

論文の要約

報告番号	① 乙	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>論文の要約</p> <p>※「目的・問題提起・考察・まとめ」のように論文の構成に沿ったかたちでまとめられたもので、論文の中身が分かるもの</p> <p>本研究はNADP合成酵素であるNADキナーゼ(NADK)の植物の非生物ストレス応答における機能解明を目的とし、乾燥ストレス条件でNADKによって調節される代謝および遺伝子発現制御の解析および主要な園芸作物であるトマトでの変異体の作製と表現型解析を行った。植物には3種のNADK(NADK1-3)が存在しており、葉緑体局在性NADK2のシロイヌナズナ <i>nadk2</i> (<i>atnadk2</i>) 欠失変異体はクロロフィル合成が抑制されることや様々な代謝経路への影響が示されている。トマトにおけるNADK2の機能を解明することにより、環境ストレス条件下の果実における有用物質生産などの応用に繋がれると考えた。そこで、本研究では、<i>nadk2</i> 変異体の乾燥ストレス条件での代謝および遺伝子発現の制御機構、および、トマト (<i>Solanum lycopersicum</i>) の2種の葉緑体局在性NADK2 (S1NADK2A および S1NADK2B) の機能解析を行った。トマト幼植物体における <i>S1NADK2</i> 遺伝子の発現解析の結果、<i>S1NADK2A/2B</i> は本葉と根において異なる発現様式を示した。<i>S1NADK2A</i> は <i>S1NADK2B</i> と比較し本葉でより高い発現を示し、トマトにおいて主要なNADK2であることが示唆された。修士論文においてCRISPR/Cas9により <i>slnadk2a</i> 変異体を作製した。本研究において <i>slnadk2a</i> 変異体の表現型を解析した結果、<i>atnadk2</i> 変異体と同様に生長遅延を示すことが明らかになった。<i>S1NADK2A/2B</i> の機能重複または機能分担を明らかにするために、tRNA プロセッシングを利用したgRNA発現システムによる多重ゲノム編集を構築した。多重ゲノム編集をトマトにおいて最適化するため、異なる発現様式の遺伝子プロモーターを用いた <i>Cas9</i> 遺伝子の発現およびtRNA プロセッシングを利用し複数のgRNAを発現させるベクターを構築し、トマトカルスにおける変異様式を解析した。その結果、<i>Cas9</i> の発現プロモーターにより変異様式が異なっており、<i>SIEF1α</i> プロモーターを用いることで低モザイク性変異および長鎖塩基欠失を導入できることが明らかになった (Hashimoto et al. 2018 <i>Frontiers in Plant Science</i>)。構築した多重ゲノム編集ベクターを用い、<i>slnadk2a/2b</i> 二重変異体の作製を試みた。その結果、<i>S1NADK2A/2B</i> の2種の遺伝子に共に変異導入された系統を単離したが、種子形成が抑制されることが示された。次に、シロイヌナズナにおいてAtNADK2の機能欠損による転写や代謝経路への影響を明らかにするために、<i>atnadk2</i> 変異体の乾燥ストレス条件下における遺伝子発現および代謝産物の網羅的解析を行った。その結果、<i>atnadk2</i> 変異体において野生型植物とは異なる遺伝子群の発現様式や代謝産物の蓄積が示された。さらに、AtNADK2タンパク質の機能制御に関わる因子を、酵母2ハイブリッド法を用いて同定した。今後はNADK2の機能欠失と環境ストレス応答の分子メカニズムの詳細の解明とともに、トマト <i>slnadk2</i> 変異体の果実における代謝産物の網羅的解析を行うことで、NADK2の機能調節による有用代謝産物生産性の向上などの有用形質を付与したトマト品種の開発および育種技術の開発に繋がると期待できる。</p>				