

## 論文内容の要旨

論文題目 Isolation and characterization of *Arabidopsis* mutants that exhibit abnormal leaf senescence phenotypes  
(緑葉の老化に関与するシロイヌナズナ変異体の解析)

氏名 吉田 聡子

### <序論>

高等植物の葉は、加齢に伴って次第に黄色化し、やがて枯死にいたる。この現象は葉の老化と呼ばれる。老化の過程では、細胞内構成成分の分解がおり、分解産物の多くは若い器官などへ転流され、新たな生長のために利用される。老化の進行に伴って、いくつもの遺伝子が新たに発現することが知られており、老化は死に向かう消極的な過程というよりはむしろ、植物体の生存を有利にするための積極的な過程であると考えられる。老化は遺伝的にプログラムされていると考えられ、変異体の研究が古くからおこなわれてきたが、その内容は生理学的な解析に留まっている。一方、最近では、老化過程での遺伝子発現に関する分子レベルの知見が蓄積してきたが、老化の制御に関与する遺伝子の知見はほとんど得られていない。本研究では、老化プログラムの機構を明らかにするために、分子生物学的研究および分子遺伝学的研究の双方向からのアプローチを試みた。まず、老化に伴って発現が上昇する遺伝子 *yellow-leaf specific gene 1-9 (YLS1-YLS9)* の cDNA の単離と転写産物レベルの解析をおこなうことにより、老化の分子マーカーとしての有用性を開拓した。次に、老化が早くなる変異体 *hypersenescence1(hys1)* の解析と、変異の原因遺伝子の同定をおこない、老化の進行に関与する遺伝子の単離に成功した。また、老化が遅くなる変異体 *delayed leaf senescence 1 (dls1)* を単離し、その変異遺伝子が、N 末則タンパク質分解系に関与する一遺伝子であることを明らかにした。

### <結果と考察>

#### I. 葉の老化に伴って発現が上昇する遺伝子の解析

緑葉の老化にともなって発現する遺伝子 *YLS1-YLS9* の全長 cDNA を単離し、その塩基配列のホモロジーサーチから *YLS* 遺伝子の機能を推定した。*YLS* 遺伝子の葉の老化過程、および植物体の各器官での転写産物の蓄積量を解析し、老化の分子マーカーとしての特徴付けをおこなった。このうち、*YLS4*、*YLS6* および *YLS9* は老化後期の葉に顕著な蓄積を示し、以下の老化変異体の解析では分子マーカーとして有用であった。

#### II. 葉の老化が早くなる変異体 *hypersenescence1 (HYS1)* の解析

修士課程において単離していた老化が早まる変異体 2 系統は、遺伝学的な解析の結果、アレリックな変異であることが明らかになった (*hypersenescence1-1 (hys1-1)* および *hypersenescence1-2 (hys1-2)*) と命名、図 1)。*hys1* では、クロロフィル量、光化学系 II の量子収率を表す *Fv/Fm* 値、および可溶性タンパク質量のいずれもが、自然老化に伴い野生株よりも速やかに減少していた。また、上記の老化のマーカー遺伝子は、いずれも野生株に比べて早い時期に転写産物の蓄積がみ

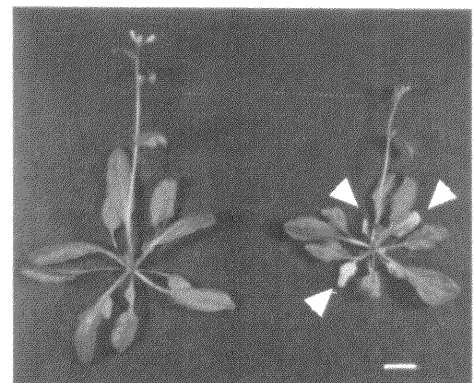


図1 *hys1*変異体の表現型。  
明暗周期下で生育させた発芽後36日目の野生株(左)および*hys1-1*(右)。*hys1-1*では下位葉に黄色化が見られる。白矢頭で黄色化している葉を示した。バーは1 cmを示す。

られた(図 2). 以上の結果は, *hys1* が生理学的にも分子レベルでも老化の早まる変異体であることを示唆している.

