

平成23年 2月 28日現在

機関番号：82111
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380063
 研究課題名（和文）低温ショックドメインタンパク質による植物の耐凍性制御の分子機構解明
 研究課題名（英文）Molecular mechanisms by which cold shock domain protein regulates freezing tolerance in plant.
 研究代表者
 今井 亮三（IMAI RYOZO）
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター・主任研究員
 研究者番号：90291913

研究成果の概要（和文）：

大腸菌は低温に応答して RNA シャペロンである低温ショックタンパク質を蓄積する。本研究では、シロイヌナズナの低温ショックタンパク質 AtCSP3 が、耐凍性を制御する機構について研究を行った。次の点が明らかになった。1) AtCSP3 は大腸菌 CSP と同様な RNA シャペロン活性を持つ。2) AtCSP3 は、ストレス耐性に関与する遺伝子の発現を正に調節する。3) 核内で複数のタンパク質と相互作用し、複合体を形成している。

研究成果の概要（英文）：

In response to cold, *E. coli* produces cold shock proteins (CSPs) that have essential roles in cold adaptation as RNA chaperones. In this study, we demonstrate that *Arabidopsis* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 (AtCSP3) also functions as an RNA chaperone and regulates expression of stress resistance genes through formation of multiple complexes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：耐凍性、低温馴化、シロイヌナズナ、低温ショック、RNA シャペロン

1. 研究開始当初の背景

多くの植物は緩やかな低温ストレスにより高度の低温耐性を獲得するいわゆる低温馴化能を持つ。これは秋の低温を認識し、冬の厳しい低温に備えるために植物が本来持つ適応能力である。従って、低温馴化機構の解明は、植物の低温耐性の向上に大きく貢献すると考えられる。

一般に、生育適温外におかれた生物は、遺伝子発現を介した適応応答を示す。熱（高温）

ショック 応答は細菌から高等動植物に至るまで、高度に保存された機構を介するが、低温（ショック）応答において、その様な共通機構は知られていない。細菌では、低温遭遇が一群の低分子量タンパク質（Cold Shock Proteins, CSP）を誘導する。CSP は RNA 結合タンパク質であり、RNA 上に形成された 2 本鎖構造を解消させる RNA シャペロンである。低温ストレス下においては mRNA 上に常温では形成されない 2 本鎖構造が形

成され、タンパク質の翻訳過程が阻害されるが、大腸菌の CSP はこの 2 本鎖構造を解消し、低温下での翻訳を可能にすると考えられている。また大腸菌の *metY-rpsO* オペロンにおいて、CSP は mRNA 上に形成される転写終結 (2 本鎖) 構造を解除し、転写段階の制御にも働くことが知られている。

我々は、コムギの低温馴化過程で高蓄積する WCSP1 タンパク質が、大腸菌 CSP との間で共通な cold shock domain (CSD) を持つことを見出した。また、WCSP1 遺伝子が大腸菌の *csp* 変異を相補すること、WCSP1 が大腸菌中及び試験管内において RNA シャペロン活性を示すこと等から、WCSP1 が大腸菌 CSP と機能的にも相同であることを明らかにした。これらの研究から、細菌と高等植物の低温適応においては、低温を受けて高度に蓄積する RNA シャペロンが、重要な機能を持つことが明らかになった。

WCSP1 様遺伝子は、ほぼ全ての植物種に見出される。シロイヌナズナには 4 つのメンバー (*AtCSP1~AtCSP4*) が存在し、そのうち *AtCSP1*, 3, 4 の 3 つが低温馴化により誘導された。最近申請者らは、最も顕著な低温誘導性を示す *AtCSP3* 遺伝子の機能欠損変異株 (*atcsp3-2*) は、耐凍性が著しく低下することを見出した。また、*AtCSP3* 過剰発現形質転換体においては耐凍性が野生株より向上した。これらの結果により、*AtCSP3* が低温馴化時の耐凍性獲得において重要な働きを持つことが証明された。

2. 研究の目的

本研究では、低温ショックドメインタンパク質 *AtCSP3* がどのような機構で耐凍性を制御するのかを明らかにすることを目的とした。*atcsp3* 変異株の低温 (非凍結) 下での生育は正常であることから、*AtCSP3* は遺伝子/タンパク質の発現制御を介して、最終的に耐凍性を直接決定するタンパク質の発現を正に調節しているものと考えられる。そこでまず、*AtCSP3* の下流において働く遺伝子群を同定し、制御の全体像を明らかにする。また、細胞内局在性の解析、複合体を形成するタンパク質の同定等から、細胞内における *AtCSP3* の機能発現の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) RNA シャペロン活性の測定

