

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻  
平成 19 年度博士課程進学  
氏 名 西内 俊策  
指導教員名 高野 哲夫

論文題目 アルカリ塩耐性 *Chloris virgata* の耐性機構解析、  
及び金属結合タンパク *Metallothionein1* の機能解析

現在、塩類集積土壌は拡大を続けており、世界の農業生産において多大な影響を与えている。対して、人口は増加の一途を辿っており、農作物の増産は今後ますます重要になると考えられる。農作物の増産には、農業技術の開発、普及といった技術面の進歩と、作物の病害耐性、環境ストレス耐性、多収性といった性質を向上させることが必要だと考えられる。

本研究では、炭酸塩集積土壌を耕地として利用するために必要なアルカリ性塩耐性機構についての知見を得るために、高いアルカリ性塩耐性を持つイネ科野生植物 *Chloris virgata* (*C. virgata*) の cDNA ライブラリーを用いた網羅的な解析を行った。また、植物の転写産物中に多く含まれる金属結合性タンパク *Metallothionein1* (MT1) の遺伝子を *C. virgata* とイネから単離し、形質転換酵母及び形質転換シロイヌナズナを用いた解析を行い、アルカリ性塩耐性との関連を模索した。

### 1. アルカリ塩耐性 *C. virgata* の EST 解析

*C. virgata* は高いアルカリ性塩耐性を持ち、120 mM NaHCO<sub>3</sub> 処理条件においても生育することが確認されている。枯死はしないがストレスとなる濃度の 100 mM

NaHCO<sub>3</sub> を 24 時間処理した *C. virgata* より cDNA ライブラリーを作出した。この cDNA ライブラリーを大腸菌に形質転換して得られた 96 コロニーに対し、コロニー-PCR 及びシーケンス、BLASTX 解析を行ったところ、それらのインサート保持率は 96%、完全長率は 79%、インサートの平均長は約 1.0kb であった。3168 コロニーに対し 5'末端からのワンパスシーケンスを行ったところ、平均長 549bp、3017EST が得られ、出現頻度の高い遺伝子として、*MT* や *chlorophyll a/b binding protein* といった光合成関連遺伝子などが見出された。

次に BLAST2GO software を用い、得られた EST データベースに対して GO annotation 解析を行った。EST データベース中の “response to stress” や、“response to abiotic stimulus” といった GO annotation が付与された EST については、*C. virgata* においてもアルカリ性塩処理に応答して発現している可能性が考えられた。そこで、実際に *C. virgata* においてアルカリ性塩に応答して発現量の変動する遺伝子を模索するために、これらの GO annotation の付与されたシーケンスと、イネやシロイヌナズナのストレス耐性に関係すると報告されている遺伝子をコードするシーケンスから計 24 遺伝子を選び、real-time RT-PCR にて発現を確認した。また、その際 EST データベース中より見出された 8 種類の一般的なハウスキーピング遺伝子をリファレンス遺伝子候補として、geNORM software を用いた Stability M の解析を行い、最もアルカリ性塩条件下で安定した発現を示す *ChvACT2* をリファレンス遺伝子として用いた。

アルカリ性塩条件下では高 pH による養分吸収阻害や光合成活性の低下などによる活性酸素の発生の誘導、塩ストレスなど複合的なストレスが植物にかかっていると考えられる。Real-time RT-PCR 解析より実際に、*Catalase* や *ascorbate peroxidase*、*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter* といった遺伝子の発現が、アルカリ性塩処理下にある *C. virgata* で誘導されることが分かった。また、*pathogenesis-related protein*、*Win1 precursor*、*two-component response regulator* など耐性に関係すると考えられる遺伝子が 2 倍以上に誘導される一方で、発現があまり変動しなかったものとして、*plasma membrane ATPase gene*、*glutathione peroxidase*、*TIP1-1* などが見出された。この結果より、アルカリ性塩条件下の *C. virgata* において様々なストレス耐性に関与する遺伝子が応答していること、また同様の遺伝子群がアルカリ性塩耐性野生植物 *Limonium bicolor* でもアルカリ性塩処理下で発現解析されているが、それと比べると *C. virgata* の遺伝子発現量や誘導が小さいことが明らかになった。

一般的に塩耐性植物において、*plasma membrane ATPase*、*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter* といった細胞内のナトリウムイオン濃度の調節に関係する遺伝子群が恒常的に発現し

ていることが知られており、同様に *C. virgata* においても、塩耐性、活性酸素除去、物質輸送などに関与する遺伝子群が恒常的に発現していて、それが *C. virgata* のアルカリ性塩耐性を担っていることが予想された。

