

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450479

研究課題名(和文) 機能未知遺伝子が制御するダイズ耐塩性機構の解明と除塩型品種開発への利用

研究課題名(英文) Studies on salt tolerance mechanism regulated by the gene of unknown function toward improving tolerance of soybean

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズの機能未知遺伝子GmTDF-5はその過剰発現によりシロイヌナズナの耐塩性を向上させる。本研究では、植物の塩ストレス応答・耐性機構におけるGmTDF-5の役割を明らかにするため、同遺伝子に関する詳細な分子生物学的研究を行った。その結果、(1) GmTDF-5タンパク質はN末端側から20番目のリジン残基を介してユビキチン-プロテアソーム系で制御されること、(2) 同遺伝子によるシロイヌナズナの耐塩性向上にはユビキチン-プロテアソーム系による制御が必要であること、(3) 国内ダイズ遺伝資源の解析から、GmTDF-5転写量の高い品種は概して耐塩性が高い傾向を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：GmTDF-5, a soybean gene encoding a protein of unknown function, enhances salt tolerance of transgenic Arabidopsis plants. In this study, we investigated how GmTDF-5 protein plays a role in molecular response and tolerance strategies of soybean under high-salt stress. The results suggested that (1) GmTDF-5 protein is controlled functionally under ubiquitin-proteasome degradation system (UPS), (2) the UPS regulation to GmTDF-5 protein is involved in the increased salt tolerance of the transgenic Arabidopsis plants, and (3) transcriptional activation of GmTDF-5 gene might be related to increased salt tolerance of several soybean species in the Japanese genetic resources.

研究分野：環境農学

キーワード：ダイズ 塩ストレス 耐塩性 アルマジロリピート ユビキチン-プロテアソーム

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、植物体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行うために大規模な除塩作業と並行して、遺伝子組換え技術や分子育種を用いた耐塩性作物の開発が求められている。

我々はこの背景のもと、耐塩性ダイズの開発を目指した塩ストレス応答遺伝子群の機能解析を進めている。ダイズはその種子に脂質やタンパク質、イソフラボンなどの有用成分を豊富に含む主要な食用作物であり、その成分には工業用資材に転用できるものも多く含まれている。また、根粒菌との共生によって貧弱な土壌でも栽培できることから、本目的において実用化しやすい植物資源である。先行研究において塩ストレス応答に関与するダイズ遺伝子 106 種類を選抜し、それぞれの遺伝子機能や非生物ストレスに対する応答性を特徴付けている(Aoki et al., 2005)。その一つ、機能未知なタンパク質をコードする遺伝子 *GmTDF-5* について、シロイヌナズナを宿主に過剰発現株を作出したところ、同株が野生株の枯死する高濃度 NaCl 条件下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を測定したところ、両者に大きな差が見られないことから、過剰発現株では根における塩の吸収が制限されたのではなく、個々の細胞に強い耐塩性形質が付与されたことが推察された。この特性は、*GmTDF-5* が塩類集積土壌における食糧生産を目指した研究だけではなく、土壌から塩を回収できる除塩型品種の開発にも利用できることを示唆している。

2. 研究の目的

塩ストレスに対する植物の防御応答から考えると、シロイヌナズナでの耐塩性の向上は *GmTDF-5* が多岐にわたる複数の耐塩性形質を活性化させた可能性が高い。これまでの研究により、(1) 過剰発現株では塩・乾燥応答遺伝子群の一つ、*rd29A* の転写量が高くなること、(2) *in silico* 構造解析から、*GmTDF-5* がタンパク質との結合に関わる二つのドメイン、アルマジロリピートとロイシンジッパーをもつと予測されること、(3) GFP 融合型の *GmTDF-5* をタマネギ表皮細胞で発現させると、その蛍光が核もしくはその周辺で見られることを明らかにしており、現在のところ、*GmTDF-5* は塩ストレス応答遺伝子群を活性化させる情報伝達系か、転写制御系に関わる核内複合体として機能するのではないかと考えている。さらに最近の研究から、真核生物で主要な細胞内プロセスを制御するタンパク質分解系の一つ、ユビキチン - プロテアソームが *GmTDF-5* の発現制御に関わることを見出しており、*GmTDF-5* は転写レベルの調節に

