

福岡県農業総合試験場特別報告

第 3 9 号

トリエン脂肪酸低減シクラメンにおける
高温耐性獲得メカニズムに関する研究

平成 25 年 3 月

福岡県農業総合試験場

(福岡県筑紫野市大字吉木)

SPECIAL BULLETIN
OF
THE FUKUOKA AGRICULTURAL RESEARCH CENTER
NO.39

Studies on the acquired mechanism of thermotolerance in cyclamen
with decreased trienoic fatty acids

by
Hiroomi Kai

THE FUKUOKA AGRICULTURAL RESEARCH CENTER

Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan

March 2013

トリエン脂肪酸低減シクラメンにおける
高温耐性獲得メカニズムに関する研究

甲斐 浩臣

2013

*九州大学 審査学位論文

目 次

緒 論	1
材 料 と 方 法	3
結 果	7
考 察	17
要 約	20
謝 辞	21
引 用 文 献	22
Summary	26

緒 論

気候システムの温暖化には疑う余地は無く、地域的な気候変化により植物の生態系や農業生産性に大きな影響を与えると考えられる(IPCC, 2007)。地球温暖化が進むと、生物全般に対して直接的な影響を及ぼす高温や、乾燥などの間接的な影響が顕在化してくると報告されている(環境省 HP, 2012)。その中でも、高温は、植物に対して減収や品質低下といった直接的な負の影響を引き起こすと指摘されている(Lobell and Field, 2007)。これまで、植物に対する地球温暖化の影響と高温耐性付与については、植物生理や遺伝子解析により精力的に研究が進められてきた (Iba, 2002; Sharkey, 2005; Sharkey and Zhang, 2010)。遺伝子解析の面では、高温等の環境ストレスで働く転写因子である *DREB* 遺伝子を改変・導入して高温耐性を付与する研究や(Sakuma et al., 2006)、ヒートショックタンパク質を過剰発現させて高温耐性を付与する研究(Katihar-Agarwal et al., 2003)が行われてきた。このように植物に対して高温耐性を付与できる研究の一つに、葉緑体型 ω -3 fatty acid desaturase (FAD)の働きを抑制し、葉緑体膜におけるトリエン脂肪酸含有量を低下させることで植物体に高温耐性を付与する研究が行われてきた (Murakami et al., 2000; Falcone et al., 2004; Liu et al., 2006; Wang et al., 2006)。しかしながら、トリエン脂肪酸含有量の低下がなぜ高温耐性を付与するのか、といったメカニズムについては明らかにされていなかった。

一方、生体内では、酵素的及び非酵素的な合成経路によりトリエン脂肪酸が過酸化され、非常に多くの代謝産物を生じることが明らかになっている(Esterbauer et al., 1991; Rustérucci et al., 1999; Alméras et al., 2003)。このような代謝産物の中には、 α,β -不飽和カルボニル群や強い細胞毒性を有する物質が含まれている(Esterbauer et al., 1991; Vollenweider et al., 2000; Alméras et al., 2003; Mano et al., 2009)。

そこで、トリエン脂肪酸含有量の低下が、高温耐性形質転換体における細胞毒性物質の生成を減少させているのではないかと仮説を立てた。このようなトリエン脂肪酸代謝産物の中でもアクロレイン(ACR)、メチルビニルケトン(MVK)、4-ヒドロキシ-2-ノネナール(HNE)は、光化学系Ⅱの働きを有意に低下させ、光合成能を下げる事が明らかになっている (Alméras et al., 2003)。また、ACR、(E)-2-ヘキセナール、HNE は、光合成を阻害し、カルビン回路の複合酵素群を不活性化することが明らかになっている(Mano et al., 2009)。さらに、ACR と MVK は、細胞死に関連する防御遺伝子群を活性化し、ACR、MVK 及びマロンジアルデヒド(MDA)については防御関連遺伝子群の発現を強力に誘導する上に、これらの物質を葉に対して長期間被爆させることで葉に障害を発生させることが明らかになっている(Alméras et al., 2003)。これらの既報を踏まえて、ACR、MVK、(E)-2-ヘキセナール、HNE、MDA に着目した。本課題では、まず高温条件下で葉において萎れや褐変などの障害が発生しやすいシクラメン(*Cyclamen persicum* Mill.)を用いてトリエン脂肪酸含有量を低下させた形質転換体を作成し、この形質転換体が高温耐性を獲得できるか評価した。シクラメンを用いた理由としては、将来的な地球温暖化によって、実際に商業生産困難になると予想される点、地中海沿岸地域に自生している野生種の多くが地球温暖化によって絶滅の恐れがある点(Yesson and Culham, 2006)から今後の研究に寄与できるものと考え、シクラメンを対象とした。さらに、高温に弱い栽培種(WT、以下同様)とトリエン脂肪酸含有量を低下させて高温耐性を付与した形質転換体を用いて、

高温条件下における ACR、MVK、(E)-2-ヘキセナール、HNE、MDA の発生活長について分析した。これらの結果からトリエン脂肪酸含有量の低下と植物体への高温耐性付与との関連について明らかにして、今後の高温耐性育種に関する研究に資することを目的に本課題を遂行し、一定の結論が得られたのでここに報告する。

材 料 と 方 法

1) 供試植物と生育条件

形質転換体を作成する材料としては、遺伝的に固定された 2 倍体‘ビクトリア’(*Cyclamen persicum* Mill.)を用いた。また、この 2 倍体‘ビクトリア’については、以降の実験で高温に弱い栽培種 wild type (WT)として用いた。シクラメン由来の葉緑体局在型 ω -3 fatty acid desaturase をコードする遺伝子である *Cyclamen persicum FAD7* (*CpFAD7*)を単離するために 4 倍体‘ビクトリア’を用いた。これらのシクラメン種子については、(有)鹿毛真耕園から購入した。シクラメンにおける流通品種については、Morel Diffusion S.A.S.社、Goldsmith 社、Varinova 社、Schoneveld Twello B.V.社、Syngenta Seeds 社から購入、若しくは分譲していただいた。種子については表面殺菌後、プラントボックス(Magenta vessel GA-7; Sigma-aldrich, USA)に 20ml の容量で作成した塩濃度 1/2 で植物生長剤を含まない Murashige and Skoog (MS) 固形培地上に無菌的に播種した。無菌播種後、温度 20°C、暗黒条件下で発芽するまで養成した。その後、実生については温度 20°C、16 時間日長条件($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)で実験に利用するまで養成した。実生における乾燥耐性と開花期における高温耐性を評価するために、一部の植物体については園芸培土(全農)を入れた直径 15cm のプラスチックポットに播種し、温度 20°C、16 時間日長条件($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)で実験に用いるまで養成した。

2) *Cyclamen persicum FAD7* (*CpFAD7*)の塩基配列決定

ゲノム DNA は、4 倍体‘ビクトリア’の 200 mg の成葉から改変セチルトリメチルアンモニウムブロマイド(CTAB)法により抽出した。シクラメン由来の *CpFAD7* を同定するために、シロイヌナズナから単離されている *FAD7* の塩基配列情報を基に作成したデジェネレートプライマー iF1 (5'-ACDCAYCAYCARAACCAAYGG-3')と iR2 (5'-CTCCAYKCCTYKCCDCKRTACCA-3')を用いた。同定できた *CpFAD7* の塩基配列情報は、DDBJ / EMBL / GenBank databases にアクセッション番号 AB250917 で登録した。

3) RNA 干渉法 (RNAi) によりトリエン脂肪酸含有量を低下させた形質転換体の作出

シクラメン植物体のトリエン脂肪酸含有量を低下させるために、部分的に *CpFAD7* の塩基配列を含む RNA interference (RNAi) ベクターを用いた RNA 干渉法を適用した。具体的には、*CpFAD7* の第 7 エキソンと第 4 イントロンの部分配列を含む DNA 断片をゲノム DNA から Xba-Ex7S (5'-CCCTCTAGAGAATGGAGTTATTTGCGAGGA-3'; *Xba* I site underlined)と Ex7AS-4thint5' (5'-GAGTAATAGGCTCACTGCTTCAATTAAGT-3')の2つのプライマーを用いて単離した。単離した DNA 断片を鋳型として、2つのプライマー、Xba-Ex7S と intron-Eco RI AS (5'-TTAGAATTTCGGAAAACCTAAAATGTTAACAACTTGTGGATCAATTCAGCAAGGGGATGGAGTAATAGGCTCAC-3'; *Eco* RI site underlined)で再度 DNA 断片を増幅した。増幅できた DNA 断片 (Xba I-7th exon-4th intron-Eco RI) については、制限酵素 *Xba* I (TaKaRa, Japan)と制限酵素 *Eco* RI (TaKaRa, Japan)で消化切断し、クローニングベクターの pGEM-7Zf (+) vector (Promega, USA)のマルチクローニングサイトに挿入した。同様の手法で、3つのプライマー、

