

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 NEANG Sarin

論文題目

Physiological and molecular mechanisms of salt removal by leaf sheath  
in rice

(イネの葉鞘における塩排除の生理・分子機構)

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学講師	三屋史朗
委員	名古屋大学教授	山内章
委員	名古屋大学教授	谷口光隆
委員	名古屋大学准教授	榎原大悟
委員	名古屋大学助教	仲田麻奈

## 論文審査の結果の要旨

土壌中の塩類集積によって起こる塩害は特に沿岸部やデルタ地域で多く見られ、農業生産性を減ずる問題となっている。沿岸部やデルタ地域では稲作が盛んに行われるが、特にイネは塩害に感受性が高く、およそ 30 mM に相当する塩化ナトリウムでその生育は著しく抑制される。塩害によるイネの生育阻害は、光合成器官である葉身にナトリウムや塩化物イオンなどの塩が過剰に蓄積することで引き起こされる。そのため、葉身に塩を移行させない塩排除能がイネの耐塩性には重要である。イネにおいて葉身に塩を移行させないために、葉鞘において塩を導管流から排除し、その塩をおそらく液胞に移行させる、葉鞘の塩排除能が知られていた。NEANG Sarin 氏はこの葉鞘の塩排除能に注目し、はじめに、イネの葉鞘がどのように高濃度の塩の蓄積を可能にするのか、葉鞘内での塩の動態を調べて蓄積に重要な役割を果たす組織を同定した。次に、葉鞘の塩蓄積に関わる部位、組織において塩輸送関連遺伝子の発現様式を調べた。さらにゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって、イネの葉鞘における塩排除能の品種間差に関連する一塩基多型 (SNP) の同定を行った。

はじめに、イネの葉鞘内での塩の動態を耐塩性イネ品種 FL478 と塩感受性品種 IR29 を用いて調べた。水耕栽培したイネ幼植物に塩を処理すると、ナトリウム (Na) と塩化物 (Cl) イオンのいずれも下位葉で多く、どの葉位でも葉鞘の方が葉身よりも Na と Cl 濃度が高かった。また一枚の葉の中では、Na は葉鞘の基部で最も多く、葉鞘の中央部、先端部、葉身と向かうに伴い Na 濃度は減少した。一方 Cl は、葉鞘のいずれの部位にも高濃度蓄積されたが、比較的中央部と先端部に多かった。このことは葉鞘は Na と Cl いずれのイオンも導管流から排除して蓄積するが、排除活性は葉鞘の部位によって異なることを示した。さらに、Na と Cl イオンの葉鞘組織内分布を調べるため、生の試料を用いた元素分析が可能な、エネルギー分散型 X 線分析装置を搭載した走査型電子顕微鏡を用いた。その結果、イネの葉鞘では Na と Cl ともに、維管束組織には蓄積せず、主に葉鞘中央部に位置する基本柔組織に高濃度蓄積することが分かった。葉鞘の基部では基本柔組織は周縁部にも存在して Na と Cl の蓄積も見られたが、葉鞘中央部と先端部では周縁部にはあまり基本柔組織が発達せず、Na と Cl は中央部の発達した基本柔組織で強く検出された。これらのことより、Na と Cl イオンは葉鞘の維管束において導管流から取り込まれた後維管束組織にはとどまらず、特に中央部の基本柔組織に輸送されて、蓄積することが明らかになった。またカリウム (K) イオンも同様に中央部基本柔組織に高濃度蓄積することが明らかになり、中央部基本柔組織が過剰なイオンを高濃度蓄積して、葉身への過剰なイオン流入を防ぐという生理機能を有することを提唱した。

続けて Neang 氏は、この葉鞘内での塩排除能の部位特異性、さらに葉鞘内組織にも周縁部と中央部で塩分布に偏りがあることに注目し、葉鞘の部位・組織特異的な塩 (Na または Cl) 輸送体遺伝子の発現解析を行った。耐塩性イネ品種 FL478 の第 5

葉を用いて、塩処理後の発現量を解析した。葉軸に沿った組織での発現量解析では、まず Na 輸送体遺伝子に関して、葉鞘の基部で特に *OsHKT1;1*、*OsHKT1;5*、*OsNHX2*、*OsNHX3* と *OsNHX5* 遺伝子が塩処理によってその発現量が増加した。さらに *OsHKT1;5* は維管束組織を含む周縁部において中央部よりも発現量が高く、同遺伝子が維管束組織でおそらく導管流からの Na の排除に関わることを示唆した。さらに *OsNHX3* と *OsNHX5* は細胞内での液胞への Na 隔離に関わるが、特に *OsNHX3* が中央部で働くことが示唆された。一方、Cl 輸送体遺伝子に関して、*OsNPF2;4*、*OsCLC1*、*OsCLC2*、*OsSLAH1* と *OsSLAH2* 遺伝子が葉鞘中央部や先端部で塩処理によって発現量が増加し、塩存在下での Cl 排除への関わりが示唆された。特に *OsNPF2;4* と *OsCLC2* が中央部に多く発現し、中央部基本柔組織でのこれらの遺伝子の関与が示唆された。

次に、イネの葉鞘における塩排除能の品種間差を利用して、この品種間差に関連する GWAS を行った。本実験は国際イネ研究所で行い、indica、aus、tropical japonica、temperate japonica、aromatic が含まれる 296 のイネ系統を用いて、約 44000 の SNP 情報を用いた。葉鞘での Na 排除能に関する SNP は 11 個、Cl 排除能に関する SNP は 214 個検出された。特に *P* 値の低い SNP に注目したところ、この SNP 領域に存在する遺伝子はそれぞれ 25 個、211 個あった。さらに遺伝子オントロジー解析および RNA-seq 解析により、これらの遺伝子のうち、葉鞘で塩により発現量が増加し、Na または Cl 輸送に直接関係する Na または Cl 輸送体遺伝子、または間接的に関係する転写因子遺伝子を見出した。これらの結果は、葉鞘の塩排除能に関連する DNA マーカーを利用したイネの耐塩性向上のための育種の可能性を示し、さらに葉鞘の塩排除能を制御する遺伝子を示唆した。今後はこれらの遺伝子の関与をさらに調べる必要がある。

以上の結果より、NEANG 氏は、塩存在下でイネが Na と Cl を葉鞘で蒸散流から排除し、基本柔組織へ移行させて高濃度蓄積することによって、葉身への塩の移行を減少させて光合成を維持する機構を持つことを示した。GWAS より得られた結果は、イネの品種には大きな葉鞘の塩排除能の違いがあり、関連する SNP を利用すれば Na については最大 15-25 分の 1 に葉身の濃度を減少させる可能性があることを示した。Cl は、葉鞘における排除能に大きな品種間差が見られなかったが、最大で 3 分の 1 に葉身の濃度を減少することができると考えられた。

NEANG Sarin氏による博士論文は、イネの耐塩性機構に関する分子生理学分野、さらにイネの耐塩性向上を目指す遺伝学分野において非常に新規性が高く、高度の学術的価値を有しており、これらの学術分野のさらなる発展に大きく貢献するものである。以上の理由により、本論文の内容が博士（農学）の博士論文として十分価値のあるものと認め論文審査に合格と判定した。