

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Dan Quang Tran
審査委員	主査 豊田 正範 副査 東江 栄 副査 諸隈 正裕 副査 荒木 卓哉 副査 宮崎 彰

論文名 Studies on the halophilism in a halophyte, the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* L. (塩生植物アイズプラントの好塩性に関する研究)

審査結果の要旨

塩害は、農業生産性を低下させる深刻な問題である。作物は塩感受性が高いため、作物の耐塩性の向上は、持続可能な農業生産を維持するために重要である。塩生植物は、海水に近い高塩環境下で生活環を完遂する耐塩性の高い植物群である。塩生植物のいくつかの種は、耐塩性に加え、塩環境下で成長を増大させる好塩性とよばれる特性を有する。本研究は、塩生植物アイズプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) における好塩性の分子機構の解明を試みた。本研究では、成長に対するより直接的な NaCl の効果を見るために、器官相互の影響や光合成産物の影響のない懸濁培養細胞を用いた。また、成長反応を細胞の伸長と分裂とに分けて NaCl の作用を検証し、さらに、塩環境下で生育した植物からミトコンドリアを単離して ATP 合成に及ぼす NaCl の影響を調べた。得られた結果は以下のとおりである。

まず、培養細胞の成長に対する NaCl の効果を調べた。NaCl 処理によるイオンと浸透圧の影響を分けて調べるために、NaCl とポリエチレングリコール (PEG) を含む培地で培養した。細胞の成長は NaCl 処理で大きく増加し (処理後 28 日目に対照区の約 2 倍)、増加率は PEG 処理よりも大きかったことから、NaCl による生育の促進がイオンの影響によることを示した。

細胞は細胞内へ水分が流入し膨圧が増加して細胞壁が弛緩すると伸長する。塩環境下における浸透圧の調整は水分吸収にとって重要である。また、細胞内への塩の流入はイオンバランスをかく乱するため、元素濃度をできる限り一定に保つ必要がある。塩処理した細胞における 9 種の無機イオンの挙動を調査したところ、Na⁺、Cl⁻、K⁺および NO₃⁻は好塩性を示す細胞において有意に蓄積され、その含量と成長には正の相関関係があることが示された。本研究では、K⁺の吸収に関与するカリウムトランスポーター *McHAK1* 及びカリウムチャネル *McKMT1*、Na⁺の取り込みに関与するトランスポーター *McHKT1*、NO₃⁻の吸収に関与する硝酸イオントランスポーター *McNRT1*、水の吸収に関与する水チャネル *McMIPC*、液胞への Na⁺

の隔離に關与する *McNHX1*、液胞膜のプロトンの取り込みに關与する *V-ATPase*、 Cl^- の取り込みに關与する原形質膜カチオン/ Cl^- トランスポーター *McCCC1*、液胞への Cl^- の取り込みに關与する液胞膜 H^+/Cl^- アンチポーター *McCLC1*、適合溶質プロリン及びオノニトールの合成に關与するデルタ 1-ピロリン-5-カルボキシレート合成酵素 *McP5CS*、及びイノシトール-1-メチルトランスフェラーゼ *McImt1*、細胞壁構築と再編に關与するキシログルカン転移酵素/加水分解酵素 *McXTH* 等の遺伝子の発現量を調べた。*McCCC1* 及び *McCLC1* は本研究で初めて同定した。これらのうち、*McHKT1*、*McKmt1*、*McNRT*、*McHKT1*、*McNHX1*、*McCCC1*、*McCLC1*、*McVmac1*、*McP5CS*、及び *McImt1* 等が好塩性を示す細胞で高く発現することを示した。

ついで、細胞の分裂に及ぼす NaCl の影響を調べた。細胞周期を同調化させるための処理条件を検討し、リン酸飢餓にすることで細胞周期を同調化させる培養法を確立した。シロイヌナズナの遺伝子情報を参照し、アイSprantの cDNA データベースから細胞周期を制御する遺伝子を同定した。すなわち、G1 期：*McCycD2;1*、*McKRP2/ICK2*、*McCDKA;1*、*McCycD3;1*、S 期：*McHistone H4*、*McKRP3*、*McCKSIAt*、*McE2Fb*、*McCDKA;1*、G2 期：*McCDKB1;1*、*McKRP4*、*McCycD1;1*、*McCycB2;1*、*McCDKA;1*、および M 期：*McCDKB2;2*、*McCycA2;1*、*McCycB1;1*、*McCycD3;1*、*McCDyc;1*、*McCDKA;1*、*McCKSIAt* である。これらのうち、*CycD2;1* 及び *CycD3;1* が、 NaCl 処理した細胞で G1-S 期に高く発現することを見出した。これは NaCl が細胞周期に關与することを示す初めての例である。

ATP の合成に及ぼす NaCl の影響をみるために、100mM 及び 400mM NaCl で栽培した個体からミトコンドリアを単離し、 NaCl 存在下で ATP 合成能を調べた。ATP 合成速度は NaCl の増加に伴い増加し、ソルビトールを単独で含む場合よりも高く推移したことから、 NaCl が ATP 合成に關与していることを示した。この要因を明らかにするために、 NaCl 処理した細胞の ATP 合成に關わる遺伝子の発現量を調べた。シロイヌナズナの遺伝子情報を参照し、アイSprantの cDNA データベースから、ミトコンドリアの ATP 合成に關わる遺伝子を同定した。すなわち、ATP シンターゼ *McATPF1b*、電子伝達鎖複合体 I *McCI76*、複合体 II *McmSDH-1*、複合体 III *McCOX6B-1*、複合体 IV *McCYC1-7*、及びシアン耐性呼吸關連酵素オルタナティブオキシダーゼ *McAOX1a*、TCA 回路のピルビン酸デヒドロゲナーゼ *McPDHE1a*、及びリンゴ酸デヒドロゲナーゼ *McMDH1*、さらに、ミトコンドリアのアデニンヌクレオチド輸送体 *McANT2*、及びリン酸輸送体 *McMPT1* 等である。このうち、*McmATPF1b*、*McCOX6B-1*、*McCI76*、*McCYC1-7*、*McmSDH-1*、*McAOX1a*、*McPDHE1a*、及び *McANT2* 等の発現量が NaCl を処理することによって増加することを明らかにした。

このように本研究は、これまで多くの研究がなされている塩に対する耐性機構ではなく、塩による成長の促進作用を調べたもので、成長を規定する要因である細胞の伸長及び分裂いづれにも NaCl が促進的に作用することを示した。また、 NaCl による ATP 合成の促進や關連遺伝子の特定など、耐塩性作物の開発にとって重要な知見が得られている。

本論文に關する公開審査会は令和元年 8 月 3 日に高知大学農林海洋科学部において開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続いて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、審査委員全員一致して博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。