

	やま ぐち こう じ
氏名（本籍地）	山 口 公 志
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第91号
学位授与年月日	平成19年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 ， 専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）分子生命科学専攻
論 文 題 目	Evidence for a protective role of the polyamine spermine against environmental stresses in <i>Arabidopsis thaliana</i> （ポリアミンの一種であるスペルミンは環境ストレスからシ ロイヌナズナを保護する）
博士論文審査委員	（主査）教 授 草 野 友 延 教 授 八 尾 寛 教 授 高 橋 秀 幸

論文内容の要旨

Polyamines (PAs) are an important and interesting group of naturally occurring low molecular weight, polycationic, aliphatic nitrogenous compounds observed in various organisms. In plants, putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm) are major components. They are not only involved in fundamental cellular processes such as cell proliferation, differentiation, and programmed cell death, but also in adaptive responses to environmental stresses. PAs are found at rather high levels compared to phytohormones in plant cells, and their endogenous concentrations are fluctuated by growth stage and various environmental stresses. PAs, positively charged at a physiological condition, interact with various macromolecules. So it may cause many functions of PAs and make PAs' works difficult. Recently, the genes for enzymes involved in PA metabolism have been identified (Fig. 1). It can help to investigate individual role of PAs. Until now, some knockout *Arabidopsis* mutants of PA biosynthesis were engineered. The double knockout mutants of arginine decarboxylase genes (*ADC1/ADC2*) and Spd synthase genes (*SPDS1/SPDS2*) have defects in embryogenesis, while the double knockout mutants of Spm synthase genes (*ACL5/SPMS*) are able to complete the life-cycle normally. Thus the current conclusion is that Put and Spd are essential for normal growth of plants, but Spm is not. Despite Spm shares similar physicochemical characters with other PAs, only Spm doesn't have essential role for normal development. So, what role(s) does Spm play in plant cells?

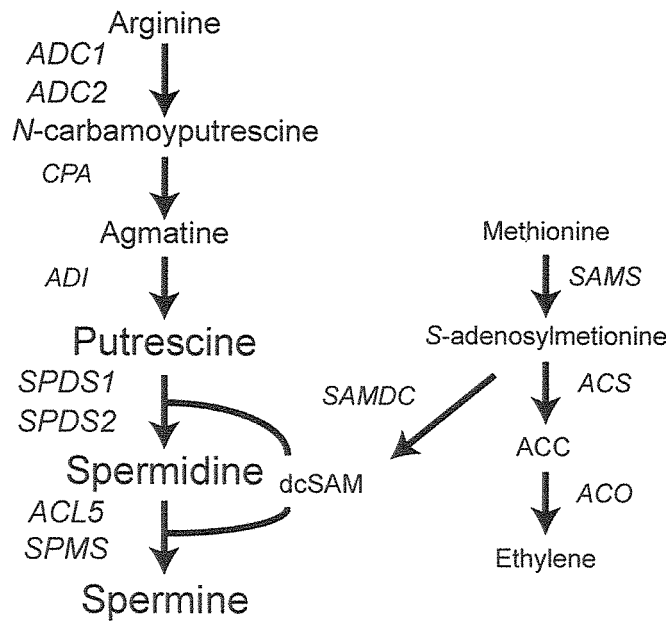


Fig. 1. Pathway of biosynthesis of the major PAs in *Arabidopsis*.

Many reports showed change of PAs contents under environmental stresses. However, no direct evidence indicating the significance of relationship between PAs and environmental stresses in plant cells has been obtained. With the situation of Spm described, in this thesis, I examined whether Spm has a specific role against environmental stresses in plants.

In chapter I, I have addressed the role of Spm in high salt stress using the Spm-deficient mutant (identical to the *acl5/spms* double knockout mutant in my study) plants. Under high salt condition, the Spm-deficient mutant showed higher sensitivity compared to wild type (WT) plants (Fig. 2). This phenotype was cured by exogenous Spm but not by the other PAs Put and Spd, suggesting a strong link between Spm-deficiency and NaCl-hypersensitivity. The mutant was also hypersensitive to high levels of KCl but not to MgCl₂ or to high osmoticum. NaCl-hypersensitivity of the mutant was compromised by treatment with Ca²⁺ channel blockers. Moreover, the mutant showed poor growth on Ca²⁺-depleted Murashige-Skoog agar media. The data suggest that the absence of Spm causes an imbalance in Ca²⁺ homeostasis in the mutant plant.

