

機関番号：32692

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580008

研究課題名 (和文) オヒルギの耐塩性機構の解明と利用

研究課題名 (英文) Analysis and application of salt tolerance mechanism in *B. gymnorhiza*

研究代表者

多田 雄一 (TADA YUICHI)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：80409789

研究成果の概要 (和文) : オヒルギの耐塩性遺伝子を同定するために、3 種のオミックス技術を活用した。それらは、塩応答性遺伝子の同定とその機能解析、アグロバクテリウムを宿主としたオヒルギ cDNA の網羅的な耐塩性スクリーニング、プロテオーム解析による塩応答性たんぱく質の同定である。これらによって選抜された遺伝子のいくつかは、シロイヌナズナに耐塩性を付与することを確認した。

研究成果の概要 (英文) : To identify key genes in the regulation of salt tolerance in *B. gymnorhiza*, we performed three kinds of omics experiments. Those are the screening of salt responsive genes, followed by their functional analysis, the comprehensive functional screening of the Agrobacterium libraries expressing the mangrove cDNAs, and the identification of salt responsive proteins by proteome analysis of the mangrove plant. The selected genes were transferred into model plants and it was confirmed that some genes could confer salt tolerance to *Arabidopsis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：植物分子育種

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：耐塩性、マングローブ

1. 研究開始当初の背景

食糧不足や塩類集積による砂漠化に対応するためには、耐塩性植物の開発による塩類土壌の耕地化と緑化が期待されている。これまでに中性植物のシロイヌナズナを中心とした耐塩性機構の研究が分子レベルで行なわれている。しかし、これらの遺伝子を利用した耐塩性は比較的短期間の塩処理には対応できるが、生育の全期間に渡って継続的、かつ高濃度の塩ストレス条件におかれた場合

に十分な生育量や生産量が確保できるような耐塩性は発揮されていない。そのため、塩害地の緑化・耕地利用や海水を利用した作物栽培を実現するためには、より高度な耐塩性機構の利用が必要である。しかし、塩生植物の耐塩性機構の解析はこれまで充分に行なわれていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、高度な耐塩性機構を持つと考

えられる塩生植物のオヒルギの耐塩性機構を解明し、作物や緑化植物の耐塩性の分子育種に利用可能な新たな遺伝子資源を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下に示す3種の「オミックス」技術を活用して耐塩性遺伝子候補の同定を行なった。

(1) 塩処理したオヒルギで発現量が上昇する遺伝子をマイクロアレイ解析の結果から選抜し、これらの遺伝子をシロイヌナズナに導入し、耐塩性検定を行なった。耐塩性が向上した組換え体については、耐性機構を解明するために、これまで知られているストレス関連遺伝子の発現の変化について調べ、活性化されているストレス応答経路の探索を行なった。また、他のストレスに対する耐性についても調べた。

(2) オヒルギ cDNA の網羅的な発現ライブラリーをアグロバクテリウムを宿主として構築し、耐塩性スクリーニングを実施した。次に、耐塩性の向上したアグロバクテリウムに導入されている cDNA をシロイヌナズナに導入して耐塩性検定を行なった。得られた耐塩性の組換え体について(1)の方法と同様に耐性機構の解明を行なった。

(3) 塩処理したオヒルギで発現量が上昇するタンパク質をプロテオーム解析により同定した。それらの遺伝子をシロイヌナズナに導入して耐塩性検定を行なった。得られた耐塩性の組換え体について(1)の方法と同様に耐性機構の解明を行なった。

4. 研究成果

(1) はじめに 28 種の塩応答性遺伝子の発現ベクターを構築して、アグロバクテリウムに導入した。これらのアグロバクテリウムの耐塩性を調べたところ、3種の塩応答性遺伝子 (BgARP1, BgZF1, BgLTP) を導入したクローンで耐塩性の向上が認められた。そこで、これらの3種の遺伝子をシロイヌナズナに導入して耐塩性検定を行なった。いずれの遺伝子を導入した系統も 150mM NaCl を含む培地で野生型に比べて良好な生育が認められた。これらについて、植物において既知のストレス応答経路に位置する遺伝子の発現がどのように変化しているか調べた。BgARP1 導入系統について、リアルタイム RT-PCR 法によって耐塩性シグナルの下流に位置する遺伝子の発現を野生型と比較した。発芽4日後の幼植物を、150mM NaCl を含む培地に移植した場合に、組換え系統では osmotin の発現量が増強されていた。また、発芽1ヶ月後の植

