

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580217

研究課題名(和文)水欠乏により大量に作られるポプラのLEAタンパク質の機能解明と機能改変

研究課題名(英文)Functional analysis of the drought-induced LEA protein from Lombardy poplar

研究代表者

西口 満(NISHIGUCHI, Mitsuru)

独立行政法人森林総合研究所・生物工学研究領域・主任研究員

研究者番号：80353796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：樹木の環境ストレス応答機構に関わるLEAタンパク質の機能を解明するために、ポプラのLEAタンパク質遺伝子の機能解析を行った。他植物のLEAタンパク質の配列に基づいて、ポプラから複数のLEAタンパク質のcDNAを単離し、塩基配列を決定した。LEAタンパク質遺伝子のうち、PnLEA1遺伝子の発現は、乾燥や高塩、低温で誘導された。PnLEA1を発現している大腸菌は高塩培地での初期増殖が回復したことから、PnLEA1が高塩環境下における細胞の初期適応性を高めることが分かった。一方、PnLEA1を過剰発現する遺伝子組換えポプラの乾燥耐性は、対照のベクター組換えポプラとほぼ同じだった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the function of LEA proteins inferred to be involved in the response to environmental stress in woody plants, the cDNAs of LEA proteins were isolated from Lombardy poplar and were investigated. Among of the poplar LEA genes, the expression of PnLEA1 was induced by drought, high salinity and low temperature. We found that PnLEA1 plays an important role for initial adaptation to salinity stress, because the expression of PnLEA1 recovered the delay in cell growth of *Escherichia coli* under high salinity. However, the PnLEA1-overexpressed poplar plants were withered after about 14 days without watering as well as empty vector control plants.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林科学

キーワード：ポプラ LEA 環境ストレス 遺伝子組換え 耐塩性 発現機構 樹木

## 1. 研究開始当初の背景

LEA タンパク質 (late embryogenesis abundant protein、後期胚発生蓄積タンパク質) は、1981 年に、綿の種子中で胚発生時に大量に作られるタンパク質として発見された。後に、他の植物の種子や、花粉からも見つかっている。また、水欠乏、高塩、低温といったストレスを植物に与えた場合に、葉などの栄養器官でも LEA タンパク質が作られることから、LEA タンパク質は植物のストレス応答機構に関わると考えられてきた。実際に、LEA タンパク質の遺伝子を組換えて、LEA タンパク質を大量に作るようにした遺伝子組換え植物(シロイヌナズナ、イネなど)では、乾燥や高塩などのストレス条件下において、非組換え植物よりも生育が良いことが報告されている。

マツ属やポプラ属、ツツジ属の樹種を乾燥や低温ストレスにさらすと、LEA タンパク質の遺伝子の発現量(遺伝子がはたらいっている量)が増加することが報告されていた。しかし、樹木の LEA タンパク質の生理学的な役割や生化学的な性質については分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、広葉樹のポプラ(*Populus nigra* var. *italica*) の LEA タンパク質について、その生理学的な役割と生化学的な性質を明らかにすることである。特に、環境ストレスに対する LEA タンパク質の機能に着目して研究を進め、樹木の環境ストレス応答機構の理解の一助とする。

## 3. 研究の方法

### (1) LEA タンパク質遺伝子の単離と構造解析

LEA タンパク質の遺伝子(cDNA)を単離するために、ポプラの苗木への灌水を止めて水欠乏状態にし、葉から RNA を抽出した。シロイヌナズナの LEA タンパク質遺伝子の塩基配列、およびポプラの EST 情報に基づいて、PCR 用の合成 DNA プライマーを設計し、先の RNA を鋳型に RT-PCR 法を行った。得られた LEA タンパク質の cDNA の塩基配列を決定した。

### (2) LEA タンパク質遺伝子の発現変動

LEA タンパク質遺伝子の発現解析のため、ポプラの苗木を、乾燥、高塩(200 mM 塩化ナトリウム)、高温(45℃)、低温(4℃)処理し、葉から RNA を抽出した。発現している LEA タンパク質遺伝子の mRNA 量は、定量的リアルタイム PCR 法で測定した。

