

発表番号 37

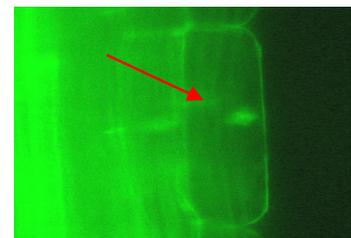
マイクロアレーを用いた塩ストレス誘導性タンパク質分解制御遺伝子の機能解析と  
耐塩性植物分子育種への応用

清末 知宏

香川大学総合生命科学実験センター遺伝子実験部門

シロイヌナズナは、全ゲノム塩基配列が決定されているだけでなく、豊富なリソース基盤が確立されているモデル高等植物である。植物の塩ストレス応答に関してもシロイヌナズナを用いた研究が進められており、明らかにされた耐性遺伝子を遺伝子組換え技術で他の植物（作物等）に導入した分子育種も成果を挙げている。本研究では、シロイヌナズナの大部分の遺伝子をカバーするマイクロアレーを用い、塩ストレス誘導性遺伝子 TLP の機能解析を行い、得られた情報を遺伝子組換えによる耐塩性植物の作出のために利用することを目的とした。TLP はシロイヌナズナのゲノム解析から見い出した LOV ドメインを有するタンパク質である。LOV ドメインは植物の青色光受容体 PHOT、FKF、LKP、ZTL に共通して見られる領域で、FMN (Flavin Mononucleotide) を結合し青色光受容に機能すると同時にタンパク質—タンパク質相互作用にも関与していることが知られている。

ノーザン解析の結果 TLP の遺伝子発現 (mRNA の蓄積) は塩ストレス、乾燥ストレス処理後、1 時間で上昇することが明らかとなった。また、過酸化水素水処理でも mRNA の蓄積が認められた。十分に水分、栄養分、光を与え、健康に育てたシロイヌナズナの各器官を使って遺伝子発現を調べたところ、乾燥種子で強い遺伝子発現が認められ、根、茎、葉、花といったそれ以外の器官でも弱い発現が認められた。TLP プロモーター:GUS 遺伝子を導入した健康なシロイヌナズナ植物体を GUS 活性染色したところ、種子胚にシグナルが認められた。また、植物体では特に根端や茎頂部にも GUS 染色が認められた。カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターと TLPcDNA を用いて過剰発現体 (TLP-OX) を作成し、ノーザン解析により遺伝子発現量の多い植物体を選別した後、ベクターのみを導入した植物と TLP-OX との生育を比較した。その結果、葉の大きさや開花時期に違いは認められなかった。GFP と融合させた TLP の過剰発現体では、GFP の蛍光シグナルは核と細胞質に認められた。TLP-OX を用いてマイクロアレー解析を行ったところ、TLP-OX では RING finger、cytochrome p450、GST 等の遺伝子発現が増加しており、zinc finger 等の遺伝子発現が減少していることが示された。





17

助成番号 0417

## マイクロアレーを用いた塩ストレス誘導性タンパク質分解制御遺伝子の 機能解析と耐塩性植物分子育種への応用

清末 知宏 (香川大学総合生命科学実験センター遺伝子実験部門)

### 研究目的

シロイヌナズナは、全ゲノム塩基配列が決定されているだけでなく、豊富なリソース基盤が確立されているモデル高等植物である。植物の塩ストレス応答に関してもシロイヌナズナを用いた研究が進められており、明らかにされた耐性遺伝子を遺伝子組換え技術で他の植物(作物等)に導入した分子育種も成果を挙げている<sup>(1, 2)</sup>。

本研究では、シロイヌナズナの大部分の遺伝子をカバーするマイクロアレーを用い、塩ストレス誘導性遺伝子 TLP の機能解析を行い、得られた情報を遺伝子組換えによる耐塩性植物の作出のために利用することを目的とした。

TLP はシロイヌナズナのゲノム解析から見出した LOV ドメイン、F-BOX モチーフを有するタンパク質である。LOV ドメインは植物の青色光受容体 PHOT、FKF、LKP、ZTL に共通して見られる領域で、FMN (Flavin Mononucleotide) を結合し青色光受容に機能すると同時にタンパク質—タンパク質相互作用にも関与していることが知られている<sup>(3-5)</sup>。他方、F-BOX は標的タンパク質のユビキチン化の為のアダプターとして働き、標的タンパク質の分解に機能する領域である。シロイヌナズナでは約 700 種類の F-BOX タンパク質遺伝子が知られているが、そのうち機能が分かっているのは数例(オーキシンシグナル伝達、サイトカイニンシグナル伝達、ジベレリンシグナル伝達、花芽形成、概日リズム制御、開花時期制御、自花不和合性、ジャスモン酸シグナル伝達等)である<sup>(6)</sup>。これまでの報告から共通しているのは F-BOX タンパク質は様々な生物現象において鍵となる因子の分解に機能している点である。

