

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06330

研究課題名(和文) 塩ストレス応答・耐性機構を活性化するダイズ機能未知遺伝子の分子生物学的研究

研究課題名(英文) Molecular characterization of the soybean gene of unknown function involved in response and tolerance to salt stress

研究代表者

小島 俊雄 (Kojima, Toshio)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：70311587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ダイズの機能未知遺伝子GmTDF-5が作用する塩ストレス応答・耐性機構を特定し、同遺伝子による耐塩性形質の活性化プロセスを解明することにある。研究の結果、GmTDF-5は塩ストレス処理後、植物の地上部器官、特に維管束・木部組織で発現していること、同遺伝子の過剰発現が細胞壁の力学的特性に関わるペクチン代謝の酵素遺伝子やストレス応答に関わる植物ホルモンの制御因子の転写量に影響を与えていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、機能未知遺伝子GmTDF-5による塩ストレス応答・耐性機構の活性化プロセスを理解する上で重要な知見になると考える。形質転換シロイヌナズナで見られたGmTDF-5の機能発現による耐塩性上昇のプロセスを適切にコントロールできれば、ダイズの潜在能力を引き出した新たな耐塩性品種をデザインできるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the molecular response and tolerance mechanism of the GmTDF-5 gene, a soybean gene of unknown function, under salt stress. Spatial and temporal expression of GmTDF-5 gene in transgenic Arabidopsis under salt stress showed mainly in aerial organs, especially in the xylem in vascular bundles. Overexpression of GmTDF-5 conferred altered transcription level of genes involved in pectin metabolism for mechanical properties of the cell wall and in regulators for phytohormones.

研究分野：環境農学

キーワード：ダイズ 塩ストレス 耐塩性 機能未知遺伝子 アルマジロリポート ユビキチン-プロテアソーム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物細胞が塩ストレスに曝されると、高浸透圧に伴う脱水や毒性イオンによる代謝の攪乱が起こり、植物の生長は著しく阻害される。近年、塩を高濃度に含む農耕地が拡大しており、このような地域で農業生産を実施するためには、大規模な除塩作業と並行して、遺伝子組換えや交配育種で作出した耐塩性作物の導入が必要となる。

当研究室では耐塩性ダイズの開発を目的に、これまでに塩ストレス応答性を示すダイズ遺伝子 106 種類を単離し、個々のタンパク質機能の特徴付けを進めている。このうち、*GmTDF-5* と命名した機能未知タンパク質をコードする遺伝子をシロイヌナズナで過剰発現させたところ、野生株が枯死する 150 mM NaCl 環境でも生存できることを見出した。過剰発現株および野生株に蓄積したナトリウム量が両者で大きく変わらないことから、*GmTDF-5* は根における塩の吸収を制限するのではなく、植物体自体に耐塩性形質を付与する機能をもつと推測された。

GmTDF-5 の分子生物学的研究を通じて、*GmTDF-5* がロイシンジッパーやアルマジロリピートといった他のタンパク質と結合できるドメインをもつ核局在タンパク質であること、同遺伝子の過剰発現シロイヌナズナでは、一部の水分ストレス応答遺伝子の応答が野生株よりさらに高まること、転写レベルでの強い塩ストレス応答に加え、タンパク質の選択的分解系であるユビキチン-プロテアソーム系 (UPS 系) により制御されていることを明らかにしている。最近、*GmTDF-5* 上のユビキチン化部位を特定し、そこを変異させたタンパク質がプロテアソームで分解されないこと、さらにこの変異型 *GmTDF-5* を過剰発現するシロイヌナズナは野生株 (コントロール系統) より耐塩性が低いことを見出した。以上の結果は、*GmTDF-5* が厳密に制御されなければならないダイズの塩ストレス応答・耐性機構に関わることを強く示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、「*GmTDF-5* が活性化するダイズの塩ストレス応答・耐性機構とは何か」「転写レベルで強い塩ストレス応答性を示すのに、なぜ UPS 系でその遺伝子産物 (タンパク質) を分解しないと耐塩性が発揮されないのか」への答えを導くため、*GmTDF-5* に関する塩ストレス応答から耐塩性形質獲得までの分子生物学的研究に取り組むことにした。

