

イネにおけるトレハロース生合成と ストレス応答に関する分子生物学的研究

学位論文内容の要旨

トレハロースは広範囲の生物種に存在しており、貯蔵糖や血糖あるいはストレス保護物質として機能している。高等植物においては近年その存在が決定的となったが、蓄積量が極微量であることから、微生物や動物における機能とは異なっていると考えられている。本研究では、イネにおけるトレハロース生合成の生理学的機能を、特にストレス応答との関係に着目して調査した。

トレハロースの生合成経路は、次に示す2段階反応で行われる。まず、trehalose-6-phosphate synthase (TPS) によってUDP-グルコースとグルコース-6-リン酸からトレハロース-6-リン酸 (Tre6P) が生成され、trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) によりTre6Pが脱リン酸化され、トレハロースが合成される。植物のトレハロース生合成系遺伝子は微生物や動物のそれと異なり多重遺伝子族を形成している。イネゲノム上には、9種類のTPS, 10種類のTPPが推定されている。本研究ではまず、リアルタイムPCRを利用した全トレハロース生合成および代謝関連遺伝子の栄養増殖期における環境ストレス応答について解析した。また、発生・生長段階における発現も解析した。

幼苗期におけるストレス応答を解析したところ、*OsTPP1* のストレス処理直後における強い一過的応答が顕著だった。TPP では発現レベルから *OsTPP1*, *OsTPP2*, *OsTPP4*, *OsTPP6* が、TPS では *OsTPS1*, *OsTPS4*, *OsTPS8* が主に機能していると考えられる。低温、塩、乾燥ストレス全てに大きく応答するものや、特定のストレスにのみ応答するなど様々であった。発現レベルが比較的強い *OsTPP1*, *OsTPS1* は根および茎葉組織で全てのストレスに強い誘導性を示した。*OsTPP6* は茎葉組織でのみ発現誘導を示し、反対に *OsTPS4* は根組織でのみ強い誘導性を示した。*OsTPP4* はどのストレスにも発現誘導を示さなかった。このように、幼苗期におけるストレス応答でも各遺伝子の発現様式は異なっていることが明らかになった。

トレハロース加水分解酵素をコードするトレハラーゼ遺伝子のストレス応答を調べると、低温ではほとんど応答しないが、塩、乾燥ストレスに強く応答した。水ポテンシャルの低下や浸透圧ストレスに対しトレハラーゼ遺伝子が強く応答すると考えられる。

開花後の穎花では、全TPS, TPPの発現は低レベルであったが、花粉形成の進行に伴い、葯組織における *OsTPP1* の発現量の上昇が見られた。また、トレハラーゼ遺伝子の発現が花粉成熟段階の葯組織において一時的に誘導された。これらの結果から、花粉形成におけるトレハロース生合成系の厳密な制御機構の存在が示唆された。本研究により、植物の生活環のほぼ全てのステージにおいてトレハロースの生合成と分解が厳密に制御されていることを初めて明らかにすることができた。

また、同時にトレハロースの生長調節物質としての多面的機能が示唆された。

幼苗期において主に発現する TPP 酵素である OsTPP1 および OsTPP2 に着目し、その生化学的性質を解析した。それぞれ大腸菌内で組換えタンパク質を合成し、インタクトな組換えタンパク質を精製した。活性測定の結果、組換え OsTPP1, OsTPP2 は Tre6P 脱リン酸活性を有することが示唆された。さらに酵素学的解析を行ったところ、OsTPP1, OsTPP2 は両酵素とも微生物由来の TPP と比べ、Tre6P に対し基質特異性が高く、著しく低い K_m 値を示した。また、熱に対しては不安定であった。OsTPP1:GFP, OsTPP2:GFP 融合タンパク質を用いた細胞内局在解析より、OsTPP1, OsTPP2 は細胞質に局在することが示唆された。至適 pH が両酵素ともほぼ中性であったことはこの結果を支持した。イネの TPP 酵素がより低い基質濃度に適応し、安定性が低いことは、植物におけるトレハロース合成は微生物とは異なり、微量に生成され、厳密な制御を受けていることを反映していると結論した。