### (3) LEA タンパク質遺伝子を導入した大腸菌の高塩耐性

LEA タンパク質の cDNA を大腸菌用発現ベクターである pET24-a(+) に組み込み、大腸菌 BL21(DE3) 株に導入した。L 液体培地に塩化ナ

トリウムを添加して、大腸菌の増殖を 660 nm の吸光度で測定した。

### (4) LEA タンパク質遺伝子の組換えポプラの解析

LEA タンパク質を過剰発現する遺伝子組換えポプラを作出するため、LEA タンパク質の cDNA をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターとタバコモザイクウイルス配列の下流につないだベクターを作製した。アグロバクテリウム法を用いて、ベクターをポプラに導入し、カナマイシン耐性を指標にして、遺伝子組換えポプラの選抜を行った。遺伝子組換えポプラの確認のため、PCR 法で導入遺伝子の存否を、定量的リアルタイム PCR 法で導入遺伝子の発現量を調べた。遺伝子組換えポプラの乾燥に対する耐性を評価するため、鉢植えにした遺伝子組換えポプラの灌水を止めて、枯死までの様子を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) LEA タンパク質遺伝子の単離と構造解析

ポプラの EST 情報とシロイヌナズナの LEA タンパク質遺伝子の情報とを比較した結果、ポプラゲノムには複数の LEA タンパク質遺伝子が存在することが分かった。そこで、水欠乏処理したポプラの RNA から、下記の LEA タンパク質の cDNA を単離し、塩基配列の決定とアミノ酸配列の推測を行った。

#### PnLEA1

この LEA タンパク質は 180 アミノ酸残基(分子量は 18.3kDa) からなると予想され、内部に LEA グループ 1 に特徴的な配列を持っていることから、PnLEA1 と名付けた(図 1)。PnLEA1 に類似しているポプラ属以外の生物種のタンパク質としては、ダイズ属の種子に含まれる LEA4 (相同性は 60%) や、シロイヌナズナの LEA4-5 (相同性は 52%) があつた。

#### PnLEA2

この LEA タンパク質は 314 アミノ酸残基からなると予想され、内部に LEA グループ 2 に特徴的な配列を二か所持していることから、PnLEA2 と名付けた(図 1)。PnLEA2 に相同なタンパク質としては、ハマミズナ科の多肉植

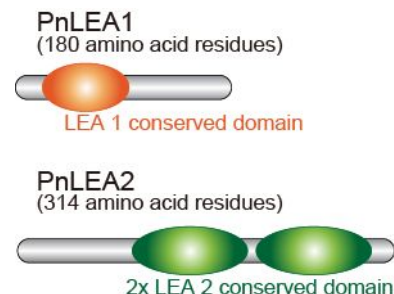


図1 ポプラの LEA タンパク質の構造模式図

物である *Sesuvium* 属植物の塩耐性タンパク質3（相同性は76%）や、シロイヌナズナのLEA2（相同性は73%）があった。

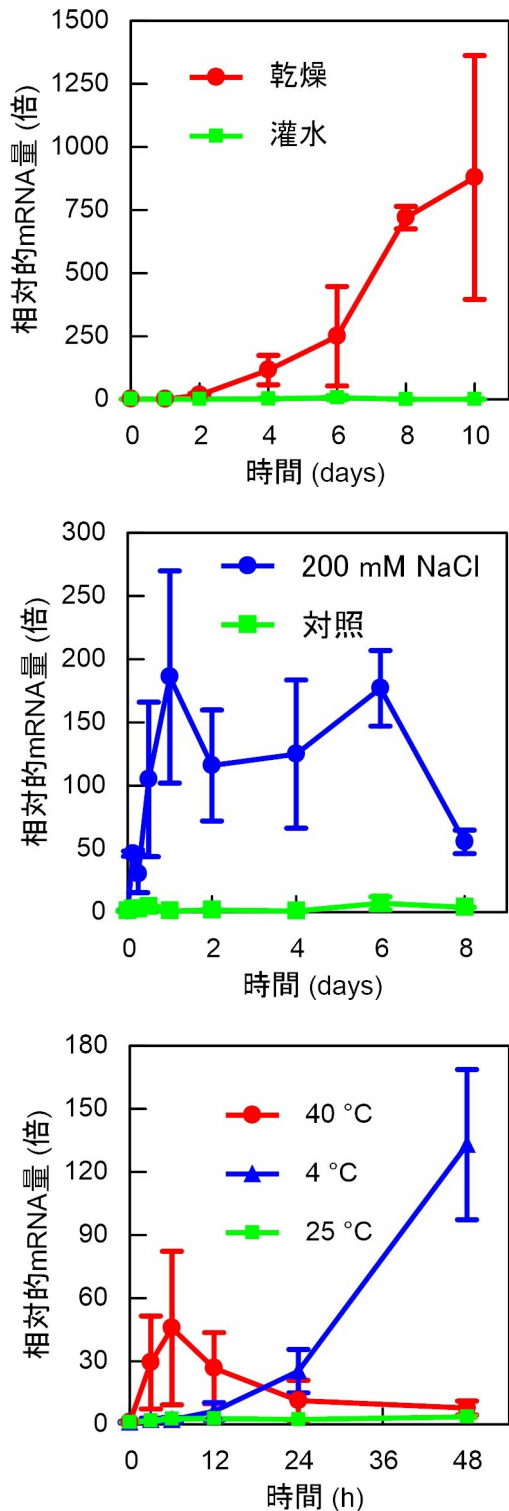


図2 環境ストレスによるポプラのPnLEA1の発現変動  
ポプラの苗木に、乾燥（灌水停止、上段）、高塩（中段）、高温・低温（下段）の各処理を行った。横軸は、処理開始からの時間を表している。mRNA量は、処理開始時の発現量を1とした相対量で示している。

(2) LEA タンパク質遺伝子の発現変動  
ポプラの LEA タンパク質が、乾燥などの環境ストレス応答機構に關与するかどうかを明らかにするために、PnLEA1 遺伝子の発現変動を調べた。その結果、土壤水分含量が低下し乾燥が進むにつれて、LEA タンパク質遺伝子の発現量が約 900 倍まで上昇していくこと、200 mM 塩化ナトリウムを与えた後、数時間で遺伝子発現が誘導され、100 倍から 200 倍に達すること、40 の高温では 25 に比較して遺伝子発現に有意な差は見られないが、4 の低温にすると約 130 倍に発現量が上昇することを発見した（図2）。これらの結果は、ポプラの LEA タンパク質が、乾燥だけでなく高塩や低温など様々な環境ストレス応答に關与することを示唆している。

(3) LEA タンパク質遺伝子を導入した大腸菌の高塩耐性  
ポプラの LEA タンパク質が、様々な環境ストレスによって発現誘導されることから、LEA タンパク質がストレス応答に關与していることが予想された。そこで、LEA タンパク質の遺伝子を大腸菌で発現させ、高塩培地での増殖を調べた。  
大腸菌が増殖し細胞の密度が高くなるにつれて、吸光度も上がる（図3）。培地に 1 M 塩化ナトリウムを加えると、増殖の立ち上がり（誘導期）が大きく遅れた。また、最終的な細胞密度も約 60%に低下した。一方、PnLEA1 タンパク質および PnLEA2 タンパク質を発現している大腸菌では、1 M 塩化ナトリウム中

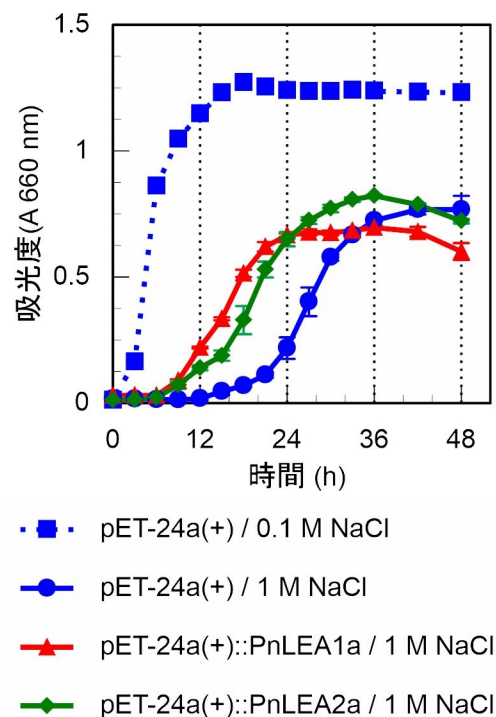


図3 LEA タンパク質を発現している大腸菌の増殖曲線  
発現誘導には 1 mM IPTG を用いた。

でも誘導期が短くなり、早期に増殖できることが分かった。しかし、48 時間後の細胞密度は、LEA タンパク質を持っていない大腸菌と同程度であった。以上の結果から、LEA タンパク質が高塩環境における細胞の初期適応性を高める機能を持つことが示された。

#### (4) LEA タンパク質遺伝子の組換えポプラの解析

LEA タンパク質のポプラでの機能を解明するため、PnLEA1 を過剰発現する遺伝子組換えポプラを作製した。遺伝子組換えポプラのゲノム DNA 中には、カナマイシン耐性遺伝子の存在を確認した(図4)。また、遺伝子組換えポプラでは、PnLEA1 の発現量が数十倍から200 倍以上に上昇していた(図4)。従って、PnLEA1 過剰発現ポプラの作出に成功したことが分かった。

乾燥に対する耐性評価のため、鉢上げしたポプラの苗木への灌水を停止し水分不足の状態にしたところ、PnLEA1 過剰発現組換えポプラは、pBF4 ベクター対照ポプラと同様に約2 週間で枯死した(図5)。すなわち、緩慢で長期的な水分低下においては組換えポプラの乾燥耐性に变化はなく、組換えた LEA タンパク質遺伝子の影響がほとんど無いことが分かった。これは緩やかな乾燥ストレスでは内在性の PnLEA1 タンパク質の発現が水分低下とともに誘導されるため、遺伝子組換えの影響が現われにくいものと考えられた。今後、急激な又は短期間の水欠乏試験や耐塩性試

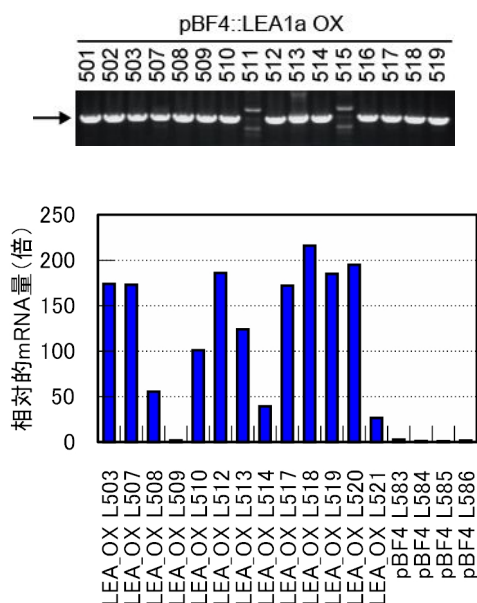


図4 PnLEA1 過剰発現遺伝子組換えポプラの導入遺伝子の確認(上段)と遺伝子発現解析(下段)

矢印は、PCR 法で増幅したカナマイシン耐性遺伝子(NPTII)を示している。相対的 mRNA 量は pBF4 ベクター対照ポプラである L585 の PnLEA1 の発現量を 1 とした相対量で表している。

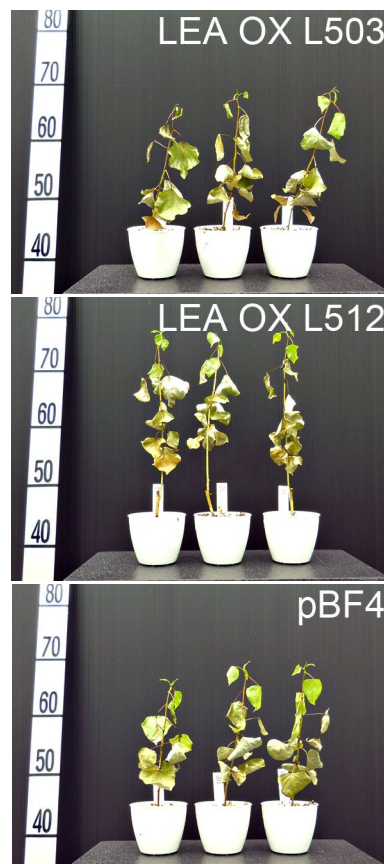


図5 遺伝子組換えポプラの乾燥耐性試験

PnLEA1 過剰発現遺伝子組換えポプラ(上段、中段)、pBF4 ベクター対照ポプラ(下段)。水やりを止めてから14 日後に写真を撮影した。

験を行い、組換えポプラの解析を進める必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計4 件)

西口 満、乾燥ストレス応答に関わるポプラの LEA タンパク質遺伝子の発現と性質、第 125 回日本森林学会大会、2014 年 3 月 28 日、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

西口 満、水欠乏により誘導されるポプラの LEA タンパク質の機能解析、第 124 回日本森林学会大会、2013 年 3 月 27 日、岩手大学(岩手県盛岡市)

西口 満、ポプラの乾燥誘導性 LEA タンパク質遺伝子の機能解析、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

西口 満、古川原 聡、横田 智、毛利武、田原 恒、掛川 弘一、楠城 時彦、

遺伝子組換え樹木の創出のためのポプラ環境ストレス耐性遺伝子の探索、第123回日本森林学会大会、2012年3月28日、宇都宮大学（栃木県宇都宮市）

6．研究組織

(1)研究代表者

西口 満 (NISHIGUCHI, Mitsuru)

独立行政法人森林総合研究所・生物工学研究領域・主任研究員

研究者番号：80353796