

学 位 論 文 題 名

Studies on peroxiredoxin antioxidant
in rice (*Oryza sativa* L.)

(イネの抗酸化タンパク質(ペルオキシレドキシン)に関する研究)

学位論文内容の要旨

イネは世界的に重要な作物であり現在までに様々な品種改良が行われてきた。その栽培可能地域を更に拡大するためには耐乾索性や耐塩性の付与も視野に入れる必要がある。一般に乾燥や塩などの環境ストレスは、細胞内の活性酸素を増加させることにより、細胞にダメージを与えるが、植物は様々な抗酸化システムを有しストレスを緩和する術を獲得している。環境ストレス下では植物ホルモンの一種であるアブシジン酸 (ABA) が増加し、それが引き金となってストレス耐性が誘導されることが知られている。ABA に応答するタンパク質としてイネ培養細胞から単離されたペルオキシレドキシン (OsPer, *Oryza sativa* peroxiredoxin) はグルタチオンを用いて活性酸素を除去する能力を持つ抗酸化タンパク質である。本研究はイネ芽生えの乾燥ストレスや塩ストレス下での OsPer の組織局在性ならびにその遺伝子 (*OsPer1*, *OsPer2*) の発現様式について検討を行った。

1. ABA によって誘導される乾燥耐性における OsPer の関与

(1) イネ芽生えの乾燥耐性に及ぼす ABA の影響

様々な齢のイネ芽生えを、送風により急激に乾燥させて 3 日間放置し (乾燥処理)、再び水を与えて培養し、その後の生育の有無から生存率を求めた。播種後 2 日目の発芽種子を乾燥させた場合の生存率は 50%以下であり、3 日目の種子では全てが枯死してしまっただ。しかし乾燥処理前に 10^{-5} M ABA に 1 日間浸漬すると (ABA 処理) 乾燥処理後の生存率は大幅に増加し、播種後 3 日目の種子でも 90%以上が生存した。

(2) イネ発芽過程における OsPer の変動

上述の ABA による乾燥耐性の付与と OsPer との関連性について検討した。抗 OsPer 抗体を用いた ELISA 法により種子及び芽生え中の OsPer 含量を測定した。イネ種子に含まれる OsPer 含量は発芽の進行に伴い減少した。一方 ABA 処理区では対照区と比較し OsPer 含量の減少は穏やかであった。

(3) イネ芽生え中の OsPer の組織局在性

OsPer の組織局在性を抗 OsPer 抗体を用いて間接蛍光抗体法で調べた。未発芽種子では茎頂部と糊粉層に OsPer の存在が認められたが、播種 3 日後にはそれらの OsPer は消失した。しかし ABA 処理を行った場合は茎頂部の OsPer は残存していた。この OsPer が乾燥処理後の生存率の向上に寄与した可能性がある。

2. イネ培養細胞を用いた OsPer の解析

(1) イネ培養細胞に含まれる OsPer

10^{-5} M ABA を含む培地で液体培養したイネ培養細胞から得られたタンパク質画分を抗 OsPer 抗体を用いたウェスタンブロット法に供した結果、OsPer は異なる等電点 (pI 5.9, pI 6.1) をもつ2種のタンパク質から成ることが示唆された。ゲノムの塩基配列からアミノ酸配列を予想し、pI 6.1 を示すタンパク質を OsPer1, pI 5.9 を OsPer2 と名付けた。OsPer1 と OsPer2 のアミノ酸配列の相同性は 80.5% であった。またオオムギのペルオキシレドキシンである Per1 とは 86.3%, シロイヌナズナの AtPer1 とは 68.5% の相同性を示した。様々な生物種のペルオキシレドキシンでは抗酸化活性に関わる PVCTTE 領域が保存されているが、この領域は OsPer1 と OsPer2 においても存在した。

次に ABA (10^{-5} M) 処理あるいは塩 (0.2 M) や乾燥ストレスが OsPer の量にどのように影響するかを検討した。乾燥ストレスは培地に 0.4 M マニトールを添加することにより与えた。3 日間イネ細胞を培養後、抗 OsPer 抗体を用いてウェスタンブロット法による OsPer の解析を行った。OsPer1 は無処理区には認められなかったが、各処理後には蓄積が認められた。これに対し OsPer2 は無処理区にも見られ、各処理による量的変化は見られなかった。

