

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 西内 俊策

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。それに対して、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。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、その機能比較とアルカリ性塩耐性との関連を模索した。

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、*C. virgata* を用いて EST 解析を行った。作製した cDNA ライブラリーの 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 の 3017 EST が得られた。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 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。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、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。Real-time RT-PCR 解析より実際に、*Catalase* や *ascorbate peroxidase*、*Na⁺/H⁺ 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、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も見出された。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、また他のアルカリ性塩耐性野生植物と比べると *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おり、それらが *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。

3 章では金属結合タンパク MT1 の機能解析を行った。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* の ChlMT1a とイネの 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。本研究では構成的に過剰発現する *CaMV35S* プロモーターを当初形質転換に用いたが、形質転換体を得られなかったため、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。寒天培地にて 25 °C Cu、Cd への耐性試験を行ったところ、形質転換酵母とは異なり、*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。金属含量を測定する事で、*OsMT1a* と *OsMT1b* の過剰発現シロイヌナズナのコントロール条件における Mg の蓄積に関与する事が分かった。また、Cu 処理下の 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が、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ことから、導入した *ChlMT1a*、*OsMT1a*、*OsMT1b* が Fe のホメオスタシス維持に関与していることが示された。そこで鉄の取り込みに関わる *FIT*、*FRO2*、*IRT1* の発現を解析したところ、Cu ストレス条件ではそれらの遺伝子の発現は、WT と形質転換体では変化がなかったことから、Fe の取り込み量の増加により Fe 含量が高くなっているのではないことが示された。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考えられる。

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。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。