

博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第 47 号

2020 年 3 月

京 都 産 業 大 学

— は し が き —

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 8 条の規定による公表を目的とし、令和 2 年 3 月 21 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第 4 条第 1 項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第 2 項によるもの（いわゆる論文博士）である。

目 次

課程博士

1. 木村 輔	〔博士（先端情報学）〕	1
2. 天野 瑠美	〔博士（生命科学）〕	5
3. CHATCHADAWALAI CHOKCHAITAWEEESUK	〔博士（生命科学）〕	9

氏 名（本 籍）	天野 瑠美（京都府）
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	甲生 第1号
学位授与年月日	令和2年3月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論 文 題 目	アブラナ科植物 <i>Rorippa aquatica</i> に見られる葉断面からの再生による栄養繁殖機構の解明
論文審査委員	主 査 木村 成介 教授
	副 査 本橋 健 教授
	〃 白鳥 秀卓 教授

論文内容の要旨

植物の繁殖様式は、有性生殖と無性生殖の2つに大別される。栄養繁殖は、植物が葉や根といった栄養器官から新しい個体（栄養分体）を繁殖する無性生殖の一種であり、自然界では多くの植物が栄養繁殖により増殖している。一般に、植物は分化全能性が高く、組織片を植物ホルモンで処理することで新しい器官を再生させることができる。この組織培養による再生のメカニズムについては知見が多く蓄積しているが、再生による栄養繁殖のメカニズムについては、適切なモデルがなかったこともあり、ほとんど研究が進められていなかった。

北米の湖畔に生育するアブラナ科植物の *Rorippa aquatica* は、栄養繁殖能が高く、自然条件下において、ちぎれた葉の根元側（基部側）の断面から不定芽を形成して無性的に繁殖している。この一連の過程には特別な条件は必要なく、水分状況さえ適切であれば、葉断面に複数の不定芽を形成し植物体が再生する。本研究では、この *R. aquatica* を栄養繁殖を研究するためのモデルとして開発し、そのメカニズムを分子レベルで解明することを目的として研究をすすめた。

本論文は2章で構成される。まず、第1章では、経時的な形態学的観察により、*R. aquatica* の葉片からの栄養分体の再生過程の詳細を明らかにした。また、組織切片の観察から、栄

養分体が維管束の形成層付近から *de novo* な器官形成によって再生していることがわかった。さらに、分裂細胞を可視化することで、葉を切断してから1日目には細胞分裂が再開されていることを明らかにした。実際、qRT-PCRによる遺伝子発現解析により、葉の切断から1日以内に、栄養分体が再生する葉片基部側において、細胞周期に関与する *CYCLINB1;1* (*CYCB1;1*) や *E2 PROMOTER BINDING FACTOR a* (*E2Fa*) の発現が上昇していることが明らかになった。

第2章では、*R. aquatica* の栄養繁殖に関与する遺伝子群を同定するため、再生過程のRNA-seq解析を行った。このとき、葉の切断後、1時間後から12日目まで経時的にサンプリングすることで、経時的な遺伝子発現変動を解析した。また、栄養分体が再生してくる葉の基部側と、再生がみられない先端部側で遺伝子発現を比較することで、再生に重要な遺伝子の同定を試みた。その結果、葉の切断直後にオーキシン応答に関与する遺伝子群が葉片の基部側で上昇していることがわかった。

さらに、オーキシンの定量実験と添加実験の結果から、葉の切断後にオーキシン極性輸送により、オーキシンが葉片の基部側に蓄積することで再生経路が誘導され、根が再生してくることが明らかとなった。その後、サイトカイニンの応答経路が活性化しており、サイトカイニンの作用によりシュートが再生してくることがわかった。また、ジベレリンが *R. aquatica* の栄養繁殖に与える影響について検討したところ、ジベレリンが根の再生に必須であることを明らかにした。

