

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻  
平成 14 年度博士課程進学  
氏 名 目黒直樹  
指導教員名 堤 伸浩

論文題目 冠水ストレスに対するイネ科植物のミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素の役割

### 1. 植物の冠水抵抗性とミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素の発現との関連性について

植物は、冠水時のエタノール発酵系の中途段階や、冠水解除後に出来るアセトアルデヒドの毒性により障害を受ける。この有毒なアセトアルデヒドを毒性の低い酢酸に換える反応を触媒するのがアルデヒド脱水素酵素 ALDH である。ALDH は細胞質に存在する ALDH1 とミトコンドリアに局在する ALDH2 が存在するが、イネでは ALDH2 が冠水解除後にアセトアルデヒドによって引き起こされる障害の緩和に関わると考えられている。そこで、冠水抵抗性の高いイネにおける ALDH2 のこのような働きが、冠水抵抗性を持つ植物において普遍的であるのかどうかを調べるために、イネ科の冠水抵抗性の高い植物と低い植物について、ミトコンドリア型 *ALDH2* 遺伝子の発現の冠水応答性について解析した。トウモロコシについてはさらに詳細な解析を行い、イネとの比較を行った。

冠水抵抗性の高いタイヌビエと冠水抵抗性の低いトウモロコシ、オオムギについて、mRNA の蓄積量を調査した。タイヌビエの *ALDH2a* では冠水前に見られなかった mRNA の蓄積が、冠水処理により増加し、冠水解除後には減少した。トウモロコシの *ALDH2a* mRNA は冠水前には存在せず、冠水中には若干量増加し、冠水解除後もわずかに蓄積が見られた。オオムギの *ALDH2a* は未同定であるため、他の植物の *ALDH2a* の配列をプローブとして用いてノーザン解析を行ったが、mRNA は検出できなかった。*ALDH2b* は、タイヌビエ、トウモロコシ、オオムギともに、冠水前に見られていた mRNA の蓄積が、冠水により減少し、冠水を解除すると冠水前の水準に戻った。

冠水中、冠水解除後に、タイヌビエ、トウモロコシ、オオムギの ALDH2 のタンパク質量がどのように変化するのかを調べた。タイヌビエにおいては ALDH2a と ALDH2b がいつも一定の量で存在した。トウモロコシ、オオムギでは ALDH2 のバンドは 1 本しか見られず、冠水により減少し、冠水解除後も冠水中のレベルと同等か冠水前のレベルに戻るといふ挙動を示した。トウモロコシとオオムギでは *ALDH2a* mRNA の蓄積量は非常に少なく、トウモロコシとオオムギの ALDH2 の発現パターンがイネの ALDH2b の発現パターンと同じであったことから、トウモロコシ、オオムギの ALDH2 は ALDH2b であると考えた。これらから、イネ、タイヌビエとトウモロコシ、オオムギの冠水抵抗性の違いは、ALDH2a が関与していると考えられた。

イネにおいて、ALDH 活性は冠水中は冠水前と同程度だが、冠水解除後 2-4 時間で 3-4 倍に増加する。また、冠水処理するとアセトアルデヒドは増加し、冠水解除後 4 時間目に減少し始める。そこで、トウモロコシの冠水中、冠水解除後の ALDH 活性の測定とアセトアルデヒドの定量を行い、イネと比較した。トウモロコシの ALDH 活性は、冠水により減少し、冠水解除後 4 時間で冠水前と同等のレベルにまで回復した。冠水前に少なかったアセトアルデヒドは冠水により増加し、冠水解除後もさらに緩やかに増加し続け、冠水解除後 4 時間目には冠水中の約 2 倍になった。

これらから、冠水抵抗性の高いイネ、タイヌビエには、植物がアセトアルデヒドの障害を受ける冠水中、冠水解除直後において、冠水抵抗性の低いトウモロコシ、オオムギよりも多くの ALDH2 タンパク質、特に ALDH2a タンパク質を蓄積させ、アセトアルデヒドの無毒化を促進していることが、冠水抵抗性を高めている一因になっていると考えられた。

トウモロコシ植物体内に存在する ALDH2 は主に ALDH2b であると推定される。ALDH2b もアセトアルデヒドによる障害を回避する役目を果たしていると考えられ、ALDH2b が欠損するとアセトアルデヒドによる障害を受けてしまうかどうかを確かめるために、トウモロコシの *ALDH2b* (*RF2A*) 変異体 *rf2a-m8904* に冠水、冠水解除処理を行った。コントロールである自殖系統 Ky21 では冠水解除後 24 時間で多少の障害が葉身に認められる程度であったのに対し、*rf2a-m8904* では葉身全体が壊死した。また、アセトアルデヒドを定量したところ、*rf2a-m8904* では冠水前、冠水中、冠水解除後において一貫して Ky21 よりも多量のアセトアルデヒドが存在した。これらから、*rf2a-m8904* が冠水解除後に大きな障害を受けたのは、ALDH2b によるアセトアルデヒドの無毒化を短時間で行うことができなかつたためと示唆された。よって、ALDH2b もアセトアルデヒドの無毒化に寄与していることが確かめられた。