加え、翻訳レベルでもその量を厳密に制御されなければならない塩ストレス応答・耐性機構に関与することが強く示唆された。しかし、*GmTDF-5* と結合するタンパク質や *rd29A* を含む塩ストレス応答遺伝子群を活性化させるメカニズム、*GmTDF-5* が関わる耐塩性機構におけるユビキチン - プロテアソームの役割、その結果として表れる耐塩性形質について具体的な知見は得られていない。また、*GmTDF-5* 機能を制御したダイズが応用・実用化研究へと展開できる優れた耐塩性を示すかの課題も残されている。

そこで本研究では、ダイズにおける機能未知遺伝子 *GmTDF-5* に関するこれらの課題を解決し、除塩型・耐塩性品種の開発に向けた具体的な遺伝資源の活用法などについて検討した。

3. 研究の方法

(1) ユビキチン - プロテアソームによる *GmTDF-5* タンパク質の発現制御に関する解析
分解性試験： *GmTDF-5* タンパク質に対するユビキチン - プロテアソームの作用を明らかにするため、ダイズ抽出液中における *GmTDF-5* の分解性を定量的に評価した。*GmTDF-5* タンパク質には、大腸菌を宿主に合成した GST 融合型組換えタンパク質 (N 末端ドメイン、全長) を使用し、ユビキチン化の標的となるリジン残基の特定には個々のリジン残基をアラニン残基に置換した変異型タンパク質を利用した。100 mM NaCl 処理したダイズ幼個体より調製した抽出液と組換えタンパク質を混和し、抽出液中での *GmTDF-5* の分解率について抗 GST 抗体を用いたウエスタン解析により定量化した。さらに、プロテアソーム阻害剤 MG132 の添加による分解率への影響にもとづき、ユビキチン - プロテアソームの関与を評価した。

形質転換植物の耐塩性試験：植物の耐塩性機構における *GmTDF-5* とユビキチン - プロテアソームの関係を明らかにするため、野生型 *GmTDF-5*、変異型 *GmTDF-5* を過剰発現する形質転換シロイヌナズナをそれぞれ作出し、耐塩性試験を実施した。各過剰発現系統は、CaMV35S プロモーター制御により GFP 融合型タンパク質を過剰発現できるプラスミドを有するアグロバクテリウムを感染させる Floral Dip 法により作成した。耐塩性試験では、ポット栽培したシロイヌナズナに 100 ~ 200 mM NaCl を与え、その後の生長率などから耐塩性能を評価した。

(2) 塩ストレスに対する *GmTDF-5* の発現制御機構に関する解析

GmTDF-5 遺伝子の 5'-側上流、隣接する遺伝子までの約 4.8 kb をプロモーター領域と仮定し、RT-PCR 法による転写開始点の絞り込みや塩基配列情報に基づく推定シス因子の探索を行った。さらに、*GmTDF-5* の組織特異

的発現性を特徴付けるため、Floral Dip 法により、同プロモーターで転写制御される GUS レポーター遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを作成した。

(3) *GmTDF-5* 高発現ダイズ品種の耐塩性に関する研究

除塩型・耐塩性ダイズの開発に利用できる育種素材を確立するため、ダイズ遺伝資源の中から *GmTDF-5* を高発現する品種を見出し、これらが同遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナ同様、高い耐塩性を示すかを評価した。農業生物資源ジーンバンク NIAS コレクションより分譲された日本のダイズ遺伝資源のうち、遺伝変異を広くカバーしている 12 品種について、成熟葉や根における塩ストレスに対する *GmTDF-5* の応答性を定量 RT-PCR により評価し、さらに各品種の耐塩性をリーフディスク法により特徴付けた。

