

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 入学
氏 名 高崎 寛則
指導教員名 篠崎 和子

論文題目

高等植物の環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子の機能解析

序論

環境ストレスは作物の生産性を制限する大きな要因の一つである。環境ストレス耐性作物の開発は、環境ストレスが問題となっている作物生産地域の農業に大きな利益をもたらすと考えられる。NAC 型転写因子は植物特異的な転写因子であり、環境ストレス応答ではシロイヌナズナの乾燥応答性遺伝子の一つとして単離された *Respond to Dehydration 26 (RD26)* がコードするタンパク質が知られている。また、乾燥ストレス初期応答性遺伝子 *early responsive to dehydration stress 1 (ERD1)* の発現を制御する因子としても同定されている。NAC 型転写因子は、N 末端側に DNA 結合ドメインと二量体の形成ドメインを持ち、C 末端側に転写活性化ドメインを持っている。また、*RD26* と相同性の高い環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子であるイネの *OsNAC6* や *SNAC1* を用いることで乾燥耐性イネを作出できることが明らかになっている。

本研究においては、新規のイネ環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子の作用機構を明らかにすること、さらにイネに乾燥耐性を付与することを目的として、イネ環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子遺伝子 *OsNAC5* について、その詳細な発現解析とタンパク質の機能解析を行った。さらに *OsNAC5* の過剰発現イネを用い

た解析から、標的と考えられるストレス誘導性遺伝子を同定した。一方、環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子の機能を詳細に解析するために、シロイヌナズナの RD26 ファミリーに属する遺伝子群の T-DNA 挿入多重変異体の作製とその表現型解析を行った。

イネの環境ストレス誘導性OsNAC5 の発現解析とタンパク質の機能解析

イネにおいて環境ストレスで誘導される遺伝子を RNA ゲルプロット法によって解析したところ、SNAC1 や OsNAC6 などの既知の遺伝子だけではなく、OsNAC3、OsNAC4、OsNAC5 もストレス誘導性であることが明らかになった。乾燥時に合成される植物ホルモンであるアブシシン酸(ABA)あるいはメチルジャスモン酸(MeJA)処理による発現解析から、OsNAC5、OsNAC6 が ABA、MeJA に誘導性であり、OsNAC3、OsNAC4、SNAC1 は MeJA のみに誘導性であることが示された。OsNAC5 のプロモーター上の ABA 応答配列(ABRE)に変異を入れると ABA 応答性が変化することから、この ABA 応答性は ABRE を介した発現である可能性が示唆された。酵母とイネのプロトプラストを用いた転写活性化能の解析により、OsNAC5 の C 末端に転写活性化領域が見出された。OsNAC5、OsNAC6、SNAC1 の組換えタンパク質を用いて DNA 結合活性を解析したところ、NACRS を持つオリゴ DNA に結合したことから、これら 3 つの転写因子が直接 DNA (NACRS) に結合することが示唆された。また、OsNAC5 の NAC ドメインを用いたプルダウンアッセイの解析により、OsNAC5 と OsNAC5、OsNAC6 あるいは SNAC1 の NAC ドメインは相互作用することが示唆された。

環境ストレス誘導性OsNAC5 過剰発現イネの解析

OsNAC5 の植物体中での機能を明らかにするために OsNAC5 をトウモロコシのユビキチンプロモーターによって過剰発現する遺伝子組換えイネを作出し、その生育ならびに環境ストレス耐性を評価した。OsNAC6 過剰発現イネは生育が遅延することが示されていることから、OsNAC5 過剰発現イネと OsNAC6 過剰発現イネの生育を比較したところ、OsNAC6 過剰発現イネは生育に遅延が見られたが、