### 研究方法

#### 1. 材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Columbia ecotype) 種子は、4°C暗下に3日間置いた後、温度22°C、長日条件(16時間 light / 8時間 Dark)、光子量は約100~200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (測定域 400 nm ~ 700 nm 測定機器 Basic Quantum Meter) 下で生育させた。MS (Murasige & Skoog SIGMA CHEMICAL CO) 培地、或は、パーミキュライト(珪石)(旭工業株式会社)を使用した。

## 2. 方法

### 2.1 ストレス処理

植物体は長日条件(16時間明、8時間暗)下で17日間育成したものを使用した。以下の処理を行った後、植物体を液体窒素を用いて凍結保存しRNAを抽出した。乾燥ストレス:植物体を寒天培地から薬方紙の上に移し乾燥させた。塩ストレス:植物体をNaCl(250 mM)MS液体培地に移した。傷ストレス:植物体のロゼット葉にピンセットで傷をつけた。低温ストレス:4°C条件下に植物体に移した。熱ストレス:35°C条件下に植物体に移した。オーキシン処理:2,4-dichlorophenoxy acetic acid(0.1 mM)の入ったMS液体培地に植物体に移した。ジベレリン処理:Gibberelic acid(0.1 mM)の入ったMS液体培地に植物体に移した。アブシジン酸処理:Abscisic acid(0.1 mM)の入ったMS液体培地に植物体に移した。ジャスモン酸処理:メチルジャスモン酸(50 μM)の入ったMS液体培地に植物体に移した。サイトカイニン処理:Kinetin(0.1 mM)の入ったMS液体培地に植物体に移した。エチレン処理:エチレンの前駆体であるエテホンを終濃度7 mMになるように加えたMS液体培地に植物体に移した。コントロールとして、MS液体培地に移した植物体からRNAを抽出した。

### 2.2 RNA抽出

ノーザン解析では、RNAはフェノール・SDS法を用いて抽出した。多糖類を多く含む種子とさやからのRNAの抽出にはCTAB法を用いた。マイクロアレーに用いるRNAはRNeasy(キアゲン)を用いて単離・精製した。

#### 2.2.1 フェノール・SDS法

植物体(100 mg)を液体窒素中で粉状になるまで破碎し、1 mlのGrinding buffer(0.18M Tris、0.09 M LiCl、4.5 mM EDTA、1% SDS、pH 8.2)と333 μlのTLE(0.2 M Tris、0.1 M LiCl、5 mM EDTA、pH8.2)飽和フェノールを加えた。次に333 μlのクロロフォルムを加えボルテックスを行い、50°Cで20分インキュベートした。その後、17,700×g 20分4°Cで遠心し、上澄みを新しい微量遠心チューブに移した。これに333 μlのTLE飽和フェノールと333 μlのクロロフォルムを加えてよくボルテックスにかけた後、17,700×g 15分4°Cで遠心し、上澄みを別のチューブに移した。この操作を3回繰り返した後、液量と等量のクロロフォルムを加えて同じように遠心を行い、上澄みを新しいチューブに移してタンパク質を除去した。次に3分の1量の8 M LiClを加えて4°Cで一晩静置した。15,300×g 20分4°Cで遠心して上澄みを捨て、沈殿に600 μlの2 M LiClを加えた。これを15,300×gで10分間遠心した後、上澄みを捨て、1 mlのDEPCと330 μlの8 M LiClを加えて氷上に2時間静置した。これを12,100×gで20分遠心してから上澄みを捨て、600 μlの2 MのLiClを加えて12,100×gで10分間遠心した。上澄みを除き、500 μlのTEと500 μlのクエン酸飽和フェノールを加え、ボルテックスをかけて15,000 rpmで5分間遠心した。この上澄みを別のチューブに移し、500 μlのクロロフォルムを加え15,000 rpmで5分間遠心した。その上澄みを別のチューブに移し、そ

