

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻

平成11年度博士課程 入学

氏名 Nurul Khumaida

指導教官名 高野 哲夫

論文題目 Studies on adaptability of soybean and upland rice to shade stress

(和訳 ダイズおよび陸稲の遮光ストレスへの適応機構に関する研究)

慢性的な耕地不足を解消するために、インドネシアでは樹間の耕地利用が注目されている。樹間を耕地として利用する場合、最も深刻な問題になるのは、樹木による遮光により混作する作物が享受する光が不足することである。そこで、弱光条件に遺伝的に適応した作物や、樹間栽培に技術的な点で適した作物、経済的に有利な作物を明らかにするための研究が行われている。今後、そのような遮光ストレスに耐性を持つ作物を育種するためには、作物の耐性機構を明らかにすることが必要不可欠である。しかし、耐性機構に関して、生理学的または分子遺伝学的なレベルで行われた例はこれまでなかった。そこで遮光（弱光）条件における植物の適応反応を明らかにする事を目的とした研究を行った。

### 1. 遮光に対する耐性が異なるダイズ・陸稲品種の生育特性の解析

50%遮光区と対象区とを設けて、ダイズ・陸稲品種を栽培し、いくつかの発育ステージで生育調査を行い、品種間差について解析した。用いた品種は、ボゴール農科大学（インドネシア）におけるス

クリーニングで遮光に対する耐性が異なることが明らかになったダイズ・陸稲品種である。遮光区では、市販の50%遮光ネットを用いて、光の波長等の質的な変化はなく、光の強さだけを減じた。

遮光区のダイズにおいて、遮光耐性が弱い品種はより徒長し、分枝の数が著しく減少したため、100粒重が減少する結果となった。陸稲では、遮光は播種後50日の時点まで草丈に影響を及ぼさなかったが、80日から110日で草丈に変化が生じた。遮光区で耐性品種は分げつ数が感受性品種より多く、感受性品種は、分げつ数、有効分げつ数共に少なかった。これらの結果から、遮光に対する植物の生育応答は品種に強く依存することが明らかになった。

## 2. 遮光区および対象区におけるダイズの光合成特性

遮光耐性の異なるいくつかのダイズ品種を用いて、遮光下における光合成特性および光合成器官の微細構造の変化を解析した。光合成速度は、完全に展開した葉で上から3番目の葉を用い、携帯型の光合成測定装置を用いて計測した。光合成測定に用いた葉と同じ葉位の葉を切り取り、クロロフィル含量を測定した。電子顕微鏡による組織観察のためには第2葉を固定して用いた。遮光区において、遮光耐性品種と感受性品種との間で、光合成速度、クロロフィルb含量、クロロフィルa/b比、および葉緑体の形態に大きな差が見られた。遮光耐性品種の中では、品種Pangrangoがもっとも大きな光合成速度を示した。また電子顕微鏡による組織観察により、遮光耐性品種のPangrangoとB613は、より発達したグラナ、多くの澱粉粒、チラコイド膜を持ち、逆にストロマは少ないことがわかった。それに対して遮光感受性品種のGodekでは、未発達のグラナと、より多くのストロマが観察された。また、耐性品種Pangrangoと感受性品種GodekとのF1においては、暗黒下に9日間おいた後でも、耐性品種である片親のPangrangoと比較して、非常に発達したグラナが観察できることが興味深かった。これらの結果から、耐性品種においては、遮光下においても、光化学系IIが存在するグラナがよく発達することにより光合成能力が高いことが示唆された。また光合成速度はクロロフィルb含量と正の相関、クロロフィルa/b比と負の相関関係にあることがわかった。

## 3. ダイズおよび陸稲品種の葉における光合成関連遺伝子の発現解析

遮光ストレス下において感受性品種では光合成能力が低下することが重要な意味を持つと考えられる。そこでいくつかの光合成関連遺伝子の発現が、光条件によりどのように変化するか、ノーザンブロッ

トにより解析した。

遮光処理は1、3、9、18日（短期間遮光）および70日（長期間遮光）行い、プローブとするRubisco(rbc)、Rubisco activase(rca)、light-harvesting complex protein(lhcp)のcDNAはRT-PCRにより合成した。

rbcとrbaに関しては、対照区および遮光区において耐性品種と感受性品種との間で遺伝子発現の差は観察できなかった。両遺伝子の発現には正の相関があった。また、遮光区において対照区より強い遺伝子発現が観察できた。

lhcpの遺伝子発現も遮光区において対照区より強かった。またダイズの耐性品種（B613、Ceneng、Orba、Pangrango）は感受性品種（Godek、8529）よりもlhcpの遺伝子発現が明らかに高かった。さらにlhcpの遺伝子発現量はクロロフィルb含量と正の相関、クロロフィルa/b比と負の相関を示すことから、lhcpの遺伝子発現が遮光ストレス耐性に深く関与することが示唆された。

#### 4.遮光ストレスに応答する遺伝子のディファレンシャルディスプレイ法による同定

rbcやrcaの遺伝子発現には耐性品種と感受性品種との間に大きな差がなかったことから、遮光ストレスに応答する遺伝子を同定することを目的としてディファレンシャルディスプレイ法を試みた。播種後3週間のダイズ品種を9日間ストレス処理し、RNAを抽出した。合成したcDNAを鋳型としてアンカープライマーを用いたPCRを行い、電気泳動後、特異的なバンドを検出した。リバースノーザン法で特異的発現が確認できたクローンについて塩基配列を決定しノーザン解析を行った。

得られたクローンについてデータベースを検索したところ、特異的な発現が確認できた9クローンのうち3クローンは、光化学系II、チトクロム、光化学系Iに関与する遺伝子と高い相同性があり、光合成の電子伝達の過程に深く関与するチラコイド膜のタンパク質であることが明らかになった。この結果は、遮光区の耐性品種において感受性品種よりも発達したグラナ構造が観察された結果とよく一致する。

これら3つの遺伝子は、対照区においては差がなかったが、遮光区においては耐性品種において感受性品種より高発現していた。

光化学系IIに関与する遺伝子の発現についてより詳細に解析するために、反応中心のタンパクをコードする遺伝子psbA、psbD、および内部アンテナのタンパクをコードする遺伝子psbB、psbCについてもノーザン解析を行った。これらの遺伝子は、耐性品種、感受性品種のいずれにおいても遮光処理により発現が低下したが、両品種のF1においては遮光区における低下が見られなかった。この結果はF1植

物の遮光に対する適応に、光化学系IIの反応中心と内部アンテナが重要な役割を果たす可能性を示している。

以上の結果から、葉緑体におけるグラナ構造の発達や、クロロフィルbの合成などによる光合成における適応が、遮光ストレス下で光を最大限受容する上で重要であることが明らかになった。また、lhcp遺伝子の発現は光合成能力を高める上で重要であると考えられた。さらにチラコイド膜のタンパク質は、光合成の電子伝達の過程を制御することにより遮光ストレス耐性に関与することが示唆された。