

プロジェクト名：環境ストレス耐性有用植物の分子育種

プロジェクト代表者：川合 真紀（理工学研究科・准教授）

1 研究の目的

本プロジェクトでは、植物が有する環境応答能力を分子遺伝学、植物生理学的手法により解明し、その機構を改変、増強することによって、不良環境下でも生育が可能な植物の分子育種、多収性植物の開発を目指す為の基盤研究をおこなう。

そのため、代表者がこれまで単離、解析を進めてきた酸化ストレス耐性因子の機能解明を進め、遺伝子組換え植物の表現型解析と相互作用因子の生化学的解析により、これらの遺伝子の分子育種への有効性について検討をおこなう。

2 研究背景

*BI-1* 遺伝子は酸化ストレスに応答して植物が引き起こす細胞死に対する抑制因子である。細胞死の制御に関わる因子は、これまで植物ではほとんど報告例が無かったが、代表者らは1999年にイネとシロイヌナズナより *BI-1* 遺伝子を単離し、それ以来、継続して本因子の機能解明をおこなってきている。これまでの成果から、本因子が動植物に広く保存された細胞死抑制因子としての機能を有する小胞体膜タンパク質であることを示した。また、本遺伝子の発現は、病原菌感染やエリシター等の生物ストレス、オゾンや高温・低温等の環境ストレス、さらには窒素欠乏やカリウム欠乏といった栄養ストレス下で発現が増加することから、環境適応に広く関与していることが考えられた。さらに本因子を過剰発現したイネ培養細胞では、いもち病菌由来のエリシターによって引き起こされる過敏感細胞死が抑制された。また、*BI-1* を過剰発現させた細胞は、サリチル酸や過酸化水素、メチルピオロゲンなどが引き起こす酸化ストレス誘導性の細胞死に対して耐性を示すため、種々の環境ストレス耐性植物の分子育種への応用の期待は高く、その分子機構の解明は急務となっている。

3 研究結果

*BI-1* 遺伝子は酸化ストレスが引き起こす細胞死に対する抑制因子である。本プロジェクトでは、その相互作用因子の解析から、植物のストレス応答における脂質分子種の関与とその代謝制御に関して、複数の新しい知見を得る事ができた。

Yeast two hybrid system によって *BI-1* 結合因子として単離されたシトクロム b5 (Cb5) は、小胞体などで脂質代謝酵素へ電子を輸送する機能を有する。一方、酵母の遺伝子欠損株を用いた解析からは、その分子内に Cb5 様領域を含む SCS7 (fatty acid hydroxylase) を欠失した株で、*BI-1* による細胞死抑制機能が低下していることが明らかとなった。植物にも SCS7

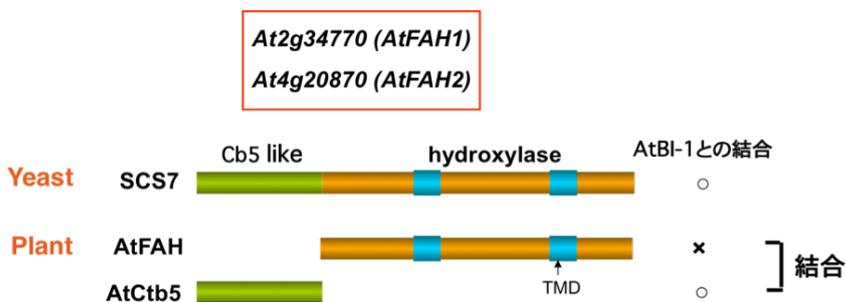


図1：脂肪酸のヒドロキシル化酵素の比較。  
酵母の SCS7 は分子内に Cb5 ドメインとヒドロキシラーゼ領域を含むが、植物の FAH は Cb5 ドメインを持たず、単独では低い酵素活性しか有さない。

の相同遺伝子が存在し、AtFAH 呼ばれている。本因子はヒドロキシラーゼドメインを有するが、Cb5 ドメインをもたない (図1)。AtFAH が酵母の SCS7 と同様の機能を有しているかを調べる為、酵母を用いて以下の実験をおこなった。SCS7 を欠失した酵母はヒドロキシ脂肪酸を欠くが、ここに AtFAH を発現すると、若干のヒドロキシ脂肪酸が合成された。さらに、AtCb5 を共発現すると野生型の酵母が有する以上のヒドロキシ脂肪酸が合成された。このことから、Cb5 ドメインを欠く AtFAH は単独では低いヒドロキシル化活性しか持たないが、植物由来の AtCb5 が加わることによって高い酵素活性を有することが明らかとなった。また、植物細胞内で BI-1 と AtCb5 が結合することが FRET 解析によって証明された。以上の結果から、植物では小胞体膜上で BI-1, AtCb5, AtFAH が複合体を構成して機能すると考えられた。一方、酵母では BI-1 は SCS7 分子内の Cb5 ドメインと相互作用すると考えられ、両者が異なった複合体構成を有していることが新たに示唆された。これらの結果は、生物が酸化ストレスという共通のストレスに対し、どのような応答機構を獲得したかという点を考える上からも興味深い。

本研究により、BI-1 が小胞体膜上に複合体を形成して存在し、その相互作用相手として FAH というスフィンゴ脂質の代謝関連酵素を同定した。スフィンゴ脂質はそれ自身が様々な生命現象のセカンドメッセンジャーとして機能していることが報告されているばかりでなく、細胞膜上で受容体やチャネルタンパク質などの局在の足場となる脂質ラフトを構成する因子として近年注目されている物質である。BI-1 がこれらの組成や性質を変化させて、環境ストレス応答の制御に関与している可能性が新たに示唆された。

#### 4 今後の展望

本研究により単離された小胞体膜上複合体に含まれる構成因子について、個々の過剰発現体、ノックアウト植物を作成し、その表現型を解析することにより、ストレス応答時の植物の反応経路におけるスフィンゴ脂質代謝酵素の寄与が解明できると期待できる。また、これらの植物の膜組成を解析することにより、細胞膜の改変が植物の生育、生長に与える影響を解明できる。脂質ラフト自身の組成変化、およびそこに局在する受容体やチャネルタンパク質の解析が今後必要であり、これらの統合的な解析により、環境ストレス耐性植物の分子育種が可能になると考えられる。



図2：小胞体膜の BI-1 を含む複合体の構成の違い。SCS7 / FAH が分子内に b5 領域を有するかどうかにより、小胞体膜上での複合体が異なっている可能性が示唆された。

#### 5 成果

本プロジェクトの成果は1報の原著論文と1報の日本語雑誌により発表した。また、現在、さらに1報の論文を作成中である。また、国内シンポジウムや国内学会、国際学会においても発表をおこない、成果報告をおこなった。さらに、本プロジェクトに関わる学生が日本植物脂質シンポジウムにおいてポスター賞を受賞するなど、本研究の成果は高い評価を得た。