

氏名	TOTAN KUMAR GHOSH
博士の専攻分野の名称	博士（学術）
学位記号番号	博理工甲第 991 号
学位授与年月日	平成 27 年 9 月 18 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Abscisic Acid Responses in Basal Land Plants Reveal Molecular Mechanisms Crucial for Stress Adaptation in Embryophytes (基部陸上植物のアブシジン酸応答から明らかとなる有胚植物のストレス適応に必須の分子メカニズム)
論文審査委員	委員長 准教授 竹澤 大輔 委員 教授 森安 裕二 委員 教授 金子 康子 委員 教授 田中 秀逸

## 論文の内容の要旨

Abscisic acid (ABA) is a ubiquitous phytohormone, existing in a wide variety of organisms and regulating many of the important physiological processes of plants like growth, development, stomatal conductance, seed maturity and dormancy, senescence etc. Nowadays, it has been reflected as the stress hormone which triggers responses to various environmental stresses such as desiccation and freezing. Bryophytes comprising liverworts, mosses and hornworts are being postulated as earliest diverging lineage of land plants and occupying the most critical stage of land plants, phylogeny. A lot of research efforts have been made with ABA response and its signaling pathways in angiosperms. In contrast, very few claims have been reported on the basal land plants; bryophytes. Hence, the present study was undertaken to reveal the ABA signaling molecules conserved in embryophytes using two widely used model bryophytes, moss *Physcomitrella patens* and liverwort *Marchantia polymorpha*. Carotenoid-mediated ABA biosynthesis, and its role in higher plants are well documented today. Contrary, this information is still unclear in basal land plants due to lack of mutants lacking ABA biosynthesis enzymes. The PpABA1 encoding zeaxanthin epoxidase (ZEP), a crucial enzyme for carotenoid-mediated ABA biosynthesis was found in moss *P. patens*. Therefore, the *ppaba1* line lacking PpABA1 was developed by the efforts of targeted gene disruption. The *ppaba1* lines showed reduced accumulation of osmotic-induced *LEA*-like transcripts indicating conserved role of endogenous ABA in hyperosmotic acclimation of mosses. Whereas, less effect on cold acclimation capacity of *ppaba1* indicated a minor role of endogenous ABA in cold acclimation of mosses.

The results suggested that the moss comprises both ABA-dependent and independent signaling during acclimation to environmental stresses. Recently couple of investigations proposed that the PP2C-mediated negative ABA regulation is conserved in bryophytes. In contrast, positive regulation mediated by SnRK2 is yet to be clarified in this plant groups. Therefore, for getting new information and clarification of positive ABA response, further we engaged liverwort *M. polymorpha* for comparative functional analysis with moss *P. patens*. In comparison with mosses, very

few research efforts of ABA response in liverworts were reported, though they are known as sister group to all other land plant lineages. We analyzed MpARK of liverwort *M. polymorpha* as the ortholog of PpARK, mutation of which causes a strong ABA insensitive phenotype in the AR7 mutant of *P. patens*. Restoration of ABA sensitivity in AR7 by the cDNA of MpARK indicated the presence of positive ABA regulator in liverwort. Overexpression of MpARK-GFP in *M. polymorpha* resulted in the enhancement of ABA-induced growth inhibition as well as accumulation of LEA-like transcripts in transgenic line indicates the presence of conserved positive ABA regulation process in liverworts. Moreover, as compared with WT, higher expression of LEA transcripts by osmotic treatments and enhanced accumulation of soluble sugars by both ABA and osmotic treatments in transgenic line, suggesting the diverse role of MpARK in stress signaling of liverwort *M. polymorpha*. Later on, we demonstrated ABA-induced LEA gene expression including endogenous dehydrins of liverwort *M. polymorpha* and analyzed promoter elements responsible for ABA response. ABA-induced gene expression is generally mediated by ACGT-core sequences recognized by bZIP transcription factors. But functional activation of these promoter elements are still unknown in liverworts. The results of this effort indicated that ACGT-core motifs proximal to the transcription initiation site contribute to ABA-mediated gene expression suggesting the presence of common cis-acting ABA responsive elements in liverworts. Finally, the findings of present investigations claim that the signaling molecules essential for regulating ABA responses are conserved in embryophytes and the mechanisms were developed during the early stages of land plant evolution and adaptation.

## 論文の審査結果の要旨

本論文は、申請者が、コケ植物における植物ホルモンアブシジン酸 (ABA) の役割について行った研究成果をまとめたものである。ABA は陸上植物のみならず藻類や一部の菌類にも存在するセスキテルペン化合物である。種子植物において ABA は、主に種子登熟や水ストレス適応に関連するホルモンとして知られている。ABA の生合成および情報伝達過程については、シロイヌナズナを用いた研究からその全貌が明らかになりつつある。一方、非維管束植物であるコケ植物に関しては、ABA の役割についての情報は非常に少ない。近年、蘚類ヒメツリガネゴケを用いた研究が行われ、その原糸体細胞では、ABA が凍結や乾燥ストレス耐性の獲得に関与することが示唆されている。しかし、コケの ABA の生合成経路や情報伝達過程については報告が少なく、その詳細は明らかではない。申請者は、ヒメツリガネゴケや、近年モデル植物として確立されつつある苔類ゼニゴケを用い、ABA 合成や応答に欠損を持つ形質転換株の解析を通して ABA の生理学的役割の解明に取り組んだ。

