

氏名	門田 宏太
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	自博甲第 23 号
学位授与年月日	令和 8 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項
文部科学省報告番号	甲第 887 号
専攻名	創成理工学専攻
学位論文題目	サイトカニンを介した植物の全身的な窒素応答機構 (Systemic nitrogen response via cytokinin in plants)
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 蜂谷 卓士

論文内容の要旨

窒素は植物の成長を規定する栄養素であり、畑土壌の好気的環境では、硝酸イオンが植物に吸収される主要な窒素源である。硝酸イオンは窒素栄養として利用されるだけでなく、シグナル分子としても機能する。さらに、硝酸応答の二次シグナルとしてサイトカニン (CK) が重要な役割を果たすことがわかっている。CK 側鎖構造には多様性があり、シロイヌナズナではトランスゼアチン (*tZ*) 型とイソペンテニルアデニン (*iP*) 型が主要な分子種である。道管液には *tZ* 型 CK が、師管液には *iP* 型 CK が多く含まれることから、CK は器官間シグナルとして機能する可能性が示されている。また、硝酸応答を介して CK 合成酵素 *IPT3* と *CYP735A2* の発現は誘導されることが知られている。これらの知見から、*tZ* 型 CK は根の窒素栄養状態を地上部へ、*iP* 型 CK は地上部の窒素栄養状態を根へ伝達するシグナルとして働くのではないかと考えられている。

硝酸応答を介した根から地上部の *tZ* 型 CK の輸送調節には、硝酸応答性転写因子 *NLP7* と CK 輸送体 *ABCG14* が中心的な役割を果たす。一方で、根から地上部の *tZ* 型 CK の輸送量を調節するフィードバック機構については不明であった。これまでの研究により、CK 受容体 *AHK2* と *AHK3* を根特異的に欠損させたシロイヌナズナでは、根とともに地上部の *tZ* 型 CK 濃度が上昇することを見出している。さらに、*in silico* 解析により *AHK3* が *NLP7* と高い共発現性を示すことが明らかとなり、*AHK3* が硝酸応答と強く関連して機能する可能性が示唆された。そこで第 1 章では、硝酸応答を介して根から地上部の *tZ* 型 CK の輸送量を調節するフィードバック制御因子の候補として *AHK3* に着目し、その機能解明を目ざした。そこで、接ぎ木により作製した根特異的に *AHK3* が欠損したシロイヌナズナを用いて、成長解析、オミクス解析、硝酸シグナルの有無の影響を検証可能な系での解析を実施した。その結果、根特異的な *AHK3* の欠損により、根の CK 分解酵素遺伝子

CKX4 の発現量が減少し、根の *tZ* 型 CK 濃度が上昇した。根における *CKX4* の発現は、硝酸シグナルと *AHK3* を介した CK シグナルにより誘導された。さらに、根特異的な *AHK3* の欠損により、道管液の *tZ* 型 CK 濃度が上昇したとともに、地上部の CK 応答性遺伝子 *ARR5* の発現量と葉の CK 応答性も上昇した。加えて、根特異的な *AHK3* の欠損により、葉面積が増加し、これは硝酸シグナルと根由来の *tZ* 型 CK シグナルに依存して制御されていた。また、根特異的な *CKX4* の欠損によっても、葉面積が向上し、*AHK3* と *CKX4* の両方を根特異的に欠損させたシロイヌナズナでは、葉面積は相加的に増加しなかった。以上のことから、*AHK3*-*CKX4* モジュールを介した *tZ* 型 CK の感知と分解が、硝酸応答を介して根から地上部の *tZ* 型 CK の輸送量を調節するフィードバック制御因子として機能することが明らかになった。

