

学位論文の要旨	
氏名	蘭 正人
学位論文題目	ダイズの植物ヘモグロビン遺伝子群の非生物ストレス条件下での発現に関する研究
<p>多くの植物は、非生物ストレスに応答して過剰に一酸化窒素（NO）を生産することがある。NOは、植物の生長におけるシグナル分子としてのさまざまな役割を担っている。特に、根では、NOが生長の抑制に働くことが知られている。加えて、NOは、細胞内でタンパク質のニトロ化やニトロシル化などの修飾にも関与している。そのため、過剰なNOは、植物の根の生長を強く阻害するなど、植物の生長に大きな影響を及ぼす。非生物ストレスに対する耐性の獲得には、NOの生産あるいはNOの量を制御する必要がある。NO制御への関与が報告されている植物分子として、植物ヘモグロビン（GLB）が知られている。ダイズのゲノムには、GLBをコードする遺伝子が、少なくとも8遺伝子同定されている。本研究では、これらすべてのダイズGLB 遺伝子のNO、及び、非生物ストレスに対する応答性を明らかにし、NO制御に関与するGLB 遺伝子の同定を試みた。</p> <p>第1章は序章である。農作物としてのダイズの生産状況、植物における非生物ストレスとNOの関係、GLBによるNO制御、ダイズのGLBとその他の植物のGLBとの進化系統関係などについて、これまでに報告されている知見を整理し、本研究の意義を述べた。</p> <p>第2章は、本研究に用いたダイズ<i>Glycine max</i> cv. Fukuyutaka の非生物ストレスに対する応答の特徴を明らかにした。非生物ストレスとして冠水に着目し、冠水条件下での根と葉の生重量、及び、根でのNO量の変化について検討した。ダイズの根を冠水条件下で10日間栽培すると、根の生重量は減少した。冠水条件下で3、6、24時間後の根組織におけるNO量の変化を観察すると、冠水6、24時間でNO量は上昇した。これらの結果と他の植物種の知見とを考えあわせ、冠水条件下で、NOがどのように根の生長を抑制するのかについて議論した。</p> <p>第3章は、ダイズのGLB 遺伝子の発現について、NO応答性を検討し、GLBの機能について議論した。2種類のNO供与剤を用いて、GLB 遺伝子の発現を調べた。いずれのNO供与剤に対しても<i>GmGLB1</i>、<i>GmGLB1-like</i>が応答した。また、NO供与剤とNO除去剤で共処理すると、これらの発現はNO供与剤単独処理と比べて低くなった。これらのことから、<i>GmGLB1</i>、<i>GmGLB1-like</i>がNO応答性のGLB遺伝子であり、NO調節に機能している可能性があると結論付けた。</p>	

第4章は、ダイズ*GLB* 遺伝子の非生物ストレス応答性と組織特異的発現について明らかにし、非生物ストレス条件下での*GLB* 遺伝子の誘導経路について議論した。NOの上昇がみられない非生物ストレスとして、新たに塩を選択した。根を24時間、冠水または塩処理し、各*GLB* 遺伝子の発現を定量した。*GmGLB1*は、冠水によって強く誘導された。*GmGLB1*がNO応答性であったことを考慮すると、*GmGLB1*は、冠水に反応して生産されたNOによって誘導され、NOを制御するのだろうと考えられる。また、*GmGLB1*はNO供与剤によって直接誘導されたことから、冠水のみならず、NOが上昇する非生物ストレス条件下で、NO調節の機能を担っているものと考えられる。根、葉、根粒での*GLB* 遺伝子の発現を検討したところ、*GmGLB1*が植物体全体で不偏的に発現しており、様々な組織でNO調節を行っている可能性がある。*GmGLB1*と同じく、*GmGLB1-like* もNO応答性が示されたが、NO供与剤や冠水による発現の誘導は*GmGLB1*ほど高くはなかったことから、根でのNO調節で中心的な役割を担っているかどうかは不明である。むしろ、その発現は葉に偏っており、*GmGLB1-like*は、葉でのNO調節に大きな役割を持つのではないかということが示唆される。冠水は、NO非応答性遺伝子*GmGLB3*の発現を誘導した。この結果は、冠水条件下での*GLB* 遺伝子の発現の誘導には、NO以外の要因も関与していることを示唆している。塩はダイズの根組織でのNO生産を誘導しなかったが、すべての*GLB*遺伝子もまた応答しなかった。ダイズの塩に対するストレス応答には、*GLB*は関与しないのだろうと推測した。*GmGLB2*の発現はすべての実験を通して、根では発現がみられず、根粒でのみ発現していた。*GmGLB2* は、根粒内の根粒菌のニトロゲナーゼ活性を維持するために酸素分圧を調節しているレグヘモグロビンの遺伝子である。*GmGLB3*は主に根粒で発現していたことから、レグヘモグロビンのように根粒の維持に関与している可能性があるが、本研究では、*GmGLB3*がどのような機能を持つかを明らかにすることはできなかった。

