

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2008 ～ 2009
 課題番号： 20780011
 研究課題名(和文) 植物の脱分極に関わる PMP3 の機能および環境ストレス応答における生理的役割の解明
 研究課題名(英文) Studies on the molecular and physiological role of PMP3, which is involved in membrane depolarization, in the environmental stress responses of rice
 研究代表者
 三屋 史朗 (MITSUYA SHIRO)
 名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
 研究者番号： 70432250

研究成果の概要(和文):近年増加している塩類集積土壌における植物の成育を可能とするため、植物の耐塩性機構の解明を目的として、酵母細胞において膜の脱分極に関わる *PMP3* 遺伝子をイネから単離した。イネの *PMP3* (*OsPMP3*) 遺伝子群の発現解析および機能解析を行った結果、イネの *OsPMP3* も細胞内への塩輸送を抑制し、耐塩性に重要であること、また *OsPMP3* 遺伝子が遺伝子発現の改変によりイネの耐塩性を向上させるための候補遺伝子となることが分かった。

研究成果の概要(英文): Most crop plants are sensitive to high salinity and the growth is repressed in saline soil, which is increasing these years. To elucidate the mechanism of salt tolerance of plants, we have isolated *PMP3* gene family, which is involved in membrane depolarization in yeast cells, from rice and analyzed the expression and function of rice *PMP3* (*OsPMP3*) genes. We have found that *OsPMP3* is also involved in salt tolerance via repressing salt uptake into the cells in rice. We suggest that *OsPMP3* genes are good candidates for improving salt tolerance of rice plants using a gene transformation technique.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：作物、耐塩性機構、イネ、分子生物学、イオンホメオスタシス

1. 研究開始当初の背景

植物の成長は、植物を取り巻く環境、特に高濃度の塩、乾燥または低温などの非生物ストレスにより著しく影響を受ける。特に塩ストレスは植物の成長および収量を制限する

最も重要な因子のひとつである。植物が塩ストレスを受けると、水欠乏、イオン障害および抗酸化障害により成長量が減少する。したがって、高塩濃度の塩集積土壌における作物生産量を増加させるためには、作物における

耐塩性を改良することが重要である。植物が長期間塩にさらされると、組織内の Na^+ 含量が増加し、障害が引き起こされる。したがって植物細胞における Na^+ 輸送および吸収の抑制メカニズムを理解する必要がある。

Na^+ は大部分の植物にとって必須元素ではないが、 Na^+ はいくつかの Na^+ 透過タンパク質を通して膜を通過する。さらに Na^+ の吸収および拡散は、膜ポテンシャルによって直接的または間接的に調節される。植物では、細胞膜プロトンポンプが ATP を利用してプロトンを細胞内から外にくみだし、プロトンの電気化学的勾配を作る。このプロトンポテンシャルが Na^+/H^+ 対向輸送体のエネルギーとなり、 Na^+ をサイトソル外に排出することに働く。

Navarre と Goffeau (2000) により、酵母細胞における *PMP3* 遺伝子の欠損が細胞膜の過分極を引き起こし、 Na^+ 吸収を増加させることが報告された。植物のシロイヌナズナにおいても、*PMP3* の相同遺伝子である *RCI2A* 遺伝子の破壊により Na^+ の過剰な蓄積が引き起こされ、塩感受性が増加した。したがって、*PMP3* は植物でも細胞膜ポテンシャルの調節に関与し、結果的に植物の耐塩性機構に関与することが考えられた。

イネは最も重要な作物のひとつであるが、塩ストレスによる過剰な Na^+ の蓄積により成長量が著しく減少し、超微形態の変化が起こる。したがってイネの耐塩性を改良するためには、 Na^+ 輸送の遺伝子レベルでの調節が効果的であると予想される。

2. 研究の目的

本研究では、イネにおける Na^+ 輸送の分子メカニズムを理解するために、イネにおいて細胞膜ポテンシャル調節に関わると考えられる *PMP3* 遺伝子を単離し、イネの *OsPMP3* 遺伝子の発現解析および機能解析を行った。またイネ *PMP3* 遺伝子過剰発現株を作製し、その耐塩性程度を調査した。

