

助成番号 0824

作物の塩輸送に関わる耐塩性遺伝子 PMP3 の機能解析

三屋 史朗

名古屋大学大学院生命農学研究科

概要 本研究では、最も重要な作物のひとつであるイネの耐塩性機構の解明および耐塩性の向上を目的として、イネの *PMP3* 遺伝子の単離、発現解析および機能解析を行った。酵母の *PMP3* 遺伝子の配列と相同なイネの遺伝子を七つ単離し、*OsPMP3* 遺伝子群とした。*PMP3* 遺伝子欠損酵母 (*Δpmp3*) を用いた相補性実験の結果、*Δpmp3* 酵母は塩に対する感受性が高くなったが、四つの *OsPMP3* 遺伝子をそれぞれ導入した株では耐塩性の向上が見られ、イネ *OsPMP3* が酵母 *PMP3* と同様の機能を有することがわかった。また、高濃度の塩、乾燥、低温、酸化ストレスの条件下のイネにおける *OsPMP3* 遺伝子群の発現量を調べたところ、三つの *OsPMP3* 遺伝子の発現量が増加した。これらのストレス応答性 *OsPMP3* 遺伝子群の mRNA 分布を *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べたところ、主に葉肉組織および側部根冠組織において検出された。したがって、イネにおいて *OsPMP3* 遺伝子は主に葉肉組織および側部根冠組織において発現し、塩ストレスによって遺伝子の発現量が増加することによって細胞レベルでの塩輸送を抑制し、耐塩性を獲得することが示唆された。

また、*CaMV35S* プロモータの下流に *OsPMP3* 遺伝子を導入して、*OsPMP3* 過剰発現イネの作出に成功した。*OsPMP3* 過剰発現イネは、通常状態での成長量が野生株に比べて減少した。しかし塩ストレス処理下での生長抑制程度は緩和された。したがって *PMP3* 遺伝子は、遺伝子発現の改変によりイネの耐塩性を向上させるための候補遺伝子となることがわかった。

1. 研究目的

植物の成長は、植物を取り巻く環境、特に高濃度の NaCl 塩、乾燥または低温などの非生物ストレスにより著しく影響を受ける。特に、塩ストレスは植物の生長および収量を制限する最も重要な因子のひとつである。植物が塩ストレスを受けると、水欠乏、イオン障害⁽¹⁾ および光酸化障害^(2,3) により成長が減少する。したがって、高塩濃度の塩集積土壌における作物生産量を増加させるためには、作物における耐塩性を改良することが重要である。植物が長期間塩ストレスにさらされると、組織内の Na^+ 含量が増加し、障害が引き起こされる^(2,3)。したがって植物の細胞における Na^+ 輸送および Na^+ 吸収の抑制メカニズムを理解する必要がある。

Na^+ は大部分の植物にとって必須元素ではないが、 Na^+ はいくつかの Na^+ 透過膜タンパク質(非選択カチオンチャ

ネル、*HKT1*、*SOS1*、*NHX1* など)を通して膜を通過する。さらに Na^+ の吸収および拡散は、膜ポテンシャルによって直接的または間接的に調節される。植物では、細胞膜プロトンポンプや液胞膜無機リン酸ピロフォスファターゼが ATP エネルギーを利用してプロトンサイトをから外にくみ出し、プロトンの電気化学的勾配を作る。このプロトンポテンシャルが Na^+/H^+ 対向輸送体のエネルギーとなり、 Na^+ をサイトゾル外に隔離することに働く。

Navarre と Goffeau⁽⁴⁾ により、酵母細胞における *PMP3* 遺伝子の欠損が細胞膜の過分極を引き起こし Na^+ 吸収を増加させることが報告された。植物のシロイヌナズナにおいても、*PMP3* の相同遺伝子である *RC12A* 遺伝子の破壊により Na^+ の過剰な蓄積が引き起こされ、塩感受性が増加した⁽⁵⁾。したがって、*PMP3* は植物においても細胞膜ポテンシャルの調節に寄与し、結果的に植物の耐塩性機構

