

学 位 論 文 題 名

Molecular and Physiological Studies
on Sugar Regulation in Rice

(イネにおける糖応答制御の分子生理学的研究)

学位論文内容の要旨

高等植物において、糖はエネルギーや炭素骨格となるばかりではなく、シグナル分子としても機能する。長期高 CO₂ 環境下で生育した植物はバイオマスの増大、糖の蓄積、光合成活性や窒素含量の低下などが観察される。この光合成活性の低下は Rubisco をはじめとした光合成関連遺伝子群の発現抑制や、タンパク量の減少を伴う。この遺伝子発現抑制機構にヘキソキナーゼが関わることを示唆されているが、分子レベルでの解明が待たれている。また、タンパク量の減少を導く窒素含量の低下の原因として、高 CO₂ 条件では、通常大気と異なる窒素同化制御機構の存在が示唆される。これら糖による遺伝子発現制御機構や窒素同化機構への影響を明らかにすることを目的とし、本研究を遂行した。

糖による遺伝子発現制御機構を明らかにするために、イネ品種能登ひかりより得た単離胚カルスを糖処理し、糖で誘導される遺伝子群 *OsSUR1-2* (*Oryza sativa* sugar-up-regulated) と糖で抑制される遺伝子群 *OsSDR1-5* (*Oryza sativa* sugar-down-regulated) をマイクロアレイにより同定した。*OsSUR1* は新規な遺伝子であるが、EF-hand モチーフを持つタンパク質をコードしていた。大腸菌に発現させた組換え *OsSUR1* タンパク質はカルシウム結合能を示すことを明らかにした。また *OsSUR1* の発現器官が、吸水後 6 時間から 24 時間の種子胚と出穂開花後の桿であることをノーザン解析により明らかにした。GFP 融合 *OsSUR1* タンパク質をイネシュートに一過的に発現させ、細胞内局在性を検討したが、特に特異的な局在は観察されなかった。単離胚カルスにおいて、様々な糖を用いた *OsSUR1* の発現誘導をヘキソキナーゼの基質となる糖において観察した。その挙動は、ヘキソキナーゼ依存的に発現抑制を受けるイネ α -アミラーゼ遺伝子 *RAmy3D* の発現と全く逆であったことから、*OsSUR1* はヘキソキナーゼ依存的に発現誘導されると考えられた。糖による *OsSUR1* の発現誘導は、カルシウムシグナリングの阻害剤やタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド処理によって阻害されないことを示した。これらの結果から *OsSUR1* はカルシウム結合タンパク質をコードするが、その発現にはカルシウムシグナリングは関与せず、糖存在下において、ヘキソキナーゼの活性に依存した何らかの細胞内に存在する転写制御因子が働き、発現が誘導される可能性を示した。

通常大気条件下における窒素固定において、窒素の取り込みのフィードバックには、窒素源そのものか、もしくは同化後の窒素代謝産物の蓄積が関与するとのモデルが提唱されている。また、イネでは、窒素飢餓処理後にアンモニア処理を行うと、アンモニアの吸収活性が一時増加することが報告されている。しかし、これらの機構とアンモニア固定に必要な炭素骨格の供給量 (C) との議論はなされていなかった。イネ品種日本晴れを高 CO₂ 処理し光合成活性を上昇させ、炭素骨格供給量を増加させた結果、8 時間後にはアンモニア吸収量が 5 倍に増加するが 24 時間後には通常大気条件下における吸収量と変わらなくなることが観察された。このことから、通常大気条件下におけるアンモニアの取り込みのフィードバックは、アンモニアそのもの、もしくは同化後の窒素代謝産物の蓄積が関与するというよりむしろ C の欠乏に起因していると考えられた。また、高 CO₂ 処理によって、アンモニアを固定するのに十分量の炭素骨格が供給されると、植物体を受容できる窒素量 (N) が飽和し、C が存在していてもアンモニアの取り込みのフィードバックが働くことが推察された。よって前者を C-deficient-regulation、後者を N-saturated-regulation と名付け、これらを新しいモデルとしてその検証を試みた。

