

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780334

研究課題名(和文)耐塩性ダイズの開発を目指した新規有用遺伝子の耐塩性機構活性化プロセスの解明

研究課題名(英文)Dissecting the activation process of salt tolerance by a novel valuable gene toward improved salt 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) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズの塩ストレス応答遺伝子GmTDF-5は、アルマジロリピートを持つ機能未知なタンパク質をコードしている。本研究では、GmTDF-5によるダイズの塩ストレス応答・耐性機構の活性化プロセスを明らかにするため、同遺伝子及びホモログに関する分子生物学的特徴付けを行った。その結果、(i) ミヤコグサホモログはGmTDF-5とほぼ同じ構造・ストレス応答性を示すこと、(ii) GmTDF-5の過剰発現は塩・乾燥誘導遺伝子の転写を促進すること、(iii) GmTDF-5タンパク質はユビキチン-プロテアソームによって制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：GmTDF-5, a salt-inducible gene of soybean, encodes an armadillo-repeat protein of unknown function. In this study, we characterized molecular features of GmTDF-5 and its homologs to understand their physiological roles in the salt tolerance and response of soybean. The results revealed that (i) LjTDF-5, a GmTDF-5-homolog from the model legume *Lotus japonicus*, shows molecular structures and stress response similar to GmTDF-5, (ii) overexpression of GmTDF-5 gene increases expression of the salt-/drought-inducible gene(s) and (iii) the level of GmTDF-5 protein is controlled through the ubiquitin-proteasome degradation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・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 タンパク質相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

塩が高濃度に蓄積する土壌は植物の成長を著しく阻害するため、農業生産に深刻な被害を与える。近年、このような塩類集積土壌が急速に増えており、現在では地球の全陸地面積の約7%を覆っている。塩類集積土壌を修復し、持続可能な農耕地へと再生するため、しばしば客土や灌水などの物理的な修復が行われるが、多大な費用と労力がかかっている。より実用的な修復法が求められるなか、植物育種学分野では塩ストレスに強い植物の開発が進められている。

このような背景のもと、我々は耐塩性に優れたダイズの開発に取り組んでいる。ダイズは食用としての重要性に加え、工業用資材としても活用でき、根粒菌との共生による土壌の肥沃効果も期待できることから、前述の目的において付加価値の高い植物である。これまで、ダイズの塩ストレス応答機構の解明と耐塩性遺伝子資源の同定を目的に、栽培品種エンレイから塩ストレス処理した際に特異的に誘導される遺伝子106種類をクローニングしている(Aoki et al., 2005)。そのひとつ、*GmTDF-5*と命名した機能未知タンパク質をコードするダイズ遺伝子について、シロイヌナズナを宿主に過剰発現させると、野生株と比べて耐塩性が上昇することを明らかにした。*GmTDF-5*の類似遺伝子(ホモログ)はダイズのほか、単子葉・双子葉植物に広く存在するが、シロイヌナズナや一部のアブラナ科植物には存在しない。*GmTDF-5*の過剰発現がシロイヌナズナの耐塩性を高めたことから、同遺伝子が植物に共通する耐塩性機構を活性化できることを示唆しており、耐塩性作物の開発に向けては地域の生態系や食文化に合わせた作物に適用できる汎用性の高い遺伝子資源になると期待される。

## 2. 研究の目的

これまでの研究で、(1) *GmTDF-5* タンパク質の機能は未知であるが、機能ドメインとしてロイシンジッパーやアルマジロリピートを持つことから、自身もしくは他のタンパク質と結合し、複合体を形成する可能性が高いこと、(2) GFP融合 *GmTDF-5* タンパク質が核もしくはその周辺に局在すること、(3) *GmTDF-5*の塩ストレスに対する転写誘導は、ダイズの地上部器官で強く見られ、さらには高浸透圧ストレスや乾燥などの水分ストレスに対しても誘導されること、(4) *GmTDF-5* 過剰発現シロイヌナズナでは、代表的な塩・乾燥誘導遺伝子のひとつである *rd29a* の転写が野生株より促進されること、などを明らかにしている。以上の知見から、*GmTDF-5* はダイズの地上部器官に存在する塩ストレス応答機構、特に高等植物に広く存在する耐塩性関連タンパク質と結合・協働し、その下流にある塩ストレス応答遺伝子群の転写を促進することで当該植物の耐塩性を高めているのではないかと推測

