

論文の内容の要旨

論文題名 耐塩性育種のためのオヒルギ (*Bruguiera gymnorhiza*)
の耐塩性遺伝子の解析

氏 名 深 山 真 史

本研究は、耐塩性育種の遺伝子源としてマングローブ植物のオヒルギ (*Bruguiera gymnorhiza*) に着目して、シロイヌナズナの耐塩性を強化するオヒルギの耐塩性遺伝子 *BgARP1* の同定を行なったものである。これを以下の3段階のプロセスによって達成した。すなわち、1. EST シークエンシングによりオヒルギの遺伝子を解読し、2. これを基に構築した DNA マイクロアレイを用いて塩応答性遺伝子を同定し、3. これらの中から、アグロバクテリウムの耐塩性を強化する遺伝子を同定し、さらにその中からシロイヌナズナの耐塩性を強化する遺伝子 *BgARP1* を同定した。以下に上記3過程の詳細をそれぞれ示す。

1. Expressed Sequence Tags (EST) シークエンシングによるオヒルギ遺伝子の解読および発現解析

オヒルギ遺伝子を解読するため、EST シークエンシングを行った。これにより、効率的かつ安価に、発現している遺伝子のみを解読することができると考えた。まず、塩などのストレス処理をしたオヒルギの葉と根から抽出した mRNA から、5つの cDNA ライブラリーを

構築し、合計 26,400 個のオヒルギ EST をシーケンシングしたところ、14,842 個の高い確度(99.99%以上)の配列が得られた(DDBJ アクセション番号 BP938635~BP953476)。さらに、この 14,842 個の EST をクラスタリングして、同一遺伝子由来の EST を一つにまとめて、6943 個の重複のない遺伝子配列を得た。これが本研究で解読された実質遺伝子数である。なお、この 6943 個の遺伝子のうち、4339 個(62.5%)は、既知の配列(UniProt データベースのエントリー)と有意な配列相同性($E \leq 10e-5$)を示した。

次に、EST の冗長度に基づいた遺伝子発現定量を行い、この結果を用いて、クラスタリング解析による遺伝子発現プロファイリングを行った。91% の信頼度で、EST 冗長度が、遺伝子発現量を反映している 129 個の遺伝子(3701 個の EST から構成される)を対象にクラスタリング解析を実施したところ、これらの遺伝子は 4 個のメジャーなクラスターに分類された。また、これにより塩ストレス時のオヒルギの組織特異的および共通の遺伝子発現が明らかになった。

2. DNA マイクロアレイを用いたオヒルギの塩応答性遺伝子の同定

まず、7029 個のオヒルギ遺伝子を搭載した cDNA マイクロアレイを用いて、樹齢 6 ヶ月のオヒルギの塩処理(500 mM NaCl)前後のオヒルギの上位展開葉、下位展開葉および根の遺伝子発現を解析したところ、塩処理によって 5 倍以上のアップレギュレートされた 228 個の遺伝子と、ダウンレギュレートされた 61 個の遺伝子を同定した。

次に、11,997 個のオヒルギ遺伝子断片を搭載したオリゴ DNA マイクロアレイを用いて、塩および浸透圧処理前後のオヒルギの葉の遺伝子発現を解析した。その結果、塩と浸透圧ストレス下で有意に発現量の異なる 865 個の遺伝子を同定した($p < 0.05$ 、false discovery rate [FDR] < 5%)。この 865 個の遺伝子のうち、1 条件以上で、2 倍以上アップレギュレート(ダウンレギュレート)された遺伝子を 380 (588) 個同定した。また、塩ストレスで 2 倍以上アップレギュレート(ダウンレギュレート)された遺伝子を 183 (286) 個、浸透圧ストレスで 2 倍以上アップレギュレート(ダウンレギュレート)された遺伝子を 188 (232) 個同定した。この 865 個の遺伝子について、塩および浸透圧処理後 6 時間および 24 時間の計 4 実験条件について遺伝子発現プロファイルの階層的クラスタリング解析を実施したところ、塩

と浸透圧処理を境に決定木が分岐したため、塩および浸透圧ストレスに対する遺伝子の応答パターンは互いに異なることが示された。遺伝子発現解析と併せて、生理学的な解析を行ったところ、オヒルギの光合成速度は、塩処理後 6 時間で低下したが、24 時間後にはそれよりも回復したことが分かった。また、オヒルギ葉の水ポテンシャルは、塩処理前後で有意な変化はなかった。一方で、浸透圧処理後には、光合成速度および水ポテンシャルは不可逆的に低下した。塩処理前のオヒルギ葉の Na^+ と Cl^- の濃度の合計は 481 mM であったが、塩処理後は上昇して、2 週間後には 1 M 程度に達した。これらの結果から、オヒルギは塩処理後、 Na^+ や Cl^- イオンを吸収して、植物体内の浸透圧を高めることで浸透圧ストレスを回避したのではないかと考察する。浸透圧応答遺伝子として知られる *osmotin* 遺伝子が、塩応答せず浸透圧応答した結果も、この考察を支持すると考えられる。