植物を窒素飢餓処理した場合、その間に C が蓄積すると考えられるが、その C の蓄積量は光合成活性に依存すると考えられる。通常大気で生育させたイネ (36 Pa) と高 CO₂ 条件下で生育させたイネ (110 Pa) を窒素飢餓処理した後、2 時間窒素源で処理し、アンモニアの吸収活性変化を Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS) を用いて測定した。PETIS は短寿命の放射活性物質を植物に与え、その移行、吸収活性をリアルタイムで計測できる。窒素源に硝酸アンモニウムを用いた結果、36 Pa ではアンモニア吸収活性が低下し、110 Pa では上昇した。このことから、36 Pa では蓄積した C が窒素源と同化したことにより欠乏した状態、即ち C-deficient-regulation が起きたのに対し、光合成活性の高い 110 Pa では C が完全に消費されていないだけでなく、硝酸アンモニウム処理に起因する何らかのシグナルがアンモニア取り込みを促進させたと考えられた。また、窒素源にグルタミンを用いたところ、先の結果とは逆に 36 Pa ではアンモニアの吸収活性が上昇し、110 Pa では低下した。このことは、110 Pa ではグルタミン処理によって N が飽和し、C が存在していてもフィードバックがかかる N-saturated-regulation が起きたのに対し、36 Pa はもともと光合成活性が低く、恒常的に N が欠乏していたためグルタミン処理を行っても N-saturated-regulation が起きなかったと考えられた。また 36 Pa におけるアンモニアの吸収活性はグルタミン処理で促進されたことから、窒素飢餓処理後に窒素源処理をおこなった場合に観察されるアンモニア取り込み活性の上昇は、窒素飢餓後の内在のグルタミン濃度の上昇が関与する可能性が示唆された。よってイネにおける窒素飢餓処理後のアンモニア吸収活性は、アンモニアを付与されたことによって生合成されたグルタミンをシグナルとして一時上昇し、その後、通常大気条件では C-deficient-regulation によって、高 CO₂ 環境下では N-saturated-regulation によってフィードバックがかかり低下すると考えられた。また、高 CO₂ 環境下で生育したイネが、通常大気条件下で生育したイネと比較して糖の蓄積や窒素含量の減少する原因は、炭素骨格が存在するにも関わらずアンモニアの吸収を抑制する N-saturated-regulation が働くことで、余剰となった炭素骨格が蓄積していくことに起因するのではないかと推察され

た。

最後に、ヘキソキナーゼ依存型の遺伝子発現制御の解明に向けた新規なマーカー遺伝子 *OsSUR1* を単離し、その植物体における発現と性質を明らかにし、また、高 CO₂ 処理を併用することでアンモニアの同化機構に関して新しいモデルを提唱し、イネにおける糖応答制御そして将来直面するであろう高 CO₂ 環境下における植物の生理機能変化に関して大きな知見を提供した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 口 淳 二

副 査 教 授 加 藤 敦 之

副 査 教 授 大 崎 満 (北海道大学大学院農学研究科)

学 位 論 文 題 名

Molecular and Physiological Studies on Sugar Regulation in Rice

(イネにおける糖応答制御の分子生理学的研究)

高等植物において、糖はエネルギーや炭素骨格となるばかりではなく、シグナル分子としても機能する。長期高 CO₂ 環境下で生育した植物はバイオマスの増大、糖の蓄積、光合成活性や窒素含量の低下などが観察される。この光合成活性の低下は Rubisco をはじめとした光合成関連遺伝子群の発現抑制や、タンパク量の減少を伴う。この遺伝子発現抑制機構にヘキソキナーゼが関わることを示唆されているが、分子レベルでの解明が待たれている。また、タンパク量の減少を導く窒素含量の低下の原因として、高 CO₂ 条件では、通常大気と異なる窒素同化制御機構の存在が示唆されるが、そのことはまだ示されていない。これら糖による遺伝子発現制御機構や窒素同化機構への影響を明らかにすることを目的とし、本研究を遂行した。

