### 学位論文題名

Signals and transcription factors involved in phosphorus starvation responses in white lupin

(シロバナルーピンのリン欠乏応答に関わるシグナルと転写調節因子)

## 学位論文内容の要旨

Cluster roots contribute much to the adaptation to phosphorus (P) deficiency in white lupin (Lupinus albus L.). Cluster root formation is affected by the P-limiting level in shoots, but not in roots. Thus, shoot-derived signals have been expected to transmit the message of P-deficiency to stimulate cluster root formation. Transcription factors and signaling proteins have also been expected to be involved in such signaling cascades. The present study indicates that sugars are required for a response to P starvation including cluster root formation and the expression of P starvation-induced genes. Moreover, transcription of 60 genes encoding transcription factors and signaling proteins is shown.

Sugar signaling mediates cluster root formation and phosphorus starvation-induced gene expression

White lupin plants were grown *in vitro* on P-sufficient or P-deficient media supplemented with sucrose for 4 weeks. Sucrose supply stimulated cluster root formation in plants on both P-sufficient and P-deficient media, but no cluster roots appeared on the P-sufficient medium without sucrose. On the medium with sucrose, a high concentration of inorganic phosphate in leaves did not suppress cluster root formation. Because sorbitol or organic acid in the media did not stimulate cluster root formation, the sucrose effect was not due to increased osmotic pressure or enriched energy source, that is, sucrose acted as a signal. Gene transcription

induced by P starvation, LaPT1 and LaPEPC3, was magnified by the combination of P limitation and sucrose feeding, and that of LaSAP was stimulated by sucrose supply independently of P supply. These results suggest that at least two sugar-signaling mediating systems control P starvation responses in white lupin roots. One system regulates cluster root formation and LaSAP expression, which acts even when P is sufficient if roots receive sugar as a signal. The other system controls LaPT1 and LaPEPC3 expression, which acts when P is insufficient.

Transcription of 60 genes encoding transcription factors and signaling proteins

In the sugar mediating signaling cascades for P starvation responses in white lupin, a lot of transcription factors and signaling proteins are expected to be involved. A total of 60 cDNA fragments representing MYB-CC (coiled coil) genes, R2R3MYB genes, other transcription factor genes and signaling protein genes were isolated from white lupin, and their transcription in normal roots, cluster roots, leaves and shoot tips was analyzed under P-deficient and P-sufficient conditions. Five MYB-CC genes isolated by using degenerated primers showed high homology with *PHR1* that regulates many P starvation responses in *Arabidopsis*. Their transcription was detected in all organs tested and was not affected by the presence or absence of P. Twenty-nine R2R3MYB genes were isolated by using degenerated primers. Among them, transcription of *LaMYB12* was enhanced by P-starvation. Thirteen of other transcription factor genes and 13 signaling protein genes were obtained from the cDNA library. Among them, *LaCaM* encoding calmodulin protein was enhanced its transcription by P starvation. The correlation of these genes to P-starvation response was discussed.

This work reveals a sugar signal that mediates P starvation resistance and provides candidate genes that regulate P deficiency responses. The identified sugar signal and candidate genes expand the current information available on the regulation and signaling mechanisms during P deficiency in plants.

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 崎 満

副 査 教 授 増 田 清(北方生物圏フィールド

科学センター)

副查教授山岸真澄

副查教授渡部敏裕

学位論文題名

# Signals and transcription factors involved in phosphorus starvation responses in white lupin

(シロバナルーピンのリン欠乏応答に関わるシグナルと転写調節因子)

本論文は英文 70 頁、図 15、表 3、4 章からなり、参考論文 1 編が付されている。 シロバナルーピン (Lupinus albus L.) はリン酸欠乏条件下でクラスター根を誘導し、 リン酸欠乏に対して強い耐性を示す。これまでリン酸欠乏に対するシロバナルーピン の応答について様々な研究が行われてきたが、これらの応答反応を制御している機構 についてはほとんど知られていなかった。本研究は、シロバナルーピンにおいてリン 酸欠乏に対する応答反応を制御しているシグナル物質を明らかにし、かつ、転写調節 遺伝子の単離を行いそれらの機能解明を試みたものである。

1) 糖シグナルはクラスター根の誘導とリン酸欠乏により誘導される遺伝子の発現に 関わっている

クラスター根の誘導や根においてリン酸欠乏により誘導される遺伝子の発現は、根の中のリン酸濃度にはほとんど影響されず、葉のリン酸濃度の低下によって誘導されることが知られている。このことは何らかのシグナルが地上部から根へ送られていることを示している。アラビドプシスでは糖がこの情報伝達に関与しており、本研究ではシロバナルーピンでも糖が情報伝達に関わっていることを示した。In vitro で生育したシロバナルーピンにショ糖、ブドウ糖、または果糖を与えるとクラスター根が誘導された。この誘導は培地中のリン酸の有る無しに関わらず起こった。糖以外の炭素源ではこの効果は認められなかったことより、糖によるクラスター根の誘導は、浸透圧やエネルギー源の増加によるものではなく、糖がシグナルとして作用して起こったものと考えられた。同様の効果はリン酸欠乏により誘導される遺伝子の発現にも認められ、糖の添加によってこれらの遺伝子の転写量が増加した。このうち LaSAP はリン酸の有る無しに関わらず発現誘導が起こり、一方、LaPT1 と LaPEPC3 はリン酸欠乏条件

下でのみ糖添加による発現増加が認められた。このことは糖が関与したシグナル伝達 系は少なくとも2つあることを示唆している。アラビドプシス以外の植物でこのよう なシグナルの存在を示した例はほとんど無い。クラスター根を誘導するシロバナルー ピンとそのような特殊な根を作らないアラビドプシスが同じ物質をシグナルとして利 用していることは興味深い。

### 2) 60 の転写調節遺伝子の単離と発現解析

MYB などの転写調節因子やシグナル伝達に関与しているタンパクをコードしている遺伝子を、合わせて 60、シロバナルーピンより単離し、発現プロファイルを明らかにした。このような遺伝子をシロバナルーピンより単離して解析した例はこれまでに無い。

中でも、5 つ単離された MYB-CC (Coild Coil) 遺伝子はアラビドプシスの PHR1 といずれも高いホモロジーを示した。PHR1 タンパクは、リン酸欠乏により誘導される遺伝子のプロモーター領域にある PHR1-binding-domain を認識して転写を調節している転写調節因子である。シロバナルーピンのリン酸欠乏に応答する遺伝子のプロモーター領域にも PHR1-binding-domain があることより、シロバナルーピンにおいても PHR1 類似の転写調節因子がリン酸欠乏応答に重要な役割りを担っていると考えられる。今後、シロバナルーピンから単離した 5 つの MYB-CC 遺伝子のうちどの遺伝子がPHR1-binding-domain と結合するか、調査する必要がある。

シロバナルーピンを用いてリン酸獲得の機構を明らかにする研究はこれまで盛んに 行われ、多くの構造遺伝子の単離と機能解析が行われてきたが、これらの遺伝子の発 現を誘導する情報伝達系についての研究は少なかった。クラスター根の誘導は、葉の リン酸レベルが低下することによって誘導されるが、本研究はこの情報の伝達に糖が 関与していることを明らかにした。また、シロバナルーピンから転写調節因子を単離 して発現を解析した研究はこれが初めてで、本研究は有用遺伝子の転写調節を解明す る今後の研究の足がかりと期待される。

よって審査員一同は、周克琴が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。