

プロリンアナログアゼチジン-2-カルボン酸 耐性シロイヌナズナの選抜

福徳 康雄

(植物栄養調節学研究室)

平成10年9月7日 受理

Isolation of Arabidopsis Mutants Resistant to Proline-Analog Azetidine-2-Carboxylic Acid

Yasuo FUKUTOKU

(Laboratory of Plant Nutrition)

Received September 7, 1998

Summary

The effects of the amino acid analogs azetidine-2-carboxylic acid (A2C), hydroxyproline and thioproline, on the growth of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Landsberg was tested for isolate proline analog-resistant mutants. "Zero growth" concentrations of each inhibitor were 30 μ M, 1 mM and 1.5 mM respectively. Because A2C was the most effective inhibitor, it was used to isolate mutants resistant to the proline analog. Growth inhibition by A2C was reversed by low proline concentrations. Five hundred thousand of bulk-harvested M2 seeds (derived from 100,000 M₁ seeds of *Arabidopsis* mutagenized by 0.3% EMS) were germinated on agar-solidified medium containing 150 μ M A2C. In this medium resistant mutants were able to germinate and produce normal shoots and roots. Thirty-nine putative mutants were selected. From this initial screening only 22 resistant mutants were chosen as these were found to be fertile. Their progeny was re-selected for resistance to A2C in the M4 generation, and some resistant lines were obtained. The mutant R26-2 and the wild-type seedlings were tested for NaCl tolerance. In addition, the mutant R26-2 showed better tolerance than the wild-type under the low concentrations of NaCl.

Key words: Analog-resistant mutant, *Arabidopsis thaliana*, Proline.

緒 言

水ストレス誘導プロリン集積は水ストレスに対する全ての植物に共通する代謝的応答であり^{1,2)}、プロリン集積量と耐乾性との間に密接な相関があることを報告する例も多い³⁾。従って、高プロリン遺伝子型（できれば水ストレスの強さに応じて集積プロリン量をコントロールするもの）の品種を選抜することは、すなわち耐乾性品種の選抜であり、安定した収量に直結する

Abbreviations: A2C, L-azetidine-2-carboxylic acid; EMS, Ethyl Methanesulfonate; Hyp, *trans*-4-hydroxy-L-proline; P5CS, Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase; T4C, L-thiazolidine-4-carboxylic acid; WT, wild-type.

ものと期待される⁴⁾。また、細胞内に集積したプロリンは、細胞質のタンパク質の安定化⁵⁾、膜の安定化⁶⁾、さらにはストレス回復時の窒素とエネルギーの貯蔵庫²⁾としての貢献を通して、水欠乏、塩類集積、凍害などの環境ストレスから細胞を保護しているのではないかと提唱されているが、これらの説を証明するうえでも重要な貢献をする。このような期待から、プロリンアナログを用いてプロリンを過剰生産するさまざまな植物の作出が行われてきた。これまで報告された事例は、懸濁細胞を用いた4-ヒドロキシプロリン (Hyp) およびアゼチジン-2-カルボン酸 (A2C) 耐性ニンジン^{7,8)}、Hyp 耐性ポテト⁹⁾、A2C 耐性タバコ¹⁰⁾、A2C 耐性シアノバクテリア¹¹⁾の例、初生葉、根由来のカルスを用いた A2C 耐性大豆¹²⁾、チオプロリン (T4C) および Hyp 耐性緑豆^{13,14)}の例、胚由来カルスを用いた T4C 耐性コヌカグサ¹⁵⁾、Hyp 耐性小麦¹⁶⁾の例、NaN₃処理した種子の胚を使用した Hyp 耐性大麦¹⁷⁾の例、種子で耐性株を作出した Hyp および A2C 耐性シロイヌナズナ (ecotype Bensheim を供試)¹⁸⁾の例がある。細胞培養による突然変異体の選抜は非常に有効な方法であるが、この方法は、再分化系の確立されていない植物種や長期継代培養のため細胞が再分化能を失い個体として育成することが困難な場合が多く、また遺伝的安定性に欠けるといったことが指摘されている¹⁹⁾。現に、報告された事例の中で再生個体を得たのは、大麦¹⁷⁾、ポテト⁹⁾、コヌカグサ¹⁵⁾、小麦¹⁶⁾の4例である。従って、シロイヌナズナのように種子選抜が可能な植物は先述の理由で大きなメリットを持っている。