3. 研究の方法

シロイヌナズナを宿主とする形質転換システムを駆使して *GmTDF-5* が作用する塩ストレス応答・耐性機構を特定し、複数の発現制御システム下にある *GmTDF-5* による耐塩性形質の活性化プロセスを考察することにした。具体的には、

(1) *GmTDF-5* の発現組織から同遺伝子が活性化する耐塩性形質の局在組織・器官を明らかにするため、*GmTDF-5* プロモーター-GUS 発現系を導入した形質転換シロイヌナズナを作成し、GUS 活性を指標とする塩ストレス前後のヒストケミカルアッセイを実施した。さらに、塩ストレス応答性を特徴付ける同プロモーターの構造を理解するため、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター上の制御領域を特定することにした。

(2) *GmTDF-5* と高い相同性を示す遺伝子 (ホモログ) を有するモデル植物を用いた分子生物学的研究を展開するため、栽培作物が多く分類されるナス科のモデル植物タバコにおける *GmTDF-5* ホモログの遺伝子解析を実施した。

(3) *GmTDF-5* が作用する内在遺伝子群を特定し、その発現に与える影響と、結果として現れる耐塩性形質を明らかにするため、*GmTDF-5* を過剰発現する形質転換シロイヌナズナに対して網羅的遺伝子発現解析 (RNA シークエンス) を実施した。この解析を通じて、*GmTDF-5* の過剰発現により転写量を変化させる遺伝子群をリスト化し、各遺伝子の推定機能をもとに *GmTDF-5* が活性化する耐塩性形質を絞り込むことにした。

4. 研究成果

(1) *GmTDF-5* が作用する耐塩性機構の局在組織・器官の特定

GmTDF-5 が作用する耐塩性機構が局在する組織・器官を特定するため、*GmTDF-5* プロモーター-GUS 発現系を導入した形質転換シロイヌナズナを作成し、ヒストケミカルアッセイを実施した。その結果、塩ストレスにより茎の基部や葉脈などの地上部器官で強い GUS 活性が確認され、その後、時間の経過に伴い成熟した葉から若い葉へと活性組織が拡大した。葉の気孔やトライコームでは GUS 活性が見られなかったが、葉の周辺で局所的に活性の高い部位が存在した。一方、直接塩ストレスにさらされる根で GUS 活性は見られなかった。そこで GUS 発現が認められたロゼット葉・葉柄について組織切片を作成し顕微鏡観察したところ、その発現が維管束の木部組織に集中していることが明らかとなった。この結果から *GmTDF-5* が作用する植物の塩ストレス応答・耐性機構が木部組織に存在していることが示唆された。*GmTDF-5* プロモーター制御によ

る GUS 発現は、塩ストレス下では地上部器官でのみ観察されたが、オーキシンを添加すると根でもその発現が観察された。これは GmTDF-5 が作用する形質は塩ストレス応答・耐性機構の活性化のために地上部の特定の組織に必要なが、オーキシン存在下では同形質が根にも必要であることを示唆した。

次に *GmTDF-5* プロモーター 4.8 kb 上に存在する塩ストレスに対する転写制御領域を特定するため、同プロモーターに対するルシフェラーゼアッセイを実施した。その結果、同遺伝子上流 -1.4 kb ~ -2.4 kb 領域に塩ストレスに対する転写制御領域が存在した。同領域内には、塩ストレス応答に関わるシス因子群が複数座乗していたことから、これらのシス因子を介して塩ストレスに対する転写制御が行われていると推測された。

