

## 論 文 概 評

氏 名	NOBIZA KHATUN		
学位の種類	博士 (学術)		
学位記番号	博理工乙第 277 号		
学位授与年月日	令和 5 年 9 月 22 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
学位論文題目	Abscisic acid-mediated sugar responses necessary for desiccation tolerance in bryophytes		
論文審査委員	委員長	教授	竹澤 大輔
	委員	教授	小竹 敬久
	委員	教授	田中 秀逸
	委員	准教授	川村 哲規
	委員	東京農業大学 教授	坂田 洋一

### 論文の内容の要旨

The plant stress hormone 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 non-vascular bryophytes, such as mosses and liverworts, representing the earliest land plant lineages. Hence, I made my efforts to reveal the ABA-regulated processes using ABA-deficient lines of two widely used model bryophytes, the moss *Physcomitrium patens* and the liverwort *Marchantia polymorpha*.

It has been shown that in some plants that ABA is involved in cold acclimation process by which tissues acquire freezing tolerance. *P. patens* undergoes cold acclimation with enhanced expression of *Late embryogenesis abundant (LEA)* transcripts and soluble sugars that mitigate freeze-induced cellular damage. However, the role of endogenous ABA in cold acclimation was not clear in *P. patens*. Using an antibody against one of cold-induced LEA-like protein 17B9, I showed that disruptant of *PpABAI* of *P. patens* encoding zeaxanthin epoxidase crucial for carotenoid-mediated ABA biosynthesis, which accumulated only a trace amount of endogenous ABA, showed cold acclimation capacity similar to that of the wild-type line. My analysis also indicated that the ABA-insensitive *AR7* line lacking the gene for group B3 Raf-like MAP kinase kinase kinase, which lacks capacity for both cold acclimation and ABA response to develop freezing tolerance, did not accumulate the LEA-like 17B9 proteins in response to cold. These results indicated that although the signaling process for ABA is critical for freezing tolerance, endogenous ABA is not necessary for cold signaling in *P. patens*.

In the case of the liverwort *M. polymorpha* on the other hand, its gemmae, dormant propagules, did not undergo cold acclimation to develop freezing tolerance and did not accumulate the *LEA*-like transcripts in response to cold as well, while the gemmae are highly responsive to exogenous ABA. The gemmae accumulate low molecular weight soluble sugars in response to exogenous ABA for the development of desiccation tolerance. These sugars serve as compatible solutes in response to changes in environmental conditions such as freezing and desiccation. Soluble sugars not only serve as protectants of cells but also function as signaling molecules to control the expression of genes involved in plant growth and stress tolerance. It has previously been shown that sucrose treatment of the gemmae of *M. polymorpha* enhance desiccation tolerance with accumulation of both *LEA*-like proteins and soluble sugars similar to ABA treatment. To determine the role of endogenous ABA in sugar and stress responses in bryophytes, ABA-deficient lines of *M. polymorpha* by disrupting *MpABAI* encoding zeaxanthin epoxidase were generated.

Analysis of osmotic response to sugars, desiccation tolerance, dormancy, and sugar-induced gene expression in the generated ABA-deficient lines revealed that endogenous ABA plays a crucial role in sugar-induced cellular responses in the liverwort. RNA-seq analysis of sucrose-treated gemmalings of *M. polymorpha* revealed that expression of a large part of sucrose-induced genes was reduced in *Mpabal* in comparison with that in the wild type. Furthermore, *Mpabal* accumulated smaller amounts of soluble sugars in tissues upon sucrose treatment than did the wild type, with reduced expression of genes for sucrose synthesis, sugar transporters and starch-catabolizing enzymes. These results indicate that endogenous ABA plays a role in regulation of sugar-induced sugar accumulation in liverworts, enabling the tissue to have desiccation tolerance.

## 論文審査の結果の要旨

2023年8月21日に Nobiza Khatun 氏の博士論文発表会を開催し、論文内容の審査を行った。以下に審査結果の要約を記す。

本論文は、蘚苔類における低温や乾燥などの環境ストレスへの応答と植物ホルモンアブシジン酸 (ABA) の役割について Khatun 氏が行った研究の成果をまとめたものである。ABA は種子植物において種子の休眠や気孔の閉鎖を制御する「ストレスホルモン」として知られている。近年、種子を作らない蘚苔類において ABA が環境ストレス耐性の制御に関わっていることが明らかとなってきた。ABA の生合成および情報伝達過程については、主に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。しかし、低温応答における ABA の役割や、糖シグナルなど、他の情報伝達経路との関わりは明らかではない。本論文において Khatun 氏は、モデルコケ植物であるヒメツリガネゴケ (*Physcomitrium patens*) やゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) の ABA 欠損株を用い、低温や糖応答、及び乾燥耐性との関わりについての研究に取り組んだ。ABA は、カロテノイドであるゼアキササンチンに由来する。ゼアキササンチンエポキシダーゼは、これをコードする *ABAI* 遺伝子変異株の解析から、ABA 合成に必須な酵素であることが明らかにされている。Khatun 氏は、ヒメツリガネゴケ及びゼニゴケの *ABAI* 様遺伝子の破壊株 (*ppabal* 株及び *Mpabal* 株) を用いて、低温応答や糖応答と内生 ABA との関わりについて解析を行った。

