

# 学位論文の要旨

論文題目 トマトにおけるアルド-ケト還元酵素の生理機能と遺伝子発現機構

広島大学大学院生物圏科学研究科  
生物機能開発学専攻  
学生番号 D155555  
氏名 末川 麻里奈

アルド-ケト還元酵素(aldo-keto reductase; AKR)は、微生物や動物、植物界に広く存在し、大きな酵素ファミリーを形成している。AKR は幅広い基質特異性をもつことから、その生理機能は多岐に渡り、糖や脂質、ステロイドなど様々な生体物質の代謝に関与する。植物においては、活性アルデヒドの解毒や適合溶質の産生、二次代謝、膜輸送などに関与することが知られている。

最近になって、AKR が植物のアミノ酸生合成阻害剤であるグリホサートを解毒することが新たに報告された。植物 AKR の生理機能は重要かつ多種多様であり、新規生理機能が見出されたことから、その重要性に注目が集まっている。植物 AKR は、一次構造に基づいて、AKR2、AKR4、AKR6 に大きく分類され、AKR4 はさらに AKR4A、AKR4B、AKR4C の3つに細分化される。AKR4A および AKR4B に属する植物 AKR は、主に植物の二次代謝に関与し、AKR4C は活性カルボニル化合物の消去系として、植物の非生物学的ストレス耐性に関与する。

AKR4B に属するイチゴ FaAKR4B は、ガラクトツロン酸還元酵素(galacturonic acid reductase; GalUAR)として、アスコルビン酸生合成に関与することが報告された。GalUAR は、植物のアスコルビン酸生合成副経路として示唆されるガラクトツロン酸経路において、D-ガラクトツロン酸をL-ガラクトン酸に還元する反応を触媒する。植物において、アスコルビン酸は、その強い還元力により環境ストレス耐性に寄与する。また、自身の体内でアスコルビン酸を生合成できない我々ヒトにとって、植物は重要なアスコルビン酸供給源となる。植物のアスコルビン酸は、植物とヒトの双方に有益な物質であり、AKR が植物のアスコルビン酸生合成に関わるという知見は、大変意義深い発見であった。しかし、これまでのところ、イチゴ以外の高等植物において、アスコルビン酸生合成に関わる AKR 遺伝子は報告されていない。そこで、これまで遺伝子発現が確認されているトマト AKR のうち、イチゴにおいて GalUAR として働くイチゴ FaGalUAR の一次構造と最も高い相同性をもつトマト SIAKR4B に着目した。

SIAKR4B は、その一次構造から AKR4B に分類されると推定される。これまでに、トマト SIAKR4B の遺伝子発現は、塩や過酸化水素、エテホンやサリチル酸、ジャスモン酸といった植物ホルモンによって著しく増加することが明らかにされている。SIAKR4B がアスコルビン酸生合成に関わるかどうかは不明であるが、SIAKR4B 遺伝子は様々な環境ストレスに対して誘導的に発現し、何らかの機構によって環境ストレス耐性に関与する可能性がある。また、植物の遺伝子工学において、環境ストレス誘導的に発現する遺伝子のプロモーターは、環境ストレス応答的な遺伝子発現に有効利用される。そこで、本研究は、SIAKR4B の生理機能と遺伝子発現機構の解明を目的とした。

## 第1章 アスコルビン酸生合成における SIAKR4B の機能解析

まず、SIAKR4B が AKR として機能発揮しているかどうか検討するため、SIAKR4B の酵素性状の評価を試みた。大腸菌を用いて GST-SIAKR4B 組換えタンパク質を発現させ、GST カラムで GST-SIAKR4B 組換えタンパク質を精製した。得られた精製タンパク質の AKR 活性を評価したが、組換えタンパク質の AKR 活性は認められなかった。大腸菌から調製したイチゴ FaGalUAR 組換えタンパク質も酵素活性を示さないことが報告されており、SIAKR4B は、酵素活性の発現に翻訳後修飾を必要とする可能性がある。次いで、トマト葉から単離したプロトプラストやタバコ培養

細胞で **SIKR4B** を過剰発現させて、**SIKR4B** の機能解析を行った。**SIKR4B** を過剰発現させたプロトプラストおよびタバコ培養細胞から調製した抽出液は、高い GalUAR 活性を有する傾向を示した。しかし、プロトプラストとタバコ培養細胞のいずれにおいても、**SIKR4B** の過剰発現によるアスコルビン酸量の増加は認められなかった。さらに、**SIKR4B** を過剰発現させた細胞に GalUAR の基質である D-ガラクトツロン酸を添加しても、アスコルビン酸量の増加は認められなかった。植物には複数のアスコルビン酸生合成経路が存在する。トマト葉プロトプラストやタバコ培養細胞では、ガラクトツロン酸経路によるアスコルビン酸の生合成が活発でない可能性がある。実際に、野生株のタバコ培養細胞では、D-ガラクトツロン酸に対する酵素活性は、グリセルアルデヒドやメチルグリオキサール、グリオキサールに対する酵素活性と比較して著しく低かったことから、野生株のタバコ培養細胞では GalUAR が発現していないと思われる。また、イチゴ FaGalUAR 遺伝子をトマト葉プロトプラストに導入しても、アスコルビン酸量の増加は認められなかった。ガラクトツロン酸経路によるアスコルビン酸生合成は、器官や時期特異的に行われることが示唆されている。そのため、**SIKR4B** がアスコルビン酸生合成に関わるかどうかを検討するためには、プロトプラストや培養細胞ではなく、**SIKR4B** 組換え植物体を用いた解析が必要であると思われる。

