

申請者氏名 笠島 一郎

本論文はモデル植物であるシロイヌナズナにおける栄養欠乏への応答や耐性について研究したものである。序章に引き続く6章より成る。

序章では以下の点を中心に植物の栄養研究の現状を述べている。植物の生育や繁殖に必要な必須元素が17個知られている(Cakmak and Römheld 1997)。これらのうち、窒素、リン酸、カリウムは三大栄養素と呼ばれ、広く農耕地に散布され農業生産の向上に寄与している。この三つ以外の微量元素についても、土壌で欠乏し農業上の問題を引き起こす例が世界中で知られている。このような栄養欠乏に対する応答や耐性に関する遺伝的な機構を明らかにするために、研究者はこれまで様々な手法を用いてきた。機能喪失変異株をスクリーニングするという手法は、カリウムのチャネルを制御するLKS1の同定等、いくつかの成功例が報告されている(Xu et al. 2006)。これ以外にも、毒性アナログ物質に耐性の変異株の解析や栄養欠乏による発現誘導、その他の手法により、多くの栄養欠乏耐性に関わる遺伝子が同定されている。

第一章ではBIG遺伝子はシロイヌナズナの硫黄欠乏応答性遺伝子の制御に関わっていることを示している。asr1は大鎌直子博士により単離された硫黄欠乏応答変異株の一つである。この変異株では、硫黄欠乏応答性遺伝子の発現が強まっている。共同で行ったマッピングにより、この変異株ではBIG遺伝子にナンセンス変異が挿入されていることが分かった。また、他のbig変異株でも硫黄欠乏応答が誘導されていた。big変異株ではオーキシン輸送が阻害されていることから、オーキシンやオーキシン輸送阻害剤を植物に添加してみると、これらの処理により硫黄欠乏応答が誘導された。ただ一方で、この誘導パターンはbig変異株のそれとは異なっており、BIG遺伝子はオーキシンを介さずに硫黄欠乏応答に影響していると考えられた。

第二章ではPCRのためのシロイヌナズナからの迅速DNA抽出法の開発について述べている。シロイヌナズナからのDNA抽出は従来、煮沸、エタノール沈殿、減圧下での乾燥といったいくつかのステップを必要としていた。そこで私は迅速な手法を試み、PCRに適したDNAをワンステップで抽出する方法を開発した。具体的には、既知の方法に基づき幾つかの簡便法を試みた。その中で、ある抽出バッファー(Edwards et al. 1991)を希釈した溶液を用いることによりワンステップでDNAを抽出することに成功した。このDNA溶液を用いることにより、シロイヌナズナのアクセッション間の多型を判別したりT-DNAの有無(井出曜子さんのデータ)を確認することができた。ここで開発したようなワンステップ法を用いることにより、シロイヌナズナからのDNA抽出を行う際の手間、時間、コストを削減することができる。

第三章ではホウ素過剰により発現が誘導される新たなシロイヌナズナ遺伝子の同定について報告している。シロイヌナズナでホウ素欠乏により発現が誘導される遺伝子として、ホウ素チャネルであるNIP5;1が知られていた(Takano et

al. 2006)。ホウ素欠乏やホウ素過剰により発現が誘導される新たな遺伝子を同定するため、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、ホウ素欠乏特異的に強く発現誘導を受ける遺伝子としては *NIP5;1* だけが検出された。一方、ホウ素過剰により発現が誘導される遺伝子が、初めて同定された。

第四章ではシロイヌナズナの根の先端周辺でのホウ素欠乏による遺伝子発現調節と *WRKY6* の関与について述べている。第三章で同定された、ホウ素欠乏や過剰により発現誘導を受ける遺伝子のいくつかについて、その機能を調べるために T-DNA 挿入変異株を入手した。このうち、*WRKY6* という転写因子に T-DNA 挿入を持つ *wrky6-3* 変異株の生育がホウ素欠乏条件下で野生型株と異なっていた。違いが見られないこともあるものの、差が顕著な場合にはホウ素欠乏条件下で栽培した変異株の根は野生型株の3分の2程度にまで短かった。また、*WRKY6* 遺伝子のプロモーター活性はホウ素欠乏により根の先端付近で誘導され、マイクロアレイを行うと *wrky6-3* 変異株でホウ素欠乏による誘導が抑制される遺伝子が見られた。

第五章では栄養欠乏条件下でのシロイヌナズナ機能獲得変異株のスクリーニングを行っている。栄養欠乏条件下で機能喪失変異株をスクリーニングするというアプローチは遺伝学として一般的な手法であるが、成功例は限られている。また、機能喪失で表現型を示す遺伝子は必ずしも機能獲得で表現型を示すものではない。そこで、機能獲得変異株を栄養欠乏条件下でスクリーニングすることにより栄養欠乏耐性を植物に与える遺伝子を効率よく直接的に同定できるのではないかと考え、スクリーニングを行った。約45万個体を栄養欠乏条件等でスクリーニングしたが、残念ながら明らかに欠乏耐性である変異株は得られなかった。一方で、サイズが通常条件下で栽培した際にも大きい変異株が得られたことを述べている。

第六章では自己四倍体シロイヌナズナにおける根の構造のホウ素欠乏条件下での異なる制御について述べている。第五章ではホウ素欠乏条件下で根が長い3つのアクチベーションタグラインも単離されていたが。このうち A152B と名付けたラインは形態的に四倍体に似ていた。cell ploidy を測定すると、確かにこのラインは四倍体だった。A152B はホウ素欠乏条件下でのみ二倍体よりも明らかに根が長い。ストックセンターから入手した他の四倍体も同様の生育を示したことから、これが自己四倍体の一般的な表現型であることが分かった。新鮮重の比率は通常条件とホウ素欠乏条件下で変わらないことから、このフェノタイプはホウ素欠乏に対する耐性というよりは、ホウ素欠乏に対する応答が異なっていると言える。四倍体で環境ストレス応答が変化しているということはこれまで知られておらず、四倍体の新たなタイプの性質が本研究により明らかとなった。

以上、本論文は、シロイヌナズナの栄養欠乏や過剰に対する応答に関して新たな現象をいくつか明らかにしたものであり、植物栄養の分野において極めて高い貢献をしている。

よって、審査委員一同は、本論文を博士論文として高く価値あるものと認めた。