

Molecular Physiological Studies on the Role of Purine Ring Catabolism in Stress Acclimation of Plants

(植物のストレス適応におけるプリン環分解の役割に関する分子生理学的研究)

広島大学大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻 渡邊俊介

1. 研究の背景と目的

植物の成長や生存は、光エネルギーに依存した同化作用のみならず、異化代謝を介した同化栄養のリサイクル機構が間断なく働くことで維持されている。核酸やヌクレオチドの主要成分であるプリン塩基は、多量必須元素である窒素の含有率が格段に高いため、その分解は生育環境で枯渇しがちな窒素栄養の体内リサイクルを担うとされてきた。即ち、分解運命にある全てのプリン塩基は、キサンチンに代謝収束されたのちに尿酸を経てアラントインを生じ、さらにその加水分解によってアミノ酸の合成基質である NH_4^+ を逐次放出する。この代謝過程は、細胞質、ペルオキシソームおよび小胞体に跨がり 7 つの酵素が関与するなど、高等生物では最も複雑なプリン分解経路を構成する。

一方、このようなハウスキーピングな役割とは峻別される生理現象として、乾燥などのストレスに遭遇した植物では、プリン環分解の初発酵素であるキサンチン脱水素酵素 (XDH) が転写レベルで活性化され、プリン分解の代謝中間体が一過的に蓄積することが知られていた。私はこの現象に着目し、ストレス適応におけるプリン分解の役割を逆遺伝学的に検証した。その結果、XDH を標的としたプリン分解の機能抑制はシロイヌナズナの乾燥感受性を亢進するが、XDH の反応産物 (尿酸) の投与により、この感受性は野生株レベルまで回復することを示した [論文目録の参考文献(1)]。この先行研究から、プリン分解が実質的にストレス適応に関与し、それに貢献するプリン代謝中間体が存在することが示唆された。本研究では、そのような代謝中間体を同定し、ストレス適応機構におけるその作用の解明を通じて、古くからハウスキーピングな役割を位置づけられてきた植物代謝に隠された、新規な生理機能を証明することを目指した。

2. ストレス適応に貢献するプリン分解中間体アラントインの同定(1章)

ストレス適応に貢献する代謝中間体候補として、ストレスに遭遇した植物で蓄積する主要なプリン代謝中間体の一つであるアラントインに注目した。アラントイン分解酵素 (ALN) の機能破壊により、アラントインを恒常的に蓄積するシロイヌナズナ遺伝子破壊株 2 アレル (*aln-1*, *aln-2*) を同定し、そのストレス耐性を評価した。両株は野生株と比べて約 6 倍のアラントインを蓄積し、乾燥ショックに対して野生株よりも有意に高い生存率と成長量を示した。*aln-1* 株に野生型遺伝子 (*ALN*) を導入した遺伝子相補実験では、アラントイン含量と乾燥耐性がともに野生株レベルまで低下したことから、乾燥適応におけるアラントインの関与が確認された。次に、乾燥と並び植物機能に甚大なストレス損傷をもたらす脱水要因である高浸透圧に対する耐性を評価した。本実験では、二つの *aln* 株に加え、ALN よりも上流または下流で働くプリン分解酵素 (XDH, AAH) の遺伝子破壊株 (それぞれ *xdh1* 株, *aah* 株) を用い、プリン分解系の阻害による副次的影響や、アラントイン以外のプリン代謝物の蓄積がもたらす影響も検証した (*xdh1* 株はキサンチンを、*aah* 株はアラントイン酸を蓄積する)。その結果、高浸透圧培地における成長量は、二つの *aln* 株のみについて特異的かつ有意に高いことが示された。以上の結果から、キサンチンやアラントイン酸の蓄積はストレス適応には貢献せず、アラントインがこれを担うプリン分解の代謝中間体であることが示された。

3. ストレス適応におけるアラントインの役割の分子生理学的解析(2章)

ストレス適応には遺伝子発現の質的・量的変動が伴う。そこで、*aln-1* 株についてトランスクリプトーム解析を実施し、アラントインの蓄積がもたらすゲノムワイドな遺伝子発現への影響を調査した。その結果、通常生育条件で栽培した *aln-1* 株では、野生株と比較して 3 倍以上に発現が増大した遺伝子が 361 個あり、遺伝子オントロジー解析から、これらの多くがストレス関連遺伝子であることを明らかにした。特に、スト

