

アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) 根における 水チャンネル (アクアポリン) 遺伝子の発現

日本たばこ産業 (株) 遺伝育種研究所 山田茂裕
Shigehiro.Yamada@pbgrl.jti.co.jp

1. はじめに

近年、水分子に特異的なチャンネルタンパク質(アクアポリン)が生体膜に存在することが明らかになり、生体膜における水の透過に対する概念を大きく変えることになった(Chrispeels and Agre, 1994)。高等植物には、細胞膜に局在するPIP (plasma membrane intrinsic protein) アクアポリンと液胞膜に局在するTIP (tonoplast intrinsic protein) アクアポリンの2種類が存在する(Chrispeels and Maurel, 1994)。乾燥ストレスによるPIPアクアポリン遺伝子の発現誘導が報告されたことから(Daniels et al., 1994; Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992)、PIPアクアポリンは高等植物の水分ストレス適応に寄与している可能性が示唆された。本研究では、高等植物におけるPIPアクアポリンの生理的意義を解明することを目的として、PIPアクアポリン遺伝子の水分ストレス下における発現制御と組織特異性について研究を進めた。

2. アイスプラントにおけるPIPアクアポリン遺伝子発現の解析

アイスプラントはアフリカ原産の塩生植物 (facultative halophyt) であり、塩ストレスによりCAM光合成の誘導、ピニトール合成系の誘導、表皮ブラダー (のう胞) 細胞 (epidermal bladder cell) の発達などの生理的変化を引き起こす(Adams et al., 1998)。筆者が本研究を行ったHans Bohnert教授の研究室 (University of Arizona, Department of Biochemistry) では、塩ストレス付与により生ずる遺伝子発現の変化が、この植物の塩ストレス耐性メカニズムに関与していると考え、根において塩ストレス下で発現量の変動があると思われる遺伝子のcDNAを、ディファレンシャルスクリーニングにより多数単離した (Michalowski C., 未発表データ)。これらのクローンの中に、MIP (Major Intrinsic Protein) ファミリーと相同性を持つクローンが3種類(*McMipA*, *McMipB*, *McMipC*)見いだされた。MIP遺伝子は、最初にウシの水晶体から単離された、チャンネル機能を持つ膜タンパク質をコードする遺伝子である(Gorin et al., 1984)。これまでに知られているアクアポリンはMIP遺伝子と相同性を持つMIPファミリーに属していることから、今回単離された遺伝子の産物はアクアポリンである可能性が示唆された。共同研究者の且原真木博士 (岡山大学資源生物科学研究所) により、*McMipA* および *McMipB* のcRNAをアフリカツメガエルの未受精卵にマイクロインジェクションして産物を発現させると、卵細胞膜の水透過性が上昇することが明らかにされ、これらの遺伝子産物が水チャンネル活性を持つことが証明された(Yamada et al., 1995)。

得られた3種類の遺伝子 (以下総称して、McMip) のうち、*McMipB* は根においてのみ転写産物の蓄積が見られ、*McMipA* と *McMipC* は根と葉において転写産物の蓄積が見られた。また、*McMipB* の転写産物蓄積量は他の2遺伝子に比べて低かった。塩ストレス条件下 (450 mM NaClを含むHoagland溶液による水耕栽培) におけるMcMip転写産物の蓄積量を調査したところ、*McMipA* と *McMipC* の転写産物の蓄積量は、地上部・地下部でともに塩ストレス付与直後から30時間後までの間著しく減少し、3日目から5日目までに少なくともストレス付与前のレベルにまで回復した。この変動は、塩ストレス処理後の植物体地上部の膨圧変化と一致していた。つまり、アイスプラントの地上部は、塩ストレス付与後一時的に膨圧を失いその後回復するが、この膨圧の変化と *McMipA* および *McMipC* の転写物蓄積量の変化はほぼ一致していた。従って、これらの遺伝子は植物体の水分維持機能と関連して

いると考えられる。一方、*McMipB*は塩ストレスによる影響をほとんど受けていなかった。このように、3種類の*McMip*遺伝子はすべてアクアポリンをコードしているが、それぞれの遺伝子発現が異なる器官特異性や塩ストレスに対する反応を示すことから、アイスプラントにおけるアクアポリン発現は複雑に制御されていると考えられる。

*McMip*遺伝子発現の組織特異性を詳細に調べるため、*McMipA*と*McMipB*について、*in situ* hybridizationを行った。その結果、*McMipA*転写産物は根端付近の細胞や、維管束が分化途上にある成長中の組織の表皮細胞で多く見られた (Fig. 1, B)。二次分化が生じているような成熟した根では、*McMipA*転写産物は木部を取り囲んでいる細胞で高い蓄積を示した (Fig. 1, D, E)。*McMipA*転写産物はまた、葉の維管束と、低くはあるが葉肉細胞で蓄積していた。一方、*McMipB*転写産物の蓄積は根端付近のみで限定的に見られ、維管束が発達している部分と一致していると思われた (Fig. 2)。これらの細胞はいずれも水分移動が盛んな組織にあり、PIPアクアポリンは細胞間の水分移動に機能していると考えられる。

