

## [ 別 紙 2 ]

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 ナイヤネート ジャルンサンティ タナカ

本論文は、複数の植物ホルモン共通の信号伝達経路の存在を想定し、申請者がスクリーニングで選抜した当該経路制御剤候補 NJ15 の作用解析を展開したものである。本論文は、第 1 章の序論に続き、以下の第 2 章から第 4 章で構成されている。

第 2 章では、NJ15 選抜時に用いた 2 つの応答系を再度用いて、NJ15 に低感受性を示すシロイヌナズナ変異体を選抜している。すなわち、ブラシノステロイドの関与が大きい暗所胚軸伸長応答系とオーキシンの関与が大きい胚軸重力応答系を用いて、対照の野生型と比べ、有意に NJ15 応答変化が小さい変異体 5 種を選抜し、その原因遺伝子を同定している。うち、解析が先行した 3 種に絞り、次世代シーケンサを用いた網羅的遺伝子発現解析を実施して、NJ15 低感受性付与の原因を探っている。GO term 解析より、3 種いずれも脂肪酸、クチクラ、フェニルプロパノイドの各生合成に関わる遺伝子群、および、糖関連遺伝子群の発現変動が顕著であること、さらに NJ15 低感受性が最も強い *f127* 変異体の発現変動規模が最大であることを見出し、NJ15 の作用点がそれらと関連するとの見通しを得ている。

第 3 章では、前章で得た情報に基づきクチクラ合成に焦点を当て、NJ15 の作用を解析している。これは、*f127* 変異体では *DCR* (*Defective in Cuticular Ridges*) 遺伝子が破壊されていること、かつ、既存 *DCR* 欠損変異体 *dcr2* も NJ15 低感受性を示すことを受け、NJ15 低感受性付与にクチクラ合成異常の関与が判明した点が発端となっている。*dcr2* 関連の既報において、 $\sigma$ -トルイジンブルー(TB)異常染色が意味するクチクラ層の透過性向上が示されている点を参考に、*f127* 変異体でも TB 染色を確認できたが、この染色強度に NJ15 は影響を与えないとの結果を得ている。クチクラ層は、クチクラワックスとクチンポリマーの 2 成分で構成され、うちクチクラワックス合成に *DCR* 遺伝子産物が関与することから、その原料である脂肪酸への影響を定量分析している。クチンポリマーの合成阻害剤 *cafenstrole* と投与比較を行い、少なくとも NJ15 は *cafenstrole* と異なる様式で作用するとの結論を得た上で、脂肪酸の組成および量に NJ15 は大きく影響しないことを把握している。加えて、TEM 観察からも明瞭な構造変化を見出せなかったことも考え合わせ、NJ15 の作用範囲がクチクラと密に関連する

ものの、直接的に及ぼすものではない可能性を提示している。

第4章では、空間的にクチクラと接する細胞壁に焦点を当て、細胞壁成分に NJ15 が作用し、間接的にクチクラに影響を与える可能性を検証すべく、成分としてセルロース、ヘミセルロース、ペクチンの各異常と NJ15 低感受性との関係を調べている。最初に、ヘミセルロース主成分キシログルカン合成能を欠く変異体 *xxt1 xxt2* を用いて TB 染色を行い、クチクラ異常状態と NJ15 低感受性を確認している。これにより、想定どおり細胞壁異常がクチクラ異常も引き起こす実例を示している。続いて、セルロース合成阻害剤 isoxaben (IXB)、ペクチンの構造制御剤で、ペクチン断片化を阻害する epigallocatechin gallate (EGCG) を用いて投与効果を調べている。結果、野生型の重力応答に対し IXB は NJ15 への感受性を低下させ、EGCG は低下させないのに対し、EGCG は、*f127* 変異体の NJ15 感受性を回復させ、クチクラ層の透過性を低下させたとする結果を得ている。これらより、細胞壁異常がクチクラ層透過性と NJ15 低感受性に影響を与え、NJ15 の作用範囲として細胞壁も対象に含むことを実証した。

本章後半では、細胞壁関連変異体にデンプン蓄積例が多く、また、重力感知との関連性も周知であることを受け、デンプン蓄積とクチクラ層透過性や NJ15 低感受性との関連性を調べている。ルゴール染色により、*f127* 変異体では胚軸上部に通常より多いデンプン蓄積を認め、この蓄積に NJ15 投与は変化をもたらさないが、野生型で認められる染色強度が NJ15 投与で低下すること、*f127* 変異体でも EGCG 投与で強度が低下し、NJ15 との共処理でより一層低下することを明らかにした。これらの結果から、*f127* 変異体の NJ15 低感受性には、細胞壁異常に加えデンプン蓄積状態が関与している可能性を提示した。デンプン蓄積に細胞膜  $H^+$ -ATPase が関わるとする既報を参考に、 $H^+$ -ATPase 活性化剤 fusicoccin (Fc) の投与効果を調べ、野生型への Fc 投与は NJ15 の効力に影響せず、デンプン蓄積にも影響しないこと、さらに胚軸切片応答系を導入して、*f127* 変異体は基底状態でも細胞膜  $H^+$ -ATPase が活性化状態と予測される結果を得ている。これらを統合し、*f127* 変異体の NJ15 低感受性は、クチクラ異常と細胞壁異常の両方が生じている点が原因との考えに基づき、NJ15 の作用はクチクラ・細胞壁双方に対するポジティブな調節を通じてクチクラ層透過性を低下させ、構造的にクチクラ層を固める、あるいは、しっかりとさせることにあると結論し、それら機構の概説図を最後に提示している。

これまで、細胞壁とクチクラ間の連絡およびクチクラ層透過性に対する両者の協働に関する知見は乏しかったが、多種類の化合物を駆使した本研究によって、この未解明な研究領域に新たな知見が得られた。このため、本研究は学術的応用的に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。