

助成番号 9940

酵母の遺伝子発現系を用いた塩生植物ウラギクの耐塩性関与遺伝子のクローニング

助成研究者：稲垣 昇(神戸大学 農学部 植物資源学科)
共同研究者：金地 通生(神戸大学 農学部 植物資源学科)
宇野 雄一(神戸大学 農学部 植物資源学科)
竹田 みぎわ(神戸大学大学院 自然科学研究科)

塩生植物ウラギク (*Aster triporium* L.) の耐塩性に関与する遺伝子を機能性スクリーニング法で単離するため、酵母のストレス応答性発現ベクターを構築した。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の InvSc1 を様々な NaCl 濃度の培地に植え付け、生育状況を調査して耐塩性を評価した。その結果、形質転換を行った酵母を SD-Ura 培地を用い、30℃・48時間の培養条件で培養すると、700mM以上のNaCl濃度の培地では成長抑制が認められた。

酵母用発現ベクターを構築するため、酵母のストレス応答性プロモーター51bp (Oligo 31/32, Kobayashi and McEntee, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87, p.6550-p.6554, 1990) を *CYC1* 最小プロモーターに連結させて pYES2 ベクター中のプロモーター部分である *GAL1* と置換した (pYES2-oligo31/32)。構築した酵母用発現ベクターのプロモーター Oligo 31/32-*CYC1* のストレス応答性を評価するため、*lacZ* 遺伝子をレポーター遺伝子として pYES2-oligo31/32 ベクターに組み込み (pYES2-oligo31/32-*lacZ*)、形質転換させた酵母に対して β -ガラクトシダーゼ分析を行った。その結果、 β -ガラクトシダーゼの活性は培地内に含まれる NaCl 濃度に比例することが明らかになり、oligo31/32-*CYC1* プロモーターが NaCl の濃度に依存して目的遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。

pYES2-oligo31/32 ベクターを用いてウラギクの cDNA ライブラリを作成した結果、約 500,000 個の形質転換体を得ることができた。これらの形質転換体を 700mM の NaCl 濃度の SD-Ura 培地でスクリーニングを行い、ポジティブクローンを得た。現在、これらのベクター中に含まれる cDNA の塩基配列の決定を行っている。

助成番号 9940

酵母の遺伝子発現系を用いた塩生植物ウラギクの耐塩性関与遺伝子のクローニング

助成研究者：稲垣 昇 (神戸大学 農学部 植物資源学科)
 共同研究者：金地 通生 (神戸大学 農学部 植物資源学科)
 宇野 雄一 (神戸大学 農学部 植物資源学科)
 竹田 みぎわ (神戸大学大学院自然科学研究科)

1. 研究目的

ウラギク (*Aster tripolium* L.) は汽水域に自生するキク科シオン属の双子葉の野草で、通常の植物に比べて高い耐塩性を有する。我々は、ウラギクの植物体と培養細胞を材料に用い、生理・生態的特性と遺伝子レベルでの塩ストレス応答について調査および研究を行ってきた。その結果、150mMのNaClでは生長が阻害されないことや、300mMという高塩濃度存在下で発芽率の低下や栄養生長の阻害が見られるものの、依然として生存能力を保持していることが明らかになった (Uno *et al.*, 1996)。また、NaCl濃度が150mMを越えた際に発現が誘導される *samip* 遺伝子がコードする水チャンネルタンパク質が積極的に細胞質内に水分子を輸送する可能性も示唆された (Uno *et al.*, 1998)。また、Pereraら (1994) は、ウラギクの耐塩性機構について、孔辺細胞周辺のアポプラストにナトリウムイオンを集積して濃度を上昇させることにより気孔を部分閉鎖し、蒸散を抑制して水利用効率を高めていることを示唆した。ウラギクの耐塩性を評価し、作物の栽培に役立つ将来の遺伝資源としての価値を見出すことは重要であると考えられるが、ウラギクの耐塩性に関与する遺伝子全体の把握は出来ておらず、今後は塩ストレスで発現する他の遺伝子の検索や、遺伝子の機能に着目した研究が必要であると考えられる。

