

称号及び氏名 博士（応用生命科学） 中本 雅俊

学位授与の日付 平成28年2月29日

論文名 **Studies on essential roles of C24-ethylsterol in plant development**
(植物ステロールが担う未知生理機能の解明)

論文審査委員 主査 太田 大策
副査 青木 考
副査 小泉 望

論文要旨

序論

正常な膜ステロール組成は植物のみならず、あらゆる生物の発生・発達に不可欠とされている。しかし「正常なステロール組成」についての明確な定義は無く、個々のステロール分子が特異的機能を担う可能性はほとんど言及されていない。植物ステロールは側鎖 C24 位メチル化レベルが異なる C24-メチルステロール（カンペステロール）と C24-エチルステロール（シトステロール、スチグマステロール）に大別され、これら主要ステロールの蓄積プロファイル（C24-メチルステロールと C24-エチルステロールの比）がステロール組成に反映される。C24 位のメチル化反応は S-アデノシルメチオニン依存の 2 種類のメチル基転移酵素（SMT）が触媒する。第 1 段階 *SMT1* は、菌類から高等植物に至るまで、広く保存され、第 2 段階は車軸藻から多細胞の陸上植物において特異的に多様化した *SMT2* が触媒する。本研究では、*SMT2* 変異によって C24-エチルステロール蓄積能だけを失ったシロイヌナズナ変異体を作成し、C24-エチルステロールが担う細胞生物学的機能の理解を通して、*SMT2* 遺伝子の多様化が多細胞植物の進化過程において果たした役割の解明を目的とした。

第 1 章 C24-エチルステロール欠損変異体の樹立と表現型解析

まず、シロイヌナズナの *SMT2* 遺伝子の変異系統を樹立し、その表現型解析

を実施した。シロイヌナズナ SMT2 反応に関わるメチル基転移酵素は、SMT2 と SMT3 の 2 遺伝子がコードする。まず、両遺伝子の二重変異系統 (*smt2 smt3*) を樹立した。*smt2 smt3* 二重変異体は C24-エチルステロール産生能を失っていたが、C24-メチルステロール産生能を保持しており、総ステロール含量にもほとんど影響がないにもかかわらず、発生初期段階から広範な重篤表現型を呈し、最終的には不稔に至り、生活環を完結できなかった。*smt2 smt3* では、オーキシンが関与する細胞機能の異常（重力屈性喪失、維管束の分断、オーキシン濃度勾配の崩壊など）とともに、根の幹細胞とそれに連続する細胞系譜における細胞分裂方向異常と組織形成阻害が顕著であった。根の分裂阻害は、細胞部分裂面における微小管集積によって形成されるプレプロフェーズバンドの段階から観察され、引き続いて KNOLLE シンタキシンと微小管の異常局在を伴った異常フラグモプラスト（断片化、方向性喪失、多核化）が形成され、その結果、細胞分裂の破綻と途中停止に伴う異常な細胞構造が認められた。オーキシン輸送排出体 (PIN2) の GFP 融合タンパク質を発現させたところ、PIN2 は断片化した細胞壁や異常細胞構造に偏在し、正常な細胞内 PIN2 極性も攪乱されていた。すなわち、*smt2 smt3* 変異体では、オーキシンの正常な極性輸送が攪乱され、その結果として発生・発達が阻害されると考えられた。*smt2 smt3* 培養根では、オーキシン濃度勾配形成とともに、側根発達が完全に阻害された。この時、外生 C24-エチルステロールを添加すると、オーキシン濃度勾配と側根発達阻害は顕著に回復したが、野生型のステロール組成までは回復せず、C24-エチルステロール代謝物の蓄積も認められなかった。一方、C24-メチルステロールには回復効果は認められなかった。これらの結果から、極微量 C24-エチルステロールが、細胞分裂の正常な進行を維持するための特異的機能を担うと考えられた。

