

論文内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 12 年度博士課程 進学
氏 名 長岡修一
指導教官 高野哲夫

論文題目 シロイヌナズナ STO 遺伝子と耐塩性機構に関する研究

地球上ではナトリウムイオンを代表とする塩類を含んだ塩類集積土壌の面積が増加し続けている。そのような土壌では作物も牧草も野草も生育できないため、被覆する植物がない大地は乾燥し風食や雨期の降雨による水食といった土壌浸食を受け豊かな土壌を失ってしまう。一方、世界の総人口は増え続けており食糧の増産が急務となりつつある。このような状況の中で土壌自体を変えていくことももちろん必要であるが植物にストレス耐性を付与することも重要であると考えられている。本研究では植物の耐塩性機構を明らかにすることを目的としてシロイヌナズナの STO 遺伝子に注目して研究を行った。

酵母においてカルシニューリンは細胞内のナトリウムイオンとカリウムイオンの濃度を調節する役割を担っており、これが欠失すると酵母の耐塩性が著しく低下する。カルシニューリンを欠失したミュータント酵母に対してシロイヌナズナの STO 遺伝子を導入すると耐塩性の低下という表現型が相補されるため、シロイヌナズナにおいて STO 遺伝子は細胞内のナトリウムイオン、カリウムイオンの濃度を調節する役割を持っているのではないかと考え以下の実験を行った。

1. STO 遺伝子過剰発現シロイヌナズナの作出

カルシニューリンを欠失した酵母の耐塩性の低下という表現型を相補する STO 遺伝

子をシロイヌナズナで過剰に発現させると細胞内のナトリウムイオン、カリウムイオンのバランスをよりよく調節するのではないかと考え、シロイヌナズナにおいて STO 遺伝子を過剰に発現する形質転換体を作製した。その結果、ナトリウムストレス条件下で生育するとワイルドタイプよりも生育が良く高い耐塩性をもつ形質転換体が得られた。ノーザンブロットにより形質転換体における STO 遺伝子の高発現が確認されたがナトリウムストレスによる発現誘導はワイルドタイプ、形質転換体共に見られなかった。また GFP タンパク質と STO タンパク質との融合タンパク質を作製したマネギ表皮細胞における細胞内局在性を観察したところ核に局在が見られた。これらのことから STO は細胞膜上にありナトリウムイオンを細胞外に排出する Na^+/H^+ アンチポーターやストレスに応答して合成され細胞内の浸透圧を一定に保つ働きをする適合溶質のグリシンベタイン、プロリンが直接的に耐塩性に関与するのと異なり、ストレスシグナル経路の一部として間接的に耐塩性に関与しストレスに応答するための遺伝子の発現を調節しているのではないかと考えられた。

2. STO タンパク質と相互作用するタンパク質の探索

ストレスシグナル経路の一部として間接的に耐塩性に関与するシロイヌナズナの SOS3 というタンパク質は SOS2 というプロテインキナーゼと相互作用することによりストレスシグナルを下流へと伝えていく。STO タンパク質もストレスシグナルを伝達する過程の中で他のタンパク質と相互作用しているのではないかと考え酵母の two-hybrid screening system を用いて STO と相互作用するタンパク質の探索を行った。その結果、Myb DNA binding domain を一つ持つタンパク質である HPPBF が相互作用していることが明らかとなった。HPPBF タンパク質と GFP タンパク質との融合タンパク質を作製したマネギ表皮細胞における細胞内局在性を観察したところ核に局在が見られたことや、HPPBF の発現量はナトリウムストレスにより増加していることから、HPPBF タンパク質は STO タンパク質と複合体を形成し、植物がナトリウムストレスを受けた際にストレスへの応答に必要な遺伝子の発現調節に関与していると考えられた。しかし、ストレスを受けた際の HPPBF 遺伝子発現量のピークは 2 時間後に見られたためストレスの初期に働いている可能性も示唆された。また、HPPBF と高い相同性を示し同じように一つの Myb DNA binding domain しか持たない CrBPF-1 は病原菌抵抗性に関わっていることが知られている。このことから STO の関与する耐塩性機構と病原菌抵抗性の機構とは似たメカニズムを持つ可能性も示唆された。