Sac-Ex7S (5'-GGGGAGCTCGAATGGAGTTATTTGCGAGG-3'; *Sac* I site underlined)、Ex7AS-4thint3' (5'-CTGTTTATTCCTCATGCTTCAATTAAGTGA-3')及び *Eco* RI-intron (5'-TTCCGAATTCTAATGATTTTTTACGTTTTTCTGTTTATTCCTCAG-3'; *Eco* RI site underlined)を用いて増幅した DNA 断片 (*Sac* I-7th exon antisense-4thintron-*Eco* RI)についても制限酵素 *Sac* I (TaKaRa, Japan)と制限酵素 *Eco* RI で消化切断し、クローニングベクターの pGEM-7Zf (+) vector (Promega, USA)のマルチクローニングサイトに挿入した。最終的に、*Xba* I-7th exon-4th intron-*Eco* RI の DNA 断片を含むクローニングベクターから抽出した DNA に対して制限酵素 *Xba* I と制限酵素 *Eco* RI で消化切断することで *Xba* I-7th exon-4th intron-*Eco* RI の DNA 断片を大量に獲得できた。同様に、*Sac* I-7th exon antisense-4thintron-*Eco* RI の DNA 断片を含むクローニングベクターから抽出した DNA に対して制限酵素 *Sac* I と制限酵素 *Eco* RI で消化切断することで *Sac* I-7th exon antisense-4thintron-*Eco* RI の DNA 断片を大量に獲得した。これら2つの DNA 断片を *Eco* RI 切断部位でライゲーションすることで *Xba* I-7th exon-4th intron-7th exon antisense-*Sac* I の DNA 断片を作製した。この *Xba* I-7th exon-4th intron-7th exon antisense-*Sac* I の DNA 断片をバイナリーベクター pBI121 の *Xba* I-*Sac* I のクローニングサイトに挿入した。さらに、効果的に外来遺伝子を発現させ、かつ効率的にシクラメンにおける形質転換体を獲得できるバイナリーベクターに構築するために、元々 pBI121 ベクターに備わっているカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターとネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II (*NPTII*) 遺伝子を、それぞれ Soy CMV noncoding region プロモーターとハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ (*HPT*) 遺伝子に置換した。作製した RNAi ベクターは、アグロバクテリウムツメファシエンスの EHA105 菌株に感染させ、etiolated petiole explants 法 (Aida et al., 1999)を用いて2倍体‘ビクトリア’に形質転換を行った。具体的には、20ml の容量で作成した塩濃度 1/2 で植物生長剤を含まない Murashige and Skoog (MS) 固形培地上に無菌的に播種した2倍体‘ビクトリア’を暗黒条件下で発芽させ、60 日間養成することで黄化葉柄を獲得した。黄化葉柄については、無菌的に 1 cm 長に切断し、これを外植片とした。その後、外植片については、アグロバクテリウム懸濁液中に浸して 30 分間の感染処理を行った後、1.0 ml/l のチジアズロン、0.1 ml/l の 2,4-D、100 μ M のアセトシリンゴンを含む MS 固形培地に移植した。この外植片を暗黒条件下で 20°C、7 日間培養することで形質転換を促した。その後、抗生物質である 10 mg/l のハイグロマイシンと 10 mg/l のメロペネムを含む MS 固形培地 (選択培地) に外植片を移植し、暗黒条件下で 20°C、60 日間培養してハイグロマイシン耐性カルスの選抜を行った。なお、選択培地については2週間毎に交換・継代を行った。得られたハイグロマイシン耐性カルスについては、塩濃度を 1/2 に除して植物生育調節剤を含まない MS 固形培地に移植後、20°C、16 時間日長条件 (70 μ mol m⁻² sec⁻¹) 下でシュートの再生を行った。形質転換植物体については、採種目的で開花期まで生育させるために園芸培土を入れたプラスチックポットに鉢上げして、開花期まで 20°C、16 時間日長条件 (70 μ mol m⁻² sec⁻¹) 下で養成した。高温耐性、乾燥耐性及びトリエン脂肪酸由来代謝産物の発消長を評価・分析するために、形質転換体2系統の次世代種子を獲得する目的で、形質転換体の雌蕊に対して、WT 植物体の花粉を人工授粉させた。獲得できたそれぞれの分離集団のうち、ガスクロマトグラフィーでトリエン脂肪酸含有量が低い個体を選び、各々を形質転換体 T15 及び T31 として評価・分析に用いた。

4) 遺伝子発現解析

シクラメン植物体の成葉、塊茎、根から抽出した 10 µg のトータル RNA を用いて *CpFAD7* の遺伝子発現解析を行った。抽出したトータル RNA は、変性アガロースゲル(ゲル濃度 1 %)で電気泳動を行い画分化し、positively charged nylon membrane (Roche Applied Science, Germany) に 20 × SSC 水溶液でブロッティングした。一方、葉から抽出したトータル RNA は Oligotex™-dT30<Super> mRNA purification kit (TaKaRa, Japan)を用いて mRNA へと精製し、SuperScript™ Choice System for cDNA Synthesis (Invitrogen, USA)を用いて cDNA を合成した。*CpFAD7* の遺伝子発現解析に用いる *CpFAD7* cDNA は、先に合成した cDNA からフォワードプライマー (5' -GCCCCTCTCCAGAATCTACC-3') とリバースプライマー (5' -GGGATCTGAGGGAATAGATGG-3')を用いて増幅し、pGEM-T ベクター (Promega, USA)にライゲーションした。このベクターDNAを鋳型にしてPCR DIG Probe Synthesis kit (Roche Applied Science, Germany)を用いて DIG 標識の *CpFAD7* プローブを合成した。なお、ノーザンハイブリダイゼーションの方法については、Roche Applied Science 社のプロトコールに従って行った。

5) 脂肪酸分析

シクラメンの成葉における脂肪酸組成については、Kodama et al. (1994) の論文に基づきガスクロマトグラフィーを用いて分析を行った。分析については、独立した個体から 3 反復で採取した 4.0 x 4.0 cm 程度の成葉 1 枚を用いて行った。

6) 高温及び乾燥ストレス処理

高温処理については、MS 固形培地で養成した植物体、若しくは園芸培土を詰めたプラスチックポットで養成した植物体について Murakami et al. (2000) の方法を一部改変し、38°C、24 時間日長条件(70 µmol m⁻² s⁻¹)で行った。高温耐性における統計学的な評価を行うために、Zhang et al. (2005)の方法を参考に評価した。具体的には、わずかでも萎れや褐変が認められた葉を被害葉として判定し、成葉 5 枚を有する 1 個体につき 2 枚以上の被害葉を呈する個体を被害株として算出した。この高温耐性評価は、6 個体における試験を 3 反復で行った。

乾燥耐性については、園芸培土を詰めたプラスチックポットに植物体を播種後、3 日毎に灌水(通常の灌水条件)して 6 か月養成させ、成葉が 4~5 枚に達した植物体を用いて評価した。乾燥処理については、18 日間の灌水中断を行い、その後通常の灌水条件に戻した。乾燥耐性評価としては、乾燥処理を開始して 12 日後における全葉数あたりの萎れ葉数の割合で算出した。この評価は、6 個体における試験を 3 反復で行った。また、被害程度を確認するために、乾燥処理前、灌水中断 18 日後及び灌水再開 14 日後に葉の萎れ等、達観による調査を行った。

7) トリエン脂肪酸由来物質の測定

トリエン脂肪酸由来物質は、成葉から抽出し、Deighton et al., (1999)の方法により誘導体化を行った。高温処理後の植物体から切除した成葉と ACR 及び MVK による浸漬処理を行った切除

葉を用いて分析を行った。成葉サンプル(1 g)は、液体窒素を用いて破碎して、その後 0.005% butylated hydroxytoluene を含む 5 ml のメタノールを加えて混和した。このサンプルについて遠心分離(10 min, 500 g, 4°C)を行い、上清のうち 3 ml を新しい 50 ml コニカルチューブに移し、350 mg/l 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)を含む 5 ml の 1 M HCl 水溶液を加えた。その後、30 分間、20°C 条件で誘導体化反応を促した。反応後、誘導体化したトリエン脂肪酸由来物質は、5 ml のジクロロメタンを 2 回混和・回収して抽出した。この抽出物は室温条件下で乾燥させた後、400 μ l のアセトニトリルで溶解して分析に用いた。調製した ACR-DNPH の濃度は、Grosjean et al., (1999) の手法に基づき液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC-MS) で測定した。なお、ACR-DNPH の分子量は、標品 ACR(Sigma-Aldrich, USA)を用いた測定によって算出し、成葉サンプル中の ACR 濃度は、標品との比較によって決定した。MVK-DNPH、(E)-2-ヘキセナール-DNPH、HNE-DNPH は、高速流体クロマトグラフィー(逆位相)によって 360 nm の吸光度より測定した。一方、MDA-DNPH については、Korchazhkina et al., (2003) の手法に基づき 307 nm の吸光度より決定した。MVK-DNPH、(E)-2-ヘキセナール-DNPH、HNE-DNPH の濃度算出には、それぞれの標品 (Sigma-Aldrich) を誘導体化した誘導体化物の測定を基に行った。また、MDA-DNPH については、1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane(Sigma-Aldrich)から調製した MDA を用い、誘導体化後、測定値を基に濃度の算出を行った。これらの測定は、それぞれ 3 個体の植物体から採取した成葉を用いて測定した。

8) 葉に対するトリエン脂肪酸由来物質を用いた浸漬実験の効果

ACR と MVK の葉内濃度が高温ストレスによって引き起こされる高温障害に関係しているか調べるために、WT の成葉に対して ACR と MVK を用いた浸漬実験を実施した。1 枚の WT の切除葉(約 4.0 x 4.0 cm)を葉の裏面を液面に接するように滅菌水 (water-infiltrated)、5 ppm の ACR 水溶液及び 50 ppm の MVK 水溶液に 20°C、16 時間日長条件($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)で浮かべて容器を密封して浸漬実験を行った。浸漬処理の期間は、ACR で 3 日間、MVK で 2 日間とした。浸漬処理後は、各サンプルを 1L の蒸留水で 3 回洗浄して、表面に残存する水溶液を十分に除去した。その後、浸漬後の成葉サンプルは前述の方法によって ACR と MVK の含有量を測定した。この浸漬実験及び測定については、3 個体それぞれから成葉 1 枚(約 4.0 x 4.0 cm)をサンプルとして行った。

