

論文内容の要旨

論文題目： Molecular biological and reverse genetic studies of the isogenes for CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナの CDP-コリン合成酵素イソ遺伝子に関する分子生物学ならびに逆遺伝学的研究)

氏名 : 稲継理恵

序論

生育場所を変えることのできない植物は、周囲の環境の変化に対応するために自らの生理状態を変化させる。この現象は馴化と呼ばれる。例えば低温に曝された植物は、細胞の脂質組成を変化させ、環境に適した生体膜系を作り出すと考えられている。そのような変化の一つとして、低温でのリン脂質組成の変化が古くから知られる。ホスファチジルコリン (PC) は植物細胞の色素体膜以外の生体膜を構成する主要なリン脂質であり、色素体膜糖脂質の生合成前駆体としても重要である。また PC は、脂肪酸の不飽和化反応を司るアシル脂質不飽和化酵素の基質として生体膜の流動性の調節に関与するほか、乾燥ストレスシグナルの伝達過程でセカンドメッセンジャーとして働くホスファチジル酸を生成するホスホリパーゼ D の基質でもある。低温においては、多種の低温耐性植物で PC が増加することが報告されており、これが凍結温度下での細胞の生存率上昇などに寄与するという仮説がたてられている。これらはいずれも生理学的な研究に基づくもので、分子生物学的な視点からその意義を明らかにする試みはまだ行われていない。低温での PC 増加の意義を明らかにするためには、低温に応答した PC 生合成活性化の分子機構を明らかにし、さらにその機構の破壊による影響を解析することが必要である。

真核生物の PC 生合成にはいくつかの経路が知られるが、植物では CDP-コリン経路が主要と考えられている。そこで、本研究では、CDP-コリン経路上の鍵酵素で CDP-コリンの生合成を司る CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase (CCT; EC 2.7.7.15) に着目し、低温耐性植物であるシロイヌナズナで、低温に応答した遺伝子発現と酵素活性の細胞内での挙動を調べた。

結果

1. シロイヌナズナには2つの CCT 遺伝子が存在する

シロイヌナズナゲノムには2つの CCT 遺伝子が登録されている。既に機能が同定されていた *AtCCT1* (*At2g32260*) と、機能未同定であった *AtCCT2* (*At4g15130*) について、それぞれゲノム遺伝子断片及び cDNA を単離した。さらにこれらイソ遺伝子の翻訳産物の組換えタンパク質を作製し、CCT 活性を持つことを確認した。また、植物の全ての器官で *AtCCT1* および *AtCCT2* のタンパク質が検出されたことから、これらのイソ遺伝子が構成的に発現することを示した。

2. 低温における *AtCCT1* および *AtCCT2* の発現

低温における *CCT* イソ遺伝子の発現を、RNA ゲルブロット法およびイムノブロット法で解析した。23°Cで生育させたロゼットを 2°Cで処理すると、*AtCCT2* の転写産物レベルは処理後 12 時間で処理前の約 6 倍に増加し、*AtCCT2* タンパク質も処理後 96 時間で約 3 倍に増加した。一方 *AtCCT1* は、転写産物、タンパク質レベルともに 168 時間の低温処理の間ほとんど変化しなかった。これらの結果は、2つの *CCT* 遺伝子のうち *AtCCT2* のみが低温によって発現増強を受けることを示す。しかし、このような発現制御の生理的な意義は依然不明であり、低温での *CCT* アイソザイムそれぞれの役割について詳しく検討する必要がある。そこで以下の項では、*CCT* 遺伝子破壊株を単離することにより、これらの問題に取り組んだ。

3. *CCT* 遺伝子破壊株の単離

シロイヌナズナ T-DNA タグラインから *AtCCT1* および *AtCCT2* の破壊株、*cct1* 株および *cct2* 株、を単離した。*cct1* 株では T-DNA が *AtCCT1* の第 6 イントロンに、*cct2* 株では T-DNA が *AtCCT2* の第 2 エキソンに挿入されており、RNA ゲルブロット法およびイムノブロット法でそれぞれに由来するシグナルは検出されなかった。これらの結果から、*cct1* 株と *cct2* 株はいずれも、それぞれの *CCT* イソ遺伝子の機能が完全に破壊された株であると考えられた。