3. STO 遺伝子によって発現が制御される遺伝子の探索

直接的に耐塩性に関与する遺伝子を過剰発現する形質転換植物での耐塩性の向上は数多く報告されているが、ストレスシグナル伝達など間接的に耐塩性に関与する遺伝子の導入に

よる耐塩性の向上はそれほど多くはない。シグナル伝達には数多くの因子が関与しておりプロテインキナーゼなどの遺伝子発現がストレスにより制御されていることや、シグナル伝達系の中で MAP キナーゼカスケード等が複雑に絡み合っていることが明らかとなってきた。STO 遺伝子を過剰発現している形質転換植物において耐塩性の上昇が見られたのは、STO により転写制御を受けているナトリウムストレスに応答するための遺伝子の発現量が増えたためではないかと考えられた。そのためシグナル伝達系の中で働く因子の一つであると考えられている STO 遺伝子は、どのような遺伝子の発現を制御しているのかを、かずさ DNA 研究所の作製したシロイヌナズナ EST をもとに作製された約 13000 の遺伝子が載ったマイクロアレイを用いて STO 形質転換体とワイルドタイプの発現パターンを比較することにより調べた。

その結果いくつかの遺伝子において STO 形質転換体で発現量が増えていることが観察された。さらに発現量の違いをノーザンブロットを行うことにより確認した。顕著な違いが見られたのは disease resistance RPP5 like protein であった。disease resistance RPP5 like protein 遺伝子は通常の条件下でワイルドタイプよりも STO 形質転換体における発現量の方が多く、ナトリウムストレスを受けた際はワイルドタイプで発現量の増加が見られると同時に STO 形質転換体ではワイルドタイプよりもより大きな発現量の増加が観察された。このことから disease resistance RPP5 like protein はナトリウムストレスに対する防御機構に関わっていると考えられた。また、RPP5 は病原菌抵抗性に関わるシグナル伝達系に含まれる遺伝子であり、STO タンパク質と相互作用する HPPBF タンパク質が病原菌抵抗性に関わる遺伝子と高い相同性を持つことから、STO が含まれるシグナル伝達系は病原菌抵抗性と何かしらの共通する機構を利用して耐塩性に関与している可能性が示唆された。

4. *sto* 遺伝子変異シロイヌナズナの検索とその耐塩性の評価

STO 遺伝子の細胞内局在性の観察や、STO 遺伝子過剰発現形質転換シロイヌナズナの観察により STO 遺伝子および STO タンパク質はシロイヌナズナにおいて耐塩性に関与していると考えられたので、かずさ DNA 研究所が提供するシロイヌナズナタグラインス共同利用システムを利用して STO 遺伝子を欠失した変異シロイヌナズナを検索し、STO の機能について解析した。

得られた *sto* 遺伝子変異シロイヌナズナはナトリウムストレスに対する耐性が低下していた。さらにナトリウムストレス後の植物体内のナトリウムイオン、カリウムイオン含量を測定したところナトリウムイオン含量は STO 遺伝子過剰発現形質転換体において最も低く、*sto* 遺伝子変異シロイヌナズナで最も高い値を示し、ストレス後のカリウムイオン含量については逆に STO 遺伝子過剰発現形質転換体において最も高く、*sto* 遺伝子変異シロイヌナズナで最も低い値を示した。このことは STO 遺伝子が酵母内での働きと同様のことをシロイヌナズナ内でも行っ

ていることを示唆している。つまり、ナトリウムストレスを受けている間にナトリウムイオンの流入経路と考えられているカリウムトランスポーターに対してカリウムに対する親和性を高めナトリウムイオンの流入量を低く抑えた結果、形質転換体ではカリウムイオン含量が高くナトリウムイオン含量が低くなり、*sto* 遺伝子変異シロイヌナズナではそのような働きかけが失われたためカリウムイオン含量が低くナトリウムイオン含量が高くなったのではないかと考えられた。酵母において *STO* 遺伝子はナトリウムイオンを細胞外へ排出する Na^+ -ATPase の発現量を増加させることにも関与している。植物においてはそのようなナトリウムポンプを用いた排出機構は見つかっていないが、ナトリウムの排出に関わっているのではないかと考えられている *AtHKT1* や細胞膜上の Na^+/H^+ アンチポーターである *SOS1* などを介して細胞からナトリウムイオンを取り除くことに関わっている可能性も考えられた。

以上のように、本研究ではシロイヌナズナ *STO* 遺伝子は植物体におけるナトリウムイオン、カリウムイオンのバランスを調節することにより耐塩性の機構に関与していることを明らかにしたものである。