

氏名(本籍)	た　し　て　る　あ　き 太　治　輝　昭(兵　庫　県)
学位の種類	博　士(理　学)
学位記番号	博　甲　第　2776　号
学位授与年月日	平成14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	生物科学研究科
学位論文題目	Important Roles of Drought-and Cold-Inducible Genes for Galactinol Synthase in Stress Tolerance in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ galactinol synthase 遺伝子群の環境ストレス条件での発現および機能解析)
主　査	筑波大学(客員)教授　　理学博士　篠　崎　一　雄 (理化学研究所筑波研究所)
副　査	筑波大学教授　　理学博士　鎌　田　博
副　査	筑波大学教授　　理学博士　沼　田　治
副　査	筑波大学助教授　　理学博士　佐　藤　忍

論　文　の　内　容　の　要　旨

植物の乾燥・塩・低温などの水ストレス下における細胞レベルでの応答のうち、適合溶質の蓄積はストレス耐性に関わる最も重要な因子の一つと考えられている。これまでに適合溶質としての機能が報告された物質には、glycine betaine, prolineなどが挙げられ、これらの合成系、あるいは分解系を操作したトランスジェニック植物が野生型と比較して、乾燥や塩ストレス耐性が向上することが示された。近年の研究により、新たに raffinose family oligosaccharides, RFOが同様に適合溶質としての機能を持つ可能性が示唆された。RFOは galactinolを基質として合成されるオリゴ糖で raffinose, stachyoseが含まれる。これまでのRFOの適合溶質としての機能を示唆した報告は、そのほとんどが種子の乾燥耐性に着目されたもので、種子の乾燥過程において raffinose, stachyoseが上昇する等から、種子の乾燥耐性獲得にはRFOが何らかの役割を果たしていることが示唆される。しかしながら植物体におけるRFOと乾燥ストレス耐性の関係は不明であった。本研究では、高等植物、特に植物体のストレス耐性獲得とRFOの関係を明らかにすることを目的として、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて生理学的、分子生物学的解析を行った。

シロイヌナズナを組織別に糖分析したところ、他の植物種での報告と同様、ほぼ乾燥種子のみにおいて、蓄積量の多いものから順に stachyose, raffinose, galactinolの蓄積が見られた。次に、土植えの植物に乾燥・NaCl・低温ストレスを施して糖分析を行った。その結果、非ストレス下においては、galactinol, raffinoseの蓄積は認められないものの、乾燥・塩・低温ストレス下において蓄積の上昇が認められ、これにより初めて植物体のストレス耐性獲得にもRFOが関与する可能性が示された。そこでRFO合成の律速段階と考えられている galactinol synthaseの遺伝子をシロイヌナズナのゲノム上より7つ同定し、3つの遺伝子についてストレス誘導性を確認し、*AtGolSI,2,3*と命名した。*AtGolSI,2*遺伝子は乾燥・NaClストレスにより誘導されるのに対し、*AtGolS3*遺伝子は低温ストレスにより誘導されることを初めて示した。また組織別の発現部位を調べたところ、乾燥種子のみにおいて、*AtGolSI,2*の発現が認められた。これらの遺伝子発現の経時的变化は、先の糖分析で得られたRFO蓄積の経時的变化と矛盾なく、相関関係が見られた。またGST-AtGolS融合タンパク質を大腸菌内に合成させ、目的のタンパク質を精製して酵素活性測定を行った結果、GST-AtGolSI,2,3いずれにおいても galactinol synthase活性が認め

られた。

galactinol synthase とその産物である galactinol, raffinose の個体レベルでの機能を調べるために, *AtGolS* cDNA を過剰発現したとトランスジェニック植物を作成した。*AtGolS2* を導入したトランスジェニック植物では非常に高い *AtGolS* の発現と, galactinol, raffinose 含量の顕著な増加した。そこで, *AtGolS2* 過剰発現植物の乾燥ストレス耐性に関して解析した結果, 野生型がいずれも枯死する乾燥条件下において, *AtGolS2* 過剰発現植物は枯死することなく, 顕著に乾燥耐性が向上した。本研究により, ストレス誘導性 galactinol synthase 遺伝子が乾燥ストレス時における galactinol, raffinose の蓄積に重要な役割を果たし, 蓄積した galactinol, raffinose が乾燥ストレス下において適合溶質として耐性獲得に重要な役割を果たすことを初めて明らかにした。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は, 以下の点について明らかにすることにより, raffinose family oligosaccharides, RFO が乾燥ストレス時に適合溶質として機能し, 乾燥ストレス耐性の付与に関与することを, 高等植物において初めて明らかにしたものである。

高等植物シロイヌナズナの植物体において, 乾燥, 塩, 低温ストレスにより galactinol, raffinose が蓄積することを初めて明らかにした。シロイヌナズナより RFO 合成の律速段階と考えられている galactinol synthase の 3 種の遺伝子, *AtGolS1,2,3* を単離し, それらが乾燥, 塩, 低温などの環境ストレスにより誘導されたことを明らかとした。さらに, 遺伝子発現の経時変化と RFO の蓄積が相関を示すことを明らかとした。また, これらの遺伝子産物が galactinol synthase 活性を示すことを大腸菌で発現したタンパク質を用いて明らかにした。*AtGolS* を過剰発現したトランスジェニック植物を作成し, この *AtGolS* 過剰発現植物が野生型の植物と比較して galactinol, raffinose 含量が増加していることを示した。さらに, 乾燥ストレスに対する耐性試験を行った結果, *AtGolS* 過剰発現植物は野生型の植物に比べて顕著に乾燥ストレス耐性が向上することを示した。

本研究は, 植物の乾燥ストレス耐性獲得に重要である適合溶質として, RFO の galactinol, raffinose が機能することを, その合成系のキー酵素の galactinol synthase 遺伝子を過剰発現させるトランスジェニック植物を用いて, 直接に証明した点で独創的であり, 高等植物の乾燥ストレス耐性の獲得に関与する生理応答機構の研究の進展に大きく貢献するものとして評価される。

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。