

発表番号 35 (0522)

ナス科モデル作物トマト品種 Micro-Tom の塩ストレス、乾燥ストレス耐性  
獲得に関与する有用形質原因遺伝子の探索

湯淺 高志 (九州大学大学院農学研究院)

井上 眞理 (九州大学大学院農学研究院)

植物は環境ストレスに曝された際に速やかに細胞内シグナルを活性化して遺伝子発現変動や代謝酵素の調節することにより、環境ストレスに適応して生理性化学的な耐性を獲得するメカニズムを持つ。近年、シロイヌナズナのゲノム解析から酵母において糖代謝に関与する SNF1 キナーゼの高等植物ホモログ SRK が遺伝子ファミリーを構成し、そのうち SRK2 サブファミリーは乾燥ストレスや ABA 応答に関与することが明らかとなった。また SRK2 分子の過剰発現体がストレス耐性を獲得することが報告されている。

現在、国際ナス科ゲノムプロジェクト(SOL)が進行中であり、多くの有用作物を含むナス科植物のモデル実験作物としてトマト MicroTom のゲノム情報が利用可能になっている。トマトのストレスシグナル分子と適応メカニズムに関与する酵素を同定、解析することで、様々な極限環境に生育するナス科植物の有用形質遺伝子資源情報を育種改良に利用可能にすることが期待できる。そこでトマト SRK2 ホモログの活性化メカニズムやシグナル機構を明らかにする目的でトマトゲノム情報データベース MiBASE(かずさ DNA 研究所)に登録されているトマト SRK2 ホモログの部分長塩基配列を元に、全長トマト SRK2 ホモログ(LeSRK2C)をクローニングし、諸性質の解析を進めた。LeSRK2C の ORF は全長 345 アミノ酸をコードしており、N 末端領域にキナーゼ活性ドメイン、C 末端に酸性アミノ酸と疎水アミノ酸に富む調節領域を持つ。LeSRK2C の C 末可変領域と 3'-UTR 配列を元に特異的プライマーを設計して半定量的 RT-PCR を行い、トマト MicroTom の光合成組織や生殖器官に多く発現し、

地下部や茎部の発現レベルが低いことが示された。またトマト植物体を塩ストレス、乾燥、ABA 処理、低温ストレスなどのストレス処理を行った場合、LeSRK2C の発現レベルに大きな差はなかった。組換え体 LeSRK2C をマルトース融合タンパク質として大腸菌を用いて発現、精製しキナーゼ活性を解析した。その結果、シロイヌナズナ SRK2C, SRK2E がヒストンを良好な基質とするのに対して、LeSRK2C はヒストンをほとんどリン酸化せず、ミエリン塩基性プロテインをリン酸化した。ステロイド誘導系アグロバイナリベクターとアグロインフィルトレーション法による一過性発現実験系を用いて GST-LeSRK2C を *Nicotiana benthamiana* 葉身に発現させた後に、塩ストレス、ABA 処理および低温ストレス処理を行った。*N.benthamiana* 葉身破碎液の可溶性画分から免疫沈降実験により GST-LeSRK2C を回収してキナーゼ活性を解析した結果、低温処理および塩ストレス処理により LeSRK2C が活性化されることが示唆された。

さらに乾燥、低温ストレスの細胞内シグナル伝達の下流において適応機構に関与するトレハロースの代謝系酵素であるトレハロース-6-リン酸合成酵素(TPS)およびトレハロース 6-リン酸脱リン酸化酵素(TPP)をコードする遺伝子候補についても半定量的 RT-PCR による解析を行った。その結果、TPS 代謝酵素候補遺伝子 Contig15270、Contig10668 がそれぞれ低温ストレスおよび ABA 処理により顕著に発現誘導されることが示された。現在、それらの全長 cDNA クローニングと発現誘導メカニズムの解析を進めている。



助成番号 0522

## ナス科モデル作物トマト品種 Micro-Tom の塩ストレス、乾燥ストレス耐性獲得に関与する有用形質原因遺伝子の探索

湯浅 高志 (九州大学大学院農学研究院植物資源科学部門)

井上 眞理 (九州大学大学院農学研究院植物資源科学部門)

### 「緒言」

低温、乾燥や塩ストレスは植物の生育や物質生産を制限する代表的な環境要因である。植物は環境ストレスに曝された際に速やかに細胞内シグナルを活性化して遺伝子発現変動や代謝酵素の調節することにより、環境ストレスに適応して生理化学的な耐性を獲得するメカニズムを持つ。これまで環境ストレスにตอบสนองして活性化されるプロテインキナーゼとして MAP キナーゼが多数報告されており、そのいくつかは塩ストレスや活性酸素、エリシターなどのシグナルにตอบสนองして活性化される事が報告されていた (Yuasa et al., 2001)。しかし、アブシジン酸や乾燥で特異的に活性化される 40 kDa 付近のプロテインキナーゼは MAP キナーゼでは説明がつかず、最近ようやくその正体が明らかとなった。近年のシロイヌナズナのゲノム解析から酵母において糖代謝に関与する SNF1 キナーゼの高等植物ホモログ SRK が遺伝子ファミリーを構成し、そのうち SRK2 サブファミリーは乾燥ストレス、ABA 応答に関与することが明らかとなり、MAP キナーゼとは異なる新規ストレス応答性キナーゼであることが判明した。シロイヌナズナ SNF 様キナーゼ AtSnRK2C および AtSnRK2E はそれぞれ乾燥、アブシジン酸にตอบสนองして顕著に活性化されること、SRK2 分子の過剰発現体がストレス耐性を獲得することが報告されている。したがって SRK2 は環境ストレスの受容とその下流で活性化される耐性獲得メカニズム、特に適合溶質合成や LEA 様タンパク質誘導を仲介するシグナル分子として注目される。

