

論文審査の結果の要旨

氏名 吉田 彩子

本論文は、維管束細胞の分化転換初期過程におけるオーキシシン作用を、オーキシシン極性輸送阻害剤を用いて分子生物学的、細胞生物学的に解析したものである。本論文の構成は5章からなる。第1章では、Prefaceとして、この研究の背景と研究を始めるにあたっての動機を述べている。第2章では本研究で使われた材料と方法について記述されている。第3、4章は研究の結果とその考察であり、第3章では、オーキシシン極性輸送阻害剤の分化転換初期プロセスに対する作用機構の解析について、第4章では、マイクロアレイを用いた分化転換過程のオーキシシン作用解析について、第5章では得られた結果を受けて、総合的に、オーキシシンによる維管束細胞分化転換の制御機構について考察している。

オーキシシンは茎頂から根端に向けて極性輸送され、これに沿って維管束が連続的に形成されると考えられている。しかしながら、細胞レベルでは、維管束細胞分化におけるオーキシシンの作用機構はほとんど明らかになっていない。そこで、論文提出者は、ヒヤクニチソウ単細胞管状要素分化誘導系を用いて、管状要素分化転換におけるオーキシシン制御機構の解明を試みた。

論文提出者は、管状要素が NAA(オーキシシン)存在下で分化することから、まず、様々なオーキシシン排出キャリア阻害剤 NPA、TIBA、HFCA を用いて、管状要素分化に対する影響を調べた。その結果、これらはいずれも管状要素分化を生理的な濃度で阻害することが分かった。そのため、阻害剤により NAA が細胞内に蓄積し、高濃度の細胞内 NAA が分化を阻害すると予想された。しかし、予想外なことに外から大過剰のオーキシシン (NAA、IAA、2,4-D) を与えることでその阻害が回復することが明らかになった。この結果は、阻害剤投与でむしろ細胞がオーキシシン欠乏状態になることを示唆した。そこで、細胞内の NAA 代謝を解析したところ、NPA 処理により、細胞内の総 NAA 量は増加するのだが、その多くは代謝型 NAA であり、遊離型 NAA はむしろ減少していることが明らかとなった。オーキシシン排出キャリア阻害剤による細胞内活性型オーキシシンの減少を個々の細胞レベルで調べるために、[オーキシシン誘導性プロモーター:: YFP 蛍光タンパク質] キメラ遺伝子をヒヤクニチソウ細胞

に導入した。その結果、NPA 処理細胞では YFP 蛍光が顕著に減少していることが明らかになった。この結果は、NPA が細胞内活性化型オーキシシン量を減少させていることを強く支持した。以上の結果は、オーキシシン排出キャリア阻害剤は、これまで考えられていた阻害作用とは異なり、細胞内の活性化型オーキシシン濃度をむしろ下げていることを示しており、頻用される阻害剤の新規作用を証明した、初めての報告となった。

続いて、論文申請者は NPA が細胞内オーキシシン量を減少させるという結果を利用して、NPA と NAA のパルス処理により、管状要素分化を自在に停止・再開できる実験系を開発した。さらに、この実験系と約 9000 個の遺伝子のマイクロアレイを組み合わせ、オーキシシンの分化誘導初期過程の解析を行った。その結果、管状要素分化転換過程は、ステージ 1 (傷害応答・脱分化過程)、ステージ 2 (分化能制限過程) 及びステージ 3 (管状要素特異的分化過程) にわけられるが、NPA はステージ 1 の進行を延長させ、ステージ 2 への移行を阻害することが明らかとなった。一方、オーキシシンはステージ 1 を停止させ、ステージ 2 への移行を促進することが明らかとなった。この結果は、オーキシシンが管状要素分化の初期過程の鍵因子となることを証明した初めての報告として、高く評価された。さらに、遺伝子発現の詳細な解析から、オーキシシンはステージ 2 移行誘導時に、まず *AUX/IAA* 遺伝子発現による初期のオーキシシン応答を引き起こし、次いでオーキシシン取り込みキャリア遺伝子、オーキシシン制御転写因子の生産というようにオーキシシンシグナルのポジティブフィードバックを駆動することが示唆された。これらの反応はオーキシシン添加後 4 時間という極めて短期間に起こることが明らかとなった。この時期には、維管束幹細胞である前形成層の特異的遺伝子が発現することが分かり、オーキシシンは極めて速やかに維管束の分化を進行させることがはじめて示された。この結果は新規かつ独創的なものと評価された。これらの結果と同時に、オーキシシンと他の植物ホルモンとのクロストークも遺伝子解析から示された。特に、オーキシシンによるサイトカイニンオキシダーゼ遺伝子発現の促進は興味深い。これはヒヤクニチソウ分化誘導系で申請者が発見したものであるが、シロイヌナズナの植物体においても、前形成層特異的にオーキシシンがこの遺伝子の発現を促進することが明らかとなった。この結果は、オーキシシンがサイトカイニンオキシダーゼ量を増加させることで、サイトカイニン量を減少させ、その結果、さらなる分化の進行を促進させることを示唆した。この結果も新規かつ重要であり、高く評価された。

なお、本論文第 1 章は栗山英夫、福田裕穂氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上、ここに得られた結果の多くは新知見であり、いずれもこの分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、かつ本人が自立して研究活動を行うのに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、吉田彩子提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。