

論文の内容の要旨

氏名：水野 修平

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：環境抵抗性マメ科木本植物 *Acacia mangium* の低 pH とアルミニウムストレス応答に関する研究

【研究背景と目的】

酸性土壌は、世界の耕作地の約 40%にも及ぶ問題土壌である。酸性土壌では、高濃度のプロトン (H^+) とアルミニウムイオン (Al^{3+} ：以下 Al) の毒性や、無機栄養塩の不溶化による栄養欠乏が植物の生育を著しく阻害し、農業生産の低下を招いている。また、バイオ燃料植物の生産においても、食用作物との耕作地競合を避ける観点から、問題土壌の利用はきわめて重要な課題である。このように食糧、エネルギー問題の観点から、植物の酸性土壌適応機構の解明と有用植物の酸性土壌適性の改良が急務である。

今日までに、Al毒性とプロトン毒性に関する分子生物学的研究は主としてシロイヌナズナ、イネ、コムギ等の草本のモデル植物や穀類で行われている。Al適応は比較的多く研究されており、Al活性型有機酸輸送体等のAl抵抗性遺伝子が同定されている。プロトン耐性の分子機構に関する知見はきわめて限られているが、シロイヌナズナの転写因子をコードする *STOPI (sensitive to proton rhizotoxicity 1)* とその下流の遺伝子等について研究されている。

一方、ある種の木本植物は酸性土壌においても旺盛な生育を示し、独自のあるいはより高機能な酸性土壌適応機構の発達が期待されるが、その分子機構に関する知見は未だ限られている。マメ科木本植物 *Acacia mangium* は高い環境抵抗性を有し、酸性土壌や塩類土壌でも旺盛な生育を示すので、重要な植林木として東南アジアにおいて広く栽培されている。また、マメ科植物に特有な根粒菌共生窒素固定を行う。したがって、*A. mangium* のストレス応答に関する研究は、環境抵抗性植物の酸性土壌適応機構の分子レベルでの理解、植物の酸性土壌適性改良における遺伝子資源の獲得、さらには酸性環境下におけるマメ科植物-根粒菌共生窒素固定の理解という観点から非常に重要である。

本研究は、*A. mangium* の実生と培養細胞を用いて低 pH と Al ストレス応答に関わる諸性質の検討を行い、培養細胞の転写解析からストレス応答遺伝子の検出とクローニングを行った。その結果、酸性土壌適応に関与すると思われる遺伝子を新規なものを含めて数多くクローニングすることができた。

【結果と考察】

根の伸長は、pH に関して pH 3.5 以下の培地、Al に関して 5.0 mM $AlCl_3$ を含む培地 (pH 4.3) で阻害されたが、それより高 pH と低 Al 濃度では殆ど影響を受けなかった。ヘマトキシリンおよびモリン染色により、Al の吸着が 1.0 mM 以下では根冠のみに、5.0 mM では根全体および根の内部に観察された。エバンスブルー染色により、細胞膜の傷害が 5.0 mM では根全体で見られたが、他の条件では僅かであった。多くの植物種では数百 μM までの Al によって根の伸長が阻害され、根での Al の吸着や蓄積、細胞膜の傷害が起こることが報告されているので、*A. mangium* が低 pH のみならず Al ストレスにも高い抵抗性を有していることが示された。

A. mangium では、モデル植物とは異なり実験系統が確立しておらず、遺伝的な個体差が大きいことを考慮し、胚軸から培養細胞系を構築した。この培養細胞系は、徐々に培地の pH を下げながら継代することにより pH 2.5 の培地においても継代培養が可能だった。 $AlCl_3$ による増殖阻害は、コントロールと比較して 1.0 mM と 2.0 mM で約 10%、5.0 mM で約 60% であった。他植物の培養細胞での 0.025 mM $AlCl_3$ による増殖阻害の報告例などを考慮すると、*A. mangium* は実生と同様に培養細胞でも高い Al ストレス抵抗性を有していることが示された。これらの結果から、分化した細胞で複雑に構成された植物体を用いるよりも、個々の細胞に対して比較的均一かつ直接ストレスが加えられる培養細胞がストレス応答の分子生物学的解析に適していると考えられた。

A. mangium は遺伝子情報が未整備であることから、低 pH および Al ストレスに応答する遺伝子を検出するために、DDRT-PCR (differential display RT-PCR) 法による転写解析を行った。細胞培養液に硫酸