している。*GmTDF-5* を利用した耐塩性ダイズの開発に向けては、これら一連の活性化プロセスを分子レベルで理解しておかなければならない。そこで本研究では、機能未知タンパク質 *GmTDF-5* による植物の塩ストレス応答・耐性機構の活性化プロセスについて、まだ解明されていない分子生物学的研究を完成させ、同遺伝子を利用した耐塩性ダイズの開発へと展開できる研究基盤の構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マメ科のモデル植物ミヤコグサに由来する *GmTDF-5* ホモログのクローニングと高等植物における遺伝子分布

ミヤコグサ *Lotus japonicus* Miyakojima MG-20 から RNA を抽出し、ミヤコグサ EST データベース、RACE 法などの常法の遺伝子クローニング法を用いて *GmTDF-5* ホモログを単離した (*LjTDF-5* と命名)。塩基配列決定後、ダイズ *GmTDF-5* と植物ゲノムデータベース Phytozome に登録された高等植物に由来するホモログのアミノ酸配列を比較し、さらにバイオインフォマティクスツールを駆使して *LjTDF-5* タンパク質の分子構造と機能ドメインの詳細を特徴付けた。*LjTDF-5* のストレス応答性を明らかにするため、塩ストレス (100 mM NaCl) 及び乾燥ストレス (水分の供給無し) 各処理後 0~72 時間の植物体をサンプリングし、地上部と根に分けて抽出した RNA を鋳型に Realtime qRT-PCR を実施した。併せて、ミヤコグササンプルからナトリウムを抽出し、原子吸光分析によって地上部、根に蓄積したナトリウム量を測定した。*LjTDF-5* の細胞内局在性は、GFP 融合型タンパク質を発現するプラスミドをパーティクルガンによってタマネギ表皮細胞に導入し、その蛍光から局在する細胞小器官を特定した。

### (2) シロイヌナズナを宿主とする *GmTDF-5* 過剰発現株の作出と耐塩性試験

アグロバクテリウム感染法によってシロイヌナズナ培養細胞 T87 株を宿主とする *GmTDF-5* 過剰発現株を作出した。シロイヌナズナ植物体の耐塩性は、0~125 mM NaCl を含む寒天培地上での種子発芽率と個体生存率、その後の地上部の伸長度に基づき評価した。一方、培養細胞については、0~100 mM NaCl 処理 48 時間後の細胞生存率を Evans Blue を用いた死細胞染色によって評価した。植物体及び培養細胞における塩ストレス処理前後の遺伝子発現の変化を調べるため、シロイヌナズナにおいてよく特徴付けられている塩・乾燥誘導遺伝子 14 種類を対象に Semi qRT-PCR を実施した。

### (3) 塩ストレス処理後の *GmTDF-5* タンパク質の細胞内安定性に関する調査

大腸菌を宿主とする組換え型タンパク質発現系を利用して、GST 融合型 *GmTDF-5*、GST 融合型 *LjTDF-5* タンパク質を作製した。なお、全長タンパク質の発現系に加え、N 末端領域

(約 100 アミノ酸残基) C 末端領域 (約 60 アミノ酸残基) に関するドメイン発現系も構築した。タンパク質の細胞内安定性は、100 mM NaCl で 24 時間処理したダイズ、もしくはミヤコグサ幼体全組織から調製した細胞抽出液中における GST 融合型タンパク質の分解率に基づき評価した (コントロールには GST タンパク質を用いた)。さらに、この反応液に 26S プロテアソーム阻害剤である MG-132 を添加することで、GmTDF-5、LjTDF-5 タンパク質の安定性にユビキチン-プロテアソームが関与しているかを調査した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ミヤコグサホモログ *LjTDF-5* 遺伝子の分子的特徴付け