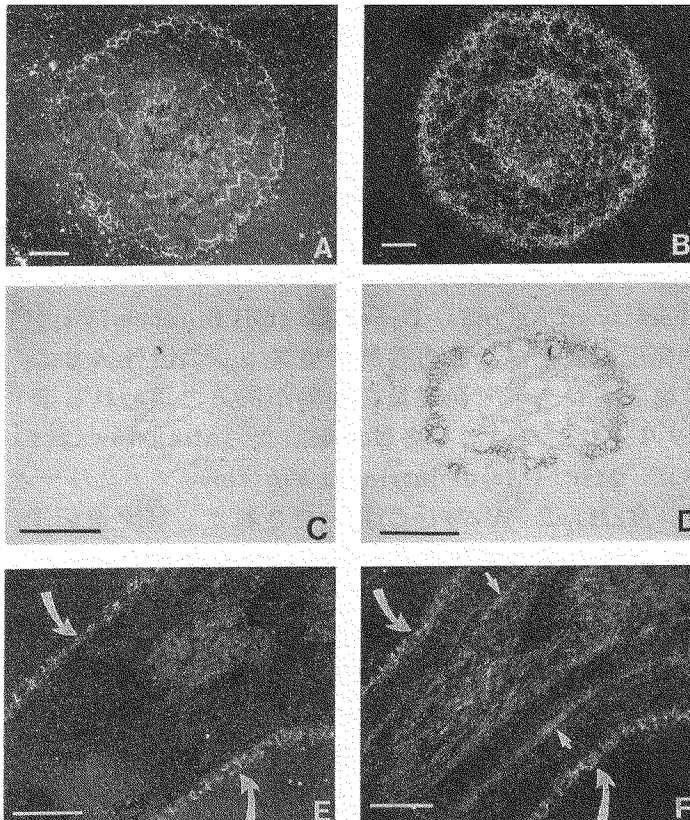


Figure 1 アイスプラント根における、*McMipA*の *in situ* hybridization.

A, C, E ; センスプローブ (コントロール)

B, D, F ; アンチセンスプローブ

E, Fの大型矢印は細胞壁の自家蛍光を、Fの小型矢印はアンチセンスプローブによるシグナルを、それぞれ示している。

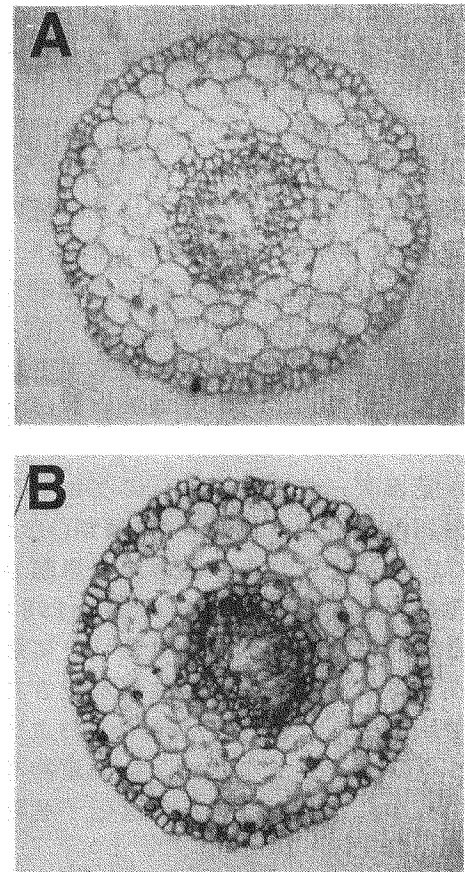


Figure 2 アイスプラント根における、*McMipB*の *in situ* hybridization.

A ; センスプローブ (コントロール)

B ; アンチセンスプローブ

3. 形質転換体を用いた*McMipB*プロモーターの解析

アイスプラント由来*McMipB*遺伝子のプロモーター領域約3.2 kbを含むDNA断片を単離し、転写開始点より上流約2 kbについて塩基配列を決定した。転写開始点は翻訳開始点より176、170および161ベース上流の3ヶ所存在していた。このプロモーターの組織特異性を調べるため、下流部に*uidA*遺伝子を配置した融合遺伝子を作製し、アグロバクテリウム法により*Nicotiana tabacum*に導入した。形質転換体のGUS発現の解析から、このプロモーターは形質転換タバコにおいてもアイスプラントとほぼ同じ組織特異性を持っていると思われた。発芽種子では強度に差はあるが、全ての細胞においてGUS活性が見られ、最も強い発現を示したのは根端であった。幼植物では急速に成長中の細胞において、つまり根端と頂芽の分裂組織、側根の原基等で強いGUS活性が見られた。成熟した植物体では腺毛、茎と葉柄における表皮の下層の細胞、維管束周辺の細胞および木部柔細胞においてGUS発現が見られた。未熟な花芽組織ではほぼ全ての細胞において強いGUS発現が見られた。その強度は組織が成熟するにつれて弱くなった(Yamada et al., 1997b)。全般的には、このプロモーターは急速に成長している細胞や水分移動の盛んな細胞、特に木部柔細胞において発現していた。この結果から、*McMipB*産物は水分移動の盛んな組織にある細胞において、細胞内外への水分移動を助長していると考えられる。