(2) *GmTDF-5* ホモログを保有するモデル植物の解析

GmTDF-5 と相同性を示す遺伝子 (ホモログ) は、シロイヌナズナを含むアブラナ科の植物では見出されていない。このため、分子機能の解析や相互作用タンパク質の同定、耐塩性形質への影響などを調べるためにはホモログを有するモデル植物を用いた実験系も必要となる。そこでトマトやナスなど、栽培作物が多く分類されるナス科のモデル植物タバコにおける *GmTDF-5* ホモログの遺伝子解析を実施した。その結果、栽培タバコ *Nicotiana tabacum* は *GmTDF-5* ホモログを 2 つ有し、塩基配列の保存性から栽培タバコの祖先種である *N. sylvestris*、*N. tomentosiformis* にそれぞれ由来することが示唆された。両者の推定アミノ酸配列の相同性は 95% と高かったが、各組織における塩ストレスに対する応答性には違いが見られ、組織・器官ごとに遺伝子を使い分けられている可能性が示された。今後は、栽培タバコと祖先種の耐塩性の違いや各遺伝子の分子機能などを詳細に特徴付けし、ホモログ保有種・非保有種を宿主とした *GmTDF-5* の発現機能を比較したい。

(3) *GmTDF-5* が作用する遺伝子群のリスト化と耐塩性形質の特定

GmTDF-5 を過剰発現する形質転換シロイヌナズナに対して RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。対照区の形質転換植物と比較したところ、同遺伝子の過剰発現により転写量を大きく変化させるシロイヌナズナ遺伝子を複数特定できた。特定した遺伝子群がコードする個々のタンパク質機能を調べたところ、そこには細胞壁の主要な構成成分であるペクチンの生合成・分解に関わる複数の酵素遺伝子が含まれており、いずれもその転写が抑制されていることが明らかとなった。一次細胞壁中のペクチンはセルロース微繊維とキシログルカンの隙間を埋めるように存在しており、細胞壁に多様な力学的特性を与えている。本研究で特定した酵素遺伝子の推定機能から、*GmTDF-5* によるペクチン代謝関連酵素遺伝子の転写抑制は細胞壁を硬化する方向に導くと推測され、その結果としてシロイヌナズナの耐塩性を上昇させたのではないかと考えている。また、サイトカニンの情報伝達に関わる制御因子の転写量も促進されており、ペクチン代謝だけでなく植物ホルモンの制御因子群に作用することで塩ストレス応答・耐性機構を活性化させる可能性も示唆された。

(4) まとめ

研究期間全体を通じて得られた成果をまとめると、「*GmTDF-5* が活性化するダイズの塩ストレス応答・耐性機構とは何か」に対する答えは、現時点で“植物の地上部器官、特に維管束・木部組織に存在する細胞壁の硬化に関わるペクチン代謝系、もしくはストレス耐性を高める植物ホルモンの制御因子群に関わる塩ストレス応答・耐性機構”と考えられる。また、「転写レベルで強い塩ストレス応答性を示すのに、なぜ UPS 系でその遺伝子産物 (タンパク質) を分解しないと耐塩性が発揮されないのか」に対しては、“両者の制御により適切なタンパク質レベルで *GmTDF-5* 量を維持し、塩ストレス応答と生長を両立できる細胞壁の力学的特性や植物ホルモン応答を柔軟にコントロールするため”ではないかと考察している。今後は、シロイヌナズナとタバコを宿主とする形質転換システムを駆使した分子生物学的研究をさらに推し進め、*GmTDF-5* と相互作用するタンパク質及びその分子機能、*GmTDF-5* が制御するペクチン代謝や植物ホルモンを介した耐塩性形質発現までのメカニズムを詳細に特徴付けし、本研究を完成させたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤 里奈、小島 俊雄
2. 発表標題 アルマジロリピートタンパク質をコードするタバコ機能未知遺伝子の構造と塩ストレス応答性
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会 第37回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤 まりな、牧野 果子、高木 ひかり、須藤 弘樹、野口 和人、小島 俊雄
2. 発表標題 ダイズ耐塩性関連遺伝子GmTDF-5のプロモーター解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 佳奈、小川 佳祐、小島 俊雄
2. 発表標題 形質転換シロイヌナズナを用いたダイズ塩ストレス応答遺伝子GmTDF-5の機能解析
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会 第38回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------