大腸菌 CSP 四重欠損変異体 BX04 (*cspA*, *cspB*, *cspE*, *cspG*) にベクター-pINIII を用いて *AtCSP3* を導入した。コントロールとして大腸菌 *cspA*, およびコムギ WCSP1 を導入した。液体培養した菌体を適宜希釈後 LB 培地にスポットした。低温感受性は 17°C で比較した。in vitro における 2 本鎖核酸解離活性は分子

ビーコンを用いた蛍光検出により行った。

(2) 発現部位、細胞内局在性の解析
AtCSP3 のプロモーター領域 (1219 bp) を pBI121 にクローン化し、プロモーター: α -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子に融合した。融合遺伝子はアグロバクテリウムを介してシロイヌナズナ花蕾に滴下法により導入した。*AtCSP3* の細胞内局在性を明らかにするため、*AtCSP3* に緑色蛍光タンパク質 (GFP) のタグを付加し、同様に形質転換してシロイヌナズナ中で発現させた。形質転換体組織を蛍光顕微鏡で観察した。

(3) マイクロアレイ解析

各系統組織より抽出した total RNA を調整し、Cy3, Cy5 2 色標識法によりラベル化した。アジレント社 22K オリゴ DNA アレイ (*Arabidopsis 2*) を用いて、標準プロトコールに沿って解析した。データの統計処理、機能同定、クラスタリング解析は Gene Spring ソフトウェアを用いて行った。

(4) 酵母ツーハイブリッド法

バックグラウンドが低い LexA-B42 システムを用いた。5 日間 4°C で低温馴化させたシロイヌナズナ実生より CloneMiner キット (Invitrogen) を用いて cDNA ライブラリーを作製した。ゲートウェイシステムを用いて pJG4-5 ベクター上にライブラリーを移した。pJG4-5 上ではプレイクローンが Gal1 添加により発現誘導される。*AtCSP3* 全体をベイトとして発現させ、相互作用は lacZ の発現により検出した。

(5) 2 分子蛍光相補法

酵母ツーハイブリッド法でスクリーニングされたクローンは 2 分子蛍光相補 (BiFC) 法により植物細胞内における相互作用を確認した。

4. 研究成果

(1) *AtCSP3* の RNA シャペロン活性

AtCSP3 (図 1) の RNA シャペロン活性を調べるために、大腸菌 CSP 欠損株を用いた相補試験を行った。

CSP 欠損株にベクターのみを保持させた場合は 17°C で生育できなかったが、*AtCSP3* を導入した株では *CspA*, WCSP1 導入株と同様に生育可能となった (図 1B)。従って *AtCSP3* は *CspA* の RNA シャペロン機能を代替できることが示された。試験管内 2 本鎖核酸解離活性も観察された (図 1C)。

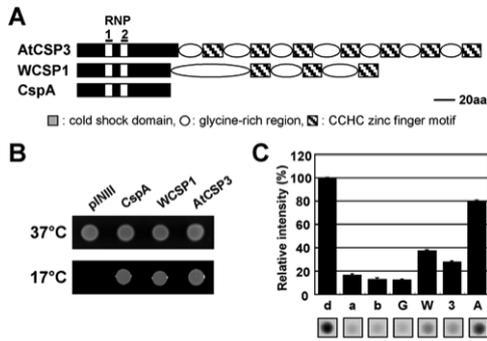


図1. A. AtCSP3の構造とWCSP1, CspAとの比較. B. CSP四重変異株の低温感受性相補試験. C. 一本鎖解離状態(d), 2本鎖状態(a)の分子ビーコンの蛍光. (a)のビーコンに, buffer (b), GST (G), WCSP1 (W), AtCSP3 (3), CspA (A)を添加した場合の蛍光.

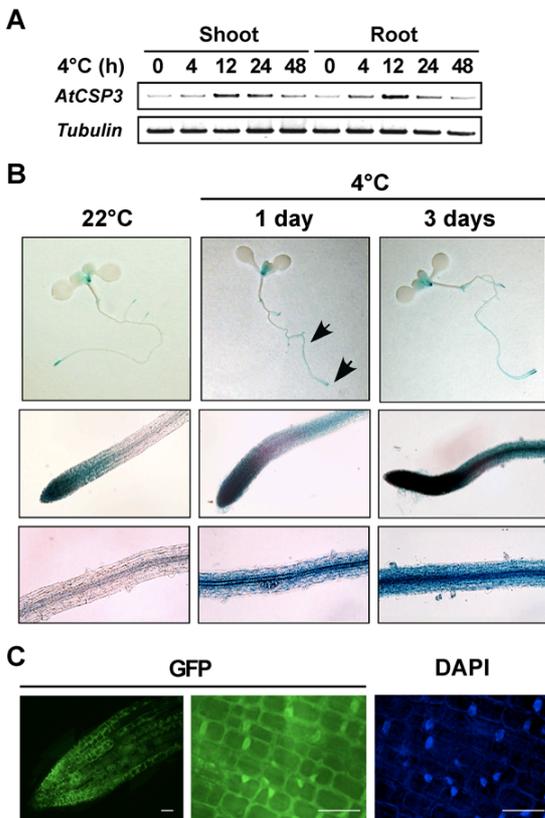


図2. A. AtCSP3 低温に反応した発現. B. GUS 染色による AtCSP3 発現部位の特定. C. の構造と WCSP1, CspA との比較. B. CSP 四重変異株の低温感受性相補試験. C.