また, *hys1* は様々な濃度の糖を含む培地上で生育させた際に, 野生株よりも低濃度の糖により胚軸の伸長が阻害されることから, 外部から与えられた糖に対して高感受性を示すことが明らかになった(図 3). また, 糖を含む培地上で生育させた *hys1* の芽生えでは, 光合成関連遺伝子の転写産物レベルが野生株に比べて著しく減少していた. 糖による胚軸の伸長阻害と光合成関連遺伝子の転写産物レベルの抑制はいずれも糖センサーとして知られているヘキソキナーゼによって制御されていることが知られていることから, *hys1* はヘキソキナーゼのシグナル伝達に関与する変異体であることが示唆された.

Map-based cloning 法を用いて *hys1* 変異体の原因遺伝子 *HYS1* の同定をおこなった. *HYS1* は既知の遺伝子配列とは全く相同性をもたない新規遺伝子産物 (564 アミノ酸残基) をコードしていた(図 4). *hys1-1* では, そのうち 473 番目のトリプトファンが終始コドンに, *hys1-2* では 535 番目のプロリンがセリンに置換する変異が生じていた. *HYS1* のアミノ基末端(N 末端)側には核移行シグナルが, またカルボキシル基末端(C 末端)側には疎水性アミノ酸のクラスターからなる 5 つの膜貫通領域が予想された(図 4B). *hys1-1* および *hys1-2* 変異はいずれも C 末端側に生じていたため, 予想された膜貫通領域は *HYS1* の機能において重要な役割を果たしていると考えられる. *HYS1* 遺伝子の転写産物は, 葉の発達や老化の時期, 植物体の器官によらず恒常的に蓄積しており, *HYS1* が恒常的な機能を担っていることが示唆された.

*HYS1* の具体的な機能については現時点ではまだ明らかではない. しかし, 最近, ヘキソキナーゼの過剰発現体が老化が早まる表現型を示すという報告がなされるなど, 糖シグナルと老化の関係が示唆されている. *hys1* が糖シグナルと老化に関わる変異体であり, また, 遺伝子構造から核に局在することが予想されることから, *HYS1* はヘキソキナーゼ下流のシグナル伝達に関与する老化の抑制因子である可能性が高いと考えている.

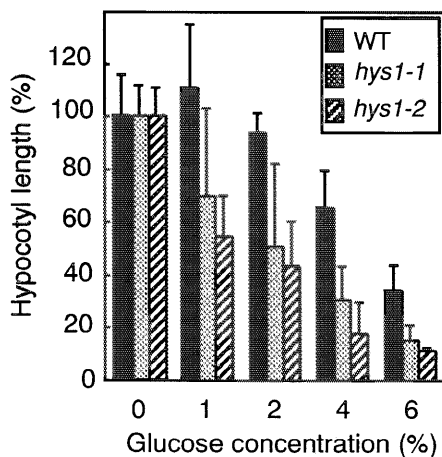


図 3 *hys1* のグルコース感受性. 様々な濃度のグルコースを含む培地上で野生株および *hys1* を 6 日間暗所で生育させ, 12 時間光を照射した後に, 胚軸の長さを測定した. *hys1* では野生株に比べて低濃度のグルコースにより胚軸の伸長抑制が観察された.

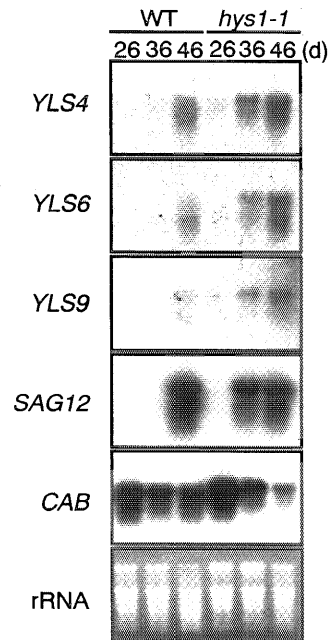


図 2 *hys1* における老化遺伝子の転写産物の蓄積. 発芽後 26 日, 36 日および 46 日目の野生株(WT)および *hys1-1* から, 第 5, 6 葉を材料に RNA ゲルブロット解析をおこなった. 老化時に転写産物の蓄積レベルが上昇する遺伝子 (YLS4, YLS6, YLS9 および SAG12) および, 減少する遺伝子 (CAB) をプローブに用いた.