国際ナス科ゲノムプロジェクト (International Solanaceae Genomics Project (SOL)) が進行中であり、多くの有用作物を含むナス科植物のモデル実験作物としてトマト MicroTom (*Lycopersicon esculentum*) のゲノム情報が利用可能になっている。トマトのストレスシグナル分子と適応メカニズムに関与する酵素を同定、解析することで、様々な極限環境に生育するナス科植物の有用形質遺伝子資源情報を育種改良に利用可能にすることが期待できる。そこでトマトにおいても SNF1 キナーゼホモログが乾燥/塩ストレス耐性メカニズムに関与しているかどうかを確認するため、乾燥/塩ストレスにตอบสนองする SRK2C ホモ

グ (LeSRK2C) をトマト MicroTom からクローニングを行い、諸性質を解析した。環境ストレスにตอบสนองしたトマト SRK2 遺伝子産物の活性変動を解析するために、アグロインフィルタレーション法による一過性遺伝子発現実験を採用した。また non-RI 条件でタンパク質リン酸化解析を行うためリン酸化アミノ酸特異的蛍光染色試薬「Pro-Q diamond」を用いてリン酸化アッセイ試料を SDS-PAGE したのち蛍光染色によりリン酸化タンパク質の検出を試みた。

トマトの乾燥、塩ストレスその他、低温ストレスなど様々な環境ストレス耐性において浸透溶質の代謝変動が関与していると予想される。近年、グルコース二分子が結合したトレハロースが高温、高塩ストレスにおいてタンパク質や生体膜の保護に関与していることが報告されている。またストレス条件下で誘導された細胞内のトレハロース、トレハロース-6-リン酸が糖代謝をダイナミックに調節するシグナル分子として機能していることが示唆されている。トマトにおけるトレハロース代謝とその細胞内機能については必ずしも明確ではない。現在、トマトの EST データベースによる予測からトレハロース合成に関与するトレハロース-6-リン酸合成酵素 (TPS) およびトレハロース-6-リン酸フォスファターゼ (TPP) をコードする複数の候補遺伝子が存在する。そこでトマトの TPS および TPP の発現レベルが環境ストレス条件下における応答プロファイルと生化学的性質の解析を進めた。

### 「材料及び方法」

#### 植物材料およびストレス処理:

トマト MicroTom 種子はかずさ DNA 研究所より分与された。水洗した 6 cm 角ロックウールをアルミ фольで包み、上部に穴を開けて種子を播種した。40 W 昼色蛍光灯 2 本の常時照射の下、26°C で栽培を行った。栽培 6 週間のトマト MicroTom 植物体を RNA 調製および生化学的実験に供した。アグロインフィルタレーション実験に用いる *Nicotiana benthamiana* の栽培のために 7 cm ポットにスーパーミックスバーミキュライトの混合土を入れて播種し、トマトと同じ栽培条件下で 6-8 週間培養した

*N.benthamiana* を実験に供した。

栽培時期とサイズの揃った植物体を用意して、NaCl 処理はロックウールを 0.25 M NaCl 溶液に浸し、アブシジン酸 (ABA) 処理では 50  $\mu$ M ABA を葉面に塗布してさらにロックウールを同濃度の ABA 溶液に浸した。乾燥処理ではロックウールを包むアルミフویلを除き、ロックウールをペーパータオルの上に置き根圏の脱水を促進した。低温処理ではロックウール部分も含む植物体全体を 10°C 冷凍庫に置いた。各処理区ごとに、0, 1, 2, 5, 8, 15, 24, 48 時間に地上部を切断して重量を計測して液体窒素で冷却後、-80°C で保存した。

#### RNA 調製および RT-PCR:

トマト MicroTom 植物体の各器官から SDS フェノール LiCl 法によりトータル RNA を調製した。遺伝子クローニングの際には 10  $\mu$ g トータル RNA、半定量的 RT-PCR には 1  $\mu$ g トータル RNA を出発材料として、オリゴ dT<sub>18</sub> もしくは 9mer ランダムプライマーと M-MLV 逆転写酵素を用

いて常法に従い 1st ストランド cDNA を合成した。PCR 反応には exTaqDNA ポリメラーゼを用いた。トマト SRK ホモログおよびトレハロース代謝関連酵素遺伝子の特異的プライマーの設計には、かずさ DNA 研究所のトマトゲノム情報データベース MiBASE\* に登録されている EST データベースから構築された複数のオーバーラップする EST 配列を統合した Contig 情報を利用した (Table. 1)。

(\*URL: <http://www.kazusa.or.jp/jsol/microtom/indexj.html>)

#### クローニングおよび塩基配列決定:

RT-PCR 産物のクローニングには pCR TOPO TA クローニングキットおよび pST1 Blue TA クローニングキットを用いて常法に従いクローニングを行い、ABI PRISM310 と BigDye ver1.1 を用いてダイターミネーター法により塩基配列決定を行った。また MiBAS では全長 ORF 情報を得られない場合には 3'-RACE、5'-RACE により延長部分の未知配列をクローニングして全長 cDNA 塩基配列決定を行った。

Table. 1 Specific primers for tomato SRK2 homolog and trehalose metabolizing enzymes.

