

氏名	アシュラフ ムハammad アリフ ASHRAF, Mohammad Arif
本籍（国籍）	バングラデシュ人民共和国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 737 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 寒冷圏生命システム学
学位論文題目	The role of membrane proteins in abiotic stresses in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナの非生物ストレスにおける膜タンパク質の役割)
学位審査委員	主査 岩手大学准教授 RAHMAN, Abidur 副査 笹部 美知子(弘前 准教授),三橋 渉(山形 教授),上村 松生 (岩手 教授)

論文の内容の要旨

The growth and development of plants are constantly challenged due to the change in the environment or stressful conditions. These unfavorable environmental conditions include biotic stresses, such as invasion of virus, parasites, and insects, and abiotic stresses, such as drought, heat, cold, salinity, nutrient deficiency, and excess of toxic compounds like arsenate, cadmium, cesium in the soil. Among these, temperature stress has become the major concern as heat and cold stress lead to other abiotic stresses. For instance, heat and cold stresses cause drought and osmotic stress, respectively. Between high and low temperature stresses, the decrease in temperature and the increased length of winter have become the major limiting factor to provide the favorable growth temperature for most of the crop plants (Chapter 1).

Altered response of plants' growth and development due to abiotic stress is the summation of cellular response. From the cellular perspective, plasma membrane acts as boundary and helps to maintain the cell – cell communication. Additionally, plasma membrane residing proteins function as transporter, receptor, and receptor kinases. The perception of stress is mediated through plasma membrane proteins and manipulation of membrane proteins restrict the uptake of toxic metal and perturbs the stress signal

transduction inside the cell. Hence, the membrane proteins play pivotal role in abiotic stress regulation (Chapter 1).

In recent years, temperature stresses, more specifically low temperature stress, has become the cause of huge economic loss in most part of the world. Despite the huge financial loss due to low temperature stress, our understanding about cold stress response in plant is still elusive. Till date, our knowledge about cold stress regulation is mostly based on stress hormone Abscisic acid (ABA) and the major cold stress inducible transcription factor CBFs (C-Repeat Binding Factors). But, the plant growth and regulation is mediated through multiple hormones and cold stress mediated transcriptional regulation follows both CBF-dependent and –independent pathway. Recent discoveries pointed out the role of auxin in low temperature stress regulation. The study of auxin depicted a cold stress-mediated inhibition of intracellular trafficking model (Chapter 2).

In this research, I have used known protein trafficking mutants and identified GNOM, Guanine nucleotide Exchange Factors for ADP Ribosylation Factor (ARF-GEF), as one of the master regulator of cold stress response. GNOM is localized in the both cytosol and PM. Weak mutant of GNOM, *gnom*^{B/E}, is hypersensitive to cold and GNOM-engineered BFA resistant line (GNOM^{M696L}) is resistant to cold from root phenotype and whole plant level. I have found that the point mutation in the BFA res. line results in overexpression of GNOM both at transcriptional and translational levels. GNOM participates in the recycling endosomal pathway and facilitates trafficking of proteins, including auxin efflux carrier PIN2, between PM and cytosol. Using PIN2-GFP, it had been demonstrated that recycling endosomal trafficking is disappeared during cold stress and in contrast, persistent trafficking is observed in BFA resistant line background. Altogether, it suggests that the overexpression of GNOM retains protein trafficking between plasma membrane and cytosol even after cold stress treatment (Chapter 2).

Another major abiotic stress is metal stress, because toxic metals exploit plants' transport system and easily incorporate in our food chain. In these recent years, cesium

drew our attention most due to the nuclear power plant accident in Fukushima, Japan during the Tsunami of 2011. Due to its chemical similarity with potassium, plants easily uptake cesium using potassium transporters. Consistently, so far identified cesium transporters are mostly known potassium transporters. As a result, most of the low cesium uptake strategy employed the alteration of potassium transporters to reduce cesium uptake. Unfortunately, this approach is irrational as it changes the intracellular concentration of important nutrient potassium. Gene expression analysis of cesium intoxicated plants compared with potassium starved plants highlighted that a group of potassium independent transporters, including ABC (ATP-binding cassette) transporters, are differentially expressed. Among these group of transporters, ABC transporters have less substrate specificity and are involved in detoxification of metal in both animal and plant cells. Hence, I focused on the screening of ABC transporters to find alternative cesium transporter (Chapter 1).

Based on the screening of ABC transporters, I have identified two ABC transporters, ABCG33 and ABCG37, as cesium influx carriers, which function redundantly. The gain-of-function mutant of ABCG37, *abcg37-1*, is hypersensitive to cesium. However, single knockout mutants of ABCG37 (*abcg37-2*, *abcg37-3*, and *abcg37-4*) have wild-type like phenotype. The unexpected wild-type like response of single mutants prompted us to hypothesize that loss of ABCG37 may be compensated by another ABC protein. Based on phylogenetic analysis, ABCG33 turned out to be the closest homolog of ABCG37, residing in the same clade and have ~80% identity at protein level. Double knockout mutant (*abcg37-2 abcg33-1*) shows the resistant phenotype and reduce uptake of cesium. Combining the knowledge of these transporters with existing low cesium containing crop plants will help to develop varieties capable of growing in cesium contaminated soil (Chapter 3).

