

計時機構研究部門

村 田 紀 夫

当研究室では、植物の環境（特に温度と高塩濃度）への耐性と適応の分子機構を、細胞内における遺伝子の発現調節の視点から研究してきた。研究材料としては高等植物およびそのモデル系である藍藻（シアノバクテリア）を用い、植物の示す種々の生理現象のなかで最も敏感に環境の変化に应答する光合成を主な指標としている。

1. 高等植物における低温耐性の分子機構と低温耐性植物の作出

植物の低温傷害の最初の段階は、低温下でおこる膜脂質の相転移である。この相転移のおこる温度は、膜脂質を構成する脂肪酸の不飽和結合の数に依存する。当研究室では、先ず高等植物の低温感受性の決定要因と推定されているリン脂質の一種、ホスファチジルグリセロールの生合成を支配する酵素、グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ（以下、アシルトランスフェラーゼ）の遺伝子を低温感受性のカボチャと低温耐性のシロイヌナズナから単離した。次にこれらの cDNA をタバコに導入して形質転換植物を作出した。カボチャのアシルトランスフェラーゼの cDNA を導入したタバコでは、ホスファチジルグリセロールの不飽和分子の割合が減少し、より低温感受性になった（図 1；口絵 4 参照）。またシロイヌナズナのアシルトランスフェラーゼの cDNA を導入したタバコでは、ホスファチジルグリセロールの不飽和分子の割合が増加し、より低温耐性になった（図 1；口絵 4 参照）。これらの事実から、ホスファチジルグリセロールの不飽和分子が高等植物の低温耐性能を決定している因子であるという結論に到達した。これらの研究成果は、植物の低温適応の機構解明にとって重要であるが、同時に低温に強い農作物の作出に応用することもできる。

2. 藍藻における不飽和化酵素と低温耐性

藍藻から、膜脂質の脂肪酸の $\Delta 6$ 位、 $\Delta 9$ 位、 $\Delta 12$ 位、 $\omega 3$ 位に不飽和結合を導入する 4 種類の不飽和化酵素の遺伝子を単離し、細胞免疫化学的解析により各不飽和化酵素が、細胞質膜およびチラコイド膜に分布していることを明らかにした。次にこれらの遺伝子を順次不活性化することによって膜脂質の不飽和結合数を人為的に調節することのできる系を確立した。また、これらの遺伝子を $\Delta 9$ 位での不飽和化しかできない藍藻に導入することによって、膜脂質に不飽和結合を順次導入することもできるようになった。これらの系を用いて、膜脂質の不飽和結合が低温耐性にとって重要な役割を担っていることを明らかにした。特に、低温下における光傷害（低温光阻害）において不飽和膜脂質が低温光阻害の修復を促進することを明らかにした。今後は、不飽和膜脂質がどのような分子機構で遺伝