3. 研究の方法

(1) イネ (*Oryza sativa* L.) の EST データベースから、酵母 *PMP3* 遺伝子の相同遺伝子を検索し、PCR 法により単離した。

(2) *OsPMP3* タンパク質の機能解析には *PMP3* 遺伝子欠損酵母 ($\Delta pmp3$) を使い、 $\Delta pmp3$ 酵母の *OsPMP3* 遺伝子群による相補性を検定した。

(3) イネにおける *OsPMP3* 遺伝子群の発現解析は、Northern ブロット分析またはリアルタイム RT-PCR 法により行った。

(4) *OsPMP3-3* 遺伝子を CaMV35S プロモーターの下流に導入した pCambia1300 ベクターを作製し、アグロバクテリウム法によりイネに導入した。

4. 研究成果

(1) イネの *PMP3* 遺伝子群を単離するため、酵母 *PMP3* 遺伝子の相同遺伝子をイネの EST データベースから BLAST 検索を行った。その結果、少なくとも 7 つの相同遺伝子を単離し、*OsPMP3-1* から *OsPMP3-7* 遺伝子と命名した。*OsPMP3-1* から *OsPMP3-7* 遺伝子配列からの予想アミノ酸配列から系統樹を作成した。その配列はイネおよびその他の植物種内で高度に保存されていた (図 1)。

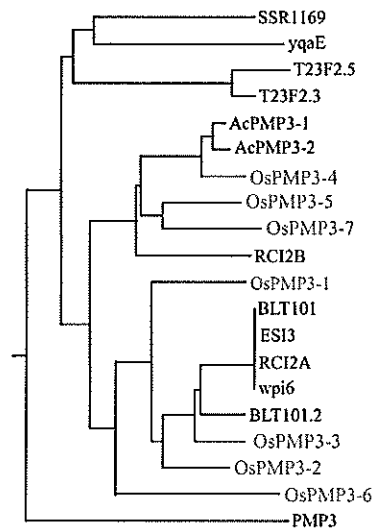


図 1 *PMP3* タンパク質の系統樹

(2) 酵母細胞では、*PMP3* 遺伝子の欠損により Na^+ イオンの蓄積が過剰になり、塩感受性が増加することが報告されている (Navarre and Goffeau 2000)。そこで本研究により単離した *OsPMP3* 遺伝子群を *PMP3* 遺伝子欠損酵母株 ($\Delta pmp3$) に導入し表現系を調べることで、*OsPMP3* 遺伝子群の相補性検定をおこなった。

その結果、*OsPMP3-1*, *-2*, *-3*, *-4*, *-5*, *-7* が酵母 *PMP3* の機能を相補したが、*OsPMP3-6* は相補しなかった。また、*OsPMP3-1* および *OsPMP3-7* の相補性程度は他の遺伝子群に比べて小さかった。

(3) イネにおける *OsPMP3* 遺伝子群の発現解析をおこなうため、3 週間水耕栽培したイネに NaCl 、乾燥、低温または過酸化水素による酸化ストレスを与えた。また非生物ストレス耐性機構におけるシグナル伝達物質であるアブシジン酸も同様に処理した。処理後各時間後にシュートおよび根を採取し、RNA 調整に用いた。

その結果、7 つの *OsPMP3* 遺伝子群のうち、*OsPMP3-3*, *-4*, *-5* 遺伝子が非生物ストレス処理によりその転写量が増加した (図 2)。また、7 つの *OsPMP3* 遺伝子のイネ植物体にお

ける発現部位を調べたところ、主に葉身または根において発現量が多く見られた。

In situ ハイブリダイゼーション法によりストレス応答性 *OsPMP3* 遺伝子の組織内局在性を調べたところ、葉身では葉肉組織、根では側部根冠において mRNA が検出された(図3)。

