

## *Solanum* 属 2 種の耐凍性に関する形態学的比較

生体機能開発研究分野 伊藤 俊平

### 【背景】

越冬性の植物にとって低温や凍結ストレスに曝されることは宿命であり、そのような生育に不利な環境に対する耐性を獲得しながら進化してきた。非凍結温度に一定期間晒されることで低温・凍結耐性を増大させる現象である低温馴化はその一環であると考えられる。また、この低温馴化能力は植物種によって様々であり、中でも *S.commersonii* と *S.tuberosum* は同じ属にありながら、低温馴化処理(4/2、明条件 14 時間/暗条件 10 時間)によって前者はその耐凍性を-4.5 から-10 に増大させるのに対して、後者はその耐凍性が-3 のままである。このことから、以前よりこの 2 種は低温馴化機構あるいは凍結回避機構解明の研究において比較対象として用いられてきたが、形態学的な観点から 2 種の間にはどのような差異があるのかについての報告はほとんどない。

### 【目的】

低温馴化前後の *Solanum* 属 2 種の形態学的・生理学的比較を通して、凍結耐性獲得機構に寄与する要因を明らかにする。

### 【結果】

WTにおける凍結過程における収縮は、NA区で両者同程度であったが、CA区で *S.commersonii* にのみ収縮度合いが軽減される傾向が見られた。

WTにおいて細胞内浸透濃度は両者ともCA区で上昇するが、全試験区で *S.commersonii* が高かった。WTにおいて適合溶質(糖、アミノ酸)の含量は両者とも低温処理で増加し、その量に差は見られなかった。

細胞は概して *S.tuberosum* で大きく、葉緑体数も多かった。

細胞壁の厚さには有意な差は見られず、その他にも電子顕微鏡レベルの違いは観察できていない。

### 【研究計画】

全体的に実験に対する再現性を高めていく。

凍結耐性における細胞壁の効果を示すため細胞壁を染める蛍光色素を用いた顕微鏡観察を進める。

低温誘導性遺伝子(COR)の発現を活性化する転写因子である *AtCBF3* 導入形質転換体についてWTで行ったような実験を進めていく。

## 寒冷地適応型イネ科作物特異的タンパク質 (P23k) の機能解析

寒冷シグナル応答研究分野 植村 亜衣子

### 【研究背景と目的】

当研究室では、オオムギをはじめとする寒冷地適応型イネ科作物特異的に存在するタンパク質 P23k の解析を行っている。これまでの研究から、P23k は糖の輸送や代謝に関与することが示唆されていたが、その詳細に関しては不明のままであった。そこで本研究では、P23k の機能解明を目的に、形質転換体を用いた表現型観察と細胞内局在解析を行った。

### 【進行状況】

Virus-induced gene silencing(VIGS)による P23k の機能解析

VIGS にはオオムギ斑状モザイクウイルス (BSMV) 由来のベクターを使用した。栄養生長期のオオムギを使用して P23k の発現抑制を行った結果、葉の左右非対称性や葉縁の切れ目といった表現型が観察された。この結果から、P23k は細胞壁構成多糖類の合成に関与していると推察された。

P23k の発現抑制に伴う細胞壁構成多糖類の変化

P23k を発現抑制させたオオムギから切片を作成し、細胞壁構成多糖類を染色する蛍光色素 calcofluor で染色した。非 VIGS 系統では強い蛍光を示したのに対し、P23k の発現を抑制したオオムギ系統では、その蛍光は弱かった。この結果から、P23k は細胞壁構成多糖類の合成に関わることが明らかとなった。

オオムギにおける P23k の細胞内局在

細胞内局在解析には、P23k が高発現しているオオムギ種子の胚盤組織を使用した。当該組織の細胞破碎液をスクロース二層分画法で分画し、得られた膜画分をさらに 20-40% のスクロース密度勾配遠心分離法により分画した。得られた画分を用いて western blot 解析を行った結果、P23k は小胞体ないしゴルジ体に局在していることが明らかとなった。これらのオルガネラではヘミセルロースの合成が行われていることから、P23k は細胞壁構成多糖類の一つであるヘミセルロースの合成に関与している可能性が示唆された。

P23k の VIGS 個体における細胞壁構成多糖類合成・分解関連遺伝子群の発現解析

細胞壁構成多糖類を染色する蛍光色素 calcofluor はセルロースをはじめ  $-(1,3;1,4)$ -グルカンやカロースなどのヘミセルロースも染色する。そのため、P23k がいかなる多糖類の合成に関与しているのか、P23k 発現抑制個体における細胞壁構成多糖類関連遺伝子の発現を RT-PCR 法によって調べた。その結果、P23k 発現抑制系統では  $-(1,3;1,4)$ -グルカン合成酵素 (CsIF) の発現量が顕著に減少していた。これにより、P23k は  $-(1,3;1,4)$ -グルカンの合成に関与する可能性が示された。

