

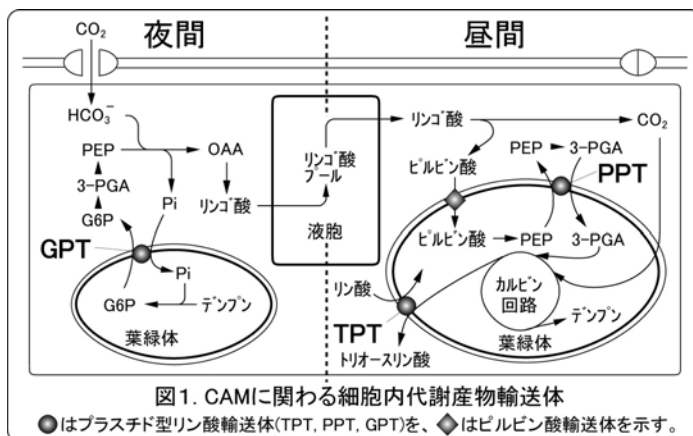
通性 CAM 植物アイスプラントの乾燥耐性獲得に伴う葉緑体輸送体の発現制御

Differential Expression of Plastidic Translocators during Drought Tolerance Acquisition in a Facultative CAM Plant, *Mesembryanthemum crystallinum*.

プロジェクト代表者：是枝 晋 (科学分析支援センター・講師)
Shin Kore-eda (Lecturer, Molecular Analysis and Life Science Center)

1 研究の背景

乾燥地域の植物の多くは、多肉植物型酸代謝 (CAM) を発達させ、光合成の水利用効率を上げることで、乾燥耐性を獲得している。CAM 植物葉緑体は C3 植物葉緑体よりも大量のデンプンを蓄えられ、デンプン代謝能も高く、さらに、光エネルギーでピルビン酸を能動的に取り込みリン酸化できるという、C3 植物葉緑体にはない機能を持つ。CAM 経路のうち、昼間のトリオースリン酸の輸送には、C3 植物葉緑体の場合と同じく、プラスチド型リン酸輸送体の一つ、トリオースリン酸/リン酸輸送体 (TPT) が関与している (図 1)。一方、昼間の PEP の輸送、および夜間のグルコース 6-リン酸 (G6P) の輸送には、C3 植物葉緑体は非常に低い活性しか持たない PEP/リン酸輸送体 (PPT) と G6P/Pi 輸送体 (GPT) とが、それぞれ関与している (Neuhaus, *et al.* 1988, Neuhaus and Schulte 1996)。このように、CAM 植物葉緑体は、C3 植物葉緑体とは異なる固有の代謝産物輸送特性を持っている。



通性 CAM 植物アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) は、好適な条件では C3 光合成を行うが、乾燥ストレスや水ストレスを与えられると CAM 経路を誘導し (CAM 化)、C3 植物では光合成をできないような条件下でも継続的に光合成を行うことができるようになる。これまでの研究で、このアイスプラントの CAM 化の際、プラスチド型リン酸輸送体のうち、GPT の活性が大きく上昇することが分かっている (Kore-eda and Kanai 1997)。ストレスに応じて葉緑体の代謝産物輸送特性が変化するという報告はこれまでにあまり無く、大変ユニークな現象である。一方、アイスプラントの CAM 化に伴い、多くの遺伝子の転写産物量が増加することがすでに知られている (Cushman and Bohnert 1999, Kore-eda *et al.* 2004)。中でも CAM 特異的炭酸固定酵素、PEP カルボキシラーゼの遺伝子・*McPPC1* はいち早くクローン化され、そのプロモーター領域の機能解析が試みられたが、その転写調節に必要なシス因子やトランス因子の同定には至っていない。4 つのリン酸輸送体遺伝子のうち、*McTPT1* は CAM 化の過程で転写産物量は変化せず、*McGPT1* はやや増加する。これに対し *McGPT2* は *McPPC1* と同程度、あるいはそれ以上に顕著な CAM 特異的発現を示す (Kore-eda *et al.* 2005) ことから、このようなプロモーター領域の機能解析に向いている。本研究ではアイスプラント・リン酸輸送体の発現調節機構を明らかにするため、これらの遺伝子上流領域を単離することを 1 つ目の目的としている。リン酸輸送体ファミリーのプロモーター領域の機能的な解析・比較は、代謝産物輸送能制御機構の解明だけでなく、アイスプラントでのストレス応答遺伝子の転写制御機構の研究として、重要な知見を得られると期待される。

