

氏 名	Khaleda Akter
博士の専攻分野の名称	博士（学術）
学 位 記 号 番 号	博理工乙第 227 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	Roles of sugar and ABA on stress tolerance in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i> (苔類ゼニゴケのストレス耐性における糖とアブシジン酸の役割)
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

The plant growth regulator abscisic acid (ABA) is involved in triggering responses to various environmental stresses such as freezing and desiccation in angiosperms, but little is known about its role in lower plants, especially in liverworts, representing one of the earliest land plant lineages. ABA-insensitive mutants and the transgenic have been isolated to compare their stress tolerance with that of wild type. For isolation of ABA-insensitive mutants, screening was carried out on gamma-radiated sporangium of *Marchantia*. Transgenic liverwort lines were developed by introducing MpABI1A encoding the group A protein phosphatase 2C, known as a negative regulator of ABA signaling. For analysis of ABA responses, I focused on gemmae, the asexual reproductive form of liverworts which have higher degree of stress tolerance under natural condition but the underlying mechanisms are not understood. I found that sucrose that is accumulated in response to ABA plays a crucial role in stress tolerance in the liverwort gemmae. In a freezing test, Survival rate after freezing of ABA-treated gemmae increased as the sucrose concentration in medium increased. In a desiccation test, the highest survival was observed in 0.3 M sucrose treated sample with ABA. It was thought that sucrose functions as a protectant during freezing and drying but accumulation of sucrose might vary in the presence or absence of ABA. Determination of sugar levels during culture with or without ABA revealed that the gemmalings accumulated more sugars in response to ABA. In contrast, it was found that mature thalli, which are sensitive to both freezing and desiccation, did not accumulate sugars in response to the ABA treatment. Results of TLC analysis indicated that the gemmalings accumulate sucrose by ABA treatment. Observation by a dissection microscope and area measurement indicated that growth of gemmalings was inhibited by 0.1 M and greater concentrations of sucrose. Significant growth inhibition was found when ABA was present in the medium. By northern blot analysis, I examined the expression of ABA-responsive genes isolated from ABA-treated gemmae and thalli. ABA treatment of gemmalings induced accumulation of transcripts for proteins with similarity to late embryogenesis abundant (LEA) proteins, which is accumulated in association with acquisition of desiccation tolerance in maturing seeds of angiosperms. It was found that expression of these transcripts was also induced by 0.1 M sucrose.

These results indicate that ABA plays a role in accumulation of sucrose and LEA-like proteins in gemmalings and enhances stress tolerance in liverworts. Results of my research suggest that gemmalings of *M. polymorpha* are useful for studying cellular or ABA signaling mechanisms for the development of stress tolerance.

論文の審査結果の要旨

本論文は、Khaleda Akter 氏が、苔植物の乾燥および凍結耐性と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の成果をまとめたものである。ABA は植物の種子において登熟促進や乾燥耐性を制御するホルモンとして知られているが、シダやコケ植物、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。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概要が明らかになりつつあるが、植物進化の基部に位置する苔植物における ABA の役割についての知見は限られている。Akter 氏は、近年モデル苔植物として確立されつつあるゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) を用い、ABA の生理学的役割の解明に取り組んだ。

Akter 氏は培養したゼニゴケの無性芽を用い、ABA が凍結および乾燥耐性に与える影響を調べた。無性芽はゼニゴケ葉状体上の杯状体内に形成される板状の栄養生殖形態である。無性芽は杯状体内では休眠状態にあるが単独で培地に植えると 2 つのメリステムが成長を開始する。これまで、ABA が無性芽の成長を阻害することは報告されているが、凍結や乾燥耐性に及ぼす影響は不明であった。実験の結果、培養無性芽にはほとんど凍結・乾燥耐性がなく、ABA 処理でも耐性は獲得されなかった。そこで、植物のストレス耐性に対して保護効果の高いことで知られるショ糖存在下で ABA の効果を調べたところ、0.1 M ショ糖存在下で ABA が凍結耐性と乾燥耐性を飛躍的に増大させることが明らかとなった。そこで、無性芽において ABA が組織の糖蓄積や遺伝子発現に与える影響を調べたところ、ショ糖存在下では無性芽組織に ABA 依存的な可溶性糖の蓄積が見られた。培地のショ糖濃度依存的に組織の糖が蓄積したことから、ABA により培地中のショ糖の取り込みが促進されていることが示唆された。遺伝子発現解析では、ABA は糖合成や代謝に関わる遺伝子の発現には大きな影響を与えなかった。一方、ABA 誘導性遺伝子である *Late Embryogenesis Abundant (LEA)* 様遺伝子の発現が、培地中のショ糖で誘導されることが明らかとなった。このことから糖が ABA シグナルに影響を与え、凍結や乾燥耐性に必要な遺伝子の活性化に関与している可能性が示された。Akter 氏はさらに、ゼニゴケ無性芽の細胞内で起こる変化についても観察し、ABA による組織の成長阻害に伴い、オルガネラ、特に葉緑体の構造と配向が大きく変化することを見出した。このような形態変化は、ABA と 0.1 M ショ糖の共存下でより顕著に観察され、ゼニゴケ無性芽の凍結・乾燥耐性との関連が示唆された。

また、ゼニゴケ ABA 応答の仕組みを解明するため、Akter 氏はガンマ線処理したゼニゴケ胞子から ABA 非感受性株をスクリーニングする試みや、ABA 応答の情報伝達に関わることで知られる遺伝子を改変した形質転換体の作出を行った。ガンマ線を使った実験では、複数の ABA 非感受性株が単離できたが、ABA 非存在下での形態異常が見られたため、さらなる解析には用いることができなかった。一方、形質転換体の解析では、ABA の負の制御因子であるグループ A-PP2C をコードする *MpABI1A* 遺伝子を過剰発現する形質転換体 MT-2 株を得ることができた。この株は、ABA 非感受性の成長を示すことが明らかとなった。MT-2 株は、今後、野生株との比較オミクス解析により、ゼニゴケの ABA 特異的な生理学的応答を解析するのに有用であると考えられた。

以上の研究は、苔植物のストレス耐性における ABA の役割についての明確な証拠を示すとともに、糖シグナルと ABA シグナルのクロストークが陸上植物の起源に近い植物にも保存されていることを示した。本学位論文の内容を 4 人の審査委員会で審査した結果、背景、実験方法、結果、考察のそれぞれについて適切に記述さ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 *Journal of Plant Physiology* 誌に掲載されてい

る（2014 年）。また、共著論文が *Physiologia Plantarum* 誌に発表（2015 年）されている。

以上のことから、審査委員会は本論文が博士（学術）の学位授与に値する内容を含んでいると判断し、合格と判定した。