イネの TPP の中において、*OsTPP1* はストレスに応答し、最も主に発現する。その生理学的機能を解析することを目的として、ユビキチンプロモーターの下流に *OsTPP1* を連結させたコンストラクトでイネを形質転換した。*OsTPP1* 過剰発現体における可溶糖の解析の結果、*OsTPP1* 過剰発現体ではトレハロース含量が野生株の約 3~6 倍に増加していた。またこの時グルコース及びフルクトースが野生株と比較して約 3~15 倍蓄積していることを明らかにした。*OsTPP1* 過剰発現体においては、葉身および穂軸の伸長が観察された。22k オリゴ DNA マイクロアレイを用いて、*OsTPP1* 過剰発現体の網羅的発現解析を行ったところ、光合成に関わる光化学系 I・II およびその関連遺伝子、RubisCO 大小サブユニットの発現が総じて減少していることを見出した。このような光合成関連遺伝子の発現抑制は、*OsTPP1* の過剰発現による Tre6P の減少に起因する可能性が高い。また、光合成能の低下を補うように、*OsTPP1* 過剰発現体において葉身の伸長が観察された。*OsTPP1* 過剰発現体は高濃度の ABA に対し強い生育阻害を示した。しかし、野生株と比較して *OsTPP1* 過剰発現体における ABA 応答遺伝子の ABA 応答性は低くなっており、*OsTPP1* は ABA シグナルを抑制する働きを有することが示唆された。また、形質転換体を用いて低温耐性試験を行い、*OsTPP1* 過剰発現体は低温耐性が低下していることが明らかになった。逆に *OsTPP1* の Tos17 レトロポゾン挿入変異株では野生株より低温耐性が向上した。*OsTPP1* は低温ストレス下で、ABA シグナルを抑制することにより、その下流にある低温応答関連遺伝子の発現を抑制することで、低温耐性獲得に負の効果をもたらすという作業仮説を提案した。

水耕栽培したイネ幼苗を用いて、トレハロース誘導性遺伝子を 22k オリゴ DNA マイクロアレイを用いて網羅的に同定した。これらの中には、ERF, JAMYB, WRKY 等の転写因子、PR タンパク質、サリチル酸およびジャスモン酸生合成酵素等の病害応答関連遺伝子が大多数を占めた。誘導された遺伝子を選択し、ノーザン解析でさらにトレハロース誘導性を解析した。転写因子群には一過的誘導の傾向が見られ、PR タンパク質は処理後徐々に発現誘導される傾向がみられた。トレハロース以外の主要な単糖、二糖で処理した場合は、上記の遺伝子の発現誘導はほぼ検出されなかった。トレハロースによる抵抗性誘導の有無をいもち病菌の噴霧接種および葉面接種による病斑形成を指標に評価した。その結果、5 mM トレハロースで 5 日間処理したイネにおいては病斑数の減少、病斑進展抑制が観察された。イネにおいて、トレハロースを PAMPs として認識する機構が存在すると推定された。さらに、*OsTPP1* 過剰発現株のいもち病菌に対する抵抗性を調べたところ、病害抵

抗性が向上していることから、病害応答に拮抗的に働く ABA シグナルが OsTPP1 によって抑えられ、病害抵抗性が向上したと示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 井 博 和

副 査 教 授 横 田 篤

副 査 准教授 伊 藤 浩 之

副 査 主任研究員 今 井 亮 三(北海道農業研究センター)

学 位 論 文 題 名

イネにおけるトレハロース生合成と ストレス応答に関する分子生物学的研究

本論文は、図 31、表 11、引用文献 81 を含み、6 章からなる総ページ 130 の和文論文である。別に参考論文 1 編が添えられている。

トレハロースは広範囲の生物種に存在しており、貯蔵糖や血糖あるいはストレス保護物質として機能している。高等植物においては蓄積量が極微量であることから、微生物や動物における機能とは異なっていると考えられている。本研究では、イネにおけるトレハロース生合成の生理学的機能を特にストレス応答との関係に着目して調査した。

トレハロースの合成は 2 段階反応で行われる。すなわち、trehalose-6-phosphate synthase (TPS) によってUDP-グルコースとグルコース-6-リン酸からトレハロース-6-リン酸 (Tre6P) が生成され、trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) によりTre6Pが脱リン酸化されトレハロースが生じる。植物のトレハロース生合成系遺伝子は多重遺伝子族を形成し、イネゲノム上には9種類のTPS、10種類のTPPの存在が推定されている。本研究ではまず、リアルタイムPCRを利用した全トレハロース生合成および代謝関連遺伝子の栄養増殖期における環境ストレス応答について解析した。また、発生・生長段階における発現も解析した。

