

助成番号 0816

高等植物の塩・乾燥ストレス耐性の概日リズムによる制御～塩・乾燥ストレス応答性遺伝子の発現が概日リズムによって制御されている意味は？～

清末 知宏

香川大学研究推進機構総合生命科学研究センター遺伝子研究部門

概要 モデル植物シロイヌナズナを用い、概日リズム制御因子 LKP2 の過剰発現による植物体へのストレス耐性付与に焦点を当てて解析した。LKP2 は ADO/FKF/LKP/ZTL ファミリーに属する F-box 型青色光受容体で、青色光受容部でありタンパク質間相互作用に関わる LOV domain、SCF 複合体の構成因子としてユビキチン-プロテアソーム系を介したタンパク質分解に関与する F-box motif、タンパク質間相互作用に関わる kelch repeat の三つの領域から構成されている。これまでに、LKP2 遺伝子を過剰発現させた植物では、明所下で胚軸が徒長すること、長日条件下で花芽形成の時期が遅れること、連続明・連続暗所下で概日リズムが失われることが示されていた。本研究では、GFP-LKP2 過剰発現体が長日条件下での開花遅延、連続明条件下での概日リズムの消失という LKP2 過剰発現体と同様の表現型を示すことを明らかにした後、GFP-LKP2 過剰発現体と GFP 過剰発現体間でマイクロアレイ解析を行い、GFP-LKP2 過剰発現体では細胞伸長に関与すると考えられる遺伝子の他に複数のストレス応答性遺伝子の発現が上昇していることを明らかにした。そして、乾燥ストレス時の水分減少率、乾燥ストレス後の成長と生存率を指標に、GFP-LKP2 過剰発現体が乾燥ストレス耐性であることを示した。更に、RT-PCR によりストレス応答性遺伝子の発現を解析し、非ストレス条件下でのストレス応答性遺伝子の発現とストレス条件下での早いストレス応答性遺伝子の発現誘導が、GFP-LKP2 過剰発現体の乾燥ストレス耐性の原因であるとした。

1. 研究目的

植物にとって乾燥・塩・低温によって引き起こされる水分ストレスは生育に直接的な影響を与えることが多く、その詳細なメカニズムを理解することは農業生産技術への応用的側面からも非常に重要だと考えられている。植物はストレスを受けた際ストレス耐性を獲得するために多くのストレス応答性遺伝子の発現を誘導するが、最近のシロイヌナズナを用いた研究でこれらの遺伝子は非ストレス条件下でも発現が変動しており、その中でも乾燥・低温ストレス応答に関わる遺伝子の発現は概日周期を刻んでいることが明らかになってきた (Harmer *et al.*, 2000, Covington *et al.*, 2008)。我々はこれまでに概日時計制御因子の一つである LOV Kelch Protein 2 (LKP2) を植物細胞内で過剰に発現させると植物が乾燥ストレス耐性を示すという予備実験結果を得ていた。LKP2 は ADO/FKF/LKP/ZTL ファミリータンパク質の一つで、青色光受容部である LOV ドメイン、SCF 複合体形成に関わる F-box モチーフ、タンパク質-タンパク質間相互作用に関与する Kelch リピートをそれぞれ一つ有している (高瀬ら, 2006)。LKP2 過剰発現体では、遺伝子発現や葉の運動を指標とした概日リズムが連続明条件下で消失する (Schultz *et al.*, 2001)。そこで LKP2 過剰発現体を用いて乾燥ストレス耐性、ストレス応答性遺伝子の発現周期変動と乾燥ストレス条件下での発現誘導を詳しく調べることを糸口として、植物が概日リズムによる遺伝子発現制御機構を獲得することでどのように環境に適応しているのかを明らかにしたいと考えた。

ン、SCF 複合体形成に関わる F-box モチーフ、タンパク質-タンパク質間相互作用に関与する Kelch リピートをそれぞれ一つ有している (高瀬ら, 2006)。LKP2 過剰発現体では、遺伝子発現や葉の運動を指標とした概日リズムが連続明条件下で消失する (Schultz *et al.*, 2001)。そこで LKP2 過剰発現体を用いて乾燥ストレス耐性、ストレス応答性遺伝子の発現周期変動と乾燥ストレス条件下での発現誘導を詳しく調べることを糸口として、植物が概日リズムによる遺伝子発現制御機構を獲得することでどのように環境に適応しているのかを明らかにしたいと考えた。

