

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22370021

研究課題名(和文)植物の茎伸長過程におけるサーモスペルミンの作用機構の解明

研究課題名(英文)A study on the mode of action of thermospermine in the stem growth of plants

研究代表者

高橋 卓(Takahashi, Taku)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：20271710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円、(間接経費) 4,140,000円

研究成果の概要(和文)：サーモスペルミンはポリアミンの1つで、植物において維管束分化の抑制に関わり、欠乏すると維管束の異常な増殖と矮化が起きる。その作用機構を解明するため、シロイヌナズナのサーモスペルミン合成欠損変異株から、サーモスペルミンなしで茎の伸長が回復する変異株sac53-d, sac56-dを単離し、原因遺伝子としてリボソームタンパクRACK1, L4をそれぞれ同定した。一方、サーモスペルミンの代替効果を持つ活性物質として、ノルスペルミンを見つけた。さらに、サーモスペルミンがオーキシンと拮抗し、維管束形成を抑制する作用を持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Thermospermine functions in repressing xylem differentiation in plants and its deficiency results in excess proliferation of xylem vessels and severe dwarfism. To know the mode of action of thermospermine, we have isolated suppressor mutants of a thermospermine-requiring mutant of Arabidopsis that restore the dwarf phenotype, and revealed that sac53-d and sac56-d mutants are defective in a gene encoding ribosomal protein RACK1 and L4, respectively. We further found that thermospermine can be functionally replaced with norspermine. A chemical screening experiment revealed that thermospermine and auxin have an opposite function in xylem differentiation.

研究分野：植物発生遺伝学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物 発生 ポリアミン 維管束 突然変異 シロイヌナズナ

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

1. 研究開始当初の背景

プトレシン, スペルミジン, スペルミンを代表とするポリアミンは, 多くの生き物が持つ低分子塩基性化合物で多面的な生理活性をもつ。本研究者らは, シロイヌナズナの茎の伸長に特異的な欠損を示す *acl5* 変異株の解析から, *ACL5* 遺伝子がサーモスペルミン合成酵素をコードし, 外的なサーモスペルミンに応じて *acl5* 変異株の茎の伸長が回復することを明らかにした。サーモスペルミンはスペルミンの構造異性体である。さらに, シロイヌナズナのゲノムは 2 つのスペルミジン合成酵素遺伝子 *SPDS1*, *SPDS2* と, スペルミン合成酵素遺伝子 *SPMS* を有し, *SPDS1*, *SPDS2* の二重欠損変異株は胚致死となり, スペルミジンが植物の生育に必須であることを証明した。*SPMS* についても T-DNA 挿入変異株を単離し, スペルミンは通常の生育に必須ではなく, ストレス応答や病原抵抗反応の信号伝達に働くことが示唆された。

これらの結果はサーモスペルミンが茎の伸長に特異的に関わることを示すが, 具体的な作用機構は不明である。そこで, *acl5* 変異株から茎の伸長が回復したサプレッサー変異株 *sac51*~*54* を単離し, 解析をすすめた。その 1 つ *sac51* の原因遺伝子は転写因子をコードしていたが, その 5'側転写領域に短いペプチドコード領域, いわゆる upstream ORF (uORF) を複数持っており, 変異はその uORF の一つに見出され, これが転写因子の翻訳効率の上昇を引き起こして, 優性を示す茎の伸長回復の表現型をもたらしていることを突き止めた。また, *sac52* では翻訳開始の鍵因子の一つとして知られるリボソームタンパク質 L10 の遺伝子 *RPL10A* に変異があり, その異常が *SAC51* 遺伝子の uORF を介した翻訳

調節に影響を与えていることがわかった。以上から, 茎の伸長制御にサーモスペルミンによる uORF を介した遺伝子(*SAC51*)の翻訳調節が関わるという, 重要な手がかりを得るに至った。