(2) AtCSP3 の発現解析および細胞内局在性 幼苗における発現の低温応答性を調べたところ, AtCSP3 は茎葉及び根において低温誘導性を示した (図 2 A). 次に, プロモーター::GUS を導入した形質転換体において発現解析を行った. AtCSP3 の発現は発芽後の茎葉と根の頂端分裂組織で見られた (図 2 B). 低温処理後は発現部位が根端から根全体に広

がった (図 2 B). GFP 融合タンパク質を発現する形質転換体を作成して, GFP の細胞内局在性を調べたところ, 核及び細胞質でシグナルが観察された (図 2 C).

(3) AtCSP3 の下流遺伝子の同定

野生株と *atcsp3-2* 変異株間で発現の変動している遺伝子をマイクロアレイを用いて同定した. 変異株中で 2.5 倍以上発現が低下している遺伝子を 19 種類同定した. このうち多くがストレス誘導性遺伝子として報告されていた. それらのうち 6 種類について半定量的 RT-PCR により発現解析を行ったところ, アレイ結果と同様に変異株において発現レベルが低下していた (図 3).

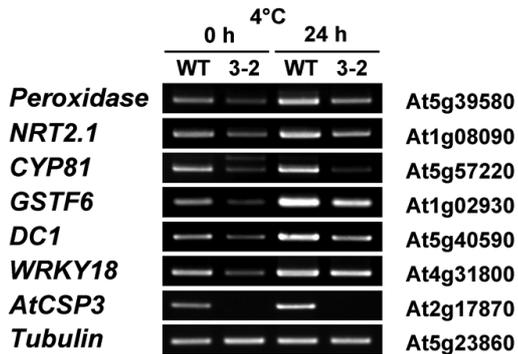


図3. マイクロアレイで同定された変異株で発現が低下している遺伝子の発現解析.

(4) AtCSP3 機能複合体の解析

酵母ツーハイブリッド法により AtCSP3 相互作用タンパク質のスクリーニングを行った. 相互作用するタンパク質として表 1 に示したタンパク質が同定された. 核内に局在し RNA の代謝に関わるタンパク質が多く含まれており, AtCSP3 が核内において様々なタンパク質と複合体を形成している可能性が示唆された. また, これらのうち, 核型ポリ A 結合タンパク質については 3 種類全てが相互作用タンパク質として同定されたことから, 極めて重要な複合体を形成していると推定された. そこで, PABN1-3 の AtCSP3 の植物細胞内における相互作用を BiFC 法により検証した. PABN1 とは核内で, PABN2 と PABN3 とは核内スペckルでそれぞれ相互作用していることが明らかとなった (図 4).

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Kim, M.H., Sasaki, K. Imai, R. (2009) *COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3* regulates freezing

表1. 酵母ツーハイブリッド法で同定された相互作用タンパク質.