2. 材料及び実験方法

2.1 植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Columbia accession) を使用した。LKP2 過剰発現体は安原ら (Yasuhara *et al.*, 2004) が作成したものをを用いた。植物は

22°C、16時間明8時間暗の長日条件(40 W 白色蛍光灯: 90~100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)で生育させた。

2. 2 概日リズムの測定

CCR2::LUC (COLD, CIRCADIAN RHYTHM, AND RNA BINDING 2 ::LUCIFERASE) 形質転換体とGFP-LKP2 過剰発現体、あるいは GFP 過剰発現体を掛け合わせ、得られたF1種子(F1植物)を概日リズムの測定に使用した。概日リズムの測定は Yamamoto らの方法(Yamamoto *et al.*, 2003)に従った。F1 種子を 0.8% 寒天で固化させた 1% のショ糖を含むGM培地(Valvekens *et al.*, 1988)上に播種し、4°Cで3日間の春化处理を行なった後、白色光下で12時間明12時間暗のサイクル条件で4日間育成し、連続明条件下でルシフェラーゼ活性を Topcount(Perkin Elmer)で測定した。

2. 3 マイクロアレー解析

GFP-LKP2 過剰発現体の T3(形質転換三世代目)種子約1,000粒を、0.8% 寒天で固化させ、ショ糖を含まず、培地成分を1/2にしたMS培地(Murashige & Skoog, 1962)上に播種した。コントロールには GFP 過剰発現体の種子を用いた。4°Cで3日間の春化处理後、植物を 0.7 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の連続白色光下 22°Cで5日間生育させた後、液体窒素で凍結させ、Sepasol-RNA I (nacalai tesque)を用いて全 RNA を調製した。単離した全 RNA を RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN)で更に精製した後、Affymetrix社のgene chipシステムを用いてマイクロアレー解析を行なった。プローブ合成は One-Cycle Target Labeling and Control Reagents(Affymetrix)を用いて行った。Arabidopsis ATH1 Genome Array(Affymetrix)を用いて得たシロイヌナズナ遺伝子の発現データ解析には GeneSpring ver.7(Agilent Technologies)を用いた。

2. 4 乾燥ストレス耐性試験

二つの方法で植物の乾燥ストレス耐性を評価した。

2. 4. 1 乾燥ストレス条件下での植物体の水分減少

0.8% 寒天で固化させ、1% ショ糖を含み、培地成分を1/2にしたMS培地上で2週間生育させた植物をプラスチックシャーレに移すことで乾燥ストレスを与え、20分毎に植物体の生重量を測定して水分減少量を調べた。

2. 4. 2 乾燥ストレス後の植物体の成長と生存率

0.8% 寒天で固化させ、1% ショ糖を含み、培地成分を1/2にしたMS培地上で8日間生育させた植物をキムタオ

ル上に移すことで乾燥ストレスを与えた後、植物体を再び培地上で8日間生育させ、根と葉の数を調べた。その後、それらの植物をバーミキュライト入りのポットに移植し、2週間後の生存率を比較した。

2. 5 乾燥ストレス応答マーカー遺伝子の発現解析

0.8% 寒天で固化させ、1% ショ糖を含み、培地成分を1/2にしたMS培地上で生育させた植物をプラスチックシャーレ上に移し、0、10、20、40分、1、2、5時間の乾燥ストレス処理を行った後、液体窒素で凍結させた。16時間明8時間暗の条件下で2週間生育させた植物を、4時間毎にサンプリングし、液体窒素で凍結させた。取得したサンプルから全RNAをSepasol-RNA I (nacalai tesque)を用いて抽出した。単離した全RNAを鋳型にランダムプライマーとHigh-Capacity cDNA Revers Transcription Kits(Applied Biosystems)を用いて逆転写反応を行なった後、合成したcDNAを鋳型にPCRを行なった(変性:94°C 30秒, アニール:50°C 20秒, 伸長反応:72°C 100秒で33サイクル)(Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystem)(AmpliTaq Gold, Applied Biosystems)。

3. 研究結果

3. 1 花芽形成時期と概日リズム

GFP-LKP2 過剰発現体(GFP-LKP2)と GFP 過剰発現体(GFP)、非形質転換体(Col)を16時間明8時間暗の長日条件下で育成し、開花するまでの日数を測定した。その結果、GFP-LKP2 過剰発現体では約9週間、GFP 過剰発現体と非形質転換体では約5週間の育成で開花が観察され、GFP-LKP2 過剰発現体の開花遅延が認められた(図1)。

