

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田中 秀典

本論文は第1章で、研究の背景と目的を述べた。浸透圧ストレスを受けた植物は、細胞レベルや分子レベルで様々な応答反応を示す。細胞外環境の認識を行う分子として働くと考えられる受容体様キナーゼ (RLK) は、浸透圧ストレスやそれに関与する植物ホルモン等の外的因子を細胞表層で認識し、細胞内に伝達する分子としても働く可能性が考えられた。本研究では、浸透圧ストレスシグナルの全体像の解明を目指し、浸透圧ストレス時に重要な働きを示す植物ホルモンのアブシシン酸 (ABA) のシグナル伝達に関与する新規 RLK の同定を目的とした。当研究室で行われたマイクロアレイデータを用いて、シロイヌナズナ *RLK* 中から浸透圧ストレスや ABA により発現が顕著に誘導される *ARCK1* 遺伝子を選抜し、浸透圧ストレス及び ABA 条件下における *ARCK1* の関与するシグナル伝達の機能解析を行った。

第2章で材料と方法を示した後、第3章および第4章で、*ARCK1* の機能解析に関する結果と考察を記した。*ARCK1* は細胞内のキナーゼドメイン (KD) のみを持つ受容体様細胞質キナーゼ (RLCK) である。*ARCK1* の発現は浸透圧ストレス及び ABA 条件下で主に地上部で誘導されることが示された。形質転換植物体の解析から、GFP-*ARCK1* が細胞質局在性を示すことが示唆された。*arck1* 変異体では、塩ストレス及び ABA 存在下で、発芽後の成育段階において野生型に比べて子葉の緑化抑制が観察され、*ARCK1* は発芽後の成育段階で ABA 及び塩ストレスシグナルにおける負の制御因子であることが示唆された。

次に、*ARCK1* と協調的に機能する RLK の探索および解析を行った。RLCK は細胞膜付近での受容体複合体の形成を介し RLK シグナル伝達系において重要な役割を果たすと考えられる。細胞質局在性 *ARCK1* は、膜局在型 RLK と協調的に機能し浸透圧ストレスシグナルを制御する可能性がある。*ARCK1* と協調的に機能する RLK の探索のため、公共の共発現解析ツールにより遺伝子共発現解析を行った。共発現解析より類似した発現様式を示した RLK 群と *ARCK1* の相互作用を酵母ツーハイブリッド系により解析し、システインリッチリピート (CRR) -RLK (CRK) ファミリーに属する CRK36 の KD が酵母内で *ARCK1* と相互作用することが示唆された。定量的 RT-PCR により CRK36 は浸透圧ストレス条件下で地上部において発現が誘導されることが示唆された。*CRK36-GFP* を恒常的に発現する形質転換体を用い、CRK36-GFP の蛍光シグナルが原形質分離後に細胞壁から離れ、CRK36-GFP

は細胞膜に局在することが示唆された。ARCK1 及び CRK36 の相互作用を詳細に解析するため、プルダウン法、BiFC 法及び共免疫沈降法を行った。ARCK1 と CRK36 は植物細胞膜上で複合体を形成することが示唆された。ABA 及び浸透圧ストレス下における CRK36 の機能解析のために、RNAi 法による CRK36 ノックダウン植物を作出した。ABA、高塩及び高浸透圧条件下で CRK36 RNAi 植物の子葉緑化割合は、野生型や *arck1-2* と比べ低下し CRK36 は発芽後の成育段階で ABA 及び浸透圧ストレスシグナル伝達における負の制御因子として機能することが示唆された。ARCK1 及び CRK36 による分子レベルでの制御を明らかにするためにマイクロアレイ及び定量的 RT-PCR により解析し、CRK36 及び ARCK1 は ABA シグナル伝達に関わる多くの遺伝子発現を制御することが示唆された。

最後に、ARCK1 及び CRK36 の関与するシグナル伝達においてリン酸化による制御について解析した。*in vitro* リン酸化実験から ARCK1 及び CRK36KD が機能的なプロテインキナーゼであることを確認し、ARCK1 と CRK36KD を共存時には ARCK1 リン酸化シグナルが増強した。CRK36KD は ARCK1 をリン酸化の基質とすることが示唆された。植物中の ARCK1 のリン酸化状態を明らかにするために、ARCK1 及び CRK36 を恒常的に発現させた形質転換シロイヌナズナにおける ARCK1 のリン酸化状態を解析した。得られた免疫沈降産物では塩ストレス依存的に抗リン酸化スレオニン抗体によるシグナルが検出された。CRK36 の恒常的発現により塩ストレス依存的に ARCK1 のリン酸化が促進されることが示唆された。

以上、本論文は植物の浸透圧ストレス時の成長制御機構において重要な機能を持つ受容体様キナーゼの機能及びそのシグナル伝達系を明らかにしたものであり、学術上、応用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。