

(様式第9 別紙2:公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名: 吉村和也

2. 養成カリキュラム名: 植物利用エネルギー使用合理化工業原料生産技術研究開発

3. 養成カリキュラムの達成状況

これまでに取得した活性酸素種代謝遺伝子以外にアクティベーションタギングより、新たに候補遺伝子を取得し、その機能が酸化DNAもしくはシグナル分子としてのADP-riboseの代謝に関与することを明らかにした。これらを利用することにより、複合ストレス環境耐性植物の作出という、最終目標に近づいた。

4. 成果(A4版3枚程度)

植物は種々の環境ストレス(低温、強光、塩など)を受けると多くの酵素・タンパク質を誘導し、適応している。しかし、植物のストレスに対する代謝応答は非常に多彩であり、誘導される遺伝子群は多岐にわたっており、植物細胞内に常時発現している酵素・タンパク質も種々のストレス防御に関与しているが、発現量または変動が少ないことからその生理的意義が明確ではないものも少なくない。さらに、多くの防御系遺伝子の発現をコントロールする制御因子の存在も明らかになりつつある。このような状況で、植物が本来持つ種々のストレス防御に関与するタンパク質、それらの発現をコントロールする制御因子を同定し、ストレス耐性を強化した植物の分子育種も可能であると思われる。

そこで、低温・強光・乾燥などの種々のストレスに由来する光・酸素毒に対する耐性、すなわち極限的な環境下でも生存できる耐性植物の開発を目指し、アクティベーションタギング法を用いて、アラビドプシスから種々のストレス条件下で生育できる変異株を単離し、環境ストレス耐性に関与するタンパク質遺伝子の単離、機能および発現制御機構の解析を行い、最終的にそれら耐性遺伝子を導入した複合的環境ストレス耐性形質転換植物を創製する。以下、本年度成果の概要を述べる。

アクティベーションタギング法による変異体のスクリーニングのためには多くの変異体の作製およびスクリーニング系の整備が不可欠である。そこで、スクリーニング系の充実および再現性の確保のために、アクティベーションタグラインのT₂世代の種子を作製/保存するストラテジーを選択した。

カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター由来のエンハンサーを4つ重複して有するアクティベーションタグ導入用プラスミド(pPCVICEn4HPT)をアグロバクテリウムを介した減圧浸潤法によりアラビドプシスに導入し、得られたT₁種子をハイグロマイシン添加培地で選抜を行い、自家交配後のT₂種子をそれぞれのライン毎に採取した。本年度において、700ライン/月のペースでアクティベーションタグラインの作製を行っており、すでにT₂種子約6,000ラインを採取した。PCRによる確認の結果、回収したT₂種子には95%以上の割合で遺伝子導入されていることが明らかになった。

得られたタグラインは、簡便なスクリーニングを行うために、それぞれのライン毎 200 粒の種子を分取し、50 ラインを 1 プールとして整備している。これまでに、80 プールの整備が終了した。

一次スクリーニングとして、酸素毒ストレス耐性のモデルとなるパラコートでのスクリーニングを行った。整備したアクティベーションタグライン 5000 ライン (100 プール) を通常培地で 7 日間栽培後、パラコート (3 μ M) を含む培地へ移植し、一週間処理を行い、更に通常の培地で生育させた結果、7 日後では野生株や他の変異株はクロロフィルの退色が生じて枯死しているのに対し、明らかに緑色を保っているパラコート耐性株 (paraquat resistant: *pqr*) を 2 株 (*pqr*-216、*pqr*-236) 単離した。そこで、プラスミドレスキュー法およびインバースPCR法により、*pqr*-216 におけるアクティベーションタグの挿入位置の同定を試みた。その結果、アクティベーションタグはCCAATボックス結合転写因子様タンパク質 (AtHap3b) およびMutTドメイン様タンパク質 (AtMutT1) をコードする遺伝子の下流に挿入されていた (図 1)。また、*pqr*-216 のAtMutT1 およびAtHap3bの転写量は、野生株と比較してそれぞれ8.7および2.7倍増加していることが明らかになった (図 1)。一方、*pqr*-236 では機能未知の遺伝子およびCXIP1 (Calcium Exchanger-Interacting Protein-1) の上流にアクティベーションタグが挿入されていた

