

# 論文内容の要旨

申請者氏名 Ng Lee Mei

Drought and salinity are major environmental stresses that are commonly encountered by plants. Propyzamide hypersensitive 1 (PHS1) was discovered in *Arabidopsis thaliana* to link hyperosmotic stress to cytoskeleton remodeling. PHS1 consists of a tubulin kinase domain and a phosphatase domain. Under unstressed conditions, the phosphatase suppresses the tubulin kinase activity. Upon hyperosmotic stress, the tubulin kinase is immediately activated and phosphorylates Thr-349 of  $\alpha$ -tubulin, thereby converting it to a polymerization-incompetent form and subsequently leading to microtubule disassembly. Microtubules repolymerize after few hours even when the stress persists. However, it is not known how such transient microtubule disassembly affects plant performance under stress, and whether PHS1-mediated stress responses occur in other plants, especially in aquatic non-land plants.

I first surveyed the occurrence of *PHS1* genes in the sequenced plant genomes. *PHS1* is present in land plants and aquatic plants belonging to the phylum Charophyta, but are absent in Rhodophyta (marine red algae). In my study, I chose the model green algae *Chlamydomonas reinhardtii* (fresh water algae of the phylum Chlorophyta). A T-DNA insertion knock-out strain and its complementation strain were generated. *Chlamydomonas* cells were synchronized by alternating light and dark periods.

Interphase cells of wild type and the complemented strain responded to 0.2-0.3M sorbitol by phosphorylating Thr349 of  $\alpha$ -tubulin within 10 min, while the tubulin phosphorylation level returned to a non-stressed level after 1 hr under continued stress conditions; cytoplasmic microtubules were transiently depolymerized. Mitotic cells also induced tubulin phosphorylation within 10 min of sorbitol stress, which was maintained for 1 hr. Tubulin phosphorylation and microtubule depolymerization were not observed in the *phs1* mutant cells with or without osmotic stress. Therefore, hyperosmotic moderate stress triggers PHS1-dependent transient tubulin phosphorylation, which manifests as transient microtubule disassembly in both interphase and mitotic cells. Cell growth in interphase was reduced by sorbitol but was not affected by PHS1. Application of sorbitol just before mitosis delayed cell cycle progression, which was partly dependent on the PHS1 function.

In conclusion, the fresh water green algae *C. reinhardtii* possesses a functional PHS1 tubulin kinase that is activated immediately and transiently after mild hyperosmotic stress. This ancient cytoskeleton modulation may be involved in cell division control under acute stress.

☐ やむを得ない事由[ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Ng Lee Mei

植物の進化上、海洋から陸上への生育環境の変化は細胞にいくつもの新機能の創造をもたらした。ストレスホルモンを介した乾燥適応遺伝子ネットワークは詳細に研究されているが、細胞骨格が乾燥ストレスに伴い素早く再編成することが近年明らかとなってきた。本研究は淡水性緑藻における微小管細胞骨格を脱重合させるチューブリン・リン酸化酵素 Propyzamide Hypersensitive 1 (PHS1)の機能を明らかにしたものである。

申請者はまず公開ゲノム情報を用いて植物界における *PHS1* 遺伝子の有無を調べた。その結果、緑藻 Chlorophyta 植物門において *PHS1* 遺伝子が誕生したこと、さらに、淡水性緑藻は *PHS1* 遺伝子を保持しているが、海洋性緑藻では欠損している場合が多いことを見出した。*PHS1* 遺伝子の進化は海洋から淡水への緑藻の生育環境の推移と関連している可能性を示唆している。

次に、申請者はモデル淡水性緑藻であるクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) の *PHS1* 遺伝子破壊株とその相補株を作製し、さらに細胞周期同調培養系を確立した。この実験系を用いて乾燥ストレス応答に関わる PHS1 機能を解析した。クラミドモナス細胞は軽度の高浸透圧ストレスに応答し、10 分以内に細胞内チューブリンの半分以上がリン酸化され、微小管の脱重合が引き起こされるが、この反応は一過的であり、1 時間以降にはストレス処理前の状態に戻る。この反応は PHS1 依存的であり、間期細胞でも分裂期細胞でもほぼ同様に見られた。

間期細胞の細胞体積の増大は浸透圧ストレスにより阻害されたが、この阻害には PHS1 は関与していなかった。一方、分裂期の細胞周期の進行も浸透圧ストレスにより遅延したが、PHS1 による微小管の不安定化がこの遅延の原因の一部となっていることが明らかとなった。乾燥や高塩ストレスに晒された際に、緑藻は PHS1 依存的な微小管不安定化を一部利用することにより、素早く細胞分裂を一時的に遅延させる機構を備わっていると考えられた。

以上のように、本論文は高浸透圧ストレスが淡水性緑藻のチューブリン・リン酸化と生育に及ぼす影響を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。

☐ やむを得ない事由[ 図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】