

氏 名(本籍)	吉 田 理 一 郎
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 5 1 7 号
学位授与年月日	平 成 8 年 3 月 26 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 (博士課程) 農 学 専 攻
学位論文題目	イネ (Oryza sativa L.) 低温クロロシスの 品種間差異に關与する要因解析
論文審査委員(主 査)	教 授 亀 谷 壽 昭 教 授 日 向 康 吉 教 授 菅 洋

# 論文内容要旨

## 第1章 序論

熱帯を起源とするイネ (*Oryza sativa* L.)は、低温に感受性を示す作物の一つとして知られており、様々なタイプの低温障害が引き起こされる。

本研究では、イネの低温障害の分子機構を解明する一つのモデルとして、イネ幼苗期に認められる低温クロロシスについて注目した。低温クロロシスは、低温により新しく形成される葉がクロロフィルを欠いた状態で抽出、展開する現象であり、その形質発現は劣性の単一核遺伝子により制御されることが知られている。また、アジアの栽培イネ内で、明確な品種間差異が認められる。この障害は、植物体の葉鞘の基部を局部的に冷却することにより誘導されることから、葉鞘内に存在する未成熟葉がその発現における感受部位であると指摘されており、また、このことから、葉の発達に伴うクロロプラスト形成が低温により阻害されることが、その発現の大きな要因であると示唆されてきた。しかし、低温がどのように作用してこの阻害を誘導するのかについて、現在、その基礎的な知見は皆無といつてよい。

筆者は、イネ低温クロロシスにおける品種間差異を決定する要因を、分子生物学的な角度から検討した。特に、色素体形成に関与する遺伝子発現が低温によりどのような影響を受けるのかについて焦点を絞った。

## 第2章 暗所で生育させた植物体を用いた実験系の開発

低温が植物体にどのように作用して障害を誘導するかを把握するためには、できるだけ単純な実験系を開発することが望ましい。野外における実験環境は、温度のみでなく光という重要な環境因子が関与するため、それだけ複雑な系にならざるを得ない。そこで、筆者は、暗所で生育させた植物体を実験系として用い、耐性、感受性の差異を検討することにした。方法としては、まず、発芽から暗所低温下で10日間育成し（第1成長過程）、その後、常温暗所下(25℃)に戻して第2葉が完全に抽出するまで育成し（第2成長過程）、その植物体に25℃、24時間の光照射を行ない（緑化過程）、クロロフィルの蓄積にどのような変化がみられるかを観察した (Fig. 1)。

第1成長過程の温度は10, 13, 15, 17, 20, 25℃とした。10, 13, 15, 17℃の温度区では10日間の生育期間の後、25℃暗所に移して第2葉が完全に抽出

した段階で、20、25℃の温度区では第2葉が完全に抽出した段階で25℃、24時間の光照射を行ない、その緑化能力を確認した。その結果、インド、ベンガル地方の在来品種で感受性品種の"Surjamukhi"(SUR)では、15および17℃で顕著に緑化能力が低下し、15℃以下の低温では逆にその低下が回避されることが明らかにされた (Fig. 2)。一方、日本水稲品種で耐性品種の奥羽195号(O-195)では、15および17℃暗所で生育させた場合でも緑化能力が保持されていた。そこで、他の感受性、耐性品種のいくつかを15℃暗所で生育させ、その緑化能力を調査したところ、その品種間差異が明確に得られた (Fig. 3)。

このことから、この実験系を用いることにより、実際に野外レベルで観察される低温クロロシスの誘導、およびその品種間差異を、実験室レベルで模倣および再現できることが確認された。また、SURとO-195との交雑後代F<sub>2</sub>を同実験系に用いたところ、クロロフィルを蓄積した個体と、蓄積しなかった個体とが、3:1に分離することが統計的に証明されたことから (Table 1)、低温クロロシスと同様、この実験系で認められた緑化能力の欠損が劣性の単一核遺伝子によって支配されることも示唆された。