遺伝学的方法を用いた遺伝子の機能解析は、突然変異体を作成してスクリーニングする方法が一般的であるが、ウラギクは、春に播種して秋から冬に採種するというように生長サイクルが遅く、再分化系や遺伝子の導入系がまだ確立していないため、かなりの年月を要する。そこで、ウラギクの遺伝子を検索しその機能を解析して行くにあたり、逆遺伝学的方法を用いることにした。逆遺伝学的方法を用いた遺伝子の検索は、PCR法やディファレンシャルスクリーニング法が主流である。しかしながら、PCR法では既知の相同性遺伝子の検索に他ならず、目的の植物に特異的な遺伝子を見つけることはできない。また、遺伝子の発現を基本とするディファレンシャルスクリーニング法では、ストレス応答時にかなり強く発現している遺伝子しか単離できず、発現が弱くても重要な機能を持つ遺伝子を見落とす可能性が高い。このような問題点を克服するには、スクリーニング方法に機能性を与える必要があると考えられる。表現型を基準にした機能性スクリーニングを行うことができるならば、耐塩性に直接関与する遺伝子のクローニングができる可能性がある。植物の遺伝子を機能性スクリーニング法で単離するには、宿主として植物を選ぶのが妥当であると考えられるが、形質

転換効率の良さや培養法の簡便さを考慮し、実験室レベルで容易に取り扱うことのできる酵母を宿主とした。ウラギクは、塩を排出する塩腺のような構造を葉に備えておらず、細胞レベルで強い耐塩性を示すので、単細胞生物の酵母の系を用いて耐塩性機構の解明に接近することが出来ると考えられる。酵母は大腸菌とは異なり、真核生物で進化的に植物に近いので、植物の持つ遺伝子が酵母中で機能を保持する可能性がある。実際に、トマトに存在する *le25* 遺伝子を酵母で発現させた場合、NaClを含む培地での生存率や成長速度が上昇したことも報告されている (Imai *et al.*, 1996)。また本実験では、目的遺伝子の発現を司るプロモーター領域として、*GAL1* などのガラクトース誘導型ではなく、ストレス誘導型のものを用いることにした。KobayashiとMacEntee(1990)は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、熱ショックで誘導される *DDR2* 遺伝子のプロモーター領域を解析し、CCCCT(C₄T)を含む51bpのシスエレメントが、熱ショックに応答することを明らかにした。また、このシスエレメントは、300mMのNaClを用いた浸透ショックストレスにも応答することがノーザン解析により明らかにされている (Treger *et al.*, 1998)。このストレス応答性プロモーターを用いたならば、ストレス存在下に限定して目的の遺伝子を発現させることができ、恒常的発現によって致死したり生育が悪くなる酵母をスクリーニングで取りこぼさずにクローニングができる可能性がある。

本研究では、以上のような観点から、ウラギクの耐塩性に関与する遺伝子を機能性スクリーニング法で単離するため、酵母のストレス応答性発現ベクターを構築した。

2. 研究方法

2.1 研究材料

種子発芽させたウラギク (*Aster triporium* L.) の実生をハイポネックス液肥で水耕栽培し、15日後に終濃度が400mMになるようNaClを添加して10時間の塩ストレス処理を行った。

2.2 酵母InvSc1の耐塩性調査

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のInvSc1 (*MAT α /a*, *his3--1/his3--1*, *leu2/leu2 1-289*, *ura3-52/ura3-52*, Invitrogen社) を様々なNaCl濃度 (0,100,200,~1500mM) のYPD培地に植え付け、生育状況を調査して耐塩性を評価した。また、pYES2ベクター (Invitrogen社) を形質転換したInvSc1を様々なNaCl濃度のSD-Ura培地に植え付け、同様に耐塩性を評価した。

2.3 酵母用発現ベクターの構築

酵母のストレス応答性プロモーター51bp (Oligo 31/32, Kobayashi and McEntee.1990) に制限酵素サイトの *Hind*IIIと *Sa*Iを末端に付加したDNA断片を合成オリゴDNAで作成し、

