

氏名	パルveen スマヤ PARVEEN SUMAYA
本籍（国籍）	バングラデシュ人民共和国
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	連研第 825 号
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 23 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 生物資源科学専攻
学位論文題目	Understanding the role of cytoskeletal component, actin in prolonged moderate high temperature mediated stress response in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナにおける長期的な中程度の高温ストレス応答に対するアクチン細胞骨格の役割)
学位審査委員	主査 岩手大学准教授 RAHMAN, Abidur 副査 岩手大学教授 上村 松生 副査 山形大学教授 三橋 渉 副査 弘前大学准教授 笹部 美知子

### 論文の内容の要旨

With the upsurge of utilization of fossil fuel and emission of greenhouse gases after the beginning of industrialization, earth's average temperature has substantially increased resulting in global warming. This undeniable alarming phenomenon is primarily causing an increase in temperature and challenging the crop production world-wide. Recent discoveries show that high temperature stress physiology is a complex process that is regulated by multiple factors including phytohormones and cellular protein trafficking. Among the phytohormones, auxin has been shown to play an important role in regulating the high temperature stress response pathway. Another important regulatory factor is intracellular protein trafficking. In general, intracellular protein trafficking is a fundamental cellular process required for normal growth and development, which also influences various biotic and abiotic stresses, including high temperature stress response. Cellular auxin homeostasis is largely dependent on the intracellular trafficking of the auxin transport carriers required for their polar localization. Not surprisingly, the moderate high temperature- induced cellular auxin homeostasis was also found to be regulated by altered intracellular protein trafficking. The cellular protein trafficking activity largely relies on the cytoskeletal component, actin. Filamentous actin provides the track for vesicle movement and thereby facilitates the cellular trafficking. Obviously, any alteration in actin filaments impair vesicle movement and cause mistransport of various proteins. Actin is also interconnected with phytohormone auxin. Auxin transport inhibitors have obvious impact on actin organization. Similarly, actin polymerizing and depolymerizing drugs affect auxin distribution. Lack of certain actin isoforms shows altered auxin distribution. Taken together, these results raise a possibility that actin may function as an upstream regulator of the temperature response pathway. Nevertheless, the relation of actin cytoskeleton in high temperature mediated response has not been studied yet. Therefore, the focuses of this research were to understand the thermomorphogenesis of root under prolonged moderate high

temperature (Chapter 3), involvement of actin isoforms in this process in root (Chapter 4) and shoot (Chapter 5) development in Arabidopsis.

To achieve the research goals, firstly, I focused on the underground part root as it is easily observable and experimentally exploitable. The root elongation behavior was observed for a prolonged period under moderate high temperature (29 °C for 3 days). In contrast to short-term treatment, under long term moderate high temperature root losses normal elongation pattern, which was found to be linked with perturbed auxin transport. Auxin influx transporters PIN1 and PIN2 abundances were reduced, resulting in hampered auxin homeostasis in the root. Long term moderate high temperature treatment also directly affects the actin dynamicity in terms of filament bundling, parallelness and orientation in the epidermal root cells. This finding suggests that prolonged moderate high temperature stress can modulate the actin dynamicity and abundance of auxin transporter proteins and thereby affects the root growth (Chapter 3).

Actin is a highly conserved protein ubiquitously present across the kingdom. In Arabidopsis, actin is largely divided in two subclasses, vegetative and reproductive classes. Since in this study, I primarily focused on vegetative growth, I examined the role of vegetative actin isoforms, ACT2, ACT7 and ACT8 in high temperature mediated root elongation and plant phenotype. ACT2 and ACT7 were found to be essential for normal root elongation under prolonged moderate high temperature stress. Lack of ACT2 and ACT7, influence auxin transport negatively by diminishing PIN1 and PIN2 abundance and drastically hamper auxin homeostasis. Actin quantification reveals that actin dynamicity is altered in *act2-1* and *act7-4* mutants under prolonged moderate high temperature stress. These results indicate that lack of ACT2 or ACT7 makes plant more sensitive towards prolonged moderate high temperature through auxin mediated pathway (Chapter 4).

