

氏 名(本籍)	すず 鈴 木 雄 二
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 698 号
学位授与年月日	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)
学位論文題目	イネ葉の一生における ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase のターンオーバーと <i>rbcL</i> mRNA および <i>rbcS</i> mRNA の量的変動の関係
論文審査委員	(主 査) 教 授 前 忠 彦 教 授 山 谷 知 行 教 授 西 尾 剛

論文内容要旨

序論

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco; EC 4. 1. 1. 39) は光合成における CO₂ 固定および光呼吸の初発反応を担う 2 つの機能を有する酵素であり、その葉における量は光飽和、現在の大气 CO₂ 分圧下での光合成速度を律速する因子となっている。また、Rubisco は C₃ 植物の成熟葉において全窒素の 15-30% を占める最も多量なタンパク質であり、葉の老化に伴うその分解物は個体内の生長部位で再利用される窒素の重要な供給源である。したがって、葉における Rubisco の量的変動は植物における炭素経済および窒素経済に直接的な影響を与える。

葉における Rubisco の量はその生成と分解により決定されると考えられているが、葉の一生における生成と分解の実態とそれを支配する分子的基盤については意外なほど知られていない。Rubisco は葉緑体 DNA にコードされている大サブユニット (*rbcL*) と核 DNA にコードされている小サブユニット (*rbcS*) それぞれ 8 個ずつからなる 16 量体である。アマランス (Nikolau and Klessig 1987) やインゲン (Bate et al. 1991) においては、これらのサブユニットの生成が葉の老化に伴い低下するが、その原因は *rbcL* mRNA および *rbcS* mRNA の量的減少やこれらの翻訳レベルでの制御であることが示唆されている。しかし、これらの研究例において Rubisco 量の変動はその生成量と分解量に分けて調べられてはいない。一方、イネにおいては葉の完全展開以降の老化過程において Rubisco の分解量が生成量をはるかに上回るようになることが示されているが (Mae et al. 1983; Makino et al. 1984)、Rubisco の生成と *rbcL* mRNA および *rbcS* mRNA の量的関係は調べられていない。このように、Rubisco の生成および分解の量的変動と *rbcL* mRNA および *rbcS* mRNA の量的変動とを同時に調べ相互比較している研究例は今までになく、老化葉における Rubisco の量的変動はこれらの因子からどのように説明されるかは未だに明らかではない。

そこで本博士論文研究は、イネ葉の一生の中でも特に老化過程に注目し、Rubisco の量的変動を遺伝子の転写産物、タンパク質の生成および分解のレベルから明らかにすることを目的とした。始めに、この目的に合致した実験手法 (total RNA および total DNA の抽出法) の確立を試みた。次いで、イネ葉の一生を通じて Rubisco の生成と分解を ¹⁵N を用いたラベルトレーサー実験で調べ、更に Rubisco 生成と Rubisco の大小のサブユニットをコードする mRNA との間の量的関係を調べた。また、ダイズやタバコの葉の老化過程では葉緑体 DNA 量の減少に起因する *rbcL* DNA 量の減少が *rbcL* mRNA 量を限定する要因になることが示唆されているので (Jiang et al. 1993; Jiang and Rodermeil 1995; Miller et al. 2000)、イネ葉においてもこれらの点について定量性を検討した上で調べた。

第 1 章 イネ葉の total RNA 含量および total DNA 含量測定のための RNA および DNA の抽出法の確立

葉の一生を通じて Rubisco 生成と *rbcL* mRNA および *rbcS* mRNA、また、*rbcL* mRNA と *rbcL* DNA の間の量的関係を正確に評価するためには、これらを葉の新鮮重などの単位組織量あ

たりで表し相互比較する必要がある。このためには、異なる葉齢の葉の total RNA 含量や total DNA 含量を測定することが必要となる。しかし、一般的に用いられている RNA 抽出法であるグアニジン酸と水飽和フェノール、クロロホルムおよびイソアミルアルコールの混和物を用いる方法 (AGPC 法; Chomczynski and Sacchi 1987) や DNA 抽出法である Zhu et al. (1993) の方法ではかなりの量の RNA および DNA が抽出後の残渣にそれぞれ残留するため、これらの方法を total RNA 含量や total DNA 含量の測定に用いることができないということが予備的な実験により明らかになった。そこで、葉に含まれる RNA および DNA の大部分が抽出可能となるように、AGPC 法および Zhu et al. (1993) の方法をそれぞれ改変することとした。

(1) RNA 抽出法の検討

材料としてイネ (*Oryza sativa* L. cv Notohikari) の葉齢の異なる葉を用いた。AGPC 法と、これをもとに ①葉を変性液に懸濁後、少量の石英砂を用い更に磨砕する ②フェノール処理の代わりに細胞壁を破壊する作用を持つ (Zhu et al. 1993) 塩化ベンジルを用いた加熱処理を行う の 2 点を改変した方法 (BC 法) を用い RNA を抽出した。抽出された RNA 量の全 RNA 量に対する割合を抽出効率と定義した。抽出効率は AGPC 法で 54-69%であったのに対し、BC 法では葉齢によらず 91-95%であった (Table 1)。また、葉の磨砕液調製の後に生じる RNA の分解や他画分への混入による損失は葉齢によらず AGPC 法で 10%前後、BC 法で 2-9%であった。BC 法を用いて抽出した RNA をホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動に供したところ、

Table 1. Comparison of the amounts of extractable RNA and residual RNA and extraction efficiency between the BC method and the AGPC method in rice leaves at different ages

Data are means \pm SE (n = 3).

Leaves	Method	Extractable RNA	Residual RNA	Extraction efficiency
		($\mu\text{g g}^{-1}\text{FW}$) (A)	($\mu\text{g g}^{-1}\text{FW}$) (B)	(%) (A/(A + B) \times 100)
Expanding	BC	1700 \pm 147	99 \pm 24	94.5 \pm 1.1
	AGPC	1240 \pm 150	573 \pm 180	68.8 \pm 4.1
Mature	BC	1217 \pm 67	77 \pm 12	94.0 \pm 1.1
	AGPC	861 \pm 38	408 \pm 2	67.8 \pm 1.1
Senescing	BC	789 \pm 21	82 \pm 18	90.6 \pm 1.7
	AGPC	481 \pm 44	405 \pm 4	54.2 \pm 2.5

25S および 17S rRNA のバンドが認められた。更に、DIG ラベルを行ったイネ *rbcS* cDNA フラグメントをプローブとしてノーザンブロット解析を行ったところ単一のシグナルが検出された。以上から、この改変法によりイネ葉に含まれる約 9 割の RNA が葉齢によらず抽出され、それらはノーザンブロット解析に用いることができる質を保っていることが示唆された。

(2) DNA 抽出法の検討

材料としてイネ (*Oryza sativa* L. cv Notohikari) の葉齢の異なる葉を用いた。塩化ベンジルを用いた従来法 (Zhu et al. 1993) と、これをもとに ①葉を変性液に懸濁後、少量の石英砂を用い更に磨砕する ②塩化ベンジルを用いた加熱処理を 2 回繰り返し行う の 2 点を改変した方法を用い DNA を抽出した。抽出効率は従来法では著しく低く 40%前後であったのに対し、改変法では葉齢によらず 80%前後になった (Table 2)。また、葉の磨砕液調製の後に生じる

DNA の分解や他画分への混入による損失は、従来法および改変法ともに葉齢によらず 10%程度であった。改変法を用いて抽出した DNA を *EcoRI* で消化した後、DIG ラベルを行ったイネ *rbcS* cDNA フラグメントをプローブとしてサザン

プロット解析を行ったところ単一のシグナルが検出された。以上から、この改変法によりイネ葉に含まれる約 8 割の DNA が葉齢によらず抽出され、それらはサザンプロット解析に用いることができる質を保っていることが示唆された。

