

〈一般研究課題〉 都市緑化に適した高い光合成能・環境ストレス
耐性に関する植物遺伝子の評価
助成研究者 名城大学 田中 義人



都市緑化に適した高い光合成能・環境ストレス耐性に関与する植物遺伝子の評価

田中 義人
(名城大学)

Analysis of plant genes relating to high photosynthetic capacity and abiotic stress tolerance suitable for urban greening

Yoshito Tanaka
(Meijo University)

Abstract:

Long distance translocation of glycinebetaine from source leaves to sink leaves in sugar beet (*Beta vulgaris*) was examined by applying deuterium-labeled glycinebetaine. Within 2 days, translocation of glycinebetaine from mature leaves to young developing leaves was observed. A gene coding homologue of plant proline/glycinebetaine transporter was isolated from *Beta vulgaris*. The characteristics of its gene product were compared with homologues of other plants.

1. はじめに

1.1 塩ストレスに対する植物の応答

土壌での塩の集積は農作物の収量を減少させる大きな要因のひとつである。Na⁺は、塩ストレス環境下で植物に直接的に有害な影響を与える成分である。Na⁺は植物が成長するために重要な成分を植物細胞が取り込むのを阻害し、また、細胞内に高濃度のNa⁺が蓄積すると様々な酵素の活性が阻害され、生体膜の膜ポテンシャルにも悪影響を与える¹⁾。塩ストレス環境下では、いくつかの経路でNa⁺が植物細胞内へと進入する。植物がNa⁺の量を低く保ち、細胞の生理活性を維持するためには、植物細胞のイオン輸送が適切に制御されることが必要である。高等植物の細胞においては、細胞質の過剰なNa⁺はH⁺-ATPaseやH⁺-pyrophosphataseなどによる一次能動輸送とNa⁺/H⁺アンチポーターによる二次輸送の組み合わせによって細胞外へ排出されるか、液胞内に隔離される²⁴⁾。また、塩ストレスは浸透圧ストレスを伴う。浸透圧ストレスに応答して、植物細胞

は極めて溶解度の大きい低分子量の化合物である適合溶質を合成する。適合溶質は、塩ストレス環境下の生物が水を取り込んだり、取り込んだ水を細胞内に保持することを可能にし、細胞の正常な代謝を持続させる^{5,6)}。

1.2 グリシンベタイン

グリシンベタイン (N,N,N-トリメチルグリシン) は、細菌、好塩性古細菌、海産無脊椎動物、植物、動物で細胞内に蓄積することが知られており、自然界に最も広く存在する適合溶質のひとつである^{7,9)}。グリシンベタインはアミノ酸であるグリシンの窒素原子がメチル化された四級アンモニウム化合物であり、両性イオンであるという特徴をもっている。植物において、グリシンベタインは、高浸透圧による様々な生理活性の失活から細胞を保護するという役割をもっている¹⁰⁾。例えば、ホウレンソウは高塩条件では葉緑体に300 mMのベタインを蓄積し¹¹⁾、その結果として、高塩条件でも葉緑体が光合成できるようになることが報告されている¹²⁾。

1.3 グリシンベタインの輸送

細胞が高濃度の適合溶質を蓄積するためには、適合溶質の生合成を促進させ、分解を抑制する方向へ代謝系を変化させることと、細胞外からの適合溶質の取り込みを促進し、漏出を抑制する方向へ膜輸送系を変化させることが重要である^{13,14)}。植物の場合は、グリシンベタインは葉緑体で合成され、塩ストレス条件下では、植物体の各部分へと長距離を輸送されなければならない。しかし、植物におけるグリシンベタインの輸送に関しては、わずかなことしか分かっていない。

2. 本研究の目的

塩ストレスは、植物が晒される環境ストレスの主要なもの1つであり、植物の塩ストレス耐性を向上させることは、農業以外の植物利用にとっても重要である。本研究は、植物の塩ストレス耐性機構のうち、適合溶質であるグリシンベタインに着目して、その蓄積機構を明らかにすることを目的とし、グリシンベタインを蓄積する植物であるテンサイ (*Beta vulgaris*) を材料として、グリシンベタインの輸送に関わる遺伝子を単離し、その特徴を調べることにした。

