

高等植物におけるグルタチオン類の生合成に関する研究

山崎 真一

2019

目次

第1章	緒言	1
第2章	イネのファイトケラチン合成酵素の解析	
第1節	<i>PCS</i> ホモログ遺伝子の配列決定と発現量解析	7
第2節	<i>OsPCS</i> 組み換えタンパク質の酵素活性の解析	25
第3節	<i>OsPCS</i> 遺伝子発現抑制イネの表現型解析	32
第4節	2章 結論	46
第3章	イネのグルタチオン合成酵素ホモログの生理的解析	
第1節	グルタチオン生合成阻害剤の影響の検討	47
第2節	<i>GS</i> ホモログ遺伝子の相同性検索と発現量解析	52
第3節	<i>OsGS</i> 遺伝子発現抑制イネの表現型解析	60
第4節	3章 結論	70
第4章	イネのグルタチオン合成酵素の酵素化学的解析	71
	総合考察	83
	発表論文	85
	謝辞	86
	引用文献	87

第1章 緒言

グルタチオン (GSH) は陸上植物に普遍的に存在する低分子のチオール化合物で、グルタミン酸、システイン、グリシンから成るトリペプチド (γ Glu-Cys-Gly) である。通常のペプチドとは異なりグルタミン酸-システイン間のアミド結合はグルタミン酸側鎖の γ 位カルボキシ基とシステインの α 位アミノ基の結合 (γ グルタミル結合) であるため、グルタチオンはほとんどのペプチダーゼによる分解を受けない (Sies, 1999)。グルタチオンの生理活性は主にシステイン残基のチオール基 (-SH) に由来し、これは反応性が高いため生体内の多くの酸化還元反応に関わる (Sies, 1999; Noctor et al., 2012)。遊離システインのチオール基は $pK_a = 8.45$ であり (Clement & Hartz, 1971)、これは生理的条件下で容易に解離してチオラートアニオンを生じ Fe^{3+} や Cu^{2+} を介して酸素を1電子還元することでスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) などの活性酸素種 (ROS) を生じるため細胞毒性が強い (Viña et al., 1983; 渡辺, 平竹, 2015)。一方で、グルタチオンのチオール基は $pK_a = 8.93$ であり (Rabenstein, 1973)、システイン残基の N 末端が γ グルタミル化され、正に帯電した α アミノ基がないのでチオール基は解離しにくく反応性が低い (渡辺, 平竹, 2015)。このため、細胞内の遊離システイン濃度は数十 μ M 程度と低く保たれるのに対し (Schupp & Rennenberg, 1988)、グルタチオンは数 mM 程度の高い濃度で存在する (Foyer & Halliwell, 1976; Rennenberg, 1980)。

グルタチオンは、 γ グルタミルシステイン合成酵素 (γ ECS または GSH1) とグルタチオン合成酵素 (GS または GSH2) が触媒する2段階の ATP 依存的な反応によって合成される (Meister & Tate, 1976; Rennenberg, 1980)。このうち、 γ グルタミルシステイン合成酵素が一連の反応の律速となる鍵酵素であるとされる (Meister & Anderson, 1983; Noctor et al., 1996)。

グルタチオンは植物において様々な生理機能を有する (Noctor et al., 2012)。モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において、*AtGSH1* 遺伝子の欠損変異は種子の胚発生の段階で致死性を示し (Cairns et al., 2006)、*AtGSH2* 遺伝子の欠損変異は種子の発芽後に致死性を示す (Pasternak et al., 2008)。*AtGSH1* 遺伝子の変異によりグルタチオン含有率が野生型株の3%に減少した変異体 *root meristemless1 (rml1)* は、根端における細胞分裂領域が縮小し野生型株と比べて根が極端に短い (Cheng et al., 1995; Vernoux et al., 2000)。これらの報告は、植物の正常な発生と成長においてグルタチオンが必須であることを示す。また、グルタチオンは光合成系や様々なストレスに伴って生じた ROS を還元して消去し、細胞内成分の過酸化を防ぐ (Noctor et al., 2012)。この際グルタチオン自身は還元型 GSH から酸化型 GSSG となるが、これはグルタチオンレダクターゼ (GR) により速やかに再還元されるため (Halliwell & Foyer, 1978; Smith et al., 1989; Mhamdi et al., 2010)、細胞内の GSH : GSSG 比はほぼ一定 (20 : 1 程度) に保たれる。グルタチオンを基質とする酵素の1つにグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) がある。GST はグルタチオン分子内の硫黄原子を他分子の求電子的部位に結合させ、グルタチオン抱合体を形成する。これにより細胞内に侵入した生体異

物を無毒化し、植物の除草剤耐性に寄与する (Dixon & Edwards, 2010)。さらに、このグルタチオン化はグルコシノレートなど含硫二次代謝産物の生合成への関与が示唆されているほか (Dixon et al., 2010)、アントシアニンの液胞への輸送にも関わる (Kitamura et al., 2004)。

グルタチオンは動物や微生物にも普遍的に存在する生命に必須の化合物であるが、植物はそれとは別にグルタチオンと構造の似たペプチドを合成する。それがグルタチオンの重合体であるファイトケラチンと、グルタチオンのグリシン残基が他のアミノ酸に置換したグルタチオン類縁体である。

ファイトケラチンの生合成と生理機能

ファイトケラチン (phytochelatins; PC) は γ グルタミルシステイン部分が複数連なった構造 $[(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}]$ をもつチオールペプチドである。繰り返しの数は最大 11 と言われるが (Gekeler et al., 1989)、重合度 2~4 程度のものが主に検出される。ファイトケラチンは最初に分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) から発見された (Murasugi et al., 1981)。Murasugi et al. (1981) は分裂酵母においてカドミウム (Cd) ストレス条件により、グルタミン酸 3 分子、システイン 3 分子、グリシン 1 分子からなるカドミウム結合性ペプチドの合成が誘導されることを見出した。Kondo et al. (1983) はこのペプチドをカジスチン (cadystin) と名付け、 $(\gamma\text{Glu-Cys})_3\text{-Gly}$ の構造を決定した (Kondo et al., 1984)。Grill et al. (1985) はインドジャボク (*Rauvolfia serpentina*) 培養細胞から同様の構造 $[(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly} (n=3-7)]$ のカドミウム結合性ペプチドを単離し、その合成が複数の植物種で重金属 (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}) により誘導されることを示し、これをファイトケラチンと名付けた。ファイトケラチンはこれまで解析された全ての高等植物で存在が確認されており (Grill et al., 1987; Gekeler et al., 1989)、藻類や珪藻でも見つかっている (Rea, 2012)。

ファイトケラチンはグルタチオンを基質として、 γ グルタミルシステイン部分を別のグルタチオン分子に転移するジペプチド転移反応によって合成される (Grill et al., 1989)。この反応を触媒するファイトケラチン合成酵素 (PCS) の活性は Cd^{2+} や Cu^{2+} など重金属イオンにより著しく上昇する (Grill et al., 1989)。Vatamaniuk et al. (2000) によると、その活性化機構はファイトケラチン合成酵素が遊離のグルタチオンと金属-グルタチオン抱合体の 2 つを基質とすることに起因する。また、Vestergaard et al. (2008) によると C 末端のシステイン残基に富む領域に Cd^{2+} が結合することで酵素が活性化するほか、C 末端配列の一部を欠いたタンパク質断片は特定の金属イオンへの応答性を失うことから (Ruotolo et al., 2004; Uraguchi et al., 2018)、C 末端ドメインの関与が示唆されているが、反応の分子機構や立体構造の解明には至っていない。

ファイトケラチンはカドミウムやヒ素 (As) などの有害金属ストレスに対する植物の耐性機構に大きく寄与すると考えられている。ファイトケラチンは分子内の複数のチオール基によって過剰の有害金属イオンと結合して抱合体を形成する (Grill et al., 1985; Schmöger et al.,

2000)。この抱合体形成は細胞質で行われ、次いで液胞へと輸送されることで有害金属を無毒化し隔離すると考えられた (Vögeli-Lange & Wagner, 1990)。実際に、シロイヌナズナのファイトケラチン合成酵素 AtPCS1 の機能欠損変異体 *cad1-3* はファイトケラチンを合成できずカドミウムやヒ素ストレスに対して超感受性を示す (Howden et al., 1995; Ha et al., 1999)。また液胞に PC-Cd, PC-As 抱合体を輸送する輸送体タンパク質 AtABCC1/AtABCC2 の機能欠損二重変異体もヒ素やカドミウムに対する耐性が著しく低下する (Song et al., 2010; Park et al., 2012)。これらの報告は、シロイヌナズナにおけるカドミウム、ヒ素耐性がファイトケラチンを介した当該元素の液胞への隔離に大きく依存することを示している。

ファイトケラチン合成酵素をコードする遺伝子はシロイヌナズナ、コムギ (*Triticum aestivum*)、分裂酵母から単離され (Clemens et al., 1999; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999)、現在では DNA 配列データが明らかにされた全ての高等植物において PCS ホモログ遺伝子の存在が確認できる。またそれぞれの植物種には複数コピーの PCS 遺伝子が存在する (Clemens, 2006)。シロイヌナズナには *AtPCS1* とは別に、機能的な PCS タンパク質をコードする *AtPCS2* 遺伝子が存在するが (Cazalé & Clemens, 2001)、上述の通り *AtPCS1* 遺伝子の欠損によりファイトケラチン合成活性はほぼ完全に失われる (Howden et al., 1995)。これは、*AtPCS1* と比べて *AtPCS2* の発現量が著しく低いことや (Cazalé & Clemens, 2001)、*AtPCS1* は植物全体で発現するのに対して *AtPCS2* は根端でのみ発現が見られること (Blum et al., 2010) に起因すると考えられている。また、金属ストレスのない条件では *AtPCS2* によるファイトケラチン合成が微量ながら検出されることから (Kühnlenz et al., 2014)、*AtPCS1* との機能的な違いが示唆されてはいるが、その生理的意義は不明である。

高等植物のグルタチオン類縁体

グルタチオンは γ Glu-Cys-Gly の構造のトリペプチドであるが、植物種のなかには末端のグリシン残基が他のアミノ酸に置き換わったグルタチオン類縁体を合成するものがある。マメ科の多くの植物では β アラニンに置き換わったホモグルタチオン (hGSH, γ Glu-Cys- β Ala) が見つかった (Carnegie, 1963)。コムギ、オオムギ (*Hordeum vulgare*) など一部のイネ科植物からはセリンに置き換わったヒドロキシメチルグルタチオン (hmGSH, γ Glu-Cys-Ser) が単離され (Klapheck et al., 1992)、イネ (*Oryza sativa*) では特にカドミウムストレスにより誘導される (Klapheck et al., 1994)。トウモロコシ (*Zea mays*) はヒドロキシメチルグルタチオンを合成しないが、カドミウムに暴露した際にグルタミン酸に置換した γ グルタミルシステイニルグルタミン酸 (γ ECE, γ Glu-Cys-Glu) が検出される (Meuwly et al., 1993)。

このうちホモグルタチオンの生合成はグルタチオンと類似した経路が同定されており、 γ グルタミルシステインと β アラニンを基質として合成される (Macnicol, 1987; Klapheck et al., 1988)。この反応を触媒するホモグルタチオン合成酵素 (hGS) はグリシンより β アラニンに対して高い親和性を示すが (Macnicol, 1987; Klapheck et al., 1988)、グルタチオン合成酵素と

配列の相同性が高く (Moran et al., 2000)、グルタチオン合成酵素遺伝子の重複によって生じたと推定される (Frendo et al., 2001)。ホモグルタチオンとグルタチオンの含有率はマメ科植物のなかでも種間差、あるいは組織間の違いが大きい。エンドウ (*Pisum sativum*) やタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) では地上部ではグルタチオンが大部分を占めるが、根や根粒では GSH : hGSH 比が 2 : 1 から 8 : 1 程度で検出される (Matamoros et al., 1999; Frendo et al., 1999)。一方でダイズ (*Glycine max*) では組織に拘らずホモグルタチオンが大部分を占める (Klapheck et al., 1988; Matamoros et al., 1999)。このことから、ホモグルタチオンはグルタチオンと類似の生理活性をもち相互に代替しうると考えられるが、その生理的意義は明らかにされていない。

ヒドロキシメチルグルタチオンと γ ECE の生合成経路は同定されていない。Meuwly et al. (1995) によると、トウモロコシではカドミウムによるファイトケラチン $[(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}]$ の合成誘導が見られた後に γ ECE ($\gamma\text{Glu-Cys-Glu}$) が検出されることから、 γ ECE はファイトケラチンの分解によって生じる可能性が示唆されていた。Klapheck et al. (1992) によると、コムギにおいて γ グルタミルシステイン合成酵素阻害剤によりヒドロキシメチルグルタチオンの合成が阻害されることから、グルタチオンやホモグルタチオンと同様に γ グルタミルシステインとセリンを基質としたライゲーション反応が示唆されていた。一方で、Skipsey et al. (2005) はコムギとトウモロコシのグルタチオン合成酵素 TaGS1, TaGS2, ZmGS の組み換えタンパク質の *in vitro* における酵素活性を検討したが、いずれも γ グルタミルシステインとセリンまたはグルタミン酸を基質としたヒドロキシメチルグルタチオンと γ ECE の合成活性を示さなかった。また Okumura et al. (2003) は、酵母由来のカルボキシペプチダーゼ Y が *in vitro* においてグルタチオンと高濃度 (> 50 mM) のセリンを含む条件でヒドロキシメチルグルタチオン合成活性を示したことを報告した。以上の報告から、ヒドロキシメチルグルタチオンはグルタチオンを基質とした修飾 (ヒドロキシメチル化) 反応や末端アミノ酸交換反応によって合成されるのではないかと推定されていた (図 1-1)。

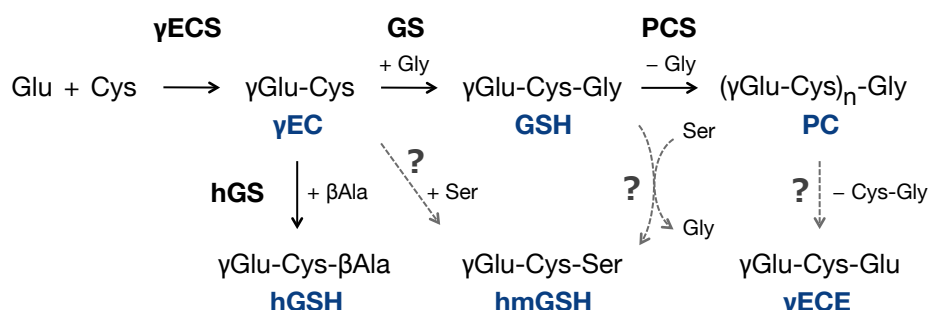


図 1-1 高等植物におけるグルタチオン類の生合成経路

実線は既知の経路、破線は未同定の推定経路を示す。

土壤条件や植物種によるカドミウム、ヒ素の可給度の違い

植物におけるグルタチオン類（グルタチオン、ファイトケラチン、グルタチオン類縁体）、特にファイトケラチンの生理機能として、カドミウムやヒ素など有害金属ストレスに対する防御応答への寄与がしばしば述べられる。一方で、カドミウム超集積植物であるゲンバイナズナ的一种 [*Noccaea (Thlaspi) caerulescens*] やヒ素超集積植物であるモエジマシダ (*Pteris vittata*) の当該元素への耐性はファイトケラチンに依存しないことが示唆されている (Ebbs et al., 2002; Zhao et al., 2003)。また、ファイトケラチンの寄与を遺伝子破壊等により直接的に検討した例はモデル植物であるシロイヌナズナに限られ (Howden et al., 1995; Ha et al., 1999)、イネのような栽培環境の異なる植物種を用いた検討は少ない。

カドミウムやヒ素の化学形態および可給度はその植物が生育する土壤環境に強く影響される。シロイヌナズナが生育する畑地のような好氣的土壤条件では、カドミウムは Cd^{2+} として存在し溶解性が高い (伊藤, 飯村, 1976; Honma et al., 2016)。その条件ではヒ素は大部分がヒ酸 $As^{(V)}$ として存在するが、これは土壤中の鉄化合物に吸着されるため移動性が低い (山根, 1989; Masscheleyn et al., 1991; Takahashi et al., 2004)。一方で、イネが栽培される水田のような嫌氣的土壤条件では、土壤溶液中の硫酸イオンが硫化物イオンに還元されカドミウムと難溶性の硫化物 CdS を形成するためカドミウムの溶解度は低くなる (伊藤, 飯村, 1976; Honma et al., 2016)。その条件では鉄酸化物の還元、溶出に伴い、ヒ素も溶出したヒ酸 $As^{(V)}$ から移動性の高い亜ヒ酸 $As^{(III)}$ へと還元される (山根, 1989; Masscheleyn et al., 1991; Takahashi et al., 2004)。すなわち、土壤中のカドミウムとヒ素の可給度はトレードオフの関係にある (Honma et al., 2016)。

加えて、イネは他の植物種と比べてヒ素を多く吸収する傾向にある。イネはケイ素 (Si) を高集積する植物種として知られ、その吸収は2つの輸送体タンパク質 Lsi1 (OsNIP2;1) と Lsi2 を介して行われる。これらは根の外皮と内皮の細胞膜に局在し、Lsi1 は遠心側で発現して細胞内へケイ酸を取り込み (Ma et al., 2006)、Lsi2 は向心側で発現してアポプラストへケイ酸を排出することでケイ酸を効率的に中心柱へと輸送する (Ma et al., 2007)。この2つの輸送体タンパク質 Lsi1 と Lsi2 はケイ酸だけでなく亜ヒ酸 $As^{(III)}$ も輸送基質とするため、イネは効率的にヒ素を吸収する (Ma et al., 2008; Su et al., 2010)。以上のように、カドミウムとヒ素の可給度や吸収能力の異なる植物種間では、当該元素に対する防御応答にも違いがある可能性が考えられる。しかしながら、イネのカドミウム、ヒ素ストレス耐性機構についての報告はほとんどなく、またグルタチオン類の生合成に関わる遺伝子の単離や生理機能の検討は行われていなかった。

本研究では、イネのグルタチオン類の生合成経路と生理機能を明らかにすることを目的とし、それらに関わる遺伝子の単離とカドミウム、ヒ素耐性への寄与を検討した。

第2章では、イネのファイトケラチン合成酵素についてホモログ遺伝子を探索し、*OsPCSI*

と *OsPCS2* を見出した。組み換えタンパク質の酵素活性の検討から、*OsPCS1* は $As^{(III)}$ に対する応答性が高いのに対し、*OsPCS2* は Cd^{2+} に対して高い応答性を示すことを明らかにした。遺伝子発現抑制株の表現型解析から、*OsPCS2* が *in vivo* におけるファイトケラチン合成と個体のヒ素耐性に寄与することを示した。またイネのカドミウム耐性へのファイトケラチンの寄与は小さいことが示唆された。

第3章では、グルタチオン生合成阻害剤の検討から、イネのカドミウム耐性にグルタチオンやグルタチオン類縁体が寄与することを示した。イネのグルタチオン合成酵素のホモログ遺伝子を探索し、*OsGS1*, *OsGS2*, *OsGS3* を見出した。遺伝子発現抑制株の表現型解析から、*OsGS1* がグルタチオン合成を介してイネのカドミウム耐性に寄与することを明らかにした。また、*OsGS2* がヒドロキシメチルグルタチオンの生合成に関与することを見出した。

第4章では、*OsGS1*, *OsGS2*, *OsGS3* の酵素化学的解析を行い、*OsGS2* が γ -グルタミルシステインとセリンを基質としたヒドロキシメチルグルタチオン合成活性を示すことを明らかにした。またセリンとグリシンへの基質親和性の違いを検討した。

最後に、本研究の内容を総合的に考察し、今後の課題と展望をまとめた。

第2章 イネのファイトケラチン合成酵素の解析

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、ファイトケラチン (PC; $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$) と呼ばれる低分子チオールペプチドの合成がカドミウム、ヒ素への耐性に寄与する (Howden et al., 1995; Ha et al., 1999)。ファイトケラチンは細胞内で最も豊富なチオールペプチドであるグルタチオン (GSH; $\gamma\text{Glu-Cys-Gly}$) を基質として酵素的に合成され (Grill et al., 1989)、分子内の複数のシステイン残基に由来するチオール基 (-SH) に富む。チオール基はカドミウムやヒ素との反応性が高いため、ファイトケラチンは細胞内に流入したカドミウムやヒ素と結合して抱合体を形成し (Grill et al., 1985; Schmöger et al., 2000)、その抱合体が ABC 輸送体により液胞へ隔離されることでシロイヌナズナに当該元素への耐性を賦与する (Song et al., 2010; Park et al., 2012)。一方で、イネ (*Oryza sativa*) のカドミウム、ヒ素耐性機構におけるファイトケラチンの役割は明らかにされていなかった。イネではヒ素とカドミウムにより誘導されるファイトケラチンの合成量に差がある (図 2-1-2) ことから、それぞれの有害金属に対する応答にも違いがある可能性が考えられた。

本章では、イネのファイトケラチン合成酵素遺伝子を探索し、*in vitro* と *in vivo* の解析からイネのカドミウム、ヒ素耐性におけるファイトケラチンの役割を明らかにしようと考えた。

第1節 PCS ホモログ遺伝子の配列決定と発現量解析

ファイトケラチン合成酵素 (Phytochelatase Synthase; PCS) をコードする遺伝子は多くの高等植物において複数コピー存在する (Clemens, 2006)。シロイヌナズナでは2つの遺伝子 (*AtPCS1*, *AtPCS2*) のうち *AtPCS1* がファイトケラチン合成および個体のカドミウム、ヒ素耐性に寄与する (Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999)。イネにも PCS 遺伝子は2コピー (*OsPCS1*, *OsPCS2*) 存在し、これまでに RNAi 法による種子特異的な遺伝子発現抑制によりイネ種子のカドミウムとヒ素の含有率が減少すると報告されている (Li et al., 2007; Das et al., 2017)。しかしながら、個体レベルでの *OsPCS1* と *OsPCS2* の生理的役割は明らかにされていなかった。

本節では、イネファイトケラチン合成酵素遺伝子の配列を決定し、選択的スプライシングによって複数のトランスクリプトが生じることを見出した。また、各バリエーションの発現量を解析した。

【材料と方法】

・ 植物材料

イネ (*Oryza sativa* L., 品種：日本晴)

・ 栽培方法と培養液組成

催芽処理として、イネ種子をマルエム容器（19 mL 容）に入れ、蒸留水と 0.3% (w/v) の殺菌剤（トリフミン；日本曹達）を加えて、30°C で 3 日間インキュベートした。種子を蒸留水で軽くすすぎ、スライドにメッシュを張ったフロートに播種し、1 L 容プラスチックコンテナに入れた培養液に浮かべて人工気象器で水耕栽培した（図 2-1-1 A）。人工気象器内の条件は、温度 30°C、相対湿度 80%、明期 12 時間とした。培養液の組成を表 2-1-1 に示した。カドミウムまたは亜ヒ酸を与える際は、 CdSO_4 または NaAsO_2 を培養液に添加した。

表 2-1-1 水耕栽培試験の培養液組成

多量要素	(mM)	微量元素	(mg L ⁻¹)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	EDTA-FeNa	37.7
KCl	0.5	H_3BO_3	2.86
KH_2PO_4	0.25	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81
CaCl_2	0.5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08
MgCl_2	0.5	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22
		$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1

A



B

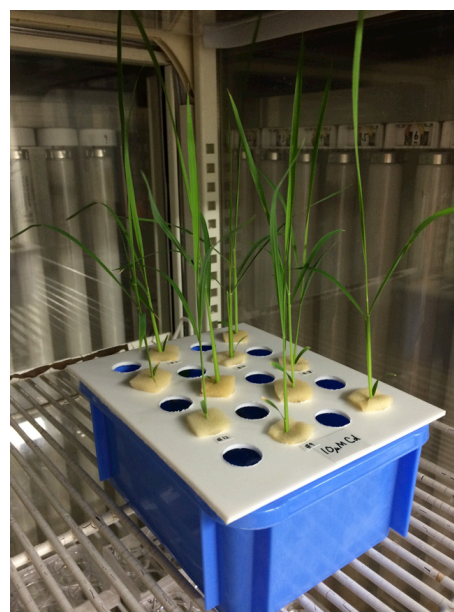


図 2-1-1 イネ幼苗の水耕栽培の様子

(A) フロートを用いた水耕栽培の様子。(B) 20 穴プレートを用いた水耕栽培の様子。

- ・ イネ植物体からのチオールペプチドの抽出と定量

イネ（品種：日本晴）を通常の培養液に播種して7日間水耕栽培したのち、対照区、10 μ M Cd 処理区、20 μ M As^(III)処理区に移してさらに7日間栽培した。1 L 容プラスチックコンテナに培養液を入れ、20 個の穴の空いたプレートを上に乗せ、1つの穴に幼苗1株ずつを入れて根が培養液に浸るようにスポンジで固定した（図2-1-1B）。14日齢幼苗を4個体ずつを地上部と根に分けてサンプリングした。植物試料を凍結乾燥したのち、ボールミルで粉碎した。

チオールペプチドはモノブロモビマン(monobromobimane; mBBBr)で蛍光誘導体化し HPLC を用いて定量した (Sneller et al., 2000 一部改変)。植物粉末試料 10 mg を 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid; TFA) /6.3 mM ジエチレントリアミン五酢酸 (diethylene triamine pentaacetic acid; DTPA) 250 μ L と混和し、4°C で 10 分間遠心分離した。上清 125 μ L を 200 mM HEPES-KOH (pH 8.2) /6.3 mM DTPA 225 μ L と混和し、50 mM mBBBr (ジメチルスルホキシドに溶解) 10 μ L を添加して暗所、室温で1時間静置した後、1 M メタンサルホン酸 (methanesulfonic acid; MSA) 150 μ L を添加して誘導体化反応を停止した。試料は解析まで遮光して氷上に置くか冷凍保存した。

試料はコスモスピンフィルターG (孔径 0.2 μ m; ナカライテスク) を通したのち、20 μ L を HPLC (LC-10AS; 島津製作所) に供試した。Hypersil ODS C18 カラム (粒子径 5 μ m, 4.6 mm x 250 mm; Thermo Fisher Scientific) を使い、流速 0.5 mL/min で水とメタノールのグラジエントで溶出した。溶離液 A は 10% (v/v) メタノール/0.05% TFA、溶離液 B は 80%メタノール/0.05% TFA を使い、グラジエント溶出のタイムプログラムを次のように設定した (0 min, 溶離液 B 28%; 15 min, 30%; 30 min, 40%; 35 min, 45%; 40 min, 58%; 45 min, 75%; 48 min, 90%; 49 min, 100%; 55 min, 28%; 60 min, 28%)。チオール誘導体は蛍光検出器 (RF-10A_{XL}; 島津製作所) を用いて励起波長 380 nm、蛍光波長 470 nm で検出した。標品としてグルタチオン (ナカライテスク)、PC₂、PC₄、ヒドロキシメチルグルタチオン (hmGSH; γ Glu-Cys-Ser)、 γ Glu-Cys (γ EC)、 γ Glu-Cys-Glu (γ ECE) (ハイペップ研究所) の人工合成品を用いて溶出ピークを同定した。ヒドロキシメチル PC₂ [hmPC₂; (γ Glu-Cys)₂-Ser] は、第2章 第2節の酵素反応の生成物からピークを同定した。グルタチオンと PC₂ 標品の検量線を用いて定量した。

- ・ 遺伝子断片の増幅とシーケンス

遺伝子の配列を決定するため、イネ（品種：日本晴）cDNA を鋳型とし Polymerase Chain Reaction (PCR) で目的の遺伝子断片を増幅した。DNA ポリメラーゼは Blend Taq (東洋紡) を使い、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (タカラバイオ) で PCR 増幅した。PCR 産物の一部を 1% (w/v) アガロースゲルで電気泳動し、増幅断片の特異性とサイズを確認した。PCR 産物を Mag Extractor (東洋紡) で精製し、シーケンス解析 (ファスマック) を行った。PCR とシーケンスに用いたプライマーの配列を表2-1-2に示した。

・ 遺伝子発現量解析

イネ（品種：日本晴）を対照区、10 μ M Cd 処理区、10 μ M As^(III)処理区で10日間水耕栽培し、幼苗からRNAを抽出した。1つのフロートあたり種子10粒を播種し、3個体をまとめて地上部サンプルとして、残りは根サンプルとして、乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で磨砕した。粉末試料から Plant Total RNA Extraction MiniPrep System (VIOGENE)を用いて total RNAを抽出した。抽出 RNA 溶液中のゲノム DNA を Recombinant DNase I (タカラバイオ) で消化したのち、オリゴ(dT)₂₀ プライマーと逆転写酵素 ReverTra Ace (東洋紡)を用いて一本鎖 cDNA を合成した。

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) と Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ) を用い、cDNA を鋳型として、遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。*Ubiquitin* と *Actin1* の発現量の相乗平均の値を内部標準として $\Delta\Delta C_t$ 法で相対発現量を算出した。トランスクリプトバリエーション別での解析では、cDNA の濃度を8段階 (2^3 - 2^{10} 倍) に希釈したものを鋳型として各バリエーション特異的プライマーの増幅効率を算出した上で、バリエーションの発現量を補正した。発現量解析に用いたプライマーの配列を表2-1-2に示した。

表2-1-2 シーケンスと遺伝子発現量解析に用いたプライマー

クローニングとシーケンス解析	
PCS1.seq1F	5'-CCAGACTGGAACAGGGCATT-3'
PCS1.seq2F	5'-GCCCTACCCTATCCAGCCTA-3'
PCS1.seqR	5'-AGGACGAGCTAAGTGTGCTT-3'
PCS2.seqF	5'-AAGCAAGACGCGTCAAATCT-3'
PCS2.seq1R	5'-GAAACTTTTGCAAGGACACCA-3'
PCS2.seq2R	5'-TTTGACAACCTCGTTGCTTG-3'
遺伝子発現量解析	
PCS1-1.ex-F	5'-AACTGGAGATATTGCACCTAAGGA-3'
PCS1-1.ex-R	5'-GCCCAGTGAACAGCGAAA-3'
PCS1-1.2.ex-F	5'-GCATGGCAAAGTATTGCATAGAAG-3'
PCS1-1.2.ex-R	5'-TCCAGCATTGGGAGGAAGA-3'
PCS1-3.ex-F	5'-GGCTTCTCAGGGGTGGTAAA-3'
PCS1-4.ex-F	5'-CTTTATTGATCCGTGCAGTGGTA-3'
PCS1-3.4.ex-R	5'-ATCCTCCTTCCTCTTGTCTCCTAAC-3'
PCS2-1.ex-F	5'-CATTGCTCTACACAGTGAGTTGC-3'
PCS2-1.ex-R	5'-ATTTCACTAAGCGGGACAGAAG-3'
PCS2-2.3.ex-F	5'-TTTGGGAAGCCATGAATACAAC-3'
PCS2-2.3.ex-R	5'-TTTCATCTCTGCAACTCTGCAC-3'
Ubiquitin. F	5'-AGAAGGAGTCCACCCTCCACC-3'
Ubiquitin. R	5'-GCATCCAGCACAGTAAAACACG-3'
Actin1. F	5'-ATCCTTGTATGCTAGCGGTCGA-3'
Actin1. R	5'-ATCCAACCGGAGGATAGCATG-3'
PCS1.total.ex-F	5'-TCGCTTCAAATACCCTCCTCA-3'
PCS1.total.ex-R	5'-TCACTGCACGGATCAATAAAGG-3'
PCS2.total.ex-F	5'-CTTTGGGAAGCCATGAATACAAC-3'
PCS2.total.ex-R	5'-TTCCAGCTTTCATCTCTGCAAC-3'

【結果】

・ カドミウムとヒ素によるファイトケラチンの合成誘導

イネ（品種：日本晴）幼苗の根におけるチオールペプチドの含有率を測定した（図2-1-2）。カドミウムやヒ素を含まない対照区ではグルタチオンとヒドロキシメチルグルタチオンが主要なチオールペプチドであり γ EC もわずかに検出されたが、ファイトケラチン類は検出されなかった。カドミウム処理区ではグルタチオンやファイトケラチンの合成が誘導されたが、特にヒドロキシメチルグルタチオン（hmGSH; γ Glu-Cys-Ser）の蓄積が著しく、ファイトケラチン（PC₂; $(\gamma$ Glu-Cys)₂-Gly）やヒドロキシメチルファイトケラチン（hmPC₂; $(\gamma$ Glu-Cys)₂-Ser）の含有率の増加は限定的であった。亜ヒ酸処理区でも合成が誘導されたが、カドミウム処理区と比べると特にファイトケラチン類（PC₂, hmPC₂）と γ EC の含有率が著しく増加した。

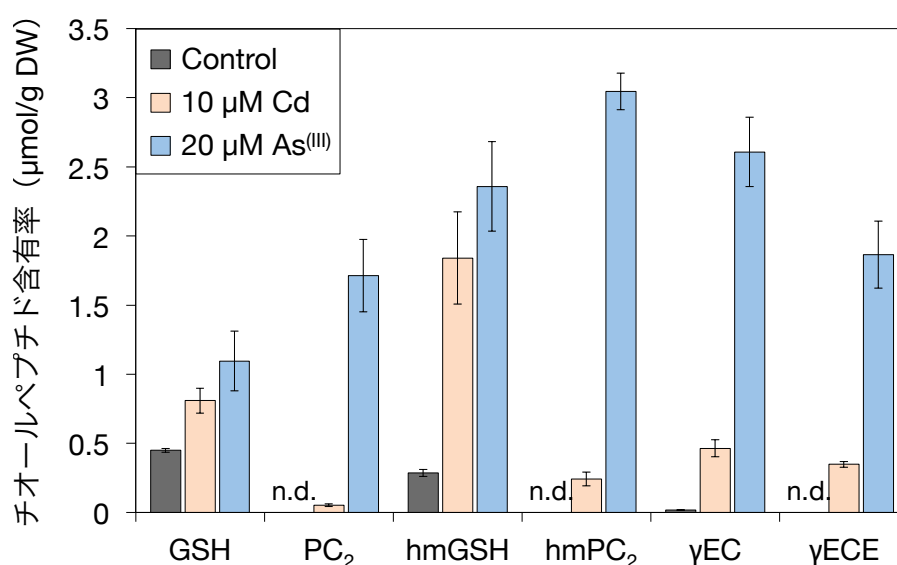


図2-1-2 カドミウムとヒ素によるチオールペプチドの合成誘導

イネ幼苗の根におけるチオールペプチドの含有率。日本晴を通常条件で7日間水耕栽培したのち、対照区、10 μ M Cd 処理区、20 μ M As^(III)処理区に移してさらに7日間栽培した。チオールペプチドを抽出し、HPLC で定量した。値は平均値 \pm SE で示した（対照区, n = 3; Cd, As, n = 4）。グルタチオン（GSH, γ Glu-Cys-Gly）、PC₂ [$(\gamma$ Glu-Cys)₂-Gly]、ヒドロキシメチルグルタチオン（hmGSH, γ Glu-Cys-Ser）、hmPC₂ [$(\gamma$ Glu-Cys)₂-Ser]、 γ グルタミルシステイン（ γ EC, γ Glu-Cys）、 γ グルタミルシステイニルグルタミン酸（ γ ECE, γ Glu-Cys-Glu）。

・ 相同性検索と遺伝子配列の予測

シロイヌナズナのファイトケラチン合成酵素遺伝子 *AtPCS1* (accession no. AF093753) の推定アミノ酸配列を問い合わせ配列として Rice Annotation Project Database (RAP-DB) で Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 検索を行ったところ、2つの遺伝子 *Os05g0415200* (*OsPCS1*), *Os06g0102300* (*OsPCS2*) がヒットした。双方のトランスクリプト配列 (*OsPCS1*: AF439787; *OsPCS2*: AK071754, AK071958) のコード領域は既報の植物の PCS 配列の半分程度の長さしかなく、完全長のコード領域を含んでいない可能性が考えられた。

OsPCS1 について、トランスクリプト配列 AF439787 のコード領域 (741 bp) は *AtPCS1* の N 末端側半分の配列に相当した。この配列 AF439787 を問い合わせ配列として National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Expressed Sequence Tag (EST) データベースを対象として BLAST 検索を行ったところ、8つの cDNA 断片配列 (CB646798, CK083842, CB646799, CI275800, CI126777, C96924, CI067086, CI226673) が見つかった。これら断片配列と *OsPCS1* のゲノム配列をアラインメントすると (図 2-1-3 A)、完全長と思われるコード領域 (1560 bp) を含む推定トランスクリプト配列 (*OsPCS1#1*) が予測された。

OsPCS2 について、トランスクリプト配列 AK071754 のコード領域 (783 bp) は *AtPCS1* の N 末端側半分の配列に相当し、AK071958 のコード領域 (1083 bp) は開始コドンを含まないが *AtPCS1* の C 末端側半分の配列に相当した。これらトランスクリプト配列と *OsPCS2* のゲノム配列をアラインメントすると (図 2-1-3 B)、完全長と思われるコード領域 (1509 bp) を含む推定トランスクリプト配列 (*OsPCS2#1*) が予測された。

推定トランスクリプト配列 (*OsPCS1#1*, *OsPCS2#1*) はどちらもスプライシングの GT-AG 則に合致したエクソン、イントロンの配置であった (図 2-1-3)。