2. 研究の目的

以上の経過に基づいて本研究では,

- 1) サーモスペルミンがどのように働いて茎の伸長をもたらすのか,
 - 2) サーモスペルミンにある一方, スペルミンにはない生理活性の違いを生み出す原因は何か,
 - 3) 外から加えたサーモスペルミンによって, *acl5* 変異株が細胞レベルでどのような分化, 伸長の回復を示し, また遺伝子発現の変動を示すか,
- をそれぞれ明らかにして, 茎の伸長におけるサーモスペルミンの作用機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

1) サーモスペルミンの作用機構

acl5 変異株にさらに変異を誘発し, 茎の伸長が回復したサプレッサー変異株を単離, 解析することで, サーモスペルミンの作用機構を遺伝学的に明らかにする。前述のように, *sac51*, *sac52* 変異の原因遺伝子については平成 19 年度までの基盤研究(B)の成果として論文公表済みである。本研究課題では, *sac53*, *sac56* 変異の原因遺伝子の同定を目指す。

また, *acl5* 変異株の細胞観察から, サーモスペルミンの生理作用に木部分化を抑制する効果が認められることから, 子葉の葉脈の分化を指標に, 変異株の過剰な木部分化を打ち消す, または増強する化合物をケミカルラ

イブラリーの探索によって単離する。

2) サーマスペルミンの生理活性に必要な構造的特徴

人工的に合成したポリアミンを用いて、サーモスペルミンの生理活性に必要な構造的特徴を明らかにする。

3) 外的なサーモスペルミンに対する植物の応答

acl5 変異株を用いてマイクロアレイ実験を行い、サーモスペルミンの欠乏によって発現が影響を受ける遺伝子を明らかにする。さらに外的なサーモスペルミン添加による効果を遺伝子発現、および細胞分化のレベルで詳細に調べる。

4 . 研究成果

1) サーマスペルミンの作用機構

acl5 変異による茎の伸長欠損が回復したサブレッサー変異株 *sac53*, *sac56* について、遺伝学的に原因遺伝子を調べた結果、それぞれリボソームの構成タンパクである RACK1, L4 タンパク質をコードし、いずれも SAC51 の翻訳を増加させる効果をもつ変異であることがわかった。

また、ケミカル探索により、*acl5* 変異の表現型を亢進する物質としてオーキシシン誘導体 2,4-D IOE を見つけ、オーキシシンによる維管束分化の誘導をサーモスペルミンが抑えるという相互作用を明らかにした。

2) サーマスペルミンの生理活性に必要な構造的特徴

acl5 変異株に対する添加実験から、ノルスペルミンにサーモスペルミンと同等以上の維管束分化の抑制、および茎の伸長促進の効果が認められ、C3C3 の炭素鎖と4つのアミノ基を持つ直鎖のテトラアミンであることが生理活性に重要であると示唆された。

3) サーマスペルミン応答

acl5 変異株を用いたマイクロアレイ解析から、サーモスペルミンの欠乏によって維管束木部が過剰に分化する原因として、オーキシンの合成、および信号伝達が時空間的に適切に抑制されないことが強く示唆され、前述のケミカル検索の結果と合わせて、オーキシシンとサーモスペルミンの拮抗作用が木部分化の制御に重要であることが突き止められた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

W. Tong, K. Yoshimoto, J.-I. Kakehi, H. Motose, M. Niitsu and T. Takahashi (2014) Thermospermine modulates expression of auxin-related genes in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **5**: 94

doi: 10.3389/fpls.2014.00094 (査読有)

G. Inoue, T. Kaneta, T. Takayanagi, J.-I. Kakehi, H. Motose and T. Takahashi (2013) Determination of polyamines in *Arabidopsis thaliana* by capillary electrophoresis using salicylaldehyde-5-sulfonate as a derivatizing reagent. *Anal. Methods* **5**: 2854-2859

doi: 10.1039/C3AY26360F (査読有)

K. Yoshimoto, Y. Noutoshi, K. Hayashi, K. Shirasu, T. Takahashi and H. Motose (2012) Thermospermine suppresses auxin-inducible xylem differentiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* **7**: 937-939

doi: 10.4161/psb.20784 (査読有)

