

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 シントー ワユニング アルディエ

世界各地で拡大している塩類集積土壌により耕地面積が減少している。耕地面積の減少を食い止めるためには耐塩性作物を育種することが必要であるが、そのためには植物の耐塩性機構を明らかにする事が重要である。植物の耐塩性の指標として、高濃度の塩存在化で K^+/Na^+ 値を高く保つ能力がよく用いられる。したがって植物における K^+ および Na^+ の輸送機構を明らかにする事は、耐塩性機構を理解する上で非常に重要な課題である。

一般的な作物は中性植物であり、高濃度の塩存在化では著しい生育阻害を受ける。それに対して塩類集積土壌に生育できる塩性植物が多数存在し、そのような植物の耐塩性機構を明らかにする事により、作物の耐塩性を改良する上で有用な知見が得られる事が期待できる。本研究では、高濃度塩存在化で K^+/Na^+ 値を高く維持する能力に由来する極強の耐塩性を有する野生植物 *Puccinellia tenuiflora* (*P. tenuiflora*) を用いて、 K^+ および Na^+ の輸送に関与するタンパク質の遺伝子に関する詳細な解析を行った。

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、*P. tenuiflora* とイネから HKT (a high-affinity K^+ transporter) タイプのカリウムトランスポーター遺伝子 (*PutHKT2;1* および *OsHKT2;1*) を単離し、酵母と形質転換シロイヌナズナを利用した比較機能解析を行った。*GFP* を用いた解析から *PutHKT2;1* は細胞膜に局在することがわかった。遺伝子発現は根で特に強く、しかも高濃度の塩ストレス (300 mM NaCl) および K^+ 飢餓により発現が誘導された。*PutHKT2;1* を導入した酵母を用いた実験により *PutHKT2;1* は *OsHKT2;1* とは異なり高アフィニティー型の Na^+K^+ 供輸送体としての機能を持つ事が明らかになった。*PutHKT2;1* を高発現するシロイヌナズナは、 Na^+ , K^+ , and Li^+ に対して感受性をもち、*OsHKT2;1* を高発現するシロイヌナズナが Na^+ だけに感受性になるのとは異なっていた。また、*PutHKT2;1* 導入シロイヌナズナと *OsHKT2;1* 導入シロイヌナズナとは、外部 K^+ 濃度に応じた Na^+ 吸収能力の点で大きな違いがある事がわかった。

3章では、電位非依存型の K^+ チャンネルをコードする遺伝子 (*PutAKT1*) を *P. tenuiflora* から単離し、解析した。*PutAKT1* は *Shaker* K^+ チャンネルファミリーの AKT-1 サブファミリーに属することがわかった。また *PutAKT1* は細胞膜に局在し、遺伝子発現は根で強く観察された。その遺伝子発現は K^+ 飢餓で誘導されるとともに、他の植物で見られるような高濃度 Na^+ による発現抑制を受けなかった。*PutAKT1* を高い発現する形質転換シロイヌナズナは、野生型と比較して塩ストレス条件下 (75 mM NaCl) で植物体の重量が大きい事から、より強い耐塩性を持つ事がわかった。また形質転換体では、通常条件、 K^+ 飢餓条件および塩ストレス条件のいずれにおいても、植物体内 K^+ 含有量が野生型よりも高くなり、逆に Na^+ 含有量は低下していた。これらの結果から *PutAKT1* は外部 K^+ 濃度に関わらず K^+ の輸送に関与し、その機能は外部 Na^+ 濃度

に影響を受けない事が明らかになった。

4章では、AKT1 タンパク質 (K⁺チャンネルの α -サブユニット) と相互作用し、K⁺チャンネルの安定性等に関与する事が知られている β -サブユニットをコードする遺伝子を *P. tenuiflora* およびイネから単離し (*KPutB1* および *KOB1*)、比較機能解析を行った。*KPutB1* の遺伝子発現は、K⁺飢餓および高濃度 Na⁺存在下で上昇した。KPutB1 が PutAKT1 と相互作用する事は酵母 two-hybrid 法により確かめられた。また KPutB1 はイネの OsAKT1 やシロイヌナズナの AKT1 とも相互作用する事がわかった。これらの相互作用の意義について明らかにするために酵母に α -および β -サブユニットを同時に導入する実験を行った。その結果、*PutAKT1* を β -サブユニット (*KPutB1* または *KOB1*) と同時に酵母に導入すると、酵母の生育と K⁺吸収能力が *PutAKT1* だけを導入した場合より改良されるのに対し、*OsAKT1* を β -サブユニットと同時に酵母に導入するとそれらは低下した。また、*KPutB1* または *KOB1* を高発現する形質転換シロイヌナズナでは、塩ストレス (75 mM NaCl) および K⁺飢餓条件下で野生型と比較して植物体地上部の K⁺含有量が上昇し、根の Na⁺含有量は低下した。しかし形質転換体の耐塩性等には野生型との差は観察されなかった。

以上のように、本研究では耐塩性極強野生植物 *P. tenuiflora* を用いて、K⁺および Na⁺の輸送に関与するタンパク質の遺伝子をクローニングし、イネ等の相同遺伝子との比較から、それらの遺伝子が *P. tenuiflora* の有する、「高濃度塩存在化で K⁺/Na⁺値を高く維持する能力」に関与する事を明らかにした。このような知見は耐塩性に関する分子育種を行う上で非常に重要であり、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。