

# 活性酸素シグナル伝達・応答に関する遺伝子群の単離と構造解析

応用生物学研究室 碓山 菜々子

## 序論

植物における活性酸素の生成・消去システムについては明らかになってきているが、その関与する周辺の現象については、まだ解明されていない。例えば植物が乾燥・強光などの強いストレスにさらされた時、光傷害により枯死する。またこれらのストレスが徐々に作用する場合は、植物は適応として耐性を身につけることも分かっている。その適応の仕組みは、まずストレスを与える事によって活性酸素が生成し、それがストレスシグナルの役割をして耐性を生じる遺伝子を発現させる、と考えられている。この環境応答を、「活性酸素シグナル伝達応答系」と呼んでいるが、その反応系に関与する分子種・遺伝子は未知なままである。この植物の環境耐性の基礎をなす活性酸素シグナル伝達応答系の機構を明らかにすることは、環境耐性の強い植物を作るために有用であり、環境問題を解決するのに役立つ。そこで本研究で、活性酸素シグナル伝達応答系に関与する遺伝子群の単離と構造解析をおこなった。

## 方法と結果

### 材料と実験概要

本研究では、ストレスとして約  $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の強光(High Light, HL)をインゲンに 14 日間照射して育成した。一方、比較として約  $120 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の弱光である蛍光灯の光(Low Light, LL)を 14 日間照射して育成した。この 2 つの比較によってわかる環境応答を、WALZ 社製のクロロフィル蛍光解析装置 PAM-2000 を使って明らかにした。そして、HL と LL で異なって発現する耐性に関与する遺伝子群の探索を、Differential Display 法を用いて行った。

### PAM-2000 を使った光呼吸測定

クロロフィル蛍光解析装置 PAM-2000 は、クロロフィルから放出される蛍光を解析する事により、葉の組織を壊さずに内部でおこる電子の動きを測定できる装置である。光を照射する事によって葉緑体中の電子移動量、すなわち光合成能力がわかるのである。本実験では、2 枚のガラス板とチューブで空間を作り、植物をその空間にいれて外から測定する事によって、大気組成を変えての簡単な測定を可能にした。

強光下で育成したインゲン (HL) と蛍光灯下で育成したインゲン(LL)の葉で、それぞれ通常(通常大気)・酸素 21%(酸素 20.6%+窒素)・酸素 2%(酸素 2.005%+窒素)という異なる 3 つの大気成分中での光合成能力の測定を行った(図 1)。酸素 2%では光呼吸系は作動しないが、酸素濃度が上昇するにつれて作動する。そのため、酸素 21%と酸素 2%の測定値の差(図 1 太線)が光呼吸となる。通常大気では強光下 LL と蛍光灯下 HL でほとんど光合成に差がない。それに対し、酸素 21%と酸素 2%の測定値の差、すなわち光呼吸は LL より HL の方が大きかった。

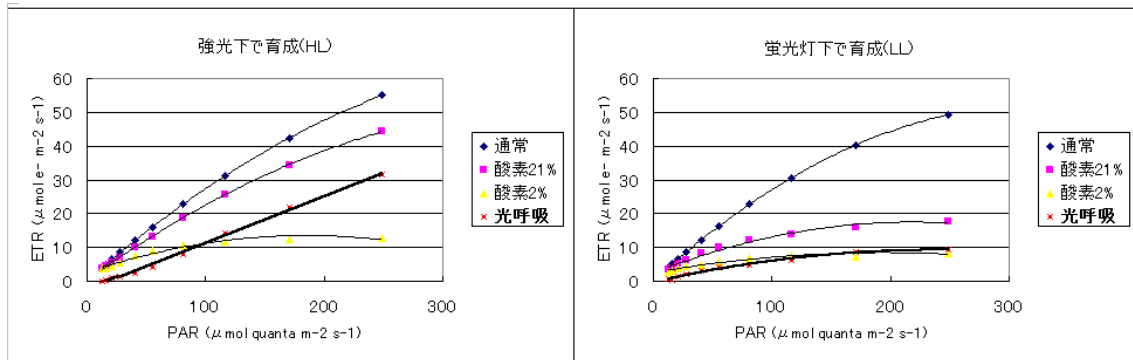


図1. 強光下で育成インゲン(HL) と蛍光灯下で育成インゲン(LL)の光呼吸の比較  
 通常・・・通常大気 酸素21%・・・酸素20.6%+窒素 酸素2%・・・酸素2.005%+窒素 光呼吸・・・酸素21%-酸素2%  
 PAR・・・照射する光の強さ ETR・・・光合成能力

### Differential Display 法(D.D.法)による新たに発現する遺伝子群の探索

#### ・ mRNA の抽出と RT-PCR

この光呼吸の差に関与する遺伝子を明らかにするため、HL,LL 両方のインゲンの葉からそれぞれ QIAGEN QuickPrep micro mRNA Purification Kit を使い mRNA を抽出し、それから一本鎖の相補的 DNA(single strand complementary DNA, ss cDNA)を合成した。これを鋳型にし、PCR にかけて複製を行った(Reverse Transcription-Polymerase chain reaction, RT-PCR)。

#### ・ Differential Display 法(D.D.法)

複製した cDNA を電気泳動にかけ、オートラジオグラフィーをとった(図 2)。それぞれのレーンで特異的に発現しているバンドや、発現量に大きく差が表れているバンドを、計 8 回の D.D. で 23 個発見した。

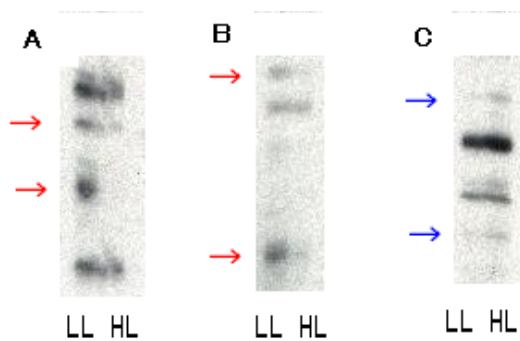


図2. オートラジオグラフィー結果

それぞれ、左にLL, 右にHLサンプルを流した。  
 A,Bの赤い矢印部分で  
 LLであった遺伝子群がHLでは発現していない。  
 Cの青い矢印部分で  
 LLで無かった遺伝子群がHLで発現している。

### 考察

酸素 21%と酸素 2%での光合成の差の比較から、強光を照射したインゲンは光呼吸を行うという事を明らかにした(図 1)。強光というストレスから枯死を回避するため、インゲンに光呼吸という耐性が生じたのである。その光呼吸に関与すると思われる遺伝子断片の発見までは出来た(図 2)。今後はこの遺伝子断片の配列決定を行い、活性酸素シグナル伝達・応答に関与する遺伝子群の単離と構造の解析を進めていく。