

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 15 年度博士課程 進学  
氏 名 木村 智子  
指導教員名 米山 忠克

論文題目 硫黄栄養応答に異常を示すシロイヌナズナ変異株の解析

硫黄は全生物にとって必須な元素であり、アミノ酸(Cys、Met)やビタミン、補酵素、グルタチオン(GSH)、フェレドキシン等の構成成分として重要な役割を担っている。高等植物において、硫黄は硫酸イオンとして環境中から吸収され、一連の還元・同化過程を経てシステイン、さらにメチオニンが生成される。硫黄の吸収や代謝経路で機能するトランスポーターや酵素は数多く同定され、これらの多くが硫黄欠乏(-S)により発現誘導されることが示されている。

植物を-Sにさらすと、遺伝子発現誘導だけでなく、代謝産物が変動する。O-アセチルセリン(OAS)量は上昇し、GSHやCys量が減少する。また、OAS及びGSHは硫黄欠乏応答をそれぞれ正及び負に制御するシグナル物質と考えられている。しかしながら、細胞内の硫黄シグナル物質を感知し伝達する機構は植物では未解明である。本研究では、高等植物における硫黄応答制御機構を解明するために、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を実験植物として用いて二つのアプローチから研究を行った。

一つ目は、他生物で既に同定されている硫黄応答制御因子の、シロイヌナズナにおける相同遺伝子の解析である。大腸菌や酵母、藻類などでは既に硫黄応答制御因子が同定されている。特に、クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)は、光合成生物のモデルとされ、高等植物と生理機能が似ていると考えられている。クラミドモナスの硫黄応答制御因子Sac3の、シロイヌナズナにおける相同遺伝子について、遺伝子欠損変異株を用いた解析を行った。二つ目は、硫黄応答に異常を示すシロイヌナズナ変異株の解析であり、硫黄応答異常の原因遺伝子の同定を試みた。

## 1. シロイヌナズナにおける *Sac3* 相同遺伝子欠損変異株の生理解析

クラミドモナスの硫黄応答制御因子 *Sac3* が欠損した *sac3* 変異株では、-S 誘導性のアリルスルファターゼが +S で構成的に発現し、-S でも硫酸吸収能が十分に上昇しない。*Sac3* 遺伝子は serine/threonine kinase をコードし、植物の type 2 snf1-related protein kinase (SnRK2) ファミリーに属している。データベースによる相同性検索の結果、*Sac3* とアミノ酸配列が 60%以上同一の、あるいは性質の似ているシロイヌナズナの遺伝子は 10 個 (SnRK2.1-SnRK2.10) 存在し、いずれも SnRK2 ファミリーに属していた。SnRK2 は乾燥、塩、浸透圧、アブシジン酸の応答に関与し、これらのストレス環境下で発現誘導されると報告されているが、10 個のうち少なくとも 5 個は -S あるいは OAS 添加でも mRNA レベルの発現が誘導されることを確認した。そして、発現誘導を受けた SnRK2 のうちのひとつ、SnRK2.3 (相同性 67%) について詳細な解析を行った。

3 系統の独立した *snrk2.3* 変異株においてはいずれも、-S による硫酸トランスポーター *Sultr2;2* の発現誘導が見られず、-S における OAS の濃度も野生型株よりも増加していた。これらの結果は、*SnRK2.3* 遺伝子が -S 応答における硫酸トランスポーター *Sultr2;2* の発現および OAS の蓄積を制御していることを示唆している。

以上の結果は、シロイヌナズナの SnRK2.3 が乾燥、塩、浸透圧以外にも -S のストレス応答にも関与することを示すとともに、クラミドモナスとシロイヌナズナとの間で進化の過程で硫黄応答制御機構が保存されている可能性を提唱するものである。

## 2. シロイヌナズナにおける *O*-acetyl-L-serine 非感受性変異株の生理学および遺伝学的解析

NOB (Naoko-Ohkama-beta) は、作成者の名前に因んで命名された形質転換シロイヌナズナ系統であり、以下に述べる硫黄応答領域  $SR$  を含むキメラプロモーターに GFP を連結した融合遺伝子を発現させた植物である。 $SR$  は、ダイズの主要な種子貯蔵タンパク質である コングリシニン サブユニットのプロモーターの -307bp から -73bp までの 235bp の領域であり、この領域は種子における硫黄欠乏応答に十分な領域であり、OAS や GSH にも応答することが分かっている。NOB 植物は、-S および OAS 添加によって地上部でも根でも GFP 蛍光を発するため、-S 応答を簡単に可視化することができる。

NOB (以下 wild type [WT] とする) を EMS 処理して得られた M2 種子を用いたスクリーニングの結果、硫黄十分条件 (+S) でも GFP 蛍光を発する、あるいは -S で GFP 蛍光強度が低下した変異株が当研究グループにより多数単離され、原因遺伝子が同定されてきた。こうした変異株の他に、より硫黄応答特異的に機能する遺伝子を同定するために、OAS を添加しても GFP 蛍光を発しない変異株 *oda* (OAS decreased accumulation) が複数単離された。このうちの 3 つの

