

論文内容の要旨

論文題目 Analysis of rice overexpressing *Hm1* like gene
 (*Hm1* 様遺伝子過剰発現イネの解析)

氏名 林 光紀

序論

糸状菌である北方斑点病菌(*Cochliobolus carbonum*)は、トウモロコシの病原菌として大きな被害をもたらすことが知られている。トウモロコシの *Hm1* 遺伝子は NADPH 依存性 HC-toxin 還元酵素(HCTR)をコードし、この菌の生産する HC-toxin を還元し無毒化することがわかっている(Johal and Briggs, *Science* 1992)。当研究室ではイネから *Hm1* 様遺伝子(YK1)を得た(Hihara et al., *Plant Biotechnol.*1997)。さらに、YK1 を過剰発現させたイネは、紫外線や冠水ストレス条件下で耐性を示した(Uchimiya et al., *Mol. Breeding* 2002)。また、オオムギなどのイネ科植物にも *Hm1* 様遺伝子の存在が報告されている(Han et al., *Mol. Plant-Microbe Interact.*1997)。しかしながら、北方斑点病菌はトウモロコシ以外のイネ科の植物には感染しないことからイネ *Hm1* 様遺伝子の機能については不明であった。そこで私は博士課程において、*Hm1* 様遺伝子の過剰発現イネを用いて *Hm1* 様遺伝子の生化学的機能を明らかにした。

結果と考察

1 . *Hm1* 様遺伝子(YK1)形質転換イネのストレス耐性の解析

YK1 過剰発現体に過酸化水素等の処理を行いストレス応答の解析を行った。エバンスブルーによる生死染色やストレス処理後の経時的なイオン漏出の測定を行った。その結果、形質転換体(L-1 と L-2)は過酸化水素(図 1)、塩、スクロース飢餓の各ストレスに対して耐性を示した。さらに、イネに感染する病原菌への抵抗性を解析したところ、柔組織病であるイネ褐条病菌(*Acidovorax avenae* subsp.

avenae)の病斑拡大を抑制することがわかった。これらの結果から YK1 はストレス耐性に関わる機構に深く関与する可能性が示唆された。

2. YK1 タンパク質の特性の解析

YK1 が HCTR 活性を有しているかどうかを植え継ぎ後 5 日目のイネカルス、及び播種後 7 日目の植物体を用い、NADPH 存在下での HC-toxin の還元活性を測定することにより解析した。その結果、カルス、植物体共に YK1 過剰発現体(L-1 と L-2)で有意に HCTR 活性の増加が検出された(表 1)。

近年のイネゲノムの遺伝子データの公表により YK1 遺伝子がシナモイル-CoA 還元酵素(CCR)遺伝子、及びジヒドロフラボノール還元酵素(DFR)遺伝子と相同性を持つことを見出した。CCR はリグニン合成系で働く酵素で、NADPH 存在下で 4-ヒドロキシシナモイル-CoA、フェルロイル-CoA、シナポイル-CoA を還元する。一方、DFR はフラボノイド合成系の 1 つであるアントシアニン合成系で働く酵素であり、NADPH 存在下でジヒドロクエルセチン、ジヒドロミリセチン、ジヒドロケンペロールをロイコアントシアニンに還元する。

細胞内の CCR 活性とリグニン量に変化は見られなかったため、YK1 のリグニン合成系への関与はないものと考えられたが、アントシアニン合成系の中でジヒドロクエルセチンからロイコシアニジンが生成する反応系を用いて DFR 活性の測定を行ったところ、カルス、植物体共に YK1 過剰発現体で有意に DFR 活性の増加が検出された(表 1)。さらに、アントシアニジンの 1 つであるデルフィニジン量、及びアントシアニン量共に YK1 過剰発現体で有意な増加が検出された。

YK1 タンパク質が実際に DFR 活性を有しているかどうかを調べるため、YK1 を GST との融合タンパク質として大腸菌内で発現させ、精製し *in vitro* での DFR 活性の検出を NADPH の酸化反応を用いた方法で試みた結果、YK1 は DFR 活性を有することが明らかとなった。また、DFR による反応産物(ロイコシアニジン)量を、キャピラリー電気泳動質量分析装置(CE-MS)を用いて測定した。CE-MS は物質の電気浸透流中の移動度の違いを利用してキャピラリー中でイオン成分の分離を行い、溶液試料中のイオン成分の同定、定量を行うものである。その結果、本手法によりジヒドロクエルセチンから生成されるロイコシアニジンを検出した(図 2)。YK1 が HCTR 活性のみならず DFR 活性も有していたことから YK1 が抗酸化剤としての機能を持つアントシアニン合成系に関わっている可能性が示唆された。そこでこれ以後 YK1 を OsDFR/HCTR と定義した。