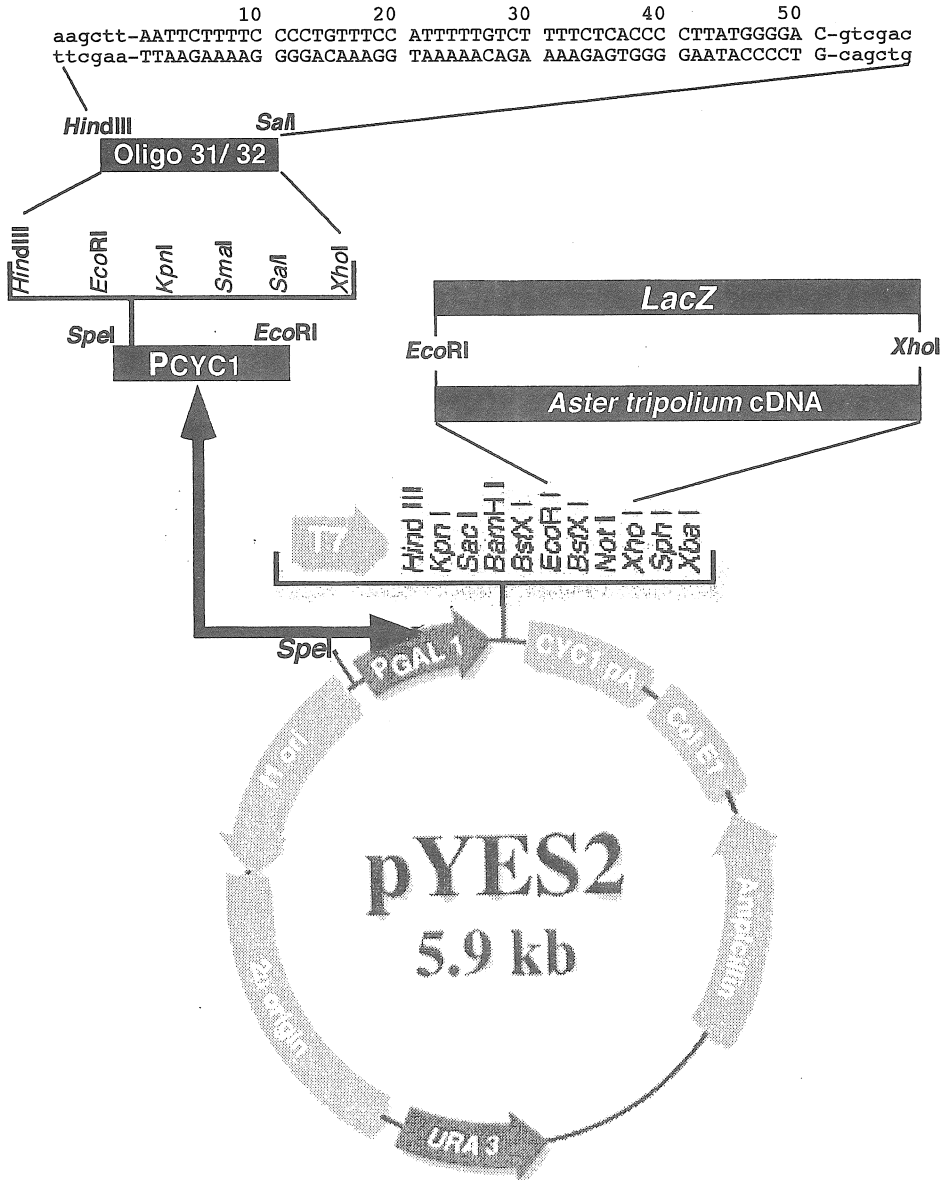


Fig.1 Schematic diagram of yeast expression vector. A yeast expression vector was constructed with the 51-bp promoter region (Oligo 31/32: Kobayashi and MacEntee, 1990) of yeast *DDR2* gene containing the STRE (STress Responsive Element) based on pYES2 (Invitrogen). Oligo 31/32 was ligated into the multi cloning site of the minimal promoter of the yeast cyclin gene (PCYC1) in pLacZi vector (Clontech). Oligo 31/32-CYC1 promoter was replaced with *GAL1* promoter (PGAL1) in pYES2. The reporter vector containing *lacZ* reporter gene (pYES2-Oligo 31/32-*lacZ*) turn the yeast cells blue in β -galactosidase assay. An expression library with *Aster tripolium* L. cDNA under the control of the oligo 31/32 containing the STRE was transformed into the yeast strain InvSc1.

One-Hybridスクリーニング用ベクターpLacZi (Clontech社)のマルチクローニングサイト中のHindIII-XhoIサイトに組み込み、大腸菌に形質転換させた (Fig.1). クローニングを行った大腸菌からプラスミドを回収し、pLacZiのプロモーターCYC1-Oligo 31/32の部分には制限酵素サイトのSpeIとEcoRIを、lacZ遺伝子の部分にはEcoRIとXhoIを末端に付加したDNA断片をそれぞれPCR法によって増幅させた。pYES2ベクターのプロモーター部分であるGALIを制限酵素のSpeIとEcoRIで消化して取り除き、増幅させたCYC1-Oligo 31/32のDNA断片を挿入した (pYES2-Oligo 31/32). また、増幅させたlacZ遺伝子は、pYES2ベクターのマルチクローニングサイト中のEcoRI-XhoIサイトに組み込み、大腸菌に形質転換させた (pYES2-Oligo 31/32-lacZ).

