

論文の内容の要旨

論文題目 オヒルギ(*Bruguiera gymnorrhiza*)の耐塩性に
 関与する遺伝子の探索とその機能の解析

氏名 坂 西 俊 明

現在地球上の灌漑耕地のおよそ半分にあたる土地が塩害を被っているといわれている。これらの土地でも生育が可能な耐塩性作物の育種は、食料問題への対処策として期待されている。これまで耐塩性作物の育種は主に交配による手法により行われていたが、近年、塩生植物種に特徴的な耐塩性機構である Na^+ の液胞への隔離機構に関与する遺伝子を導入したトマトが、野性株の生長に最適な濃度のおよそ 80 倍の高 NaCl 濃度下においても通常通り生長可能であったという報告がなされた。これは遺伝子工学的手法による耐塩性作物の育種の可能性を示すとともに、そのためには塩生植物種の有する耐塩性機構を理解することが重要であることを示唆している。

そこで本研究では、塩生植物種のなかでもとりわけ耐塩性能の高いマングローブ植物の一種、オヒルギ(*Bruguiera gymnorrhiza*)に着目し、その耐塩性機構を遺伝子レベルから解明することを試みた。マングローブ植物種はその大半が木本植物であり、核酸抽出が困難であるということから、これまでに遺伝子レベルでの解析はほとんど行われていないのが現状である。そこで本研究ではまずオヒルギの葉からの RNA 抽出法を確立し、塩ストレス応答性遺伝子の探索とその遺伝子の塩ストレス時における生化学的機能の検討を中心に解析を進めた。

第 1 章は緒論であり、高等植物の耐塩性機構に関する研究およびマングローブ植物の耐塩性に関する研究について、これまでに得られている知見をまとめた。

第 2 章では、まずオヒルギの葉からの RNA 抽出方法の確立を行い、次に塩ストレス応答性遺伝子の探索を行った。遺伝子の探索には、500 mM NaCl による塩処理前、塩処理 6 時間目、3 日目および 28 日目のオヒルギの葉から抽出した RNA を比較サンプルとして、differential display 法を用いた。次にそこで得られた遺伝子断片を用いてノ

ノーザン解析を行い、塩ストレス応答性遺伝子に対応する遺伝子断片を 9 つ単離した。本研究ではノーザン解析の結果を受け、塩ストレス時における発現パターンによりこれらを 3 つの群に分類した。Group I は塩処理 6 時間目で一時的に発現量の増加する遺伝子群、Group II は塩処理 6 時間目から少なくとも 28 日目まで発現量が増加する遺伝子群、Group III は塩処理 3 日後で一時的に発現量の増加する遺伝子群である。次にこれらの遺伝子断片に対応する全長 cDNA のクローニングのため、cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、5 つの遺伝子断片について、対応する全長 cDNA のクローニングに成功した。これらについては塩基配列の解析、さらにデータベースの相同性検索を行い、遺伝子産物を同定した。

第 3 章では、Group III に分類した bg56 (dihydrolipoamide dehydrogenase; DLDH) と bg64 (lipoate synthase; LAS) について、その塩ストレス時における生化学的機能に関する解析を行った。ノーザン解析の結果、これらの遺伝子は光条件とは無関係に塩処理 1 日目から 3 日目にかけて塩処理前と比較して発現量が増加した。また、塩処理時におけるオヒルギの葉からの二酸化炭素放出量を測定した結果、この転写量の増加に伴い、二酸化炭素放出量が増加した。これらの結果は、塩処理 1 日目から少なくとも 3 日目にかけて、DLDH と LAS が関与するミトコンドリア中の酵素複合体のうち、TCA 回路に関連した反応を触媒するピルビン酸脱水素酵素および 2-オキソグルタル酸脱水素酵素の機能が強化され、呼吸代謝が活性化されていることを示している。

第 4 章では、第 3 章での解析結果を受け、塩処理時における呼吸代謝の活性化の生化学的意義について検討を行った。呼吸代謝の活性化は通常 ATP 生産量の増加を意味する。塩ストレス時にこの ATP を消費する分子機構の一つの候補として、 Na^+ の液胞への隔離機構が挙げられる。そこで本章では、塩処理時におけるオヒルギの葉中の Na^+ 含量変化の測定および液胞へ Na^+ を輸送する Na^+/H^+ antiporter 遺伝子の発現解析を行った。オヒルギの葉中の Na^+ 含量は、塩処理直後から 10 日目過ぎにかけて急激に増加し、その後はゆっくりと増加していた。一方、 Na^+/H^+ antiporter 遺伝子の転写レベルでは塩処理 1 日目から 7 日目にかけて、すなわち葉に急激に Na^+ が流入している際に、発現量が増加しており、処理 14 日目および 28 日目には再び処理前と同じレベルにまで減少した。これらの結果は、オヒルギの葉においては塩処理 1 日目から 7 日目過ぎにかけて Na^+ の隔離機構が活性化されていることを示唆している。 Na^+ を液胞へと輸送する際には液胞膜内外のプロトン勾配が必要であるが、これは H^+ -ATPase による ATP エネ

