

論文内容の要旨

論文題目 Molecular and genetic studies of sugar metabolism and freezing tolerance
in *Arabidopsis thaliana*
(シロイヌナズナの糖代謝と耐凍性に関する分子遺伝学的研究)

氏名 矢野 亮一

< 序論 >

冷温耐性植物の多くは、凍らない程度の低温にさらされると凍結ストレスに対する耐性(耐凍性)を増大させる。この現象は低温馴化と呼ばれる。低温馴化は、植物が厳しい冬の凍結環境を生き抜くための環境順応であり、生理的に様々な変化(糖・アミノ酸の蓄積、生体膜組成の変化など)を伴うことが知られる。低温馴化過程で発現する低温応答性遺伝子は、こうした生理的变化を制御することにより耐凍性の増大に寄与すると考えられており、近年では、モデル植物シロイヌナズナを中心に、その転写制御機構について研究が進められ、低温シグナル伝達の全体像について理解が深まってきている。しかしながら、遺伝子と低温下で起こる多様な生理的变化、さらには耐凍性との関係については不明な点が多く、このため、低温馴化をより深く理解するためには、個々の生理的要因に着目した分子遺伝学的研究が必要である。シロイヌナズナでは、低温下における糖の蓄積は他の生理的要因に比べ速やかに起こることが知られるが、それがどのような分子機構で起こり、また耐凍性の向上とどのような関係にあるのか、を遺伝学的に解析した研究例は少ない。本研究では、多くの生理学的研究から耐凍性との間に量的相関が明らかにされているこの糖の蓄積に注目し、博士課程ではまず、暗所でのデンプン分解不全が既に報告されている *starch-excess 1 (sex1)* 変異体を用いた解析により、低温馴化におけるデンプン分解の重要性を明らかにした。次に、成熟葉において恒常的な耐凍性の増大と糖・デンプンの過剰蓄積を示す新規 T-DNA 挿入変異体、*freezing tolerant 1 (ftr1)* を単離し、変異の原因遺伝子を同定して解析した。

< 結果と考察 >

I. 低温馴化における α -glucan/water dikinase の解析

近年、暗所下の葉のデンプン分解で中心的因子として働く、 α -glucan/water dikinase (GWD) の遺伝学的・分子生物学的解析が進んでいる。この酵素は、ATP の β 位のリン酸基をアミロペクチンに転移する活性を持つが、直接デンプンを分解しない。しかし、GWD の機能を欠くシロイヌナズナ変異体 *sex1* は、デンプンのリン酸含量の低下と共に、暗所下においてデンプンを分解できないことが報告されており、このため、GWD によるリン酸化はデンプンの分解過程で必須であると考えられている(図 I-1)。本研究では、低温下での糖の蓄積におけるデンプン分解の重要性を探るため、シロイヌナズナ GWD/SEX1 の ATP 結合部位に変異を持つ既存の変異アリル *sex1-1* と、新規に取得した T-DNA 挿入アリル *sex1-7* (SALK_062752) を用いて解析を行った(図 I-2)。

はじめに、低温(2 °C)処理 24 時間以内における、成熟葉のデンプンと糖の蓄積量について調べたところ、野生株では 3 時間以内にデンプン蓄積量が減少し、同時にその分解産物であるマルトオリゴ糖 (MOS, *malto-oligosaccharides*) の蓄積が認められた(図 I-3A)。一方、*sex1* ではこの過程が制限されており、同時に、野生株に比べてグルコース(Glc)とフルクトース(Fru)の蓄積量が低下した(図 I-3B)。しかし、スクロース(Suc)の蓄積パターンは野生株と *sex1* で違いが無く(図 I-3B)、さらに、7 日間の低温処理後では、野生株と *sex1* の間で MOS やその他の糖の蓄積量には殆ど差異が認められなくなった(図 I-4)。従って、これらの結果から、GWD/SEX1 が関与するデンプン分解が、低温処理 1 日以内における葉の糖蓄積(Glc, Fru)に重要であることが分かった。