結 果

1) トリエン脂肪酸含有量を低下させた形質転換シクラメンの作出

シクラメンの葉におけるトリエン脂肪酸を抑制するために、シロイヌナズナのデサチュラーゼ遺伝子 *FAD7* の塩基配列情報を基に設計したデジェネレートプライマー (Iba et al., 1993) を用いてシクラメンのデサチュラーゼ酵素をコードする遺伝子 *CpFAD7* (Accession number: AB250917) を同定した (Fig. 1A)。*CpFAD7* の塩基配列数は 3,939 bp で、そのうち 435 個のアミノ酸をコードする 1,305 bp の ORF 領域が存在していた。*CpFAD7* の第 1 エキソンには、シロイヌナズナ由来のデサチュラーゼ酵素における膜輸送ペプチドをコードする領域と高い相同性が認められる領域が存在していた。また、遺伝子発現解析の結果、WT における内在性 *CpFAD7* mRNA は、葉で発現され、葉緑体が存在しない塊茎や根では発現が認められなかった (Fig. 1B、左図)。これらの結果から、同定できた *CpFAD7* は、シクラメンの葉緑体型デサチュラーゼをコードする遺伝子であると考えられた。構築した RNAi ベクターを導入した形質転換体のうち、2 つの形質転換体 (T15 及び T31) については内在性 *CpFAD7* の遺伝子発現が効果的に抑制されていた (Fig. 1B、右図)。WT の葉における脂肪酸組成を測定した結果、16:0 が 16.7mol%、18:0 が 2.9mol%、18:1 が 6.0mol%、18:2 (ジェン脂肪酸) が 22.2mol%、18:3 (トリエン脂肪酸) が 52.0mol% であった (Fig. 1C)。一方、T15 及び T31 におけるトリエン脂肪酸含有量は、*CpFAD7* の遺伝子発現抑制に伴い、WT における約 52 mol% から約 2 mol% まで劇的に低下していた。このトリエン脂肪酸含有量の低下に伴って、トリエン脂肪酸の基質であるジェン脂肪酸含有量は、WT における約 22mol% から約 71mol% へと大幅に増加していた (Fig. 1C)。

2) トリエン脂肪酸含有量を低下させた形質転換シクラメンの高温耐性

トリエン脂肪酸含有量が低下した形質転換体について、高温耐性評価を実施するにあたり、プラントボックスで養成したシクラメンについて高温耐性を評価した既報は無いことから、まずプラントボックスで養成したシクラメンについて高温耐性を評価する条件設定を行った。本葉が 5 枚程度に生長した WT の個体について、32°C、35°C、38°C 及び 41°C の温度条件で最大 21 日間の高温処理を、24 時間日長条件 ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) で行った (Fig. 2)。32°C 及び 35°C の温度条件では、7 日間の高温処理で高温障害が発生したもの、葉における高温障害が判定しづらく、長期間における高温処理で固形培地の乾燥による障害が著しく認められ、純粋な高温障害を判定するのが困難であった。一方、41°C の温度条件では、わずか 2 日間で完全に枯死することから高温耐性の評価が困難であった。38°C の温度条件では、2 日間の高温処理から葉において明らかな萎れや褐変といった判定が容易な高温障害が発生し、5 日間の高温処理で全ての葉において高温障害が認められ、固形培地の乾燥などは認められなかった。これらの結果から、プラントボックスで養成したシクラメンにおける高温耐性評価条件としては、38°C、5 日間、24 時間日長条件が最適な条件であった。この条件で、WT、T15 及び T31 について高温耐性を評価した結果、WT では 2 日間の高温処理から葉における高温障害が発生し始め、5 日間で全ての葉において高温障害が認められた。一方、T15 及び T31 においては、高温処理期間を通して高温障害の発生が WT より軽微であり、5 日間の高温処理でも WT の半分以下の高温障害発生程度であった (Fig. 3A, B)。

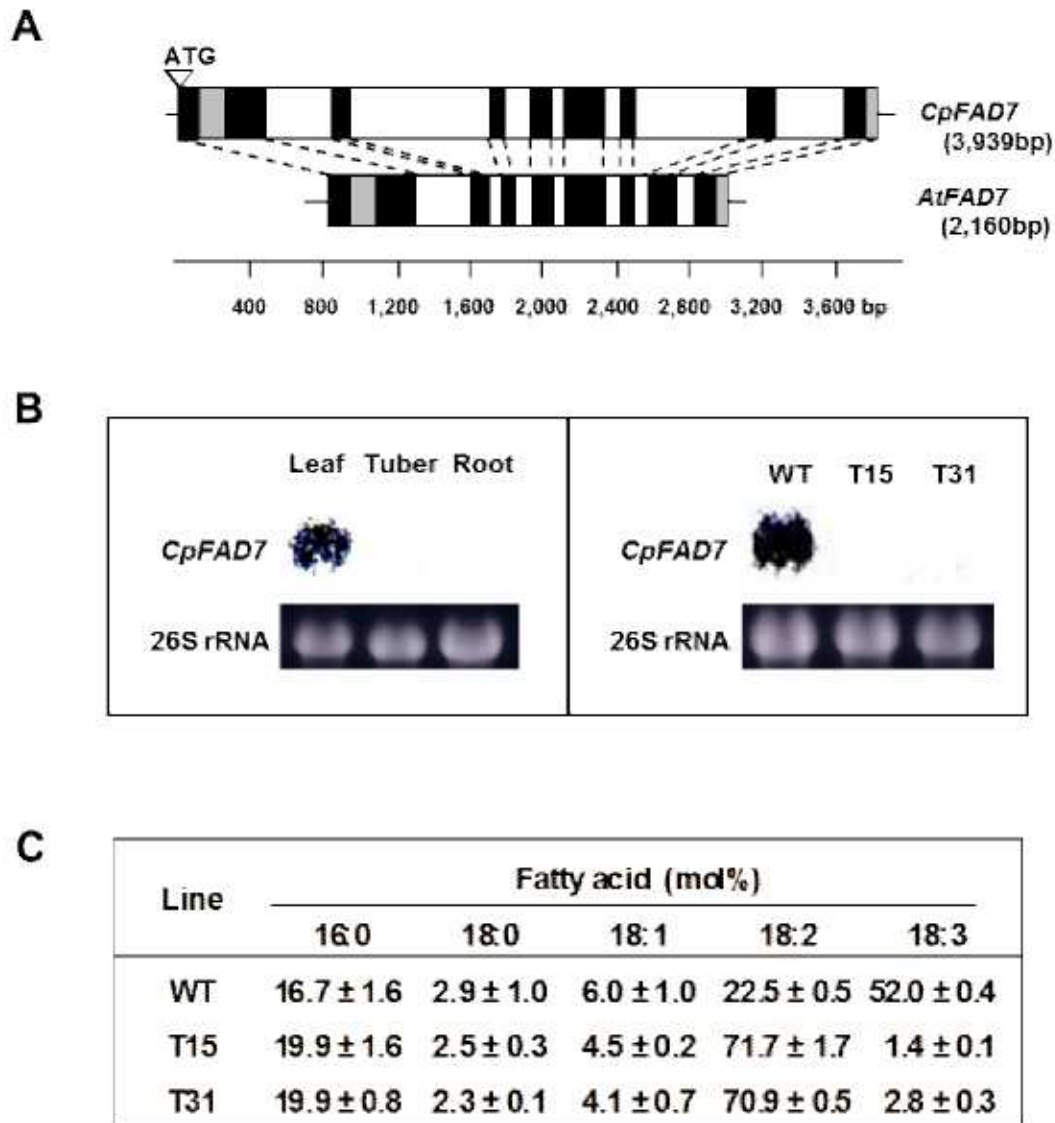


Fig. 1. トリエン脂肪酸含有量を低下させた形質転換シクラメンの作出

(A) *CpFAD7* 及び *AtFAD7* 遺伝子構造の比較

白色はイントロン、黒色はエキソン領域を示す。灰色は、両遺伝子間で相同性が低い領域を示す。

(B) WT 及び形質転換体 (T15 及び T31) における *CpFAD7* 遺伝子発現

左図: WT の葉、塊茎、根における *CpFAD7* 遺伝子発現。 右図: WT、T15、T31 の葉における *CpFAD7* 遺伝子発現。 各プロット共にプローブは全長 *CpFAD7* cDNA を用いた。各図の下段は 26S rRNA のエチジウムブロマイド染色図。

(C) WT 及び形質転換体における脂肪酸組成

値は平均値 ± 標準偏差 (n = 3)。植物体は、1/2 MS 培地上で本葉 4-5 枚まで 20℃、16 時間日長条件 ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で養成した個体を供試した。

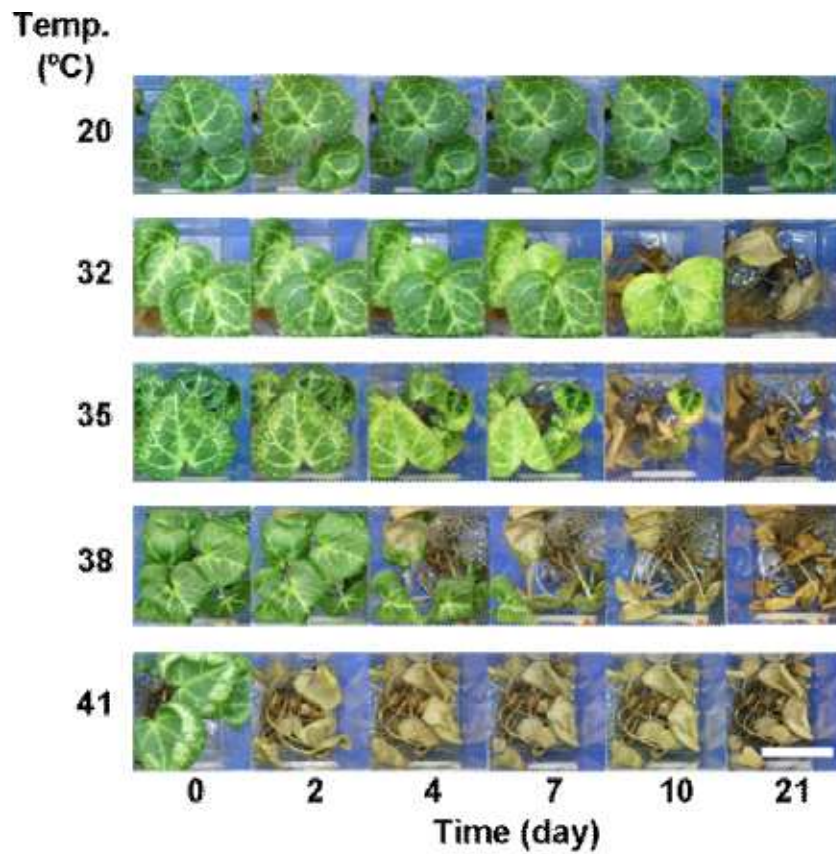


Fig. 2. シクラメン(WT)における高温耐性評価条件の確立

植物体は、1/2 MS培地上で本葉 4-5 枚まで 20℃、16 時間日長条件 ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で養成した個体を供試した。処理条件として、温度を 20、32、35、38、41℃とし、24 時間日長条件($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)で 21 日間まで評価した。Bar は、5 cm を示す。