### 第3章 低温クロロシスの誘導と36 kD エチオプラストタンパク質 NADPH-プロトクロロフィリド酸化還元酵素(POR)の蓄積阻害

暗所で生育させた植物体の葉では、色素体は、エチオプラストという形に分化する。エチオプラストは、光照射によりクロロプラストへと分化する。この実験系で感受性品種に認められたグリーニング能の低下から、筆者は、第1成長過程における低温が、このエチオプラストの形成を阻害したものと考えた。エチオプラストを構成するタンパク質は、クロロプラストのものとは大きく異なるが、その主要タンパク質として36 kDのNADPH-プロトクロロフィリド酸化還元酵素 (POR) が知られている。PORは、核支配の色素体タンパク質であり、エチオプラストのプロラメラポディーを構成するタンパク質の90%を占めている。また、クロロフィルの前駆物質であるプロトクロロフィリドをクロロフィリドへと変換する重要な機能を担う。これらの理由から筆者は、このPORをエチオプラスト形成のマーカーとして解析に用いることを考えた。各温度で生育させた黄化実生の第2葉から粗色素体画分を単離し、その全タンパク質をSDS-PAGEによって解析

したところ、13~17℃で生育させたSURで36 kDのタンパク質が特異的に減少していることが確認された (Fig. 4)。PORの抗体を用いてimmunoblotを行なったところ、同様な結果が得られ、15℃で生育させた場合では、対照(25℃)の約20%程度の蓄積量であった (Fig. 4,5)。また、このPORタンパク質の蓄積量の変化と第3章での緑化阻害の程度とが平行な関係にあった。これらの結果から、低温クロロシスの誘導と色素体内のPORタンパク質の低下、つまり、エチオプラストの形成阻害との間に、密接な関連性があることが示唆された。

#### 第4章 透過型電子顕微鏡による色素体内部構造の観察

低温暗所で生育させた葉の色素体、つまり、この場合、エチオプラストの内部形態にどのような変化がみられるかを、透過型電子顕微鏡により観察した。25℃暗所で生育させた植物体の第2葉を試料として用いたところ、プロラメラボディーやプロチラコイドなど、通常、エチオプラストにみられる特徴的な内部構造が、耐性、感受性品種ともに明確に確認された (Fig. 6A, E)。しかし、15℃暗所で生育させたSURの植物体では、そのような内部構造は観察されなかった (Fig. 6F)。また、光照射によるチラコイド膜の発達も認められなかった (Fig. 6H)。これらの結果から、形態的な面から、低温暗所で生育させた感受性品種の葉では、正常なエチオプラスト形成が阻害されていることが示唆された。

#### 第5章 色素体内のPOR蓄積量の低下に関する要因解析

感受性品種で認められた色素体内のPOR蓄積量の低下が、遺伝子発現のどの過程に起因するかを理解することは、低温クロロシス誘導の機構解明につながるものと思われる。そこで、まず、ノザン解析によりPOR転写物の蓄積量を調査した。その結果、15℃暗所で生育させた感受性品種SURにおいても対照(25℃)と同レベルの蓄積量を示した (Fig. 7)。

このことから、色素体内のPOR蓄積量の低下は、転写レベルではなく、転写後の過程に起因することが示唆された。その過程は、大きく二つに分けて考えられる。一つはPOR転写物が翻訳されない場合、そしてもう一つは細胞質中で翻訳された後、色素体へ輸送されない場合である。最近、

PORタンパク質の細胞質から色素体への輸送が、基質であるプロトクロロフィリド(Pchl)に依存して行なわれていることが示唆された。低温(15℃)暗所で生育させた植物体のPchlの蓄積量を調査したところ、SURで常温(25℃)で生育させた場合の約10%程度に抑制されていることが明らかにされた(Fig. 8)。

色素体内のPOR蓄積量の低下がPchlを介した輸送過程に関与するのならば、Pchlの蓄積量を増加することでその過程が回復する可能性が考えられる。そこで、15℃暗所で生育させたSURに、Pchlの前駆物質であるアミノレブリン酸(ALA)を投与してPchlを蓄積させることにより、色素体内のPORのレベルにどのような変化がみられるかを調査した。ALAを投与したことにより、15℃暗所で生育させたSURにおいても常温と同レベルあるいはそれ以上のPchlを蓄積した(Fig. 9)。

しかし、Pchlレベルの上昇にも関わらず、色素体内のPORのレベルは低下したままであった(Fig. 10)。これらのことから、感受性品種で認められたPORタンパク質の低下は、少なくともPchlが関与する輸送系には起因しないであろうことが示唆された。

## 第6章 低温による色素体ゲノム遺伝子の発現変化

色素体の発達に伴い、色素体ゲノムにコードされた遺伝子の発現も活性化されることが、転写および翻訳レベルから明らかにされている。そこで、低温暗所で生育させた感受性品種の植物体で、色素体ゲノムの遺伝子発現にどのような変化がみられるかを調査した。ノザン解析により、色素体ゲノム遺伝子の転写物の蓄積を調査したところ、15℃暗所で生育させた感受性品種の植物体で、RNAポリメラーゼをコードする*rpoB*の転写物は、非常に多量に蓄積されていた(Fig. 11)。しかし、16S rRNAなどその他の遺伝子の転写物は減少していた(Fig. 11)。