(A) OsPCS1

```
Genome 161>TTTTGCCGAATGGCGTCTAAACCAAGCAGCCGAGCGGAAAGCAACCAGGCGGCGGCGGCGGTGCCGTCGCTGTACGGGC>240
CB646798 1>~~~~~ATGGCGTCTAAACCAAGCAGCCGAGCGGAAAGCAACCAGGCGGCGGCGGCGGTGCCGTCGCTGTACGGGC>70
OsPCS1#1 161>TTTTGCCGAATGGCGTCTAAACCAAGCAGCCGAGCGGAAAGCAACCAGGCGGCGGCGGCGGTGCCGTCGCTGTACGGGC>240
OsPCS1#2 1>~~~~~ATGGCGTCTAAACCAAGCAGCCGAGCGGAAAGCAACCAGGCGGCGGCGGCGGTGCCGTCGCTGTACGGGC>70
OsPCS1#3 1>~~~~~ATGGCGTCTAAACCAAGCAGCCGAGCGGAAAGCAACCAGGCGGCGGCGGCGGTGCCGTCGCTGTACGGGC>70
OsPCS1#4 1>~~~~~ATGGCGTCTAAACCAAGCAGCCGAGCGGAAAGCAACCAGGCGGCGGCGGCGGTGCCGTCGCTGTACGGGC>70
      * * * * *
      * * * * *

Genome 641>GGATTGCCATCTCGTCGCCTCCTACCACCGGAAGCTTCTCGGCCAGTTGCTGCCTGCTCGCCACCTCTCTCGGAAC>720
CB646798 471>GGATTGCCATCTCGTCGCCTCCTACCACCGGAAGCTTCTCGGCCAG----->516
OsPCS1#1 641>GGATTGCCATCTCGTCGCCTCCTACCACCGGAAGCTTCTCGGCCAG----->686
OsPCS1#2 471>GGATTGCCATCTCGTCGCCTCCTACCACCGGAAGCTTCTCGGCCAG----->516
OsPCS1#3 471>GGATTGCCATCTCGTCGCCTCCTACCACCGGAAGCTTCTCGGCCAG----->516
OsPCS1#4 471>GGATTGCCATCTCGTCGCCTCCTACCACCGGAAGCTTCTCGGCCAG----->516
      * * * * *
      * * * * *

Genome 721>TCGAATTCGACGATTTCTGTTGCTGTTCTGTAACGAATGATGTTGTTGATTGATGACAGACTGGAACAGGGCA>800
CB646798 517>-----ACTGGAACAGGGCA>530
OsPCS1#1 687>-----ACTGGAACAGGGCA>700
OsPCS1#2 517>-----ACTGGAACAGGGCA>530
OsPCS1#3 517>-----ACTGGAACAGGGCA>530
OsPCS1#4 517>-----ACTGGAACAGGGCA>530
      * * * * *
      * * * * *

Genome 881>ATTGGATTCCGCTGCCGCTTCTTTGGGAAGCCATGAACACGATTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGGATATATATTC>960
CB646798 611>ATTGGATTCCGCTGCCGCTTCTTTGGGAAGCCATGAACACGATTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGG----->680
OsPCS1#1 781>ATTGGATTCCGCTGCCGCTTCTTTGGGAAGCCATGAACACGATTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGG----->850
OsPCS1#2 611>ATTGGATTCCGCTGCCGCTTCTTTGGGAAGCCATGAACACGATTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGG----->680
OsPCS1#3 611>ATTGGATTCCGCTGCCGCTTCTTTGGGAAGCCATGAACACGATTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGG----->680
OsPCS1#4 611>ATTGGATTCCGCTGCCGCTTCTTTGGGAAGCCATGAACACGATTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGG----->680
      * * * * *
      * * * * *

Genome 1761>GTTTAAACATGTCGGCATCTTCATATTTGGTAGGTTTCATGCTTATCTCAAGGAATACTGAAGCTCCTTTATTGATCCGTGC>1840
CB646798 681>-----GTTTCATGCTTATCTCAAGGAATACTGAAGCTCCTTTATTGATCCGTGC>728
OsPCS1#1 851>-----GTTTCATGCTTATCTCAAGGAATACTGAAGCTCCTTTATTGATCCGTGC>898
OsPCS1#2 681>-----GTTTCATGCTTATCTCAAGGAATACTGAAGCTCCTTTATTGATCCGTGC>728
OsPCS1#3 680>-----GTTTCATGCTTATCTCAAGGAATACTGAAGCTCCTTTATTGATCCGTGC>680
OsPCS1#4 681>-----GTTTCATGCTTATCTCAAGGAATACTGAAGCTCCTTTATTGATCCGTGC>728
      * * * * *
      * * * * *

Genome 1841>AGTGGTAAATTAACATGCCAATGCTTGGTGAATCAAATATGTAAGTGTCAAGTGTACCCTTGATCTATTTTTTTCTCAT>1920
CB646798 729>AGTG----->732
OsPCS1#1 899>AGTG----->902
OsPCS1#2 729>AGTG----->732
OsPCS1#3 681>--TGGTAAATTAACATGCCAATGCTTGGTGAATCAAATAT----->718
OsPCS1#4 729>AGTGGTAAATTAACATGCCAATGCTTGGTGAATCAAATAT----->768
      * * * * *
      * * * * *

Genome 1921>TCCTTTCAATGCTATGCAGAAATGTCAGGGATGAAAGCTGGCAAAGCATGGCAAAGTATTGCATAGAAAGTTGCCAAATC>2000
CB646798 733>-----AATTGCAGGGATGAAAGCTGGCAAAGCATGGCAAAGTATTGCATAGAAAGTTGCCAAATC>2400
CK083842 8>-----AGAAAGTTGCCAAATC>24
OsPCS1#1 903>-----AATTGCAGGGATGAAAGCTGGCAAAGCATGGCAAAGTATTGCATAGAAAGTTGCCAAATC>963
OsPCS1#2 733>-----AATTGCAGGGATGAAAGCTGGCAAAGCATGGCAAAGTATTGCATAGAAAGTTGCCAAATC>793
OsPCS1#3 718>-----AATTGCAGGGATGAAAGCTGGCAAAGCATGGCAAAGTATTGCATAGAAAGTTGCCAAATC>718
OsPCS1#4 768>-----AATTGCAGGGATGAAAGCTGGCAAAGCATGGCAAAGTATTGCATAGAAAGTTGCCAAATC>768
      * * * * *
      * * * * *

Genome 2001>TTTTGAGGGATAACAGCGTAGACAATGCTTAAACAATTTCTTCCCGTTTAGTGAATCATCTTCTCCCAATGCTGGAAAT>2080
CK083842 25>TTTTGAGGGATAACAGCGTAGACAATGCTTAAACAATTTCTTCCCGTTTAGTGAATCATCTTCTCCCAATGCTGGAAAT>104
OsPCS1#1 964>TTTTGAGGGATAACAGCGTAGACAATGCTTAAACAATTTCTTCCCGTTTAGTGAATCATCTTCTCCCAATGCTGGAAAT>1043
OsPCS1#2 794>TTTTGAGGGATAACAGCGTAGACAATGCTTAAACAATTTCTTCCCGTTTAGTGAATCATCTTCTCCCAATGCTGGAAAT>873
OsPCS1#3 719>-----TGAATCATCTTCTCCCAATGCTGGAAAT>747
OsPCS1#4 769>-----TGAATCATCTTCTCCCAATGCTGGAAAT>797
      * * * * *
      * * * * *

Genome 2161>CCTGAAGTCAATTTAATTTCCATTTCTGTTGTTGGGTCAGTTTGTCTTCTGTTCAACCAGTTAATGTTGATGTT>2240
CK083842 185>CCTGAAG----->191
OsPCS1#1 1124>CCTGAAG----->1130
OsPCS1#2 954>CCTGAAG----->960
OsPCS1#3 828>CCTGAAG----->834
OsPCS1#4 878>CCTGAAG----->884
      * * * * *
      * * * * *

Genome 2241>CGCTTGCAGGAAAAGGTCCTACAGCAATCCGTGATACTAAGCTTTTTTCAGCTGGTCCACAACTGCAATGTTCTAAGCA>2320
CK083842 192>-----GAAAAGATCCTACAGCAATCCGTGATACTAAGCTTTTTTCAGCTGGTCCACAACTGCAATGTTCTAAGCA>262
CB646798 794<-----GCAATCCGTGATACTAAGCTTTTTTCAGCTGGTCCACAACTGCAATGTTCTAAGCA>739
OsPCS1#1 1131>-----GAAAAGTCTTACAGCAATCCGTGATACTAAGCTTTTTTCAGCTGGTCCACAACTGCAATGTTCTAAGCA>1201
OsPCS1#2 961>-----GAAAAGTCTTACAGCAATCCGTGATACTAAGCTTTTTTCAGCTGGTCCACAACTGCAATGTTCTAAGCA>1031
OsPCS1#3 835>-----GAAAAGTCTTACAGCAATCCGTGATACTAAGCTTTTTTCAGCTGGTCCACAACTGCAATGTTCTAAGCA>905
OsPCS1#4 885>-----GAAAAGTCTTACAGCAATCCGTGATACTAAGCTTTTTTCAGCTGGTCCACAACTGCAATGTTCTAAGCA>955
      * * * * *
      * * * * *
```

Genome 2321>GCCCTGTTGTAGTTGCTCGTCTTTAACGGACGAAGATTCATTTCCAGATTGCAGCCAGTGTGTGCTGTGAAGCAACCG>2400
 CK083842 263>GCCCTGTTGTAGTTGCTCGTCTTTAACGGACGAAGATTCATTTCCAGATTGCAGCCAGTGTGTGCTGTGAAGCAACCG>342
 CB646799 738<GCCCTGTTGTAGTTGCTCGTCTTTAACGGACGAAGATTCATTTCCAGATTGCAGCCAGTGTGTGCTGTGAAGCAACCG>659
 OsPCS1#1 1202>GCCCTGTTGTAGTTGCTCGTCTTTAACGGACGAAGATTCATTTCCAGATTGCAGCCAGTGTGTGCTGTGAAGCAACCG>1281
 OsPCS1#2 1032>GCCCTGTTGTAGTTGCTCGTCTTTAACGGACGAAGATTCATTTCCAGATTGCAGCCAGTGTGTGCTGTGAAGCAACCG>1111
 OsPCS1#3 906>GCCCTGTTGTAGTTGCTCGTCTTTAACGGACGAAGATTCATTTCCAGATTGCAGCCAGTGTGTGCTGTGAAGCAACCG>985
 OsPCS1#4 956>GCCCTGTTGTAGTTGCTCGTCTTTAACGGACGAAGATTCATTTCCAGATTGCAGCCAGTGTGTGCTGTGAAGCAACCG>1035

* * * * *
 * * * * *

Genome 2481>GAGGGGCTTAAAAATGTCATTACAGGCCAAAGTGGTATCTGAAGGCAATGGACATGTTGATAAGCTTTCACCGATATCCTC>2560
 CK083842 423>GAGGGGCTTAAAAATGTCATTACAGGCCAAAGTGGTATCTGAAGGCAATGGACATGTTGATAAGCTTTCACCGATATCCTC>502
 CB646799 578<GAGGGGCTTAAAAATGTCATTACAGGCCAAAGTGGTATCTGAAGGCAATGGACATGTTGATAAGCTTTCACCGATATCCTC>499
 OsPCS1#1 1362>GAGGGGCTTAAAAATGTCATTACAGGCCAAAGTGGTATCTGAAGGCAATGGACATGTTGATAAGCTTTCACCGATATCCTC>1441
 OsPCS1#2 1192>GAGGGGCTTAAAAATGTCATTACAGGCCAAAGTGGTATCTGAAGGCAATGGACATGTTGATAAGCTTTCACCGATATCCTC>1271
 OsPCS1#3 1066>GAGGGGCTTAAAAATGTCATTACAGGCCAAAGTGGTATCTGAAGGCAATGGACATGTTGATAAGCTTTCACCGATATCCTC>1145
 OsPCS1#4 1116>GAGGGGCTTAAAAATGTCATTACAGGCCAAAGTGGTATCTGAAGGCAATGGACATGTTGATAAGCTTTCACCGATATCCTC>1195

* * * * *
 * * * * *

Genome 2561>GACTGAAACATGCTTCTGCAATTCAACTCTGAGCAATGAAA-CTGTC-AATTATCCATCAAACACAGAC-ATTCTAACTG>2637
 CK083842 503>GACTGAAACATGCTTCTGCAATTCAACTCTGAGCAATGAAA-CTGTC-AATTATCCATCAAACACAGAC-ATTCTAACTG>579
 CB646799 498<GACTGAAACATGCTTCTGCAATTCAACTCTGAGCAATGAAA-CTGTC-AATTATCCATCAAACACAGAC-ATTCTAACTG>422
 C96924 32>----AAACATGCTTCTGCAATTCAACTCTGAGCAATGAAA-CTGTC-AATTATCCATCAAACACAGAC-ATTCTAACTG>106
 OsPCS1#1 1442>GACTGAAACATGCTTCTGCAATTCAACTCTGAGCAATGAAA-CTGTC-AATTATCCATCAAACACAGAC-ATTCTAACTG>1518
 OsPCS1#2 1272>GACTGAAACATGCTTCTGCAATTCAACTCTGAGCAATGAAA-CTGTC-AATTATCCATCAAACACAGAC-ATTCTAACTG>1348
 OsPCS1#3 1146>GACTGAAACATGCTTCTGCAATTCAACTCTGAGCAATGAAA-CTGTC-AATTATCCATCAAACACAGAC-ATTCTAACTG>1222
 OsPCS1#4 1196>GACTGAAACATGCTTCTGCAATTCAACTCTGAGCAATGAAA-CTGTC-AATTATCCATCAAACACAGAC-ATTCTAACTG>1272

* * * * *
 * * * * *

Genome 2638>TTCTATTACTGTCGTACATCCTAGCACATGGTTGTGCATTGAAGATGAGAAGTTGAAAGCTGAATTCAGAGCCTTGT>2717
 CK083842 580>TTCTATTACTG~>590
 CB646799 421<TTCTATTACTGTCGTACATCCTAGCACATGGTTGTGCATTGAAGATGAGAAGTTGAAAGCTGAATTCAGAGCCTTGT>342
 C96924 107>TTCTATTACTGTCGTACATCCTAGCACATGGTTGTGCATTGAAGATGAGAAGTTGAAAGCTGAATTCAGAGCCTTGT>186
 OsPCS1#1 1519>TTCTATTACTGTCGTACATCCTAGCACATGGTTGTGCATTGAAGATGAGAAGTTGAAAGCTGAATTCAGAGCCTTGT>1598
 OsPCS1#2 1349>TTCTATTACTGTCGTACATCCTAGCACATGGTTGTGCATTGAAGATGAGAAGTTGAAAGCTGAATTCAGAGCCTTGT>1428
 OsPCS1#3 1223>TTCTATTACTGTCGTACATCCTAGCACATGGTTGTGCATTGAAGATGAGAAGTTGAAAGCTGAATTCAGAGCCTTGT>1302
 OsPCS1#4 1273>TTCTATTACTGTCGTACATCCTAGCACATGGTTGTGCATTGAAGATGAGAAGTTGAAAGCTGAATTCAGAGCCTTGT>1352

* * * * *
 * * * * *

Genome 2718>TCTACGGACGATCTTCTGATCCTCTTAACTGGAGGTGTGCTGCTCCTAGAACCTTGCAATGATTGTTTACCT>2797
 CB646799 341<TCTACGGACGATCTTCTGATCCTCTTAACTGGAG----->306
 C96924 187>TCTACGGACGATCTTCTGATCCTCTTAACTGGAG----->222
 OsPCS1#1 1599>TCTACGGACGATCTTCTGATCCTCTTAACTGGAG----->1634
 OsPCS1#2 1429>TCTACGGACGATCTTCTGATCCTCTTAACTGGAGGTGTGCTGCTCCTAGAACCTTGCAATTCGA~>1497
 OsPCS1#3 1303>TCTACGGACGATCTTCTGATCCTCTTAACTGGAGGTGTGCTGCTCCTAGAACCTTGCAATTCGA~>1371
 OsPCS1#4 1353>TCTACGGACGATCTTCTGATCCTCTTAACTGGAGGTGTGCTGCTCCTAGAACCTTGCAATTCGA~>1421

* * * * *
 * * * * *

Genome 3358>TCTATTCTAAGTAGAGCTACTATTTATATTGACAGATATTGCACCTAAGGAGGCAGCTCCGTTATCTGAAGGCTTGTAGA>3437
 CB646799 305<-----ATATTGCACCTAAGGAGGCAGCTCCGTTATCTGAAGGCTTGTAGA>261
 C96924 223>-----ATATTGCACCTAAGGAGGCAGCTCCGTTATCTGAAGGCTTGTAGA>267
 OsPCS1#1 1635>-----ATATTGCACCTAAGGAGGCAGCTCCGTTATCTGAAGGCTTGTAGA>1679

* * * * *
 * * * * *

Genome 3438>GAAAAGGAGGCATATGAAGATACTTGGCCACAACCTTGGGAACAATGCTAACATGGCAACCCACTCACTTAATAATGAAT>3517
 CB646799 260<GAAAAGGAGGCATATGAAGATACTTGGCCACAACCTTGGGAACAATGCTAACATGGCAACCCACTCACTTAATAATGAAT>181
 C96924 268>GAAAAGGAGGCATATGAAGATACTTGGCCACAACCTTGGGAACAATGCTAACATGGCAACCCACTCACTTAATAATGAAT>347
 OsPCS1#1 1680>GAAAAGGAGGCATATGAAGATACTTGGCCACAACCTTGGGAACAATGCTAACATGGCAACCCACTCACTTAATAATGAAT>1759

* * * * *
 * * * * *

(B) OsPCS2

* * * * *
 * * * * *

Genome 81>AGAGAAGCAGCGATCCGATCGCCGGCAGCAGCAATCTGTGCCGGGGCGGAGGAGGAGCGGCGATGGCAGCGATGG>160
 OsPCS2#1 81>AGAGAAGCAGCGATCCGATCGCCGGCAGCAGCAATCTGTGCCGGGGCGGAGGAGGAGCGGCGATGGCAGCGATGG>160
 OsPCS2#2 81>AGAGAAGCAGCGATCCGATCGCCGGCAGCAGCAATCTGTGCCGGGGCGGAGGAGGAGCGGCGATGGCAGCGATGG>160
 AK071958 0>~>0
 OsPCS2#3 1>~>13

* * * * *
 * * * * *

Genome 561>CTCTGCCTCCTCCAGGACTGCCATCTCATCGCATCTACCACAGGAAGCCTTTCAAACAGTTGTTTTTGTAAATCCTT>640
 OsPCS2#1 561>CTCTGCCTCCTCCAGGACTGCCATCTCATCGCATCTACCACAGGAAGCCTTTCAAACAG----->621
 OsPCS2#2 561>CTCTGCCTCCTCCAGGACTGCCATCTCATCGCATCTACCACAGGAAGCCTTTCAAACAG----->621
 AK071958 0>~>0
 OsPCS2#3 414>CTCTGCCTCCTCCAGGACTGCCATCTCATCGCATCTACCACAGGAAGCCTTTCAAACAG----->474

* * * * *
 * * * * *

Genome 641>CTCTTCTTCAATTTCAAGGTCTTAATAACCAACCAATTTATCATTCGATTGCATTTCAAGTGGAAACCGGCCATTTCTCTC>720
 OsPCS2#1 622>-----ACTGGAACCGGCCATTTCTCTC>643
 OsPCS2#2 622>-----ACTGGAACCGGCCATTTCTCTC>643
 AK071958 1>~>71
 OsPCS2#3 475>-----ACTGGAACCGGCCATTTCTCTC>496

* * * * *
 * * * * *

```

* * * * *
Genome 801>CCACTCCCCTGCTTTGGGAAGCCATGAATACAACCTGATGACGCAACTGGTCTACTCAGGGGGTCTCTTCTCTACCCATC>880
OsPCS2#1 724>CCACTCCCCTGCTTTGGGAAGCCATGAATACAACCTGATGACGCAACTGGTCTACTCAGGGG----->785
OsPCS2#2 724>CCACTCCCCTGCTTTGGGAAGCCATGAATACAACCTGATGACGCAACTGGTCTACTCAGGGG----->785
AK071958 152>CCACTCCCCTGCTTTGGGAAGCCATGAATACAACCTGATGACGCAACTGGTCTACTCAGGGG----->213
OsPCS2#3 577>CCACTCCCCTGCTTTGGGAAGCCATGAATACAACCTGATGACGCAACTGGTCTACTCAGGGG----->638

* * * * *
Genome 4721>CCATCTTGATATTTGAAGGTTTCATGCTTATCTCAAGGCACACTGCAGCTCCTTCATTGCTCTACACAGTGGTAAACATGC>4800
OsPCS2#1 786>-----GTTTCATGCTTATCTCAAGGCACACTGCAGCTCCTTCATTGCTCTACACAGTG----->837
OsPCS2#2 786>-----GTTTCATGCTTATCTCAAGGCACACTGCAGCTCCTTCATTGCTCTACACAGTG----->837
AK071958 214>-----GTTTCATGCTTATCTCAAGGCACACTGCAGCTCCTTCATTGCTCTACACAGTG----->265
OsPCS2#3 639>-----GTTTCATGCTTATCTCAAGGCACACTGCAGCTCCTTCATTGCTCTACACA----->687

* * * * *
Genome 4801>CAATGCTTGGTATATCGAATTCAAGTGGGTACATTGATATAATTTCCCTTTATATCATTCCCTTTAGCTTTTGTGCAGAGTT>4880
OsPCS2#1 838>-----AGTT>841
OsPCS2#2 838>-----CTTTTGTGCAGAGTT>852
AK071958 266>-----AGTT>269
OsPCS2#3 688>-----CTTTTGTGCAGAGTT>702

* * * * *
Genome 4881>GCAGAGATGAAAGCTGGAAAAGCATGGCGAAGTATTGCATGGAAGATGTACCCGATCTTCTTAAGGATGAGAGTGTAGAC>4960
OsPCS2#1 842>GCAGAGATGAAAGCTGGAAAAGCATGGCGAAGTATTGCATGGAAGATGTACCCGATCTTCTTAAGGATGAGAGTGTAGAC>921
OsPCS2#2 853>GCAGAGATGAAAGCTGGAAAAGCATGGCGAAGTATTGCATGGAAGATGTACCCGATCTTCTTAAGGATGAGAGTGTAGAC>932
AK071958 270>GCAGAGATGAAAGCTGGAAAAGCATGGCGAAGTATTGCATGGAAGATGTACCCGATCTTCTTAAGGATGAGAGTGTAGAC>349
OsPCS2#3 703>GCAGAGATGAAAGCTGGAAAAGCATGGCGAAGTATTGCATGGAAGATGTACCCGATCTTCTTAAGGATGAGAGTGTAGAC>782

* * * * *
Genome 5041>TAGGAGACAAGAGGAAGGAGGATCAGGATTAAGCAAAGAGGAGGAAGAAAGGCTTATTTTGAAGGTCATCTTCAACCTTT>5120
OsPCS2#1 1002>TAGGAGACAAGAGGAAGGAGGATCAGGATTAAGCAAAGAGGAGGAAGAAAGGCTTATTTTGAAG----->1065
OsPCS2#2 1013>TAGGAGACAAGAGGAAGGAGGATCAGGATTAAGCAAAGAGGAGGAAGAAAGGCTTATTTTGAAG----->1076
AK071958 430>TAGGAGACAAGAGGAAGGAGGATCAGGATTAAGCAAAGAGGAGGAAGAAAGGCTTATTTTGAAG----->493
OsPCS2#3 863>TAGGAGACAAGAGGAAGGAGGATCAGGATTAAGCAAAGAGGAGGAAGAAAGGCTTATTTTGAAG----->926

* * * * *
Genome 5121>TCTTTTCAATCTGGGATTCTGGATCAGAATTTCTTTTTGTCTCTTTTAAACACACCTTACACTGTGTGCACTTGCAGGAA>5200
OsPCS2#1 1066>-----GAA>1068
OsPCS2#2 1077>-----GAA>1079
AK071958 494>-----GAA>496
OsPCS2#3 927>-----GAA>929

* * * * *
Genome 5681>CTTCATGATGATCTTAAACGAGAGGTTTGTGTATTAATCCAAACATCCCTTGTCTCCCTACTCCCTAGCAAGATTGTTT>5760
OsPCS2#1 1549>CTTCATGATGATCTTAAACGAGAG----->1572
OsPCS2#2 1560>CTTCATGATGATCTTAAACGAGAG----->1583
AK071958 977>CTTCATGATGATCTTAAACGAGAG----->1000
OsPCS2#3 1410>CTTCATGATGATCTTAAACGAGAG----->1433

* * * * *
Genome 6481>AAAAACATTTGTTGCACTAGTTTGAATAAACATTTTGTCTGTTGACACAGATATTGCATCTAAGACGGCAACTCCATTAT>6560
OsPCS2#1 1573>-----ATATTGCATCTAAGACGGCAACTCCATTAT>1602
OsPCS2#2 1584>-----ATATTGCATCTAAGACGGCAACTCCATTAT>1613
AK071958 1001>-----ATATTGCATCTAAGACGGCAACTCCATTAT>1030
OsPCS2#3 1434>-----ATATTGCATCTAAGACGGCAACTCCATTAT>1463

* * * * *
Genome 6561>GTGAGGTCCTGTAAAGAGGAGGAATATGGAGATCCTGTGCCACAATCCCATTAACAATGATGCAAAATCGCGCAGTTGGTT>6640
OsPCS2#1 1603>GTGAGGTCCTGTAAAGAGGAGGAATATGGAGATCCTGTGCCACAATCCCATTAACAATGATGCAAAATCGCGCAGTTGGTT>1682
OsPCS2#2 1614>GTGAGGTCCTGTAAAGAGGAGGAATATGGAGATCCTGTGCCACAATCCCATTAACAATGATGCAAAATCGCGCAGTTGGTT>1693
AK071958 1031>GTGAGGTCCTGTAAAGAGGAGGAATATGGAGATCCTGTGCCACAATCCCATTAACAATGATGCAAAATCGCGCAGTTGGTT>1110
OsPCS2#3 1464>GTGAGGTCCTGTAAAGAGGAGGAATATGGAGATCCTGTGCCACAATCCCATTAAC~>1517

```

図2-1-3 OsPCSトランスクリプトバリエントのアラインメント

(A) OsPCS1 のゲノム配列と4つの cDNA 断片配列 (CB646798, CK083842, CB646799, C96924) と4つのトランスクリプト配列 (#1: LC192427, #2: LC192428, #3: LC192429, #4: AF439787) の比較。残り4つの cDNA 断片配列 (CI275800, CI126777, CI067086, CI226673) は他と重複するため省略した。(B) OsPCS2 のゲノム配列と3つのトランスクリプト配列 (#1: LC192430, #2: AK071754, #3: LC192431) とトランスクリプト部分配列 (AK071958) の比較。図中の配列は全領域ではなく、DNA 配列に違いのある領域だけを示した。白色ボックスは開始コドンまたは終始コドン、灰色ボックスはスプライシングのドナー部位 (GT) とアクセプター部位 (AG)、黒色ボックスはゲノム配列と一致しない塩基、をそれぞれ示す。

・ *OsPCS* 遺伝子断片の単離とシーケンス解析

予測したトランスクリプト配列をシーケンス解析で確認するため、推定コード領域の外側に設計したプライマーとイネ(品種:日本晴)cDNAを鋳型としてPCRを行った。*OsPCS1#1*断片は *PCS1.seq2F*, *PCS1.seqR* のプライマー組で増幅し、予測したPCR産物(1992 bp)と合致する約2 kbの断片が得られた(図2-1-4)。*OsPCS2#1*断片は *PCS2.seqF*, *PCS2.seq1R* のプライマー組で増幅し、予測したPCR産物(1886 bp)と合致する2 kb弱の断片が得られた(図2-1-4)。PCRに用いたプライマーと配列の中間付近に設計したプライマー *PCS1.seq1F*, *PCS2.seq2R* を用いてシーケンス解析を行ったところ、*OsPCS1#1* (LC192427) と *OsPCS2#1* (LC192430) 断片の塩基配列はどちらも推定した配列と完全に一致した。

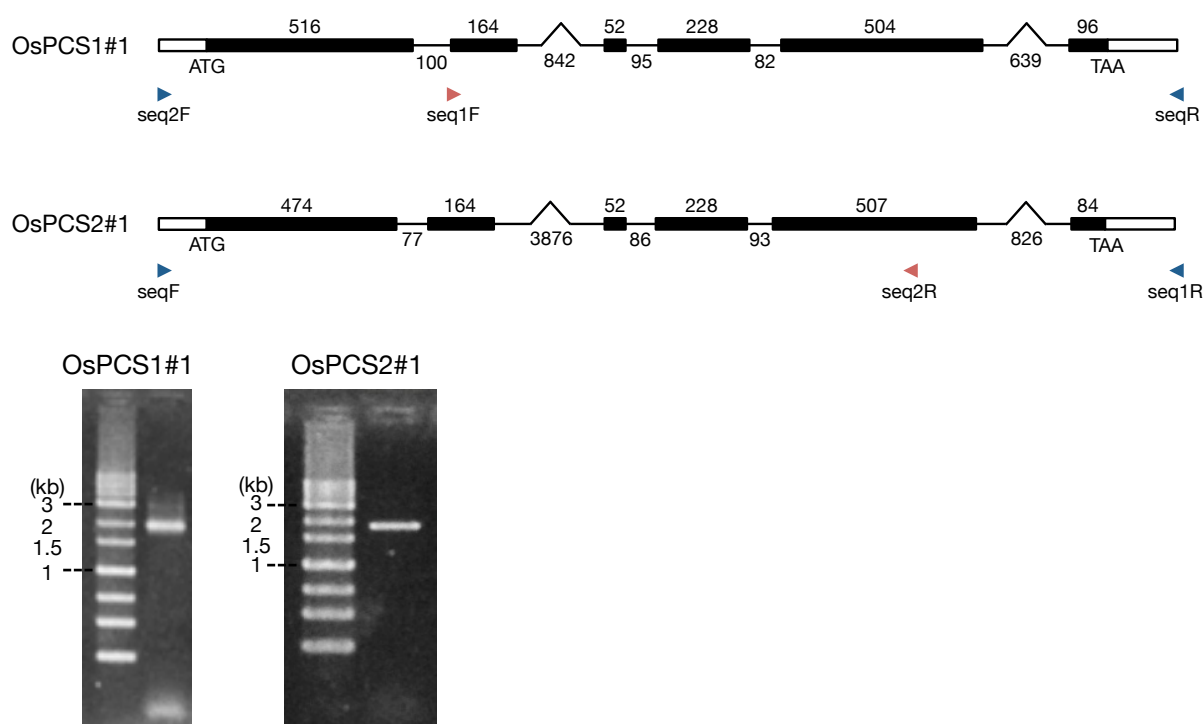


図2-1-4 *OsPCS* 遺伝子断片のクローニングの模式図と増幅断片の電気泳動

OsPCS1#1 と *OsPCS2#1* のクローニングとシーケンスに用いたプライマーの位置関係を示した。青色はPCRとシーケンスに用いたプライマー、赤色はシーケンスに用いたプライマーの位置。黒色ボックスはエクソン、白色ボックスは非翻訳領域(UTR)、線はイントロン、エクソンの上部とイントロンの下部の数字は当該領域の塩基数、をそれぞれ示す。PCR増幅産物を1%アガロースゲルで電気泳動し、ラダーと比較してサイズを確認した。

OsPCS1#1 と OsPCS2#1 の翻訳産物の推定アミノ酸配列を他の植物種のファイトケラチン合成酵素と比較した (図 2-1-5)。OsPCS1#1 と OsPCS2#1 はコムギのファイトケラチン合成酵素 TaPCS1 とそれぞれ 67.5%, 76.3% の相同性があり、シロイヌナズナ of ファイトケラチン合成酵素 AtPCS1, AtPCS2 とはそれぞれ 49.2, 46.9% (OsPCS1) , 56.5, 52.5% (OsPCS2) の相同性があった。

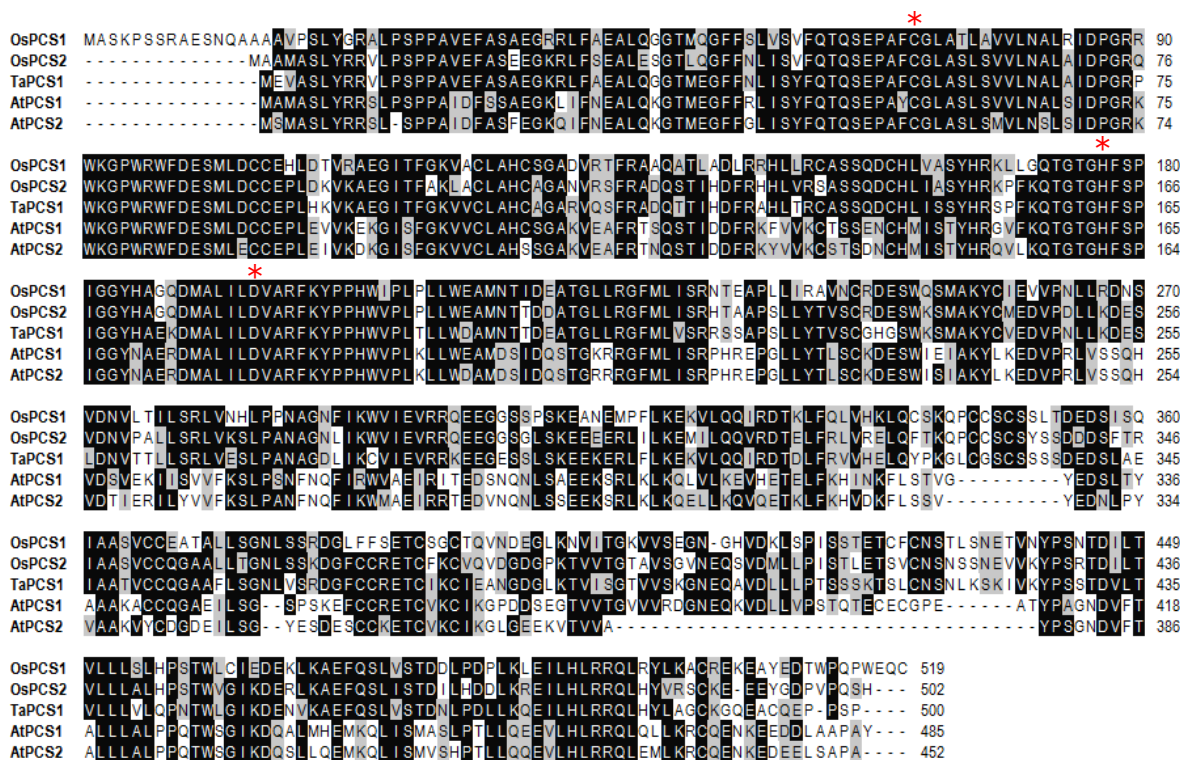


図 2-1-5 高等植物の PCS アミノ酸配列のアラインメント

イネ、コムギ、シロイヌナズナ of ファイトケラチン合成酵素遺伝子の推定アミノ酸配列を比較した。ClustalW 2.1 プログラムを用いてアラインメントを行なった。アスタリスク (*) は保存された PCS の触媒残基を示す。アクセッション番号を以下に示す。OsPCS1, LC192427; OsPCS2, LC192430; TaPCS1, AF093752; AtPCS1, AF093753; AtPCS2, AY044049

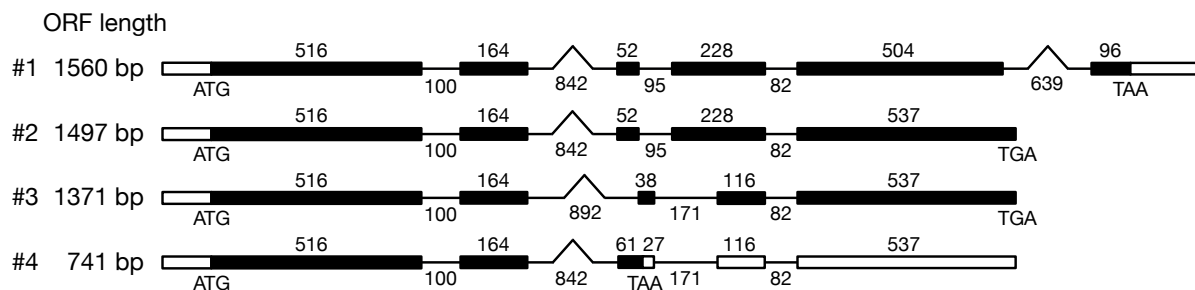
・ *OsPCS* 遺伝子のトランスクリプトバリエーション

第2章 第2節の *OsPCS* 遺伝子の完全長 Open Reading Frame (ORF) 断片を得る際の PCR 増幅とシーケンス解析から、*OsPCS1#1* と *OsPCS2#1* とは別のトランスクリプト配列が見つかった。当研究室の上田の先行研究によると、*OsPCS1* 遺伝子配列のクローニングの際、ベクター挿入断片をシーケンスしたところ 1497 bp と 1371 bp の2つの ORF 断片が見つかった (上田, 2012)。これをそれぞれ *OsPCS1#2* (LC192428) と *OsPCS1#3* (LC192429) とした。また、RAP-DB 上の *OsPCS1* トランスクリプト配列 (AF439787, ORF 741 bp) を *OsPCS1#4* とした。

OsPCS2 については、*OsPCS2#1* の完全長 ORF 断片をクローニングした際、ベクター挿入断片をシーケンス解析すると 780 bp のコード領域を含むトランスクリプト配列が見つかった。これを *OsPCS2#3* (LC192431) とした。RAP-DB 上の開始コドンを含む *OsPCS2* トランスクリプト配列 (AK071754, ORF 783 bp) を *OsPCS2#2* とした。

これらの配列はすべてスプライシングの GT-AG 則に合致したエキソン、イントロンの配置であった (図 2-1-3) ことから、選択的スプライシングにより複数のトランスクリプトが生ずると判断した (図 2-1-6)。

OsPCS1



OsPCS2

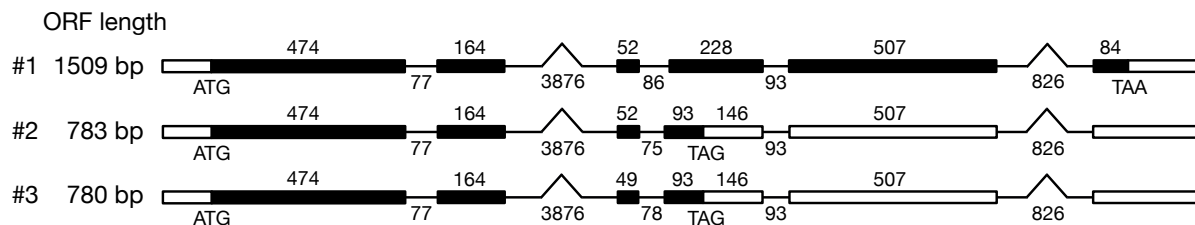


図 2-1-6 *OsPCS* トランスクリプトバリエーションの模式図

各バリエーションの ORF の長さ、エキソン、イントロンの配置を模式図で示した。黒色ボックスはエキソン、白色ボックスは UTR、線はイントロン、エキソンの上部とイントロンの下部の数字は当該領域の塩基数、をそれぞれ示す。