以上の研究により、*R. aquatica* では、維管束周辺にある、おそらく幹細胞性を維持した細胞が、自律的な植物ホルモンの制御により活性化し、再生することが明らかとなった。自然界で栄養繁殖する植物について、分子レベルでそのメカニズムを解析した例は無く、意義のある研究成果である。

論文審査結果の要旨

本論文は植物の栄養繁殖のメカニズムの解明に関するものである。栄養繁殖は、植物が栄養器官から次世代を繁殖する無性生殖の一種であり、自然界では多くの植物が栄養繁殖により増殖している。いわゆる水草は、葉や茎など植物体の断片からの再生により栄養繁殖していることが多く、これは花粉を介した有性生殖が困難な水中適応するための繁殖戦略であると考えられている。また陸生の植物であっても、地下茎や走出枝（ランナー）、珠芽（むかご）などを介して栄養繁殖している植物は数多く存在しており、植物の繁殖様式を考える上で重要である。また、栄養繁殖は、農業における種苗生産などにも応用されている。一方で、基礎研究に利用されるいわゆるモデル植物に栄養繁殖を示すものが少ないことなどから、栄養繁殖メカニズムはほとんど明らかとなっていなかった。

北米の湖畔に生育するアブラナ科植物の*Rorippa aquatica*は、栄養繁殖能が高く、自然条件下において、ちぎれた葉の根元側（基部側）の断面から不定芽を形成して無性的に繁殖している。この一連の過程には特別な条件は必要なく、水分状況さえ適切であれば、葉断面に複数の不定芽を形成し植物体が再生する。本研究は、*R. aquatica*の高い栄養繁殖能を利用して、この植物をモデルとして開発し、栄養繁殖のメカニズムを分子レベルで明らかにしようとするものである。

論文は2部で構成されている。まず、第1部では、発生学的な解析により、*R. aquatica*の栄養繁殖の過程を明らかにした。その結果、葉の切断後1日で細胞分裂が誘導されていることや、維管束組織の形成層付近から新しい植物体が生じることなどを明らかにした。

続く第2部では、RNA-seq解析により葉断面からの再生過程での遺伝子発現変動を網羅的に解析した。また、植物ホルモンの定量解析などの結果も合わせて考察することで、再生過程の初期においては極性輸送によるオーキシンの蓄積が根の再生を誘導し、その後サイトカイニン応答がおこることでシュート（茎葉）の再生が誘導されることを明らかにした。また、ジベレリンが*R. aquatica*の栄養繁殖に与える影響について検討したところ、ジベレリンが根の再生に必須であることを明らかにした。

以上の研究により、*R. aquatica*では、維管束周辺にある、おそらく幹細胞性を維持した細胞が、自律的な植物ホルモンの制御により活性化し、再生することが明らかとなった。自然界で栄養繁殖する植物について、分子レベルでそのメカニズムを解析した例は無く、意義のある研究成果である。

主査および副査による論文調査では、適切なモデルがないことからこれまでほとんど分子レベルでの研究が進められなかった再生による栄養繁殖のメカニズムについて、*Rorippa aquatica*という新しい研究モデルを提唱し、その栄養繁殖の発生学的な基盤を明らかにしただけでなく、次世代シーケンシング技術を用いた大規模な遺伝子発現解析により、分子レベルのメカニズムの一端を明らかにした点において学術的な意義があることが認められた。

また、研究課題の新規性、作業仮説の設定の仕方、実験方法の妥当性、結果の解釈や考察などについて問題はないと判断された。得られた知見は豊富な実験に基づくものであり、信頼性が高く、植物科学の発展に大きく寄与するものであると認められた。

令和2年2月10日に開催された公聴会において、論文内容およびこれに関連する事項についての発表および質疑応答があり、提出者が本論文の内容や関連分野について十分な知識を持ち、また、研究成果について考察を深められていることを確認できた。

結論として、本論文は博士学位論文としてふさわしいものであり、本審査に合格と判定する。