を添加して培地の pH を 3 にした低 pH 処理と、pH 3 で終濃度 0.1 mM になるように AlCl_3 を添加した低 pH/Al 処理の、開始 1 および 24 時間後に解析を行った。また、高濃度の Al 処理に対する転写解析では 2 mM と 5 mM の濃度の AlCl_3 を含む 1/2 MS 培地に細胞を移し換え、24 時間後に解析した。DDRT-PCR の後、ストレス処理で転写レベルが変化した DNA 断片の塩基配列を決定し、特異的プライマーを設計して半定量 RT-PCR による候補遺伝子の絞り込みを行った。さらに、RACE (rapid amplification of cDNA ends)法による cDNA の塩基配列の解析後、全長 cDNA をクローニングした。低 pH および低 pH/Al 処理では 34 遺伝子が検出され、2 個が低 pH 処理のみに、1 個が低 pH/Al 処理のみに応答したが、残りの 31 個は両方の処理に応答した。一方、高濃度 Al 処理からは 31 遺伝子が検出されたが、7 遺伝子は低 pH/Al 処理で検出されたものと共通であった。

以上の結果、*A. mangium* から低 pH および Al ストレス応答遺伝子 58 種類が検出され、45 遺伝子の全長 cDNA がクローニングされた。それらのほとんどは *Acacia* 属植物の EST データベースには未登録なものであった。同定された遺伝子は膜輸送や代謝、シグナル伝達等で機能すると考えられ、膜輸送に関わる ABC (ATP-binding cassette)輸送体や脂肪酸代謝に関わるシトクロム P450 等の遺伝子の Al 抵抗性への関与に興味を持たれた。さらに、rhamnogalacturonate lyase、neomenthol dehydrogenase、dihydropyrimidinase、MYND type Zn finger は、他植物の Al ストレス応答遺伝子の転写解析では報告されていないものだった。

他方、既報の低 pH 耐性および Al 抵抗性遺伝子の *ALMT* (aluminum-activated malate transporter)、*MATE* (multidrug and toxic compounds extrusion)、*STO1*、*STAR1* (sensitive to aluminum rhizotoxicity 1)、*ALS1* (aluminum sensitive 1)および *ALS3* のホモログをディジェネレート PCR 法により検出して全長 cDNA をクローニングした。転写解析の結果、これらの遺伝子は Al 処理によって転写レベルが増大し、既知の Al 抵抗性機構が *A. mangium* においても機能している可能性が示唆された。

本研究で単離された *MATE* 遺伝子は、既報の Al 活性型クエン酸輸送体と相同性を示し、この遺伝子の転写レベルは Al 処理によって増加した。また、Al 処理を行った *A. mangium* 培養細胞で培地へのクエン酸排出が認められた。これらの結果から *A. mangium* 培養細胞においても、クエン酸排出による Al 抵抗性機構の存在が明らかになり、検出された *MATE* 遺伝子の Al 抵抗性への関与が示唆された。

細胞膜型 H^+ -ATPase は有機酸排出に関わるほか、いくつかの植物では酸性条件下でのプロトン排出促進にも関わっている。今回単離された細胞膜型 H^+ -ATPase 遺伝子は低 pH と Al 処理の両方に応答して転写レベルが上昇した。また、24 時間の低 pH 処理を加えた培養細胞には、未処理の細胞よりも高いプロトン排出活性が認められた。これらの結果から、細胞膜型 H^+ -ATPase が低 pH ストレス抵抗性に関与している可能性が示唆された。

培養細胞から単離された遺伝子の多くは、実生においても低 pH や Al ストレスに応答した。また、転写応答は地上部よりも根において顕著であった。

これまでに培養細胞系を用いた低 pH や Al ストレス応答遺伝子の検出や転写解析の研究はなかったが、本研究の成果は、ストレス適応に関与する遺伝子を探索する際に培養細胞系を用いた実験系が有効であることを示すものである。

【総括】

本研究では高い環境抵抗性を示すマメ科木本植物の *A. mangium* を研究材料として、植物体と培養細胞が低 pH および Al ストレスに対する高い抵抗性を持つことを示し、多数のストレス応答遺伝子を検出して全長 cDNA をクローニングした。これら遺伝子の機能は多様なものであったが、従来の研究では報告されていない遺伝子も検出された。また、*MATE* や H^+ -ATPase に関しては、これらの遺伝子が関与する機構が *A. mangium* においても機能している可能性が示唆された。また、植物体を扱うことが困難な木本植物において、培養細胞を用いた解析の有用性を示した。

本研究で得られた全長 cDNA は、新規遺伝子の関わる酸性土壌適応の分子機構を明らかにするためのリソースとなるだろう。そして、得られた遺伝子資源は、遺伝子組換え技術を用いて直接的に、あるいは分子マーカーとしての利用を通じて間接的に、植物の酸性土壌適性改良への応用が期待される。