

氏 名	さい じょう ゆう すけ 西 條 雄 介
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1123 号
学位授与の日付	平 成 12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	Studies on Physiological Functions of Stress-Inducible Calcium-Dependent Protein Kinases in Plants (植物におけるストレス誘導性カルシウム依存性プロテインキナーゼの生理機能に関する研究)

論文調査委員 (主 査)
教 授 泉 井 桂 教 授 古 澤 巖 教 授 遠 藤 隆

論 文 内 容 の 要 旨

植物は、低温・塩・乾燥ストレスを含む、さまざまな環境からの刺激に対して細胞内カルシウム濃度の変動を介して応答することが知られている。植物細胞のカルシウムシグナル系において重要な役割を担っていると推定されるのが、カルシウム依存性プロテインキナーゼ（以下、CDPK と略す）である。CDPK には多くの分子種が存在し、カルシウムと直接結合することにより活性化される植物に特有のキナーゼである。しかし、これまで特定の CDPK 分子種の生理機能が明らかになった例はない。本研究では、トウモロコシにおける CDPK の cDNA クローニングを出発点とし、その中でストレス誘導性の分子種に着目してイネからそのホモログ遺伝子 (*OsCDPK7*) を単離し、形質転換植物を用いた機能解析を行っている。同時にストレス耐性植物の分子育種を視野に入れて研究を展開している。主な研究成果は次の通りである。

1. トウモロコシにおける CDPK を介したシグナル伝達の全貌を明らかにすることを目的として、まず、アミノ酸配列の相同性に基づく PCR 法を利用して、2 種類の典型的な CDPK (*ZmCDPK9*・*ZmCDPK7*) に加えて、CDPK とは近縁であるものの C 末端側にカルシウム結合部位を持たない新規なキナーゼ (*ZmPK12*) の cDNA クローンを単離した。これらの遺伝子は全て根および黄化葉において緑葉より mRNA 発現レベルが高いことが分かった。また、典型的な CDPK については組換え体酵素を用いた解析により、カルシウム依存性のリン酸化活性を有することを示した。

2. *ZmCDPK7* は、*ZmCDPK1* とアミノ酸配列で 97% の同一性を示し、ともに、葉および根において低温およびタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドの投与によって mRNA レベルが上昇することが分かった。この CDPK 分子種は、データベース解析により、単子葉植物から双子葉植物まで存在することが示唆された。*ZmCDPK7* のホモログ遺伝子と推定される *OsCDPK7* をイネから単離したところ、イネには本遺伝子が単一コピー存在すること、また、その mRNA 発現が低温・塩ストレス誘導性およびアブシジン酸（以下、ABA と略す）非誘導性であることが分かった。さらに、抗 *OsCDPK7* 抗体を作製してウェスタン解析を行った結果、mRNA 発現が増大する低温・塩ストレス条件下においても本酵素のタンパク質量に有意な変化は検出できず、翻訳後の活性調節が重要であることが予想された。

3. ストレス応答における *OsCDPK7* の生理機能の解析を目的として、本酵素の発現量をさまざまなレベルに改変した形質転換植物（イネ）を作出した。形質転換後代の幼苗期におけるストレス耐性を評価したところ、*OsCDPK7* 過剰発現植物は顕著に低温・塩・乾燥ストレス耐性が増強されていた。一方、発現抑制植物はストレス耐性が野生型イネよりも低下していた。したがって、*OsCDPK7* はこれらのストレス耐性の獲得に促進的に機能することが分かり、植物体レベルで CDPK の特定の分子種の生理機能が初めて明らかになった。同時に過剰発現植物は通常の生育条件下における生長や稔性について異常が全く観察されず、ストレス耐性植物の分子育種という観点において本遺伝子の有用性が示された。

4. つづいて、イネにおける *OsCDPK7* を介したストレスシグナル系を解明する第一歩として、本酵素の発現量の改変に

よる既知のストレス応答性遺伝子の発現への影響を解析した。過剰発現植物では *rab16A* などについて塩・乾燥ストレスや ABA による誘導が著しく増強されていたが、発現抑制植物では低下していた。これらの遺伝子産物は非常に親水性の高いタンパク質で細胞内の保水や他のタンパク質の保護に役立つと推定されており、少なくともこれらの遺伝子の発現の増大を介して塩・乾燥ストレス耐性の獲得に至ると考えられた。一方、低温条件下や通常の生育条件下ではこれらの遺伝子の発現は過剰発現植物においても誘導されておらず、耐冷性は異なる経路で獲得されたこと並びにストレスの非存在下では OsCDPK 7 シグナル系は不活性状態であることが示唆された。以上の結果より、低温および塩・乾燥という異なるシグナル系が共通の構成因子として OsCDPK 7 を共有すること、及び OsCDPK 7 の過剰発現によるシグナルの増幅にもかかわらず経路の独立性を保つ分子機構の存在が示唆された。

論文審査の結果の要旨

植物のストレス応答機構について、これまで CDPK の関与が推定されてはきたものの、分子生物学的な証明はなされていなかった。本論文では、低温・塩ストレス誘導性の CDPK 分子種に着目し、形質転換植物を作出して、ストレス条件下におけるその分子種の機能解析を目的として研究を行っている。評価すべき主な研究成果は次の通りである。

1. 本研究では、まずトウモロコシにおける CDPK の cDNA クローニングを行い、典型的な CDPK 2 分子種に加えてカルシウム結合部位が全くない新規なキナーゼ 1 分子種を単離した。これは、多様な CDPR 分子種の存在を確認し、各分子種の機能分担の解明への出発点となる成果である。

2. それらの中で、mRNA 発現が低温誘導性である CDPK 分子種に着目し、イネの分子種 (OsCDPK 7) については様々なストレスに対する応答性も解析した。さらに、分子種特異的の抗体を作製して本酵素のタンパク質レベルが mRNA 誘導条件においても上昇しないことを見出した。このことは、mRNA 誘導条件下における本酵素の代謝回転の増大を示唆しており、今後検討すべき新たな課題を提起するものである。

3. 次に、イネにおいて *OsCDPK7* 遺伝子を過剰発現させることによって、低温・塩・乾燥ストレス耐性が付与された形質転換イネの作出に成功した。一方、本遺伝子の発現抑制によってストレス耐性が低下することも観察し、本酵素がイネにおいて上述のストレス耐性の獲得に促進的に機能することを明らかにした。この結果は、特定の CDPK 分子種の生理機能を世界で初めて植物体レベルで解明したものであり、分子生物学的に大きな意義をもつ。同時に、本 CDPK 分子種の発現強化によって植物のストレス耐性が増強できることを示し、農学的にも重要な知見である。

4. さらに、形質転換植物において *OsCDPK 7* の発現量といくつかのイネのストレス応答性遺伝子の誘導レベルとの相関性を解析した。その結果、低温耐性と塩・乾燥ストレス耐性に至るシグナル経路は、共通の構成因子、として *OsCDPK 7* を介するものの、経路の下流においては互いに異なっていることが示唆された。これは、CDPK を介したストレス応答シグナル伝達の分子機構に関して新たな視点を提示するものである。

以上のように、本論文は植物の CDPK を介したストレス適応機構を分子生物学的に探求したものであり、植物生理学・植物分子育種学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 12 年 2 月 17 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。