(3) 結論

以上の結果から、BC 法および DNA 抽出の改変法を用いることで異なる葉齢のイネ葉身における total RNA 含量および total DNA 含量を測定できると判断された。このことから、Rubisco の大小のサブユニットをコードする mRNA および DNA テンプレートの量を単位組織量当たりで表すことができるようになり、mRNA と Rubisco タンパク質の生成や DNA テンプレートとの間の量的関係を正確に評価することが可能となった。

第 2 章 イネ葉の一生における Rubisco のターンオーバーと *rbcL* mRNA および *rbcS* mRNA の量的変動の関係

(1) イネ第 8 葉身の一生を通じての解析

本研究の目的に合致する RNA および DNA の抽出法がそれぞれ確立されたため、次にイネ (*Oryza sativa* L. cv Notohikari) 第 8 葉身の一生における Rubisco の生成と分解、および *rbcL* mRNA と *rbcS* mRNA の量的変動とそれらの関係を経時的に調べた。また、*rbcL* mRNA の量的制御に関与する可能性がある *rbcL* DNA と、核 DNA にコードされている *rbcS* DNA の量的変動も同時に調べた。各パラメーターは第 8 葉身 1 枚当たりで表した。

まず、葉齢の指標として第 8 葉身の長さ、新鮮重、全窒素量、および chlorophyll 量を調べた (Fig. 1)。第 8 葉身は播種後 42 日後に出葉した。葉身の長さや新鮮重は展開に伴い増加し、出葉後 13 日目に最大となり (完全展開)、以降は一定であった。Chlorophyll 量および全窒素量はともに葉の展開に伴い急激に増加し完全展開時に最大となり、以降は徐々に減少した。

Table 2. Comparison of the amount of extractable DNA and extraction efficiency between the improved method and the conventional method of Zhu et al. (1993) in rice leaves at different ages

Data are means \pm SE (n = 3).

Leaves	Total DNA ($\mu\text{g g}^{-1}\text{FW}$) (A)	Extractable DNA ($\mu\text{g g}^{-1}\text{FW}$) (B)		Extraction efficiency (%) (B/A \times 100)	
		Improved	Conventional	Improved	Conventional
Expanding	429 \pm 14	349 \pm 7	180 \pm 8	81.4 \pm 3.3	41.9 \pm 0.1
Mature	355 \pm 6	277 \pm 2	152 \pm 22	78.1 \pm 0.1	42.9 \pm 5.6
Senescing	339 \pm 16	296 \pm 22	128 \pm 8	79.3 \pm 3.7	37.2 \pm 0.1

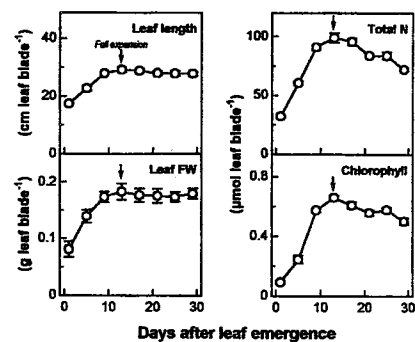


Fig. 1. Changes in length and fresh weight of the 8th leaf blades of rice, and changes in their amounts of total N and chlorophyll from emergence to senescence.

次に、Rubisco 量、および Rubisco の生成量と分解量の変動を調べた (Fig. 2)。Rubisco 量は葉の展開に伴い急激に増加し完全展開時付近に最大となった後、徐々に減少した。Rubisco の生成と分解の量的変動は ^{15}N を用いたトレーサー実験により調べた。第 8 葉が出葉してから 4 日間通常の水耕液の代わりに $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含む水耕液をイネに与えることで ^{15}N ラベルを行った。Rubisco の ^{15}N atom% excess 値はラベル直後に最大となり、以降は葉齢の進行とともに徐々に減少した。これらの結果から、Rubisco の生成量および分解量を算出した。Rubisco の生成は葉の展開中において著しく活発であったが、完全展開直前には既に著しく低下し、それ以降は更に低下した。これに対し、Rubisco の分解は完全展開の直前に始まり完全展開直後に最も著しく、その後は徐々に低下した。Rubisco の分解量は老化過程を通じて生成量をはるかに上回った。