・ *OsPCS* トランスクリプトバリエントの発現量解析

イネ（品種：日本晴）cDNA を鋳型とした PCR とシーケンス解析から、*OsPCS1* は少なくとも4つ、*OsPCS2* は少なくとも3つのトランスクリプトバリエントを生ずることがわかった（図2-1-6）。近年、植物のイントロンを含む遺伝子のうち60%以上が選択的スプライシングを受けるといわれ、1つの遺伝子から複数の転写産物およびタンパク質が生じることで、異なる組織や発達段階における遺伝子発現変化や環境応答において重要な役割を果たすとされる（Syed et al. 2012）。そこで、金属ストレス（カドミウム、ヒ素）により *OsPCS* 遺伝子のバリエントの発現量が変化するか、それぞれのバリエントに特異的なプライマーを設計し発現量を解析した。

イネ（品種：日本晴）を対照区、10 μ M Cd 処理区、10 μ M As^(III)処理区に播種して10日間水耕栽培し、RNA を抽出してリアルタイム PCR を行った。*OsPCS1* では4つのバリエントのうち *OsPCS1#1* の発現量が大きく、対照区の根では#3, #4 の60-70倍であった（図2-1-7A）。ヒ素ストレスにより#3以外のバリエントの発現量が有意に増加したが、それぞれの変化率にはほとんど差がなく *OsPCS1#1* の発現量が最も大きいことには変わりがなかった（図2-1-7A）。カドミウムストレスによる有意な発現量変化はなかった。*OsPCS2* では3つのバリエントのうち *OsPCS2#1* の発現量が大きく、対照区の根では#2, #3 の30倍以上であった（図2-1-7B）。ヒ素ストレスにより#2と#3の発現量が有意に増加したが、*OsPCS2#1* の発現量が最も大きいことには変わりはなかった。カドミウムによる有意な発現量変化は見られなかった。

地上部でも同様に *OsPCS1* では4つのバリエントのうち *OsPCS1#1* の発現量が大きく、*OsPCS2* では3つのバリエントのうち *OsPCS2#1* の発現量が大きかった（図2-1-8）。カドミウムとヒ素による遺伝子発現への影響はなかった。

各バリエントに共通した配列のプライマーでも発現量を解析した（図2-1-9）。*OsPCS1* 遺伝子は地上部での発現量が大きい、ヒ素による発現上昇は根で見られ地上部では影響されなかった。*OsPCS2* 遺伝子は地上部と根で発現量に大きな差はなく、カドミウムとヒ素による発現量への影響もなかった。

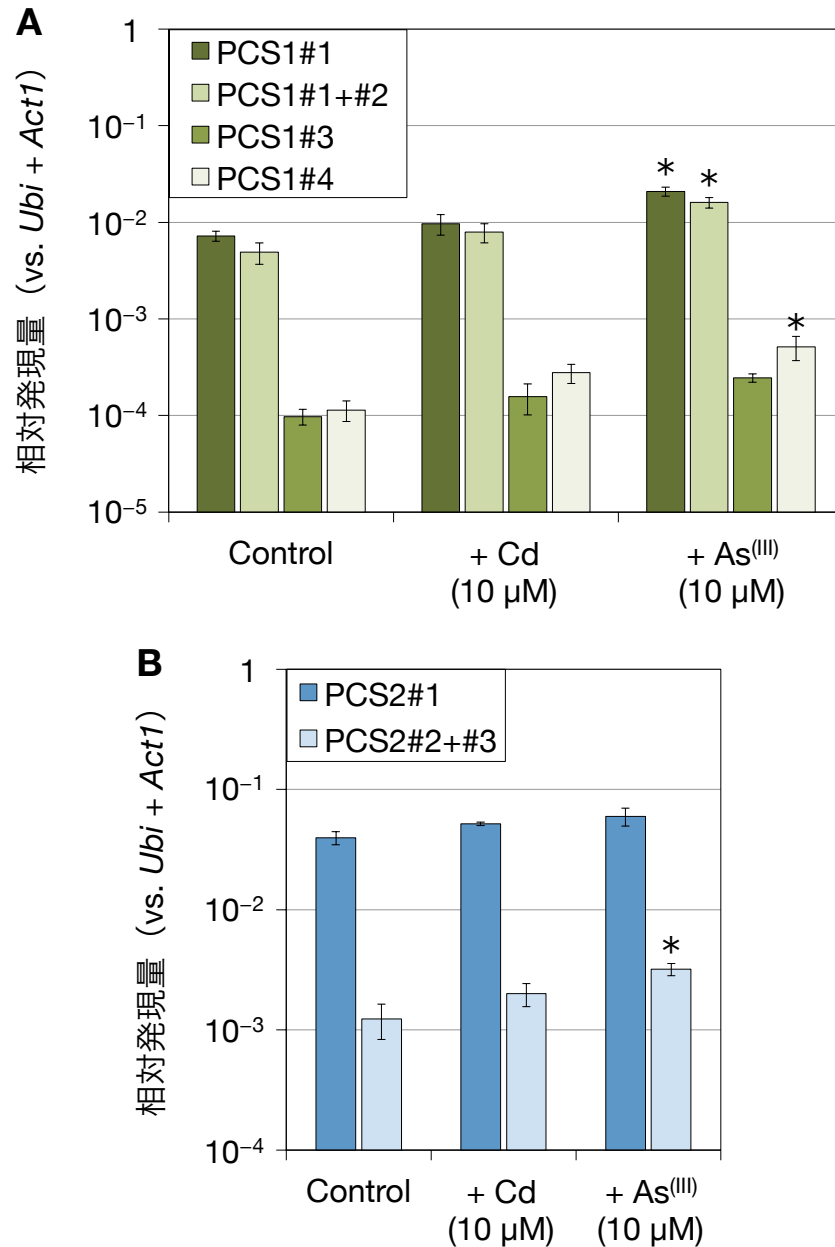


図2-1-7 根における *OsPCS* 遺伝子のバリエント別の発現量

(A) *OsPCS1* のバリエント別の発現量。(B) *OsPCS2* のバリエント別の発現量。対照区、10 μM Cd 処理区、10 μM As^(III) 処理区で栽培した 10 日齢のイネ幼苗（品種：日本晴）から RNA を抽出した。リアルタイム PCR を用いて遺伝子発現量を解析した。バリエントに特異的なプライマーを設計し、各プライマーの PCR 増幅効率を算出した上で発現量を補正した。*Ubiquitin* と *Actin1* を内部標準遺伝子として用いた。値は平均値 ± SE で示した (n = 4)。アスタリスクは対照区との有意な差を示す ($p < 0.05$, Dunnett 検定)。

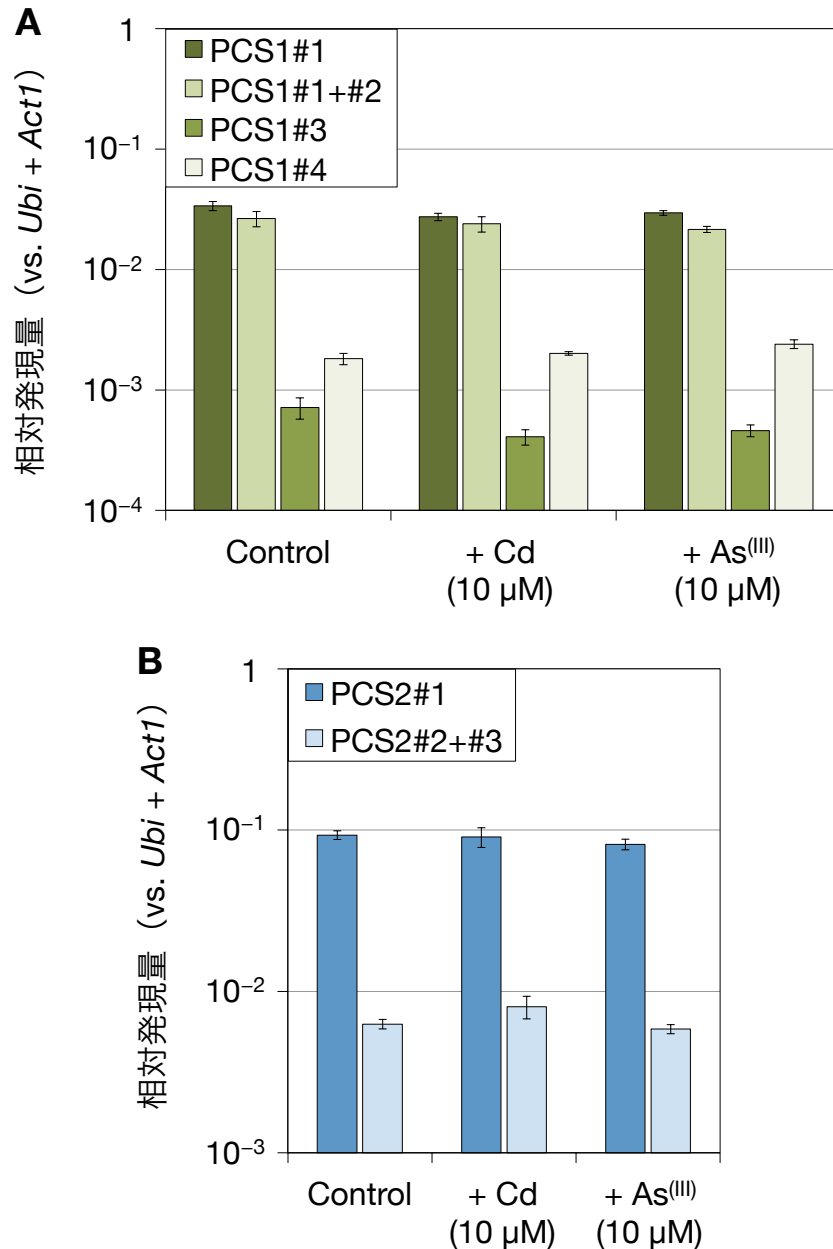


図2-1-8 地上部における *OsPCS* 遺伝子のバリエント別の発現量

(A) *OsPCS1* のバリエント別の発現量。(B) *OsPCS2* のバリエント別の発現量。対照区、10 μM Cd 処理区、10 μM As^(III) 処理区で栽培した 10 日齢のイネ幼苗（品種：日本晴）から RNA を抽出した。リアルタイム PCR を用いて遺伝子発現量を解析した。バリエントに特異的なプライマーを設計し、各プライマーの PCR 増幅効率を算出した上で発現量を補正した。*Ubiquitin* と *Actin1* を内部標準遺伝子として用いた。値は平均値 ± SE で示した (n = 4)。対照区との有意な差はなかった (Dunnett 検定)。

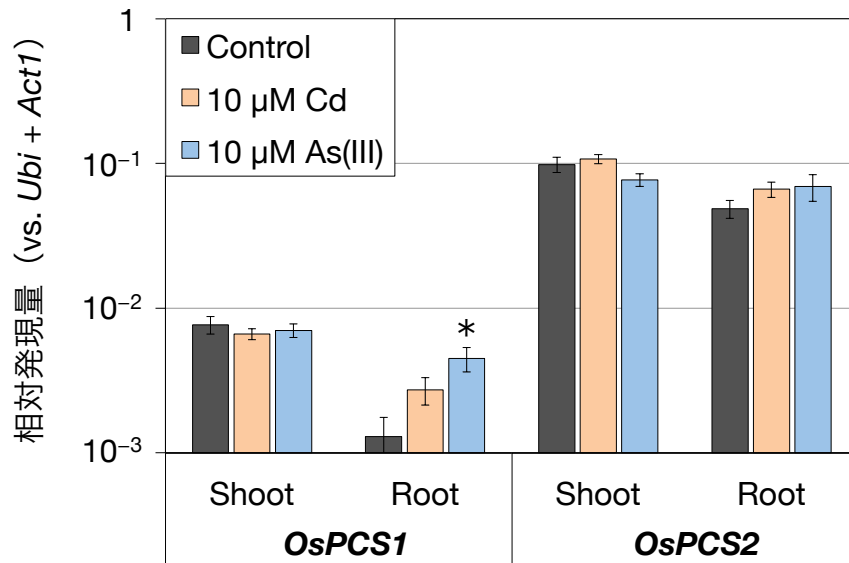


図2-1-9 カドミウム、ヒ素による *OsPCS* 遺伝子の発現量変化

対照区、10 μM Cd 処理区、10 μM As^(III)処理区で栽培した10日齢のイネ幼苗（品種：日本晴）からRNAを抽出した。リアルタイムPCRを用いて遺伝子発現量を解析した。バリエーションに共通した配列のプライマーを設計した。*Ubiquitin*と*Actin1*を内部標準遺伝子として用いた。値は平均値 ± SE で示した (n = 4)。アスタリスクは対照区との有意な差を示す ($p < 0.05$, Dunnett 検定)。

【考察】

- ・ カドミウムとヒ素によるファイトケラチンの合成誘導の違い

イネではヒ素によってファイトケラチン類の合成が強く誘導され、カドミウムによる PC_2 , $hmPC_2$ の合成量はその10分の1以下であった(図2-1-2)。向井(2011)は様々な金属種 (Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Mo, Zn, As^(III), As^(V), Cd) に暴露したイネ幼苗におけるファイトケラチン合成量を比較し、このうち Cu, Zn, As^(III), As^(V), Cd によりファイトケラチン合成が誘導され、特に As^(III)と As^(V)暴露時の合成量が大きいことを示した。一方で、インドジャボク (*Rauvolfia serpentina*) の培養細胞やセイヨウアカネ (*Rubia tinctorum*) ではカドミウムにより誘導されるファイトケラチンの合成量がヒ素による誘導の4倍または2倍程度大きいと報告されている (Grill et al., 1987; Maitani et al., 1996)。これらの結果は、金属種によるファイトケラチンの合成誘導のレベルの違いが植物種によっても異なることを示唆する。

ファイトケラチン生合成の調節機構としては転写レベルの制御と酵素活性の制御が考えられる。シロイヌナズナでは *AtPCS1* 遺伝子は構成的に発現しておりカドミウムや銅に応答した発現上昇を示さないことから (Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 2000)、金属イオンによる

酵素の活性化が主要な制御機構であると考えられている (Cobbett & Goldsbrough, 2002)。イネの *OsPCS2* も同様に構成的に発現しておりカドミウムやヒ素による発現上昇を示さなかったが、*OsPCSI* はヒ素ストレスにより発現量が有意に増加した (図 2-1-9)。この結果から、ファイトケラチン合成の調節機構は植物種間および遺伝子コピー間でも異なることが示唆された。

・ トランスクリプトバリエントの発現量

イネのファイトケラチン合成酵素遺伝子 *OsPCSI* と *OsPCS2* はどちらも選択的スプライシングによって複数のトランスクリプトを生じることがわかった (図 2-1-6)。シロイヌナズナではこのような報告はないが、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) のファイトケラチン合成酵素遺伝子 *LjPCS2* では根と根粒で異なる mRNA 配列が単離されている (Ramos et al., 2007)。また非生物学的ストレスは選択的スプライシングに影響を与えるとされ (Reddy, 2007)、例えばトウモロコシのグルタチオン S-トランスフェラーゼ遺伝子 *Bz2* ではカドミウムストレス条件下で未成熟終止コドンをもつバリエントの転写量が増加する (Marrs & Walbot, 1997)。一方で、*OsPCSI* と *OsPCS2* ではそのような部位やストレス条件によるバリエントの発現パターンの変化は見られず、最も長いコード領域をもつトランスクリプト (*OsPCS1#1*, *OsPCS2#1*) の発現量がどの部位 (地上部、根) と条件 (対照区、カドミウム処理区、ヒ素処理区) においても発現量全体の 90%以上を占めていた (図 2-1-7、2-1-8)。この結果から *OsPCSI* と *OsPCS2* が複数のトランスクリプトを生じる生理的意義は不明であるが、少なくとも完全長 ORF を含むバリエントが主要なトランスクリプトとして発現すると考えた。

・ トランスクリプトバリエントの配列の違い

OsPCSI と *OsPCS2* のバリエントの翻訳産物はいずれも N 末端側の 226 aa または 229 aa の配列が同一である。この N 末端領域にはファイトケラチン合成酵素 *AtPCS1* の触媒残基である Cys⁵⁶, His¹⁶², Asp¹⁸⁰ (Vatamaniuk et al., 2004; Romanyuk et al., 2006) に対応するアミノ酸残基が保存されている (図 2-1-5)。Romanyuk et al. (2006) によると *AtPCS1* は *in vitro* において N 末端 221 aa の断片だけでも PCS 活性を示すことから、*OsPCS* のバリエントはいずれも PCS 活性をもつと考えられる。Uraguchi et al. (2017) によると、*OsPCS2* 遺伝子には本研究で見出したトランスクリプトとは別に第 2 エキソンに転写開始点のあるバリエントも存在するが、それらは N 末端の大部分を欠失しているため酵素活性は持たないと予想される。

シロイヌナズナのグルタチオン合成酵素遺伝子 *AtGS* は開始コドン位置の異なる 2 つのトランスクリプトを生じ、細胞質局在型と葉緑体局在型のタンパク質に翻訳される (Wachter et al., 2005)。本研究で見つかった *OsPCSI* と *OsPCS2* のトランスクリプトバリエントはどれも開始コドンの位置が同じであるため (図 2-1-6)、*AtGS* 遺伝子のような細胞内局在の違いはないと思われる。

第2節 OsPCS 組み換えタンパク質の酵素活性の解析

ファイトケラチン合成酵素 (PCS) は、グルタチオン (γ Glu-Cys-Gly) の γ グルタミルシステインユニットを別のグルタチオン分子に転移するジペプチド転移反応を触媒し、ファイトケラチンを合成する (Grill et al., 1989)。この反応は ATP に依存しないが、カドミウムイオンや亜硫酸の存在により酵素活性が上昇する (Vatamaniuk et al., 2000)。

本節ではイネのファイトケラチン合成酵素 OsPCS1, OsPCS2 のタンパク質としての機能を検討するため、最も転写量の多いトランスクリプトである OsPCS1#1 と OsPCS2#1 の完全長翻訳産物を組み換えタンパク質として調製し、その酵素活性を解析した。

【材料と方法】

・ PCS 組み換えタンパク質の調製と精製

マルトース結合タンパク (MBP) と融合させた組み換えタンパク質 (MBP-OsPCS1, MBP-OsPCS2) を大腸菌 (*Escherichia coli*) に発現させ、アミロース担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。発現コンストラクトの作成から目的タンパク質の精製まで、pMAL Protein Fusion and Purification System (New England Biolabs) のマニュアルに従った。

OsPCS1#1 と OsPCS2#1 の完全長 ORF 配列断片をイネ (品種: 日本晴) cDNA を鋳型とした PCR で増幅した。DNA ポリメラーゼは PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ) を用い、OsPCS1#1 断片は PCS1.proF, PCS1.proR のプライマー組で、OsPCS2#1 断片は PCS2.proF, PCS2.proR のプライマー組で増幅した。リバースプライマーの 5' 末端には制限酵素 SbfI の認識配列を付与した。用いたプライマー配列を表 2-2-1 に示した。増幅した断片をライゲーション反応により pMAL-c5X ベクターにサブクローニングし、大腸菌 NEB Express 株 (ER2523; New England Biolabs) に導入した。形質転換株から抽出したプラスミドをシーケンス解析し、挿入された完全長 ORF 断片に PCR エラーがないことを確認した。この際、別のトランスクリプト配列も見つかった (第2章 第1節参照)。大腸菌に目的の組み換えタンパク質を発現させ、超音波破碎して溶菌したのち、アミロース担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した (Kellermann & Ferenci, 1982)。粗抽出液から溶出画分までを Sodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供試し、目的タンパク質の精製を確認した (図 2-2-1)。溶出画分のタンパク質濃度は Bradford 法 (Bradford, 1976) を用いて牛血清アルブミン (BSA) を標準物質として定量した。

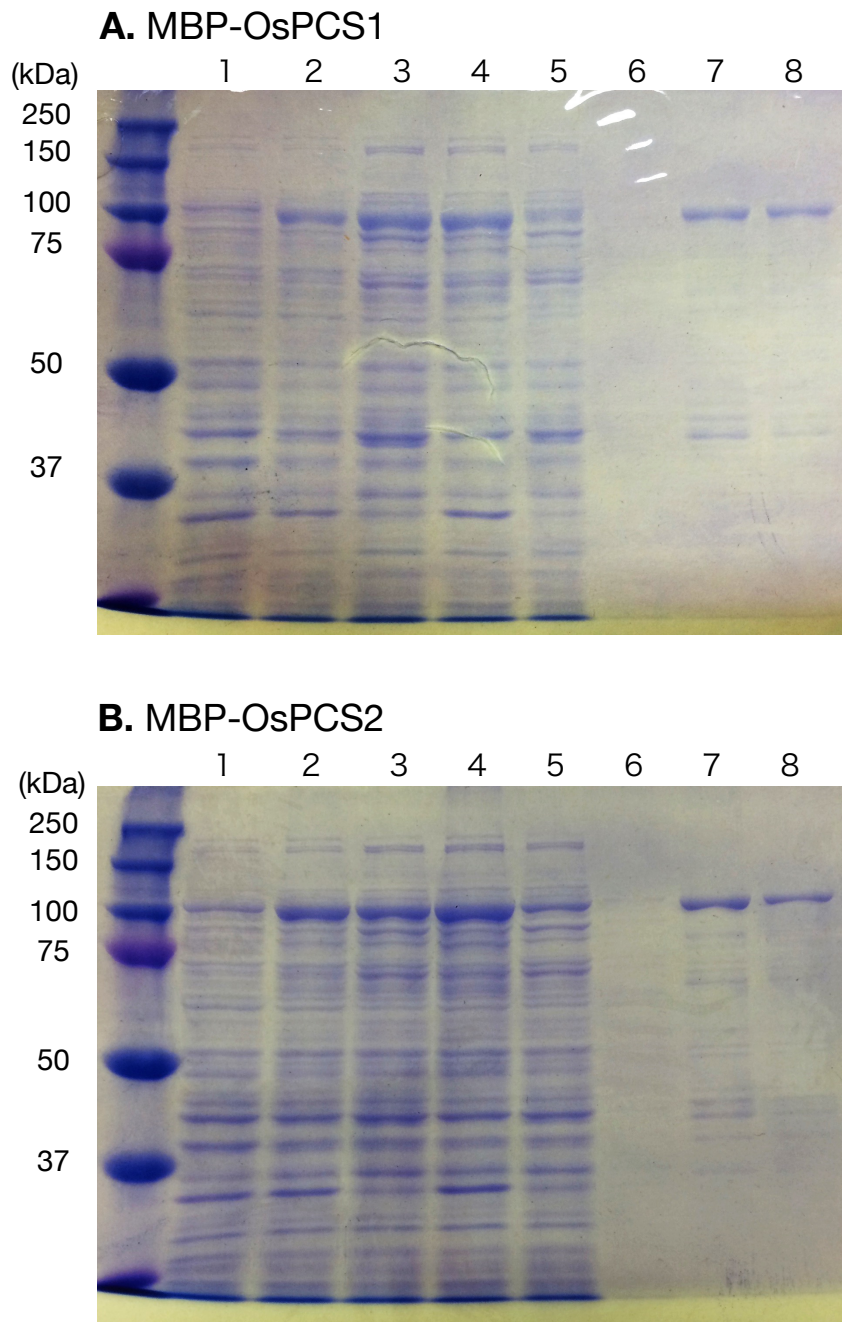


図2-2-1 大腸菌 OsPCS 組み換えタンパク質の精製過程の SDS-PAGE

レーン1：大腸菌（非誘導）、2：大腸菌（誘導）、3：大腸菌粗抽出液、4：不溶性画分、5：素通り画分、6：洗浄画分、7, 8：溶出画分

溶出画分の約 100 kDa のバンドが MBP-OsPCS1 (MW: 99.9 kDa) と MBP-OsPCS2 (MW: 98.4 kDa) に相当する。溶出画分の 40 kDa 付近の薄いバンドは MBP タグ (MW: 42.5 kDa) が内在性プロテアーゼにより切り出されたものと思われる。

表2-2-1 OsPCS 完全長 ORF 断片のクローニングに用いたプライマー

PCS1.proF	5'- ATGGCGTCTAAACCAAGCAGC -3'
PCS1.proR	5'-ACTGCCTGCAGG TTA GCATTGTTCCCAAGGTTG-3'
PCS2.proF	5'- ATGGCAGCGATGGCATCCCT -3'
PCS2.proR	5'-GAGTCCTGCAGG TTA ATGGGATTGTGGCACAG-3'

太字は開始コドンと終始コドン、下線部は制限酵素 SbfI の認識配列を示す。

・ PCS 酵素活性の測定

反応液の組成は 200 mM HEPES-KOH (pH 8.0)、10 mM グルタチオン、50 μM 各種金属塩 (MnCl₂, NiSO₄, CoCl₂, ZnSO₄, Na₂MoO₄, Na₂HAsO₄, CuSO₄, NaAsO₂, CdSO₄ のうちいずれか) とした。反応液を 35°C で 15 分以上プレインキュベーションしたのち、1/10 容の精製タンパク質溶液を終濃度が 15 μg/mL (MBP-OsPCS1) または 5 μg/mL (MBP-OsPCS2) となるように添加して反応を開始した。反応は 35°C で行い、TFA を終濃度 1% (v/v) となるように添加して反応を停止した。試料は解析まで -20°C で冷凍保存した。

・ ファイトケラチンの定量

酵素反応生成物のチオールペプチドは mBBBr で蛍光誘導体化し HPLC を用いて定量した (Sneller et al., 2000 一部改変)。酵素反応停止液 20 μL をとり、0.1% TFA/6.3 mM DTPA 180 μL と混和して希釈し、4°C で 10 分間遠心分離した。上清 125 μL を 200 mM HEPES-KOH (pH 8.2) /6.3 mM DTPA 225 μL と混和して酸を中和し、25 mM mBBBr (ジメチルスルホキシドに溶解) 10 μL を添加して暗所、室温で 1 時間静置した後、1 M MSA 150 μL を添加して誘導体化反応を停止した。試料は解析まで遮光して氷上に置くか冷凍保存した。

HPLC を用いた定量は第 2 章 第 1 節と同様に行ったが、グラジエント溶出のタイムプログラムは次のように設定した (0 min, 溶離液 B 40%; 15 min, 45%; 21 min, 58%; 25 min, 75%; 28 min, 90%; 29 min, 100%; 35 min, 40%; 40 min, 40%)。標品としてグルタチオン (ナカライテスク)、PC₂、PC₄、γGlu-Cys (ハイペック研究所) の人工合成品を用いて溶出ピークを同定し定量した。PC₃ は、PC₂ と PC₄ の溶出ピークの間で反応時間依存的に増加するピークを PC₃ とし、PC₂ と PC₄ の検量線の傾きの平均値を用いて定量した。

【結果】

・ 様々な金属イオン存在下における OsPCS の活性化

精製した MBP-OsPCS1 と MBP-OsPCS2 を用いて、様々な金属イオン (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , MoO_4^{4-} , Zn^{2+} , $\text{As}^{(\text{III})}$, $\text{As}^{(\text{V})}$, Cd^{2+}) のうちいずれかを含む反応液でアッセイを行い、PC 合成活性を調べた。金属イオン濃度 50 μM 、反応時間 60 分での PC_{2-4} 合成活性を比較した (図 2-2-2)。OsPCS1 は Cu^{2+} , $\text{As}^{(\text{III})}$, Cd^{2+} により PC_2 合成活性の上昇がみられ、OsPCS2 は Cu^{2+} , Zn^{2+} , $\text{As}^{(\text{III})}$, Cd^{2+} によって PC_2 合成活性が上昇した。このうち、 Cu^{2+} 存在下では重合度 3 以上の $\text{PC}_{3,4}$ は検出されなかった。両酵素は $\text{As}^{(\text{III})}$ と Cd^{2+} による活性上昇が著しかったが、OsPCS1 は特に $\text{As}^{(\text{III})}$ によって PC_2 合成活性が 70 倍に、 Cd^{2+} によって 50 倍に活性が上昇した。一方で、OsPCS2 は特に Cd^{2+} によって PC_2 合成活性が 70 倍に、 $\text{As}^{(\text{III})}$ によって 50 倍に活性が上昇した。 PCS のもつグルタチオン加水分解活性により生成したと考えられる $\gamma\text{Glu-Cys}$ (γEC) も検出されたが、その生成量は OsPCS1 は $\text{As}^{(\text{III})}$ の存在下で高いのに対し、OsPCS2 は Cu^{2+} と Cd^{2+} の存在下で高かった (図 2-2-2)。

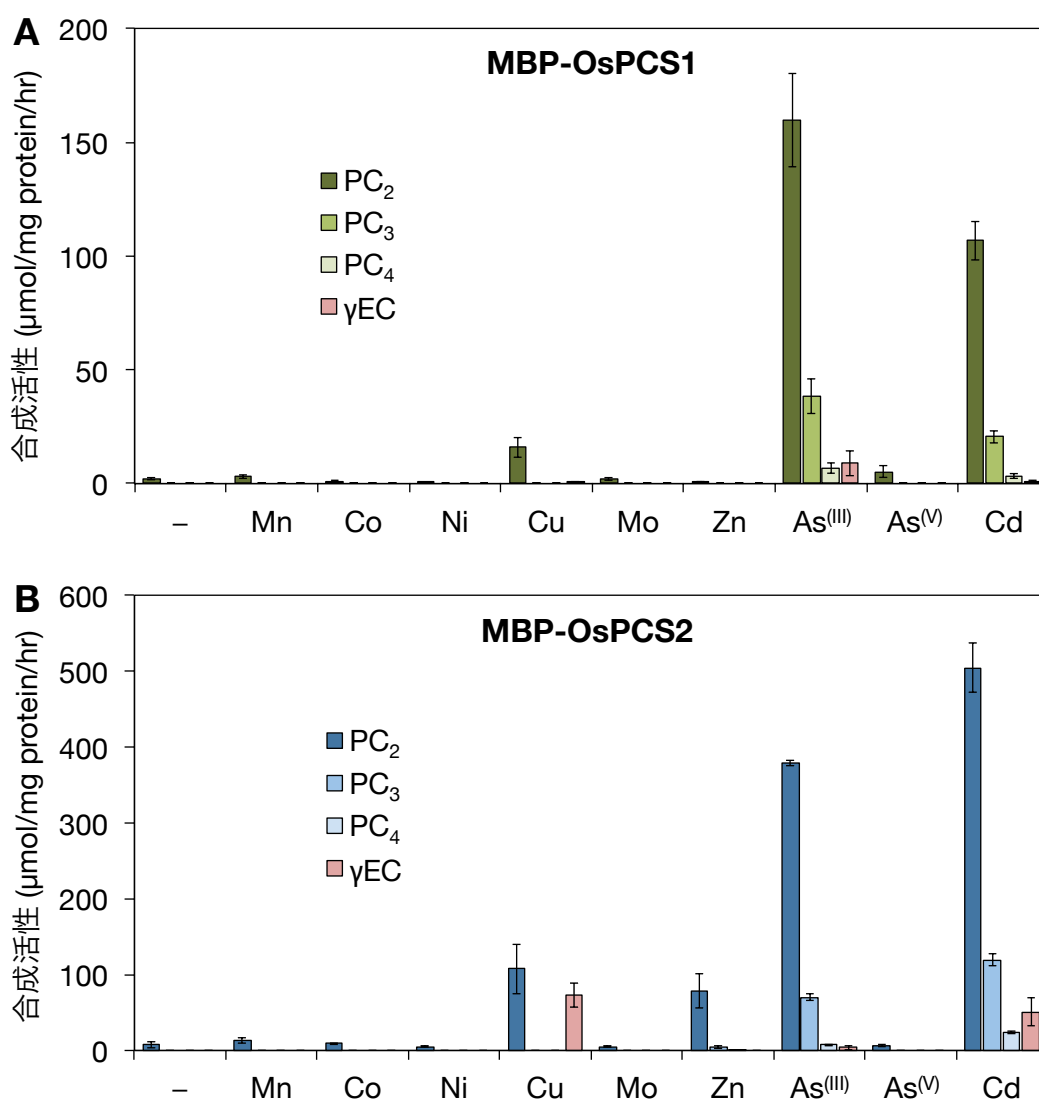


図2-2-2 金属イオンによる OsPCS1 と OsPCS2 の活性化

(A) OsPCS1 と (B) OsPCS2 の PC₂₋₄ 合成活性。各金属イオン 50 μM、グルタチオン 10 mM を含む緩衝液 (pH 8.0) で 35°C、60 分反応させた。対照として、金属イオンを加えない処理区を設けた。値は平均値 ± SE で示した (n = 3)。

・ カドミウムと亜ヒ酸による活性化の濃度依存性

OsPCS1 と OsPCS2 のカドミウムとヒ素による活性化の違いについて詳細に比較するため、PC 合成活性に対する As^(III) と Cd²⁺ の濃度の影響を調べた。金属イオン濃度を 10–200 μM、反応時間を 20 分として PC₂ 合成活性を比較した(図 2-2-3)。MBP-OsPCS1 は As^(III) 10–50 μM では濃度の上昇に伴って活性が上昇したが、As^(III) 100 μM 以上では活性が低下した。また、Cd 濃度の上昇に伴い活性が上昇したが、10–100 μM の濃度範囲では As^(III) 存在下の方が活性は高かった。MBP-OsPCS2 は As^(III) と Cd どちらについても濃度の上昇に伴い活性が上昇したが、Cd 存在下の方が常に活性は高かった。

図 2-2-3 のグラフに対して酵素反応速度論のミカエリス・メンテン式を適用した際の、As^(III) と Cd 濃度に対する速度論パラメータを算出した (表 2-2-2)。OsPCS1 は As^(III) に対する $K_m = 3.41 \mu\text{M}$ 、Cd に対する $K_m = 16.3 \mu\text{M}$ であり、As^(III) への親和性が高いことがわかった。一方で、OsPCS2 は As^(III) に対する $K_m = 47.3 \mu\text{M}$ 、Cd に対する $K_m = 11.7 \mu\text{M}$ であり、Cd への親和性が高いことがわかった。比活性は OsPCS2 の方が OsPCS1 よりも高かった。

表 2-2-2 OsPCS の Cd と As^(III) による活性化の速度論パラメータ

	K_m (μM)	V_{max} (μmol/mg/20 min)
MBP-OsPCS1		
As ^(III)	3.41 ± 1.15	90.5 ± 5.2
Cd	16.3 ± 0.4	86.5 ± 1.0
MBP-OsPCS2		
As ^(III)	47.3 ± 5.4	242.4 ± 60.6
Cd	11.7 ± 1.6	478.3 ± 21.7

Hanes-Woolf プロット ($[S]/v$ vs. $[S]$) を用いて K_m と V_{max} を算出した。OsPCS1 の As^(III) については、As^(III) 濃度の上昇に伴って活性が上昇した 3 点 (10, 20, 50 μM) のみを計算に用いた。値は平均値 ± SE で示した (n = 3)。

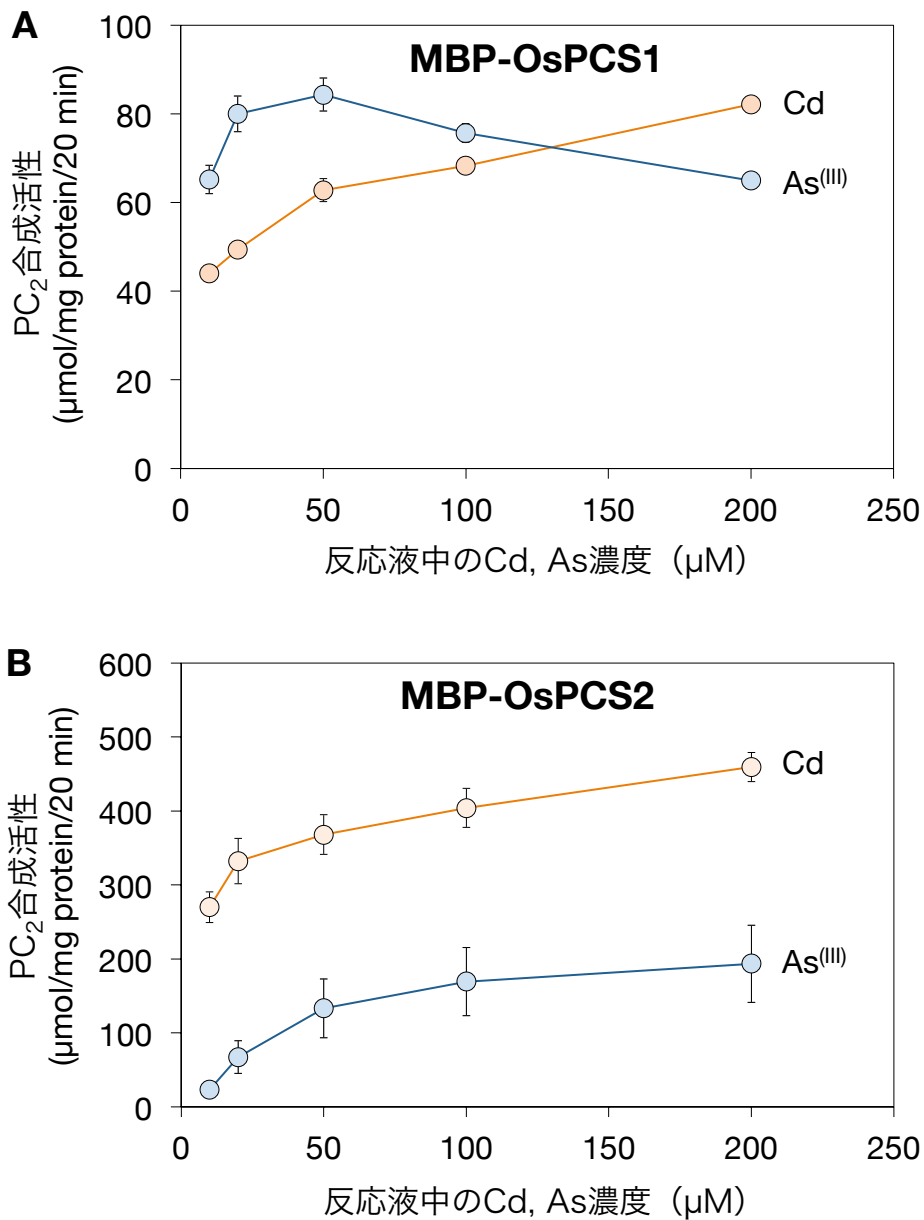


図2-2-3 OsPCSのCdとAs^(III)による活性化の濃度依存性

(A) OsPCS1 と (B) OsPCS2 の PC₂ 合成活性。Cd²⁺ または As^(III) を 10, 20, 50, 100, 200 μM、グルタチオン 10 mM を含む緩衝液 (pH 8.0) で 35°C、20 分反応させた。値は平均値 ± SE で示した (n = 3)。

