

環境耐性関連遺伝子研究の現状と展望

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
巻/号	171
掲載ページ	p. 16-21
発行年月	1994年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



環境耐性関連遺伝子研究の現状と展望

小池 説夫

環境耐性にかかわる遺伝子を単離する試みは活発に行なわれつつあるが、その成果はまだ非常に少ない。これは、一種類の環境耐性においても現象面が多岐にわたり、しかも鍵となるステップのメカニズムが解明されていない場合が少なくないからだといえる。

本稿では、環境耐性の中でも、とくに耐冷性と耐塩性とに焦点をあて、現在までにえられた、ならびにえられつつある成果をストレスに誘導される遺伝子にまで言及して概観することにした。

1. はじめに

環境ストレスには、温度（高温・低温・凍結温）、水分（過湿・乾燥）、光（強光・弱光・光質）、塩類（浸透圧・一般無機イオン・重金属）、物理的力（重力・風力）など、さまざまなストレスがある。ここでは、農業生産とも深く結びついているストレスの中で、温度ストレスとして低温ストレスと、塩類ストレスとしてナトリウム塩ストレスとに焦点をあて、これらのストレスと密接な関係をもつ場合のある水分ストレスとしての乾燥ストレスをとりあげる。

凍結温度以上の低温に対する耐性については、耐冷性と耐寒性という区別が必ずしも明確でない二つの用語が使われている。一般的に農業上議論される場合は耐冷性の用語が多く用いられ、

耐寒性は主に越冬作物を対象とした場合に限定されて用いられる傾向がある。しかし、低温耐性の機構としては共通する面があるので、耐冷性の中に耐寒性も含めて考えていくことにする。

塩類ストレスに対する耐性の中でも耐塩性という用語はナトリウム塩の害に対する耐性を指すことが一般的であるため、ここでは耐塩性をナトリウム塩に対する耐性という意味で用いることにする。

耐冷性や耐塩性遺伝子に限らず、環境耐性遺伝子が単離され、機能の解明がなされている例は極めて少ないので、ここではストレスによって誘導されてくる関連遺伝子や耐性のメカニズムが明らかにされつつあり、将来遺伝子レベルの研究が期待される例をとりあげることでこれらの分野の研究を展望することにする。

2. 耐冷性関連遺伝子

耐冷性遺伝子が発現するかしないかで耐冷性

Setsuo KOIKE : A perspective of the researches on the genes related to environmental stress tolerance

の有無が決定される、という意味での耐冷性遺伝子は単離されていない。

耐冷性といっても、作物の生育時期も対象となる器官・組織によって問題となる耐冷性は異なる。イネを例にとりあげてみると、苗の時期であれば低温ストレス下での葉の光合成機能にかかわる耐冷性であり、その中で、根の養分や水分吸収にかかわる耐冷性がとくに重要となる。穂ばらみ期であれば花粉発育機能にかかわる耐冷性であり、開花期であれば花粉発芽と受精にかかわる耐冷性となり、登熟期であれば転流や子実におけるデンプン蓄積にかかわる耐冷性、という具合に要求される耐冷性の質とその程度とが異なってくる。

これらのうち、イネではないが光合成機能にかかわる耐冷性関与遺伝子の究明がなされた。すでに本誌 (vol. 16, No. 1) に笠毛¹⁾が詳述しているので、ここでは概略を記すことにする。生体膜は脂質の二重層にタンパク質が埋めこまれたり、膜周辺に位置する構造をとっている。この脂質の流動性が低温ストレス下でも高く保たれば、傷害を受けにくい。このような考え方²⁾に立って、脂質の流動性に影響を与える不飽和脂肪酸の含量を制御する酵素および遺伝子に注目がおかれ研究がすすめられた。村田³⁾は、葉緑体にとくに多く含まれるフォスファチジルグリセロール (GP) というリン脂質の脂肪酸組成を分析し、耐冷性の低い植物には飽和脂肪酸が多く、逆に耐冷性の高い植物には不飽和脂肪酸が多いことを明らかにした。つづいて、この飽和/不飽和脂肪酸を導入する過程に関与するグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (AT) 遺伝子を耐冷性の低いカボチャから単離し、タバコに導入して形質転換させ飽和脂肪酸含量を増加させた。この結果、カボチャの遺伝子を導入したことで耐冷性の比較的高いタバコの光合成機能は低温処理 (1℃, 4時間) でカボチャと同程度まで傷害を受けやすくなった⁴⁾。これは遺伝子操作により高等植物の耐冷性を改変させた最初の報告であり、A