Total RNA 量は葉の展開に伴い増加し、葉長が最大時の 75% に達した頃に最大となった後、徐々に減少した (Fig. 3)。一方、total DNA 量は葉の展開に伴い完全展開時まで緩やかに増加した後、老化過程において若干減少する傾向にあった。*rbcL* mRNA および *rbcS* mRNA の量は葉の展開に伴い急激に増加し、葉長が最大時の 75% に達した頃に最大となった後に急激に減少した (Fig. 4)。これらの量は完全展開時には既に著しく低くなっており、老化過程において更に減少した。これらの mRNA の量的変動は葉の一生を通し Rubisco 生成の量的変動 (Fig. 2) とおおむね一致した。*rbcL* DNA 量は葉の展開に伴い徐々に増加し、完全展開直前に最大となった後に徐々に減少した。一方、*rbcS* DNA 量は葉の展開に伴い徐々に増加した後、ほぼ一定に保たれていた。*rbcL* DNA 量の葉の老化に伴う減少は *rbcL* mRNA 量の減少より遅れて生じ、ゆっくりとした速度で行った。

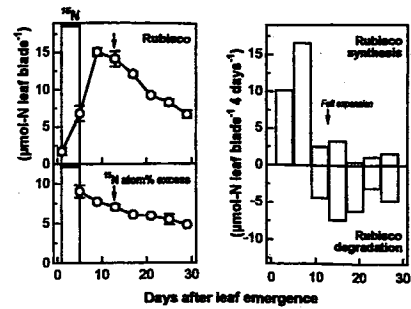


Fig. 2. Changes in the amount of Rubisco, its ^{15}N abundance and its synthesis and degradation in the 8th leaf blades of rice from emergence to senescence.

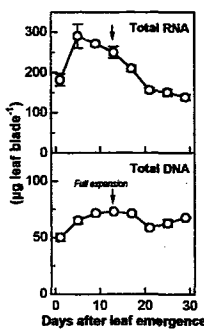


Fig. 3. Changes in the amounts of total RNA and total DNA in the 8th leaf blades of rice from emergence to senescence.

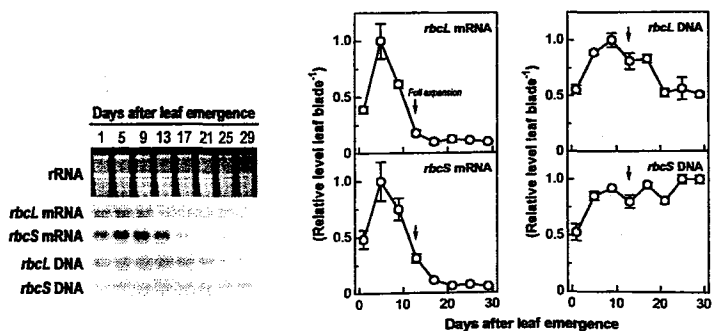


Fig. 4. Changes in the relative levels of *rbcL* and *rbcS* mRNAs and *rbcL* and *rbcS* DNAs in the 8th leaf blades of rice from emergence to senescence.

(2) 異なる葉位の葉についての解析

次に、第 8 葉身の一生において認められた Rubisco 生成と *rbcL* mRNA および *rbcS* mRNA、

また、*rbcL* mRNA と *rbcL* DNA との間の量的関係が、主稈の葉位の違う葉身の間においても同様に認められるかを調べた。サンプルとして、展開中の第 8 葉身、最上位完全展開葉である第 7 葉身、および第 5 葉身をそれぞれ成熟前の葉身、成熟した葉身および少し老化した葉身として選んだ。各パラメーターは単位葉新鮮重当たりで表した。

Rubisco 量は第 8 葉身および第 7 葉身でほぼ同じであり、第 5 葉身ではこれらの約 50% であった (Fig. 5)。Rubisco の生成量は、サンプリング直前の 2 日間に通常の水耕液の代わりに $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含む水耕液をイネに与え、 ^{15}N の Rubisco への取り込み量から算出した。Rubisco の生成量は第 8 葉身で最大であり、第 7 葉身および第 5 葉身では著しく少なかった。この結果は、成熟葉や老化中の葉では Rubisco の生成量が著しく少なかったという点で第 8 葉身の一生について得られた結果と同様であった。