植物においてグリシンベタインの輸送を行なうトランスポーターとして報告されているものは、アミノ酸トランスポーターに属している。グリシンベタインの輸送活性を持つことが知られているトランスポーター(ProT)に関して、シロイヌナズナでは3つのProT(AtProT1 - AtProT3)が知られており^{15,16)}、それぞれ、維管束(AtProT1)、根の表皮と内皮(AtProT2)、葉の表皮細胞(AtProT3)で発現しており、異なる機能を持っていると考えられている¹⁶⁾。近年、グリシンベタインを蓄積するマングローブである *Avicennia marina* からグリシンベタイントランスポーターの遺伝子が単離され、その性質が調べられた¹⁷⁾。マングローブのグリシンベタイントランスポーターは、細菌のグリシンベタイントランスポーターや動物のグリシンベタイン/ γ -アミノブチル酸(GABA)トランスポーターとの相同性は低く、シロイヌナズナやトマトのプロリントランスポーターとの相同性が高かった。これらのトランスポーター遺伝子は、いずれも高塩条件下の葉でmRNAが増加し、大腸菌を用いた実験から、このグリシンベタイントランスポーターは、グリシンベタインとプロリンの双方に対して、ほぼ同じ親和性(Km値0.32-0.43 mM)と最大速度(1.9-3.6 nmol/min/mg proteins)を示した。また、部位特異的変異体による実験から、ベタイン輸送活性の制御にペリプラズミックループが関与することが示唆されている。

3. テンサイにおけるグリシンベタインの輸送の測定

3.1 方法

3.1.1 材料

6-7週間生育させたテンサイの成熟葉に、100 mMの重水素ラベルしたd11-グリシンベタインをシリンジを用いて浸潤させた後、プラスチックバッグで被い、1日経過後にプラスチックバッグをはずし、さらに1日経過後に若い展開中の葉をサンプリングした。

3.1.2 グリシンベタインの測定

サンプリングした葉を生重量の9倍量のメタノールを用いてすり潰し、グリシンベタインを抽出した。14,000 rpm, 5分遠心した上澄みを取り、減圧下でメタノールを蒸発させ、抽出液を濃縮した。得られた溶液に対してクロロホルムによる抽出を行なった後、水層を適宜希釈し、島津製作所のMALDI TOF-MSにより、グリシンベタインの定量を行なった。

3.2 結果

図1にTOF-MSによるグリシンベタインの測定結果を示す。

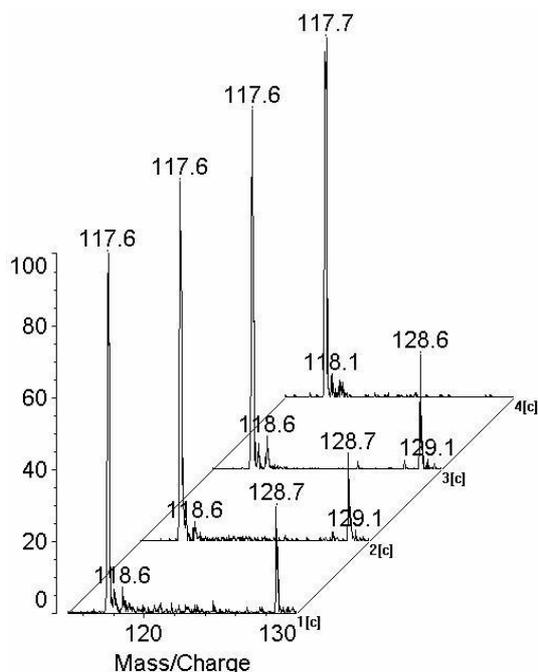


図1 TOF-MSによるグリシンベタインの測定

手前から順に1, 2, 3は、展開中の若い葉の抽出液の測定結果を示し、4はd11-グリシンベタインの浸潤を行なわなかった場合の測定結果を示す。

重水素ラベルしたd11-グリシンベタインは、分子量128.7の位置に検出される。分子量117.7の位置にみられるピークは内在性のグリシンベタインである。測定の結果、成熟葉に浸潤させたd11-グリシンベタインは、2日のインキュベーション期間に、展開中の若い葉へと移行していることが明らかになった。この結果は、テンサイの植物体において、成熟葉から生育途上の若い組織へとグリシンベタインが輸送されることが、若い組織におけるグリシンベタインの蓄積にとって重要であることを示している。

