

学位論文題名

Physiological Changes Associated  
with Development of Freezing Tolerance  
in the Moss *Physcomitrella patens*

(ヒメツリガネゴケの凍結耐性獲得過程における生理学的解析)

学位論文内容の要旨

地球上の植物は、外界のさまざまな環境変化に適応して生育している。特に、冬季の凍結ストレスに対する適応能力は、植物の生育限界を決める上で非常に重要である。植物の凍結傷害、および凍結耐性の研究は主に高等植物を用いて行われている。しかしながら、これらの植物では、組織、器官間で凍結耐性能力や凍結様式が異なる他、加齢や部位によっても耐凍性の違いがみられる。このため、植物の細胞レベルでの耐凍性獲得機構に関して不明な点が多い。

コケ植物蘚類ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) は、相同組換え率が高いことから、植物で唯一遺伝子ターゲティングを利用した単一遺伝子の破壊が出来る植物である。体裁が単純で、高等植物と比べ器官や組織の分化も進んでいないことから、細胞レベルでの解析が比較的容易である。また、分子生物学的解析用の実験系も確立しつつあることから、今後新たなモデル植物として発展することが期待される。しかしながら、コケ植物を含む非維管束植物の耐凍性機構に関する知見は非常に少ない。そこで、ヒメツリガネゴケを耐凍性研究の新たなモデル植物として確立することを目的とし、ヒメツリガネゴケのストレス応答機構や、耐凍性獲得過程における生理学的変化について詳細に解析した。

1. ヒメツリガネゴケ原系体細胞のアブシジン酸 (ABA) 処理による耐凍性上昇に伴う生理的変化の解析

乾燥や塩、低温などの環境ストレスにさらされた高等植物では、植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) がシグナルとなって遺伝子やタンパク質の発現を誘導し、細胞のストレス耐性の獲得に貢献することが知られている。通常の培養条件下のヒメツリガネゴケ細胞の耐凍性  $LT_{50}$  (50%の細胞が傷害を受ける温度) は、約 $-2^{\circ}\text{C}$ と非常に低かった。しかしながら、 $10\mu\text{M}$  ABA 1日処理後の耐凍性  $LT_{50}$  は $-10^{\circ}\text{C}$ まで上昇し、高等植物と同様、ABA がストレスホルモンとして機能することを示した。

タンパク質の解析を行ったところ、ABA は、ヒメツリガネゴケ細胞において熱安定性タンパク質の蓄積を誘導した。種子の乾燥時に大量に蓄積することが知られている LEA (Late-embryogenesis abundant) タンパク質は親水性が高く、熱に対して安定性を持つものが多い。ABA による耐凍性上昇は、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドによって阻害されたことから、LEA のような親水性タンパク質の合成が促進され大量に蓄積することで、細胞内に水を保持し凍結脱水ストレスから細胞を保護している可能性が考えられた。

ABA で誘導されるヒメツリガネゴケ *PPAR* (*Physcomitrella patens* ABA responsive) 遺伝子を、ディファレンシャルディスプレイ法や、ディファレンシャルスクリーニング法、EST データベースを使った遺伝子検索によって同定した。他の生物と相同性がみられない新規の遺伝子も含まれていたが、*PPAR* 遺伝子のほとんどは、高等植物の遺伝子、例えば、LEA や抗酸化作用を持つタンパク質、また、水チャネルなど膜タンパク質をコードする遺伝子と相同性が見られた。一方、高等植物ではなく、バクテリアや緑藻、シダ、コケ植物の遺伝子と相同性がみられるものも含まれていたことから、コケ植物独自のストレス応答機構が存在する可能性が推察された。これら遺伝子の多くは数時間の ABA 処理で顕著に発現が誘導された。

また、高張のマンニトールや塩処理によっても、耐凍性が上昇した。*PPAR* 遺伝子の中にはこれら高張溶液の処理でも発現するものが多くあった。これらのことから、*PPAR* 遺伝子発現と耐凍性上昇が相関することを示唆した。