本報告では ecotype Landsberg を用いて、低濃度で明確な成長阻害を示す A2C に対する耐性株を選抜し、その生育、遺伝的安定性および NaCl に対する反応について調べた。

材料および方法

種子の変異剤処理

約10万粒のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Landsberg) の野生型種子を、常温で0.3% EMS 溶液に16時間攪拌しながら浸漬した。処理した種子 (M₁) を数回水で洗浄後プランターに播種し、M₂種子を得た。

シロイヌナズナの生育に及ぼすプロリンアナログ、NaCl、マニトールの影響と A2C 耐性株の選抜

種子を5%次亜塩素酸ナトリウムと0.02% Triton-X100を含む滅菌水で5~10分間殺菌し、その後滅菌した純水で5回リンスした。滅菌した種子100粒を、0.5%シュークロース、0.7%寒天(和光植物培地用)及び濃度の異なる生育阻害剤 A2C, Hyp, T4C, NaCl, マニトールを含む最小培地²⁰⁾に、パスツールピペットを用いてシャーレ全面に均一に置かれるよう播種した。生育阻害剤を含む培地は、終濃度が既知の濃度になるよう考慮したろ過滅菌済みの高濃度溶液をシャーレに添加し、オートクレーブした最小培地を加えて十分に攪拌・固形化したものである。播種したシャーレは十分な吸水が行われるよう冷蔵庫に2日間置いた。その後、9日間23°C連続光のもとで栽培し、芽生えを採取、根に付着した寒天を取り除いて新鮮重を測定した。

A2C 耐性株の選抜は以下のように行った。オートクレーブした0.05%寒天溶液に分散させた約1000粒の滅菌種子(合計50万粒)を、A2C 150 μ M を含む培地に播種し、上記と同様に栽培した。この培地で野生型の芽生えは発芽後すぐに死滅したが、A2C に対して耐性を示す幼植物は発芽・生長した。50万粒のM₂種子から良好な発芽・生長を示した耐性個体を選抜し、慎重に肥料入りピートモスの培土(ジフィー9)に移植し、それぞれ自殖種子 (M₃) を得た。さらに、M₄世代で実施した耐性の検定により特に耐性の強いものを選び、再選抜にかけ、いくつかの耐

性系統を得た。

耐性の検定

得られた耐性株の種子を、A2C 0 μ M と野生型の芽生えがゼロ生長を示す A2C 50 μ M を添加した培地にそれぞれ約100粒ずつ播種して生育を比較した。栽培条件は上記の通りである。

結 果

プロリンアナログがシロイヌナズナの生育に及ぼす影響

3種類のプロリンアナログがシロイヌナズナの生育をどのように阻害するのか調べた。A2C が30 μ M と低濃度で完全に芽生えの生育を阻害したのに対し、Hyp と T4C の生育阻害濃度はそれぞれ約 1 mM, 1.5 mM と高かった (図1)。根の成長は葉の展開に比べ著しく阻害され、“ゼロ成長濃度”は A2C で15 μ M, Hyp で 1 mM, T4C は0.7 mM であった。

アゼチジン-2-カルボン酸耐性株の選抜

A2C が低濃度で最も明瞭な阻害効果をもたらしたので A2C 耐性を示す株を選抜した。EMS 処理のM₁から得た50万粒のM₂種子を A2C150 μ M を含む寒天培地に播き、良好な発芽を示した39個体を選抜したが、多くのは不稔であり、最終的に22個体から種子を得た。抵抗性の検定に基づき更にM₄世代で2回目の選抜を行い、いくつかの抵抗性系統を得た (図2)。