まず、論文の第1章では、General Introduction として、ABA の環境ストレス応答における役割や、陸上植物の進化との関わりについて概説した。続く第2章では、コケ ABA 欠損株の低温応答についての解析結果を述べた。過去の研究から、ヒメツリガネゴケは 10°C 以下の低温に反応して凍結耐性を向上させることが知られている。Khatun 氏の結果では、ヒメツリガネゴケ *ppabal* 株の凍結耐性の程度は野生株と同様であり、低温により蓄積する Late embryogenesis abundant (LEA) 様タンパク質 17B9 の蓄積も、野生株と比べ顕著な減少は見られなかった。また、低温応答の情報伝達因子 ARK の活性化についても野生株と *ppabal* 株で差は見られなかった。ゼニゴケにおいては、高い ABA 応答性を示す無性芽における低温応答を調べた結果、ヒメツリガネゴケと異なり、低温処理による凍結耐性の向上はみられず、ABA 欠損株 *Mpabal* においても同様であった。また、遺伝子発現解析では、LEA 様タンパク質遺伝子の中に低温により発現が増大するものが見い出されたものの、その発現量については野生株と *Mpabal* 株で顕著な違いは見られなかった。これらの結果から、コケ植物の低温応答において内生の ABA は必須ではないことが明らかとなった。

第3章では、2章で作成した *Mpabal* 株を用いて、コケ植物の糖シグナルについての解析を行った。過去に、シロイヌナズナの発芽種子を用いた実験から、ABA と糖シグナルとの関連が示されている。例えば、種子の発芽と成長は、培地に数%の糖が含まれると著しく阻害を受けるが、ABA 欠損株や ABA 非感受性株では阻害を受けにくいことが明らかにされている。一方、ゼニゴケの無性芽は、ABA やスクロース処理によりシリカゲルによる乾燥にも耐える高い乾燥耐性を獲得する。Khatun 氏はゼニゴケ無性芽における糖蓄積と乾燥耐性を野生株と *Mpabal* 株で比較し、野生株ではスクロース処理により組織内に蓄積する糖が *Mpabal* 株では減少しており、また、スクロース処理により獲得される乾燥耐性能が著しく低下していることを明らかに

した。野生株と *Mpabal* 株を用いた RNA-seq 解析では、スクロースで誘導される多くの遺伝子の発現が、*Mpabal* 株で減少していた。これら遺伝子には、ABA の合成に関わる 9-cis-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼや ABA トランスポーター、ABA 誘導性遺伝子の発現に関わる転写因子 ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3)や ABI5 の遺伝子が含まれており、定量的 RT-PCR の結果からもそのことが証明された。

また、ABA 誘導性の LEA 様タンパク質の遺伝子 36 個すべてについて、これらの発現がスクロース処理で増大し、*Mpabal* 株で減少していることが示された。さらに、スクロース合成や輸送、デンプンの分解に関わる遺伝子についても解析を行い、 $\alpha$ -アミラーゼ及び  $\beta$ -アミラーゼ、スクロースリン酸シンターゼ、およびスクロース輸送体を含むいくつかの糖輸送体の遺伝子がスクロース処理で発現が増大し、*Mpabal* 株で減少していた。これらの事実は、スクロースにより誘導される LEA 様タンパク質の蓄積だけでなく、細胞内可溶性糖の蓄積についても、内生 A を介して遺伝子発現レベルで制御され、乾燥耐性に寄与していることを示している。また、ABA を介した糖応答の仕組みが種子植物だけでなくコケ植物にも保存されている可能性を示した。

Khatun 氏の以上の研究は、植物の低温や乾燥ストレスへの応答の仕組みについての知見だけでなく、植物における陸上適応の進化的側面についても多くの考察を与える。今後、氏の研究を発展させることにより、陸上植物に普遍的な低温応答や乾燥応答、糖シグナル伝達の基本メカニズムの解明が進むことが期待される。

本学位論文では、上記の研究内容について、背景、実験方法、結果（図表を含む）、考察のそれぞれが適切に記述されていた。よって、本学位論文審査委員会は、Khatun 氏の論文が博士（学術）の学位授与に値するものであると考え、合格と判定した。