次に、低温処理の前後で野生株と *sex1* の成熟葉の耐凍性を電解質漏出法で比較した。その結果、*sex1* の電解質漏出度は未馴化状態では野生型と違いが無い(耐凍性に違いが無い)が、低温馴化 24 時間後では顕著に上昇する(耐凍性が低い)ことが分かった(図 I-5A, B)。一方、低温処理 7 日後の *sex1-7* は野生型に比べて同等の電解質漏出度を示し、*sex1* 変異が最大耐凍性には影響しないことが分かった(図 I-5C)。このような傾向は植物個体の凍結実験においても認められ、低温処理 24 時間後では *sex1* は野生株に比べて凍結傷害を受けやすい傾向が観察された(図 I-5D)。さらに、野生型 GWD/SEX1 の cDNA をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモータの下流に繋げ、*sex1-7* に導入すると、低温馴化時の耐凍性が野生型レベルに復帰した(図 I-5E)。従って、糖の蓄積の場合と同様に、GWD/SEX1 は低温馴化の早い段階(1 日前後)において重要であることが分かった。

sex1 における耐凍性変化の要因について調べるため、低温処理 24 時間前後の野生株と *sex1* の葉において、50% の電解質漏出を起こす温度(T_{EL50} 、耐凍性の指標)と糖の蓄積量の比較を行った。その結果、全糖、Glc, Fru で両者の量的相関が認められた(図 I-6)。従って、低温処理 24 時間後における *sex1* の耐凍性の減少は Glc, Fru 蓄積量の減少に起因することが考えられる。一方で、耐凍性に関係する低温シグナルおよびアブシジン酸シグナルのマーカー遺伝子、*COR78/RD29A*, *dehydrin-RAB18* の発現パターンは、*sex1-1* と野生株で違いが無かった(図 I-7)。以上の結果は、GWD/SEX1 が低温馴化の早い段階における糖の蓄積と耐凍性の増大に遺伝的に関係することを示しており、低温下での速やかなデンプン分解が、速やかな糖の蓄積と低温馴化の進行に重要であることを示している。

低温馴化での GWD/SEX1 の役割についてさらなる知見を得るため、低温処理による遺伝子発現の変化を RNA

ゲルブロット法によって調べた。その結果、*GWD/SEX1* 転写産物は低温処理 6 時間以降で顕著に増加することが分かった(図 I-8A)。しかし、デンプン分解はさらに早い時間(2 °C, 3 時間以内)に認められたこと、および、葉のタンパク質抽出液における *GWD* 活性は低温処理 12 時間目までほぼ一定であったこと(図 I-8B)から、*GWD/SEX1* は低温下での速いデンプン分解において制限的要因となるものの、制御要因は他にあることが示唆された。

今後は、低温下のデンプン分解における制御因子の同定と、*GWD* の下流の代謝経路について明らかにすることが重要であると考えられる。

II. 新奇耐凍性変異体 *freezing tolerant 1* の単離と解析

本研究では、シロイヌナズナの新しい耐凍性変異株を単離するために、脱馴化スクリーニング法を開発し、シロイヌナズナの T-DNA タギングライン(background Columbia)から、低温馴化後の脱馴化時に、野生株に比べ高い耐凍性を持つ *frt1* 変異体を単離し、解析した(図 II-1)。*frt1* は、野生株に比べ、常温下(未馴化状態)においても耐凍性の向上と糖の過剰蓄積を示したが、一方で、既知の耐凍性関連および糖代謝関連遺伝子の過剰発現や適合溶質プロリンの過剰蓄積は示さなかった(図 II-2, 3)。また、*frt1* はこの他に成熟葉の先端における赤色素の蓄積や著しい稔性の低下などを示した(図 II-4)。さらに、*frt1* における耐凍性の向上は、常に成熟した側の葉で顕著であり(図 II-5A)、糖の過剰蓄積も成熟葉で顕著であった(図 II-5B)。ヨウ素染色によると、*frt1* の葉は、葉齢に依存して、成熟葉においてデンプンを過剰蓄積しており(図 II-5C)、したがって、*frt1* では常温での糖転流に関わる何らかの機能が欠失しており、その結果、成熟葉における糖・デンプンの過剰蓄積や耐凍性の向上、その他の表現型が観察される可能性が考えられた。