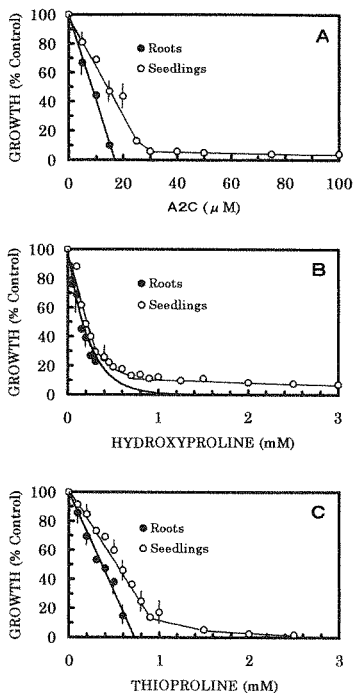


Fig. 1. Growth of wild-type (WT) seedlings on a range of concentrations of 3 proline analogs. A A2C; B Hyp; C T4C.

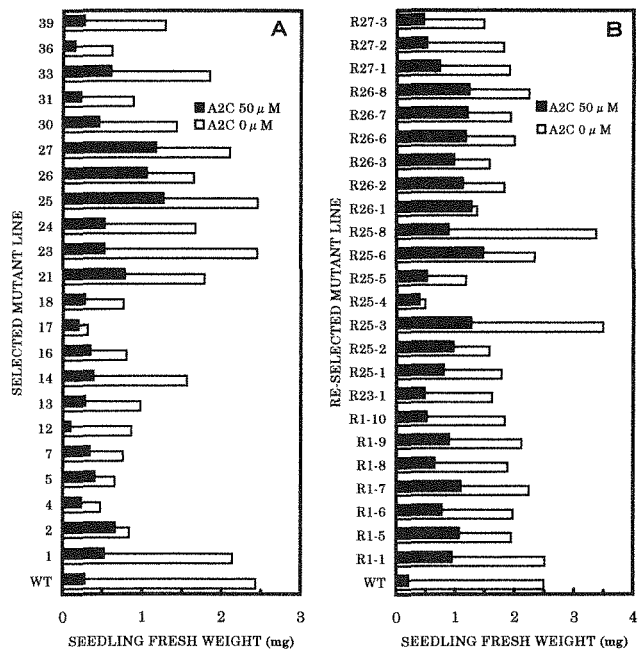


Fig. 2. Test for resistance to 50 μ M A2C of the wild-type (WT) and selected mutant seedlings. A M4 progeny of selected mutants from M2 populations; B M5 progeny of re-selected mutants in the M4 generation.

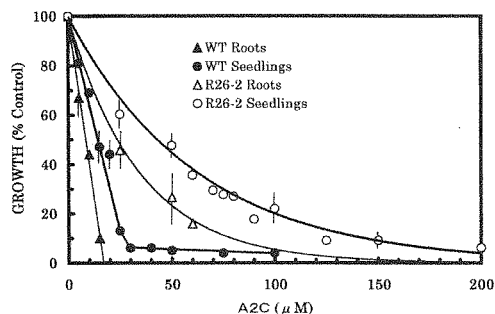


Fig. 3. Sensitivity of wild-type (WT) and mutant (R26-2) seedlings to A2C.

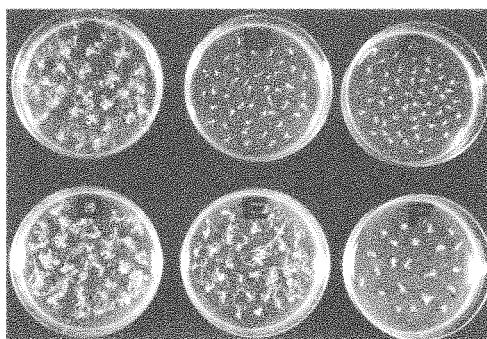


Fig. 4. Growth of mutant (R26-2) and wild-type seedlings in petri dishes containing A2C. Plants were grown 9 days in the presence of A, D no additions; B, E 50 μM A2C; C, F 100 μM A2C. Upper row: wild-type seedlings; lower row, R26-2 seedlings.

