

【論文内容の要旨】

申請者氏名 仲 山 英 樹

【研究題目】 エクトイン生合成系遺伝子およびナトリウムポンプ遺伝子を利用した耐塩性植物の分子育種

【要 旨】

本論文は耐塩性植物の分子育種をタバコを材料に試みたものである。

第 1 章の耐塩性植物の分子育種の概論では、植物細胞が受ける「塩 (NaCl) ストレス」は、1) 細胞外の高濃度の塩による「高浸透圧ストレス」と、2) 細胞質ゾルに流入した「Na⁺のイオン毒性」の 2 つの因子が複合的に作用することを述べた。

第 2 章では「高浸透圧ストレス」に対しては好塩性細菌 *Halomonas elongata* の適合溶質であるエクトインの生合成系の 3 遺伝子 (*ect* 遺伝子: *ectA*, *ectB*, *ectC*) を導入したタバコが高浸透圧ストレス耐性を示すことを明らかにした。具体的には、*H. elongata* の 3 種の *ect* 遺伝子をそれぞれ CaMV35S プロモーターに連結した融合遺伝子を直列に連結し、アグロバクテリウム感染法によって、タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv BY2)、およびタバコ植物体 (*N. tabacum* L. cv SR1) に導入した。形質転換タバコにおいて遺伝子導入と 3 種の *ect* 遺伝子の発現を確認した。形質転換 BY2 細胞におけるエクトイン蓄積濃度は 14 - 79 nmol/gFW (新鮮重量) であり、浸透圧調節には関与しないことが予想された。形質転換 BY2 細胞は、620 mM マンニトールおよび 500 mM NaCl による一過的な高浸透圧ショックに対する耐性が、エクトインの蓄積量に相関して向上していた。また、*ect* 遺伝子が発現している形質転換タバコ植物体の第 2 世代の芽生え、13 系統中 2 系統は乾燥ストレスに対する顕著な耐性を示した。しかしながら、塩ストレスに対しては顕著な耐性を示す系統はなく、高浸透圧ストレス耐性のみではなく、Na⁺ のイオン毒性に対する耐性を賦与することの重要性が示唆された。

第 3 章では「Na⁺のイオン毒性」に対しては酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Na⁺/Li⁺-ATPase をコードする遺伝子 (*ENA1* 遺伝子) をタバコ培養細胞に導入し、毒性の Li⁺、Na⁺イオン耐性を賦与した結果を述べた。*S. cerevisiae* では、*ENA1* 遺伝子の発現量によって、細胞の塩ストレス耐性が決定されている。そこでゲノム PCR によって単離した *S. cerevisiae* の *ENA1* 遺伝子を CaMV35S プロモーターに連結し、アグロバクテリウム感染法によって、BY2 細胞へ導入した。*ENA1* 遺伝子導入株の中に 120 mM LiCl に顕著な耐性を示す株がみられた。LiCl 耐性株については、PCR法により遺伝子導入を確認し、RT-PCR によって *ENA1* mRNA の蓄積を検出した。平板培養から液体懸濁培養へ BY2 細胞を移しても LiCl 耐性が維持されていたことから、細胞内で *ENA1* 遺伝子が機能的に発現していることが示唆された。

第 4 章では、成果を総括し、上記 2 種類のストレス耐性の同時賦与による実用耐塩性植物の育種の戦略について述べた。

論文審査結果の要旨

耐塩性植物の分子育種は、砂漠の緑化による地球環境の再生や、塩土および海水の農業利用による食糧増産に役立つ点で非常に意義深い。本論文はモデル植物のタバコに適合溶質のエクトイン生合成系、ナトリウムイオン排出系を遺伝子導入により与え、それぞれ高浸透圧ストレス耐性および有毒なNa⁺イオン耐性を賦与したもので、以下の成果を上げている。

1) 植物細胞が受ける「塩 (NaCl) ストレス」は、1) 細胞外の高濃度の塩による「高浸透圧ストレス」と、2) 細胞質ゾルに流入した「Na⁺のイオン毒性」の2つの因子が複合的に作用することに基づき、耐塩性植物の分子育種の戦略を明解にした。

2) 好塩性細菌 *Halomonas elongata* の適合溶質であるエクトインの生合成系の3遺伝子 (*ect* 遺伝子: *ectA*, *ectB*, *ectC*) を、それぞれCaMV35Sプロモーターに連結した融合遺伝子を直列に連結し、タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv BY2)、およびタバコ植物体 (*N. tabacum* L. cv SR1) へ導入し、3種の *ect* 遺伝子の発現を確認している。

3) 形質転換 BY2 細胞におけるエクトイン蓄積濃度は 14 - 79 nmol/gFW (新鮮重量) と低く、浸透圧調節に直接は関与しないが、620 mM マンニトールおよび 500 mM NaCl による一過的な高浸透圧ショックに対する耐性が、エクトインの蓄積量に相関して向上していることを明らかにした。また、*ect* 遺伝子が発現している形質転換タバコ植物体の第2世代の芽生え、13系統中2系統は乾燥ストレスに対する顕著な耐性があることを示している。

4) ゲノム PCR によって単離した、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のナトリウムポンプ遺伝子 (*ENA1*) を導入したタバコ培養細胞の中に、毒性の 120 mM LiCl に顕著な耐性を示すものを見つけている。PCR法によりLiCl耐性細胞に*ENA1*遺伝子を確認し、RT-PCRによって*ENA1*mRNAの蓄積を検出している。平板培養から液体懸濁培養へBY2細胞を移してもLiCl耐性が維持されており、細胞内で*ENA1*遺伝子が機能的に発現していることを証明している。

以上、本論文は耐塩性植物の分子育種には、高浸透圧耐性と有毒Na⁺イオン耐性を別個に賦与することの重要性と、その成果を述べたもので、実用的な耐塩性作物の育種を大きく前進させた。21世紀に危惧される食糧、環境問題解決に寄与することが期待される。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)学位論文として価値あるものと認めた。