これまでの研究から、地上部特異的に硝酸イオンが蓄積したシロイヌナズナでは、地上部の *IPT3* の発現量と *iP* 型 CK 濃度がともに増加することが知られていたが、その生理的役割は不明であった。そこで第二章では、地上部の硝酸充足により発現誘導される *IPT3* が、*iP* 型 CK を介して局所的小よび全身的にどのような影響を及ぼすか解明することを旨とした。そこで、硝酸還元酵素 *NIA1/2* 欠損株と *IPTs* 欠損株を用いた接ぎ木実験および培地の窒素栄養濃度の経時的な操作実験を組み合わせて、地上部特異的に硝酸シグナルと *IPT3* 発現を制御可能な実験系を開発した。そして、この系で栽培した接ぎ木植物を用いて、成長解析とオミクス解析を実施した。その結果、地上部の硝酸充足時には、地上部の *IPT3* を介して *iP* 型 CK 濃度が増加したとともに、地上部の成長が増加した。さらに、地上部の硝酸充足を介して制御される遺伝子発現は、地上部の *IPT3* によりさらに調節され、その効果は地上部と根で逆方向に作用していた。加えて、地上部の硝酸充足時には、地上部の *IPT3* を介して地上部の硝酸イオン誘導性遺伝子の転写応答が増強した一方で、根の硝酸イオン輸送・同化遺伝子の転写応答は減弱した。以上のことから、地上部の硝酸充足により発現誘導される *IPT3* が、*iP* 型 CK を介して地上部の窒素利用能と成長および根の窒素獲得能を調節することが明らかになった。

以上の研究により、CK を介した植物の全身的な窒素応答機構に関する理解が大きく前進したとともに、植物の窒素利用効率の向上に向けた有望な標的遺伝子の発見につながった。

論文審査結果の要旨

本論文は、植物における窒素栄養応答の全身制御機構について、サイトカイニン (CK) を介した根—地上部間のシグナル伝達に着目して解析したものである。とくに、硝酸応答により誘導される CK の分子種特異的な機能と、その輸送およびフィードバック制御機構について、シロイヌナズナを材料とした分子遺伝学的解析ならびにオミクス解析を通して詳細に検討している。接ぎ木という古典的手法に現代の分子生物学的アプローチを融合させることで、器官間における遺伝子の相互作用を空間的に切り分けて解析することに成功している。

第1章では、硝酸応答を介した根から地上部へのトランスゼアチン (*tZ*) 型 CK の輸送を制御する新規フィードバック機構の解明を目的として、CK 受容体 *AHK3* に着目した解析が行われた。根特異的に *AHK3* を欠損させた接ぎ木植物を用いた解析の結果、*AHK3* の欠損により CK 分解酵素遺伝子 *CKX4* の発現が低下し、根および道管液中における *tZ* 型 CK 濃度が上昇することが

示された。さらに、これに伴って地上部の CK 応答性遺伝子の発現および葉面積が増加することが明らかとなった。以上の結果から、根における AHK3–CKX4 モジュールが、硝酸応答に依存した *EL* 型 CK 輸送量の負のフィードバック制御因子として機能することが示された。

第 2 章では、地上部の硝酸充足時に誘導される IPT3 の生理的役割について、イソペンテニルアデニン (iP) 型 CK を介した局所的小および全身的制御の観点から詳細に検討された。硝酸シグナルおよび *IPT3* 発現を地上部特異的に制御可能な実験系を構築して解析を行った結果、地上部の硝酸充足により *IPT3* 依存的に iP 型 CK が増加し、地上部の成長ならびに硝酸応答遺伝子の発現が促進されることが示された。一方で、根における硝酸輸送・同化関連遺伝子の発現は抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、iP 型 CK が地上部の窒素利用能と成長を高めると同時に、根の窒素獲得能を調節する全身シグナルとして機能することが示された。

以上のように本論文では、植物の硝酸応答における CK を介した全身的制御機構について、その中核を担う分子機構の同定に成功している。得られた成果の一部は、申請者を筆頭著者兼責任著者とする関連論文として査読付き英語学術誌 (Q1) に公表されており、当該分野において学術的に大きな価値を有するものと判断された。申請者独自の実験系を用いた解析アプローチについても新規性および独創性が高く評価された。公聴会および最終試験における発表と質疑応答においても、その内容の完成度および学術的意義が十分に確認された。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。