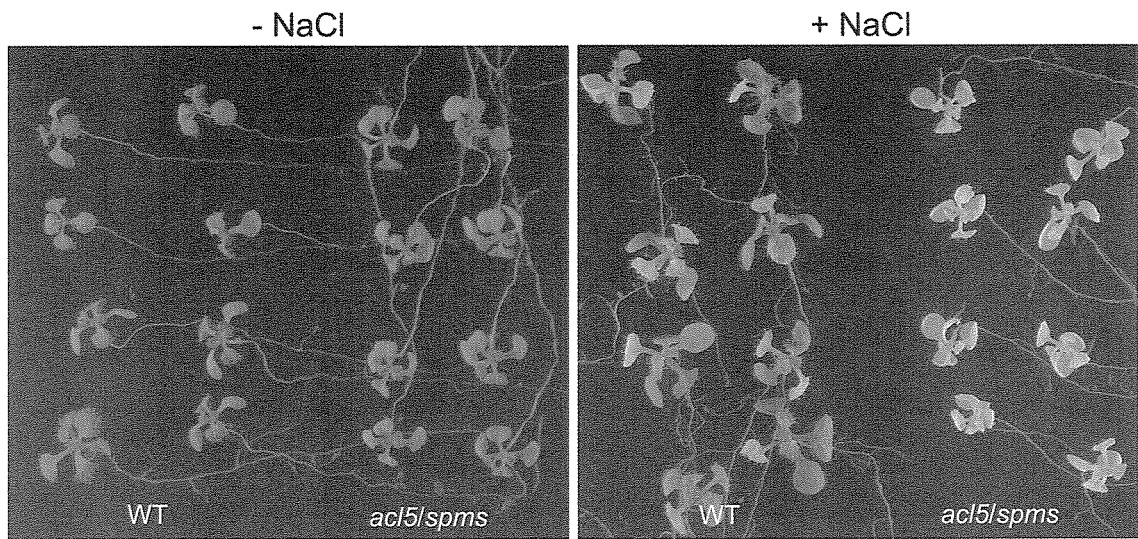


Fig. 2. Spm-deficient *Arabidopsis* plants are hypersensitive to high salt stress

In chapter II, I have focused on the role of Spm against drought stress. Again, the Spm-deficient mutant showed hypersensitivity to drought compared to WT plants (Fig. 3). This phenotype was cured by Spm pretreatment but not by the other PAs (Put and Spd), suggesting that drought-hypersensitivity exhibited by the mutant is due to Spm deficiency. The water loss rate of WT and mutant plants was similar until 20 min after onset of dehydration stress, but after the longer exposure to drought the rate in mutant plants was higher than in WT plants. Consistent with this result, the stomata of the mutant leaves remained open while in WT leaves they closed. It means that absence of Spm causes blockage or slow response of stomatal closure during drought stress, and the Spm-deficient plants lost more water compared to WT and thus became hypersensitive to drought.