の1/10量の3 M酢酸ナトリウムと2倍量の100 %エタノールを加えて、-20°Cで一晩静置した。次にこれを17,700×gで15分間遠心し、上澄みを除いた後、400 μlの70 %エタノールを加えた。17,700×gで10分間遠心し上澄みを除き、エタノールを飛ばすため風乾させた。沈殿をDEPCに溶かし、吸光度を測定した。

### 2.2.2 CTAB法

植物体(100 mg)を液体窒素中で粉状になるまで破碎し、1 mlの2×CTAB溶液(2% CTAB、0.1 M Tris-HCl(pH8.0)、20 mM EDTA(pH8.0)、1.4 M NaCl、0.5% βメルカプトエタノール)に溶かした。次に65°Cで20分間インキュベートし、この中に1 mlのクロロフォルムを加えて攪拌した。その後17,700×g 10分室温で遠心し、上澄みを新しい微量遠心チューブに移した。これに333 μlのクロロフォルムを加えてよくボルテックスにかけた後、17,700×g 15分4°Cで遠心し、上澄みを別のチューブに移した。この操作を3回繰り返した後、3分の1量の8 M LiClを加えて4°Cで一晩静置した。以後はフェノール・SDS法のリチウム沈殿、エタノール沈殿と同様な操作を行った。

### 2.3 TLP1プロモーター: GUS植物体の作成

pBI101ベクターにTLPプロモーター(転写開始点から約1.5 kb上流)を組込んだ後、アグロバクテリウムを用いて植物体に遺伝子導入した。選抜はカナマイシンで行い、GUS染色は常法に従って行った<sup>(5)</sup>。

### 2.4 過剰発現体の作成

pBE2113ベクター<sup>(7)</sup>にTLPcDNAをセンス方向に、或は、GFPとTLPのcDNAを融合させて組込んだ後、アグロバクテリウムを用いて<sup>(8)</sup>植物体に遺伝子導入した。カナマイシンを用いて形質転換体の選抜を行った。

### 2.5 RNAi個体の作成

pHellsgate8ベクター<sup>(9)</sup>にTLPのコード領域(約600 bp)をトリガー部位として用い、RNAiコンストラクトを作成した。アグロバクテリウムを用いて植物体に遺伝子導入し、選抜はカナマイシンで行った。

### 2.6 マイクロアレー解析

過剰発現体と野生型のシロイヌナズナ長日条件(16時間明、8時間暗)で育てた植物(13日齢)を点灯後4時間目に、前日に連続暗にした植物はZT4hにサンプリングを行った。RNA抽出後、Affymetrix Arabidopsis ATH1 Genome GeneChipを用いてハイブリダイゼーションを行い、Gene Spring(バージョン7.0)で解析した。

### 2.7 Root bending アッセイ

1.5%寒天(2%ショ糖、1/1,000 ハイポネックスを含む)を分注したプレート上に滅菌した種子を播種し、4°Cで2日処理後、プレートを23°C、連続白色光のフォトチャンバーに垂直に立て3日間培養を行った後、プレートを水平に置き、植物育成チャンバー内にてUV-Bランプにより $3.86 \text{ Wm}^{-2}\text{s}^{-1}$ のUV-Bを一定時間照射した。プレートを光照射下処理区

(UV-B\_light) と暗所下処理区 (UV-B\_dark) に分け、それぞれ連続白色光下または暗所下のフォトチャンバーに鉛直方向に 90°回転させて立て置き、この状態で 3 日間培養した。UV-B 照射後の 3 日間で伸長した根の長さ (屈曲点から先端までの長さ) を測定 (写真撮影した後に Scion Image にて測定) し、根の伸長の程度により、感受性または非感受性を評価した<sup>(10-11)</sup>。

## 研究結果

### 1. TLP 遺伝子発現解析

マイクロアレーデータベースの解析から TLP の遺伝子発現 (mRNA の蓄積) が乾燥ストレス、塩ストレスに応答する可能性が示されたので、TLP 遺伝子発現に及ぼす各種ストレス、植物ホルモンの影響をノーザン法で解析した。その結果、TLP 遺伝子発現は、塩ストレス、乾燥ストレス処理後、1 時間で上昇することが明らかとなった。また、過酸化水素水処理でも mRNA の蓄積が認められた。

十分に水分、栄養分、光を与え、健康に育てたシロイヌナズナの各器官を使って遺伝子発現を調べたところ、乾燥種子で強い遺伝子発現が認められ、根、茎、葉、花といったそれ以外の器官でも弱い発現が認められた。