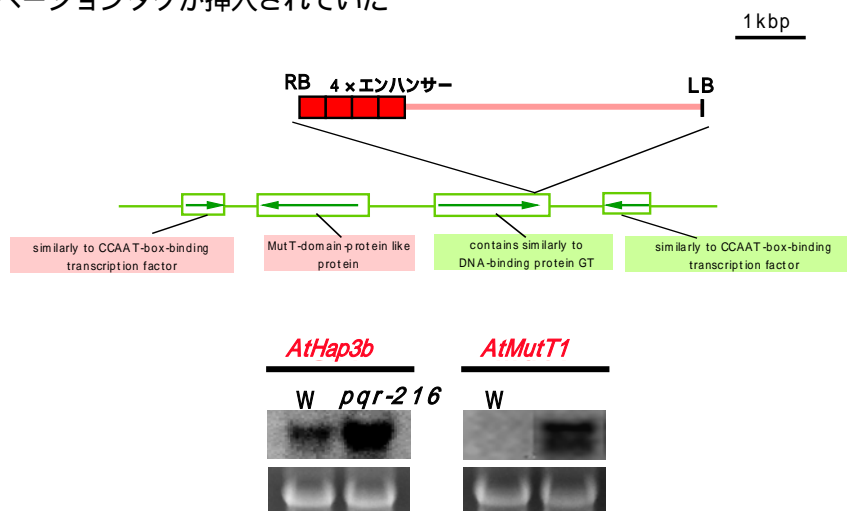


図1, *pqr*216-1におけるT-DNA挿入位置とその近傍遺伝子の発現量の解析

そこで、それぞれの遺伝子の過剰発現形質転換体を作製し、パラコート耐性再試験を行った。その結果、AtHap3b 形質転換体では変化が認められなかったが、AtMutT1 を過剰発現させた形質転換体では、コントロールベクターの形質転換体と比較して明らかにパラコート耐性能が向上していた (図 2)。発現量の増加に依存してパラコート耐性能が向上していた。上述のように、AtMutT1 遺伝子からは選択的スプライシングによって 2 つの mRNA 産物が生成している。そこで、それぞれの cDNA を用いて過剰発現体を作製し、パラコート耐性能を検討した。その結果、AtMutT1a の過剰発現体においてパラコート耐性能の向上が認められた (図 3)。これらの結果から、*pqr*-216 のパラコート耐性表現型の原因遺伝子は AtMutT 遺伝子であり、その産物の AtMutT1a mRNA がコードするタンパク質がパラコート耐性の機能を有することが示された。

現在までに、MutTモチーフをもつタンパク質は多種の生物に数多く存在することが知られている。これらはNudix (nucleoside diphosphate linked to some moiety X) hydrolase familyと呼ばれ、大腸菌やヒトにおけるMutTタンパク質は、突然変異の原因となる酸化ヌクレオチド、8-oxo-dGTPを加水分解することでDNAの酸化損傷からの防御に機能している。このことから、AtMutT1 の過剰発現によって認められた酸化的ストレス耐性能の向上は、ヌクレオチドプールの酸化損傷の修復能の向上に起因すると考えられた。データベース解析の結果、シロイヌナズナにおいてAtMutT1 以外にも 7 種類 (AtMutT2~8) のMutT様タンパク質ホモログが存在した (図 4)。