形質転換カルスの作出

P23k が発現していないオオムギ未熟胚由来のカルスで P23k を高発現させ、細胞壁構成多糖類の量的変化を観察した。検出には、calcofluor を使用した。その結果、P23k 発現カルスでは野生型のカルスに比べて細胞壁構成多糖類の含量が顕著に上昇していることが明らかとなった。この結果からも、P23k が細胞壁構成多糖類の合成に関与していることが証明された。

## 細胞の増殖・停止期におけるイネ CKI 遺伝子の発現解析

細胞複製研究分野 漆澤 響

### 【背景と目的】

CKI (cyclin-dependent kinase inhibitor) は細胞周期の進行においていわばブレーキとして働く分子である。植物においては主にシロイヌナズナを用いて研究が進められており、動物の CKI の 1 つである Kip 1 との相同性から 7 種類の CKI (KRP1~7) が報告されている。

イネは世界の人口の半数以上が主食とする重要な作物であり、イネにおける CKI の働きを解明することはその生産性とストレス耐性の向上に寄与できる可能性がある。当研究室において発見された 5 種類のイネ CKI とシロイヌナズナの CKI との間でアミノ酸配列を比較したところ、cdk サイクリンとの結合に重要な役割を果たすと考えられているモチーフ 1~3 はすべて保存されていた。しかし、モチーフ 4~6 については持つものと持たないものがあった。またそれ以外の部分の配列では相同性が存在せず、シロイヌナズナ KRP 1~7 と相同なイネ CKI はアミノ酸配列上においては存在していないと考えられた。そこでイネ CKI の機能解明に向けて、イネを材料に用いて細胞の増殖および停止期におけるイネ CKI の遺伝子発現について調べることにした。

### 【進行状況】

イネ懸濁培養細胞を用いて細胞増殖とイネ CKI の発現との関連を調べた。まず、一定時間ごとに細胞の重量を測定し、増殖曲線を作成した。その後 RT-PCR 法およびリアルタイム RT-PCR 法を用いて細胞の増殖段階の変化に応じた 5 種類のイネ CKI (OsKRP1,4,5 ESOCKI AK063208) の発現を調べた。その結果 OsKRP4 と AK063208 は対数増殖期の直前、OsKRP5 は終盤、そして OsKRP1 は対数増殖期の最中に発現のピークを迎えていた。

また、細胞増殖停止時における発現を調べるために、イネ懸濁培養細胞を低温や糖の欠乏といった状況下においたところ、細胞増殖の停止が観察され、その際に OsKRP 1,5,AK063208 の発現が増大していた。特に OsKRP1 は大きな変化を見せていた。

次に植物体において増殖とイネ CKI 遺伝子の発現を調べた。発芽後 1 ヶ月のイネ苗を 4 で 1 週間処理したところ、この間に成長が停止していた。そこでの CKI の発現について調べたところ OsKRP1,4,ESOCKI の発現が増大していた。

イネにおいて 5 種類の CKI が存在している理由やその機能の違いについてはこれまで不明であったが、これらの結果から細胞増殖の進行に関わるものや停止時に関わるものなど、それぞれ異なる役割や機能を持っている可能性が示唆された。

## 低温誘導される葉緑体包膜タンパク質の機能と構造に関する研究

生体機能開発研究分野 大川 久美子

### 【背景・目的】

緑色植物における葉緑体は、光合成により NADPH や ATP を合成するだけでなく、複数のアミノ酸や脂肪酸を合成するなど代謝上非常に重要な働きをしている。低温ストレス下では、葉緑体包膜が損傷を受け葉緑体内の様々な代謝活動が著しく低下すると考えられる。低温馴化したシロイヌナズナにおいては、特定の可溶性タンパク質が葉緑体に蓄積し植物の凍結耐性を向上させることが知られている。しかし、低温ストレス下で葉緑体機能の維持に関わる膜タンパク質は報告例が非常に少ない。

これまで、バイオインフォマティクス解析およびゲノムデータベースの検索を行った結果、葉緑体への局在が示唆される低温誘導性の新規膜タンパク質として Cor413im を見出した。シロイヌナズナ Cor413im は低温誘導性の転写因子 DREB1A/CBF3 の制御下にあり、低温馴化 1 日目において転写発現が顕著に誘導されることが知られている。このことから、低温状況下における葉緑体代謝機能の維持あるいは包膜の保護に役割を果たしている可能性が考えられた。そこで本研究では、植物の凍結耐性機構に葉緑体膜タンパク質がどのように機能しているかを調べることを目的に、生化学的解析により Cor413im の葉緑体内局在解析や複合体解析を行った。また、T-DNA 挿入変異株を用いて Cor413im の凍結耐性への生理学的機能を解析した。

