

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 目黒 直樹

---

本研究では、イネ科植物の冠水抵抗性およびイネ子葉鞘の伸長にミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素が寄与するかどうかについて明らかにすることを目的として行ったものであり、2つの章から構成されている。

### 1. 植物の冠水抵抗性とミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素の発現との関連性について

植物は、冠水時のエタノール発酵系の中途段階や、冠水解除後に出来るアセトアルデヒドの毒性により障害を受ける。この有毒なアセトアルデヒドを毒性の低い酢酸に換える反応を触媒するのがアルデヒド脱水素酵素 ALDH である。ALDH は細胞質に存在する ALDH1 とミトコンドリアに局在する ALDH2 が存在するが、イネでは ALDH2 が冠水解除後にアセトアルデヒドによって引き起こされる障害の緩和に関わると考えられている。そこで、冠水抵抗性の高いイネにおける ALDH2 のこのような働きが、冠水抵抗性を持つ植物において普遍的であるのかどうかを調べるために、イネ科の冠水抵抗性の高い植物と低い植物について、ミトコンドリア型 *ALDH2* 遺伝子の発現の冠水応答性について解析した。トウモロコシについてはさらに詳細な解析を行い、イネとの比較を行った。

冠水抵抗性の高いタイヌビエと冠水抵抗性の低いトウモロコシ、オオムギについて、mRNA およびタンパク質の蓄積量を調査した。タイヌビエの *ALDH2a* では冠水前に見られなかった mRNA の蓄積が、冠水処理により増加し、冠水解除後には減少した。トウモロコシ、オオムギの *ALDH2a* mRNA は冠水前には存在せず、冠水中には若干量増加し、冠水解除後もわずかに蓄積が見られた。タンパク質の蓄積量については、タイヌビエでは *ALDH2a* と *ALDH2b* がいつも一定の量で存在した。トウモロコシ、オオムギでは *ALDH2* のバンドは1本しか見られず、冠水により減少し、冠水解除後も冠水中のレベルと同等か冠水前のレベルに戻るという挙動を示した。これらから、イネ、タイヌビエとトウモロコシ、オオムギの冠水抵抗性の違いは、*ALDH2a* が関与していると考えられた。

トウモロコシの冠水中、冠水解除後の ALDH 活性の測定とアセトアルデヒドの定量を行い、イネと比較した。冠水抵抗性の高いイネには、植物がアセトアルデヒドの障害を受ける冠水中、冠水解除直後において、冠水抵抗性の低いトウモロコシよりも多くの *ALDH2* タンパク質、特に *ALDH2a* タンパク質を蓄積させ、アセトアルデヒドの無毒化を促進していることが、冠水抵抗性を高めている一因になっていると考えられた。さらに、*ALDH2b* の役割を明らかにするために、トウモロコシの *ALDH2b* (*RF2A*) 変異体 *rf2a-m8904* に冠水、冠水解除処理を行った。野生型である自殖系統 Ky21 では冠水解除後 24 時間で多少の障害が葉身に認められる程度であったのに

対し、*rf2a-m8904* では葉身全体が壊死した。また、アセトアルデヒドを定量したところ、*rf2a-m8904* では冠水前、冠水中、冠水解除後において一貫して Ky21 よりも多量のアセトアルデヒドが存在した。これらから、*rf2a-m8904* が冠水解除後に大きな障害を受けたのは、ALDH2b によるアセトアルデヒドの無毒化を短時間で行うことができなかつたためと示唆された。よって、ALDH2b もアセトアルデヒドの無毒化に寄与していることが確かめられた。

以上により、植物のアセトアルデヒドの無毒化には、ALDH2a、ALDH2b の両方が寄与しており、イネ、タイヌビエは ALDH2a を持つことによりトウモロコシ、オオムギよりも冠水抵抗性が高いと考えられた。

## 2. イネ子葉鞘の伸長とミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素の発現との関連性について

イネやタイヌビエでは、冠水条件下での発芽時には、子葉鞘という器官が伸長する。子葉鞘は物理的な障害から本葉を保護し、生育中の他の器官へ養分を供給する役割を果たす器官である。冠水中で伸長した子葉鞘においてもエタノール発酵系は活性化されており、エタノール発酵系の中間産物のアセトアルデヒドを酢酸に酸化する ALDH2 が、イネの冠水中、冠水解除時において発現が誘導され、イネの冠水抵抗性に関して重要な役割を果たすと考えられているため、イネ子葉鞘の伸長と ALDH2 の発現との関連性について解析を行った。

イネ幼植物体で見られた冠水応答性がイネ子葉鞘においても見られるのかどうかを調べるために、冠水中、冠水解除後の子葉鞘における mRNA の蓄積量を調べた。*ALDH2a* mRNA は冠水中に十分量存在し、冠水解除により減少した。*ALDH2b* mRNA は冠水中の子葉鞘にはほとんど存在せず、冠水解除により増加した。冠水中、冠水解除後の子葉鞘からミトコンドリアタンパク質を抽出し、ALDH2 タンパク質の蓄積量を調査した。冠水中の子葉鞘には ALDH2a が主に存在し、ALDH2b はほとんど存在しなかった。冠水を解除すると、ALDH2a は減少し始め、ALDH2b は増加した。

ALDH2a と子葉鞘の伸長の関連を調べるために、ALDH の阻害剤を用いた実験を行った。まず、ALDH の阻害剤であるジスルフィラム (DSF) がイネの ALDH2 タンパク質の ALDH 活性を阻害することを確認するために、イネ ALDH2a、ALDH2b タンパク質それぞれを高発現させた大腸菌から粗酵素抽出液を抽出し、DSF を作用させた後、アセトアルデヒドに対する ALDH 活性を測定した。ALDH2a は DSF により強く ALDH 活性が阻害されたが、ALDH2b は ALDH2a ほど強くは阻害されなかった。次に DSF 水溶液にて冠水した状態でイネを発芽させ、子葉鞘の伸長を調査した。子葉鞘の伸長は DSF の濃度依存的に抑制された。これらと ALDH2 タンパク質の蓄積パターンから、子葉鞘の伸長には ALDH2a が関わっていると考えられた。

以上、本研究はイネ科植物の冠水抵抗性やイネ子葉鞘の伸長にミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素が寄与することを明らかにするとともに、将来的な冠水抵抗性作物の作出の可能性を示すことができ、学術上、応用上価値が高い。従って、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値があるものと認めた。