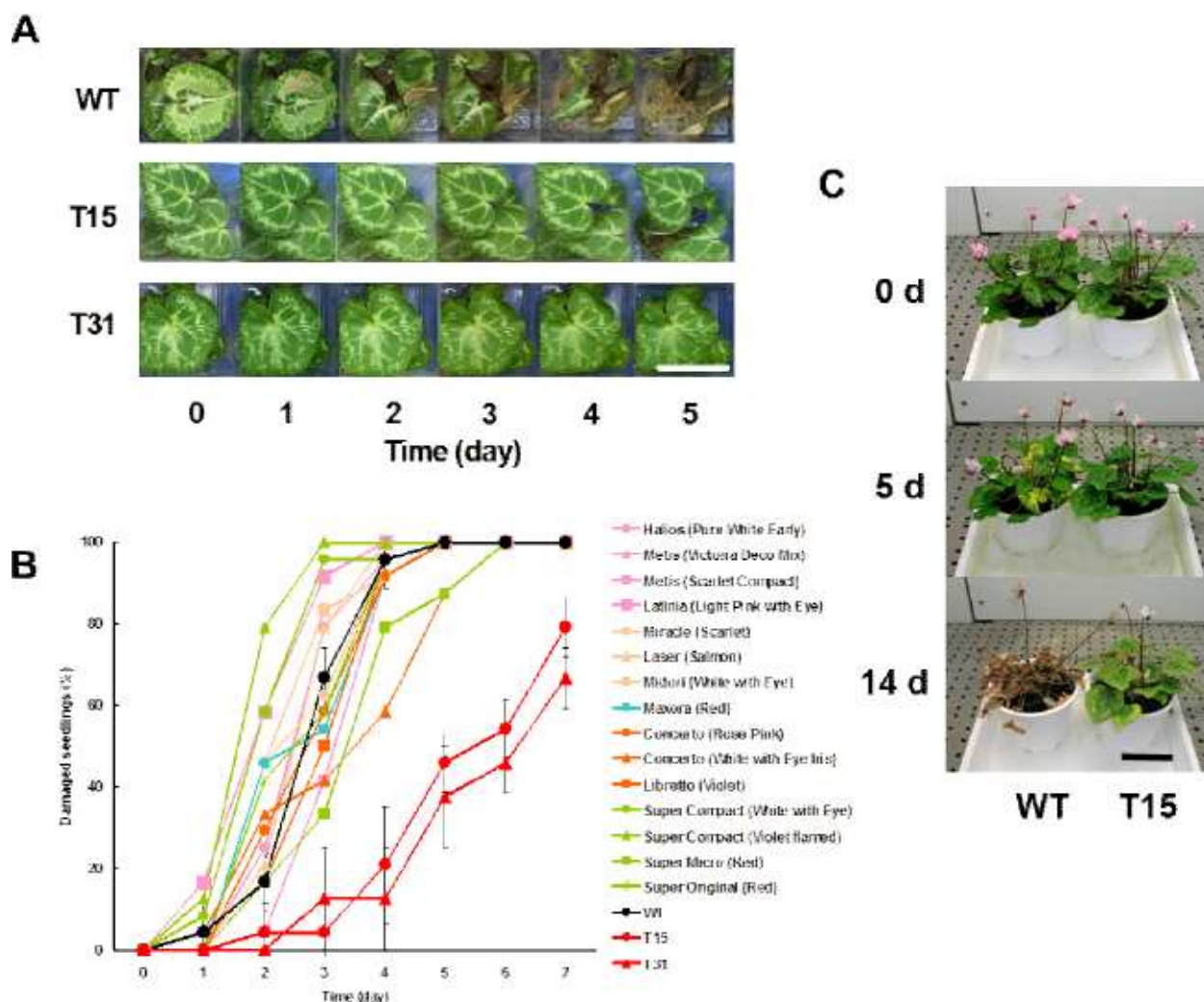


Fig. 3. トリエン脂肪酸含有量を低下させた形質転換体の高温耐性

植物体は、A 及び B については 1/2 MS 培地上で本葉 4-5 枚まで、C については園芸培土で本葉 20-25 枚程度の開花期ステージになるまで、それぞれ 20℃、16 時間日長条件 ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で養成した個体を供試した。

(A) WT 及び形質転換体における高温障害発生の様子

高温処理は 38℃、24 時間日長条件で毎日観察を行った。Bar は、5 cm を示す。

(B) 流通品種、WT 及び形質転換体における高温耐性

ピンク: Morel Diffusion S.A.S.、薄いオレンジ色: Goldsmith、青色: Varinova、オレンジ色: Syngenta Seeds、薄い緑色: Schoneveld Twello B.V.、黒色: WT、赤色: 形質転換体を示す。各品種・系統について 6 個体の 3 反復で評価した。評価方法としては、わずかでも萎れまたは褐変の発生した葉を被害葉とし、1 個体あたりに被害葉が 2 枚以上の個体を被害株としては判定した。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n = 3$)。

(C) 開花期における WT と形質転換体の高温耐性

写真は高温処理 (38℃、24 時間日長条件) 開始時 (0d)、5 日間処理及び 14 日間処理における様子。Bar は、10 cm を示す。

Table 1. 流通品種、WT 及び形質転換体における高温耐性

植物体は、1/2 MS 培地上で本葉 4-5 枚まで、20℃、16 時間日長条件 ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で養成した個体を供試した。その後、38℃、24 時間日長条件で 7 日間の高温処理を行った。評価方法としては、わずかでも萎れまたは褐変の発生した葉を被害葉とし、1 個体あたりに被害葉が 2 枚以上の個体を被害株としては判定した。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n = 3$)。

Cultivar	Breeder	Time (days)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
'Halios Pure White Early'	MOREL DIFFUSION S.A.S.	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	25.0 $\pm$ 12.5	79.2 $\pm$ 7.2	95.8 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Metis Victoria Deco Mix'	MOREL DIFFUSION S.A.S.	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	45.8 $\pm$ 7.2	83.3 $\pm$ 7.2	91.7 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Metis Scarlet Compact'	MOREL DIFFUSION S.A.S.	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	4.2 $\pm$ 7.2	41.7 $\pm$ 7.2	91.7 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Latinia Light Pink with Eye'	MOREL DIFFUSION S.A.S.	0.0 $\pm$ 0.0	16.7 $\pm$ 14.4	58.3 $\pm$ 19.1	91.7 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Miracle Scarlet'	Goldsmith	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	45.8 $\pm$ 7.2	62.5 $\pm$ 12.5	95.8 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Laser Salmon'	Goldsmith	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	20.8 $\pm$ 7.2	79.2 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Midori White with Eye'	Goldsmith	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	45.8 $\pm$ 7.2	83.3 $\pm$ 7.2	91.7 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Maxora Red'	VARINOVA	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	45.8 $\pm$ 7.2	54.2 $\pm$ 7.2	91.7 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Concerto Rose Pink'	Syngenta seeds	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	29.2 $\pm$ 7.2	58.3 $\pm$ 7.2	91.7 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Concerto White with Eye Iris'	Syngenta seeds	0.0 $\pm$ 0.0	4.2 $\pm$ 7.2	33.3 $\pm$ 7.2	41.7 $\pm$ 7.2	58.3 $\pm$ 19.1	87.5 $\pm$ 12.5	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Libretto Violet'	Syngenta seeds	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	16.7 $\pm$ 7.2	50.0 $\pm$ 12.5	95.8 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Super Compact White with Eye'	Schoneveld Twello b.v.	0.0 $\pm$ 0.0	8.3 $\pm$ 7.2	58.3 $\pm$ 14.4	95.8 $\pm$ 7.2	95.8 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Super Compact Violet flamed'	Schoneveld Twello b.v.	0.0 $\pm$ 0.0	12.5 $\pm$ 12.5	79.2 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Super Micro Red'	Schoneveld Twello b.v.	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	16.7 $\pm$ 7.2	33.3 $\pm$ 7.2	79.2 $\pm$ 7.2	87.5 $\pm$ 12.5	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
'Super Original Red'	Schoneveld Twello b.v.	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	41.7 $\pm$ 7.2	58.3 $\pm$ 7.2	95.8 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
WT		0.0 $\pm$ 0.0	4.2 $\pm$ 7.2	16.7 $\pm$ 7.2	66.7 $\pm$ 7.2	95.8 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0.0
T15		0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	4.2 $\pm$ 7.2	4.2 $\pm$ 7.2	20.8 $\pm$ 14.4	45.8 $\pm$ 7.2	64.2 $\pm$ 7.2	79.2 $\pm$ 7.2
T31		0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	12.5 $\pm$ 12.5	12.5 $\pm$ 12.5	37.5 $\pm$ 12.5	45.8 $\pm$ 7.2	66.7 $\pm$ 7.2

and Table 1)。また、市場で流通している 15 品種の高温耐性と比較した結果、これら 15 品種のトリエン脂肪酸含有量は 45.9 mol%-59.7 mol%WT と幅があったものの、高温耐性については WT と同程度であった (Fig. 3B、Tables 1 及び 2)。これらの結果から、形質転換体 T15 及び T31 の高温耐性は、WT と比較して改良されており、シクラメンにおいてもトリエン脂肪酸含有量を低下させることで高温耐性を付与できることが明らかになった。さらに、T15 系統の開花ステージにおける高温耐性を評価した結果、WT と比較して明らかに高温耐性を獲得していることが明らかになった (Fig. 3C)。

