

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	石田 咲子
論文題目	植物ホルモンオーキシンの減少が引き起こすゼニゴケ葉状体再生の分子機構		
(論文内容の要旨)			
<p>陸上植物は高い再生能をもち、組織欠損後に新たに組織や器官を再形成することができる。維管束植物の根やシュートの再生には主要な植物ホルモンの一つオーキシンが重要な機能をもつことが古くから知られている。コケ植物もまた高い再生能をもち、再生は頂端メリステムを含む頂端部を切除することによって基部側断片に誘導され、頂端側断片の切断面では誘導されない。また、基部側断片にオーキシンを添加すると再生芽の形成が抑制されることから、コケ植物の再生はオーキシンによる頂芽優勢機構の一形態であると考えられてきた。しかしながら、その詳細な分子機構は未だ不明である。そこで本研究では、苔類ゼニゴケを用いて葉状体再生過程の詳細な分子機構の解明を目指した。</p> <p>まず、オーキシンの添加によって再生過程の細胞周期再開が阻害されることを明らかにした。また、ゼニゴケに1分子種存在する転写活性化型の AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) 転写因子 <i>MpARF1</i> の機能欠損株の再生はオーキシン存在下においても抑制されないことから、オーキシン添加による再生抑制はオーキシン信号伝達経路を介することがわかった。ゼニゴケ葉状体切断後の内生ホルモンの経時的な定量から、頂端部を切除した基部側断片の切断面領域では内生オーキシン量が一過的に大きく減少することを明らかにした。一方で、頂端側断片の切断面領域では内生オーキシン量は緩やかに減少するものの、その程度は基部側と比較して小さかった。これらの結果から、内生オーキシン量の一過的な減少が再生を引き起こすことが示唆された。次に、葉状体切断後の経時的なトランスクリプトーム解析により再生関連遺伝子の探索を行い、基部側断片特異的に発現が上昇し、かつオーキシン添加によって発現誘導が抑制される 29 遺伝子を見出した。その中には転写因子が 1 遺伝子含まれており、それは APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF) ファミリーのクラス VIIIb に属する <i>MpERF20</i> であった。<i>MpERF20</i> は基部側断片特異的に発現が誘導され、オーキシンの添加によって誘導が抑制された。反対に、無傷の葉状体にオーキシン生合成阻害剤を処理しオーキシンレベルを低下させると <i>MpERF20</i> の発現が上昇した。以上のことから、<i>MpERF20</i> を <i>LOW-AUXIN RESPONSIVE</i> (<i>MpLAXR</i>) と再命名した。<i>MpLAXR</i> の機能欠損株では、オーキシン添加時と同様の細胞周期進行遅延が生じた。また、β-エストラジオール依存的に <i>MpLAXR</i> を誘導過剰発現する <i>proMpE2F:XVE</i>>><i>MpLAXR</i> 株を用いて、一過的に発現誘導した上で、オーキシン含有培地で再生実験を行ったところ、オーキシン存在下においても再生芽が形成された。つまり、<i>MpLAXR</i> の一過的な過剰発現はオーキシン添加による再生芽形成抑制効果が無効化できることが明らかになった。さらに、<i>proMpE2F:XVE</i>>><i>MpLAXR</i> 株の無性芽を切断することなくβ-エストラジオール含有培地で培養すると、メリステム領域だけでなく、通常は細胞分裂をしない領域においても細胞分裂が起こり、未分化な細胞塊が生じた。<i>MpLAXR</i> 過剰発現誘導を止めると新たな葉状体が発生したことから、この細胞塊は幹細胞形成能をもつ細胞からなることが明らかとなった。これらの結果から、<i>MpLAXR</i> は再生過程において細胞リプログラミング因子として機能することが示唆された。本研究において、ゼニゴケ葉状体切断後に内生オーキシン量が一時的に減少し細胞リプログラミング因子 <i>MpLAXR</i> の発現を誘導することを明らかにした。<i>MpLAXR</i> と同じ AP2/ERF ファミリーのクラス VIIIb に属するシロイヌナズナ <i>ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1/DORN RÖSCHEN</i> (<i>ESR1/DRN</i>) はシュート再生因子として機能するとともに、オーキシン内生量の極小領域における腋芽メリステムの確立に関与する。本研究は、陸上植物におけるオーキシンによる幹細胞新生制御と頂芽優勢機構確立の関わりを示唆している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

陸上植物は高い再生能をもち、その制御には植物の主要なホルモンの一つであるオーキシンが重要な役割をもつことが古くから知られている。コケ植物において再生は頂端基部軸に沿った極性を示し、頂端メリステムを含む頂端部が切除された基部側断片の切断面からは再生するが、頂端側断片の切断面からは再生しない。また、基部側断片にオーキシンを添加すると再生が抑制される。以上のことから、コケ植物の再生はオーキシンによる頂芽優勢機構の一形態であると考えられてきた。本論文で申請者は、苔類ゼニゴケを用いて葉状体再生過程における内生オーキシンの役割とその詳細な作用機作を解明し、以下の発見を報告している。

1) オーキシンによる再生の阻害は、葉状体切断後に誘導される細胞周期再開より前の段階、すなわち細胞の運命を転換させ、細胞周期へ進入させる過程で起こることを明らかにした。また、頂端側断片の切断面と比較して、基部側断片の切断面における内生オーキシン量の一過的かつ劇的な減少を見出した。これらのことから、オーキシン量の一過的な減少が細胞の運命転換を引き起こすことが示唆された。

2) 経時的なトランスクリプトーム解析により、基部側断片特異的に発現が上昇し、かつオーキシン添加によって発現誘導が抑制される転写因子遺伝子 *MpERF20* を同定した。切断処理をしていない葉状体においてもオーキシンレベルを低下させると発現が上昇したことから、*MpERF20* を *LOW-AUXIN RESPONSIVE (MpLAXR)* と再命名した。*MpLAXR* と同じ AP2/ERF 遺伝子ファミリーのクラスに属するシロイヌナズナ遺伝子にはシュート再生促進因子である *ESR1/DRN* が含まれることから、この遺伝子ファミリーに陸上植物進化において保存された機能があること示唆された。

3) ゲノム編集により作出した *MpLAXR* の機能欠損株や、*MpLAXR* を誘導過剰発現する株を用いた解析により、*MpLAXR* は再生過程において既に分化した細胞を幹細胞形成能を備えた細胞に運命転換する細胞リプログラミング因子として機能することを明らかにした。

以上の発見により、長らく未解明であった頂芽優勢に類似したコケ植物再生の極性制御メカニズムが解明された。近年、シロイヌナズナにおいて、頂芽優勢の標的である腋芽の形成過程でも、オーキシン内生量の極小領域における *ESR1/DRN* の発現が重要な役割を果たすことが報告された。オーキシンの減少が *MpLAXR* の発現誘導を介して細胞リプログラミングを引き起こすという、申請者が本研究で明らかにしたスキームは、植物再生機構だけでなく、頂芽優勢機構の進化に対しても興味深い示唆を与えるものであり、その意義は大きい。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、植物生理学分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見ならびに概念が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、令和4年1月28日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日