



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular genetic studies on Transmembrane Nine 1 for rhamnogalacturonan II deposition in <i>Arabidopsis thaliana</i> [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	廣口, 覚彦
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	乙第7129号
Issue Date	2021-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82404
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	HIROGUCHI_Akihiko_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士（環境科学）

氏名 廣口 寛彦

審査委員	主査	准教授	三輪 京子
	副査	教授	森川 正章
	副査	教授	山口 良文
	副査	特任准教授	山崎 健一
	副査	教授	藤田 知道（大学院理学研究院）

学位論文題名

Molecular genetic studies on *Transmembrane Nine 1*
for rhamnogalacturonan II deposition in *Arabidopsis thaliana*
(ラムノガラクトンII合成におけるシロイヌナズナ*Transmembrane Nine 1*の
分子遺伝学的研究)

本論文は植物細胞における細胞構造維持および細胞接着を担うペクチン質多糖ラムノガラクトンII（RG-II）の合成に焦点をあて、RG-II合成に関わる新規分子の同定を目指したものである。モデル植物シロイヌナズナを用いた遺伝学的手法により、植物体における機能が未解明であったゴルジ体局在膜タンパク質TMN1（*Transmembrane Nine 1*）が植物細胞壁ペクチン合成に働き、植物個体の正常な成長に必須であることを明らかにした。

植物の一次細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、ペクチンから主に構成されている。ペクチンにはホモガラクトン（HG）、RG-I、RG-IIという多糖の領域がある。カルシウムイオンによるHGの架橋およびハウ酸によるRG-IIの架橋により、ペクチン質多糖のネットワークが形成され、ペクチンはゲルとしてセルロース繊維を接着する機能を担う。ハウ酸によるRG-II架橋は正常なペクチン形成に必須であり、ハウ素欠乏環境においてはRG-II架橋減少によって植物体の成長抑制が起こる。RG-IIを含むペクチン質多糖は、ゴルジ体で糖転移酵素によって合成され、小胞輸送によって細胞外に放出されると考えられている。RG-IIは高度に複雑な構造をもち、その構造は植物で保存されている。RG-IIはペクチン質多糖として植物の成長に必須であることは明らかにされてきたが、RG-II合成の分子機構の全体像は不明であった。既知のRG-II合成変異株にはハウ素栄養応答が変化する株があることから、先行研究でハウ素栄養依存的な成長に異常を示すシロイヌナズナ変異株が単離された。本論文では2株を対象として遺伝学および生理学的な解析を実施することにより、RG-II合成に関与する新たな分子の同定を目的とした。

対象としたシロイヌナズナ変異株は、固形培地において低濃度ハウ素条件下で野生型株と比較して主根伸長抑制が緩和された。一方、通常ハウ素条件では変異株の主根は野生型株と比較して伸長抑制を示した。遺伝学的解析から2つの変異株の原因変異が*TMN1*の一塩基置換

であることが明らかにされた。一方の変異株*tmn1-1*ではエキソン上に終止変異が存在し、もう一方の変異株*tmn1-2*ではイントロンのスプライスドナーサイトに変異が存在し、その結果、*tmn1-2*のcDNAにはpremature stop codonが生じた。*TMN1*にT-DNA挿入をもつ*tmn1-3*も同様の主根伸長の変化を示したこと、*tmn1-1*における相補性試験から、*TMN1*の機能欠損が主根のホウ素栄養応答変化の原因であることが示された。変異株の主根伸長変化は細胞伸長変化に起因することに加え、変異株では根冠の脱離が正常に起こらず接着したままであることが示された。*TMN1*相同遺伝子は真核生物で保存されているが、シロイヌナズナではゴルジ体への局在が報告されているものの植物体における生理的な機能は明らかにされていなかった。

*TMN1*変異株の成長を長期間の水耕栽培で観察したところ、固形培地と同様に低濃度ホウ素条件において根の伸長抑制の緩和が認められた。一方、低濃度、通常、高濃度のいずれのホウ素条件においても変異株のロゼット葉および根の乾燥重量は野生型株と比較して減少した。低濃度ホウ素条件の根の伸長の点においては変異株ではホウ素栄養応答が変化しているが、*TMN1*変異株の成長はホウ素条件とは関係なく常に抑制されており、*TMN1*が正常な植物個体の成長に必要であることが明らかにされた。

*TMN1*変異株のロゼット葉および根から抽出した細胞壁画分のホウ素濃度を測定したところ、変異株で減少が観察され、ホウ酸架橋されたRG-II量の低下が考えられた。変異株の細胞壁においてホウ酸によるRG-IIの相対的な架橋率の減少は観察されなかった一方で、RG-II特異的な糖の量は20-30%減少した。さらにRG-II抗体を用いた免疫染色によって*TMN1*変異株の根ではシグナル強度が低下したことから、変異株での細胞壁におけるRG-II量の低下が示され、*TMN1*変異株の成長抑制の一因はRG-II減少であると考えられた。さらに産業技術総合研究所との共同研究によるロゼット葉の細胞壁中の単糖組成分析において、変異株のラムノース量の減少が観察され、RG-Iの減少が考えられた。これらの結果より、*TMN1*が細胞壁ペクチン質多糖のRG-IIやRG-I量の維持に必要であることが明らかにされた。さらに、GFPを連結した*TMN1*の細胞内局在の観察から、*TMN1*は主にゴルジ体に局在しており、*TMN1*はペクチンの細胞外へ輸送という過程よりも、ゴルジ体でペクチンを生合成する過程に機能していると考察された。

本学位論文は、機能未知であった植物の*TMN1*タンパク質がペクチン質多糖のRG-IIとRG-I合成において重要な因子であり、*TMN1*が植物の正常な成長に必須であることを示した。さらに、低濃度ホウ素条件における植物の成長がペクチン量によって変化することを支持した。本成果は生産者である植物の成長の分子機構に新しい知見を与えるものであり、植物生理学および環境科学として高い価値を有する。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。