### 2. TLP 遺伝子プロモーター活性

TLP プロモーター: GUS 遺伝子を導入した健康なシロイヌナズナ植物体を GUS 活性染色したところ、種子胚にシグナルが認められた。また、植物体では特に根端や茎頂部にも GUS 染色が認められた。

### 3. 過剰発現体解析

カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターと TLPcDNA を用いて過剰発現体 (TLP-OX) を作成し、ノーザン解析により遺伝子発現量の多い植物体を選別した後、ベクターのみを導入した植物と TLP-OX との生育を比較した。その結果、葉の大きさや開花時期に違いは認められなかった。GFP と融合させた TLP の過剰発現体では、GFP の蛍光シグナルは核と細胞質に認められた。

### 4. KO 植物、RNAi 植物の解析

TLP 遺伝子に T-DNA が挿入されたラインを種子バンクデータベースから探し出し、PCR を用いて解析し、T-DNA ホモ個体を選抜した結果、TLP プロモーターと考えられる領域に T-DNA が挿入されていることが分かった。しかしながら、ノーザン解析の結果、この T-DNA 挿入植物体でも塩ストレスによる遺伝子発現誘導が認められた。そこで、RNAi 個体を作成し、現在、RNAi 植物体の選抜と解析を進めている。

### 5. マイクロアレー解析

TLP-OX を用いてマイクロアレー解析を行ったところ、TLP-OX では RING finger、cytochrome p450、GST 等の遺伝子発現が増加しており、zinc finger 等の遺伝子発現が減少

していることが示された。

## 6. UV-B 感受性試験

TLPの機能解析を行うことを目的として、TLP-OXを用いて root bending アッセイを行い、UV-B 感受性を解析した結果、野生型と TLP-OX で UV-感受性における有意な差は認められなかった。

## 考 察

本研究において、塩ストレス、乾燥ストレス応答遺伝子としての TLP の特徴付けを行うことができた。TLP 遺伝子発現は、植物体での ABA 蓄積の時期よりも早く誘導されると考えられ<sup>(13)</sup>、実際、培地に与えた ABA に殆ど応答しなかった。他方、TLP 遺伝子発現は、過酸化水素水処理でも、暗所でも誘導されることから、複数の遺伝子発現誘導系によって制御されている可能性が考えられる。

TLP と LOV ドメイン構造が似ている PHOT1 の局在は細胞膜系であることが知られているが<sup>(14)</sup>、GFP-TLP、及び、TLP-CFP のシグナルが核と細胞質に認められることから、遺伝子発現の違いも含めて、TLP は PHOT1 とは異なった反応を制御していると考えられる。

## 今後の課題、謝辞

本研究は過剰発現植物体とノックアウト植物体を用いて、マイクロアレー解析を行い、乾燥誘導遺伝子 TLP の機能に迫り、得られた情報を利用して耐塩性植物、ストレス耐性植物の作出をめざしたが、本研究期間内にはまだ機能解明に至らなかった。今後、更に解析を進め、この目標に到達したい。

遺伝子発現解析は森林総合研究所の楠城時彦博士、マイクロアレー解析は理化学研究所の安部洋博士、UV-B 感受性試験は日本原子力研究所の高橋真哉博士の協力で行った。

本研究を遂行するにあたり、御支援を賜りましたソルト・サイエンス研究財団に深く感謝致します。

## 参考文献

- ( 1 ) Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol.* 1999; 17(3) :287-91.
- ( 2 ) Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol.* 2004; 45(3): 346-50.
- ( 3 ) Motchoulski A, Liscum E. Arabidopsis NPH3: A NPH1 photoreceptor-interacting protein