第 2 章 オーキシン排出輸送体 (PIN2) の細胞内局在

第 2 章では、C24-エチルステロール欠損による発生・発達阻害の分子機構解明を目指し、PIN2 極性の破綻に至る原因を解析した。正常な植物細胞では、細胞分裂後期に新規合成された PIN2 は細胞分裂面に集積した後に細胞膜に輸送され、細胞分裂終了後、エンドサイトシスによって非対称的に細胞内での極性分布が成立する。*smt2 smt3* 変異体では、細胞膜からの膜小胞輸送、SNARE タンパク質である KNOLLE, および PIN2 の細胞分裂面への集積が野生型と同様に進行したことから、C24-エチルステロール欠損細胞においても細胞内膜輸送と細胞膜からのカーゴ輸送が機能していると考えられた。そこで PIN2 極性異常は細胞分裂後の非対称 PIN2 輸送が阻害されていることに起因すると考え、細胞分裂終了後の PIN2 極性成立過程を詳細に解析した。その結果、PIN2 エンドサイトシスに異常は認められなかったが、エンドサイトシスリサイクリングの著しい阻害が明らかとなった。またエンドサイトシスリサイクリングに関わる CLASP1 (cytoplasmic linker associated protein1) と微小管の組織内分布の顕著な異常が観察され、PIN2 極性異常は、C24-エチルステロール欠損によるエンドサイトシスリサイクリングの阻害によるものであることが明らかとなった。以上の結果は、

C24-エチルステロールが、細胞分裂過程、小胞輸送と膜交通制御、および細胞骨格タンパク質の配向性制御に共通する分子基盤に参与することを示している。

第3章 総合考察

従来の研究では、ステロール生合成経路の前半部分、すなわち SMT2 の上流に位置する生合成段階に関わる遺伝子変異の結果、正常ステロール蓄積能を完全喪失し、異常ステロールを大量に蓄積する変異体を共試して実験してきた。すなわち、これらの研究では、個々のステロール分子が参与する分子機構を考慮せず、ステロール生合成変異体の著しい発生・発達の阻害の原因を、正常な膜ステロール組成喪失に帰するのみであった。本研究の成果は、C24-エチルステロールが細胞分裂面の決定機構に必須の役割を担うことで、多細胞植物の細胞分裂方向と細胞系譜が成立・維持されること、その結果正常な体軸決定とボディプラン形成プロセスが進行することを示している。言い換えるならば、SMT2 遺伝子の多細胞植物特異的な多様化が、多細胞植物の進化の駆動力になったことを示している。さらに本研究成果は、ステロール側鎖の単一メチル基が、細胞分裂面の決定に関わる未知分子メカニズムに参与することを示している。今後、代謝機能進化によって獲得された新たな生体分子構造の獲得と生物進化の関係を理解するための研究の新展開が期待される。

審査結果の要旨

正常な膜ステロール組成は植物のみならず、あらゆる生物の発生・発達に不可欠とされている。しかし「正常ステロール組成」についての明確な定義は無く、個々のステロールが担う分子メカニズムは明らかではない。植物ステロールは側鎖 C24 位メチル化レベルが異なる C24-メチルステロール(カンペステロール)と C24-エチルステロール(シトステロール, スチグマステロール)に大別され、これら主要ステロールの蓄積プロファイル (24-メチルステロールと C24-エチルステロールの比) をステロール組成と定義しうる。C24 位メチル化反応は、2種類のメチル基転移酵素 (SMT) が触媒する。第1段階 SMT1 は、菌類から高等植物まで生物界に広く保存され、第2段階は多細胞植物に特異的に多様化した SMT2 が触媒する。従来の植物ステロール研究では、生合成が完全に破綻し、異常ステロールを蓄積する突然変異体の解析が主体であったため、ステロールが担う本来の生理機能解明は困難であった。本研究では、SMT2 変異によって 24-エチルステロール生合成能だけ失ったシロイヌナズナ変異体を作成し、C24-エチルステロールが担う細胞生物学的機能、および SMT2 遺伝子の多様化が多細胞植物の進化過程において果たした役割の解明を目的とした。