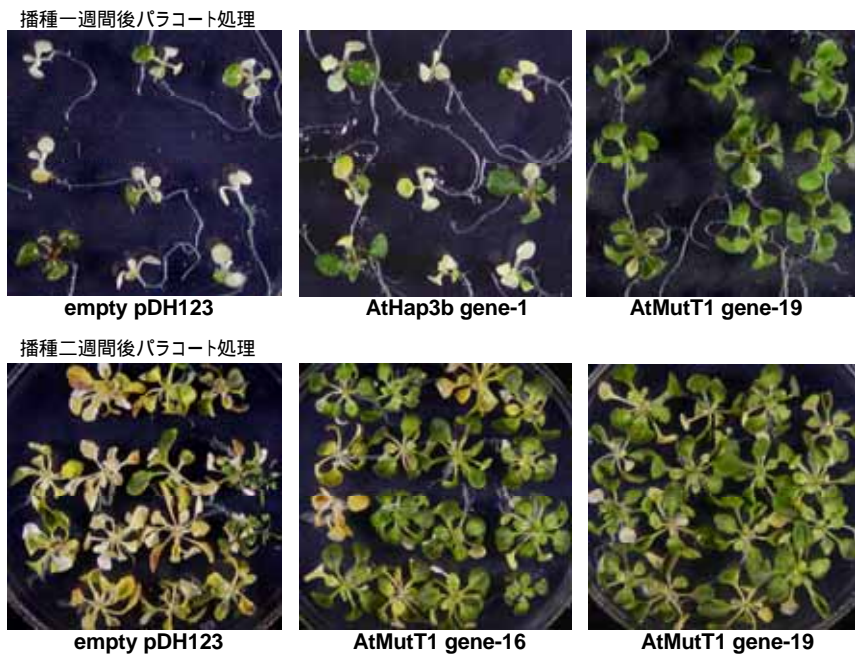


図 2, AtMutT1 遺伝子の過剰発現によるパラコートストレス耐性能の向上

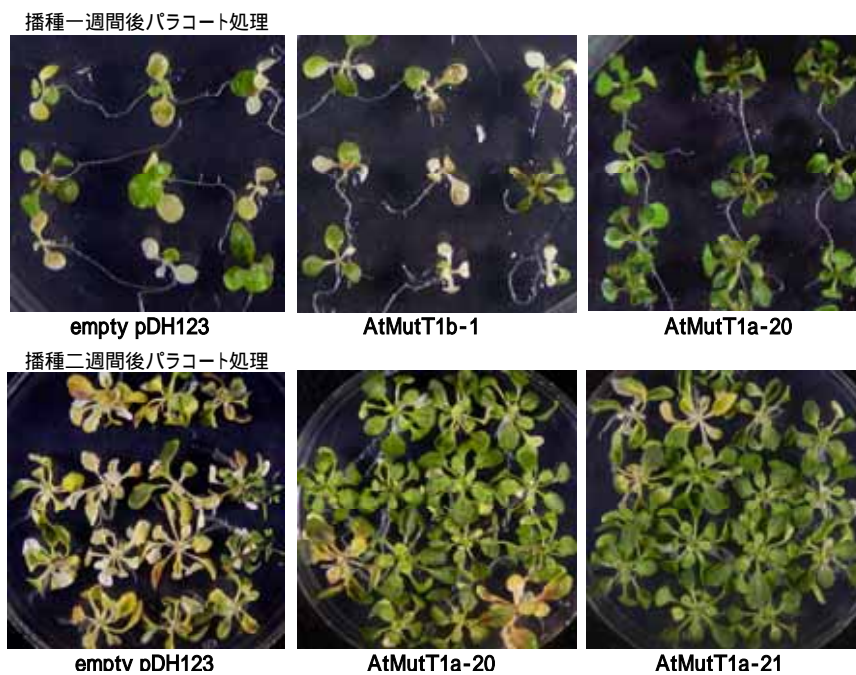


図 3, AtMutT1a cDNA の過剰発現によるパラコートストレス耐性能の向上

そこで植物における MutT 様タンパク質と酸化的ストレス耐性との関連性を明らかにするために、シロイヌナズナ MutT 様タンパク質ホモログの分子特性および機能解析を試みた。すべての AtMutT のリコンビナントタンパク質を作製し、基質特異性を検討した。その結果、AtMutT1, 5, 6 は、ADP-ribose 及び NADH を、AtMutT8 は 8-oxo-dGTP および NADH を加水分解する活性を有していた(表 1)。そこで、AtMutT1 および AtMutT8 がヌクレオチドプールの酸化修復機能を有しているかを検討するために、大腸菌 MutT 欠損株を用いて相補試験を行った。その結果、野生株と比較して約 1,000

