

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19580111

研究課題名 (和文) 物質集積に関わる植物の糖応答システムの解析

研究課題名 (英文) Genetic analysis of plant sugar response pathways involved in carbon partitioning.

研究代表者

森上 敦 (MORIKAMI ATSUSHI)

名城大学・農学部・教授

研究者番号：10211608

研究成果の概要 (和文)：

低濃度の糖条件において導入した *LUC* 遺伝子の発現が高発現となるシロイヌナズナの *hsi12* および *hsi9* の原因遺伝子は、デンプン合成に関わる PGM であった。これにより、デンプンの蓄積が糖応答性に影響およぼすことが明らかになった。また、*hsi20* および *hsi13* の原因遺伝子は、染色体 5 番の上腕に存在することがマッピングにより明らかになった。

研究成果の概要 (英文)

The *hsi12* mutant of *Arabidopsis* exhibiting enhanced *LUC* expression under low sugar conditions contained a mutation in a gene encoding a plastid-isoform of the enzyme phosphoglucomutase involved in starch formation. This result implies that starch accumulation effects on the sugar response in plant cells. Genetic analysis of *hsi20* mutant indicated that the causal gene is mapped to a region on the upper-arm of chromosome V.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：植物生化学

## 1. 研究開始当初の背景

多くの生物において、その細胞を取り巻く環境中に存在する糖の種類やその濃度によって、数多くの遺伝子の発現量に変化が起こる事が知られている。それは植物においても例外ではなく、植物が高濃度の糖条件下にある場合は、炭素源を蓄積するソース機能に關与する光合成系やデンプンの分解に關連するタンパク質の遺伝子の発現量が減少するが、シンク機能に關与するデンプンなどの貯蔵物質の集積に關わるタンパク質の遺伝子は、逆にその発現量が増加する。これまで、様々な生理実験により、このような糖による遺伝子の発現量の変化は、複数の経路によって制御されていることなどが明らかにされてきていたが、その解明はまだ十分ではなかった。

## 2. 研究の目的

植物の糖に対する反応応答系は、物質集積のシンク・ソース機能の轉換に關わっていることから、植物の機能開發のための基礎的な知見として、世界各国で種々の作物種を用いて解析が進められてきた。近年は、モデル植物であるシロイヌナズナの突然変異株を採り入れた研究がすすめられたことにより、糖濃度センサーから情報伝達系を通過して最終的に転写因子の発現へと繋がる経路の存在が明らかにされつつあった。しかし、これまで単離された変異株の多くは高濃度糖条件下での植物の生育の可否を指標にして単離されたものであり、得られた情報は全体の一部に過ぎないと考えられた。そこで、我々は新しいスクリーニングのシステムにより突然変異株を単離して、こ

の糖に対する反応応答経路の解析を行った。

## 3. 研究の方法

サツマイモの貯蔵タンパク質遺伝子の解析結果から得られた糖応答性最小領域プロモーター(Morikami et al, 2005)とホタルシフェラーゼレポーター遺伝子をつないだ融合遺伝子 *sGsL* を導入したシロイヌナズナを利用して、その形質轉換体に変異原処理を施し、その子孫から低糖濃度条件下においても導入したレポーター遺伝子の発現量が高くなる変異株(*high-level expression of sugar-inducible gene = hsi*)や高糖濃度条件下でのレポーター遺伝子の発現量が低くなる変異株(*low-level expression of sugar-inducible gene = lsi*)を多数単離した。本研究では、そのうち *hsi9*, *hsi12*, *hsi13*, *hsi15*, *hsi16*, *hsi20* 変異株についての解析を進めた。

## 4. 研究成果

### (1) *hsi9* および *hsi12* 変異株の原因遺伝子の解明

*hsi9* および *hsi12* 変異株は、その遺伝的な背景は *Columbia-0* 株である。そこで、これらの変異株を異なる遺伝的背景である *Ler* 株と掛け合わせを行い、その *F2* の中から、1%ショ糖処理時に *sGsL* 基本株では検出できないレベルの高いシフェラーゼ活性をもつ個体を選抜した。分子マーカーを用いて、これらの個体 DNA の遺伝解析を行ったところ、*hsi9* および *hsi12* の原因遺伝子は、5 番染色体の下腕 *MWS2* 領域にある約 70kb の領域にあることが明らかになった。

シロイヌナズナのゲノムプロジェクトに

より、この領域内には 17 個の遺伝子の存在が予想されている。それらの遺伝子のアノテーションを調べたところ、遺伝子領域がプラスチド局在型ホスホグルコムターゼ (PGM) をコードする At5g5180 遺伝子が見いだされた。