- essential for phototropism. *Science*. 1999; 286(5441): 961-4.
- ( 4 ) Imaizumi T, Tran HG, Swartz TE, Briggs WR, Kay SA. FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature*. 2003; 426(6964): 302-6.
- ( 5 ) Yasuhara M, Mitsui S, Hirano H, Takanabe R, Tokioka Y, Ihara N, Komatsu A, Seki M, Shinozaki K, Kiyosue T. Identification of ASK and clock-associated proteins as molecular partners of LKP2 (LOV kelch protein 2) in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*. 2004; 55(405): 2015-27.
- ( 6 ) Moon J, Parry G, Estelle M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell*. 2004 ; 16(12): 3181-95.
- ( 7 ) Mitsuhashi I, Ugaki M, Hirochika H, Ohshima M, Murakami T, Gotoh Y, Katayose Y, Nakamura S, Honkura R, Nishimiya S, Ueno K, Mochizuki A, Tanimoto H, Tsugawa H, Otsuki Y, Ohashi Y. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol*. 1996; 37(1): 49-59.
- ( 8 ) Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 1998; 16(6): 735-43.
- ( 9 ) Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J*. 2001; 27(6): 581-90.
- ( 10 ) Britt AB, Chen JJ, Wykoff D, Mitchell D. A UV-sensitive mutant of *Arabidopsis* defective in the repair of pyrimidine-pyrimidinone(6-4) dimers. *Science*. 1993; 261(5128): 1571-4.
- ( 11 ) Tanaka A, Sakamoto A, Ishigaki Y, Nikaido O, Sun G, Hase Y, Shikazono N, Tano S, Watanabe H. An ultraviolet-B-resistant mutant with enhanced DNA repair in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2002; 129(1): 64-71.
- ( 12 ) Sakamoto A, Lan VT, Hase Y, Shikazono N, Matsunaga T, Tanaka A. Disruption of the *AtREV3* gene causes hypersensitivity to ultraviolet B light and gamma-rays in *Arabidopsis*: implication of the presence of a translesion synthesis mechanism in plants. *Plant Cell*. 2003; 15(9): 2042-57.
- ( 13 ) Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: identification of three ERDs as HSP cognate genes. *Plant Mol Biol*. 1994; 25(5): 791-8.
- ( 14 ) Sakamoto K, Briggs WR. Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell*. 2002; 14(8): 1723-35.

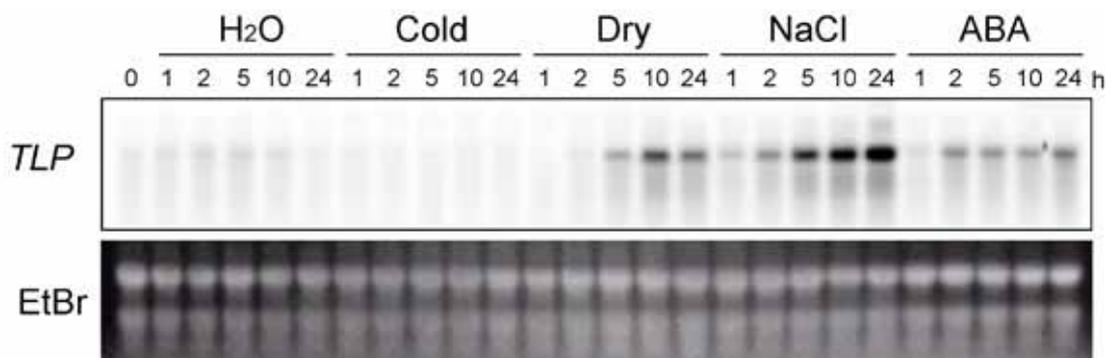


Figure 1. RNA gel blot analysis of TLP gene

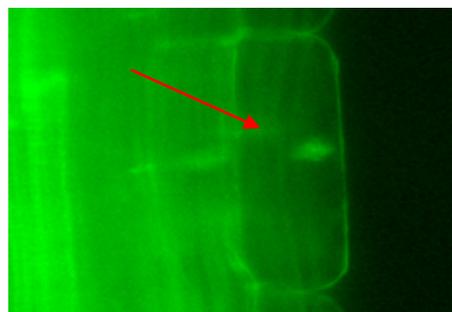


Figure 2. Subcellular localization of the GFP-TLP fusion protein in Arabidopsis cells

