

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 孫 茜

ススキ (*Miscanthus sinensis* Andersson) は日本や中国の広範囲に自生するイネ科ススキ属の多年生草本であり、C<sub>4</sub> 植物であることが知られている。日本では古来から屋根葺き材などの建築資材、家畜の飼料、堆肥の原料および観葉植物として用いられて来た。それに加えて近年ではリグノセルロース系バイオマス原料として着目されるようになった。特にススキと四倍体オギ (*Miscanthus sacchariflorus*) との交配で生まれた三倍体のジャイアントミスカンサス (*Miscanthus* × *giganteus*) は驚異的なバイオマス生産量を示すため、バイオ燃料の原料として欧米で特に注目を集めている。ジャイアントミスカンサスは遺伝的多様性に乏しく環境適応性が低いことが問題であるが、三倍体であるため不稔であり育種は困難である。それに対してススキはより多様な環境に適応している。二倍体であり稔性もあるので交配育種も可能である。したがって環境適応性の高いススキを育成することができればバイオ燃料の原料として有望である上に、ジャイアントミスカンサスの育種にも有効利用できると考えられるが、ススキの環境適応性について研究された例は極めて少ない。そこで本研究ではススキの耐塩性に着目し、塩ストレスに対する応答および耐塩性の機構について検討した。

第1章の緒論では、研究の背景、意義と目的について述べた。

第2章では、塩化ナトリウムストレスに対するススキの生理的な応答について解析した。

日本各地から収集されたススキ 17 系統を北海道大学北方生物圏フィールド科学センターから分譲を受け供試した。最初に 0~360 mM の塩化ナトリウム存在下で発芽試験を行った。高濃度の塩化ナトリウムはススキの発芽と初期成育を阻害したが、耐塩性については系統間で明らかな差があった。発芽後の幼植物体を用いた成育試験においても耐塩性の差異を確認することができた。その結果、耐塩性系統である JM119 と塩感受性系統である JM99 を見いだすことができた。2 系統間で数種類濃度の塩化ナトリウム存在下での、乾物重、クロロフィル含有量、分げつ数、総葉面積、光合成速度、気孔伝導度、光化学系 II の量子収率 ( $\Delta F/F'_m$ ) および植物体内無機イオン含有量の変化について詳細に比較解析した結果、JM119 が JM99 と比較して強い耐塩性を示すことは、塩ストレス下における総葉面積および分げつ数の維持、光合成能力の持続、有害なナトリウムイオンの過度な蓄積の排除に起因することが示唆された。

第3章では、ススキの C<sub>4</sub> 光合成に対する塩ストレスの影響について解析した。

耐塩性系統 JM119 と塩感受性系統 JM99 の幼植物体を、塩化ナトリウム (250 mM) 存在

下、非存在下で栽培し、植物体の成育、葉クロロフィル含有量、光合成能力、C<sub>4</sub> 光合成に関する酵素：ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)、ピルビン酸-リン酸ジキナーゼ (PPDK)、NADP-リンゴ酸酵素 (NADP-ME)、リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) およびルビスコ (RuBisCO) の活性の変化について解析した。炭水化物、タンパク質および遊離アミノ酸量についても比較した。その結果、塩ストレス条件下でのススキの成育阻害は光合成能力の低下に伴って引き起こされることが明らかになった。耐塩性系統 JM119 では塩感受性系統 JM99 と比較して、塩ストレス下でも光合成を維持する能力が高いことが示された。特に、クロロフィル含有量や光化学系 II の維持、PEPC、PPDK および MDH 活性の維持など気孔の開閉に関係しない要因が重要であると考えられた。

第 4 章では、ススキ遺伝子の塩ストレスに対する発現応答について解析した。

C<sub>4</sub>光合成に関する酵素をコードする遺伝子 (*PEPC*, *PPDK*, *MDH*, *NADP-ME*, *RbcS*) およびナトリウムイオンの細胞からの排出 (*SOS1*) 又は液胞への隔離 (*NHX1*) を行うナトリウムプロトンアンチポーター ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter) の遺伝子発現を、塩処理を施した耐塩性系統 JM119 と塩感受性系統 JM99 とでリアルタイム PCR 法により比較した。ススキ遺伝子の塩基配列についての情報が少ないので、近縁種のサトウキビやソルガムおよびトウモロコシ遺伝子の配列をもとにディジェネレートプライマーを設計しススキ遺伝子断片を増幅し塩基配列を決定した。リアルタイム PCR には遺伝子断片内部のススキ遺伝子特異的プライマーを用いた。*PEPC*, *PPDK*, *MDH*, *NADP-ME* の遺伝子発現は塩ストレス処理により上昇し、*RbcS* の遺伝子発現は低下した。*PEPC* 遺伝子発現は JM119 で強かったが *MDH*, *NADP-ME* 遺伝子発現は JM99 で強かった。*SOS1* および *NHX1* 遺伝子の発現は JM119 において明らかに JM99 より強く発現することから、ススキの耐塩性の一因となっていることが考えられた。

以上のように、本研究ではススキの耐塩性の多様性について解析を行い、耐塩性系統と塩感受性系統とを同定することができた。またそれらの系統を用いて塩ストレスに対する応答について詳細に解析し、新しい知見を得た。本研究で得られた成果は、ススキの環境応答に関する遺伝的多様性を理解する上で非常に重要であり、学術上、応用上貢献することが少なくない。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。