

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580025

研究課題名(和文) アイスプラントの表皮塩集積細胞の形成と機能を制御する分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for development and function of epidermal bladder cells in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*.

研究代表者

東江 栄 (Agarie, Sakae)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：50304879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アイスプラントの耐塩性及び塩集積能に関与するブラッター細胞の形成に関わる遺伝子を単離するために、シロイヌナズナのトライコームとワタの繊維の形成に関わる遺伝子と相同性の高い遺伝子を単離し発現量を調べた。野生株では、トライコーム及び繊維の形成に関わるGL2及びMYB2が強く発現し、突然変異体では、トライコームの形成を抑えるCPC及びTRYが強く発現していた。SSH法を用いて野生株で強く発現するWM10及びWM28、変異株で強く発現するMW3、MW21、及びMW31を単離した。WM10とWM28は報告のない新規遺伝子であった。変異株のWM28の転写開始点上流はシス因子C-boxが欠損していた。

研究成果の概要(英文)：The common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum* L., a halophyte develops epidermal bladder cells (EBCs) on the aerial surfaces for the sequestration of excess salt from metabolically active tissues. To elucidate the molecular determinants governing EBC development, we examined the relative steady-state mRNA abundance of orthologs of cotton fiber-related genes and *Arabidopsis* trichome-related genes in wild-type plants and a mutant lacking EBCs. We also isolated genes by cDNA-based suppressive-subtractive hybridization (SSH) PCR. Among them, a putative GLABRA2 and a MYB transcript factor homolog were preferentially expressed in wild-type plants, whereas a putative TRIPTYCHON and CAPRICE-like gene were preferentially expressed in the EBC mutant. Two of SSH-derived clones (WM10 and WM28) were preferentially expressed in wild-type plants, whereas MW3, MW21 and MW31 were preferentially expressed in the mutant. The WM10 and WM28 showed no similarity to any genes previously reported.

研究分野：作物学

キーワード：アイスプラント 遺伝子発現 塩生植物 耐塩性 トライコーム ブラッター細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ブラッター細胞

ブラッター細胞は、ハマミズナ科の塩生植物アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) の体表面に形成される塩集積細胞である。アイスプラント以外にも塩生植物の中で特に耐塩性の高い種は同様の細胞をもつ。一般的な作物は約 100 mM (海水の約 5 分の 1) 程度の NaCl で枯死するが、アイスプラントは 800 mM でも生育する。事前調査では、体内に集積した NaCl は乾燥重量の約 40% に達し、1 個体あたり約 14 g、耕地面積 1 ヘクタールあたりでは約 2 トンと試算された。

(2) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

ブラッター細胞の機能や形成機構を分子レベルで解析した例は応募者の研究以外にはない。ブラッター細胞は表皮系起源の突起様構造であるトライコームから進化したと考えられているが、進化発生学的な研究は行われていない。

(3) 応募者のこれまでの研究成果及び着想に至った経緯

アイスプラントの耐塩性及び塩集積能に対するブラッター細胞の寄与度を明確にし、その形成に関わる遺伝子を単離する目的で、ブラッター細胞を欠失した突然変異体を作成した。変異体は、高塩環境下における生長量及び NaCl 含量が低く、K⁺ 及び NO₃⁻ 含量等が NaCl 処理によって大きく低下した。このことから、ブラッター細胞がアイスプラントの耐塩性、塩集積能、及びイオン恒常性に深く関わっていることが示唆された (Agarie et al., 2007)。ブラッター細胞はトライコームから進化したと考えられる。トライコーム及び繊維の形成に関する研究のモデルであるシロイヌナズナ及びワタのトライコーム及び繊維形成関連遺伝子と相同性の高いアイスプラントの遺伝子について発現解析を行ない、ブラッター細胞の形成に関与している候補遺伝子を推定した。また、サプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション (SSH) 法によって野生株と変異株とで発現量の異なる遺伝子の単離を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、塩集積細胞を付与した高度耐塩性作物の創出を最終目標に、アイスプラントのブラッター細胞の形成制御機構を分子レベルで解析し、塩集積機能の分化に関わる分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

トライコーム及び繊維の形成に関わる遺伝子、NaCl の取り込み及びイオン恒常性に関わる遺伝子、及び SSH 法で単離した遺伝子等を単離し塩基配列を決定し機能を推定