Primers for cloning and RT-PCR of tomato SRK2 homolog, Contig14422:	
LeSRK2-5'	5'-TATGGATCCAAAATGGAAAGATATGAAATTCAGAAA-3'
LeSRK2-3'	5'-GCTGTTAACAAAATAATCACTTGCTTTAGATCC-3'
LeSRK2(nest1)-5'	5'-AAGAGGATAACGATCGAAGAAATAAAG-3'
LeSRK2C(nest2)-5'	5'-CATCCATGGTTCTTAAAGAAGCTTGCCT-3'
LeSRK2C-RT-PCR-3'	5'-TTATCTAAGAAAAGTATCACTCAT-3'
Primers for cloning of Contig15270:	
Contig15270-5'	5'-CGGGGATCCATTGGTATCGACTATTTTGGTAGA-3'
Contig15270-3'	5'-CTGTCGACTATACAAAGGATGCATGATTCTTAAC-3'
Primers for RT-PCR of TPS candidate genes:	
Contig15270RT-PCR-5'	5'-GGTACCTGCAGACACTGAGTGGAA-3'
Contig4226-5'	5'-ATTGTCGAAGTCAAGCCACAAGGT-3'
Contig4226-3'	5'-CAGAACAGAGTCGAATGCAACCTG-3'
Contig6177-5'	5'-GAACAACCTTCTATTGCAGCACCCA-3'
Contig6177-3'	5'-TCTTGTAAGAACTGCGAGCCCAG-3'
Contig6532-5'	5'-CAGCATCTCTGGACAGGTCCAATA-3'
Contig6532-3'	5'-AGGTGCTTCAGCTAGTTCCCTTAG-3'
Contig10675-5'	5'-CGCCACAGGCATAACTTTCTGCAT-3'
Contig10675-3'	5'-ACGTTGTTCAAAGTGAGATCTCGG-3'
Contig13883-5'	5'-GATCACATCGTCTCCTCATATAGG-3'
Contig13883-3'	5'-CCTGTCATCTCCAATGCACATCAC-3'
Contig15890-5'	5'-AAGCAGATTGCTGAGCCTGTAATG-3'
Contig15890-3'	5'-GTCAATGATTACGCGTTGAGGAGA-3'
Primers for RT-PCR of TPP candidate genes:	
Contig3236-5'	5'-GCTTCTCTAAGTGGTGCTATACGT-3'
Contig3236-3'	5'-TAAGAAGTATCCGTGTTCCGCAGC-3'
Contig10668-5'	5'-GGTATTGCAGCTGAGCATGGATAC-3'
Contig10668-3'	5'-CTGTGGTAACATTTGGGCAGCAAC-3'
Contig12997-5'	5'-CACACTGCCTTCAATATCCACCT-3'

### 発現ベクターの構築および大腸菌による組換え体タンパク質の発現と精製:

トマト SRK2C(LeSRK2C)全長 cDNA の組換え体タンパク質を調製するため、グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質発現ベクター pGEX-4T-1 およびマルトース結合タンパク質(MBP)発現ベクター pMAL-c を用いた。全長 LeSRK2C 断片を pCR-LeSRK2C から BamH I および Xho I を切断して切り出し、pGEX-4T-1 および pMAL-c の BamH I-Sal I サイトに挿入した。pGEX-LeSRK2C あるいは pMAL-c-LeSRK2C を導入した大腸菌 TOP10 を 150 ml アンピシリン含有 2xYT 液体培地で 37°C 一晚培養後、最終濃度 0.5 mM IPTG 添加して 37°C 2 時間誘導を行って集菌した。超音波破碎後、冷却高速遠心機により 10,000 x g 上清を回収し、GST 融合 LeSRK2C には glutathione-Sepharose、MBP-LeSRK2C には amylose beads を用いてバッチ精製を行い、30%グリセリン含有 1xTBS のスラリー状態で-40°C保存した。

### DEX 誘導性ベクターとアグロインフィルタレーション法による一過性遺伝子発現:

植物シグナル分子の解析にタバコなど遺伝子組換え植物体を作成する場合、少なくとも数ヶ月の時間と労力とカルス培養など煩雑なステップを経る必要がある。シグナル分子の植物細胞内での機能発現と機能解析を短時間に簡便に実行するためにアグロインフィルタレーション法を用いて GST などエピトプタグ付き LeSRK2C を発現する実験系をデザインした。特に発現レベルを向上させて *in vivo* に近い状況で活性化された GST-LeSRK2C を大量に調製するために Rockefeller University の Nam Hai Chua 教授から DEX 誘導性アグロバイナリーベクター pTA7002(図 3)を分与していただいた。また翻訳効率を増大させるために元々高発現ベクターとして知られる pBE2113 ベクターの翻訳促進領域 Ω 配列を転写開始位置下流に挿入した。pTA7002-Ω-GST-LeSRK2C を構築してアグロバクテリウム EH105 に凍結融解法により導入した。Yuasa et al(2005)の方法に従って、*N.benthamiana* 成熟葉に 23 番針で穴を開け、その穴に注射器をあてがって濁度 0.5-0.7 OD<sub>600nm</sub> アグロバクテリウム懸濁液を注入した。24 時間後、*N.benthamiana* 葉身に 50 μM dexametazon を噴霧して GST-LeSRK2C の誘導を開始した。24 時間後、各植物体を無処理、0.25 M NaCl 処理、50 μM アブジジン酸処理、4°C低温処理を行い、30 分間後に各葉身を収穫して液体窒素で凍結して-80°Cに保存した。