3) 高温ストレスを受けた葉におけるトリエン脂肪酸由来物質の変化

トリエン脂肪酸は、酵素的あるいは非酵素的な代謝経路を経て、さまざまな代謝産物を生成する。その中には細胞毒性を有する α,β -不飽和カルボニル群も含まれる。このようなトリエン脂肪酸由来の代謝産物の中でも ACR、MVK、(E)-2-ヘキセナール、HNE、MDA は、光合成阻害作用やカルビン回路における酵素群の不活化、長期被爆による葉に対する障害作用を引き起こすことが知られている。そこで、WT 及び高温耐性を獲得した低トリエン脂肪酸含有量の形質転換体について、高温ストレス条件下における ACR、MVK、(E)-2-ヘキセナール、HNE 及び MDA の葉内濃度について発生活長を測定した (Fig. 4A)。ACR については、高温処理 2 日間までは WT 及び形質転換体共に、葉内濃度の上昇は認められなかった。しかしながら、WT については、その後葉内濃度が上昇したにもかかわらず、形質転換体については葉内濃度の上昇は認められなかった (Fig. 4A)。MVK については、ACR と同様に高温処理期間が長くなるにつれて、WT では葉内濃度が上昇したものの、形質転換体では葉内濃度の上昇は認められなかった。このような WT 及び形質転換体における ACR と MVK の葉内濃度の発生活長は、葉における高温障害の発生活長と一致していた (Fig. 3B 参照)。一方、(E)-2-ヘキセナールについては、WT において高温処理 1~2 日間のごく短期間で一過的に葉内濃度が上昇したものの、その後速やかに葉内濃度は低下した。このような葉内濃度の変化は形質転換体では認められなかった (Fig. 4A)。また、HNE 及び MDA については、WT 及び形質転換体共に類似した発生活長を示し、高温障害の発生活長とは一致しない変動を示した (Fig. 4A)。これらの結果から、測定した物質の中では、ACR 及び MVK が高温ストレス条件下における高温障害の発生に関連があるものと考えられた。

4) 葉に対する ACR 及び MVK の作用

先の結果から、ACR と MVK の葉内濃度の上昇が、葉における高温障害に関連があるのではないかと考えた。そこで、通常の生育条件 (20°C、16 時間日長条件) で WT の葉に対して ACR 及び MVK を浸漬処理することで、通常の温度条件でも高温障害が再現できるか調査した。通常の生育条件における ACR 及び MVK の葉内濃度は、それぞれ $9.9 \text{ ng g}^{-1} \text{ FW}$ and $0.1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ であった (Fig. 4B)。また、38°C、5 日間の高温処理によって葉に高温障害が発生した時点での ACR 及び MVK の葉内濃度は、それぞれ $63.0 \text{ ng g}^{-1} \text{ FW}$ 及び $6.9 \text{ } \mu\text{g g}^{-1} \text{ FW}$ まで蓄積していた (Fig. 4B)。高温障害が発生した葉内濃度になるまで ACR 及び MVK を外部から切除葉に浸漬させる条件を検討した結果、ACR については 5 ppm の ACR 水溶液で切除葉に対して 3 日間の浸漬処理を行うと、葉内濃度が $69.7 \text{ ng g}^{-1} \text{ FW}$ まで上昇した (Fig. 4B 左図)。同様に、50 ppm の MVK

Table 2. 流通品種の葉における脂肪酸組成

植物体は、1/2 MS 培地上で本葉 4-5 枚まで、20℃、16 時間日長条件 ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で養成した個体を供試した。成葉 1 枚 (約 4.0 x 4.0 cm) を、ガスクロマトグラフィーを用いて分析した。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n = 3)。

Cultivar	Fatty acid (mol%)				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
'Halios Pure White Early'	20.4 $\pm$ 0.7	5.4 $\pm$ 3.2	4.5 $\pm$ 0.4	15.5 $\pm$ 1.1	54.2 $\pm$ 2.2
'Metis Victoria Deco Mix'	21.5 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.0	6.6 $\pm$ 0.2	16.2 $\pm$ 0.8	53.0 $\pm$ 1.0
'Metis Scarlet Compact'	18.7 $\pm$ 0.7	3.4 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.2	15.1 $\pm$ 1.2	59.5 $\pm$ 2.2
'Latinia Light Pink with Eye'	20.9 $\pm$ 4.1	3.0 $\pm$ 0.1	19.4 $\pm$ 4.1	10.9 $\pm$ 1.3	45.9 $\pm$ 7.2
'Miracle Scarlet'	17.3 $\pm$ 0.5	3.7 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.2	14.6 $\pm$ 1.5	59.7 $\pm$ 1.4
'Laser Salmon'	19.4 $\pm$ 1.0	3.0 $\pm$ 0.3	5.0 $\pm$ 0.3	13.2 $\pm$ 0.2	59.3 $\pm$ 0.6
'Midori White with Eye'	21.3 $\pm$ 0.7	3.5 $\pm$ 1.0	6.3 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.9	56.9 $\pm$ 0.7
'Maxora Red'	18.9 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 0.5	17.2 $\pm$ 1.6	55.8 $\pm$ 1.1
'Concerto Rose Pink'	18.7 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 1.0	14.1 $\pm$ 1.2	58.4 $\pm$ 1.6
'Concerto White with Eye Iris'	19.8 $\pm$ 0.7	3.1 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.9	18.6 $\pm$ 0.5	51.4 $\pm$ 1.4
'Libretto Violet'	20.4 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.6	13.0 $\pm$ 0.9	59.3 $\pm$ 0.9
'Super Compact White with Eye'	19.7 $\pm$ 1.5	3.6 $\pm$ 0.3	9.4 $\pm$ 0.1	13.1 $\pm$ 1.0	54.3 $\pm$ 0.3
'Super Compact Violet flamed'	18.4 $\pm$ 0.7	3.1 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 0.3	18.2 $\pm$ 0.4	55.7 $\pm$ 0.8
'Super Micro Red'	19.0 $\pm$ 0.8	1.9 $\pm$ 0.1	9.8 $\pm$ 1.7	16.3 $\pm$ 1.0	53.0 $\pm$ 0.7
'Super Original Red'	19.3 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.0	9.7 $\pm$ 0.8	14.0 $\pm$ 0.4	54.4 $\pm$ 0.8

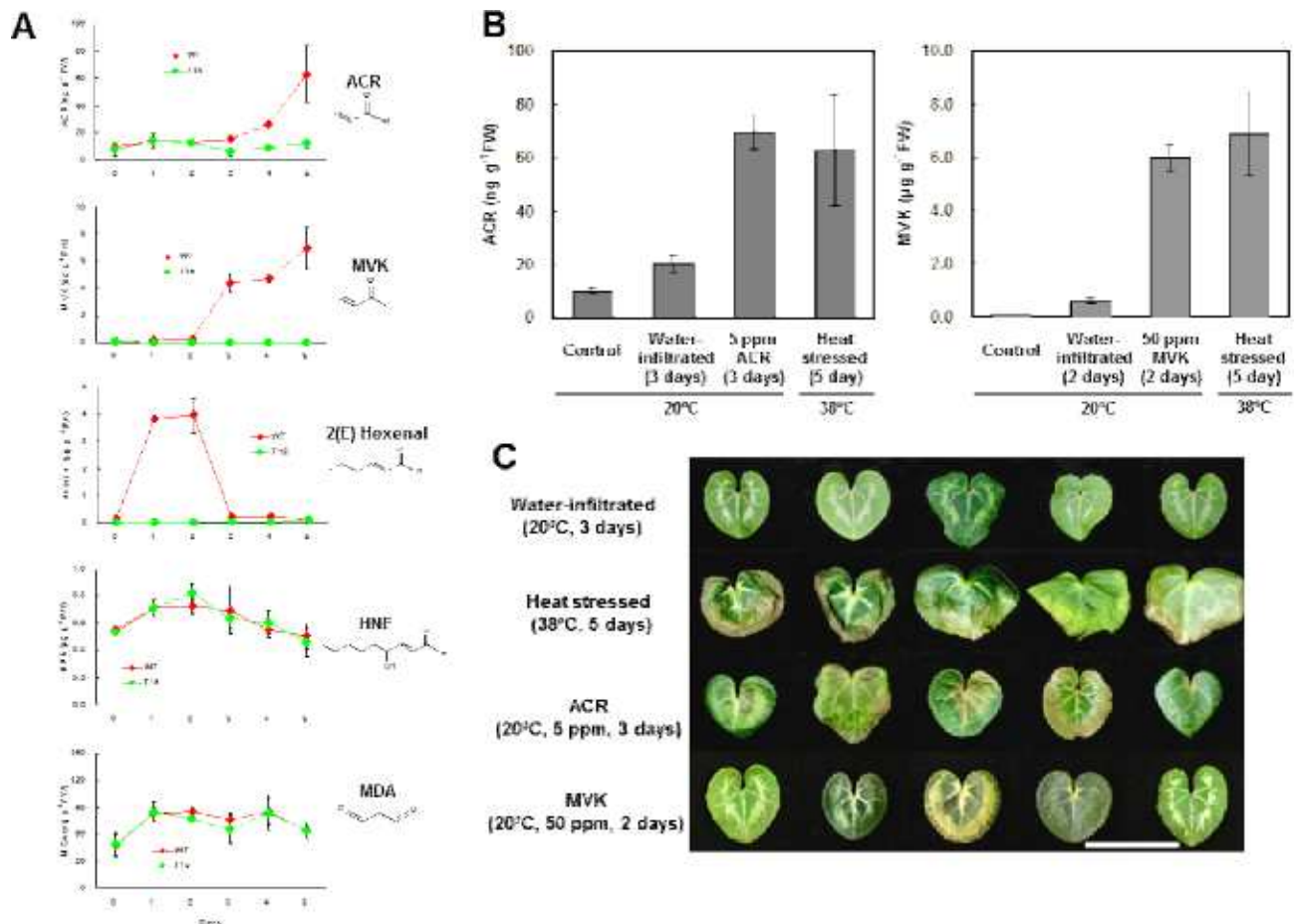


Fig. 4. 高温処理によるトリエン脂肪酸派生物質の発消長と高温障害への影響
植物体は、1/2 MS 培地上で本葉 4-5 枚まで 20℃、16 時間日長条件 ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
で養成した個体を供試した。

