

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 張 欣欣

世界の人口増加の傾向は今後も継続すると予想されているが、増加する人口を養うために必要な食料を生産するための耕地の面積は世界的に頭打ちか減少傾向にある。その要因の一つとして、地球環境の変化、不適切な土地利用、環境破壊等によって生じる植物をとりまく不適切な環境条件が、植物に対する環境ストレス（非生物的ストレス）となることとがあげられる。環境ストレスの要因としては、乾燥、過湿、冠水、土壌への塩類集積、高温・低温、有毒化学物質の蓄積等があげられるが、植物はそれらのストレスに応答して遺伝子発現を変化させ、ストレスに適応する事により耐性・抵抗性を示す機構を持っている。また、このような機構は植物種、系統、品種によって異なっている。したがって、植物の環境ストレス耐性の機構を解明する事は、環境ストレスに耐性を持つ作物を今後育成するために必要不可欠であり、分子レベルでの機構解明が求められている。

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、タンパク質分解酵素インヒビターの一つである、cysteine proteinase inhibitors をコードする遺伝子を2つシロイヌナズナからクローニングし (*AtCYSa* および *AtCYSb*)、これらの遺伝子がコードするタンパク質の、環境ストレス耐性に対する関与について検討を行った。まず最初に大腸菌で2つの遺伝子を発現させ生合成されるタンパク質を精製すると、精製タンパク質はタンパク質分解酵素活性を阻害する事から、*AtCYSa* および *AtCYSb* がタンパク質分解酵素インヒビターであることを確認した。遺伝子発現の環境ストレスに対する応答を明らかにするために、シロイヌナズナ培養細胞および植物体に様々なストレス処理を行い、遺伝子発現の変化について解析した。2遺伝子の発現量は、塩、高浸透圧、低温、活性酸素などにより上昇する事から、*AtCYSa* および *AtCYSb* はそれら様々な環境ストレスに対する植物の応答に関与すると考えられた。生体内における機能を明らかにするために、2遺伝子を高発現する形質転換酵母および形質転換シロイヌナズナを作成した。環境ストレスに対する耐性を評価したところ、形質転換酵母および形質転換シロイヌナズナの環境ストレス耐性は野生型と比較して明らかに向上していた。これらの結果から、*AtCYSa* および *AtCYSb* は、環境ストレス条件下の生体内において、ストレス耐性機構が働く際に重要な役割をはたすタンパク質を保護する事により生体にストレス耐性を付与する事が示唆された。

3章では、ミトコンドリアのATP合成酵素の1サブユニットである6kDaサブユニットをコードする遺伝子を、イネ (*RmtATP6*) およびシロイヌナズナ (*AtMtATP6*) からクローニングし、これらの遺伝子がコードするタンパク質の、環境ストレス耐性に対する関与について検討を行った。GFPと*RmtATP6*との融合タンパク質を発現するようにベクターに組み込みタバコおよび酵母細胞に導入すると、GFPのシグナルはミトコンドリアに局在して観察される事から、*RmtATP6* はミトコンドリアに存在する事が予想された。また *RmtATP6* および

AtMtATP6 の遺伝子発現は、炭酸塩や塩化ナトリウム処理により上昇する事から、ストレスに対する植物の応答に関与すると考えられた。さらに、*RMtATP6* を高発現する形質転換タバコ、*AtMtATP6* を高発現する形質転換酵母および形質転換シロイヌナズナは、野生型と比較して塩、乾燥、高浸透圧、低温に対して明らかに強い耐性を持つ事が明らかになった。

4章では、中国東北部のアルカリ性塩類集積地に自生し、アルカリ性塩類に対して極めて高い耐性を持つ野生植物である *Chloris virgata* から、細胞膜 H⁺-ATPase (PMA) 遺伝子 (*ChvPMA*) をクローニングし、この遺伝子がコードするタンパク質の、環境ストレス耐性に対する関与について検討を行った。最初に、このタンパク質が細胞膜上に存在する事を、*GFP* 遺伝子と結合させた *ChvPMA* をベクターに組み込み、タマネギ上皮細胞に打ち込んだ後に *GFP* の蛍光を観察することにより確認した。ストレス処理した植物体における遺伝子発現について解析した結果、*ChvPMA* は塩処理により発現誘導されることが明らかになった。全長の *ChvPMA* および C 末端に存在すると予想される自己抑制領域 (autoinhibitory domain) を切り取った *ChvPMA ΔC* を高発現する形質転換酵母および形質転換シロイヌナズナを作成した。形質転換酵母では、*ChvPMA* および *ChvPMA ΔC* 形質転換体の両方で耐塩性と酸性耐性が向上したが、酸性条件での塩ストレス条件化では *ChvPMA ΔC* 導入酵母の耐性がより優れていた。同様に *ChvPMA ΔC* 導入シロイヌナズナは、*ChvPMA* 導入シロイヌナズナより酸性条件下で優れた根の伸長を示した。

以上本論文は、植物の環境ストレス耐性に関与する重要な遺伝子について、詳細な検討を行ったものである。本研究で得られた成果は、環境ストレス耐性を持つ作物を分子育種により作出する際に重要な情報となるため、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。