### Immune-complex キナーゼアッセイと蛍光染色によるリン酸化タンパク質の検出:

アグロインフィルタレーション実験後に収穫した *N.benthamiana* 葉身から GST-LeSRK2C を単離して特異的キナーゼ活性を解析する目的で免疫沈降実験をおこなった。凍結葉に脱リン酸化阻害剤を含む破碎緩衝液(20 mM MOPS, 50 mM Na<sub>3</sub>β-glycero リン酸, pH 7.2, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA, 1% TritonX-100, 0.5% β-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 5 μg/ml leupeptin)を加えて乳鉢で磨砕したのち 200,000 x g, 20 分間遠心して上清を得る。上清に 0.5 μl 抗 GST 抗血清と 20 μl プロテイン A-sepharose (50%(v/v))を加えて 2 時間ローテーションを行い GST-LeSRK2C-antibody-protein A sepharose の免疫複合体を形成させる。遠心後、高塩強度緩衝液で 4-5 回洗浄〜遠心を繰り返し、次にキナーゼ反応緩衝液(25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM EGTA, 0.1% Triton-X100, 0.1% β-mecaptoethanol)に平衡化する。遠心後、上清を除き、免疫複合体ビーズを含めて容積を 20 μl 程度に合わせる。各反応チューブに Histone H1、ミエリン塩基性タンパク質、脱リン酸化カゼインなどを 10 μg と最終濃度 1 mM ATP を加えてキナーゼ反応を開始する。1 時間後、50 mM EDTA を含む 2xSDS-PAGE サンプル緩衝液を加えて 70°C 10 分間保温して反応を終結させる。各サンプルを 15% SDS-PAGE ゲルにより電気泳動を行い、ゲルを酢酸メタノール水溶液で固定した後、Pro-Q diamond 蛍光染色を行う。リン酸化タンパク質を FluoChdem (AlphaInotech)を用いて 365 nm(励起)/595 nm(蛍光)により検出した。

### 「結果と考察」

#### トマト SRK2 ホモログのクローニングと塩基配列決定:

MiBASE の blast 検索によるシロイヌナズ SRK2 との相性の高いトマト EST クローンのうちから最も塩基配列が長く開始 Met を含むと考えられる Contig14422 を選択した。Contig14422 は予想アミノ酸配列のキナーゼドメインの C 末領域の配列比較からシロイヌナズ SRK2 ファミリーのうち乾燥、塩ストレス耐性に関与することが示された AtSnRK2C にもっとも近いことが予想された。そこでトマトの乾燥、塩ストレス耐性シグナルについてトマト SRK ホモログの関与について詳細に解析するため Contig14422 をコードする全長トマト SRK2 ホモログ(LeSRK2C)のクローニングに着手した。Contig14422 には終止コドンを含めなかったため既知塩基配列を元に nest プライマー(Table 1)を設計し 3'-RACE により、LeSRK2C の開始 Met から

ポリ A 配列にいたる全長 ORF をコードする LeSRK2C の塩基配列決定を行った (Fig. 1)。LeSRK2C の ORF は全長 345 アミノ酸をコードしており、N 末端領域にキナーゼ活性ドメイン、C 末端に酸性アミノ酸と疎水アミノ酸に富む領域を持つ。N 末 Hisx6 タグ発現ベクター pQE9-LeSRK2C-C-terminus を構築して Hisx6 タグペプチドを大腸菌により大量発現、精製をおこない抗-LeSRK2C 特異的抗血清の作成を進めている。

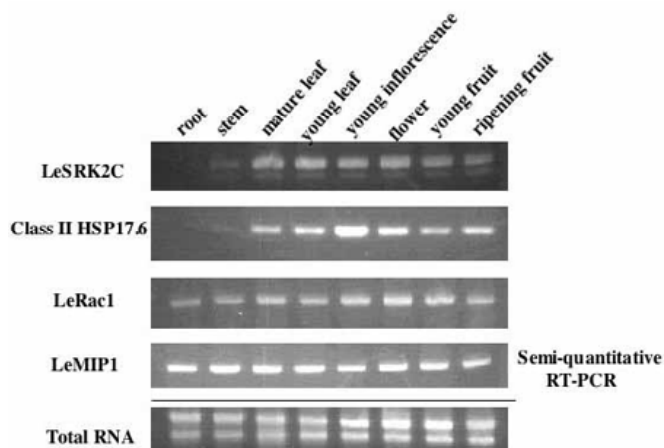


Fig. 1 RT-PCR analysis of LeSRK2 and stress related genes in various organs of tomato.

LeSRK2C の器官特異的発現の解析:

播種 8 週間目の花、果実を持つトマト MicroTom 植物

体から各器官を採取してトータル RNA を調製して、LeSRK2C の C 末可変領域と 3'-UTR 配列を元に特異的プライマーを用いて半定量的 RT-PCR を行った。トマト MicroTom の光合成組織や生殖器官に多く発現し、地下部や茎部の発現レベルが低いことが示された。シロイヌナズナの AtSnRK2C は乾燥および塩ストレス特異的に活性化することが報告されており、LeSRK2C とキナーゼドメインと C 末端可変領域のアミノ酸配列相同性が比較的高い。しかし、AtSRK2C は根端局所的な発現プロファイルを示しており、地上部に発現が限定される LeSRK2C とは両者で発現パターンが大きく異なっている。これはアミノ酸相同性が比較的高い LeSRK2C と AtSnRK2C の生理的機能が異なっている可能性がある。

LeSRK2C 環境ストレスにともなう発現変動の解析:

播種 4 週間目のトマト MicroTom 植物体に塩ストレス (0.25 M NaCl)、乾燥、ABA 処理 (50 μM)、低温ストレス (10°C) の各ストレス処理を行って 1, 2, 5, 8, 15, 24, 48 時間における LeSRK2C の mRNA レベルを RT-PCR により解析した。各ストレス処理後のシグナルはほとんど変化せず、LeSRK2C の mRNA 発現レベルは環境ストレス下で変動が少ないことが示唆された。これは SNF-1 キナーゼ関連キナーゼ AtCIPK3 の mRNA レベルが様々な環境ストレスや ABA に応答して誘導されるのと比較して大きく異なっている。

