

## 主論文の要約

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

氏名 福田 茉由

本研究は、植物液胞膜のプロトンポンプである  $H^+$ -pyrophosphatase ( $H^+$ -PPase) に注目し、その遺伝子欠失株が示す表現型を解析することで、 $H^+$ -PPase の生理機能、およびその基質であるピロリン酸 (PPi) の濃度が形態形成に与える影響の詳細を明らかにすることを目的とした。

$H^+$ -PPase は、PPi の加水分解とプロトンポンプの2つの機能を合わせもつ。PPi は細胞内で DNA や RNA、タンパク質、多糖などの合成反応の副産物として生成し、細胞内に過剰に蓄積すると、これらの高分子合成反応を化学平衡論的理由により抑制する。一方で、解糖系の一部の酵素等は PPi を基質として必要とする。したがって、その適切な濃度の維持は細胞にとって必須である。また、液胞は植物細胞にとって極めて重要な器官である。液胞は、多くの植物細胞において細胞体積の大部分を占めており、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、細胞の分化や成長など、様々な機能を担っている。また、液胞内には多くの酵素が含まれており、それらの至適 pH を維持するためにも、 $H^+$ -PPase の機能は重要であると考えられる。よって、 $H^+$ -PPase のもつ2つの機能、すなわち PPi 加水分解能とプロトンポンプは植物細胞の機能維持に必須であり、 $H^+$ -PPase の欠損による植物細胞への影響はきわめて大きいと予想された。

しかし、 $H^+$ -PPase の欠損による植物への影響は、予想に反しマイルドなものであった。 $H^+$ -PPase 欠損株である *vhp1* (T-DNA 挿入変異株) および *fugu5* (アミノ酸置換・欠損変異株) の表現型は、スクロース無添加培地における子葉の形態変化と、発芽以降のステージにおけるわずかな生育の遅延以外に報告がない。一方、シロイヌナズナの生育実験で広く用いられている MS 培地 (スクロース含む) においては、 $H^+$ -PPase 欠損株であっても子葉、本葉ともに、野生株 (WT) と変わらず正常に生育する。よって、発芽時以降のステージにおいて  $H^+$ -PPase がどのような役割を果たしているのかを解明する手がかりが少なく、疑問が残されたままであった。そこで本研究では、遺伝子欠失株が示す表現型を解析することで、 $H^+$ -PPase の植物の生育調節に果た

す役割とその機構を分子生物学的に解明することを大きな目的とした。本研究では、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でシロイヌナズナを生育させた場合には、葉柄と葉身の間が壊死し、本葉が発達しないという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、この表現型は回復する。 $H^+$ -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も課題とした。

$H^+$ -PPase の細胞機能を明らかにするには、本酵素の2つの機能、すなわち PPI 加水分解とプロトンポンプ機能を切り分けて解析する必要がある。具体的には、 $H^+$ -PPase の遺伝子欠失株である *fugu5* 株を対象にして、この株に、PPI 加水分解機能のみをもつ酵母の可溶性 PPase 等を遺伝子導入するなどの実験により検証・解析した。

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培地 (MGRL 培地) で生育すると、遺伝子欠失株 *fugu5* 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。葉柄と幼本葉の連結部分の壊死が進行し、その後、本葉がまったく発達しない状態となる。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、本葉表面のクチクラ層でも *fugu5* 株では部分的な欠損が起こるといった知見も得た。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と推測し、窒素源が 2 倍希釈 MS 培地と同程度となるように、MGRL 培地に硝酸を添加し、*fugu5* 株の生育試験を行った。しかし、この培地では *fugu5* 株は表現型を示し、窒素の総量が原因ではないことが判明した。次に、アンモニアの有無が重要と推測した。MGRL 培地の窒素源を変更し、4 mM の硝酸と 3 mM のアンモニアを含む MGRL<sup>Am</sup> 培地を調製し、*fugu5* 株の生育試験を行った。その結果、MGRL<sup>Am</sup> 培地で生育した *fugu5* 株は、野生株と同様に正常に成長した。さらに、1 mM のアンモニアにより *fugu5* 株の表現型を回復できることも明らかにした。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ことを示す新しい知見となった。

次に、 $H^+$ -PPase の 2 つの機能、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。表現型を示す *fugu5* 株に PPi 加水分解機能のみをもつ酵母可溶性 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。酵母の可溶性酵素 IPP1 を  $H^+$ -PPase のプロモーター制御下で発現させると、表現型が生ずることなく、しかも、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の PPi 含量は野生株の 1.8 倍となるが、*fugu5* に IPP1 を導入した *fugu5* 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 *fugu5* 株に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の PPi 濃度の異常な増大が、MGRL 培地での顕著な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。このことは、 $H^+$ -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示している。

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き生育させた場合には、*fugu5* 株の表現型が軽減された。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。*fugu5* 株の本葉表皮を解析したところ、クチクラ層が部分的に欠損していることも明らかになった。これらの知見から、本葉の先端が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。とくに、アンモニアの存在がなぜ表現型の発生を抑制するのかに注目した。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否かを検証した。本葉に局在する sPPase (PPa1, PPa2, PPa4, PPa5) について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「 $\text{NH}_4^+$ 非存在下ではシュートの PPi 生成経路が亢進する」について検証した。ここでは植物の地上部と地下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、その後他の器官に長距離輸送される。一方、硝酸は細胞に対して毒性を示さないため、吸収した  $\text{NO}_3^-$ 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。これらを考慮すると、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られる。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、MGRL<sup>Am</sup> 培地で生育した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、PPi 濃度上昇によるアルギニンの生合成の低下を補い、かつアルギニン生合成過程での PPi 生成量を抑えることが *fugu5* 株の回復に繋がったと推測する。

本研究により、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 の代謝異常あるいは濃度調節異常が、植物の形態形成異常につながる事が明らかになった。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。その異常が、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、位置付けも議論する手がかりを得た。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示している。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られた。