また、光合成の光化学系IIをコードする*psbB*オペロン中の*petB*をプローブとした場合、15℃暗所で生育させたSURで、長いポリシストロニックな一次転写産物がプロセッシングされないままに蓄積されていることも確認された(Fig. 11)。

翻訳産物についても、15℃暗所で生育させたSURでかなり減少していることがimmunoblot法により明らかにされた(Fig. 12)。

一方、ミトコンドリアゲノムにコードされている遺伝子をプローブとし

ノザン解析を行なったところ、感受性品種においても温度による差異は全く認められなかった(Fig. 13)。また、ミトコンドリアゲノム支配のチトクロームcオキシダーゼサブユニットIの抗体を用いてimmunoblotを行なったが、やはり、温度による差異は認められなかった(Fig. 14)。よって、ミトコンドリアゲノムの遺伝子発現は正常であることが示唆された。

これらのことから、低温暗所下で生育させた感受性品種の植物体では、色素体ゲノムの遺伝子発現が特異的に阻害されていることが明らかにされた。

## 第7章 ストレプトマイシンによって誘導されるクロロシスと低温クロロシスとの関連性

原核生物型のタンパク質合成阻害剤であるストレプトマイシン(Sm)を培地に加え、暗所、常温(25℃)下で植物体を生育させたところ、低温クロロシス感受性のSURで著しい緑化能力の低下が認められた(Fig. 15)。この傾向は、他のクロロシス感受性品種にもみられ、一方、耐性品種はどれもその能力が保持されていた(Fig. 16)。SURとO-195との交雑後代F<sub>2</sub>を用いて、その遺伝分離を調べたところ、緑化した個体と、緑化が阻害された個体とが3:1に分離することが統計的に証明され、この場合、Smによる緑化能力の欠損が、劣性の単一核遺伝により支配されることが示唆された(Table 2)。

また、色素体ゲノムの*rpoB*転写物は、Sm存在下で生育させたSURで多量に蓄積されていたが、16S rRNAの蓄積はかなり抑制されていた(Fig. 17A)。色素体ゲノム支配の翻訳産物も減少していた(Fig. 18)。しかし、ミトコンドリアゲノムの遺伝発現には異常が認められなかった(Fig. 17B, 18)。エチオプラストのマーカータンパク質であるPORの蓄積も、Sm存在下で生育させたSURで特異的に減少しており、このことはSmが暗所におけるエチオプラスト形成を阻害したことを示唆した(Fig. 18)。

これらのSmによる色素体ゲノムの遺伝発現の変化は、低温の場合に認められた結果とかなり類似しており、このことから、低温とSmが同様な機構を標的にしてクロロシス発現を誘導させることが推測された。

## 結語

本研究では、イネ低温クロロシスの品種間差異に関与する要因を、特に色素体形成の面から追求した。

そこで、まず、

(1) イネの低温クロロシスを誘導する分子機構を解明するため、暗所で生育させた植物体を用いた実験系を開発した。

そして、この実験系を用いることにより、以下の結果が得られた。

(2) 低温クロロシスは、15~17℃の比較的狭い温度領域で誘導され、15℃以下の温度では逆にその誘導が阻止された。

(3) エチオプラスト内に多量に存在するPORタンパク質の蓄積が低温暗所下で生育させた感受性品種で顕著に阻害されており、この阻害は転写レベルではなく、転写後の過程に起因することが示唆された。

(4) エチオプラストに特徴的なプロラメラボディーやプロチラコイドなどの膜構造の発達が低温暗所下で生育させた感受性品種で阻害されていた。

(5) 色素体ゲノムにコードされているRNAポリメラーゼ (*rpoB*, *C1*) の転写物が低温暗所下で生育させた感受性品種で多量に蓄積されているにも関わらず、他の色素体ゲノム遺伝子の転写物の蓄積が顕著に阻害されていた。また、その翻訳産物の蓄積も顕著に阻害されていた。しかし、ミトコンドリアゲノム遺伝子の発現は正常であった。

(6) ストレプトマイシンによって誘導されるクロロシスの品種間差異と、低温クロロシスの品種間差異とが互いに平行な関係にあることが、遺伝子分析および色素体遺伝子発現の面から示唆された。

