

氏名	大西 誠		
学位（専攻分野）	博士（理学）		
学位記番号	総研大甲第 873 号		
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	生命科学研究科 分子生物機構論専攻 学位規則第 6 条第 1 項該当		
学位論文題目	アサガオ花卉の液胞に存在する InNHX および InVP24 の 発現とアントシアニンの呈色		
論文審査員	主査	教授	西村 幹夫
		教授	飯田 滋
		教授	大隅 良典
		教授	前島 正義（名古屋大学）

## 論文内容の要旨

アサガオの花弁の色は、2 次代謝産物であるアントシアニンに主に由来し、アントシアニンは細胞質基質で合成され、液胞内へ輸送されて蓄積するので、その呈色は液胞内の環境および液胞内のアントシアニンの形態に左右される。著者は本論文で、 $H^+$ を液胞から排出することにより液胞内の pH を変化させる液胞膜型  $Na^+/H^+$ アンチポーターである NHX および、アントシアニンの凝集体であるアントシアノプラストに多量に含まれる蛋白質である VP24 について解析を行った。

野生型アサガオの花弁の色が開花直前の数時間に赤紫色から青色に変化する現象は、アントシアニンの呈色が液胞内の pH の上昇により変化することに由来し、液胞膜型  $Na^+/H^+$ アンチポーターである *InNHX1* が深く関与することが易変性変異系統を用いた実験により示されている。アサガオの *InNHX1* 遺伝子は、開花約 12 時間前の花弁で転写産物が著しく蓄積する一方、根・茎・葉では蓄積量が少なく、さらに NaCl 処理によって転写が誘導されないという他の植物で同定された *NHX* 遺伝子とは異なる特徴を持つ。しかし、*InNHX1* の同定に用いた *purple-mutable* 系統においても、開花時に花弁搾汁液の pH が上昇し、花弁の色が赤紫色から紫色に変化するので、*InNHX1* 以外にも開花時に花弁の pH を上昇させる遺伝子が存在すると予想されていた。今回、アサガオの花の cDNA ライブラリーから新たに *InNHX* 遺伝子のクローンが得られたので *InNHX2* と名付け、解析を行った。

また、アントシアニンの形態も呈色に影響し、その一例としてアントシアノプラストが挙げられる。アントシアノプラストは、水溶性のアントシアニンが液胞内で凝集してできる構造物であり、アントシアノプラストが存在するアサガオの花弁の色にはくすみが生じる。アントシアノプラストに大量に含まれる蛋白質については、VP24 についてのみ解析されている。VP24 は、サツマイモの培養細胞から最初に単離され、アミノペプチダーゼ活性を持つ。しかし、アミノペプチダーゼはアントシアニンを分解しないと考えられ、さらにアントシアニンを生産しない生物にも VP24 と相同性の高い蛋白質が存在することから、VP24 とアントシアノプラストの関係は不明である。サツマイモと同じヒルガオ科に属するアサガオの花の cDNA ライブラリーから *VP24* cDNA と思われるクローンが同定されたので *InVP24* と名付け、解析を行った。

本研究では、*InNHX* については 5 種類の実験を行った。第 1 に、*InNHX2* cDNA から推定されるアミノ酸配列およびゲノム配列を解析した結果、*InNHX2* は、*InNHX1* および *AtNHX1* とアミノ酸配列が約 70%一致し、*InNHX2* 遺伝子は *InNHX1* と同様に 15 エキソンを持ち、第 1 イントロン以外の位置が同一であった。第 2 に、*InNHX2* が  $Na^+$ ,  $K^+$ を輸送することが、酵母菌の *Δnhx1* 変異体を用いた相補性検定により示された。第 3 に、*InNHX* の発現をノーザンブロットにより解析した結果、*InNHX2* は、根・茎・葉・花で一様に発現していたが、開花時の花弁のリムで mRNA が最も多く蓄積していた。さらに、実生への NaCl 処理により *InNHX2* の転写が誘導されることも確認された。*InNHX1* については、ウェスタンブロットにより開花時における翻訳産物の増減を調査した結果、完全に開花した時点で翻訳産物が最も多く蓄積していた。第 4 に、花弁を用いた *in-situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、*InNHX1* は花弁表皮細胞で比較的多く発現していたのに対し、*InNHX2* の発現に偏りは見られなかった。さらに、タマネギ表皮細胞で発現させた *InNHX-GFP* 融合蛋白質の蛍光は、*InNHX1*, *InNHX2* とも液胞膜で観察された。第 5 に、*InNHX* の発現により液胞内の Na および K 含量が上昇すると考えられるので、開花前

