

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 菅野 里美

本研究は、植物栄養元素のうちリン酸に注目し、放射性同位体を利用した非破壊で経時的なリン酸の観察ができる新たな解析ツールを開発する一方、ミヤコグサリン酸トランスポータを単離し、その機能解析へ新規ツールの応用を試みた。

ラジオアイソトープイメージングシステムの開発と改良

GFP を用いて遺伝子を可視化するように植物体内のイオンや化合物の放射性トレーサを非破壊解析することができれば、植物の物質輸送や無機元素の応答機構を調べるための有効なツールになると考えた。そこで、放射線（ベータ線）のシンチレーション反応による微弱光を高感度に検出する原理を基に、非破壊で植物体内のトレーサを検出するシステムを組み立てた。標準線源や植物サンプルのイメージ検出のための条件検討を行ったところ、通常用いられているイメージングプレート(IP)より感度が 10 倍以上高く、同程度の分解能を示すことが判った。このことは、1 フレームの画像取得が短時間で行えるため、連続的な画像取得が可能であることを意味する。微弱光を検出する原理であることから、開発当時は暗条件下での計測しかできなかったが、植物生理を解析するためには明条件下で撮影する必要があった。そこで、植物体地上部に LED 光を照射し、かつ植物体から放出される放射線を暗条件下でシンチレーションを起こさせ検出するよう装置の改良を行い、明条件下でのイメージング撮影を可能にした。さらに、根と地上部を同時に撮影し植物個体全体の³²P-リン酸の動態を解析できるように装置の改良と工夫を重ねた結果、植物体内の³²P-リン酸動態をリアルタイムでイメージング解析できる環境を整えることができた。

ミヤコグサリン酸トランスポータ遺伝子の単離

このリン酸輸送体タンパク質（以下リン酸トランスポータ）は、植物のリン酸輸送を制御する重要な因子であり、³²P 蓄積の異なる組織でトランスポータの特異的な働きが予想された。そこで、イメージング解析を進めていたミヤコグサのリン酸トランスポータの単離および発現解析を行った。ミヤコグサの Pht1 ファミリー属するリン酸トランスポータ遺伝子は 3 つ報告されていたが、他のファミリー遺伝子が存在する可能性が高いことから、データベースを利用し新たに 3 つの遺伝子（LjPT4、LjPT6、LjPT7）を単離した。これらの遺伝子がどの組織のリン酸吸収や移行の制御に関わっているのか調べるため、水耕栽培 2 週目の幼植物と 6 週目の花と子実から RNA を抽出し、リアルタイム PCR および *in situ* ハイブリダイゼーションにより遺伝子発現解析を行った。LjPT1 は花や子実、LjPT2 と LjPT3、LjPT7 は根、茎、葉、花、子実、LjPT6 は開花前の花、LjPT3 と LjPT4 は菌根菌感染根で発現していた。リン酸欠乏時、LjPT1 は、花や子実に加え、通常は発現が少ない根（根端および維管束細胞周辺）、茎、葉でも発現が増加し、LjPT2 と LjPT3 では根、葉、茎での発現が 4~8 倍に増加していた。特に LjPT2 は根の皮層細胞および維管束周辺細胞で発現していた。また、LjPT7 は茎での発現が 2 倍に増加していた。一方、花やさやでの各遺伝子の発現量は、

リン酸欠乏により大きな変動を示さなかった。以上をまとめると、LjPT1、LjPT2、LjPT3、LjPT7はリン酸欠乏条件下では、根、葉、莖における発現量が増加していたので、体内リン酸濃度に応答して誘導されるリン酸トランスポータである可能性が考えられた。

リン酸欠乏ストレス時のリン酸トランスポータの発現と ^{32}P 移行の解析

^{32}P イメージング解析によりリン酸は組織特異的に分配されることが示され、かつトランスポータの発現解析により LjPT1、LjPT2、LjPT3、LjPT7 遺伝子がリン酸欠乏時に根、莖、葉で発現量を増加することが示された。次に、これらの遺伝子がリン酸輸送にどの程度関与するのかを知るため、トランスポータの発現量と ^{32}P 移行量の関係を調べた。十分なリン酸を含む水耕液で栽培したミヤコグサをリン酸抜き培地に移植し（以下、リン酸欠乏ストレス処理）、根、第一・第二本葉、新葉の3組織のリン酸濃度とトランスポータ遺伝子の発現量を調べた。ストレス処理10日目に遺伝子の発現量がコントロール栽培区と比較して大幅に増加したことから、同条件下における植物体内の ^{32}P -リン酸イメージングを行った。イメージングでは、新たに施与した $^{32}\text{P}(\text{H}_3\text{PO}_4)$ の組織への移行蓄積からリン酸量(mol/h)を換算した。根では、リン酸濃度がコントロールの約1/4であり、LjPT1は7倍、LjPT2は4倍に mRNA 発現量が増加していた。このとき根が吸収し地上部へ移行したリン酸移行速度は、コントロールの3-5倍に増加した。第一本葉と第二本葉は、リン酸濃度がコントロールの約1/9であり、LjPT1の発現量は4倍に増加した。このとき、これらの葉へのリン酸移行速度はコントロールの9-15倍に増加した。LjPT1は、特に葉肉細胞で発現しており、葉の組織細胞のリン酸取り込みに働くことが考えられた。新葉では、リン酸濃度がコントロールの約1/3であり、LjPT1、LjPT2、LjPT3、LjPT7 遺伝子の発現量は3-6倍に増加した。以上から、各組織は、組織のリン酸濃度の減少に伴い特定のリン酸トランスポータ遺伝子の発現量を増加させており、リン酸の移行速度および蓄積量を上昇させることが分かった。

リン酸トランスポータ遺伝子のノックダウン個体の作出とイメージング解析

LjPT1、LjPT2、LjPT3は、それぞれリン酸欠乏に応答し、また、他の遺伝子よりも発現量が高く、輸送に寄与する割合が高いことが考えられた。そこで、これらの遺伝子機能を抑制した場合にリン酸の移行蓄積に違いが生じることを考え、形質転換体の作成と解析を試みることにした。RNAi コンストラクトを導入したアグロバクテリウムの胚軸感染法により形質転換体を作成した結果、*ljpt1-5* は LjPT1 と LjPT2 遺伝子の発現が1/7、*ljpt3-1* は LjPT3 遺伝子の発現が1/5に抑制されていた。これらの形質転換体を用いて、 ^{32}P イメージングを試みた結果、野生株に比較して *ljpt1-5* はリン酸欠乏時の地上部への移行は約20%減少し、成熟葉への移行は約40%減少していた。一方、*ljpt3-1* のリン酸欠乏時の移行量は野生株とほぼ同様の結果となった。これらの結果から、リン酸欠乏時のリン酸輸送量に寄与する割合は LjPT1 LjPT2 遺伝子が高く、LjPT3 遺伝子が低いことが分かった。

本研究は、植物栄養元素のうちリン酸に注目し、放射性同位体を利用した非破壊で経時的なリン酸の観察ができる新たな解析ツールを開発し、ミヤコグサリン酸トランスポータの種類と発現量と、植物体内のリン酸のラジオアイソトープの移行量および速度を関連させた初めての研究である。ラジオアイソトープの移行量および速度を解析できる点を植物の物質動態機構の解明に応用したこれらの結果は、今後の活用が大いに期待されるものであり、学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。