糖による遺伝子発現制御機構を明らかにするために、イネ品種能登光より得た単離胚カルスを糖処理し、糖で誘導される遺伝子 *OsSUR1* (*Oryza sativa* sugar-up-regulated) をマイクロアレイにより同定した。*OsSUR1* は新規な遺伝子であるが EF-hand モチーフを持つタンパク質をコードしており、大腸菌に発現させた組換え *OsSUR1* タンパク質はカルシウム結合能を示すことを明らかにした。また *OsSUR1* の発現器官が、吸水後 6 時間から 24 時間の胚と出穂開花後の桿であることを明らかにした。単離胚カルスにおいて、様々な糖を用いた *OsSUR1* の発現誘導をヘキソキナーゼの基質となる糖において観察し、その挙動は、ヘキソキナーゼ依存的に発現抑制を受けるイネ α -アミラーゼ遺伝子 *RAmy3D* の発現と全く逆であったことから、*OsSUR1* はヘキソキナーゼ依存的に発現誘導されることを明らかにした。糖添加による *OsSUR1* の発現誘導はカルシウムシグナリングの阻害剤やタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド処理によって阻害されないことを示した。これらの結果から *OsSUR1* はカルシウム結合タンパク質

をコードするが、その発現にはカルシウムシグナリングは関与せず、糖存在下において、細胞内に存在しているヘキソキナーゼの活性の制御を受けた転写制御因子によって発現が誘導される可能性を示した。

糖による窒素同化機構への影響に関して、通常大気で生育しているイネと高 CO₂ 処理したイネを用いて、アンモニアの吸収活性制御を明らかにした。通常大気で生育しているイネに高 CO₂ 処理をおこない 8 時間経過すると根から投与したアンモニア由来の窒素化合物の植物体地上部への移行量が 5 倍となるが 24 時間経過すると移行量は同等となることを観察した。この結果は通常大気条件ではアンモニア同化に必要な炭素骨格 (C) が十分量供給されていないことを示唆し、これを C-deficient-regulation と名づけ、高 CO₂ 処理によって C が十分供給されアンモニアを十分吸収したため処理後 24 時間では窒素が植物体内で飽和状態に達し、アンモニア吸収が抑制されたと考えられ、これを N-saturated-regulation と名づけた。窒素飢餓処理後にアンモニアを与えるとその吸収活性が増大し、十分量供給後フィードバックがかかり吸収活性が低下することが報告されている。この低下にはアンモニアそのものかもしくはグルタミン以降の窒素同化産物によるという議論がなされていたが、炭素骨格供給量との関係は議論されていなかった。通常大気と高 CO₂ 処理条件で生育させたイネを窒素飢餓処理し、その後硝酸アンモニウムで 2 時間処理すると地上部におけるアンモニアの吸収活性は通常大気のイネでは低下するのに対し、高 CO₂ 処理イネでは上昇した。同様の実験をグルタミンで 2 時間処理して行くと、通常大気のイネではアンモニアの吸収活性は上昇するのに対し、高 CO₂ 処理イネでは低下した。これらの結果は通常大気条件では C が窒素源処理によって消費されて欠乏した状態、即ち C-deficient-regulation がアンモニア吸収活性低下の要因であると推察され、高 CO₂ 条件では、ある程度のグルタミンの蓄積によって、C が存在してもアンモニアの吸収活性を抑制する前述の N-saturated-regulation が実際起きることを明らかにした。これらのモデルはアンモニア吸収に関して新規性があるばかりではなく、通常大気条件と比較して高 CO₂ 環境下で生育したイネで糖の蓄積や、窒素含量の低下が観察される一因を示したものである。

以上を要するに、ヘキソキナーゼ依存型の遺伝子発現制御の解明に向けた新規なマーカー遺伝子 *OsSUR1* を単離し、その植物体における発現と性質を明らかにし、また、高 CO₂ 処理を併用することでアンモニアの同化機構に関して新しいモデルを提唱するなど、イネにおける糖応答制御そして将来直面するであろう高 CO₂ 環境下における植物の生理機能変化に関して大きな知見を提供した。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格があるものと認める。