変異株、*oda1-1*、*oda2-1*、*oda3-1* について、本研究で生理学的および遺伝学的解析を行った。分析には全て地上部をサンプルとして用いた。3つの変異株はいずれも表現型を決定する劣性の一遺伝子変異を持っており、マッピングの結果から、変異箇所はそれぞれ異なる部位であると考えられる。いずれの変異株も -Sにおける地上部OAS濃度がWTと比較して著しく低下しており、おそらくこのことが原因でGFP蛍光強度が低下したと考えられる。また、いずれの変異株においても、WTと比較して代謝産物量や硫黄応答性遺伝子の発現に顕著な変化が観察された。

*oda1-1* 変異株は葉の緑色が薄く、クロロフィル量がWTの半分程度に減少していた。硫酸およびリン酸イオン濃度は+Sでも-SでもWTよりも低下していた。OASの前駆体であるセリン濃度は+Sおよび-SでWTの半分以下に減少していた。CysおよびGSH濃度に違いはなかった。-SのOAS濃度はWTの約30%に低下していた。また、硫黄応答性遺伝子 *adenonine 5'-phosphosulfate reductase (APR) 1* の転写産物量が+Sでも-SでもWTの10%以下に低下していた。*APR1* のアイソフォームである *APR2* および *APR3* にはWTと違いがなかった。このように、*oda1-1* 変異株ではセリン合成が阻害され、結果としてOAS濃度も低下していると考えられる。また、3つの*APR* 遺伝子の中で *APR1* の発現のみが顕著に抑制されていることから、*APR1* の転写制御に変異原因遺伝子が関与していると考えられる。ポジショナルクローニングの結果、*oda1-1* の変異原因遺伝子は1番染色体上腕の約140kbpの範囲に存在することが分かった。

*oda2-1* 変異株は、葉柄が長い変異株である。硫酸イオン濃度がWTの半分以下に低下していた。Cys濃度に違いはなく、GSH濃度は-SでWTの半分程度に低下していた。-SのOAS濃度はWTの約20%に低下していた。硫黄応答性遺伝子 *Sultr2;2* の-Sにおける転写産物量はWTの1.4倍に増加していた。以上のように、*oda2-1* 変異株では、硫酸イオン、GSH、OAS濃度の低下が顕著に観察されたが、硫黄応答性遺伝子の発現に大差はなかった。このことから、硫黄代謝系遺伝子の発現には影響を与えず、化合物量を変化させるような遺伝子に変異している可能性がある。ポジショナルクローニングの結果、*oda2-1* の変異原因遺伝子は3番染色体の上腕に存在することが分かった。

*oda3-1* 変異株は根の長さがWTよりも有意に短かった。-Sにおける硫酸イオン濃度および+Sにおける硝酸イオン濃度が有意に低下していた。+SにおけるCys濃度はWTの約4倍に増加し、GSHは約2倍に増加していた。OAS濃度は、+Sおよび-SでWTの約20%に低下していた。また、硫黄応答性遺伝子の転写産物量に関しては、-Sで *Sultr2;2* がWTの2倍程度に増加しており、*APR1* は+Sでは3倍程度に増加している一方で、-SではWTの0.1%以下に減少していた。*APR2* および *APR3* には違いはなかった。以上のように、*oda3-1* 変異株では、内生遺伝子発現や代謝産物量に関してWTと差異があるだけでなく、+Sと-Sで異なる挙動を示すことから、+Sおよび-Sのシグナルが正常に伝達されていないと考えられる。ポジショナルクローニングの結果、*oda3-1* の変異原因遺伝子は1番染色体中腕の約60kbpの範囲に存在することが判明し、この範囲内に存在する遺伝子 *At1g54450* のコード領域においてCからTへの塩

基置換を発見した。*At1g54450*はCa-binding EF hand protein をコードしており、一般的に、カルシウム依存的に標的タンパク質と結合し、結合相手の活性を高める働きをすると考えられている。*oda3-1* 変異株を用いて、高等植物におけるカルシウムを介した - S 応答に関する初めての知見が得られることが期待される。

以上本論文において、シロイヌナズナにおける *Sac3* 相同遺伝子 *SnRK2.3* がクラミドモナスと同様に硫黄応答を制御する可能性を示した。また、OAS 非感受性変異株 *oda* の解析から、新たに3つの未知遺伝子が硫黄欠乏応答に関与すること、各遺伝子は硫黄代謝においてそれぞれ異なる段階を制御していることを明らかにした。これらの結果は、硫黄欠乏応答は複数の遺伝子により調節されていることを如実に示すものであり、硫黄応答制御機構の全貌解明への糸口となると大いに期待される。

Kimura et al., (2005) tentatively accepted to *Soil Science and Plant Nutrition*  
Arabidopsis SnRK2.3 protein kinase is involved in regulation of sulfur responsive gene expression and *O*-acetyl-L-serine accumulation under condition of limited sulfur supply.