4. テンサイのプロリン/グリシンベタイン輸送体遺伝子の単離

4.1 方法

テンサイからRNAを抽出し、Clontech Laboratories社のSMART cDNA Library Construction Kitを用いてcDNAライブラリを作成した。他の植物で知られているProT/BetT遺伝子の塩基配列に基づいてプライマを作成し、PCR法でcDNAライブラリのスクリーニングを行い、テンサイのグリシンベタイントランスポーター遺伝子を単離した。

4.2 結果

作成したcDNAライブラリからテンサイのグリシンベタイントランスポーター遺伝子を1つ単離することができた。図2に、単離したテンサイのグリシンベタイントランスポーター遺伝子の塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したものを示す。

```
MSSSDPENASRPTNGASLNDNSSNQSQTVVVPQTAHQISTDSWLQAGFVLTGINSAYVL 60
GYSGAIMVPLGWIPAVLGLMAATGISLYANSLVAKLHEFGGKRHIRYRDLAGFIYGP 120
KLTWASQYINLFMINTGFIIILAGSSIKAAYTLFKDDALCLPYCIIIAGFVCALFAIGIP 180
HLSALRIWLGVSTFFGLIYIIIAIALSLKDGLQSPPRDYTPPTKRNQVFTTIGAAANLVF 240
AFNTGMLPEIQATVRKPVVENMMKALYFQFTVGVVPMYAIVFIGYWAYGNKTSSYLLSSV 300
HGPVWLKALANISAFQLQTVIALHIFASPMYEYLDTRFGISGNALNPKNLGFRVIIRGGYL 360
ALNTFVSALLPFLGDFMSLTGAISTFPLTFILANHMYFRAKRNKLSLAMKIWLWNIVFF 420
SCMALASFIAALRLIATDSKEYHLFADL 448
```

図2 テンサイのグリシンベタイントランスポーター遺伝子産物のアミノ酸配列

単離された遺伝子の塩基配列から推定される遺伝子産物のアミノ酸配列を他の植物のプロリン輸送体およびグリシンベタイントランスポーターのアミノ酸配列と比較したところ、テンサイのグリシンベタイントランスポーターは植物の輸送体と高い相同性を示し、グリシンベタインを蓄積する植物の中では、樹木である *Avicennia marina* よりも、近縁種である *Atriplex* や *Amaranthus* の輸送体との相同性が高いことがわかった (図3)。

図4にテンサイのグリシンベタイントランスポーターの推定されるトポロジーを示す。今回単離されたテンサイのグリシンベタイントランスポーターは、11の膜貫通領域を持ち、これまで報告されているプロリン輸送体およびグリシンベタイントランスポーターと同様の構造を持つ膜タンパク質であることが示唆された。また、これまで報告されている輸送体で保存されているアミノ酸は、テンサイの輸送体においても保存されていることが明らかになった。