これまで多くの C3、C4 植物からリン酸輸送体各アイソザイムの完全長 cDNA が単離されているが、CAM 植物では、ドイツの Häusler らが *TPT1*、*PPT1*、*GPT1* の cDNA を、さらに我々がもう一つ *GPT* (*GPT2*) の cDNA をアイスプラントから単離した報告があるのみである (Häusler *et al.* 2000, Kore-eda *et al.* 2005)。これら 4 つのアイスプラント・リン酸輸送体は、他の植物のリン酸輸送体に対するアミノ酸配列上の類似性に基づき、アイソザイムの同定がされている。しかしこの同定はあくまでも類似性に基づく予想であり、これらの生理的な役割を議論するためには、これらが実際にリン酸輸送活性を持つことや輸送基質に対する特異性を、実験的・定量的に確かめなければならない。そこで本研究ではこれらの輸送体タンパク質を酵母細胞内で発現させ、精製後、輸送活性の速度論的解析を行うことを 2 つ目の目的としている。

2 研究の経過・成果

2-1 プラスチド型 G6P/リン酸輸送体遺伝子 *McGPT1* および *McGPT2* の構造の解明

アイスプラントのリン酸輸送体遺伝子として、従来から知られていた *McTPT1*、*McPPT1*、*McGPT1* の 3 つに加え、我々は新たに *McGPT2* を発見した。この遺伝子は他の 3 つに比べ、塩ストレスによる発現誘導の程度が非常に大きいことが分かっている。そこで、この遺伝子を中心に調べた。

① *McGPT2* cDNA の 5'側約 0.8 kb をプローブとし、ゲノム DNA に対しサザンブロット解析を行った

ところ、GPT2 遺伝子は1コピーであることが示唆された。

② *McGPT1* と *McGPT2* のゲノム DNA 断片を PCR 法で増幅した。その結果、*McGPT1* と *McGPT2* ともに、4つのイントロンをそれぞれ持つことが分かった。これらのイントロンの挿入位置は両者ともアラビドプシスの2つの GPT 遺伝子 (*AtGPT1* と *AtGPT2*) と全く同一であることがわかった。

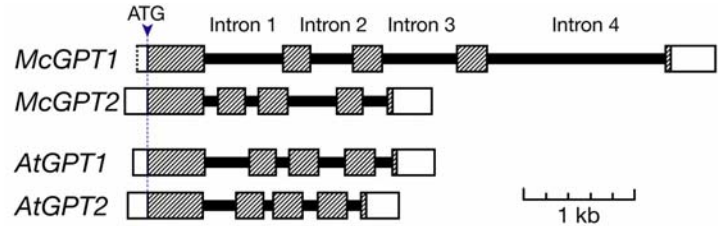


図2. GPT遺伝子のイントロン/エクソン構造の比較

アイスプラント (*Mc*) とアラビドプシス (*At*) の GPT 遺伝子転写領域を、翻訳開始コドン (ATG) の位置をそろえて図示した。太線と四角はそれぞれイントロンとエクソンを示し、斜線の部分は翻訳領域である。*McGPT1* については転写開始点は同定されていないので、データベースに登録されている cDNA 塩基配列の 5' 端を太点線で示した。

③ PCR 法を応用した「Cassette-ligation mediated 法」により、*McGPT2* 遺伝子上流領域約 2.7 kb を単離した。この領域の塩基配列を調べたところ、非常に長い逆向き反復配列が、転写開始点の上流 2.1 kb 付近 (IR1a と IR1b) と 1.4 kb 付近 (IR2a と IR2b) とを中心に見られた。特に IR1b は、*McGPT2* と同じくアイスプラントの CAM 化の際に転写産物量が大きく上昇する *McPPC1* の遺伝子上流領域にも共通してみられる約 150 bp の配列を含んでいた。

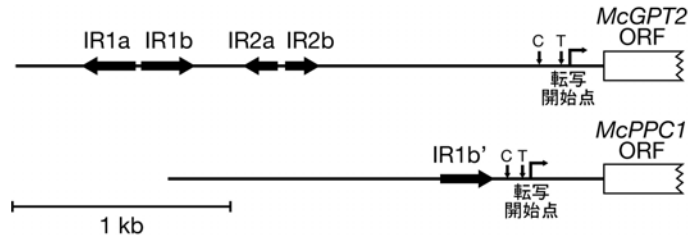


図3. *McGPT2* と *McPPC1* の遺伝子上流領域の比較

McGPT2 遺伝子上流領域には、転写開始点の上流 2.1 kb 付近 (IR1) と 1.4 kb 付近 (IR2) とに非常に長い逆向き反復配列が見られた。*McPPC1* 遺伝子上流領域には、このような長い反復配列は見られないが、*McGPT2* の IR1 下流側半分 (IR1b) とよく似た配列 (IR1b') がある。C は CAT box、T は TATA box と思われる配列の位置をそれぞれ示す。

④ *McGPT2* ほどではないが CAM 化で転写産物量が上昇する *McGPT1*、さらに、CAM 化で転写産物量が変化しない *McTPT1* についても遺伝子上流領域の単離を進めている。特に、*McGPT2* は根では全く発現していないのに対し、*McGPT1* は根で非常によく発現しており、組織特異的な発現調節に関わる因子についても、知見が得られる可能性がある。現在までのところ、*McGPT1* では約 0.5 kb、*McTPT1* では約 0.8 kb の遺伝子上流領域が単離できている。

なお上記 2-1 の内容は、第 48 回日本植物生理学会年会で公表した (Kore-eda *et al.*, 2007)。

2-2 アイスプラント・リン酸輸送体の酵母細胞内での発現と基質特異性の決定

アイスプラントの4つのプラスチド型リン酸輸送体 (TPT1、PPT1、GPT1、GPT2) の輸送活性の速度論的解析を行うため、これらの遺伝子 (それぞれ、*McTPT1*、*McPPT1*、*McGPT1*、*McGPT2*) の ORF 全長を含む cDNA 断片を、大腸菌/出芽酵母のシャトルベクター pYES263 に挿入し、酵母細胞内で各輸送体を発現させ、リポソームに組み込む準備を進めている。

上記遺伝子のうち、前年度までにアイスプラント TPT1 および GPT2 輸送体は予想通りの基質特異性を示すことが分かっていた。しかし、この結果はこれらのアイスプラント輸送体タンパク質を発現している酵母細胞の粗膜画分をリポソームに組み込んで得たものであったので、酵母自身に由来すると思われる輸送活性をバックグラウンドとして含んでおり、詳細な速度論的解析を行うことができなかった。

そこで、アイスプラント・リン酸輸送体を酵母細胞で発現させたあと、それらを精製してからリポソームに組み込むこととした。そのためには、精製の際に利用するタグと目的の輸送体成熟タンパク質との融合タンパク質をコードする融合遺伝子を作成する必要がある。これまでに、*McTPT1*、*McPPT1*、*McGPT1*、*McGPT2* の全長 cDNA をクローン化した。現在、精製のためのタグ (ヒスチジンタグと GST タグ) を付加した融合遺伝子を作成している。

3 参考文献

- Cushman JC, Bohnert HJ (1999) Annual Review of Plant Physiol Plant Mol Biol **50**: 305-332
- Häusler RE, Baur B, Scharte J, Teichmann T, Eicks M, Fischer KL, Flugge U-I, Schubert S, Weber A, Fischer K (2000) Plant J **24**: 285-296
- Kore-eda S, Cushman MA, Akselrod I, Bufford D, Fredrickson M, Clark E, Cushman JC (2004) Gene **341**: 83-92
- Kore-eda S, Kanai R (1997) Plant Cell Physiol **38**: 895-901
- Kore-eda S, Noake C, Ohishi M, Ohnishi J, Cushman JC (2005) Funct Plant Biol **32**: 451-466
- Kore-eda S, Morita K, Nakamata K, Ohnishi J (2007) Plant Cell Physiol. **48**, s175、ポスターNo.034
- Neuhaus HE, Holtum JA, Lutzko E (1988) Plant Physiology **87**: 64-68