

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	八木 宏樹
論文題目	シロイヌナズナを用いた排水組織の多面的解析		
(論文内容の要旨)			
<p>排水組織は植物から液体の水を排出するための組織である。植物は朝露に代表されるように液体としての水分を排出する。この現象のことを溢泌と呼び、維管束植物で広く観察されている。多くの植物では排水組織は葉の鋸歯の末端に位置しており、維管束と連結している。維管束を介して運ばれた水分は排水組織を経由して外界へと排出される。排水組織の構造を理解しようとする研究例は見られるものの、体系だった研究例はほとんどなかった。本研究ではモデル植物シロイヌナズナを用いて、排水組織を生理学、組織学、発生学、分子生物学と多面的に解析することで、排水組織を広く理解することを試みた。</p> <p>本研究ではまず、物質が維管束を介して排水組織へと運搬される様子を確認するため、色素液を用いたpetiole dip実験を行った。色素が排水組織に即座に運搬されたことから、排水組織は植物にとって不要な物質を蓄積することが示唆された。また、溢泌の生理学的意義を見出すため、ワセリンを葉の周縁部に塗布することで溢泌を阻害する系を構築した。溢泌を阻害された植物体ではガラス化の症状が見られたことから、溢泌は体内の水分量の調整に機能していることが示唆された。</p> <p>シロイヌナズナ排水組織の構造を理解するため、多種の蛍光タンパク質発現マーカーラインを用いた排水組織のイメージングを行った。E325-GFP株は、排水組織中の水孔と導管末端とをつなぐ領域の小さな細胞 (E cellと名付けた) でGFPを発現することが判明した。電子顕微鏡などの観察から、E cell間の細胞間隙は小さく、密な構造をとっていた。さらにE cellの存在領域を囲う様に配置された葉肉細胞 (境界葉肉細胞と名付けた) も観察された。この葉肉細胞は、水分やその溶質が排水組織の外へ漏洩させないためのバリアー様構造を形成している可能性が考えられた。篩部蛍光マーカーラインの観察から、排水組織には篩部は連結していないことが判明した。以上のように様々な観察法を組み合わせることでシロイヌナズナ排水組織の構造の把握に成功した。</p> <p>排水組織の発生機序を解明するため、排水組織三重蛍光マーカーラインE325-GFP/YUC4:nls-3xGFP/DR5rev:erRFP株を作出し、時系列を追った観察を行った。観察の結果、排水組織のE cellが分化するよりも前に、オーキシンの生合成および蓄積が開始されることが判明した。また、E325-GFPの発現機序を解明することで、排水組織発生の理解にもつながると考え、in vitro系でのE325-GFPの発現解析も行った。E325-GFP株に維管束系列細胞誘導法VISUALを適用すると、サンプルでGFP蛍光が観察されたことから、排水組織の発生と維管束の発生には共通する分子メカニズムが存在することが示唆された。</p> <p>排水組織で発現する遺伝子の網羅的な同定のため、排水組織特異的なトランスクリプトーム解析を行った。本研究では特殊なニードルデバイスを利用することで直径約100 μmという小さな組織である排水組織の単離に成功した。最新の高効率なRNA-seq法であるLasy-seqを用いることで、排水組織特異的なRNA-seqを実施した。その結果、68個の排水組織で高く発現する遺伝子を同定した。その68遺伝子にはキチナーゼやトランスポーターが多く含まれていた。</p> <p>以上の成果により、排水組織について多面的な知見の獲得および排水組織研究の基礎の構築に成功した。</p>			

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

八木宏樹氏は、シロイヌナズナの排水組織を研究対象とした。排水組織は溢泌に関与する組織であるが、その生理学的意義や発生学的な知見はほとんど分かっていなかった。特に分子レベルでの解析はほとんどなされていない状態であった。八木氏はモデル植物シロイヌナズナを用いることで、生理学から形態学、発生学、分子生物学的に多面的な解析を試みた。

八木氏は、シロイヌナズナにおいて排水組織が体内の水分調整の機能をにやうことを明らかにした。これまで、排水組織が水分を溢泌する理由は、夜間の水循環のためと考えられていた一方、小型の草本植物から大型の木本植物まで広く、説明できるものではなかった。簡易な実験系ではあるが、溢泌の新たな意義を見出した点は評価に値する。

他の植物種の排水組織構造の記載は古くから行われていた一方で、モデル植物の明瞭な記載は行われていなかった。八木氏は、多種の蛍光マーカークラインを用いることで排水組織の構造の解明を試みた。その結果、排水組織が水孔、導管末端および本研究で命名したE cellから成ることを明らかにした。さらに排水組織と篩部は連結しないことも明らかにした。通常の解剖学的手法のみならず、蛍光タンパク質発現形質転換体を利用することで得られた結果であり、モデル植物の利点を活かしたものであり、今後様々な植物における形態記載にも影響を与えるものと考えられる。

八木氏は排水組織の発生機序の解明のため、多種のマーカークラインを用いた経時観察を行い、排水組織発生の前にオーキシンの蓄積が起こることを明らかにした。さらに、排水組織発生と維管束発生には共通するシステムが存在することも示唆された。排水組織の発生メカニズムはほとんど分かっておらず、分子レベルでのメカニズムを示した点は評価できる。

八木氏は排水組織を単離し、網羅的な発現遺伝子同定も試みた。排水組織は微細な組織であるため、単離は難しいものであったが、排水組織蛍光マーカークライン、特殊なサンプルリングデバイスおよび最新のRNA-seq解析法を組み合わせることで、解析に成功した。排水組織の単離および解析は、世界的にも初めての試みである。同定された遺伝子群にはキチナーゼが豊富に含まれており、排水組織の病原体抵抗性を示唆するものであった。また、同定した遺伝子に着目することで、今後排水組織の生理学的意義や発生機序が解明されることが期待される。

これまで体系だった研究が行われていなかった排水組織に着目し、今後の研究の基礎を築いた点は、植物学の発展に大きく寄与するものとして高く評価できる。以上より、本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。また、令和3年2月2日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規定第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えて、その内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降