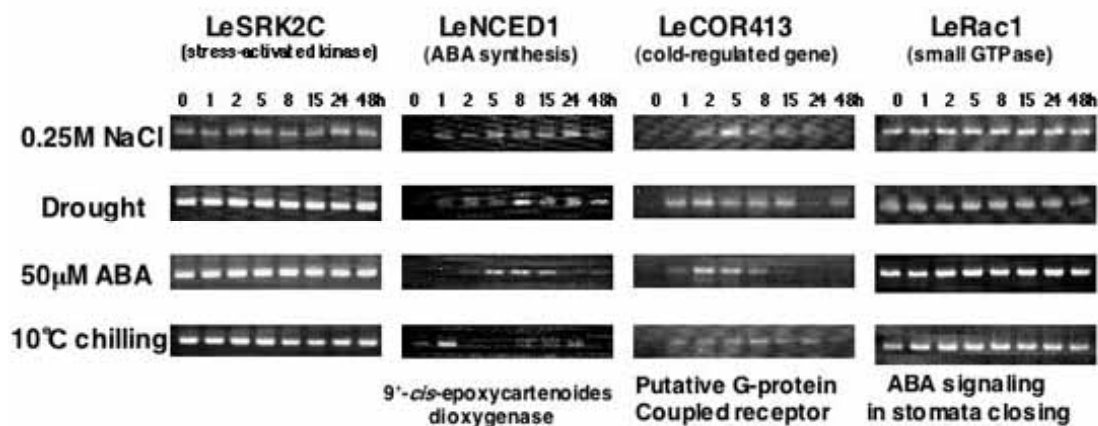


Fig. 2 RT-PCR analysis of stress signaling related genes in tomato under various stress.

組換え体 LeSRK2C タンパク質の調製とキナーゼ活性の解析:

pMAL-LeSRK2C を用いてマルトース融合全長 LeSRK2CcDNA (MBP-LeSRK2C) を発現、精製を行った。MBP-LeSRK2C の精製産物の SDS-PAGE、クローマシー染色により、相対分子量約 85 kDa および 70 kDa、55 kDa の複数のバンドが観察された。85 kDa バンドが全長 LeSRK2C に由来し、それより低分子量のバンドは大腸菌細胞内でタンパク質分解されたキナーゼドメインや C 末端領域を欠いた部分長 LeSRK2C であると推測された。この組換え体 MBP-LeSRK2C 精製標品を用いて *in vitro* プロテインキナーゼ実験を行い、自己リン酸化および基質タンパク質の解析を進めた。

基質無し、Histone H1、ミエリン塩基性プロテイン、脱リン酸化カゼインを基質にした *in vitro* リン酸化実験後、SDS-PAGE 泳動したゲルを Pro-Q diamond 蛍光染色を行った。基質無し場合、CBB 染色で検出されたバンドと同じ位置にリン酸化タンパク質の強いシグナルが検出された。これは LeSRK2C の自己リン酸化および MBP のリン酸化が検出されたと考えられる。基質のみと基質+MBP-LeSRK2C の各レーンセットの蛍光を比較して LeSRK2C によるリン酸化を評価した。Histone H1 はほとんどリン酸化されず、ミエリン塩基性プロテインは強くリン酸化された。また脱リン酸化カゼインは LeSRK2C の無い条件でもわずかにリン酸化プロテインのシグナルが検出されたが、LeSRK2C 共存下でリン酸化シグナルが増強した。

以上の結果から、LeSRK2C はミエリン塩基性プロテインを良好な基質とする、カゼインを弱くリン酸化する、Histone H1 は基質とならないことが示された。LeSRK2C の自己リン酸化については MBP を基質とした可能性が否定できないので、いくつか異なるタグを用いて比較検討する必要があると考えられる。AtSRK2C と AtSRK2E がミエリン塩基性プロテインより Histone H1 を良好な基質としてリン酸化する。LeSRK2C が Histone H1 をほとんどリン酸化せず、ミエリン塩基性プロテインを良好な基質とするという基質特異性の顕著な違いは、LeSRK2 と AtSRK2C、AtSRK2E とでは細胞内における基質や生理的機能がお互いに異なる可能性を示唆している。

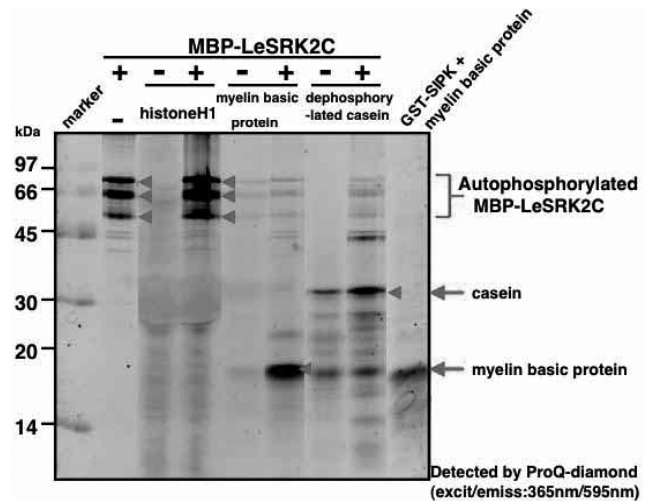


Fig. 3 *In vitro* kinase assay with recombinant MBP-fused LeSRK2C

アグロインフィルタレーション法による GST-SRK2C の発現と塩ストレス応答:

pTA7002- $\Omega$ -GST-LeSRK2C を構築してアグロバクテリウム EH105 に形質導入後、アグロインフィルタレーション法により *N.benthamiana* 葉身間隙にアグロ懸濁液を注入してデキサメタゾン噴霧により GST-LeSRK2C を発現誘導した。葉面および栽培度に 0.25 M NaCl 処理を行って 30 分後に葉身を採取した。液体窒素による凍結、破碎したのち可溶性画分を抗 GST 抗血清により免疫沈降実験を行い、GST-LeSRK2C-プロテイン A sepharose ビーズ免疫複合体を調製した。これを用いてミエリン塩基性プロテインを基質とした *in vitro* プロテインキナーゼ実験を行い塩ストレスにより LeSRK2C の活性変動を解析した。

