

論文審査の結果の要旨

氏名 若竹 崇雅

本論文は、寄生植物がいかにして宿主植物に侵入し維管束を結合させ寄生状態にはいるかをハマウツボ科の寄生植物であるコシオガマを材料に研究したものである。ハマウツボ科の寄生植物であるストライガやオロバンキは、作物に感染して特にアフリカや地中海沿岸の諸国で多くの被害を出しており、その感染機構の理解と防除戦略の策定が課題となっている。モデル寄生植物コシオガマは宿主範囲が広く、モデル非寄生植物であるシロイヌナズナおよびイネに感染できる。宿主を認識すると、コシオガマは根の先端付近に感染器官である吸器を形成し、宿主の根に感染を開始する。寄生の分子機構は全く未知であり、論文提出者は、寄生に重要な吸器の発生の仕組みを分子生物学的に解明することを目標として、吸器の細胞分裂のパターン、細胞種の分化パターン、発生に重要な植物ホルモンであるオーキシンの応答性を中心に解析をおこなった。本論文は4章からなる。第1章では、研究の背景としての寄生植物研究の現状がまとめられ、これと関連付けて研究の目的が記されている。第2章では、吸器発生におけるこれまでの知見が背景として記述された後、吸器発生におけるダイナミックな細胞の分裂および分化パターンの変化を、新たに立ち上げた細胞特異的マーカーを用いたライブイメージングのシステムで詳細に解析した結果およびその考察について記述されている。また本章末には、この解析に用いた材料と研究手法が記載されている。第3章では、植物におけるオーキシンの役割についての背景が記述され、吸器発生におけるオーキシンの応答性パターンの経時的变化とオーキシントランスポーターの発現および局在パターン、オーキシントランスポーター阻害剤の効果についての詳細な解析および結果が記されている。また章末にこの解析に用いた材料と手法がまとめられている。研究全体の総括が第4章に記され、引用文献が最後にまとめられている。

論文提出者は、コシオガマの感染器官である吸器に着目し、まず吸器発生におけるダイナミックな細胞の分裂および分化パターンの変化を解析することにした。吸器の発生は宿主植物を認識してからすぐに始まり、およそ72時間後には宿主との維管束接合を完成する。この時間内に吸器がどのように形成されるかを、顕微鏡を用いて詳細に観察した。宿主を認識して12時間後には、表皮から内鞘までの細胞の分裂が検出される。40時間後

には全体が宿主に向かって膨らみ、64時間後には中心に多くの小さな細胞が検出され、道管細胞の分化も確認できた。また、宿主と接する細胞は侵入細胞として検出された。細胞分裂のパターンは細胞分裂マーカーである *CYCB1;2* のプロモーターに YFP を付けた系でも同様なパターンを示すことが確認できた。また、核局在シグナルを融合した GFP を用いて、細胞の分裂方向を詳細に観察した。表皮細胞、皮層細胞、内皮細胞等の外層では垂層分裂、内層では並層分裂が観察された。

次に、論文提出者は植物の根における細胞特異的マーカーを用いて、細胞種の同一性とそのパターンニングを詳細に解析した。表皮細胞マーカーとしては、シロイヌナズナ *PGP4* プロモーターに 3xVenusNLS (核局在シグナルをつけた3連の蛍光タンパク質 Venus) を利用した。宿主不在のコシオガマの根においては、表皮細胞のみに蛍光シグナルが見られることから、本マーカーがコシオガマで機能していることが示された。宿主を認識して24時間後には表皮で活発な細胞分裂が見られたが、マーカーの発現は保持されていた。48時間後には吸器の先端の侵入細胞でそのシグナルが消失していた。内皮細胞のマーカーとしてはコシオガマの *CASP1* 遺伝子のプロモーターをクローンして使用した。*CASP1* マーカーはシロイヌナズナの *CASP1* の発現と同様のパターンを示した。興味深いことに、吸器内では *CASP1* の蛍光シグナルが見られなかった。同様にして、維管束幹細胞のマーカーとしては *HB15a*、*HB15b*、*WOX4*、*TDR*、道管細胞のマーカーとして *IRX3* のプロモーターを利用した。宿主を認識して48時間後には吸器の中心で *HB15a*、*HB15b*、*WOX4* などの維管束幹細胞のマーカーの発現が確認できた。これに対し *TDR* は道管結合後に発現が確認された。*IRX3* のシグナルは72時間後の道管結合直前に観察された。