In addition, I checked the role of ACT2 and ACT7 in shoot elongation under prolonged moderate high temperature where ACT2 was found to be a regulator of shoot elongation like root elongation. Surprisingly, ACT7 did not play any role in shoot elongation under prolonged moderate high temperature, although it was found to be an important regulator for root elongation (Chapter 5). Taken together, these findings suggest that ACT2 is required for shoot and root elongation while ACT7 is necessary only for root elongation under prolonged moderate high temperature stress.

In summary, this work identifies ACT2 and ACT7 as potential upstream regulators of moderate high temperature stress response pathway and can be exploited for developing plants tolerant to high temperature stress in future.

#### [和訳]

産業革命以降、化石燃料の利用と温室効果ガス排出の増加に伴い、地球の平均気温は大幅に上昇し温暖化が進んでいる。この明白な現象によって、世界中で食料危機に晒されている。近年、高温ストレス応答プロセスに、植物ホルモンや細胞内タンパク輸送など様々な要因が複雑に制御されていることが報告された。植物のホルモンの中で、オーキシンは高温ストレス応答経路の調整に重要な役割を果たすことが示されている。もう一つの重要な調整因子である細胞内タンパク輸送は、正常な成長と発達に必要な基本的な細胞プロセスであり、高温ストレス応答を含むさまざまな生物学的および非生物学的ストレスによって影響を受ける。細胞内オー

キシン恒常性は、極性輸送に必要なオーキシン輸送担体の細胞内輸送に大きく依存している。予想通り、中程度の高温で誘発される細胞性オーキシン恒常性は、細胞内タンパク質輸送の変化によって調節されていることが解明された。細胞内のタンパク質輸送は、細胞骨格成分であるアクチンに大きく依存している。フィラメント状のアクチンは、輸送小胞の線路的な役割を担っており、フィラメントに沿って細胞内輸送が行われる。そのため、アクチンフィラメントに異常が生じた場合、小胞輸送が抑制され、様々なタンパク質の誤輸送を引き起こす。また、アクチンは植物ホルモンのオーキシンと相互作用することが報告されており、オーキシン輸送阻害剤は、アクチン形成に明らかな影響を及ぼす。同様に、アクチンの重合および脱重合剤はオーキシン勾配に影響を与え、またアクチンアイソバリエントの欠如は、オーキシン分布に変化をもたらす。まとめると、これらの結果は、アクチンが温度応答経路の上流調節因子として機能する可能性があるにもかかわらず、高温ストレス応答におけるアクチン細胞骨格との関係は未だ研究されていない。したがって、本研究の目的は、長期にわたる中程度の高温下での根の熱形態形成（第3章）、シロイヌナズナの根（第4章）および新芽（第5章）の発達に対して、このプロセスにおけるアクチンアイソバリエントの関与を解明することである。

研究目標を達成するために、地下部分であり、実験的に容易に観察が可能である根に焦点を当てた。根の伸長は、中程度の高温（29°Cで3日間）下で長期間観察した。短期間処理とは対照的に、長期的な中程度の高温下では、根の伸長パターンに障害があり、これはオーキシン輸送の異常と関連していることがわかった。また、オーキシン排出タンパク質 PIN1 および PIN2 の活性低下によって、根のオーキシン恒常性が阻害されました。さらに、長期の中程度の高温処理はフィラメントバンドリング、平行度合い、および表皮の根細胞における配向に関して、アクチンのダイナミクスに直接影響を及ぼすことを発見した。この発見は、長期にわたる中程度の高温ストレスが、アクチンダイナミクスとオーキシン輸送体タンパク質を制御し、それによって根の成長に影響を与える可能性があることを示唆した（第3章）。