## 2. ヒメツリガネゴケの低温馴化

越冬性植物は、秋から冬にかけての日長や気温変化を認識し、凍結に対する耐性を増加させる。この過程は低温馴化とよばれ、凍らない程度の低温にさらすことによっても再現が可能である。モデル植物のシロイヌナズナでは、低温馴化過程で光依存的に耐凍性が上昇する。また、低温処理による内生 ABA 量の一過的な増加が細胞内の多様な変化を促進し、耐凍性を向上させる。そこでコケ植物の低温馴化機構に関する生理学的変化について解析し、高等植物の機構と比較した。

25℃で培養したヒメツリガネゴケ細胞を異なる低温で数日間処理したところ、15℃処理では耐凍性の上昇はみられなかったが、0℃から10℃の低温処理した場合、耐凍性の増加がみられ、0℃処理の場合に最大の耐凍性を示した。この低温処理では *PPAR* 遺伝子や熱安定性タンパク質の発現変化、可溶性糖の増加がみられた。暗所下でも低温馴化し、耐凍性の上昇には光を必要としないことが明らかとなった。また、低温処理期間におけるヒメツリガネゴケ原糸体細胞の内生 ABA 量を GC-MS によって測定したところ、低温処理期間を通して ABA 量は増加せず、ほぼ 2ng/g 乾重量 の値を保っていた。これらの結果から、低温馴化過程のヒメツリガネゴケが、高等植物でみられる内生 ABA 量の増加や光シグナルによる低温馴化促進経路を介さないで耐凍性を向上させていることが明らかとなった。

コケ植物の ABA 誘導性遺伝子の多くは高等植物のストレス応答遺伝子と相同性を示した。また、ストレス応答に伴う耐凍性上昇過程では、ストレス関連遺伝子や熱安定性タンパク質の発現誘導、可溶性糖の蓄積がみられるなど、高等植物のストレス応答機構と類似点が多いことを明らかにした。これらの結果は、ヒメツリガネゴケの耐凍性研究のモデル系としての有用性を明確に示したものである。この研究で同定されたストレス関連遺伝子を使った遺伝子破壊を含む分子生物学的手法を取り入れた詳細な研究によって、高等植物を用いた研究では成し得ない細胞レベルでのストレス応答機構の解明に大きく貢献することが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 歩  
副 査 教 授 森 川 正 章  
副 査 助 教 授 奥 山 英 登 志  
副 査 助 教 授 竹 澤 大 輔 (埼玉大学理学部)

学 位 論 文 題 名

## Physiological Changes Associated with Development of Freezing Tolerance in the Moss *Physcomitrella patens*

(ヒメツリガネゴケの凍結耐性獲得過程における生理学的解析)

温帯以北に生育する植物は秋から冬の日長変化や気温低下を認識し、形態学的・生理学的変化が起こる。このような低温馴化と呼ばれる過程を経て、植物の凍結耐性(耐凍性)は上昇し冬期の凍結温度下での生存が可能となる。また、植物の耐凍性は常温下における植物ホルモンのアブシジン酸(ABA)処理でも増加することが知られている。申請者は温帯に分布するコケ植物ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)原糸体細胞を用い、耐凍性獲得過程で起こる生理学的変化について解析を行った。ヒメツリガネゴケは、高等植物では困難な遺伝子ターゲティングによる単一遺伝子破壊が可能で、逆遺伝学的手法が利用できる植物として近年注目されている。しかしながら、これまでコケ植物の耐凍性獲得機構における遺伝子レベルでの解析例はなく、最初の陸上植物であるコケ植物の耐凍性獲得機構の解析は、陸上植物の寒冷環境への適応進化を明らかにする上でも非常に重要だと考えられる。