TAIL-PCR 法により *frt1* の T-DNA 挿入位置を決定したところ、機能未報告の遺伝子 At5g04310 に T-DNA 挿入があることが分かった(図 II-6A)。At5g04310 の変異が *frt1* 変異の原因であるかを調べるため、別の T-DNA 挿入株、SALK_115982(*frt1-2*)を取得し解析すると同時に、At5g04310 のみを含む野生型ゲノム DNA 断片(*gFRT1*, 6.5 kb)の導入による変異の相補を試みた。その結果、*frt1-2* は既存の *frt1-1* と同様に、ホモ接合体では At5g04310 の mRNA が検出限界以下であり、*frt1-1* と同一の変異形質を示すことが分かった(図 II-6B, II-7)。また、*frt1-1* と *frt1-2* の交配で生じた F₁ 植物についても、*frt1-1* と同一の変異形質が認められた。一方、*frt1* バックグラウンドで *gFRT1* を導入された植物(*frt1 gFRT1*)では表現型(耐凍性、糖・デンプンの蓄積、稔性など)の復帰が認められた(図 II-7)。従って、これらの結果から、*frt1* 変異の原因遺伝子が At5g04310 であることが分かった。

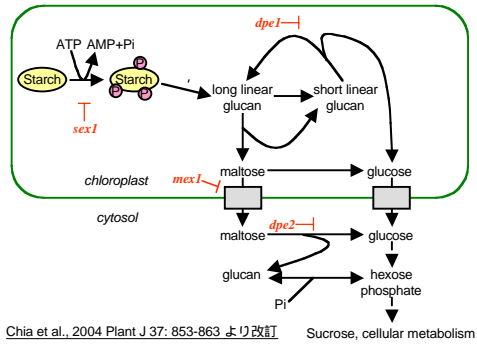
完全長 cDNA 配列から予想される *FRT1* タンパク質アミノ酸配列を Web 上のデータベースと照合したところ、酵素活性が報告されている植物由来のペクチンリアーゼ(E.C.4.2.2.2)と高い相同性が確認された(図 II-8)。これらの酵素は、細胞壁を構成するペクチン質のポリガラクトuron酸を分解する活性を持つ。また、*FRT1* はシロイヌナズナでは 27 個の遺伝子から構成される遺伝子ファミリーのメンバーであった。これらのうち、*FRT1* と最もアミノ酸配列の相同性が高い POWDERY MILDEW RESISTANCE 6 (PMR6)は、変異体においてウドンコ菌耐性を持つことが既に報告されていたが、*pmr6-1* を取得し解析すると *frt1* 様の表現型は観察されなかった(図 II-9)。従って、*FRT1* を含め、ペクチンリアーゼファミリーでは個々のメンバーが機能的に多様化している可能性が示唆された。

次に、*FRT1* の遺伝子発現部位特異性を調べるため、*FRT1* プロモータ(転写開始点上流約 2 kb)の下流に β -glucuronidase (GUS) レポーター遺伝子を結合したキメラ遺伝子(*FRT1*promoter:*GUS*)を作成し、これを野生株に導入して解析した。その結果、*FRT1*promoter:*GUS* 植物では、GUS 活性は葉脈(篩部)に沿って認められ、葉の発達に伴って葉身の先端から基部へ向けて拡がること分かった。(図 II-10A, 10B)。このパターンは、一般的に知られる葉のソース化(葉脈の sugar export 能力獲得など)のパターンと一致している。一方、根や花では GUS 活性は検出されなかった。また、RNA ゲルブロット解析から、*FRT1* の遺伝子発現が低温処理で抑制されることが分かり、*FRT1* と低温馴化プロセスとの関連性が示唆された(図 II-10C)。

以上の結果は、*FRT1* の機能が、本質的には、葉のソース化に伴う葉脈の糖輸送能力の獲得に関係することを示している。*FRT1* は、維管束細胞およびその周辺細胞の細胞壁(ペクチン質)を分解することにより、効率的な糖転流を促していると考えられる。今後、シロイヌナズナの糖輸送経路において *FRT1* がどのような役割を担っているのかを明らかにすることで、常温下での糖転流の分子機構を明らかにするだけでなく、低温馴化における糖転流の制御についても理解を深められると考えられる。

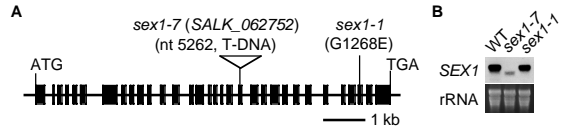
<まとめ>

- 1) *GWD/SEX1* が関与するデンプン分解が、低温馴化における速やかな糖の蓄積と耐凍性の向上に寄与することを遺伝的に明らかにした。
- 2) *GWD/SEX1* が低温応答性遺伝子であることを明らかにした。
- 3) 成熟葉において糖の過剰蓄積と耐凍性の向上を示す *frt1* 変異体を単離した。
- 4) *frt1* 変異の原因遺伝子を同定し、*FRT1* がペクチンリアーゼ様タンパク質をコードすることを明らかにした。
- 5) *FRT1* が葉脈(篩部)において発現することを明らかにし、糖転流との関連性を示した。
- 6) *FRT1* の転写産物蓄積が低温で減少することを見出し、低温馴化との関連を示唆した。

