

論文内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 10 年度博士課程進学

氏名 青野 俊裕

指導教官 小柳津 広志

論文題目 セスバニアのリン酸欠乏応答に関する研究

セスバニア (*Sesbania rostrata*) は西アフリカ原産のマメ科植物であり、*Azorhizobium caulinodans* ORS571 が感染することによって、根粒のみならず茎粒も形成する。セスバニアの生長は非常に早く、多大なバイオマスを生み出す。また、リン酸肥料の代わりに廉価なリン灰岩を投与しても正常に生長するため、熱帯地方では優れた緑肥植物として用いられている。マメ科植物は非常に多くのリン酸を要求し、リン酸の供給を絶たれると窒素固定活性が著しく低下するため、リン酸は窒素固定の最も重要な限定要因の一つであると考えられている。

土壌中に存在するリンの 10~80% は有機態リンであり、残りの無機態リンも、リン酸イオンと Fe、Al、Ca 原子との非常に強い親和性のため、ほとんどがこれらの原子と強く結合した難溶性リン酸化合物として土壌に固定されている。このため、植物の利用できる土壌中水溶性無機リン酸濃度はきわめて低い。植物は一度根付いた場所から移動することができないので、環境中の栄養条件の変動に対して敏感に適応する能力を発達させてきたと考えられる。リン酸に関しても、土壌への固定や植物自体による吸収のために環境中リン酸濃度が低下した場合、植物は様々な反応を示し、致命的なリン酸欠乏を回避している。植物のリン酸獲得戦略の一部として、リン酸吸収能の促進、根からの有機酸、プロトン分泌などがよく知られている。根から分泌された有機酸とプロトンは難溶性リン酸化合物を溶解する働きがある。

本研究は、セスバニアのリン酸欠乏に対する応答を、リン酸吸収促進、有機酸及びプロトンの放出を中心に、生理学的ならびに分子生物学的に解析したものである。

1. リン酸欠乏がセสบニアの生長に及ぼす影響

発芽後 6 日目及び 15 日目の植物体を様々なリン酸濃度の水耕液 (1mM, 50 μ M, 30 μ M, 0 μ M Pi 水耕液、及び 0 μ M Pi 水耕液に $\text{FePO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ を懸濁した水耕液) に移したところ、0 μ M Pi 条件下では生長が抑制されたが、他の条件下では抑制されなかった。また、体内リン酸濃度を測定したところ、発芽後 6 日目の植物体の場合、根、茎、葉でのリン酸濃度は 0 μ M Pi, 30 μ M Pi, FePO_4 条件下では、3 日以内に約半分まで低下した。一方、発芽後 15 日目の植物体の場合、30 μ M Pi 条件下ではわずかにしか低下しなかった。茎頂部のリン酸濃度は 0 μ M Pi 条件下でのみ低下した。これらのことから、セสบニアは体内リン酸濃度の低下に対して強い耐性を持ち、茎頂部のリン酸濃度が低下しない限り生長しうることが示唆された。また、30 μ M Pi 条件下での体内リン酸濃度の測定結果から、リン酸吸収能もしくはリン酸消費量が植物体の生育段階によって異なることが示唆された。

2. リン酸欠乏によるリン酸吸収機構、有機酸分泌機構の促進

植物のリン酸吸収は二つの吸収システムから成り立っている。一つは K_m 値が十数 μ M 以下の高親和性吸収機構であり、もう一つは K_m 値が数百 μ M の低親和性吸収機構である。リン酸濃度の低い土壌からのリン酸吸収には高親和性吸収機構が主に働いており、リン酸欠乏条件下ではこの機構が促進されると考えられている。セสบニアの初期リン酸吸収速度を測定したところ、高親和性吸収機構の K_m 値は約 7 μ M であった。一方、低親和性吸収機構の K_m 値は約 20-30 μ M と、これまで調べられている他の植物に比べて、かなり低いことがわかった。この結果から、セสบニアは低親和性吸収機構によっても低濃度のリン酸を吸収できるのではないかと考えられる。この低親和性吸収機構によるリン酸吸収速度は、発芽後 6 日目の植物体より発芽後 15 日目の植物体の方が高いこともわかった。このことが 30 μ M Pi 条件下での体内リン酸濃度の生育段階による差の原因ではないかと考えられる。セสบニアを 0 μ M Pi 条件下に移すと高親和性吸収機構によるリン酸吸収速度は 2 日以内に促進された。

リン酸欠乏条件下では、根におけるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)の活性が促進され、それに伴い根から多量の有機酸が分泌されることが多くの植物で知られている。セสบニアの場合、0 μ M Pi 条件下に移されるとリンゴ酸の分泌と根における PEPC 活性が 2 日以内に促進されることがわかった。

発芽後 6 日目の植物体を 30 μ M 以下のリン酸を含む水耕液に移した場合、根におけるリン酸吸収速度と PEPC 活性は促進されたが、発芽後 15 日目の植物体の場合は 30 μ M Pi 条件下では促進されなかった。この結果から、セสบニアは体内リン酸濃度の低下に対してリン酸欠乏応答するのであって、環境中リン酸濃度に対してではないことが示唆された。

セสบニアに多数の莖粒を形成させると、体内リン酸濃度が低下することがわかった。これ

は窒素固定のために多量のリン酸が消費されることが原因であると考えられる。このとき、根におけるリン酸吸収速度と PEPC 活性がともに促進されていた。この結果も、セสบニアが体内リン酸濃度の低下に対して応答していることを支持している。

3. 高親和性リン酸トランスポーター遺伝子と PEPC 遺伝子の単離

すでに報告されている他の植物の高親和性リン酸トランスポーター遺伝子、PEPC 遺伝子の推定アミノ酸配列を基にして PCR プライマーを合成し、リン酸欠乏条件下で生育させたセสบニアの根から抽出した mRNA を用い、RT-PCR を行った。この結果、高親和性リン酸トランスポーターをコードしていると思われる増幅断片が二種類、PEPC をコードしていると思われる増幅断片が一種類得られた。さらに 5',3'-RACE を行い、これらの完全長 cDNA を単離した。既知のリン酸トランスポーター遺伝子、PEPC 遺伝子との相同性の高さ、推定二次構造の類似性より、これらは高親和性リン酸トランスポーター遺伝子 (*SrPT1*, *SrPTC2*)、PEPC 遺伝子 (*SrPEPC*) であると判断した。

様々なリン酸欠乏処理期間、リン酸濃度条件下で生育させた植物体、及び茎粒を形成させた植物体を用いてノーザン解析を行った。その結果、*SrPT1*、*SrPT2* の転写促進とリン酸吸収速度の促進は同調しており、同様に *SrPEPC* の転写促進と PEPC 活性の促進も同調していた。この結果は、リン酸トランスポーターの発現と PEPC の発現は両方とも転写レベルで体内リン酸濃度により調節されていることを示唆する。酵母においてリン酸トランスポーターを含むいくつかの遺伝子がリン酸欠乏により転写促進されることが知られており、それらは同じレギュロン (*pho*-レギュロン) に属していると報告されている。セสบニアの場合もリン酸トランスポーターと PEPC がほぼ同様にリン酸欠乏により転写促進されることから、これらは同じレギュロンに属しており、同様な調節を受けているのではないかと考えられる。

高親和性リン酸トランスポーター遺伝子、PEPC 遺伝子と同様に、細胞質リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (cMDH) をコードする cDNA も単離した。ノーザン解析の結果、cMDH 遺伝子もリン酸欠乏により転写が促進されることがわかった。リン酸欠乏条件下においてセสบニアの根からリンゴ酸が多量に放出されるのは、PEPC によりホスホエノールピルビン酸から合成されたオキサロ酢酸が、速やかに細胞質において cMDH によりリンゴ酸に変換されるためではないかと考えられる。

各組織を用いてノーザン解析を行ったところ、*SrPEPC* は根粒及び茎粒でも高発現していることがわかった。また、茎粒における *SrPEPC* の発現はリン酸欠乏により抑制された。いくつかのマメ科植物で根粒で高発現する PEPC (nodule PEPC) の遺伝子が単離されているが、これらは根での発現が弱く、根で発現するタイプの PEPC (root-form PEPC) とは異なると考えられている。しかしセสบニアの *SrPEPC* は root-form PEPC としても、nodule PEPC としても機能し

ているのではないかと考えられる。あるいは、これまでに報告された **nodule PEPC** もリン酸欠乏によって根での発現が促進されるのかもしれない。

4. リン酸欠乏応答型 H⁺-ATPase 遺伝子の単離

リン酸欠乏条件下では根における H⁺-ATPase の活性が上昇し、根からのプロトン放出量が増加するのではないかと、多くの研究者たちにより推測されている。しかし、未だにリン酸欠乏に応答する H⁺-ATPase 遺伝子は単離されていなかった。このリン酸欠乏応答型の H⁺-ATPase 遺伝子を探索するために、既知の H⁺-ATPase のアミノ酸配列を基にディジェネレートプライマーを合成し、リン酸欠乏条件下で生育させたセสบニアの根から抽出した mRNA を用い、RT-PCR を行った。その結果、H⁺-ATPase をコードする増幅断片が五種類 (*SrHA1*, *SrHA2*, *SrHA3*, *SrHA4*, *SrHA5*) 得られた。さらにこれらの塩基配列を基にディジェネレートプライマーを合成し 3'-RACE を行った結果、*SrHA1*, *SrHA4*, *SrHA5* のみが伸長され、また新たに一種類の断片 (*SrHA6*) が得られた。さらに 5'-RACE により *SrHA1*, *SrHA4*, *SrHA5* の完全長 cDNA を単離した。

ノーザン解析の結果、*SrHA1* は子葉で、*SrHA4* は根で、*SrHA5* は根粒及び茎粒でそれぞれ主に発現していた。セสบニアをリン酸欠乏条件下におくと、処理後 2 日目から *SrHA4* の発現は抑制され始めた。さらに条件を細かくすると、高親和性リン酸トランスポーター遺伝子と PEPC 遺伝子の発現が促進される条件下では *SrHA4* の発現は抑制されることがわかった。リン酸欠乏に対する応答の早さから、この転写抑制は積極的なものではないかと思われる。この結果はこれまでの仮説に全く反するものである。セสบニアが特殊であるのか、仮説が間違いなのか、他の植物でのリン酸欠乏応答型 H⁺-ATPase 遺伝子の単離が待たれる。

まとめ

本研究により、セสบニアの低親和性リン酸吸収機構の *K_m* 値が低いこと、高親和性リン酸吸収機構によるリン酸吸収速度と PEPC の活性が非常に早く体内のリン酸濃度低下に反応することわかり、セสบニアは低リン酸条件によく適応していることが示された。また、リン酸トランスポーター、PEPC の発現はともに転写レベルで調節されており、これらの遺伝子が同じレギュロンに属している可能性が示唆された。さらに、*SrPEPC* は root-form PEPC 及び **nodule PEPC** として機能している点において、*SrHA4* はリン酸欠乏に反応して転写が抑制される点において特異な遺伝子であることが示された。