アクチンは、生物間で遍在する高度に保存されたタンパク質である。シロイヌナズナでは、アクチンは栄養クラスと生殖クラスの2つのサブクラスに大きく分類される。当研究では、主に栄養成長に焦点を当てており、栄養クラスで発現するアクチンアイソバリエント、ACT2、ACT7、および ACT8 における高温を介した根の伸長と植物の表現型に対する役割を調べた。その結果、ACT2 と ACT7 は、長期の中程度の高温ストレス下で、根の伸長に不可欠であることがわかった。ACT2 と ACT7 の欠損によって、PIN1 と PIN2 タンパク質の異常が引き起こされ、オーキシン輸送に負の影響を及ぼし、オーキシンの恒常性を大幅に阻害する。アクチン定量化によって、act2-1 および act7-4 変異体におけるアクチンダイナミクスが、長期にわたる中程度の高温ストレス下で変化することを明らかにした。これらの結果を踏まえ、ACT2 または ACT7 の欠如により、オーキシンを介した長期の中程度の高温に対して植物がより敏感になることを示した（第4章）。

さらに、長期の中程度の高温下でのシュート伸長における ACT2 と ACT7 の役割を確認した結果、ACT2 が根の伸長と同じ、シュート伸長の調節因子であることも解明された。驚くべきことに、ACT7 は、中程度の高温下で根の伸長の重要な調節因子であることがわかったものの、シュートの伸長には何の役割も果たしていなかった（第5章）。以上のことをまとめると、長期の中程度の高温ストレス下において ACT2 がシュートと根の伸長に必要であるのに対し、

ACT7は根の伸長にのみ必要であることを示唆した。

要約すると、ACT2とACT7を中程度の高温ストレス応答経路の潜在的な上流調節因子として特定した。本研究を通して、将来、高温ストレス耐性植物の開発が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

産業革命以降、化石燃料の利用と温室効果ガス排出の増加に伴い、地球の平均気温は大幅に上昇し温暖化が進んでいる。この明白な現象によって、世界中で食料危機に晒されている。植物の高温応答は、ホルモン、細胞内輸送、代謝物の変化を伴う複雑なプロセスであり。最近の研究では、細胞内輸送を介したオーキシンホメオスタシスが、高温応答に対する植物の応答を決定する上で重要な役割を果たすことが確認されている。細胞内のタンパク質輸送は、細胞骨格成分であるアクチンに大きく依存している。フィラメント状のアクチンは、輸送小胞の線路的な役割を担っており、フィラメントに沿って細胞内輸送が行われる。これは、アクチンが植物の熱応答の調節に積極的な役割を果たしている可能性を高める。しかし、高温ストレス下でのオーキシン、タンパク質輸送、アクチンの関係はまだわかっていない。本博士論文で申請者は、長期にわたる高温応答の調節におけるアクチンの役割の解明に焦点を当てた。

野生型では、長時間の高温中程度の高温が根の成長挙動が変化し、細胞分裂が阻害される。この現象は、アクチンの束化とオーキシン輸送体タンパク質 PIN1 および PIN2 の分布の変化、および細胞内オーキシン分布の変化に関連していることが示された。

栄養クラスのアクチン変異体を用いた研究では、ACT7とACT2は、長時間の高温でのオーキシン輸送体タンパク質の輸送の調節に重要な役割を果たしているが、ACT8はそうではないことが明らかになった。ACT7とACT2タンパク質が欠損されると、オーキシントランスポーターPIN1とPIN2の発現が大幅に減少し、根の成長が阻害される。さらに、ACT7およびACT2が存在しない場合、高温が長引くとアクチンがより多く束ねられ、オーキシンの分布が変化することも示されている。細胞内オーキシンの最大値の減少は、*act7*および*act2*変異体の細胞分裂および細胞伸長プロセスに影響を及ぼし、長時間の高温中程度に対するこれらの変異体の根の過敏感反応を引き起こす。

本博士論文では、申請者はACT7とACT2を高温応答の2つの新しい調節因子として特定し、これらのタンパク質が根の熱形態形成をどのように調節するかについて明らかにしたもので、草本植物の熱耐性増大を可能にする新規知見を提供し、農学だけでなく植物科学の進展への貢献も大きい。以上のことから、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、本論文を博士（学術）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

Parveen, S. and Rahman, A. (2021).

Actin isovariant ACT7 modulates root thermomorphogenesis by altering intracellular auxin homeostasis.

International Journal of Molecular Science 22 (14),7749.