(A) 高温ストレス条件下での WT と T15 における毒性物質の変動

ACR:アクロレイン、MVK:メチルビニルケトン、2(E)-Hexenal:(E)-2-ヘキセナール、HNE:4-ヒドロキシ-2-ノネナール、MDA:マロンジアルデヒド。

値は平均値 ± 標準偏差(n = 3)。

(B) 対照区、蒸留水浸漬区、高温処理区 (38℃、5 日間)、ACR 及び MVK 浸漬葉区における ACR と MVK の葉内濃度

Control:対照区(通常の養成条件下)、Water-infiltrated:蒸留水浸漬区。

浸漬処理は、WT の切除葉に対して、ACR が 5 ppm の 3 日間、MVK が 50 ppm の 2 日間で 20℃、16 時間日長条件で行った。値は平均値 ± 標準偏差(n = 3)。

(C) WT の葉に対する高温処理、蒸留水浸漬処理、ACR 及び MVK 浸漬処理による障害発生の進展

浸漬条件は、(B)と同様。Bar は、5 cm を示す。

水溶液で切除葉に対して2日間の浸漬処理を行うと、葉内濃度が $6.0 \mu\text{g g}^{-1}$ FW まで上昇した (Fig. 4B 右図)。一方、切除葉を蒸留水で浸漬処理を行うと、3日間の処理で ACR の葉内濃度は 20.5 ng g^{-1} FW に、また2日間の処理で MVK の葉内濃度は $0.6 \mu\text{g g}^{-1}$ FW であった (Fig. 4B)。ACR 及び MVK を前述の浸漬条件で処理した葉では、高温処理で発生した葉の萎れや褐変などの高温障害と類似した障害が認められたが、蒸留水による浸漬処理では、葉における障害は認められなかった (Fig. 4C)。これらの結果から、高温処理によって ACR 及び MVK の葉内濃度が蓄積することによって葉の萎れや褐変などの障害が発生するものと考えられた。

5) 形質転換シクラメンにおける乾燥耐性

タバコでは、葉緑体膜のトリエン脂肪酸含有量を低下させると乾燥耐性が低下するといった報告がある (Im et al., 2002)。本報では高温耐性について研究を進め、高温耐性を付与できたものの、乾燥耐性が低下しては将来的に実用段階で問題が発生する可能性がある。そこで、高温耐性を獲得した形質転換体について乾燥耐性の評価を行った。通常の灌水条件 (3 日毎に灌水) から灌水を中止して12日後の WT 及び T15 における全葉数当たり萎れ葉数の割合で乾燥耐性を評価した。その結果、わずかに T15 における萎れ葉率が高かったものの、統計的な有意差は認められず、乾燥耐性の低下は無かった (Fig. 5A)。さらに、18日間の灌水中断後、通常の灌水条件に戻して12日後の WT 及び T15 の回復程度を達観調査した結果、差は認められなかった (Fig. 5B)。これらの結果から、トリエン脂肪酸含有量を低下させた形質転換シクラメンにおいては、乾燥耐性の低下は認められないことが明らかになった。

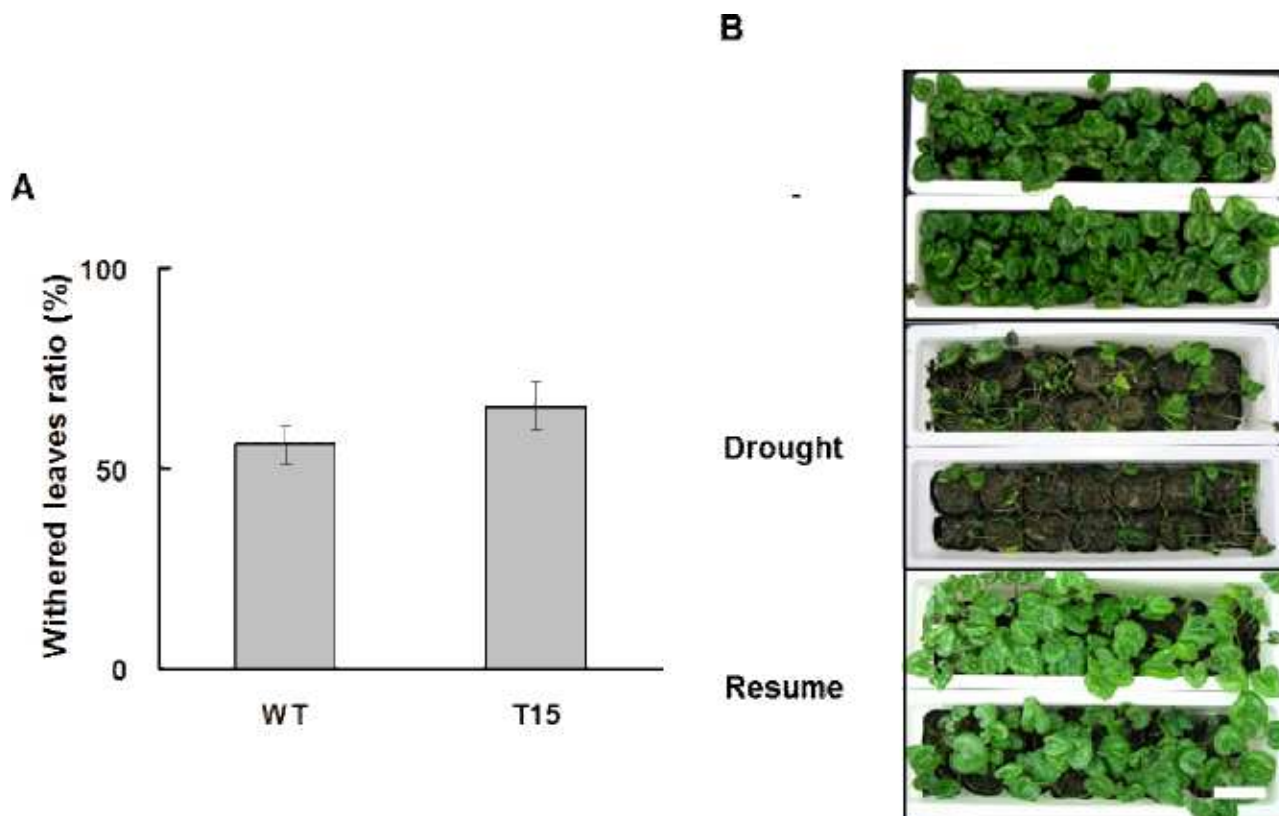


Fig. 5. WT と形質転換体の乾燥耐性

植物体は、園芸培土を入れたポリポットで本葉 4-5 枚まで 20℃、16 時間日長条件 ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で養成した個体を供試した。

(A) WT 及び形質転換体における乾燥耐性

乾燥耐性の統計的な評価を行うために、通常灌水から 12 日間の灌水中断を実施し、全葉数あたりの萎れ葉の割合で評価した。値は、平均値 $\pm$ 標準偏差(n=3)。

(B) 灌水条件の違いによる WT 及び形質転換体の乾燥耐性

WT と T15 の植物体における通常灌水時 (-)、18 日間の灌水中断(Drought)、灌水再開 14 日後(Resume)の様子

Bar は、10 cm を示す。

考 察

1) トリエン脂肪酸含有量を低下させた形質転換シクラメンの高温耐性

本研究では、高等植物におけるトリエン脂肪酸含有量の低下と高温耐性との関係について明らかにするために、トリエン脂肪酸含有量を低下させた形質転換シクラメンを作出し、高温条件下におけるトリエン脂肪酸由来の物質について分析を行った。シクラメンにおける内在性の *CpFAD7* の遺伝子発現を抑制することで、トリエン脂肪酸含有量を約 50 mol% から 3 mol% 未満まで低下させ、それに伴いトリエン脂肪酸の基質であるジエン脂肪酸含有量を約 20 mol% から約 70 mol% まで増加した形質転換体を作成した (Fig. 1)。ジエン脂肪酸含有量とトリエン脂肪酸含有量の比 (DA/TA) でみると、WT では 0.5 未満であるのに対し、T15 では約 50、T31 では約 25 と形質転換体では劇的に組成比を変化させることに成功した。タバコにおける同様の実験では、WT の DA/TA が 0.1 に対して、シロイヌナズナ由来の *AtFAD7* によるジーンサイレンシング効果で作出した 2 系統の形質転換タバコの DA/TA は、それぞれ 1.5 と 2.2 であった (Murakami et al., 2000)。同様に、トマトを用いた実験をみると、WT の DA/TA が 0.5 に対して、アンチセンス *LeFAD7* による形質転換トマト 2 系統の DA/TA は、それぞれ 2.8 と 1.2 であった (Liu et al., 2006)。このような類似の実験と比較して、本研究で作出した形質転換シクラメンにおける高い DA/TA は、シクラメンに特有な脂質生合成経路の特性からか、内在性 *CpFAD7* の効果的な抑制からか、若しくはその両方が関係しているものと推測される。一方、シロイヌナズナにおける *fad3fad7fad8* のトリエン脂肪酸完全欠失変異体では、光合成活性の低下や高温条件下での生育遅延などが認められている。このような、トリエン脂肪酸完全欠失変異体における生育阻害は、トリエン脂肪酸由来のジャスモン酸やそのような代謝産物の欠失及び減少により引き起こされているとの報告がある (Routaboul and Browse, 2002; Wallis and Browse, 2002)。しかし、形質転換シクラメンにおけるトリエン脂肪酸含有量は、完全欠失ではなく 1.4~2.8 mol% 残存している。このように残存しているトリエン脂肪酸が、高温条件下での生存に不可欠なトリエン脂肪酸代謝産物の供給源となることで高温耐性の付与に成功したと考えられる。さらに、トリエン脂肪酸由来のジャスモン酸は、生物的若しくは非生物学的なストレスに対する植物の防御反応に不可欠であり (McConn et al., 1997; Tuteja and Sopory, 2008)、同時に葯の発達や花粉の成熟過程にも必須な物質であると報告されている (McConn and Browse, 1996)。今回の形質転換シクラメンにおいては、活性のある花粉が認められ、不適環境下でも通常に生育したことからジャスモン酸の生合成は行われていたものと考えられる。このように、トリエン脂肪酸含有量を低下させた形質転換シクラメンの生物的若しくは非生物学的なストレスに反応するジャスモン酸生成量を調査することは非常に興味深く、今後の課題である。

