

氏 名 田 坂 恭 嗣

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大乙第53号

学位授与の日付 平成10年3月24日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目 高等植物およびラン藻の低温耐性における不飽和膜脂質の役割

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 西村 幹夫
教 授 村田 紀夫
教 授 飯田 滋
助 教 授 渡辺 正勝

論文内容の要旨

低温は植物の生育限界を規定する大きな要因の1つである。植物は低温に曝されると、膜脂質の脂肪酸に不飽和結合を導入し、低温での生体膜の流動性の低下を補償する。これまで植物の低温感受性と不飽和膜脂質との関連を示す研究は多くなされてきたが、低温耐性における不飽和膜脂質の役割を直接的に解明した研究は行われていない。

本研究は、植物の低温傷害の機構と、低温に対する植物の応答機構を生理・生化学的、あるいは分子生物学的に解明し、低温耐性の機構を解明することを目指して進められた。

本論文は次の6章から構成されている。

第1章：緒言 本研究を遂行する目的と意義を述べた。

第2章：研究の背景 “植物の低温傷害の原因は膜脂質の相転移である”とする Lyons-Raison仮説に言及し、低温傷害に関わると推測されている葉緑体膜の機能、原因物質[フォスファチジルグリセロール (PG) の飽和およびトランス-モノ不飽和分子種]の生合成の経路と脂肪酸デサチュラーゼの種類と特徴についてまとめた。後半では、PGの分子種組成を改変した形質転換タバコを用いて行われた低温傷害のメカニズムの解明に関する研究の結果を紹介した。そして植物のモデル系として、ラン藻を用いて明らかになった低温適応の機構に関する既知の研究成果を紹介した。

第3章：大本植物の低温感受性とフォスファチジルグリセロールの脂肪酸組成の関連 植物の低温傷害の原因物質を明らかにするために、大本植物の低温感受性と膜脂質の脂肪酸組成との関連を調べた。対象とした植物は温帯性常緑樹を9種類、熱帯性常緑樹を7種類、そして温帯性落葉樹から7種類である。その結果、これらの大本植物グループのPGに含まれる飽和脂肪酸[パルミチン酸 (16:0)、ステアリン酸 (18:0)]、およびトランス-モノ不飽和脂肪酸[トランス-3-ヘキサデセン酸 (16:1 (3t))]の合計が占める割合は、それぞれ55~62%、67~75%、そして58~72%であった。これらの結果から、大本植物の低温感受性とPGの脂肪酸の飽和分子とトランス型の不飽和結合をした分子の占める割合との間に相関関係がある事が示された。

第4章：シロイヌナズナの葉緑体局在グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼの遺伝子とcDNAの構造 植物のPGの分子種組成は葉緑体局在グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT) の脂肪酸に対する基質特異性により決定されている。基質特異性の異なるGPATをタバコに導入してPGの分子種組成を改変させ、植物の低温感受性とPGの分子種組成との関連を直接証明するために、本研究では低温耐性植物であるシロイヌナズナからGPATのゲノム遺伝子 (ATS1) とcDNAをクローニングした。ATS1遺伝子を解析した結果、mRNA前駆体の長さは3288bpで、5'側と3'側にそれぞれ57bp、422bpの非翻訳領域を含んでいた。遺伝子の読み枠1377bpは、11個のイントロン (1412bp) で分断され、さらに、94bpからなるもう1つのイントロンが3'側の非翻訳領域に含まれていた。読み枠には、459残基のポリペプチドがコードされており、このアミノ酸配列は、カボチャとエンドウから単離された葉緑体局在性のグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼに対して、高い相同性を示した。

後の研究において、得られたcDNAをタバコに導入し、PGの分子種組成を改変した

形質転換タバコが低温に耐性になった事が証明された [Murata, N., Isizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y. and Nishida, I. (1992) Nature, 356, 710-713]。

