

|           |   |         |       |
|-----------|---|---------|-------|
| 氏名        | Dutta Amit Kumar  |         |       |
| 学位の種類     | 博士 (理学)   |         |       |
| 学位記番号     | 自博乙第3号  |         |       |
| 学位授与年月日   | 令和7年3月19日   |         |       |
| 学位授与の要件   | 学位規則第4条第2項  |         |       |
| 文部科学省報告番号 | 乙第357号  |         |       |
| 学位論文題目    | Molecular characterization of <i>SHA1</i> encoded AtRecQ15 protein and expression analyses of <i>AtRecQ1</i> and <i>AtExLRR</i> genes to reveal their roles in development and stress response in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ <i>SHA1</i> 遺伝子 (AtRecQ15)、 <i>AtRecQ1</i> 遺伝子群、 <i>AtExLRR</i> 遺伝子群の発現解析と発達およびストレス応答における機能解析) |         |       |
| 論文審査委員    | 主査  | 島根大学教授  | 中川 強  |
|           |   | 島根大学教授  | 赤間 一仁 |
|           |   | 島根大学教授  | 丸田 隆典 |
|           |   | 島根大学准教授 | 西村 浩二 |

## 論文内容の要旨

The stomata are specialized epidermal minute aperture structures surrounded by twin guard cells involved in gas exchange between plants and their surroundings. In this study, an EMS mutant *shabondama1* (*sha1*) in *Arabidopsis thaliana* was identified, with a single guard cell stomata phenotype. Molecular analysis revealed that the *SHA1* gene encodes a DEAD/DEAH box helicase family protein, AtRecQ15. Loss of SHA1 function showed severe growth reduction and less photosynthesis capacity during development. Here, the result uncovered that SHA1 is a nuclear protein that functions in the stage of meristemoid to guard mother cell (GMC) during the development of guard cells. A single 4C nucleus containing defective *sha1* guard cells confirms that the mutant phenotype blocked division of GMC. Furthermore, the transcript result showed that the most G2/M marker gene expression increased, and stomata differentiation gene MUTE showed the highest downregulation in the *sha1* background. The growth reduction, ploidy distribution, cell size and number, and differences in transcriptome profiles of *sha1* were strongly associated with endoreduplication. Those findings indicated that *SHA1* has a vital role in cell cycle progression and cell proliferation by reducing cell number in the mutant background. In summary, these results demonstrate that the nucleus-localized

SHA1 promotes symmetric division in the Arabidopsis stomatal lineage.

Helicases are omnipresent enzymes that play distinct roles by being involved in almost every process of nucleic acid metabolism. Through recombination, repair, and replication of DNA, a family of helicase proteins known as RecQ helicase is critical for preserving genome integrity. These genome surveillance proteins have conserved all living organisms, from bacteria to humans, regarding their widespread structure and functions. This work examined five *A. thaliana* RecQ-like (*AtRecQ*) genes, demonstrating a range of functional diversity as well as a variety of structural and physiochemical characteristics. The findings of promoter analysis, GO annotation, and the functional interaction network prediction of *AtRecQ* indicated that *AtRecQ* interacted with and was controlled by the regulators involved in multiple plant growth and abiotic stresses, demonstrating their crucial role in plant development and various stress responses. Using structural analysis and molecular dynamics (MD) modelling, projected models of *AtRecQ*s were exposed and validate. Limited coordinate movements were shown by the PCA values, showing stability over the course of the experiment. The proteins displayed thermodynamically stable structures throughout the simulation.

The *ProAtRecQ1:GUS* expression analysis during the vegetative and reproductive development stages exhibited a range of tissue-specific expressions with some strong and sharp cutoffs. Out of five tissues, reproductive tissues had noticeably elevated transcript levels of *AtRecQ*s, suggesting a role for these proteins in reproduction. Real-time gene expression was performed in response to drought, cold, heat, NaCl, mannitol, and UV stress to provide insight into the functional involvement of *AtRecQ*s. It is evident that *AtRecQ*s expression has evolved at various time points of different stress conditions. Changes in the transcript level of *AtRecQ*s in response to abiotic stressors suggest the possible roles of these proteins in response to diverse stimuli. The stress responses of the *AtRecQ12* and *AtRecQ13* genes were investigated using T-DNA insertion mutants. Several characteristics, such as fresh weight, root length, and germination rate, showed noticeably lower in mutants (*atrecq12s* and *atrecq13*) than in the wild-type at various salt stress concentrations. Furthermore, relative electrolyte leakage was investigated after being subjected to the freezing stress of mutants and WT plants, where the mutant plant exhibited sensitivity to cold during post-germination seedling growth stages. All things considered, the current data demonstrate that *AtRecQ*s are positive regulators of abiotic stress tolerance during the post-germinative and germinative phases.