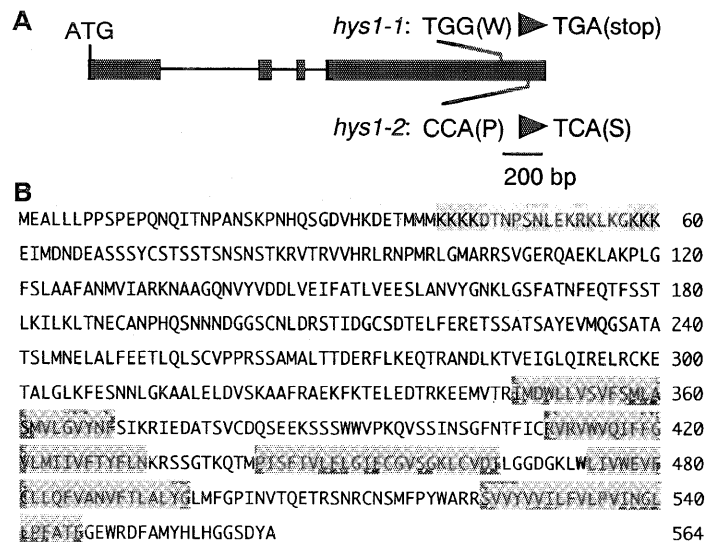


図 4 *HYS1* 遺伝子の一次構造. (A) *HYS1* 遺伝子のエキソンイントロン構造. 黒い四角がエキソン領域を示す. *hys1-1* および *hys1-2* の変異箇所を記した. (B) *HYS1* の予想されるアミノ酸配列. 予想された核移行シグナル, 膜貫通領域をそれぞれ黄色い網かけ, 水色の網かけで示した. 赤文字は変異の起こったアミノ酸を示す.

### III. 老化が遅れる変異体 *dls1* の単離と解析

老化の進行に変化が生じる新たな変異体の選抜を目的として、1,600 ラインの T-DNA タグラインの種子を、暗所下における子葉の黄色化を指標にスクリーニングした。その結果、黄色化が遅くなる変異体を一系統単離し、*delayed leaf senescence 1 (dls1)* と命名した。遺伝学的な解析の結果、*dls1* は一遺伝子座における劣性変異であった。*dls1* は暗処理によって誘導される老化および自然老化の進行が野生株よりも遅いことが分かった(図 5)。

F2 世代の解析から、*dls1* 表現型と T-DNA 挿入とのリンクが示唆されたため、プラスミドレスキュー法を用いて挿入 T-DNA 配列の近隣のゲノム配列を単離し、その塩基配列を決定した。*dls1* では、第 5 染色体上に位置するアルギニル tRNA:プロテイン アルギニルトランスフェラーゼ (以下、アルギニルトランスフェラーゼと呼ぶ) をコードする *AtATE1* 遺伝子の第 4 イントロンに T-DNA 挿入が生じていた(図 6A)。*dls1* における *AtATE1* の転写産物の蓄積を RT-PCR 法を用いて調べたところ、正常な *AtATE1* 転写産物の蓄積は見られなかった(図 6B)。さらに、*AtATE1* を完全に含む野生株のゲノム領域を *dls1* に遺伝子導入すると、T2 世代の形質転換体において、老化が遅れる表現型が相補された。以上の結果は、*dls1* の表現型が *AtATE1* の欠損に由来することを示している。

アルギニルトランスフェラーゼは、酵母、哺乳類などでは N 末則と呼ばれるタンパク質分解系に参与していることが明らかになっている。N 末則とは、タンパク質のアミノ基末端にあるアミノ酸残基の性質によってそのタンパク質の分解速度が決まるという説である。酵母細胞内では、アスパラギン酸、グルタミン酸を N 末端に持つタンパク質は、アルギニルトランスフェラーゼによってアルギニン残基が N 末端に付加される。N 末端のアルギニン残基は不安定残基として認識され、アルギニンを付加されたタンパク質はユビキチン/プロテアソーム系によって速やかに分解される(図 7)。しかし、植物における N 末則については、その存在のみが示唆されているだけで、ほとんど研究はなされていない。そこで私は、トランジェントアッセイ系を用いて *dls1* における N 末則によるタンパク質分解系の活性を調べた。ユビキチンの下流に任意のアミノ酸 X を N 末端に持つシフェラーゼを融合したタンパク質 (Ub-X-LUC) をコードするキメラ遺伝子を、シロイヌナズナ葉肉細胞プロトプラスト内で発現させた。Ub-X-LUC は、プロトプラスト内では、ユビキチン特異的プロテアーゼによってユビキチンの C 末端側で切断をうけ、X-LUC タンパク質を生じる。X-LUC はその後 X 依存的に分解されると考えられる。同じプラスミド内にβ-グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を組み込み、LUC 活性を GUS 活性で基準化することにより、LUC タンパク質の安定性を検定した (図 8)。その結果、N 末端にアスパラギン酸、グルタミン酸を持つ LUC タンパク質 (D-LUC, E-LUC) は、メチオニンを持つ LUC タンパク質 (M-LUC) に比べて、野生株および *dls1* 株に野生型 *AtATE1* を導入した形質転換体 (*dls1/ATE1g-1*) では低い LUC 活性を示すが、*dls1* では高い活性を示した(図

