

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850073

研究課題名(和文)光センサーを介した植物の低温耐性増強機構の解明

研究課題名(英文)Uncovering the mechanisms by which light sensors enhance the freezing tolerance of plants

研究代表者

稲葉 丈人 (INABA, TAKEHITO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：00400185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「光センサー」としての葉緑体による低温シグナル伝達活性化機構を明らかにすることを目的とした。低温誘導性遺伝子COR15Aのプロモーターにルシフェラーゼを融合したコンストラクトをシロイヌナズナに導入した結果、低温応答を可視化することができた。さらに、この植物を用いて低温シグナル伝達系を活性化する化合物のスクリーニング系を開発した。また、葉緑体形成異常が低温シグナル伝達に与える影響を詳細に解析するため、シロイヌナズナの無菌培養法を用いて葉緑体形成異常変異体の種子を回収する系を開発した。

研究成果の概要(英文)：This project aimed at uncovering the mechanisms by which chloroplasts activate low-temperature signaling pathway as light sensors in plants. We fused the promoter region of COR15A to luciferase gene, and introduced this chimeric gene into Arabidopsis. This allowed us to visualize low temperature response based on bioluminescence derived from luciferase. We were able to establish the system that can screen low molecular mass compounds affecting low temperature response in plants. Furthermore, we developed a method of recovering seeds from the seedling lethal Arabidopsis mutant *ppi2-2*, allowing us to analyze the roles of developed chloroplasts in low temperature response.

研究分野：農学

キーワード：低温応答 葉緑体

1. 研究開始当初の背景

移動手段を持たない植物は、自身を取り巻く温度の変化に対応するために、様々な手段を獲得してきた。その最も代表的な例が、「低温馴化」と呼ばれる仕組みである。低温馴化とは、夏から冬への移行にともない、植物が生理機能や細胞の構造を大きく変化させて高い耐寒能力を獲得することを言う。さらに、低温馴化能を持つ植物は、ある一定期間、凍結しない程度の低温に曝されると、次に襲ってくるさらに低い温度に対する耐性を獲得する。低温馴化中に植物は数多くの低温誘導性遺伝子 (*COR* 遺伝子) の発現を誘導し、これらの遺伝子産物の機能により高い耐寒性を獲得していると考えられる。

植物が十分に低温馴化するには「低温処理」だけではなく「光」が必要であることが知られている。しかしながら、どのようにして光が低温シグナル伝達経路を活性化しているのか、そのメカニズムは分かっていない。最近の申請者らの研究により、植物細胞のオルガネラである「葉緑体」の形成に異常があると、光存在下でも十分な低温馴化が起こらないことが明らかになった。すなわち、葉緑体が光エネルギーを利用して産生した代謝産物により、低温シグナル伝達系が活性化されていると予想される。言い換えれば、葉緑体が低温馴化に必要な「光センサー」として機能していると仮定できる。しかしながら、葉緑体がどのような仕組みで低温シグナル伝達を活性化しているかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では「光センサー」としての葉緑体を介した植物の低温耐性増強機構の解明を目指して研究を進めた。

3. 研究の方法

レポーター遺伝子を用いた低温応答の可視化

低温応答を可視化するために、低温誘導性遺伝子プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を融合したコンストラクトを作出し、これを導入したシロイヌナズナを作出した。

低温シグナル伝達を活性化する低分子化合物のスクリーニング系の開発

葉緑体由来のどのようなシグナル分子が低温シグナル伝達を光依存的に活性化するか調査するためには、シグナル分子スクリーニング系の開発が必要不可欠である。そこで、マイクロプレートを使ったハイスループットスクリーニング系の開発を試みた。

実生致死性を示す葉緑体形成異常変異体からの種子回収方法の開発

低温シグナル伝達における葉緑体の役割を調査するためには、葉緑体形成異常を示す変異体の活用が有効である。しかしながら、葉緑体形成異常変異体の多くはアルビノ表現型を示し、実生致死性である。したがって、これらの変異体からホモ変異体種子を回収する技術の開発が必要不可欠である。そこで、無菌培養したシロイヌナズナからアルビノ変異体種子を回収する技術の開発し、これを用いて低温応答機構の解析を試みた。

4. 研究成果

レポーター遺伝子を用いた低温応答の可視化

まず、低温誘導性遺伝子 *COR15A* のプロモーター領域をクローニングし、これをルシフェラーゼ遺伝子に融合したコンストラクトを作製した。具体的には翻訳開始点から上流約 1kbp を含む断片 (*COR15Apro* ATG) と第一エクソン及びイントロンを含む断片 (*COR15Apro* 1st intron) を含むコンストラクトを作製し、アグロバクテリウム法を用いてシロイヌナズナに導入した。形質転換体は、カナマイシン耐性を指標にスクリーニングした。その結果、両方のコンストラクトともに 20 個体以上の独立した形質転換体 (T1 植物) を得ることができた。

次に、レポーター遺伝子を 1 コピーのみ持つ植物をスクリーニングするため、次世代の植物 (T2 植物) のカナマイシンプレート上での分離比を調査した。その結果、いずれのコンストラクトからも数ラインを選抜することができた。さらに、T3 種子を用いて、レポーター遺伝子をホモに持つラインを選抜し、T3 植物を用いて様々な解析を行った。

まず、プレート上で生育させた低温馴化前後の植物からタンパク質を抽出して、ルシフェラーゼの活性を調査した。その結果 *COR15Apro* ATG:*LUC* 株では低温に反応して

ルシフェラーゼ活性の増加が見られた。さらに、タンパク質の抽出をせず直接ルシフェリンを植物体に噴霧した場合でも低温応答をモニターできることが明らかになった(図1)。

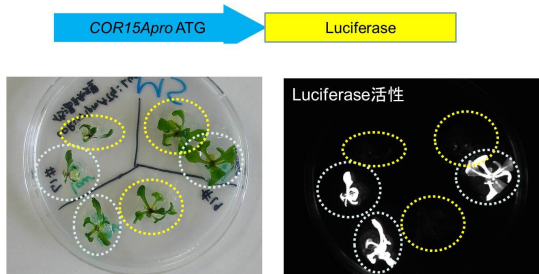


図1. *COR15Apro ATG:LUC* 株の低温応答

右側ではルシフェラーゼの発光を検出している。黄色の点線で囲まれた植物は低温未馴化、水色の点線で囲まれた植物は低温馴化した植物である。

一方、*COR15Apro 1st intron:LUC* 株は、予想に反してルシフェラーゼが低温にほとんど応答しなかった。原因は不明であるが、低温応答を厳密にモニターできる *COR15Apro ATG:LUC* 株を得ることができたので、以後の解析ではこの植物を用いることとした。

低温シグナル伝達を活性化する低分子化合物のスクリーニング系の開発

次に、この植物を用いて低温シグナル伝達に影響を与える化合物のスクリーニング系開発を試みた。具体的には、*COR15Apro ATG:LUC* 株の葉を低分子化合物で処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。測定は96穴プレートで三反復行った。その結果、スクリーニング系は *COR15A* の発現を誘導する化合物及び発現に影響を与えない化合物を正確にスクリーニングすることが出来た。すなわち、低温シグナル伝達を活性化する化合物のスクリーニング系が開発できた。

実生致死性を示す葉緑体形成異常変異体からの種子回収方法の開発

次に、アルビノ変異体 *ppi2-2* ホモ株から種子を回収する系の確立を行った。詳細を図2に示した。まず、*ppi2-2* ヘテロ株から得られた種子を、1%ショ糖を含むMS培地に播種した。発芽した植物のうち、アルビノ表現型を示す実生(*ppi2-2* ホモ株)を3%ショ糖を含むMS培地の入ったジップロックコンテナに移した。植物が開花したのち、種子形成を促進するために蓋の一部を開け、サージカルテープで塞いだ。

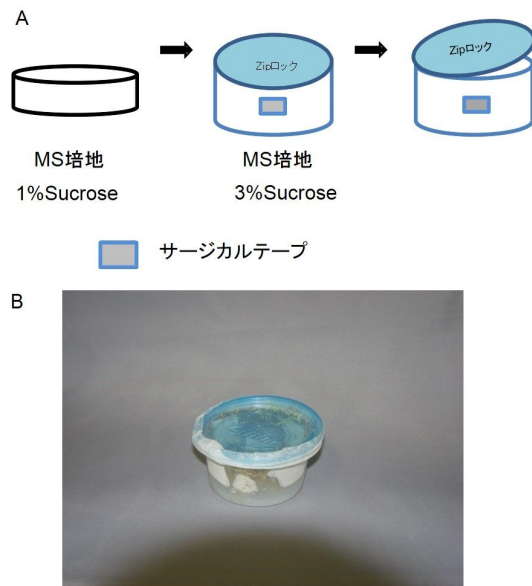


図2. *ppi2-2* ホモ変異体からの趣旨回収方法

(A)は全体の流れを示している。(B)は実際に *ppi2-2* 株を栽培中のジップロックコンテナ。

その結果、下の図3に示すように無菌培養した *ppi2-2* 株から種子を回収することが出来た。回収した種子を播種して実生の表現型を調べたところ、発芽したすべての実生がアルビノ表現型を示した。このことから、*ppi2-2* ホモ株は実生致死性だと考えられていたが、無菌培養すれば種子を回収できることが明らかになった。



図3. 無菌培養により種子を形成した *ppi2-2* ホモ変異株

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. Okawa, K., Inoue, H., Adachi, F., Nakayama, K., Ito-Inaba, Y., Schnell, D.J., Uehara, S. and **Inaba, T.** (2014) Targeting of a polytopic membrane protein to the inner envelope membrane of chloroplasts in vivo involves multiple transmembrane segments. *J. Exp. Bot.*, 65, 5257-65. (査読有り)

2. Tada, A., Adachi, F., Kakizaki, T. and **Inaba, T.** (2014) Production of viable seeds from the seedling lethal mutant *ppi2-2* lacking the atToc159 chloroplast protein import receptor using plastic containers, and characterization of the homozygous mutant progeny. *Front. Plant Sci.*, 5, article 243. (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 徳丸充明, 安達ふみ, 戸田真, 稲葉靖子, 矢津芙美子, 榊原陽一, 水光正仁, 柿崎智博, **稲葉丈人** (2015) 転写因子 AtGLK1 の細胞内動態と制御機構の解析. 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月 16 日, 東京都世田谷区

2. 多田朱里, 安達ふみ, 松浦恭和, 森泉, **稲葉丈人** (2014) シロイヌナズナにおけるプラスチドシグナル誘発処理にตอบสนองした植物ホルモンの変化. 第 37 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2014 年 9 月 11 日, 福岡県久山町

〔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

稲葉 丈人 (INABA TAKEHITO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号: 00400185

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし