
 論文題目 薬用植物ニチニチソウをモデルとしたアルカロイド代謝の場としての異形細胞分化過程の解析

### 論文審査担当者

主 査	名古屋大学客員教授	平井 優美
委 員	名古屋大学教授	榊原 均
委 員	名古屋大学教授	中道 範人
委 員	名古屋大学教授	森 仁志
委 員	名古屋大学准教授	木羽 隆敏

## 論文審査の結果の要旨

固着生活を行う植物は、環境に適応するために種特異的な代謝である特化代謝を発達させてきた。幅広い植物種において、特化代謝が細胞種特異的に行われることが知られている。一例として、抗がん剤として使用されるビンブラスチン等を含む多様なモノテルペノイドインドールアルカロイド (MIA) を生合成するニチニチソウにおいて、MIA 代謝が複数の細胞種を経由して行われることが知られている。具体的には、まず **Internal phloem associated parenchyma (IPAP)** 細胞でログニン酸が合成され、表皮細胞へと運搬される。次に、表皮細胞において複数の酵素反応を経てログニン酸からストリクトシジンが合成される。ストリクトシジンはさらに多段階の反応を経てカサランチン等の中間代謝産物となり、特殊に分化した異形細胞、乳管細胞へと運搬される。異形細胞、乳管細胞において中間代謝産物は更なる反応を経てビンブラスチンやセルペンチン等の最終産物になって蓄積する。MIA 代謝に関しては、これまでの生化学的研究により生合成経路について多くの知見が得られてきた一方で、上述のように細胞種横断的に MIA 代謝が起こる理由と機構は未解明である。本論文は、植物特化代謝が細胞種特異的に行われる生理学的理由とその機構の解明を目指して、ニチニチソウの個体成長に伴う MIA 代謝の変動と異形細胞・乳管細胞の分化との関係を解析した研究をまとめたものである。以下に各章において得られた結果を要約する。

## 第2章 本葉におけるニチニチソウ MIA 代謝変動と異形細胞分化との関係

ニチニチソウの本葉を対象とし、異形細胞と乳管細胞の発する青色蛍光を指標にしてこれらの細胞数を顕微鏡下で計測し、個体成長に伴う葉 1 枚あたりの細胞数の変化を詳細に調べた。また、この青色蛍光を発する化合物は MIA の 1 種であるセルペンチンであることを蛍光スペクトル解析により明らかにし、葉の成長過程における蓄積量の変化を液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) によって定量解析した。さらにメイヤー試薬を用いたアルカロイド染色により簡易的にアルカロイドの細胞局在を解析した。この結果、異形細胞と乳管細胞が形態的に分化する時期、及び、セルペンチンがそれぞれの細胞に蓄積し始める時期は、異形細胞と乳管細胞とは異なっていることが明らかとなった。これまで、異形細胞と乳管細胞は、前者が丸い形状、後者が細長い形状であるという違いがあるものの、MIA 代謝における機能は同じであると考えられていたが、本章の結果から、これらが異なる生理的役割を持つ可能性が示された。

## 第3章 種子におけるニチニチソウ MIA 代謝変動と異形細胞分化との関係

MIA の生合成は多数の酵素反応によってなされており、また MIA 代謝経路の中

## 論文審査の結果の要旨

間代謝産物、最終産物の化学的性質は多様である。従って、MIA 代謝が生体内で円滑に行われるためには、各酵素反応がそれぞれ最適な条件で行われ、かつ各代謝産物がそれぞれ最適な条件で蓄積されることが必要であると推察される。上述のように MIA 代謝が細胞種横断的に行われる理由は、反応ごとに異なる細胞内環境が必要であるためであると予想される。そこで本章では、MIA 代謝の開始に先立って細胞種ごとに異なる細胞内環境が構築されるという仮説を立て、その検証を目指した。実験系として、全ての代謝がいったん停止し、吸水・発芽に伴って徐々に代謝が開始する種子発芽過程に着目した。本章では、まず詳細な顕微鏡観察により乳管細胞が未熟種子の登熟過程で形態的に分化し、細胞種特異的な化合物が蓄積することを明らかにした。次に、MIA 代謝が種子発芽の過程でいつ開始するのかを、時系列メタボローム解析及びトランスクリプトーム解析によって明らかにした。具体的には、MIA 代謝において表皮細胞で起こる反応は発芽後 12 時間目から活性化するが、IPAP 細胞、異形細胞、乳管細胞で起こる反応は発芽後 36 時間目以降に活性化することが分かった。これらの結果から、各経路が活性化される時期は細胞の分化と関わっている可能性が示された。また、電子顕微鏡観察によって異形細胞、乳管細胞の細胞内構造が他の細胞とは異なる特徴を持つことを発見した。これらの結果に基づいて、細胞の“代謝的な分化”について考察した。

### 第 4 章 ニチニチソウ MIA 代謝を制御する新規転写因子の探索

第 2 章、第 3 章の結果から、個体の成長や細胞の分化と連動した複雑な MIA 代謝制御機構の存在が示唆された。そこで第 4 章では、細胞の代謝的分化に関連した MIA 代謝経路の制御機構を明らかにすることを目指して、転写因子の探索を行った。第 3 章の結果からカサランチン生合成酵素遺伝子である *HL1* に着目し、ニチニチソウ発芽過程の時系列 RNA-seq データを得て、*HL1* と同じ発現パターンを示す転写因子遺伝子を選抜した。そのうちの 50 遺伝子を対象としてウイルス誘導性遺伝子サイレンシングを行い、各対象遺伝子の発現が抑制された葉の非ターゲット代謝産物分析を LC-MS/MS を用いて行って、カサランチン蓄積を制御する転写因子遺伝子を選抜した。

### 第 5 章 総合考察

第 2 章～第 4 章で得られた結果を元に、ニチニチソウの異形細胞、乳管細胞の形態的な分化と代謝的な分化の関係について考察した。

## 論文審査の結果の要旨

鵜崎真妃氏が自ら立てた研究テーマは、薬用植物としても知られるニチニチソウの MIA 代謝を題材として、特化代謝の起こる場である細胞の「容れ物」としての完成が、特化代謝の開始に先だって必要であるという仮説を検証し、さらに細胞の形態的分化と“代謝的分化（特化代謝が起こるのに必要な細胞内環境が整うこと）”をリンクする制御因子を同定することを目指す、壮大なものである。ニチニチソウは未だ形質転換系が確立されておらず、分子遺伝学的手法による研究が極めて困難であることから、現状では分子メカニズムの解明に至るのは容易ではない。こうした状況のもとで、本論文では、丹念な顕微鏡観察およびオミクス解析を主とした研究によって、ニチニチソウにおいて MIA 代謝の少なくとも一部分は登熟過程の未熟種子胚において始まっていることを明らかにした。一般的に、特化代謝は分化を終えて成熟した器官で起こると考えられており、上記の発見は極めて新規性の高いものである。また、これまで MIA 代謝において同じ機能を果たしていると考えられていた異形細胞と乳管細胞が、葉の成熟過程や種子発芽の過程において、互いに異なる時期に機能していることを示した。これは特化代謝研究において学術的価値の高い知見である。

以上により、本委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。