T 遺伝子は耐冷性関与遺伝子とよべる数少ない例である。

これらの結果は、生体膜の脂質成分が耐冷性に深く関与する、という基礎的データの蓄積の上にたっていることで説得力をもつ。しかし、光合成機能に関与した葉緑体の特定の脂質に関する実験結果であり、飽和/不飽和脂肪酸含量をつかさどる遺伝子が他の生育ステージや器官・組織における耐冷性についても同様に決定的に重要であるかどうかはわからない。例えば、光合成機能に関連して、低温ストレスによってルヴィスコ (RuBisco) の生合成が抑えられる⁵⁾が、とくに核支配の小サブユニットタンパク質をコードする遺伝子の転写活性が特異的に抑制される⁶⁾。イネの品種間でみられる低温ストレス下での光合成活性の違いが RuBisco 遺伝子の発現機構そのものに求められるのか、あるいは膜機能との関連で考えられるのかは今後の課題である。

生殖生長期の耐冷性に関しては、イネの場合、現状は細胞形態学的研究や生理学的研究の段階までで遺伝子レベルの研究にいたっていない。ただ、花粉発育の過程でもっとも低温に感受性の高い時期である四分子細胞からの小孢子細胞の遊離過程に関与する酵素、 $\beta-1, 3$ -グルカナーゼがこの生育ステージの耐冷性を考えるうえで重要であることが指摘された⁷⁾。この酵素の低温ストレス下での発現様式の解明は、耐冷性遺伝子の解明につながる可能性がある。

低温ストレスで誘導されてくる遺伝子については数多くの報告がある⁸⁻¹³⁾が、誘導されてくる遺伝子産物であるタンパク質の機能についてまで解明されている例はほとんどない。さらに、耐冷性が水分ストレス耐性と密接に関係している面があり、この観点からの研究もある。水分の蒸散が、気孔の開閉機能と根からの吸水機能のどちらによってより大きく影響されるかは局面によって異なるが、低温ストレスによる枯死の耐性は水分バランス保持機能の耐性の問題となる。最近、水分ストレスを付与しておくとし

温耐性が獲得され、これに関与する遺伝子が単離された¹⁴⁾。この際、水分生理に関与するホルモン、アブシジン酸 (ABA) は水分ストレスのかわりの効果を持っていなかった。単離された遺伝子の一部は、種子の成熟期に大量に発現する *Lea* (Late-embryogenesis-abundant) 遺伝子¹⁵⁾ とよばれる一群の遺伝子と共通していた。*Lea* 遺伝子にコードされたタンパク質は、親水性の構造をもち、水分が失われた時に細胞を保護する機能をはたしていると考えられている。

水分ストレスにより誘導されてくる遺伝子は数多くあり¹⁶⁻¹⁸⁾、遺伝子にコードされたタンパク質の機能はチオールプロテアーゼや膜タンパク質であることが一部の遺伝子で帰属されている¹⁹⁾。これらの遺伝子の中にはアブシジン酸 (ABA) によっても誘導されることから、ABA 処理によって誘導される遺伝子²⁰⁻²²⁾ もストレス耐性関連遺伝子として注目していく必要がある。

今後にもこれらのようにストレスによって誘導される遺伝子は数多く報告されてくると思われるが、コードされたタンパク質についての機能までが十分に究明されない限り耐性に関与した遺伝子として位置づけられない。これは、メカニズムから遺伝子にせまる以上に難しい面があると予想されるが、意外な展開も期待できるかもしれない。

