

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高橋 竜一

ヨシは日本では主として淡水湿地に自生している野生植物であるが、海外では塩類集積地などの様々な環境条件において分布が認められている。塩類集積地に自生しているヨシは強い耐塩性を示すのに対して、河川敷のヨシは塩感受性である。またヨシは中生植物に分類されており、ナトリウムを植物体内に浸入させないことで耐塩性を示していると考えられている。そのため耐塩性のヨシを塩感受性のヨシと比較することは中生植物の耐塩性機構を明らかにする上で有効であると考え、中国の半乾燥塩類集積地(南皮、塩池) および日本の鬼怒川河川敷(宇都宮) から採集したヨシを用いて以下の研究を行った。

1, 耐塩性のヨシと塩感受性のヨシのイオン含量

塩ストレス条件下の植物体内のイオン含量を調べたところ、カリウム含量は宇都宮のヨシではすべての器官で低下していたのに対し、南皮のヨシでは増加していた。ナトリウム含量は宇都宮のヨシの地上部で劇的に増加していたが、南皮のヨシでは根でのみ増加が認められ、地上部ではコントロールと同程度となった。ストレス解除後の根からのナトリウム排出量は、宇都宮よりも南皮で顕著に高い事が分かった。

以上の結果から、耐塩性のヨシには塩ストレス条件下でも効果的にカリウムを吸収する機能、ナトリウムが浸入しても地上部への輸送を抑制する、地上部に輸送されたナトリウムを根に送り返し、根から排出する機構があることが考えられた。

2, HAK トランスポーターの機能解析

植物ではカリウム吸収経路がナトリウムの流入経路の一つとして考えられている。そこで HAK タイプのカリウムトランスポーター遺伝子を単離し、機能の差と耐塩性との関連について調べた。

4 種類の HAK 遺伝子 (*PhaHAK2*、*PhaHAK3*、*PhaHAK4*、*PhaHAK5*) を単離した。このうち *PhaHAK5* は宇都宮のヨシからのみ単離できた。*PhaHAK5* の発現を調べたところ、宇都宮のヨシでのみ認められ、耐塩性のヨシでは遺伝子発現が認められなかった。

酵母で *PhaHAK* を発現させて機能を比較したところ、宇都宮の遺伝子を導入した酵母ではナトリウム存在下でカリウム吸収量が減少し、ナトリウム吸収量も多かった。そのため、ナトリウム存在下では K^+/Na^+ 比が大幅に減少した。一方耐塩性のヨシから単離した遺伝子を導入した酵母ではカリウム吸収量はほとんど減少せず、ナトリウム吸収量も少なかったため、 K^+/Na^+ 比は高い値を維持していた。

以上の結果から、耐塩性ヨシではナトリウム存在下でも選択性の高いトランスポータ

一を介してカリウム吸収を維持しているのに対し、塩感受性ヨシではカリウム吸収が阻害され、HAK がナトリウムの流入経路となるため、細胞内の K^+ - Na^+ バランスが崩れ、塩感受性の要因の一つとなっていると考えられた。

3, HKT トランスポーターの機能解析

各地域のヨシから *HKT* 遺伝子を単離したところ、南皮 (*PhaHKT1-n*) と塩池 (*PhaHKT1-e*) は他の植物 *HKT* と高い相同性を示したが、宇都宮 (*PhaHKT1-u*) は 3' 末端側に 2 カ所、イントロンに相当する配列が残存しており、終止コドンが生じていたため、他の *HKT* よりも 141 アミノ酸短いタンパクをコードすることが予想された。

酵母を用いて機能解析を行ったところ、*PhaHKT1-u* 発現株はカリウム吸収を示さず、ナトリウム存在下では生育できなかった。*PhaHKT1-u* の 3' 領域を *PhaHKT1-n* と組み替えたキメラ DNA を作製して同様に機能解析を行ったところ、酵母の耐塩性は部分的に回復し、カリウム吸収も認められたことから、*PhaHKT1-u* で欠失していると推測される部位は *PhaHKT1* のイオン吸収において重要な役割を果たしていることが考えられた。

ヨシのゲノムには *HKT* が 1 コピー存在すると考えられることから、宇都宮のヨシでは *PhaHKT1* の機能が欠失しているために植物体内に浸入したナトリウムの移動を制御することができず、植物体内の K^+ - Na^+ バランスが崩れた可能性がある。

4, ヨシの耐塩性とナトリウムの排出

細胞膜型の Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子 (*PhaNHA1*) を単離し、機能を比較した。

PhaNHA1 の発現は、ナトリウムストレス条件下では宇都宮のヨシと耐塩性のヨシで同程度検出された。しかし細胞膜型および液胞膜型の Na^+/H^+ アンチポーターおよびナトリウムポンプを欠失した酵母に *PhaNHA1* を導入して機能を調べたところ、25mM、100mM の NaCl 存在下では南皮の *PhaNHA1-n* 発現株は宇都宮の *PhaNHA1-u* 発現株と比較してそれぞれ 42.7%、36.0% のナトリウムを含み、より多くのナトリウムを排出していると考えられた。

以上のことから、耐塩性のヨシにはより高いナトリウム排出機能をもったアンチポーターが存在し、細胞に浸入したナトリウムを排出していることが考えられた。

以上のように、本研究では耐塩性と塩感受性のヨシの NaCl ストレス条件下での体内イオン含量の違いをもとに、カリウム吸収やナトリウムの移動、排出に関連することが示唆されているいくつかの遺伝子の機能比較を行うことで、ヨシの耐塩性機構への関与を明らかにしたものであり、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。