

(別紙様式博 5)

学位論文要旨

学位授与申請者

松澤 萌

論文題目：植物の新生組織発生モデル「側根形成」における CAP ファミリー遺伝子の機能解析

第 1 章 序論

植物に虫こぶを誘導する因子として、虫こぶ形成昆虫が分泌する CAP タンパク質内の高度に保存された領域を含むペプチド (CAP ペプチド) が同定されている。CAP タンパク質は細菌から昆虫、高等植物に至るまで広範な生物種に保存された分泌タンパク質である。

虫こぶ形成昆虫は、植物との共通因子である CAP タンパク質を介して植物の器官形成プログラムを操作し、虫こぶを形成していることが明らかとなっている。しかしながら、高等植物の CAP タンパク質の機能は、これまで未解明であった。

本研究では、「CAP ペプチドが植物の器官形成プログラムを操作して虫こぶを誘導するならば、植物の内在性 CAP タンパク質も本来の器官形成において重要な役割を担っているのではないか」との仮説を立て、この仮説を検証するために、シロイヌナズナの 22 個の CAP 遺伝子について網羅的な発現解析を行い、特に、側根に発現する CAP 遺伝子について側根形成における役割を解析した。また、シロイヌナズナにおいて低濃度の CAP ペプチドが光合成やストレス応答関連遺伝子の発現を制御することから、CAP ペプチドが植物の発達や環境ストレス耐性に与える影響について調査し、新規ペプチド性バイオスティミュラントとしての実用可能性を検討した。

第 2 章 シロイヌナズナ CAP ファミリー遺伝子の網羅的発現解析

シロイヌナズナゲノム上の 22 種類の CAP 遺伝子について、プロモーターGUS 法を用いた網羅的解析を実施した。その結果、これらの遺伝子は、根やシュートの分裂組織、生殖組織、側根形成部位など、細胞分裂や分化が活発な組織で顕著に発現していた。その中でも特に、側根形成過程で特異的な発現を示す 3 つの CAP5 ファミリー遺伝子 (CAP51, CAP52, CAP53) に着目し、蛍光タンパク質 mNeonGreen を用いたライブイメージング解析の結果、いずれの遺伝子も側根形成予定部位の皮層細胞で発現することが判明した。この結果は、CAP5 遺伝子群が皮層側から側根の発生プロセスを制御している可能性を示唆している。

第3章 シロイヌナズナの側根に発現するCAP遺伝子の機能解析

側根に発現するCAP遺伝子に関して、側根形成における詳細な機能を解析した。初めに、側根開始部位の皮層細胞で発現するCAP52について、保存性の高いCAPペプチド領域を含む推定CAP52成熟ペプチドの発現動態をライブイメージングによって解析した。その結果、側根原基形成前は皮層細胞に局在していたCAP52ペプチドの蛍光が、側根発生に伴い、形成された側根原基の表皮細胞で強く観察された。この結果から、成熟型CAP52ペプチドは、皮層細胞から分泌され側根原基の表皮細胞内へと移行することが示された。次に、側根開始部位に発現した3つのCAP遺伝子(CAP51, CAP52, CAP53)について、CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集によって遺伝子破壊したシロイヌナズナ変異体を解析した。その結果、*cap52,53*二重変異体では野生型と比較して若干の側根数減少が認められた。

一方、発現解析において、側根発生部位付近で発現が見られた2つのCAP遺伝子(CAP34, CAP61)の二重変異体*cap34,61*は、野生型に比べて側根の数が有意に減少していた。CAP34は主根内部の前形成層を構成する細胞の一部で発現が確認され、その発現位置より側根形成が誘導されることが確認された。以上の結果より、これら5つのCAPタンパク質(CAP34, CAP61, CAP51, CAP52, CAP53)が協調的に側根形成に関与しており、特に、CAP34は、側根発生予定位置の前形成層細胞からの分泌を介して、側根創始細胞の誘導を担う鍵因子である可能性が示唆された。

第4章 CAPペプチドが植物にもたらすバイオスティミュラントとしての効果

高度に保存された6残基のアミノ酸からなるCAPペプチドの施用が、植物の生理作用に与える影響を評価した。低濃度(10 nM)のCAPペプチドを処理したシロイヌナズナで、クロロフィル濃度および光化学系IIの最大量子効率(Fv/Fm)が有意に増加し、葉面積や側根数も有意に増加していた。これらの結果から、適度な濃度のCAPペプチド処理は、光合成反応を促進することにより植物の成長を増強することが明らかとなった。

また、環境ストレス耐性への影響を調査した結果、10 nMのペプチド処理群では高温ストレス(44°C, 4時間)に対する生存率が向上し、窒素欠乏条件下においても正常に生育する個体率が顕著に高まった。これらの知見は、適正濃度のCAPペプチド処理が、光合成活性の向上とストレス応答系の強化を両立させるバイオスティミュラントとして極めて有効であることを示している。

第5章 総合考察

本研究により、CAP遺伝子が、様々な発達初期の組織で顕著に発現し、中でも5つのCAPタンパク質(CAP34, 61, 51, 52, 53)が、シロイヌナズナの側根形成に関与することが明らか

となった。今後は、CAP ペプチドの受容体や下流のシグナル伝達経路を特定することで、CAP タンパク質/ペプチドが制御する分子機構の全容の解明が進むと考えている。

また、CAP ペプチドの低濃度処理は、シロイヌナズナにおいて光合成反応を活性化し、成長を促進するとともに、高温ストレスなどの環境ストレス耐性を付与することが明らかとなった。これらの結果は、植物内在性の CAP タンパク質が、植物の発達やストレス応答に関与するという考えをさらに裏付けるものである。また、この結果は、CAP ペプチドが植物の成長と防御の両面を支えることで、低コストかつ環境負荷の少ない安全なバイオスティミュラントとして利用できることを示している。

CAP タンパク質は、哺乳類において生殖や多様な疾患への関与が報告されており、将来的には植物にとどまらず様々な生物における CAP タンパク質の機能解明が重大な発見につながる可能性を秘めており、本研究は、真核生物における CAP タンパク質の機能の理解の第一歩を示すものである。