A2C 耐性系統 R26-2 の生育に及ぼす A2C の影響

A2C 耐性を示す亜系統 R26-2 と野生型で A2C 耐性を比較したところ、野生型が 30 μM で生育が完全に停止したのに対し、R26-2 は A2C の阻害が緩慢で、A2C 30 μM で、芽生え、根双方の成長率は無処理に比べそれぞれ 6 割、4 割と高く、A2C 100 μM でも発芽・成長が認められた (図 3, 図 4)。根は野生型よりもほぼ 6 倍高い A2C 100 μM で成長が停止した。

プロリンの添加が A2C 阻害を軽減する

プロリンはプロリンアナログに比べ軽微ではあったがシロイヌナズナの生育を阻害した (阻害の程度は 300 μM で 90%, 1 mM で約 70%, 図 5)。このことは、ストレスのかかっていない通常の条件下では、内生的なプロリンは、常に、低濃度に調節される事を示唆している。プロリン添加が野生型および R26-2 の A2C 阻害にどのような影響を及ぼすのか調べた。いずれの植物でもプロリンを共存させると A2C の阻害効果は大きく後退し、プロリン濃度を上げるとより阻害は軽減された (図 6)。

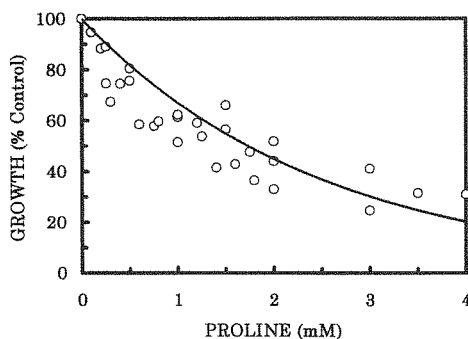


Fig. 5. Growth of wild-type seedlings in the presence of proline.

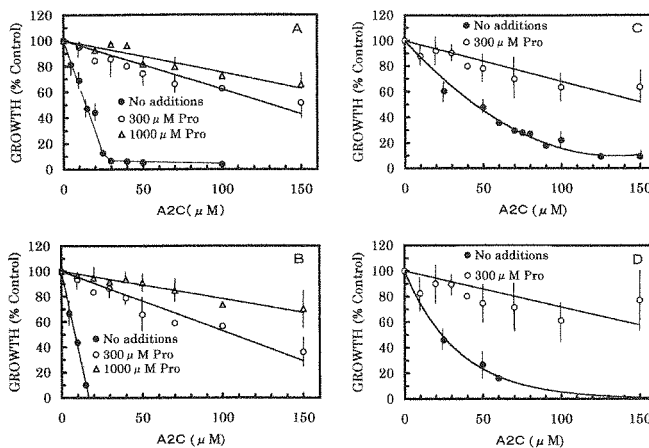


Fig. 6. Relief by proline of A2C growth inhibition. A WT seedlings; B WT roots; C R26-2 seedlings; D R26-2 roots.

NaCl と マニトール が 野生型 と R26-2 の 生育 に 及ぼす 影響

初期生育に対する模擬環境ストレスの影響をみるために NaCl 及び マニトール を 添加した。R26-2 は NaCl 添加により 100 mM 以下の低濃度領域で若干の耐性が認められたが、高濃度領域ではみられなかった(図7)。一方、マニトールを添加した時の影響をみると野生型と R26-2 の間に差は認められなかった(データは示さず)。

