論文内容の要旨

申請者氏名 田村 尚

(背景) 植物は固着生活をするがために、様々な環境ストレスから空間的移動によって逃れることができない。特に塩や乾燥、低温に由来する極度の浸透圧変化は植物にとって最も厳しいストレスの 1 つである。そのため植物は、浸透圧ストレスに対して素早い対応をとり、自己死を防ぎ、酷環境に順応する高い能力を進化させてきた。浸透圧ストレスに対する自己防御機構は次の 3 つの素過程に分けられる。(1) 浸透圧ストレスの認識、(2) 情報伝達、(3) 対応。第 1 の認識の素過程において、大腸菌の EnvZ や酵母の SLN1 などが浸透圧センサーとして研究されている。シロイヌナズナでは二成分系の AtHK1 が同定されているが、その植物体内での機能はまだ未知である。第 2 の情報伝達の素過程には、プロテインキナーゼやアブシジン酸などが関与しており、浸透圧ストレス応答遺伝子の発現を誘導することが知られている。第 3 の対応の素過程は最も研究がなされており、様々な OR (osmotic stress-regulated) 遺伝子が単離されている。また、それら遺伝子を用いて浸透圧耐性を付与する研究もされている。このように第 2、第 3 の素過程についての研究は比較的多いが、第 1 の認識についての知見は少ない。そこで本研究では、認識に関わる遺伝子の単離を目的とした。

(結果) 蛍光ディファレンシャルディスプレイ(FDD)法によって、野生型タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc)葉で浸透圧ストレス初期に応答する遺伝子を単離した。いくつかの cDNA 断片のうち、mRNA が 10 分以内に蓄積を始め 3 時間後には減少する遺伝子断片 C7 (*NtC7*), C15, C20 (*NtNAK*)について検討した。三者の発現様式を詳しく検討した結果、傷害、200 mM NaCl による塩ストレスや 500 mM マンニトールによる浸透圧ストレスに対して早期一過的に mRNA を蓄積することが分かった。*NtC7*, C15 は病傷害ストレス応答遺伝子を誘導するジャスモン酸 (50 μ M MeJA) やエチレン (100 μ M ethephon)、浸透圧ストレス応答遺伝子を誘導するアブシジン酸 (100 μ M ABA) では発現が誘導されなかった。しかし、*NtNAK* はエチレン、ABA に応答し mRNA の蓄積が誘導された。

本研究では *NtC7* についてさらに詳しく調べた。cDNA ライブラリーより 1,210 塩基対で 308 アミノ酸をコードする *NtC7* の全長鎖 cDNA を単離した。予想されるアミノ酸配列より、疎水性シグナル配列や膜貫通領域が同定された。相同性検索より、レセプター様キナーゼ (receptor-like kinase; RLK) のレセプター部位と相同性が見られた。*NtC7*-GFP 融合タンパク質を用い、タマネギ表皮細胞での GFP 蛍光を指標に *NtC7* の細胞内局在を調べたところ、原形質膜上に局在することが示された。*NtC7* の生理機能を調べるために、CaMV35S プロモーターで過剰発現させたトランスジェニック植物体を作製した。10 ライン以上の形質転換体を得られ、PCR により 9 ラインで導入

遺伝子が確認できた。ノーザン解析により、それらのうち7ラインで恒常的な mRNA の蓄積が見られたが、2ラインでは見られなかった。ライン#1の T₃ 種子を用いて、220 mM NaCl の塩ストレス、500 mM マンニトールの浸透圧ストレス培地で発芽試験を行った。野生型の種子は、それらのストレス下で発芽しなかった。トランスジェニック種子は、NaCl による塩ストレス下で発芽したものの、黄化や根の伸長阻害が見られた。一方、マンニトールによる浸透圧ストレス下ではほぼ正常に発芽した。NaCl による生育阻害が塩ストレスあるいは、浸透圧ストレスのどちらによるか調べるために、60 mM LiCl のイオンストレスを与えた。この濃度の LiCl はイオン毒性は高いが、浸透圧ストレスはほとんどかからない。その結果、NaCl よりも顕著に黄化、根の伸長阻害が見られた。T₀ 健全葉を用いて浸透圧ストレス耐性を調べた。条件検討のために、野生型の健全葉を 500 mM マンニトールで処理したところ、12 時間でほとんど回復できなかった。トランスジェニック植物体葉では、12 時間処理後でも回復した。これらの結果より、*NtC7* はイオン毒性には対応せず、浸透圧変化にのみ対応することが明らかになった。

