

氏名(国籍)	きむ 金	で 大	うく 煜	(韓国)
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	博甲第4022号			
学位授与年月日	平成18年3月24日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	<b>Physiobiochemical and Proteomic Approaches for Analysing the Salt Stress Responses of Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)</b> (イネの塩ストレス応答を分析するための生理生化学的及び proteomics 的接近)			
主査	筑波大学教授	農学博士	白井健二	
副査	筑波大学教授	博士(農学)	丸山幸夫	
副査	筑波大学教授(連携大学院)	農学博士	藤原伸介	
副査	筑波大学助教授	農学博士	小林勝一郎	

### 論文の内容の要旨

塩ストレスは、植物の生育や生産性を低減する深刻な環境ストレスの一つである。本研究では、塩ストレスに対する植物の応答を体系的に追究するため、実験植物として有用なイネを用い、酸化障害、適合溶質およびアンモニア蓄積に関連している重要な酵素の動態を遺伝子の発現により調べた。さらに、近年、確立された研究方法であるプロテオミクス (proteomics) を用い、塩ストレスに応答するイネのタンパク質を調べた。

水耕法で3葉期のイネを用いて塩ストレスの負の影響を観察したところ、その形態に経時的な変化が顕著に現れた。塩ストレスを与えたイネは、第3葉の葉身先端から乾燥し始め、葉身の表面が褐色に変色した。一方、塩ストレスによる生化学的な障害として、葉の光合成効率を示す塩ストレスの指標となるクロロフィル蛍光が大きく低下した。また、塩ストレスにより細胞膜の脂質過酸化が促進されたことから、酸化障害の発生が明らかになった。

塩ストレスに対するイネの抗酸化酵素活性および個々の酵素に相当する様々な遺伝子の発現を調べた。抗酸化酵素活性は、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX)、グルタチオン還元酵素 (GR) が増加したが、カタラーゼ (CAT) の活性は低下した。一方、塩ストレスによって Mn-SOD、細胞質 APX、ストローマ APX、細胞質 GR または CatB の遺伝子発現が増加した。しかし、チラコイド結合 APX や CatA 及び CatC の遺伝子発現が低下したことから、これらの遺伝子の発現を増加させることがイネの塩ストレス耐性を増加させる戦略になると考えられた。

プロリンと  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) の含量はイネの塩ストレス障害が最大の時期に多く蓄積したので、それらの蓄積がイネの浸透圧を調整し、塩ストレスの障害からイネを防御する可能性は低いと考えられた。一方、 $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) や GABA-T の遺伝子発現が塩ストレスによって強く誘導された結果から、これらの遺伝子の発現がプロリンと GABA の生成に影響を及ぼすことが示唆された。

更に、塩ストレスによるアンモニア蓄積の原因について調べた。フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) の遺伝子発現は塩ストレスによって明らかに強く誘導された。この結果から塩ストレス条件下では

フェニルアラニンの脱アミノ反応が促進され、その過程からアンモニアが多く生成される可能性が強く示唆された。また、塩ストレスによってグルタミン合成酵素の遺伝子発現が低下することによってアンモニアが適切に同化されず、結果的にアンモニアが蓄積すると考えられた。

塩ストレスに応答する葉のタンパク質をプロテオミクスにより調べた。二次元電気泳動によって、塩ストレスを受けたイネの葉サンプルから 440 個のタンパク質スポットが分離された。そのうち 47 個が増加し、8 個が減少した。また、個々のタンパク質を分析した結果、25 個の異なるタンパク質が同定された。

これら一連の実験から塩ストレスにおけるイネの抗酸化酵素系、適合溶質やアンモニア蓄積に関連している重要な酵素の動態が、遺伝子レベルで明らかになった。特に、塩ストレスを受けたイネの場合、細胞内の特定の部位で生成される活性酸素の消去がイネを酸化障害から保護する機構になると考えられた。また、アンモニアの蓄積にはフェニルアラニンの脱アミノ反応の増加およびアンモニアの同化の低下が関与すると示唆された。また、プロテオミクスにより同定された塩ストレスに関与するタンパク質は、主に二酸化炭素の同化および光呼吸に関与する重要な酵素タンパク質であることが確認された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

砂漠化や塩類集積による耕地、作物生産の制限に対して、環境ストレス耐性作物の利用の他に耐性機構研究が先鋭的に行われているが、1つの植物を用いた体系的な研究は少ない。本研究では、イネを用いて塩ストレスに対する応答を、個体から遺伝子、タンパク質のレベルにわたり、可視的影響、生理的反応、酵素活性、遺伝子発現、さらに新たな方法のプロテオミクスによるたんぱく質の変動を体系的に追及しており、独創的であるとともに有意義である。特に、塩ストレスによる抗酸化系酵素のカタラーゼアイソザイムの発現低下、適合溶質のプロリンや GABA 生成遺伝子の発現増大、アンモニア集積につながる PAL の発現増大とグルタミン合成酵素の低下、炭酸同化および光呼吸に関連するタンパク質の変動等を明らかとした。

本研究は、高濃度塩類等の環境ストレスに関する基礎的研究に貢献するのみならず、その応用への寄与も期待され、高く評価される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。