【考察】

・ 金属種による OsPCS 活性化の違い

OsPCS1 は Cu^{2+} , $\text{As}^{(\text{III})}$, Cd^{2+} によって、OsPCS2 は Cu^{2+} , Zn^{2+} , $\text{As}^{(\text{III})}$, Cd^{2+} によって *in vitro* における PCS 活性が上昇した (図 2-2-2)。これは、イネ幼苗において Cu, Zn, $\text{As}^{(\text{III})}$, Cd に暴露した際にファイトケラチン合成が誘導されたこと (向井, 2011) と一致する。ただし、イネ幼苗では $\text{As}^{(\text{V})}$ によってもファイトケラチン合成が誘導されたが、*in vitro* では OsPCS1 と OsPCS2 のどちらも $\text{As}^{(\text{V})}$ による活性化を受けなかった。植物細胞内に吸収されたヒ酸 $\text{As}^{(\text{V})}$ はグルタチオンもしくはヒ酸還元酵素によって速やかに亜ヒ酸 $\text{As}^{(\text{III})}$ へと還元され (Delnomdedieu, et al., 1994; Dhankher et al., 2006; Sánchez-Bermejo et al., 2014; Chao et al., 2014)、イネ植物体内では大部分が $\text{As}^{(\text{III})}$ として存在する (Xu et al., 2007) ので、PCS タンパク質に作用する分子は $\text{As}^{(\text{III})}$ であると考えた。

・ OsPCS1 と OsPCS2 の活性化の違い

OsPCS1 と OsPCS2 はどちらもカドミウムと亜ヒ酸により強く活性化されたが (図 2-2-2)、OsPCS1 は亜ヒ酸に対する親和性が高く活性化レベルも大きかったのに対し、OsPCS2 はカドミウムに対する親和性と活性化レベルが高かった (図 2-2-3、表 2-2-2)。このような金属種への親和性の違いは C 末端のアミノ酸配列の違いによるかもしれない。ファイトケラチン合成酵素の N 末端側配列には触媒残基が存在し植物種間でも高度に保存されているが、C 末端側の配列は比較的多様であり (図 2-1-5) その役割には不明な点が多い。AtPCS1 の N 末端から 284 番目以降 (C 末端側 200 aa) を欠いたタンパク質断片は *in vitro* において温度安定性が低下し、373 番目以降を欠いた断片は Zn^{2+} , Hg^{2+} に応答した PCS 活性を失うが Cd^{2+} , Cu^{2+} への応答性は保持する (Ruotolo et al., 2004)。また AtPCS1 の 471 番目以降を欠いたタンパク質断片は $\text{As}^{(\text{III})}$ への応答性が低下する (Uraguchi et al., 2018)。これらの知見は、C 末端ドメインが酵素の安定性や金属イオンへの応答性に関わることを示唆する。Vestergaard et al. (2008) によると AtPCS1 の C 末端ドメインの Cys^{358} , Cys^{359} , Cys^{363} , Cys^{366} を Ala に置換すると Cd^{2+} , Zn^{2+} に応答した PCS 活性が低下するが、本研究の OsPCS1 では Cys^{358} - Cys^{359} に対応する残基は Phe^{382} - Phe^{383} に置換されていた (図 2-1-5)。このアミノ酸配列の置換が OsPCS1 と OsPCS2 の金属イオンへの応答性の違いに関わる可能性がある。

第3節 *OsPCS* 遺伝子発現抑制イネの表現型解析

シロイヌナズナでは、ファイトケラチン合成酵素遺伝子 *AtPCS1* を欠損した *cad1-3* 変異体はカドミウムやヒ素に対して超感受性を示す (Howden et al., 1995; Ha et al., 1999)。一方で、シロイヌナズナ以外の植物種での *PCS* 遺伝子欠損株の解析は報告されておらず、ファイトケラチン合成によるカドミウムとヒ素への耐性機構が植物全般に当てはまるかはわからない。

第2章 第1、2節でイネのファイトケラチン合成酵素遺伝子の配列決定とその遺伝子産物がファイトケラチン合成活性をもつことを確認した。本節では、*OsPCS1* と *OsPCS2* の生理機能の違いを検討するため、RNA 干渉 (RNAi) 法により *OsPCS1*, *OsPCS2* 遺伝子のどちらかの発現を特異的に抑制した形質転換イネを作出し、植物体内のファイトケラチン含有率とカドミウム、ヒ素への耐性に与える影響を解析した。

【材料と方法】

・ 形質転換による *PCS* RNAi イネの作出

RNAi ベクターとして pANDA を用い (Miki & Shimamoto, 2004)、イネ (品種: 日本晴) をアグロバクテリウム法で形質転換して (Toki et al., 2006)、RNAi イネを作出した。pANDA ベクターは、単子葉植物で高発現する Maize *ubiquitin promoter* の制御により、標的遺伝子の発現を構成的に抑制する (Miki & Shimamoto, 2004)。*OsPCS1* と *OsPCS2* のそれぞれに特異的な 3'非翻訳領域 (3' UTR) の 317 bp と 327 bp の配列を RNAi のトリガー配列として用いた。トリガー配列の相同性は 39.9%であった (EMBOSS Needle)。トリガー配列断片は、イネ (品種: 日本晴) cDNA を鋳型とし PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ) と、対応するプライマー組 (*PCS1.RNAi.F*, *PCS1.RNAi.R* または *PCS2.RNAi.F*, *PCS2.RNAi.R*) を用いて PCR 増幅した。フォワードプライマーの 5'末端には TOPO クローニングのための CACC 配列を付与した。増幅断片を Gateway® エントリーベクター pENTR/D-TOPO (Invitrogen) にサブクローニングし、LR 反応によりデスティネーションベクター pANDA にクローニングして RNAi コンストラクトを作成した。クローニングした pENTR/D-TOPO ベクターまたは pANDA ベクターは大腸菌 TOP10 株に導入し、M13 プライマーと RNAi プライマーまたは Gus linker プライマーと RNAi.R プライマーを用いてコロニーPCR を行い、挿入断片の有無と挿入方向を確認した。完成した pANDA ベクターをアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 株 (Hood et al., 1993) に導入し、イネ (品種: 日本晴) 完熟種子胚由来カルスを用いて形質転換した (Toki et al., 2006)。形質転換イネからゲノム DNA を抽出して鋳型とし、Gus-linker プライマーと RNAi.R プライマーを用いて PCR を行い、RNAi コンストラクトの導入を確認した。用いたプライマーの配列を表 2-3-1 に示した。

表 2-3-1 PCS RNAi コンストラクトの作成と形質転換の確認に用いたプライマー

PCS1.RNAi.F	5'- <u>CACC</u> ACATGGCAACCCACTCACTT-3'
PCS1.RNAi.R	5'-AGGACGAGCTAAGTGTGCTT-3'
PCS2.RNAi.F	5'- <u>CACCG</u> CATCTAAGACGGCAACTCC-3'
PCS2.RNAi.R	5'-GAAACTTTTGGCAAGGACACCA-3'
M13F	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
Gus-linker.F	5'-CATGAAGATGCGGACTTACG-3'
Gus-linker.R	5'-ATCCACGCCGTATTCGG-3'

下線部は TOPO クローニングのために付与した配列を示す。M13 プライマーは pENTR/D-TOPO ベクター中の配列、Gus linker プライマーは pANDA ベクター中の配列である。

・ 遺伝子発現量解析

作出した PCS RNAi イネと野生型株（品種：日本晴）を通常の培養液（表 2-1-1）で 4 週間水耕栽培した。培養液は 1 週間ごとに交換した。1 個体ずつ地上部と根から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて *OsPCS1* と *OsPCS2* 遺伝子の発現量を解析した。RNA 抽出および発現量解析は第 2 章 第 1 節と同様に行った。プライマーは、PCS1.total.ex-F, PCS1.total.ex-R および PCS2.total.ex-F, PCS2.total.ex-R を用い、*Ubiquitin* と *Actin1* を内部標準として用いた（表 2-1-2）。

・ カドミウムまたはヒ素ストレス条件での生育試験

生育試験の予備実験として、野生型株（品種：日本晴）を対照区とカドミウム処理区（3, 10, 30 μM Cd）または亜ヒ酸処理区（5, 20, 50 μM As^(III)）に播種して 10 日間水耕栽培し、草丈と根長を測定した。

OsPCS1 RNAi イネの生育試験では、RNAi 株と野生型株を対照区、10 μM Cd 処理区、20 μM As^(III) 処理区にそれぞれ播種して 10 日間水耕栽培し、草丈と根長を測定した。*OsPCS2* RNAi イネのヒ素ストレス条件の生育試験も同様に行った。

OsPCS2 RNAi イネのカドミウムストレス条件の生育試験では、RNAi イネと野生型株を通常の培養液で 7 日間水耕栽培したのち、同程度の大きさの幼苗を選んで対照区と 3 つの濃度（3, 10, 30 μM Cd）のカドミウム処理区に移した。1 L 容プラスチックコンテナに培養液を入

れ、20個の穴の空いたプレートを上に乗せ、1つの穴に幼苗1株ずつを入れて根が培養液に浸るようにスポンジで茎を固定した(図2-1-1B)。この栽培系でさらに7日間水耕栽培し、14日齢幼苗の草丈と根長を測定した。

・ PCS RNAi イネのチオールペプチド含有率の測定

PCS RNAi イネと野生型株(品種:日本晴)を通常の培養液で7日間水耕栽培したのち、10 μM Cd 処理区または20 μM As^(III)処理区に移し、さらに8日間栽培した。チオールペプチドの抽出とHPLCを用いた定量は第2章 第1節と同様に行った。

・ 植物体内のカドミウムとヒ素の含有率の測定

PCS RNAi イネと野生型株(品種:日本晴)を10 μM Cd 処理区、20 μM As^(III)処理区にそれぞれ播種して10日間水耕栽培し、地上部と根に分けてサンプリングした。試料を試験管に入れ70°Cの乾熱器中で2日間乾燥したのち秤量した。濃硝酸2 mLを入れ、メタルバス(MB-3H-U;小池精密機器製作所)を用いて80°Cから120°Cまで段階的に温度を上げて加熱、分解した。放冷後、過塩素酸0.2 mLを添加し、分解液が無色になるまで120°Cで加熱したのち、温度を150°Cに上げて酸を蒸発させた。0.1% (v/v) 硝酸で10 mL定容とした。

カドミウムは原子吸光分光光度計(AA-6300;島津製作所)とグラファイトファーネスアトマイザ(GFA-EX7i;島津製作所)を用いて測定した。マトリックスモディファイヤーとして10 ppm 硝酸パラジウム溶液を添加した。

ヒ素はICP発光分光分析装置(SPS1500VR;セイコー電子工業)を用いて測定した。

【結果】

・ PCS RNAi イネにおける標的遺伝子の発現抑制

作出した PCS RNAi イネにおける標的遺伝子の発現抑制を確認するため、*OsPCS1*, *OsPCS2* 遺伝子の発現量を解析した (図 2-3-1)。独立した 2 系統において、*OsPCS1* RNAi イネでは *OsPCS1* 遺伝子の発現量が野生型株の 25%程度に抑制されていたが、*OsPCS2* 遺伝子の発現量には有意な減少はみられなかった。同様に、*OsPCS2* RNAi イネでは *OsPCS2* 遺伝子の発現量が野生型株の 10%程度に抑制されていたが、*OsPCS1* 遺伝子の発現量には変化はみられなかった。

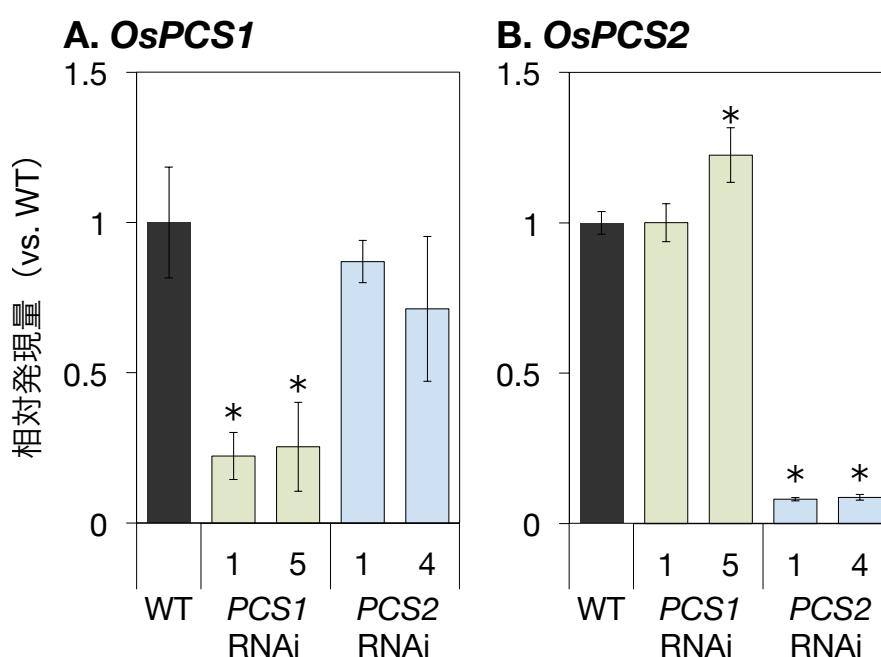


図 2-3-1 PCS RNAi イネにおける *OsPCS* 遺伝子の発現抑制

通常条件で 4 週間水耕栽培した野生型株 (WT, 品種: 日本晴) と PCS RNAi イネの幼苗 1 個体ずつから RNA を抽出し、リアルタイム PCR で *OsPCS* 遺伝子の相対発現量を解析した。*Ubiquitin* と *Actin1* を内部標準遺伝子として用いた。値は野生型株に対する相対値の平均 \pm SE で示した (n = 3)。アスタリスクは野生型株との有意な差を示す ($p < 0.05$, Dunnett 検定)。

・ *OsPCS* 遺伝子発現抑制のカドミウム、ヒ素耐性への影響

カドミウムまたはヒ素ストレスによるイネ幼苗の生育への影響を調べた。予備実験として野生型株（品種：日本晴）の生育への影響を検討した（図2-3-2）。カドミウム条件では、草丈はカドミウム濃度 3 μM 以上で対照区より有意に減少したが、根長は 3 μM と 10 μM Cd 区で有意に増加した。亜ヒ酸条件では、草丈は 5 μM $\text{As}^{(\text{III})}$ 区では影響はなく亜ヒ酸濃度 20 μM 以上で対照区より有意に減少した。根長は 5 μM $\text{As}^{(\text{III})}$ 区で対照区より有意に増加し、50 μM $\text{As}^{(\text{III})}$ 区では有意に減少した。この検討から、*PCS* RNAi イネの生育は 10 μM Cd および 20 μM $\text{As}^{(\text{III})}$ 処理区の草丈で評価することとした。

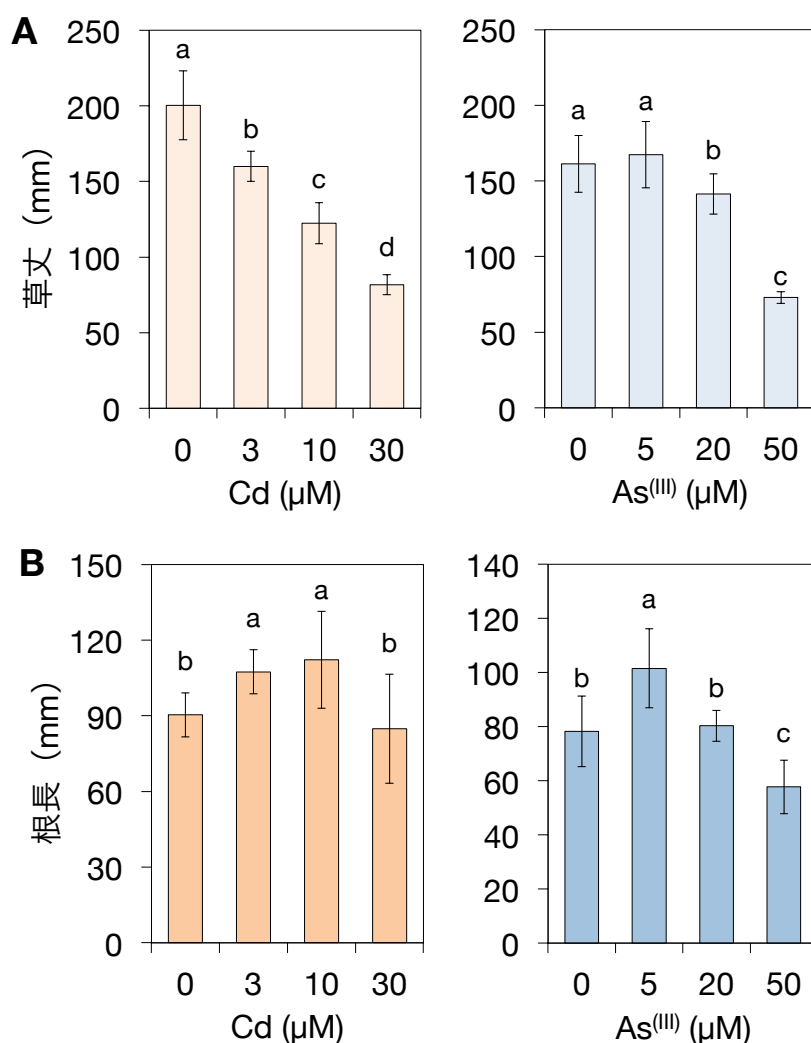


図2-3-2 野生型株（日本晴）の生育へのカドミウム、ヒ素ストレスの影響

カドミウムまたはヒ素ストレス条件でのイネ幼苗の (A) 草丈と (B) 根長。イネ（品種：日本晴）を対照区、カドミウム (3, 10, 30 μM Cd) 処理区または亜ヒ酸 (5, 20, 50 μM $\text{As}^{(\text{III})}$) 処理区に播種して 10 日間水耕栽培し、草丈と根長を測定した。値は平均値 \pm SD で示した (Cd: $n \geq 14$, As: $n \geq 10$)。バー上の異なる文字は有意な差を示す ($p < 0.05$, Tukey 検定)。

OsPCS1 RNAi イネは、対照区、10 μ M Cd 処理区、20 μ M As^(III)処理区いずれの条件においても野生型株と比べて有意な生育の差を示さなかった (図 2-3-3)。

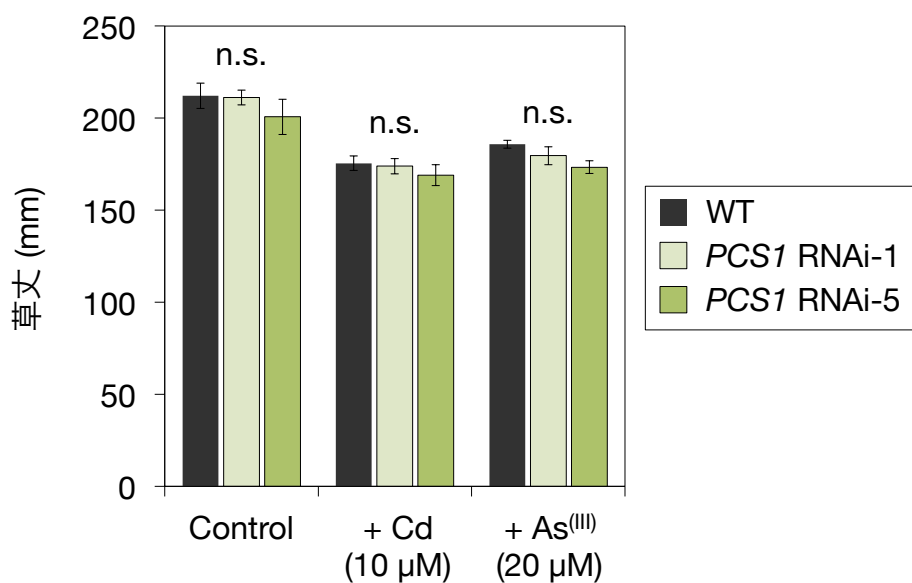


図 2-3-3 カドミウム、ヒ素ストレス条件における *OsPCS1* RNAi イネの生育

野生型株 (WT, 品種: 日本晴) と *OsPCS1* RNAi イネを対照区、10 μ M Cd 処理区、20 μ M As^(III)処理区に播種し、10 日間水耕栽培して草丈を測定した。値は平均値 \pm SE で示した (n = 5-7)。野生型株との有意な差はなかった (Dunnett 検定)。

OsPCS2 RNAi イネは、対照区では野生型株と比べて生育に差はなかったが、20 μM $\text{As}^{(\text{III})}$ 処理区では野生型株より有意に生育が低下した (図 2-3-4 A)。一方で、カドミウム条件では 3, 10, 30 μM Cd 処理区で生育を比較したが、野生型株と比べてほとんど生育に差がなく、独立した 2 系統に共通した有意な生育低下は見られなかった (図 2-3-4 B)。

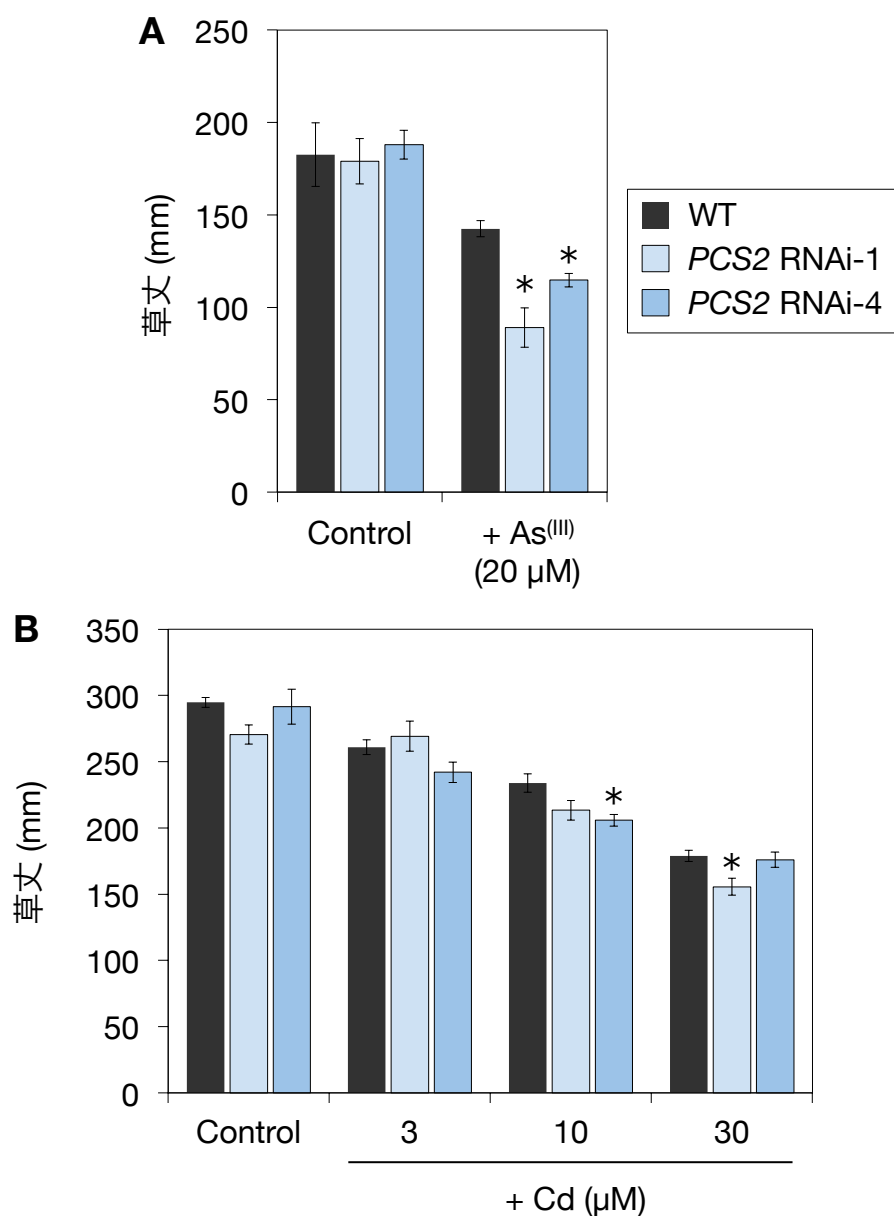


図 2-3-4 カドミウム、ヒ素ストレス条件における *OsPCS2* RNAi イネの生育

(A) ヒ素ストレス条件での *OsPCS2* RNAi イネの草丈。野生型株 (WT, 品種: 日本晴) と *OsPCS2* RNAi イネを対照区と 20 μM $\text{As}^{(\text{III})}$ 処理区に播種し、10 日間水耕栽培して草丈を測定した。値は平均値 \pm SE で示した ($n = 4$)。 (B) カドミウムストレス条件での *OsPCS2* RNAi イネの草丈。野生型株と RNAi イネを通常条件で 7 日間水耕栽培したのち、対照区と 3, 10, 30 μM Cd 処理区に移してさらに 7 日間栽培し草丈を測定した。値は平均値 \pm SE で示した ($n = 4, 5$)。アスタリスクは野生型株との有意な差を示す ($p < 0.05$, Dunnett 検定)。

・ *PCS* RNAi イネのファイトケラチン含有率

植物体内のファイトケラチン合成への影響を調べるため、カドミウムまたは亜ヒ酸を与えて栽培したイネ幼苗のファイトケラチン含有率を測定した (図 2-3-5)。 *OsPCS1* RNAi イネでは、カドミウムとヒ素どちらのストレス条件においても、ファイトケラチン類 (PC_2 , $hmPC_2$) や基質であるグルタチオンの含有率に野生型株と有意な違いはなかった。一方で、 *OsPCS2* RNAi イネではカドミウムストレス条件で PC_2 , $hmPC_2$ の含有率が顕著に減少し、グルタチオンは有意差はないが増加する傾向にあった (図 2-3-5 A)。ヒ素ストレス条件では、 $hmPC_2$ は野生型株と比べて有意に減少、 PC_2 も減少する傾向にあり、グルタチオンは野生型株より顕著に増加した (図 2-3-5 B)。

グルタチオンの類縁体 ($hmGSH$, γECE , γEC) の含有率を図 2-3-6 に示した。 *OsPCS1* RNAi イネでは野生型株との有意な違いはなかったが、 *OsPCS2* RNAi イネではカドミウムストレス条件で $hmGSH$, γECE , γEC の含有率が野生型株より減少し (図 2-3-6 A)、ヒ素ストレス条件では γECE 含有率が野生型株より有意に減少した (図 2-3-6 B)。

・ *PCS* RNAi イネのカドミウム、ヒ素含有率

ファイトケラチンがイネ植物体内のカドミウムとヒ素の動態に及ぼす影響を調べるため、 *PCS* RNAi イネにおけるカドミウムとヒ素の含有率を測定した。 *OsPCS1* RNAi イネでは、地上部と根のどちらにおいてもカドミウムとヒ素の含有率に野生型株とほとんど違いは見られなかった (図 2-3-7)。一方で、 *OsPCS2* RNAi イネでは、地上部のカドミウム含有率は野生型株と有意差がなかったが、根のカドミウム含有率は野生型株の半分程度に減少していた (図 2-3-8 A)。また、ヒ素含有率は地上部と根のどちらにおいても野生型株より有意に減少していた (図 2-3-8 B)。

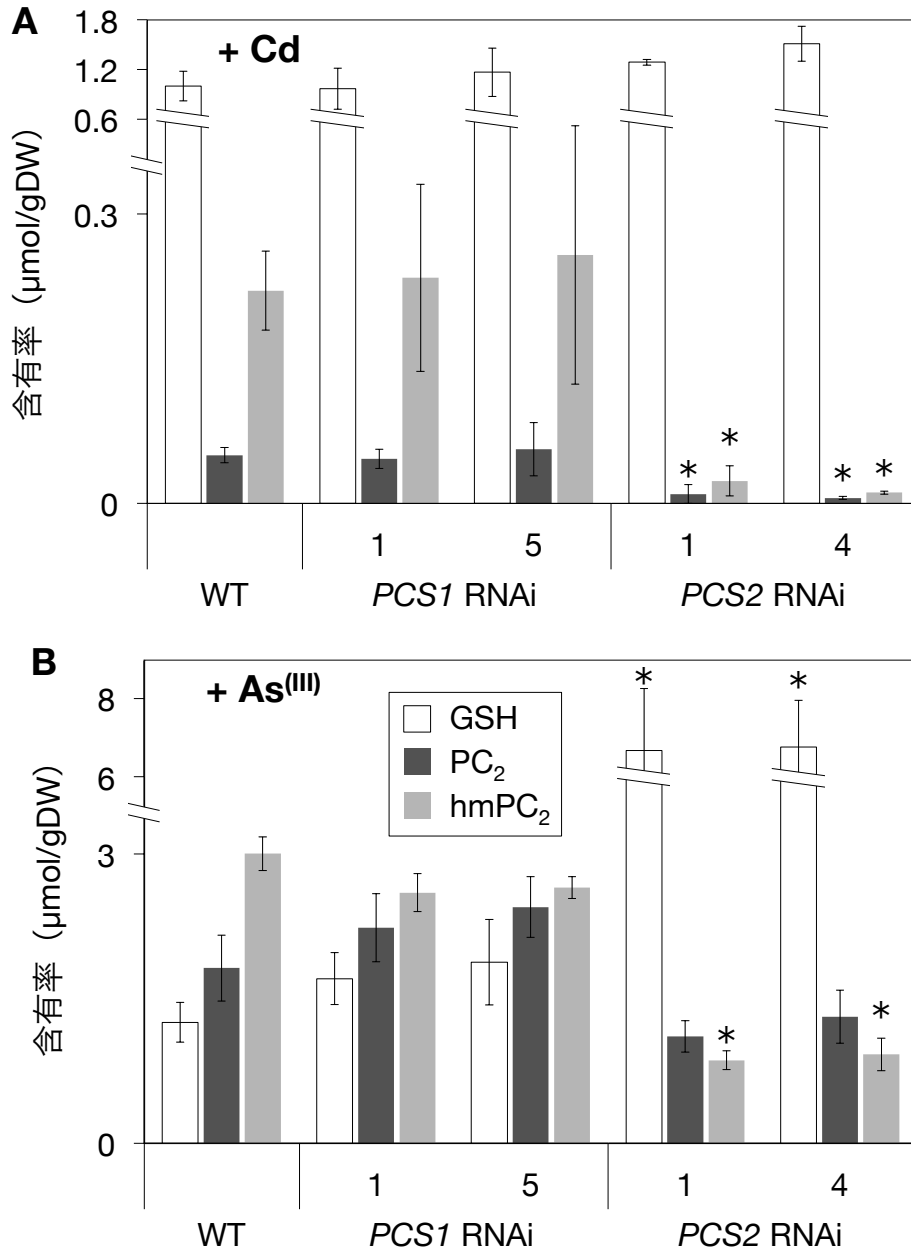


図2-3-5 PCS RNAi イネにおけるファイトケラチン類の含有率

(A) カドミウムストレス条件と (B) ヒ素ストレス条件で栽培したイネ幼苗の根におけるグルタチオン、PC₂ [(γ-Glu-Cys)₂-Gly]、hmPC₂ [(γ-Glu-Cys)₂-Ser] の含有率。野生型株 (WT, 品種：日本晴) と PCS RNAi イネを通常条件で7日間水耕栽培したのち、10 μM Cd 処理区と 20 μM As^(III) 処理区に移してさらに8日間栽培した。チオールペプチドを抽出し、HPLCで定量した。値は平均値 ± SE で示した (n = 3)。アスタリスクは野生型株との有意な差を示す (p < 0.05, Dunnett 検定)。

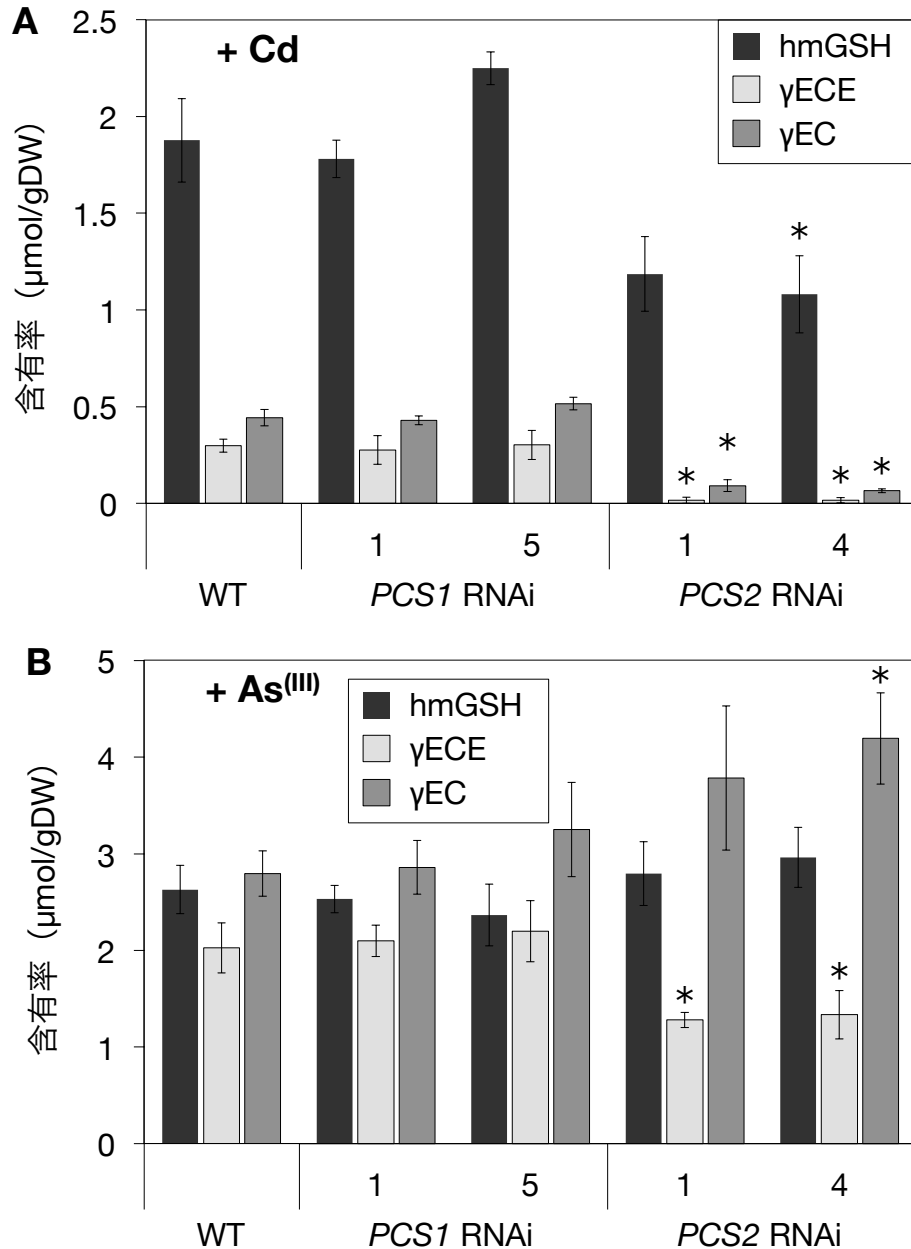


図2-3-6 PCS RNAi イネにおけるグルタチオン類縁体の含有率

(A) カドミウムストレス条件と (B) ヒ素ストレス条件で栽培したイネ幼苗の根におけるヒドロキシメチルグルタチオン (hmGSH, γ Glu-Cys-Ser)、 γ グルタミルシステニルグルタミン酸 (γ ECE, γ Glu-Cys-Glu)、 γ グルタミルシステイン (γ EC, γ Glu-Cys) の含有率。野生型株 (WT, 品種: 日本晴) と PCS RNAi イネを通常条件で7日間水耕栽培したのち、10 μ M Cd 処理区と 20 μ M As^(III)処理区に移してさらに8日間栽培した。チオールペプチドを抽出し、HPLC で定量した。値は平均値 \pm SE で示した (n = 3)。アスタリスクは野生型株との有意な差を示す ($p < 0.05$, Dunnett 検定)。

