



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（理学）
報告番号	甲第1657号
学位記番号	第18号
氏名	應 夢超
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	オオムギ低温応答性遺伝子 CISP の機能 Function of novel cold-induced CISP genes in barely
論文審査担当者	主査： 木藤 新一郎 副査： 田上 英明、櫻井 宣彦、中園 幹生

学位論文内容要旨 (1/2)

氏名	應 夢超	提出年月日	平成30年1月11日
主論文名	オオムギ低温応答性遺伝子 <i>CISP</i> の機能		
<p>過酷なストレス環境に曝された植物では、多様なストレス応答遺伝子が特異的に発現し、細胞内の代謝や恒常性を維持するのに役立っている。低温環境に於かれた植物でも多くの低温応答遺伝子が発現しているが、それらの多くは機能が不明である。本研究で対象とした <i>CISP</i> も低温応答性の遺伝子で、オオムギの低温耐性に関わることが期待されているが、その機能については推測の域を出ていない。本研究では、低温をはじめとする各種ストレス条件下におけるオオムギ <i>CISP</i> の発現様式や、当該遺伝子を人為的に過剰発現させた形質転換植物の形質を調べ、<i>CISP</i> の機能解明に挑んだ。</p> <p>はじめにデータベースを利用した解析を行った結果、オオムギには当研究室で単離同定された <i>CISP1</i> 以外に2種類のホモログ (<i>CISP2</i>, <i>CISP3</i>) が存在することが明らかとなった。また、これら <i>CISP</i> 遺伝子と全体を通じて相同な遺伝子はムギ類をはじめとした寒冷地適応型のイネ科植物にしか存在しないことが判明した。よって、<i>CISP1</i> とそのホモログは、寒冷地適応型のイネ科植物が低温耐性を獲得するのに重要な役割を果たしていると確信した。そこで、<i>CISP1</i> がコードするタンパク質の機能推定を目的に、オオムギの実生を用いて器官別に <i>CISP</i> の発現様式を調べた。その結果、<i>CISP1</i> の主な発現部位は根であることが明らかとなった。一般に、植物の低温耐性は直接外気温にさらされる地上部の葉や茎頂分裂組織で生じると考えられており、この結果は予想外であった。ただし、根は植物にとって大切な水や養分の吸水器官であり、それらの代謝や地上部へ運搬、そして貯蔵に重要な役割を任っている。よって、根にも低温などのストレスに打ち勝ち生命活動を維持するための未知なる機構が存在しているはずであり、<i>CISP</i> はその機構に関わっている可能性が高い。次に、オオムギが持つ3種類の <i>CISP</i> の低温応答性を詳細に調べた。その結果、すべてが数週間にわたる長期の低温処理に伴い根で顕著に発現上昇することが明らかとなった。長期の低温環境は植物に酸化ストレスを与えるため、酸化ストレスによる影響も疑われたが、過酸化水素を用いた実験で <i>CISP</i> の発現は長期の低温に特異的に応答していることが確認できた。オオムギは一定期間低温に曝されると低温順化して低温耐性を獲得することが知られているが、<i>CISP</i> の発現誘導時期はオオムギが低温順化する時期と重なることから、その関連性が強く示唆された。また、植物体を低温環境から常温に戻すと <i>CISP</i> の発現が1時間以内に停止することが明らかとなった。この結果から、<i>CISP</i> の翻訳産物である <i>CISP</i> タンパク質は低温環境下では必要であるが、通常の生長条件下においては有害な作用をしていると予想できる。次に大腸菌で人工合成した <i>CISP</i> タンパク質</p>			

(システム自然科学研究科)

学 位 論 文 内 容 要 旨 (2 / 2)

