

## 審査の結果の要旨

氏 名 竹 村 太 郎

本論文は、高い耐塩性能を有しながらそのメカニズムについての分子生物学的な研究がこれまで行なわれてこなかったマングローブのオヒルギについて、抗酸化系酵素の塩ストレス応答の解析を行なったものであり、6章より構成されている。

第1章は緒論であり、本研究が行われた背景について述べ、及び本研究の目的と意義を明らかにしている。

第2章では、オヒルギに塩ストレスを与えた場合の葉中のナトリウム濃度およびスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)とカタラーゼの酵素活性の経時変化について測定している。塩ストレス処理の結果、オヒルギの全 SOD 活性は、塩処理開始後すぐに上昇し始め、最終的には9日目で塩処理開始時の約8倍に達すること、カタラーゼも SOD と類似した変化を示し、9日目の活性は塩処理開始時の約5倍くらいであることを示している。オヒルギ葉中のナトリウム濃度については処理開始時に150 mM 程度であり、3日後ぐらいまでは急激に上昇し、最終的には約450 mM に達することを確認している。以上からオヒルギは塩環境下では塩を植物体内に吸収すること、SOD やカタラーゼなどの抗酸化系が活性化されることが明らかとなり、このことから塩ストレスによる障害の低減に活性酸素消去系が寄与していると結論している。

第3章では、オヒルギの細胞質型 Cu/Zn-SOD とカタラーゼの遺伝子をクローニングして、その cDNA をプローブとし、発現レベルでの塩ストレス応答をノーザンハイブリダイゼーションにより解析している。クローニングした細胞質型 Cu/Zn-SOD 配列を決定して、153 残基のタンパクをコードしていること、他の植物のホモログと約 80% 以上の高い相同性があることを明らかにしている。次に塩処理を行い、ノーザンハイブリダイゼーションによって細胞質型 Cu/Zn-SOD とカタラーゼの発現変化を調べている。細胞質型 Cu/Zn-SOD 遺伝子の転写レベルでの発現には、塩処理後1日以内と5~7日後の2つのピークを認めている。最も強い発現が5日目で観察されたことは、SOD 活性測定値が5日目以降も増大していることを支持し、細胞質に局在する細胞質型 Cu/Zn-SOD が塩ストレスによる植物への障害の低減に寄与している可能性を示唆していると述べている。塩処理の代わりに等しい浸透圧を与えるマンニトール溶液で同様の実験を行なっている。マンニトール処理して1日後のノーザン解析によると細胞質型 Cu/Zn-SOD は発現が増加することを示している。よって塩処理における1日後の細胞質型 Cu/Zn-SOD の発現増加は塩の浸透圧によるものであることが示唆されると述べている。塩処理5日後は葉が萎れておらず、葉中の塩濃度が300 mM 程度まで高まったときなので、細胞質型 Cu/Zn-SOD の増加は葉中の塩によるイオンストレスによるもの、つまり塩ストレス応答

は初期と後期の 2 段階に分けることができるとしている。次に葉の位置の違いによって塩ストレスに対する応答がどのように異なるかを調べている。その結果、若い葉や成熟した葉は老化した葉よりも塩ストレスの影響を受けやすいと述べている。最後にどの植物ホルモンが細胞質型 Cu/Zn-SOD やカタラーゼの発現に関与しているかを調べている。オヒルギにアブシジン酸(ABA)、ジャスモン酸メチル(MJ)、2-クロロエチルホスホン酸(CEPA)を与えてノーザンブロット解析を行なっている。解析の結果、細胞質型 Cu/Zn-SOD の発現には ABA が関与していること、カタラーゼの発現制御はエチレンに関与することが示唆されると述べている。

第 4 章では、細胞質型 Cu/Zn-SOD の耐塩性における役割を示すため、タバコの細胞質型 Cu/Zn-SOD 過剰発現組換え体を作製し、耐塩性評価を行なっている。最終的に遺伝子が組み換えられたタバコ再生体を 10 個体ほど得ている。これらの株の種子を使用して、発芽による塩ストレス耐性の評価を行なっている。

第 5 章では、抗酸化作用としての銅シャペロンに着目し、遺伝子発現レベルでの塩ストレス応答をノーザンハイブリダイゼーション解析している。銅イオンは Cu/Zn-SOD を始めとするいくつかの酵素の補酵素として細胞に必須のものであるが、ハーバー・ワイス反応によって活性酸素種の中でも最も毒性の高い種とされているヒドロキシラジカルを発生させ得ると述べている。銅シャペロンは細胞質から銅イオンを輸送しゴルジ体へ隔離するので、細胞質の銅イオン濃度を下げることによって活性酸素の発生を抑制する可能性を述べている。オヒルギの銅シャペロン遺伝子は全長 121 残基で、うち N 末端側 70 残基ほどは他の動植物のホモログと相同性があると述べている。この部分は銅イオンと結合するドメインであるとしているが、残りの C 末端側は動物や細菌のホモログには存在せず、他の植物とは相同性が低い部分で、7 残基の TE(A/P)KPA(E/K)を単位とする 6 回の繰り返し配列となっていることを明らかにしている。この部分の役割は未知ながら、2 次構造の予測としてはアミノ酸のチャージから  $\alpha$  ヘリックスを組む可能性をあげている。銅シャペロンの発現量については塩処理時に老いた葉では発現が大きく増加することを確認している。これらの結果と、銅シャペロンは老化した葉において銅イオンを別の器官に運ぶために働くことが報告されていることを考えると、塩ストレスによって老化現象が進行する可能性が示唆されると述べている。

第 6 章では、本研究で得られた知見を総括している。

以上のように、本論文は、オヒルギの塩ストレスに対する応答、特に抗酸化系酵素の遺伝子レベルでの応答についての解析に成功している。

よって、本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。