

## 浸透圧調節に関わる転写因子の効率的利用による耐塩性植物の分子育種技術の開発

上中 弘典, 小泉 陽平, 恩田 沙織, 末次 舞, 中村 歩

鳥取大学農学部生物資源環境学科

**概要** 塩害地における作物生産の向上には、生産技術の改善だけではなく、耐塩性を向上させた作物の開発が重要である。従来の育種法とは異なり、遺伝子組換え技術を用いた分子育種により、短期間で新しい形質を付与した作物を作出することが可能となる。特に複数の遺伝子の機能を調節できる転写因子の利用は効率的であることから、塩耐性にも関わる細胞内の浸透圧調節を司る転写因子 *AtbZIP10* と *AtbZIP53* に注目した。これら転写因子の標的遺伝子である *ProDH* 遺伝子を利用した自己活性化のメカニズムの利用により、恒常的に発現させた場合に比べて発現量の劇的な増加も見込まれる。そこで本研究では、これらの **bZIP** 型転写因子の機能を効率的に利用することで、植物に耐塩性を付与できる分子育種技術の開発を目指した研究を行った。

シロイヌナズナのプロトプラストにおける一過的発現系を用いて *ProDH* 遺伝子の転写活性化について調べた結果、*AtbZIP53* と *AtbZIP10* を同時に発現させることで強く転写活性化されるが、転写活性化には *AtABI3* の機能は必要ないことが明らかになった。また、*AtbZIP10* と *AtbZIP53* は他の **bZIP** 型転写因子と同様に核に局在し、**bZIP** ドメインを介して結合していた。更に、*CaMV35S* プロモーターを用いた *AtbZIP10* の過剰発現体 *P<sub>35S</sub>::AtbZIP10* 植物では導入遺伝子由来のタンパク質が恒常的に分解されていたことから、転写因子である導入遺伝子の過剰発現のアプローチとしては、**bZIP** 型転写因子とその標的遺伝子 *ProDH* 遺伝子のプロモーターを用いた自己活性化のシステムの利用が非常に有効であると示唆された。一方、*AtbZIP10*、*AtbZIP53*、*ProDH* 遺伝子の発現パターン、及び適合溶質プロリンの浸透圧調節における役割を総合すると、*AtbZIP10*、もしくは *AtbZIP53* の機能強化により期待できるのは、塩や乾燥によるストレスそのものに対してではなく、ストレスから回復する際のストレスの緩和に重要な細胞内の浸透圧の低下の促進や過剰な適合溶質によるダメージの軽減である。実際、*P<sub>35S</sub>::AtbZIP10* 植物では乾燥ストレス処理後の給水による回復時でのみ、野生型と比較して有意なストレス耐性の差が見られた。塩ストレスから回復する際も同様に急激な浸透圧の低下により障害を受けることから、*AtbZIP10* と *AtbZIP53* の機能を効率的に利用した形質転換体作出のアプローチにより、塩ストレスに関しても同様の結果が得られると考えられる。目標達成にはまだ多くの実験を行う必要があるが、本研究に今後も精力的に取り組むことで、これら転写因子の機能を利用した新しい耐塩性植物の分子育種技術の開発が可能であると期待される。

### 1. 研究目的

塩害地における作物生産の向上のためには、生産技術の改善だけではなく、耐塩性を向上させた作物の開発が重要であると考えられる。従来の育種法とは異なり、遺伝子組換え技術を用いた分子育種により、短期間で新しい形質を付与した作物を作出することが可能となる。また、遺伝子組換え技術を用いた耐塩性作物の分子育種のた

めには、作物に効率的に耐塩性を付与できる遺伝子の開発が必要となる。特に、標的の形質以外の形質の変化を避けること、及びフィールドレベルでも利用できる作物への耐性付与、を可能とする技術の確立が、実際の作物の分子育種の際において非常に重要である。我々も含めてこれまでも耐塩性植物の分子育種に関して様々な研究が行われているが、実際に利用できる技術が開発されて

いるとは言い難いのが現状である。一方、移動能を持たない植物は常に様々な環境ストレスに晒されているため、進化の過程において高度で複雑なストレス耐性機構を獲得してきたと考えられる。植物は他の真核生物と比べて数多くの転写因子を持つことから、この複雑なメカニズムは転写因子の機能分化によるものである可能性が示唆されている。

これまで我々は、耐塩性に関わる機能を持つ遺伝子一つずつ植物に導入し、恒常的に発現させることで、耐塩性植物の分子育種技術の開発を目指してきた (Eltayeb *et al.*, 2006, 2007, Uddin *et al.*, 2008)。しかしながら作物への耐塩性の付与を考えると、遺伝子発現制御により複数の遺伝子の機能を調節できる転写因子を利用した方が効率的であるといえる (Fig. 1)。これまで申請者が研究対象としてきたモデル植物であるシロイヌナズナの bZIP 型転写因子 AtbZIP10 (Kaminaka *et al.*, 2006) と AtbZIP53 は、共役して標的遺伝子の転写調節を行うことでプロリンなどの浸透圧調節に関わる適合溶質の量を調節する (Weltmier *et al.*, 2006)。細胞内の浸透圧調節機構は耐塩性に深く関与することから、AtbZIP10 と AtbZIP53 の機能を利用することで、植物の塩ストレスによる障害、特にストレスから回復する際の劇的な浸透圧の変化によるダメージの軽減が可能であると考えられる。ただし、転写因子の多くはその精緻な転写制御機構の維持のために細胞中で速やかに分解されるため、植物において恒常的に高発現させることは一般的に難しい。そこで、これら転写因子の直接の標的遺伝子のプロモーターを用いることで、ストレス条件下でのみこれら転写因子の発現を誘導できるだけでなく、自己活性化のメカニズムを利用することにより、恒常的に発現させた場合に比べて発現量の劇的な増加も見込まれる (Fig. 2)。そのため、このアプローチによる塩ストレス特異的な転写因子の高発現技術の開発は、効率的な耐塩性植物の分子育種において非常に有効であるといえる。