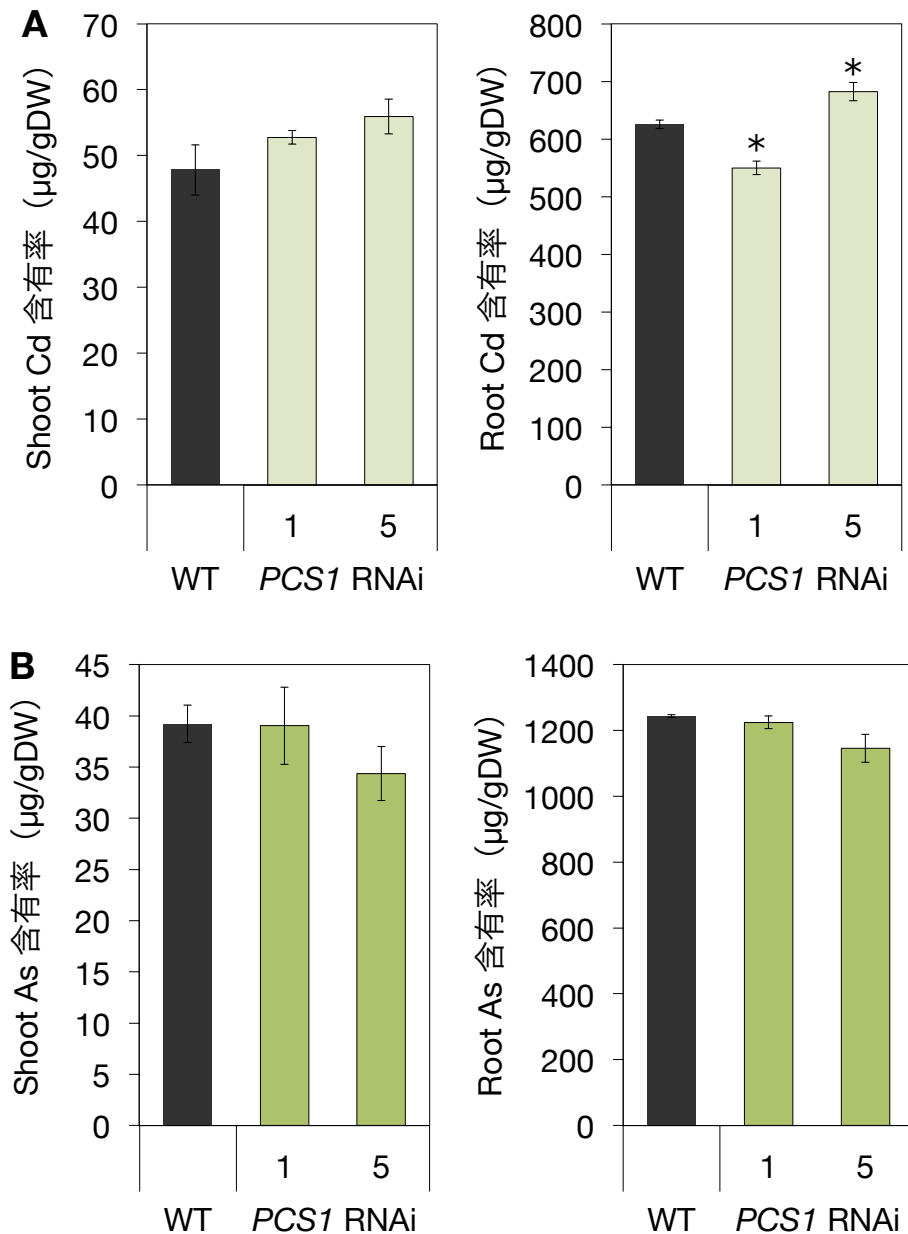


図2-3-7 *OsPCS1* RNAi イネのカドミウム、ヒ素含有率

OsPCS1 RNAi イネの地上部と根の (A) カドミウムと (B) ヒ素の含有率。野生型株 (WT, 品種：日本晴) と RNAi イネを 10 μM Cd 処理区と 20 μM As^(III) 処理区に播種し、10 日間水耕栽培した。カドミウムは原子吸光分析法で、ヒ素は ICP 発光分析法で測定した。値は平均値 ± SE で示した (n = 4)。アスタリスクは野生型株との有意な差を示す ($p < 0.05$, Dunnett 検定)。

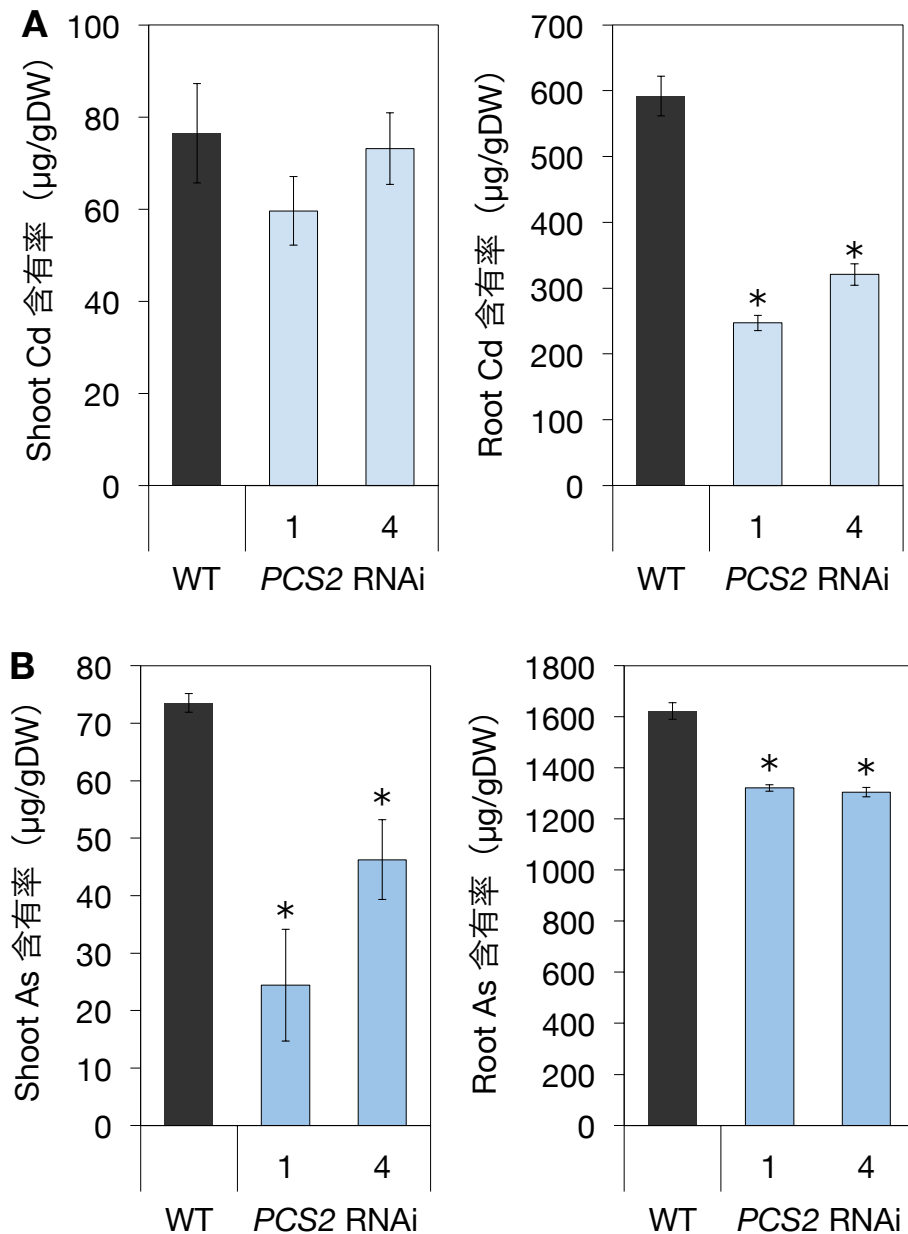


図2-3-8 *OsPCS2* RNAi イネのカドミウム、ヒ素含有率

OsPCS2 RNAi イネの地上部と根の (A) カドミウムと (B) ヒ素の含有率。野生型株 (WT, 品種: 日本晴) と RNAi イネを 10 μM Cd 処理区と 20 μM As^(III) 処理区に播種し、10 日間水耕栽培した。カドミウムは原子吸光分析法で、ヒ素は ICP 発光分析法で測定した。値は平均値 ± SE で示した (n = 4)。アスタリスクは野生型株との有意な差を示す ($p < 0.05$, Dunnett 検定)。

【考察】

・ OsPCS1 と OsPCS2 の生理的役割

OsPCS1 遺伝子の発現抑制はイネ幼苗のファイトケラチン含有率やカドミウム、ヒ素への耐性に有意な影響を与えなかった (図 2-3-3、2-3-5)。Hayashi et al. (2017) によると、*OsPCS1* の機能欠損変異体 *has2* もカドミウム、ヒ素耐性の低下を示さない。一方で、*OsPCS2* 遺伝子の発現抑制により植物体内のファイトケラチン含有率は有意に減少し、合成の基質であるグルタチオンが蓄積していた (図 2-3-5)。*OsPCS2* RNAi イネでは *OsPCS1* 遺伝子の発現量に影響はなかった (図 2-3-1)。以上の結果から、イネのファイトケラチン合成には *OsPCS2* が主要なファイトケラチン合成酵素として働くと考えた。

Hayashi et al. (2017) によると、*OsPCS1* 欠損変異体 *has2* と *OsABCC1* 欠損変異体 *has1* はどちらも野生型株と比べて穀実のヒ素含有率が高く、穂主節のヒ素含有率は低い。*OsABCC1* は液胞膜に局在する ABC 輸送体タンパク質でありファイトケラチン-ヒ素抱合体を液胞へと輸送する (Song et al., 2014)。このことから、*OsPCS1* は *OsABCC1* とともに上位節でヒ素を隔離することで穀実へのヒ素の転流を抑制すると考えられる (Hayashi et al., 2017)。一方で、幼苗では *OsPCS1* 遺伝子の発現抑制は地上部と根のヒ素含有率に影響しなかったことから (図 2-3-7 B)、*OsPCS1* は生育段階および組織特異的に機能すると考えた。

・ イネのカドミウム、ヒ素耐性におけるファイトケラチンの役割

OsPCS2 遺伝子の発現抑制により、ヒ素に暴露したイネ幼苗のファイトケラチン含有率が減少し (図 2-3-5)、個体のヒ素耐性が低下した (図 2-3-4 A)。Song et al. (2014) によると、*OsABCC1* の機能欠損はイネのヒ素感受性を増大させる。これらの結果は、ファイトケラチンを介した液胞へのヒ素の隔離がイネのヒ素耐性機構において重要な寄与を果たすことを示す。

対照的に、*OsPCS2* 遺伝子の発現抑制により、カドミウムに暴露したイネ幼苗のファイトケラチン含有率は顕著に減少したが (図 2-3-5)、個体のカドミウム耐性には大きな影響が見られなかった (図 2-3-4 B)。Song et al. (2014) によると、イネの *OsABCC1* 欠損変異体もカドミウム感受性を示さない。一方で、シロイヌナズナでは、*AtPCS1* 欠損変異体 *cad1-3* と *AtABCC1/AtABCC2* 二重欠損変異体はどちらもカドミウムへの感受性が顕著に増大する (Howden et al., 1995; Park et al., 2012)。以上の結果から、シロイヌナズナとイネのカドミウム耐性機構には違いがあり、イネはファイトケラチンに依存しないカドミウム耐性機構を備えている可能性が示唆された。

イネ幼苗ではカドミウムにより誘導されるファイトケラチン合成量はヒ素による誘導と比べて 10 分の 1 以下であったが (図 2-1-2)、*OsPCS2* (と *OsPCS1*) は *in vitro* においてカドミウムにより強く活性化した (図 2-2-2)。この一見矛盾する結果は、イネ細胞内においてカドミウムの大部分がファイトケラチンを介さない経路で液胞に輸送されることを示

唆するかもしれない。液胞へのカドミウムの輸送に関わる既知のイネの遺伝子として *OsHMA3* (heavy metal ATPase 3) が挙げられる。*OsHMA3* は液胞膜局在の P_{1B}-ATPase であり、根の液胞に Cd²⁺ を隔離することで地上部へのカドミウムの転流を抑制する (Ueno et al., 2010; Miyadate et al., 2011)。*OsHMA3* がイネのカドミウム耐性に関わるという報告はないが、*OsHMA3* の過剰発現はイネのカドミウム耐性を向上させる (Sasaki et al., 2014)。もう一つ可能性のある経路として、グルタチオン-カドミウム抱合体の輸送が考えられる。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では、グルタチオン-カドミウム抱合体が ABC 輸送体 YCF1 (yeast cadmium factor 1) により液胞へと隔離されることでカドミウム耐性を獲得する (Li et al., 1996; Li et al., 1997)。植物におけるグルタチオン-カドミウム抱合体の輸送体タンパク質は発見されていないが、Song et al. (2003) によるとシロイヌナズナに YCF1 を発現させるとカドミウム耐性が向上する。以上のような、Cd²⁺ もしくはグルタチオン抱合体の形態での液胞への隔離が、イネのカドミウム耐性に寄与している可能性がある。

・ グルタチオン類縁体の生合成へのファイトケラチン合成酵素の関与

イネはカドミウム、ヒ素ストレス条件下でグルタチオンの類縁体であるヒドロキシメチルグルタチオンや γ ECE を合成するが(図 2-1-2)、その生合成経路は明らかにされていない。本研究において、*OsPCS2* 遺伝子の発現抑制によりグルタチオン類縁体の含有率に変化がみられた。ヒドロキシメチルグルタチオンの含有率はカドミウム条件において野生型株の半分程度に減少し、 γ ECE の含有率はカドミウム、ヒ素条件ともに野生型株より有意に減少した(図 2-3-6)。この結果は *OsPCS2* がグルタチオン類縁体の生合成に関与することを示唆する。しかしながら、*in vitro* のアッセイでは MBP-*OsPCS2* にグルタチオンと L-Ser または L-Glu を与えてインキュベートしてもヒドロキシメチルグルタチオンや γ ECE は生成しなかった (data not shown)。Meuwly et al. (1995) によると、トウモロコシではカドミウムに暴露した際、ファイトケラチン [(γ Glu-Cys)_n-Gly] の合成が誘導された後に γ ECE (γ Glu-Cys-Glu) が検出されることから、 γ ECE はファイトケラチンの分解によって生じることが示唆されていた。本研究の、*OsPCS2* 遺伝子の発現抑制で γ ECE 含有率が減少するという結果はこの説を支持するものである。

第4節 2章 結論

本章ではイネのファイトケラチン合成酵素遺伝子について *in vitro* と *in vivo* の解析を行い、カドミウムやヒ素ストレスに対するイネの防御応答におけるファイトケラチンの生理的役割を明らかにしようとした。

第1節で、ファイトケラチン合成酵素のホモログ遺伝子を探索し、*Os05g0415200 (OsPCS1)* と *Os06g0102300 (OsPCS2)* が見つかった。この2つの遺伝子は選択的スプライシングにより複数のトランスクリプトを生じるが (図2-1-6)、双方とも完全長 ORF をもつバリエーションの転写量が最も大きいことを見出した (図2-1-7)。

第2節で、*OsPCS1* と *OsPCS2* の *in vitro* における酵素活性を調べた。どちらもカドミウムと亜ヒ酸により強く活性化しファイトケラチン合成活性を示した (図2-2-2)。また、*OsPCS1* は亜ヒ酸への高い親和性を示すのに対し、*OsPCS2* はカドミウムに対する親和性が高いことを見出した (図2-2-3)。

第3節で、*OsPCS1* と *OsPCS2* 遺伝子の発現抑制の影響を調べた。イネでは *OsPCS2* が金属ストレスに応答したファイトケラチン合成と個体のヒ素ストレス耐性に寄与することを明らかにした (図2-3-4、2-3-5)。一方で、イネのカドミウム耐性へのファイトケラチン合成の寄与は小さいことが示唆された (図2-3-4)。

第3章 グルタチオン合成酵素ホモログの生理的解析

第2章の検討から、ファイトケラチン合成酵素がイネのヒ素耐性に重要であることが示された。一方で、カドミウム耐性へのファイトケラチンの寄与は小さいことが示唆され、ファイトケラチン合成に依存しないカドミウム耐性機構の存在が推察された。ファイトケラチン合成酵素を持たない出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では、ABC 輸送体 YCF1 がグルタチオン-カドミウム抱合体を液胞へと隔離することで酵母にカドミウム耐性を賦与する (Li et al., 1996; Li et al., 1997)。また、イネはカドミウム暴露時にグルタチオンやヒドロキシメチルグルタチオンを多く蓄積する (図2-1-2)。このことから、イネのカドミウム耐性に単量体チオールのグルタチオンやグルタチオン類縁体が関与する可能性を考えた。

本章では、グルタチオンやグルタチオン類縁体の寄与について検証するため、グルタチオン生合成阻害剤の影響を調べるとともに、イネのグルタチオン合成酵素ホモログ遺伝子を探索し、遺伝子発現抑制イネを解析することでグルタチオンの役割を明らかにしようとした。

第1節 グルタチオン生合成阻害剤の影響の検討

本節では、イネのカドミウムとヒ素耐性へのグルタチオン類の寄与を検討するため、グルタチオンの生合成阻害剤であるブチオニンスルフォキシミン (buthionine sulfoximine, BSO) を用い、イネ幼苗の生育への影響を調べた。BSO はグルタチオン生合成経路の初発反応を触媒する γ グルタミルシステイン合成酵素 (γ EC synthetase; γ ECS) の活性を阻害することで細胞内グルタチオンの枯渇をまねく (Griffith, 1982; 図3-1-1)。またイネ科植物では、BSO によりグルタチオンだけでなく類縁体であるヒドロキシメチルグルタチオンの合成も顕著に阻害される (Klapheck et al., 1992)。

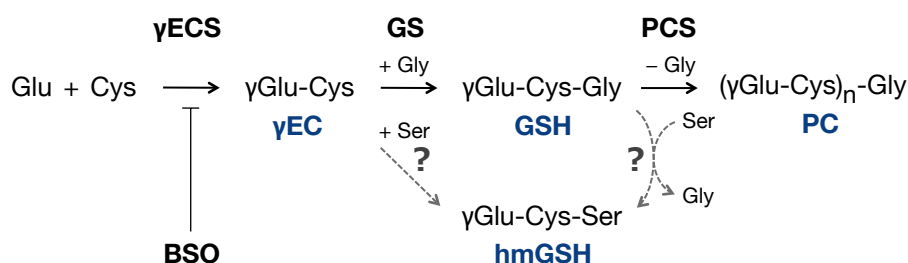


図3-1-1 高等植物におけるグルタチオン類の生合成経路

実線は既知の経路、破線は未同定の推定経路を示す。

【材料と方法】

・ 植物材料

イネ（品種：日本晴）

・ BSO を与えた生育試験

イネ（品種：日本晴）を通常の培養液（表 2-1-1）に播種して 7 日間水耕栽培したのち、6 つの処理区（対照区、10 μM Cd 処理区、10 μM As^(III)処理区、0.5 mM BSO 処理区、0.5 mM BSO + 10 μM Cd 処理区、0.5 mM BSO + 10 μM As^(III)処理区）に移してさらに 7 日間栽培した。培養液 50 mL を入れたバイアルに幼苗を 1 株ずつ入れ、根が培養液に浸るようにスポンジで葉鞘部を固定した。移植後 4 日目に培養液を交換した。14 日齢幼苗の草丈、根長、新鮮重を測定した。

・ カドミウムとヒ素の含有率の測定

上記の生育試験を行った個体を用いてカドミウムとヒ素の含有率を測定した。測定方法は第 2 章 第 3 節と同様に行った。

【結果】

・ グルタチオン合成を阻害したイネ幼苗の生育

BSO によりグルタチオン合成を阻害した際のイネ幼苗の生育を比較した (図 3-1-2)。BSO を添加しない場合では、カドミウムとヒ素による新鮮重の有意な減少は見られなかった。カドミウムやヒ素を含まない場合では BSO を添加しても新鮮重に影響しなかったが、カドミウムまたはヒ素を含む処理区では BSO の添加によって新鮮重が有意に減少した。草丈は、BSO の添加によって全ての処理区で有意に低下したが、カドミウムまたはヒ素を含む処理区の方が BSO による低下の度合いが大きかった。

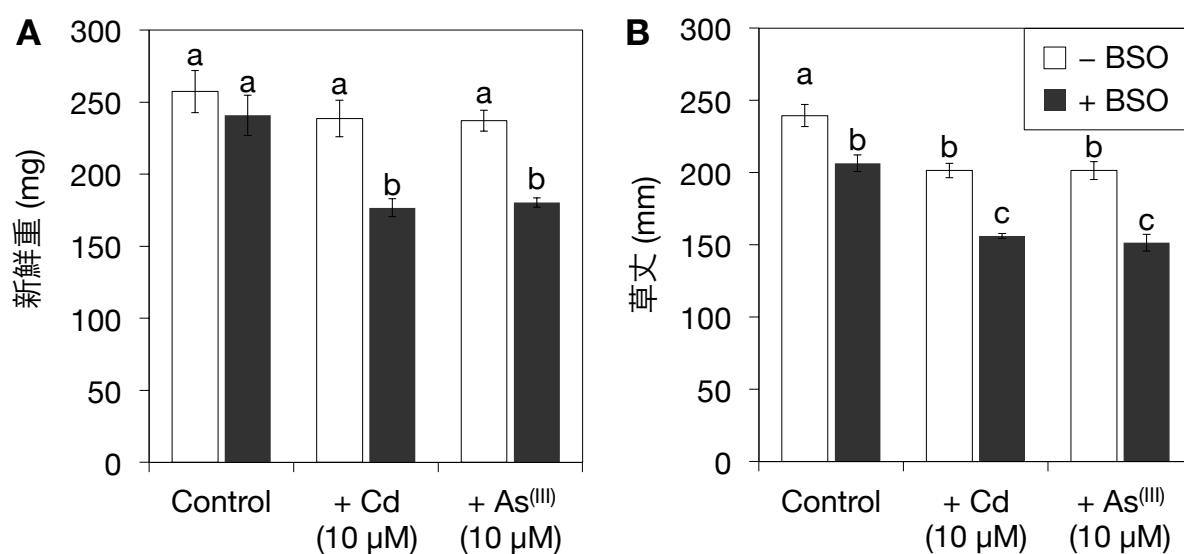


図 3-1-2 BSO 処理したときのイネの生育

(A) イネ幼苗全体の新鮮重量と (B) 草丈。イネ (品種: 日本晴) を通常の培養液に播種して 7 日間水耕栽培したのち、6 つの処理区 (対照区、10 μM Cd 処理区、10 μM As^(III) 処理区、0.5 mM BSO 処理区、0.5 mM BSO + 10 μM Cd 処理区、0.5 mM BSO + 10 μM As^(III) 処理区) に移してさらに 7 日間栽培した。値は平均値 ± SE で示した (n = 5)。バー上の異なる文字は有意な差を示す (p < 0.05, Tukey 検定)。

・ イネ幼苗のカドミウム、ヒ素含有率

BSO を与えて栽培したイネ幼苗のカドミウムとヒ素の含有率を測定した (図3-1-3)。BSO の添加により根のカドミウム含有率が顕著に減少し、地上部のカドミウム含有率は有意に増加した (図3-1-3A)。一方で、ヒ素の含有率は BSO により地上部と根のどちらも有意に減少した (図3-1-3B)。

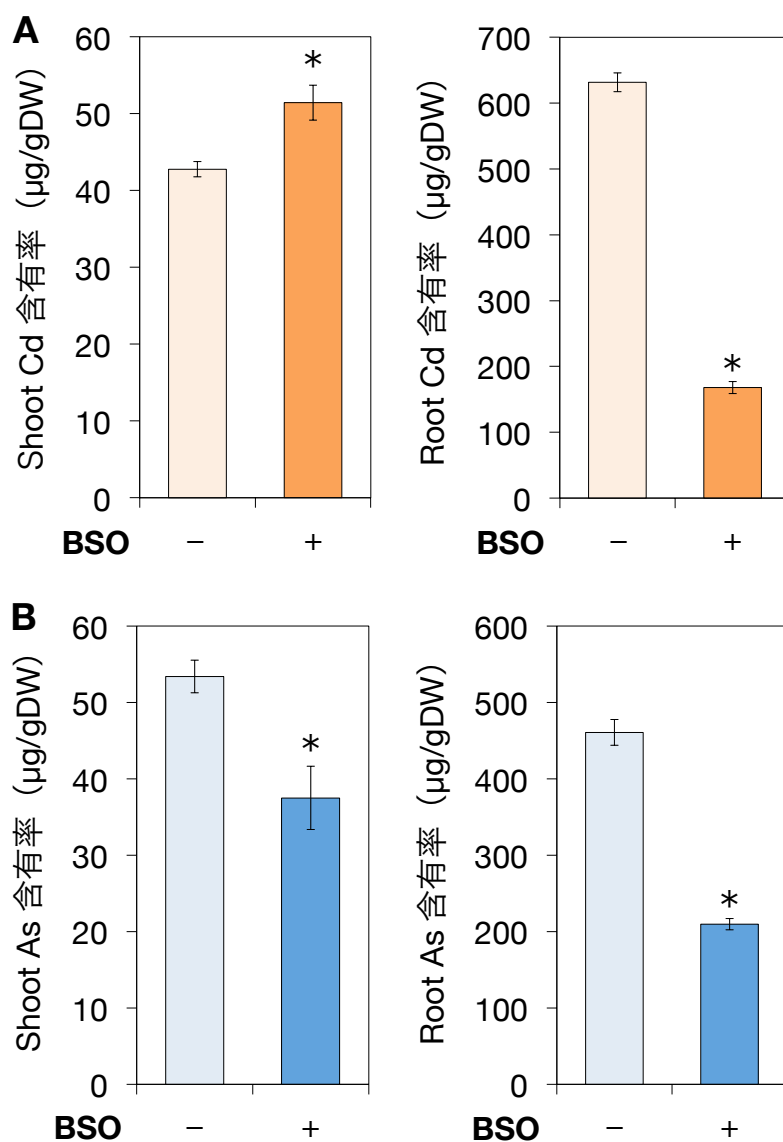


図3-1-3 BSO 処理したときのカドミウムとヒ素の含有率

イネ幼苗の地上部と根の (A) カドミウムと (B) ヒ素の含有率。カドミウムは原子吸光分析法で、ヒ素は ICP 発光分析法で測定した。値は平均値 ± SE で示した (n = 5)。アスタリスクは処理区間の有意な差を示す ($p < 0.05$, Student t 検定)。

【考察】

・ グルタチオンの生合成阻害がイネのカドミウム、ヒ素耐性に与える影響

グルタチオンの合成阻害によりイネ幼苗のカドミウムとヒ素への耐性が低下した（図3-1-2）。これはイネの金属ストレス耐性においてグルタチオンが重要な役割を果たすことを示す。ヒ素耐性の低下はグルタチオンの減少によりファイトケラチン合成が滞ったためと考えられる。一方で、ファイトケラチン合成の抑制はカドミウム耐性に大きな影響を与えなかったことから（図2-3-4）、グルタチオンまたはグルタチオン類縁体は単量体チオールとしてイネのカドミウム耐性に寄与することが示唆された。グルタチオンはカドミウムストレスによって生じた活性酸素種（ROS）の消去系においても重要な役割を果たすことから（Jozefczak et al., 2012）、抗酸化作用もしくは抱合体形成によってイネのカドミウム耐性に寄与すると考えた。

・ カドミウムとヒ素の体内動態への影響

グルタチオンの合成阻害によって根のカドミウム含有率が4分の1程度に減少し地上部のカドミウム含有率は増加した（図3-1-3A）。この結果は、グルタチオンなどのチオールペプチドがイネの根でカドミウムを隔離することで地上部への転流を抑制していることを示唆する。また、イネの根に蓄積するカドミウムの大部分はチオールペプチドと結合した形態で存在すると考えられる。山岡ら（2010）は、X線吸収端微細構造（XAFS）解析によりイネにおけるカドミウムの化学形態を分析し、イネの根に含まれるカドミウムのほとんどがCd-S結合をもつ化学形態で存在することを報告しており、本研究の結果はこれを支持するものである。

グルタチオン合成阻害により根のヒ素含有率は半分程度に減少し、地上部のヒ素含有率も減少した（図3-1-3B）。これは *OsPCS2* RNAi イネでも同様であった（図2-3-8B）。この結果から、イネの根でファイトケラチンと結合していない遊離の亜ヒ酸 $As^{(III)}$ は速やかに根の細胞外へと排出され、地上部へは転流されにくいことが示唆された。Zhao et al. (2010) によると、イネ幼苗にヒ酸 $As^{(V)}$ を与えると吸収された $As^{(V)}$ の80%以上は $As^{(III)}$ として速やかに根から排出される。

第2節 GS ホモログ遺伝子の相同性検索と発現量解析

第3章 第1節の検討から、グルタチオンやグルタチオン類縁体がイネのカドミウム耐性に関与することが示された。

グルタチオンは、 γ グルタミルシステイン合成酵素 (γ ECS または GSH1) とグルタチオン合成酵素 (GS または GSH2) が触媒する2段階の反応によって合成される(図3-1-1)。シロイヌナズナでは両酵素はそれぞれ単一の遺伝子にコードされ、*AtGSH1* または *AtGSH2* の欠損は致死性を示すほか (Cairns et al., 2006; Pasternak et al., 2008)、*AtGSH1* の変異により GSH 合成量が減少した *cad2-1* 変異体はカドミウム感受性を示す (Howden et al., 1995; Cobbett et al., 1998)。一方で、イネのグルタチオン生合成に関わる酵素および遺伝子の解析はこれまで行われていない。

本節では、イネのグルタチオン合成酵素遺伝子を同定するためシロイヌナズナのグルタチオン合成酵素 AtGS のホモログ遺伝子を探索し、植物の既知のグルタチオン合成酵素遺伝子の配列と比較した。また、金属ストレスに応答した遺伝子発現量の変化を解析した。

【材料と方法】

・ ホモログ遺伝子の相同性検索

シロイヌナズナのグルタチオン合成酵素 AtGS の推定アミノ酸配列を問い合わせ配列とし、RAP-DB で BLAST 検索を行ったところ、3つの遺伝子 *Os11g0642800*, *Os12g0263000*, *Os12g0528400* が見つかったため、これらを順に *OsGS1*, *OsGS2*, *OsGS3* と名付けた。*OsGS1* のトランスクリプト配列 (AK068792) は完全長の ORF (1623 bp) を含んでいたが、他2つのトランスクリプト配列 (*OsGS2*, AK099555; *OsGS3*, AK103004, AK058922) はコード領域の部分配列であった。そこで、これらの配列 (*OsGS2*, AK099555; *OsGS3*, AK103004) を問い合わせ配列として NCBI で再度 BLAST 検索したところ、完全長トランスクリプト配列の候補 (*OsGS2*, EU267952; *OsGS3*, XM_015762575) が見つかった。*OsGS2* のトランスクリプト配列 (EU267952) は完全長の ORF (1623 bp) を含んでいた。これはジャポニカ品種 Ilpumbyeo 由来の配列であったが、エキソン領域の塩基配列は日本晴ゲノムの対応する領域と完全に一致した。*OsGS3* のトランスクリプト配列 (XM_015762575) はコンピュータ解析で予測された推定トランスクリプトであった。

・ 遺伝子断片の増幅とシーケンス解析

OsGS2 と *OsGS3* の推定トランスクリプト配列をシーケンス解析で確認するため、推定コード領域の外側に設計したプライマーとイネ (品種: 日本晴) cDNA を鋳型として PCR を行った。*OsGS2* 断片は GS2.seqF, GS2.seqR のプライマー組、*OsGS3* 断片は GS3.seqF, GS3.seqR のプライマー組を用いた。DNA ポリメラーゼは Blend Taq (東洋紡) を用い、TaKaRa PCR

Thermal Cycler Dice (タカラバイオ) で PCR 増幅した。PCR 産物の一部を 1% (w/v) アガロースゲルで電気泳動し、増幅断片の特異性とサイズを確認した。PCR 産物を Mag Extractor (東洋紡) で精製し、PCR 増幅に用いたプライマーと GS2.ex-F, GS2.ex-R, GS3.ex-R プライマーを用いてシーケンス解析 (ファスマック) を行った。PCR とシーケンスに用いたプライマーの配列を表 3-2-1 に示した。OsGS2 と OsGS3 (LC385880) の増幅断片の塩基配列は推定トランスクリプト配列と完全に一致した。

・ 分子系統解析

高等植物のグルタチオン合成酵素 GS とホモグルタチオン合成酵素 hGS 遺伝子の ORF 配列を用い、Clustal W 2.1 プログラムの隣接結合法 (neighbor-joining method) で系統樹を作成した (Larkin et al., 2007)。植物種は、アブラナ科: シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、セイヨウカラシナ (*Brassica juncea*)、マメ科: ダイズ (*Glycine max*)、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*)、タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*)、エンドウ (*Pisum sativum*)、イネ科: イネ (*Oryza sativa*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、コムギ (*Triticum aestivum*)、オオムギ (*Hordeum vulgare*) を用いた。アクセッション番号は以下の通り。AtGS (AJ243813), BjGS (Y10984), Gm-hGS (AJ272035), LjGS (AF279703), Lj-hGS (AY219337), MtGS (AF194421), Mt-hGS (AF075700), PsGS (AF231137), Ps-hGS (AF258319), OsGS1 (AK068792), OsGS2 (EU267952), OsGS3 (LC385880), ZmGS (AJ579383), TaGS1 (AJ579380), TaGS2 (AJ579381), TaGS3 (AJ579382), TaGS4 (predicted, AK455907), HvGS1 (predicted, AK354495), HvGS2 (predicted, AK364878)。このうち TaGS4 (AK455907), HvGS1 (AK354495), HvGS2 (AK364878) は、本研究で OsGS1 または OsGS2 のトランスクリプト配列を問い合わせ配列として NCBI で BLAST 検索した結果見つかった配列であり、アノテーションはされていない。

・ 遺伝子発現量解析

イネ (品種: 日本晴) を対照区、10 μ M Cd 処理区、10 μ M As^(III) 処理区で 10 日間水耕栽培し、幼苗から RNA を抽出した。リアルタイム PCR を用いてグルタチオン合成酵素遺伝子 OsGS1, OsGS2, OsGS3 と γ グルタミルシステイン合成酵素様遺伝子 OsECSs (Os05g0129000, Os07g0462000) の相対発現量を解析した。2つの OsECS 遺伝子は塩基配列が 95% 同一であり、それぞれに特異的なプライマーを設計することが難しかったため、双方に共通するプライマーを設計して解析に用いた。RNA 抽出および発現量解析は第 2 章 第 1 節と同様に行った。プライマーは、GS1.ex-F, GS1.ex-R, GS2.ex-F, GS2.ex-R, GS3.ex-F, GS3.ex-R および ECSs.ex-F, ECSs.ex-R を用い (表 3-2-1)、Ubiquitin と Actin1 を内部標準として用いた。

表 3-2-1 シークエンスと遺伝子発現量解析に用いたプライマー

GS1.seqR	5'-TCCGTAGCTTGGCAATGTC-3'
GS2.seqF	5'-CACCAACTCCGATCGAACA-3'
GS2.seqR	5'-GTACCTCAATCTCGGCTGATAG-3'
GS3.seqF	5'-ACTTCGGTTCGACAGTTCGGCAC-3'
GS3.seqR	5'-TGCCATTCAAAAAGTTCGAAA-3'
GS1.ex-F	5'-GCGCACCAAAGTTTCTTCATC-3'
GS1.ex-R	5'-GACCCTCTGCTTTACCACTCATC-3'
GS2.ex-F	5'-TGGGCTGAGTTCAACAATCAA-3'
GS2.ex-R	5'-CACCCCATACATTTCTCTCAAGG-3'
GS3.ex-F	5'-TTGAAGCCCCAACGTGAA-3'
GS3.ex-R	5'-GGCAAACACCACCACGAA-3'
ECSs.ex-F	5'-TGAATGACTGGGAGAACCATCTAA-3'
ECSs.ex-R	5'-GGCAAAGCACACAATCTCCTC-3'

【結果】

・ 相同性検索と分子系統解析

シロイヌナズナのグルタチオン合成酵素 AtGS との相同性に基づき、イネの3つのホモログ遺伝子 (*OsGS1*, *OsGS2*, *OsGS3*) を見出した。イネ (品種: 日本晴) cDNA を鋳型とした PCR とシークエンス解析から、これら3つの遺伝子のトランスクリプト配列 (*OsGS1*, AK068792; *OsGS2*, EU267952; *OsGS3*, LC385880) を確認した。これらの翻訳産物の推定アミノ酸配列を他の植物種のグルタチオン合成酵素と比較した (図 3-2-1)。OsGS1, OsGS2, OsGS3 はコムギのグルタチオン合成酵素 TaGS1 とそれぞれ 82.7, 61.8, 77.9%の相同性があり、シロイヌナズナのグルタチオン合成酵素 AtGS とはそれぞれ 62.1, 56.8, 67.0%の相同性があった。

アブラナ科、マメ科、イネ科植物のグルタチオン合成酵素遺伝子 *GS* とホモグルタチオン合成酵素遺伝子 *hGS* の完全長 ORF 配列から系統樹を作成した (図 3-2-2)。同じ科に属する植物種の遺伝子はそれぞれまとまったクラスターを形成したが、マメ科クラスターの中で *GS* 遺伝子群と *hGS* 遺伝子群は別の小クラスターを形成した。*OsGS1* と *OsGS3* は既報のイネ科植物グルタチオン合成酵素 *TaGS1* や *ZmGS* と同じクラスターに属したが、*OsGS2* はそれとは離れた位置にあった。BLAST 検索の結果、*OsGS2* と高い相同性のある推定 *GS* 遺伝子配列 (*TaGS4*, *HvGS2*) がコムギとオオムギにも見つかり、これら3つの遺伝子が他のイネ科植物の *GS* 遺伝子とは別のクラスターを形成した。