また、**SIKR4B** は、グリセルアルデヒドやメチルグリオキサール、グリオキサールのカルボニル化合物に対して酵素活性を示した。**SIKR4B** は、これらのカルボニル化合物消去系の酵素として、非生物学的ストレス耐性に関わる可能性も考えられ、**SIKR4B** 組換え植物体の環境ストレス耐性を評価することも重要である。

## 第2章 酸化と病傷害ストレスに対する **SIKR4B** の機能解析

第1章において、**SIKR4B** は GalUAR 活性を有することが明らかになったが、アスコルビン酸生合成への関与は不明のままである。そこで、タバコ植物体で **SIKR4B** を過剰発現させた。播種 60 日後と 135 日後の生育段階や、過酸化水素処理による酸化ストレス下において、**SIKR4B** 過剰発現タバコ植物体のアスコルビン酸量を評価した。しかし、いずれの生育段階や酸化ストレス下でも、**SIKR4B** の過剰発現によるアスコルビン酸量への影響は認められなかったことから、**SIKR4B** は、アスコルビン酸生合成に関与していない可能性が示唆された。また、タバコ植物体の実生や葉を用いて、過酸化水素処理による酸化ストレスに対する耐性を評価したが、**SIKR4B** の過剰発現による影響は認められなかった。

これまでに、**SIKR4B** の遺伝子発現は、過酸化水素処理による酸化ストレス下だけでなく、サリチル酸やジャスモン酸といった病傷害応答に関わる植物ホルモンによっても著しく増加することが明らかになっている。そこで、**SIKR4B** が病傷害応答に関わる可能性を検討した。トマト葉において、アグロバクテリウム懸濁液の浸潤処理により、**SIKR4B** の遺伝子発現の著しい誘導が認められたが、病原感染のエリシターとして用いられるリポ多糖処理では、**SIKR4B** の遺伝子発現に影響は認められなかった。**SIKR4B** の遺伝子発現は、アグロバクテリウムやリポ多糖を含まないバッファーの浸潤処理によって、著しく誘導された。浸潤処理によって引き起こされた細胞壁の損傷が、**SIKR4B** の遺伝子発現を誘導した可能性がある。実際、トマト葉の浸潤処理により、葉の電解質溶出率の有意な増加が認められている。電解質溶出率は細胞内容物の滲出量を反映していることを考慮すると、葉の電解質溶出率の増加は、浸潤処理によって細胞壁が損傷したことを示唆する。病原菌の感染や害虫の食害により、植物の細胞壁が損傷すると、細胞壁の分解産物が生じる。植物細胞壁の分解産物は、病傷害ストレスに対する防御反応を引き起こすエリシターとなる。**SIKR4B** は、病傷害応答に関わる植物ホルモンや、細胞壁の損傷を伴う傷害ストレスによって遺伝子発現が誘導され、病傷害応答に関与している可能性がある。

## 第3章 **SIKR4B** の発現調節機構の解析

まず、**SIKR4B** の遺伝子発現を調節する転写因子を探索した。トマトのマイクロアレイデータベースを用いて、**SIKR4B** 遺伝子発現パターンと最も似た発現傾向を示す遺伝子を検索した結果、bZIP 転写因子である anaerobic basic leucine zipper (ABZ1)が見つかった。ABZ1 と **SIKR4B** の遺伝

子発現解析において、トマト植物体では明確な相関が認められなかったが、トマト葉プロトプラストにおいていずれの遺伝子も高発現していた。ゲルシフト解析において、6×His-ABZ1 組換えタンパク質は SIAKR4B プロモーター領域 1362 bp の配列に結合したことから、ABZ1 は SIAKR4B プロモーターに作用することが示唆された。しかし、プロトプラストにおいて一過的な ABZ1 遺伝子の発現抑制では、SIAKR4B の遺伝子発現は変動せず、ABZ1 が SIAKR4B の遺伝子発現を制御するかどうかは不明である。

次いで、トマト葉プロトプラストを用いた一過的発現系による SIAKR4B のプロモーター解析を行った。SIAKR4B プロモーターは、植物における恒常的高発現プロモーターであるカリフラワーマザイクウイルス 35S プロモーターと同程度の非常に高いプロモーター活性を示した。さらに、SIAKR4B 遺伝子の開始コドンから上流-600 から-500 bp までの配列に高いプロモーター活性に関わるシス因子が存在することが示唆された。また、SIAKR4B プロモーターの高い転写活性は、シロイヌナズナ葉プロトプラストにおいても同様に認められ、-600 から-500 bp の領域に、高い転写活性に関わるシス因子が存在することが示唆された。そこで、SIAKR4B プロモーター領域に存在する高い転写活性に関わるシス因子の同定を試みた。その結果、SIAKR4B プロモーター領域の-585 から-582 bp および-510 から-507 bp に存在する 2 つの G-box 様配列を置換・欠損させると、プロモーター活性の著しい低下が認められた。この 2 つの G-box 様配列が SIAKR4B のストレス誘導的な高発現に重要なシス因子であることが示唆された。

本研究により、SIAKR4B は、アスコルビン酸合成や非生物学的ストレス耐性よりも、病傷害応答に関与する可能性が示唆された。今後、SIAKR4B 組換え植物体を用いた解析により、SIAKR4B の病傷害応答的な生理機能の解明が必要である。また、SIAKR4B のストレス誘導的な遺伝子高発現には、プロモーター領域の-585 から-582 bp および-510 から-507 bp に存在する 2 つの G-box 様配列が重要であることが明らかになった。SIAKR4B プロモーターは、トマトやシロイヌナズナにおいて高い転写活性を示したことから、遺伝子工学において、植物種間に共通のストレス誘導的な高発現プロモーターとして有用であると確信する。