

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 柳 蔘 奎

中国での不良土は全耕地の1/3に当たる。その中でもアルカリ性土壌は、中国の遼寧省、吉林省、黒龍江省などの地域に広く分布し、大きな問題である。アルカリ性土壌は塩類集積土壌で、主に炭酸水素ナトリウムや炭酸ナトリウムが集積しているが、これらの塩が加水分解することによってアルカリ性を呈する。この2種類の塩が植物に与えるストレスを本論文で炭酸塩ストレス (Carbonate stress) と呼ぶ。本論文では、イネにおいて炭酸塩ストレスと関連すると考えられる遺伝子、またこのストレスに対して応答する遺伝子をクローニングし解析した。またその結果に基づき、新たな視点から植物の炭酸塩耐性のメカニズムの検討を試みた。

1章の緒論では、研究の背景、意義と目的について述べている。

2章では炭酸塩ストレスがイネの育成におよぼす影響について解析した。炭酸ナトリウムストレスと炭酸水素ナトリウムストレスを比較すると炭酸ナトリウムストレスの方が生育阻害の程度が大きいことが分った。また、ほぼ同じpH、ナトリウムイオン濃度に調製しても、NaCl処理に比べ炭酸塩ストレスの方が植物に強い生育阻害を与えていることから、炭酸塩ストレスには高濃度のナトリウムイオンによるストレス、高pHストレスに加えて、 $\text{HCO}_3^-$ と $\text{CO}_3^{2-}$ とが植物に強い生育阻害効果を持つことが示唆された。

3章では炭酸脱水酵素遺伝子のクローニングおよび発現特性の解析を行った。その結果、イネのCA遺伝子はORFに対応する塩基配列が8060bpで、この遺伝子は8つのexonとは7つのintronから構成されていることが判明した。次にCA遺伝子の発現特性について解析した。CA遺伝子は葉で多く発現しているが、根においては炭酸塩ストレスに誘導されることが明らかになった。また、酸ストレスや弱アルカリ性条件下で大量的に誘導されるなど外部環境のpHに応答することが明らかになった。さらに光の強さなどの因子にも応答していることが判明した。

4章ではディファレンシャルディスプレイ法と大腸菌を用いた炭酸塩ストレス耐性の機能スクリーニングにより、炭酸塩ストレスと関連する遺伝子の単離および解析を行った。その結果、NADP-Malic Enzyme I (NADP-ME1)、NADP-Malic Enzyme II (NADP-ME2)、Heat shock protein90、L-ascorbate peroxidase (APX)、thioredoxin、ABA and stress inducible proteinなどの遺伝子、およびこれまで相同な配列が報告されていない数種類のタンパク質の遺伝子を単離し、これらの塩基配列と発現特性を解析した。その中で細胞内pHの調節に関わるNADP-ME遺伝子が炭酸塩ストレスに誘導されることから、炭酸塩ストレス条件下では細胞内のpHが異常になることによって、植物は障害を受けることが推察された。一方、活性酸素の解毒系に関与するAPX遺伝子の発現が炭酸塩ストレス

によって誘導されているため、炭酸塩ストレスによっても活性酸素が生成することにより酸化ストレスを受けていることが示唆された。

5章では炭酸塩ストレスが細胞内のpH制御メカニズムに及ぼす影響について解析するために、植物細胞内のpH調節に関わると考えられる遺伝子のストレス下における発現特性を調べた。その結果、NADP-ME、PEPCase遺伝子は炭酸塩ストレスに誘導されること、さらに3つの酵素は根およびカルスにおいては酸性ストレス条件下で発現量が増加することが分かった。また、細胞膜ATPase (P-ATPase) 遺伝子の発現は炭酸塩ストレスによって大量に誘導されており、また液胞膜PPase (v-PPase) 遺伝子も炭酸塩ストレスによって誘導されることが示された。この結果は以下のように解釈できる。植物が炭酸塩ストレスを受けると細胞内 $\text{HCO}_3^-$ 濃度が増加するためPEPCaseの活性が上昇して解糖系の反応を促進し、細胞質が酸性に傾くことが考えられた。これに対してNADP-MEはプロトンを消費して細胞内のPHを調節するという重要な役割を果たすと考えられた。一方、P-ATPase 遺伝子は炭酸塩ストレスによって大量に誘導されることから、プロトンを細胞外に排出することによって酸性化された細胞内のpHを調節することが示唆された。

以上本研究はアルカリ性土壌における炭酸塩ストレスが植物に与える障害と耐性機構について分子レベルで詳細に検討したものであり、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は本論分が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。