

# プロジェクト名：代謝工学による環境ストレス耐性植物の分子育種

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

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植物分子遺伝学、植物代謝工学的手法を用いて改変、増強することにより、不良環境下でも生育が可能な、多収性の植物の分子育種を目指すための基盤研究を行った。具体的には、酸化ストレス耐性関連遺伝子の機能解析と、それらの遺伝子の発現量を変化させた組換え植物の成長、代謝変動解析を行い、植物の酸化ストレス耐性獲得の分子機構の一端を解明した。

## 2 研究背景

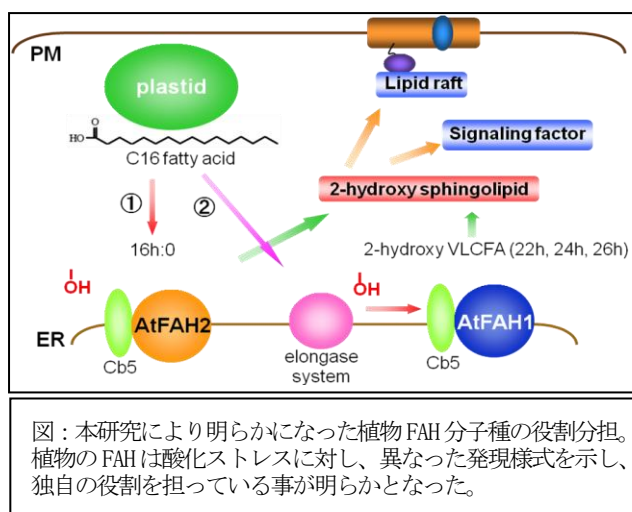
BI-1 (Bax Inhibitor-1)は、酸化ストレスに応答して植物に引き起こされるストレス誘導性細胞死の抑制因子である。代表者らは1999年に植物の酸化ストレス誘導性細胞死の制御に関与する因子として、イネとシロイヌナズナより *BI-1* 遺伝子を単離し、それ以降、継続して本因子の機能解明を行ってきた。これまでの成果として、本因子が動植物に広く保存された細胞死抑制因子としての機能を有する小胞体膜タンパク質であることを示した。さらに本遺伝子は、病原菌の感染時や、オゾンや高温・低温等の環境ストレス、窒素欠乏やカリウム欠乏といった栄養ストレス下で発現が増加する事から、植物の環境適応に広く関与する機能を有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のためのツールとして期待が大きく、その分子機構の解明が望まれている。本プロジェクト研究では、特にBI-1との相互作用が検出された脂質代謝関連酵素タンパク質との相互作用や、その相互作用因子自身の機能を明らかにすることにより、BI-1を介した細胞死制御の分子機構の解明を試みた。

先の研究成果から、BI-1タンパク質は小胞体膜上で電子伝達因子であるシトクロム b5 と相互作用することが明らかとなっている。シトクロム b5 がBI-1によるストレス耐性機構に関与するかを調べる為に、酵母の変異体を用いた解析を行った結果、スフィンゴ脂質脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼ (FAH) 遺伝子が欠失した遺伝子欠損酵母株では、BI-1による酸化ストレス誘導細胞死の抑制活性が失われることが明らかとなり、BI-1の機能にFAHが関与していることが強く示唆された。そこで、本研究では、FAH自身の機能解析に加え、本因子の発現量を変化させた植物体の表現型を、生化学、代謝工学的手法を用いる事により解析した。

## 3 研究成果

スフィンゴ脂質脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼ FAH は、これまでに出芽酵母や哺乳類で同定され、その機能が研究されてきた。我々が単離した植物の FAH は、これら既知の分子種とは大きく異なり、前者が分子内にシトクロム b5 ドメインを含有しているのに対し、植物の FAH は、その分子内にシトクロム b5 ドメインを含まないという大きな違いが存在した。すなわち、植物の FAH は小胞体局在型である単独のシトクロム b5 と相互作用することで電子を受容しているのではないかと考えた。そこで、BiFC法によって解析を行った結果、シトクロム b5 と FAH が小胞体膜上で相互作用することが植物細胞内で明らかとなった。さらに、BiFC法とFRET法を組み合わせた手法により、BI-1、FAH、シトクロム b5 の3者の相互作用も明らかになり、これらの複合体が小胞体膜上に局在することがBI-1による細胞死制御機構に重要であることが示唆された。また、シロイヌナズナには AtFAH1 と AtFAH2 という2種類の *FAH* 遺伝子が存在する。これらが共に類似の機能を有しているのかを調べるため、それぞれの変異体の解析を行った。AtFAH1については、RNAi ノックダウンシステムを作成し、遺伝子の発現量が減少した植物体を用いて表現型の解析を行った。一方、AtFAH2については、T-DNA が遺伝子中に挿入された完全な欠損植物体入手することができたため、これを材料として表現型の解析を行った。その結果、これらの植物体は、通常の生育条