3. 形質転換体における NAD(P)合成系の解析

YK1 (OsDFR/HCTR)の過剰発現による細胞内の代謝物変化を見る上で、酵素活性が NADPH 依存적であるということから、細胞内のニコチンアミド補酵素に注目し NAD(H)、NADP(H)の定量を行った。NAD と NADH はアルコール脱水素酵素によるエタノールからアセトアルデヒドへの酸化反応、NADP と NADPH はグルコース-6-リン酸脱水素酵素によるグルコース-6-リン酸から 6-ホスホグルコノラクトンへの酸化反応を用い、チアゾリルブルー(MTT)の還元による吸光度変化により測定した。その結果、形質転換体ではニコチンアミド補酵素量が有意に増加していた(図 3)。

NAD 及び NADP の合成には 2 つの回路が知られている。すなわち、Deamido-NAD から NAD の合成経路と NMN から NAD の合成経路である。形質転換体における NAD synthetase、NMN adenylyltransferase (NMNAT)、及び NAD kinase の活性測定を行った。NAD synthetase では Deamido-NAD、NMNAT の場合は NMN、NAD kinase では NAD と、異なる反応の前駆体を用いた。その結果、NAD synthetase、NAD kinase 活性が形質転換体で有意に増加していた(図 4)。ノーザン解析の結果、NAD

synthetase と NAD kinase の mRNA の蓄積量に差は見られなかったことから、遺伝子の転写以降の過程で何らかの機構を介して酵素の活性が上昇したことが示唆された。ここまでの結果から、DFR としての機能を有する YK1 が増加したことによりアントシアニン合成系が活性化され、さらに反応で使われるニコチンアミド補酵素の合成系の活性化が起こり、これが協調することでストレス耐性を獲得したものと考えられた(図 5)。

4 . *Hm1* 変異体の解析

YK1 が HCTR だけではなく DFR 活性も有していたことから、トウモロコシ変異体(*Hm1hm2* と *hm1hm2*) を用いて、DFR 活性、及びアントシアニン量の測定を行ったところ、*Hm1* 変異体(*hm1hm2*)で活性、量共に減少していた。さらに植物体(播種後 14 日目)に過酸化水素処理を行いイオン漏出を調べた。その結果、*Hm1* 変異体はストレスに感受性を示した(図 6)。また、ニコチンアミド補酵素量も *Hm1* 変異体で減少していた。これらの結果は YK1 過剰発現体における結果と正反対であり、トウモロコシ *Hm1* も YK1 と同様に DFR としての機能を有していることが示唆された。

5 . *DFR* 遺伝子欠損イネの解析

本研究において、イネゲノム中には *DFR* 様遺伝子が 8 つ(AK099770, AB003496, AK059518, AK072654, AK067955, AK071832, AK106089, AK067272)存在することを見出した。さらに、ノーザン解析によりこのうち 5 つ(AK099770, AB003496, AK059518, AK072654, AK067272)が実際に発現していることが明らかになった。これらのイネ *DFR* 遺伝子の 1 つ(AB003496; Nakai et al., *Plant Biotechnol.* 1998)が欠損したイネ(Taichung 65; T65)と、T65 にこの *DFR* 遺伝子を戻し交配により導入したイネ(T65:DFR)を用いてアントシアニン合成系の変化、及びストレス耐性に対する解析を行った。その結果 *DFR* 遺伝子欠損イネでは DFR 活性の減少及びアントシアニジンの 1 つであるシアニジン量の減少が検出された。また、播種後 14 日目の植物体に過酸化水素処理を行いイオン漏出を調べたところ、*DFR* 遺伝子欠損イネではストレスに感受性を示した。これらの結果より *DFR* が過酸化水素ストレスに対する防御機構に関わっていることが明らかになった。

今後は、YK1 の過剰発現とニコチンアミド補酵素合成系の上昇との詳細な相関機構について調べていきたい。さらに、今回 YK1 が DFR としての機能を有していることは明らかになったが、イネにおいてこの他の基質還元能力の有無についても解明を行いたい。また、トウモロコシ *Hm1* も DFR ファミリーに入ると考えられたことからトウモロコシにおける *Hm1* の機能の詳細についても解析を行いたい。

