

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Goitseone Malambane
審査委員	主査 明石 欣也 (印) 副査 辻本 壽 (印) 副査 中川 強 (印) 副査 執行 正義 (印) 副査 石川 孝博 (印)
題目	Research on Drought Physiology and Molecular Responses, and Development of Biotechnology Tools for the Drought-Tolerant Wild Watermelon ( <i>Citrullus lanatus</i> acc. 101117-1)
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>アフリカ・ボツワナ共和国のカラハリ砂漠に自生する野生種のスイカは、乾燥や強光に対し強い耐性を有する。この植物は乾燥ストレスに暴露されると、アミノ酸代謝などにおいてユニークな分子制御を行い、乾燥および強光環境に適応する。本研究は、この植物のストレス分子生理メカニズムに関する新たな知見の獲得と、この植物における遺伝子操作系の構築を目指したものである。</p> <p>この植物のストレス耐性機構に関する従来の研究報告は、人工的な気象環境での実験に基づくものであり、自然環境における生理挙動に関する知見は限られていた。そこで本研究では、野生種スイカ系統 (<i>Citrullus lanatus</i> acc. 101117-1) および栽培種スイカ品種 (<i>Citrullus lanatus</i> cv. Maturibayashi-777) を用い、自然環境および人工環境での乾燥ストレス生理応答を比較した。自然環境の実験では、2017年の夏にボツワナの圃場で試験を実施した。その結果、自然環境下では、光合成CO<sub>2</sub>固定の抑制や気孔閉鎖などの乾燥ストレス応答が、より迅速に起こることが示された。また、吸収光エネルギーの熱散逸は、自然環境下の乾燥ストレスにおいてより強く誘導されていることが示された。興味深いことに、生理応答の振幅の大きさには違いが観察されるものの、両環境条件において野生種スイカは類似の生理応答を示すことが示された。</p>	

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) は、環境ストレス下において活性酸素種の除去に重要な役割を果たす。そこで本研究では、野生種スイカにおける APX 遺伝子ファミリーの構造および発現制御について解析した。スイカゲノムから *CLAPX1* から *CLAPX5* までの 5 遺伝子を同定した。葉緑体型と推定される *CLAPX5* については、alternative splicing により C 末端アミノ酸配列の異なる CLAPX5-I と CLAPX5-II の 2 種のタンパク質が生じ、それぞれストロマおよびチラコイド膜に局在することが示唆された。野生種スイカを乾燥ストレスに暴露したところ、乾燥ストレス初期において *CLAPX5-I* と *CLAPX5-II* の発現上昇が観測され、葉緑体型 APX の酵素活性が顕著に上昇した。これらの結果から、葉緑体型 APX の酵素活性の強化には、同遺伝子の転写制御が関与することが示唆された。

植物ホルモンのエチレンは、アグロバクテリウム法による形質転換の効率に影響を及ぼすことが知られる。本研究では、野生種スイカをアグロバクテリウム法により形質転換する際に、様々なエチレン阻害剤がどのような影響を及ぼすのかを解析した。その結果、エチレン前駆体の 1-aminocyclopropane-carboxylic acid (ACC) を分解する ACC デアミナーゼ遺伝子 (*acdS*) を有するアグロバクテリウムを用いた際に、硝酸銀や aminoethoxyvinylglycine などの化学阻害剤に比べ、エチレン蓄積が有意に低下することが示された。また *acdS* 遺伝子は化学阻害剤に比べ遺伝子導入促進効果が高いことが示された。さらに、形質転換シュートの形成効率は、*acdS* 遺伝子を用いた場合に有意に高かった。これらの実験結果は、野生種スイカの形質転換効率を向上させる上で、*acdS* 遺伝子等を利用したエチレン産生の抑制が有効であることを示している。

ゲノム編集は、部位特異的ヌクレアーゼ等を用いて標的遺伝子配列を特異的に改変する技術である。本研究では、近年開発された CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を野生種スイカに適用した。標的として、野生種スイカの適合溶質であるシトルリンの生合成の律速酵素 *N*-acetylglutamate kinase (NAGK) の遺伝子を選び、部位特異的な遺伝子破壊を試みたところ、ゲノム編集コンストラクトを導入した野生種スイカ細胞の標的配列内において、高頻度で塩基置換変異が検出された。また、コンストラクトを導入した野生種スイカ葉の抽出液において、NAGK 酵素活性の有意な低下と、NAGK 標的配列に依存した壊死が観察された。これらの結果は、CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集がこの植物において実施可能であることを示唆しており、この植物の乾燥耐性機構の解明に役立つ新技術として有効と期待される。

これら一連の研究は、乾燥地のストレス耐性植物の分子生理メカニズムについて新たな知見を提供しているだけでなく、乾燥地に由来する植物の遺伝子操作技術に関して具体的な知見を提示したものであり、植物科学分野の発展に大きく貢献している。以上を総合して、本論文は学位論文として十分な価値があると判定した。