

審査の結果の要旨

論文提出者氏名

坂西俊明

本論文は、高い耐塩性能を有するマングローブの一種、オヒルギ (*Bruguiera gymnorrhiza*) の耐塩性遺伝子の探索とその機能解析に関するものであり、8章より構成されている。

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

第2章では、まず、本研究で確立したオヒルギの葉からの RNA 抽出法について述べている。さらに differential display 法の適用により塩 (500 mM NaCl) 処理に応答して発現する遺伝子の探索を行っている。その結果、9つの塩ストレス応答性遺伝子を特定し、そのうちの5つについて遺伝子産物を同定している。これらはそれぞれ、bg51 が 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphate 2-phosphatase、bg55 が機能未知のタンパク質、bg56 が dihydrolipoamide dehydrogenase、bg64 が lipoic acid synthase、bg70 が新規タンパク質をコードしていることを明らかにしている。また、塩処理時における経時的な転写発現パターンにより、これらの遺伝子を処理 6 時間目で一時的に発現量が増加する Group I、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 Group II、さらに処理 3 日目で一時的に発現量が増加する Group III という3つの群に分類している。

第3章では、Group III に分類した bg56 と bg64 についてその生化学的機能の解析を行っている。これらの遺伝子の転写発現量が光条件に無関係に塩処理 1 日目から 3 日目にかけて増加すること、およびこれに伴いオヒルギの葉の呼吸活性が増加することを明らかにしている。このことから、塩処理 1 日目から少なくとも 3 日目にかけて TCA 回路が活性化され、呼吸代謝が活性化されていると述べている。

第4章では、呼吸代謝の活性化の意義を明らかにするために、ATP エネルギーの消費機構のひとつである Na⁺ の液胞への隔離機構に着目して解析を行っている。塩処理直後から 10 日目までの間、葉へ急激に Na⁺ が流入していること、および、Na⁺ を液胞へと輸送する Na⁺/H⁺ antiporter 遺伝子の転写発現量が塩処理 1 日目から 7 日目にかけて増加していることを明らかにしている。呼吸代謝および Na⁺ の液胞への隔離機構の活性化のタイミングが一致していることから、ATP 生産量の増加は、主にこの Na⁺ の液胞への隔離機構への供給のためではないかと述べている。

第5章では、Group I に分類した bg51 について、酵素活性およびその反応生成物の定量をもとに機能の解析

を行っている。この酵素が触媒する反応の生成物である fructose-2,6-bisphosphate (F26BP) が水ストレスに応答して増加することを明らかにしている。また、急激な浸透圧変化をオヒルギが受けた際にのみ遺伝子の転写発現量が増加し、酵素活性および F26BP 含量の増加がみられることを明らかにしている。さらに塩処理時には、常に F26BP 量が増加することを明らかにし、処理中は常に水ストレスを受け続けている可能性があるとして述べている。

第 6 章では、第 5 章での解析結果を受け、塩処理時における水ストレスの影響を解析している。シロイヌナズナにおいて水ストレス時にアブシジン酸 (ABA) により発現制御を受けることが知られている遺伝子のオヒルギにおける相同遺伝子 (BgBDC3) の転写発現解析を行い、水ストレス時に ABA を介して BgBDC3 の転写発現が抑制されることを明らかにしている。さらに、塩処理時には、常に BgBDC3 の転写発現が抑制されることから、塩処理中オヒルギは常に水ストレスの影響を受けていることを明らかにしている。

第 7 章では、Group I に分類した bg55、および、Group II に分類した bg70 について、アミノ酸配列の解析および転写発現の解析から機能の推定を行っている。bg55 のコードするタンパク質に関しては核移行シグナル、Ca²⁺ 結合モチーフ、他のタンパク質と相互作用するモチーフ構造を有していることから、ストレス応答遺伝子発現の際のシグナル伝達に関与している可能性があるとして述べている。bg70 に関しては転写発現パターンの解析により水ストレス応答性遺伝子であること、さらに細胞外または液胞へと輸送される疎水性の高いタンパク質をコードしていることを明らかにしている。また、これまでに報告のある水ストレス応答性遺伝子とは逆の性質を有すること、およびこの遺伝子がオヒルギに特有の遺伝子であることから、オヒルギに特徴的な高い耐塩性能に深く関与している可能性があるとして述べている。

第 8 章は総括であり、本研究を要約して得られた研究成果をまとめている。

以上のように、本論文は、遺伝子レベルでの解析が困難であったオヒルギからの RNA 抽出法を確立し、differential display 法の適用により、9 つの塩ストレス応答性遺伝子を特定している。特にそのうちの 5 つについては、遺伝子産物の同定に成功している。また、塩ストレス時におけるこれらの遺伝子の生化学的機能の解析により、これらの遺伝子それぞれが、イオンストレス、水ストレスおよび浸透圧の急激な変化といった塩ストレスに付随する種々のストレス要因のいずれに対抗するための機能を果たしているのかを明らかにしている。さらに、これらの遺伝子の発現パターンと対抗するストレス要因、および葉のしおれと回復、葉への Na⁺の蓄積といったオヒルギの応答との間により相関関係があることを見出し、今後オヒルギの耐塩性遺伝子を網羅的に探索する際の指針を提示している。

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。