考 察

これまで報告された事例をまとめると、選抜に用いられた各プロリンアナログの選抜濃度は Hyp 2~10 mM, A2C 50~150 μ M, T4C 1~3 mM であり、A2C が最も生育阻害作用の強いアナログである。本実験でも、A2C は他の 2 剤に比べ 1 ケタ低い濃度でシロイヌナズナの生育を明瞭に阻害した(図1)。A2C を選抜のためのアナログとして用い、1 回目の選抜で、突然変異原 EMS 処理した 50 万粒の M_2 種子から良好な発芽・生長を示した 39 個体の耐性植物を得た(選抜頻度は 1.3×10^{-4})。その後、 M_4 世代で実施した耐性の検定により耐性の強いものを再選抜にかけ、いくつかの耐性系統を得て、その中から R26-2 を選びその特性について調べた。

アミノ酸アナログ耐性株の特徴のひとつは、アナログに対応するアミノ酸の過剰生産である。過剰生産は毒物であるアナログを天然のアミノ酸で希釈することによって被害を少なくしようという細胞代謝の調節機構の現れとみることができる。蓄積が生じる機構が明らかにされているものは少ない。プロリンアナログ耐性植物のアミノ酸生成量をみると、A2C 耐性の事例では、タバコ¹⁰とダイズ¹²)ではプロリンの増加は認められず、シアノバクテリア¹¹)とニンジン⁸)でプロリンの増加が認められた。Hyp 耐性株と T4C 耐性株では全てでプロリン集積が起こった。本実験では、ノーマルな条件では期待したプロリンの増加は認められなかった。先に報告された ecotype Bensheim を用いたものでは Hyp 耐性株 RP07 でプロリンの増加がみられたが、A2C 耐性株 RP14, 18 ではプロリンの増加は起こっていない¹⁸)。このことは、プロリンアナログの作用機作の違い^{8,21})により、耐性のメカニズムの異なる植物が選抜されることを示唆している。本実験で得られた A2C 耐性株 R26-2 と同様にプロリンの増加がみられなかった A2C 耐性タバコの耐性は、プロリンと A2C の transport system の変革(吸収の軽減)によると報告されている¹⁰)。しかしながら、プロリンを共存させると、R26-2 は野生型と同じように A2C の阻害効果が大きく後退し、300 μ M プロリン添加ではその阻害が同程度であった(図6)。このことは、R26-2 の A2C 耐性はタバコの事例と異なり、細胞内部の代謝の場にあることを示唆する。細胞内プロリン含有量が低く維持されているにも関わらず高い A2C 耐性を示す稲の懸濁細胞の耐性は、プロリンと A2C の transport system の変革(吸収の軽減)によるものではなく、A2C が疑似の最終産物阻害剤としてプロリン合成のフィードバックコントロールに作用しない事によると報告されている²²)。R26-2 の A2C 耐性は稲の懸濁細胞と同じメカニズムが働いているのかもしれない。この点に関しては、ストレスを付加した時の R26-2 の遊離アミノ酸の

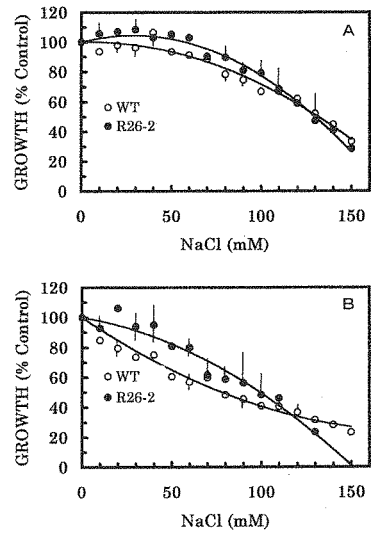


Fig. 7. Growth of mutant (R26-2) and wild-type (WT) seedlings in the presence of NaCl. A seedlings; B roots.