OsNAC5 の過剰発現イネには生育の遅延が見られず、ベクターコントロールのイネと同様の生育を示した。*OsNAC5* の過剰発現イネを用いて塩ストレス耐性試験、あるいは乾燥耐性試験を行った結果、*OsNAC5* の過剰発現イネはベクターコントロールと比較して高い生存率を示した。マイクロアレイによって遺伝子の発現を解析した結果、*OsLEA3* を含む数種の乾燥誘導性遺伝子が *OsNAC5* 過剰発現イネにおいて発現が増加していることが明らかになった。*OsLEA3* は乾燥時にストレス耐性獲得のために機能する重要な遺伝子であると考えられたため、*OsLEA3* と *OsNAC5* の関連性についてさらに解析を行った。*OsLEA3* 遺伝子の 5'側のの上流配列に *OsNAC5* の結合配列が存在する可能性を検証するために、*OsNAC5* の DNA 結合ドメインを GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させた。*OsLEA3* の 5'側上流 1.5-kb 配列上には 14 個の NAC 結合コア配列が存在した。これらの 14 個の配列の中から、ANAC019 が結合しやすいとされる配列 (T/A T/G NCGT G/A) を 3 つ選択した。さらに、NAC 結合コア配列を含まない配列を一つ選択し、オリゴヌクレオチドを合成してゲルシフトアッセイを行った。その結果、*OsNAC5*-GST 融合タンパク質は *OsLEA3* の転写開始点から 56 塩基上流から 85 塩基上流の間の領域の配列に結合した。さらに、*OsNAC6* を用いてこの配列への結合実験ならびに非 RI 標識のオリゴヌクレオチドを用いた競合阻害実験を行った。その結果、*OsNAC5* と *OsNAC6* の両方ともこの配列に結合することが示された。

シロイヌナズナの環境ストレス誘導性NAC型転写因子の機能解析

環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子の機能を明らかにするために、変異体を用いて表現型を解析した。イネにおいては、*OsNAC3*, *OsNAC4*, *OsNAC5*, *OsNAC6* および *SNAC1* が顕著に環境ストレスによって誘導されるため、環境ストレス下では重要な役割を担っていることが推定される。しかし、これまでに *OsNAC3*, *OsNAC4*, *OsNAC5*, *SNAC1* の T-DNA 挿入変異体は単離されていない。そこで、材料が整備されていて解析が比較的容易なシロイヌナズナを用いて、*OsNAC5* と相同性が高い環境ストレス誘導性遺伝子 *RD26* を含むファミリー遺伝子の T-DNA 挿入変異体の表現型を解析した。シロイヌナズナの環境ストレス誘導性 NAC 型転

写因子をコードする *RD26* を含むファミリー遺伝子の T-DNA 挿入変異体の多重変異体を作製した。*ANAC019*, *ANAC055*, *RD26*, *ATAF1*, *ATAF2* の五重変異体においても顕著な乾燥耐性の変化は見られなかった。しかし、ABA による葉の老化に関して顕著に差が観察され、ABA によって誘導される葉の老化が、五重変異体において抑制されることを見出した。変異体においては ABA によるクロロフィルの減少が抑制され、老化のマーカー遺伝子である *SEN4* あるいは *ERD1* の発現も抑制されていた。

総括

本研究により、環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子は乾燥等の環境ストレス耐性の獲得機構の制御において重要な機能をもつが、ABA による葉の老化の制御にも関与する可能性が示唆された。環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子遺伝子が ABA 誘導性の老化を制御していることを、多重変異体を用いることで証明した。また、イネの環境ストレス誘導性 *OsNAC5* は、過剰発現することによって乾燥、塩ストレス耐性イネを作出することができる遺伝子であることを示した。また、生育に与える影響は NAC 型転写因子遺伝子の種類によって異なる事が明らかになった。本研究で新規に機能を明らかにしたイネの *OsNAC5* は、生育を阻害することなく乾燥や塩ストレスなどの環境ストレス耐性を向上させることができるため、環境ストレス耐性作物を開発するために有効であると考えられる。今後は、*OsNAC5* 過剰発現植物が、圃場レベルでの干ばつや塩害といった不良環境に耐えるか検証することが求められる。また、今後さらなる機能解析によって環境ストレス誘導性 NAC 型転写因子による環境ストレス耐性獲得の制御機構や老化の詳細な制御機構が解明されることが期待される。

参考文献

Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nakashima K (2010) The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol Genet Genomics* 284: 173-183