(2) イネ培養細胞における OsPer 遺伝子の発現解析

上述の方法で様々なストレスが OsPer 遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた。処理前の培養細胞では OsPer1 の発現は観察されなかったが、各処理 1 時間後には発現が観察された。一方 OsPer2 は処理前の培養細胞でも発現しており、各処理間で大きな変化は見られなかった。

(3) イネの OsPer 遺伝子上流域の解析

OsPer1 と OsPer2 はゲノム上で約 1 kbp 離れて同発現方向に並んで配置していた。OsPer1 の上流 1 kbp には ABA に反応するための ABRE 配列が、また ABA とは独立に環境ストレスに反応するための DRE 配列が存在した。しかしながら OsPer2 上流にはこれらの配列は見られなかった。また OsPer1 と OsPer2 には種子形成時に特異的発現する遺伝子に共通に見られる配列が存在した。

(4) レポーター遺伝子を用いた発現解析

ホタルとウミシイタケの2種のルシフェラーゼを用いたデュアルアッセイ法により、OsPer のプロモーター領域の解析を行った。OsPer1 と OsPer2 のそれぞれのプロモーター領域 (上流約 1 kbp) の下流にホタルのルシフェラーゼ遺伝子を結合したものと、35S プロモーターの下流にウミシイタケのルシフェラーゼを配置したものの両者をベクターに挿入し、DNA デリバリー法を用いてイネの培養細胞に遺伝子を導入した。その後、細胞を 10^{-5} M ABA あるいは 0.2 M NaCl を含む液体培地で培養した。また弱い乾燥条件を与えるために固体培地も用いた。導入 1 日後のウミシイタケのルシフェラーゼ活性に対するホタルのルシフェラーゼ活性から OsPer 遺伝子プロモーターの発現活性を相対値として求めた。OsPer1 プロモーターは ABA に反応して 6 倍以上に活性が増加し、また乾燥処理や塩ストレスにも応答して対照区よりも高い活性を示した。しかし OsPer2 プロモーターの活性は ABA 等によりほとんど変化しなかった。また無処理区では OsPer2 のプロモーター活性は OsPer1 の活性より約 5 倍高かった。

本研究から OsPer は 2 種存在することが明らかとなった。OsPer1 遺伝子は ABA や環

境ストレスに応答して発現するが、*OsPer2* は種子の胚や糊粉層において恒常的に発現しているものと思われる。現在までに報告された植物のペルオキシレドキシンはゲノム中に1コピー存在するものしか知られていないが、イネには *OsPer 1* と *OsPer2* の2コピー存在することが示された。イネは雨季と乾季に適応して生育する植物であり、他の植物より活性酸素による酸化ストレスの影響を受けやすいため、進化の過程で2種の遺伝子を獲得したと考えられる。本研究で得られた成果が今後、イネの環境ストレス耐性機構を高めるための育種に寄与できることを期待したい。

学位論文審査の要旨

主査	教授	幸田	泰則
副査	教授	増田	清
副査	助教授	貴島	祐治
副査	講師	藤野	介延

学位論文題名

Studies on peroxiredoxin antioxidant in rice (*Oryza sativa* L.)

(イネの抗酸化タンパク質(ペルオキシレドキシン)に関する研究)

本論文は4章からなり、図38、表2を含む118頁の英文論文であり、別に参考論文1編が添えられている。

イネは世界的に重要な作物であり現在までに様々な品種改良が行われてきた。その栽培可能地域を更に拡大するためには耐乾索性や耐塩性の付与も視野に入れる必要がある。一般に乾燥や塩などの環境ストレスは、細胞内の活性酸素を増加させることにより、細胞にダメージを与えるが、植物は様々な抗酸化システムを有しストレスを緩和する術を獲得している。環境ストレス下では植物ホルモンの一種であるアブシジン酸(ABA)が増加し、それが引き金となってストレス耐性が誘導されることが知られている。ABAに応答するタンパク質としてイネ培養細胞から単離されたペルオキシレドキシン(OsPer, *Oryza sativa* peroxiredoxin)はグルタチオンを用いて活性酸素を除去する能力を持つ抗酸化タンパク質である。本研究はイネ芽生えの乾燥ストレスや塩ストレス下でのOsPerの組織局在性ならびにその遺伝子(*OsPer1*, *OsPer2*)の発現様式について検討を行った。