25°Cで無菌培養したヒメツリガネゴケ原糸体細胞の耐凍性は非常に低く、耐凍性LT<sub>50</sub>(細胞の50%生存率)は-2°Cであった。申請者は、耐凍性を誘導するストレス処理として、ABAや低温、浸透圧、塩処理を行い、ストレス条件下における原糸体細胞の耐凍性の変化を調べた。その結果、ABA10 $\mu$ M処理では、わずか数時間で耐凍性の上昇がみられ24時間処理後のLT<sub>50</sub>は-10°Cまで増加し、ヒメツリガネゴケのABA応答が速やかに起こることを示した。また、高浸透圧・塩処理でも耐凍性の上昇がみられ、0.5M マンニトールによる高浸透圧1日処理でのLT<sub>50</sub>は-6°Cであった。一方、低温処理では耐凍性の上昇に数日間を要し、0°C低温処理7日目でもLT<sub>50</sub>は-4°Cと低い値を示した。さらに、GC-MS(ガスクロマトグラフィー質量分析法)によって、ストレス条件下におけるヒメツリガネゴケの内生ABA量を調べた。その結果、内生ABA量は浸透圧処理によって増加したが、低温処理期間では増加せず、ほぼ2ng/g乾重量の値を保っていた。このことから、内生ABAの増加が耐凍性の獲得に有する時間や程度の違い影響を与えていることが推察された。また、コケ植物は維管束系を持たない故に、ABAの蓄積が細胞外(培地中)にも認められたが、今回申請者が行った処理期間中における

ABAの蓄積量は微量で、細胞の耐凍性上昇に影響を与えるほどではないことを証明した。

これらの耐凍性獲得過程で誘導をうけるPPAR(*Piscomitrella patens* ABA-responsive)遺伝子を、ディファレンシャルディスプレイ法やディファレンシャルスクリーニング法によって約120個同定した。遺伝子解析の結果から、ヒメツリガネゴケストレス誘導性遺伝子群が高等植物のそれと比べて高い共通性を持つことがわかり、植物の耐凍性研究のモデル植物としての有用性が示された。また、熱安定性タンパク質の発現変化、スクロースなど可溶性糖の蓄積を伴った細胞内浸透濃度の増加がみられ、これらの生理学的変化が耐凍性の獲得に関与している可能性が示された。特にABA処理による耐凍性の上昇には、可溶性糖の蓄積だけでは不十分で、新規のタンパク質合成過程が耐凍性の向上には必須であることを明らかにした。

申請者の研究によって、コケ植物が、ABAをストレスホルモンとして認識し、耐凍性を向上させることが明らかとなった。また、高浸透圧条件下では内生ABAの増加を介した経路で、低温馴化過程では内生ABAの増加に非依存的なシグナル経路により生理学的変化を伴った耐凍性上昇を引き起こすことが示唆された。高等植物のストレス応答におけるシグナル系では、転写因子CBFに代表されるABA非依存的経路、転写因子DREB2に代表されるABA依存的シグナル伝達経路によってストレス誘導性遺伝子の発現機構が調節を受けることが知られている。この研究は、陸上植物の中で最も原始的なコケ植物が、すでに高等植物と共通したストレス応答シグナル伝達機構を持つことを証明した。また、低温処理では、0、4、10、15℃という温度の違いを認識し、遺伝子発現や耐凍性が温度依存的に変化したことから、ヒメツリガネゴケが非常に精度の高い温度認識システムを持つことを明らかにした。一方で、低温誘導性遺伝子発現や可溶性糖の蓄積、耐凍性の上昇が暗所下でも起こったことから、高等植物で知られている光依存的な遺伝子発現や可溶性糖の蓄積を伴う耐凍性向上機構が、コケ植物以降の進化の過程で得られた可能性を申請者は推察していた。

申請者は、セリン・スレオニンプロテインキナーゼをコードするPPAR3遺伝子破壊株を作成し、ストレス条件下での耐凍性が野生株よりも減少するという結果を得ている。今後、このような遺伝子改変植物体を用いた解析によって、植物の耐凍性研究が大きく発展し、ヒメツリガネゴケが植物に共通する基本的な分子機構を解明する上で好ましいモデル植物としてなり得ることを提示した発表であった。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(地球環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。