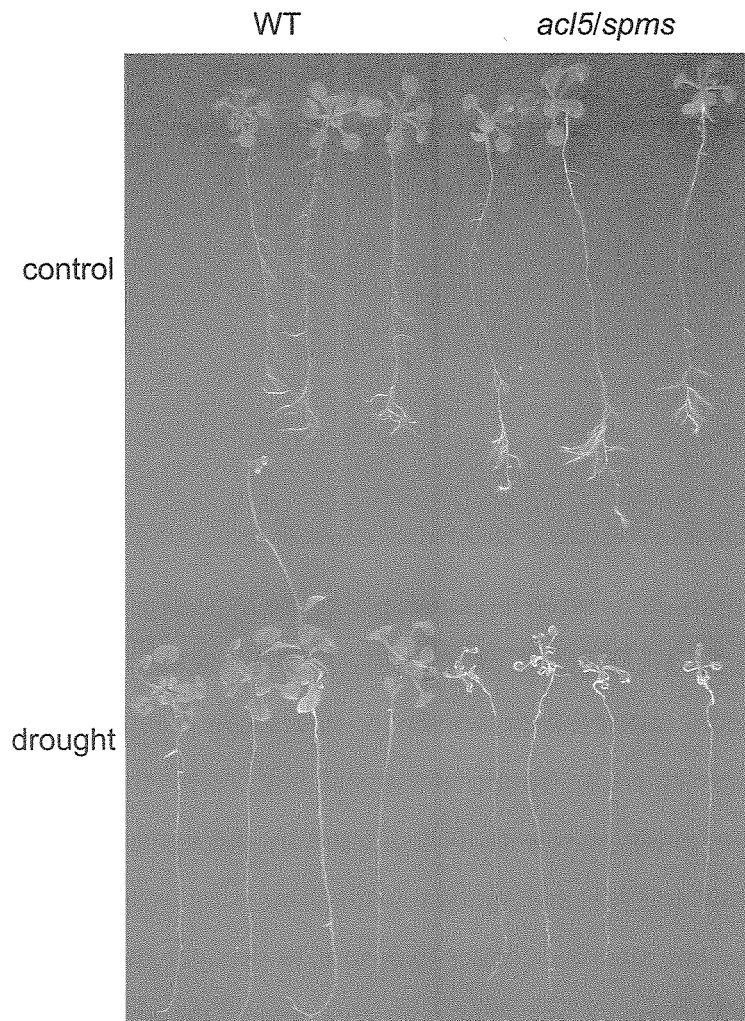


Fig. 3. Spm-deficient *Arabidopsis* plants are hypersensitive to drought.

In the present work, I have clearly disclosed the defensive roles of Spm against high salt and drought stresses in *Arabidopsis*. Moreover, incorporating the current information from the literature, especially regarding action of polyamines on various ion channels, I have proposed the models describing a defensive role of Spm in high salt and drought stresses in *Arabidopsis*.

論文審査結果の要旨

山口公志君は山形大学理学部を卒業後、本研究科の前期課程に入学してきた。片岡助教授のもとで前期課程を終えた後、分子生物学的なアプローチをしたいということで草野の指導のもと、学位取得を目指し研究を開始した。彼の研究課題は「Evidence for a protective role of the polyamine spermine against environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. (ポリアミンの1種であるスペルミンは環境ストレスからシロイヌナズナを保護する)」である。山口君が研究の対象としたポリアミンは、原核生物から真核生物にいたるまで生物界に広く存在する生理活性アミンである。生理条件下でポリアミンは正に荷電することから負に荷電した生体高分子と相互作用することにより種々の作用を示す。核酸・蛋白質合成を促進し細胞増殖因子として機能する、一方で細胞死を誘導するといった多面的な役割が示されている。近年アブラナ科シロイヌナズナにおいて、主要なポリアミン生合成遺伝子を欠損した変異体は胚発生の段階で致死となり、ポリアミンが植物の生存に必須であることが示されている。しかしスペルミン合成酵素遺伝子の機能欠損によりスペルミンを合成できない植物体は、通常の状態化で正常に生育でき他のポリアミンとその性質を異にしていた。そこで、山口君はシロイヌナズナでのスペルミンの役割を明らかにすることを目的に実験を行い、上記のスペルミン合成欠損変異株が環境ストレス（高塩、乾燥）に対して極めて感受性になっていること、高感受性がスペルミン処理により回復すること、さらにはカルシウム動態が異常になっていることを明らかにした。すなわち通常の生育に必須でないスペルミンはシロイヌナズナの生体防御応答において重要な役割を果たしていることを明らかにした。環境ストレス時に、スペルミンは陽イオンチャネル活性を制御し、さらにカルシウム動態を制御することにより、高塩ストレス時の Na⁺イオンの細胞内小器官への隔離や、乾燥ストレス時の気孔の閉鎖を促進することにより生体防御に寄与していることを明らかにした。

学位論文の第1章相当部分をまとめたものが昨年12月に FEBS Letters に、さらに本年1月号に第2章部分が Biophys Biochem Res Commun に公表されており、学位申請の要件を十分に満たしている。

学位論文の審査及び2月1日に行なわれた最終試験において5人の審査員はいずれも「合格」と判定した。上記のことは、山口君が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、山口公志君提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。