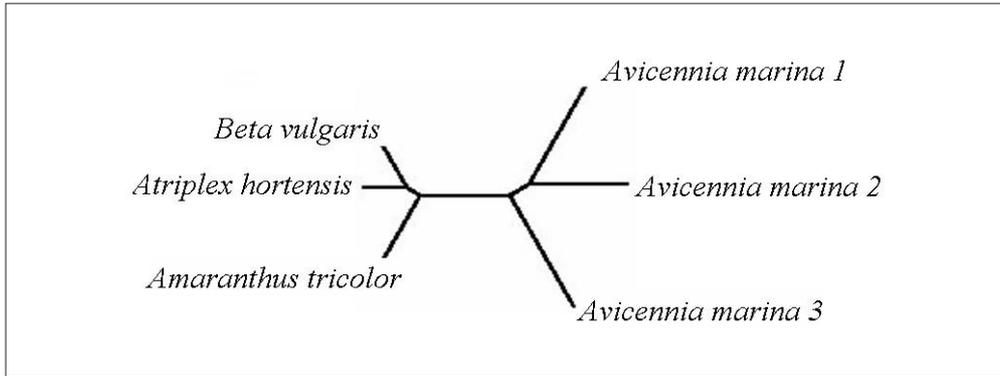


図3 グリシンベタイントランスポーターの相同性を示す樹形図

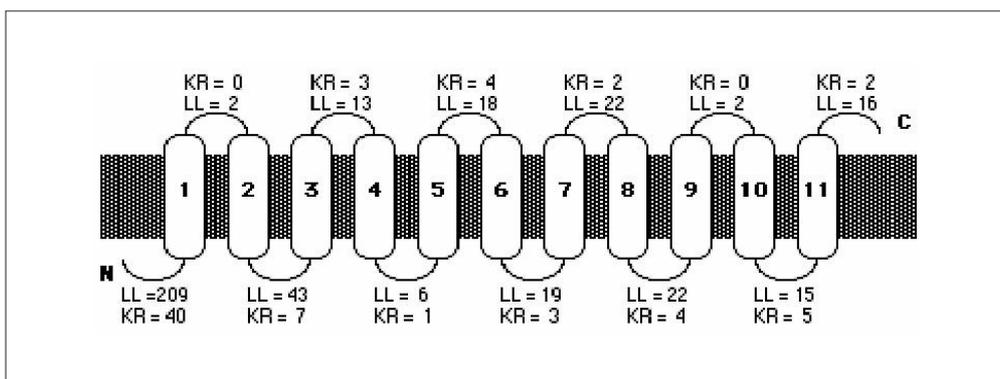


図4 テンサイのグリシンベタイントランスポーターの推定されるトポロジー

5. まとめ

植物の塩ストレス耐性にとって重要な役割を果たしているグリシンベタインの輸送に関して、グリシンベタインを蓄積する植物であるテンサイを用いた研究を行った結果、植物体におけるグリシンベタインの蓄積にとって、長距離のグリシンベタインの輸送が重要であることを示す結果を得た。また、テンサイのcDNAライブラリを作成し、グリシンベタイントランスポーター遺伝子のスクリーニングを行った結果、テンサイのグリシンベタイントランスポーター遺伝子を単離することができた。

6. 謝辞

本研究は、日比科学技術振興財団の研究助成を受けて行なわれたものである。また、研究の遂行にあたり、名城大学大学院総合学術研究科 山田奈々さんならびにPDの山根浩二君に協力して頂いた。ここに記して謝意を表します。

7. 参考文献

- 1) Zhu, J.K., Curr. Opin. Plant Biology 6: 441-445. (2003)
- 2) Hasegawa, P. M. *et al.*, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 463-499. (2000)
- 3) Blumwald, E. *et al.*, Biochimica et Biophysica Acta 1465: 140-151. (2000)

- 4) Horie, T. and Schroeder, J. I., *Plant Physiol.* 136: 2457-2462. (2004)
- 5) Hanson, A. D. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 306-310. (1994)
- 6) McNeil, S. D. *et al.*, *Plant Physiol.* 120: 945-950. (1999)
- 7) Roessler, M. and Muller, V., *Environ. Microbiol.* 3: 743-754. (2001)
- 8) Blunden, G. and Gordon, S. M., *Prog Phycol Res* 4: 39-80. (1986)
- 9) Rhodes, D. and Hanson, A. D., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 357-384. (1993)
- 10) Sakamoto, A. and Murata, N., *Plant Cell Environ.* 25: 163-171. (2002)
- 11) Robinson, S. P. and Jones, G. P., *Aust J Plant Physiol* 13: 659-668. (1986)
- 12) Papageorgiou, G. C. and Murata, N., *Photosynthesis Research* 44: 243-252. (1995)
- 13) Poolman, B. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1666: 88-104. (2004)
- 14) Kramer, R, Morbach, S., *Biochim. Biophys. Acta* 1658: 31-36. (2004)
- 15) Breitzkreuz, K. E. *et al*, *FEBS Letters* 450: 280-284. (1999)
- 16) Grallath, S. *et al.*, *Plant Physiol.* 137: 117-126. (2005)
- 17) Waditee, R. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277: 18373-18382. (2001)