

(第5号様式)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Siranet Roern
審査委員	主査 東江 栄 副査 市村 和也 副査 荒木 卓哉 副査 諸隈 正裕 副査 宮崎 彰

論文名

Molecular genetic studies on the development of a salt-accumulating organ in a salt tolerant plant.

(耐塩性植物の塩集積細胞の形成に関する分子生物学的研究)

審査結果の要旨

塩害は農業生産性を大きく低下させる。塩生植物はほとんどの作物が枯死する塩条件下においても生存する耐塩性の高い植物である。塩生植物は高塩環境に耐えるための様々な機構を進化させた。体表面に発達する塩嚢細胞（ブラッダー細胞）もその一つで、体内部から体表面への塩の排出に機能する。塩濃度の調整以外にも水分の貯蔵庫としての役割や、イオン濃度の調整、適合溶質の蓄積等が報告されている。アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) も塩生植物の一種で、耐塩性が高く NaCl を体内に高濃度に蓄積する。ブラッダー細胞はアイスプラントの耐塩性、塩吸収能、イオン恒常性、水分含量の保持に重要であることが示されている。本研究はブラッダー細胞の形成メカニズムを分子生物学的に検討したものである。

ブラッダー細胞はトライコームから進化したと考えられている。申請者の研究室では、アイスプラントの野生株とブラッダー細胞欠損変異体を用いた解析により、ワタの繊維形成関連遺伝子である MYB 転写因子、及びシロイヌナズナのトライコーム形成関連遺伝子の *GLABRA2* が野生株で強く発現し、逆にトライコーム形成に対し抑制的に働く遺伝子 *TRIPTYCHON* と *CAPRICE* が変異体で強く発現することが明らかにされた。さらに、サブトラクティブハイブリダイゼーション (SSH) 法を用いた解析により、野生株及び変異体で高く発現する遺伝子断片が5個得られた。申請者は、これらの遺伝子の塩基配列を決定し、機能を推定した。単離した遺伝子のトライコームに対する機能を調べるために、これらを含むバイナリーベクターを構築し、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に導入した。

ワタの繊維形成関連遺伝子であるMYB転写因子と相同性の高い遺伝子を単離した (*McMYB2*, KT223761)。*McMYB2*はR2R3 MYBタンパク質をコードしており、R2 MYB DNA結合ドメインを含んでいた。*McMYB2*を、転写を恒常的に促進するプロモーターである*CaMV35S*に連結しシロイヌナズナに導入した。*McMYB2*の高発現によりシロイヌナズナのトライコームが20%~40%増加した。また9種のトライコーム形成関連遺伝子のうち、*GLABRA2 (GL2)*の発現量が増加したことから、*McMYB2*は*GL2*の発現誘導に関与してトライコームの形成を促進することが示唆された。

シロイヌナズナのトライコーム形成関連遺伝子の*GLABRA2 (GL2)*と相同性の高い遺伝子のcDNA全長の塩基配列を決定した。相同性検索の結果、本遺伝子はHD-Zip III and IVタンパクファミリーに高度に保存されているHD-Zip領域とSTARTドメインを含んでおり、Class IV Homeodomain Leucine Zip (HD-ZIP IV)タンパクをコードしていると推定された。*McC4HDZ* (KT223762)と命名したこの遺伝子は、系統解析からシロイヌナズナの*GL2*と最も近縁であることが確認された。*McC4HDZ*を、前述の*CaMV35S*と*GL2*のプロモーター(*AtPGL2*)に連結し*GL2*欠損変異体 (*gl2-1*)に導入した。その結果、変異体の形質転換体ではトライコームが回復し、野生株の形質転換体ではトライコーム数が増加した。形質転換体では、トライコーム形成を促進する遺伝子である*GL1*、*TTG1*及び*GL2*の発現が増加したことから、*McC4HDZ*は、これら遺伝子の発現を介してトライコームの形成を促進していると考えられた。

トライコーム形成に対し抑制的に働く *CAPRICE* と相同性の高い遺伝子としてアイスプラントから単離された *McCPC* (KT366262) はテンサイ (*Beta vulgaris subsp. vulgaris.*) のジンクフィンガータンパク質に類似したタンパク質をコードしていた。*McCPC* の cDNA をシロイヌナズナに導入した形質転換体では、導入遺伝子の発現は確認されたが、トライコームに大きな変化はなかった。

SSH法を用いて野生株で強く発現する遺伝子 (WM10, WM28) 及び変異体で強く発現する遺伝子 (MW3, MW21, MW31) を単離した。WM28は変異体では全く発現していなかった。WM28の転写開始点上流約1500bpのDNA断片を単離し塩基配列を野生株と変異体とで比較したところ、変異体はシスエレメントであるC-boxを欠失していた。これがWM28が変異体で発現しない要因と考えられた。WM28のcDNAを*CaMV35S*と連結し、シロイヌナズナに導入した。形質転換体ではトライコームの数が約40%増加し、*GL1*と*GL3*の発現が増加することが明らかになった。WM28はG/AAVVY及びY/WLVAVW等のアミノ酸配列を含んでおりジャスモン酸誘導性の遺伝子であることが示唆された。WM28は*GL1-GL3-TTG1* アクティベーター複合体の発現を誘導しトライコームの形成を促進すると考えられた。

このように本研究は、アイスプラントのブラッダー細胞の形成に関する要因を明らかにした初めての知見であり、ブラッダー細胞の進化的起源についても重要な示唆を与えている。これらは作物に耐塩性を付与する上で重要な知見となる。

本論文に関する公開審査会は、平成29年2月4日に愛媛大学農学部において開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査委員会で本論文の内容を慎重に審査した結果、審査員全員一致で博士(農学)の学位を授与するに値するものと判定した。