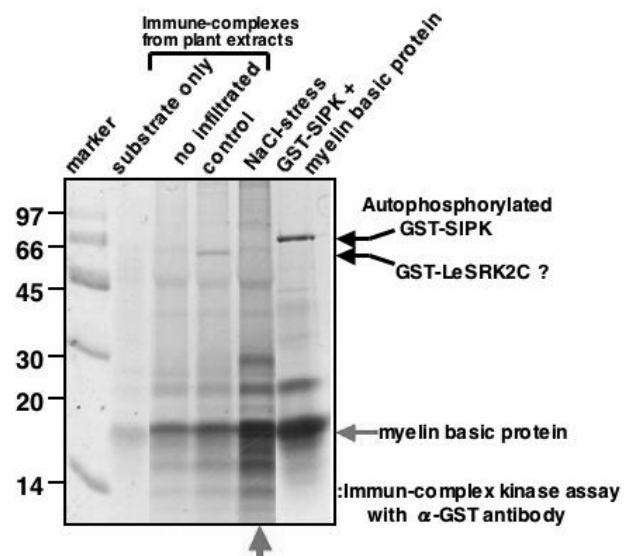


Fig. 4 Activation of GST-LeSRK2C by NaCl stress. GST-LeSRK2C was expressed in *N.benthamiana* leaves by agroinfiltration with DEX-inducing agrobacary vector.

その結果、非アグロ注入区、アグロインフィルタレーション後無処理区とアグロインフィルタレーション後塩ストレス処理区からそれぞれ調製した免疫複合体ビーズにあるキナーゼ活性を比較したところ塩ストレスによりキナーゼ活性の増大が観察された。また非アグロ注入区とアグロインフィルタレーション後無処理区を比較した場合、ストレス処理をしていない葉身の GST-SRK2C のキナーゼ活性はキナーゼ活性はきわめて低いと推測された。

次にアグロインフィルタレーション法と DEX 誘導系により GST-LeSRK2C を発現させた *N.benthamiana* 葉身に塩ストレス (0.25 M NaCl)、ABA 処理 (50  $\mu$ M)、低温ストレス (4 $^{\circ}$ C) などの各種環境ストレス、ホルモン処理を行い、各葉身サンプルから調製した GST-LeSRK2C 免疫複合体のキナーゼ活性を比較した。その結果、塩ストレスと比較して ABA 処理では LeSRK2C の活性化は顕著ではなく、低温ストレス処理では塩ストレスより顕著なキナーゼ活性上昇が観察された。このことは LeSRK2C は塩ストレスおよび低温ストレスにより顕著に活性化されること、ABA 処理単独では活性化に十分ではないことを示唆している。LeSRK2C は塩ストレスより低温ストレスによる活性化が顕著であるが、AtSRK2C では低温ストレスよりも塩ストレスや乾燥ストレスの方がキナーゼ活性化が著しいことが報

告されている。このことは LeSRK2C が基質特異性のみならず、活性化を引き起こす環境ストレスの種類についても AtSRK2C とは異なる可能性を示唆している。また低温ストレスについては乾燥ストレスが同時に生じている可能性があるため、乾燥ストレス単独で処理した場合の LeSRK2C の活性変動について検討を予定している。

これらの結果から、LeSRK2C はトマトの環境ストレス応答性 SNF キナーゼ関連分子としていくつか顕著な特徴を持つことが明らかとなった。1)地上部の光合成組織、生殖器官など広範囲で発現するものの根部ではほとんど発現しない、2)環境ストレスに応答した発現変動が顕著でない、3)基質特性が他の SRK2 分子と異なる、4)塩ストレスおよび低温ストレスで活性化されるのと比較して ABA による活性化が顕著でない。このように LeSRK2C は AtSRK2C とは発現部位、基質特異性や活性化を引き起こす環境ストレスの種類がそれぞれ異なっていることは、この二つのキナーゼの上流活性化因子や *in vivo* 基質タンパク質がそれぞれ別の細胞内機能に関わっている可能性がある。

