

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 24 年度博士課程進学

氏名 小林紫緒
指導教員名 高野哲夫

論文題目 炭酸塩ストレスが高等植物に与える影響と、植物の炭酸塩耐性機構に関する研究

作物の生育に適さない不良土壌のひとつである塩類集積土壌は、主に中性塩 (NaCl) が集積したものと、主に炭酸塩 (NaHCO_3 、 Na_2CO_3 、 CaCO_3) が集積したものの 2 つに大別される。特に炭酸塩による植物の生育阻害は中性塩と比べても著しく強いことが知られているが、その生育阻害機構やそれに対する植物の耐性機構はあまりよくわかっていない。本研究は「炭酸塩ストレスとは何か、また耐性植物はどのようにしてそれに耐えるのか」という問いに答えることを目標に始められた。

中国東北部の炭酸塩類集積土壌 (図 1) に生育する炭酸塩耐性植物 *P. tenuiflora* および同族の炭酸塩感受性種スズメノカタビラ (*Poa annua* L.)、またモデル植物のシロイヌナズナとイネに炭酸塩ストレス処理を行い観察した結果、これらの植物では炭酸塩ストレスにより液胞内 pH が上昇することや、シロイヌナズナの根では低濃度炭酸塩ストレスにより液胞形態が異常になることが示され、炭酸塩はごく低濃度かつわずか一晚の処理で根細胞内ホメオスタシスに影響を及ぼすことが明らかになった。また根のスベリン染色による内皮のバリア構造のイネ-*P. tenuiflora* 間の比較が試みられたが、蛍光顕微鏡下では顕著な違いは観察されず、*P. tenuiflora* の耐性を決定づける要因とは断定できなかった。また酵母 $\Delta nhx1$ 変異体が炭酸塩ストレス処理に対し野生型よりも感受性であることが明らかになり、液胞膜型 Na^+/H^+ 対抗輸送体の *Nhx1* が少なくとも酵母においては細胞レベルの炭酸塩耐性に関与していることが示された。

また炭酸塩由来炭素の植物体内動態を調べるため炭素安定同位体を含む炭酸塩を根に与えた結果、 ^{13}C の根への取り込みが炭酸塩感受性植物のイネと耐性植物の *P. tenuiflora* のいずれにおいても見られた一方、 ^{13}C の地上部への移行はイネで 24 時間以内に見られたが *P. tenuiflora* においては見られなかったという結果が得られた。このことから、*P. tenuiflora* には炭酸イオンまたはその代謝産物を根に蓄積し、地上部への移行を抑えるメカニズムがあるのではないかと考えられた。



図1 中国黒龍江省に広がる炭酸塩類集積土壌。2009年10月撮影

スズメノカタビラの炭酸塩耐性の強さに関して知見を得るため、炭酸塩ストレス処理条件下で *P. tenuiflora* との生育比較を行った結果、スズメノカタビラは中性塩には比較的強い耐性を持つ一方で炭酸塩に感受性であることが明らかになった (図2)。また *P. tenuiflora* は通常の水耕液の pH で生育させると水耕液 pH を上昇させたが、スズメノカタビラではその現象は見られなかった。これら2種の炭酸塩ストレス条件下での遺伝子発現を RNA-seq 解析により網羅的に解析したところ、耐性種の *P. tenuiflora* では発現変動遺伝子数が大幅に少なく、その少ない発現変動遺伝子の中には鉄獲得関連遺伝子が多く含まれるという結果が得られた (図3、表1)。それらの鉄獲得関連遺伝子は *P. tenuiflora* で誘導される一方でスズメノカタビラでは発現抑制されており、炭酸塩ストレス耐性の種間差の一部を説明するのではないかと考えられた。

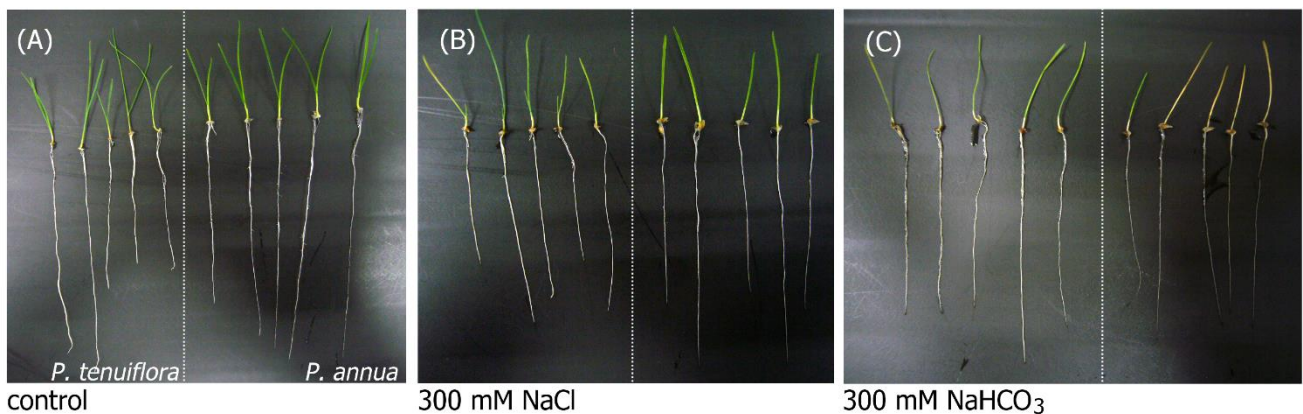


図2 水耕栽培による高濃度炭酸塩耐性試験。(A) コントロール処理、(B) 300 mM NaCl、(C) 300 mM NaHCO₃。それぞれ点線より左が *P. tenuiflora*、右がスズメノカタビラ。