物を塩処理した場合には、組換え系統では、野生型で見られる塩処理 6 時間後の RD29A、RD29B、RD22 の一過的な発現量の増加が抑制されていた。また、組換え系統では、塩処理条件下での K⁺イオンの含量が比較的高く保たれていた。これらのことから、BgARP1 導入系統では、K⁺イオンの恒常性の維持、osmotin の高発現、および RD29A、RD29B、RD22 の過剰発現の抑制により耐塩性を獲得していることが推測された。また、塩ストレス以外にも各種重金属に対する耐性検定を行なったところ、BgARP1 組換え体では Ni 耐性が高まっている可能性が示された。これらの結果からマングローブの耐塩性と重金属耐性の関連性が示唆された。特に、ストレスによって発生する活性酸素種を消去することで耐塩性と Ni 耐性が発揮されている可能性が考えられる。

その後、新たに 21 種の塩応答性遺伝子をシロイヌナズナに導入し、耐塩性検定を実施した。その結果、転写因子遺伝子 BgZF1、アルミニウム誘導性タンパク質遺伝子のホモログ (BgAIP)、レチクリン酸化酵素遺伝子を導入した組換え体で 150mM NaCl を含む培地で野生型に比べて良好な生育が認められた。

BgZF1 を導入したシロイヌナズナ系統で既知のストレス応答経路に位置する遺伝子の発現がどのように変化しているか調べるために、塩を含まない条件で栽培した場合のマイクロアレイによる転写プロファイリングを行なった。その結果、Z 検定で有意水準 0.05 (両側検定) で有意差があり、かつ Ratio が 3 以上の変動を示した遺伝子を 7 種同定した。それらは、F-box family protein, phosphate translocator-related, zinc finger family protein と 4 種の unknown protein をコードしていた。このように非ストレス下では、BgZF1 組換え体と WT の発現プロファイリングに大きな差異は認められず、更に別の転写因子を活性化することどまっていた。

また、blight associated protein 様 (BAP) 遺伝子の組換え体では、50mM NaCl 程度の弱い塩ストレスで前処理することで、その後の 150mM NaCl に対する耐性が著しく増強されることが明らかとなり、耐塩性シグナルが増強されやすい状態になっていることが示唆され。

BgAIP 組換え体、および BAP 組換え体のストレス関連遺伝子の発現を定量 RT-PCR で測定したところ、BgAIP 組換え体では塩処理前に RD29B の発現が野生型に比較して高まっていたが、塩処理 2 4 時間後には処理前に比較して数十倍に上昇するものの、野生型よりは発現量が低くなっていた。RD22 でも類似の傾向が認められた。それ以外の遺伝子では、組換え系統では野生型と比較して際立った発現の差異は認められず、導入遺伝子が既知の

耐塩性シグナル経路へ与える影響はほとんどないと考えられた。BAP 組換え体では、RD29B と RD22 の発現が塩処理前は抑制されていた。

また、マングローブは重金属耐性が比較的高いことが報告されており、また、各種ストレス耐性機構にはクロストークがあることが報告されているため、オヒルギの耐塩性遺伝子を導入したシロイヌナズナの重金属耐性を調べた。各組換え体を 1mM Mn、100 μ M Cu、75 μ M Ni、250 μ M Zn、200 μ M Co、200 μ M Fe、300 μ M Mo、または 50 μ M Cd を含む 1/2MS 培地に播種して生育を調べたところ、Bg70、BgWRKY1 組換え体が WT に比較して Mn を含む培地で良好な生育を示した。BAP 組換え体は Zn に対して耐性の向上が認められた。

