

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	松田 陽菜子
論文題目	ダイズイソフラボンの根外への分泌と根圏での蓄積に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>根圏とは、植物の根から影響を受ける土壌領域と定義される。植物が根圏に分泌する有機化合物の量は、植物種や環境条件により大きく異なるが、光合成で固定した炭素量の10 %以上にも達し、根に配分された炭素量の20 %以上とも推定されている。根から根圏へ分泌される代謝産物の中には、アミノ酸、糖、有機酸、脂肪酸、核酸等の一次代謝産物に加え、特化代謝産物（二次代謝産物）が含まれる。植物特化代謝産物（Plant Specialized Metabolites, PSM）は、直接的に生命維持や生殖に必須ではないものの、植物が環境に適応する進化の過程で個々に獲得してきた代謝産物群であり、PSMには生物的・非生物的ストレスに対する防御物質として、あるいは、他生物を誘引・忌避するための色素や香り成分として機能するものが知られている。また、植物根圏での生物間相互作用において機能するPSMも存在し、その代表例としてダイズ (<i>Glycine max</i>) 等のマメ科植物が広く含有するフラボノイドの1グループ、イソフラボン類が挙げられる。ダイズ根圏において、イソフラボン類は根粒菌との共生関係構築の開始段階におけるシグナル分子として知られ、ダイズ根圏細菌叢の形成にも深く関与する。このように、ダイズ根圏において重要な機能を担うイソフラボン類であるが、細胞内で生合成された後、根圏土壌へ至るまでの生物化学的過程は十分に明らかにされていない。そこで本研究では、ダイズイソフラボン類の根外への分泌機構、および根圏での動態の解明を目的とし、下記の研究を行った。</p>			
<p>1. 第1章では、イソフラボン類の生合成および根外分泌の日周性を調べることを目的とした。水耕栽培ダイズのRNA-seq解析により、イソフラボン生合成を制御する既知の転写因子の中で、最も高い遺伝子発現を示した<i>GmMYB176</i>の発現量は、根において朝 6 時から昼 12 時にかけて最大となることを見いだした。イソフラボン生合成遺伝子群の根における発現量は、昼 12 時頃に最大となり、夜 0 時頃に最小となることを明らかにした。根で見いだされたイソフラボン生合成関連遺伝子の発現パターンの日周性は、葉においては見出されなかった。次に、根組織中のイソフラボン配糖体ならびにアグリコンの含量を調べたところ、生合成遺伝子群の発現量のピークから約 6 時間遅れた日周変動パターンを示すことが明らかとなった。根のイソフラボン生合成が日周変動するのに対し、水耕液のイソフラボン含量は日周性を示さず、根外へのイソフラボン分泌が単純拡散ではないことが示唆された。そこでイソフラボン根外分泌への関与が示唆される酵素として、日周期でイソフラボン生合成遺伝子群と発現が同調した輸送関連遺伝子の中から、2個のATP-binding cassette (ABC) 輸送体と、イソフラボン生合成遺伝子群と対称的な位相の遺伝子発現を示すisoflavone conjugate-hydrolyzing <math>\beta</math>-glucosidase (ICHG) を見いだした。</p>			

