

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 19 年度博士課程 進学
氏名 松倉智子
指導教員 篠崎和子

論文題目 イネの環境ストレス応答に関与する DREB2 型転写因子の網羅的解析

序論

植物は移動の自由を持たないので、生育環境の影響を絶えず受けている。環境ストレスの中でも温度、乾燥、高塩濃度などの非生物学的ストレスは、植物の生存を左右する大きなダメージを与える。植物はこれに対して組織レベル、細胞レベルなど様々な段階での応答機構を持っており、それらは遺伝子発現の変化を伴う。DREB はストレス応答性の転写因子の 1 つであり、ストレス応答性シス因子である DRE/CRT 配列に特異的に結合することで多くの下流遺伝子の発現を制御し、結果として植物はストレス耐性を獲得する。モデル植物であるシロイヌナズナのゲノム中には DREB2 型の遺伝子が 9 種類存在し、その中で *DREB2A* が乾燥・高温ストレスに強く応答する。*DREB2A* タンパク質は負の制御領域を欠損させることで転写因子としての活性を強く持つようになり、この活性型 *DREB2A* を過剰発現させたシロイヌナズナは乾燥や高温ストレスに対して高い耐性を示すことが報告されている。

近年の温暖化等による世界規模の環境劣化や開発途上地域での人口増加などによって不良環境においても生育可能な作物の開発は重要な課題となっており、作物においてストレス耐性獲得機構を解明することはこれらの課題解決に大きく貢献すると考えられる。多くの穀物がイネ科に属しているが、その中でイネは単子

葉植物のモデル植物であり、ゲノム情報のデータベースや形質転換作物の作出方法が確立されているという利点があるために遺伝子のより詳細な解析が可能である。そこで本研究では、イネの *DREB2* 型の転写因子をコードする遺伝子群を網羅的に解析し、その中で植物のストレス耐性獲得に強く関与する遺伝子を選出し、その機能解析を行うことを目的とした。

1. イネの *DREB2* 型遺伝子(*OsDREB2s*)の網羅的解析

まず、イネがゲノム上に持っている *DREB2* 型遺伝子をすべて単離した。シロイヌナズナの 9 種類の *DREB2* のアミノ酸配列データを用い、イネゲノム配列のデータベース上で相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子を探索した。その結果、相同タンパク質は、6 遺伝子座 (*OsDREB2A/B/C/D/E*, *OsABI4*) にコードされていることが示された。*DREB2* 型遺伝子は、コードするタンパク質の構造から 4 つの小グループ(サブタイプ)に分けられるが、アミノ酸配列の比較解析の結果、これらの 4 サブタイプに *OsDREB2D* 以外の 5 遺伝子が分散して存在していることが明らかになった。系統的に離れた植物であるシロイヌナズナとイネが共に 4 サブタイプに属する遺伝子を持っていることから、これらの 4 サブタイプはそれぞれ異なる役割を担っていると考えられる。

シロイヌナズナの *DREB2A* はストレス応答性遺伝子であるため、ストレス条件下における *OsDREB2s* の mRNA 蓄積量の変化を定量 RT-PCR 法によって調べたところ、*OsDREB2A* の mRNA は非ストレス条件下で蓄積量が多く、乾燥・高温・高塩のストレス処理によって蓄積量が少し増加した。*OsDREB2B* の mRNA は非ストレス条件下での蓄積量はわずかであったが、乾燥・高温・低温・高塩の各ストレス処理によって蓄積量が増加しており、ストレス処理前と比較した蓄積量の増加率が最も大きかった。他の *OsDREB2s* は非ストレス条件下での mRNA 蓄積量が少なく、顕著なストレス応答性も示さなかった。

次に各 *OsDREB2* の転写因子としての機能を調べるために、イネ由来のプロトプラストを用いた一過的発現系で細胞内局在と転写活性化能を調べた。GFP と各 *OsDREB2* の融合タンパク質をプロトプラスト内で発現させたところ、GFP-*OsDREB2E* 以外の融合タンパク質は核に特異的に局在していることが観察された。転写活性化能は、酵母 GAL4 の DNA 結合領域とシス配列を利用する系を用いて解析した。その結果、*OsDREB2B* が他と比較して特に高い転写活性化能を示した。また、シロイヌナズナのプロトプラストを用いた一過的発現系で *DRE-GUS* レポーター遺伝子に対する *OsDREB2B* の転写活性化能を調べた結果、*OsDREB2B* が DRE 配列に依存した下流遺伝子の発現を活性化できることが示唆

