

論文内容の要旨

申請者氏名 加藤 啓太

タバコ植物はニコチンを始めとするピリジンアルカロイドを根で生合成し、その後、茎の導管を通じて地上部に転流し、全草でこれら殺虫性アルカロイドを蓄積する。昆虫などによる葉の傷害によって、根におけるニコチン生合成量は数倍に上昇するが、この活性化はジャスモン酸シグナル伝達系を経由する。一方、別の植物ホルモン、オーキシンはジャスモン酸によるニコチン合成の活性化を抑制するが、この拮抗作用の分子機構は不明である。

植物界で普遍的なジャスモン酸シグナル伝達系の下流転写因子 MYC2 は、タバコのニコチン蓄積の調節遺伝子座 *NIC2* に座する ERF 型転写因子遺伝子群（主に *ERF189*）を転写誘導し、*ERF189* がニコチン生合成酵素遺伝子群を特異的に転写活性化することが知られている。最近、タバコ根細胞の細胞膜に局在するプリン取り込み輸送体様の構造をもつ NUP1 (nicotine uptake permease 1) が酵母細胞においてニコチン取り込み活性を示すことが報告された。興味深いことに、*NUP1* 発現抑制タバコ植物体では、ニコチン蓄積総量が減少し、根の生育が促進される実験結果が報告されている。この *NUP1* 発現抑制植物体の形質は、NUP1 のニコチン取り込み活性からは説明がつかない。本研究では、NUP1 がどのような分子機構で、ニコチン生合成と植物体の生育に影響を与えるのかを明らかにした。

まず、酵母およびタバコ培養細胞を用いた取り込み実験から、NUP1 はニコチンのみならず、ビタミン B6 も培地から細胞内へ輸送する活性をもつことを見出した。*NUP1* 過剰発現タバコ植物体では根から地上部へのニコチン転流が抑制されたが、これは過剰に存在する NUP1 が根アポプラストに分泌されたニコチンを細胞内へ再取り込みすることにより、根から導管へのニコチン取り込みを阻害したと推察した。次に、*NUP1* を発現抑制または過剰発現させたタバコ培養細胞を用いた解析により、NUP1 はニコチン輸送活性に加えて、ニコチン生合成総量を調節する働きがあることを明らかにした。さらに、ジャスモン酸シグナル伝達系因子の発現解析により、NUP1 はニコチン生合成特異的転写因子 *ERF189* の発現制御を介してニコチン生合成量に影響を与えることを見出した。さらに、*NUP1* 発現抑制タバコ培養細胞を用いた cDNA マイクロアレイ解析により、ニコチン生合成酵素遺伝子に加えて、ER 局在型細胞内オーキシン輸送体である *PILS* (*PIN-Likes*) 遺伝子が顕著に発現抑制されていることが明らかになった。アラビドプシスでは、*PILS* は細胞質中の活性型オーキシンを ER 内に隔離することで、オーキシンシグナルを負に制御すること報告されている。各種発現抑制株を用いた一連の実験結果より、ジャスモン酸誘導性 *PILS* がオーキシンによるジャスモン酸シグナル伝達系の抑制作用を緩和しており、NUP1 はジャスモン酸誘導性 *PILS* 遺伝子の発現に必要であると結論した。

本研究では多機能ニコチン取り込み輸送体 NUP1 の機能解析を通じて、オーキシンによるジャスモン酸シグナル系の抑制作用がジャスモン酸誘導性オーキシン細胞内輸送体 *PILS* を介することを明らかにした。本成果は、タバコ植物のアルカロイド蓄積のみならず、植物全般に見られるジャスモン酸とオーキシンの相互作用解析に新たな局面を提示するものである。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 加藤 啓太

生物の発生、形態形成、代謝、環境応答などの多様な局面で働く生体機能性低分子ホルモンは単独で働く場合はおそらくまれであり、多くは他のホルモンと協調的または拮抗的に働く。こうしたホルモンシグナル伝達経路の相互作用の分子機構はまだ未解明な点が多い。植物の成長や分化などに多面的に働くオーキシンは他の植物ホルモンと相互作用し、シグナル伝達系の相互作用点が幾つか報告されている。タバコ植物では虫などによる葉への傷害がジャスモン酸シグナル伝達経路を活性化し、根でニコチン生合成を増大させる。一方、オーキシンの主要生成場所である茎頂と若い葉を取り除くことにより、根へのオーキシンの供給が減少し、ニコチン合成量が増大することが知られており、タバコ農家がニコチン量を増大させる際に、トップングという茎頂部の除去が行われる。すなわち、この系においてオーキシンはジャスモン酸の作用を抑制するが、その分子機構は不明であった。

本論文では、タバコ植物において細胞外から細胞内にニコチンを取り込む輸送体 NUP1 (nicotine uptake permease 1)の機能解析を行った。NUP1の発現を抑制したタバコ植物ではニコチン蓄積量が減少し、根の生育が促進されることが他の研究者により報告されているが、こうした現象はNUP1のニコチン取り込み活性では説明できない。申請者はまず、酵母とタバコ培養細胞での実験系を利用して、NUP1がニコチンのみならず同じピリジン環を有するピリドキサミン類(ビタミンB6)も輸送する活性を持つことを証明した。

本論文では、引き続き、NUP1がニコチン蓄積特有のマスター転写因子 *ERF189* 遺伝子の発現を制御することにより、ニコチン蓄積量に影響を与えていることを見出した。さらに、NUP1がジャスモン酸誘導性細胞内オーキシン輸送体 *PILS1* 遺伝子の発現に必要であり、NUP1が機能しないと、ジャスモン酸により *PILS1* が発現せず、細胞内オーキシン量が増大することを解明した。増大したオーキシンは *ERF189* 遺伝子のジャスモン酸による発現誘導を抑制し、ニコチン生合成が阻害されると議論している。これらの研究成果は、NUP1がニコチン取り込み活性以外に *PILS1* 遺伝子の発現制御に深く係ることを示しており、この制御がNUP1により細胞内に取り込まれる未知の遺伝子発現活性化低分子化合物によるものなのか、今後の研究の展開が期待される。

以上のように、本論文は植物の主要ホルモン間の相互作用に輸送体が係る新規な調節機構をタバコのニコチン蓄積を中心に生化学、分子生物学、代謝解析を用いて研究したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。