

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 13 年度博士課程進学

氏名 辻 寛之

指導教官名 堤 伸浩

論文題目 冠水条件下におけるイネの遺伝子発現調節

イネは冠水状態にさらされると、多数の遺伝子の発現を変化させることによって様々な適応反応を誘導する。しかし、この遺伝子発現の変化がどのような機構によって調節されているのかについては不明な部分が多い。本研究では、冠水条件下におけるイネの遺伝子発現調節について明らかにするために、アルデヒド脱水素酵素の冠水解除時の活性化、カルシウムイオンによるシグナル伝達、ヌクレオソームヒストンのアセチル化に着目して解析した。

1. 冠水中および冠水解除時におけるイネミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素(ALDH2)遺伝子の発現調節

冠水状態では、酸素呼吸による ATP 合成の低下を補償するために解糖系とエタノール発酵系が活性化される。エタノール発酵系では、解糖系で生じたピルビン酸がピルビン酸脱炭酸酵素(PDC)によってアセトアルデヒドに変換され、さらにアセトアルデヒドはアルコール脱水素酵素(ADH)のはたらきでエタノールに代謝される。解糖系とエタノール発酵系の活性化は

冠水状態を生き抜くために必須であるが、ATP 合成効率が低いことが大きな問題となる。

植物は冠水中だけでなく冠水状態から解除されたあとも大きなダメージを受ける。このダメージの原因は、一つは冠水解除時に急激に生じる活性酸素であり、もう一つは冠水中に蓄積したエタノールが酸化されて生じるアセトアルデヒドである。活性酸素消去系については様々な研究が行われているが、アセトアルデヒドの無毒化に関する報告は少ない。植物においてミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素(ALDH2)はアセトアルデヒドを無毒化できる酵素のひとつであることが知られているので、本研究ではイネ *ALDH2* 遺伝子の構造を明らかにし、その発現調節や冠水解除時の生理的役割について調査した。イネ *ALDH2* 遺伝子には *ALDH2a*、*ALDH2b* の 2 つが存在しており、両者の発現を詳細に解析した。その結果、*ALDH2a* の mRNA は冠水中急激に増加するにも関わらず *ALDH2a* タンパク質はそれほど増加しないことが分かった。そして冠水を解除した直後、*ALDH2a* の mRNA が減少していくにも関わらず *ALDH2a* タンパク質が一過的に増加することが明らかになった。これはイネが冠水中に *ALDH2a* の mRNA を増加させてプールしておき、冠水解除後これを急激に翻訳することで *ALDH2a* タンパク質を増加させていることを示唆している。このことを反映して、イネは冠水解除時に ALDH 活性が増加し、アセトアルデヒド量が減少していることが分かった。冠水に弱い作物であるオオムギやタバコでは、冠水中に *ALDH2a* の mRNA が増加するという性質は見られない。したがって、*ALDH2a* の mRNA が冠水中に増加するという性質は、イネが進化の過程で冠水に適応するために獲得したものである可能性が考えられた。

2. 冠水条件下のイネにおけるカルシウムイオンを介した遺伝子発現調節

トウモロコシ、アラビドプシスでは、低酸素状態になると細胞質カルシウムイオン濃度が上昇し、このカルシウムイオン濃度上昇が *ADH1* mRNA の冠水誘導性に必要であることが知られている。そこで *ALDH2a* mRNA の冠水誘導性にカルシウムイオンが関与しているかどうかを解析した。その結果、すべての植物に共通な *ADH1*、*PDC1* mRNA の冠水誘導性はカルシウムイオン

ンを介したシグナル伝達経路で調節されていたのに対して、イネに特有の *ALDH2a* mRNA の冠水誘導性はカルシウムイオンを介さない経路で調節されていることが分かった。

これらの冠水で活性化する代謝経路の遺伝子と比較するため、冠水状態で機能が低下する酸素呼吸に関わる遺伝子の発現も同時に解析した。冠水状態で呼吸系遺伝子を発現し続けることはエネルギーの損失になるが、この損失を減少させるような調節があるのかどうか分かっていない。呼吸系遺伝子の一部はミトコンドリアゲノムに、残りは核ゲノムにコードされており、冠水処理によって、ミトコンドリアゲノムコードの呼吸系遺伝子群の mRNA 量は影響されなかったが、核ゲノムコードの呼吸系遺伝子群の mRNA 量は減少することが分かった。さらに、主要な ATP 合成を行うシトクロム呼吸系の遺伝子群の発現はカルシウムイオンに依存しない経路で調節されていたのに対し、ストレス応答に関わるオルタナティブ呼吸系遺伝子の発現はカルシウムイオンに依存した経路で調節されていることが明らかになった。

3. 冠水条件下のイネにおけるヌクレオソームヒストンのアセチル化を介した遺伝子発現調節

真核生物のゲノム DNA は、核内においてクロマチンと呼ばれる高次構造へと折りたたまれて格納されている。クロマチンの基本単位はヌクレオソームと呼ばれており、約 150bp の DNA がヒストンに巻きついた構造をとっている。ヌクレオソームヒストンがアセチル化、メチル化などで修飾されると、その修飾を認識する分子によって解読され、遺伝子発現の変化が引き起こされる。もっとも有名なヒストン修飾はアセチル化で、一般的に活発に転写が行われている領域ではヒストンがアセチル化されており、逆に転写が抑制されている領域ではヒストンが脱アセチル化されていると考えられている。しかしこれらの知見は、定常状態の細胞における遺伝子発現領域を規定するものである。植物において、環境ストレスに応答してヒストン修飾が変化するかどうかはまったく分かっていない。そこでイネを冠水処理し、*ADHI* および *PDCI* それぞれの領域におけるヌクレオソームヒストンのアセチル化状態をクロマチン免疫沈降法によって解析した。その結果、冠水処理によって *ADHI*、*PDCI* の mRNA が増加する際、これらの遺伝子を

含む領域のヌクレオソームヒストンが高アセチル化されていることが分かった。

ヒストンのアセチル化状態は、アセチル化を促進するヒストンアセチル基転移酵素(HAT)と脱アセチル化を行うヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の活性のバランスによって決定されており、例えば HDAC 阻害剤はヒストンのアセチル化を促進することが知られている。イネに HDAC 阻害剤を処理したところ、好気状態であるにも関わらず *ADHI*、*PDC1* の mRNA が増加することが明らかとなった。したがって、好気状態における *ADHI*、*PDC1* の発現は TSA 感受性の HDAC によって抑制されている可能性が示唆された。この可能性を検証するために、イネ *HDAC* 遺伝子の構造を決定しその発現の冠水応答性を調べた。イネゲノム中には少なくとも 19 個の *HDAC* 遺伝子が存在しており、これらすべてについて冠水中の発現を解析したところ、3 遺伝子を除いてすべて冠水処理によって抑制されることが明らかとなった。

これらの結果から、好気状態では、TSA 感受性の HDAC が HAT 活性を上回って *ADHI* 周辺のヌクレオソームヒストンを脱アセチル化し、*ADHI* の発現が抑制されていると考えられる。冠水状態では、HAT 活性が HDAC 活性を上回って *ADHI* 周辺のヌクレオソームヒストンがアセチル化され、*ADHI* の発現が活性化したというモデルが考えられる。

以上、本研究により、冠水状態および冠水解除時のイネにおいて、シグナル伝達、転写、翻訳といった様々なステップにおける遺伝子の発現調節の一端が明らかとなった。イネの冠水ストレス応答は多段階において複雑に制御されており、今後その全体像が明らかにされれば、将来的に湿害、冠水害に対する耐性を増強した作物を作出することに寄与できると期待される。