4日間12時間明12時間暗の明暗サイクル条件下で育成した植物を連続明条件下に移し、*CCR2* プロモーター制御下での *LUC* 遺伝子の発現を解析した。その結果、GFP 過剰発現体はおおよそ24時間周期のリズムを示したのに対し、GFP-LKP2 過剰発現体ではそのリズムが消失していた(図2)。

これらの結果は、以前報告した LKP2 過剰発現体の表現型と今回明らかにした GFP-LKP2 過剰発現体の表現型とが同じであることを示しており、LKP2 の本質的な機能に GFP タグは影響を及ぼさないと考えられた。

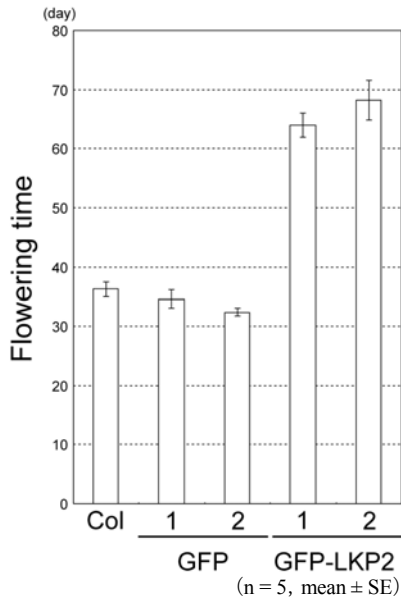


図 1. 長日条件下における開花時期

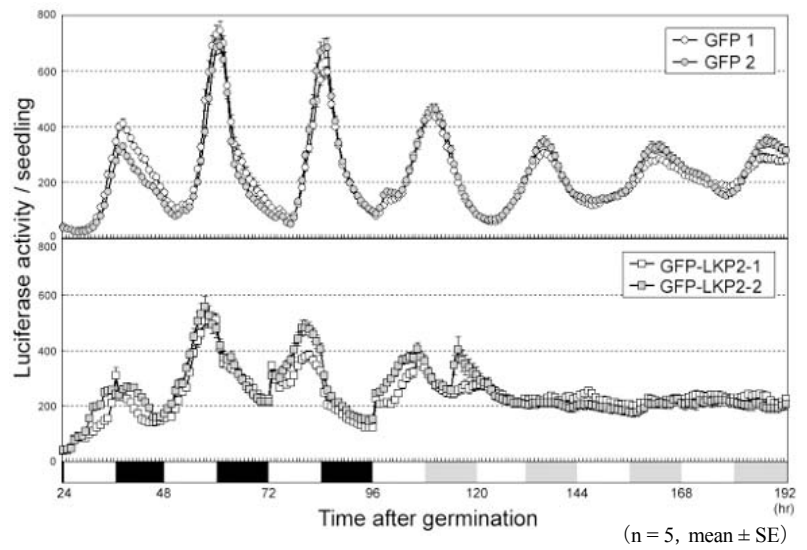


図 2. 遺伝子発現の概リズム

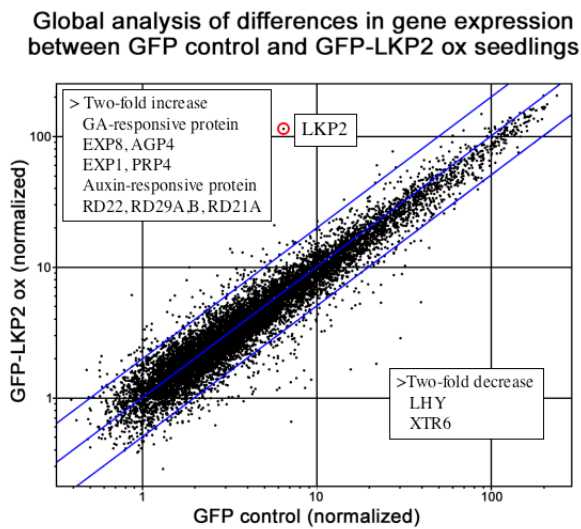


図 3. マイクロアレーによる網羅的遺伝子発現解析

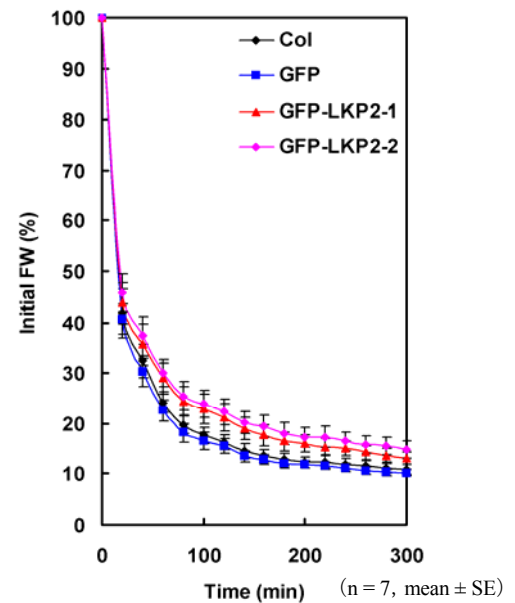


図 4. 乾燥ストレスによる植物体の水分減少

3. 2 マイクロアレーによる網羅的遺伝子発現

マイクロアレーを用いて GFP-LKP2 過剰発現体と GFP-過剰発現体の網羅的な遺伝子発現の比較を行った。GFP-LKP2 過剰発現体では、GFP-過剰発現体に比べ、細胞伸長に関わると考えられる遺伝子 (*GA-responsive protein*、*auxin-responsive protein* 等) の発現が上昇していた。また、乾燥ストレス応答に関与する *dehydration-responsive protein 22 (RD22)*、*desiccation-responsive protein 29A (RD29A)*、*desiccation-responsive protein 29B (RD29B)* 等の複数のストレス応答性遺伝子の発現上昇も

認められた(図 3)。

3. 3 乾燥ストレス時の植物体の水分減少

GFP-LKP2 過剰発現体、GFP 過剰発現体、非形質転換体に乾燥ストレスを与え、20 分毎に植物体の重量を測定し、水分の減少量を比較した。その結果、GFP-LKP2 過剰発現体では、コントロールである GFP 過剰発現体、非形質転換体に比べて重量減少率が少なく、乾燥ストレスに対する耐性が認められた(図 4)。

3. 4 乾燥ストレス後の植物の成長と生存率

乾燥ストレス処理後の植物の成長と生存率を指標にストレス耐性を比較した。野生型である非形質転換体と GFP 過剰発現体では成長が顕著に阻害されたのに対し、GFP-LKP2 過剰発現体では葉の枚数、根の本数共に増加していた(図 5)。また、乾燥ストレス処理後にバーミキュライト入りのポットに移植して2週間後の植物の生存率では、非形質転換体と GFP 過剰発現体のそれらが 13.3% であったのに対し、GFP-LKP2 過剰発現体の生存率は系統 1 (GFP-LKP2-1) が 93.3%、系統 2 (GFP-LKP2-2) が 91.7% であった(図 6)。従って、乾燥ストレス後の植物の成長と生存率を指標にした場合でも GFP-LKP2 過剰発現体の乾燥ストレス耐性が認められた。

3. 5 乾燥ストレス応答性マーカー遺伝子の発現

DRE Binding Protein 2A (DREB2A)、*2B (DREB2B)* 両遺伝子と *Responsive to Desiccation 29A (RD29A)* 遺伝子は乾燥ストレス応答性マーカー遺伝子として良く知られている(Liu *et al.*, 1998)。また、*DRE Binding Protein 1A/CRT binding factor 3 (DREB1A /CBF3)* 遺伝子は非ストレス条件でその遺伝子発現が概日周期を示し、その過剰発現体は乾燥、低温、塩ストレスに耐性を示すことが知られている(Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998, Harmer *et al.*, 2000)。LKP2 過剰発現体が乾燥ストレス耐性を示したことから、これらの

植物では *DREB/CBF* ファミリー遺伝子や乾燥ストレス応答性マーカー遺伝子の発現上昇が予想された。

3. 5. 1 乾燥ストレス時のストレス応答性遺伝子の発現

GFP-LKP2 過剰発現体、GFP 過剰発現体、非形質転換体における乾燥ストレス応答性遺伝子の発現を RT-PCR 法を用いて調べた。その結果、*DREB1A/CBF3* と *RD29A* の mRNA は、野生型では乾燥ストレス処理開始前には非常に低いレベルであり、処理 10 分後から発現誘導が認め

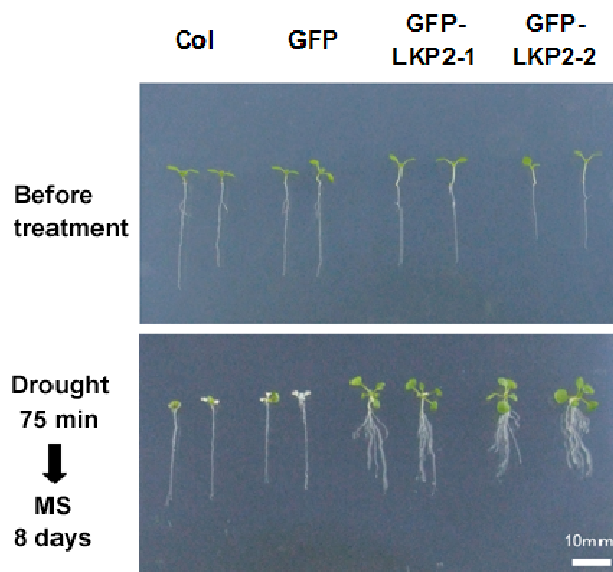


図 5. 乾燥ストレス処理後の葉と根の成長

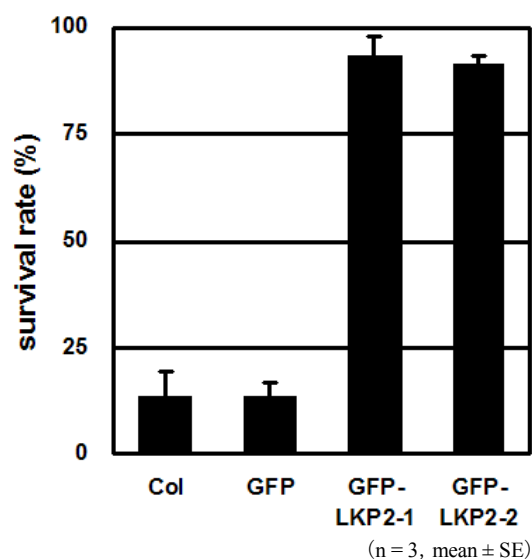
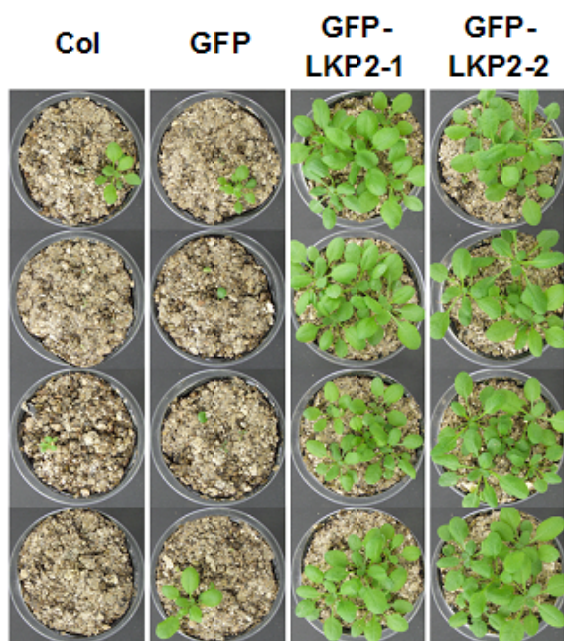


図 6. 乾燥ストレス処理後の生存率

られたのに対し、GFP-LKP2過剰発現体では両者とも乾燥ストレス処理開始前の状態で既に高いレベルであり、乾燥ストレス処理後に発現量が最大となるのにかかった時間も短かった(図7)。

3. 5. 2 非乾燥ストレス時のストレス応答性遺伝子の発現

非ストレス条件下の GFP-LKP2 過剰発現体で *DREB1A/CBF3* と *RD29A* 遺伝子の発現が増加していたことから、それらの日周変動を RT-PCR 法で調べた。*DREB1A/CBF3* 遺伝子は、野生型では ZT12 で発現が最も高いのに対し、GFP-LKP2 過剰発現体では ZT8 で最も高くなっており、しかも ZT8 以外の時間帯でも野生型に比べて発現量が増加していた(図8)。

4. 考察と今後の課題

本研究から、LKP2 過剰発現体は、これまでに知られていた連続明条件下での概日リズム消失と胚軸徒長、長日条件下での花芽形成遅延という表現型に加えて、乾燥ストレス耐性を示すことが明らかとなった。

DREB1A/CBF3 はマスターキー遺伝子として働き、その制御下にある乾燥ストレス応答性遺伝子、低温ストレス応答性遺伝子の発現を誘導することができる。これらの一群のストレス応答性遺伝子は水チャネル、解毒酵素、分子シ

ャペロン、タンパク質分解酵素、親水性タンパク質などをコードしており、それらの働きで細胞・個体のストレス耐性が高まることが知られている。GFP-LKP2 過剰発現体では、野生型に比べて、非ストレス条件下での *DREB1A/CBF3* や *RD29A* の発現が高かったため、非ストレス条件下で *DREB1A/CBF3* 制御下のストレス応答性遺伝子の発現も高くなっていることが予想される。それ故、LKP2 過剰発現体は非ストレス下でも野生型に比べて既にある程度のストレス耐性を有していたと考えられる。

また、GFP-LKP2 過剰発現体では、野生型に比べて、乾燥ストレスを受けた後のストレス応答性遺伝子の早い発現誘導が認められた。このことが、GFP-LKP2 過剰発現体が急激な乾燥ストレスに対して耐性を示したもう一つの理由であると考えられる。

最近、*PRR5*、*PRR7*、*PRR9* 遺伝子の三重変異体 (*prp9-11 prp7-10 prp5-10*) が乾燥、塩、低温ストレスに耐性を示すことが報告された(Nakamichi *et al.*, 2009)。LKP2 過剰発現体と *prp9-11 prp7-10 prp5-10* の表現型は、連続明条件下での概日リズムの消失、長日条件下での花成遅延、連続赤色光下での胚軸徒長など共通点が多い。従って、*PRR5*、*PRR7*、*PRR9* 遺伝子の三重変異体の作用点と LKP2 過剰発現体の作用点と同じであり、LKP2 過剰発現体も塩ストレス耐性を示す可能性がある。

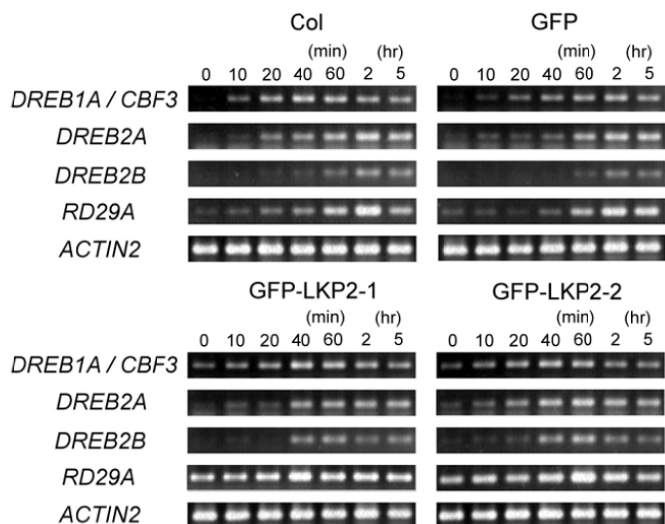


図7. 乾燥ストレスによる *DREB1A*、*2A*、*2B*、*RD29A* 遺伝子の発現誘導

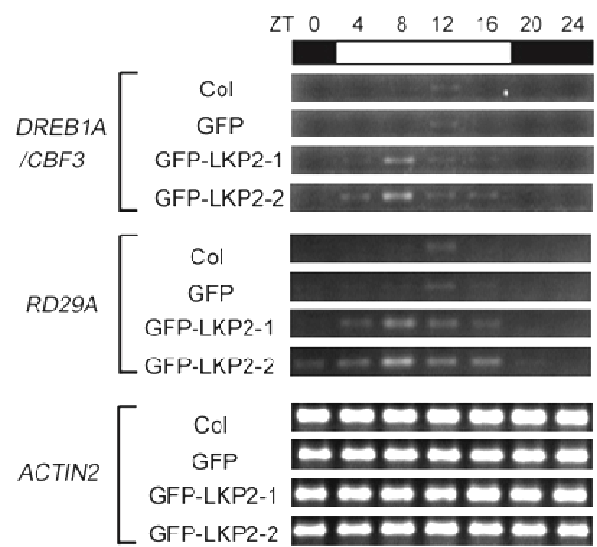


図8. *DREB1A*、*RD29A* 遺伝子発現の日周変動

農作物、園芸品種への有用形質の導入を考えた場合、一つの遺伝子を導入する方が複数の遺伝子を破壊するよりはるかに簡単である。従って、LKP2 遺伝子を用いたストレス耐性遺伝子組換え作物への応用研究は興味深い。