2.4 レポーター遺伝子の導入とストレス応答性の評価

CYC1-Oligo 31/32のストレス応答性を確認するために、上記2.3で作成したpYES2-Oligo 31/32-lacZベクターを酵母に形質転換してNaCl存在下のSD-Ura培地にプレーティングし、酵母が青色を呈することをβ-ガラクトシダーゼフィルタアッセイ法によって確認した。また、形質転換した酵母をNaCl存在下のSD-Ura培地で液体振とう培養し、15時間後に菌体を回収してβ-ガラクトシダーゼ活性の定量を行った。

2.5 ウラギクcDNAライブラリーの作成とスクリーニング

処理を行った植物体からmRNAを抽出し、cDNAを合成した。その後、構築したpYES2-Oligo 31/32に組み込み、cDNAライブラリーを作成した。このcDNAライブラリーを酵母に形質転換させ、700mMの濃度のNaClを含む培地で生育可能な酵母をスクリーニングした。

3. 研究結果

3-1. ウラギクの塩ストレス処理時の生育

400mMのNaClの添加によって、ウラギクは急激なストレスを受け、1-2時間以内に萎凋した。処理終了時の10時間後には完全に脱水したようであったが、その後NaClが入っていない液肥に戻すと5時間程度で回復し、通常の生育を続けた。

3-2. 酵母InvSc1の耐塩性

pYES2ベクターの宿主である酵母InvSc1株を0mMから1500mMのNaCl濃度のYPD培地に塗り広げ、24時間30℃で培養を行った。その結果、1200mMのNaCl濃度のYPD培地でも生育が可能であった (Fig. 2)。次に、pYES2-lacZベクターおよびpYES2-oligo31/32-lacZベクターを形質転換した酵母InvSc1を様々なNaCl濃度のSD-Ura培地に植え付け、同様に耐塩性を評価したところ、30℃で48時間の培養条件では700mM以上のNaCl濃度の培地では生