### 【結果】

1)  $^{35}\text{S}$  で標識した Cor413im を *in vitro* 転写翻訳システムにより合成し、葉緑体への取り込み実験を行った。取り込み後の葉緑体を分画した結果、成熟型の Cor413im が包膜に局在することが明らかとなった。また、Cor413im-GFP 過剰発現株を作出し葉切片の蛍光観察を行った結果、GFP 蛍光が包膜に検出された。さらに Cor413im の局在様式を詳細に調べるため、Cor413im1-proteinA(pA) 過剰発現株由来の無傷葉緑体をアルカリ処理およびトリプシン消化した。その結果、Cor413im1 は葉緑体内包膜に局在する膜貫通型タンパク質であることが示唆された。

2) Cor413im の T-DNA 挿入変異株を選抜し、電解質漏出法を用いた細胞レベルでの凍結耐性を評価した。その結果、Cor413im ノックアウト変異株の凍結耐性が野生株に比べて有意に低下していた。また、変異株における他の低温誘導性遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析したところ、低温馴化に伴う発現パターンに変化は見られなかった。

3) 低温未馴化および馴化処理した Cor413im1-pA 過剰発現株から葉緑体包膜を調製し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより複合体解析を行った。その結果、Cor413im1 は高分子の複合体を形成している可能性が示唆され、またその複合体は低温馴化前後で変化しないことが明らかとなった。

### 【計画】

- 1) Cor413im1 欠損変異株を用いたトポロジー解析を行い、タンパク質の構造面から機能を推察する。
- 2) Cor413im1 と Cor413im2 の相互作用を免疫沈降法により解析する。
- 3) T-DNA 挿入変異株における光合成活性および糖分配への影響を解析する。

## 酸化ストレスにより生じる過酸化タンパク質の解析

生体機能開発研究分野 丹野 有里子

### 【背景・目的】

イネをはじめとする低温感受性植物 (=低温傷害を受ける植物) は、植物体全体を低温に曝すと気孔が開放状態となり脱水され、葉の萎れが生じる。また、根のみを低温に曝しても、根の水輸送能力の低下により脱水され、葉の萎れが生じる。このような葉の萎れは低温傷害の一つである。

一方、低温傷害の過程では、過酸化水素を始めとする活性酸素が大量に発生する。活性酸素は核酸、膜脂質、タンパク質などを過酸化し、傷害を引き起こすが知られている。しかし、通常、高等植物は活性酸素を除去するための消去系酵素(カタラーゼ、アスコルビン酸ペルオキシダゼなど)を持ち、活性酸素を除去する結果、大事に至らない。これまでの研究により、植物体全体及び根のみを低温処理すると、コムギカタラーゼ遺伝子を過剰発現させたイネは野生型イネよりも高いカタラーゼ活性を維持すること、そして形態上でも葉の萎れが遅延し、野生型より強くなることが明らかとなっている。

カタラーゼは活性酸素の一つである過酸化水素を除去する酵素である。低温下において、コムギカタラーゼ遺伝子を過剰発現したイネの葉の萎れが遅延したのは、高く維持されたカタラーゼ活性が低温耐性に関与するタンパク質の過酸化を防ぎ、その機能を維持することに貢献したためであると予想される。そこで本研究では、まず、低温処理過程において過酸化されるタンパク質の存在を明らかにすることを試みた。その上で、野生型イネ及びコムギカタラーゼ遺伝子過剰発現イネを用いて、酸化ストレスにより生じる過酸化タンパク質を比較し、高いカタラーゼ活性を有する形質転換体イネがタンパク質の過酸化を防いでいるかどうかについて検証する。

### 【結果】

低温処理過程で、葉における過酸化水素発生量は増加傾向を示した。

低温処理により主に葉が傷害を受ける一方、過酸化水素処理では主に根が傷害を受けることが明らかになった。また、低温処理および過酸化水素処理ともに形質転換体の傷害程度は野生型よりも抑制されていた。

低温処理および過酸化水素処理による酸化ストレスによって特異的に酸化されるタンパク質が存在することを明らかにした。野生型と形質転換体との比較により、酸化されるタンパク質には差異が見られた。

### 【研究計画】

低温処理過程で特異的に酸化されるタンパク質を、質量分析により同定する。また、過酸化タンパク質の細胞内局在性も考慮に入れ、細胞分画後の解析も考える。