Interestingly, study of these abiotic stresses (cold and cesium stress) helped to identify three membrane proteins as major regulators. Among them, GNOM was identified

as response regulator of cold stress and two ABCG transporters, ABCG37 and ABCG33, were characterized as plasma membrane-localized potassium-independent cesium influx carriers (Chapter 2, 3, 4).

日本語

環境の変化やストレスのために、植物の成長と発達には絶えず挑戦がなされている。これらの望ましくない環境条件には、ウイルス、寄生虫、昆虫の侵入、干ばつ、熱、低温、塩分、栄養欠乏、および土壌中のヒ素、カドミウム、セシウムなどの毒性化合物などの非生物学的ストレスが挙げられる。その中でも、熱ストレスや低温ストレスが特に他の非生物学的ストレスを助長するため、温度ストレスが大きな懸念材料となっている。例えば、熱ストレスおよび低温ストレスは、それぞれ干ばつおよび浸透圧ストレスを引き起こす。高温ストレスと低温ストレスとの間で、温度の低下および冬期が長引くことは、多くの作物にとって好ましくない成長温度をもたらす主要な制限要因となった。

非生物学的ストレスに起因する植物の成長および発達の変化は、細胞応答の総和であると言える。細胞の観点から、原形質膜は境界として働き、細胞間の通信を維持するために役立つ。さらに、原形質膜に存在するタンパク質は、トランスポーター、受容体、および受容体キナーゼとして機能する。ストレス応答は原形質膜タンパク質を介しており、有毒金属の取り込みを制限し、細胞内のストレスシグナル伝達を摂動させる。したがって、膜タンパク質は非生物学的ストレス調節に重要な役割を果たす。

近年、温度ストレスの代表である、低温ストレスは、世界の大部分における大きな経済損失の原因となっているにも関わらず、植物における低温ストレス応答に関する知見は依然として不明である。今日、低温ストレス調節に関する我々の認識は、

主にストレスホルモン ABA および主要な低温ストレス誘導性転写因子 CBF に基づいている。しかし、植物の成長および調節は複数のホルモンによって媒介され、低温ストレス媒介性の転写調節は CBF 依存性および非依存性の両方の経路に従う。最近の発見は、低温ストレス調節におけるオーキシンの役割を指摘している。オーキシンの研究は、低ストレス媒介性の細胞内輸送モデルの阻害を示した。

この研究では、既知のタンパク質輸送突然変異体を使用し、低温ストレス応答のマスターレギュレーターの一つとして、ADP リボシル化因子 (ARF-GEF) のグアニンヌクレオチド交換因子である GNOM を同定した。GNOM は細胞質と PM の両方に局在する。GNOME の弱い突然変異体である gnomBE は低温に対して感受性が高く、GNOM を処理された耐性株 (GNOMM696L) は、根の表現型および植物全体において低温耐性がある。私は、転写および翻訳レベルの両方で GNOM の過剰発現をもたらす、BFAres の点突然変異を発見した。GNOM は、リサイクリングエンドソーム経路に入り込み、PM と細胞質の間のオーキシン排出キャリアである PIN2 を含むタンパク質の輸送を促進する。PIN2-GFP を使用すると、低温ストレス中にエンドソームリサイクルの循環が失われ、対照的に BFA 耐性株のバックグラウンドにおいて持続的な輸送が観察された。全体として、GNOM の過剰発現は、低温ストレス処理後でさえ、原形質膜と細胞質間のタンパク質輸送を保持することを示唆している。

もう一つの大きな非生物学的ストレスは金属ストレスだ。有害な金属は植物の輸送システムを使い、容易に我々の食物連鎖に入り込むためである。近年、セシウムは、2011 年の東日本大震災における、福島県の原子力発電所事故により、注目された。カリウムとの化学的類似性のために、植物はカリウム輸送体を使用してセシウムを容易に吸収する。一貫して、これまでに同定されたセシウム輸送体の多くが既知のカリウム輸送体である。結果として、セシウムの取り込みを低くするため計画は、カリウム輸送体の変化を利用してセシウムの取り込み量を減少させた。残念なことに、このアプローチは、重要な栄養カリウムの細胞内濃度も変化させるため、非合理的である。カリウム欠乏植物と比較したセシウム摂取植物の遺伝子発現分析は、

ABC (ATP 結合カセット) トランスポーターを含む一群のカリウム非依存性トランスポーターが差次的に発現されることを強調した。これらのトランスポーター群の中で、ABC トランスポーターは基質特異性が低く、動物細胞および植物細胞の両方で金属の解毒に関与している。そこで、代替セシウム輸送体を見つけるための ABC 輸送体のスクリーニングに焦点を当てた。