以上のように、低温クロロシスの誘導は、低温による色素体の形成阻害に起因することが、タンパク質、核酸、形態レベルから指摘された。

今後としては、15~17℃の低温が色素体の発達に伴う遺伝子発現、特に色素体内の転写、翻訳機構を形成し始める過程にどのように影響するかが大きなテーマとなるものと思われる。また、その機構解明に、ストレプトマイシンが有効な手段となることが期待される。

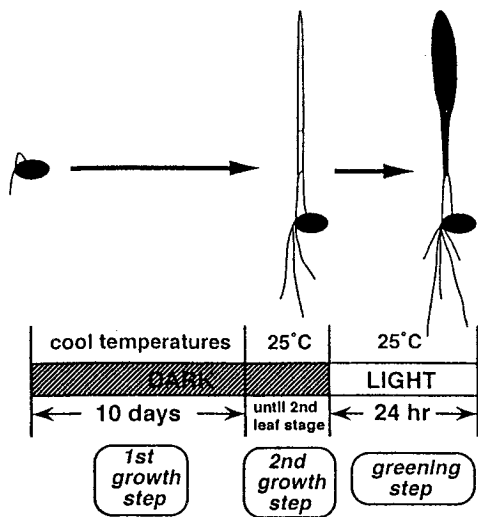


Fig. 1 Schematic representation of cool temperature treatment.

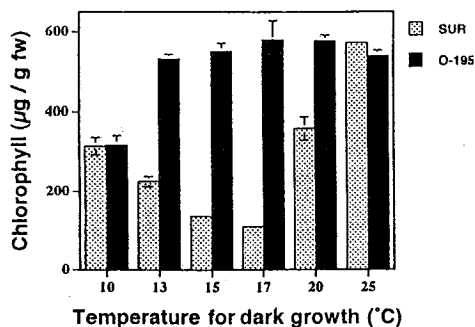


Fig. 2 Effects of temperature during initial growth in darkness on the accumulation of chlorophyll during subsequent illumination.

O-195, Ouu no. 195; SUR, Surjamukhi. Each bar shows the mean  $\pm$  SE (n=4). The missing error bars indicate that they are smaller than the label marks.

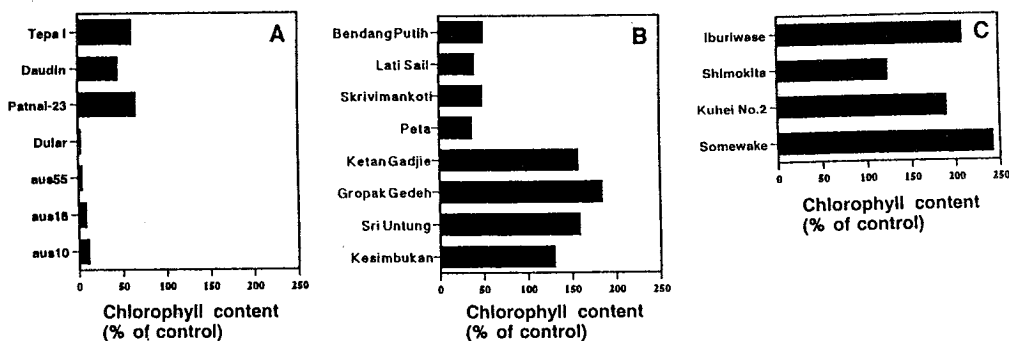


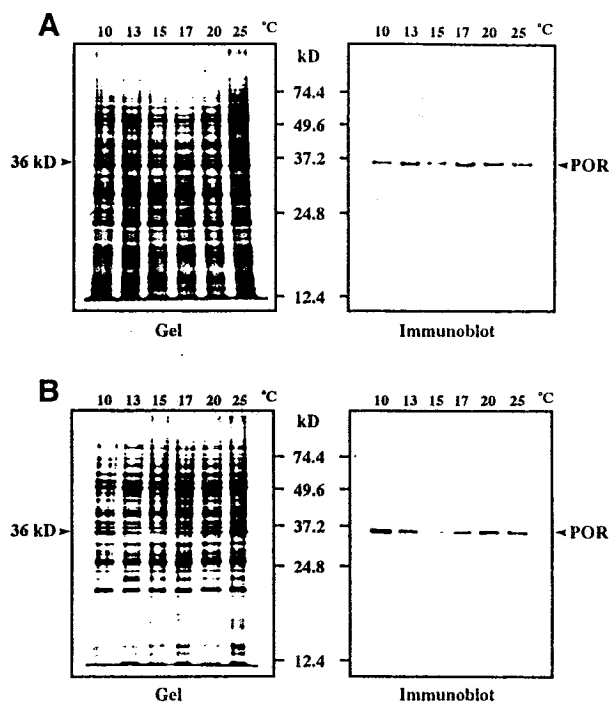
Fig. 3 Varietal diversity of greening ability in etiolated seedlings grown in darkness at 15°C. Results are expressed relative to the results for the seedlings grown in darkness at 25°C. A, Indian cultivars; B, Indonesian cultivars; C, Japanese lowland rice cultivars.

