

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 長岡 修一

世界ではナトリウムイオンを含んだ植物の生育できない塩類集積土壌の面積が増加し続けている。同時に世界の総人口も増え続けており食糧の増産が急務となりつつある。そのような状況の中で土壌自体を変えていくことももちろん必要であるが植物にストレス耐性を付与することも重要である。本研究では植物の耐塩性機構の一端を明らかとするために、酵母の耐塩性に関与することが知られているシロイヌナズナの STO 遺伝子に注目して研究を行った。酵母においてカルシニューリンは細胞内のナトリウムイオンとカリウムイオンの濃度を調節する役割を担っており、これが欠失すると耐塩性が低下する。カルシニューリンを欠失したミュータント酵母に対してシロイヌナズナの STO 遺伝子を導入すると耐塩性の低下という表現型が相補されるため、シロイヌナズナにおいても STO 遺伝子は細胞内のナトリウムイオン、カリウムイオンの濃度を調節する役割を持っているのではないかと考え以下の実験を行った。

1章の緒論では、研究の背景、意義と目的について述べている。

2章ではカルシニューリンを欠失した酵母の耐塩性の低下という表現型を相補する STO 遺伝子をシロイヌナズナで過剰に発現させると細胞内のナトリウムイオン、カリウムイオンのバランスをよりよく調節するのではないかと考え、シロイヌナズナにおいて STO 遺伝子を過剰に発現する形質転換体を作製した。その結果、ワイルドタイプよりも高い耐塩性をもつ形質転換体を得られた。ノーザンブロットにより形質転換体における STO 遺伝子の高発現が確認されたがナトリウムストレスによる発現誘導は見られなかった。また GFP タンパク質との融合タンパク質を作製シタマネギ表皮細胞における細胞内局在性を観察したところ核に局在が見られた。これらのことから STO は Na^+/H^+ アンチポーターやグリシンペプター、プロリンと異なりストレスシグナル経路の一部として間接的に耐塩性に関与していると考えられた。

3章では、STO タンパク質と相互作用するタンパク質を Two-hybrid screening system により探索した。その結果、HPPBF という一つの Myb DNA binding domain をもつタンパク質が相互作用していることが明らかとなった。HPPBF タンパク質と GFP タンパク質との融合タンパク質を作製シタマネギ表皮細胞における細胞内局在性を観察したところ核に局在が見られたことや、HPPBF の発現量はナトリウムストレスにより増加していることから、HPPBF は STO と複合体を形成しながらナトリウムストレスを受けた際にストレスに応答するための遺伝子の発現調節に関与していると考えられた。しかし、ストレスを受けた際の発現量のピークは 2 時間後に見られたため、ストレスの初期に働いている可能性も示唆された。また、同じように一つの Myb DNA binding domain しか持たない CrBPF-1 は病原菌抵抗性に関わっていることが知られている。このことから STO の関与する耐塩性機構と病原菌抵抗

性の機構とは似たメカニズムを持つ可能性も示唆された。

4章では、STO 遺伝子によって発現が制御される遺伝子をマクロアレイを用いて探索した。STO 遺伝子を過剰発現している形質転換植物において耐塩性の上昇が見られたのは、STO により転写制御を受けているナトリウムストレスに応答するための遺伝子の発現量が増加したためではないかと考えられた。そのためシグナル伝達系路の中で働く因子の一つであると考えられている STO 遺伝子は、どのような遺伝子の発現を制御しているのかを、かずさ DNA 研究所の作製したシロイヌナズナ EST をもとに作製された約 13000 の遺伝子が載ったマクロアレイを用いて STO 遺伝子導入形質転換体とワイルドタイプの発現パターンを比較することにより調べた。その結果いくつかの遺伝子において STO 形質転換体において発現量が増加していることが観察された。さらに発現量の違いをノーザンブロットを行うことにより確認した。顕著な違いが見られたのは disease resistance RPP5 like protein、Dem-like protein、protease、diphenol oxidase であった。disease resistance RPP5 like protein に関しては STO タンパク質と相互作用する HPPBF タンパク質が病原菌抵抗性に関わる遺伝子と高い相同性を持つことから病原菌抵抗性と何かしらの共通する機構を利用して耐塩性に関与していることが示唆された。

5章では、STO 遺伝子を欠失した *sto* 遺伝子変異シロイヌナズナの検索とその耐塩性の評価を行った。かずさ DNA 研究所が提供するシロイヌナズナタグラインズ共同利用システムを利用して、STO 遺伝子を欠失した変異シロイヌナズナを検索した。得られた *sto* 遺伝子変異シロイヌナズナはナトリウムストレスに対する耐性が低下していた。さらにナトリウムストレス後の体内のナトリウムイオン、カリウムイオン含量を測定したところナトリウムイオン含量は STO 遺伝子過剰発現形質転換体において最も低く、*sto* 遺伝子変異シロイヌナズナで最も高い値を示し、カリウムイオン含量については逆に STO 遺伝子過剰発現形質転換体において最も高く、*sto* 遺伝子変異シロイヌナズナで最も低い値を示した。このことは STO 遺伝子が酵母内での働きと同様のことをシロイヌナズナ内でも行っていることを示唆している。つまり、ナトリウムストレスを受けている間にナトリウムイオンの流入経路と考えられているカリウムトランスポーターに対してカリウムに対する親和性を高めた結果、形質転換体ではカリウムイオン含量が高くナトリウムイオン含量が低くなり、*sto* 遺伝子変異シロイヌナズナではそのような働きかけが失われたためカリウムイオン含量が低くナトリウムイオン含量が高くなったのではないかと考えられた。酵母において STO 遺伝子はナトリウムイオンを排出する Na^+ -ATPase の発現量を増加することも関与している。植物においてはそのような排出機構が見つからないが AtHKT1 や SOS1 などのトランスポーターを介して細胞からナトリウムイオンを取り除くことに関与している可能性も考えられた。

以上本論文は、シロイヌナズナの STO 遺伝子の機能について、耐塩生機構との関連から詳細な解析を行ったものであり、学術上、応用上貢献することが少なくない。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。