第1章では、シロイヌナズナ *SMT2* 変異系統の表現型解析を実施した。シロイヌナズナ *SMT2* は、*SMT2* と *SMT3* の2遺伝子がコードする。まず、両遺伝子の二重変異系統 (*smt2 smt3*) を樹立した。*smt2 smt3* 二重変異体は C24 エチルステロール産生能を失っていたが、C24 メチルステロール産生能を保持しており、総ステロール含量にもほとんど影響が無いにもかかわらず、発生初期段階から広範な重篤表現型を呈し、最終的には不稔に至り生活環が完結できなかった。*smt2 smt3* では、植物ホルモンであるオーキシン応答の異常（重力屈性喪失、維管束の分断、オーキシン濃度勾配の崩壊など）とともに、根の幹細胞と連続する細胞系譜における異常細胞分裂に伴う組織形成阻害が顕著であった。根の細胞分裂阻害はプレプロフェーズバンド形成段階から観察され、KNOLLE シンタキシンと微小管の異常局在を伴った異常フラグモプラスト（断片化、方向性喪失）が形成された。オーキシン輸送排出体 (PIN2) の GFP 融合タンパク質を発現させたところ、PIN2 は断片化した細胞壁や異常細胞構造に偏在し、細胞内 PIN2 極性も攪乱されていた。すなわち、*smt2 smt3* 変異体ではオーキシン輸送体の局在性が破綻し、その結果、オーキシンの組織内分布が攪乱され、発生・発達が阻害されると考えられた。*smt2 smt3* 培養根でも、オーキシン濃度勾配形成と側根発達の著しい阻害が認められた。外生 C24-エチルステロール添加は、これらの発達阻害を顕著に回復させたが、野生型のステロール組成は回復せず、C24-エチルステロール代謝物の蓄積も検出されなかった。また、C24-エチルステロール効果は、C24-メチルステロールでは代替できなかった。これらの結果から、極微量 C24-エチルステロールが、オーキシン輸送および細胞分裂の制御に関わる分子機構に必須の役割を担うと考えられた。

第2章では、C24-エチルステロールが関与する分子機構の特定を目的として、PIN2 極性成立の過程を解析した。正常細胞では、細胞分裂後期に新規合成された PIN2 は細胞分裂面に微小管依存的に集積し、その後に均等に細胞膜 (PM) に輸送される。細胞分裂終了後、PIN2 は細胞内小胞輸送によって非対称的に分配されることで極性が成立・維持される。*smt2 smt3* 変異体においても、細胞分裂面への PIN2 集積は正常に機能していたことから、細胞分裂後の極性成立過程が阻害されていると考えられた。*smt2 smt3* 変異体の細胞内小胞輸送を調べたところ、PIN2 エンドサイトシスに阻害は認められなかったが、エンドサイトシスリサイクリングが著しく阻害されていた。さらに、エンドサイトシスリサイクリングの進行に関わる CLASP1 (cytoplasmic linker associated protein1) と表層微小管の組織内分布の顕著な異常が認められ、C24-エチルステロールが細胞骨格タンパク質の配向性制御とエンドサイトシスの分子基盤に関与することが明らかとなった。

本研究によって、多細胞植物は *SMT2* 遺伝子の多様化によって C24-エチルステロール産生能を獲得し、その結果、オーキシン極性輸送、細胞系譜の成立、最終的には多細胞の体軸決定とボディプラン形成過程が進行したことが明らかとなった。今後、側鎖単一メチル基が担う生理機能解明、C24-エチルステロール

を前駆体とする植物シグナル物質の探索，さらに代謝物構造多様化と細胞機能進化に関する新たな領域の展開が期待される．最終試験の成績とあわせて博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める．