OsGS1	1	MSSYVTTPHH HHHGCCSGSRRLQAE APPARPRLLVAAAARHVALPPRRRAVAS -RAMSAE
OsGS2	1	MAAAAARSAGHPPSFASSLGR CRVLEVVVVRRPGGAARPSPLLA PARCAAAVGTAPKVE
OsGS3	1	-----MSAAAE
TaGS1	1	MSSCVSSSHH-----CARLPAPPPRAH-----LAAADSCASPYRRRVGSLRAMGAE
AtGS	1	MGSGCCSSLSYSSSSSTCSATVFSISSEPPSSSSSLKLNPSFLFQNPKTLRNQOPPLRCGRSF
OsGS1	60	APLGVAPAAAEEMA-A-VVDEMAFEAAVWCAVHGLVVGDRAEFRSGTIFGVGLVHAPFA
OsGS2	61	GGRRSSEQQLAVAPARLVDELVEEALVWSSQHGLVVGDKNHPRSGKAPGVGLHAPFA
OsGS3	7	GRPPAAAG-----EMVREATAWCALHGLVVGDRADPRSGTVPGVGLVHAPFS
TaGS1	49	APSSVAPAG-RKAS-A-VOAEMVBAAMWCAMHGLVVGDRGNPRSGTVPGVGLVHAPFS
AtGS	61	KMESQKPIFDLEKLDDF-VQKLVVDALVWSSLHGLVVGDKTYQKSGNVPGVGLHAPIA
OsGS1	118	LLPTRFPASFWKQARELAPIFNLDVDRVSLDGEFLQDSLRTKOVDDFTSRLLDIHKMM
OsGS2	121	LLPMSFSKVVDQAVELAPFNELVDRVSLDGFLOETLARTKEVDSFTGRLLDIHKMM
OsGS3	56	LLPTHLPESHWRQACELAPIFNELVDRVSLDGFLODSLRTKOVDDFTSRLLDIHKMM
TaGS1	106	LLPTRFPASFWKQACELAPIFNELVDRVSLDGFLOGSLRTKOVDDFTARLLDIHKMM
AtGS	120	LLPTGFPEAVWKQACDVTPLFNELVDRVSLDSKFLQDSLRTKVVDFVFTSRLLDIHSKML
OsGS1	178	EVNKEEDIRLGLHRSYMLDSETNLLQIELNTISSFPGLSSLVSELHRTLNRHGKVL
OsGS2	181	KLNKKEDVRLGLHRSYMLDGAADQLLQVELNTISSNGLACGVCELHRTNIRHEREL
OsGS3	116	EINKENIRLGLHRSYMLDSETNLLQIELNTISSFPGLSSLVSELHRTLIDYGHLF
TaGS1	166	AVNKKEDIRLGLHRSYMLDSETNLLQIELNTISSFPGLSSLVSELHRTLNYQGEVL
AtGS	180	ERNKKEDIRLGLHRFDYMLGEETNLLQIEMNTISCSFPGLSRLVSOLHQSLLRSYGDQI
OsGS1	238	GLDSKRIPONWAAATQFAEALSMWTEFNKSAVIMMVVOPEERNMYDOYWLINHLKESHG
OsGS2	241	GLDPESVVGNTAIAQHAELAGAWAFNNOSSVVLVVVOPEERNMYDOYWLITVALREMYG
OsGS3	176	CLDSKRVPGNASSQFAKALARAWDEFNVDSAVIMMIVOPEERNMYDOYWLAKHLKESHG
TaGS1	226	GLDSERIPRNWAAIQFAEALGKAWVEVNGSAVMMIVOPEERNMYDOYWLINHLKESHG
AtGS	240	GIDSERVPIINTSTIQFADALAKAWLEYSNPRAVVMVIVVOPEERNMYDQHLSSILREKHN
OsGS1	298	VKTIRKTLAQVEAEGVLPDGTLVVDGQTVSVVYFRAGYSPNDYPSEAEWRARLLIEOSS
OsGS2	301	VTTIRKTLAADAEGELRPDGTLDGLPVAVVYFRAGYTPNDYPSEAEWRARLLIEOSS
OsGS3	236	ITTIRKTLSEVEAEGHVLDPDGTLDGKTVSVVYFRAGYTPNDYPSEAEWRARLLIEOSS
TaGS1	286	VMTIRKTLAQVEAEGVLPDGTLVVDGRPVAVVYFRAGYTPNDYPSEAEWVARLLIEOSS
AtGS	300	IIVVIRKTLAIVEKEGSVQEDETLVGGQAVAVVYFRSGYTPNDHPSESEWVARLLIEOSS
OsGS1	358	AIKCPISYHLVGTKKIQOELAKPNI LERFLNKKEDIAKLRKCFAGLWSLDNEEIVKQAI
OsGS2	361	AIKCPISAHHLVGTKKIQOELAKENVLERFLDNKADI EKVRKCFAGLWSLDENDSIVMSAI
OsGS3	296	AVKCPISYHLVGTKKIQOELARPNVLERFLENKEIITKLRKCFAGLWSLDDEEIVKSAI
TaGS1	346	AIKCPISYHLVGTKKIQOELAKPSVLERFLDN EEDIAKLRKCFAGLWSLDNEEIVKSAI
AtGS	360	AVKCPISYHLVGTSKKIQOELAKPVLERFLDNKEDIAKLRKCFAGLWSLDDEEIVKQAI
OsGS1	418	EKPDFVLKLPQREGGGNNIYGDVRETIVRLOKEQGEALAAAYILMQRIFPRASLTHLVQG
OsGS2	421	ESPELFLVLPQREGGGNNIYGDNLRETLLSLKKDGSNELAAAYILMQRIFPPASLICYLVRD
OsGS3	356	QKPELFLVLPQREGGGNNIYGDVRETIVRLOKEGGDALAAAYILMQRIFPKASLNLVVRG
TaGS1	406	EKPDFVLKLPQREGGGNNIYGDVRETIVRLOKKEGEALAAAYILMQRIFPRASLTHLVQG
AtGS	420	EKPGFLVLPQREGGGNNIYGDVRENLRLRLOKEGEGNAAAYILMQRIFPKVSNMFLVRE
OsGS1	478	GVCFEELTISELGIYGAYLRNKDKVVLNNOCGYLMRTKVSSSNEGGVAAGFVLDLSILT
OsGS2	481	GTCIRENAVSEFIFGAYLRNKDRIVINDOCGYLMRTKASINEGGVAGVAFVLSVFLT
OsGS3	416	GVCHEALTISELGIYGAYLRNKDKVVMNEOCGYLMRTKVSSSDEGGVAAGFVLDLSYLT
TaGS1	466	GVCFEELTISELGIYGSYLRNKDKVVLNNOCGYLMRTKVSSSNEGGVAAGFVLDLSILT
AtGS	480	GVYHKHQAMSELGVYGYLRSKDKVLVNEOCGYLMRTKASSDEGGVAAGFVLDLSIVLN
OsGS1	538	DEW-
OsGS2		----
OsGS3	476	DKAM
TaGS1	526	DE--
AtGS	540	----

図3-2-1 高等植物のグルタチオン合成酵素アミノ酸配列のアラインメント

イネ、コムギ、シロイヌナズナのグルタチオン合成酵素遺伝子の推定アミノ酸配列を比較した。ClustalW 2.1 プログラムを用いてアラインメントを行なった。アクセッション番号を以下に示す。OsGS1, AK068792; OsGS2, EU267952; OsGS3, LC385880; TaGS1, AJ579380; AtGS, AJ243813

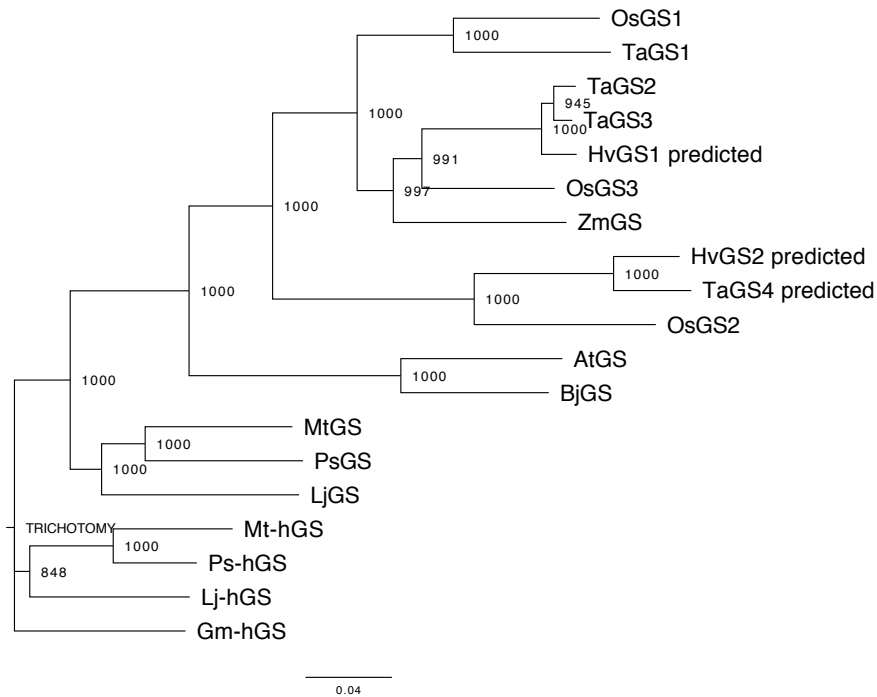


図3-2-2 高等植物のグルタチオン、ホモグルタチオン合成酵素遺伝子の系統樹

高等植物のグルタチオン合成酵素 (GS)、ホモグルタチオン合成酵素 (hGS) 遺伝子の ORF 配列を用い、Clustal W 2.1 プログラムの隣接結合法 (neighbor-joining method) で系統樹を作成した。分枝点の数字はブートストラップ値 (/1000) を示す。略称とアクセッション番号を以下に示す。AtGS (*Arabidopsis thaliana* GS, AJ243813), BjGS (*Brassica juncea* GS, Y10984), Gm-hGS (*Glycine max* hGS, AJ272035), LjGS (*Lotus japonicus* GS, AF279703), Lj-hGS (*L. japonicus* hGS, AY219337), MtGS (*Medicago truncatula* GS, AF194421), Mt-hGS (*M. truncatula* hGS, AF075700), PsGS (*Pisum sativum* GS, AF231137), Ps-hGS (*P. sativum* hGS, AF258319), ZmGS (*Zea mays* GS, AJ579383), TaGS1 (*Triticum aestivum* GS1, AJ579380), TaGS2 (*T. aestivum* GS2, AJ579381), TaGS3 (*T. aestivum* GS3, AJ579382), TaGS4 (*T. aestivum* predicted GS mRNA, AK455907), HvGS1 (*Hordeum vulgare* predicted GS mRNA, AK354495), HvGS2 (*H. vulgare* predicted GS mRNA, AK364878)

・ 細胞内局在の予測

TargetP (Emanuelsson et al., 2000) と WoLF PSORT (Horton et al., 2007) を用いて、OsGS1, OsGS2, OsGS3 の推定アミノ酸配列の N 末端配列から翻訳産物の細胞内局在を予測した (表 3-2-2)。OsGS1 と OsGS2 は葉緑体局在、OsGS3 は細胞質または葉緑体に局在すると予測された。

表 3-2-2 OsGS タンパク質の細胞内局在の予測

TargetP v1.1							
	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC
OsGS1	540	0.954	0.141	0.002	0.056	C	1
OsGS2	540	0.910	0.269	0.005	0.017	C	2
OsGS3	479	0.436	0.112	0.081	0.420	C	5

WoLF PSORT				
	Chlo	Mito	Cyto	Cysk
OsGS1	10	4		
OsGS2	14			
OsGS3	2		9	3

TargetP: Len, sequence length; cTP, chloroplast transit peptide; mTP, mitochondrial transit peptide; SP, signal peptide; Loc, prediction of localization; C, chloroplast; RC, Reliability class, 1: $\text{diff} > 0.800$, 2: $0.800 > \text{diff} > 0.600$, 3: $0.600 > \text{diff} > 0.400$, 4: $0.400 > \text{diff} > 0.200$, 5: $0.200 > \text{diff}$.

WoLF PSORT: Chlo, chloroplast; Mito, mitochondria; Cyto, cytoplasm; Cysk, cytoskeleton.

・ *OsGS* 遺伝子の発現量解析

3つの *OsGS* 遺伝子と、グルタチオン合成の1段階目の反応を触媒する γ グルタミルシステイン合成酵素様遺伝子 *OsECSs* の相対発現量を調べた (図3-2-3)。イネ (品種: 日本晴) を対照区、10 μ M Cd 処理区、10 μ M As^(III) 処理区に播種して10日間水耕栽培し、RNAを抽出してリアルタイムPCRを行った。*OsGS1* 遺伝子の相対発現量は他の2つの *OsGS* 遺伝子と比べて顕著に (1/100程度) 低かった。*OsGS1* 遺伝子の発現量は地上部においてカドミウムとヒ素により有意に増加し、根においても増加する傾向にあった。*OsGS3* 遺伝子の発現量は根においてカドミウムとヒ素により有意に増加し、その発現変化は *OsECSs* 遺伝子群の発現変化のパターンと同じであった。一方で、*OsGS2* 遺伝子の発現量はカドミウムによっては有意に変化せず、ヒ素によって有意に減少した。

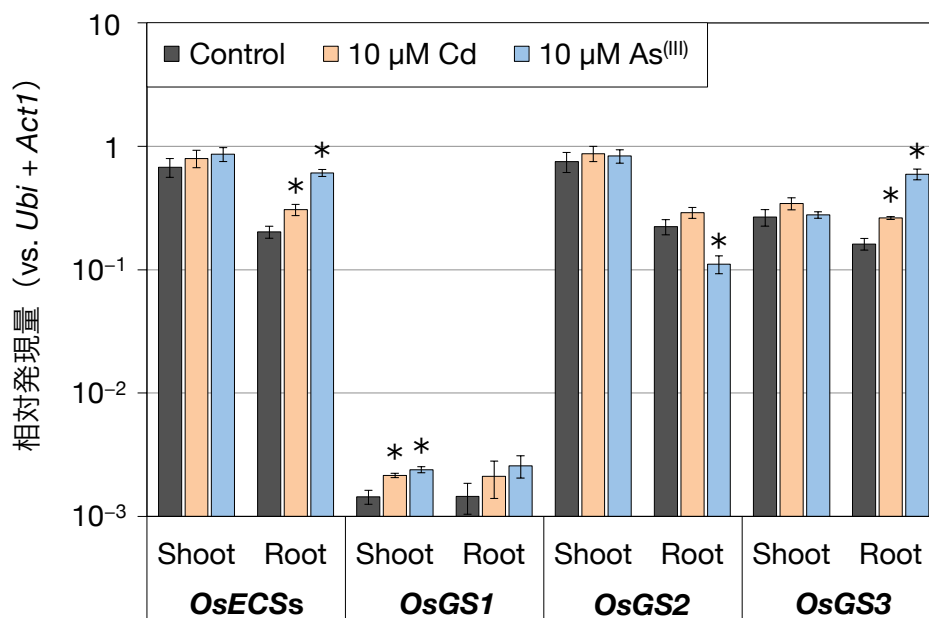


図3-2-3 カドミウム、ヒ素による *OsGS* 遺伝子の発現量変化

対照区、10 μ M Cd 処理区、10 μ M As^(III) 処理区で栽培した10日齢のイネ幼苗 (品種: 日本晴) からRNAを抽出した。リアルタイムPCRを用いて遺伝子発現量を解析した。 γ グルタミルシステイン合成酵素様遺伝子 *OsECSs* は2つの遺伝子に共通する配列のプライマーを設計した。*Ubiquitin* と *Actin1* を内部標準遺伝子として用いた。値は平均値 \pm SE で示した (n = 4)。アスタリスクは対照区との有意な差を示す ($p < 0.05$, Dunnett 検定)。

【考察】

・ *OsGS* 遺伝子の配列

イネには3つの *GS* ホモログ遺伝子が見つかったが、*OsGS1* と *OsGS3* は既報のイネ科植物のグルタチオン合成酵素遺伝子と高い相同性を示した (図3-2-2)。これは *OsGS1* と *OsGS3* がグルタチオン合成活性を持つことを示唆する。一方で、*OsGS2* は *TaGS1* などとは比較的相同性が低く、系統樹解析では *OsGS1*, *OsGS3* とは別のクラスターに属した (図3-2-2)。マメ科植物において *GS* 遺伝子と *hGS* 遺伝子は独立したクラスターを形成していることから、*OsGS1*, *OsGS3* と *OsGS2* の間にも酵素活性に違いがあることが示唆された。また *OsGS2* と高い相同性を示す遺伝子配列 (*TaGS4*, *HvGS2*) が新たにコムギとオオムギにも見つかったことから、*OsGS2* はイネ科植物に共通の酵素活性をもつことが予想された。この点については第4章で検討した。

OsGS1 と *OsGS2* は独立した2つのプログラムで葉緑体に局在すると予測されたが、*OsGS3* はN末端の60 aaを欠失しており細胞質または葉緑体に局在すると予測された (表3-2-2)。この局在はシロイヌナズナの *AtGS* と同じである。*AtGS* 遺伝子はシングルコピーであるが、選択的スプライシングにより葉緑体局在型と細胞質局在型の2つのトランスクリプトが生じるとされている (Wachter et al., 2005)。

・ *OsGS* 遺伝子の発現量変化

カドミウムやヒ素ストレスにより *OsGS1*, *OsGS3* と *OsECS* 遺伝子の発現量が有意に増加した (図3-2-3)。これはカドミウム、ヒ素ストレス条件下でイネのグルタチオン含有率が増加すること (図2-1-2) と一致する。同様に、シロイヌナズナでもカドミウムにより *GSH1* (*γECS*), *GSH2* (*GS*) 遺伝子の発現量が増加する (Jozefczak et al., 2014)。一方で、*OsGS2* の遺伝子発現量はヒ素ストレスにより減少した。この結果から、*OsGS2* は *OsGS1*, *OsGS3* とは生理的機能に違いがあることが示唆された。

第3節 *OsGS* 遺伝子発現抑制イネの表現型解析

第3章 第2節の検討から、イネには3つのグルタチオン合成酵素遺伝子が存在し、既知の植物のグルタチオン合成酵素との相同性や遺伝子発現変化に違いがあることがわかった。本節では、3つの *OsGS* 遺伝子の生理機能の違いを明らかにするため、RNAi 法により *OsGS1*, *OsGS2*, *OsGS3* のいずれかの遺伝子発現を特異的に抑制した形質転換イネを作出し、植物体内のチオールペプチドの含有率やカドミウム、ヒ素耐性への影響を解析した。

【材料と方法】

・ 形質転換による RNAi イネの作出

RNAi ベクターとして pANDA を用い (Miki & Shimamoto, 2004)、イネ (品種: 日本晴) をアグロバクテリウム法で形質転換して (Toki et al., 2006)、RNAi イネを作出した。*OsGS1*, *OsGS2*, *OsGS3* それぞれに特異的な 306 bp, 289 bp, 290 bp の配列を RNAi のトリガー配列として用いた。トリガー配列の相同性は 39.6–53.8% であった。対応するプライマー組 (GS1.RNAi.F, GS1.RNAi.R, GS2.RNAi.F, GS2.RNAi.R または GS3.RNAi.F, GS3.RNAi.R) を用いてトリガー断片を PCR 増幅し、第2章 第3節と同様に形質転換イネを作出した。実験には T₁ 世代の個体を用い、サンプリングの際に地上部と根に分けたあと、残った基部の植物片からゲノム DNA を抽出した。これを鋳型とし、対応する RNAi.R プライマーと Gus-linker.R プライマー、DNA ポリメラーゼとして Blend Taq (東洋紡) を用いて PCR を行い各個体の遺伝子型を確認した。用いたプライマーの配列を表 3-3-1 に示した。

表 3-3-1 GS RNAi コンストラクトの作成に用いたプライマー

GS1.RNAi.F	5'- <u>CACCGTCACTC</u> ACCATGCACCATC-3'
GS1.RNAi.R	5'-AACTGGTGCTCAACCGAATC-3'
GS2.RNAi.F	5'-CACCAACTCCGATCGAACA-3'
GS2.RNAi.R	5'-CTCCTCGACCAGCTCATCC-3'
GS3.RNAi.F	5'- <u>CACCGACAAGG</u> CGATGTAGAC-3'
GS3.RNAi.R	5'-TGCCATTCAAAA <u>ACTG</u> CAAAA-3'

下線部は TOPO クローニングのために付与した配列を示す。

- ・ 遺伝子発現量解析

作出した *GS RNAi* イネと野生型株（品種：日本晴）を通常の培養液（表 2-1-1）で 18 日間水耕栽培した。培養液は 6 日ごとに交換した。1 個体ずつ地上部と根から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて *OsGS1*, *OsGS2*, *OsGS3* の遺伝子発現量を解析した。RNA 抽出およびリアルタイム PCR は第 2 章 第 1 節と同様に行った。プライマーは、GS1.ex-F, GS1.ex-R, GS2.ex-F, GS2.ex-R および GS3.ex-F, GS3.ex-R を用い（表 3-2-1）、*Ubiquitin* を内部標準として用いた。

- ・ チオールペプチド含有率の測定

野生型株（品種：日本晴）と *GS RNAi* イネを通常の培養液に播種して 10 日間水耕栽培したのち、10 μM Cd 処理区に移してさらに 10 日間栽培した。培養液は 5 日ごとに交換した。20 日齢幼苗を 1 個体ずつ地上部と根に分けてサンプリングした。地上部試料を凍結乾燥したのち、ボールミルで粉碎した。

チオールペプチドの抽出と mBBR 誘導体化は、第 2 章 第 1 節から一部を変更して行った。植物粉末試料 10 mg を 0.1% TFA/6.3 mM DTPA 250 μL と混和し、4°C で 10 分間遠心した。上清 100 μL を 200 mM HEPES-KOH (pH 8.2) /6.3 mM DTPA 180 μL と混和したのち、20 mM ジチオトレイトール (dithiothreitol; DTT) 10 μL を添加し室温で 30 分静置した。50 mM mBBR (ジメチルスルホキシドに溶解) 10 μL を添加して暗所、室温で 1 時間静置した後、1 M MSA 120 μL を添加して誘導体化反応を停止した。試料は解析まで遮光して氷上に置くか冷凍保存した。

HPLC のタイムプログラム、測定条件などは第 2 章 第 1 節と同様に行った。

- ・ カドミウムまたはヒ素ストレス条件での生育試験

野生型株（品種：日本晴）と *GS RNAi* イネを対照区と 3, 10 μM Cd 処理区、5, 20 μM As^(III) 処理区にそれぞれ播種して 10 日間水耕栽培し、草丈、根長、地上部と根の乾物重を測定した。

【結果】

- ・ *GS RNAi* イネにおける標的遺伝子の発現抑制

作出した *GS RNAi* イネにおける標的遺伝子の発現抑制を確認するため、*OsGS1*, *OsGS2*, *OsGS3* 遺伝子の発現量を解析した（図 3-3-1）。*OsGS1 RNAi* イネでは、独立した 2 系統において *OsGS1* 遺伝子の発現量が野生型株の 15–24% 程度に抑制されていたが、標的ではない *OsGS2*, *OsGS3* の遺伝子発現量には有意な減少はみられなかった。同様の、標的遺伝子特異的な発現抑制は *OsGS2* または *OsGS3 RNAi* イネにおいても確認した。以降の実験では、主に *OsGS1 RNAi-1*, *OsGS2 RNAi-1*, *OsGS3 RNAi-3* の系統を用いた。これらの系統では標的遺伝子の発現が効果的に抑制されており他の *OsGS* 遺伝子の発現にはほとんど影響がなかった。

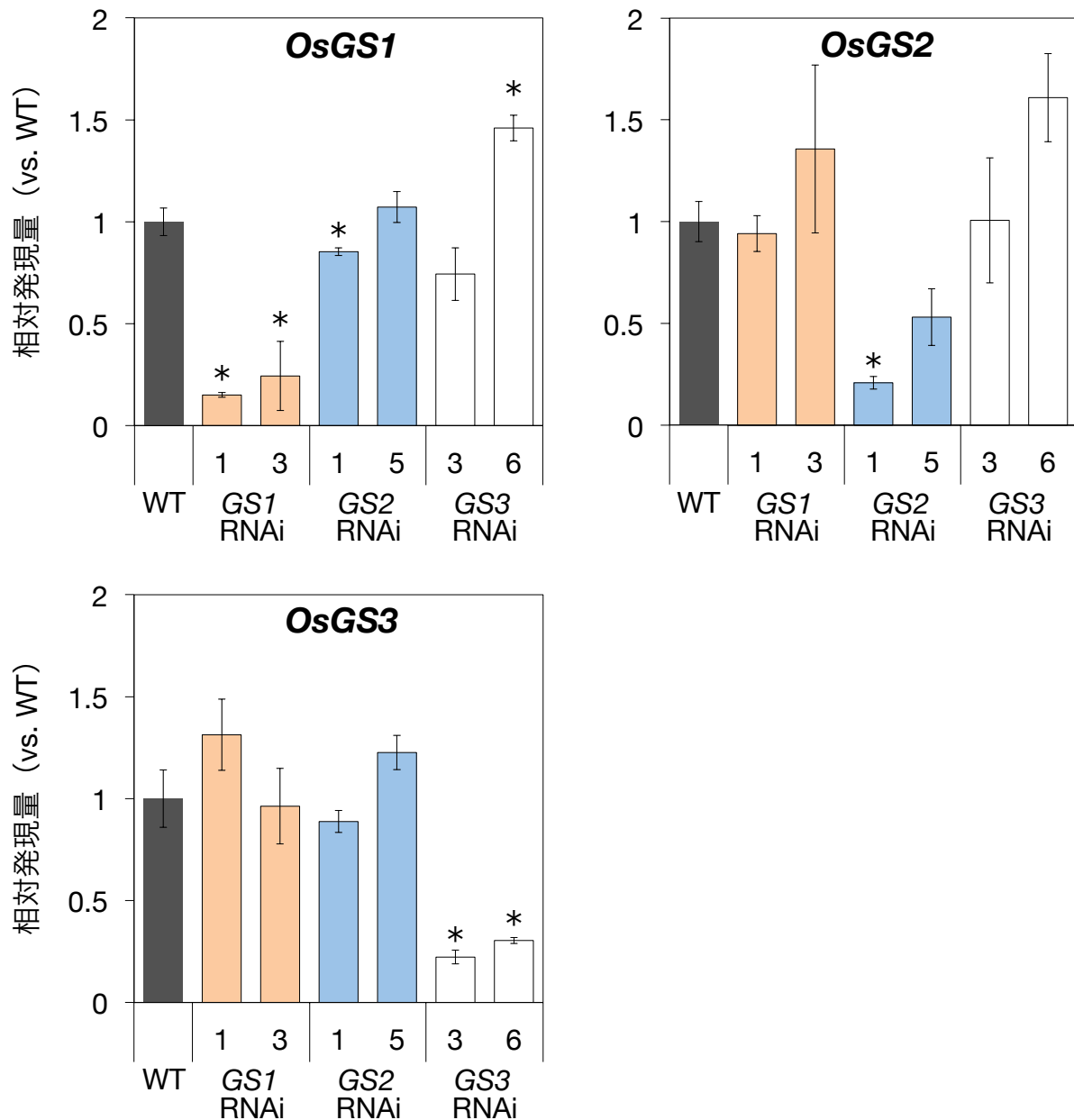


図3-3-1 GS RNAi イネにおける OsGS 遺伝子の発現抑制

通常条件で18日間水耕栽培した野生型株（WT、品種：日本晴）とGS RNAi イネの幼苗1個体ずつからRNAを抽出し、リアルタイムPCRでOsGS遺伝子の相対発現量を解析した。Ubiquitinを内部標準遺伝子として用いた。値は野生型株に対する相対値の平均 ± SE で示した（n = 3）。アスタリスクは野生型株との有意な差を示す（ $p < 0.05$, Dunnett 検定）。

・ *GS* RNAi イネのグルタチオン、ヒドロキシメチルグルタチオン含有率

植物体内のグルタチオン類の合成への影響を調べるため、カドミウムを与えて栽培したイネ幼苗のグルタチオン類の含有率を測定した (図 3-3-2)。地上部では、グルタチオンとヒドロキシメチルグルタチオンがチオールペプチドの大部分を占めていた。グルタチオンの含有率は *OsGS1* RNAi イネでは野生型株と比べて半分程度に減少し、*OsGS2* RNAi イネでは野生型株より有意に増加し、*OsGS3* RNAi イネでは有意差はないが野生型株より減少する傾向にあった。一方で、ヒドロキシメチルグルタチオンの含有率は *OsGS1* RNAi イネでは野生型株と比べて 2 倍程度に増加し、*OsGS2* RNAi イネでは野生型株より顕著に減少し、*OsGS3* RNAi イネでは有意差はないが野生型株より増加する傾向にあった。

グルタチオン合成酵素の基質である γ グルタミルシステインの含有率は *OsGS1* RNAi イネでは野生型株より有意に減少し、*OsGS2* RNAi イネでは野生型株と比べて有意に増加し、*OsGS3* RNAi イネでは有意差はないが野生型株より増加する傾向にあった。

・ *OsGS* 遺伝子発現抑制のカドミウム、ヒ素耐性への影響

グルタチオンやヒドロキシメチルグルタチオンのカドミウム、ヒ素耐性への寄与を調べるため、野生型株 (品種: 日本晴) と *GS* RNAi イネのカドミウムストレス条件 (図 3-3-3) とヒ素ストレス条件 (図 3-3-5) の生育を比較した。対照区ではいずれの *GS* RNAi 系統も野生型株との有意な生育の差を示さなかった。*OsGS1* RNAi イネは 3, 10 μM Cd 処理区において野生型株と比べて有意に草丈と地上部乾物重が減少した (図 3-3-3)。*OsGS2* RNAi イネは 10 μM Cd 処理区で野生型株より草丈が有意に増加し、地上部乾物重は野生型株と差がなかった。*OsGS3* RNAi イネはカドミウム処理区において野生型株より生育が低下する傾向にあったが有意差はなかった。独立した別の *GS* RNAi 系統においても同様の表現型を確認した (図 3-3-4)。

ヒ素ストレス条件では、*OsGS1* RNAi イネと *OsGS3* RNAi イネは 5, 20 μM As^(III) 処理区において野生型株と比べて有意に草丈が減少した (図 3-3-5)。地上部乾物重も野生型株より減少する傾向にあったが有意差はなかった。*OsGS2* RNAi イネは草丈、地上部乾物重ともに野生型株との有意な違いはなかった。

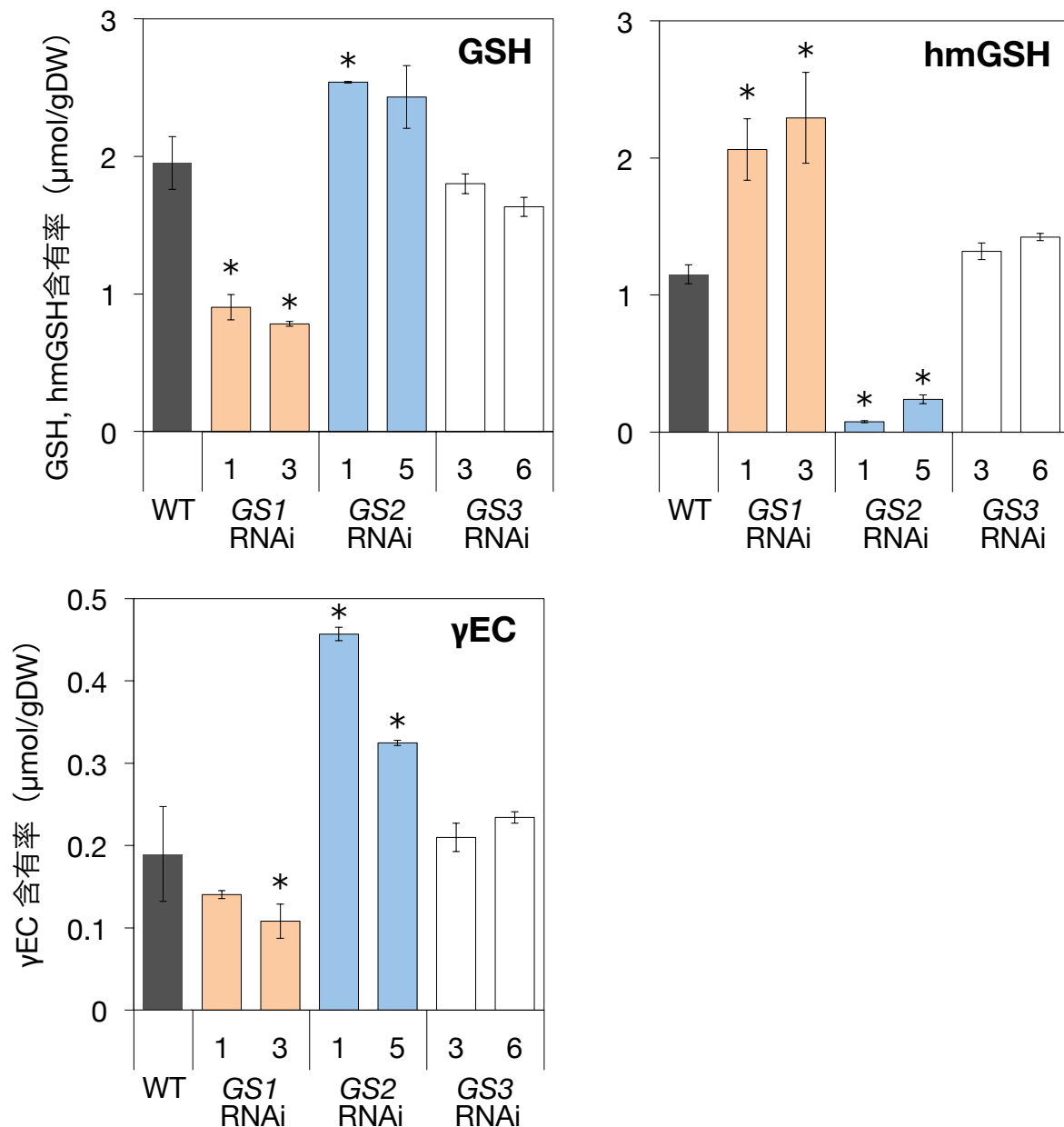


図3-3-2 GS RNAi イネにおけるグルタチオン類の含有率

カドミウムストレス条件で栽培したイネ幼苗の地上部におけるグルタチオン (GSH, γ Glu-Cys-Gly)、ヒドロキシメチルグルタチオン (hmGSH, γ Glu-Cys-Ser)、 γ グルタミルシステイン (γ EC, γ Glu-Cys) の含有率。野生型株 (WT, 品種: 日本晴) と GS RNAi イネを通常条件で 10 日間水耕栽培したのち、10 μ M Cd 処理区に移してさらに 10 日間栽培した。各個体からチオールペプチドを抽出し、HPLC で定量した。値は平均値 \pm SE で示した ($n = 3$)。アスタリスクは野生型株との有意な差を示す ($p < 0.05$, Dunnett 検定)。

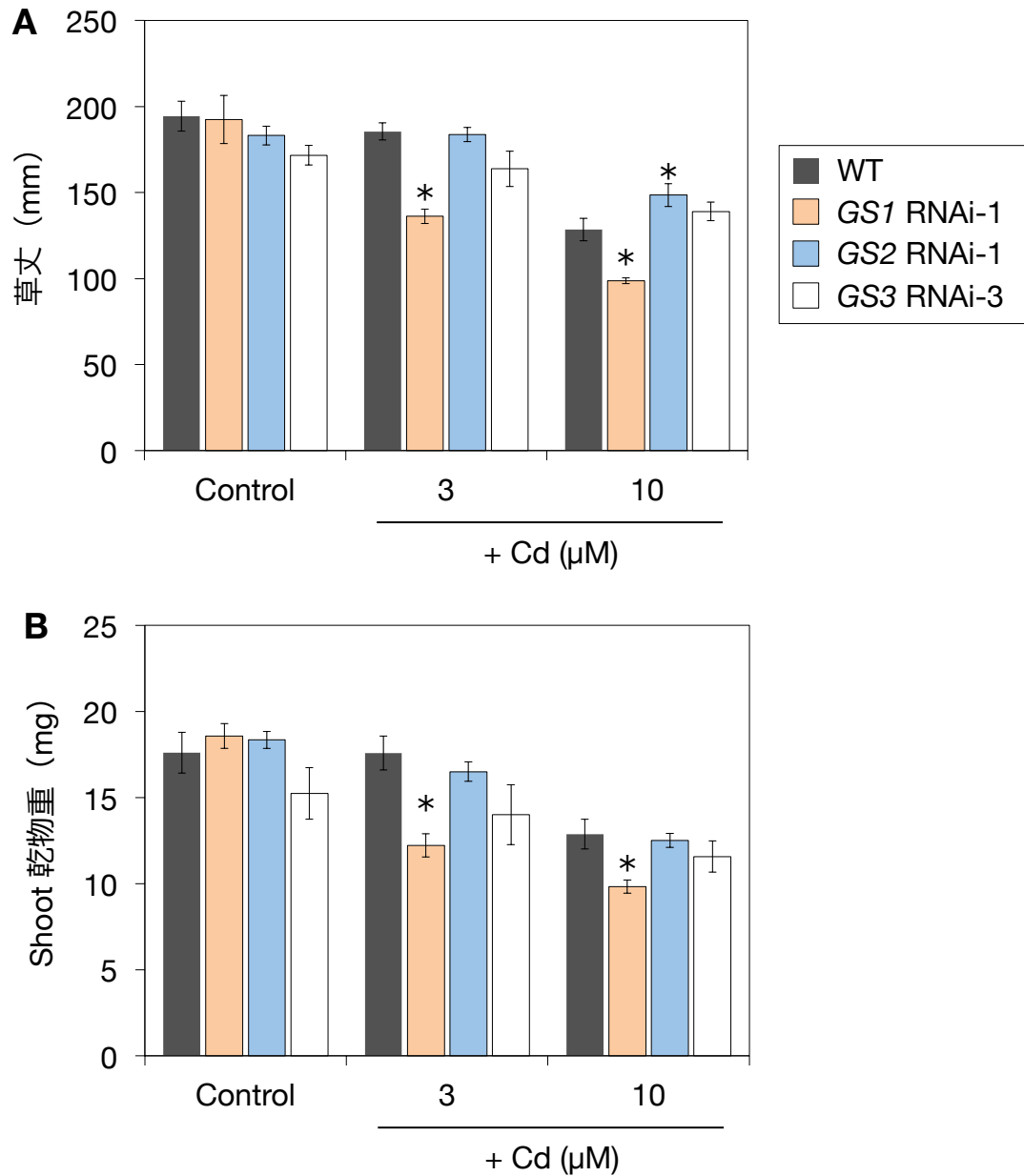


図3-3-3 カドミウムストレス条件における *GS* RNAi イネの生育

カドミウムストレス条件での *GS* RNAi イネの (A) 草丈と (B) 地上部乾物重。野生型株 (WT, 品種：日本晴) と *GS* RNAi イネを対照区と 3, 10 μM Cd 処理区に播種し、10 日間水耕栽培した。値は平均値 \pm SE で示した ($n = 4-6$)。アスタリスクは野生型株との有意な差を示す ($p < 0.05$, Dunnett 検定)。