一方、高等植物における高温ストレスと乾燥ストレスに対する反応は、高い相関がある。過去の知見によると、葉緑体膜におけるトリエン脂肪酸含有量を低下させると高温耐性が高まるものの、乾燥耐性が低下するといった報告がある (Im et al., 2002)。しかしながら、形質転換シクラメンにおける乾燥耐性は、WT の乾燥耐性と遜色ないことが明らかになり、既報とは異なる結果であった。

2) 高温ストレスを受けた葉におけるトリエン脂肪酸由来物質の変化

トリエン脂肪酸は、脂肪酸ペルオキシド、脂肪酸ケトジエン、4-ヒドロキシノネナール、低分子アルデヒド及び酸化脂肪酸発生物質等の様々な物質を生成する基質として知られている (Esterbauer et al., 1991; Rustérucci et al., 1999; Howe and Schilmiller, 2002; Alméras et al., 2003)。これらの物質は、病障害やストレスを受けた植物体組織において、酵素的及び非酵素的な酸化反応により生成され、その一部は植物におけるストレス応答反応に関係している (Deighton et al., 1999; Imbusch and Mueller, 2000; Vollenweider et al., 2000; Jalloul et al., 2002; Weber et al., 2004)。一方、 α,β -不飽和カルボニル群を含むトリエン脂肪酸発生物質は、プログラム細胞死を誘発し、マイケル反応付加体として働くことで DNA に対する毒性を有することが明らかになっている。

これらの物質のうち、既報の細胞毒性に関する情報を基に、ACR、MVK、(E)-2-ヘキセナール、HNE 及び MDA に焦点を絞って研究を進めた。その結果、3 日間の高温処理により WT では ACR 及び MVK の蓄積量が上昇したのに対して、形質転換体では変化しなかった。これら ACR と MVK の蓄積量の変化と高温障害の発生程度との関連が高かったために、高温障害の発生には両物質の関与が示唆された。他方、(E)-2-ヘキセナールの葉内濃度は、高温処理 1 日～2 日間の短期間に WT でのみ一過的に上昇した。そこで、(E)-2-ヘキセナールの葉内濃度について、このような一過的な濃度上昇と高温耐性との関係を確認するために、WT に対して 2 日間の高温処理を行い、その後通常の生育条件 (20°C、16 時間日長条件) に戻し、その 7 日後の高温障害発生について調べた結果、葉における高温障害の発生は認められなかった (データ略)。これらの結果から、形質転換シクラメンにおける高温耐性と (E)-2-ヘキセナール葉内濃度との間には関係がないものと考えられた。また、WT と形質転換体における HNE 含有量についてみると、どちらも高温処理 2 日間で濃度上昇が認められたが、その発消長は WT と形質転換体で差が無く、形質転換体にも認められた高温耐性との関連は見いだせなかったことから、HNE についても高温障害の発生及び高温耐性とは関係がないものと考えられた。*Capsicum annuum* (トウガラシ) において、HNE はその大部分がジエン脂肪酸から生成されることが知られている (Deighton et al. 1999)。しかし、ジエン脂肪酸含有量が劇的に増加した形質転換シクラメンにおいても、HNE 生成量が WT と変わらなかったことから、シクラメンにおける HNE の生合成経路は *Capsicum annuum* とは異なる可能性が考えられる。また、MDA についてみると、高温処理 1 日間から高温処理期間を通して WT 及び形質転換体共に葉内濃度は同様の蓄積傾向を示した。この結果から MDA についても、形質転換体における高温耐性には関係していないものと考えられた。シロイヌナズナにおける MDA は、その大部分がトリエン脂肪酸を基質として生合成されることが明らかになっており、局在型及び遊離型 MDA の量的な変化が、非生物学的なストレスに対するストレス防御遺伝子の遺伝子発現に影響を及ぼすことが知られている (Muckenschnabel et al., 2002; Weber et al., 2004)。しかしながら、今回の研究結果から、シクラメンにおける MDA の生成は、トリエン脂肪酸とは異なる不飽和脂肪酸から生成されている可能性がある。若しくは、形質転換シクラメンにおいて残存しているわずかなトリエン脂肪酸含有量でも、シクラメンにおける MDA の生成に十分な基質として働いている可能性も考えられる。MDA は非生物学的なストレスに対する関連遺伝子発現に強く影響を及ぼしていると考えられているが、本研究ではそのような傾向は認められなかった。

3) 葉に対する ACR 及び MVK 添加実験の効果

WTと形質転換体におけるACRとMVKの葉内濃度は、高温処理3日間まで変化はなかった。しかし、その後も高温処理を継続することでWTでのみ両物質の葉内濃度が経時的に上昇した。ACRとMVKを外部から浸漬させた処理葉では、WTに対する5日間の高温処理で発生した高温障害と類似した障害が発生した。このようにACRを浸漬した処理葉におけるACR葉内濃度及びMVKを浸漬した処理葉におけるMVK葉内濃度は、5日間の高温処理を行った葉におけるACR葉内濃度及びMVK葉内濃度と同程度であった。

一般的に、ACR被爆により葉の表面に障害が発生することが知られている(Haagen et al., 1952; Darley et al., 1960)。さらに、ACRとMVKは光合成系Ⅱに対する強力な毒性物質であることが知られている(Alméras et al., 2003; Mano et al., 2009)。これらの結果から、ACR及びMVKを含むトリエン脂肪酸由来の代謝物質は高温ストレスで発生し、その一部は高温障害を発生させる可能性が示唆された。今回のこれらの研究結果により、通常の植物体の葉におけるトリエン脂肪酸は、高温条件下で酵素的あるいは非酵素的に分解及び代謝され、ACRやMVKといった細胞毒性を有するトリエン脂肪酸代謝産物を生成する。これら細胞毒性を有するトリエン脂肪酸代謝産物が、結果的に葉における萎れや褐変といった高温障害を引き起こす一因であることが明らかになった。一方、葉緑体に局在するデサチュラーゼ酵素をコードする*FAD7*の発現を抑制し、トリエン脂肪酸含有量を低下させた形質転換植物においては、ACRやMVKの基質となるトリエン脂肪酸が微量であるため、高温条件下においても細胞毒性を有するトリエン脂肪酸代謝産物の生成が抑制され、結果的に葉における高温障害の発生を軽減若しくは遅延させることが明らかになった。このような、トリエン脂肪酸の低下と高温耐性の付与については、現象としては報告されていたものの、そのメカニズムについては明らかにされていなかった。今回、このような高温耐性付与のメカニズムが明らかにできたことで、有用植物における高温耐性付与の研究、実用化が進む可能性が出てきた。一方、本報告で用いた低トリエン脂肪酸植物体は、形質転換によって作出したものであるが、他の高温耐性を付与する手法、例えば*DREB*遺伝子の改変導入やヒートショックタンパク質を過剰発現させる遺伝子の導入などと異なり、トリエン脂肪酸を生合成するデサチュラーゼ酵素をコードする*FAD7*を突然変異育種法で不活化することで、形質転換法に依存しない低トリエン脂肪酸植物、つまりは高温耐性植物を育成できる可能背が高い。その上、ACRやMVK等の細胞毒性を有するトリエン脂肪酸由来の物質について分析・評価を行うことで、植物における高温耐性を効果的に評価できる可能性がある。将来的には、このような育成法、分析法、評価法を用いることで、突然変異育種法によるトリエン脂肪酸含有量を低下させた高温耐性植物を開発できると考えられ、本研究が食物生産にとって脅威となりうる地球温暖化に対して有効な打開策となりうると考えられる。

要 約

植物の細胞膜を構成するトリエン脂肪酸の含有量を低下させることで、植物体に高温耐性が付与できることが報告されている。しかしながら、そのトリエン脂肪酸含有量の低下と高温耐性の付与に関するメカニズムは明らかになっていなかった。一方、トリエン脂肪酸は、過酸化反応により α,β -不飽和カルボニル群を含む細胞毒性を有する物質を発生させることが報告されていた。そこで、今後の高温耐性育種に関する研究に資することを目的に、形質転換技術を用いてトリエン脂肪酸含有量を低下させた高温耐性シクラメンを作出し、トリエン脂肪酸含有量の低下と細胞毒性を有するトリエン脂肪酸由来の過酸化物質との関係を調査した。数多く生成するトリエン脂肪酸の過酸化物質の中でも細胞毒性が高いと報告されるアクロレイン(ACR)、メチルビニルケトン(MVK)、(E)-2-ヘキセナール、4-ヒドロキシ-2-ノネナール(HNE)、マロンジアルデヒド(MDA)について、高温条件下での栽培種(WT、以下同様)と高温耐性シクラメンにおける葉内濃度の発生消長を分析した。その結果、WTの葉におけるACRとMVKの葉内濃度は、高温障害の発現程度と同様に上昇した。一方、高温耐性シクラメンについては、高温条件下でも高温障害の発生がほとんど認められず、ACRとMVKの葉内濃度も上昇しなかった。さらに、WTの切除葉に対して、高温条件下においてWTの葉内で蓄積された濃度になるまで外部からACR及びMVKをそれぞれ浸透させる浸漬実験を行った結果、高温条件下で発生した高温障害と同様の萎れや褐変といった障害が葉に発生した。

