

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	黒田 凌
論文題目	シロイヌナズナにおける <i>PIP5K7</i> 、 <i>PIP5K8</i> および <i>PIP5K9</i> の機能解析		
(論文内容の要旨)			
<p>本研究では、シロイヌナズナの<i>PIP5K7</i>、<i>PIP5K8</i>および<i>PIP5K9</i>遺伝子に対して遺伝学のおよび分子生物学的解析が行われ、それらが有する生物学的機能が解明された。</p> <p>ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (<i>PIP5K</i>) は膜リン脂質であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 [$PI(4,5)P_2$] を産生する。$PI(4,5)P_2$は主に細胞膜上でシグナル分子として働き、植物の発生・分化、環境応答など多くの現象に関わると考えられている。シロイヌナズナには2つのAタイプと9つのBタイプの<i>PIP5K</i>がコードされており、Bタイプは<i>PIP5K1-3</i>、<i>PIP5K4-6</i>および<i>PIP5K7-9</i>の3つのサブグループに分けられる。<i>PIP5K1-3</i>および<i>PIP5K4-6</i>が被子植物のみで保存されているのに対して、<i>PIP5K7-9</i>はコケ類を含む陸上植物で広く保存されているため、<i>PIP5K7-9</i>は陸上植物に共通の重要な機能を保持しているものと考えられた。そこで、それらをコードする遺伝子群の生物学的機能が解析された。</p> <p><i>PIP5K7</i>、<i>PIP5K8</i>および<i>PIP5K9</i>遺伝子の組織特異的なプロモーター活性を調べた結果、それらは主に維管束を含む分裂組織で発現することが示された。さらに、<i>PIP5K7</i>、<i>PIP5K8</i>および<i>PIP5K9</i>の細胞内局在性を蛍光タンパク質との融合タンパク質を用いて解析した結果、それらは根端分裂組織の表皮細胞において細胞膜に均一に局在することが示された。次に、機能欠損変異体<i>pip5k7</i>、<i>pip5k8</i>および<i>pip5k9</i>が単離され、それらの多重変異体が作製された。それら変異体を通常生育条件下で観察したところ、各単一変異体のみならずいずれの多重変異体においても明確な表現型を見出すことが出来なかったが、高浸透圧ストレス条件下では、<i>pip5k7pip5k8pip5k9</i>三重変異体の主根の伸長が野生型と比較して抑制されており、根端分裂組織も縮小していた。さらに、三重変異体では、根端分裂組織表皮細胞での高浸透圧ストレスに応答するエンドサイトーシスが遅延していた。また、細胞内局在性の解析においては、<i>PIP5K7</i>、<i>PIP5K8</i>および<i>PIP5K9</i>が高浸透圧ストレスに応答して細胞膜付近で粒状に局在することが示された。蛍光分子マーカーを用いた解析においては、細胞膜上の$PI(4,5)P_2$の量が三重変異体では野生型に比べて有意に少ないことが示された。</p> <p>これらの結果から、<i>PIP5K7</i>、<i>PIP5K8</i>および<i>PIP5K9</i>は重複して根端分裂組織表皮細胞の細胞膜上で$PI(4,5)P_2$を産生し、高浸透圧ストレス下においてエンドサイトーシスを促進させることで主根の伸長に寄与することが明らかとなった。このことにより、陸上植物において保存性の高い<i>PIP5K7-9</i>オルソログ遺伝子群の機能が、植物の発生・分化ではなく、むしろ環境応答に関わるものである可能性が示された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本申請論文では、シロイヌナズナの高浸透圧ストレス応答におけるホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PIP5K) 遺伝子 *PIP5K7*、*PIP5K8* および *PIP5K9* が根における高浸透圧ストレス応答に参与することが示された。また、陸上植物におけるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 [PI(4,5)P₂] シグナルの重要な役割の一つとして、高浸透圧ストレス下でのエンドサイトーシスの促進が明らかにされた。

PI(4,5)P₂は、真核生物においてアクチン細胞骨格の形成、膜交通、遺伝子発現調節など、様々な細胞内諸過程の制御に関わるシグナル分子として知られている。植物分野においても、近年そのシグナル機能の研究が盛んに行われており、細胞内シグナル伝達や細胞極性制御におけるその役割が明らかになっている。また、シロイヌナズナを用いた遺伝学的解析により、PI(4,5)P₂生成の鍵酵素であるホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PIP5K) をコードする遺伝子群の根毛伸長、花粉管伸長、気孔の開閉、根におけるオーキシン極性輸送など、様々な植物固有の生命現象への関与が示されている。一方、シロイヌナズナの *PIP5K7*、*PIP5K8* および *PIP5K9* については、陸上植物で保存されたサブグループに属するPIP5Kをコードするにも拘らず、それらの本格的な遺伝学的解析が行われておらず、そのサブグループが担う生物学的機能についても不明のままであった。

本研究における重要な知見および意義は以下の4点である。(1) *PIP5K7*、*PIP5K8* および *PIP5K9* のそれぞれについて機能欠損型変異体を揃え、それらの三重変異体を作製、解析することにより、PIP5K7-9サブグループの機能欠損が通常生育条件下での植物の発生・分化に対して明確な影響を与えないことが示された。このことは、植物のPIP5Kの中でPIP5K7-9サブグループのみが陸上植物で保存されていることを考慮すると、植物におけるPI(4,5)P₂シグナルの役割を理解する上で重要な事実である。また、他のPIP5Kサブグループの機能がシロイヌナズナの発生・分化に必須であることとは対照的であり、PIP5K遺伝子群が高等植物の進化において大きく機能分化を遂げたことを示唆する。(2) 様々な環境条件下において *pip5k7pip5k8pip5k9* 三重変異体の表現型を解析した結果、PIP5K7-9サブグループの機能が高浸透圧条件下の根の生育に参与することが見出された。このことは、高浸透圧適応におけるPIP5Kの機能が陸上植物全体で保存されていることを示唆するものであり、PI(4,5)P₂シグナルの植物環境応答における役割の重要性を示すものとして非常に意義深い。(3) 蛍光タンパク質との融合タンパク質を用いた観察により、PIP5K7、PIP5K8 および PIP5K9 は根端分裂組織表皮細胞において細胞膜全体に均一に局在することが示された。この局在性は、細胞膜上で極性をもって局在する他のサブグループのPIP5Kとは対照的であり、双方の機能分化と関連づけられる重要な知見である。(4) 三重変異体を用いた解析により、PIP5K7、PIP5K8 および PIP5K9 は高浸透圧に晒された根端分裂組織表皮細胞におけるエンドサイトーシスの促進に参与することが示された。ま

た、当該細胞における蛍光分子マーカーの観察により、PIP5K7、PIP5K8およびPIP5K9は細胞膜上の大部分のPI(4,5)P₂の産生に関わることが示された。これらは、PI(4,5)P₂シグナルが高浸透圧により誘導されるエンドサイトーシスの促進に関わることを示す直接的な証拠であり、ストレス応答下での細胞膜のリサイクリングを理解する上でも重要な知見である。

以上のように、本申請論文は植物脂質シグナルおよび植物環境応答の研究分野に大きく寄与するものと考えられる。よって、本申請論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和3年4月12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。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降