

氏 名 (本籍)	モハマド ザマン ヌリ デラヴァレ (イ ラ ン)			
学 位 の 種 類	博 士 (生物工学)			
学 位 記 番 号	博 甲 第 5752 号			
学位授与年月日	平成 23 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	<b>Identification and Characterization of Osmotic Stress Responsive Proteins in Soybean using Quantitative Proteomics Approach</b> (量的プロテオミクス手法を用いての大豆の浸透圧ストレス応答性タンパク質群の同定と解析)			
主	査	筑波大学教授 (連携大学院)	薬学博士	小 松 節 子
副	査	筑波大学教授	農学博士	松 本 宏
副	査	筑波大学教授	理学博士	藤 村 達 人
副	査	筑波大学講師	博士 (農学)	春 原 由香里

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

近年、地球温暖化の影響で、洪水や旱魃、猛暑などの異常気象が世界的に問題となっている。こうした自然環境の変化は、農業などへも影響を与え、食料問題の深刻化や生物相の変化などが懸念されている。作物に対する、乾燥、塩、温度などの非生物学的環境ストレスは、共通して浸透圧ストレスを招く。ダイズは、イネ、ムギ、トウモロコシに続き消費量の多い作物であるが、環境ストレスの中でも浸透圧ストレスに弱い作物でもある。従来、ダイズに対する乾燥、塩、温度ストレスについては、個々のストレスとして研究が進められてきたが、共通に働くストレス応答の分子機構を明らかにすることにより、作物生産性維持のための抵抗性管理技術の構築を加速する。本研究は、ダイズの浸透圧ストレス抵抗性機構を、植物生理学的・分子生物学的に解析したものである。

本研究では、浸透圧ストレスを誘導する薬剤として広く用いられているポリエチレングリコールを用いた。ダイズを播種後 2 日目に出芽する時期にポリエチレングリコールで処理すると、早期に根や胚軸の生長を抑制したので、生育初期の胚軸と根に対する浸透圧ストレス応答機構を明らかにすることとした。さらに、特異的なチャンネルによってイオンなどの低分子を透過させ、受容体を介して細胞外からの情報を受け取る機能、細胞膜の一部を取り込んで細胞内に輸送する機能など、細胞にとって重要な機能を担っている細胞膜におけるストレスの影響を解析することとした。ダイズをポリエチレングリコールで処理後、根と胚軸を採取し、細胞膜を二層分離法で精製した。細胞膜の ATPase 活性を指標とした精製効率率は 92.5% であり、高純度の細胞膜が精製できたと判断した。

次に、浸透圧ストレス下のダイズの応答機構を包括的に解析するためにプロテオーム解析技術を利用することとした。近年、ダイズゲノム塩基配列情報および完全長 cDNA 配列情報が公開され、ダイズにおいてもゲノムサイエンス規模でプロテオーム解析ができるようになったことより、その長所を生かして、二次元電気泳動を基盤にしたプロテオーム解析技術と質量分析計を基盤にしたプロテオーム解析技術の両者を用いて解析した。その結果、合計 98 個の細胞膜タンパク質が、浸透圧ストレス下で顕著に増加・減少した。浸透

圧ストレス下で、細胞膜  $H^+$ -ATPase を含むトランスポーターおよび、カルネキシンを含む分子シャペロンについては、顕著に増加した。特に、 $H^+$ -ATPase は、遺伝子発現レベル、タンパク質発現レベル、さらに酵素活性において、浸透圧ストレスで増加した。

二次元電気泳動を基盤にしたプロテオーム解析技術と質量分析計を基盤にしたプロテオーム解析技術の両方で、浸透圧ストレスで増加したカルネキシンについて、詳細に解析した。質量分析計で同定されたカルネキシンのアミノ酸配列を元に、ダイズゲノム塩基配列情報を用いて検索し、相同性の高いカルネキシン遺伝子を単離し、コムギの無細胞系にてタンパク質を発現させ抗体を調製した。細胞内小器官を精製し、抗カルネキシン抗体を用いてウエスタンブロット法を行った結果、カルネキシンは小胞体に存在し、浸透圧ストレスにより細胞膜に移動することが明らかになった。なお、定量リアルタイム PCR の結果、本遺伝子発現は浸透圧ストレスにより変動しないことより、ストレスの影響は遺伝子発現レベルではなく、タンパク質の翻訳後修飾あるいは細胞内局在の変化に起因することを示唆した。浸透圧ストレス下のイネにおけるカルネキシンの発現変動は穏やかであり、ダイズにおいて顕著であったことより、浸透圧ストレス下のカルネキシンの変動は、生物間で差があると考えられた。以上、ダイズにおける浸透圧ストレス応答機構には、細胞膜でのイオン透過性のみならず、小胞体のカルネキシンを介した応答機構の関与していることを示唆した。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、乾燥、塩、温度などの非生物学的環境ストレスにより誘導される浸透圧ストレス応答の分子機構解明に迫ったものである。最新の技術である二次元電気泳動を用いない質量分析計を基盤にしたプロテオーム解析技術を植物に利用するために改良し、ダイズの浸透圧ストレス応答機構解明研究に応用することにより、包括的に解析した。この技術開発は、今後、広く他のストレス条件および多くの植物プロテオーム解析に利用できる点で画期的である。一方で、本技術を利用して、ダイズにおける浸透圧ストレス応答機構には、細胞膜でのイオン透過性のみならず、小胞体のカルネキシンを介した応答機構の関与を示唆した。特に、浸透圧ストレス下でダイズの細胞内ではカルネキシンが小胞体から膜へ移動することを明確にした点で新規性がある。本研究において、新しい技術を導入してダイズにおける浸透圧下の分子機構に関する多くの知見を提供したことは、今後の作物の環境ストレス耐性機構の解明研究、さらには、その遺伝子改良による環境ストレス耐性作物の作出に寄与する成果として高く評価される。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。