(考察) FDD 法を用いて浸透圧ストレス初期に関わる遺伝子を単離した。*NtNAK* は NAK キナーゼに分類され、情報伝達に関わっていると示唆された。*C15* は 3' 断片のみで機能は明らかではないが、*NtC7* と同様な発現様式をしているためストレス初期に重要な役割を果たしているとして示唆された。*C15* や *NtC7* の発現が傷害ストレスでも誘導されたが、ホルモンで誘導されなかった。このことから、ストレスシグナルの 1 つに水圧変化があることも示唆された。*NtC7* は予想されるアミノ酸配列により疎水性シグナルや膜貫通領域を持つことが分かり、RLK のレセプター部位と相同性があった。これは GFP 融合タンパク質の結果からも原形質膜上に局在することが支持された。RLK はレセプター構造の違いからいくつかのグループに分類されるが、*NtC7* はそれらどれにも属さない全く新規なものであった。細胞質キナーゼを持たないレセプターは細胞質内のタンパク質と相互作用することが予想されており、*NtC7* にもそのようなパートナーが存在することが示唆された。*NtC7* は浸透圧ストレスを認識し、細胞内にその情報を伝達して耐性を付与する働きをしているのではないだろうか。その意味で、*NtC7* は新規な浸透圧センサーである可能性が高いと思う。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 田村 尚

本研究では、植物の浸透圧ストレス応答を分子レベルで明らかにすることを目的とした。植物は環境ストレスから空間的移動によって逃れることができない。特に塩や乾燥、低温に由来する極度の浸透圧変化は植物にとって最も厳しいストレスの一つである。そのため植物は、浸透圧ストレスに対して順応する高い能力を進化させてきた。浸透圧ストレスに対する自己防御機構は (1) 浸透圧ストレスの認識、(2) 情報伝達、(3) 対応の3段階がある。本研究では、第一の認識に関わる遺伝子の単離と解析を課題とした。実験材料にはタバコを選んだ。

本論文では、まず、蛍光ディファレンシャルディスプレイ法によって、野生型タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc)葉で浸透圧ストレス初期に応答する遺伝子を単離した(第1章)。いくつかのcDNA断片のうち、mRNAが10分以内に蓄積を始め、3時間後には減少する遺伝子 *NtC7* (*NtC7*), *C15*, *C20* (*NtNAK*)を同定した。次に、3者の発現様式を詳しく検討した(第2章)。傷害、NaClによる塩ストレスやマンニトールによる浸透圧ストレスに対して、早期一過的に mRNA を蓄積することが示された。病傷害ストレス応答遺伝子を誘導するジャスモン酸やエチレン、浸透圧ストレス応答遺伝子を誘導するアブシジン酸に対して *NtC7*, *C15* は応答しないが *NtNAK* は応答することが明らかになった。続いて *NtC7* についてさらに詳しく調べた(第3章)。まず、308アミノ酸をコードする *NtC7* の全長鎖 cDNA を単離した。相同性検索より、レセプター様キナーゼ (receptor-like kinase; RLK) のレセプター部位と相同性が見られた。*NtC7* の細胞内局在を調べたところ、原形質膜上に局在することが示された。さらに *NtC7* の過剰発現トランスジェニック植物体を作製した。種子の発芽と生長を調べたところ、野生型では完全に抑制されるマンニトールに抵抗性を示した。しかし、NaCl や LiCl によるイオン毒性には野生型と同様の感受性があった。これらの結果から、*NtC7* は浸透圧ストレスを認識し、細胞内にその情報を伝達する機能を持つことが推測された。多数の浸透圧ストレス応答遺伝子群を活性化し、最終的に耐性を付与することが推察される。その意味で、*NtC7* は新規な浸透圧センサーであることが強く示唆された。今後、実用的な悪環境耐性植物の創出が実現できる可能性を開いたことは、本研究の大きな成果である。

以上のように、本論文はこれまで報告例の少ない、植物の浸透圧認知機構について多くの新しい知見を与えるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。