後の花卉のリムおよび筒における Na および K 含量を放射化分析により測定した。その結果、リムでは、Na 吸収量の増加割合が、新鮮重の増加を上回ったのに対して、開花前後における K 吸収量の増加割合は新鮮重の増加割合を下回った。

以上の結果から、*InNHX2* 遺伝子は 2 種類の機能を持つ点において、第 1 に塩ストレス処理により転写が誘導される点、第 2 に *InNHX1* が機能していない系統の赤紫色の花弁を紫色に変える程度に、花弁の青色化に関係する遺伝子群の一つであると考えられる点において、これまでにはない型の *NHX* 遺伝子であることが示された。*InNHX1* は、開花時に活発に発現することが翻訳レベルで裏付けられ、花弁のとくにリム表皮細胞の液胞膜において、組織特異的に発現することが強く示唆された。

*InVP24* については、2 種類の実験を行った。第 1 に、*InVP24* cDNA から予想されるアミノ酸配列をサツマイモの *IbVP24* と比較した結果、約 80% のアミノ酸配列が一致した。遺伝子構造を明らかにするためにゲノミッククローンを同定した結果、*InVP24* は 13 エキソンから構成されることが示された。また、*VP24* と相同性の高いゲノミッククローンが 3 コピー同定され、そのうちの 2 コピーは縦列重複であったが、アサガオの花の cDNA ライブラリーからは、1 コピーの *VP24* cDNA しか同定されなかった。第 2 に、*InVP24* の発現をノーザンブロットにより解析した結果、開花 9 時間前の萼および筒における mRNA の蓄積量は、それぞれリムの 10 倍以上、約 0.6 倍であった。雌しべ・成熟した葉・若い茎・若い根ではリムよりも *InVP24* の発現が多かった。開花時のリムでは開花 36 時間前に *InVP24* mRNA の蓄積量が最も多く、筒では、開花 21 時間前に蓄積量が最も多かった。

以上の結果から、クローン化された 3 コピーの *InVP24* 遺伝子のうち、花では 1 コピーが強く発現し、その発現は、開花 36 時間以上前のリムで最も強いと予想される。また、*VP24* のアミノペプチダーゼ活性は、萼・雌しべ・成熟した葉・若い茎・若い根においてアントシアニン・アントシアノプラストに関係のない何らかの役割を果たしている可能性がある。

アサガオ花卉細胞の液胞内に存在するアントシアニンの呈色は、液胞内の環境およびアントシアニンの形態の影響を受け、*InNHX2* 遺伝子の発現は、*InNHX1* と同様に液胞内の pH の上昇に伴うアントシアニンの青色化に寄与すると考えられる。また、アサガオの花弁の色にくすみを生じさせる構造体であるアントシアノプラストは、*VP24* を主要な蛋白質の一つに含み、花弁のリムにおける *VP24* の発現は、開花 36 時間以上前に最も強いと予想される。