2. 第2章では、イソフラボン類が根組織内では配糖体として存在するのに対し、根圏においては主にアグリコンとして蓄積することに着目した。イソフラボン配糖体を基質とするICHGが根アポプラストに局在することから、本酵素がイソフラボンの根外分泌に関与すると推測されてきたが、その実態は未解明のままであった。そこで、メタンスルホン酸エチルによる突然変異処理にて作出されたダイズの*ichg*変異体を用いて逆遺伝学的な機能解析を行い、ICHGが根アポプラストにおいてイソフラボン配糖体を加水分解し、アグリコンを生成することを示した。さらに、圃場栽培試験において、*ichg*変異体の根圏土壌のイソフラボン配糖体含量は、野生型個体と比較して有意差が認められなかった一方で、アグリコンの含量は減少し、イソフラボン類の総含量も減少することを示した。以上の結果から、*ichg*の変異によりダイズ根圏のイソフラボン含量は減少し、ICHGが実際にイソフラボンの根外分泌に寄与することを明らかにした。一方、根内・根圏の細菌叢や根粒共生については、*ichg*の変異による影響は見いだされなかった。
3. 第3章では、ダイズ根の細胞膜上に存在し、主要なイソフラボンアグリコンの1つゲニステインを輸送する輸送体の研究に取り組んだ。第1章の研究結果と従前の報告とを考慮すると、ゲニステインの輸送体はABC輸送体である可能性が高いと判断した。そこで、ダイズにおいてゲニステインの輸送に関与するABC輸送体遺伝子の同定を目的とし、第1章で見出した2つのフルサイズABC輸送体遺伝子*GmABCG18*および*GmABCG23*について解析を行った。初めに、アミノ酸配列を用いた系統解析と窒素欠乏条件における遺伝子発現解析により、両遺伝子が実際にイソフラボン輸送体遺伝子候補として有力であることを示した。次に、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) およびタバコ (*Nicotiana tabacum*) Bright Yellow-2 (BY-2) 細胞を用いて、*GmABCG18*発現ラインを作成し、ゲニステイン輸送能の評価を試みた。タバコBY-2細胞から調製したミクロソームを用いた輸送実験では、BY-2野生型、ベクターコントロール、*GmABCG18*発現ラインのいずれにおいてもATP依存的なゲニステイン輸送活性の増加が認められ、タバコ内在性の輸送体がゲニステインを輸送することが示された。しかし、*GmABCG18*発現ラインにおいて、ベクターコントロールと比較してより高いゲニステインの輸送活性は認められなかった。以上の結果から、*GmABCG18*がゲニステインを基質とするかは確認できなかったものの、タバコBY-2細胞の膜画分のゲニステイン輸送活性を測定する方法を確立することができた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。  
論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

植物根圏において植物の特化代謝産物 (PSM) は重要な役割を担うが、植物の細胞内で生合成されたPSMが根圏へ分泌される生物化学的過程については、これまで未解明な部分が多かった。本論文は、ダイズが生産するPSMであるイソフラボン類に着目し、その生合成および根外分泌における日周性の解析、配糖体加水分解酵素 ICHGのイソフラボン根外分泌への関与、およびABC輸送体の機能解析を行った一連の研究成果をまとめたものである。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. 水耕栽培ダイズのRNA-seq解析と植物体ならびに水耕液におけるイソフラボンの定量解析により、根に特徴的なイソフラボン生合成の日周変動を明らかにした。さらに、遺伝子発現の日周変動パターンから、イソフラボンの根外分泌に関与する可能性のあるタンパク質として、2つのABC輸送体と、ICHGを見出した。
2. ダイズ根のアポプラストに局在してイソフラボン配糖体を加水分解する $\beta$ -グルコシダーゼのICHGが、根アポプラストのイソフラボン量および組成を変化させることを、*ichg*変異体の表現型解析により示した。圃場試験においては、ダイズ根圏土壌のイソフラボン量が*ichg*の変異により減少すること、またICHGが根圏へのイソフラボン分泌に寄与することを明らかにした。
3. 分子系統解析と遺伝子発現解析により、第1章で見出した2つのABC輸送体、GmABCG18およびGmABCG23が、イソフラボン輸送体候補として有力であることを示した。タバコBY-2細胞を用いてGmABCG18発現ラインを作出し、主要なイソフラボンアグリコンの1つであるゲニステインの輸送解析手法を確立した。

以上のように本論文は、生化学、分子生物学、情報科学的解析を通して、ダイズイソフラボン類の生合成がダイズ根において日周変動していること、根アポプラスト局在の $\beta$ -グルコシダーゼICHGがダイズ根圏へのイソフラボン分泌に寄与することを明らかにし、ダイズ根圏で重要な生理的役割を果たしているイソフラボン類が、根圏へもたらされる過程の一端を解明したものである。本論文の成果は、植物代謝生化学、植物分子生物学、および植物微生物相互作用研究の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和6年1月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第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。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)