Table 1. Genetic analysis in F<sub>2</sub> population of the crosses between "Ouu no. 195" and "Surjamukhi" for greening ability in seedlings grown at 15°C in darkness.

Cross combination	Segregation in F <sub>2</sub> population			X <sup>2</sup> for 3:1	p value
	G	W	Total		
SUR / O-195	68	31	99	2.104	0.1-0.2
O-195 / SUR	66	33	99	3.667	0.05-0.1

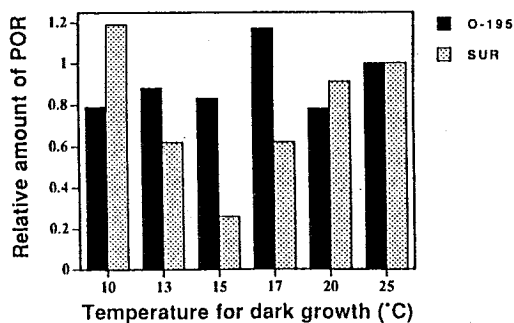
O-195, Ouu no. 195; SUR, Surjamukhi; G, green seedlings; W, white seedlings





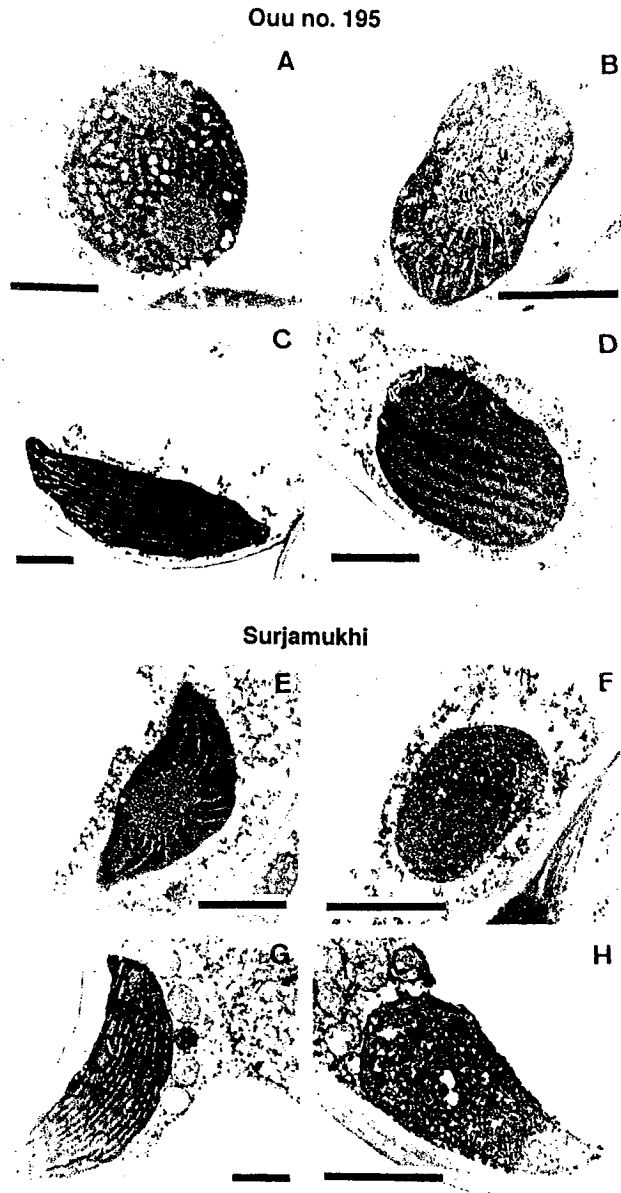
**Fig. 4** Changes in profiles after SDS-PAGE and immunoblotting of polypeptides in plastid-enriched fractions as a function of the temperature in the 1st growth step. 3  $\mu$ g of total protein from plastid-enriched fractions were fractionated in each lane. Gels were either stained with silver or blotted onto a PVDF membrane and immunostained with the POR-specific antiserum.

A, Ou no. 195; B, Surjamukhi.

