

## 審査の結果の要旨

氏名 小林 紫緒

不良土壌のひとつである塩類集積土壌は、主に中性塩 ( $\text{NaCl}$ ) が集積したものと、主に炭酸塩 ( $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{CaCO}_3$ ) が集積したものと2つに大別される。炭酸塩による植物の生育阻害作用は中性塩と比べて著しく強いことが知られており、長らくそれは「 $\text{Na}^+$ によるストレスに、高 pH が引き起こす鉄欠乏ストレスが加わるためである」とされてきた。しかし炭酸塩ストレスによる生育阻害は単なる高 pH ストレスによるものよりも大きいという報告があるほか、申請者の実験でも、炭酸塩を含む水耕液は鉄を含まず  $\text{Na}^+$ を含む水耕液よりもはるかに強い生育阻害作用を持っていた。したがって、炭酸塩は  $\text{Na}^+$ とも高 pH とも異なる未知のストレス機構を持っていると考えられる。一方で、炭酸塩類集積土壌にはそこに自生する能力を持つ耐性植物が存在しており、その耐性メカニズムもまた未だ明らかでない。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的として行われた。

1章の緒論では、研究の背景、意義と目的について述べた。

2章では、炭酸塩ストレスが植物の根に与える影響について検討した。供試植物には、中国東北部の炭酸塩類集積土壌に自生する炭酸塩耐性植物 *Puccinellia tenuiflora* (*P. tenuiflora*)、同族の炭酸塩感受性種スズメノカタビラ (*Poa annua* L.)、およびシロイヌナズナとイネを用いた。それぞれの植物種を水耕栽培し、 $\text{NaHCO}_3$  ストレス処理を行い、液胞内 pH を測定したところ、いずれの植物種でも液胞内 pH が上昇する傾向が見られた。また液胞膜マーカーを発現させたシロイヌナズナの根の観察では、ストレス処理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で根の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。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、いずれの種でも塩処理により内皮へのスベリン蓄積が起こることが明らかになったが、蛍光顕微鏡下では植物種間の顕著な違いは観察できなかった。酵母  $\Delta nhx1$  変異体は 50 mM  $\text{NaHCO}_3$  ストレス処理に対し野生型よりも感受性が高いことが明らかになり、液胞膜型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  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。

3章ではスズメノカタビラの炭酸塩耐性試験を行った。*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強い耐性を持つ一方で、炭酸塩には感受性が高いことが明らかになった。この結果から NaCl と NaHCO<sub>3</sub> には異なる耐性機構が必要であることが推測され、スズメノカタビラは前者への耐性のみを有していると考えられる。スズメノカタビラでは炭酸塩処理条件下で *P. tenuiflora* よりも多くの細胞死と根の伸長阻害が見られることがわかり、地上部の枯死に先行して根の細胞死が起こると考えられ、植物の炭酸塩耐性には炭酸塩条件下で根を細胞レベルで保護する何らかの機構が重要であることが示唆された。

4章では *P. tenuiflora* とスズメノカタビラの網羅的遺伝子発現解析を行った。NaHCO<sub>3</sub> 処理を行い、根における遺伝子発現を RNA-seq 解析により調べた。*P. tenuiflora* とスズメノカタビラのそれぞれについて 29,619,901 リードと 47,700,089 リードが得られ、*de novo* アセンブリによりそれぞれ 77,329 本と 115,335 本のコンティグが得られた。ストレス処理により 2 倍以上の発現変動が見られた転写産物は *P. tenuiflora* で 157 個、スズメノカタビラで 1,090 個あった。定量的 RT-PCR の結果は RNA-seq 解析の結果とよく整合する傾向を示し、RNA-seq 解析の結果を裏付けた。*P. tenuiflora* 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ていたが、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。一方で *P. tenuiflora* ではスズメノカタビラに比べて炭酸塩ストレスにより発現変動する遺伝子が少ないという結果から、*P. tenuiflora* では通常時からストレス関連遺伝子が高発現しているのではないかと推測される。通常時の遺伝子発現を *P. tenuiflora* とスズメノカタビラの間で種間比較する目的で、RNA-seq 解析で得たリードのミナトカモジグサ転写産物へのマッピングを試みた。フラボノイドなどの二次代謝物合成系に関わる遺伝子群は *P. tenuiflora* で、鉄獲得関連遺伝子群はスズメノカタビラでそれぞれ通常条件における発現量が高いという結果が出るなど、興味深い結果が得られた。

以上のように、本研究で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れ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示唆した。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。