

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Characterization of plasma membrane H⁺-ATPase
function in stomatal opening and plant growth

(植物の気孔開口と成長における細胞膜 H⁺-ATPase の機能解析)

氏 名 丁 明

論 文 内 容 の 要 旨

植物の細胞膜 H⁺-ATPase は、光による気孔開口、根における養分吸収、師部積み込みなど、多くの生理現象に関することが知られている。本研究では、これまで詳しく調べられてこなかった植物の栄養成長期と生殖成長期に出現する葉における気孔の特徴付けや植物生産量への影響について、また、イネに細胞膜 H⁺-ATPase を過剰発現させた時のイネの表現型解析や、気孔孔辺細胞における主要な細胞膜 H⁺-ATPase のプロモーターの *in silico* 解析による発現特性の解析とプロモーター改変をゲノム編集で行うことによる発現制御を試みた。

植物の栄養成長期と生殖成長期に出現する葉における気孔の特徴付けについて、まずはシロイヌナズナを用いて解析を行った。栄養成長期に出現するロゼット葉と生殖成長期に出現する茎生葉の気孔を比較したところ、気孔サイズは、茎生葉ではロゼット葉の気孔よりも少し小さいにも関わらず、気孔開度は 25%程度大きかった。そこで、気孔開口のキーエンザイムである細胞膜 H⁺-ATPase のタンパク質量を比較したところ、茎生葉ではロゼット葉の気孔よりも 12%高まっていた。また、主要な細胞膜 H⁺-ATPase である AHA1 のノックアウト変異体における茎生葉での気孔の表現型を調べた結果、茎生葉の気孔ではロゼット葉の気孔よりも細胞膜 H⁺-ATPase のタンパク質量が 32%減少しており、気孔開度の指標となる気孔コンダクタンスも 30%以上低下し、光合成活性も 30%以上低下しており、気孔における細胞膜 H⁺-ATPase のタンパク質量の増加が茎生葉での有意な気孔開口促進の原因であることが示唆された。さらに、茎生葉を切り取ることで植物の収量への

影響を調べた結果、茎生葉を切り取った植物では、種子の収量が 50%程度に低下した。イネでは第 6 葉まで栄養成長期に出現し、生殖成長期に入ると止め葉と呼ばれる葉が形成され、出穂する。そこで、葉齢を揃えて、第 2 葉と止め葉で気孔特性を比較した結果、シロイヌナズナの場合と同様に、細胞膜 H^+ -ATPase に依存して止め葉の気孔コンダクタンスや光合成活性が有意に高まっていた。さらに、止め葉を切り取る実験を行ったところ、種子の収量が 35%以上低下していた。以上の結果より、植物の生殖成長期に出現する葉は、気孔の細胞膜 H^+ -ATPase のタンパク質量増加することで気孔開口が有意に促進され、光合成活性が高まり、種子への養分転流に貢献することで種子の収量に多大な影響を与えていることが明らかとなった。

次に、イネの細胞膜 H^+ -ATPase の役割を明らかにする目的で、細胞膜 H^+ -ATPase の過剰発現イネを作出し、根における養分吸収や収量への影響を調べた。その結果、過剰発現イネでは根からの水素イオン放出量が 80%程度増加しており、イネの主要な窒素栄養源であるアンモニウムの取り込みが 15%以上増加しており、その他の主要養分であるカリウム、リン酸、カルシウムなども有意に増加していることが明らかとなった。さらに野外隔離圃場で生育試験を行ったところ、過剰発現イネは野生株よりも 30%以上収量が増加することが明らかとなった。さらに興味深いことに、過剰発現イネでは施肥する窒素量を半分に減らしても、通常施肥量の野生株よりも有意に収量が多いことが明らかとなった。

さらに、シロイヌナズナの主要な細胞膜 H^+ -ATPase である AHA2 のプロモーター領域の *in silico* 解析を行ったところ、多くの TATA ボックスやエンハンサーとして機能する cis エlementが多く存在することが明らかとなった。次に、AHA2 プロモーター上の TATA ボックスや cis エlementのない場所に 4ヶ所のガイド RNA を設計し、ゲノム編集によるプロモーター配列の改変を行った。その結果、10%程度の割合で、AHA2 のタンパク質量の増加したシロイヌナズナが出現し、それらの植物では、光による気孔開口、光合成活性が上昇しており、25 日齢の植物で 20%以上のバイオマス増加が見られ、最終的な種子収量としては 12%~43%増加していた。以上の結果から、AHA2 プロモーター領域のゲノム編集によっても発現タンパク質を増加することができ、AHA2 のタンパク質量の増加したゲノム編集植物では、気孔開口や光合成活性が向上し、植物のバイオマスや種子収量が増加することが明らかとなった。