形質転換タバコ

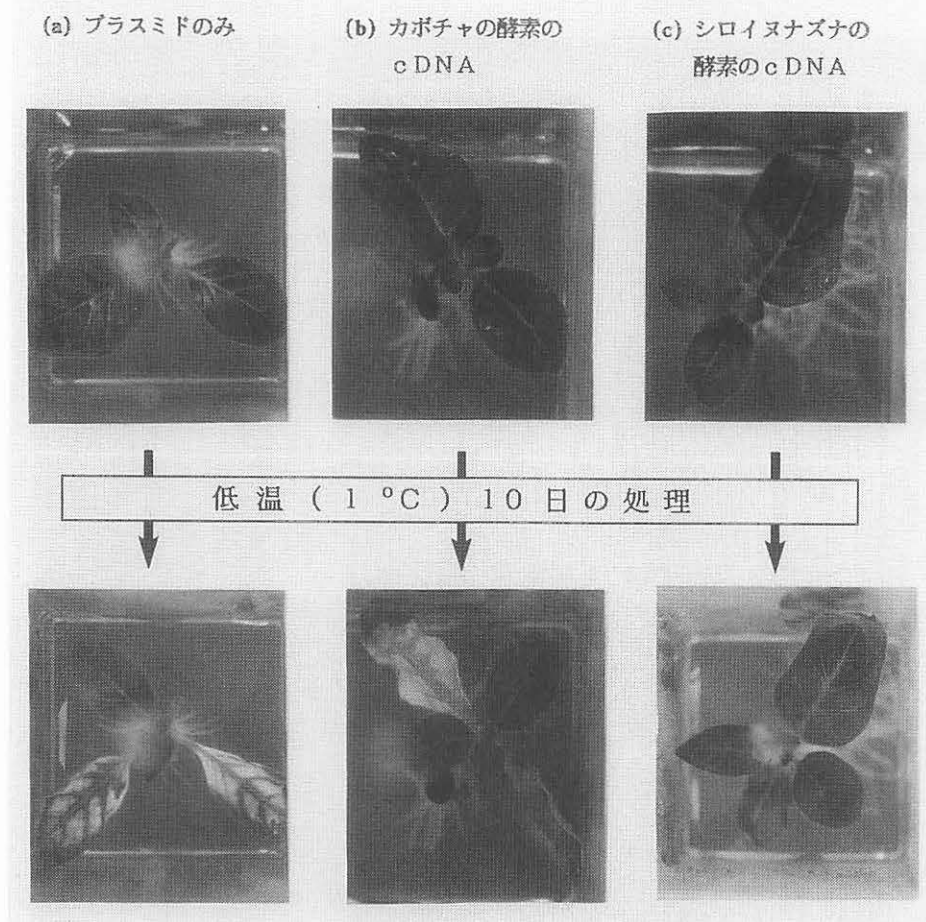


図1 アシルトランスフェラーゼの cDNA の導入によるタバコの低温耐性能の改変。低温耐性能は、1℃に10日間、さらに室温に2日間曝すことによって評価した。(a) バイナリープラスミドベクター pBI121 だけを導入したタバコ (対照実験)。(b) 低温感受性植物カボチャのアシルトランスフェラーゼ cDNA を導入した形質転換タバコ。(c) 低温耐性植物シロイヌナズナのアシルトランスフェラーゼ cDNA を導入した形質転換タバコ。

子発現を介した光傷害からの修復を調節しているのかを解明していく予定である。

3. 温度検知の機構

植物や藍藻は損傷を被らない程度の低温に曝されると、膜脂質の脂肪酸を不飽和化して適応し、より低温耐性になる。当研究室では、藍藻の不飽和化酵素の発現が低温下において著しく促進されることを明らかにした。またパラジウム触媒を用いた水素添加法により、細胞質膜の脂質を飽和化する(従って、細胞膜質の流動性を低下させる)ことによっても不飽和化酵素の発現が促進されることを見出した。これらの事実から、最初の低温シグナルは膜脂質の流動性の低下であるという結論を得た。

形質転換株

野生株

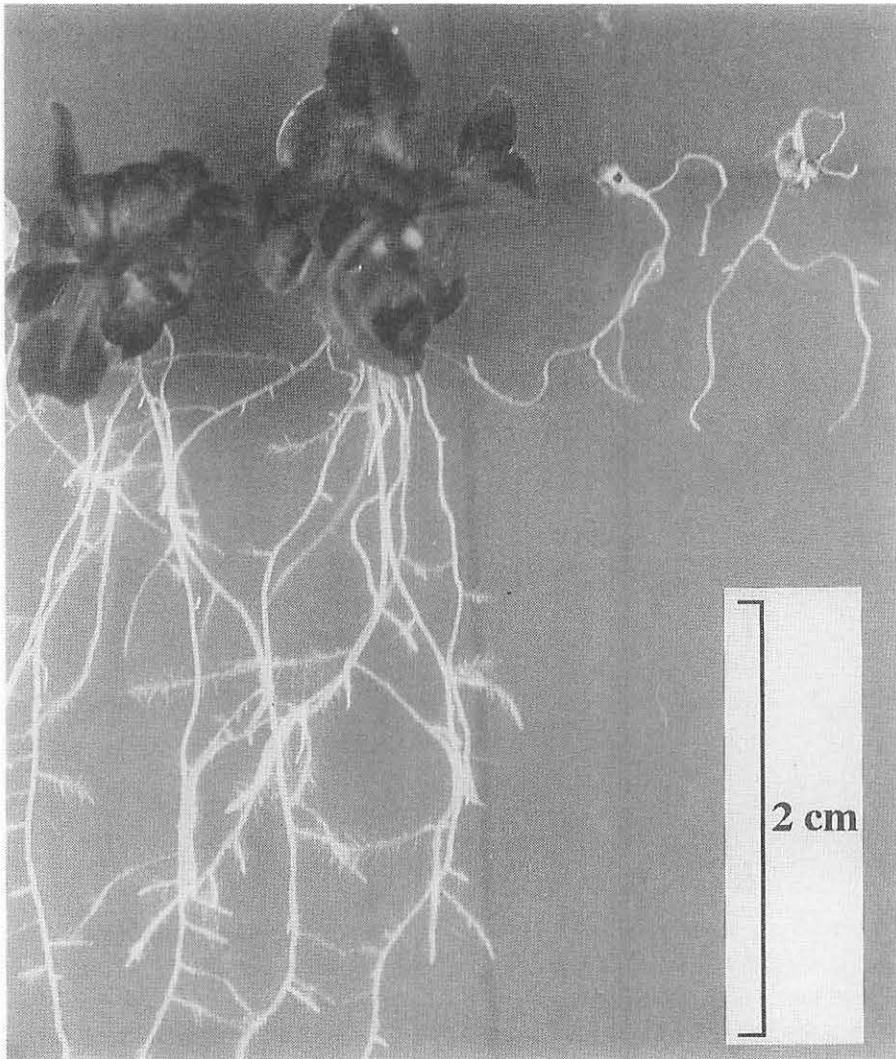


図2 土壌細菌 *Arihrobacter globiformis* から単離したコリンオキシダーゼ遺伝子の導入によるシロイヌナズナの耐塩性の遺伝子工学的改変。写真は 100mM NaCl を含む MS ジェランガム培地での野生株および形質転換株の種子発芽後の生育を示す。

現在は、温度に依存して発現が完全に On-Off する ω 3 不飽和化酵素の遺伝子の発現調節機構を解析し、それを通じて温度検知タンパク質（流動性検知タンパク質）と温度信号伝達系の解明をおこなっている。

4. 高温適応の分子機構

高温下において植物は種々の生理活性を失うが、最も損傷を被りやすいのは光合成の光化学系Ⅱタンパク質複合体において水分子を酸化して酸素分子を発生する過程（酸素発生）である。当研究室で

は、藍藻を高温失活を被るよりやや低い温度で適応させると、その酸素発生系はより高温耐性になることを明らかにした。これまでに酸素発生系の高温耐性に関与する2種類のタンパク質因子を決定してきた。これらのタンパク質の遺伝子を改変した形質転換株を作製し、光合成の高温適応の分子機構の解明を目指している。

5. ベタインによる光合成の耐塩化・低温耐性化

光合成の種々の部分反応系の中で酸素発生系は、塩ストレス下において最も失活しやすい性質を持っている。当研究室では、グリシルベタイン（以下、ベタイン、耐塩性の微生物や植物の葉緑体内に高濃度に蓄積する化合物）が、酸素発生系の失活に対して著しい保護効果を持つことを明らかにした。このベタインを生合成するコリンオキシダーゼの遺伝子を土壌細菌より単離し、藍藻と高等植物に導入して、遺伝子工学的に耐塩性を増強した形質転換株を作出することに成功した（図2；口絵5参照）。さらに、ベタインを蓄積するこれらの藍藻や植物の形質転換株は、低温に対しても耐性であることを明らかにしている。これらの研究の成果は、耐塩性農作物や乾燥地に生育する植物の分子育種に応用することができる。

主要論文リスト

1. Original Papers

1. Wada, H., Gombos, Z. and Murata, N. (1990) Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature* 347, 200-203.
2. Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y. and Nishida, I. (1992) Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* 356, 710-713.
3. Vigh, L., Los, D. A., Horvath, I. and Murata, N. (1993) The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9090-9094.
4. Wada, H., Gombos, Z. and Murata, N. (1994) Contribution of membrane-lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4273-4277.
5. Gombos, Z., Wada, H. and Murata, N. (1994) The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: a mechanism of chilling tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8787-879.
6. Sakamoto, T., Wada, H., Nishida, I., Ohmori, M., and Murata, N. (1994) Δ^9 acyl-lipid desaturase of cyanobacteria : molecular cloning and substrate specificities of fatty acids, *sn*-positions, and polar head groups. *J. Biol. Chem.* 269, 25576-25580.
7. Nishiyama, Y., Hayashi, H., Watanabe, T. and Murata, N. (1994) Photosynthetic oxygen evolution is stabilized by cytochrome c_{500} against heat inactivation in *Synechococcus* sp. PCC7002. *Plant Physiol.* 105, 1313-1319.

8. Moon, Y., Higashi, S., Gombos, Z. and Murata, N. (1995) Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6219-6223.
 9. Deshniun, P., Los, D. A., Hayashi, H., Mustardy, L. and Murata, N. (1995) Transformation of *Synechococcus* with a gene for choline oxidase enhances tolerance to salt stress. *Plant Mol. Biol.* 29, 897-907.
 10. Tasaka, Y., Gombos, Z., Nishiyama, Y., Mohanty, P., Ohba, T., Ohki, K. and Murata, N. (1996) Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. *EMBO J.* 15, 6416-6425.
 11. Mustardy, L., Los, D. A., Gombos, Z. and Murata, N. (1996) Immunocytochemical localization of acyl-lipid desaturases in cyanobacterial cells: evidence that both thylakoid membranes and cytoplasmic membranes are sites of lipid desaturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10524-10527.
- 2. Review Articles**
1. Murata, N. (1989) Low-temperature effects on cyanobacterial membranes. *J. Bioenergetics Biomembranes* 21, 61-75.
 2. Murata, N. and Wada, H. (1995) Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.* 308, 1-8.
 3. Nishida, I. and Murata, N. (1996) Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The crucial contribution of membrane lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 541-568.