ルギーを利用したプロトン輸送により形成されていることが知られている。したがって、呼吸代謝の活性化による ATP 生産量の増加の意義は、活性化のタイミングが一致していることから、主にこの一連の Na^+ の隔離機構の活性化のためではないかと考えられる。

第 5 章では、Group I に分類した bg51 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphate 2-phosphatase; F6P2K/F26BPase) について、水ストレス時における機能を中心に解析を進めた。脱水処理、1M mannitol 処理および 500 mM NaCl 処理 6 時間により水ストレスを与えたオヒルギについて、転写レベルでの発現量および両酵素活性の測定、さらに代謝産物である fructose-2,6-bisphosphate (F26BP) の定量を行った。その結果、いずれの処理によっても葉の F26BP 含量が非処理の対照と比較して増加した。また、1M mannitol 処理および 500 mM NaCl 処理 6 時間といった、急激な浸透圧変化を伴う水ストレス時には、転写量の増加と両酵素活性の増加がみられた。これは酵素量の増加を意味しており、これにより F26BP 含量が増加していた。一方、脱水処理により水ストレスを与えた際には、F6P2K/F26BPase の kinase 活性と phosphatase 活性の比 (K/P 比) が増加し、それにより葉の F26BP 含量が増加した。

次に塩処理を行ったオヒルギについて同様の解析を行った。その結果、塩処理時には常に葉の F26BP 含量が塩処理前と比較しておよそ 2 倍に増加した。転写レベルでの発現量の増加がみられたのは、葉が強くしおれている塩処理 6 時間目のみであった。葉のしおれが回復した処理 1 日目以降のオヒルギでは、発現量に変化はみられず、K/P 比が増加していた。これらの結果は、オヒルギは塩処理時には常に水ストレスの影響を受けていることを示唆している。

第 6 章では、シロイヌナズナにおける水ストレス応答性遺伝子である RD22 遺伝子の、オヒルギにおける相同遺伝子となる BgBDC3 に着目し、これを用いた発現解析から、塩ストレス時における水ストレスの影響について解析を行った。RD22 はシロイヌナズナにおいては植物ホルモンアブシジン酸 (ABA) を介して水ストレス時に発現が誘導されることが知られているが、その相同遺伝子となる BgBDC3 はオヒルギにおいては逆の発現パターンを示し、ABA を介して水ストレス時には発現が抑制されることがわかった。オヒルギの塩処理時における BgBDC3 の発現パターンを解析した結果、塩処理により数時間後には発現が抑制され、少なくとも処理 28 日目まで発現は抑制されたままであった。これは、オヒルギは塩処理中は常に水ストレスの影響を受けてい

ることを示しており、第 5 章での解析を裏付ける結果となった。

第 7 章では、Group II に分類した新規遺伝子 bg70 および Group I に分類した機能未知のタンパク質をコードする bg55 について、アミノ酸配列のキャラクタリゼーションおよびノーザン解析の結果からその機能を考察した。bg55 のコードするタンパク質は Ca^{2+} 結合ドメイン、核移行シグナル配列、さらに他のタンパク質と相互作用するモチーフを有することから、ストレス時におけるシグナル伝達に関与している可能性が示唆された。

一方、bg70 に関してはノーザン解析の結果、水ストレスにより発現量が増加すること、さらにアミノ酸配列の解析の結果、細胞外または液胞中へと輸送される可能性の高い疎水性タンパク質をコードしている遺伝子であることがわかった。これらの特徴はこれまでに水ストレス時に蓄積することが知られているタンパク質とは逆の性質を示すものであり、またこの遺伝子がオヒルギあるいはその近縁種に特有の遺伝子であることから、オヒルギに独特な特徴である高い耐塩性能に深く関わっているのではないかと推察される。

第 8 章は結論であり、本研究で得られた知見をオヒルギの塩処理応答としてまとめた。