に關与することが考えられた。

イネは最も重要な作物のひとつであるが、塩ストレスによる過剰なNa⁺の蓄積により生長率の著しい減少、超微形態の変化が起こる^(2, 3, 6)。したがってイネの耐塩性を改良するためにはNa⁺輸送の遺伝子レベルでの調節が効果的であると予想される。そこで本研究では、イネの耐塩性を向上させる候補遺伝子としてPMP3に注目し、PMP3遺伝子の相同遺伝子をイネから単離し、イネにおけるPMP3遺伝子の発現解析および機能解析をおこなった。またイネPMP3遺伝子過剰発現株を作製し、その耐塩性程度を調査した。

2. 研究方法

2.1 イネのPMP3相同遺伝子の単離

イネ(*Oryza sativa* L.)のESTデータベースから、酵母PMP3遺伝子の相同遺伝子を検索し、PCR法により作製した。

2.2 イネOsPMP3タンパク質の機能解析

イネにおけるOsPMP3タンパク質群の機能解析には、PMP3遺伝子欠損酵母を用い、*Δpmp3*酵母のOsPMP3遺伝子群による相補性を検定した。*Δpmp3*酵母はEUROSCARFから入手した。OsPMP3遺伝子はpYES2ベクターのGAL1プロモータの下流に導入し、エレクトロポレーション法により酵母に導入した。

2.3 イネOsPMP3遺伝子群の発現解析

イネにおけるOsPMP3遺伝子群の発現解析はNorthernブロット分析法により行った。イネ植物体からATA法により全RNAを抽出し、電気泳動により分離した後ナイロンメンブレンに転写し、それぞれのOsPMP3遺伝子群の3'非翻訳領域をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。また、イネの組織におけるOsPMP3遺伝子群の発現解析は、in situハイブリダイゼーション法により行った。

2.4 OsPMP3遺伝子過剰発現株の作出

OsPMP3-3遺伝子をpCAMBIA1300ベクターのCaMV35Sプロモータの下流に導入し、アグロバクテリウム法によりイネに導入した。

3. 研究結果

3.1 イネのPMP3相同遺伝子の単離

イネのOsPMP3遺伝子群を単離するため、酵母PMP3

遺伝子の相同遺伝子をイネのESTデータベースからBLAST検索をおこなった。その結果、少なくとも七つの相同遺伝子を単離し、OsPMP3-1からOsPMP3-7遺伝子と命名した。OsPMP3-1から-7遺伝子配列からの予想アミノ酸配列から系統樹を作成した(Fig. 1)。その配列はイネおよびその他の植物種内で高度に保存されていた。

OsPMP3遺伝子群のコードするアミノ酸配列を比較した場合、OsPMP3-1からOsPMP3-7に向かうに連れて配列類似性は低くなるが、OsPMP3-1とOsPMP3-2は80.6%の配列類似性があり、OsPMP3-1とOsPMP3-7は51.5%の配列類似性があった。

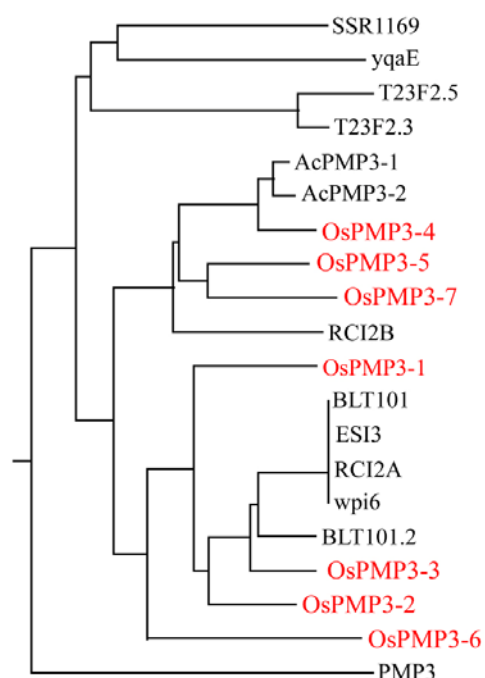


Fig. 1. Phylogenetic tree of PMP3 proteins

3.2 イネOsPMP3タンパク質の機能解析

酵母細胞では、PMP3遺伝子の欠損によりNa⁺イオンの蓄積が過剰になり、塩感受性が増加することが報告されている⁽⁴⁾。また、シロイヌナズナと*Aneurolepidium chinense*のPMP3相同遺伝子であるRC12AおよびAcPMP3を*Δpmp3*酵母に導入すると塩感受性の表現型が相補されることから、植物のPMP3が酵母PMP3の機能を相補することが知られている^(7, 8)。そこで本研究により単離したOsPMP3遺伝子群を*Δpmp3*酵母株に導入し表現型を調べることにより、OsPMP3遺伝子群の相補性検定を

おこなった。

その結果、OsPMP3-1、OsPMP3-2、OsPMP3-3、OsPMP3-4、OsPMP3-5、OsPMP3-7 が酵母 PMP3 の機能を相補したが、OsPMP3-6 は相補しなかった。また OsPMP3-1 および OsPMP3-7 の相補性の程度は他の遺伝子群に比べて小さかった (Fig. 2)。

3.3 イネにおける OsPMP3 遺伝子群の発現解析

イネにおける OsPMP3 遺伝子群の発現解析をおこなうため、3週間水耕栽培したイネに NaCl、乾燥、低温または過酸化水素による酸化ストレスを与えた。また、非生物ストレス耐性機構におけるシグナル伝達物質であるアブシジン酸も同様に処理した。処理後各時間後にシュートおよび根を採取し、RNA 調製に用いた。

その結果、七つの OsPMP3 遺伝子群のうち、OsPMP3-3、OsPMP3-4 および OsPMP3-5 遺伝子の三つが非生物ストレス処理によりその転写量が増加した (Fig. 3)。

また、in situ ハイブリダイゼーション法により、非生物ストレスにより転写量の増加した OsPMP3-3、-4 および -5 遺伝子の組織内発現部位を調べた。その結果、三つの遺伝子群の発現部位は同様であり、葉身における葉肉組織および根冠における側部根冠組織において mRNA のシグナルが検出された (Fig. 4)。

3.4 OsPMP3-3 遺伝子過剰発現イネの作出および表現型調査

ここまでの結果より、イネがストレスにさらされると、OsPMP3-3、OsPMP3-4 および OsPMP3-5 の3遺伝子の発現量が主に葉肉組織および側部根冠組織において増

加し、イネのストレス耐性機構に何らかの役割を果たすことが示唆された。一方、耐塩性植物である *Aneurolepidium chinense* の根における *AcPMP3* 遺伝子発現部位は中心柱や表皮などであり⁷⁾、イネにおける *OsPMP3* 遺伝子群の発現部位は比較的制限されていることがわかった。そこで、イネにおいて *OsPMP3* の発現量を増加させ、かつ様々な部位で発現させることにより、イネの耐塩性向上を試みた。そのために、組織非特異的高発現プロモーターである CaMV35S プロモーターの下流に *OsPMP3-3* 遺伝子をつなぎ、イネにアグロバクテリウム法により導入した。

Northern プロット分析の結果、野生型イネに比べて *OsPMP3-3* 過剰発現イネにおける *OsPMP3-3* 遺伝子発現量は高かった (Fig. 5a)。empty ベクター導入イネ (Emp) における *OsPMP3-3* 遺伝子発現レベルは野生型と同様であった (データは示さず)。

Emp および *OsPMP3-3* 遺伝子発現イネを水耕栽培し、3週間後に NaCl を水耕液に加えて塩ストレス処理を施した。その結果、対照区では Emp に比べて *OsPMP3-3* 過剰発現株の成長が小さかった (Fig. 5b)。しかし塩ストレス処理区では Emp と *OsPMP3-3* 過剰発現株の成長の違いが見られなかった。

4. 考 察

本研究の結果、イネから七つの PMP3 相同遺伝子 (*OsPMP3-1* から *OsPMP3-7*) の単離に成功した。七つの *OsPMP3* 遺伝子群の内、*OsPMP3-3*、-4、-5 遺伝子が高塩などの非生物ストレスに応答してその発現量を増加させ

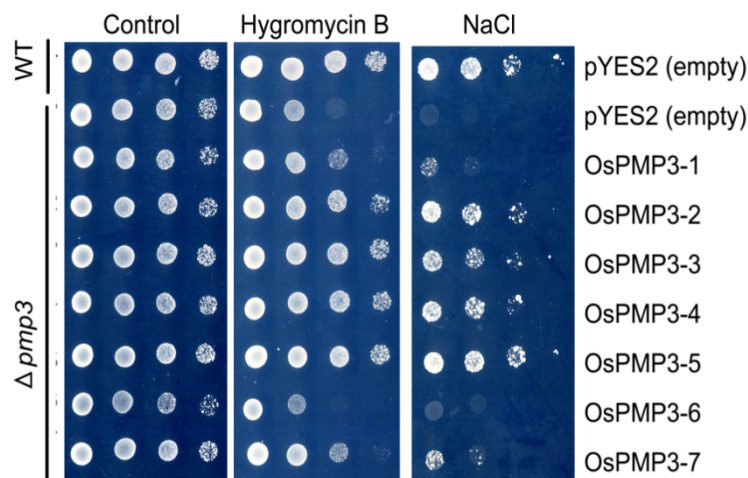


Fig. 2. Complementation test using $\Delta pmp3$ yeast

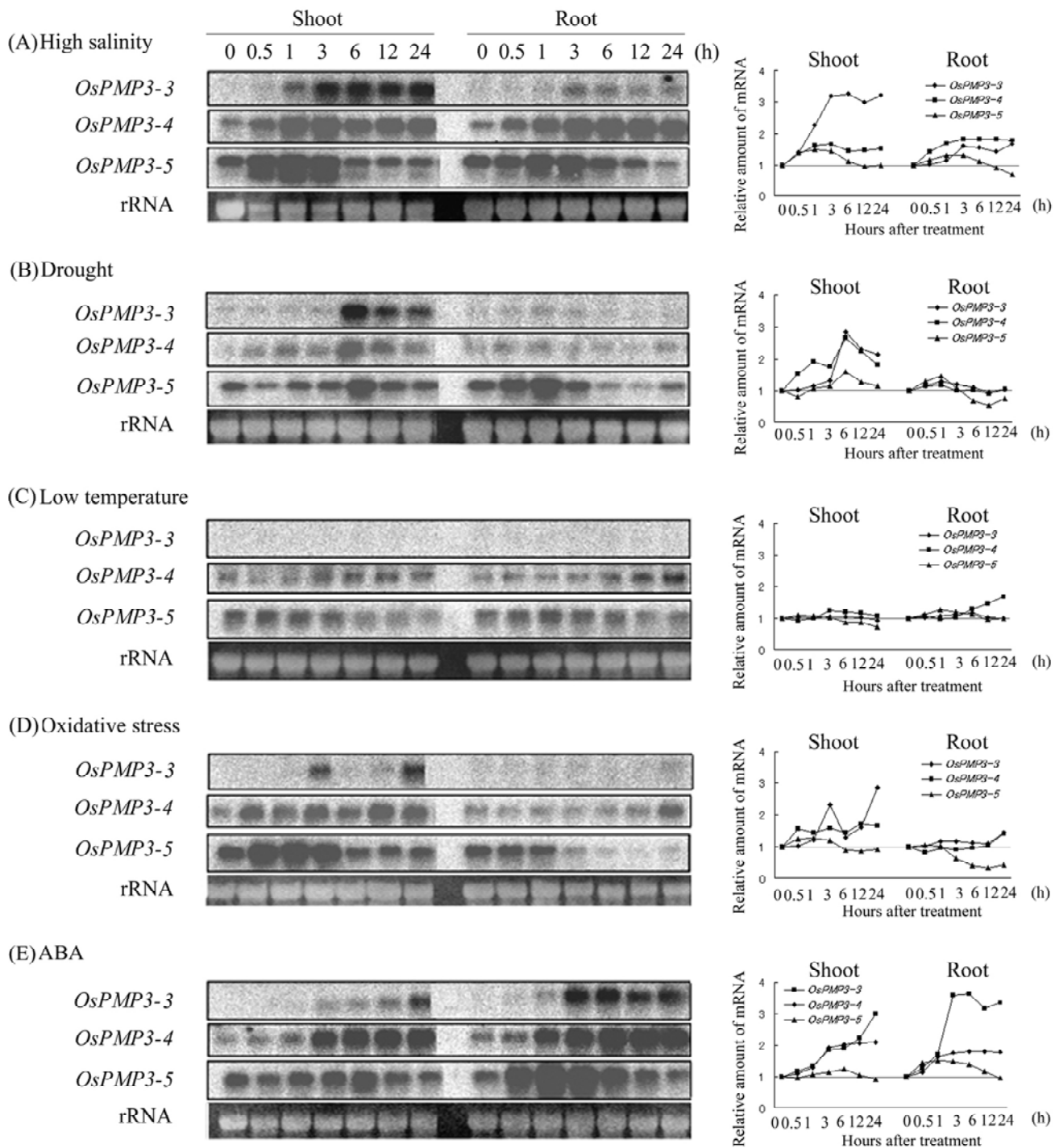


Fig. 3. Northern blot analyses of *OsPMP3* genes under various treatments

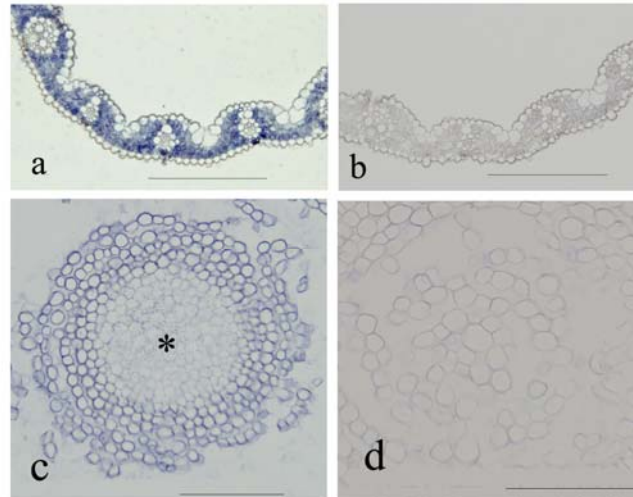


Fig. 4. In situ hybridization of *OsPMP3-4* gene in rice plants. a, b leaf blades; c, d root cap. a, c; antisense probe; b, d sense probe.

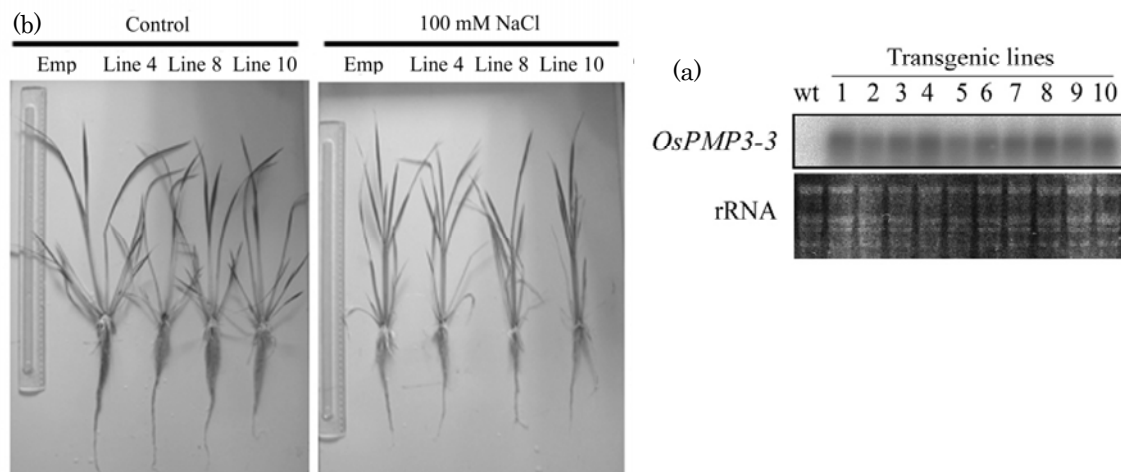


Fig. 5. *OsPMP3-3* overexpressing rice plants. a) Northern blot analysis of *OsPMP3-3* gene in empty and *OsPMP3-3* o/e plants. b) Phenotype of *OsPMP3-3* o/e plants under control and NaCl treatment conditions.

たことから、これらの遺伝子群がイネの塩ストレス応答において重要であることが示唆された。またストレス応答性 *OsPMP3* 遺伝子群の発現部位は葉肉組織および側部根冠組織に限定されており、発現部位が限定されていることがイネの塩感受性の一因と考えられた。

さらに *OsPMP3-3* 遺伝子の過剰発現イネを作出したところ、通常状態における成長量が減少したものの、塩ストレスによる成育抑制率を緩和した。したがって *OsPMP3* 遺伝子の過剰発現によりイネの耐塩性を向上させることができたことがわかった。

5. 今後の課題

今後は、イネ *OsPMP3* タンパク質の分子レベルでの機能解析を行い、どのように *PMP3* がイネの耐塩性機構において機能しているのかを検証していく必要がある。また *OsPMP3-3* 過剰発現イネが通常状態で成長量が減少したことの原因を検証していきたい。

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。

なお、本研究は、国際学会 Plant Biology 2009 (2009年7月18日-7月23日アメリカ合衆国)において発表する予定です。

文献

- 1) Munns R. and Termaat A. (1986) Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 143-160.
- 2) Mitsuya S., Kawasaki M., Taniguchi M. and Miyake H. (2003) Light dependency of salinity-induced chloroplast degradation. *Plant Prod. Sci.* 6: 219-223.
- 3) Mitsuya S., Kawasaki M., Taniguchi M. and Miyake H. (2003) Relationship between salinity-induced damages and aging in rice leaf tissues. *Plant Prod. Sci.* 6: 213-218.
- 4) Navarre C. and Goffeau A. (2000) Membrane hyperpolarization and salt sensitivity induced by deletion of PMP3, a highly conserved small protein of yeast plasma membrane. *EMBO J.* 19: 2515-2524.
- 5) Mitsuya S., Taniguchi M., Miyake H. and Takabe T. (2005) Disruption of *RCI2A* leads to over-accumulation of Na⁺ and increased salt sensitivity in *Arabidopsis thaliana* plants. *Planta* 222: 1001-1009.
- 6) Akita S. and Cabuslay G.S. (1990) Physiological basis of differential response to salinity in rice cultivars. *Plant Soil* 123: 277-294.
- 7) Inada M., Ueda A., Shi W. and Takabe T. (2005) A stress-inducible plasma membrane protein 3 (AcPMP3) in a monocotyledonous halophyte, *Aneurolepidium chinense*, regulates cellular Na⁺ and K⁺ accumulation under salt stress. *Planta* 220: 395-402.
- 8) Medina J., Ballesteros M.L. and Salinas J. (2007) Phylogenetic and functional analysis of *Arabidopsis* *RCI2* genes. *J. Exp. Bot.* 58: 4333-4346.

No. 0824

Functional Analysis of Salt-Tolerance-Related PMP3 Gene in the Salt Transport of Crop Plants

Shiro Mitsuya

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

Summary

To elucidate the mechanism of salt tolerance of rice, one of the most important crop plants, and improve its salt tolerance, we have isolated *PMP3* gene from rice and analyzed their expression and function. We have isolated 7 *OsPMP3* genes from rice, which were homologous to yeast *PMP3* gene. Although the deletion of *PMP3* induced salt hypersensitivity in yeast, 4 of *OsPMP3* genes complemented the phenotype of $\Delta pmp3$ yeast. Northern blot analysis showed that 3 of *OsPMP3* genes were up-regulated under the treatment of NaCl, drought, low temperature and H₂O₂. In addition, the mRNA of stress-inducible *OsPMP3* genes was detected in the mesophyll of leaves and lateral root cap of roots revealed by in situ hybridization. These results indicated that *OsPMP3* genes were expressed mainly in mesophyll and lateral root cap and contribute to salt tolerance via restricting Na⁺ uptake in their tissues.

We have introduced *OsPMP3* gene under the control of CaMV 35S promoter. *OsPMP3* overexpressing rice plants showed decreased growth compared with wild type under a normal condition. However, under saline conditions, *OsPMP3* overexpression alleviated NaCl-induced growth suppression. These results suggest that *PMP3* gene can be used for improving salt tolerance by its genetic modification.