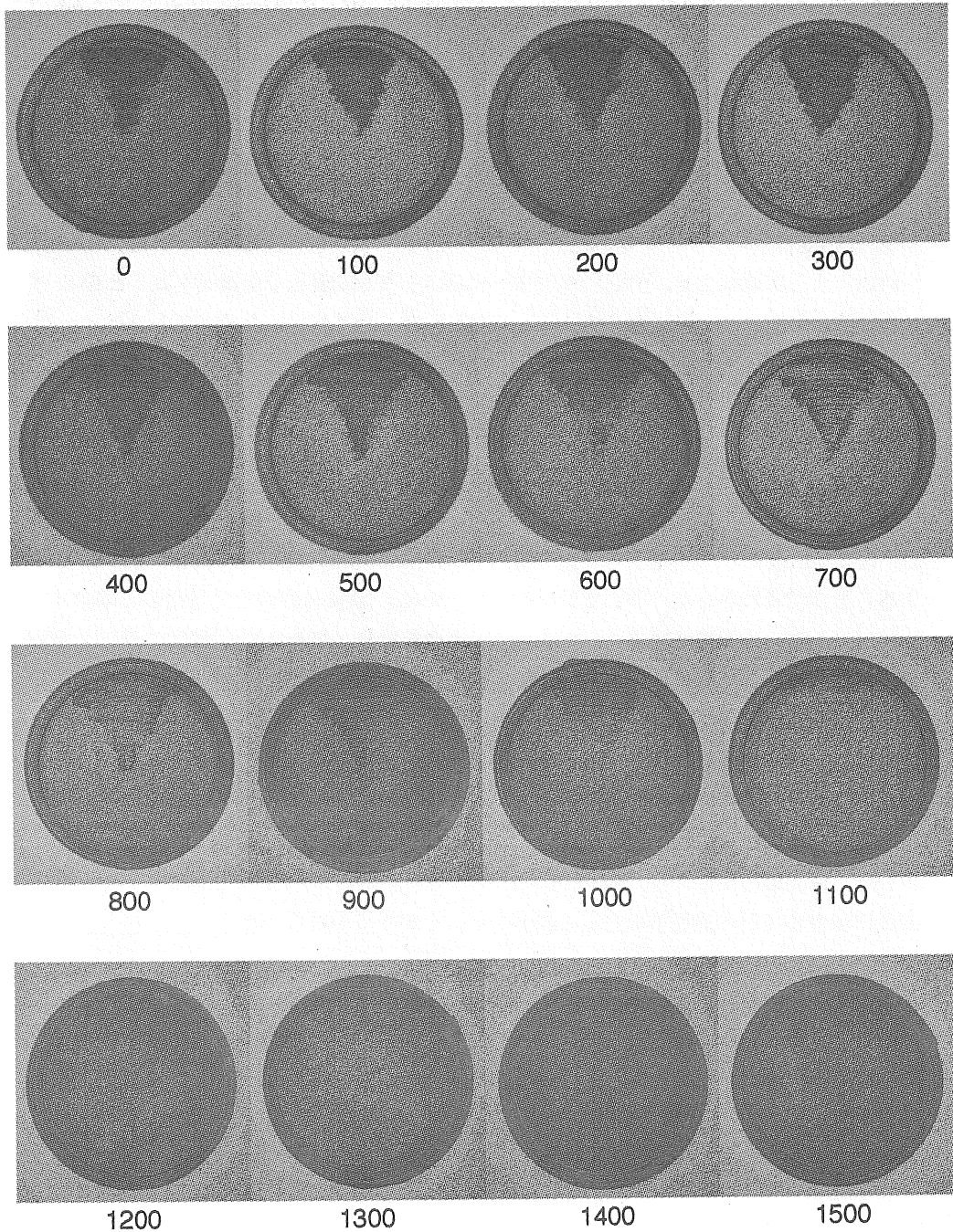


Fig.2 Salt tolerance of InvSc1 cells in YPD medium. *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 cells were picked up and grown in YPD medium with various concentration of NaCl. Each cell was grown at 30°C for 24 h.

育を確認することができなかった (Fig. 3). pYES2ベクターのみを形質転換させた場合でも同様の結果であり、挿入したoligo31/32の断片や*lacZ*遺伝子の影響で酵母の耐塩性が変化しないことを示唆した。以上の実験結果に従い、ウラギクのcDNAを入れたpYES2-oligo31/32-*lacZ*ベクターを形質転換させた酵母InvSc1は、700mMのNaCl濃度の培地でスクリーニングを行うことにした。

3-3. 酵母用発現ベクターの構築とβ-ガラクトシダーゼ分析によるストレス応答性の評価

PCRによって増幅させ、pYES2ベクターに挿入した*lacZ*遺伝子が機能することをβ-ガラクトシダーゼフィルタアッセイ法によって確かめた。形質転換したすべてのコロニーがガラクトース入りの培地で青色を呈したので、*lacZ*遺伝子はPCR反応によって塩基置換変異することなく機能することが確認できた。次に、STREを含む51bpのoligo31/32-CYCIプロモーターがNaClに応答して*lacZ*遺伝子の転写を促すことを同様にして確かめた。コントロールの培地 (0mMのNaCl) でも酵母の形質転換体がわずかに青色を呈していたが、100から500mMと培地内のNaCl濃度が上昇するに従い、濃い青色を呈することが確認できた (Fig. 3)。600 mM以上のNaClを含む培地では酵母の生育が極端に悪かったため、色の変化を確認することができなかった。そこでプロモーターのNaCl濃度依存性を定量化して確かめるため、コントロールの培地で成長したコロニーを掻き取り、様々なNaCl濃度のSD-Ura液体培地で振とう培養して酵母の塩ストレス下での成長量とSTREによる*lacZ*遺伝子の転写活性化を確認した。成長量はOD₆₀₀で、*lacZ*遺伝子の転写活性化は、β-ガラクトシダーゼの活性を定量することで評価した。その結果、形質転換酵母の成長量はNaCl濃度に反比例し、β-ガラクトシダーゼの活性はNaCl濃度に比例することが明らかになった (Fig.4)。β-ガラクトシダーゼの活性の最大値は、1500mMのNaCl処理時に確認でき、コントロールの約22倍に相当した。以上の結果により、STREを含む51bpのoligo31/32-CYCIプロモーターがNaClの濃度に依存して目的遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。

3-4. ウラギクの耐塩性関与遺伝子のスクリーニング

ウラギクのcDNAを含むpYES2-oligo31/32ベクターを大腸菌に形質転換させた際に、約500,000個の形質転換体を得ることができた。これらの形質転換体からプラスミドを抽出し、酵母InvSc1に再度形質転換させて、700mMのNaCl濃度のSD-Ura培地でスクリーニングを行い、ポジティブクローンを得た。現在、これらのベクター中に含まれるcDNAの塩基配列を決定している。

4. 考察

本実験で構築した酵母用発現ベクターは、NaClの濃度に依存して目的遺伝子の転写を促進させることが明らかになった (Fig. 3およびFig. 4)。Tregerらによれば、450mMのNaClを

