

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主査） 教授 綾部 眞一

（副査） 教授 青木 俊夫

教授 長谷川 功

准教授 内山 寛

世界の耕作地の数十%を占める酸性土壌への対処は、農業生産とエネルギー・環境に関連する大きな課題であり、特に植物ストレスの研究を通じた取り組みには期待がもたれる。酸性土壌における植物ストレス（酸性ストレス）の主要な要因は、プロトン（ H^+ ）および溶出するアルミニウムイオン（ Al^{3+} ；以下 Al）の毒性であり、その作用や植物の応答に関する生理学的知見が蓄積している。また最近の10年間に酸性ストレスに対する植物の応答の遺伝子レベルでの研究が進展し、草本モデル植物や穀類を利用して、有機酸輸送体その他のトランスポーターをコードする Al 抵抗性遺伝子や、Al およびプロトン耐性の制御に関わる転写因子が同定されている。一方、酸性土壌でも旺盛に生育する植物が存在し、独自または高度の酸性ストレス適応機構が期待されるが、多くの場合それらの研究環境は十分整備されていない。本論文では、高い酸性土壌適応性を持ち東南アジアにおける重要な植林木であるマメ科木本植物 *Acacia mangium* について、その実生と培養細胞の実験系としての有用性を検討した上で、培養細胞より酸性ストレス応答遺伝子の検出とクローニングを試み、以下の成果を得た。

まず *A. mangium* 実生を用いた検討により、この植物が低 pH と Al ストレスに高い抵抗性を有していることが確認された。また培養細胞は適切な条件設定を行えば pH 2.5 の培地においても生育し、Al による増殖阻害は 2.0 mM $AlCl_3$ によりコントロールの約 10%、5.0 mM $AlCl_3$ により約 60% で、*A. mangium* は実生と同様に培養細胞でも高い酸性ストレス抵抗性を有していることが示された。

酸性ストレス応答転写解析は、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/低濃度 Al 処理の、開始 1 および 24 時間後、および高濃度（2 mM と 5 mM）Al 処理の 24 時間後の培養細胞を用いた。Differential display RT-PCR によりストレス処理で転写レベルが変化した DNA 断片を検出した後、半定量 RT-PCR により候補遺伝子を絞り込み、RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法による塩基配列の解析後、全長 cDNA をクローニングした。低 pH および低 pH/低濃度 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/低濃度 Al 処理のみに応答し、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、うち 7 遺伝子は低 pH/低濃度 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、そのうち 45 遺伝子の全長 cDNA をクローニングし、その塩基配列をデータベースに登録した。検出された 58 遺伝子のうち、18 種は代謝酵素、10 種はトランスポーター、9 種はシグナル伝達系の構成要素、3 種は転写因子としての機能が予測されたほか、10 種はその他の機能、8 種は機能不明のカテゴリーに分類された。低 pH/Al 処理と高濃度 Al 処理の両方に応答した 7 遺伝子は、トランスポーター 3 種（細胞膜型 H^+ -ATPase と 2 種の ABC (ATP-binding cassette) トランスポーター）、代謝酵素 2 種（cytochrome P450 と糖代謝酵素）、そしてタンパク質輸送および相互作用に関連する 2 種をコードするものであった。またこれらとは別に、他植物において既報の、トランスポーターおよび転写因子をコードする低 pH 耐性および Al 抵抗性遺伝子 6 種をディジェネレート PCR 法により検出し、全長 cDNA をクローニングした。

膜輸送関連遺伝子に関しては以下の知見が得られた。すなわち、本研究で単離された MATE (multidrug and toxic compounds extrusion) 遺伝子は Al 処理を行った *A. mangium* 培養細胞で転写が増加するとともに、クロマトグラフィー分析により細胞から培地へのクエン酸排出が検出され、本培養細胞におけるクエン酸による Al キレート化による抵抗性機構の存在とこの遺伝子の Al 抵抗性への関与が示唆された。また細胞膜型 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、低 pH 処理を加えた培養細胞で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とより、この遺伝子が酸性ストレス抵抗性に関与している可能性が示唆された。

検出された酸性ストレス応答遺伝子には、代謝酵素には炭素や窒素代謝に関わる酵素遺伝子の他にホルモン生合成や二次代謝関連などの多様な遺伝子が、また転写因子にはMYBドメインをもつものなど、そしてシグナル伝達関連遺伝子には複数の膜結合型プロテインキナーゼをコードするものがあった。またこれらには、他植物の酸性ストレス応答遺伝子の転写解析で例があるもの以外に、数種の代謝酵素やその他の機能に分類されるタンパク質など以前に報告されていないものも含まれていた。

さらに水耕栽培した*A. mangium*実生を用いて器官別転写解析を行った結果、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、転写応答は全般的に地上部よりも根において顕著であることがわかった。

以上のように本研究では、従来高い環境抵抗性を示すことが知られながら分子レベルでの研究対象として取扱いに困難があった非モデル木本植物 *A. mangium* を用い、培養細胞を有効に利用して多様な酸性ストレス応答遺伝子をクローニングし、それらの低 pH と Al ストレス抵抗性への関与について知見を得た。この成果は植物ストレス研究の新分野を開拓するものであり、本研究で得られた遺伝子資源は、植物の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してきわめて有用なものである。

よって本論文は、博士（生物資源科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 26 年 2 月 7 日