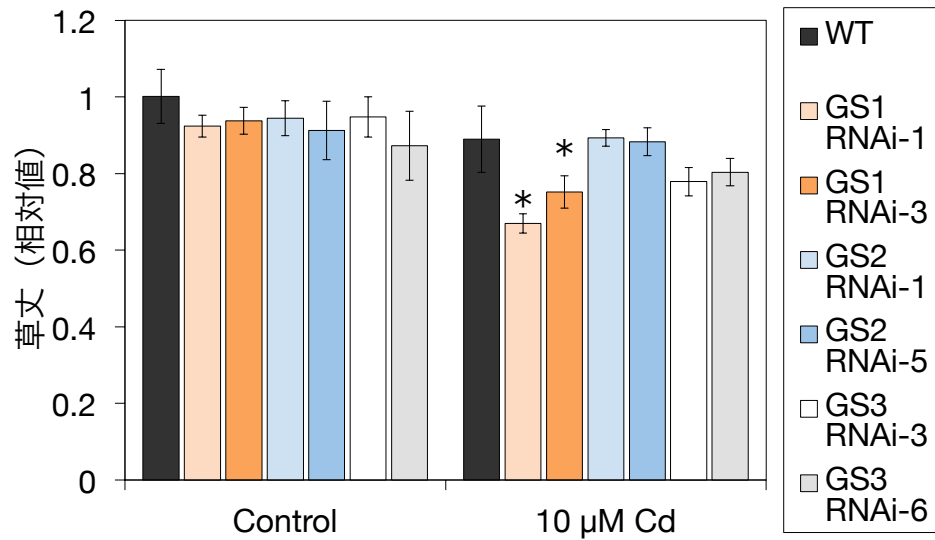


図3-3-4 独立した GS RNAi 系統のカドミウムストレス条件における生育

野生型株 (WT, 品種: 日本晴) と GS RNAi イネを対照区と 10 μM Cd 処理区に播種し、10 日間水耕栽培した。値は対照区の野生型株に対する相対値とし、平均値 ± SD で示した (n = 4-6)。アスタリスクは野生型株との有意な差を示す ($p < 0.05$, Dunnett 検定)。

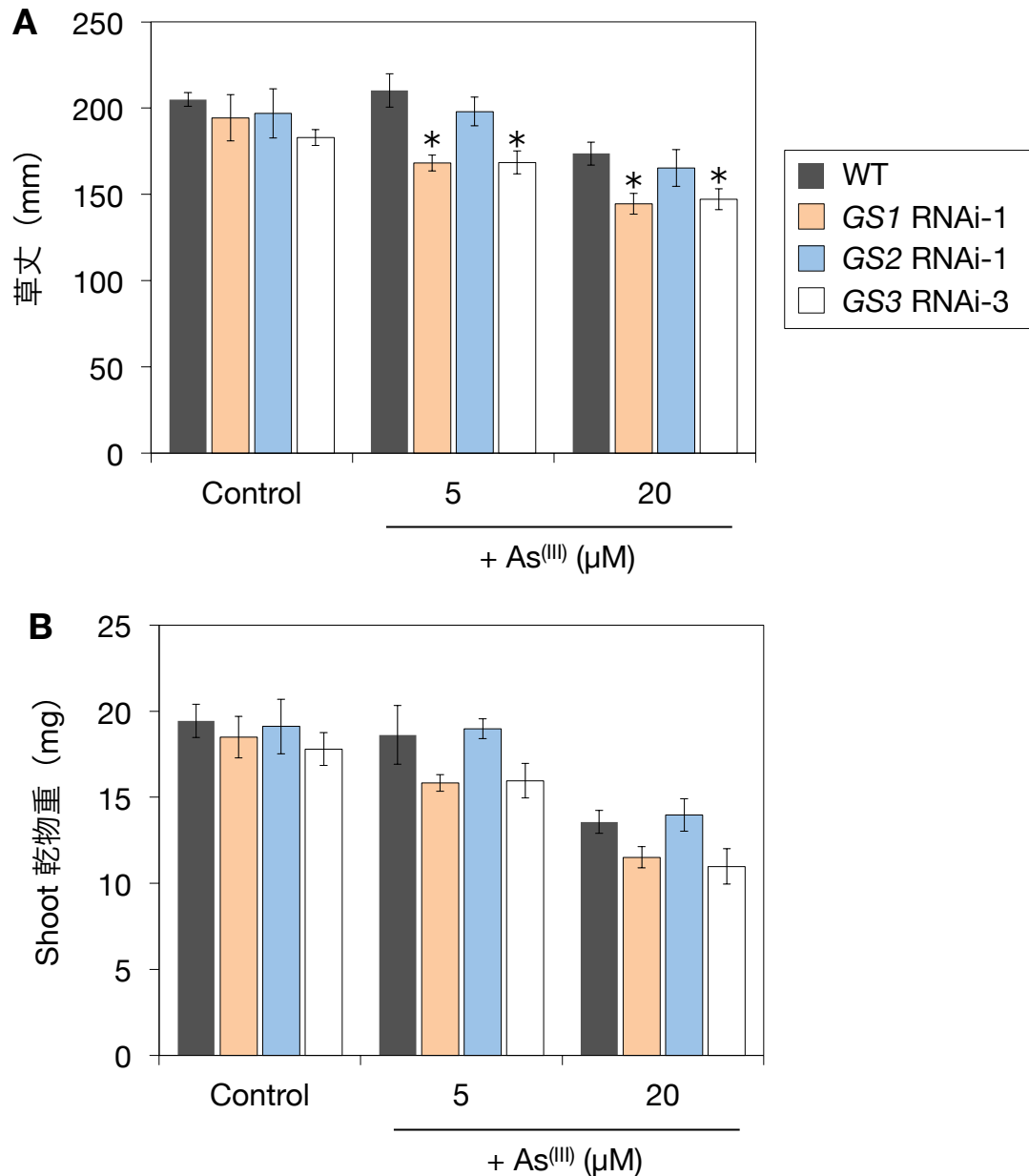


図3-3-5 ヒ素ストレス条件における GS RNAi イネの生育

ヒ素ストレス条件での GSRNAi イネの (A) 草丈と (B) 地上部乾物重。野生型株 (WT, 品種: 日本晴) と GSRNAi イネを対照区と 5, 20 μM As^(III) 処理区に播種し、10 日間水耕栽培した。値は平均値 ± SE で示した (n = 4-6)。アスタリスクは野生型株との有意な差を示す ($p < 0.05$, Dunnett 検定)。

【考察】

・ グルタチオン類の生合成への影響

OsGS2 遺伝子の発現抑制によりイネ幼苗のヒドロキシメチルグルタチオン含有率が著しく減少した (図 3-3-2)。これは *OsGS2* がヒドロキシメチルグルタチオンの生合成に関与することを示唆する。また *OsGS1* RNAi イネでは野生型株と比べてグルタチオン含有率が減少し、ヒドロキシメチルグルタチオン含有率は増加した。この結果から、ヒドロキシメチルグルタチオンはグルタチオンと同じく γ グルタミルシステインを基質として合成されることが示唆された。

OsGS1 遺伝子の発現抑制によりイネ幼苗のグルタチオン含有率は野生型株の半分以下に減少した (図 3-3-2)。これは *OsGS1* がグルタチオン合成酵素をコードすることを示唆する。一方で、*OsGS3* 遺伝子の発現抑制によるグルタチオン含有率への有意な影響はなかった。後述の第 4 章の検討で *OsGS3* はグルタチオン合成活性を示したこと (図 4-5B)、*OsGS3* 遺伝子の発現量は *OsGS1* よりも明らかに高いこと (図 3-2-3) を考えると、*OsGS3* 遺伝子の発現抑制の影響があまり見られないのは細胞内局在の違いによるのかもしれない。N 末端配列を用いた予測によると、*OsGS1* は葉緑体に局在し *OsGS3* は細胞質または葉緑体に局在する (表 3-2-2)。シロイヌナズナでは γ グルタミルシステイン合成酵素 (γ ECS, GSH1) は葉緑体に局在するが、グルタチオン合成酵素 (GS, GSH2) は葉緑体局在型と細胞質局在型のうち細胞質型バリエーションの転写量が大きい (Wachter et al., 2005)。これはイネの *OsGS1* と *OsGS3* の局在、遺伝子発現量と共通する。

・ カドミウム、ヒ素耐性へのグルタチオン類の寄与

OsGS1 遺伝子の発現抑制によりグルタチオン含有率が減少しヒドロキシメチルグルタチオン含有率は増加したが、イネ幼苗のカドミウムとヒ素への耐性は低下した (図 3-3-3、3-3-5)。一方で、*OsGS2* 遺伝子の発現抑制によりヒドロキシメチルグルタチオンの含有率が減少したが、個体のカドミウム、ヒ素耐性に負の影響はなかった。むしろ *OsGS2* RNAi イネはカドミウムストレス条件の草丈が野生型株より有意に大きくなったが (図 3-3-3)、これはグルタチオン含有率の増加によると考えられる (図 3-3-2)。これらの結果から、*OsGS1* によるグルタチオン合成がイネのカドミウム耐性に重要であると考えた。加えて、その生理的役割はヒドロキシメチルグルタチオンによって代替されないことが示唆された。

グルタチオンは ROS 消去系や生体異物の解毒など様々な生理機能が知られており、それら代謝系に関わる酵素の基質として使われる。Zopes et al. (1993) によると、コムギとイネのグルタチオンレダクターゼ (GR) は酸化型ヒドロキシメチルグルタチオンの還元活性を示すが、その親和性は酸化型グルタチオンよりも 10 分の 1 および 30 分の 1 程度低い。また Klapheck et al. (1992) によると、馬肝臓由来の GST タンパク質はヒドロキシメチルグルタチオンを基質とはしない。ただし、イネ科植物の GST タンパク質に関する報告はない。以上の

結果から、グルタチオンとヒドロキシメチルグルタチオンには、カドミウムストレスによって生じた ROS の消去系やカドミウムとの抱合体形成において基質としての有効性に違いがあることが考えられる。

・ ヒドロキシメチルグルタチオンの生理的意義

OsGS2 RNAi イネでは野生型株との表現型の差異が見られなかったことから、イネ科植物におけるヒドロキシメチルグルタチオンの生理的意義は不明なままである。遺伝子発現量解析では *OsGS2* はヒ素ストレスにより発現量が減少していた (図 3-2-3)。またイネの RNA-seq データベース Transcriptome ENcyclopedia Of Rice (TENOR; Kawahara et al., 2016) によると、低温、浸透圧、アブシシン酸などの非生物学的ストレス条件下では *OsGS2* 遺伝子の発現量は減少する。グルタチオンは植物において還元同化された硫黄の貯蔵形態でもあることから (Rennenberg, 1984)、ヒドロキシメチルグルタチオンはグルタチオンのようなストレス応答性分子ではなく、イネ科植物における硫黄源として利用されるのかもしれない。

第4節 3章 結論

本章ではグルタチオン生合成阻害剤と RNAi 法によるグルタチオン合成酵素遺伝子の発現抑制イネを用いた解析により、カドミウムやヒ素ストレスへのイネの防御応答におけるグルタチオン類の生理的役割を明らかにしようとした。

第1節で、グルタチオン生合成阻害剤 BSO の影響を調べた。BSO によりイネ幼苗のカドミウム耐性は低下したことから (図 3-1-2)、グルタチオンやグルタチオン類縁体が単量体チオールとしてイネのカドミウム耐性に寄与することが示唆された。

第2節で、グルタチオン合成酵素のホモログ遺伝子を探索し、*Os11g0642800* (*OsGS1*), *Os12g0263000* (*OsGS2*), *Os12g0528400* (*OsGS3*) を見出した。これら3つの *OsGS* 遺伝子は既知の *GS* 遺伝子との相同性や細胞内局在、金属ストレスへの応答性に違いがあり (図 3-2-1、3-2-3)、それぞれの生理機能は異なることが予想された。

第3節で、*OsGS1*, *OsGS2*, *OsGS3* 遺伝子の発現抑制の影響を調べた。イネでは *OsGS1* がグルタチオン合成を介して個体のカドミウム耐性に寄与することを明らかにした (図 3-3-2、3-3-3)。また *OsGS2* はヒドロキシメチルグルタチオンの生合成に関与することが示唆された (図 3-3-2)。

第4章 イネのグルタチオン合成酵素の酵素化学的解析

第3章の検討から、グルタチオン (γ Glu-Cys-Gly) の類縁体であるヒドロキシメチルグルタチオン (γ Glu-Cys-Ser) の合成に、イネのグルタチオン合成酵素遺伝子 *OsGS2* が関わることが示唆された。ヒドロキシメチルグルタチオンはイネ、コムギ、オオムギなどいくつかのイネ科植物に特異的に存在するチオールペプチドであり (Klapheck et al., 1992)、トウモロコシでは γ Glu-Cys-Glu (γ ECE) が見つかったが (Meuwly et al., 1993)、これらの生合成経路や生理機能は明らかにされていない。Skipsey et al. (2005) によると、コムギとトウモロコシのグルタチオン合成酵素 TaGS1, TaGS2, ZmGS は *in vitro* においてヒドロキシメチルグルタチオンや γ ECE の合成活性を示さないことから、これらグルタチオン類縁体はグルタチオンを基質とした修飾 (ヒドロキシメチル化) 反応や末端アミノ酸交換反応によって合成されると推定されている。

本章では、ヒドロキシメチルグルタチオン合成への *OsGS2* の関与について明らかにするため、*OsGS1*, *OsGS2*, *OsGS3* の翻訳産物を大腸菌組み換えタンパク質として調製し、それらの酵素化学的解析を行った。

【材料と方法】

・ GS 組み換えタンパク質の調製と精製

マルトース結合タンパク (MBP) と融合させた組み換えタンパク質 (MBP-*OsGS1*, MBP-*OsGS2*, MBP-*OsGS3*) を大腸菌に発現させ、アミロース単体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。完全長 ORF 配列は、*OsGS1* と *OsGS2* は GS1.proF, GS1.proR または GS2.proF, GS2.proR のプライマー組でイネ (品種: 日本晴) cDNA を鋳型とし PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて PCR 増幅した。*OsGS3* の完全長 ORF 配列は 5'末端が GC リッチであったため nested PCR で増幅した。1段階目は GS3.seqF, GS3.proR、2段階目は GS3.proF, GS3.proR のプライマー組をそれぞれ用いた。用いたプライマー配列を表 4-1 に示した。

コンストラクトの作成と目的タンパク質の精製は第2章 第2節と同様に行ったが、大腸菌の溶菌操作を変更し、菌液に 0.2% (v/v) Triton X-100、1 mg/mL リゾチームを添加して氷上で1時間静置することとした。粗抽出液から溶出画分までを SDS-PAGE に供試し、目的タンパク質の精製を確認した (図 4-1)。

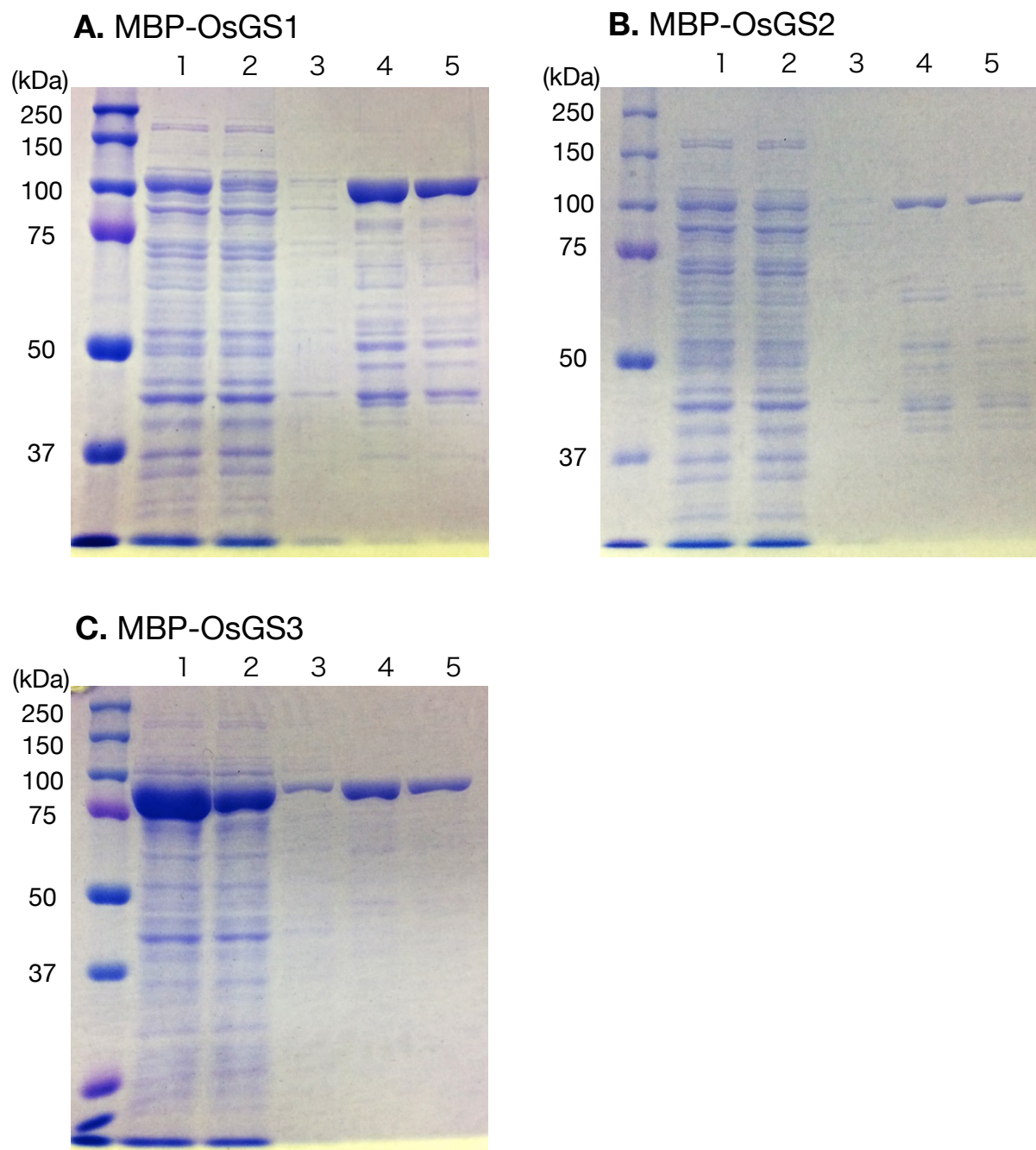


図4-1 OsGS 組み換えタンパク質の精製過程の SDS-PAGE

レーン1：大腸菌粗抽出液、2：素通り画分、3：洗浄画分、4, 5：溶出画分（OsGS3は10倍希釈した。）

溶出画分の約100 kDaのバンドがそれぞれMBP-OsGS1 (MW: 102.4 kDa)、MBP-OsGS2 (MW: 101.5 kDa)、MBP-OsGS3 (MW: 95.6 kDa) に相当する。

表4-1 OsGS 完全長 ORF 断片の増幅に用いたプライマー

GS1.proF	5'- ATG TCCTCCTACGTCACCACC-3'
GS1.proR	5'-ACTGCCTGCAGG TTA CCACTCATCTGTGAGGAG-3'
GS2.proF	5'- ATG GCCGCCGCCGCCGCCCGTTC-3'
GS2.proR	5'-GCTCCCTGCAGG TC ATGTCAGGAATACGCTGTTC-3'
GS3.seqF	5'-ACTTCGGTTCGACAGTTCGGCAC-3'
GS3.proF	5'- ATG AGCGCCGCCGCCGGAGGGGAG-3'
GS3.proR	5'-ACTACCTGCAGG CTA CATCGCCTTGTCGGTTAAG-3'

太字は開始コドンと終始コドン、下線部は制限酵素 SbfI の認識配列を示す。

・ GS 酵素活性の測定

反応液の組成は、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM KCl、20 mM MgCl₂、0.1 mg/mL BSA、1 mM DTT、2 mM ATP、1 mM γEC (またはグルタチオン)、4 mM アミノ酸 (Gly, L-Ser または L-Glu) とした。反応液 (100 μL) を 30°C で 15 分以上プレインキュベーションしたのち、1/10 容の精製タンパク質溶液を終濃度が 10 μg/mL (MBP-OsGS1, MBP-OsGS2) または 0.5 μg/mL (MBP-OsGS3) となるように添加して反応を開始した。反応は 30°C で行い、TFA を終濃度 1% (v/v) となるように添加して反応を停止した。試料は解析まで -20°C で冷凍保存した。

・ チオールペプチドの定量

酵素反応生成物のチオールペプチドは mBBBr で蛍光誘導体化し HPLC を用いて定量した (Sneller et al., 2000 一部改変)。酵素反応停止液 15 μL をとり、0.1% TFA/6.3 mM DTPA 135 μL と混和して希釈し、4°C で 10 分間遠心分離した。上清 100 μL を 200 mM HEPES-KOH (pH 8.2) /6.3 mM DTPA 180 μL と混和して酸を中和し、25 mM mBBBr (ジメチルスルホキシドに溶解) 10 μL を添加して暗所、室温で 1 時間静置した後、1 M MSA 120 μL を添加して誘導体化反応を停止した。試料は解析まで遮光して氷上に置くか冷凍保存した。

HPLC を用いた定量は第 2 章 第 1 節と同様に行ったが、グラジエント溶出のタイムプログラムは次のように設定した (0 min, 溶離液 B 28%; 10 min, 30%; 12 min, 40%; 16 min, 70%; 19 min, 100%; 25 min, 28%; 30 min, 28%)。標品としてグルタチオン (ナカライテスク)、ヒドロキシメチルグルタチオン、γEC、γECE (ハイペック研究所) の人工合成品を用いて溶出ピークを同定し、グルタチオンの検量線で定量した。

・ 反応速度論解析

反応液の Gly または L-Ser 濃度を 0.2, 0.4, 0.6, 1, 2, 4, 10 mM の 7 点としてアッセイを行った。反応開始から 5, 10, 15, 20 分の時点で反応系 (100 μ L) から 20 μ L ずつ分取し 5% TFA 5 μ L と混和することで反応を停止した。

MBP-OsGS2 の 0.2–1 mM Gly と 0.2–0.6 mM L-Ser の反応生成物は、HPLC 分析の検出感度を向上させるため mBBr 誘導体化のスケールを以下のように変更した。酵素反応停止液 10 μ L を 200 mM HEPES-KOH (pH 8.2) /6.3 mM DTPA 120 μ L と混和し、25 mM mBBr (ジメチルスルホキシドに溶解) 10 μ L を添加して暗所、室温で 1 時間静置した後、1 M MSA 80 μ L を添加して誘導体化反応を停止した。HPLC 分析は前述と同様に行った。

R ソフトウェアを用いて非線形最小二乗法により、測定データがミカエリス・メンテン式 $v = V_{\max} [S]/(K_m + [S])$ にフィットするような速度論パラメータ (K_m , V_{\max}) を算出した。

【結果】

・ ヒドロキシメチルグルタチオン合成活性の解析

MBP-OsGS2 の精製タンパク質を用いてヒドロキシメチルグルタチオン合成活性の有無と、活性が認められた場合は基質が何であるかを検討した。基質の候補としてグルタチオンまたは γ EC と L-Ser を与え、OsGS2 タンパク質とともにインキュベートして反応産物を HPLC で分析した (図 4-2)。MBP-OsGS2 に ATP 存在下で γ EC と L-Ser を与えてインキュベートし反応産物を分析したところ、ヒドロキシメチルグルタチオンのピークが検出された。ATP を与えなかった場合ではピークは検出されず、ATP 存在下でグルタチオンと L-Ser を与えた場合でもヒドロキシメチルグルタチオンは生成しなかった (図 4-2)。ヒドロキシメチルグルタチオンの合成量は反応時間 30 分まで直線的に増加し (図 4-3 A)、反応液に加える OsGS2 タンパク量依存的に増加した (図 4-3 B)。熱処理 (95°C, 2 min) した MBP-OsGS2 精製タンパク質やベクターコントロールでは合成活性は検出されなかった (図 4-3 A)。以上の結果から、OsGS2 は γ EC と L-Ser を基質とした ATP に依存するヒドロキシメチルグルタチオン合成活性をもつと判断した。

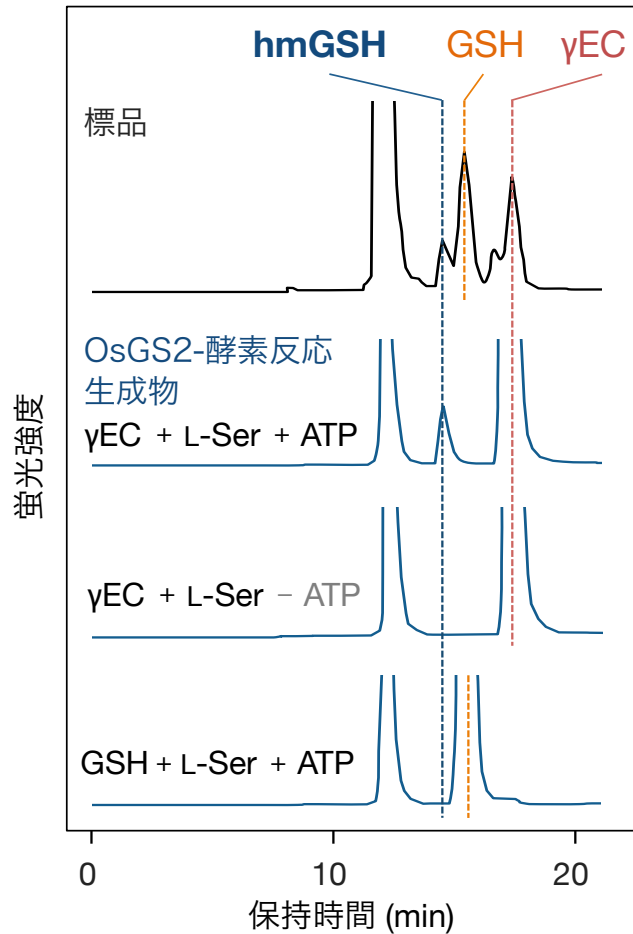


図4-2 OsGS2 組み換えタンパク質による ATP に依存した hmGSH 合成

OsGS2 酵素反応生成物の HPLC 分析のクロマトグラム。精製 MBP-OsGS2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM KCl、20 mM MgCl_2 、0.1 mg/mL BSA、1 mM DTT、(+/-) 2 mM ATP、1 mM γEC (またはグルタチオン)、4 mM L-Ser を含む反応液で 30°C、30 分インキュベートした。生成物を mBBR で誘導体化し HPLC で分析した。グルタチオン、ヒドロキシメチルグルタチオン、 γEC の標品を用いて溶出ピークを同定した。

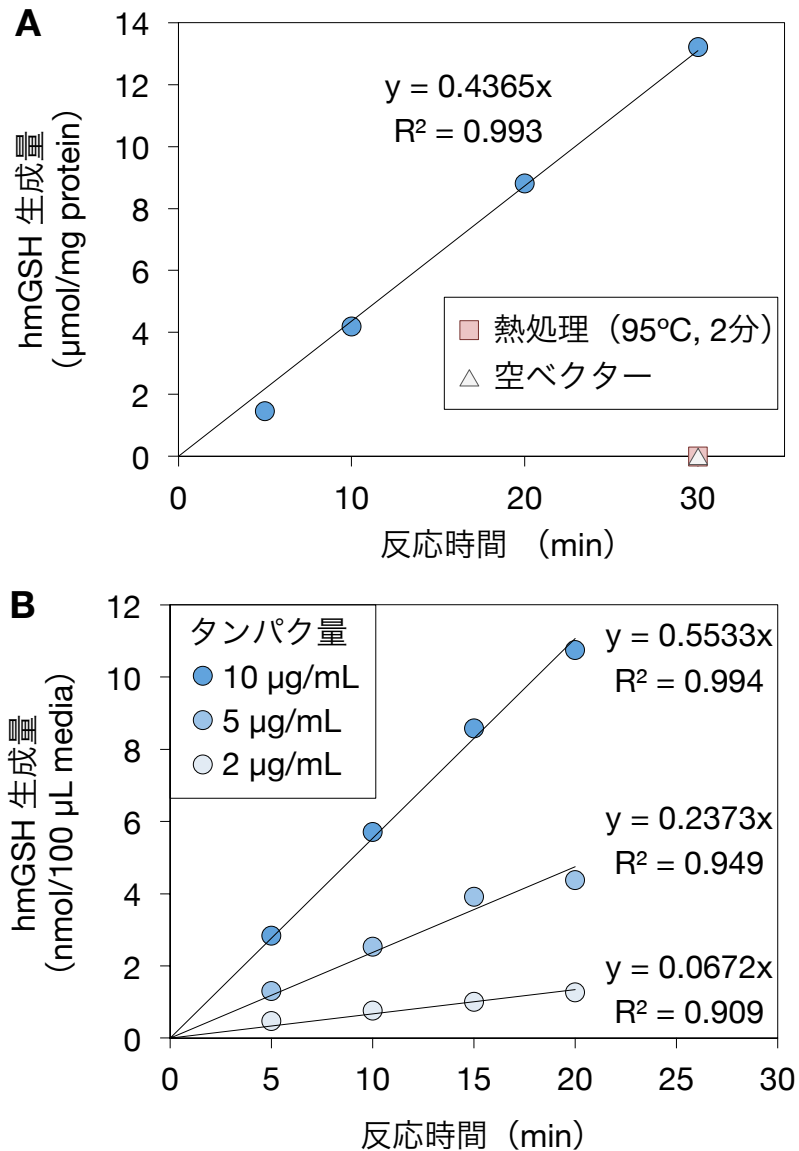


図4-3 OsGS2 組み換えタンパク質による hmGSH 生成の反応時間と酵素量依存性

(A) 反応時間依存性。精製 MBP-OsGS2 (10 μg/mL) を 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM KCl、20 mM MgCl₂、0.1 mg/mL BSA、1 mM DTT、2 mM ATP、1 mM γEC、4 mM L-Ser を含む反応液で 30°C でインキュベートし、開始後 5、10、20、30 分に取り出して反応を停止した。(B) 酵素量依存性。反応液に添加する OsGS2 タンパク量を変えて (2.5、5、10 μg/mL) インキュベートした。生成物を mBBr で誘導体化して HPLC で分析し、グルタチオンの検量線で定量した。

・ 基質特異性の検討

OsGS2 の基質特異性を調べるため、 γ EC と Gly または L-Glu を与えた際の生成物の有無を検討した (図 4-4)。MBP-OsGS2 に ATP 存在下で γ EC と Gly を与えてインキュベートしたところ、グルタチオンのピークが検出された。一方で L-Glu を基質として与えた場合では、生成物として予想される γ ECE のピークは検出されなかった。

OsGS1 と OsGS3 も同様に基質特異性を調べた (図 4-5)。MBP-OsGS1 と MBP-OsGS3 はどちらもグルタチオン合成活性を示したが、L-Ser や L-Glu を基質としたヒドロキシメチルグルタチオンや γ ECE 合成活性は示さなかった。

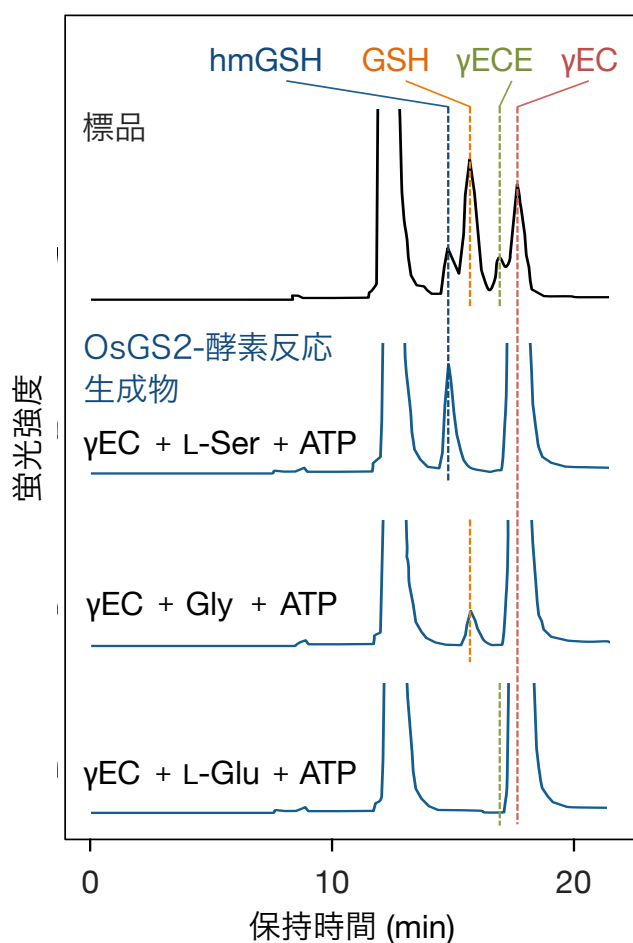


図 4-4 OsGS2 組み換えタンパク質の基質特異性

OsGS2 酵素反応生成物の HPLC 分析のクロマトグラム。精製 MBP-OsGS2 (10 μ g/mL) を 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM KCl、20 mM $MgCl_2$ 、0.1 mg/mL BSA、1 mM DTT、2 mM ATP、1 mM γ EC、4 mM アミノ酸 (L-Ser, Gly または L-Glu) を含む反応液で 30°C、30 分インキュベートした。生成物を mBBR で誘導体化し HPLC で分析した。グルタチオン、ヒドロキシメチルグルタチオン、 γ EC、 γ ECE の標品を用いて溶出ピークを同定した。

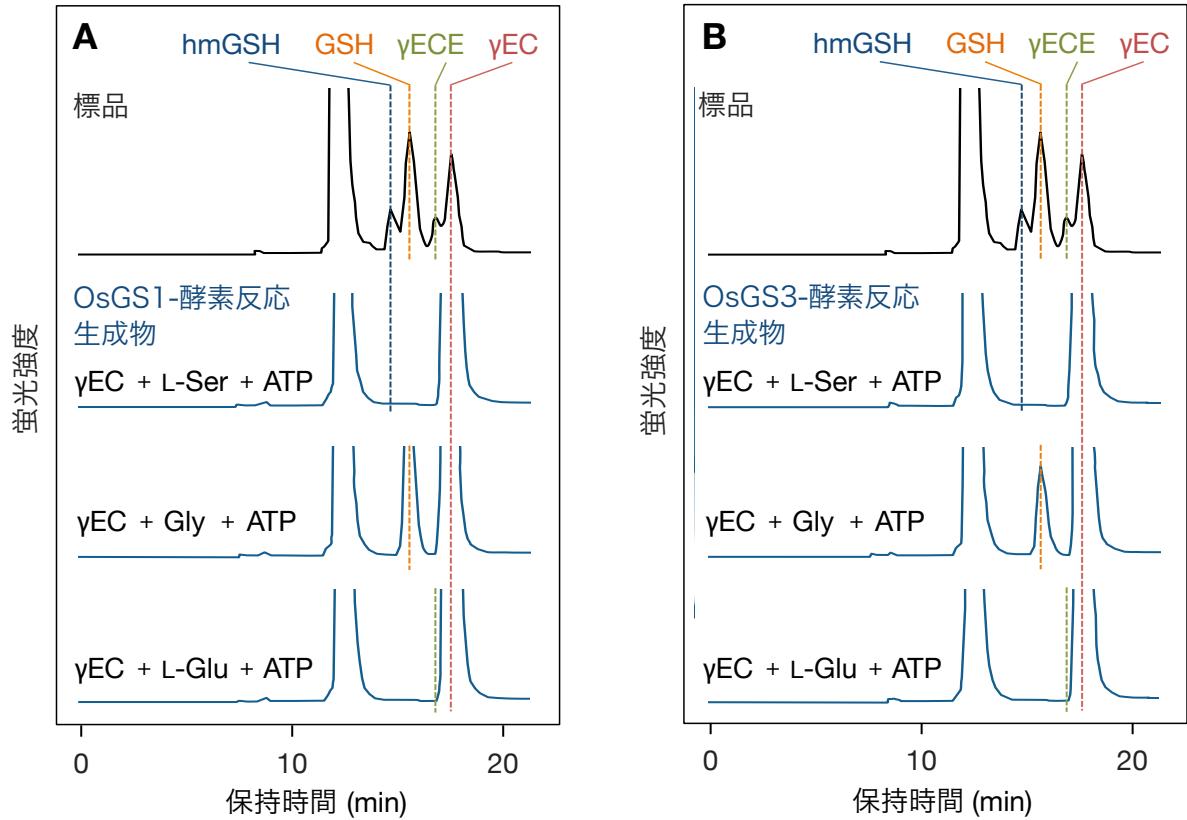


図4-5 OsGS1 と OsGS3 組み換えタンパク質の基質特異性

(A) OsGS1 と (B) OsGS3 の酵素反応生成物の HPLC 分析のクロマトグラム。精製 MBP-OsGS1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) または MBP-OsGS3 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM KCl、20 mM MgCl_2 、0.1 mg/mL BSA、1 mM DTT、2 mM ATP、1 mM γEC 、4 mM アミノ酸 (L-Ser, Gly または L-Glu) を含む反応液で 30°C、30 分インキュベートした。生成物を mBBR で誘導体化し HPLC で分析した。グルタチオン、ヒドロキシメチルグルタチオン、 γEC 、 γECE の標品を用いて溶出ピークを同定した。

・ 基質選択性の検討 (反応速度論解析)

OsGS2 の基質選択性を調べるため、反応液中の Gly または L-Ser 濃度を変えた際の反応速度の変化を分析した (図 4-6)。 γ EC 濃度は 1 mM に固定し、Gly または L-Ser を 0.2-10 mM の濃度範囲で変えたところ、MBP-OsGS2 のヒドロキシメチルグルタチオン合成速度はグルタチオン合成速度よりも常に大きかった。また、MBP-OsGS2 の L-Ser に対する K_m (2.64 ± 0.05 mM) は Gly に対する K_m (19.3 ± 1.1 mM) よりも小さかった (表 4-2)。