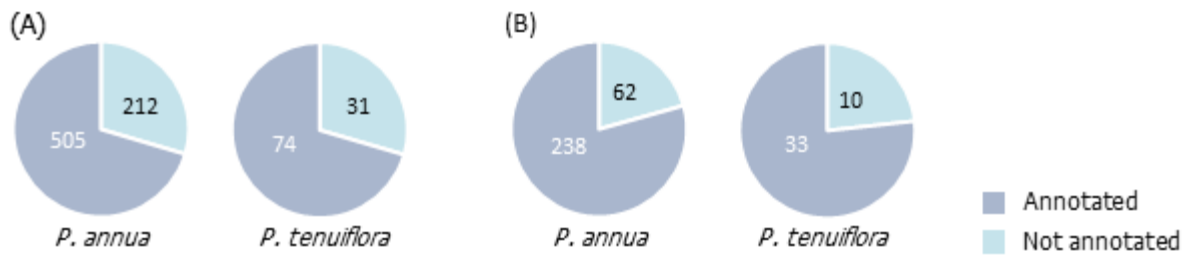


図3 RNA-seq解析結果の概略。(A)、(B)はNaHCO₃ストレス処理によって発現が変動した転写産物の数と、そのうちBLASTXで検索結果の得られたものの数。(A)スズメノカタビラ、(B) *P. tenuiflora*。

表1 RNA-seq解析の結果、発現変動が見られた遺伝子(2倍以上の発現変動、FDR-corrected *p*-value < 0.05)のうち、興味深かったものの一覧。Sequence desc.はBDA (Blast2GO Descriptor Annotator)によってつけられたアノテーションで、当該コンティグのすべてのBLAST hit description中に最も多く見られた単語を示す。Fold changeはNaHCO₃ストレス処理時の発現量/コントロール処理時の発現量。

Feature ID	Sequence desc.	Fold change (EDGE test)
スズメノカタビラ・発現上昇		
Poa_27190	glutathione S-transferase	11.34
Poa_3657	high affinity nitrate transporter	53.21
Poa_12387	anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase-like	5.09
Poa_688	ABC transporter b family member 4-like	62.27
Poa_2744	aspartic proteinase nepenthesin-2	7.68
Poa_18988	cytochrome p450	54.50
Poa_15731	disease resistance protein RPM1	18.52
Poa_4898	flavonoid 3 -monooxygenase-like	14.47
Poa_6299	mitochondrial chaperone BCS1-B	2.93
Poa_8595	patatin group A-3	3.97
Poa_2480	phosphate transporter	176.58
Poa_8940	phosphoenolpyruvate carboxykinase	54.00
Poa_12214	potassium channel skor	6.51
Poa_25791	probable WRKY transcription factor 70-like	16.62
Poa_19228	subtilisin-like protease	9.35
<i>P. tenuiflora</i>・発現上昇		
Put_2050	boron transporter	3.58
Put_11515	carbonic anhydrase	3.90
Put_1357	high-affinity nitrate transporter -like	3.53
Put_763	leucine-rich repeat receptor-like protein kinase at2g19210-like	3.48
Put_2064	long chain acyl-CoA synthetase 4-like	5.03
Put_4625	metal-nicotianamine transporter YSL6	3.68
Put_22802	nicotianamine aminotransferase A-like	4.65
Put_1383	phosphate transporter	25.87
Put_1973	phosphoenolpyruvate carboxykinase	7.47

表 1 (続き)

Put_7021	sucrase-like protein	6.08
Put_3399	sulfate transporter	3.21
Put_4027	thionin-like peptide	6.82
Put_10418	zinc transporter	5.74

スズメノカタビラ・発現抑制

Poa_40361	2'-deoxymugineic-acid 2'-dioxygenase-like	-3.90
Poa_7047	actin	-3.31
Poa_13081	ammonium transporter	-2.94
Poa_24077	beta-expansin 1a precursor	-8.33
Poa_8466	cellulose synthase	-3.48
Poa_9099	GDSL esterase lipase At5g45910-like	-2.24
Poa_2507	high-affinity potassium transporter	-2.80
Poa_21856	iron-phytosiderophore transporter	-3.51
Poa_36815	mate efflux family protein chloroplastic-like	-6.77
Poa_2955	nicotianamine aminotransferase A-like	-4.99
Poa_64935	nicotianamine synthase 3	-90.37
Poa_58054	protein zinc induced facilitator-like 1-like	-50.8
Poa_41522	STOP1	-9.44
Poa_6256	urea active transporter 1	-2.47
Poa_9416	wall-associated receptor kinase 2-like	-3.47

***P. tenuiflora*・発現抑制**

Put_32521	cytochrome p450 716b1-like	-3.72
Put_28631	sodium transporter	-8.04
Put_52287	WRKYnscription factor	-5.15

結論として本研究は炭酸塩処理のストレス要因は鉄欠乏であるという従来の説を一部支持した一方で、液胞内 pH や液胞形態の変化などそのみでは説明の難しい現象が広く植物に見られることを明らかにし、その耐性の鍵は *P. tenuiflora* で非ストレス条件下でも恒常的に発現する遺伝子にあるのではないかということを示唆した。