倍高い MutT 欠損株の突然変異頻度は、AtMutT1 を導入しても変化しなかったが、AtMutT8 導入により野生株と同程度にまで抑制された（図5）。これらの結果から、AtMutT8 はヌクレオチドプールの酸化損傷の修復に機能していることが示された。一方、AtMutT1 は酸化的ストレス耐性能の向上に関わる新規の機能を有している可能性が示唆された。

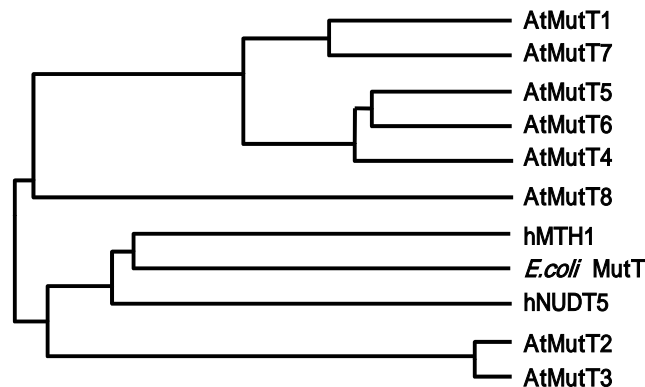


図4、Nudix ファミリーのアライメントおよび系統樹

表1、シロイヌナズナ MutT 様タンパク質の基質特異性

| | 8-oxo-dGTP | ADP-ribose | NADH |
|----------------------------|------------|------------|------------|
| AtMutT1 | n.d. | 0.19±0.02 | 0.10±0.001 |
| AtMutT2 | n.d. | n.d. | n.d. |
| AtMutT3 | n.d. | n.d. | n.d. |
| AtMutT4 | n.d. | n.d. | n.d. |
| AtMutT5 | n.d. | 0.19±0.02 | 0.28±0.01 |
| AtMutT6 | n.d. | 0.11±0.01 | 0.07±0.01 |
| AtMutT7 | — | — | — |
| AtMutT8 | 0.23±0.02 | n.d. | 0.14±0.01 |
| <i>E. coli</i> MutT | 50.53±7.25 | n.d. | n.d. |

μmol/min/mg protein
n.d.: not detected

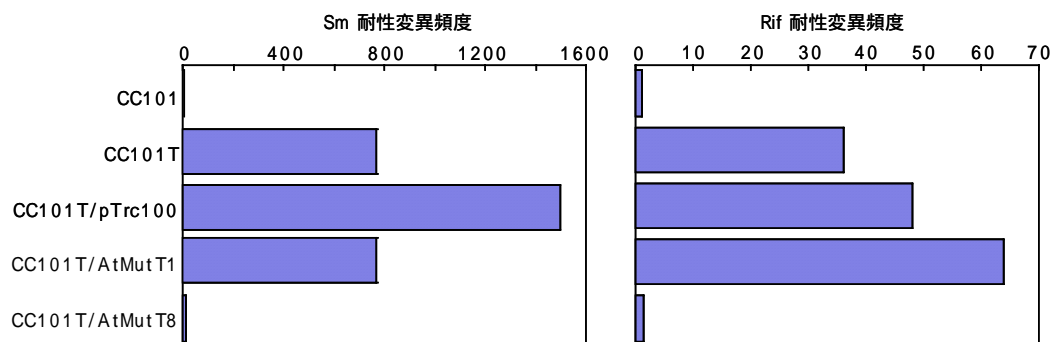


図5, 大腸菌 MutT 欠損株における相補試験

6. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。コピーを添付。)

- Yoshimura, K et al. (2004) **Plant J.** 37,12-33
Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol

(2) 口頭発表 (発表済を対象。予稿集のコピーを添付。)

- 植物 MutT 様タンパク質ファミリーの特性と酸化的ストレス耐性能に及ぼす影響
小川貴央、上田弥生、藤原範己、吉村和也、重岡 成
2004 年度日本農芸化学会大会

(3) 特許等 (出願番号を記載)