Total RNA 量は第 8 葉身で最大であり、第 5 葉身で最小であった (Fig. 6)。また、total DNA 量は第 8 葉身および第 7 葉身でほぼ同じであり、第 5 葉身でこれらより若干少なかった。*rbcL* mRNA および *rbcS* mRNA の量は第 8 葉身で最大となり、第 7 葉身および第 5 葉身で著しく少なかった (Fig. 7)。葉位間でのこれらの mRNA 量の差異は Rubisco の生成量の差異とほぼ一致しており、第 8 葉身の一生について得られた結果と一致した。*rbcL* DNA 量は第 8 葉身および第 7 葉身でほぼ同じであり、これらの葉身に比べ第 5 葉身においては有意に少なかったが、葉位間での *rbcL* DNA 量の差異は *rbcL* mRNA 量の差異よりもはるかに小さく、第 8 葉身の老化過程について得られた結果と一致した。

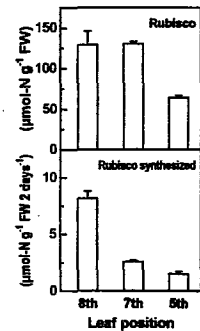


Fig. 5. The amount of Rubisco and its synthesis in the 8th, 7th and 5th leaf blades at nine days after emergence of the 8th leaf blades.

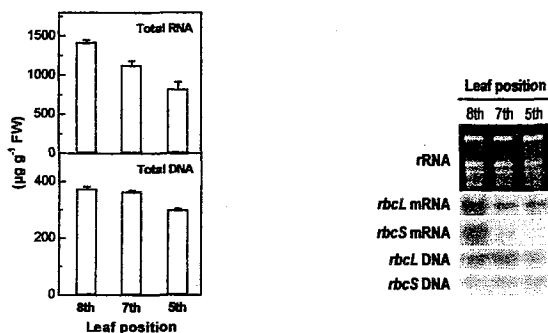


Fig. 6. The amounts of total RNA and total DNA in the 8th, 7th and 5th leaf blades at nine days after emergence of the 8th leaf blades.

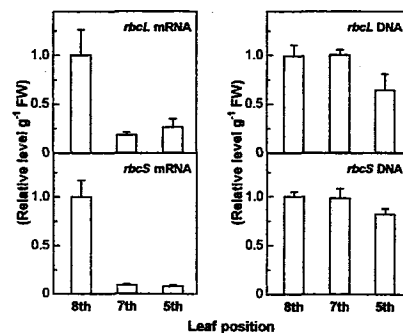


Fig. 7. The relative levels of *rbcL* and *rbcS* mRNAs and *rbcL* and *rbcS* DNAs in the 8th, 7th and 5th leaf blades at nine days after emergence of the 8th leaf blades.

(3) 結論

イネ葉の一生における Rubisco 生成の量的変動は *rbcL* mRNA および *rbcS* mRNA の量的変動と互いにおおむね一致していた (Fig. 2, 4, 5, 7)。したがって、イネにおいては Rubisco 生成の量的変動は葉の展開過程ばかりでなく老化過程においてもこれらの mRNA の量的変

動により主に説明されることが示唆された。しかし、葉の完全展開時以降の老化過程においては Rubisco の生成量やこれらの mRNA 量は展開中に比べ著しく低く、Rubisco の分解量がこれらをはるかに上回っていた (Fig. 2)。このことから、イネ葉の老化過程においては Rubisco の生成が Rubisco の量的変動に及ぼす影響はきわめて小さく、Rubisco の分解が Rubisco の量的変動の主要な支配因子となることが明らかになった。また、*rbcL* DNA と *rbcL* mRNA の量的変動のパターンは葉の一生を通じて互いに大きく異なっていたため (Fig. 4, 7)、イネ葉の老化過程においては *rbcL* DNA 量は *rbcL* mRNA 量の主要な決定因子ではないことが示唆された。