AGI code	Encoded protein
At1g1210	Unknown n prot ein
At1g48920	rRN A processing prot ein, nucleic acid binding prot ein (ATNUCL1/PARL1)
At4g10970	Unknown n prot ein
At3g53460	Chloropl ast 29 kDa r n bonucleoprot ein (CP29)
At5g60980	Nuclear transport fa ctor 2 fa mily prot ein (N TF2)
At1g15690	Vacuolar-type H ⁺ -pump ping pyrophos phatase 1/ATPase (AVP1)
At3g03920	Gar1 RNA -binding re gion fa mily prot ein
At1g26110	Decapping prot ein 5 (DCP5)
At5g12000	DEAD/DEAH box helicase, putative (RH 15/EL F4A)
At4g36020	Cold shock domain prot ein (AICSP1)
At5g51120	Poly A binding prot ein, nuclear (AIPABN1)
At5g10350	Poly A binding prot ein, nuclear (AIPABN2)
At5g65260	Poly A binding prot ein, nuclear (AIPABN3)
At3g23390	60S ribosomal protein L36a/L44 (RP L36aB)
At4g32420	peptidyl-prol yl cis trans isomerase cyclophi lin-type family prot ein (A1CYP95)
At5g13650	Elongation fa ctor fa mily prot ein (EFG/EF2)
At3g49910	60S ribosomal protein L26 (RP L26A)
At5g42050	Unknown n prot ein / N-ri ch prot ein (N PR)
At3g16470	Jasmonate response (JRI)
At5g62190	DEAD/DEAH box helicase binding prot ein (P RH75)
At1g28050	Zinc fi nger (B-box t ype) fa mily prot ein (CONSTANS-like prot ein 15/COL15)
At4g23890	Unknown n prot ein
At3g59810	Small nuclear r n bonucleoprotein F (S m prot ein F)
At3g46780	Plastid tra nscriptionally active 16 (PTAC16)
At2g37220	Chloropl ast 29kDa r n bonucleoprotein
At5g13590	Unknown n prot ein
At2g36170	Ubiquitin extensi on prot ein 2 (UBQ2) / 60S ribosomal prot ein L40 (RP L40A)
At5g05210	Nuclear matrix prot ein / prot ein of t elomeres 1 (POT1)
At2g36530	Copper ion binding / phosphopyruvate hy dratase / enolase 2 (ENO2/LOS2)
At1g35720	Annexin 1 (ANNAT1)
At1g77180	Chrom atin protein fa mily / Ski-inteact ing prot ein (S KIP)
At2g35860	Fasci cin-like ana binolactan prot ein 16 precursor (F LA16)
At3g09690	Hydrol ase, alpha/beta fold fa mily prot ein
At5g23230	Nicotinamide 2 (N IC2)
At5g37850	Salt overly sensitive 4 (S OSA)
At3g14415	Peroxisomal (S)-hydroxy-a cid oxidase/glycolate oxidase (MOA 2.13)
At5g02810	Pseudo-response regulator 7 (P RR7/ APRR7)
At1g35160	Squamosa prom oter binding prot ein-like 4 (SPL4)
At5g23290	Prefold ing prot ein 5 (P DF5)
At2g21660	Cold, circadian rhy thm and RNA binding 2 (CCR2/ ATGRP7)
At1g26630	Fumonisin B1-se sistant 12 (F BR12)/ eukaryotic elongation fa ctor 5A-2 (E LF5A-2)
At4g25340	Immunophilin-se lated / FKBP 4-type peptidyl-prol yl cis-trans isomerase-se lated (A1FKBP53)
At5g15200	40S ribosomal protein S9 (RP S9B)
At2g36000	Mitochondrial tra nscription termination fa ctor-se lated (m TERF-se lated)
At1g27450	Adenine phosphon bosyl tra nslase 1 (APT1)
At4g25100	Fe superoxide dismutase (FSD1)
At4g19200	Proline-ri ch fa mily protein

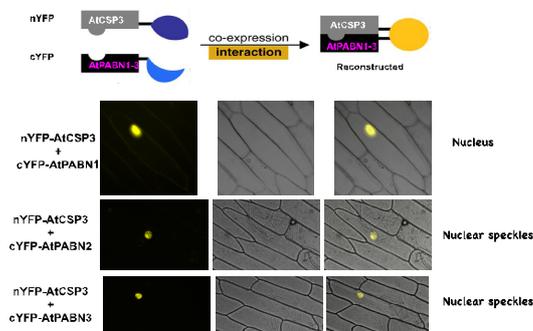


図4. BiFC 法による植物細胞内における AtCSP3 と PABN の相互作用検出.

tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **J. Biol Chem.** 284, 23454-23460.

② Sasaki, K., Kim, M.-H., Imai, R. (2007) *Arabidopsis* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN2 is a RNA chaperone that is regulated by cold and developmental signals. **Biochem Biophys. Res. Commun.** 364, 633-638.

③ 今井亮三、金 明姫 (2009) 「植物の耐凍性を向上させる新しい遺伝子の発見」ニュー

カントリー 11, 68-69.

④ 中南健太郎, Dale Karlson, 今井亮三 (2007) 「低温下で RNA の働きを助けるタンパク質」ブレインテクノニュース, 119, 15-18.

[学会発表] (計 6 件)

① Imai, R., Kim, M.H., Sasaki, K., Sonoda, Y., Radkova, M. A conserved RNA chaperone function of cold shock domain proteins. CRYO2009 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology. 2009 年 7 月, 札幌.

[図書] (計 1 件)

① Sasaki, K., Kim, M.-H., Imai, R. (2009) Expressional and functional characterization of *Arabidopsis* cold-shock domain proteins. In *Plant Cold Hardiness: from the Laboratory to the Field.* (Gusta, L.V., Wisniewski, M., Tanino, K. eds) in press. CAB International, Oxfordshire, UK.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 低温ストレス耐性を有するトランスジェニック植物

発明者: 今井 亮三, 佐々木 健太郎, 金 明姫

権利者: 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2006-112086

出願年月日: 平成 18 年 4 月 14 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

今井 亮三 (IMAI RYOZO)

農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター 低温耐性研究チーム

研究者番号：19380063

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：