(2) アグロバクテリウムに耐塩性を付与するオヒルギ cDNA のうち、メタロチオネン遺伝子 (BgMT1) を導入したシロイヌナズナの芽生えを 150mM NaCl 培地に移植した場合に、野生型に比較して有意に耐塩性の向上が確認された。BgMT1 組換え体は、土壌栽培においても 7 日間の 450mM NaCl 処理の後に通常の栽培に戻した時に、野生型と比較して高い生存率を示したことから、成熟期においても耐塩性を発揮すると考えられる。BgMT1 組換え体は、Cu、Ni に対する耐性も向上していたが、Cu 処理した植物体中の Cu 含量には、野生型との差は認められなかった。

その他にアグロバクテリウムに耐塩性を付与した vegetative strage protein, majio strage protein, RbiscoS, CYP92B3, G3PDH, DNAJ heat shock protein, イネの未知 cDNA, ポプラの未知 cDNA のホモログ遺伝子を導入したシロイヌナズナでは耐塩性の向上は認められなかった。

(3) 塩処理したオヒルギのプロテオーム解析から、塩応答性タンパク質として FBP aldolase、osmotin と新規なタンパク質を見出した。FBP aldolase と osmotin の発現ベクターを構築してシロイヌナズナに導入した。

osmotin の組換え体では、50mM NaCl 程度の弱い塩ストレスで前処理することで、その後の 150mM NaCl に対する耐性が著しく増強されることが明らかとなり、BAP 組換え体と同様に耐塩性シグナルが増強されやすい状態になっていることが示唆され。これらの組換え体の酸化ストレス、重金属耐性を調べたところ Ni に対して耐性の向上が認められた。

FBP aldolase 遺伝子を導入した組換え体でも耐塩性の向上が認められた。しかし、これらの組換え体については詳細な解析をするまでには至らなかった。

新規な塩応答性タンパク質については、内部アミノ酸配列から対応するミックスプラ

イマーを合成し、RACE 法によって cDNA の取得を試みたが、残念ながら該当する cDNA の増幅・クローニングはできなかった。

(4) 上記のように、本研究においてオヒルギの耐塩性遺伝子を複数同定することができた。これらの中には、これまでに機能が報告されていない遺伝子が含まれており、新たな耐塩性遺伝子資源の提供という所期の目的を達成することができた。しかしながら、それらの耐塩性遺伝子の効果は 150mM NaCl で生育可能な程度であり、オヒルギの高度な耐塩性にははるかに及ばず、実用的にも充分とはいえない。従って、更に詳細にオヒルギの耐塩性機構の解析を継続することが必要である。

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 5 件)

①Miyama M, Tada Y (2011) Expression of *Bruguiera gymnorhiza* BgAR1 enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *Euphytica* 177:383-392 査読有

②Tada Y, Kashimura, T (2009) Proteomic analysis of salt-responsive proteins in mangrove plant, *Bruguiera gymnorhiza*. *Plant Cell Physiol.* 50: 439-446 査読有

③Yamanaka T, Miyama M, Tada Y (2009) Transcriptome profiling of the mangrove plant *Bruguiera Gymnorhiza* and identification of salt tolerance genes by *Agrobacterium* functional screening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 : 304-310 査読有

④Ezawa S, Tada Y (2009) Identification of salt tolerance genes from the mangrove plant *Bruguiera gymnorhiza* using *Agrobacterium* functional screening. *Plant Sci.* 176: 272-278 査読有

⑤Miyama M, Tada Y (2008) Transcriptional and physiological study of the response of Burma mangrove (*Bruguiera gymnorhiza*) to salt and osmotic stress. *Plant Mol. Biol.* 68:119-129 査読有

[学会発表] (計 16 件)

①Yuichi Tada, Yuta Nagase, Chisato Endo (2011) Omics-based identification of salt-tolerance genes from the mangrove plant *Bruguiera gymnorhiza*. *Plant Gene Discovery Technologies* (Vienna) 23-26/02/2011