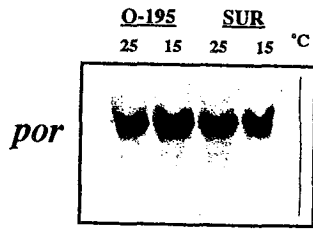


**Fig. 5** Densitometric analysis of levels of POR in plastid-enriched fractions during growth in darkness at different temperatures.

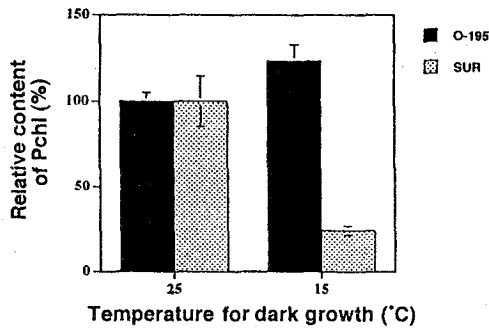
O-195, Ou no. 195; SUR, Surjamukhi.



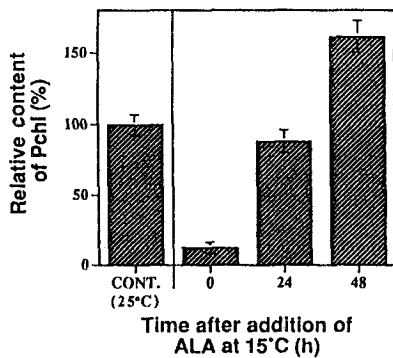
**Fig. 6** Ultrastructure of plastids in the second-leaves excised from seedlings immediately after dark growth at 15°C and after transfer to light and warm conditions. A-D, Ouu no. 195; E-H, Surjamukhi. A and D show plastids in second leaf cells after growth at 25°C in darkness. B and F show plastids in second leaf cells after growth at 15°C in darkness. C and G show plastids in second leaf cells after illumination for 24 h at 25°C subsequent to dark growth at 25°C. D and H show plastids in second leaf cells after illumination for 24 h at 25°C subsequent to dark growth at 15°C. Bars correspond to 1  $\mu$ m.



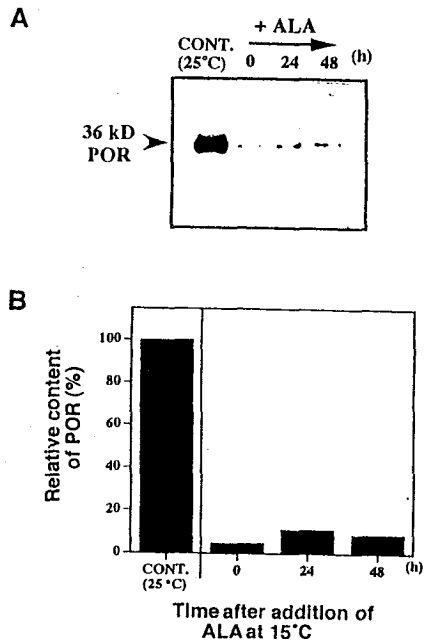
**Fig. 7** Northern blot analysis of POR mRNA. 50  $\mu\text{g}$  of total RNAs were loaded onto each lane in 1.2% agarose formaldehyde gels to give hybridization with probe specific to POR gene from barley. O-195, Ouu no. 195; SUR, Surjamukhi.



**Fig. 8** Effects of cool temperature on Pchl accumulation in dark-grown seedlings. O-195, Ouu no. 195; SUR, Surjamukhi.



**Fig. 9** Accumulation of Pchl in the seedlings of SUR grown in darkness at 15°C after incubation in darkness at 15°C in the presence of ALA (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in darkness.



**Fig. 10** Effects of Pchl accumulation on POR levels in plastid-enriched fraction isolated from 2nd leaves of 15°C-grown SUR seedlings. A, immunoblot; B, densitometric analysis.

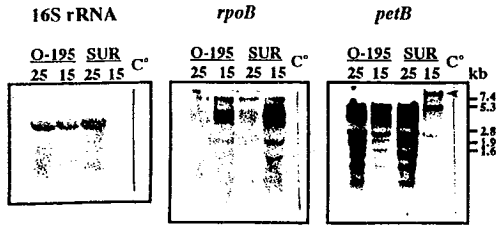


Fig. 11 Northern blot analysis of plastid-encoded genes. 20  $\mu$ g of total RNAs were loaded onto each lane in 1.5% agarose formaldehyde gels to give hybridization with probe specific to 16S rRNA, *rpoB* and *petB* from rice. O-195, Ouu no. 195; SUR, Surjamukhi.

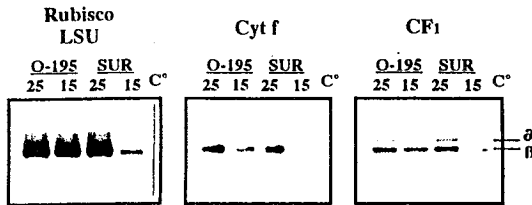


Fig. 12 Western blot analysis of plastid-encoded genes. 3  $\mu$ g of total protein from plastid-enriched fractions were fractionated in each lane. O-195, Ouu no. 195; SUR, Surjamukhi.

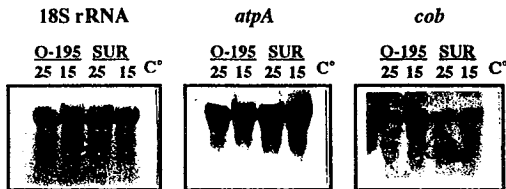


Fig. 13 Northern blot analysis of mitochondria-encoded genes. 20  $\mu$ g of total RNAs were loaded onto each lane in 1.5% agarose formaldehyde gels to give hybridization with probe specific to 18S rRNA, *atpA* and *cob*. O-195, Ouu no. 195; SUR, Surjamukhi.

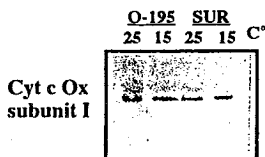


Fig. 14 Western blot analysis of mitochondria-encoded genes of cytochrome c oxidase subunit I. 3  $\mu$ g of total protein from mitochondria-enriched fractions were fractionated in each lane. O-195, Ouu no. 195; SUR, Surjamukhi.

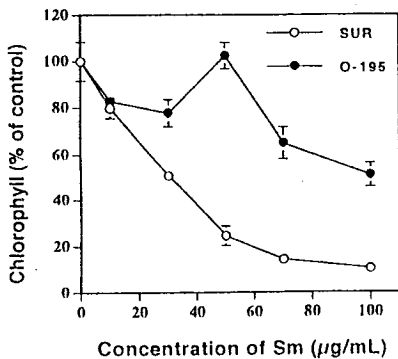


Fig. 15. Effects of streptomycin during growth in darkness on the accumulation of chlorophyll during subsequent illumination. O-195, Ouu no. 195; SUR, Surjamukhi. Each bar shows the mean  $\pm$  SE (n=3). The missing error bars indicate that they are smaller than the label marks.

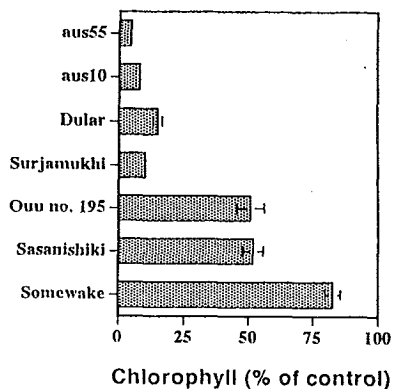


Fig. 16. Varietal diversity of greening ability in etiolated seedlings of each cultivar grown in the presence of streptomycin at 25°C. Results are expressed relative to the results for the seedlings grown in the absence of streptomycin at 25°C. Each bar shows the mean  $\pm$  SE (n=3). The missing error bars indicate that they are smaller than the label marks.

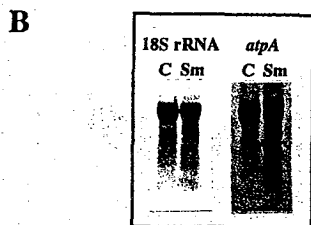
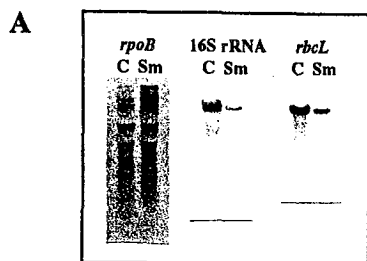


Fig. 17 Effects of streptomycin on the accumulation of gene transcripts encoded by plastid (A) or mitochondria (B) genome. 20  $\mu$ g of total RNA from SUR seedlings grown in the presence or absence of streptomycin in darkness at 25°C was analyzed in each lane. Filters were probed with gene-specific probes made from cloned rice chloroplast DNA and rice (*cob*), pea (*atpA* and 18S rRNA) mitochondria DNA. C, control; Sm, streptomycin.