4. *CCT* イソ遺伝子の相補性

23°Cで生育させた破壊株の *CCT* 活性は、*cct1* 株で野生株の約 20%、*cct2* 株で約 70%に減少していた。しかし *cct1* 株および *cct2* 株の PC 含量はいずれも野生株と同レベルで、個体の生育も野生株と違いがなかった。また、低温処理 7 日後の PC 含量も、これらの破壊株と野生株で同じレベルだった。これらの結果から、常温および低温で、いずれか一方の *CCT* 遺伝子の発現で通常の PC 量維持に充分であることが示された。

cct2 株のロゼット葉の *CCT* 活性は、野生株と *cct1* 株と同様に低温処理によって増加した。これは、*cct2* 株では低温で転写産物レベルがほとんど変化しない *AtCCT1* のみが発現していることを考えると興味深い結果であった。

5. 細胞内の *CCT* 活性分布と *CCT* 遺伝子破壊株を用いた低温における PC 合成活性化機構の再評価

低温における *cct2* 株の *CCT* 活性上昇を説明する一つの考え方は、*AtCCT1* の翻訳後の活性調節である。*AtCCT1* の活性調節のしくみを詳細に検討するために、まず、*CCT* 活性の細胞内分布を調べた。野生株のロゼット葉破砕液を遠心分画し、各画分の *CCT* 活性を比較したところ、15 k x g と 150 k x g の膜画分で顕著に高い比活性が検出された。また、7 日間低温処理後の試料では、15 k x g と 150 k x g の膜画分で比活性が上昇した。これらの結果から、シロイヌナズナ細胞内の *CCT* 活性は、通常の温度下で主に 15 k x g と 150 k x g の膜画分に分布し、低温環境下ではこれらの画分でさらに上昇することが明らかとなった。

次に *cct1* 株および *cct2* 株について同様の遠心分画を行い、各画分の *CCT* 活性と、イムノブロット解析による *CCT* イソタンパク質の分布との相関を調べた。*cct1* 株では、低温処理により 15 k x g および 150 k x g 膜画分で *CCT* 比活性が顕著に上昇した。また、これらの画分での *AtCCT2* タンパク質の増加率は、活性の増加率とほぼ平行関係にあった。これらの結果は、*cct1* 株のこれらの膜画分における低温での *CCT* 活性の上昇は、*AtCCT2* タンパク質の増加に起因することを示唆している。一方、*cct2* 株では、低温処理後の 15 k x g 膜画分の活性の上昇はわずかで、*AtCCT1* タンパク質もほとんど増加しなかった。それに比べて 150 k x g 膜画分では、低温処理による *AtCCT1* タンパク質の増加は 1.07 倍とわずかであったのに対し、活性は 1.85 倍と顕著に増加した。これらの結果から、低温における 150 k x g 膜画分の *CCT* 活性の上昇は、*AtCCT1* タンパク質の量の増加によるものではなく、*AtCCT1* タンパク質の翻訳後の活性化に起因すると考えられる。これらの結果から、*AtCCT1* と *AtCCT2* は低温によってどちらも膜画分の *CCT* 活性を上昇させるが、それぞれ異なる機構によるものであることが示された。