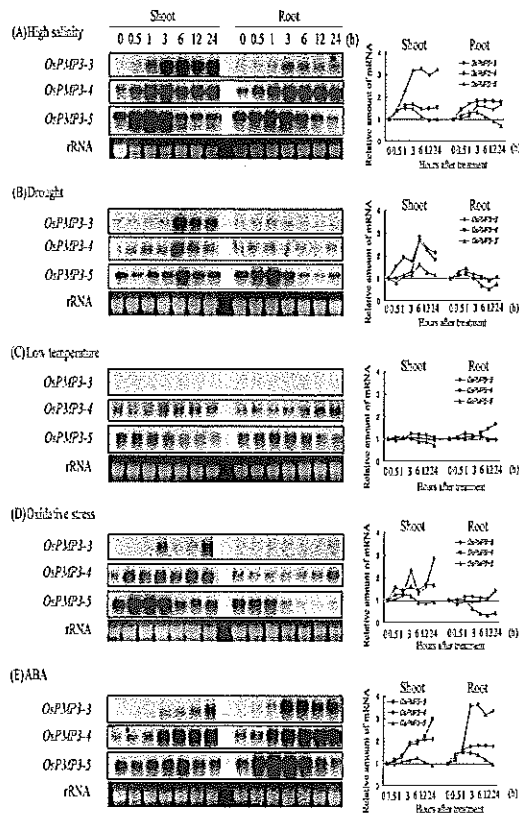


図2 様々な処理をしたイネにおける *OsPMP3* 遺伝子の発現解析

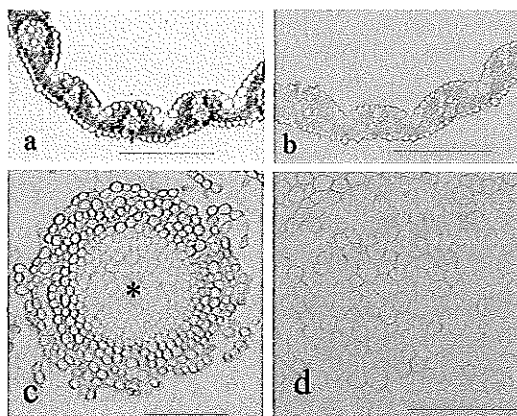


図3 葉身および根における *OsPMP3-4* 遺伝子の発現解析. a, b: 葉身, c, d: 根. a, c: アンチセンスプローブ, b, d: センスプローブ.

(4) *OsPMP3* 遺伝子の過剰発現によるイネの

耐塩性向上を試みた。そのために組織非特異的高発現プロモーターである CaMV35S プロモーターの下流に *OsPMP3-3* 遺伝子をつなぎ、イネにアグロバクテリウム法により導入した。Northern ブロット分析の結果、野生型イネに比べて *OsPMP3-3* 過剰発現イネにおける *OsPMP3-3* 遺伝子発現量は高かった。Empty ベクター導入イネ (Emp) における *OsPMP3-3* 遺伝子発現レベルは野生型と同様であった。

Emp および *OsPMP3-3* 遺伝子発現イネを水耕栽培し、塩ストレス処理を施した。その結果、対照区では Emp に比べて *OsPMP3-3* 過剰発現株の成長が小さかったが、塩ストレス処理区では Emp と *OsPMP3-3* 過剰発現株の成長の違いが見られず、相対的に耐塩性の向上が見られた。しかし塩ストレス下でのカルシウムシグナル伝達関連遺伝子の発現量に Emp との差は見られなかった。

また、対照区における Emp および *OsPMP3-3* 遺伝子過剰発現株の植物体におけるイオンを ICP-AES 分析したところ、複数のイオン含量がそれぞれ増加または減少したことから、*OsPMP3-3* 遺伝子の過剰な発現によりイオン恒常性の異常が起こったと考えられた。

(5) 本研究の結果、イネから7つの *PMP3* 遺伝子 (*OsPMP3* 遺伝子) の単離に成功した。*OsPMP3-3*, -4, -5 遺伝子が特にストレスにตอบสนองして遺伝子発現量が増加したことから、これらの遺伝子が特に葉肉組織および側部根冠において塩ストレス時に Na^+ イオンの吸収抑制およびイオン恒常性の維持に重要であることが示唆された。また *OsPMP3-3* 遺伝子の発現量を増加させたところイネの耐塩性がわずかながら増加したことから、今後プロモーターを工夫して *OsPMP3* 遺伝子を導入することにより、イネの耐塩性のさらなる向上につながると考えられた。

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7件)

- ① Fujiwara T., Mitsuya S., Miyake H., Hattori T., Takabe T. Characterization of a novel glycinebetaine/proline transporter gene expressed in the mestome sheath and lateral root cap cells in barley. *Planta* 232, 133-143. 2010. 査読有り
- ② Yamane K., Mitsuya S., Taniguchi M. and Miyake H. Transcription profiles of genes encoding catalase and ascorbate peroxidase in the rice leaf tissues under salinity. *Plant Prod. Sci.* 13, 164-168. 2010. 査読有り