1. ABAによって誘導される乾燥耐性におけるOsPerの関与

3日間発芽させたイネ芽生えを、乾燥させて3日間放置すると(乾燥処理)、全ての芽生えが枯死した。しかし乾燥処理前に 10^{-5} M ABAを与えると、90%以上が生存できるようになった。抗OsPer抗体を用いたELISA法により種子及び芽生え中のOsPer含量を測定した。イネ種子に含まれるOsPer含量は発芽の進行に伴い減少した。一方ABA処理区では対照区と比較しOsPer含量の減少は穏やかであった。OsPerの組織局在性を間接蛍光抗体法で調べた。未発芽種子では茎頂部と糊粉層にOsPerの存在が認められたが、播種3日後にはそれらのOsPerは消失した。しかしABA処理を行った場合は茎頂部のOsPerは残

存していた。この残存した OsPer がイネの耐乾燥性向上に寄与した。

2. イネ培養細胞を用いた OsPer の解析

イネ培養細胞を 10^{-5} M ABA を含む培地で培養し、得られたタンパク質画分を抗 OsPer 抗体を用いたウェスタンブロット法に供した結果、OsPer は異なる等電点 (pI 5.9, pI 6.1) をもつ 2 種のタンパク質から成ることが判明した。ゲノムの塩基配列からアミノ酸配列を予想し、それぞれを OsPer1 および OsPer2 と名付けた。OsPer1 と OsPer2 のアミノ酸配列の相同性は 80.5% であった。また他の植物由来のペルオキシレドキシシンとも高い相同性を示した。

ABA、NaCl および浸透ストレスによる乾燥を与えるための mannitol をそれぞれ含む培地でイネ細胞を培養後、抗 OsPer 抗体を用いてウェスタンブロット法による OsPer の解析を行った。OsPer1 は無処理区には認められなかったが、各処理後には蓄積が認められた。これに対し OsPer2 は恒常的に存在し、処理による量的変化は見られなかった。それらの遺伝子の発現量にも同様の傾向が認められ、OsPer1 は各処理による発現誘導が観察されたが、OsPer2 は恒常的に発現していた。

OsPer1 のプロモーター領域には ABA に反応する ABRE 配列と環境ストレスに反応する DRE 配列が存在した。しかしながら OsPer2 上流にはこれらの配列は見られなかった。デュアルアッセイ法を用いて OsPer のプロモーター領域の活性解析を行った。OsPer1 プロモーターは ABA に反応して 6 倍以上に活性が増加し、また乾燥処理や塩ストレスにも応答して活性が増加した。しかし OsPer2 プロモーターの活性は ABA 等によりほとんど変化しなかった。また無処理区では OsPer2 のプロモーター活性は OsPer1 の活性より約 5 倍高かった。

本研究からイネのペルオキシレドキシシン (OsPer) は 2 種存在することが明らかとなった。OsPer1 遺伝子は ABA や環境ストレスに応答して発現するが、OsPer2 は種子の胚や糊粉層において恒常的に発現しているものと思われる。現在までに報告された植物のペルオキシレドキシシンはゲノム中に 1 コピー存在するものしか知られていないが、イネには OsPer1 と OsPer2 の 2 コピー存在することが示された。イネは雨季と乾季に適応して生育する植物であり、他の植物よりも活性酸素による酸化ストレスの影響を受けやすいため、進化の過程で二つの遺伝子を獲得したと考えられる。本研究で得られた成果は今後、イネの環境ストレス耐性機構を高めるための育種に寄与できるものと期待される。

よって審査員一同は、陶 艶が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。