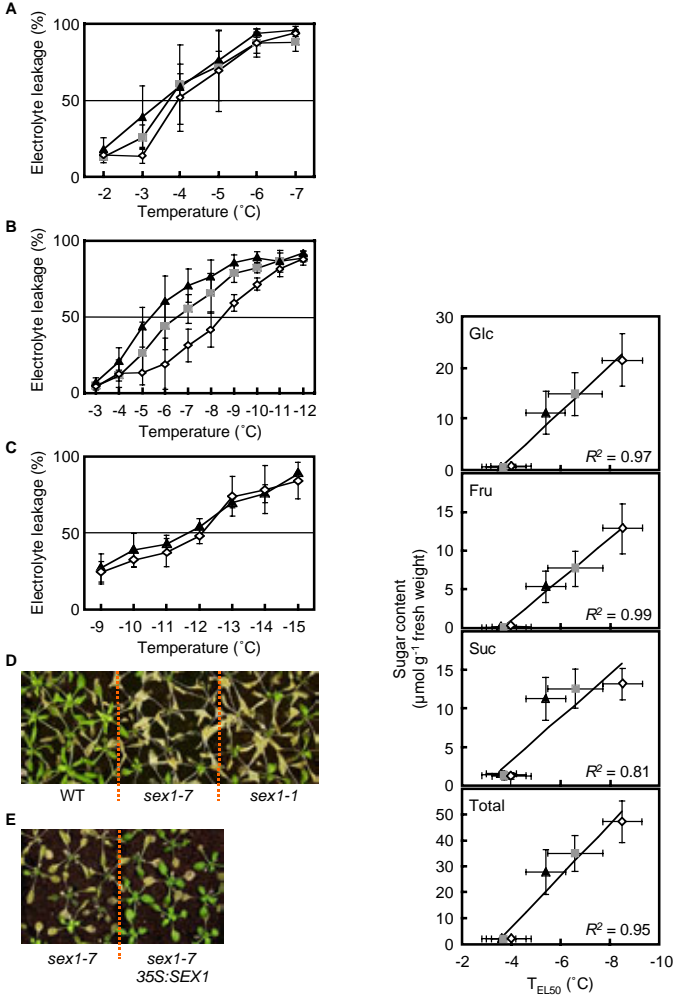


Chia et al., 2004 Plant J 37: 853-863 より改訂 Sucrose, cellular metabolism

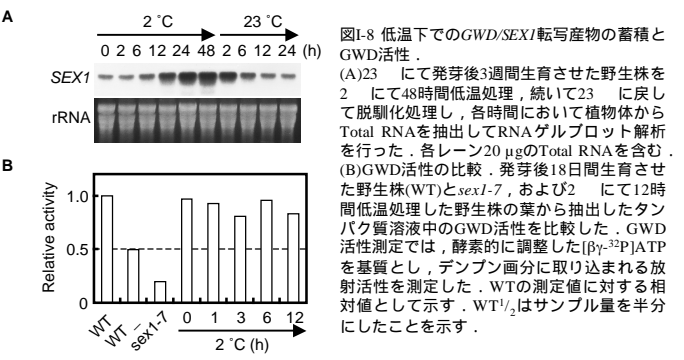
図I-1 シロイヌナズナにおける暗所下の葉のデンプン分解代謝経路。番号は酵素活性あるいは相同性遺伝子配列が報告されていることを示す。オレンジの小文字と線はその遺伝子の変異と効果が報告されていることを示す。α-glucan/water dikinase, isoamylase, α-amylase, β-amylase, disproportionating enzyme (D-enzyme), α-glucosidase, maltose transporter, glucose transporter, cytosolic D-enzyme, cytosolic glucan phosphorylase. *sex1*: *starch excess 1*; *dpe1*, 2: *disproportionating enzyme 1, 2*; *mex1*: *maltose excess 1*.