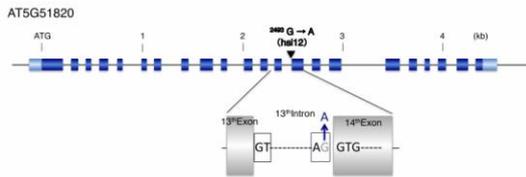


図1 *hsi12*に見られる PGM 遺伝子領域の塩基置換

この遺伝子の産物は糖代謝関連酵素であることから、糖に対する応答性に関与する可能性が高いと思われた。そこで、*hsi12* 変異株のゲノム DNA を単離し、この遺伝子全領域約 4.5kb の塩基配列の決定を行った。

イントロンが正確に切除されるためには、イントロンの 3' 端の配列が AG となっている必要がある。しかし、*hsi12* 変異株では、PGM 遺伝子の第 13 番イントロン 3' 末端の AG 配列の G 塩基が A 塩基に変わっていた (図 1)。*hsi12* 変異株では PGM の mRNA のイントロン切除が正確に行われなため、不活性化酵素が生じていると考えられる。

PGM は、細胞質から輸送された、もしくは葉緑体内で合成されたグルコース-6-リン酸をグルコース-1-リン酸に変換することにより、デンプン合成の直接的な基質となる ADPG の形成に関わる酵素である。それ故、この酵素の遺伝子が欠失した植物では、デンプンの合成がほとんど起こらない。そこで、*hsi12* について、その葉におけるデンプンの蓄積について調べたところ、変異株の葉にデンプン蓄積は検出できなかった (図 2)。

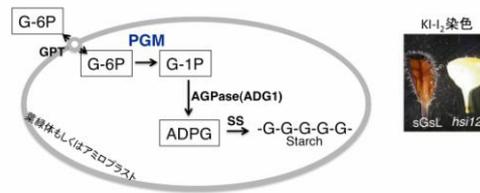


図2 デンプン合成経路と *hsi12* のデンプン染色の結果

また、*hsi9* についても遺伝子座のマッピングを行った所、この変異遺伝も *hsi12* とほぼ同じ結果になったので、この変異株についてもデンプンの蓄積を調べたところ、*hsi12* 同様デンプンが検出できなかった (図 3)。そこで、*hsi9* と *hsi12* の間で掛け合わせを行い、相補テストを行ったところ、*hsi9* 変異株は *hsi12* 変異株を相補しなかった。

*hsi9* 変異株のゲノム DNA を単離し、そのゲノムの PGM 領域の塩基配列を一部決定したが、*hsi12* に見つかった第 13 番目のイントロンの塩基置換の部位を含め、現時点では塩基置換などは検出できていない。*hsi9* は *hsi12* とは同じ遺伝子の別の部位に変異が起こった変異株と考えられる。

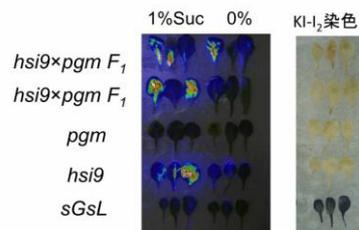


図3 *hsi9* 変異株も PGM 遺伝子に変異をもつ

## (2) デンプン合成能力と糖応答性との関連

PGM の欠損は、sGsL 遺伝子発現の異常を引き起こすことは明らかになったが、その現象が PGM の活性欠失がもたらす直接的な影響下によるものなのか、デンプンが

作られないために起こる現象なのかは明らかではない。そこで、PGM と同様にデンプンの合成ができなくなる、ADP グルコースピロフォスホリラーゼの小サブユニットの変異株 *adg1* の存在下で sGsL の発現がどのようになるかを検討した。すると *adg1* においても sGsL 融合遺伝子は低濃度の糖条件での発現上昇が見られた (図 4)。このことは、デンプンの合成ができないというそのこと自体が、sGsL の低濃度の糖条件での発現誘導をもたらすことを示している。

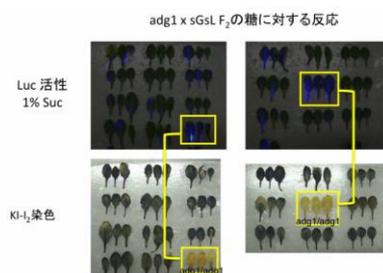


図4 *adg1* 変異株も sGsL の発現に影響を及ぼす

植物は、葉で光合成を行い、最終的な産物としてデンプンの合成を行う。このデンプン合成は、合成した糖を多糖の形で細胞質から不溶化し、細胞質の糖質の濃度を下げるという意味がある。今回の *hsi9* および *hsi12* の原因遺伝子が PGM にあったということは、デンプン合成・分解の制御が、植物内部の糖濃度調節の重要な要因となっていることを改めて浮き彫りにしたものと考えられる。

