

氏名(本籍)	よし だ せい じ (東京都)		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 甲 第 4979 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 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	Study on Protective Effects of Ethylene and Salicylic Acid against Ozone Exposure in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナにおけるオゾン暴露に対するエチレンとサリチル酸の防御作用に関する研究)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	中 嶋 信 美
副 査	筑波大学教授	理学博士	佐 藤 忍
副 査	筑波大学教授	理学博士	鎌 田 博
副 査	筑波大学准教授	博士(農学)	玉 置 雅 紀

論 文 の 内 容 の 要 旨

光化学オキシダントの主成分であるオゾンは植物の葉に可視障害を引き起こす。これまでの研究からオゾンにより生成される活性酸素によって葉の可視障害が引き起こされると考えられている。さらに活性酸素によって、エチレン、サリチル酸、ジャスモン酸、アブシジン酸といった植物ホルモンの生成が誘導され、これらの作用により葉に可視障害が生じると考えられている。特にエチレンとサリチル酸による可視障害の促進・拡大は多くの研究によって示されている。一方で、研究例は少ないもののエチレンとサリチル酸は可視障害を抑制させる効果があることも報告されている。そこで、本研究ではエチレンとサリチル酸がオゾンによる可視障害を促進するだけでなく、オゾンに対する防御作用を持つことを示し、その作用機序の一端を明らかにすることを目的として研究を行った。シロイヌナズナの野生型 Col-0 は 0.2ppm のオゾンを暴露しても可視障害が見られず、オゾン耐性を示すことが知られている。本研究では Col-0 由来のエチレンシグナル欠損変異体 *ein2* とサリチル酸合成欠損変異体 *sid2* を用いることにより、エチレンとサリチル酸シグナルが働かない状態における植物のオゾンに対する様々な応答反応を野生型と比較することにより研究を行った。

植物体をオゾンに暴露したところ、Col-0 の葉では変化が見られないのに対して、変異体の葉において可視障害が観察された。次に変異体の葉からの電解質流出量を測定することで可視障害の度合いを定量的に解析したところ、変異体の可視障害は野生型に比べて有意に増加していた。さらに、このときの活性酸素の発生量を調べたところ、変異体においてのみ活性酸素の生成が確認された。エチレンとサリチル酸はシロイヌナズナ Col-0 においてオゾン暴露に対して防御的な作用を持つことが示唆された。

そこで、どのような防御作用にエチレンとサリチル酸が関与しているのかを探索することにした。オゾンに対する防御機構として、気孔の閉鎖、活性酸素の消去の二つが考えられる。まず Col-0 と変異体のオゾン暴露時における気孔開度を計測したところ、Col-0 と変異体において気孔開度に差異はなかった。次に活性酸素の消去に関与する遺伝子を含む 157 個のオゾン応答性遺伝子の発現量の変化を Col-0 と変異体間で比較した。その結果、変異体において、還元型アスコルビン酸と還元型グルタチオンの生成・再生などに関与す

る遺伝子の多くで発現が顕著に低下していた。したがって、オゾン暴露時にエチレンとサリチル酸は還元型アスコルビン酸と還元型グルタチオンの生成・再生に関与することが考えられたため、これらの定量を行った。その結果、オゾンを暴露した Col-0 と変異体において還元型アスコルビン酸量に有意な差異は見られなかった。一方、還元型グルタチオン量は Col-0 ではオゾン暴露 6 時間後に 3 倍程度に上昇するのに対し、変異体では上昇は見られなかった。このことから、Col-0 でオゾン暴露時に見られる還元型グルタチオン量の上昇は、エチレンとサリチル酸により制御されており、オゾンによる葉の可視障害発生を防ぐ重要な役割があることが推測された。この仮説を検証するため、変異体に濃度の異なる還元型グルタチオン (0, 500, 1000, 1500 μM) を投与して栽培した後オゾン暴露を行い、可視障害の緩和効果の有無を計測した。その結果、500 μM 以上の還元型グルタチオンの投与によりオゾンによる可視障害の緩和が見られた。以上の結果から、オゾンを暴露した Col-0 においてエチレンとサリチル酸は、還元型グルタチオン量の増加を介して葉の可視障害発生の防御を行う働きを持つ可能性が示唆された。

では Col-0 で観察される還元型グルタチオン量の上昇はどのようにエチレンとサリチル酸によって制御されているのだろうか？全還元型グルタチオンの生合成過程には二つの酵素、 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (GSH1) とグルタチオン合成酵素 (GSH2) が関与している。また、酸化型グルタチオンがグルタチオン還元酵素 (GR) によって還元されることによっても還元型グルタチオン量は影響を受ける。これらの酵素はシロイヌナズナにおいては *GSH1*, *GSH2*, *GRI*, *GR2* という 4 つの遺伝子によりコードされている。そこでこれらの遺伝子の発現量を定量的 PCR 法を用いて調べた。その結果、*GSH1*, *GSH2*, *GRI* の発現量は変異体において Col-0 に比べて有意に発現量が低下していた。さらに、これらの酵素活性を測定した結果、変異体における *GSH1*, *GSH2* の活性は Col-0 よりも有意に低下していた。一方、GR 活性には全ての植物において有意な差は見られなかった。以上の結果から、オゾン暴露時に生成されるエチレンおよびサリチル酸は、還元型グルタチオンの生合成経路に関与する遺伝子の発現量や活性上昇を介して還元型グルタチオン量を高めることによりオゾンに対する防御機構の獲得に寄与していることが示された。

本研究では、エチレンとサリチル酸には、葉の可視障害の促進・拡大というこれまでに知られている作用とは相反する作用である、オゾンによる葉の可視障害を緩和する防御機構を誘導することを示した。ではオゾンにより生成される二つの物質、エチレンとサリチル酸が相反する機能を持つのは何故だろうか？一つの可能性として、これらの植物ホルモンは生成量の違いにより二つの異なる機能を持つことが挙げられる。このような同一の植物ホルモンに対して相反する応答機構を持つことにより、植物は様々な環境ストレスに適応していることが推察された。

審査の結果の要旨

学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。