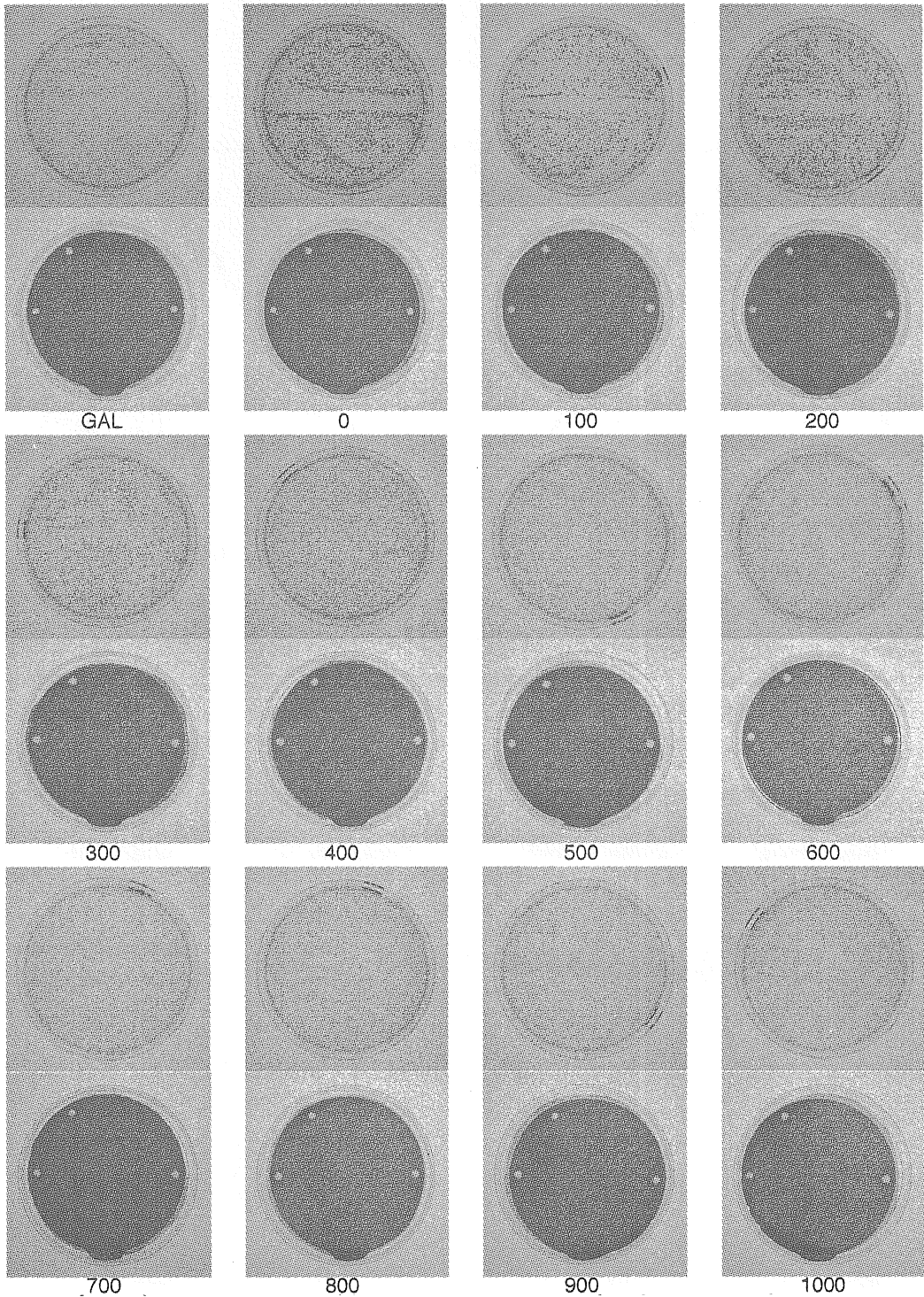


Fig.3 Growth and β -galactosidase activity of *InvSc1* cells expressing *lacZ* gene under the control of the oligo 31/32-*CYC1* or *GAL1* promoter. The cells were transformed with pYES2-oligo 31/32-*lacZ* (upper) or pYES2-*GAL1-lacZ* (lower) were grown in SD-Ura medium with the various concentration of NaCl. The number below the each dish indicates the concentration of NaCl in the SD-Ura (0-1500 mM) or SD-Ura-galactose medium (GAL). Each cell was grown at 30°C for 24 h.