ABC トランスポーターのスクリーニングに基づいて、重複して機能する ABCG33 と ABCG37 の 2 つをセシウム取り込みキャリアとして同定した。ABCG37 の機能獲得突然変異体、*abcg37-1* はセシウムに対して大変敏感である。しかし、ABCG37 (*abcg37-2*、*abcg37-3*、および *abcg37-4*) の単一ノックアウト突然変異体は野生型のような表現型を有する。これにより、単一突然変異体の予期しない野生型応答のように、ABCG37 の喪失が別の ABC タンパク質によって補償され得るという仮説が強まった。系統発生解析に基づいて、ABCG33 は、同じクレード内に存在し、タンパク質レベルで約 80% の同一性を有する ABCG37 に最も近い同族体であることが判明した。二重ノックアウト突然変異体 (*abcg37-2 abcg33-1*) は抵抗性を示し、セシウムの取り込みを減少させた。これらの輸送体の知識を既存の低セシウム含有作物と組み合わせることで、セシウム汚染土壌で生育可能な品種の開発に役立つと考えられる。

興味深いことに、これらの非生物学的ストレス (低温および、セシウムストレス) の研究は、3 つの膜タンパク質を主要な調節因子として同定する一助となった。その中で GNOM は低温ストレスの応答調節因子として同定され、ABCG37 と ABCG33 の 2 種は原形質膜に局在するカリウム非依存性セシウム取り込みキャリアとして特徴付けられた。

論文審査の結果の要旨

固着生物である植物は生活環の間に多くの非生物的ストレスに遭遇する。植物の成長と発達は、非生物的ストレスの影響を大きく受ける。非生物的ストレスに起因する植物の成長および発達の変化は、細胞応答の総和であると言える。細胞の観点から考えると、原形質膜は外界との境界として働き、また、細胞間のコミュニケーションを維持するために役立つ。さらに、原形質膜には、トランスポーター、受容体、および、受容体キナーゼとして機能するタンパク質などが存在する。ストレス応答には原形質膜タンパク質が関わっており、例えば、有毒金属の取り込みを制限したり、細胞内のストレスシグナル伝達を摂動させたりすることが知られている。したがって、膜タンパク質は非生物的ストレス調節に重要な役割を果たしている。以上のことを鑑み、本博士論文では、モデル植物 *Arabidopsis thaliana* の非生物的ストレス（特に低温ストレスと金属ストレス）における膜タンパク質の役割に焦点を当てて研究を行った。

温度ストレスの研究では、既知のタンパク質輸送突然変異体を使用し、低温ストレス応答のマスターレギュレーターの一つとして、ADP リボシル化因子 (ARF-GEF) のグアニンヌクレオチド交換因子である GNOM を同定した。GNOM は細胞質と細胞膜の両方に局在した。GNOM の弱い突然変異体である *gnom*^{B/E} は低温に対して感受性が高く、低温でもタンパク質輸送が保たれるように GNOM を修飾した耐性株 (GNOM^{M696L}) は、根の表現型および植物全体において低温耐性を示した。この突然変異は GNOM の細胞膜一細胞質局在様式の変化をもたらし、その結果、寒冷ストレス下でより多くのタンパク質輸送を維持するのを助けることになり、しいては、植物が寒冷ストレスに対して抵抗性となると考えられた。

金属ストレスの研究では、セシウムの影響に集中して研究を行った。セシウムとカリウムとの化学的類似性のため、植物はカリウム輸送体を使用してセシウムを容易に吸収することが可能である。この事実は、これまでに同定されたセシウム輸送体の多くが既知のカリウム輸送体であることから証明されている。しかしながら、本研究におけるカリウム欠乏植物と比較したセシウム摂取植物の遺伝子発現分析の結果は、ABC (ATP 結合カセット) トランスポーターを含む一群のカリウム非依存性トランスポーターが差次的に発現されることを明らかにした。この結果は、ABC 輸送体がセシウム輸送に関与している可能性を提起する。さらに、本研究では、多数の ABC 突然変異体をスクリーニングすることによって、セシウム輸送体の候補として ABCG33 および ABCG37 を新規に同定した。直接輸送アッセイおよび ICP-MS アッセイによって、ABCG33 および ABCG37 が確かにカリウム非依存性セシウム輸送体であること、および、これら2つのトランスポーターが重複して活性化することも示された。

低温応答の中心的調節因子として GNOM を発見したこと、さらには、単一遺伝子だけを操作することによって耐寒性植物を作成することに成功したことは、ユニークで新しい発見である。さらに、カリウム非依存性セシウム取り込みタンパクである ABCG33 および ABCG37 を見いだしてそれらを特徴付けたことは、これらのタンパク質を用いたセシウム除去方法の開発に結びつくと言った大きな科学的影響を与えうる。以上のように、本研究は、膜タンパク質が植物の非生物学的ストレス応答の調節に重要な役割を果たすことを詳細な実験結果を基に明らかにすることに成功した新規性の高い研究である。以上の貢献から、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Ashraf MA, Rahman A* (2018) Cold stress response in *Arabidopsis thaliana* is mediated by GNOM ARF-GEF

Plant Journal doi: 10.1111/tpj.14137 (IF-5.9)

First published: 26 October 2018

Reference paper:

Ashraf MA, Rahman A* (2018) Hormonal regulation of cold stress response. *In* Cold tolerance in Plants (eds: Wani SH, Herath V) pp65-88 Springer-Nature.