4. まとめ

アイスプラントでは塩ストレスにより一部のPIPアクアポリン遺伝子の発現が抑制されることが明らかとなった。一方、筆者が現在用いている*Nicotiana*属植物やシロイヌナズナ等の非塩生植物 (glycophyte) では、水分ストレスによりPIPアクアポリン遺伝子発現が上昇することが見いだされている(Guerrero et al., 1990; Yamada et al., 1997a; Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992)。従って、水分ストレスに対するPIPアクアポリン遺伝子発現の変化は、植物の水分ストレス耐性と密接に関連しているのかもしれない。

また、PIPアクアポリンは成長・肥大中の細胞において、細胞内への水分の取り込みを円滑にするなどの重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、PIPアクアポリン遺伝子が維管束などで発現していることが本研究以外にも報告されており(Jones and Mullet, 1995)、高等植物における水の長距離輸送において機能していると考えられる。

5. 終わりに

高等植物は多くのアクアポリン遺伝子を持っており、シロイヌナズナでは23個 (PIP、TIP各11個、不明1個) の遺伝子の存在が報告されている(Weig et al., 1997)。こうした遺伝子構造の複雑さは、高等植物におけるアクアポリン遺伝子の発現が、時間的・空間的に複雑な制御を受けているためであるからかもしれない。アクアポリン遺伝子発現の組織特異性や環境による影響についての研究は少なく、そのためアクアポリン自身やその発現制御の生理的意義については不明な点が多い。また、PIP、TIPの両者についてタンパク質レベルでのリン酸化による活性制御の報告があるが(Johansson et al., 1998; Maurel et al., 1995)、この現象についても生理学的意義は不明である。今後、このような生理学的視点からのアクアポリン研究を通して、高等植物におけるアクアポリンの機能が明らかになっていくものと思われる。

引用文献

Adams, P., Nelson, D. E., Yamada, S., Chmara, W., Jensen, R. G., Bohnert, H. J., Griffiths, H. (1998) Growth and development of *Mesembryanthemum*

- crystallinum*. (*Aizoaceae*). *New Phytol.* 138: 171-190
- Chrispeels, M. J. , Agre, P. (1994) Aquaporins: Water channel proteins of plant and animal cells. *Trends Biol. Sci.* 19: 421-425
- Chrispeels, M. J. , Maurel, C. (1994) Aquaporins: The molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? *Plant Physiol.* 105: 9-13
- Daniels, M. J., Mirkov, T. E. , Chrispeels, M. J. (1994) The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiol.* 106: 1325-1333
- Gorin, M. B., Yancey, S. B., Cline, J., Revel, J. P. , Horwitz, J. (1984) The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: Characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell* 39: 49-59
- Guerrero, F. D., Jones, J. T. , Mullet, J. E. (1990) Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.* 15: 11-26
- Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V. K., Chrispeels, M. J., Larsson, C. , Kjellbom, P. (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 10: 451-459
- Jones, J. T. , Mullet, J. E. (1995) Developmental expression of a turgor-responsive gene that encodes an intrinsic membrane protein. *Plant Mol. Biol.* 28: 983-996
- Maurel, C., Kado, R. T., Guern, J. , Chrispeels, M. J. (1995) Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin alpha-TIP. *EMBO J.* 14: 3028-3035
- Weig, A., Deswarte, C. , Chrispeels, M. J. (1997) The major intrinsic protein family of *Arabidopsis thaliana* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol.* 114: 1347-1357
- Yamada, S., Katsuhara, M., Kelly, W. B., Michalowski, C. B. , Bohnert, H. J. (1995) A family of transcripts encoding water channel proteins: Tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 7: 1129-1142
- Yamada, S., Komori, T., Myers, P. N., Kuwata, S., Kubo, T. , Imaseki, H. (1997a) Expression of plasma membrane water channel genes under water-stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol.* 38: 1226-1231
- Yamada, S., Nelson, D. E., Lay, E., Marquez, S. , Bohnert, H. J. (1997b) The expression of an aquaporin promoter from *Mesembryanthemum crystallinum* in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 38: 1326-1332
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urano, S. , Shinozaki, K. (1992) Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.* 33: 217-224

Gene expression of PIP aquaporins in the root of *Mesembryanthemum crystallinum*.
Shigehiro YAMADA