細胞系譜の解析としては表皮と皮層の特異的系譜マーカーを用いて解析し、表皮細胞の一部が侵入細胞に、また皮層細胞の一部が維管束幹細胞および道管細胞に再分化することを示した。侵入細胞についてはレーザーマイクロダイセクション法を用いて、RNA を採取して、RNA-seq 解析をおこなって、侵入細胞特異的に発現する遺伝子群を同定した。そのうち *HSL1*、*GLP1*、*CDR* についてはそのプロモーター活性を蛍光マーカーにより観察し、その特異的発現を確認した。

以上の結果から、吸器発生におけるダイナミックな細胞発生パターンが明らかになった。この結果をもとに、宿主を認識すると宿主に近い側のそれぞれの層の細胞が分裂を開始し、器官が宿主に向かって膨らみ始める。その後、表皮の細胞が侵入細胞へと、また皮層から維管束にかけての細胞が維管束幹細胞を経て道管へと再分化していくという吸器発生仮説を提唱した。

次に、論文提出者は、この細胞発生パターンを説明するため、植物ホルモンであるオーキシンの応答性をオーキシンの応答性マーカーである *DR5* を用いて、そしてオーキシンの流れをオーキシンの排出トランスポーターPIN および流入トランスポーターLAX の発現パターンおよび細胞内局在から解析した。*DR5* シグナルは感染して16時間後に宿主細胞の最も近い表皮細胞で観察されはじめ、20時間後にはその周辺の細胞でも観察された。吸器が膨らむ際にその突端で主に観察されるが、これは誘導性のオーキシン生合成酵素 *YUC3* をコードする遺伝子の発現パターンと一致する。*YUC3* を表皮細胞特異的に発現すると吸器様の器官の発生を誘導できることから、*YUC3* の発現が吸器の初期誘導に十分であることが示された。55時間後には、吸器の中心部で道管細胞が形成される場所に発現が見られる。道管細胞分化のマーカーである *IRX3* と *DR5* の発現パターンが重なることから、道管細胞分化のパターニングにオーキシンが関与することが示唆された。*PIN2* は吸器の突端、*PIN1* は吸器の中心部、*PIN3* はその両方、*PIN4* および *PIN9* は吸器とは無関係に発現することが明らかになり、それぞれの特異性が示された。同様に、*LAX1* は吸器の突端と中心部、*LAX2* は道管細胞が形成される領域、*LAX5* は侵入細胞、*LAX3*, *LAX4* は吸器とは無関係に発現しており、その特異性が明らかになった。オーキシン排出トランスポーター阻害剤である *NPA* を投与すると、吸器突端と維管束付近では道管が形成されるがそれをつなぐ道管は形成されない。また、*NPA* が吸器中心部でのオーキシン応答を阻害していることも *DR5* の発現パターンから確認された。一方で、流入トランスポーター阻害剤を投与すると道管は結合されるが、コシオガマ維管束側の道管細胞の分化パターンが大きく変化することが明らかになった。以上の結果は、オーキシンの生合成とトランスポーターによる局在が吸器発生において非常に重要であることを示した初めての成果となった。

なお、本論文に記載された研究は石田ジュリアーニ、吉田聡子、白須賢との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上、ここに得られた結果の多くは新知見であり、いずれもこの分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、かつ本人が自立して研究活動を行うのに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、若竹崇雅提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。