氏 名	應 夢超	提出年月日	平成30年1月11日
主論文名	オオムギ低温応答性遺伝子 <i>CISP</i> の機能		
<p>を利用して解析を行った結果、<i>CISP</i> タンパク質と一本鎖 RNA との結合が確認できた。この結果は、<i>CISP</i> タンパク質は低温下で mRNA と結合して mRNA の分子内二次構造の形成を阻害する RNA シャペロンであることを強く示唆する。この仮説が正しければ、通常の生育条件下で <i>CISP</i> が発現するとタンパク質の合成阻害が生じることから、常温で <i>CISP</i> の発現が停止するのも理解できる。</p> <p>一方、<i>CISP</i> は低温以外のストレスにも発現応答する可能性が示唆されていたため、本研究では過剰な塩や重金属に対する発現応答も解析した。その結果、<i>CISP</i> 遺伝子はそれらのストレス条件に対しても発現応答することや、その応答部位が低温に対する応答とは異なり、葉で顕著であることが明らかとなった。よって、<i>CISP</i> はそれらストレスに対する耐性にも関与すると考えられるが、発現部位が異なることや応答レベルが低いことから、RNA シャペロン以外の機能で対処している可能性が高い。一般に、重金属ストレスに対して発現上昇する遺伝子の機能は金属イオンの吸収、排出、輸送、代謝などに関わっていると考えられる。そのうち、<i>CISP</i> がどの機能に関わっているから不明であるが、リーフディスクアッセイの結果で、<i>CISP</i> を過剰発現させると植物の重金属耐性が下がることが確認できたことから、蓄積に関与する可能性が最も高いと考えられる。そこでこの仮説を検証するため、コントロールと共に <i>CISP</i> を過剰発現させたイネを過剰な重金属を含む培地で2週間栽培した後、それら葉を回収して原子吸光分析法により重金属含量を測定した。その結果、コントロールに比べて、<i>CISP</i> の過剰発現系統では銅やマンガンの含有量が増加していることが確認できた。この結果から、<i>CISP</i> は根から吸収した金属を蓄積する働きを持つ可能性の高いことが明らかとなった。</p> <p>以上の結果から、<i>CISP</i> はオオムギで二つの機能を持つと考えている。一つは低温耐性の向上で、低温下で発現誘導された <i>CISP</i> が細胞内の mRNA と結合し、分子内二次構造の形成を阻害することで翻訳活性を維持する働きである。もう一つは、金属イオンの貯蔵であるが、残念ながら本研究ではその詳細な分子機構を推察するための解析結果を得られなかった。ただし、金属イオンの吸収や貯蔵は植物の養分吸収にとって非常に重要な機構であり、<i>CISP</i> がその促進に関与することは明らかである。今後 <i>CISP</i> の研究が進んでさらに詳細な機能が明らかとなれば、低温耐性の向上や養分吸収の向上を目指した作物の分子育種につながると期待できる。本研究はその礎となる重要な知見を見出したと考えている。</p>			

博士論文審査結果の要旨及び最終試験結果の要旨

論文提出日	平成 30年 1月 11日
学位試験日	平成 30年 2月 22日

受付番号	1	論文提出者	應 夢超
博 士 論 文 審 査 結 果			
学 位 審 査 委 員	主 査 木藤新一郎	副 査 田上英明、櫻井宣彦、中園幹生 (名古屋大学)	
主論文題目	オオムギ低温応答性遺伝子 <i>CISP</i> の機能		
論文審査結果の要旨			
<p>オオムギは、低温耐性など優れた環境適応能力を持つ植物である。本論文では、低温下で栽培したオオムギで発現する遺伝子 <i>CISP</i> に着目し、その機能解析を行っている。そして、<i>CISP</i> が低温耐性をもつムギ類特有の遺伝子であることや低温順化した根で特異的に発現上昇することを明らかにしている。また、<i>CISP</i> 遺伝子を導入して過剰発現させてシロイヌナズナの低温耐性が有意に上昇することも確認している。以上の結果に加えて <i>CISP</i> 遺伝子がコードする <i>CISP</i> タンパク質が RNA との結合能力を持つことから、本論文では、<i>CISP</i> は低温環境に曝されたオオムギの根で RNA が分子内二次構造を形成するのを抑制するために働く遺伝子であるとの仮説を提案している。さらに、本論文では <i>CISP</i> 遺伝子が過剰な重金属存在下でも発現上昇することに着目して解析を進め、<i>CISP</i> 遺伝子が根の分裂組織における重金属の貯蔵に関与することを示唆する結果を導き出している。これらの結果は、オオムギが低温順化する過程で <i>CISP</i> 遺伝子が担っている役割や環境適応における根の重要性を理解する上で新規かつ重要な知見であり、博士論文として評価できる。</p>			
最 終 試 験 結 果			
最終試験 担当者	主 査 木藤新一郎	副 査 田上英明、櫻井宣彦、中園幹生 (名古屋大学)	
最終試験結果の要旨			
<p>公聴会では研究内容をわかりやすく説明しており、質疑に対する応答も概ね的確であった。公聴会後の審査会でも、審査委員からの専門的な質問に対して研究成果や文献等から得た専門知識に基づいて的確に答えており、本研究科の学位授与に値する研究能力と学識を有していると評価できる。よって、審査委員会は申請者が合格に値すると判断する。</p>			