アサガオの花が開花直前の数時間に赤紫色の蕾から明るい青色の開いた花に変化する現象は、花色を司る色素アントシアニンが蓄積する花弁表層細胞の液胞内の pH が上昇するためであり、この pH の上昇には液胞膜型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーターである *InNHX1* タンパクが深く関与していることは、この *InNHX1* 遺伝子の機能が欠損した変異体では、赤紫色の蕾が開花しても花弁は紫色にしかならず、花弁表層細胞の液胞内の pH も青色花を咲かせる野生型の約半分程度しか上昇しないことから明らかである。また、高等植物の液胞膜型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーター遺伝子は一般には根・茎・葉など種々の組織で発現し、NaCl 処理によって発現が誘導され、植物に耐塩性を賦与する機構の一翼を担っていると考えられているが、アサガオの *InNHX1* 遺伝子は根・茎・葉ではほとんど発現せず、開花約 12 時間前の花弁で mRNA が著しく蓄積する一方、NaCl 処理による発現誘導は観察されないという他の植物の *NHX* 遺伝子とは異なる特徴を持っている。また、時にアントシアニン色素を蓄積している植物細胞の液胞中に見出されるアントシアニン色素を含む液胞内凝集物で、色調に影響を与えられているアントシアノプラスト中の主要タンパク構成成分として知られている VP24 をコードする遺伝子の発現は、サツマイモのアントシアニン色素を生合成して蓄積する培養細胞でよく解析されている。アサガオの花色がくすんだ色調になる変異体の中には花弁液胞中にアントシアノプラストが蓄積する変異体も見出されているので、アサガオでも VP24 をコードする遺伝子は発現していると考えられている。

申請者は、アサガオの蕾で発現する遺伝子の cDNA ライブラリー中から、新規の液胞膜型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーターをコードしていると考えられるクローンを分離同定して *InNHX2* と名付けた。さらに、この *InNHX2* cDNA およびゲノム遺伝子の構造を解析し、さらに予測される液胞膜型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーターを機能解析が進んでいる 17 の高等植物の cDNA から予測される液胞膜型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーターと比較したところ、ペチュニアやトレニアなどの蕾から分離された *NHX* cDNA がコードする  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーターと系統樹上近縁であり、一方でアサガオの *InNHX1* 遺伝子は開花時に花弁液胞の pH 上昇に係ると考えられるソライロアサガオの *NHX* 遺伝子以外は近縁関係にはないことを見出した。さらに、アサガオの *InNHX1* および *InNHX2* は、共に液胞に局在し、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーター活性ばかりでなく  $\text{K}^+/\text{H}^+$  アンチポーター活性もあると思われる結果を得た。次いで、両遺伝子の発現様式を詳細に解析して、*InNHX1* 遺伝子は開花時に花弁表層細胞で大量に発現し、花色を青色化させる主要なアンチポーター遺伝子であるのに対して、*InNHX2* 遺伝子は花以外の諸器官でも発現して耐塩性の賦与に係るとともに、開花時に発現が上昇し、*InNHX1* 遺伝子欠損変異体の花弁液胞の pH を上げて赤紫色の蕾が開花すると紫色化する過程にも係ると考えられる新規の *NHX* 遺伝子であると結論した。

また、申請者は、蕾で発現する遺伝子の cDNA ライブラリー中からアサガオの VP24 をコードしていると考えられる遺伝子の cDNA クローンを分離同定して cDNA とゲノム遺伝子の構造を解析し、アサガオゲノム上に見出された 3 コピーの *InVP24* 遺伝子中の 2 コピーは終止コドンをもつ偽遺伝子であり、残りの 1 コピーだけが得られた cDNA に対応する活性な *InVP24* 遺伝子であることを明らかにした。さらに、発現様式を解析して、*InVP24* 遺伝子はアントシアニン色素が顕著に生合成してはいない諸組織でも発現しており、特に萼片で顕著な発現が観察されるなど予想外の結果も得られ、*InVP24* 遺伝子の機能に新たな問題を提起した。

本研究は花色に係ると考えられるアサガオの *InNHX1*、*InNHX2* および *InVP24* 遺伝子の構造と発現様式および機能を論じたもので、審査委員会は学位論文として十分な内容をもつと判定した。