今後は LeSRK2C の活性調節機構や上流活性化因子、相互作用する調節タンパク質の探索と LeSRK2C の基質タンパク質の探索を予定している。

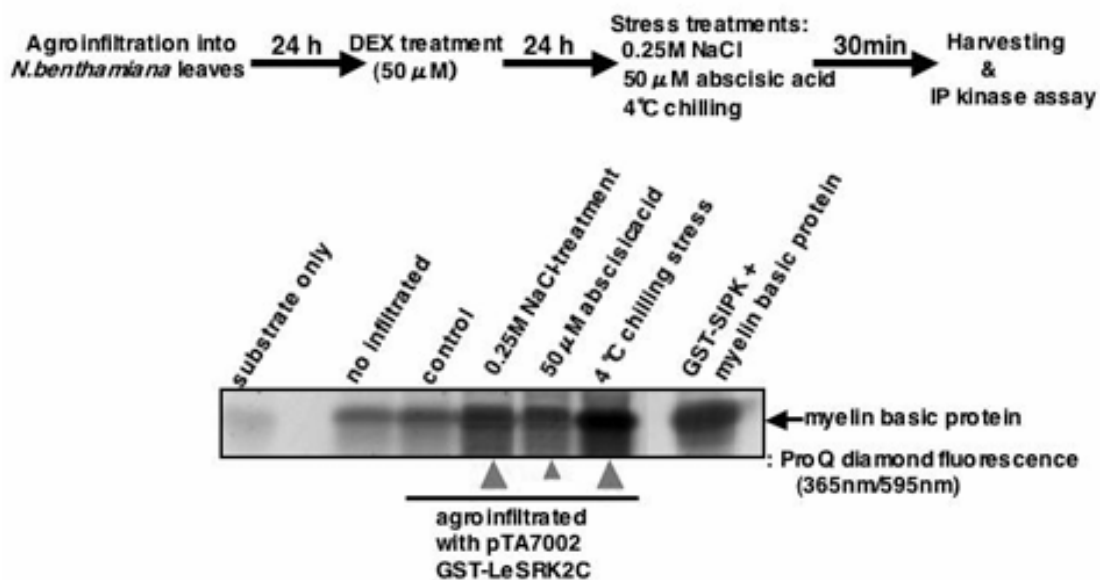


Fig. 5 NaCl and cold stresses activate ectopically expressed LeSRK2C. GST-SRK2C was induced by DEX treatment 24 hr after *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated.



### トレハロース代謝酵素系遺伝子の発現と環境ストレス:

新規ストレス応答性キナーゼSRKホモログの解析に加えて、乾燥、低温ストレスの細胞内シグナル伝達の下流において代謝的に適応機構に関与するトレハロース合成酵素(TPS, TPP)の変動についても半定量的 RT-PCR による解析をおこなった。MiBASE より TPS 候補遺伝子、TPP 候補遺伝子を選び出し、各 Contig の塩基配列情報に基づいて RT-PCR 検出用の特異的プライマーを設計した(Table1)。播種後 4 週間目のトマトに塩ストレス(0.25 M NaCl)、乾燥、ABA 処理(50  $\mu$ M)、低温処理(10 $^{\circ}$ C)の各ストレス処理を行い、1, 2, 5, 8, 15, 24, 48 h における各遺伝子発現レベルを半定量的 RT-PCR により解析した。Fig. 6 で示すように矢印で示した Contig が特異的ストレス処理により発現上昇が認められたものであり、矢印の太さが発現上昇強度レベルを示している。TPS 候補遺伝子 Contig15270 は低温及び ABA 処理によって上昇する蛍光が観察された。高等植物 TPS は N 末端に TPS 活性ドメイン、C 末に TPP 様の機能未知ドメインが存在しており、Class I と Class II のサブファミリーに分かれる。Class I は TPS 酵素活性が確認されており C 末端領域は TPP 様配列を持ちながら活性に必須のアミノ酸クラスター(TPPbox)を欠いている。Class II は TPS 活性も TPP 活性も確認されていないものの、C 末 TPP 様ドメインには保存された TPPbox が存在する。今回、低温ストレスで顕著に発現上昇する TPS 候補遺伝子 Contig15270 について現在、

5'-RACE による全長 cDNA クローニングを進行中であり、組換え体タンパク質調製と生化学的解析も含めた機能解析を予定している。

TPS と同様にトレハロース合成レベルを調節している TPP 候補遺伝子のストレスに応答した発現プロファイルを TPS 候補遺伝子と同様に RT-PCR により解析した。

トマト TPP 候補遺伝子のうち Contig10668 は乾燥ストレスおよび ABA 処理により顕著にシグナルが増大した。イネ TPP の発現パターンへの報告でも 10 個程度の TPP 関連遺伝子のうち2個だけがストレスに応答して、それぞれ応答するストレスが異なることが知られている。植物細胞内でトレハロース-6-リン酸は糖代謝経路を調節するシグナル因子として働くことが報告されており、トレハロース-6-リン酸のレベルは TPS と TPP のバランスにより調節されている。ストレスに応答した TPS と TPP の発現パターンの相違は、高等植物の糖代謝とストレス応答が複雑にクロストークしている可能性を示唆しており、より詳細な解析を進める必要がある。

今回の RT-PCR 解析により、トマトの TPS と TPP の候補遺伝子のうち Contig15270 と Contig10668 がストレス処理に応答した顕著な発現変動を示しており、これら遺伝子の全長 cDNA クローニングおよび組換え体タンパク質を調製して生化学的な解析、さらに RNAi などを用いた組換え体トマト作出による機能解析などを予定している。