本論文の最初の章では、General Introduction として、種子植物やコケ植物における ABA の役割、生合成、受容体および情報伝達過程に関する過去の研究がまとめられている。続く章では、ヒメツリガネゴケの ABA 欠損株の解析結果について示されている。これまでコケ植物において、外から与えた ABA の影響については、乾燥耐性や凍結耐性を増大するなどの効果があることは知られていたが、内生 ABA の役割については明らかではなかった。申請者は、ABA 合成の初期反応酵素として知られるゼアキサンチンエポキシダーゼをコードするヒメツリガネゴケ *PpABAI* 遺伝子の破壊株 (*ppabal*) を用い、低温、乾燥および浸透圧応答について解析を行った。*ppabal* 株では野生株と比べ、通常の成長に大きな差は見られなかったものの、高浸透圧応答および低温応答的な遺伝子発現レベルが低下していることが明らかとなった。野生株では高張の 0.5 M マンニトールで原糸体細胞を処理すると塩耐性や凍結耐性が獲得されるが、*ppabal* 株では耐性が獲得されなかった。一方、コケの低温馴化に重要な役割を果たすと言われる可溶性糖の蓄積レベルについては、野生株と *ppabal* 株で大きな違いは見られなかった。これらの結果から、申請者はコケの内生 ABA が原糸体細胞の高浸透圧応答に寄与していると結論付けた。

また、別の章では、ゼニゴケを用いた苔類 ABA 応答性プロモーターの解析結果について述べられている。これまで、苔類の ABA 応答的遺伝子発現に関わるプロモーター因子の解析は全く行われていなかった。申請者は、GUS レポーター遺伝子をゼニゴケ培養細胞にパーティクルガンを用いて導入し ABA 応答的遺伝子発現を解析するアッセイ系を用い、ゼニゴケプロモーターに保存されるシス因子を解析した。ゼニゴケからデハイドリン遺伝子 *MpDHNI* を単離し、そのプロモーター領域に含まれる ACGT をコアとするシス配列を同定した。これらシス配列に変異を加え、レポーターアッセイを行うことで、転写開始点に最も近い ACGT コア配列が ABA 応答的遺伝子発現に大きく寄与していることを明らかにした。

また、申請者は、培養細胞ではなく、ゼニゴケの無性芽を用いて同様のアッセイを行う実験系を確立し、培養 3 日目の無性芽に対し遺伝子導入を行うことで、ABA 応答を解析できることを明らかにした。培養細胞ではルシフェラーゼ (LUC) 遺伝子の発現が小さく、導入効率を補正するコントロールとして用いることができなかったが、培養無性芽では十分な LUC 活性が得られ GUS/LUC 比により遺伝子発現レベルを評価することができた。このことにより、ゼニゴケでは野生株だけでなく、野生株と変異株や形質転換体間における ABA 応答の違いを定量的に解析することが可能になった。

さらに、申請者は、コケ植物の ABA 応答に関わると考えられるゼニゴケ遺伝子 *MpARK* についての解析を行った。*MpARK* はプロテインキナーゼをコードしており、その一過的発現はヒメツリガネゴケの ABA

非感受性 AR7 株の ABA 応答を回復する。AR7 株は ABA 応答だけでなく、高浸透圧や低温応答が低下していることから、申請者は、*MpARK* 遺伝子を安定に発現する形質転換 AR7 株を樹立し、ABA、高浸透圧、低温応答の変化を調べた。その結果、形質転換株では ABA および高浸透圧に対する応答性が部分的に回復していた。しかし、低温応答については回復が見られず、別の因子を介した情報伝達過程の存在が示唆された。申請者は *MpARK* を過剰発現するゼニゴケ形質転換体についても解析を行った。結果、形質転換体は野生株と比べ ABA 応答が過剰となり、野生株が成長阻害をほとんど受けない 0.5  $\mu$ MABA 存在下でも成長が阻害された。また、形質転換体の無性芽は野生株と比べ、乾燥に対してより高い耐性を獲得することが明らかとなった。

以上の研究は、コケ植物における ABA の役割についての明確な証拠を示すとともに、有胚植物に保存される ABA 応答に関わる基本メカニズムの存在を明らかにした点において新規性が高く、植物の環境応答研究に新たな知見を加える内容であると考えられる。本学位論文の内容を 4 人の審査委員会で詳しく審査した結果、背景、実験方法、結果、考察について適切に記述されており、実験結果についても信頼できる手法に基づいて行われていると判断された。

研究内容の一部については、申請者を筆頭著者とした論文が *Physiologia Plantarum* 誌に受理されている (2015 年 7 月 17 日)。加えて、共著論文が *New Phytologist* 誌に発表されているほか、申請者は主発表者として国際学会で 2 回、国内学会で 2 回の研究発表を行っている。

以上のことから、審査委員会は本論文が博士 (学術) の学位授与位に十分な内容を含んでいると判断し、合格と判定した。