②遠藤千里、多田雄一 (2010) オヒルギのアルミニウム応答性たんぱく質類似遺伝子を導入したシロイヌナズナの耐塩性 第 33 回

日本分子生物学会年会 (神戸) 08/12/2010
③長瀬優太、多田雄一 (2010) オヒルギのオスモチン様遺伝子と病害応答性タンパク質様遺伝子を導入したシロイヌナズナの耐塩性 第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸) 08/12/2010
④多田雄一、遠藤千里、長瀬優太、玉城功 (2010) オヒルギ・ソナレシバの耐塩性遺伝子スクリーニング 日本育種学会第 118 回講演会 (秋田県立大学) 24/09/2010
⑤多田雄一、遠藤千里、長瀬優太、玉城功 (2010) オヒルギ・ソナレシバの耐塩性遺伝子スクリーニング 日本育種学会第 118 回講演会 (秋田県立大学) 09/24/2010
⑥Yuichi Tada, Yuta Nagase, Satsuki Sawai (2010) Identification of salt tolerance genes from the mangrove plant *Bruguiera gymnorhiza* by functional analysis in transgenic *Arabidopsis*. 21st International Conference on Arabidopsis Research (Yokohama) 07/06/2010
⑦多田雄一 (2010) オヒルギ遺伝子を導入したシロイヌナズナの耐塩性と耐重金属耐性 日本育種学会第 117 回講演会 (京都大学) 26/03/2010
⑧澤井五月・多田雄一 (2010) アグロバクテリウムを宿主とした耐塩性スクリーニングで選抜したオヒルギ遺伝子を導入したシロイヌナズナの解析 日本育種学会第 117 回講演会 (京都大学) 26/03/2010
⑨多田雄一・深山真史 (2009) オヒルギ遺伝子を導入した耐塩性シロイヌナズナの解析 第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜) 14/12/2009
⑩多田雄一・深山真史 (2009) オヒルギ遺伝子を導入した耐塩性シロイヌナズナの解析 日本育種学会第 116 回講演会 (北海道大学) 26/09/2009
⑪Yuichi Tada, Masashi Miyama, Shota Ezawa (2009) Identification of genes involved in salt tolerance of the mangrove plant *Bruguiera gymnorhiza*. *Plant Biology* 2009 (Honolulu) 18-22/07/2009
⑫多田雄一 (2009) 砂漠緑化と食糧増産のための耐塩性植物の開発 国際バイオ EXPO2009 (東京ビッグサイト) 03/07/2009
⑬柏村高朗、多田雄一 (2009) オヒルギの塩応答性タンパク質のプロテオーム解析 第 50 回日本植物生理学会年会 (名古屋) 21-23/03/2009
⑭多田雄一、江澤祥太、深山真史 (2008) オヒルギの遺伝子を導入したシロイヌナズナの耐塩性の解析 第 31 回日本分子生物学会年会 (神戸) 12/12/2008
⑮多田雄一、深山真史 (2008) オヒルギの塩応答性遺伝子を導入したシロイヌナズナの解析 日本育種学会第 114 回講演会 (滋賀県

立大学) 11/10/2008
⑯江澤祥太、多田雄一 (2008) *Agrobacterium* を宿主とした耐塩性スクリーニングで選抜したオヒルギ遺伝子を導入したシロイヌナズナの解析 日本育種学会第 114 回講演会 (滋賀県立大学) 12/10/2008

〔図書〕 (計 2 件)

①Tada Y (2011) Molecular dissection of salinity tolerance mechanisms in mangrove plants for molecular breeding of salt-tolerant plants In "Plant Biotechnology and Transgenic Research & Molecular Agrobiolgy", Eds, Thangadurai D, Othman RY, Biradar DP, Bentham Science Publishers Ltd. IL, USA in press

②Tada Y (2011) Molecular mechanisms of salt tolerance in mangrove plants. In "Agricultural Research Updates, Volume 1, Chapter 3, pp1-26" Ed, Hendricks BP, Nova Science Publishers, Inc., NY, USA, ISBN:978-1-61324-292-6

〔その他〕

ホームページ等

「マングローブプロジェクト」

<http://www.teu.ac.jp/tada/Mangrove%20project1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 雄一 (TADA YUICHI)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：80409789

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号