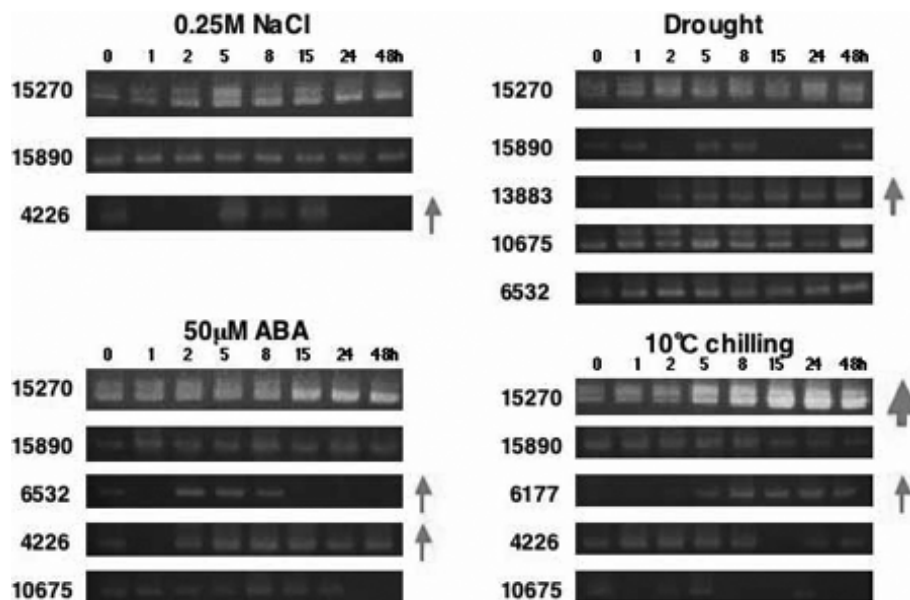


Fig. 6 RT-PCR analysis of TPS candidate genes in tomato under various stress

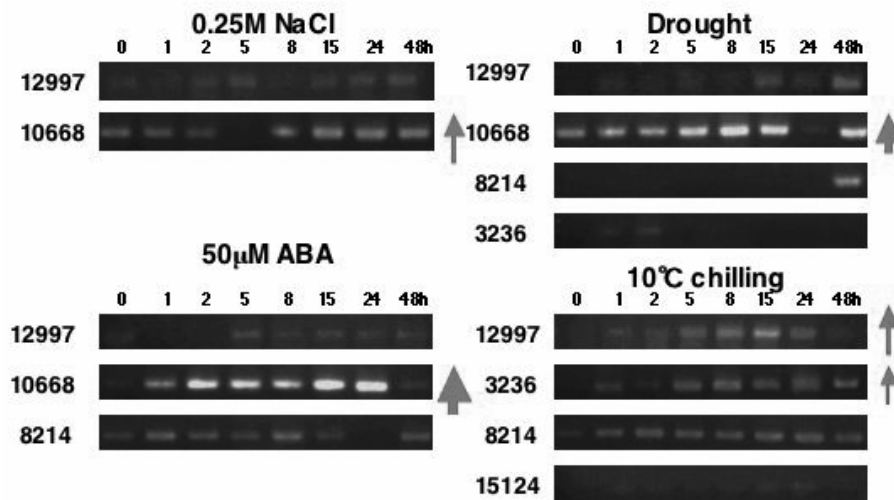


Fig. 7 RT-PCR analysis of TPP candidate genes in tomato under various stresses.

References:

Yuasa, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Shinozaki, K. (2001) Oxidative stress activates ATMPK6, an Arabidopsis homolog of MAP kinase. *Plant Cell Physiol.*, 42: 1012-1016

Yuasa T., Sugiki M., Watanabe Y. (2005) Activation of SIPK in response to ultraviolet-C (UV-C) irradiation: Utility of glutathione-S transferase (GST)-tagged plant MAP kinases by transient expression system with agroinfiltration. *Plant Biotechnolog.*, 22, 7-12

0522

## Isolation of responsive genes involved in acquiring salt- and drought-tolerances in tomato Micro-Tom, a new model plant of Solanaceae.

Takashi YUASA and Mari Iwaya-Inoue

Department of Plant Resources, Graduate School of Bioresources and Bioenvironmental Sciences,  
Kyushu University.

### Summary

Plant cells response to environmental stress by exerting intracellular signaling pathway rapidly, leading to induction of a set of specific genes and then acquiring stress tolerance. Recent progress of whole genomic analysis and reverse genetic approach of *Arabidopsis* clarified that *Arabidopsis* has multiple SNF 1 kinase-related kinase (SRK) families composed of SRK1-, SRK2- and SRK3-subfamilies and that SRK2 has a important role in stress signaling in response to drought, salt stress and ABA. It was also reported that SRK2C-overexpressing *Arabidopsis* plant shows salt- and drought-resistant phenotype.

Now, International Solanaceae Genome project has focused on tomato Micro-Tom as a novel model plant and has started genomic projects. Therefore, tomat genetic resources including EST database (MiBASE, for an example) has come to be broadly available for molecular and genetic research of tomato and Solanaceae-related plants living in various habitats including extremely severe circumstance. Today, we isolated a SRK2 homolog from Tomato MicroTom and analyzed biochemical properties and expression profiles of tomato SRK2 homolog (LeSRK2C). The DNA sequence data of full length cDNA of LeSRK2C indicate that LeSRK2C has a similar domain structure and relatively high similarity of aminoacid sequences in the catalytic domain in the N-terminal domain and the COOH-terminus region to those of AtSRK2C, compared with other SRKs.

We characterized protein kinase activities of recombinant proteins of maltose binding protein fused LeSRK2C expressed in *E.coli* and GST-fused LeSRK2C ectopically and transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* leaves by agroinfiltration and DEX-inducible vector system. Our present data by *in vitro* kinase assay and immunoprecipitation assay indicate significant difference between LeSRK2C and AtSRK2C, 1)LeSRK2C phosphorylates myelin basic protein but not histone H1, while AtSRK2C phosphorylates histone H1, 2)LeSRK2C is expressed in photosynthetic organs, floral organs and fruit but not in root, while expression of AtSRK2C is detected in root tips, 3) LeSRK2C is stimulated by chilling stress rather than by NaCl stress, while AtSRK2C is activated by NaCl but not by chilling stress. Detail biochemical mechanism involving activation of LeSRK2C remains to be clarified.

We also focused on expression profiles of candidate genes for trehalose metabolism-related enzymes in tomato under various stress. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that at least two TPS-/TPP-related candidate genes, Contig15270 and Contig10668 are significantly induced by cold stress and ABA treatment, respectively. Cloning and characterization of full length cDNA of the TPS-related gene Contig15270 are currently in progress.