

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 21 年度博士課程進学

氏 名 齊藤 貴之

指導教員 中西 友子

論文題目

イネにおけるマグネシウム動態と MRS2 ファミリーの解析

マグネシウム (Mg) はあらゆる生物に必須な養分元素であり、植物細胞内においては、クロロフィルの中心元素として配置されることや、ATP を介する数多くの代謝反応において、ATP と酵素を架橋してリン酸化反応が進む際の補因子として Mg^{2+} が必要であることなど、その必須性および重要性は以前から認められている。さらに、植物葉中の Mg 濃度は、植物間ではほぼ一定していることから、種間を越えて Mg 濃度を一定に保つため高度な恒常性の維持機構が保存されていることが推察される。

植物体内の Mg 輸送に関しては、シロイヌナズナにおける Mg 輸送タンパク質の研究が進められ、膜局在型の AtMRS2/AtMGT ファミリーが葉緑体や液胞などの様々な部位で Mg 輸送に関与することが示唆されている。また、Mg 濃度の恒常性に液胞膜局在型タンパク質 (AtMHX) が関わっている可能性が報告され、Mg 輸送タンパク質の生理学的な意義について推察されている。しかし、それ以外の植物種においては、Mg 輸送や Mg 濃度制御機構について分子レベルで解析された例はこれまでに無い。Mg は窒素、リン、カリウム、カルシウムなどの必須元素と比較すると、吸収および移行などの輸送機構や恒常性に関する報告は少ない。近年になり、Mg 欠乏に対する応答機構の解明や、生産性への関与

の観点から重要性が見直されてきた。

本研究では、主要作物であるイネ (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) を供試植物として研究を進めた。イネの生育過程において、形態変化に伴う Mg の吸収量や再移動性ならびに分布の変化などに関する特徴については、これまでに詳細な研究がなされている一方、Mg 輸送を担う分子に関する報告はない。そこで、第 1 章ではイネに存在する *MRS2* ファミリーの発現部位や機能に関する解析を行い、既知の *AtMRS2* ファミリーとの比較を行うことにより基本的な性質やファミリー間の対応関係を推察した。第 2 章では、Mg 欠乏条件下で栽培したイネが示す形質と遺伝子発現の関係について解析した。第 3 章では *MRS2* 遺伝子の内、*OsMRS2-6* (locus : Os03g0684400) のノックダウン体が生ずる表現型を解析することにより、植物体内において *OsMRS2-6* が果たす生理学的な意義について考察した。

1. イネにおける *MRS2* ファミリーの発現および機能解析

イネにおいて *MRS2* ファミリーに属するタンパク質は少なくとも 9 つ存在すると考えられた (以下、*OsMRS2*)。この *OsMRS2* ファミリーには CorA スーパーファミリーの特徴である 2 回膜貫通領域や GMN および一部が置換されたモチーフが存在し、系統関係の比較から 5 つのサブグループに分類された。そのサブグループ内においては、*AtMRS2* と対応しないものも存在した。

OsMRS2 遺伝子ファミリーは、植物体全体で発現するグループ (*OsMRS2-1/3/4*, locus : Os06g0650800/Os01g0908500/Os10g0545000)、根において特に強く発現するグループ (*OsMRS2-2/7/8*, locus : Os01g0869200/ Os03g0742400/Os04g0430900)、葍や花などの生殖器官で発現するグループ (*OsMRS2-5/9*, locus : Os03g0137700/Os04g0501100)、葉身部分で発現するグループ (*OsMRS2-6*, locus : Os03g0684400) に大きく分けられた。また、mRNA 蓄積量の解析結果より、*OsMRS2-5* にはスプライシングパターンが複数存在することや、*OsMRS2-1/6* については日周に伴うと考えられる発現変動が確認された。さらに、*in situ hybridization* による解析結果から、*OsMRS2-2* は Mg²⁺ の維管束周辺部位における輸送に関与している可能性が考えられた。イネの葉身部分から抽出したプロトプラストを用いて細胞内局在部位を解析した結果、*OsMRS2-5/6* は葉緑体に局在するタンパク質であることが示唆され、アミノ酸配列情報による系統解析結果を踏まえ、*OsMRS2-6*