## 2. 金属結合タンパク MT1 の機能解析

*C. virgata* の cDNA ライブラリーの解析より、*C. virgata* の MT1 遺伝子 (ChlMT1a) が最も出現頻度が高いことが分かった。植物 MT は、金属ホメオスタシスの維持や重金属耐性に関与すると考えられているシステインリッチな金属結合性のタンパクである。*C. virgata* 以外の植物においても MT の発現量はストレスの有無に関わらず非常に高く保たれているが、その機能についてはまだ分からないことが多い。本研究では、ChlMT1a とイネの OsMT1a、OsMT1b の各形質転換酵母や形質転換シロイヌナズナの解析を通して、MT の機能とストレス耐性との関連について、新しい知見を得ることを目的として行った。

ChlMT1a、OsMT1b のアミノ酸配列は非常に高い相同性を示すが、形質転換酵母を用いた解析では、OsMT1b より ChlMT1a を発現する形質転換酵母の塩、アルカリ塩、活性酸素耐性の著しい向上が確認された。ChlMT1a と OsMT1b のストレス耐性への関与の比較と、植物 MT の機能解析をするために、形質転換シロイヌナズナを作出し表現型の解析を行った。本研究では当初、構成的に過剰発現する CaMV35S プロモーターを形質転換に用いたが、形質転換シロイヌナズナが得られなかったため、最終的にシロイヌナズナの *AtRD29A* プロモーターの制御下に導入遺伝子を置いた。その結果、通常条件では生育に異常は見られないが、低温誘導にて導入遺伝子の発現の確認できる形質転換シロイヌナズナを作出することが出来た。

プレートにて 25  $\mu$ M Cu、Cd への耐性試験を行ったところ、形質転換シロイヌナズナと WT の間で根の伸長に違いは見られず、重金属耐性の向上は見られなかった。また、Cu 欠乏、過剰のプレート上で生育した植物の乾物重を測定したところ、形質転換シロイヌナズナはコントロール MS プレート上でも WT の 50%程度となった。これは、プレートが密閉された空間であり嫌気条件にあることから導入遺伝子の発現が誘導され、過剰な金属イオンのキレートが行われた結果、形質転換シロイヌナズナの生育が抑制されたと考えられる。また、形質転換酵母の場合とは異なり、ChlMT1a と OsMT1b の形質転換シロイヌナズナ間では耐性に明らかな違いは見られなかった。

金属含量の測定には、好気条件になるように水耕栽培を用いて植物体の栽培を

行った。プレート培地を用いた場合 Cu の蓄積が見られたが、水耕栽培条件では Cu の蓄積は見られなかった。水耕液に 1  $\mu$ M、25  $\mu$ M Cu を加えた場合、WT の根では Cu の濃度依存的に Fe の含量の低下が見られた。しかし、ChlMT1a、OsMT1a、OsMT1b の各形質転換体ではコントロール条件と同等かそれより高い Fe 含量を維持していた。Cu 処理下においても形質転換シロイヌナズナが Fe 含量を維持できることから、導入した ChlMT1a、OsMT1a、OsMT1b の各タンパクが Fe のホメオスタシス維持に関与していることが分かった。また、Mn も Cu 処理条件下で WT と比べて蓄積量が多くなっていた。

形質転換シロイヌナズナの根の Fe 含量が鉄の取り込み経路の活性化によるものかを明らかにするために、シロイヌナズナの根圏からの Fe の獲得に関与する遺伝子の発現解析を行った。*FIT*、*FRO2*、*IRT1* の発現を RT-PCR にて解析したところ、Cu ストレス条件では Fe の取り込み経路の遺伝子の発現は、WT と形質転換体では変化がなかった。このことから、形質転換シロイヌナズナにおいて根の Fe 含量が Cu 過剰ストレス条件においてもコントロール条件と同様に維持されているのは、Fe の取り込み量が増加したわけではなく、Fe の減少を抑えているからだと考えられる。高 pH 条件下では植物が鉄欠乏になることが知られており、MT は Fe のホメオスタシス維持によってアルカリ性塩耐性の一端を担っている可能性が示された。

以上のように、本研究では野生植物 *C. virgata* を材料に用い、アルカリ性塩という複合的なストレスへの耐性機構について研究を行った。特異的にアルカリ性塩耐性に関与する遺伝子は特定できなかったが、ChlMT1a を含む複数の耐性機構が関与している可能性を示した。