6. CCT 二重破壊株での PC 合成

前項までに、*AtCCT1* と *AtCCT2* のうち一方を破壊しても常温および低温下での PC 量には影響がないことを示した。そこで CCT 活性がさらに抑制される二重破壊株、*cct1 cct2* 株を作出し、PC 生合成と生長への影響を調べた。23°C で生育させた *cct1 cct2* 株の PC 含量は野生株よりわずかに減少したが、生育は野生株と変わりがなかった。*cct1 cct2* 株では、イムノブロット法によって CCT イソ遺伝子の翻訳産物はどちらも検出されなかったが、ロゼット葉破碎液の CCT 活性は野生株の約 8% 残存していた。また [*methyl*-¹⁴C] コリンのパルスラベル実験を行ったところ、*cct1 cct2* 株では、速度は低下するものの、CDP-コリン経路を介した PC 合成が行われていた。これらの結果は、*cct1 cct2* 株は 23°C の生育において残存レベルの CCT 活性で通常の PC 量を維持できることを示す。

ここで、CCT イソ遺伝子を欠損する *cct1 cct2* 株において、CCT 活性を発現する酵素の実体は何かという疑問が持たれた。酵母・動物などの研究から、CDP-エタノールアミン経路上で PE 合成を支配する CTP:phosphorylethanolamine cytidylyltransferase (ECT; EC 2.7.7.14) は、*in vivo* では phosphorylethanolamine に対する基質特異性が高いと考えられてきた。しかし我々の研究室では、シロイヌナズナ ECT (*AtECT1*) の大腸菌発現タンパク質が *in vitro* で CCT 活性を発現することが確認されていた。そのため、*AtECT1* が *in vivo* でも CCT 活性を発現する可能性が考えられた。この可能性を調べるために、シロイヌナズナ *AtECT1* 過剰発現株 S051 株の ECT 活性および CCT 活性を野生株と比較したところ、ECT 活性は約 10 倍、CCT 活性も約 2 倍に増加していた。S051 株の CCT イソタンパク質のレベルはいずれも野生株と同じであったので、S051 株で増加した CCT 活性は *AtECT1* 由来である可能性が示唆された。したがって、*cct1 cct2* 株の残存 CCT 活性の少なくとも一部は *AtECT1* の CCT 活性に起因する可能性が考えられる。このような *cct1 cct2* 株での PC 生合成は、植物の中性リン脂質合成経路において、CCT と ECT が相補性を持つ可能性を示した点で新しい結果といえる。

7. CCT 遺伝子二重破壊の生理的影響

前項で示したように、*cct1 cct2* 株は 23°C 下の生育では通常の PC 量を維持していたが、低温のように PC 含量を増加させる生育環境に対しては十分適応できない可能性が考えられた。そこで、23°C で生育させた *cct1 cct2* 株を 2°C に移して PC 含量の変化を調べたところ、低温処理後 7 日目までは野生株と同等に増加したが、処理 14 日後には処理前のレベルまで低下した。この結果は、*cct1 cct2* 株は長期にわたる低温での生育で正常な PC 量を維持できないことを示す。次に、長期の低温環境下での PC 含量の低下が、実際の生育に影響するか調べるため、8°C で長期間栽培した *cct1 cct2* 株の生育を野生株と比較したところ、*cct1 cct2* 株ではロゼット葉の成長および花茎の伸長が抑制された。これらの結果は、人工栽培室内の好適な環境下では *cct1 cct2* 株は野生株と同様の生育を示せても、様々な環境ストレスに直面する野外においては、CCT 活性の欠損が個体の生存や繁殖に不利な形質になりうることを示唆する。

まとめ

- ・シロイヌナズナの 2 つの CCT 遺伝子のうち、*AtCCT2* は低温処理によって発現が増加し、もう一方の *AtCCT1* はタンパク質レベルで活性調節を受けることにより、ともに低温での PC 合成活性化に寄与することを明らかにした。
- ・2 つの CCT 遺伝子それぞれの破壊株は、常温および低温下で通常の PC 合成と生育が可能であること、すなわちこれらの遺伝子が互いに相補可能であることを示した。
- ・CCT 遺伝子二重破壊株は、常温では ECT の CCT 活性を利用した PC 合成により正常な生育が可能であるが、長期の低温環境下での PC 量の維持に欠損を示し、個体の成長にも遅延が見られたことから、環境への適応能力に対する CCT の寄与を明らかにした。