以上により、植物のアセトアルデヒドの無毒化には、ALDH2a、ALDH2b の両方が寄与しており、イネ、タイヌビエは ALDH2a を持つことによりトウモロコシ、オオムギよりも冠水抵抗性が高いと考えられた。

## 2. イネ子葉鞘の伸長とミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素の発現との関連性について

イネやタイヌビエでは、冠水条件下での発芽時には、子葉鞘という器官が伸長する。子葉鞘は物理的な障害から本葉を保護し、生育中の他の器官へ養分を供給する役割を果たす器官である。

冠水中で伸長した子葉鞘においてもエタノール発酵系は活性化されており、エタノール発酵系の中間産物のアセトアルデヒドを酢酸に酸化する ALDH2 が、イネの冠水中、冠水解除時において発現が誘導され、イネの冠水抵抗性に関して重要な役割を果たすと考えられているため、イネ子葉鞘の伸長と ALDH2 の発現との関連性について解析を行った。

イネ幼植物体で見られた冠水応答性がイネ子葉鞘においても見られるのかどうかを調べるために、冠水中、冠水解除後の子葉鞘における mRNA の蓄積量を調べた。ALDH2a mRNA は冠水中に十分量存在し、冠水解除により減少した。ALDH2b mRNA は冠水中の子葉鞘にはほとんど存在せず、冠水解除により増加した。冠水中、冠水解除後の子葉鞘からミトコンドリアタンパク質を抽出し、ALDH2 タンパク質の蓄積量を調査した。冠水中の子葉鞘には ALDH2a が主に存在し、ALDH2b はほとんど存在しなかった。冠水を解除すると、ALDH2a は減少し始め、ALDH2b は増加した。

ALDH2a と子葉鞘の伸長の関連を調べるために、ALDH の阻害剤を用いた実験を行った。まず、ALDH の阻害剤であるジスルフィラム (DSF) がイネの ALDH2 タンパク質の ALDH 活性を阻害することを確認するために、イネ ALDH2a、ALDH2b タンパク質それぞれを高発現させた大腸菌から粗酵素抽出液を抽出し、DSF を作用させた後、アセトアルデヒドに対する ALDH 活性を測定した。ALDH2a は DSF により強く ALDH 活性が阻害されたが、ALDH2b は ALDH2a ほど強くは阻害されなかった。次に DSF 水溶液にて冠水した状態でイネを発芽させ、子葉鞘の伸長を調査した。子葉鞘の伸長は DSF の濃度依存的に抑制された。また、もう 1 つの ALDH の阻害剤であるシアナマイド (Cya) 水溶液にて冠水処理し、子葉鞘の伸長を調査した。Cya 水溶液においても Cya の濃度依存的に子葉鞘の伸長は抑制された。これらと ALDH2 タンパク質の蓄積パターンから、子葉鞘の伸長には ALDH2a が関わっていると考えられた。

ALDH2 がアセトアルデヒドを酢酸に酸化する際に、補因子として  $\text{NAD}^+$  が必要である。そこで、ミトコンドリア内で嫌気状態においても  $\text{NAD}^+$  が作り出される反応として、グルタミン酸脱水素酵素 (NADH-GDH) が触媒する 2 オキシグルタル酸をグルタミン酸に変える反応に着目した。この反応は同時に NADH を  $\text{NAD}^+$  に酸化する。データベースでイネ GDH 遺伝子の配列情報を検索したところ、イネの NADH-GDH はゲノム中に少なくとも 3 コピーが存在した。この情報を基に、冠水中、冠水解除後の子葉鞘における mRNA の蓄積量を調査した。その結果、2 コピーの mRNA が冠水条件下の子葉鞘に蓄積しており、残り 1 コピーの mRNA は冠水解除後の子葉鞘に蓄積していた。GDH の触媒する反応は可逆的だが、嫌気状態の子葉鞘では  $\text{NAD}^+$  ができる方向に反応が進んでいること、冠水中の子葉鞘では GDH の活性が増大することが知られており、これらと本研究での冠水条件下の子葉鞘における GDH mRNA の蓄積から、子葉鞘の伸長に、ALDH2 の触媒する反応に  $\text{NAD}^+$  を供給するという形で、GDH が関与している可能性が示唆された。

本研究により、植物のアセトアルデヒドの無毒化には、ALDH2a、ALDH2b の両方が寄与しており、イネ、タイヌビエはトウモロコシ、オオムギでは蓄積していない ALDH2a を持つことに

より、より冠水抵抗性が高められていると考えられた。また、冠水条件下における発芽時のイネ子葉鞘の伸長に、ALDH2a が関与していることが示唆された。