3. 耐塩性関連遺伝子

ナトリウム塩によってひきおこされる塩害は、土壤水溶液の浸透圧の上昇による吸水阻害とナトリウムイオンそのものによる生体内のさまざまな代謝阻害とにわけられるが、より重要な問題は生体内に侵入してきたナトリウムイオンによる害である。これに対する植物側の戦略としては、①根からのナトリウムイオンの侵入を阻止してしまうか、侵入してきてもすぐ排泄してしまう、②止むをえず入ってきたナトリウムイオンを生体内の特定の場所 (多くは液胞) に封

じこめてしまう、③塩性植物にみられる塩毛や塩腺からナトリウム塩として外へ排出してしまう、といった対応策がとられる。これらの機能が欠けていたり、能力が低いと塩害を受けることになる。それゆえに耐塩性はいずれかの機能か、あるいはいくつかの機能をあわせた形で植物が備えることで実現されている。耐塩性関連遺伝子は上述した機能のいずれかに関与していなければならないが、現在までに単離されている遺伝子の数は限られている。

(1) Na^+/H^+ アンチポーター

原核生物には細胞膜上に Na^+/H^+ アンチポーターのあるものがあり、これはプロトン (水素イオン) ポンプにより水素イオンを汲み上げ、生じた電位差と化学的濃度勾配で形成された駆動力によりナトリウムイオンを外へ排出してしまう。

耐塩性の植物ではこのアンチポーターは液胞膜に存在していて、細胞内に入ってきたナトリウムイオンを液胞内にためこんでしまう。こうして細胞質に高濃度のナトリウムイオンが存在して代謝阻害をひきおこすのを回避しているが、液胞内にナトリウムイオンが蓄積されるほど細胞質との浸透圧の差が大きくなってしまいうので、浸透圧を調節する物質として細胞質にベタインやプロリンあるいはショ糖といった大量にあっても阻害作用のない溶質 (適合溶質: compatible solute) を増加させる機能がある。アンチポーターの活性の高さと適合溶質の生成・蓄積能とは対になっていなければならない。この適合溶質生成に関する遺伝子は後述する。

植物のアンチポーターについては、耐塩性の高い大麦²³⁾ やテンサイ²⁴⁾、塩性植物であるホソバノハマアカサ²⁵⁾ やオカヒジキ²⁶⁾ 等を用いて研究がなされているが、タンパク質としてはまだ単離・同定されていない。したがって遺伝子レベルの研究にいたっていないが、テンサイでアンチポーター活性に密接に関係した液胞膜タンパク質として分子量170kDa (キロダルトン) のタンパク質が同定されている²⁷⁾。

(2) ATP分解酵素

動物の赤血球細胞膜には、ナトリウムポンプと呼ばれる Na^+/K^+ ATP 分解酵素があり、ナトリウムを細胞外にだすかわりにカリウムイオンを輸送して入れるタンパク質が存在している。この酵素が植物の根で十分に機能すればナトリウムイオンを排除してカリウムイオンをとりこむことで耐塩性の機能に寄与することになる。海産の緑藻にはこの酵素の存在が知られている。アカシオの内膜系にはナトリウムイオンにより活性化される ATP 分解酵素が存在しており、遺伝子がクローニングされている²⁸⁾。

ヨシは海水が入りこむ汽水域で育つイネ科の単子葉植物で、耐塩性が高い。これは茎の基部の師部にある ATP 分解酵素の働きで地上部にあがってきたナトリウムイオンを根の方へもどしてしまう機能をもっている²⁹⁾。

(3) 適合溶質生成酵素

前述したように浸透圧調節物質として細胞質に蓄積されるベタインやプロリンのような適合溶質をもつことは耐塩性の重要な側面である。これらの化合物の生合成過程の鍵となる酵素の遺伝子がとられている。

ベタイン (グリシンベタイン) は、グリシンから出発してコリンを経て2段階で葉緑体で生合成されることが証明され³⁰⁾、最終段階に関与するベタインアルデヒド脱水酵素 (BADH) の遺伝子が塩ストレスを与えたハウレンソウ緑葉を材料にしてクローニングされた³¹⁾。その後、テンサイ³²⁾、オオムギ³³⁾ から単離されている。

