

氏名	Na Renhu		
学位の種類	博士（理学）		
学位記番号	博 甲 第 9 4 5 0 号		
学位授与年月日	令和2年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Functional Analysis of MCAs and PIF4 in Plant Cold Signaling (植物低温シグナル伝達におけるMCAsおよびPIF4の機能解析)		
主査	筑波大学 教授	博士（農学）	三浦 謙治
副査	筑波大学 教授	博士（農学）	鈴木 石根
副査	筑波大学 准教授	博士（理学）	岩井 宏暁
副査	筑波大学 准教授	博士（理学）	壽崎 拓哉

## 論 文 の 要 旨

審査対象論文は、植物における低温シグナル伝達機構および低温ストレス応答に関する詳細な分子メカニズムを解明する目的で、低温シグナル伝達に関わる新たな因子を同定し、その機能解析を行ったものである。新たな因子として、カルシウム透過性機械受容チャネルMCA (mid1-complementing activity)及び光シグナルに関与する転写因子PIF4 (phytochrome interacting factor)を明らかにし、これらの因子の低温シグナル伝達における役割を明らかにした研究である。

先行研究より、植物は低温ストレスを受けると、細胞内カルシウム濃度を一過的に上昇させ、低温シグナル伝達機構により、様々な遺伝子を調節することが知られている。この低温シグナル伝達機構において、ICE1転写因子はCBF3/DREB1Aの遺伝子発現を調節するとともに、CBF3/DREB1A転写因子は、その下流の低温ストレス応答性遺伝子の発現を調節しており、ICE1-CBF/DREB1依存的な経路が、低温シグナル伝達経路において重要な役割を担っていることが明らかにされている。

論文第一部において著者は、カルシウムチャネルMCAが、低温ストレス誘導性一過的カルシウム濃度上昇にどのように関わるかについて報告している。先行研究によりMCAはシロイヌナズナに2遺伝子存在し、カルシウムチャネルとしてはたらくことが明らかにされている。著者は、低温ストレス誘導性一過的カルシウム濃度上昇が野生型に比べて、*mca*変異体では約半分しか上昇していないことを明らかにし、カルシウム濃度上昇にMCAが必要であることを見出した。また、カルシウムチャネル阻害剤により、完全にカルシウム濃度上昇が抑えられたことから、MCA以外のカルシウムチャネルの存在が示唆された。次に、著者は、これらの変異体において、低温ストレス応答への影響がみられるかを調べたところ、*mca1 mca2*二重変異体では、低温ストレスに対する抵抗性が低下していることを見出した。このことから著者は、カルシウム濃度の減少により、シグナルが適切に伝わらず、低温ストレスへの応答が適切にできなくなったものと考察した。そこで、どのような遺伝子の発現が調節されており、低温シグナル伝達に異常が生じたかを調べたところ、CBF/DREB1転写因子によって調節を受けない低温ストレス誘導性遺伝子*At5g61820*、*At3g51660*、*At4g15490*の発現が*mca1 mca2*二重変異体において抑制されていることを見出した。以上の結果から、著者は、MCAが低温ストレス誘導性カルシウム濃度上昇に関わること、低温ストレスに対する抵抗性付与に関わること、CBF/DREB1非依存的シグナル伝達経路の調節に関与していることを結論づけた。

先行研究により、光シグナル伝達と低温シグナル伝達はお互いに影響を及ぼすことが唱えられてい

るが、その詳細な分子機構は明らかにされていなかった。そこで、論文第二部において著者は、光シグナルに関与する転写因子PIF4に着目して、PIF4による低温ストレス応答および低温ストレス応答性遺伝子の発現調節に関する機能解析について報告している。著者は、PIF4はICE1の相互作用因子として同定してきた。*pif4*変異体では、低温ストレスに対して抵抗性が増加するとともに、*CBF/DREB1*やその下流の低温ストレス応答性遺伝子の発現が、野生型と比較して上昇していることを明らかにした。PIF4タンパク質は光依存的に分解されることから、著者は、N末を欠損させて光依存的分解を抑制した $\Delta$ *NP1F4*過剰発現体を作成した。 $\Delta$ *NP1F4*過剰発現体は、*pif4*変異体とは反対に、低温ストレスに対して感受性を示したことから、著者は、PIF4が負の調節因子としてはたらくと結論づけた。また、 $\Delta$ *NP1F4*は光によっては分解されないものの、低温ストレスによって分解されることが明らかになった。この低温ストレス依存的 $\Delta$ *NP1F4*の分解機構を明らかにするため、著者は、低温ストレス時に核内へ輸送されるユビキチンリガーゼHOS1とPIF4との相互作用を調べたが、PIF4とHOS1とは直接相互作用していなかった。但し、PIF4-ICE1およびICE1-HOS1はそれぞれ相互作用することが明らかになったため、著者は、ICE1が足場タンパク質として働く可能性について検討を行ったところ、 $\Delta$ *NP1F4*はICE1存在下でHOS1によるユビキチン化が促進されることを見出した。このことは、ICE1が足場タンパク質となることで、PIF4-ICE1-HOS1の複合体を形成し、HOS1によるPIF4のユビキチン化により分解が促進されることが示唆された。以上の結果から、著者は、PIF4が低温シグナル伝達機構において負の調節因子として働くこと、低温ストレス誘導性PIF4の分解は、ICE1を足場タンパク質として、HOS1ユビキチンリガーゼによってユビキチン化が促進されることによるものであると結論づけた。

論文の総合討論において著者は、カルシウム透過性機械受容チャネルMCAおよび光シグナルに関与するPIF4が、低温シグナル伝達機構において重要な調節因子としてはたらくことを明らかにし、低温シグナル伝達機構の詳細なメカニズムの解明につながる研究であると結論づけた。

## 審 査 の 要 旨

本研究で著者は、植物における低温シグナル伝達機構に関与する新たな因子を明らかにすることに取り組んだ。この研究は、カルシウム透過性機械受容チャネルMCAおよび光シグナルに関するPIF4が低温シグナル伝達機構における調節因子としてはたらくことを明らかにしたものである。特にカルシウム動態の調節という点、ICE1という転写因子が足場タンパク質となって、ユビキチンリガーゼHOS1と基質PIF4を結ぶ役割を行う点、といった発見が、植物生理学分野のみならず、生物学全般に対して大きな意義のある研究として、高く評価されると判断された。

令和2年1月28日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。