- ③ Mitsuya S., El-Shami M., Sparkes I., Charlton W., De Marcos Lousa C., Johnson B., Baker A. Salt stress causes peroxisome proliferation, but inducing peroxisome proliferation does not improve NaCl tolerance in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE 5, e9408. 2010. 査読有り
- ④ Mitsuya S., Yokota Y., Fujiwara T., Mori N. and Takabe T. OsBADH1 is possibly involved in acetaldehyde oxidation in rice plant peroxisomes. FEBS Lett. 583, 3625-3629. 2009. 査読有り
- ⑤ Yamane K., Mitsuya S., Kawasaki M., Taniguchi M., Miyake H. Antioxidant capacity and damages caused by salinity stress in apical and basal regions of rice leaf. Plant Prod. Sci. 12(3), 319-326. 2009. 査読有り
- ⑥ Hattori T., Mitsuya S., Fujiwara T., Jagendorf A. T., Takabe T. Tissue specificity of glycinebetaine synthesis in barley. Plant Sci. 176, 112-118. 2009. 査読有り
- ⑦ Fujiwara T., Hori K., Ozaki K., Yokota Y., Mitsuya S., Ichiyangi T., Hattori T., Takabe T. Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley. Physiol. Plant. 134, 22-30. 2008. 査読有り
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 三屋史朗・横田由香・藤原崇志・高倍鉄子. イネのペルオキシソームにおけるベタインアルデヒド脱水素酵素の機能解析. 第 229 回日本作物学会講演会, 2010 年 3 月 30 日, 宇都宮.
- ② 藤原崇志・三屋史朗・服部侑・高倍鉄子. オオムギにおけるベタイン/プロリン輸送体 HvGB/ProT1 の解析. 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010 年 3 月 18 日, 熊本.
- ③ 三屋史朗・横田由香・藤原崇志・高倍鉄子. OsBADH1 はイネのペルオキシソームにおけるアセトアルデヒド酸化に関与する. 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010 年 3 月 18 日, 熊本.
- ④ 服部侑・三屋史朗・藤原崇志・高倍鉄子. シロイヌナズナの生育および耐塩性におけるコリンリン酸化の役割. 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010 年 3 月 18 日, 熊本.
- ⑤ Mitsuya S., Takabe T. Characterization of physiological function of Plasma Membrane Protein 3 in salt tolerance of rice and Arabidopsis plants. Plant Biology 2009, 2009 年 7 月 18 日, ハワイ.
- ⑥ Takabe T., Kajita H., Takabe T., Hayashi T., Mitsuya S. Overexpression of DnaK from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* enhances growth rate as well as abiotic stress tolerance of poplar plants. Plant Biology 2009, 2009 年 7 月 18 日, ハワイ.
- ⑦ Fujiwara T., Mitsuya S., Hattori T., Takabe T. Functional characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley. Plant Biology 2009, 2009 年 7 月 18 日, ハワイ.
- ⑧ 服部侑・三屋史朗・藤原崇志・高倍鉄子. オオムギのグリシンベタイン合成の組織特異性に関する研究. 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009 年 3 月 21 日, 愛知.
- ⑨ 服部侑・三屋史朗・藤原崇志・高倍鉄子. シロイヌナズナのコリンおよびホスファチジルコリン代謝機構の解析. 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009 年 3 月 21 日, 愛知.
- ⑩ 藤原崇志・三屋史朗・服部侑・高倍鉄子. オオムギにおけるベタイン輸送体 HvGBT1 の解析. 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009 年 3 月 21 日, 愛知.
- ⑪ 横田有香・三屋史朗・尾崎啓子・藤原崇志・高倍鉄子. イネにおけるベタインアルデヒド脱水素酵素の機能解析. 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009 年 3 月 21 日, 愛知.
- ⑫ 尾崎-河野啓子・横田有香・三屋史朗・高倍鉄子. 塩性イネ科植物のベタインアルデヒド脱水素酵素の機能解析. 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009 年 3 月 21 日, 愛知.

- ⑬ Hattori T., Mitsuya S., Fujiwara T., Takabe T. Tissue specificities of BADH gene expression and glycinebetaine synthesis in barley. 第5回国際作物科学会議, 2008年4月14日, 濟州島.

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~symbiosis/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三屋 史朗 (MITSUYA SHIRO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号: 70432250