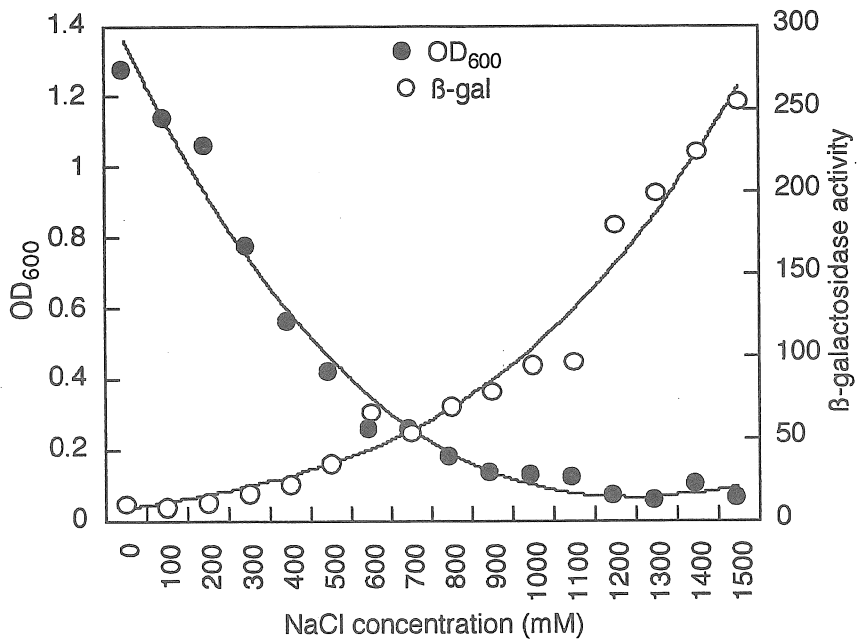


Fig.4 Dose dependency with elevated NaCl concentration for the growth and β-galactosidase activity of InvSc1 cells expressing *lacZ* gene under the control of oligo 31/32-*CYC1* promoter. The cells containing pYES2-oligo 31/32-*lacZ* were grown in SD-Ura medium with the various concentration of NaCl. 1 ml culture was removed at 15 h after treatment began and A660 nm was measured with spectrophotometer (closed circle). The β-galactosidase activity was determined for each cell extract. A410 nm was measured with spectrophotometer and values were normalized with a A660 nm (open circle).

用いた浸透ショックストレスにより, oligo31/32-CYCIプロモーターで誘導される β -ガラクトシダーゼの活性がコントロールの約3倍に上昇する(1998). 本実験においても, 400mMでコントロールの約2.0倍, 500mMでは約3.1倍に上昇しており, 同様の値を示したので, ベクターの構築等に問題は無かったと考えられる(Fig. 3). 以上の結果は, pYES2-oligo31/32ベクターを用いて酵母の機能性スクリーニングができる可能性や, 単一遺伝子をこのベクターに挿入して機能解析が行える可能性を示唆した. しかしながら, バックグラウンドのレベル(NaCl非存在下の遺伝子発現)が若干ではあるが存在するという問題点が残る. これは, 酵母の形質転換の操作過程で熱ショックやポリエチレングリコールによる浸透圧ショックなどの方法を用いることが一つの要因であると考えられるが, できる限りストレスの少ない形質転換法を検討するなどして対処していくべきであろう. スクリーニングを行う際の培地のNaCl濃度は, 酵母の生育が目視できない最低の濃度であること, 最短の時間でスクリーニングができること, β -ガラクトシダーゼの活性が確認できることという3つの観点から, 700mM・48時間を選択した. しかしながら, 800mM以上のNaCl濃度でも酵母は生育できることから, さらにNaCl濃度の高い条件を設定してもいいかも知れない. 特に遺伝子がタンパク質になり修飾を受けて, 実際に生体内で機能するまでの時間が48時間以上かかるとすると, 1000mM・72時間等の条件を考えてもいいだろう.