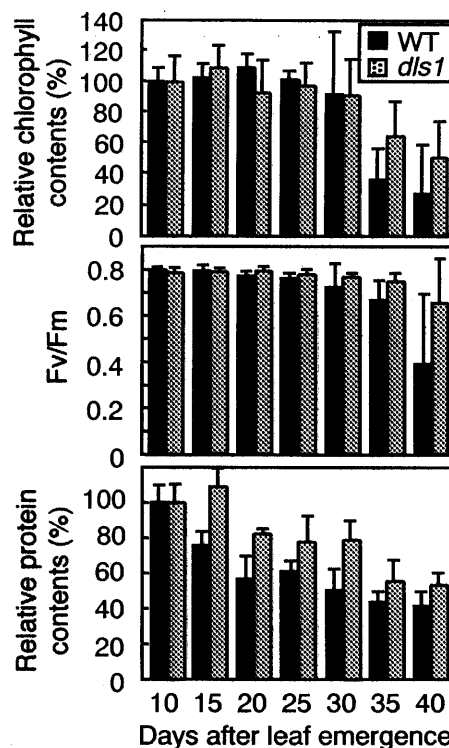


図5 *dls1*における葉の老化の指標の経時変化。第5葉を材料に葉が出現してからの日数をおって、葉面積あたりのクロロフィル量 (上段)、Fv/Fm値 (中段) および葉一枚当たりの可溶性タンパク質量 (下段) を測定した。*dls1*では野生株に比べて老化の進行が遅くなっている。

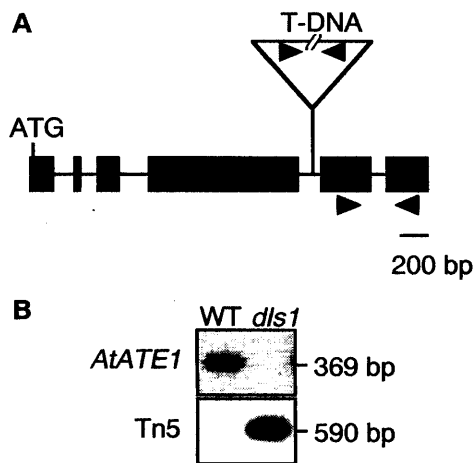


図6 アルギニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 *AtATE1* の遺伝子構造と転写産物の蓄積。

(A) *AtATE1* のエキソンイントロン構造と T-DNA 挿入位置。黒い四角がエキソンを示す。赤い矢頭は RT-PCR (B) に用いた *AtATE1* プライマーを、青い矢頭は Tn5 プライマーを示す。

(B) *dls1* における *AtATE1* 転写産物の蓄積。*AtATE1* および Tn5 プライマーを用いて、成熟ロゼット葉から単離した RNA より RT-PCR をおこなった。PCR 産物は DNA ゲルブロット法を用いて検出した。Tn5 は T-DNA 上に組み込まれているカナマイシン耐性遺伝子である。

8). この結果は、野生株および *dls1/ATE1g-1* では、D-LUC, E-LUC は M-LUC に比べて不安定なタンパク質であるが、*dls1* では、D-LUC, E-LUC の分解が速やかにおこなわれなくなっていることを示している。以上の結果から、植物細胞内でもアルギニルトランスフェラーゼが N 末則によるタンパク質分解系に関与していること、さらに、その分解系の異常によって *dls1* では老化が遅れる表現型を示すことが明らかになった。老化の進行の過程で N 末則によるタンパク質分解系がはたらき、何らかの老化の進行を制御する因子の分解に関わっていることは、老化分子機構研究における新規な知見であるばかりか、植物における N 末則タンパク質分解系の生理的役割を明確にした初めての例である。