する。あわせて発現解析を行い、野生株と変異株との間で発現量の異なる遺伝子を同定する。また、これら遺伝子のゲノム上の転写開始点 5' 上流域 (プロモーター領域) を単離し塩基配列を決定して、突然変異部位を同定するとともに機能を推定する。あわせて、単離した遺伝子及びプロモーターを変異体及び他種植物に導入するためのベクターを構築し、野生株かトライコームをもたないシロイヌナズナ変異体に導入した組み換え体の表現型の解析からブラッター細胞の形成を制御する遺伝子とその制御因子を明らかにする。

4. 研究成果

ブラッター細胞はトライコームの一種と考えられるため、シロイヌナズナのトライコームとワタの繊維の形成に関わる遺伝子と相同性の高いアイスプラントの遺伝子を単離し発現量を調査するとともに、cDNA 全長の塩基配列を決定した。また、変異株と野生株とで発現量に差のある遺伝子を SSH 法で単離し、cDNA 全長の塩基配列を決定した。さらに、ブラッター細胞の機能に関わる遺伝子として、液胞膜の物質輸送に関わる遺伝子の発現量を変異株と野生株とで比較した。以下にそれぞれについて詳述する。

(1) トライコーム及び繊維関連遺伝子の発現

シロイヌナズナのトライコーム形成関連遺伝子として報告のある TG1, CPC, AN, WRM, GL2, TRY, TFCA, CRK, またワタの繊維形成関連遺伝子として報告のある MYB2, ACY, SCP, TUB1, ACT, SUT1, ABP, RAC1, PFN1, EF1A4, RDL, FDH, TUA6, CESA, SUSY, EXP1, MAPK, ACT1, CER6 等と相同性の高いアイスプラントの遺伝子の塩基配列情報を TIGR (The Institute of Genomic Research) 及び NCBI (National Center for Biotechnology Information, 米国国立バイオテクノロジーセンター) のデータベースから取得し、RT-PCR 法で、発現量を野生株と変異株とで比較した。その結果、アイスプラント野生株では、シロイヌナズナのトライコームの形成に関わる GL2 及びワタの繊維形成に関連する MYB2 が高く発現していた。一方、変異体では、シロイヌナズナのトライコームの形成を抑える遺伝子 CPC 及び TRY が強く発現していた。ワタの遺伝子及びシロイヌナズナの遺伝子との相同性はそれぞれ 60-86% 及び 58-77% であった。変異株と野生株とで発現量に差のみられた遺伝子については、cDNA 全長を取得し塩基配列を決定した。

(2) SSH 法により単離した遺伝子の発現と推定された機能

SSH 法で単離した遺伝子のうち、WM10 及び WM28 が野生株で強く発現し、MW3, MW21, 及び MW31 等が変異株で強く発現していた。特に WM28 は野生株でのみ発現していた。これ

らの全長 cDNA を取得し、他種遺伝子との相同性を調べたところ、MW3 は、茎特異的タンパク質 TSJT1 様遺伝子、MW21 はセリン/スレオニン/チロシンキナーゼ HT1 様遺伝子 MW31 はリポゾーマル生合成 NSA2 様遺伝子とそれぞれ相同性が高かった。WM10 と WM28 は報告のない新規遺伝子であった。cDNA を単離する過程で WM28 は非翻訳領域の塩基配列が異なるアイソフォームが少なくとも 2 つあることが判明し、それぞれ WM28-1 及び WM28-2 とした。cDNA 全長の塩基配列を決定し、両者に相同性の高い部位で PCR を行ったところ、WM28-1 は野生株にのみ発現しており、WM28-2 はいずれにも発現していた。WM28-1 の発現量に違いのみられた要因を明らかにするために、発現を制御するプロモーターを含む転写開始点上流約 1600bp を単離した。予想された通り、この部位の塩基配列は両者で異なり、変異体は C-box とよばれるシス因子が欠損していることが明らかになった。

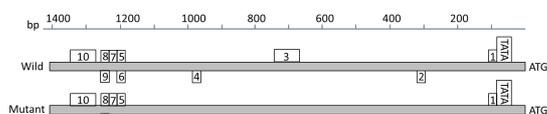


図1. 野生株とブラッター細胞欠損変異体から単離したWM28のプロモーターの構造。上部の数字は転写開始コンからの塩基対の数を示す。灰色のバーの上にある数字はプロモーター領域に含まれている制御因子。変異体には3で示した制御因子が欠如している。

