

論文内容要旨

報告番号	甲 先 第 367 号	氏 名	橋本諒典
学位論文題目	植物非生物ストレスにおける葉緑体局在性NADキナーゼ遺伝子の機能解析		
<p>NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) と NADP はすべての生物で種々の生合成反応やエネルギー代謝に必須の補酵素である。NAD キナーゼ (NADK) は NAD と ATP から NADP を合成する鍵酵素であり、植物には 3 種の主要な NADK が存在することが示されている。葉緑体局在性 NADK2 はエネルギー代謝やクロロフィル合成に影響を与えていると考えられているが、NADK2 の機能の詳細は未だ明らかになっていない部分が多く、機能解明により有用な物質生産や光合成機能の増強に役立つと期待できる。私自身が修士論文で行った先行研究では、重要な園芸作物の一つであるトマト (<i>Solanum lycopersicum</i>) において 2 種の葉緑体局在性 NADK2 (SINADK2A および SINADK2B) が存在することを示し、<i>slnadk2a</i> 遺伝子破壊株の作製を行った。本研究では、トマトにおける NADK2 の機能解明を目的とし、SINADK2 の機能解明を目指して <i>slnadk2a</i> 変異体の表現型解析と、多重ゲノム編集システムによる <i>slnadk2a/2b</i> 二重変異体作製を行った。さらに、モデル植物であるシロイヌナズナにおける NADK2 (AtNADK2) の環境ストレスにおける役割を明らかにするために、<i>atnadk2</i> 変異体における乾燥ストレス条件でのトランスクリプトーム解析およびメタボローム解析と AtNADK2 の機能制御に関わる相互作用因子の探索について研究を行った。</p>			
<p>第 1 章では、<i>slnadk2a</i> 変異体の表現型解析および <i>slnadk2a/2b</i> 二重変異体作製のための多重ゲノム編集システムの構築をと、<i>slnadk2a/2b</i> 変異体の作製を行った。CRISPR/Cas9 システムは任意の標的へ特異的に変異を導入できるため、広く植物の遺伝子機能解析に利用されている。修士論文において CRISPR/Cas9 システムにより作製した <i>slnadk2a</i> 変異体の表現型解析では、<i>slnadk2a</i> 変異体は、これまで <i>atnadk2</i> 変異体で示されたように (Takahashi et al. 2009)、クロロフィル量の減少が見られ、さらに野生型植物と比較し伸長生長が抑制されることがわかった。これらの表現型は、SINADK2A の機能欠失は AtNADK2 の機能欠失と同様にクロロフィル合成および生育に負の影響を及ぼすと考えられる。一方で、本葉の発達に差は見られなかった。伸長成長の抑制は、生育 4 週目以降に顕著となり、NADK2 が成長発達の過程の中で特異的に機能する段階があることが示唆された。さらに、成熟した個体における花の数について計数したところ、<i>slnadk2a</i> 変異体では花芽の数が少ないことがわかった。果実の色および形は野生型植物と <i>slnadk2a</i> 変異体に差は見られなかった一方で、<i>slnadk2a</i> 変異体では果実あたりの種子数が 50% に減少していた。SINADK2A のみの欠失でトマト個体の成長に影響を与えることが明らかになったが、次に、2 種の SINADK2 の機能欠損による影響を明らかにするために、CRISPR/Cas9 を利用した多重ゲノム編集システムを構築し、<i>slnadk2a/2b</i> 二重変異体の作製を試みた。まず、多重ゲノム編集を行うために、tRNA プロセッシングを利用して複数の gRNA を同時に発現させるシステムの構築を行った。tRNA プロセッシングにより gRNA を発現させ、それぞれ組織特異性の異なる 4 種のプロモーターを Cas9 の発現に用いた多重ゲノム編集ベクターを構築し、トマトカルスにおいて多重ゲノム編集による変異導入を比較した。SINADK2A 遺伝子のエクソン上の 2 箇所を標的とする gRNA を設計してベクターに挿入し、導入した植物体における変異解析を</p>			

行った。2箇所の gRNA 間の塩基欠失について PCR により解析したところ、*SIEF1α* プロモーターを使用した場合に、解析した 30% の形質転換カルスで gRNA 間 1.1 kb が完全に欠失した変異が検出された。これらの変異について、標的周辺の塩基配列を解析したところ、Cas9 の切断予測部位にて DNA 二重鎖切断が起きた後、切断部位が閉じる様に DNA 修復されたことが確認された。また、*SIEF1α* プロモーターを導入したカルス系統では *CaMV35S* プロモーターと比較してモザイク変異が少なかった。次に、異なる遺伝子座においても同様の変異導入が可能か検証するために、*SIIAA9* 上に最大 4 kb の塩基欠失が導入されると考えられる 4 種類の gRNA を設計し同様の実験を行った。その結果 *SIEF1α* プロモーターを用いたベクターでは切断部位が閉じる様に DNA 修復され、*SINADK2A* と同様にモザイク変異が低下すること明らかになった。以上から、Cas9 発現プロモーターの最適化により植物多重ゲノム編集の効率化や導入変異の正確性の向上が示唆された。構築した多重ゲノム編集システムは *SINADK2* など重複遺伝子の機能解析を行う上で、多重変異体作製に有用なツールとなることが期待される。多重ゲノム編集についての研究は筆頭著者として論文をまとめ、国際学術誌に公表した (Hashimoto et al, 2018)。構築された多重ゲノム編集を用いて、*slnadk2a/2b* 二重変異体の作製を試みたが、次世代種子が形成されないという表現型を示した。トマト *NADK2* が種子形成に影響を与えることが示唆された。

第 2 章では、まず、乾燥ストレス条件における *NADK2* 機能解明のために、*atnadk2* 変異体における乾燥ストレス条件下でのトランスクリプトームおよびメタボロームを明らかにした。先行研究より、*atnadk2* 変異体は乾燥ストレスに対して非常に強い耐性を示すことが見出されており (刑部ら、未発表)、*NADK2* の機能欠失による乾燥ストレス耐性向上に関わる因子の解明を目的とした。トランスクリプトーム解析では、乾燥ストレス条件の *atnadk2* 変異体において、これまで乾燥耐性に関わることが示された多くの遺伝子の発現上昇が見られる一方で、野生型植物とは異なり、B-box 転写因子やカルモジュリンのような遺伝子群の発現が変動することが明らかになった。メタボローム解析では、野生型植物で乾燥ストレス応答により蓄積増大し耐性付与に関わるとされる一部の代謝産物の蓄積が *atnadk2* 変異体において見られなかった一方で、*atnadk2* 変異体において特異的に蓄積する代謝産物が複数存在することが明らかになった。以上より、*atnadk2* 変異体は既存とは異なる機構によりストレス耐性を獲得していることが示唆された。

植物 *NADK2* は N 末端側にカルモジュリン結合ドメイン (CBD) が保存されており (Turner et al. 2004)、カルシウムにより *NADK2* の機能が調節されると考えられていたが、*NADK2* における CBD の機能は未解明だった。そこで、第 2 章では、次に *AtNADK2* とタンパク質間相互作用するカルモジュリンの探索を行った。酵母 2 ハイブリット法によるタンパク質間相互作用解析により、8 種のカルモジュリン様タンパク質が *AtNADK2* と相互作用することを見出した。今後は、同定した CaM/CML による *AtNADK2* の制御機構の解明と感傷ストレス耐性における役割の解明、さらにトマトにおける同様の機構の解明を進め、*NADK2* による環境ストレス条件での植物代謝制御を明らかにしたいと考えている