

氏名	SALMA BEGUM BHYAN
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 844 号
学位授与年月日	平成 23 年 9 月 16 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	Studies of Abiotic Stress Responses in Bryophytes using Abscisic Acid-insensitive Lines of <i>Physcomitrella patens</i> (ヒメツリガネゴケアブシジン酸非感受性変異株を用いた、蘚類における非生物ストレス応答の解析)
論文審査委員	委員長 准教授 竹澤 大輔 委員 教授 金子 康子 委員 准教授 仲本 準 委員 准教授 森安 裕二

## 論文の内容の要旨

Plants have ubiquitous response to abiotic stresses causing severe damage to structural organization and physiological mechanism of plant cell. The capacity of surviving under those adverse condition makes the plant *Physcomitrella patens* as a model for functional genomics of adaptive environments. In higher plants, exogenous ABA application and artificial cold acclimation were found to be the tools of enhancing stress. But the mechanism is still unclear in lower plants like *P. patens*. Analysis of ABA-insensitive lines would be important for identification of gene expression pathway involved in ABA perception and signal transduction. Present study was undertaken to clarify the mechanism underlying physiological processes leading to the development of freezing, desiccation, salt and osmotic stress tolerance in ABA insensitive lines of *P. patens*. In this study we used the transgenic D2-1 line expressing the catalytic domain of protein phosphatase 2C negatively regulating ABA signaling, and the ABA-insensitive AR7 mutant isolated by ultraviolet mutagenesis and wild type of *P. patens*. Both mutant and transgenic lines of *P. patens* were sensitive to freezing, desiccation and osmotic stresses. In wild type, ABA enhanced tolerance to all type of abiotic stresses. Accumulated sugar and proteins in mutant, transgenic and wild type lines explained their role in stress tolerance under ABA treatment. Changes in cold-acclimated protonema cells explained the influence of freezing stresses in *P. patens*. Protonema cells of the wild-type *P. patens* acquired freezing tolerance in response to cold and abscisic acid treatment. Effects of low temperature treatment on freezing tolerance indicated that the low temperature treatment for seven days of wild type plants increased the freezing tolerance significantly but the treatment had little effect on that of ABA-insensitive lines. In contrast, non-acclimated protonemata from both wild type and ABA-insensitive plants were of less survival rate. Protein and sugar analyses indicated that cold treatment induces accumulation of specific LEA-like proteins and soluble sugars in wild type, whereas the treatment increased only soluble sugars but not LEA-like proteins in the ABA-insensitive lines. As the cold acclimation could not increase freezing tolerance in ABA insensitive lines, it can be concluded that *P. patens* had an ABA dependent pathway of cold induced gene expression.

## 論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、Salma Begum Bhyan 氏の論文発表会を平成 23 年 8 月 2 日に公開で開催し、論文内容の発表と質疑応答の後、審査委員による意見交換と論文内容の審査を行なった。以下に Bhyan 氏の研究概要と論文の審査結果を要約する。

本研究は、蘚類ヒメツリガネゴケの変異株および形質転換体を用い、コケ植物における非生物ストレス応答における植物ホルモンアブシジン酸の役割の解明を目指したものである。アブシジン酸は生物界に広く存在する生理活性を持つセスキテルペンであり、種子植物では種子の休眠や乾燥耐性を誘導したり、葉の表皮にある気孔の開閉を調節するなど、植物のストレス耐性に関わるホルモンとして知られている。アブシジン酸の機能については、これまで非常に多くの研究が行われているが、そのほとんどが顕花植物 (Magnoliophyta) における研究であり、その他の植物、特に種子を持たないコケ植物における機能についての研究は非常に少ない。Bhyan 氏は、コケ植物の中で蘚類 (Bryophyta) に属するヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を用い、植物のストレス応答におけるアブシジン酸の役割について生理学的に解析した。解析においては、アブシジン酸非感受性株として、紫外線照射により単離された変異株 AR-7 と、アブシジン酸応答の負の制御因子であるプロテインホスファターゼ 2C を過剰に発現する形質転換体 D2-1 を用い、野生株とのストレス応答、特に乾燥や低温、浸透圧ショックなどの非生物ストレスに対する耐性の違いに着目して実験を行なった。

