

ふりがな いしばし ひろき
氏名 石橋 弘規
学位 博士(学術)
学位記番号 新大院博(学)第185号
学位授与の日付 平成20年3月24日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名

シロイヌナズナにおける硝酸蓄積機構に関する研究

論文審査委員
主査 准教授 末吉 邦
副査 教授 大山卓爾
副査 教授 福山利範
副査 教授 野中昌法
副査 准教授 中野 優

博士論文の要旨

硝酸イオンは、植物における主要な窒素源である。硝酸イオンは、能動的に根に吸収された後、根で硝酸還元酵素(NR)により亜硝酸に還元されるか、導管を通して葉部へ輸送される。植物は、時に過剰の硝酸イオンを吸収し、これを細胞中の液胞に高濃度に蓄積する。一方で、人間や家畜が過剰な硝酸イオンを摂取すると、メトヘモグロビン血症や他の病気を引き起こす危険性が指摘されており、作物における硝酸イオンの過剰蓄積が健康上の問題となっている。硝酸イオンの輸送・蓄積に関わる分子機構の解明によって、この課題の解決が図られることが期待されている。最近になって、遺伝学的手法により、栄養塩の輸送や蓄積に関わる遺伝子がわかってきている。本論文は、植物における硝酸蓄積機構の解明を目的とし、硝酸イオン蓄積に異常のあるシロイヌナズナ変異体の単離とその生理的性質の調査、マッピングによる原因遺伝子の同定を試みた結果を述べている。

本論文で述べられた主要な結果は以下の1)~3)とおりでである。

1) シロイヌナズナ変異体 *rnc2* の単離

EMSにより突然変異誘起処理されたシロイヌナズナのM2種子の1粒後代1,437系統について、1系統10粒ずつロックウール上に播種し、5mMの硝酸塩を含む培養液でかん水しながら連続光下で2週間栽培した。それらの系統より、葉部硝酸イオン濃度が野生株に比較して大きく低下した突然変異体 *rnc2* を選抜した。突然変異体 *rnc2* のF2世代植物における表現型の分離について調査した。それぞれのF2世代植物についてF3世代植物を展開し、表現型の決定を行った。得られた分離比について χ^2 検定を行ったところ、3対1に適合し、低硝酸蓄積への関与遺伝子数は1つであることが示された。

2) シロイヌナズナ変異体 *rnc2* の生理的性質

続いて突然変異体の示す生理的性質を調べた。0.25-15mMの硝酸塩を含む培養液で水耕栽培した時の *rnc2* における硝酸イオン濃度は、葉においては野生株の45-61%であり、根においては0.25mMを除いて野生株と同程度だった。このことは、*rnc2* における硝酸蓄積変異が葉部でより顕著であることを示した。5mMの硝酸塩を含む寒天培地で10日間栽培した時の *rnc2* の新鮮重は、葉部で野生株の67%、根部で野生株の62%であった。15mMの硝酸塩を含む寒天培地で栽培した時でも生育の回復は観察できなかった。個体あたりの根部新鮮重と葉部の硝酸含量の関係を調査したところ、*rnc2* における低硝酸蓄積は、根の生育不全によるものでないことが示された。

*rnc2*における低親和性域の正味の硝酸吸収活性は、野生株の78%に低下していた。この結果は、低親和性の正味の硝酸吸収活性が変異の影響を受けていることを示している。

NR活性は、葉部および根部ともに野生株とほとんど違いは無く、*rnc2*における低硝酸蓄積が硝酸還元能の変異によるものでないことを示している。

3) *rnc2*における変異のマッピング

rnc2(Col-0系統)とLansberg erecta系統の野生株を交配させて得たF2世代植物704個体より葉部の硝酸イオン濃度が低下した個体を選抜した。選抜した個体の自殖後代であるF3世代植物についても葉部の硝酸イオン濃度の低下が確認できた9個体を用いてマッピングを試みた。その結果、*rnc2*における変異は、第1染色体上のマーカーSGCSNP253から染色体の最下部の間に存在することが明らかとなった。

さらに詳細なマッピングを行うために*rnc2*とLansberg erecta系統の野生株を交配させて得たF2世代植物1,524個体から選抜を行い、マッピングを試みた。結果として、変異の原因遺伝子は第1染色体上の155kbpの範囲内に存在すると推定された。この範囲内には、49遺伝子が存在しているが、いずれの遺伝子も硝酸の吸収・代謝に関わる既知の遺伝子ではなかった。*rnc2*は、硝酸蓄積に関わる未知遺伝子に変異が生じていると考えられ、この変異体は、植物の硝酸蓄積機構の解明に向け有用な研究対象となることが期待された。

審査結果の要旨

本研究は、植物にとって主要な窒素源である硝酸イオンの植物体内への蓄積機構について、シロイヌナズナを用いて調べたものである。植物の諸機能を明らかにする上で、目的の形質に以上のある変異株を見つけ、それを解析することは極めて重要である。これまで、硝酸蓄積に異常のあるシロイヌナズナ変異株が得られた例は一例だけである。石橋氏は、変異原処理して得られたシロイヌナズナのM2種子の1粒後代1,437系統全てについて、葉部の硝酸イオンを測定し、低硝酸蓄積を示す変異体を選抜し、最終的に葉部でのみ硝酸イオン濃度が低下した変異体*rnc2*の単離に成功した。この*rnc2*においては、他の主要なアニオン濃度は低下せず、硝酸イオン濃度だけが特異的に低下していた。また、*rnc2*の硝酸吸収量は、野生株の80%以下であることも明らかにした。石橋氏は、*rnc2*の遺伝子マッピングも行い、原因遺伝子が第1染色体の155kbの領域に存在すること、そしてその領域に存在する49個の遺伝子がこれまで硝酸イオンの輸送や蓄積と全く関連付けられていない新規遺伝子であることも明らかにした。以上、*rnc2*は、植物の硝酸蓄積機構の解明へ向けた貴重な研究材料となることが明らかになり、この分野の研究の進展に本研究が貢献したことが示された。研究成果は、国内の関連学会において発表され、成果の主要部分は、国際誌であるSoil Science and Plant Nutrition誌に1報、筆頭著者論文として掲載された。

本研究の内容は、植物における硝酸蓄積機構の解明に寄与する基礎研究として高く評価でき、よって、論文審査委員会は、本論文が博士(学術)の学位論文として十分であると判定した。