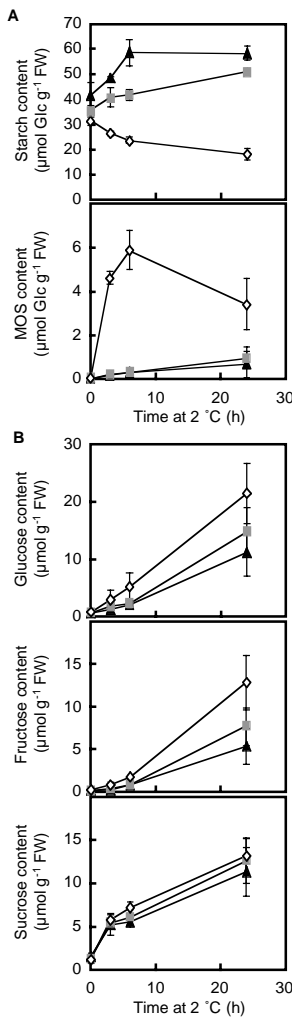
図I-2 GWD/SEX1遺伝子構造と*sex1*における転写産物蓄積。(A) GWD/SEX1(*At1g10760*)の遺伝子構造。エクソンを黒いボックスで示す。*sex1-1*は塩基置換により1268番目のアミノ酸に置換を生じている。*sex1-7*は20番目のエクソンにT-DNA挿入を持つ。(B) *sex1*におけるGWD/SEX1の転写産物蓄積。各レーンはそれぞれのTotal RNAを20 μg含む。*sex1-7*では、野生株と*sex1-1*よりサイズがやや小さい位置に転写産物が検出される。



図I-5 *sex1*の低温処理による耐凍性の変化。23 °Cにて発芽後18日間生育させた植物の耐凍性を、低温処理の前後で比較した。(A,B,C) 野生株(○), *sex1-1*(□), *sex1-7*(△)を2 °Cにて0時間(A), 24時間(B), 168時間(C)低温処理し、成熟葉(3葉-5葉)の耐凍性を凍結電解質漏出法により調べた。各凍結温度での凍結融解後に純水中に電解質が漏出しやすいほど組織が傷害を受けていることを示す。(D) 2 °Cにて24時間低温処理した植物を凍結処理(-9.0 °C, 10 h)し、融解(4 °C, 24 h)後、23 °Cに戻してリカバリーさせた。写真は処理後3日目の様子を示す。(E) 野生型*SEX1*のcDNAを導入した*sex1-7*(*sex1-7 35::SEX1*)の耐凍性を親株と比較した。凍結処理の条件は(D)に同じである。

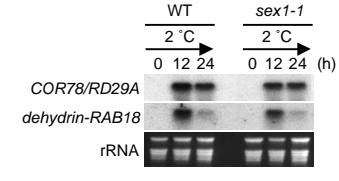


図I-8 低温下でのGWD/SEX1転写産物の蓄積とGWD活性。(A) 23 °Cにて発芽後3週間生育させた野生株を2 °Cにて48時間低温処理、続いて23 °Cに戻して脱馴化処理し、各時間において植物体からTotal RNAを抽出してRNAゲルブロット解析を行った。各レーン20 μgのTotal RNAを含む。(B) GWD活性の比較。発芽後18日間生育させた野生株(WT)と*sex1-7*、および2 °Cにて12時間低温処理した野生株の葉から抽出したタンパク質溶液中のGWD活性を比較した。GWD活性測定では、酵素的に調整した[γ-³²P]ATPを基質とし、デンプン画分に取り込まれる放射活性を測定した。WTの測定値に対する相対値として示す。WT^{1/2}はサンプル量を半分にしたことを示す。



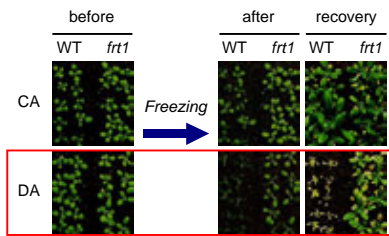
図I-3 葉における低温処理24時間以内の糖含量の変化。23 °C連続光(65 μmol m⁻² s⁻¹)で18日間生育させた野生株(○), *sex1-1*(□), *sex1-7*(△)を2 °C連続光(35 μmol m⁻² s⁻¹)にて24時間低温処理し、それぞれの成熟葉(3葉-5葉)における糖含量の変化を調べた。(A) デンプン、全マルトオリゴ糖(MOS)含量の変化。それぞれ75%(v/v)エタノール不溶性、可溶性画分において、デンプン含量はα-アミラーゼ、アミログルコシダーゼ処理で、MOS含量はアミログルコシダーゼ処理で生成するグルコース量として定量している。グルコースの定量はグルコースオキダーゼ(GOD)法を用いた。(B) グルコース、フルクトース、スクロース含量の変化。定量はHPCE(high-performance capillary electrophoresis)により行った。