特定のタンパク質の生成と分解、およびそのタンパク質をコードする転写産物の量的変動を植物葉の一生を通じて同時に調べ、これらの関係からそのタンパク質の量的変動を論じたのは本研究が初めてである。

摘要

- ①異なる葉齢のイネ葉身において total RNA 含量および total DNA 含量を測定するために用いることができる RNA および DNA の抽出法をそれぞれ確立した。これらの手法を用いることで、Rubisco の大小のサブユニットをコードする mRNA および DNA テンプレートの量を単位組織量当たりで表すことができるようになり、mRNA と Rubisco タンパク質の生成や DNA テンプレートとの間の量的関係を正確に評価することが可能となった。
- ②Rubisco の生成はイネ葉の完全展開時までにはほぼ終了しており、老化過程においてはわずかに行われるだけであった。このような Rubisco 生成の量的変動は Rubisco の大小サブユニットをコードする mRNA の量的変動により主に説明されることが示唆された。
- ③Rubisco の分解量はイネ葉の完全展開時以降の老化過程においてその生成量をはるかに上回っていたため、この間の Rubisco の量的変動を支配する主要な因子となることが明らかになった。
- ④*rbcL* DNA 量の葉の老化に伴う減少は *rbcL* mRNA 量の減少より遅れて生じ、ゆっくりとした速度で進行したため、イネ葉の老化過程において *rbcL* DNA 量は *rbcL* mRNA 量の主要な決定因子ではないことが示唆された。

原著論文

Suzuki Y, Makino A, Mae T (2001a) An efficient method for extraction of RNA from rice leaves at different ages using benzyl chloride. *Journal of Experimental Botany* 52: 1575-1579.

Suzuki Y, Makino A, Mae T (2001b) Changes in the turnover of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and levels of mRNAs of *rbcL* and *rbcS* in rice leaves from emergence to senescence. *Plant, Cell & Environment* 24: 1353-1360.

論文審査結果要旨

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) は光合成の炭酸固定ならびに光呼吸の初発反応を担う酵素であり、その量が特異的に多いことで知られている。葉の**Rubisco**量が最大光合成速度を支配すること、そして窒素経済に深くかかわっていること等から、葉の一生においてその量がいかに決定されているのかを明らかにすることは重要である。しかし、このことについては断片的な知見があるに過ぎない。

本研究はイネ葉の一生を追って**Rubisco**の大小サブユニットの**mRNA**量ならびに**Rubisco**タンパク質の生成量および分解量の変動を調べ、葉の一生の中でも特に老化過程において**Rubisco**の量がいかに決定されているのかを解析したものである。

初めに、研究目的に応じた手法の開発から以下の結果が得られた。

(1) 葉齢の異なるイネ葉において**Rubisco**の大小サブユニットの**mRNA**および**DNA**テンプレートの量を葉身1枚当たりや単位葉新鮮重当たりで評価する手法が確立された。

次に、当初の目的に従った実験から以下の結果が得られた。

(2) **Rubisco**の生成は展開中の葉において盛んであるが、完全展開直前に急激に低下し、老化葉においてはわずかに行われるのみである。このような**Rubisco**生成の変動は**Rubisco**の大小サブユニットの**mRNA**量により主に支配される。(3) 老化葉においては**Rubisco**の分解がその生成をはるかに上回る。

(4) 過去の研究例では老化葉における**Rubisco**大サブユニットの**mRNA**量の限定要因としてその**DNA**テンプレートの量が挙げられているが、その可能性は低い。

これらの結果をもとに、本論文の著者はイネ葉の老化過程において**Rubisco**の量的変動を主に支配するのはその生成に関連する因子ではなく、**Rubisco**の分解であると結論した。

葉の老化過程における**Rubisco**の量的変動を遺伝子の転写産物量およびタンパク質の生成量と分解量から明らかにしたのは本論文が世界で初めてである。よって審査員一同は、本論文の著者を博士（農学）の学位を授与するに値するものと判断した。