Table 2. Genetic analysis in F<sub>2</sub> population of the crosses between "Ouu no. 195" and "Surjamukhi" for greening ability in seedlings grown in darkness at 25°C in the presence of streptomycin (100  $\mu$ g/mL).

Cross combination	Segregation in F <sub>2</sub> population			$\chi^2$ for 3:1	p value
	G	W	Total		
SUR / O-195	82	26	108	0.05	0.8-0.9
O-195 / SUR	80	28	108	0.05	0.8-0.9

O-195, Ouu no. 195; SUR, Surjamukhi; G, green seedlings; W, white seedlings

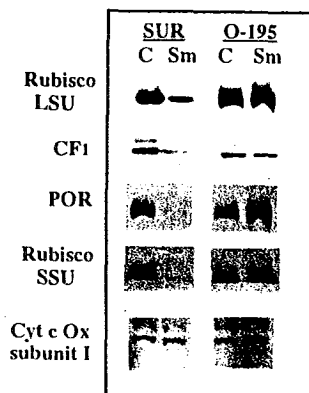


Fig. 18 Effects of streptomycin on the accumulation of plastid or mitochondria protein. 3  $\mu$ g of protein in plastid-enriched fraction, and 7  $\mu$ g of protein in mitochondria-enriched fraction were fractionated in each lane by SDS-PAGE. Gels were blotted onto a PVDF membrane and immunostained with the antiserum specific to Rubisco (from rice), CF1, cytochrome f (from spinach) and cytochrome c oxidase subunit I (from sweet potato). O-195, Ouu no. 195; SUR, Surjamukhi. C, control; Sm, streptomycin.

## 論文審査の要旨

熱帯を起源とするイネ (*Oryza sativa* L.) は低温に感受性を示す作物の一つとして知られており、様々なタイプの低温障害が引き起こされる。本研究は、イネ幼苗期に発現する低温クロロシスに注目し、その品種間差異を決定する要因を、分子生物学的面から検討したものである。低温クロロシスは、新しく形成される葉が低温により、クロロフィルを欠いた状態で抽出、展開する現象であり、その形質発現は劣性の単一核遺伝子によって支配されていることが知られている。この障害は、葉梢の基部を局部的に冷却することにより誘導されることから、葉梢内に存在する未成熟葉がその発現における感受部位であると指摘されており、また、このことから、葉の発達に伴うクロロプラスト形成が低温により阻害されることが、クロロシス発現の大きな要因であると示唆されてきた。しかし、低温がどのように作用してこの阻害を誘導するかについて、現在、その基礎的知見は無いと言える。本研究では、まず(1)イネの低温クロロシスを誘導する機構を解明するために、暗所で生育させた植物体を用いた実験系を開発した。そして、この実験系を用いることにより、以下の結果が得られた。(2)低温クロロシスは、15~17℃の比較的狭い温度領域で誘導され、15℃以下の温度では逆にその誘導が阻害された。(3)エチオプラスト内のPORタンパク質の蓄積が低温暗所下で生育させた感受性品種で顕著に阻害されており、この阻害は転写レベルではなく、転写後の過程に起因することが示唆された。(4)エチオプラストに特徴的なプロラメラボディやプロチラコイドなどの膜構造の発達が、低温暗所下で生育させた感受性品種で阻害されていた。(5)色素体ゲノムにコードされているRNAポリメラーゼ (rpoB, C 1) 転写物が感受性品種で多量に蓄積されているにも関わらず、他の色素体ゲノム遺伝子の転写物の蓄積が顕著に阻害されていた。また、その翻訳産物の蓄積も顕著に阻害されていた。しかし、ミトコンドリアゲノム遺伝子の発現は正常であった。(6)ストレプトマイシンによって誘導されるクロロシスの品種間差異と低温クロロシスの品種間差異とが互いに平行な関係にあることが、遺伝子分析および色素体遺伝子の発現の面から示唆された。

以上のように、本研究において、低温クロロシスの誘導は低温による色素体の形成阻害に起因することが、タンパク質、核酸、形態のレベルから指摘された。今後、15~17℃の温度が色素体の発達に伴う遺伝子発現、特に、色素体内の転写、翻訳機構を形成し始める過程にどのように影響するかが大きなテーマとなるものと思われる。また、その機構解明に、本研究のストレプトマイシンを用いた実験系が有効な手段となることが期待される。以上のような成果により、審査員一同は、本論文提出者は博士(農学)の学位を受けるに値すると判定した。