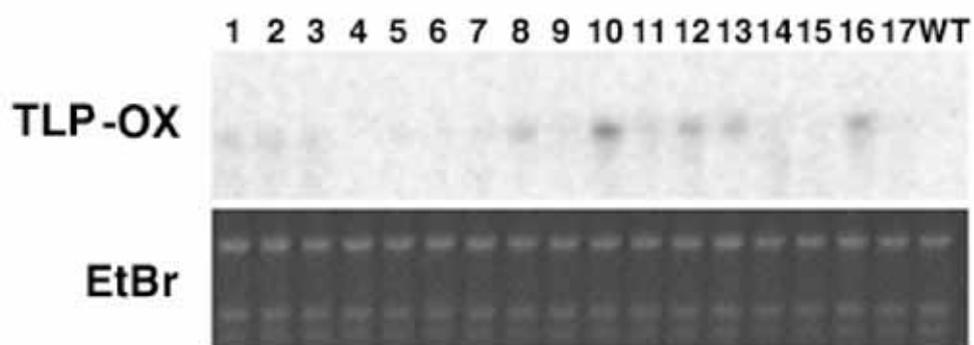


Figure 3. RNA gel blot analysis of 35S:TLP plants

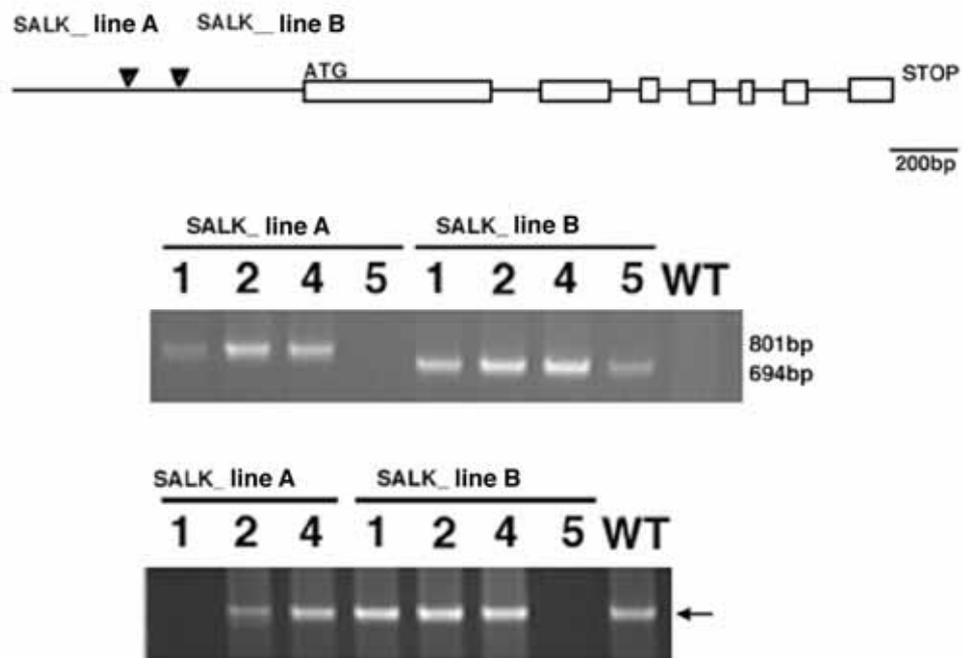


Figure 4. PCR analysis of T-DNA insertion mutants in the TLP gene

## Characterization of a salt-inducible gene in Arabidopsis and its functional analysis using a micro-array with the aim of plant molecular breeding

Tomohiro Kiyosue

Division of Gene Research, Life Science Research Center, Kagawa University

### Summary

Arabidopsis is a model plant species whose entire genome has now been reported. Numerous bio-resources derived from this tiny plant have been established and used by researchers worldwide. In the field of salt stress biology, it has been reported that several genes from Arabidopsis have been introduced into other plants to confer tolerance to salt stress or dehydration stress. The objective of our present study is to elucidate the function of TLP, a salt stress-inducible gene of Arabidopsis, using a micro-array technique and to utilize the obtained information to breed salt stress-resistant plants. TLP protein contains a LOV domain, which is also seen in blue light receptors such as PHOT, FKF, LKP, and ZTL, whose LOV domains have been shown to be able to bind FMN (Flavin MonoNucleotide). Their LOV domains are also reported to be involved in protein-protein interactions.

RNA gel blot analysis revealed that TLP gene expression was induced within 1 hour by salt stress or dehydration stress. TLP mRNA also accumulated in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated plants. In non-stressed plants, the mRNA for the TLP gene was detected at high levels in dry seeds, whereas little expression was observed in roots, stems, leaves or flowers. In the TLP promoter:GUS gene present in Arabidopsis plants, strong GUS activities were detected in embryos in dry seeds. GUS activities were also seen in root tips and shoot meristems of the transgenic plants.

We performed micro-array analysis using 35S:TLP plants, which revealed that gene expression for a RING finger protein, cytochrome p450, GST, and zinc finger protein was altered in the 35S:TLP plants compared with wild-type Arabidopsis plants.