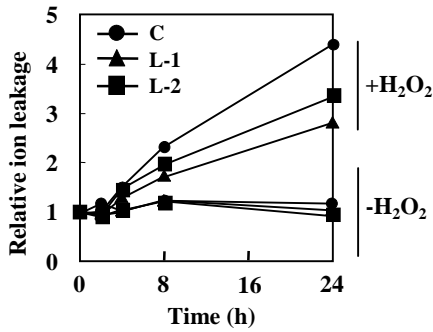


図1 ストレス誘導性細胞死の解析
植物体を過酸化水素処理し、2-24時間後にイオン漏出を測定した。

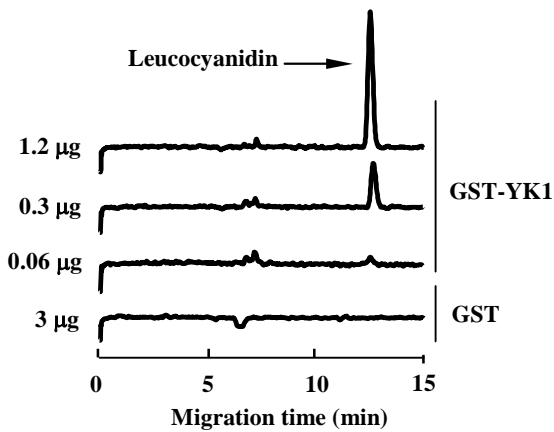


図2 CE-MSによるDFR反応生成物の検出
GST-YK1融合タンパク質を用いてDFR活性の測定を行い、反応生成物としてロイコシアニジンを検出した。

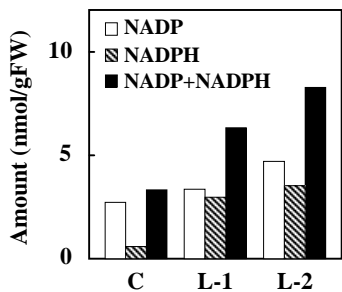


図3 ニコチンアミド補酵素の定量
液体培養細胞を用いてニコチンアミド補酵素量の測定を行った。

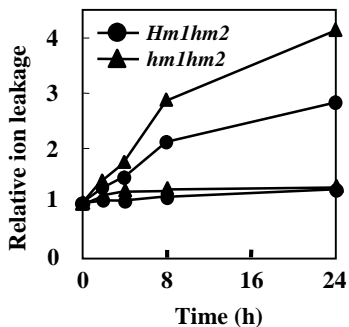


図6 Hm1変異体(トウモロコシ)を用いた解析
播種後14日目の植物体(Hm1hm2/hm1hm2)に過酸化水素処理を行った。2-24時間後にイオン漏出を測定した。

Samples	Specific activity [unit/mg protein]	
	DFR (%)	HCTR (%)
Calli		
C	0.042 ± 0.009 (100)	0.025 ± 0.008 (100)
L-1	0.103 ± 0.024 (245)	0.082 ± 0.038 (328)
L-2	0.155 ± 0.069 (369)	0.065 ± 0.032 (260)
Plants		
C	0.202 ± 0.025 (100)	0.047 ± 0.013 (100)
L-1	0.349 ± 0.033 (173)	0.099 ± 0.020 (211)
L-2	0.268 ± 0.030 (133)	0.085 ± 0.025 (181)

C ; ベクターのみのコントロール
L-1, L-2 ; YK1過剰発現体

表1 DFR及びHCTR活性の比較
液体培養細胞、及び植物体におけるDFR及びHCTR活性の比較。カッコ内はベクターコントロールの値を100とした相対値

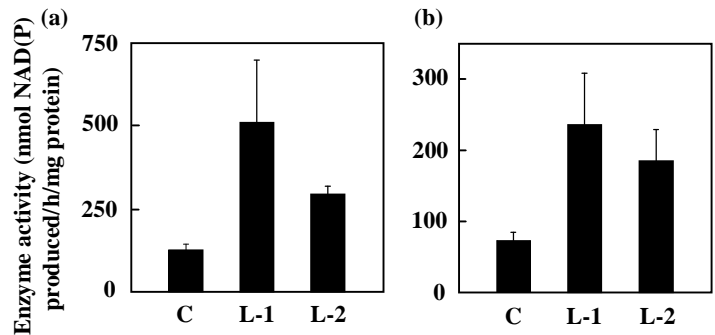


図4 NAD(P)合成に関する酵素活性の比較
植物体(播種後7日目)におけるNAD synthetase (a)とNAD kinase (b)の活性測定結果を示す。

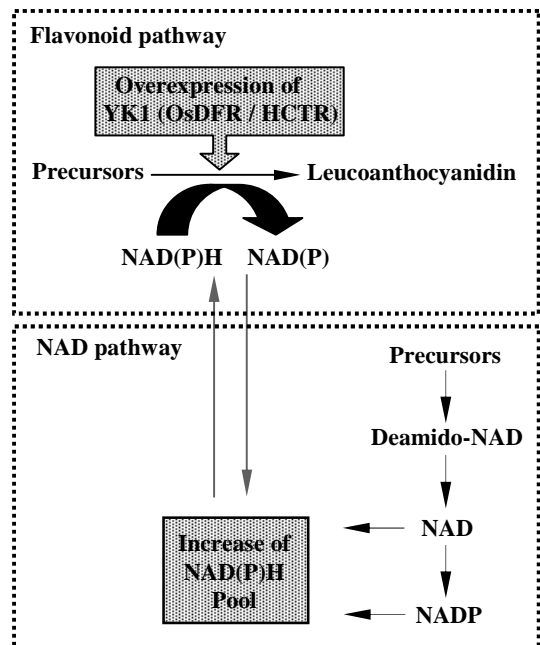


図5 形質転換体におけるフラボノイド合成系とNAD(P)合成系の協調的作用機構のモデル図
YK1の過剰発現により、フラボノイド合成系の活性化、及びNAD(P)合成系の活性化が起こる。2つの系が協調的に働くことでストレス耐性が付与されたものと考えられる。