表1. 野生株と変異株から単離したMW28プロモーターに見出された転写制御因子結合部位。

Numbers	Putative transcription factor binding sites
1	Triticum aestivum /GENE: Amy2/54/RE: Inr element
2	Arabidopsis thaliana /GENE: AtCRC/RE: EL1 /BF: LFY
3	Lycopersicon esculentum /GENE: PG/RE: C-box /BF: fruit nuclear protein extracts
4	Arabidopsis thaliana /GENE: CPC/RE: WBSI /BF: WER
5	Zea mays /GENE: a1/RE: C1 PBS/P /BF: C1
6	Nicotiana tabacum /GENE: LTR-Tto1/RE: 13 bp-box /BF: unknown nuclear factor
7	Various plants /GENE: chsA/RE: box 1 /BF: Unknown nuclear factor
8	Eucalyptus gunnii /GENE: EgCAD2/RE: MYBa /BF: MYB
9	Eucalyptus gunnii /GENE: EgCCR/RE: MYB B5 /BF: MYB
10	Glycine max /GENE: Synthetic oligonucleotides/RE: GmMYB92 B53 /BF: GmMYB92

単離した遺伝子の機能を形質転換体を用いて調べるために、トライコーム及び繊維形成関連遺伝子及び SSH 法で単離した機能未知遺伝子の cDNA 全長を組み込んだ発現ベクターを構築した。

(3) 液胞の機能に関わる遺伝子の発現

ブラッターの機能を制御する遺伝子として、カリウムトランスポーターをコードする遺伝子 McHAK1, McHAK2, McHAK3, McHAK4, Ktm1, 硝酸イオントランスポーターをコードする遺伝子 McNRT1, NaCl の取り込みに必要なプロトン勾配を生成する液胞膜プロトン ATPase をコードする遺伝子 Vmac1, 水輸送タンパク質アクアポリン McMipC をコードする遺伝子の発現量を野生株と変異株とで比較したが、変異株と野生株との間に明確な差異は認められなかった。

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 2 件)

1) Tsukagoshi, H., T. Suzuki, K. Nishikawa, S. Agarie, S. Ishiguro, T. Higashiyama: RNA-seq analysis of the response of the halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum* (ice plant) to high salinity, PLoS One. 2015; 10:e0118339. doi:10.1371/journal.pone.0118339. eCollection 2015. (査読有り)

2) 東江栄: アイスプラントの高塩環境適応機構とその応用, 極限環境生物学会誌, 12, 56-64 (2013)(査読有り)

[学会発表](計 21 件)

1) Roern, S, Hoshino, N., Soejima, K., Inoue, Y., Cushman J.C., Agarie, S.: アイスプラントの表皮ブラッター細胞関連遺伝子の機能解析, 第 239 回日本作物学会講演会, 2015 年 3 月 27 日. 日本大学生物資源科学部湘南キャンパス. 神奈川県藤沢市.

2) 東江栄, 森眞智子, 藤森由紀, 正木花苗, 近藤歩, 諸隈正裕, John C. Cushman: アイスプラント新品種 KA-I243 の諸特性と品種識別用遺伝子マーカーの作成, 第 239 回日本作物学会講演会, 2015 年 3 月 27 日. 日本大学生物資源科学部湘南キャンパス. 神奈川県藤沢市.

3) 東江栄, 一色納菜子, 出瑤子, 川本紗規子, 山口修平: 数種 CAM 植物の CAM 関連酵素遺伝子プロモーターの構造と機能に関する研究, 第 239 回日本作物学会講演会, 2015 年 3 月 27 日. 日本大学生物資源科学部湘南キャンパス. 神奈川県藤沢市.

4) Roem, S., M. Hashimoto, K. Soejima, Y. Inoue, J. C. Cushman and S. Agarie: Isolation of genes responsible for the development of epidermal bladder cells in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* L., Phytogene Symposium VII, 2014 年 9 月 30 日, かがわ国際会議場. 香川県高松市.

5) Ysshiki, N., Y. Ide, S. Kawamoto, S. Yamaguchi, and S. Agarie: Functional analysis of the promoter regions of CAM related genes, Phytogene Symposium VII, 2014 年 9 月 30 日, かがわ国際会議場. 香川県高松市.