レス応答を制御する植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) 関連遺伝子の発現が顕著に惹起されていたことから、ABA 応答に対するアラントインの影響をさらに検証した。代表的な ABA 応答遺伝子 (*RD29A*, *RD29B*, *RD26* および *COR15A*) の発現を調査したところ、*aln-1* 株では野生株よりも有意に mRNA 量が上昇していた。一方、遺伝子相補株、*xdh1* 株および *aah* 株ではこのような発現上昇は観察されなかったことから、遺伝子発現の惹起作用はアラントインに特異的に具わることが示された。さらに、これらの遺伝子発現解析から推測された通り、*aln-1* 株では野生株の約 2 倍量の ABA が蓄積していた。これに伴い *aln-1* 株では生育を妨げないレベルで気孔閉鎖が起こるなど、生理レベルでも恒常的な ABA 応答が観察されたが、外因性の ABA に対しては野生株と同等の反応を示した。以上の結果から、アラントインは ABA のシグナル伝達ではなくその量的調節 (ABA 代謝) に関与すること、また、それによって ABA 応答を遺伝子レベルから生理レベルで惹起し、シロイヌナズナのストレス耐性を向上させることが示唆された。

4. ABA レベル亢進におけるアラントインの作用メカニズムの解析 (3章)

aln 株にストレス耐性をもたらすと考えられる恒常的な ABA 応答は、一義的に内生 ABA レベルの亢進に帰せられるため、その原因を追究した。ストレスにตอบสนองした ABA レベルの増大には新生経路に加え、ホルモン活性を持たない ABA 配糖体 (AGA-GE) の加水分解により活性型の ABA を再生する経路が重要な役割を担う。そこで、まず新生経路について、その律速酵素 NCED の遺伝子発現を調査した。その結果、乾燥にตอบสนองした ABA 新生において主要な役割を担う *NCED3* の mRNA 量が、野生株と比較して *aln-1* 株では 2.5 倍上昇していることがわかった。さらに、レポーター遺伝子を用いた *NCED3* の転写調節領域の解析から、この mRNA レベルの増大には、少なくともプロモーターの転写活性化が関与することが示された。一方、再生経路は ABA-GE を基質とする β -グルコシダーゼ BG1 (*BGLU18*) により制御されている。ABA-GE の加水分解は、ストレスにตอบสนองした BG1 単量体の多量化により活性化されるため、葉抽出物をゲル濾過で分子量に応じて分画後、イムノブロットにより各画分中の BG1 を検出することで、その存在形態を調査した。その結果、*aln-1* 株でのみ、乾燥処理を施した野生株で観察される BG1 の多量化が、通常生育条件下にも関わらず生じていることが判明した。また、多量化に伴い、BG1 活性は野生株の 2 倍強に上昇していた。

ABA の新生経路と再生経路の鍵ステップを標的とした上述の解析から、*aln-1* 株では通常生育条件下でも両方の経路が活性化されていることが示された。この現象がアラントインの蓄積に因ることをさらに明確に示すために、野生株にアラントインを投与し、ABA レベル、ABA 応答遺伝子 (*NCED3*, *RD29A*, *RD29B* および *RD26*) の発現、および BG1 の存在形態を調べた。その結果、通常生育条件下にある野生株においても、これらの調査項目について *aln-1* 株の表現型が再現された。他方、ABA の新生経路あるいは再生経路に欠陥がある変異株 (それぞれ *aba2-1* 株、*bglu18* 株) について同様な解析を行ったところ、アラントインの効果は観察されなかった。以上の結果から、ストレス適応機構におけるアラントインの主な役割は ABA レベルの制御であることが示された。興味深いことに、BG1 を欠損する *bglu18* 株では新生経路が無傷であるにもかかわらず、アラントインを与えても野生株で観察される ABA レベルの上昇や律速酵素遺伝子 *NCED3* の発現上昇がみられない。*NCED3* の発現は ABA によってポジティブフィードバック制御を受けていることを鑑みると、この結果は、アラントインの直接の作用部位が BG1 の多量化プロセスにあることを示唆する (アラントインの蓄積による BG1 の恒常的な活性化が ABA レベルを亢進し、そのポジティブフィードバックを介して *NCED3* の発現が惹起する)。この仮説は、アラントインの分解部位 (アラントインの蓄積部位) と BG1 の細胞内局在部位が同じ (小胞体) であることから支持される。

まとめ

窒素栄養のリサイクルを担うプリン分解と、植物のストレス適応を制御する ABA との間の予期せぬ生理学的連関を明らかにした本研究は、生理活性な代謝中間体の蓄積を介して、単一代謝系が生育環境に応じて全く異なる生理学的役割を担う「代謝の多機能性」を例証するものといえる。また、シグナル伝達と比較して研究が立ち遅れている ABA のホメオスタシスや代謝制御に有用な知見をもたらすものである。本研究で得られた新規な知見は、運動能力を欠如した植物が進化させた巧妙な成長生存戦略やストレス適応戦略の解明に大きく貢献するものと考えられる。