はシロイヌナズナの *AtMRS2-11* のオーソログあると考えられた。

OsMRS2 を Mg 輸送能欠損酵母において発現誘導させ、Mg 輸送能の相補性を確認した。Mg 濃度が 0.1 mM の条件では、*OsMRS2-6* の導入酵母のみ顕著な増殖を示し、Mg 濃度が 1.0 mM の条件下においては、*OsMRS2-1/3/6/9* について Mg 輸送能が確認された。*OsMRS2-6* は Mg 濃度が μM ~ mM の幅広いレンジで Mg の輸送を介すると考えられた。また、*OsMRS2-6* は高 Mg 濃度条件下で生育が抑制されることから、 Mg^{2+} の細胞への取り込みを介する可能性が考えられた。以上の結果から、*OsMRS2* のメンバーは植物体内の様々な器官・組織において局在を異にして Mg 輸送に関与することが示唆され、植物体内の Mg^{2+} の移行に重要な役割を果たすファミリーである可能性が考えられた。

2. イネにおける Mg 欠乏症の解析

植物体内における Mg の移行動態に伴う生理学的な変化を解析するため、イネに Mg 欠乏処理を施し、現れる形質と部位および時期に注目して Mg 欠乏症の解析を行った。播種後 2 週間目のイネ幼植物を Mg を除いた水耕液に移植すると、その後 8 日目には第 5 葉 (第 1 葉方式、以下、L5) においてクロロシスの前兆である葉緑素含有量の低下が確認された。また、Mg を再供与した場合、6 日間と 7 日間の処理期間の間で葉の回復可否の境界があることが確認された。また、ヨウ素染色を行った結果から、欠乏処理 6 日目においてはデンプンの蓄積は確認されなかったが、8 日目では L5、L6 において濃青色に染色された。放射性トレーサーを用いた吸収実験により、Mg 欠乏処理を 6 日間施したイネでは、L5 への栄養素の移行は停止していないが、8 日間の処理では移行量が減少していることが確認された。よって、Mg 欠乏によって生じるクロロシスよりも以前の生理学的な応答を解析する条件として 6 日間の欠乏処理期間が適当であると考え、糖類の蓄積量を測定した。Mg 欠乏処理 6 日目に糖類の蓄積量を測定した結果、スクロース、グルコース、フルクトース含量に有意な変化は確認されなかった。その一方で、L5 において myo-イノシトール含量は半減し、クエン酸の含有量は大きく増加しており、代謝関連物質の産生に関して Mg 欠乏の影響が生じていた。また、この時点での遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。その結果、L5 では特徴的に生物時計関連遺伝子などに発現量の変動が認められた。さらに *OsMRS2* ファミリーの一部に関しても、2~4 倍程度の増減が確認され、Mg 欠乏による制

御機構が存在することが示唆された。シロイヌナズナにおいては、Mg 欠乏処理によって生物時計関連遺伝子などに変化があることが報告される一方、*AtMRS2* ファミリーの発現量にはほとんど変動がないことが報告されている。本実験結果は、イネの生育過程と Mg 欠乏症状の関係を解析したことにより、*MRS2* ファミリーの発現量の変動が確認された初めての例である。

3. イネにおける葉緑体局在型 *MRS2* の解析

第 1 章より、*OsMRS2-6* は他の *OsMRS2* メンバーと比較して植物体内における発現量が多く、イネ植物体内の葉緑体において機能を果たす高親和性 Mg 輸送タンパク質であることが強く示唆された。また、Mg 欠乏条件下で栽培したイネにおいては、遺伝子発現量の減少が確認された。相同遺伝子である *AtMRS2-11* に関しては、過剰発現により特別な表現型は確認されておらず、植物体に果たす役割は不明である。そこで、*OsMRS2-6* の植物体内における生理学的な役割を解明するべく、ノックダウン体を作成して表現型を解析した。その結果、幼植物期においては生育量および葉緑素含有量に大きな相違は見られなかったが、一方で、Mg 欠乏処理を施した場合に、野生型株で見られたデンプンの蓄積が確認されなかった。その後、収穫時期まで栽培を続けると、不完全米の割合が野生型株よりも高く、種子収量の減少が確認された。ただし、収穫時期まで植物体地上部の生育量には、野生型株と大きな相違が確認されなかった。イネの生活環において出穂後の登熟期においては植物体の形成が完了しており、以後の光合成産物の大部分は種子へと転流され、最終的な子実重量の 70% が出穂後の光合成に由来すると報告されている。これらのことから、*OsMRS2-6* は葉緑体内の Mg 環境を整え、葉の光合成能に寄与することが考えられ、特に登熟期の光合成能に対する寄与が大きいということが示された。

本研究においてはイネを供試植物とし、葉を葉位毎に分けて解析を行い、過去のシンク・ソースと生育過程の関係などに関する情報を基に、Mg 欠乏時に植物体内で生じる遺伝子発現の応答に関する知見が得られた。そして、葉緑体局在型の *MRS2* 遺伝子が子実生産性に影響する可能性を示した初めての報告である。