第5章：アシル脂質デサチュラーゼの遺伝子をノックアウトしたラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803株の変異株の作製とその低温感受性 植物の低温耐性機構における不飽和膜脂質の役割を明らかにするためには、生育温度とは独立に膜脂質の不飽和結合の数を調節する事が出来る実験系の確立が必須である。そこで本研究では、植物のモデル生物として形質転換型ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803株を用い、デサチュラーゼ遺伝子の *desA*、*desB*、*desD*の遺伝子に抗生物質耐性遺伝子カートリッジを挿入して破壊することによって、これらに対応する $\Delta 12$ 、 $\omega 3$ 、 $\Delta 6$ アシル脂質デサチュラーゼの活性を完全に欠いた変異株を作成することに成功した。デサチュラーゼ遺伝子を特異的に破壊することにより、膜脂質に含まれるC 18脂肪酸の不飽和結合の数を1つ、2つ、3つ、4つと操作し、膜脂質に特定の脂肪酸のみを含む変異株のシリーズを作成することができた。こうして作成した変異株を用いて、低温耐性に関する生理学的解析を行った結果、ラン藻の低温下での生育にはジ不飽和脂質が必須であることが明らかになった。示差走査カロリメトリー (DSC) を用いた熱量分析の結果、ジ不飽和脂質にはチラコイド膜の相転移温度を低下させる働きがある事が証明された。

第6章：総合考察 全体の考察として各研究の現状と位置づけ、そして今後の展望について記述した。

論文の審査結果の要旨

低温は植物の生育限界を規定する大きな要因の1つである。本研究の目的は、植物の低温傷害の機構と低温に対する植物の応答機構を、生理・生化学的、並びに分子生物学的に解明し、低温耐性の分子機構を解明することである。本論文は次の6章から構成されている。

第1章：緒言 本研究を遂行する目的と意義を記述している。

第2章：研究の背景 植物の低温傷害の原因に関わると推測されている葉緑体膜の脂質、フォスファチジルグリセロール(PG)の飽和分子種の生合成の経路と脂肪酸デサチュラーゼの種類と特徴についてまとめている。

第3章：大本植物の低温感受性とフォスファチジルグリセロールの脂肪酸組成の関連 植物の低温傷害の原因物質を明らかにするために、大本植物の低温感受性と膜脂質の脂肪酸組成との関連を調べた。実験結果から、大本植物の低温感受性とPGの飽和分子種の占める割合との間に相関関係がある事が示され、PGの飽和分子種と低温感受性との間の相関関係が大本植物でも成り立つことを明らかにした。

第4章：シロイヌナズナの葉緑体局在グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼの遺伝子とcDNAの構造 植物のPGの分子種組成を決定する葉緑体局在グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼのゲノム遺伝子とcDNAを低温耐性植物であるシロイヌナズナからクローニングした。この研究の成果は、タバコの形質転換系を用いる研究に発展した。

第5章：アシル脂質デサチュラーゼの遺伝子をノックアウトしたラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803株の変異株の作製とその低温感受性 植物の低温耐性機構における不飽和膜脂質の役割を明らかにするために、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 株のデサチュラーゼ遺伝子 *desA*、*desB*、*desC*、*desD*を挿入破壊した。これにより、膜脂質に特定の脂肪酸のみを含む変異株のシリーズを作製した。こうして作製した変異株を比較することにより、ラン藻の低温下での生育には多価不飽和脂質が必須であることを明らかにした。

第6章：総合考察 全体の考察として各研究の現状と位置づけ、そして今後の展望について記述している。

以上のように、申請者の研究の内容は、植物の低温耐性と膜脂質の不飽和脂肪酸との関係を形質転換系を用いて明確に示したものであり、博士論文にふさわしいものと判断し、合格と判定した。

また、専門分野およびその基礎となる分野に関して審査した。博士論文の内容に関する討論において十分な学力を示した。また受託研究員として3年、特別協力研究員として4年の研究歴があることから判断しても、十分な学力を有するものと判断した。

さらに、英語能力に関して審査した。既に数篇の英語原著論文を公表していることから、十分な英語能力を備えているものと判断した。