(4) *GmTDF-5* 複合体の構成因子に関する研究

酵母ツーハイブリッドシステムにより *GmTDF-5* と結合するタンパク質を同定するため、野生型 *GmTDF-5* や変異型 *GmTDF-5* K20A の全長タンパク質を発現する Bait 酵母を作成し、さらに Prey 酵母として塩ストレス処理後、*GmTDF-5* mRNA 量が著しく増加するダイズ成熟葉由来の cDNA ライブラリーを構築した。

4. 研究成果

(1) ユビキチン - プロテアソームによる *GmTDF-5* タンパク質の発現制御と耐塩性機構における役割

先行研究により、*GmTDF-5* タンパク質がユビキチン - プロテアソームにより分解制御を受けること、その標的となるリジン残基が N 末端領域 100 アミノ酸残基内に存在することを突き止めている。そこで、この N 末端領域に存在するリジン残基 4 箇所それぞれをアラニン残基に置換した変異型 N 末端ドメインタンパク質を作成し、ダイズ抽出液中における分解性試験を実施した。その結果、野生型 *GmTDF-5* の N 末端ドメインはダイズ抽出液中で速やかに分解され、その分解がプロテアソーム阻害剤 MG132 によって抑制されたが、N 末端側から 20 番目のリジン残基を変異させた N 末端ドメインタンパク質 K20A が MG132 添加の有無によらず分解されないことを見出した。この現象は同位置のリジン残基に変異を入れた *GmTDF-5* 全長タンパク質の分解性試験でも観察されており、20 番目のリジン残基が *GmTDF-5* タンパク質のユビキチン化の標的になっていると判断した。そこで、ダイズの耐塩性機構におけるユビキチン - プロテアソームの生理的役割を明らかにするため、GFP を融合した野生型 *GmTDF-5*、変異型 *GmTDF-5* K20A の全長タンパク質を過剰発現する形質転換シロイヌナズナを作成し、両系統

の耐塩性を調べることにした。これまでの研究結果同様、*GmTDF-5* 発現株では高い耐塩性が認められたのに対して、変異型 *GmTDF-5* K20A 発現株では非形質転換株よりも耐塩性が低下しており、塩ストレス処理によらずシュートの伸長も著しく抑制される傾向を示した。以上の結果は、形質転換シロイヌナズナで観察された耐塩性の向上にユビキチン - プロテアソームによる *GmTDF-5* タンパク質の発現制御が必要であることを強く示唆した。

(2) *GmTDF-5* 遺伝子の塩ストレス応答機構と組織特異的発現性の特徴付け

RT-PCR により *GmTDF-5* の転写開始点を絞り込んだところ、開始コドン上流 -387 ~ -348 bp 内に主たる転写開始点が存在することを見出した。この近傍にはストレス応答遺伝子群に多く見られる TATA ボックスが存在せず、その他、転写制御に関わる GA-rich 配列などの基本シス因子も見られないことから、*GmTDF-5* は TATA レス型 / Coreless 型の転写制御システムをもつのではないかと考えられた。また、PLACE などのシス配列データベース検索を利用し、*GmTDF-5* プロモーター内に点在するシス因子を探索したところ、MYC や GT-1 といった水分ストレス応答に関わるシス因子群が見出され、*GmTDF-5* の塩ストレス応答ではこれらの因子が協調的に働いていることが推察された。次に、*GmTDF-5* の組織特異的発現性を特徴付けるため、同遺伝子プロモーターで制御される GUS 発現系を導入した形質転換シロイヌナズナを作成し、100 mM NaCl 処理前後の GUS 活性の分布を調査した。その結果、塩ストレス処理したシロイヌナズナ植物体のシュートの基部や葉などで GUS 活性が観察される傾向にあり、*GmTDF-5* が機能する塩ストレス応答・耐塩性機構がこれらの組織に存在していることが推察された。