これらの結果から、通常の植物体の葉におけるトリエン脂肪酸は、高温条件下で酵素的あるいは非酵素的に分解及び代謝され、ACRやMVKといった細胞毒性を有するトリエン脂肪酸代謝産物を生成することで、結果的に葉における萎れや褐変といった高温障害が発生することが明らかとなった。一方、トリエン脂肪酸含有量を低下させた形質転換植物においては、ACRやMVKの基質となるトリエン脂肪酸が微量であるため、高温条件下においても細胞毒性を有するトリエン脂肪酸代謝産物の生成が抑制され、結果的に葉における高温障害の発生を軽減若しくは遅延させることが明らかになった。

このようなトリエン脂肪酸を低下させた植物体は、デサチュラーゼ酵素をコードする*FAD7*を突然変異育種法により不活化することで作出できる可能性が高い。その上、ACRやMVK等の細胞毒性を有するトリエン脂肪酸由来の物質について分析・評価を行うことで、効果的に高温耐性植物を育成できる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の着手、実験の遂行、学術雑誌への投稿にあたり、九州大学大学院理学研究院生物科学部門植物分子生理学の射場厚教授から多大なるご協力と惜しみないご指導を賜った。同じく九州大学大学院理学研究院生物科学部門植物分子生理学の松田修博士からは、本研究における分析に対するご指導や研究遂行に関するご助言を賜った。Institute of Floriculture and Woody Plant Science, Tree Nursery Science Section, Leibniz Universitaet Hannover の Traud Winkelmann 教授には、シクラメン種子のご提供及び研究遂行におけるご助言を賜った。Michigan State University Department of Biochemistry and Molecular Biology の Thomas D. Sharkey 教授には投稿論文のご校閲並びにご助言を賜った。独立行政法人国立環境研究所地球環境研究センターの伊藤昭彦博士には研究データの解析についてご協力を賜った。ハクサン株式会社企画部田島道男氏、シンジェンタシード株式会社花卉マーケティング部清水裕氏及び有限会社鹿毛真耕園鹿毛哲郎氏からは、シクラメン種子のご提供及び情報提供を賜った。

また、福岡県農業総合試験場元八女分場長中原隆夫氏、福岡県農業総合試験場研究企画部バイオテクノロジー課平島敬太課長、池上秀利氏からは、研究の実施にあたり多大なるご協力とご助言を賜った。同じくバイオテクノロジー課のスタッフ皆様からは研究遂行にあたり多大なるご支援頂いた。ここに記して皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

気象庁 HP. http://www.env.go.jp/earth/ondanka/pamph_tekiou/2012/index.html

Aida R, Hirose Y, Kishimoto S, Shibata M. 1999. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Science* 148, 1-7.

Alméras E, Stolz S, Vollenweider S, Reymond P, Mène-Saffrané L, Farmer EE. 2003. Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 34, 205-216.

Darley EF, Middleton JT, Garber MJ. 1960. Plant damage and eye irritation from ozone-hydrocarbon reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 8, 483-485.

Deighton N, Muckenschnabel I, Goodman BA, Williamson B. 1999. Lipid peroxidation and the oxidative burst associated with infection of *Capsicum annuum* by *Botrytis cinerea*. *Plant Journal* 20, 485-492.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine* 11, 81-128.

Falcone DL, Ogas JP, Somerville CR. 2004. Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biology* 4, 17.

Grosjean E, Green PG, Grosjean D. 1999. Liquid chromatography analysis of carbonyl (2,4-Dinitrophenyl) hydrazones with detection by diode array ultraviolet spectroscopy and by atmospheric pressure negative chemical ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 71, 1851-1861.

Haagen-Smit AJ, Darley EF, Zaitlin M, Hull H, Noble W. 1952. Investigation on injury to plants from air pollution in the Los Angeles area. *Plant Physiology* 27, 18-34.

Howe GA, Schilmiller AL. 2002. Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 230-236.

Iba K, Gibson S, Nishiuchi T, Fuse T, Nishimura M, Arondel V, Hugly S, Somerville CR. 1993. A gene encoding a chloroplast ω -3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis*

thaliana. *Journal of Biological Chemistry* 268, 24099-24105.

- Iba K. 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 53, 2225-245.
- Im YJ, Han O, Chung GC, Cho BH. 2002. Antisense expression of an *Arabidopsis* ω -3 fatty acid desaturase gene reduces salt/drought tolerance in transgenic tobacco plants. *Molecules and Cells* 13, 264-271.
- Imbusch R, Mueller MJ. 2000. Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostnes F1 (Phytprostanes F1) in plants. *Plant Physiol.* 124, 1293-1303.
- IPCC. 2007. IPCC 第4次評価報告書第1作業部会報告書政策決定者向け要約(翻訳気象庁).
- Jalloul A, Montillet JL, Assigbetsé K, Agnel JP, Delannoy E, Triantaphylidès C, Daniel JF, Marmey P, Geiger JP, Nicole M. 2002. Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *Plant Journal* 32, 1-12.
- Katiyar-Agarwal S, Agarwal M, Grover A. 2003. Heat-tolerant basmati rice engineered by over-expression of hsp101. *Plant Molecular Biology* 51, 677-686.
- Kodama H, Hamada T, Horiguchi G, Nishimura M, Iba K. 1994. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast ω -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiology* 105, 601-605.
- Korchazhkina O, Exley C, Spencer SA. 2003. Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography B* 794, 353-362.
- Liu XY, Yang JH, Li B, Yang XM, Meng QW. 2006. Antisense-mediated depletion of tomato chloroplast omega-3 fatty acid desaturase enhances thermal tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology* 48, 1096-1107.
- Lobell DB, Field CB. 2007. Global scale climate-crop yield relationships and the impacts of recent warming. *Environment Research letters* 2, 011002 (doi:10.1088/1748-9326/2/1/011002)

- McConn M, Browse J. 1996. The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* 8, 403-416.
- McConn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE, Browse J. 1997. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 94, 5473-5477.
- Mano J, Miyatake F, Hiraoka E, Tamoi M. 2009. Evaluation of the toxicity of stress-related aldehydes to photosynthesis in chloroplasts. *Planta* 230, 639-648.
- Muckenschnabel I, Goodman BA, Williamson B, Lyon GD, Deighton N. 2002. Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *Journal of Experimental Botany* 53, 207-214.
- Murakami Y, Tsuyama M, Kobayashi Y, Kodama H, Iba K. 2000. Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science* 287, 476-479.
- Routaboul JM, Browse J. 2002. Trienoic fatty acids and plant tolerance of temperature. *OCL-OLEAGINEUX CORPS GRAS LIPIDES* 9, 43-47.
- Rustérucci C, Montillet JL, Agnel JP, Battesti C, Alonso B, Knoll A, Bessoule JJ, Etienne P, Suty L, Blein JP, Triantaphylidès C. 1999. Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogeiin on tobacco leaves. *Journal of Biological Chemistry* 274, 36446-36455.
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor *DREB2A* in water-stress- and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 103, 18828-18833.
- Sharkey TD. 2005. Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant, Cell and Environment* 28, 269-277.
- Sharkey TD, Zhang R. 2010. High temperature effects on electron and proton circuits of photosynthesis. *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 712-722.

- Tuteja N, Sopory SK. 2008. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signaling & Behavior* 3, 525-536.
- Vollenweider S, Weber H, Stolz S, Chételat A, Farmer EE. 2000. Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant Journal* 24, 467-476.
- Wallis JG, Browse J. 2002. Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. *Progress in Lipid Research* 41, 254-278.
- Wang J, Ming F, Pittman J, Han Y, Hu J, Guo B, Shen D. 2006. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) gene encoding a temperature-dependent chloroplast ω -3 fatty acid desaturase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340, 1209-1216.
- Weber H, Chételat A, Reymond P, Farmer EE. 2004. Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *Plant Journal* 37, 877-888.
- Yesson C, Culham A. 2006. A phyloclimatic study of *Cyclamen*. *BMC Evolutionary Biology* 6, 72.
- Zhang M, Barg R, Yin M, Gueta-Dahan Y, Leikin-Frenkel A, Salts Y, Shabtai S, Ben-Hayyim G. 2005. Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct ω -3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants. *Plant Journal* 44, 361-371.

Studies on the acquired mechanism of thermotolerance in cyclamen with decreased trienoic fatty acids

Summary

Reduced levels of trienoic fatty acids (TA) in chloroplast membranes induce thermotolerance in several plant species, but the underlying mechanisms remain unclear. TA peroxidation in plant cell membranes generates cytotoxic, TA-derived compounds containing α,β -unsaturated carbonyl groups. To clarify the relationship between low TA levels and the amounts of cytotoxic TA-derived compounds, I examined the relationship using thermotolerant transgenic cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.) with low TA contents. I analyzed changes in the levels of the cytotoxic TA-derived Acrolein (ACR), methyl vinyl ketone (MVK), (E)-2-hexenal, 4-hydroxy-2-nonenal and malondialdehyde, in the leaf tissues of wild type (WT) and thermotolerant transgenic cyclamen under heat stress. Levels of ACR and MVK in the WT increased in parallel with the occurrence of heat-induced tissue damage, whereas no such changes were observed in the thermotolerant transgenic lines. Furthermore, exogenous ACR and MVK infiltrated into leaves to similar concentrations as observed in heat stressed WT leaves, caused similar disease symptoms. These results suggest that thermotolerance in transgenic cyclamen depends on reduced production rates of ACR and MVK under heat stress, due to the low level of TA in these plants.

福岡県農業総合試験場特別報告
第39号

トリエン脂肪酸低減シクラメンにおける
高温耐性獲得メカニズムに関する研究

発行 平成25年 3月

福岡県農業総合試験場
〒818-8549 福岡県筑紫野市吉木587
TEL 092-924-2937

著者 甲斐 浩 臣

印刷所 秀英社印刷株式会社
〒818-0052 福岡県筑紫野市武蔵三丁目2-6
TEL 092-923-3154