図I-4 低温処理7日後の成熟葉における糖含量。23 °Cにて発芽後18日間生育させた野生株(白)および*sex1-7*(黒)を2 °Cにて7日間低温処理し、成熟葉(3葉-5葉)における糖含量を調べた。(A) デンプン、マルトオリゴ糖(MOS)含量。(B) グルコース、フルクトース、スクロース含量。

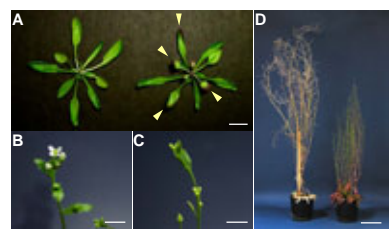


図I-7 低温、アブシジン酸応答性遺伝子の発現解析。23 °Cにて発芽後18日間生育させた野生株(WT)と*sex1-1*を2 °Cにて0, 12, 24時間低温処理し、Total RNAを抽出してRNAゲルブロット解析を行った。耐凍性に関連する低温シグナルおよびアブシジン酸シグナルのマーカー遺伝子として、それぞれCOR78/RD29A(*Cold-regulated 78/Responsive to dehydration 29A*), *dehydrin-RAB18*を用いた。各レーン20 μgのTotal RNAを含む。

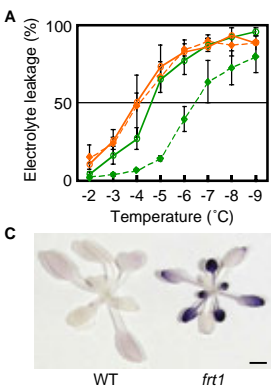
図I-6 耐凍性と糖含量の比較。低温処理24時間の前・後で、野生株(○), *sex1-1*(□), *sex1-7*(△)の成熟葉における耐凍性(よこ軸)と糖含量(たて軸)の相関を調べた。耐凍性の指標として50%の電解質漏出を起こす温度(T_{EL50})を用いた。図I-5のグラフから算出した。R₁値は近似直線の回帰係数を示す。



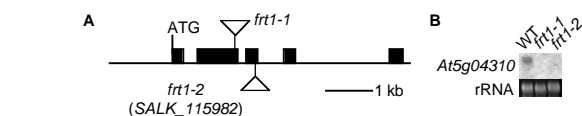
図II-1 耐凍性変異株*frt1*の選抜.
23 連続光(65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)で14日間生育させた植物を2 連続光(35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)にて2日間低温馴化(CA)し、続く脱馴化(23 $^{\circ}\text{C}$, DA)1日後に凍結処理(-7.5 $^{\circ}\text{C}$, 10 h)して、耐凍性の高い変異株を選抜した(赤枠). この条件では野生株の耐凍性は脱馴化処理により未馴化状態に戻る. 変異株(*frt1*)は耐凍性の向上により傷害が少ない. 凍結実験の対照として、低温馴化のみの場合(CA)を示す.



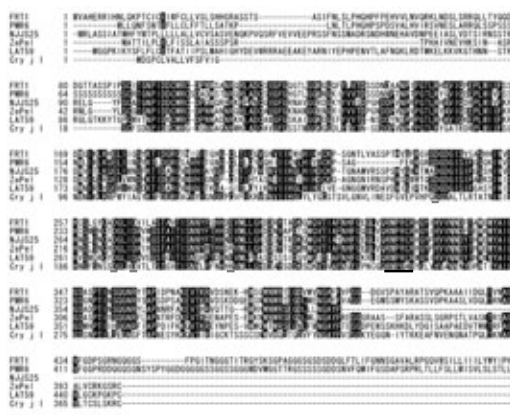
図II-4 *frt1*のその他の表現型.
(A)発芽後18日目の野生株(左)および*frt1*(右)のロゼット. *frt1*では齢を経た葉において、その先端部に赤色素の蓄積が見られる(黄矢頭). (B,C)野生株(B)および*frt1*(C)の花の様子. *frt1*の花は未成熟であり、稔性の低下が見られる. (D)発芽後連続光で5日目の野生株(左)と*frt1*(右). スケールバーは1 cm(A), 5 mm(B,C), 5 cm(D).