GmTDF-5 タンパク質の分子機能を詳細に特徴付けるためには、ダイズでは得難い網羅的な遺伝子情報の活用、変異システムを利用した機能解析が有効である。そこで、上記解析ツールが調っているマメ科のモデル植物ミヤコグサから *GmTDF-5* ホモログをクローニングし、遺伝子構造や水分ストレスに対する応答性、細胞内局在性を明らかにした。ミヤコグサホモログ *LjTDF-5* は、全長 369 アミノ酸残基からなる推定分子量 40.7 kDa のタンパク質をコードしており、GmTDF-5 タンパク質 (全長 367 アミノ酸残基、分子量 40.7 kDa) に対してアミノ酸配列レベルで 65% の相同性を示した。また、タンパク質全体にわたってアルマジロリピートが存在し、ヘリックスに富む分子構造であることが予測された。植物ゲノムデータベース Phytozome に登録された 18 種類の植物に存在する GmTDF-5 ホモログを対象に、タンパク質構造の共通性を調査したところ、アルマジロリピートが形成されない C 末端領域、約 60 アミノ酸残基が高度に保存されていることを見出した。同領域には既知の機能ドメインが存在しないことから、一群の GmTDF-5 ホモログを特徴付ける新規な機能領域であることが示唆された。また、タマネギ表皮細胞を用いた細胞内局在解析では、*LjTDF-5* タンパク質が GmTDF-5 同様、核もしくはその周辺に局在することが明らかとなった。*LjTDF-5* の塩ストレスに対する応答性は、ミヤコグサ地上部においてストレス処理後 24 時間以降に誘導が見られ、根では処理後 6 時間で著しい誘導が見られ、12 時間後に最大転写量となった後次第に減少する、一過的な応答を示すことが明らかとなった。この応答パターンを地上部・根それぞれに蓄積したナトリウム量と対応付けたところ、その挙動がほぼ一致したことから、*LjTDF-5* の転写はナトリウム量に依存して誘導されることが示唆された。乾燥ストレスに対しては、根よりも地上部において著しい誘導が見られた。*LjTDF-5* タンパク質には、GmTDF-5 の N 末端側に見られるロイシンジッパーが存在せず、塩ストレスに対する応答では根において一過的な誘導が見られるなど、GmTDF-5 と

一部異なる特徴が見られ、耐塩性機構における GmTDF-5 ホモログの作用プロセスが植物種により異なる可能性が示唆された。しかし、遺伝子・タンパク質構造やストレスに対する応答性、細胞内局在性に関しては、概して *GmTDF-5* と同じ特徴を示した。

##### (2) *GmTDF-5* を導入したシロイヌナズナ培養細胞と植物体の耐塩性比較

GmTDF-5 タンパク質が関与する植物の塩ストレス応答・耐性機構を特定するため、*GmTDF-5* の過剰発現が塩ストレス処理後のシロイヌナズナの表現型、及び代表的な塩・乾燥誘導遺伝子の発現にどのような影響を及ぼすかを調査した。これまでの知見をもとに、*GmTDF-5* を過剰発現するシロイヌナズナ植物体の耐塩性を再現性の有無も含めて詳細に特徴付けたところ、塩ストレス処理区における個体生存率と種子発芽率、地上部の伸長度はいずれも野生株より高まっており、塩ストレスによる生育阻害が有意に抑制されることを確認した。また、対象とする塩・乾燥誘導遺伝子を増やし、内在遺伝子群に対する *GmTDF-5* 過剰発現の影響を調べたところ、やはり他の遺伝子と比べて *rd29a* の転写誘導性が高まっていた。*rd29a* はアブシジン酸非依存性のストレス応答経路に位置していることから、GmTDF-5 は同系路の一部を活性化している可能性が示された。一方、シロイヌナズナ培養細胞 T87 株を宿主とする *GmTDF-5* 過剰発現株の耐塩性試験では、野生株に対して細胞生存率が有意に低下した。塩・乾燥誘導遺伝子の発現についても同様に調べたところ、いずれの遺伝子も野生株とほぼ同じ転写量を示し、*rd29a* の誘導も見られなかった。以上の結果は、GmTDF-5 タンパク質の機能発現には、組織や発達段階で特異的に存在する因子が必要であり、GmTDF-5 の分子構造から、これは GmTDF-5 と結合する (複合体を構成する) タンパク質ではないかと推測された。そこで、ダイズ成熟葉由来の cDNA ライブラリーを作製し、酵母ツーハイブリッド解析によって GmTDF-5 に結合するタンパク質の同定を試みたが、候補となるタンパク質は得られなかった。

##### (3) 塩ストレス処理後の GmTDF-5 タンパク質の機能制御

塩ストレスに対する GmTDF-5 タンパク質の組織特異的発現性を明らかにするため、100 mM NaCl 処理後のダイズ組織 (根・莖・成熟葉・新葉) から抽出したタンパク質に対して、抗 GmTDF-5 抗体を用いたウエスタン解析を行った。その結果、調査した全組織、塩ストレス処理後 24 時間までに GmTDF-5 タンパク質の発現は確認されなかった。このため、GmTDF-5 は翻訳後に何らかの選択的な分解制御を受けている可能性が示された。そこで、環境ストレス応答をはじめ、主要な細胞内プロセスを制御するタンパク質分解機構のひとつ、ユビキチン-プロテアソームに着目し、同機構によ

る GmTDF-5 分解制御への関与を調べた。塩ストレス処理したダイズ幼個体に由来する細胞抽出液に、GST 融合 GmTDF-5 と GST タンパク質を添加し、両者がこの反応液中でどの程度分解されるかを調べたところ、GST 融合 GmTDF-5 量は時間の経過にともなって著しく減少したが、GST 量は調査した反応後 3 時間まで変化が見られなかった。この傾向は塩ストレス未処理のダイズ細胞抽出液でも見られたが、減少速度は塩ストレス処理した抽出液でより速かった。この減少がユビキチン-プロテアソームによる影響かを明らかにするため、同反応液中に 26S プロテアソーム阻害剤 MG-132 を添加したところ、その速度が有意に抑えられた。同様の結果がミヤコグサホモログ LjTDF-5 を用いた解析でも得られたことから、GmTDF-5 ホモログのタンパク質量はユビキチン-プロテアソームによってコントロールされていることが推測された。そこで、塩ストレス処理したダイズ幼個体に由来するタンパク質溶液に MG-132 を添加し、抗 GmTDF-5 抗体を用いてウエスタン解析を行ったところ、推測通り目的のシグナルが検出され、ダイズにはユビキチン-プロテアソームによる GmTDF-5 の分解制御機構が存在することを確認した。次に、GmTDF-5 タンパク質のどの領域がこの分解制御に関わっているかを特定するため、N 末端領域 (100 アミノ酸残基) とホモログ間で高度に保存された C 末端領域 (60 アミノ酸残基) について同様の実験を行ったところ、N 末端領域がその制御に強く関与していることを突き止めた。N 末端領域には 4 つのリジン残基が存在しており、このうちひとつ (もしくはそれ以上) のリジン残基がユビキチン化の標的になることが推測された。以上の結果から、GmTDF-5 は塩ストレス誘導後、合成されたタンパク質がユビキチン-プロテアソームによって、N 末端領域を介して厳密に制御されていることが明らかとなった。

#### (4) まとめ

本研究から、GmTDF-5 は塩ストレスに応答して転写量を増加させるが、翻訳後、ユビキチン-プロテアソームによってタンパク質量が厳密にコントロールされることを明らかにした。また、GmTDF-5 タンパク質の機能発現には、特定のダイズ組織に存在する要素 (タンパク質構造から複合体を形成するタンパク質ではないかと推測している) が必要であること、アブシジン酸非依存性のストレス応答経路に位置する塩・乾燥誘導遺伝子群を活性化させる核タンパク質として機能することが示唆された。今後、分子生物学的研究をさらに推し進め、機能未知タンパク質 GmTDF-5 が関与する塩ストレス応答・耐性機構を解明し、耐塩性品種の開発に役立てていきたい。

## 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 1 件)

Kojima T., Kinoshita M., Yamada T., Umezaki S., Iwaizako M., Saito Y., Noguchi K., Takahara H., Molecular characterization of a novel armadillo repeat-like protein gene differentially induced by high-salt stress and dehydration from the model legume *Lotus japonicus*, Plant Molecular Biology Reporter, 31, 698-706, 2013. DOI 10.1007/s11105-012-0542-3(査読有)

[学会発表](計 4 件)

木村愛、佐藤光朗、高原英成、小島俊雄、『植物の耐塩性に関与す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 2014 年度大会、2014.3.29、明治大学生田キャンパス

齋藤祐一、高原英成、小島俊雄、『新奇ダイズ塩ストレス応答遺伝子を導入したシロイヌナズナ培養細胞と植物体の耐塩性比較』、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013.3.25、東北大学川内キャンパス

佐藤光朗、右田和琴、齋藤祐一、野口和斗、高原英成、小島俊雄、『ダイズの耐塩性を制御する機能未知アルマジロリピートタンパク質の塩ストレス応答性』、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013.3.25、東北大学川内キャンパス

野口和斗、齋藤祐一、梅崎修平、高原英成、小島俊雄、『塩・乾燥ストレスに応答するミヤコグサ ARM-repeat Protein 遺伝子の特徴付け』、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012.3.23、京都女子大学キャンパス

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 俊雄 (TOSHIO KOJIMA)  
茨城大学・農学部・准教授  
研究者番号：70311587

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し