件下では特に顕著な表現型を示さないが、過酸化水素やメナジオンといった酸化ストレス薬剤に対して感受性が上昇していることが明らかとなり、これらに対する応答に FAH の機能が関与していることが示された。さらに、ガスクロマトグラフィー質量分析装置を用いて、これらの植物体における 2-ヒドロキシ脂肪酸の定量を行った結果、AtFAH ノックダウン植物系統では、長鎖の 22h:0 から 26h:0 といった 2-ヒドロキシ脂肪酸量の低下が著しく、いっぽう、AtFAH2 欠損植物体では、16h:0 が著しく減少しており、それ以外の 2-ヒドロキシ脂肪酸量に大きな変化は見られなかった。すなわち、シロイヌナズナに存在する 2 つの FAH は、それぞれ異なった長さの脂肪酸を基質として働き、機能分化している可能性が示された。酵母や動物などは一種類の FAH を持っているのみで、このような機能分担を行う分子種の例は知られておらず、植物に特異的な現象である可能性が高い。また、FAH1 のみが酸化ストレス処理によって発現上昇する性質を持つ事も明らかとなり、本因子が植物の酸化ストレス応答において重要な役割を担っている可能性も示唆された。現在、これらの結果について学術誌への投稿準備を進めている。



#### 4 今後の展望

本研究により、BI-1 は小胞体膜上で脂質代謝酵素の一つである FAH と相互作用して機能することが明らかとなった。さらにスフィンゴ脂質の不飽和化酵素や、脂肪酸伸長酵素も BI-1 の相互作用因子の候補としてあげられてきており、これらの酵素群の総合的な制御により植物の酸化ストレス応答を変化させることが可能となることも考えられる。こうした複雑な植物脂質の代謝制御については未知の部分が多く、今後の研究展開が必要である。また、このような植物の環境応答の分子機構が解明されることにより、環境ストレス耐性植物の分子育種のための有力なターゲットとなる因子が同定されてくることも期待され、今後の研究の進展が期待される。

#### 5 発表論文

Takahara, K., Kasajima, I., Hashida, S., Takahashi, H., Onodera, H., Toki S., Yanagisawa, S., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Metabolome and photochemical analysis of rice plants over-expressing Arabidopsis. NAD kinase gene. (2010) *Plant Physiology*, 152, 1863-1873.

Hashida, S., Itami, T., Takahashi, H., Takahara, K., Nagano, M., Kawai-Yamada, M., Shoji, K., Goto, F., Yoshihara, T., Uchimiya, H. (2010) Nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenyltransferase-mediated regulation of NAD biosynthesis protects guard cells from reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal movement in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 61, 3813-3825.

Ishikawa, T., Watanabe, M., Nagano, N., Kawai-Yamada, M., Lam, E. Bax Inhibitor-1: A highly conserved endoplasmic reticulum-resident cell death suppressor. (2011) *Cell Death and Differentiation*, in press

#### 6 外部資金獲得への寄与

本プロジェクト研究経費による助成をもとに外部資金獲得を目指した結果、内閣府・最先端・次世代研究開発支援プログラム「光合成電子伝達の最適化による植物バイオマス増進の技術基盤研究」代表者：川合真紀、H22-H25、直接経費 104,000 千円、間接経費 31,200 千円（合計 135,200 千円）を獲得することができた。

(注1) 競争的資金獲得推進研究で支援を受けた者は、外部資金の応募・採択状況を明記すること。

(注2) 知財に関連して公表できないものについては、本報告書には記載せず、別紙（任意）にその旨を記入し、提出すること。