酵母の耐塩性は, 通常の植物と比較してかなり高いといえる. Imaiら(1996)の実験によれば, 1.2MのNaCl濃度でも酵母が増殖することが明らかになっている. 本実験においても, 通常のYPD培地で生育させた場合, 1MのNaCl濃度でも増殖することが確認できた(Fig. 2). 一般的な植物は, 100mMのNaCl存在下ではほとんどが枯死すると言われている. 塩生植物であるウラギクも400mMのNaCl存在下での生存が可能であるが, 1M以上のNaCl濃度では生育不可能であろう. スクリーニングの際には, 酵母の生育が目視できない700mMのNaCl濃度で48時間という条件を選択したが, 植物のタンパク質や酵素が高塩濃度存在下で機能するかは疑問である. 酵母の細胞質内の塩濃度を測定するか, 今回得られたポジティブクローンが持つcDNAの塩基配列を決定すれば, 何らかの情報を得ることができであろう. また, 植物細胞にしかない機構, 例えば葉緑体で機能する遺伝子が酵母細胞の中で機能しない可能性が高く, それらの遺伝子をスクリーニングすることは不可能である. この様な場合にはクラミドモナス等の藻類で形質転換法が確立されているものを使用するべきであると考えられる.

5. 今後の課題

今回の実験では, 発現ベクターの構築と酵母の耐塩性評価にかなりの時間を費やしてしまい, 予定していたポジティブクローンの塩基配列の決定には至らなかった. 今後は, 得られたポジティブクローンの塩基配列の決定, ノーザンハイブリダイゼーションによる発現解析, サザンハイブリダイゼーションによるゲノム内コピー数の調査等を行わなければならない

い。また、ポジティブクローンの種類が増えることを期待し、スクリーニングも後数回行うべきであろう。さらに、スクリーニングを行う際の酵母用培地のNaCl濃度を下げるため、より耐塩性の低い酵母の株を選ぶ必要があり、遺伝子破壊株で入手可能なNaCl感受性変異株等を用いることを考えている。

6. 文献等

Imai, R., Chang, L., Ohta, A., Bray, E.A. and Takagi, M.: A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 170,p.243-p.248, 1996

Kobayashi, N and McEntee, K.: Evidence for a heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87, p.6550-p.6554, 1990

Kobayashi, N and McEntee, K.: Identification of *cis* and *trans* components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, Jan., p.248-p.256, 1993

Perera, L.K.R.R., Mansfield, T.A. And Malloch, A.J.C.:Stomatal responses to sodium ions in *Aster tripolium*: a new hypothesis to explain salinity regulation in above-ground tissues. *Plant Cell & Environment* 7:p.335-p.340

Treger, J.M., Magee, T.R. and McEntee, K.: Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243,p.13-p.19, 1998

Uno, Y., Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kanechi, M., Inagaki, N., Maekawa, S. and Shinozaki, K.: Early salt-stress effects on expression of genes for aquaporin homologues in the halophyte sea aster (*Aster tripolium* L.). *Journal of Plant Research* Vol.111 • No.1103, p.411-p.419, 1998

Uno, Y., Kanechi, M., Inagaki, N., Sugimoto, M. and Maekawa, S.: The evaluation of salt tolerance in germination and vegetative growth of asparagus, table beet and sea aster. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* Vol.65 • No.3, p.579 -p.585, 1996

Cloning of cDNAs by yeast expression system in the halophyte sea aster.

Noboru Inagaki, Michio Kanechi, Yuichi UNO and Migiwa Takeda*

Faculty of Agriculture, Kobe University, 1-1, Kobe, 657-8501, Japan

*The Graduate School of Science & Technology, Kobe University

Summary

The yeast expression vector responsive to multistress was constructed for the isolating genes concerned with salt tolerance in the halophyte sea aster (*Aster tripolium* L.). InvSc1, a strain of *Saccharomyces cerevisiae* was used for salt tolerance test; the survival and growth in the medium containing various concentration of NaCl was tested. The growth inhibition of yeast transformant with pYES2 vector was observed at more than 700mM NaCl when cultured in SD-Ura agar plate at 30C for 48 h. A 51-bp promoter fragment of the *DDR2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, oligo 31/32 (Kobayashi and McEntee, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87, p.6550-p.6554, 1990) was previously identified that conferred multistress-responsive inducibility on heterologous *CYC1-lacZ* reporter gene. The yeast expression vector was constructed with oligo 31/32 fused to *CYC1* minimal promoter based on pYES2 vector (pYES2-oligo31/32). The responsibility to salt stress of the expression system was evaluated by the β -galactosidase assay with *S. cerevisiae* cells transformed with the reporter vector containing *lacZ* reporter gene (pYES2-Oligo 31/32-*lacZ*). The β -galactosidase activity was increased with elevated concentration of NaCl in the medium. These results indicated that the dose-dependent expression is induced by oligo 31/32 -*CYC1* promoter in the yeast. An expression library with *Aster tripolium* L. cDNA under the control of the oligo 31/32 was transformed into the yeast strain. The transformants were screened with media containing 700 mM NaCl and some positive clones are obtained.