プロリンに関しては、塩ストレスによりグルタミン酸経路で合成され³⁴⁻³⁵⁾、プロリン合成の最終段階に関するピロリン酸-5-カルボン酸レダクターゼ (P5Cレダクターゼ) の遺伝子がダイズ根粒からクローニングされた³⁶⁾。

塩ストレスで誘導される遺伝子も多く報告があり、一部は水分ストレスやABA処理により誘導される遺伝子とも共通している。タバコの培養細胞が塩ストレス下で産出するオスモチン³⁷⁾ (26 kDa) と称されるタンパク質の遺伝子

はクローニングされた³⁸⁾。オスモチンは名前の通り浸透圧の調節に寄与していると考えられているが、その機能については今後の研究を待たねばならない。このほか、塩ストレスをかけたカンキツ類の培養細胞で誘導されるタンパク質をコードする遺伝子はグルタチオン還元酵素 (GP) 遺伝子とホモロジーが高く、ストレスにともなう酸化反応の防御に関係していると考えられている³⁹⁾。

4. おわりに

環境耐性は形態を含めた組織化された機能である場合が多いことから、単一の遺伝子の発現よりも複数の遺伝子の効果的な発現が必須であると予想される。しかし、すでに述べたように光合成機能からみた耐冷性が単一の遺伝子操作により改変できた⁴⁾ ように、遺伝子操作による環境耐性も決して夢でないことが示されたといえる。このためにも、環境耐性の分子機構を明らかにし、耐性にもっとも寄与するステップの遺伝子を解明していくことが最善だと考える。

(農業生物資源研究所 化学耐性研究室)

参考文献

- 1) 笠毛邦弘 (1993) 低温ストレスと生体膜, 研究ジャーナル, 16(1): 7~13
- 2) Lyons, J. M. (1973) Chilling injury in plants, Annu. Rev. Plant Physiol., 24: 445~466
- 3) Murata, N. (1983) Molecular species composition of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants., Plant Cell Physiol., 24: 81~86
- 4) Murata, N. *et al.* (1992) Genetically engineered alternation in the chilling sensitivity of plants., Nature, 356: 710~713
- 5) Maruyama, S. *et al.* (1990) Response of rice leaves to low temperature I. Changes in basic biochemical Parameters., Plant Cell Physiol., 31: 303~309
- 6) Hahn, M. and Walbot, V. (1989) Effects of cold-treatment on protein synthesis and mRNA

- levels in rice leaves., *Plant Physiol.*, 91 : 930~938
- 7) 小池説夫 (1992) 生殖生長期の低温障害植物細胞工学, 4 : 329~335
 - 8) Binh, L. T. and Oono, K. (1992) Molecular cloning and characterization of genes related to chilling tolerance in rice., *Plant Physiol.*, 99 : 1146~1150
 - 9) Gilmour, S. J. *et al.* (1992) cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.*, 18 : 13~21
 - 10) Neven, L. G. *et al.* (1993) Characterization of a spinach gene responsive to low temperature and water stress., *Plant Mol. Biol.*, 21 : 291~305
 - 11) Nordin, K. *et al.* (1993) Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn., *Plant Mol. Biol.*, 21 : 641~653
 - 12) Ouellet, F. *et al.* (1993) Purification, characterization and cDNA cloning of the 200-kDa protein induced by cold acclimation in wheat., *Plant Cell Physiol.*, 34 : 59~65
 - 13) Yoshida, H. and Kato, A. (1993) Cold-responsive genes related to chilling injury in rice (*Oryza sativa* L.), 第15回国際植物科学会議講演要旨集 : 485
 - 14) Joshee, N. *et al.* (1993) A novel group of rice genes-specifically induced by water stress., 第15回国際植物科学会議講演要旨集 : 484
 - 15) Dure, L. III. *et al.* (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants., *Plant Mol. Biol.*, 12 : 475~486
 - 16) Gomez, J. *et al.* (1988) A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein., *Nature*, 334 : 262~264
 - 17) Joshi, C. P. *et al.* (1992) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a water stress protein (WSP 23) from wheat roots., *Plant Science*, 86 : 71~82
 - 18) Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1992) Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana* : Sequence analysis of one cDNA that encodes a putative transmembrane channel protein., *Plant Cell Physiol.*, 33 : 217~224
 - 19) 篠崎一雄・篠崎和子 (1991) 乾燥ストレスによる遺伝子発現, 植物細胞工学, 3 : 632~638
 - 20) Kurkela, S. and Borg-Frank, M. (1992) Structure and expression of Kin-2, one of two cold-and ABA-induced genes of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.*, 19 : 689~692
 - 21) Luo, M. *et al.* (1992) Characterization of a gene family encoding abscisic acid-and environmental stress-inducible proteins of alfalfa., *J. Biol. Chem.*, 267 : 15367~15374
 - 22) Mundy, J. and Chua, N-H. (1988) Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene., *EMBO J.*, 7 : 2279~2286
 - 23) Garbarino, J. and DuPont, F. M. (1988) NaCl induces a Na⁺/H⁺ antiport in tonoplast vesicles from barley roots., *Plant Physiol.*, 86 : 0231~0236
 - 24) Blumwald, E. and Poole, R. J. (1987) Salt tolerance in suspension cultures of sugar beet., *Plant Physiol.*, 83 : 884~887
 - 25) Matoh, T. *et al.* (1989) Collapse of ATP-induced pH gradient by sodium ions in microsomal membrane vesicles prepared from *Atriplex gmelini* leaves., *Plant Physiol.*, 89 : 180~183
 - 26) 小池説夫 他 (1993) オカヒジキ液胞膜 Na⁺/H⁺ アンチポート活性, 日本植物生理学会1993年度年会講演要旨集 : 58
 - 27) Barkla, B. J. and Blumbald, E. (1991) Identification of a 170-kDa protein associated with the vacuolar Na⁺/H⁺ antiport of *Beta vulgaris*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88 : 11177~11181
 - 28) 和田雅人 他 (1992) 海産ラフィド・藻 *H. akashiwo* の ATPase の細胞内局在, 日本植物学会第57回大会研究発表記録 : 126
 - 29) 間藤 徹 (1991) 高等植物の耐塩性機構, 植物細胞工学, 3 : 268~272
 - 30) Hanson, A. D. *et al.* (1985) Betaine synthesis in chenopods : Localization in chloroplasts, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82 : 3678~3682

- 31) Weretilnyk, E. A. and Hanson, A. D. (1990) Molecular cloning of a plant betainealdehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87 : 2745~2749
- 32) McCue, K. F. and Hanson, A. D. (1992) Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet cDNA cloning and expression., Plant Mol. Biol., 18 : 1~11
- 33) 石谷 学 他 (1992) 大麦のベタインアルデヒド脱水素酵素の cDNA クローニング, 日本植物生理学会1992年度会講演要旨集 : 137
- 34) 高倍鉄子 (1991) 塩ストレスによる遺伝子発現—浸透圧調節機構の分子生物学—, 植物細胞工学, 3 : 639~643
- 35) Delauney, A. J. and Verma, D. P. S. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants., Plant J., 4 : 215~223
- 36) Delauney, A. J. and Verma, D. P. S. (1990) A soybean gene encoding Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* is found to be osmoregulated., Mol. Gen. Genet., 221 : 299~305
- 37) Singh, N. K. *et al.* (1987) Characterization of Osmotin : a thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells., Plant Physiol., 85 : 529~536
- 38) Singh, N. K. *et al.* (1989) Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential., Plant Physiol., 90 : 1096~1101
- 39) Holland, D. *et al.* (1993) Molecular characterization of salt-stress-associated protein in citrus : protein and cDNA sequence homology to mammalian glutathione peroxidases., Plant Mol. Biol., 21 : 923~927