幼苗期のストレス応答を解析したところ、*OsTPP1* のストレス処理直後における強い一過性の応答が顕著だった。TPP では発現レベルから *OsTPP1*、*OsTPP2*、*OsTPP6* が、TPS では *OsTPS1*、*OsTPS4*、*OsTPS8* が主に機能していると考えられた。低温、塩、乾燥ストレス全てに強く応答するもの、特定のストレスにのみ応答するなど様々であった。発現レベルの高い *OsTPP1*、*OsTPS1* は根と茎葉組織で全てのストレスに強い誘導性を、*OsTPP6* は茎葉組織 *OsTPS4* は根組織のみで発現誘導性を示した。

トレハラーゼ遺伝子のストレス応答を調べると、低温ではほとんど応答しないが、塩、

乾燥ストレスに強く応答した。水ポテンシャルの低下や浸透圧ストレスに対しトレハラーゼ遺伝子が強く応答すると考えられる。

開花後の穎花では、全 TPS, TPP の発現は低レベルであったが、花粉形成の進行に伴い、葯組織における *OsTPP1* の発現量の上昇が認められた。また、トレハラーゼ遺伝子の発現が花粉成熟段階の葯組織において一時的に誘導された。これらの結果から、花粉形成におけるトレハロース生合成系の厳密な制御機構の存在が示唆され、植物の生活環のほぼ全てのステージにおいてトレハロースの生合成と分解が厳密に制御されていることを初めて明らかにした。

幼苗期において主に発現する TPP 酵素である *OsTPP1* および *OsTPP2* に着目し、その生化学的性質を解析した。それぞれについて大腸菌を用いて組換え酵素を合成し精製した。組換え *OsTPP1*, *OsTPP2* は Tre6P 脱リン酸活性を持つことを確認した。両酵素は、微生物由来の TPP と比べ Tre6P に対し基質特異性が高く、低い K_m 値を示した。熱に対しては比較的不安定であった。

OsTPP1 の生理学的機能を解析するために、ユビキチンプロモーターの下流に *OsTPP1* を連結させたコンストラクトでイネを形質転換した。過剰発現体における可溶性糖の解析の結果、トレハロース含量が野生株の約 3–6 倍に、グルコースおよびフルクトースが約 3–15 倍蓄積していることが明らかになった。22 k オリゴ DNA マイクロアレイで *OsTPP1* 過剰発現体の網羅的発現解析を行ったところ、光化学系 I・II およびその関連遺伝子 RubisCO 大小サブユニットの発現が総じて減少していることを見出した。光合成関連遺伝子の発現抑制は、*OsTPP1* の過剰発現による Tre6P の減少に起因する可能性が高い。また、光合成能の低下を補うように *OsTPP1* 過剰発現体において葉身の伸長が観察された。野生株と比較して *OsTPP1* 過剰発現体における ABA 応答遺伝子の ABA 応答性は低下し、*OsTPP1* は ABA シグナルを抑制する働きがあると示唆された。さらに *OsTPP1* 過剰発現体は低温耐性が低下していた。逆に *OsTPP1* の Tos17 レトロポゾン挿入変異株では野生株より低温耐性が向上した。*OsTPP1* は低温ストレス下で ABA シグナルを抑制することにより、その下流にある低温応答関連遺伝子の発現を抑制することで、低温耐性獲得に負の効果をもたらすという作業仮説を提案した。さらに、*OsTPP1* 過剰発現株のいもち病菌に対する抵抗性を調べたところ、病害抵抗性が向上していることから、病害応答に拮抗的に働く ABA シグナルが *OsTPP1* によって抑えられ、病害抵抗性が向上したと示唆された。

水耕栽培のイネ幼苗を用いて、トレハロース誘導性遺伝子を 22k オリゴ DNA マイクロアレイで網羅的に同定した。ERF, JAmyb, WRKY 等の転写因子、PR タンパク質、サリチル酸およびジャスモン酸生合成酵素等の病害応答関連遺伝子が大多数を占めた。誘導された遺伝子のノーザン解析によりトレハロース誘導性を調査した。転写因子群には一過性の誘導傾向があり、PR タンパク質は処理後徐々に発現誘導される傾向がみられた。トレハロース以外の主要な単糖、二糖処理では上記の遺伝子の発現誘導は検出されなかった。トレハロースによる抵抗性誘導の有無をいもち病菌の噴霧接種および葉面接種による病斑形成を指標に評価した結果、5 mM トレハロースで 5 日間処理したイネにおいては病斑数の減少、病斑進展抑制が観察された。イネにおいて、トレハロースを PAMPs として認識する機構が存

在すると推定された。

よって審査員一同は、島周平が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。