### (3) *hsi20* および *hsi13* 変異株の原因遺伝子の解明

*hsi20* は、切り取り葉を水もしくは sGsL 基本株では有意な発現がみられない水や 1% のショ糖で処理した場合にも、導入遺伝子の強い発現誘導が比較的安定に見られる

劣性の変異株である (図 5)。この変異株は、糖による処理とアブシジン酸 (ABA) による処理の影響を調べた際に、ABA に対する変化が糖に対する変化より大きいという特徴をもっていた (結果省略)。

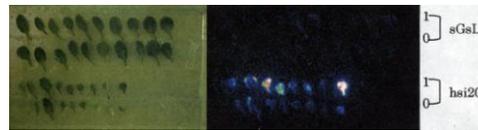


図5 *hsi20* 変異株に見られる異常な糖応答性

そこで、ストレス応答と関係が深い ABA との関連性を調べることもあり、MS 培地に NaCl を加えた培地に、*hsi20* および対象区として sGsL 基本株の種子を播種し、その生育を調べたところ、播種 2 週間後の観察では、50mM もしくは 100mM の NaCl 濃度において、*hsi20* 株の方が植物体の生育が遅くなるのが観察された。この後の生育には、特別の影響は見られないことから、この変異株の NaCl に対する感受性は特に発芽時に顕著であると推察された (図 6)。



図6 *hsi20* 変異株に見られる塩高感受性

*hsi20* 変異株についても、Ler 株との間で交配を行い、その F<sub>2</sub> 世代の中から、糖に対して高感受性になったと思われるものを選抜し、そのゲノム DNA を用いたマッピングを行った。その結果、*hsi20* の原因遺伝子は、染色体 5 番の上腕、sGsL マーカー遺伝子が導入されている領域近傍にあることが判明した。Ler との掛け合わせをおこなった後代においては、表現型が安定

しないためマッピングは困難な所があるが、sGsL 挿入部位がある MXE10 領域を中心とした 14cM の領域内に、この変異の原因遺伝子があることが判明した (図 7)。

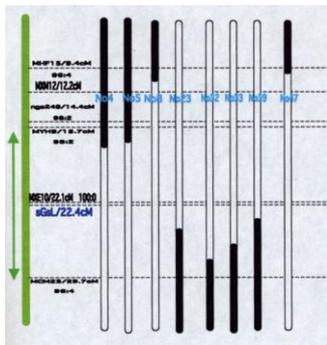


図7 *hsi20* 変異の詳細マッピング

マッピングの結果が、sGsL 導入遺伝子極近傍にあることは、各遺伝子マーカーを用いて決定した遺伝子型の分離比の解釈を難しくした。なぜなら本実験では、外部から導入した sGsL 遺伝子の発現誘導の状態を形質として調べているので、マッピングの対象となる植物体は必ず sGsL 遺伝子を少なくともヘテロの状態で保持しているからである。そこで、全ゲノム領域をカバーする数多くのマーカーを用いて、この変異の原因遺伝子が存在する可能性を調べたが、いずれも変異と連鎖が見られていない。

*hsi20* が遺伝学的に劣性であること、また塩に対する高感受性という性質を持つことから、あまり可能性も高いとは言えないが、導入した融合遺伝子のプロモーター領域の塩基配列に変異が起きていることも考えられた。そこで、*hsi20* のゲノム DNA について、sGsL の *GUS* 上流のプロモーター領域および *LUC* 上流のプロモーター領域それぞれを PCR で増幅し、その塩基配列の決定を行ったが、いずれのプロモーター配列もオリジナル遺伝子の配列と同じであった。

*hsi13* 変異株についてもマッピングを進めたところ、*hsi20* と同じく染色体 5 番上腕に位置することを示す結果が得られたので、*hsi20* と *hsi13* を掛け合わせて相補テストを行った。これらの変異株の間では相補は見られなかったことから、*hsi20* と *hsi13* はアリルであることが判明した。*hsi20* と *hsi13* はスクリーニングの際に、全く別の種子のグループから単離されているので、それぞれ独立の変異株と考えられる。この *hsi13* についても sGsL 領域のプロモーター配列を調べたが、どちらもオリジナル配列と同じであった。*hsi20* と *hsi13* が対立遺伝子であったことにより、今後のマッピングおよびその原因遺伝子の特定がより容易になったと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森上 敦 (MORIKAMI ATSUSHI)

名城大学・農学部・教授

研究者番号: 10211608

##### (2) 研究分担者

なし