された。以上の結果から、イネにおけるストレスに応答した遺伝子発現を制御する OsDREB2 型転写因子として OsDREB2B が重要な役割を担っている可能性が高いと考え、以下で更に解析を行った。

2. OsDREB2B の機能解析

2-1. 選択的スプライシングによる *OsDREB2B* の発現制御

OsDREB2B は長さの異なる 2 種類の転写産物を持つ(*OsDREB2B1*、*OsDREB2B2*)。 *OsDREB2B2* は上記 1. で示した *OsDREB2B* と一致しており、転写因子としての活性を持つタンパク質をコードしていた。一方 *OsDREB2B1* は、*OsDREB2B2* でイントロンとなっている部分のうち 53 塩基がエキソン化しており、その結果起きるフレームシフトにより短いペプチドをコードしていると考えられた。*OsDREB2B1* の mRNA は、非ストレス条件下での蓄積量が *OsDREB2B2* と比較して多いが、ストレス応答性はあまり高くなかった。また、*OsDREB2B1* は核に局在せず、転写活性化能も持たないことが示された。*OsDREB2B* のオルソログは他のイネ科植物からも単離されているが、そのいくつかは *OsDREB2B* と同様に 53 塩基からなるエキソンを持つものも含めて複数の転写産物を持つことが報告されている。*OsDREB2B* オルソログの発現制御システムがイネ科の植物間で類似していることから、このような選択的スプライシング機構を持つことが、ストレス応答にとって有利である可能性が考えられた。

OsDREB2B1 の植物体における役割を考察するために、*OsDREB2B1* が *OsDREB2B2* の前駆体として蓄積している可能性を検証した。*GFP* と *OsDREB2B1* の融合遺伝子を恒常的に過剰発現させた形質転換イネを作出し、高温ストレス処理を行った。その結果、内在性の *OsDREB2B2* の mRNA 蓄積量は増加したが、*GFP* と *OsDREB2B2* が融合した転写産物は検出されなかった。このことから、*OsDREB2B2* はストレス時に *OsDREB2B1* から 53 塩基のエキソンが抜かれて生じるのではなく、*OsDREB2B* pre-mRNA から直接スプライシングされることで生じると考えられた。

2-2. 植物体における *OsDREB2B* の機能

シロイヌナズナのプロトプラストを用いた一過的発現系の実験から、*OsDREB2B* は *DREB2A* と異なり全長配列でも高い転写活性化能を示した。そこで *OsDREB2B* がシロイヌナズナの活性型 *DREB2A* と同等な機能を持つかどうか調べるため、*OsDREB2B* を *CaMV35S* プロモーターの制御下で恒常的に過剰発現させた形質転換シロイヌナズナを作出した。これらの形質転換植物は、活性型

DREB2A を過剰発現させた植物と同様に、生育の遅れなどの性質を示し、DREB2A 標的遺伝子の発現量が非ストレス条件下でも増加していた。また、対照区の植物体と比較して高い乾燥・高温耐性を示した。一方、OsDREB2B を浸透圧ストレス誘導性の *RD29A* プロモーターの制御下で発現させた形質転換シロイヌナズナも同様に作出したところ、これらの植物体は対照区の植物体と比較して生育に差はなかったが、乾燥ストレス耐性は向上していた。

以上の結果より、OsDREB2B がシロイヌナズナ中において活性型 DREB2A と同様の機能を持ちうることを示された。しかし、*OsDREB2B* の形質転換イネを作出し解析をおこなったところ、それらの植物体は形質転換シロイヌナズナのような顕著な形態変化を示さず、これまでのところ明確なストレス耐性の変化も見られていない。そのため、イネにおいてはシロイヌナズナ中とは異なり、OsDREB2B が十分に活性を持つための特異的制御機構が存在する可能性が示唆された。

3. 総括

本研究によって、イネの DREB2 型の転写因子をコードする遺伝子群 (OsDREB2) の全体像が明らかとなり、ストレス条件下での発現解析や形質転換シロイヌナズナを用いた解析から、*OsDREB2B* がイネのストレス耐性獲得にとって重要な遺伝子であることが示唆された。また *OsDREB2B* の制御にはストレス誘導性の選択的スプライシングが重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、形質転換イネの解析結果から、OsDREB2B が他にも翻訳後修飾などの制御を受けている可能性が示唆された。これらの制御機構を解明してイネのストレス耐性獲得機構を明らかにすることは、ストレス時のシグナル伝達について理解するために重要であるばかりでなく、環境ストレスに対して高い耐性を持つ作物の分子育種にも役立つと考えられる。

発表論文

Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.: Comprehensive analysis of rice *DREB2*-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Mol Genet Genomics*, in press.