(3) 除塩型・耐塩性ダイズの開発に向けた遺伝資源の探索と有用性評価

先行研究及び本研究課題により、*GmTDF-5* をシロイヌナズナで過剰発現させると耐塩性が上昇することを明らかにしている。この結果は、*GmTDF-5* が耐塩性品種の開発に利用できる遺伝子資源になりうること、また、同遺伝子を高発現する植物は高い耐塩性を示す可能性を示唆している。そこで、*GmTDF-5* 遺伝子の由来となった品種エンレイを含む国内ダイズ遺伝資源 12 品種について *GmTDF-5* の塩ストレス応答性および耐塩性を調べたところ、エンレイより *GmTDF-5* の転写量が高い品種は概して耐塩性が高い傾向を示すことが分かった。この結果から、*GmTDF-5* 高発現品種は耐塩性品種の開発に向けた親系統に利用できること、同遺伝子を耐塩性品種選抜用の遺伝子マーカーにできることが示唆された。また、*GmTDF-5* の遺伝子解析の結果から品種間での配列変異がほとんど見られ

ないことや、その過剰発現により耐塩性を向上させたシロイヌナズナにホモログ遺伝子が存在しないことから、*GmTDF-5* 転写量の増加は、*ダイズ*のみならず多様な植物種に対して耐塩性を高めることができると推察された。

(4) *GmTDF-5* 複合体構成因子の探索

GmTDF-5 はタンパク質との結合に関わる二つのドメイン(アルマジロリピート、ロインジッパー)をもつことから、*ダイズ*の塩ストレス応答・耐性機構において複合体を形成し機能していると考えている。当初、野性型 *GmTDF-5* を発現する Bait 酵母を作成したが、酵母に内在するユビキチン-プロテアソームの影響からかタンパク質を安定に発現させることができなかつた。そこで変異型 *GmTDF-5* K20A を発現する Bait 酵母を作成し同様の実験を試みたが、やはりタンパク質の発現を確認できなかつた。これらの結果から、酵母内では *ダイズ*における *GmTDF-5* の認識機構と異なるユビキチン-プロテアソームシステムが働いていると考えられ、今後は GFP 融合型 *GmTDF-5* もしくは変異型 *GmTDF-5* K20A を過剰発現するシロイヌナズナを利用した共免疫沈降法などにより、*GmTDF-5* に結合するタンパク質を同定したいと考えている。

(5) まとめ

本研究により、*GmTDF-5* を過剰発現する形質転換シロイヌナズナで見られた耐塩性の向上にはユビキチン-プロテアソームによる制御が必要であること、その耐塩性機構がシュートの基部や葉などに局在することを突き止めた。さらに、*GmTDF-5* は植物のストレス応答遺伝子にはあまり見られない TATA レス型 / Coreless 型の転写制御機構を有することも明らかにした。その他、国内 *ダイズ* 遺伝資源を用いた解析から、*GmTDF-5* 転写量の高い品種が高い耐塩性を示す傾向にあるなど、植物科学分野に関する分子学的な知見だけでなく、他分野との共同研究に発展できるデータも得ることができた。今後は、*GmTDF-5* と結合するタンパク質の特定を含め、植物の塩ストレス応答・耐性機構における *GmTDF-5* の分子生物学的研究を完成させ、遺伝子・タンパク質機能を改変した除塩型・耐塩性 *ダイズ* の開発を目指したい。

<引用文献>

Aoki A., Kanegami A., Mihara M., Kojima T., Shiraiwa M., Takahara H. (2005) Molecular cloning and characterization of a novel soybean gene encoding a leucine-zipper-like protein induced to salt stress. *Gene* 356:135-145.

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 0件)

[学会発表](計 2件)

小川 佳祐、木村 愛、佐藤 光朗、小島 俊雄、『*ダイズ耐塩性に関わる機能未知タンパク質 *GmTDF-5* のユビキチン-プロテアソームによる制御*』、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.03.28、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

須藤 弘樹、鈴木 美緒、木村 愛、野口 和斗、小島 俊雄、『*ダイズ塩ストレス応答における機能未知遺伝子 *GmTDF-5* の転写制御機構*』、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.03.28、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし