

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 13 年度博士課程入学

氏名 傍嶋 宏行

指導教官名 山根 久和

論文題目

イネにおける 12-oxophytodienoic acid 還元酵素遺伝子の機能と発現制御機構

植物は動物のような免疫系をもたないが、カビ、細菌、ウイルスなどの病原体が感染すると、これを特異的な機構で認識し、種々の抵抗性反応を示し生存を図っている。このような植物の抵抗性反応を誘導するものを一般にエリシターとよぶ。病原体の感染を受けた植物では、病原体や植物の細胞表層由来の断片などがエリシターとなって活性酸素の発生、PR タンパク質と総称される抗菌性タンパク質やファイトアレキシンとよばれる低分子の抗菌性物質の生産など様々な抵抗性反応が誘導される。

我々の研究グループは、イネ培養細胞におけるエリシター誘導のファイトアレキシン生産においてエリシター刺激のシグナルトランスデューサーとしてジャスモン酸 (JA) が重要な役割を果たしていることを示し、JA のシグナル伝達機構の解明を目指して JA 応答性遺伝子の単離・機能解析を行ってきた。本研究はそのような JA のシグナル伝達機構解明研究の一環として行っているもので、イネ培養細胞由来の JA 応答性である 12-oxophytodienoic acid (OPDA) reductase 遺伝子 *OsOPR1* の機能および発現制御機構の解析を行うことを目的とした。また最近公開されたイネゲノムのデータベースを利用して *OsOPR1* 関連遺伝子の単離・機能解析も試みた。

1. JA 応答性遺伝子 *OsOPR1* の機能解析

(1) *OsOPR1* のクローニング、機能解析

JA 処理後 2 時間のイネ培養細胞由来の cDNA ライブラリーを用いてディファレンシャルスクリーニングにより JA 処理により mRNA レベルが増加する遺伝子を数種単離した。*OsOPR1* はそれら JA 応答性遺伝子の一つで、酵母の Old Yellow Enzyme ホモログをコードしていると考えられ、シロイヌナズナ由来の OPDA reductase 1 (*AtOPR1*) と高い相同性を示すことがわかった。そこで *OsOPR1* の ORF 全長を histidine-tagged protein として大腸菌で大量発現させ、機能解析を行った。アフィニティー精製して得られた組み換えタンパク質は JA 生合成中間体である *cis*-OPDA を *cis*-OPC 8:0 へと還元する OPDA reductase 活性を有することが確認された。

シロイヌナズナやトマトには 3 種類の OPR が存在することが知られている。そのうちシロイヌナズナ由来の *AtOPR1*、*AtOPR2* は同様の活性を示し、非天然型の (-)-*cis*-OPDA を効率よく (-)-*cis*-OPC8:0 へ変換するが、天然型の (+)-*cis*-OPDA に対しては酵素濃度が高い場合のみ微弱な (+)-*cis*-OPC8:0 への変換活性を示した。一方、*AtOPR3* は *AtOPR1*、*AtOPR2* の約 10 分の 1 の濃度で天然型、非天然型 OPDA を同等に効率よく (+)-*cis*-OPC8:0 へ変換した。トマトでも *LeOPR3* が *AtOPR3* と同様の性質を示し、*LeOPR1* が *AtOPR1*、*AtOPR2* と同様の性質を示すことが明らかにされている。最近、シロイヌナズナで JA 欠損のために雄性不稔となった変異体 *opr3* が単離されたが、その原因遺伝子が *AtOPR3* であることが示され、*AtOPR3* が JA 生合成に必須な機能を果たしていることが分かっている。そこで、単離した *OsOPR1* は *AtOPR1*、*AtOPR2* タイプなのか *AtOPR3* タイプなのかどちらに分類されるかを調べた。アミノ酸配列からは *OsOPR1* は *AtOPR1*、*AtOPR2* タイプであることが推定され、実際に *OsOPR1* の基質特異性を調べた結果、基質として非天然型の (-)-*cis*-OPDA を基質として好むことが示された。以上の結果から、*OsOPR1* は *AtOPR1*、*AtOPR2* タイプの OPR であることが明らかになった。

(2) *OsOPR1* の発現解析

ノーザン解析の結果、イネ培養細胞における *OsOPR1* mRNA レベルは JA 処理後 15 分頃から上昇し始め、1-2 時間後に極大に達した後、漸減した。また、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド存在下における応答性を調べたところ、シクロヘキシミド存在下でも *OsOPR1* の JA 応答性は抑制されないことから *OsOPR1* の転写には新たな他の転写因子等の合成を必要としないものと考えられた。

(3) *OsOPR1* 関連遺伝子の単離・機能解析

近年、イネゲノムのデータベースが公開され、イネ遺伝子の網羅的解析が可能となったため、イネにおいても JA 生合成に関与する *AtOPR3*、*LeOPR3* 型の OPR が存在するかどうかを検索した。まず *OsOPR1* のアミノ酸配列をもとに農水省データベース Rice BLAST により検索した結果、相同性の高さに応じてイネゲノム中の部分配列が表示された。それを同省データベース Rice

Genome Automated Annotation System (GAAS) を用いて解析した結果、OsOPR1 以外に 10 種類の OPR アイソザイムの存在が示唆された。これら 10 種を染色体番号ごとに整理すると、1 番染色体に 3 種、2 番染色体に 1 種、6 番染色体に 5 種、8 番染色体に 1 種で、OsOPR1 は 6 番染色体にコードされていることが判明した。なお、複数の OPR 遺伝子の存在が確認された 1 番染色体および 6 番染色体においては、OPR がタンデムに存在しており、アミノ酸配列でも高い類似性が確認され、OsOPR1 と相同性が高く同様な機能を有すると考えられるアイソザイムが複数存在することも示唆された。さらにイネゲノムデータベースには登録がない領域で cDNA クローンとしてもう 1 種発見され、総計 12 種類の OPR 遺伝子がイネゲノム中に存在していることが明らかとなった。

JA 生合成に関わる OPR として植物でクローニング、機能解析が終了したものは前述のシロイヌナズナ (AtOPR3)、トマト(LeOPR3) の 2 種類である。これら 2 種類の OPR は C 末端側にペルオキシソームへの移行シグナル配列を有しており、実際にペルオキシソームへの蓄積が観察されている。これに基づき、イネゲノムでの存在が示唆された 12 種類の OPR に加えシロイヌナズナ、トマトを含めた OPR のアミノ酸配列をもとに MEGA2 ソフトを用いた進化系統樹を作成した結果、AtOPR3、LeOPR3 と同じグループに分類されるイネ OPR が 1 種確認された。この OPR の C 末端には AtOPR3、LeOPR3 と同様のペルオキシソーム移行シグナル配列が存在していた。こうして、この OPR はイネにおける JA 生合成酵素として機能することが強く示唆された。そこで、この OPR を染色体番号に因んで OsOPR8 と仮称し、JA 処理後 1 時間の total RNA を鋳型とした RT-PCR により、ORF 全長を含む *OsOPR8* cDNA をクローニングした。今後は *OsOPR8* の機能・発現解析を行い、JA 生合成への関与を明らかにすることが必要と考えている。

(4)OsOPR1 の生物学的機能

以上の結果から、OsOPR1 の機能については 2 つの可能性が考えられる。1 つは、天然型の (+)-*cis*-OPDA 以外に本来の基質が存在し、未知の生物学的機能を果たしている可能性である。JA は膜脂質由来のリノレン酸からオクタデカノイド経路で生合成されるが、それからの分岐経路で種々の α,β -不飽和ケトン構造を有する毒性物質が派生することが知られている。OsOPR1 がそのような毒性物質の解毒系で機能している可能性も考えられる。もう一つの可能性は JA 生合成に関与しているというものである。OsOPR1 は高濃度では天然型の(+)-*cis*-OPDA の還元も行おうので、JA の生合成酵素として機能している可能性も現在のところ否定できない。ホスホリパーゼから OPR に至るまでの一連の JA 生合成酵素遺伝子が JA により発現誘導されることが示されている。病原菌が植物に感染した場合、その感染シグナルを増幅して防御反応を強力に誘導する必要があり、OPR を含む JA 生合成遺伝子の JA による発現誘導はそのような感染シグナル増幅系の一つとして重要な機能を果たしているかもしれない。

2. *OsOPR1* の発現制御機構の解析

OsOPR1 は JA 応答性のメカニズム、生物学的機能両面において興味深い遺伝子であることから、その転写誘導機構の解明を目的としてプロモーター解析を行った。

イネゲノムより *OsOPR1* 5' 上流域を含むゲノム DNA 断片を単離し、*OsOPR1* の翻訳開始点上流 1 kbp について 5' 側からのデリーションシリーズを作製した。レポーター遺伝子としてはホタルルシフェラーゼ遺伝子を用い、イネ培養細胞への遺伝子導入はパーティクルガンを用いて行った。JA 存在下でレポータージーンアッセイを行ったところ、-0.88 kbp から 20 bp をけざるとレポーター活性が半減した。そこでこの間の 20 bp について JA 応答性に関与するシスエレメントが含まれているかどうかを解析した。JA 存在下で -0.88 kbp から 20 bp をけざるとルシフェラーゼ活性が顕著に低下するのに対し、JA 非存在下では -0.88 kbp, -0.86 kbp とともに JA 存在下の -0.86 kbp の活性とほぼ同等であった。以上の結果から、この 20 bp に JA 応答性のシスエレメントが存在することが示された。

この 20 bp の領域には basic region/leucine zipper (bZIP) モチーフをもつ転写因子 TGA ファミリーの結合配列と考えられる TGACG モチーフが含まれていた。TGA ファミリーの結合配列は、サリチル酸、JA、2,4-D、過酸化水素など広範な誘導因子に対して早期に応答することが示されている。また、TGA ファミリーによる転写誘導は 1 時間以内ではじまる早い一過性の応答であり、新たなタンパク質合成を必要としないことも示されているため *OsOPR1* 5' 上流における TGACG モチーフが JA 応答性の転写活性化に関与している可能性が考えられた。この TGACG モチーフは 1 kbp から 0.9 kbp 間にも見つかったため、下流側の -0.88~-0.86 kbp に存在するモチーフを TGACG 1、上流側を TGACG 2 とよび、これら 2 つのモチーフにトランスポージョン変異を導入し(A⇄C、G⇄T)、レポーター活性が変化するかどうかを調べた。その結果、TGACG1 の単独変異および TGACG1、2 の二重変異で JA 応答性を失い、TGACG2 の単独変異では JA 応答性がやや低下する程度であることが示された。以上より TGACG1 は *OsOPR1* の JA 応答性の転写活性化に必須であり、TGACG2 は TGACG1 ほどではないものの *OsOPR1* の JA 応答性に関与していることが示された。一方、イネ培養細胞から核タンパク質を抽出し、JA 応答性が確認された *OsOPR1* 上流 0.8 k bp-0.9 kbp 間をプローブとしてゲルシフトアッセイを行ったところ、当該領域に結合するタンパク質の存在がシフトバンドとして観察された。この結果、当該領域に結合するタンパク質が確かにイネ核内に存在することが示された。今後 TGACG モチーフに結合する TGA ファミリーの転写因子を単離し、当該転写因子の発現・活性化機構を解明することができれば、JA シグナル伝達の一端が明らかになると考えられる。