前半の章では、植物におけるアブシジン酸の役割について概説するとともにアブシジン酸非感受性株の乾燥、凍結および浸透圧ストレス耐性について生理学的に解析した。コケ植物のストレス処理の方法や、耐性の評価法についての研究例は少なく、これまで信頼できる耐性評価系は確立していない。Bhyan 氏は異なるストレスそれぞれの処理条件を決定した上で、電解質漏出測定、色素による染色、細胞観察、および再成長実験など異なる評価方法を検討した。その結果、いずれのストレスについてもアブシジン酸非感受性変異株は野生株と比べて耐性が極端に低下していた。これらの結果は、アブシジン酸応答がコケ植物のストレス耐性において重要な役割を果たしていることを示唆する。氏はさらに、ストレス下で細胞を保護する機能を持つ可溶性糖 (スクロース、テアンデロース) や Late Embryogenesis Abundant (LEA) タンパク質の蓄積について解析した。その結果、野生株においてアブシジン酸処理時にこれら保護物質が多量に蓄積するのに対し、アブシジン酸非感受性株では蓄積の増加がほとんど見られないことが明らかとなった。コムギ由来のアブシジン酸誘導性プロモーターを用いた実験により、野生株に見られるアブシジン酸応答的な遺伝子発現が、非感受性株で抑制されていることが明らかとなり、種子植物同様のアブシジン酸応答と遺伝子発現過程を経て保護物質が蓄積することでストレス耐性が獲得されていることが示唆された。

後半の章では、非生物ストレス応答のうち、特に低温ストレスに焦点を当て、コケ植物におけるいわゆる低温馴化のしくみについてより詳しい解析を行なっている。低温馴化過程において植物は 0℃ 以上の低温に一定期間さらされることにより、凍結に対する耐性を獲得する。シロイヌナズナの変異株を用いた実験から、種子植物の低温馴化は主にアブシジン酸を介さない細胞応答機構を介して凍結耐性が獲得されることが示唆されている。Bhyan 氏はヒメツリガネゴケのアブシジン酸非感受性株の低温馴化能を野生株のそれと比較することで、コケ植物の低温馴化におけるアブシジン酸の役割について明らかにすることを試みた。その結果、野生株と異なり、非感受性株は低温馴化処理による凍結耐性の増加がほとんど見られないことが明らかとなった。可溶性糖と LEA タンパク質の解析を解析したところ、低温馴化処理によって可溶性糖はある程度蓄積するものの、LEA タンパク質の蓄積はほとんど見られなかった。遺伝子発現解析の結果では、LEA タンパク質遺伝子だけでなく他の低温誘導性遺伝子についてもアブシジン酸非感受性株で低温応答的発現が見

られなかった。これらの結果により、コケ植物にはアブシジン酸応答過程に大きく依存した未知の低温応答機構が存在することが明らかとなった。

以上のように、本研究は、これまで研究例のなかったコケ植物におけるアブシジン酸非感受性株の解析を通して、植物の非生物ストレス応答に関する多くの新しい知見を提示した。とくに、アブシジン酸を介したストレス応答が陸上植物共通の保存された分子機構として存在することを明確に示すとともに、低温馴化応答においては、より進化した顕花植物とは大きく異なるアブシジン酸依存的な機構が作用している可能性を示した。本論文に記された研究成果の一部については、Bhyan 氏を筆頭著者とした論文 1 編と共著者とした論文 1 編（いずれも国際誌）、および 1 編の査読付きプロシーディングスにまとめられている。従って当審査委員会は、本論文が博士（学術）の学位にふさわしいものと判断し、論文審査結果を合格と認めた。