続いて、11,997 個のオヒルギ遺伝子断片を搭載したオリゴ DNA マイクロアレイを用いて、オヒルギの主根および側根における塩処理前後の遺伝子発現を解析した結果、主根で 403 個、側根で 175 個の遺伝子が、塩処理によって顕著に ($p < 0.01$, fold change > 2) アップレギュレートされたことが分かった。Blight-associated protein p12 precursor protein 遺伝子と、他のマングローブ（ロッカクヒルギ）由来でタバコに耐塩性を付与したと報告されている *mangrin* は、側根において顕著にアップレギュレートされた。オヒルギ特有の遺伝子である *Bg70* や BURP-domain containing protein 遺伝子は、主根において顕著にアップレギュレートされた。塩処理後、1、3、6、12 時間では、225、383、576、520 個の遺伝子が顕著にアップレギュレートされた。これらのアップレギュレートされた遺伝子群には、 C_2H_2 転写因子、WRKY 転写因子、MYB 転写因子などの転写因子遺伝子が多数含まれていた。

3. オヒルギの塩応答性遺伝子の機能解析

DNA マイクロアレイによって同定された塩応答性遺伝子のうちの 40 個を、アグロバクテリウムに導入して、250 mM NaCl を含む LB 寒天培地において培養したところ、コントロールの GUS 組換え体よりも大きいコロニーを形成した組換え体が確認された。詳細に解析するために、菌数を揃えてスポットテストを実施したところ、*BgZF1*、*BgARP1* の組換え体は、300 mM、350 mM においてもコロニーを形成した。次に、組換え株が、高度な耐塩性

を示した *BgZF1*、*BgARP1* および再現良く耐塩性を示した *BgLTP* を、シロイヌナズナに導入して、機能解析を実施した。まず、播種後 6 日目に、芽ばえを 0、100、125、150、175 mM NaCl を含む 1/2 MS 培地に移植し、移植後 11 日目に芽ばえの新鮮重を測定したところ、*BgLTP* の 1 系統 (3 系統中)、*BgARP1* の 2 系統 (3 系統中) の新鮮重が、WT のものよりも有意に大きかった。同様の試験を 3 回繰り返したところ、良好な再現性を示したため、*BgLTP*、*BgARP1* は、シロイヌナズナの耐塩性を強化したことが示された。一方、*BgZF1* 組換え体には、耐塩性の向上は認められなかった。また、*BgZF1* 組換え体は、通常の栽培条件でも葉が小さく、草高が低くなっており、生育抑制が起きたと考えられる。

シロイヌナズナの耐塩性を再現よく強化した *BgARP1* について、詳細に解析した。播種後 4 日目に 0、100、125、150、175 mM NaCl を含む 1/2 MS 培地に移植し、移植後 12 日目に芽ばえの新鮮重を測定したところ、150、175 mM の高塩濃度下において、WT よりも新鮮重が大きかった。播種後 28 日の *BgARP1* 組換え体では、WT と比較して、200 mM 塩処理後の Na⁺ 濃度の増加が若干遅く、K⁺ 濃度の低下が遅くなっていた。さらに、塩応答性遺伝子の *RD29A*、*RD29B* および *RD22* の発現応答も、軽減された上で、遅延された。以上により、*BgARP1* の組換え体は、*BgARP1* を介したシグナル伝達経路の活性化または抑制により、1) *osmotin* の発現が向上したこと、2) *RD29A*、*RD29B* および *RD22* が属するパスウェイの過剰な塩応答が抑制されたこと、3) K⁺/Na⁺ の恒常性が維持されたことにより、WT よりも高い耐塩性を発現したのではないかと考えられる。

以上のように、EST 解析によってオヒルギ遺伝子を解読し、それら中から、DNA マイクロアレイを用いて塩応答性を示す遺伝子を選抜し、さらにアグロバクテリウムを宿主とした耐塩性スクリーニングをすることによって選抜された遺伝子を、シロイヌナズナに導入して機能解析を行なうことで、シロイヌナズナの耐塩性を強化する遺伝子 *BgARP1* を同定した。これにより、本手法が耐塩性遺伝子の同定法として有効であることが示された。本研究によって得られた耐塩性遺伝子 *BgARP1* およびその同定手法は、耐塩性育種の研究に資すると期待できる。