

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 福田 茉由

論文題目

ピロリン酸が植物の形態形成と成長に
与える影響の分子生物学的解析

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	前島正義
委員	名古屋大学教授	小俣達男
委員	名古屋大学教授	榊原均
委員	東京学芸大学准教授	Ali FERJANI
委員	名古屋大学助教	中西洋一
委員	名古屋大学准教授	河内美樹
委員	名古屋大学特任助教	瀬上紹嗣

論文審査の結果の要旨

福田菜由は、シロイヌナズナを対象として植物液胞膜のプロトンポンプである H^+ -pyrophosphatase (H^+ -PPase) に注目し、その遺伝子欠失株 (*fugu5* 株) が示す表現型を解析することで、 H^+ -PPase の生理機能を明らかにすることを目的した。とくに栽培に用いる培地中のアンモニア有無により、表現型が生ずるか否かの大きな差異があることを見出した。アンモニアを含まない培地では、*fugu5* 株では細胞内の無機ピロリン酸 (PPI) が過剰に蓄積し、とくに細胞分裂の活発な本葉の発達初期の葉柄組織において、細胞内の細胞構築と組織形成の異常あるいは壊死の表現型に至ることを明らかにした。これらの異常形態が、アンモニアの添加あるいはアルギニン等の一部のアミノ酸の添加により解消されることを見出し、代謝上の考察を加えた。本研究は、 H^+ -PPase の生理的意義を明らかにするとどまらず、単純な代謝無機イオンの濃度異常が細胞の正常な活動に極めて大きな影響を及ぼすことを明らかにした点において意義がある。以下、研究の概要を項目に分けて説明し、論文審査の結果を述べる。

H^+ -PPase は若い細胞においては液胞膜タンパクの 10% を占めるほどの多量酵素である。液胞は細胞の体積の大部分を占め、細胞質の浸透圧や pH の調節、物質の貯蔵、イオン濃度の調節、高分子のリサイクル等を通して多様な細胞機能を担っている。その液胞膜に局在する H^+ -PPase は細胞質の PPI を加水分解し、その反応で得られるエネルギーを用いてプロトン (H^+) を液胞内に能動輸送することで液胞の酸性状態を維持する。細胞質と液胞内の pH 勾配は液胞への物質輸送のエネルギー的な駆動力であり、酸性環境は加水分解にとって不可欠である。

H^+ -PPase 遺伝子欠失株 *fugu5* の表現型解析の過程で、窒素栄養源の化学形態、すなわち硝酸とアンモニアの違いにより植物の器官形成に明確な差異が生ずることを見出した。硝酸のみを窒素源とする培地 (MGRL 培地) でシロイヌナズナを生育させた場合には、幼本葉の葉柄と葉身基部の細胞が壊死し本葉の発達が停止する重篤な表現型となる。培地にアンモニアを添加することにより表現型は回復する。 H^+ -PPase の生理機能と合わせて、この表現型の顕著な差異がなぜ生ずるのかを解き明かすことを課題とした。

第一ステップでは、アンモニアを含まない硝酸のみを窒素源とする MGRL 培地で生育すると、*fugu5* 株の本葉の生育が顕著に抑制されることを見出した。結果として 20 日齢の *fugu5* 株の地上部の新鮮重量は野生株の 30% 以下となる。幼本葉の壊死が進行し本葉の形成が停止する。さらに、本葉での葉脈の形成不全、細胞のサイズと整列度、表皮細胞の形状 (ジグソーパズル様形態)、アクチンの配向性等においても、*fugu5* 株の本葉では顕著な表現型が生ずることを明らかにした。さらに、*fugu5* 株の本葉表面ではクチクラ層が欠失するという知見も得た。これらの現象は、*fugu5* 株の特徴的な表現型であり、野生株では一切生じない。

MGRL 培地はよく利用される培地であるが、一般には MS 培地 (Murashige-Skoog 栄養塩培地) がより広く利用されている。MGRL 培地の窒素源は 7 mM の硝酸のみであるが、2 倍希釈の MS 培地は窒素源として 20 mM の硝酸の他に 10 mM のアンモニアが含まれている。この窒素源の違いに注目した。まず、窒素源の総量が少ないことが MGRL 培地における *fugu5* 株の表現型の原因である可能性を検討し、そのことが原因ではないことを明らかにした。次に、アンモニアの有無が重要と推測した。MGRL 培地を元に、4 mM の硝酸と 3 mM のアンモニアを含む培地に変更したところ、重篤な表現型は解消した。このことは、 H^+ -PPase を欠失した植物の正常な成長にとってアンモニアが必須であることを示す新しい知見となった。

次に H^+ -PPase の PPi 加水分解とプロトンポンプ機能のいずれの欠失が、上記表現型の発生の原因となるのかを解析した。*fugu5* 株に PPi 加水分解機能のみをもつ酵母の可溶性 PPase (IPP1) あるいはプロトンポンプ機構を欠失した脱共役型変異 H^+ -PPase を遺伝子導入した。IPP1 を H^+ -PPase のプロモーター制御下で発現させると、正常に生育し、組織内の PPi 含量が野生株と同レベルに減少していた。すなわち、MGRL 培地にて *fugu5* を栽培すると組織中 PPi 含量は野生株の 1.8 倍となるが、*fugu5* に IPP1 を導入した株では野生株と同様の値に減少した。表現型の回復は、脱共役型変異 H^+ -PPase を導入した場合も同様であった。これらの結果は、 H^+ -PPase の PPi 加水分解機能の欠損が表現型発生と密接に関連していることを意味しており、本研究により細胞内 PPi の異常な濃度上昇が表現型の原因であることが明らかになった。なお、植物には PPi を加水分解する酵素として可溶性ピロホスファターゼ (sPPase) も複数種存在する。そこで、 H^+ -PPase と sPPase の一種である PPa1 の二重破壊株を作成し、MGRL 培地で栽培したところ、*fugu5* 以上に顕著な表現型を示した。これにより、 H^+ -PPase と PPa1 が協調的に PPi の加水分解機能を担っていることを解明した。

実験観察の中で、MGRL 培地で生育した *fugu5* 株は、本葉がカールし先端部分が培地に接触する現象を見出した。本葉と培地の接触を防ぐために培地表面にプラスチックシートを敷いた場合には、*fugu5* 株の表現型が軽減した。このことは、葉の先端部分、とくに排水組織から培地成分、水を吸収している可能性を示唆している。事実、シートを敷くことにより葉中のリン酸濃度が顕著に低下した。野生株、*fugu5* 株を問わず、MGRL 培地の場合は、本葉がカールして培地と接触しやすい傾向となる。加えて、*fugu5* 株では本葉表皮にクチクラ層が部分的に欠損していることを見出し、培地と触れることで異常に水を吸収して膨圧が高くなり、弱い細胞壁を中心に細胞の崩壊が進行し、結果的に組織の壊死につながると推定した。PPi はセルロースの合成過程でも生成するので、*fugu5* 株での高濃度 PPi がセルロース合成を抑制し、結果的に細胞壁の強度を下げたと推論した。

PPi が *fugu5* 株の表現型を引き起こす機構について上記のように推論したが、窒素

源の組成の違いがどのように PPI 代謝に関与するのかを解明することが新たな課題となった。本研究では 2 つの仮説を立て検証した。まず、仮説 1「アンモニアが PPI 分解酵素(sPPase)の発現量または活性を上昇させ、PPI 蓄積を防ぐ」と考え、シロイヌナズナの細胞質に局在する sPPase の発現が、アンモニアの存在によって増加するかどうかを検証した。本葉に局在する sPPase (PPa1, PPa2, PPa4, PPa5) の各遺伝子の発現を解析したが、いずれもアンモニアの添加による発現上昇はみられなかった。次に、仮説 2「NH₄⁺非存在下ではシュートの PPI 生成経路が亢進する」を検証した。ここではシロイヌナズナの根と地上部における窒素代謝の違いに注目した。アンモニアは細胞に対して毒性を示すため、根で吸収されるとすぐにアミノ酸に同化され、他の器官に長距離輸送される。一方、吸収した硝酸は根ですぐには同化されず、地上部に輸送されてから同化される。窒素代謝の過程で PPI が生成するプロセスが 2 段階存在する。これらを考慮し、アンモニアを含む培地で生育した場合は多くの窒素代謝が根で進行し、アンモニアを含まない MGRL 培地で生育した場合は主たる窒素代謝が地上部で進むと考えた。つまり、MGRL 培地ではシュートにおいて窒素代謝に伴って発生する PPI が、アンモニア添加培地での場合よりも多いと推定した。そこで、数種のアミノ酸を MGRL 培地に添加し、根でも窒素代謝を行えると想定できる環境で *fugu5* 株を栽培した。その結果、0.25 mM アルギニンとオルニチンを添加した場合に、表現型が完全に回復した。アミノ酸合成経路をみるとアルギニンが合成される過程で PPI が生成するステップがある。したがって、培地にアルギニンを供給することで、アルギニンの生合成量を抑え PPI 生成量が低下したことが表現型の回復に繋がったと推測した。

以上のように福田菜由は、単純な無機化合物であり高分子合成反応の副産物として生成する PPI の濃度調節異常が、植物の形態形成異常をもたらすことを明らかにした。その異常は細胞分裂と成長の盛んな地上部の組織に顕著であり細胞死に至る。細胞構築と形態形成が、アンモニアやアルギニン、オルニチンの添加により回復することも見出し、それらの代謝上の意義、位置付けを議論する手がかりを得たといえる。本研究は、窒素・アミノ酸代謝の上でも、PPI 濃度の厳密な調節が不可欠であることも明らかにした。PPI が関与する代謝反応は 200 種類程度存在する。その全てを解析できたわけではないが、本研究により、窒素代謝と PPI の関係を生理的、生化学的に解明する大きな手がかりが得た。これらの研究成果により、生化学および植物分子生理学における貢献度のきわめて高い、新規な知見を提供した。本審査委員会は本論文の内容が博士(農学)の学位を授与するに十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※第	号	氏名	福田 茉 由
試験担当者	主査 前島正義、小俣達男、榊原均、Ali FERJANI、中西洋一、河内美樹、瀬上紹嗣			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成30年2月7日学位審査委員会において、主論文の内容を中心</p> <p>としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した</p> <p>結果、合格と判定した。</p>				