

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 青 野 俊 裕

土壤中に存在するリンの10~80%は有機態リンであり、残りの無機態リンも、リン酸イオンとFe、Al、Ca原子との非常に強い親和性のため、ほとんどがこれらの原子と強く結合した難溶性リン酸化合物として土壤に固定されている。このため、植物の利用できる土壤中水溶性無機リン酸濃度はきわめて低い。植物は一度根付いた場所から移動することができないので、環境中の栄養条件の変動に対して敏感に適應する能力を発達させてきたと考えられる。リン酸に関しても、土壤への固定や植物自体による吸収のために環境中リン酸濃度が低下した場合、植物は様々な反応を示し、致命的なリン酸欠乏を回避している。植物のリン酸獲得戦略の一部として、リン酸吸収能の促進、根からの有機酸、プロトン分泌などがよく知られている。根から分泌された有機酸とプロトンは難溶性リン酸化合物を溶解する働きがある。本論文は、西アフリカ原産のマメ科植物であるセスバニア (*Sesbania rostrata*) を用いて、リン酸欠乏に対する応答を、リン酸吸収促進、有機酸及びプロトンの放出を中心に、生理学的ならびに分子生物学的に解明したものである。

第1章では研究の背景を記述している。続く第2章では、リン酸欠乏がセスバニアの生長に及ぼす影響について検討を行った。生理的な試験の結果、セスバニアは体内リン酸濃度の低下に対して強い耐性を示し、茎頂部のリン酸濃度が低下しない限り生長しうることが示唆された。つぎに、セスバニアの根におけるリン酸欠乏によるリン酸吸収機構、有機酸分泌機構の促進について調べた。植物のリン酸吸収は高親和性吸収機構および低親和性吸収機構で行われおり、リン酸濃度の低い土壤からのリン酸吸収には高親和性吸収機構が主に働いており、リン酸欠乏条件下ではこの機構が促進されると考えられている。さまざまな生理試験の結果、セスバニアは低親和性吸収機構によっても低濃度のリン酸を吸収できると考えられた。また、セスバニアは体内リン酸濃度の低下に対してリン酸欠乏応答するのであって、環境中リン酸濃度に対してではないと結論づけた。

第3章では、リン酸欠乏応答に関与すると考えられる高親和性リン酸トランスポーター遺伝子とホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) 遺伝子の単離を試みた。最終的に高親和性リン酸トランスポーターをコードしていると思われる増幅断片を2種類、PEPCをコードしていると思われる増幅断片を1種類取得し、5'-,3'-RACEを行い、これらの完全長cDNAを取得した。既知のリン酸トランスポーター遺伝子、PEPC遺伝子との相同性の高さ、推定二次構造の類似性より、これらは高親和性リン酸トランスポーター遺伝子 (*SrPT1*, *SrPTC2*)、PEPC遺伝子 (*SrPEPC*) であると判断した。つぎに、これらの遺伝子の発現について、さまざまなリン酸欠乏処理期間、リン酸濃度条件で生育させた植物体、及び茎粒を形成させた植物体を用いてノーザン解析を行った。その結果、*SrPT1*, *SrPT2*の転

写促進とリン酸吸収速度の促進は同調しており、同様に *SrPEPC* の転写促進と PEPC 活性の促進も同調していた。この結果は、リン酸トランスポーターの発現と PEPC の発現は両方とも転写レベルで体内リン酸濃度により調節されていることを示唆した。さらに、細胞質リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (cMDH) をコードする cDNA も単離した。ノーザン解析の結果、cMDH 遺伝子もリン酸欠乏により転写が促進されることがわかった。リン酸欠乏条件下においてセスバニアの根からはリンゴ酸が多量に放出されるが、PEPC によりホスホエノールピルビン酸から合成されたオキサロ酢酸が、速やかに細胞質において cMDH によりリンゴ酸に変換されるためではないかと推測された。つぎに、各組織を用いてノーザン解析を行ったところ、*SrPEPC* は根粒及び茎粒でも高発現していることがわかった。また、茎粒における *SrPEPC* の発現はリン酸欠乏により抑制された。いくつかのマメ科植物で根粒で高発現する PEPC (nodule PEPC) の遺伝子が単離されているが、これらは根での発現が弱く、根で発現するタイプの PEPC (root-form PEPC) とは異なると考えられている。セスバニアの *SrPEPC* は root-form PEPC としても、nodule PEPC としても機能していると考えられた。

第4章では、リン酸欠乏応答型 H^+ -ATPase 遺伝子の単離を行った。リン酸欠乏条件下では根における H^+ -ATPase の活性が上昇し、根からのプロトン放出量が増加するのではないかと、多くの研究者たちにより推測されているが、未だにリン酸欠乏に応答する H^+ -ATPase 遺伝子は単離されていなかった。最終的に、 H^+ -ATPase をコードする増幅断片を5種類 (*SrHA1*, *SrHA2*, *SrHA3*, *SrHA4*, *SrHA5*) 取得し、3'-RACE および 5'-RACE により *SrHA1*, *SrHA4*, *SrHA5* の完全長 cDNA を単離した。ノーザン解析の結果、*SrHA1* は子葉で、*SrHA4* は根で、*SrHA5* は根粒及び茎粒でそれぞれ主に発現していた。セスバニアをリン酸欠乏条件下におくと、処理後2日目から *SrHA4* の発現は抑制され始めた。さらに条件を細かくすると、高親和性リン酸トランスポーター遺伝子と PEPC 遺伝子の発現が促進される条件下では *SrHA4* の発現は抑制されることがわかった。この結果はこれまでの仮説に全く反するものであった。

本論文は、マメ植物セスバニアのリン酸欠乏応答に関与する主要な遺伝子を取得し、その発現を検討し、いくつかの新しい知見を明らかとしたものであり、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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。