変化を調べるとともに、今後詳細な検討を要する。

R26-2は、NaCl添加により100 mM以下の低濃度領域において若干の塩耐性が認められた(図7)。R26-2の塩耐性がプロリンによるものか検討していないが、プロリン集積が塩耐性を増加させることが各種のプロリンアナログ耐性株を用いて報告されている^{9,11,13,14,23,24}。プロリンの集積はストレス誘導生成の促進と分解の抑止によって起こるが^{25,26}、塩類ストレス(水でも?)では浸透圧を調節する溶質としてきわめて重要な役割を持つと受け止められている²⁷。プロリン集積の評価については全く相対峙する報告がある⁴)が、水ストレス耐性にプロリンが関与するという考え方を示す報告は多い^{1,3}。プロリン集積能を高めることが果たして植物の耐乾性に結びつくのか、プロリン合成の律速ステップに関与するP5CSをコードする遺伝子が水不足によって強く誘導されることがシロイヌナズナを用いて明らかとなっており²⁵、また形質転換タバコを用いた実験では、P5CSのoverexpressionは形質転換タバコのプロリン濃度を上昇させ、同時に水不足の条件で形質転換タバコの生産性が高まったことが報告されている²⁸。このことは、プロリンを過剰生産するよう形質転換することで植物の耐乾性が向上する可能性を肯定している。今後、これまでに提唱されてきた水ストレス下におけるプロリン集積のプラスの役割^{2,5,6})を分子生物学的に解明していく材料として、各種のプロリンアナログ耐性シロイヌナズナが利用されていくだろう。

摘 要

プロリンアナログ耐性シロイヌナズナの選抜を目的として、3種類のアナログがシロイヌナズナの生育をどのように阻害するのか調べた。ゼロ生長を示す濃度はアゼチジン-2-カルボン酸(A2C)が30 μM と低く、なおかつ明瞭な阻害を示したが、ヒドロキシプロリンとチオプロリンは各々約1 mM, 1.5 mMと高かった。A2Cは最も効果的な阻害剤であり、A2Cを耐性株の選抜に使用した。A2Cによる阻害は低濃度のプロリン添加によって弱められた。0.3% EMS処理のM₁種子10万粒からバッチで得られた50万粒のM₂種子をA2C 150 μM を含む寒天培地に播き、良好な発芽・生長を示した39個体を選抜したが、多くは不稔であり、最終的に22の耐性個体を得られた。得られた耐性個体を用い、更にM₄世代で2回目の選抜を行っていくつかの耐性系統を得た。耐性個体R26-2と野生型の初期生育に対するNaClの影響を調べた。R26-2はNaClを添加することにより低濃度領域で若干の耐性を示した。

文 献

1. Aspinall, D. and L. G. Paleg (1981). Proline accumulation: physiological aspects. in "The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants", eds by Paleg, L. G. and D. Aspinall, p 206-241. Academic Press. ISBN 0-12-544380-3.
2. Fukutoku, Y. and Y. Yamada (1984). Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*). II. Fate of 15N-labelled protein. *Physiol. Plant.* **61**, 622-628.
3. Sivaramakrishnan, S., V. Z. Patell, D. J. Flower and J. M. Peacock (1988). Proline accumulation and nitrate reductase activity in contrasting sorghum lines during mid-season drought stress. *Physiol. Plant.* **74**, 418-426.
4. Naidu, B. P., D. Aspinall and L. G. Paleg (1992). Variability in proline-accumulating ability of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars induced by vapor pressure deficit. *Plant Physiol.* **98**, 716-722.
5. Schobert, B. and H. Tschesche (1978). Unusual solution properties of proline and its interaction with

- proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **541**, 270-277.
6. Rensburg, L. V., G. H. J. Kruger and H. Kruger (1993). Proline accumulation as drought-tolerance selection criterion: its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum* L. *J. Plant. Physiol.* **141**, 188-194.
 7. Widholm, J.M. (1976). Selection and characterization of cultured carrot and tobacco cells resistant to lysine, methionine, and proline analogs. *Can. J. Bot.* **54**, 1523-1529.
 8. Cella, R., Parisi, B. and E. Nielsen (1982). Characterization of a carrot cell line resistant to azetidine-2-carboxylic acid. *Plant Sci. Lett.* **24**, 125-135.
 9. Van Swaaij, A.C., Jacobsen, E., Kiel, J.A.K.W. and W.J. Feenstra (1986). Selection, characterization and regeneration of hydroxyproline-resistant cell lines of *Solanum tuberosum*: tolerance to NaCl and freezing stress. *Physiol. Plant.* **68**, 359-366.
 10. Breiman, A., Vunsh, R. and E. Galun (1982). Characterization of resistance to the proline analog azetidine carboxylic acid in *Nicotiana sylvestris* cell line. *Z. Pflanzenphysiol.* **105**, 383-394.
 11. Riccardi, G., Sora, S. and O. Ciferri (1981). Production of amino acids by analog-resistant mutants of the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Bacteriol.* **147**, 1002-1007.
 12. Maisuryan, A.N., Khadeeva, N.V. and I.L. Dridze (1987). Selection and characterization of soybean cell lines resistant to L-azetidine-2-carboxylic acid. *Soviet Plant Physiol.* **34**, 900-906.
 13. Kumar, V. and D.R. Sharma (1989). Selection and characterization of an L-thiazolidine-4-carboxylic acid resistant callus culture of *Vigna radiata* (L.) Wilczek var. *radiata*. *Plant Cell Rep.* **7**, 648-651.
 14. Gulati, A. and P.K. Jaiwal (1993). *In vitro* selection and characterization of *trans*-4-hydroxy-L-proline resistant callus lines of *Vigna radiata*: tolerance to NaCl. *Plant Physiol. biochem.* **31**, 699-705.
 15. Shetty, K. and Y. Asano (1991). Specific selection of embryogenic cell lines in *Agrostis alba* L. using the proline analog thioproline. *Plant Sci.* **79**, 259-263.
 16. Dörffling, K., H. Dörffling and G. Lesselich (1993). *In vitro*-selection and regeneration of hydroxyproline-resistant lines of winter wheat with increased proline content and increased frost tolerance. *J. Plant Physiol.* **142**, 222-225.
 17. Kueh, J. S. H. and S. W. J. Bright (1981). Proline accumulation in barley mutant resistant to *trans*-4-hydroxy-L-proline. *Planta* **153**, 166-171.
 18. Verbruggen, N. and M. Jacobs (1987). Arabidopsis mutants resistant to proline analogues: isolation and preliminary characterization. *Arabid. Inf. Serv.* **23**, 15-23.
 19. 亀谷寿昭 (1993). アミノ酸アナログ(5-メチルトリプトファン)耐性植物の作出とその特性. 組織培養 **19**, 164-167.
 20. Haughn, G. W. and C. Somerville (1986). Sulfonyleurea-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 430-434.
 21. Elthon, T. E. and C. R. Stewart (1984). Effects of the proline analog L-thiazolidine-4-carboxylic acid on proline metabolism. *Plant Physiol.* **74**, 213-218.
 22. Nielsen, E., G. Forlani, R. Cella and B. Parisi (1986). Biochemical characterization of the natural resistance of rice to the proline analogue azetidine-2-carboxylic acid. *Plant Sci.* **44**, 147-154.
 23. Riccardi, G., R. Cella, G. Camerino and O. Ciferri (1983). Resistance to azetidine-2-carboxylic acid and sodium chloride tolerance in carrot cell cultures and *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* **24**, 1073-1078.
 24. Sumaryati, S., I. Negrutiu and M. Jacobs (1992). Characterization and regeneration of salt and water stress mutants from protoplasts culture of *Nicotiana plumbaginifolia* (Viriani). *Theor. Appl. Genet.* **83**, 613-619.
 25. Yoshihara, Y., T. Kiyosue, T. Katagiri, H. Ueda, T. Mizoguchi, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Wada, Y. Harada and K. Shinozaki (1995). Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.* **7**, 751-760.
 26. Kiyosue, T., Y. Yoshihara, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki (1996). A nuclear gene encoding

- mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8, 1323-1335.
27. Delauney, A. J. and D. P. S. Verma (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4, 215-223.
28. Taylor, C. B. (1996). Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. *Plant Cell* 8, 1221-1224.