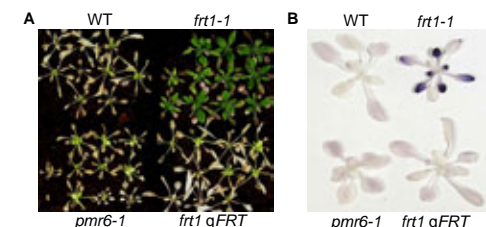
図II-5 成熟葉に特徴的な*frt1*の耐凍性と糖・デンプンの蓄積.
(A)23 にて発芽後18日間生育させた野生株()と*frt1*()の、成熟葉(3葉から7葉, 緑)および幼若葉(8葉以上の葉, オレンジ)における耐凍性を凍結電解質漏出法で測定した. (B)(A)と同様に葉齢別に葉を切り取り、それぞれの糖含量を測定した. 野生株(白), *frt1*(黒). (C)ヨウ素溶液によるデンプンの染色. 発芽後18日目の植物体を80%エタノールで脱色後、ヨウ素溶液に浸した. スケールバー: 5 mm.



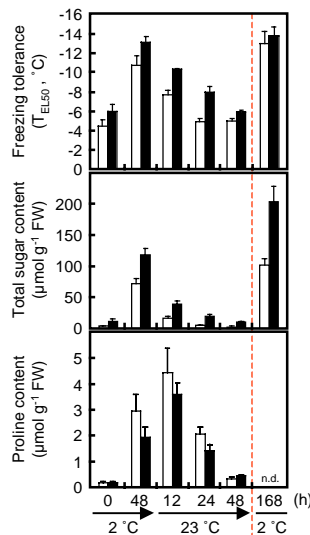
図II-6 *At5g04310*(*FRT1*)遺伝子構造と*frt1*における転写産物蓄積.
(A) *At5g04310*(*FRT1*)遺伝子構造. エクソンを黒い四角で示す. トライアングルはT-DNA挿入を示す. (B) *FRT1*転写産物の蓄積. *frt1-1*および*frt1-2*(*SALK_115982*)では転写産物が検出限界以下である. 各レーン30 μg のTotal RNAを含む.



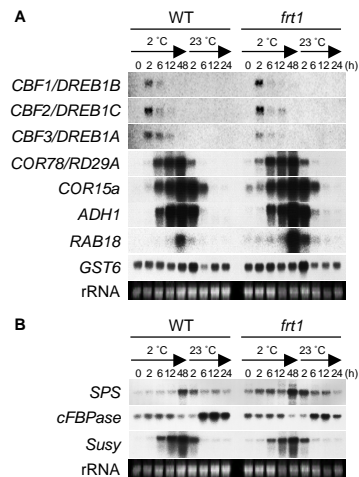
図II-8 ペクチナーゼとFRT1のアライメント.
FRT1と植物由来ペクチナーゼのタンパク質アミノ酸配列アライメント. 予想される Ca^{2+} 結合部位と活性部位をそれぞれ灰色, 黒色のアンダーラインで示す. ヒヤクニソウZePeI, ストロベリーNJS25, 日本スギCry I はペクチナーゼ活性が報告されている.



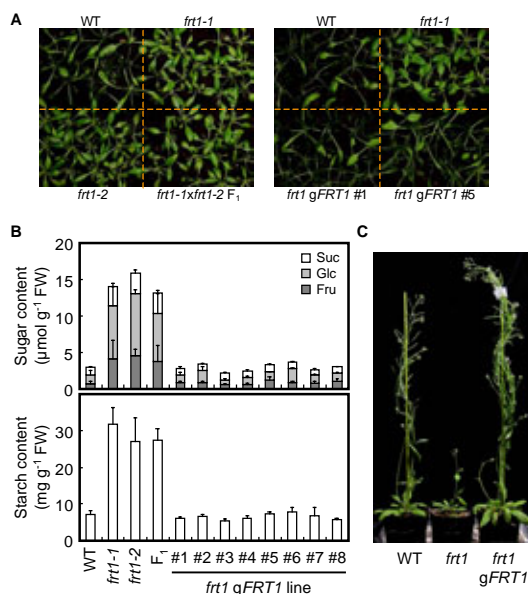
図II-9 *pmr6*の耐凍性とデンプン蓄積.
(A)発芽後18日目の野生株(WT), *frt1-1*, *pmr6-1*, *frt1 gFRT1*の耐凍性を比較した. 植物は低温処理48時間と脱馴化処理24時間の後、凍結処理(-7.5 $^{\circ}\text{C}$, 10 h)した. 写真は凍結融解後7日目の様子を示す. (B)発芽後18日目におけるデンプンの蓄積をヨウ素溶液で染色して調べた. どちらの場合も, *pmr6-1*は*frt1*様の表現型を示さない.



