

プロジェクト名：環境ストレス耐性植物の開発のための基盤研究

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、人類の活動による環境破壊が深刻な問題になるとともに、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、代謝工学、生化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行う。具体的には、酸化ストレス耐性遺伝子としてこれまで研究を推進してきたシロイヌナズナの因子(BI-1)の機能解析とその応用を目指す。そのため、BI-1の高発現により酸化ストレス耐性を獲得した植物細胞におけるシグナル伝達系の解明、膜組成の解析、結合因子の探索、およびそれらの発現量を変化させた組換え植物の生長、代謝変動解析を行う。また、これまでのモデル植物を主要な対象とした実験から、イネ等の、より実用性を重視した植物種を用いた研究へと展開する。

2 研究背景

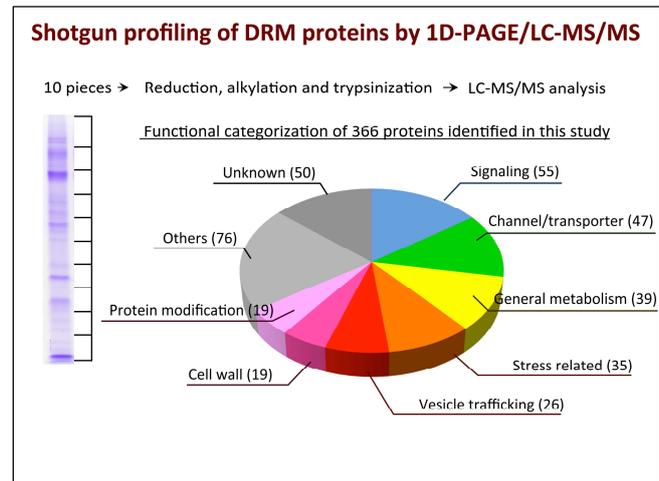
BI-1 (Bax Inhibitor-1)は、酸化ストレスに応答して引き起こされるストレス誘導性細胞死の抑制因子である。代表者らは1999年に植物の酸化ストレス誘導性細胞死の制御に関与する因子として、イネとシロイヌナズナより *BI-1* 遺伝子を単離し、それ以降、継続して本因子の機能解明を行ってきた。これまでの成果として、本因子が動植物に広く保存された細胞死抑制因子としての機能を有する小胞体膜タンパク質であることを示した。さらに本遺伝子は、病原菌の感染時や、オゾンや高温・低温等の環境ストレスに応答して発現量が上昇することから、植物の環境適応に関わる機能を有していると考えられる。さらに本因子を過剰発現した植物細胞は、サリチル酸や過酸化水素、メチルピ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され、その分子機構の解明が望まれている。近年、我々の研究室では本因子と相互作用する因子の単離を進めてきた。その結果、複数の脂質代謝酵素がBI-1と電子伝達因子であるシトクロム b5 (あるいはシトクロム b5 様ドメイン) を介して相互作用し、脂質組成に影響を与えている可能性が示された。

BI-1の相互作用因子として我々が注目してきた因子であるFAHは、脂肪酸のヒドロキシル化酵素をコードしており、主にスフィンゴ脂質の生合成に関わる因子である。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する。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。これらの相互作用研究は主にモデル植物であるシロイヌナズナを用いて行われてきたが、本プロジェクト研究では、穀物のモデル植物とされるイネを用い、BI-1の酸化ストレス誘導性細胞死の抑制機構の普遍性の確認と、さらに、イネ培養細胞を用いた細胞膜組成の変動解析をおこない、BI-1による酸化ストレス耐性の付与の機構解明を試みた。

3 研究成果

イネにおいてBI-1を過剰発現すると、メチルピオロゲンや過酸化水素などの酸化ストレスに対する耐性を付与する。また、BI-1がFAHを含めた複数の脂質代謝酵素を介して機能している可能性がシロイヌナズナ等を用いた解析により示されている。BI-1との物理的、機能的相互作用が示唆された因子としては、スフィンゴ脂質ヒドロキシル化酵素 (FAH)、脂肪酸伸長酵素 (ELO)、スフィンゴ脂質 $\Delta 8$

不飽和化酵素 (SLD) があり、酸化ストレス耐性の鍵となるのがスフィンゴ脂質代謝であると考えられた。スフィンゴ脂質は細胞中で様々な機能を有するが、特に細胞膜上で、イオンチャネルや受容体などの環境ストレス応答に関わるシグナル因子を局在化させるためのマイクロドメイン構造体として機能していることが知られている。そこで、BI-1 の発現がマイクロドメイン上のシグナル因子のプロファイルを変化させ、これが植物の酸化ストレス応答性を変化させているとの仮説を立て、これに基づき研究を行った。すなわち、BI-1 を過剰発現させ、酸化ストレス耐性を獲得したイネ培養細胞と、コントロール細胞 (野生型) からそれぞれ、界面活性剤不溶性の画分としてマイクロドメインを精製し、そこに含まれる脂質の組成分析と、マイクロドメインタンパク質のプロテオーム解析を行い、両者の比較を行った。その結果、マイクロドメインを構成する脂質組成が両者の間で異なっており、BI-1 過剰発現によりスフィンゴ脂質の量が増加していることが確認された。また、LC-MS/MS システムを用いたタンパク質同定により、マイクロドメイン上に局在する複数の機能タンパク質を同定することができた (図参照)。これらについても、BI-1 の過剰発現の有無で比較を行った結果、複数のタンパク質の存在量が著しく変化していることが明らかとなった。これらの結果は、BI-1



図：イネ培養細胞の細胞膜上の DRM に存在するタンパク質のプロテオーム解析。植物の環境応答において重要な役割を果たしていると考えられる複数のタンパク質を同定することに成功した (石川ら、未発表)

が実際に脂質組成に影響をあたえ、細胞膜マイクロドメインのプロファイルに変化をもたらすことを直接的に示したものであり、量的変動を示したマイクロドメインタンパク質が酸化ストレス耐性に直接的に関与していることを示唆している。

4 今後の展望

本研究により、BI-1 の過剰発現により付与される酸化ストレス耐性能には、細胞膜マイクロドメインの構造変化と、そこに局在するシグナル伝達因子のプロファイル変化が重要である可能性が示唆された。今後、この仮説をさらに検証していくため、量的変動を示した複数のタンパク質について、それらの機能欠損植物体、および過剰発現系統の作出をおこない、酸化ストレス応答へのこれらの因子の寄与を検討する。こうした一連の研究により、植物の環境ストレス耐性植物の分子育種のためのターゲットとなる因子が同定されることが期待される。

5 発表論文

- 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*, 18, 1271-1278.
- Watanabe, M., Miyagi, A., Nagano, M., Kawai-Yamada, M., Imai, H., Characterization of glucosylceramides in the Polygonaceae, *Rumex obtusifolius* L. injurious Weed. (2011) *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75, 877-881.
- Nakasone, A., Fujiwara, M., Fukao, Y., Biswas, K.K., Rahman, A., Kawai-Yamada, M., Narumi, I., Uchimiya, H., Oono, Y., SMALL ACIDIC PROTEIN 1 acts with RUB modification components, the COP9 signalosome and AXR1, to regulate growth and development of *Arabidopsis thaliana*. (2012) *Plant Phys.*, *in press*