本研究から、LKP2 が *DREB1A/CBF3* 遺伝子の発現量を制御している可能性が示唆された。今後、LKP2 機能欠損変異体を用いて可能性の検証を行いたい。また、LKP2 が植物細胞内のどのような因子に作用することで *DREB1A/CBF3* 遺伝子の発現を制御しているかについては全く不明である。今後は、LKP2 が作用する因子の同定とその機能解析を進めることでストレス応答性遺伝子の発現制御機構に関する新知見が得られるものと期待できる。LKP2 は概日リズムの中心振動体を制御していると考えられている青色光受容体であるので、*DREB1A* の遺伝子発現に対する青色光や概日リズムの影響についても興味を持たれる。

謝 辞

本研究にご援助頂きましたソルト・サイエンス研究財団に感謝申し上げます。本研究は愛媛大学大学院連合農学研究科博士課程宮崎裕士氏、理化学研究所バイオリソースセンター安部洋研究員、理化学研究所植物ゲノム機能研究チーム吉積毅研究員、香川大学総合生命科学研究センター高瀬智敬研究員らの共同研究で行われました。

参考文献

Covington MF, Maloof JN, Straume M, Kay SA, Harmer SL (2008) Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol.* 9:R130. Epub 2008 Aug 18.

Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290:2110-2113.

Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*. 280:104-106.

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10:1391-406

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497

Nakamichi N, Kusano M, Fukushima A, Kita M, Ito S, Yamashino T, Saito K, Sakakibara H, Mizuno T. (2009) Transcript profiling of an *Arabidopsis* PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant Cell Physiol* 50:447-462. Epub 2009 Jan 8.

Schultz TF, Kiyosue T, Yanovsky M, Wada M, Kay SA (2001) A Role for LKP2 in the Circadian Clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2659-2670.

Valvekens D, Van Montagu M, Van Lijsebettens M (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5536-5540

Yamamoto YY, Tsuchida Y, Gohda K, Suzuki K, Matsui M (2003) Gene trapping of the *Arabidopsis* genome with a firefly luciferase reporter. *Plant J.* 35:273-283.

Yasuhara M, Mitsui S, Hirano H, Takanabe R, Tokioka Y, Ihara N, Komatsu A, Seki M, Shinozaki K, Kiyosue T (2004) Identification of ASK and clock-associated proteins as molecular partners of LKP2 (LOV kelch protein 2) in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 55:2015-2027. Epub 2004 Aug 13.

高瀬智敬、小倉康裕、深松陽介、清末知宏：「植物の概日時計、花成時期制御とユビキチン」ユビキチン—プロテアソーム系とオートファジー（共立出版）、蛋白質核酸酵素 2006年8月号増刊 1321-1324頁。

No. 0816

Relationship between Circadian Clocks and Stress Responses to Salt or Dehydration in Higher Plants: What is the Meaning of Circadian Expression of Genes That are Responsive to Salt- or Dehydration-Stress ?

Tomohiro Kiyosue

Kagawa University

Summary

The LOV kelch protein 2 (LKP2) comprises three functional domains: the LOV, F-box, and kelch repeat. The LOV domain is involved in blue light perception and protein-protein interaction. The F-box motif is included in SCF complex, and the kelch repeat is a protein-protein interaction module. *Arabidopsis* plants that overexpressed LKP2 cDNA exhibited elongated hypocotyl under light conditions, delayed flowering time under long-day conditions, and arrhythmia under continuous light or dark conditions. In this study, whether overexpressor of LKP2 affect other phenomena, we used DNA microarray analysis to identify genes with altered expression levels in the LKP2 overexpressor. Microarray analysis revealed that the expression levels of some of the genes were altered in the LKP2 overexpressor as compared to the expression levels in the wild type. In addition, the upregulated genes included some plant hormone-responsive and stress-responsive genes. In order to examine the effect of LKP2 overexpression in stress responses, we assessed the expression levels of stress-responsive genes and stress tolerance in the LKP2 overexpressor.