K. Yoshimoto, Y. Noutoshi, K. Hayashi, K. Shirasu, T. Takahashi and H. Motose (2012) A chemical biology approach reveals an opposite action between thermospermine and auxin in xylem development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **53**: 635-645

doi: 10.1093/pcp/pcs017 (査読有)

A. Takano, J.-I. Kakehi and T. Takahashi (2012) Thermospermine is not a minor polyamine in the plant kingdom. *Plant Cell Physiol.* **53**: 606-616

doi: 10.1093/pcp/pcs019 (査読有)

J.-I. Kakehi, Y. Kuwashiro, H. Motose, K. Igarashi, and T. Takahashi (2010) Norspermine substitutes for thermospermine in the control of stem elongation in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **584**: 3042-3046

doi: 10.1016/j.febslet.2010.05.035 (査読有)

[学会発表] (計 3 1 件)

A. Takano, S. Ishitsuka, N. Ishii and T. Takahashi: Translational regulation of the *SAC51* mRNA by thermospermine

24th International Conference on Arabidopsis Research, Sydney, Australia, 24-28 June, 2013

K. Yoshimoto, W. Tong, H. Fukushima, H. Motose and T. Takahashi: *SAC51* mediates thermospermine-dependent repression of xylem proliferation

24th International Conference on Arabidopsis Research, Sydney, Australia, 24-28 June, 2013

福島弘子・河野恵理・坂本智昭・本瀬宏康・倉田哲也・高橋卓: シロイヌナズナのサーモスペルミン欠乏変異による矮性表現型を抑制する変異 *sac* の原因遺伝子の同定

第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山) 2013 年 3 月 21 日

本瀬宏康・吉本香織・ウリナ・懸樋潤一・高村浩由・門田功・高橋卓: サーモスペルミン合成阻害剤は道管分化を促進する

第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山) 2013 年 3 月 21 日

高野綾香・石塚壮一・石井菜水・高橋卓: シロイヌナズナ *SAC51* 遺伝子のサーモスペルミンによる翻訳制御機構

第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山) 2013 年 3 月 21 日

吉本香織・本瀬宏康・高橋卓: サーモスペルミンによる木部分化の抑制に関わるシロイヌナズナの転写因子 *SAC51* の分子遺伝学的解析

第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山) 2013 年 3 月 21 日

高橋卓・高野綾香・石塚壮一・石井菜水・懸樋潤一・本瀬宏康: シロイヌナズナの *SAC51* 遺伝子はサーモスペルミンにより翻訳が促進される

第 4 回日本ポリアミン学会年会 (松島) 2013 年 1 月 24 日

懸樋潤一・河野恵理・本瀬宏康・高橋卓: *SAC51* mRNA はサーモスペルミン及びリボソームタンパク質の変異により安定化する

第 4 回日本ポリアミン学会年会 (松島) 2013 年 1 月 24 日

福島弘子・河野恵理・坂本智昭・本瀬宏康・倉田哲也・高橋卓: シロイヌナズナの矮性変異 *acl5* に対する新たなサプレッサー変異株の分子遺伝学的解析

第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡) 2012 年 12 月 11 日

懸樋潤一・河野恵理・本瀬宏康・高橋卓: *SAC51* mRNA はサーモスペルミン及びリボソームタンパク質の変異により安定化する

日本植物学会第 76 回大会 (姫路) 2012 年 9 月 15 日

高野綾香・懸樋潤一・高橋卓: 植物界におけるサーモスペルミンの分布

日本植物学会第 76 回大会 (姫路) 2012 年 9 月 15 日

石塚壮一・石井菜水・桑城克隆・高橋卓：
シロイヌナズナ *SAC51* 遺伝子のサーモスペ
ルミンによる翻訳促進

日本植物学会第 76 回大会（姫路）2012 年 9
月 15 日

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.biol.okayama-u.ac.jp/takahashiTaku/
T-Takahashi.html](http://www.biol.okayama-u.ac.jp/takahashiTaku/T-Takahashi.html)

6．研究組織

(1) 研究代表者

高橋 卓 (TAKAHASHI TAKU)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：20271710

(2) 研究分担者

本瀬 宏康 (MOTOSE HIROYASU)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：70342863