<まとめ>

- 1) 老化にともなって発現が上昇する *YLS* 遺伝子の全長 cDNA 塩基配列を決定し、転写産物の蓄積パターンから、新たな老化の分子マーカーの有用性を開拓した。
- 2) 老化が早くなる変異体 *hypersenescence1 (hys1)* は糖に対して高感受性を示すことを明らかにし、*HYS1* がヘキソキナーゼを介した糖シグナルに関与する老化抑制因子である可能性を示した。
- 3) *hys1* 変異の原因遺伝子を同定した。野生型 *HYS1* 遺伝子は核局在シグナルと膜貫通領域を持つと予想される新規タンパク質をコードしていた。また、C 末端側に重要なドメインがあることが示唆された。
- 4) 老化が遅くなる新規変異体 *delayed leaf senescence 1 (dls1)* を T-DNA タグラインから単離した。*dls1* は自然老化、暗処理による老化の進行が野生株に比べて遅く進行する変異体であることが明らかになった。
- 5) *dls1* の原因遺伝子はアルギニルトランスフェラーゼをコードする *AtATE1* であることを証明した。トランジェントアッセイの結果から、アルギニルトランスフェラーゼは酵母やほ乳類と同様に植物細胞内においても N 末則によるタンパク質分解系に関与していることが示唆された。また、老化の進行を制御するような因子の分解が、この系を通しておこなわれていることが推察された。

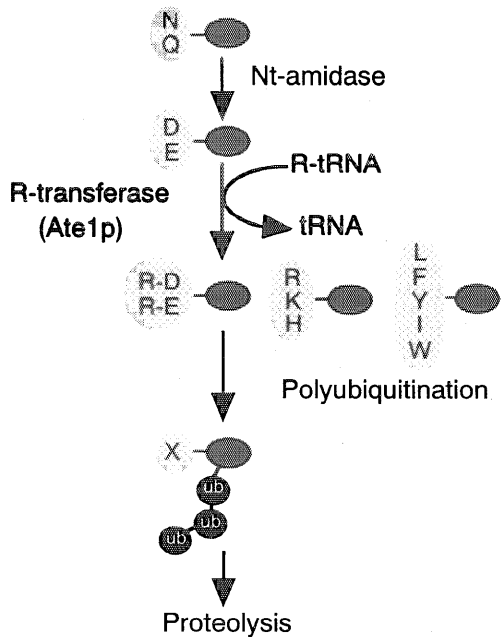


図7 酵母におけるN末則によるタンパク質分解経路。グルタミン酸、アスパラギン酸をN末に持つタンパク質は比較的安定であるが、アルギニルトランスフェラーゼによってN末にアルギニンを付加されることにより、他の不安定残基をN末にもつタンパク質と同様にユビキチン/プロテアソーム系によって分解される。●はタンパク質を、ubはユビキチンを示す。(Varshavsky 1997より改変)

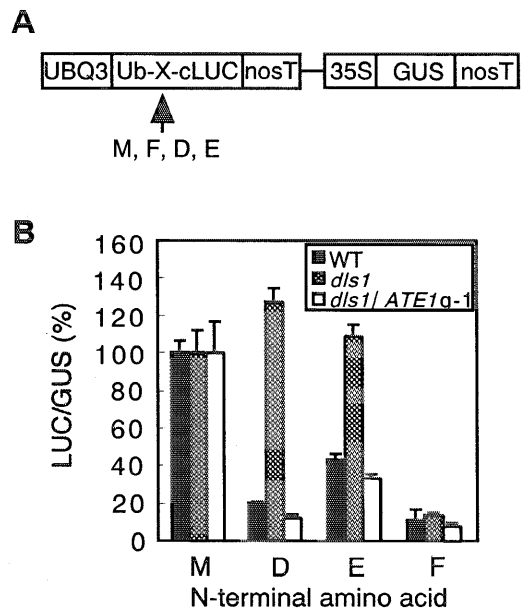


図8 トランジェントアッセイ系を用いたN末則の検定。(A) トランジェントアッセイに利用したコンストラクトの模式図。Xの位置にメチオニン(M)、フェニルアラニン(F)、アスパラギン酸(D)およびグルタミン酸(E)を導入した。M, Fは、それぞれ安定アミノ酸残基、不安定アミノ酸残基のコントロールとして用いた。(B) トランジェントアッセイの結果。黒い棒が野生株を、灰色の棒が*dls1*を、白い棒が野生型*ATE1*遺伝子を導入した*dls1*株(*dls1/ATE1g-1*)を示す。LUC活性はGUS活性で基準化したものをM-LUCに対する相対値で示している。