Leucine-rich repeat (LRR)-containing proteins have been identified in diverse species, including plants. The diverse intracellular and extracellular LRR variants are responsible for numerous biological processes. We analyzed the expression patterns of *A. thaliana* extracellular LRR (*AtExLRR*) genes, ten receptor-like proteins (RLPs), and four additional genes expressing the

LRR-containing protein by a promoter: $\beta$ glucuronidase (GUS) study. According to *in silico* expression studies, several *AtExLRR* genes were expressed in a tissue- or stage-specific and abiotic/hormone stress-responsive manner, indicating their potential participation in specific biological processes. Based on the promoter:GUS assay, *AtExLRRs* were expressed in different cells and organs. A quantitative real-time PCR investigation revealed that the expressions of *AtExLRR3* and *AtExLRR9* were distinct under various abiotic stress conditions. This study investigated the potential roles of extracellular LRR proteins in plant growth, development, and response to various abiotic stresses.

This study identified an altered stomata phenotype *sha1* in *Arabidopsis thaliana*. SHA1 encoded *AtRecQ15* protein is responsible for stomata terminal division and promotes G2/M transition in the cell cycle. Subsequent research revealed that *AtRecQ1* genes have distinct tissue-specific expressions and serve as critical regulators of abiotic stress tolerance during the germinative and post-germinative phases. Furthermore, the expression of several LRR-containing proteins was examined; LRR-proteins are involved in various biological processes, such as stomata development. The results suggested that the extracellular LRR proteins may impact different abiotic stress responses and plant development. With regard to plant improvement, the study revealed novel roles for the *AtRecQ1* and *AtExLRR* genes.

## 論文審査結果の要旨

本論文は、植物の重要な構造である気孔の発達に関与するシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 遺伝子の同定と機能解析、関連遺伝子の性質及び相互作用予測、関連遺伝子の発現とストレス応答の解析を行った結果をまとめたものであり、6章から構成されている。

第1章は序論で、気孔の重要性、シロイヌナズナの気孔発達に関与する様々な遺伝子、細胞周期の制御、DNA修復に関わる *RecQ* タンパク質と植物におけるホモログ (*RecQ1*) の説明、及び研究目的が記されている。

第2章では、シロイヌナズナの気孔変異体 *shabondama1 (sha1)* の表現型解析、原因遺伝子同定、*SHA1* 遺伝子機能解析の結果がまとめられている。Amit氏は、*sha1* 変異体で観察される異常な単一孔辺細胞ではDNAが倍化した1核の状態(細胞周期がM期の前で止まっている状態)になっていることをあきらかにした。次いで原因遺伝子が *RecQ* ホモログの一つである *AtRecQ15* であることを突き止め、同遺伝子が気孔系譜(孔辺細胞前駆体)をはじめ様々な部位で発現すること、同遺伝子産物が細胞核に局在することを見いだした。さらに網羅的遺伝子発現解析を行い、*AtRecQ15 (SHA1)* がG2-M期の制御を行うサイクリン遺伝子群の発現調節に関わる重要な機能を持つことを示している。

第3章では、シロイヌナズナ *AtRecQ1* 遺伝子群について塩基およびアミノ酸配列情報とデータベースを駆使した解析を行い、それぞれのタンパク質の性質や相互作用の予測について報告している。

第4章では、シロイヌナズナ *AtRecQ1* 遺伝子群の発現と機能に関する研究結果が報告されている。同遺伝子群の詳細な発現解析を行い、植物の発達段階において様々な組織、細胞で発現すること、塩ストレスなど非生物ストレスに応答して発現することをあきらかにした。さらに塩ス

トレス下で *AtRecQ12* と *AtRecQ13* 遺伝子破壊株の発芽や発芽後成長が阻害されることを見だし、*AtRecQ12* と *AtRecQ13* が非ストレス耐性に関与することが示されている。

第5章では、孔辺細胞の発達に関与するロイシンリッチリピート含有タンパク質の探索として、シロイヌナズナ細胞外ロイシンリッチリピートタンパク質遺伝子 (*AtExLRR* 遺伝子) について網羅的発現解析の結果が報告されている。気孔系譜で特異的に発現する *AtExLRR* 遺伝子や様々な組織や細胞で発現する *AtExLRR* 遺伝子、また、ストレスに応答して発現する *AtExLRR* 遺伝子の存在もあきらかにされ、同遺伝子群の孔辺細胞発達や各種植物組織発達への関与、ストレス応答への関与が示されている。

第6章では、本研究成果の内容が要約され、植物の発達とストレス応答における *AtRecQ1* 遺伝子と *AtExLRR* 遺伝子の重要性についてまとめられている。

以上のように本論文は、植物の気孔発達に関与する遺伝子とそのホモログおよび関連遺伝子について分子生物学的解析を行ったものである。数種の遺伝子についてその機能をあきらかにするとともに、今後他の遺伝子の機能を解明する上で重要な知見となる網羅的発現解析の情報も提供しており、学術的に大きな価値を持つものと判断できる。得られた成果の一部は申請者を筆頭著者とする関連論文として査読付き英語学術誌で公表されており、公聴会・最終試験における発表と質疑応答でもその内容の新規性および重要性が認められた。また最終試験にて、十分な学力を有することも確認された。以上から判断して、申請者の論文は博士の学位授与に相応しいものと審査委員全員一致で判定した。