6) Konishi, A. and S. Agarie: Halophyllum in higher plants - NaCl stimulation of growth in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* L. -, Phytogene Symposium VII, 2014 年 9 月 30 日, かがわ国際会議場. 香川県高松市.

7) Arima, Y., and S. Agarie: Factors involved in shoot regeneration recalcitrance in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* L., Phytogene Symposium VII, 2014 年 9 月 30 日, かがわ国際会議場. 香川県高松市.

8) 東江栄, 藤森由紀, 正木花苗, 近藤歩, John C. Cushman: アイスプラント新品種 KA-I243 の外形的特徴と DNA 多型, 園芸学会平成 26 年度秋季大会, 2014 年 9 月 27 日, 佐賀大学. 佐賀県佐賀市.

9) 橋本舞花, 副島健太郎, 井上優香, John C. Cushman, 東江栄: アイスプラント表皮塩集積細胞形成遺伝子の単離, 日本作物学会第238回講演会, 2014年9月10日, 愛媛大学・愛媛県松山市.

10) Roeum, S., M. Hashimoto, K. Soejima, Y. Inoue, J. C. Cushman, and S. Agarie: Analysis of gene expression involved in the development of epidermal bladder cells in the common ice plant,

Mesembryanthemum crystallinum L. 日本作物学会第238回講演会, 2014年9月10日, 愛媛大学・愛媛県松山市.

11) 小西絢子, 大西茂彦, 東江栄: 塩生植物の耐塩性機構 アイスプラント培養細胞の成長に及ぼす NaCl の影響, 日本作物学会第238回講演会, 2014年9月10日, 愛媛大学・愛媛県松山市.

12) 一色納葉子, 出瑤子, 川本紗規子, 山口修平, 東江栄: 数種 CAM 植物から単離した CAM 関連遺伝子プロモーターの構造と機能に関する研究, 日本作物学会第238回講演会, 2014年9月10日, 愛媛大学・愛媛県松山市.

13) 東江栄, 小西絢子, 大西茂彦: NaCl による成長促進効果のメタボローム解析, 日本作物学会第238回講演会, 2014年9月9日, 愛媛大学・愛媛県松山市.

14) 有馬友佳子・東江栄: アイスプラント形質転換技術の確立に関する研究 - *in planta* 法の検証と再分化関連遺伝子の発現 - 第237回日本作物学会講演会, 2014年3月29日, 千葉大学・千葉県千葉市.

15) Hashimoto, M., K. Soejima, Y. Inoue, J.C. Cushman and S. Agarie: Isolation of genes for formation of bladder cells in the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum* L.), Phytogene Symposium VI, 2013年10月28日, 香川国際会議場・香川県高松市.

16) Isshiki, N., Y. Ide, S. Kawamoto, S. S. Yamaguchi and S. Agarie: Isolation and characterization of the promoter sequence of genes responsible for Crassulacean acid metabolism, Phytogene Symposium VI, 2013年10月28日, 香川国際会議場・香川県高松市.

17) Agarie, S., M. Tada, M. Kimura, and H. Suzuki: Remediation of tsunami-affected soils using the common ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.), Phytogene Symposium VI, 2013年10月28日, 香川国際会議場・香川県高松市.

18) Agarie, S.: CAM and bladder cells: Strategies for salt tolerance in a Halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum* L., Phytogene Symposium VI, 2013年10月28日, 香川国際会議場・香川県高松市.

19) 東江栄: アイスプラントの高塩環境適応機構とその応用, 極限環境生物学会第14回シンポジウム「極限環境生物研究の最前線」, 2013年6月15日, 東洋大学白山キャンパス・東京都文京区.

20) 多田将宏, 東江栄: アイスプラントを用いたファイトレメディエーション - 生育および無機成分含量に及ぼすセシウムの影響 -, 日本作物学会第235回講演会, 2013年3月28-29日, 明治大学生田キャンパス・神奈川県川崎市.

21) 多田将宏, 木村雅子, 鈴木均, 東江栄: 東北地方太平洋沿岸地域の津波被災土壌におけるアイスプラントの生育. 日本作物学会第234回講演会, 2012年9月10-11日, 東北大学川内北キャンパス・宮城県仙台市.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/agarie/Top.html>
<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/member/agarie/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
東江 栄 (AGARIE, Sakae)
香川大学・農学部・教授
研究者番号: 50304879

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: