

プロジェクト名：環境ストレス耐性有用植物の作出を目指した分子基盤研究

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

近年、人類の活動により地球環境の破壊が深刻な問題となっている。差し迫った問題として、人口増加による食料不足や、気候変動が食料生産にもたらす悪影響が強く懸念されている。本研究では、植物が有する環境応答能力を分子遺伝学、植物代謝工学的手法を用いて改変、増強することにより、不良環境でも生育が可能な植物、多収性の植物の分子育種を目指すための基礎研究をおこなう。

2 研究背景

BI-1 (Bax Inhibitor-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。植物は様々に変動する環境条件下で生育しているが、多くの環境ストレスは共通して光合成の阻害を引き起こし、これが植物細胞内で活性酸素を発生させる。活性酸素類は直接植物細胞に障害を与え生育阻害を誘因するが、これに加え、植物の防御反応を誘導したり、障害細胞の積極的な排除のため、プログラム細胞死を引き起こすシグナルとして作用することも近年明らかとなっている。

代表者らは 1999 年に植物の酸化ストレス誘導性細胞死の制御に関わる因子として、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、最近では *BI-1* による酸化ストレス誘導性細胞死の抑制機構にスフィンゴ脂質代謝が関与することを明らかにしたが、その具体的な分子機構は不明となっている。さらに、本遺伝子は、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と考えられる。さらに本因子を過剰発現した植物細胞では、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る。さらには、サリチル酸や過酸化水素、メチルビオロゲンなどが引き起こす酸化ストレス誘導性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

これまでの研究から、*BI-1* は小胞体での脂質代謝に関与することが示唆されているが、その細胞死抑制との直接的なつながりや、脂質代謝の下流のイベントはよくわかっていない。そこで、本研究では *BI-1* 過剰発現イネの培養細胞における代謝物解析をおこない、*BI-1* によるストレス耐性機構に関与するファクターの精査をおこなった。

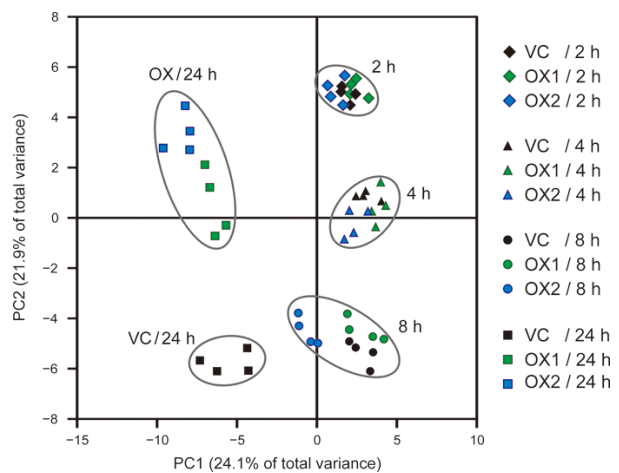
(1) *BI-1* 過剰発現イネ培養細胞におけるストレス耐性

BI-1 過剰発現イネ系統の種子から培養細胞株を樹立し、メナジオン、過酸化水素などの酸化ストレス処理に対する耐性能のテストをおこなった。これにより、継代 4 日目に 200 μM メナジオンで一晩処理したとき、非形質転換細胞で検出された細胞死が *BI-1* 過剰発現細胞で有意に抑制されていることを確認した。また、このとき、活性酸素により容易に失活することが知られているアコニターゼ活性はメナジオン依存的に低下し、過剰発現系統とコントロール（空ベクターを導入）系統間の差は検出されな

かった。このことから、イネ培養細胞において BI-1 過剰発現は、メナジオンによる細胞内の活性酸素の生成と、その一次的な障害作用には影響せず、その下流で機能していると考えられた。

(2) 過剰発現細胞における代謝物解析

酸化ストレスを受けた際のイネ細胞内の代謝変動を明らかにするため、メナジオン処理をおこなった BI-1 発現細胞と、コントロール細胞を用いて、キャピラリー電気泳動質量分析計(CE-MS)による代謝物測定をおこなった。その結果、ストレスを受けた細胞では、数時間内に全体的なアミノ酸代謝、酸化リン酸化経路、グルタチオン生合成系が強く活性化されることが分かった。一方で、解糖系及び TCA サイクルの代謝物はメナジオン処理により大きく減少するものが多かった。これは、炭素代謝が解糖系より酸化リン酸化経路へ優先的に流れていることや、活性酸素による直接的な酵素失活やタンパク質分解による TCA サイクルの阻害が要因と考えられる。こうしたメナジオン処理後 4-8 時間後をピークとする急激な代謝変動には BI-1 過剰発現の影響はほとんどなかった。一方、細胞死誘導期以降には、解糖系の代謝物や、Glu、Asp 含量、グルタチオンや NAD(P)のレドックスバランス、エネルギー代謝において、BI-1 過剰発現系統で回復傾向がみられた。以上の結果から、BI-1 過剰発現により細胞死が抑制された細胞では、代謝が酸化ストレスに対する適応応答へ移行していると考えられ、これが BI-1 過剰発現系統におけるストレス耐性に寄与している可能性が示唆された。



酸化ストレス処理後の BI-1 高発現イネ細胞(OX1, OX2)、およびコントロール細胞(VC)における代謝物変動の主成分分析。処理後初期では両者に差はないが、24 時間後には大きな差が検出された。

4 今後の展望

BI-1 による酸化ストレス誘導性細胞死の抑制機構にスフィンゴ脂質代謝が関与することが示唆されている。

スフィンゴ脂質は脂質ラフトの主要構成成分であり、またそれ自身が細胞死を誘導するシグナル物質としても働く。今後は、BI-1 と結合することが明らかになった Fatty acid hydroxylase、LCB 不飽和化酵素の酵素活性や、その産物の動態を脂質分析によって明らかにし、BI-1 によるストレス耐性の分子機構の解明をさらに進める。また、環境応答の場として重要な役割を果たしていると考えられる細胞膜脂質ラフトの構成変化にも注目して研究を進める。さらには、本遺伝子の発現量を改変したイネの表現型解析を進め、植物の環境ストレス応答のメカニズムの解明と耐性植物の分子育種を目指した基盤研究へとつなげていきたい。

5 成果

- Nagano, M., Ihara-Ohori, Y., Imai, H., Inada, N., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Uchimiya, H. and Kawai-Yamada, M. (2009) Functional association of cell death suppressor, *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome *b₅*. *Plant J.* 58, 122-134.
- Kawai-Yamada, M., Hori, Z., Ogawa, T., Ihara-Ohori, Y., Tamura, K., Nagano, M., Ishikawa, T. and Uchimiya, H. (2009) Loss of calmodulin binding to Bax Inhibitor-1 affects *Pseudomonas*-mediated hypersensitive response-associated cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 84, 27998-28003.
- Ishikawa, T., Takahara, K., Hirabayashi, T., Matsumura, H., Fujisawa, S., Terauchi, R., Uchimiya, H. and Kawai-Yamada, M. (2010) Metabolome analysis of response to oxidative stress in rice suspension cells overexpressing cell death suppressor Bax inhibitor-1. *Plant Cell Phys.*, 51, 9-20.