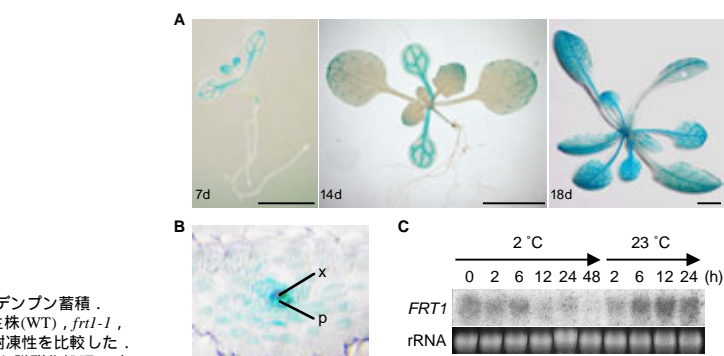
図II-2 *frt1*の耐凍性および糖, プロリン含量.
23 にて発芽後14日間生育させた野生株(白)と*frt1*(黒)を, 低温処理(2 にて0, 48, 168 h), あるいは低温処理48時間後に脱馴化処理(23 にて12, 24, 48 h)して、それぞれの耐凍性, 糖含量, プロリン含量を調べた. 耐凍性は, 50%の電解質漏出を起こす凍結温度($T_{50\%}$)を測定結果から算出した. 糖含量はグルコース, フルクトース, スクロース含量の和としている. 糖の定量はHPCEを用いて行った. プロリンの定量は, HPLC(high-performance liquid chromatography)により行った.



図II-3 *frt1*におけるストレス応答性遺伝子および糖代謝関連遺伝子の転写産物蓄積.
23 にて発芽後18日間生育させた野生株(WT)と*frt1*を, 2 にて48時間低温処理し、続いて23 にて24時間脱馴化処理した. 各時間において植物体からTotal RNAを抽出し, ストレス応答性遺伝子(A), 糖代謝関連遺伝子(B)のRNAゲルプロット解析を行った. 各レーン20 μg のTotal RNAを含む. (CBF/DREB1: C-repeat binding factor/Dehydration responsive element binding protein 1, COR78/RD29A: Cold-regulated 78/Responsive to dehydration 29A, COR15a: Cold-regulated 15a, ADH1: Alcohol dehydrogenase 1, RAB18: Responsive to ABA 18, GST6: Glutathione S-transferase 6, SPS: Sucrose-phosphate synthase, cFBPase: cytosolic fructose 1,6-bisphosphatase, Susy: Sucrose synthase.)



図II-7 野生型*gFRT1* DNA断片による*frt1*の相補試験.
*At5g04310*野生型*gFRT1* DNA断片(約6.5kb, *gFRT1*)を導入した*frt1-1*および*frt1-2*(*SALK_115982*)の表現型を示す. (A)植物個体の耐凍性試験. 発芽後18日目の植物体を, 低温処理48時間, 脱馴化処理24時間の後, 凍結処理(-7.5 $^{\circ}\text{C}$, 10 h)した. 写真は解凍後の様子を示す. 耐凍性が正常の植物の葉は深緑色を呈し萎れる傾向がある. (B)成熟葉(第3葉から第5葉)における糖とデンプンの蓄積量. (C)発芽後4日目植物の様子.



図II-10 *FRT1*遺伝子発現の部位特異性と低温応答性の解析.
(A, B) *FRT1* promoter: *GUS*形質転換植物におけるレポーター(*GUS*)活性. *GUS*活性は葉脈(篩部)に沿って検出され, 葉の先端から基部に向けて広がる. x, xylem; p, phloem. スケールバー: 5 mm(A), 50 μm (B). (C)低温処理, 脱馴化処理による*FRT1*転写産物量の変化. *FRT1*の転写産物は低温処理(2 に対応して減少し, その後の脱馴化処理(23 にて)で元に戻る. 各レーン30 μg のTotal RNAを含む.