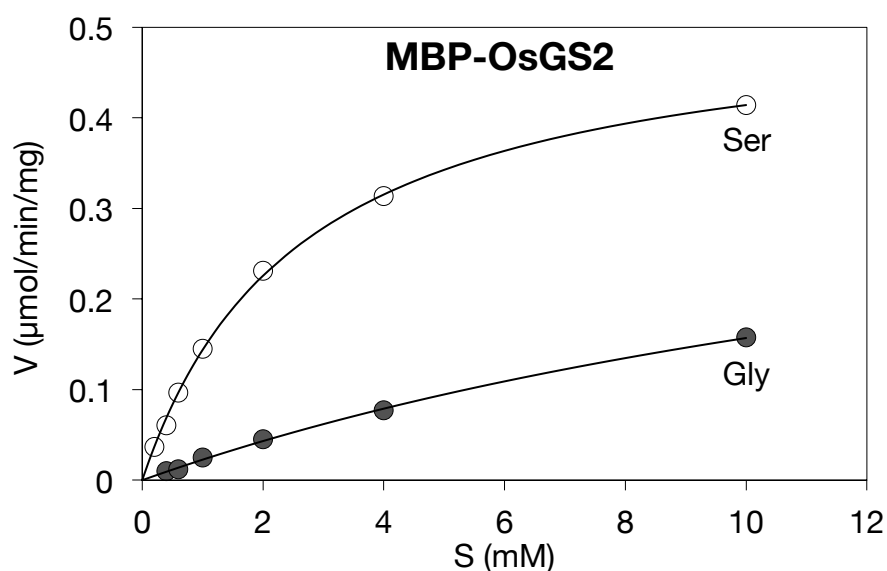


図 4-6 OsGS2 組み換えタンパク質のセリンとグリシンに対する基質飽和曲線

精製 MBP-OsGS2 (10 μ g/mL) を 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM KCl、20 mM $MgCl_2$ 、0.1 mg/mL BSA、1 mM DTT、2 mM ATP、1 mM γ EC、0.2-10 mM L-Ser または Gly を含む反応液で 30°C でインキュベートし、開始後 5、10、15、20 分に一部をとって反応を停止した。生成物を mBBR で誘導体化して HPLC で分析し、グルタチオンの検量線で定量した。Gly 0.2 mM ではピークが小さく、信頼性のある測定値が得られなかった。非線形最小二乗法で測定値にフィットする回帰曲線を得た。値は平均値 \pm SE で示した ($n = 3$)。

OsGS1 と OsGS3 についても Gly に対する速度論解析を行った (図 4-7)。MBP-OsGS1 の Gly に対する K_m (1.28 ± 0.10 mM) は既報の AtGS の K_m (1.51 ± 0.09 mM; Jez & Cahoon, 2004) と同程度の値であった (表 4-2)。MBP-OsGS3 の Gly に対する K_m (0.408 ± 0.005 mM) は他の 2 つの OsGS タンパク質より小さく、 V_{max} は大きかった (表 4-2)。

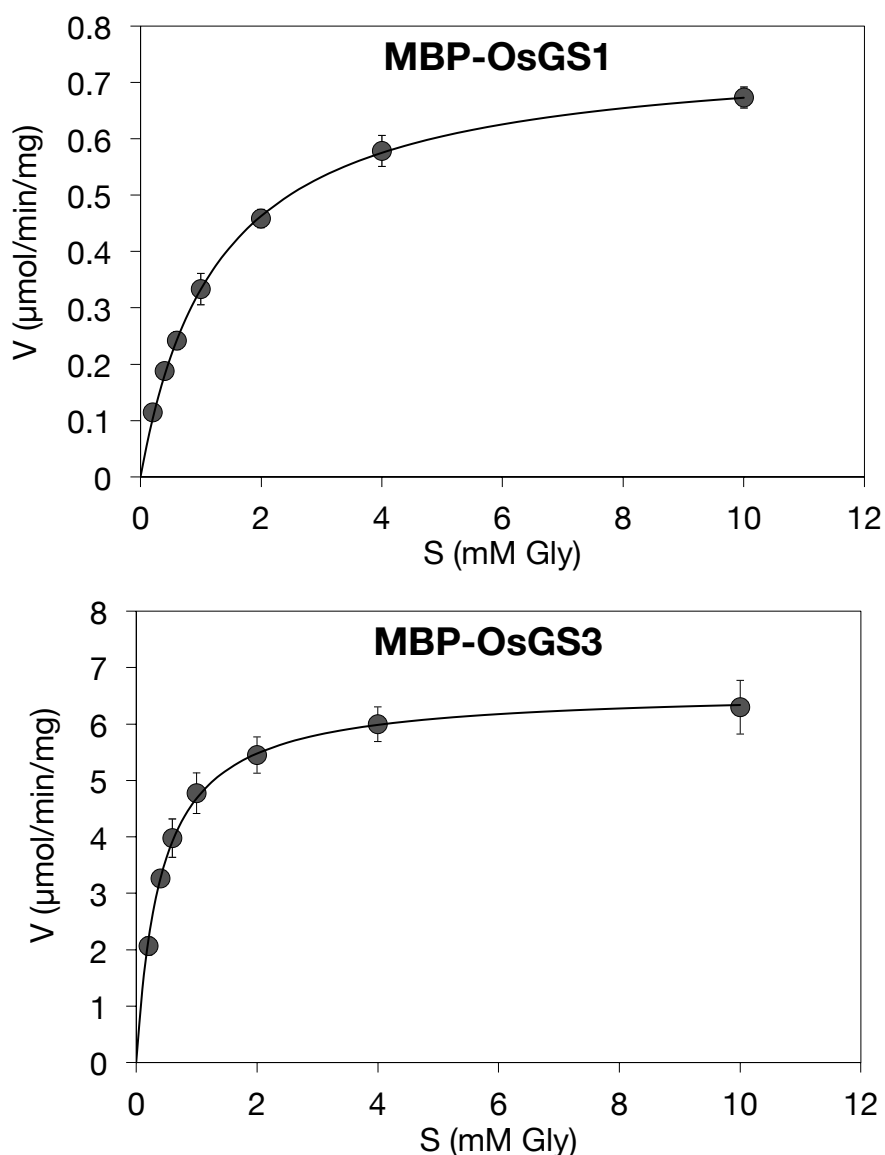


図 4-7 OsGS1 と OsGS3 組み換えタンパク質のグリシンに対する基質飽和曲線

精製 MBP-OsGS1 (10 μg/mL) または MBP-OsGS3 (0.5 μg/mL) を 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM KCl、20 mM MgCl₂、0.1 mg/mL BSA、1 mM DTT、2 mM ATP、1 mM γEC、0.2–10 mM Gly を含む反応液で 30°C でインキュベートし、開始後 5, 10, 15, 20 分に一部をとって反応を停止した。生成物を mBBR で誘導体化して HPLC で分析し、グルタチオン標品を用いて定量した。非線形最小二乗法で測定値にフィットする回帰曲線を得た。値は平均値 ± SE で示した (n = 3)。

表4-2 OsGS 組み換えタンパク質の速度論パラメータ

	基質	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
MBP-OsGS1	Gly	1.28 ± 0.10	0.759 ± 0.015
MBP-OsGS2	L-Ser	2.64 ± 0.05	0.524 ± 0.005
	Gly	19.3 ± 1.1	0.459 ± 0.009
MBP-OsGS3	Gly	0.408 ± 0.005	6.60 ± 0.41

R ソフトウェアを用いて非線形最小二乗法により、測定データがミカエリス・メンテン式 $v = V_{max} [S]/(K_m + [S])$ にフィットするような速度論パラメータ (K_m , V_{max}) を算出した。値は平均値 \pm SE で示した ($n = 3$)。

【考察】

- *OsGS2* はヒドロキシメチルグルタチオン合成酵素をコードする

MBP-OsGS2 は *in vitro* において γ EC と L-Ser を基質として ATP に依存したヒドロキシメチルグルタチオン合成活性を示した (図4-2)。*OsGS2* 遺伝子の発現抑制によりイネ幼苗のヒドロキシメチルグルタチオン含有率が顕著に減少したことから (図3-3-2)、イネにおいて *OsGS2* はヒドロキシメチルグルタチオン合成酵素をコードすると結論した。

MBP-OsGS2 は γ EC と Gly を基質としたグルタチオン合成活性も示したが (図4-4)、Gly よりも L-Ser に対して高い親和性 (K_m (L-Ser) = 2.64 ± 0.05 mM, K_m (Gly) = 19.3 ± 1.1 mM; 表4-2) を示した。トウモロコシやオオムギといった単子葉植物の葉組織における遊離の Gly と L-Ser 濃度は 1-10 mM 程度であることから (Chapman & Leech, 1979; Dietz et al., 1990)、*OsGS2* は生理的な基質濃度において L-Ser を選択的に基質としてヒドロキシメチルグルタチオンを合成すると考えられる。

コムギとオオムギにも *OsGS2* と高い相同性のある遺伝子配列 (*TaGS4*, *HvGS2*) が見つかった (図3-2-2)。コムギとオオムギはイネと同様にヒドロキシメチルグルタチオンを合成することから (Klapheck et al., 1992)、これらの遺伝子産物はヒドロキシメチルグルタチオン合成活性をもつことが予想される。

- γ ECE の合成経路

MBP-OsGS1, -OsGS2, -OsGS3 はいずれも *in vitro* において γ EC と L-Glu を基質とした γ ECE 合成活性を示さなかった (図4-4、4-5)。Skipsey et al. (2005) によると、トウモロコシの *ZmGS* タンパク質も γ ECE 合成活性を示さない。これらの結果は、 γ ECE が GS 活性とは独立した経路で合成されることを示唆する。

Meuwly et al. (1995) や *OsPCS2* 遺伝子の発現抑制 (図 2-3-6) が示唆するように、 γ ECE (γ Glu-Cys-Glu) はファイトケラチン $[(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}]$ の分解によって生成するのかもしれない。その場合、ファイトケラチン分子内の γ グルタミル結合を切断する特殊な酵素が関与すると考えられる。

総合考察

ファイトケラチンはイネのヒ素耐性に重要である

本研究により、ファイトケラチン合成酵素 OsPCS2 がイネのヒ素耐性に寄与することが示された (図 2-3-4 A)。液胞膜ファイトケラチン輸送体 OsABCC1 の機能欠損によってもイネのヒ素耐性は低下することから (Song et al., 2014)、イネのヒ素ストレス耐性機構にはファイトケラチン抱合を介した液胞へのヒ素の隔離が重要であると考えた。グルタチオン生合成阻害剤 BSO やグルタチオン合成酵素遺伝子 *OsGS1*, *OsGS3* の発現抑制によってもイネのヒ素耐性は低下したが (図 3-1-2、3-3-5)、これは基質 (グルタチオン) の減少に伴うファイトケラチン合成量の減少によるものと考えられ、イネのヒ素耐性におけるファイトケラチンの重要性を支持するものである。

シロイヌナズナでもヒ素耐性へのファイトケラチンの寄与は認められているが (Ha et al., 1999; Song et al., 2010)、イネのファイトケラチン合成はヒ素ストレスへの防御応答に特化しているように思える。というのも、イネはカドミウムや銅と比べてヒ素に曝された際のファイトケラチン合成誘導が顕著であり (図 2-1-2、向井, 2011)、重複遺伝子である *OsPCS1* はヒ素ストレスにより発現が上昇し (図 2-1-9)、OsPCS1 タンパク質はヒ素への高い親和性を示す (表 2-2-2)。OsPCS1 は幼苗期のファイトケラチン合成や個体のヒ素耐性には寄与しないが (図 2-3-3、2-3-5)、生殖成長期の穂主節においてヒ素を隔離し穀実への転流を抑制する (Hayashi et al., 2017)。これらの結果から、イネは嫌気性土壌とケイ素高集積性によりヒ素を吸収しやすい植物種であるが (Su et al., 2010)、2つのファイトケラチン合成酵素を使い分けることで効率的にヒ素に対処していると考えた。すなわち、植物全体では OsPCS2 がファイトケラチン合成を介してヒ素への耐性に寄与し、上位節では OsPCS1 が穀実へのヒ素の転流抑制に寄与する。

グルタチオンはイネのカドミウム耐性に重要である

本研究により、グルタチオン合成酵素 OsGS1 がグルタチオン合成を介してイネのカドミウム耐性に寄与することが示された (図 3-3-2、3-3-3)。一方で、OsPCS2 のカドミウム耐性への寄与は小さいことが示唆されたことから (図 2-3-4 B)、イネのカドミウムストレス耐性機構におけるグルタチオンの役割は、ファイトケラチン合成の基質としてではなく、抱合体形成あるいは抗酸化作用をもつ単量体チオールとして機能する考えた。

植物において γ グルタミルシステインまたはグルタチオンは葉緑体で合成され CLT [CRT (chloroquine-resistance transporter)-like transporter] タンパク質により細胞質へと輸送される (Maughan et al., 2010)。Yang et al. (2016) によると、イネの OsCLT1 の機能欠損変異体は野生型株と比べて細胞質グルタチオン濃度が低下し、カドミウムへの感受性が增大する。これは、細胞質におけるグルタチオンの働きがイネのカドミウム耐性に寄与することを示唆する。

ヒドロキシメチルグルタチオンは γ グルタミルシステインとセリンから合成される

本研究から、グルタチオン合成酵素のホモログ遺伝子 *OsGS2* がヒドロキシメチルグルタチオン合成酵素をコードすることが明らかになった (図 3-3-2、4-2)。*OsGS2* は、グルタチオン合成反応と同様の、 γ グルタミルシステインとセリンを基質として ATP に依存したヒドロキシメチルグルタチオン合成反応を触媒する (図 4-2)。これは先行研究で示唆されていたような (Skipsey et al., 2005; Noctor et al., 2012)、グルタチオンを基質とした修飾反応や末端アミノ酸交換反応により合成されるという説を覆すものである。コムギとオオムギにも *OsGS2* と相同性の高い遺伝子 *TaGS4*, *HvGS2* が見つかったことから (図 3-2-2)、これらはヒドロキシメチルグルタチオンを合成するイネ科植物に保存された遺伝子であると推察される。

一方で、ヒドロキシメチルグルタチオンの生理機能は判然としない。*OsGS2* 遺伝子の発現抑制により確かにヒドロキシメチルグルタチオン含有率は著しく減少したが (図 3-3-2)、通常条件、金属ストレス条件ともに生育への影響は見られなかった (図 3-3-3、3-3-5)。また、グルタチオン類縁体はグルタチオンと類似の生理活性を持つと考えられてきたが、*OsGS1* 遺伝子の発現抑制 (グルタチオンの減少とヒドロキシメチルグルタチオンの増加) はイネのカドミウム、ヒ素耐性を低下させた (図 3-3-3、3-3-5)。この結果から、ヒドロキシメチルグルタチオンは金属ストレス条件におけるグルタチオンの生理機能を相補できないことが示唆された。これは、グルタチオンとヒドロキシメチルグルタチオンの分子としての生理活性が異なる、あるいは細胞内オルガネラ間の移動性に違いがある、と考えられる。

課題と展望

イネのカドミウム耐性におけるグルタチオンの生理的役割を知るための一助として、イネ細胞内のカドミウムとグルタチオンの局在を調べることが考えられる。Vögeli-Lange & Wagner (1990) はカドミウムに暴露したタバコ (*Nicotiana rustica*) 葉からプロトプラストおよび液胞を単離し、細胞内のカドミウムとファイトケラチンのほとんどが液胞に共局在することを示した。一方で、これまでイネに関する報告はない。山岡ら (2010) によると、イネの根ではカドミウムのほぼ全てが Cd-S 結合の化学形態で存在する。このことから、カドミウムとグルタチオンが抱合体を形成して液胞に局在している可能性は充分にある。また、イネの葉ではカドミウムの多くは Cd-O 結合の化学形態で存在することから (山岡ら, 2010)、葉では細胞壁に、あるいは有機酸と配位した形で液胞に局在しているかもしれない。

本研究によりヒドロキシメチルグルタチオンの生合成経路が同定されたことで、その生理機能の検討がしやすくなった。様々なストレス条件における *OsGS2* 発現抑制イネの表現型解析や *OsGS2* の異種発現系により、ヒドロキシメチルグルタチオンの生理機能を明らかにできるであろう。また、ヒドロキシメチルグルタチオンの合成能力を変化させることでストレス耐性の高いイネ品種が作出できるかもしれない。

発表論文

Yamazaki, S., Ueda, Y., Mukai, A., Ochiai, K., Matoh, T. (2018) Rice phytochelatin synthases OsPCS1 and OsPCS2 make different contributions to cadmium and arsenic tolerance. *Plant Direct*. 2: 1–15.

印刷中

Yamazaki, S., Ochiai, K., Matoh, T. Rice plants have three homologs of glutathione synthetase genes, one of which, *OsGS2*, codes for hydroxymethyl-glutathione synthetase. *Plant Direct*. In press.

投稿準備中

Yamazaki, S., Ochiai, K., Matoh, T. Glutathione and hydroxymethyl-glutathione differentially contribute to heavy-metal tolerance and sulfur nutrition. In preparation.

謝辞

本研究を進め学位論文としてまとめるにあたり、多くの方々にご支援を賜りました。

京都大学教授 問藤徹先生には、研究の進め方、方向性について多くのご指導、ご助言をいただき、辛い時には優しく励ましてくださいました。また農業を実体験する場を設けていただき、農学研究者として視野を広げる機会をいただきました。ここに深く謝意を表します。

同大学准教授 小林優先生には、セミナーで多くのご指摘、ご助言をいただき、研究の方向性を見つめ直す貴重な機会をいただきました。また卒業後の進路についても相談にのっていただき、大変ご配慮いただきました。ここに深く謝意を表します。

同大学助教 落合久美子先生には、4回生での配属当初から直接のご指導をいただき、大変お世話になりました。私の至らない点も辛抱強く見守っていただき、研究生活を通して多大なるご支援をいただきました。ここに深く謝意を表します。

京都府立大学教授 矢内純太先生には、第2章のヒ素の定量にあたって ICP 発光分光分析装置を使用させていただきました。ここに謝意を表します。

京都大学植物栄養学研究室の皆様には研究生活において大変お世話になりました。

秘書の寺崎久美子さんには、毎日変わらぬ笑顔で迎えてくださり心穏やかなお昼を過ごさせていただきました。ここに謝意を表します。

松原圭佑さんには、博士課程の先輩として多くのご助言をいただきました。ここに謝意を表します。

卒業された先輩方、後輩たち、友人、家族をはじめ、多くの方々に支えていただきました。ここに深く謝意を表します。

引用文献

- Blum, R., Meyer, K. C., Wünschmann, J., Lenzian, K. J., Grill, E. (2010) Cytosolic action of phytochelatin synthase. *Plant Physiol.* 153: 159–169.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Cairns, N. G., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C. S., Meyer, A. J. (2006) Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol.* 141: 446–455.
- Carnegie, P. R. (1963) Isolation of a homologue of glutathione and other acidic peptides from seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biochem. J.* 89: 459–471.
- Cazalé, A. C., Clemens, S. (2001) *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Letters.* 507: 215–219.
- Chao, D. Y., Chen, Y., Chen, J., Shi, S., Chen, Z., Wang, C., Danku, J. M., Zhao, F. J., Salt, D. E. (2014) Genome-wide association mapping identifies a new arsenate reductase enzyme critical for limiting arsenic accumulation in plants. *PLoS Biol.* 12: e1002009.
- Chapman, D. J., Leech, R. M. (1979) Changes in pool sizes of free amino acids and amides in leaves and plastids of *Zea mays* during leaf development. *Plant Physiol.* 63: 567–572.
- Cheng, J. C., Seeley, K. A., Sung, Z. R. (1995) *RML1* and *RML2*, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiol.* 107: 365–376.
- Clemens, S. (2006) Evolution and function of phytochelatin synthases. *J. Plant Physiol.* 163: 319–332.
- Clemens, S., Kim, E. J., Neumann, D., Schroeder, J. I. (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J.* 18: 3325–3333.
- Clement, G. E., Hartz, T. P. (1971) Determination of the microscopic ionization constants of cysteine. *J. Chem. Educ.* 48: 395–397.
- Cobbett, C. S., Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 159–182.
- Cobbett, C. S., May, M. J., Howden, R., Rolls, B. (1998) The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant J.* 16: 73–78.
- Das, N., Bhattacharya, S., Bhattacharyya, S., Maiti, M. K. (2017) Identification of alternatively spliced transcripts of rice phytochelatin synthase 2 gene *OsPCS2* involved in mitigation of cadmium and arsenic stresses. *Plant Mol. Biol.* 94: 167–183.
- Delnomdedieu, M., Basti, M. M., Otvos, J. D., Thomas, D. J. (1994) Reduction and binding of

- arsenate and dimethylarsinate by glutathione: a magnetic resonance study. *Chem.-Biol. Interact.* 90: 139–155.
- Dhankher, O. P., Rosen, B. P., McKinney, E. C., Meagher, R. B. (2006) Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). *PNAS*. 103: 5413–5418.
- Dietz, K. J., Jäger, R., Kaiser, G., Martinoia, E. (1990) Amino acid transport across the tonoplast of vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Plant Physiol.* 92: 123–129.
- Dixon, D. P., Edwards, R. (2010) Glutathione transferases. *The Arabidopsis Book*. e0131. 10.1199/tab.0131.
- Dixon, D. P., Skipsey, M., Edwards, R. (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochem.* 71: 338–350.
- Ebbs, S., Lau, I., Ahner, B., Kochian, L. (2002) Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J. & C. Presl). *Planta*. 214: 635–640.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., Hejine, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300: 1005–1016.
- Foyer, C. H., Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 133: 21–25.
- Frendo, P., Gallesi, D., Turnbull, R., Van de Sype, G., Hérouart, D., Puppo, A. (1999) Localisation of glutathione and homoglutathione in *Medicago truncatula* is correlated to a differential expression of genes involved in their synthesis. *Plant J.* 17: 215–219.
- Frendo, P., Jiménez, M. J. H., Mathieu, C., Duret, L., Gallesi, D., Van de Sype, G., Hérouart, D., Puppo, A. (2001) A *Medicago truncatula* homoglutathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication. *Plant Physiol.* 126: 1706–1715.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. (1989) Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 44: 361–369.
- Griffith, O. W. (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J. Biol. Chem.* 257: 13704–13712.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E-L., Zenk, M. H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *PNAS*. 86: 6838–6842.
- Grill, E., Winnacker, E-L., Zenk, M. H. (1985) Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*. 230: 674–676.

- Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M. H. (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *PNAS*. 84: 439–443.
- Grill, E., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *PNAS*. 84: 439–443.
- Ha, S. B., Smith, A. P., Howden, R., Dietrich, W. M., Bugg, S., O’Connell, M. J., Goldsbrough, P. B., Cobbett, C. S. (1999) Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell*. 11: 1153–1163.
- Halliwell, B., Foyer, C. H. (1978) Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta*. 139: 9–17.
- Hayashi, S., Kuramara, M., Abe, T., Takagi, H., Ozawa, K., Ishikawa, S. (2017) Phytochelatin synthase OsPCS1 plays a crucial role in reducing arsenic levels in rice grains. *Plant J*. 91: 840–848.
- Honma, T., Ohba, H., Kaneko-Kadokura, A., Makino, T., Nakamura, K., Katou, H. (2016) Optimal soil Eh, pH, and water management for simultaneously minimizing arsenic and cadmium concentrations in rice grains. *Environ. Sci. Technol*. 50: 4178–4185.
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., et al. (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*. 35: 585–587.
- Howden, R., Andersen, C. R., Goldsbrough, P. B., Cobbett, C. S. (1995) A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 107: 1067–1073.
- Howden, R., Goldsbrough, P. B., Andersen, C. R., Cobbett, C. S. (1995) Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol*. 107: 1059–1066.
- Jez, J. M., Cahoon, R. E. (2004) Kinetic mechanism of glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem*. 279: 42726–42731.
- Jozefczak, M., Keunen, E., Schat, H., Bliiek, M., Hernández, L. E., Carleer, R., Remans, T., Bohler, S., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2014) Differential response of *Arabidopsis* leaves and roots to cadmium: Glutathione-related chelating capacity vs antioxidant capacity. *Plant Physiol. Biochem*. 83: 1–9.
- Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2012) Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int. J. Mol. Sci*. 13: 3145–3175.
- Kellermann, O. K., Ferenci, T. (1982) Maltose-binding protein from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*. 90: 459–463.
- Kitamura, S., Shikazono, N., Tanaka, A. (2004) *TRANSPARENT TESTA 19* is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant J*. 37: 104–114.
- Klapheck, S., Chrost, B., Starke, J., Zimmermann, H. (1992) γ -Glutamylcysteinylserine – a new

- homologue of glutathione in plants of the family Poaceae. *Botanica Acta*. 105: 174–179.
- Klapheck, S., Fliengner, W., Zimmer, I. (1994) Hydroxymethyl-phytochelatin [(γ -glutamylcysteine)_n-serine] are metal-induced peptides of the poaceae. *Plant Physiol*. 104: 1325–1332.
- Klapheck, S., Zopes, H., Levels, H. G., Bergmann, L. (1988) Properties and localization of the homogluthathione synthetase from *Phaseolus coccineus* leaves. *Physiologia Plantarum*. 74: 733–739.
- Kondo, N., Imai, K., Isobe, M., Goto, T., Murasugi, A., Wada-Nakagawa, C., Hayashi, Y. (1984) Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast: separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedron Lett*. 25: 3869–3872.
- Kondo, N., Isobe, M., Imai, K., Goto, T., Murasugi, A., Hayashi, Y. (1983) Structure of cadystin, the unit-peptide of cadmium-binding peptides induced in a fission yeast, *Shizosaccharomyces pombe*. *Tetrahedron Lett*. 24: 925–928.
- Kühnlenz, T., Schmidt, H., Uraguchi, S., Clemens, S. (2014) *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase 2 is constitutively active *in vivo* and can rescue the growth defect of the *PCSI*-deficient *cad1-3* mutant on Cd-contaminated soil. *J. Exp. Bot*. 65: 4241–4253.
- Larkin, M. A., Blackhields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23: 2947–2948.
- Li, J. C., Guo, J. B., Xu, W. Z., Ma, M. (2007) RNA interference-mediated silencing of phytochelatin synthase gene reduce cadmium accumulation in rice seeds. *J. Integr. Plant Biol*. 49: 1032–1037.
- Li, Z. S., Lu, Y. P., Zhen, R. G., Szczypka, M., Thiele, D. J., Rea, P. A. (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *PNAS*. 94: 42–47.
- Li, Z. S., Szczypka, M., Lu, Y. P., Thiele, D. J., Rea, P. A. (1996) The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem*. 271: 6509–6517.
- Ma, J. F., Yamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., Yano, M. (2006) A silicon transporter in rice. *Nature*. 440: 688–691.
- Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Tamai, K., Konishi, S., Fujiwara, T., Katsuhara, M., Yano, M. (2007) An efflux transporter of silicon in rice. *Nature*. 448: 209–212.
- Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X. Y., Su, Y. H., McGrath, S. P., Zhao, F. J. (2008) Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *PNAS*. 105: 9931–9935.
- Macnicol, P. K. (1987) Homogluthathione and glutathione synthetases of legume seedlings: partial

- purification and substrate specificity. *Plant Science*. 53: 229–235.
- Maitani, T., Kubota, H., Sato, K., Yamada, T. (1996) The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol*. 110: 1145–1150.
- Marrs, K. A., Walbot, V. (1997) Expression and RNA splicing of the maize glutathione *S*-transferase *Bronze2* gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiol*. 113: 93–102.
- Masscheleyn, P. H., Delaune, R. D., Patrick Jr, W. H. (1991) Effect of Redox Potential and pH on Arsenic Speciation and Solubility in a Contaminated Soil. *Environmental Science and Technology*, 25: 1414–1419.
- Matamoros, M. A., Moran, J. F., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubiom M. C., Becana, M. (1999) Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol*. 121: 879–888.
- Maughan, S. C., Pasternak, M., Cairns, N., Kiddle, G., Brach, T., Jarvis, R., Haas, F., et al. (2010) Plant homologs of the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter, *PfCRT*, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *PNAS*. 107: 2331–2336.
- Meister, A., Anderson, M. E. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711–760.
- Meister, A., Tate, S. S. (1976) Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu. Rev. Biochem.* 45: 559–604.
- Meuwly, P., Thibault, P., Rauser, W. E. (1993) γ -Glutamylcysteinylglutamic acid – a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Letters*. 336: 472–476.
- Meuwly, P., Thibault, P., Schwan, A. L., Rauser, W. E. (1995) Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J*. 7: 391–400.
- Mhamdi, A., Hager, J., Chaouch, S., Queval, G., Han, Y., Tacconnat, L., Saindrenan, P., Gouia, H., Issakidis-Bourguet, E., Renou, J-P., Noctor, G. (2010) Arabidopsis GLUTATHIONE REDUCTASE 1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular H₂O₂ and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiology*. 153: 1144–1160.
- Miyadate, H., Adachi, S., Hiraizumi, A., Tezuka, K., Nakazawa, N., Kawamoto, T., et al. (2011) OsHMA3, a P1B-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles. *New Phytologist*. 189: 190–199.
- Moran, J. F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M. A., Rubio, M. C., Clemente, M. R., Brewin, N. J., Becana, M. (2000) Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiol*. 124: 1381–1392.
- Murasugi, A., Wada, C., Hayashi, Y. (1981) Cadmium-binding peptide induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biochem.* 90: 1561–1564.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G.,

- Foyer, C. H. (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* 35: 454–484.
- Noctor, G., Strohm, M., Jouanin, L., Kunert, K. J., Foyer, C. H., Rennenberg, H. (1996) Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol.* 112: 1071–1078.
- Okumura, R., Koizumi, Y., Sekiya, J. (2003) Synthesis of hydroxymethylglutathione from glutathione and L-serine catalyzed by carboxypeptidase Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 434–437.
- Park, J., Song, W. Y., Ko, D., Eom, Y., Hansen, T. H., Schiller, M., et al. (2012). The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *Plant J.* 69: 278–288.
- Pasternak, M., Lim, B., Wirtz, M., Hell, R., Cobbett, C. S., Meyer, A. J. (2008) Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *Plant J.* 53: 999–1012.
- Rabenstein, D. L. (1973) Nuclear magnetic resonance studies of the acid-base chemistry of amino acids and peptides. I. Microscopic ionization constants of glutathione and methylmercury-complexed glutathione. *J. Am. Chem. Soc.* 95: 2797–2803.
- Ramos, J., Clemente, M. R., Naya, L., Loscos, J., Pérez-Rontomé, C., Sato, S., Tabata, S., Becana, M. (2007) Phytochelatin synthases of the model legume *Lotus japonicus*. A small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants. *Plant Physiol.* 143: 1110–1118.
- Rea, P. A. (2012) Phytochelatin synthase: of a protease a peptide polymerase made. *Physiologia Plantarum*, 145: 154–164.
- Reddy, A. S. N. (2007) Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 267–294.
- Rennenberg, H. (1980) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry*. 21: 2771–2781
- Rennenberg, H. (1984) The fate of excess sulfur in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 121–153.
- Romanyuk, N. D., Rigden, D. J., Vatamaniuk, O. K., Lang, A., Cahoon, R. E., Jez, J. M., Rea, P. A. (2006) Mutagenic definition of a papain-like catalytic triad, sufficiency of the N-terminal domain for single-site core catalytic enzyme acylation, and C-terminal domain for augmentative metal activation of a eukaryotic phytochelatin synthase. *Plant Physiol.* 141: 858–869.
- Ruotolo, R., Peracchi, A., Bolchi, A., Infusini, G., Amoresano, A., Ottonello, S. (2004) Domain organization of phytochelatin synthase: functional properties of truncated enzyme species

- identified by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* 279: 14686–14693.
- Sasaki, A., Yamaji, N., Ma, J. F. (2014) Overexpression of *OsHMA3* enhances Cd tolerance and expression of Zn transporter genes in rice. *J. Exp. Bot.* 65: 6013–6021.
- Schmöger, M. E. V., Oven, M., Grill, E. (2000) Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol.* 122: 793–801.
- Schupp, R., Rennenberg, H. (1988) Diurnal changes in the glutathione content of spruce needles (*Picea abies* L.). *Plant Science.* 57: 113–117.
- Sies, H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine.* 27: 916–921.
- Skipsey, M., Davis, B. G., Edwards, R. (2005) Diversification in substrate usage by glutathione synthetases from soya bean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*). *Biochem. J.* 391: 567–574.
- Smith, I. K., Vierheller, T. L., Thorne, C. A. (1989) Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiologia Plantarum.* 77: 449–456.
- Sneller, F. E. C., Heerwaarden, L. M., Koevoets, P. L. M., Vooijs, R., Schat, H., Verkleij, J. A. C. (2000). Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: Comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4014–4019.
- Song, W. Y., Park, J., Mendoza-Cózatl, D. G., Suter-Grotemeyer, M., Shim D., Hörtensteiner, S., et al. (2010). Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *PNAS.* 107: 21187–21192.
- Song, W. Y., Sohn, E. J., Martinoia, E., Lee, Y. J., Yang, Y. Y., Jasinski, M., et al. (2003) Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* 21: 914–919.
- Song, W. Y., Yamaki, T., Yamaji, N., Ko, D., Jung, K. H., Fujii-Kashino, M., An, G., Martinoia, E., Lee, Y., Ma, J. F. (2014) A rice ABC transporter, *OsABCC1*, reduces arsenic accumulation in the grain. *PNAS.* 111: 15699–15704.
- Su, Y. H., McGrath, S. P., Zhao, F. J. (2010) Rice is more efficient in arsenite uptake and translocation than wheat and barley. *Plant Soil.* 328: 27–34.
- Sánchez-Bermejo, E., Castrillo, G., del Llano, B., Navarro, C., Zarco-Fernández, S., Martínez-Herrera, D. J., Puerto, Y. L., Muñoz, R., Cámara, C., Paz-Ares, J., Alonso-Blanco, C., Leyva, A. (2014) Natural variation in arsenate tolerance identifies an arsenate reductase in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Commun.* 5: 4617.
- Takahashi, Y., Minamikawa, R., Hattori, K. H., Kurishima, K., Kihou, N., Yuita, K. (2004) Arsenic behavior in paddy fields during the cycle of flooded and non-flooded periods. *Environ. Sci.*

Technol. 38: 1038–1044.

- Ueno, D., Yamaji, N., Kono, I., Huang, C.F., Ando, T., Yano, M., et al. (2010) Gene limiting cadmium accumulation in rice. *PNAS*. 107: 16500–16505.
- Uraguchi, S., Sone, Y., Ohta, Y., Ohkama-Ohtsu, N., Hofmann, C., Hess, N., Nakamura, R., Takanezawa, Y., Clemens, S., Kiyono, M. (2018) Identification of C-terminal regions in *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase 1 specifically involved in activation by arsenite. *Plant Cell Physiol.* 59: 500–509.
- Uraguchi, S., Tanaka, N., Hofmann, C., Abiko, K., Ohkama-Ohtsu, N., Weber, M., Kamiya, T., Sone, Y., Nakamura, R., Takanezawa, Y., Kiyono, M., Fujiwara, T., Clemens, S. (2017) Phytochelatin synthase has contrasting effects on cadmium and arsenic accumulation in rice grains. *Plant Cell Physiol.* 58: 1730–1742.
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lang, A., Chalasani, S., Demkiv, L., Rea, P. A. (2004) Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with γ -glutamylcysteine during catalysis. Stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of *Arabidopsis thaliana* PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. *J. Biol. Chem.* 279: 22449–22460.
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y-P., Rea, P. A. (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J. Biol. Chem.* 275: 31451–31459.
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P., Rea, P. A. (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and *in vitro* reconstitution. *PNAS*. 96: 7110–7115.
- Vatamaniuk, O. K., Mari, S., Lu, Y. P., Rea, P. A. (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochealtin (PC) synthase: Blocked thiol are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J. Biol. Chem.* 275: 31451–31459.
- Vernoux, T., Wilson, R. C., Seeley, K. A., Reichheld, J. P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S. C., Cobbett, C. S., Montagu, M. V., Inzé, D., May, M. J., Sung, Z. R. (2000) The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell.* 12: 97–109.
- Vestergaard, M., Matsumoto, S., Nishikori, S., Shiraki, K., Hirata, K., Takagi, M. (2008) Chelation of cadmium ions by phytochelatin synthase: role of the cystein-rich C-terminal. *Analytical Sciences*, 24: 277–281.
- Viña, J., Saez, G. T., Wiggins, D., Roberts, A. F. C., Hems, R., Krebs, H. A. (1983) The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 212: 39–44.
- Vögeli-Lange, R., Wagner, G. J. (1990) Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves: implication of a transport function for cadmium-binding peptides.

Plant Physiol. 92: 1086–1093.

- Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J., Rausch, T. (2005) Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the *Brassicaceae*. *Plant J.* 41: 15–30.
- Xu, X. Y., McGrath, S. P., Zhao, F. J. (2007) Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytologist.* 176: 590–599.
- Yang, J., Gao, M. X., Hu, H., Ding, X. M., Lin, H. W., Wang, L., et al. (2016) OsCLT1, a CRT-like transporter 1, is required for glutathione homeostasis and arsenic tolerance in rice. *New Phytologist.* 211: 658–670.
- Zhao, F. J., Ago, Y., Mitani, N., Li, R. Y., Su, Y. H., Yamaji, N., McGrath, S. P., Ma, J. F. (2010) The role of the rice aquaporin Lsi1 in arsenite efflux from roots. *New Phytologist.* 186: 392–399.
- Zhao, F. J., Wang, J. R., Barker, J. H. A., Schat, H., Bleeker, P. M., McGrath, S. P. (2003) The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist.* 159: 403–410.
- Zopes, H., Klapheck, S., Bergmann, L. (1993) The function of homoglutathione and hydroxymethylglutathione for the scavenging of hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* 34: 515–521.
- 伊藤秀文, 飯村康二. (1976) 水稻によるカドミウム吸収・移行および生育障害、亜鉛との対比において: 重金属による土壌汚染に関する研究 (第1報). 北陸農業試験場報告. 19: 71–136.
- 上田洋介. (2012) グルタチオンと類縁化合物によるカドミウムの解毒機構に関する研究. 京都大学大学院農学研究科 修士論文.
- 向井彩. (2011) イネのグルタチオン類の合成経路に関する研究. 京都大学大学院農学研究科 修士論文.
- 山岡和希子, 高田沙織, 竹久妃奈子, 林依子, 保倉明子, 寺田靖子, 阿部知子, 中井泉. (2010) 放射光マイクロビーム蛍光 X 線分析と X 線吸収端微細構造解析を用いたイネのカドミウムの蓄積機構に関する研究. 分析化学. 59: 463–475.
- 山根忠昭. (1989) 水稻におけるヒ素被害の発生機構と対策. 島根県農業試験場研究報告. 24: 1–95.
- 渡辺文太, 平竹潤. (2015) グルタチオン代謝とチオールケミストリー: 病態との関係、創薬標的としての価値. 化学と生物. 53: 354–361.