第5章は、総括である。ダイズの*GLB* 遺伝子のNO応答性、非生物ストレス応答性を解析した結果から、8遺伝子のうち*GLB1* 遺伝子がNOを介して非生物ストレスに反応して発現が誘導されることを明らかにし、特に*GmGLB1*がダイズにおけるNOの制御で中心的な役割を担っていると考察した。モデルマメ科植物の知見と合わせ、*GmGLB1*と*GmGLB1-like* は、非生物ストレス耐性獲得はもちろんのこと、根粒菌とダイズの共生窒素固定系の機能向上にも応用可能であることに言及し、総括とした。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Fundamental studies on gene expression of plant hemoglobins of *Glycine max* under abiotic stresses

Name: ARARAGI Masato

This thesis comprises five chapters. Plant hemoglobin (GLB) is one of the plant molecules that is involved in nitric oxide (NO) regulation. Eight genes encoding GLB have been identified on the genome of soybean, *Glycine max*. In this thesis, expression of the *GLB* genes was characterized under flooding and salt stress, and *GmGLB1* and *GmGLB1-like* were identified as the gene responsible for NO regulation under stress condition.

Chapter 1 is general introduction. The relations between abiotic stresses and NO, control of NO by plant GLBs and phylogeny of plant GLBs are summarized.

Chapter 2 characterizes the growth of *Glycine max* cv. Fukuyutaka, a soybean cultivar used in this study, under flooding. Fresh weight of the plants and relative concentration of NO in the roots were measured. Flooding reduced fresh weight of the roots and increased the amount of NO in the root tissue. Based on these results, the function of NO and the mechanism of the inhibition of the root growth were discussed.

In Chapter 3, expression of the eight *GLB* genes is analyzed and the function of GLBs is discussed. *GmGLB1* and *GmGLB1-like* responded to NO donors. The induction of *GmGLB1* and *GmGLB1-like* was diminished by the NO donor co-treated with its scavenger, suggesting that *GmGLB1* and *GmGLB1-like* were NO-responsive and regulated NO in soybean.

In Chapter 4, the expression of soybean *GLB* genes is investigated under flooding and salt stress, which did not lead plant NO-generation different from flooding. In the roots exposed to these stresses, no *GLB* gene responded to NaCl, but all *GLB1* and *GLB3* genes responded to flooding. Notably, *GmGLB1*, which was NO-responsive and ubiquitously expressed in the plant, also highly responded to flooding. Thus, *GmGLB1* might be induced by abiotic stress like flooding via NO and regulate NO in various tissues. Whereas the expression of *GmGLB1-like*, which belongs to GLB1 clade with *GmGLB1*, was NO-responsive, its expression was not so strongly induced as that of *GmGLB1* and was restricted to the leaves, suggesting that *GmGLB1-like* mainly functions in leaves rather than in roots. The flooding also induced the expression of *GmGLB3* which was not NO-responsive, suggesting that flooding induces *GLB* genes not only NO dependently but also NO independently. The expression of *GmGLB2* which encodes leghemoglobin regulating oxygen partial pressure for the nitrogenase activity of the symbionts was strictly restricted to the root nodules, and *GmGLB3* which were highly expressed in the nodules, may also function for maintaining nodules like leghemoglobin.

Chapter 5 is a summary. Among the eight *GLB* genes in soybean, *GmGLB1* and *GmGLB1-like* were induced by NO and might be responsible for NO regulation in soybean. This thesis proposed that *GmGLB1* and *GmGLB1-like* could be used to improve the symbiotic ability of soybean.