そこで本研究では、細胞内の浸透圧調節に関わる転写因子 AtbZIP10 と AtbZIP53 による転写制御メカニズムを明らかにすると共に、浸透圧や塩ストレスにより発現調節されるこれら bZIP 型転写因子の標的遺伝子であるプロリンデヒドロゲナーゼ (*ProDH*) のプロモーター制御下で特異的に発現させる様々な遺伝子を構築し、これらの遺伝子を導入した遺伝子組換え植物の耐塩性を評価すること

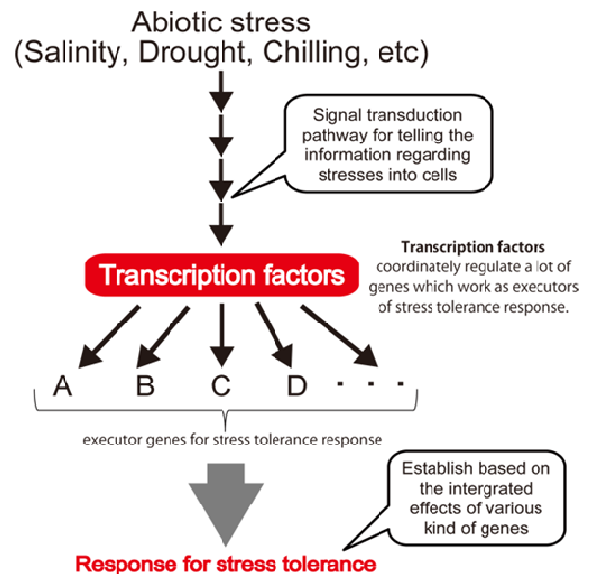


Fig. 1. Function of transcription factors under abiotic stresses in plants

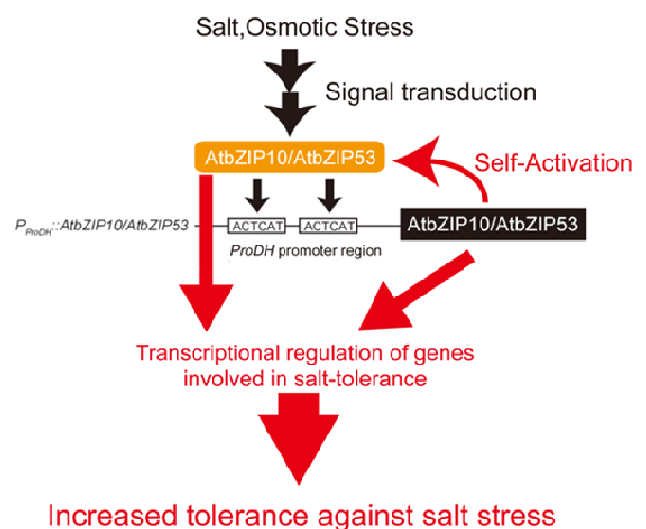


Fig. 2. Strategy of stress-responsive strong overexpression of *AtbZIP10* and *AtbZIP53* by self-activation using *ProDH* promoter

で、実際にフィールドレベルでも利用できる耐塩性作物の分子育種技術の開発を目指した研究を行った。

## 2. 研究方法

### 2.1 植物材料、生育・ストレス処理条件

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型として、Columbia エコタイプ (Col-0) の植物を使用した。シロイヌナズナの *AtbZIP10* 遺伝子の T-DNA 挿入変異体

(*atbzip10-1*)は、Kaminaka ら(2006)で使われたものを使用した。シロイヌナズナは混合培養土(サカタ・スーパーミックス A:パーミキュライト:パーライト = 3 : 2 : 1)上に播種し、12時間明期/暗期、もしくは14時間明期/10時間暗期、22°Cの条件で生育させた。イムノブロット解析には、シロイヌナズナの種子を1/2MS液体培地に播種後、巡回培養により10-14日間生育させた実生を使用した。シロイヌナズナの乾燥ストレス耐性は、発芽後4週間の植物への給水を2週間止めた後、再給水後1週間の植物の状態を評価した。

## 2.2 プラスミドの構築と形質転換シロイヌナズナの作出

シロイヌナズナの *AtbZIP10*、*AtbZIP53*、*AtABI3* の各 cDNA の全長 ORF を PCR により増幅後、BP clonase II (Invitrogen) を用いた Gateway recombination 法にて pDONRzeo (Invitrogen) に導入したエントリークローンを作成した。これらエントリークローンを用い、各 cDNA の全長 ORF を、一過的発現用の GFP 融合遺伝子の作出の場合には p2GWF7 (Karimi *et al.*, 2002) に、CaMV35S プロモーターによる過剰発現体の作出のコンストラクト作出のために pGWB605 (Nakamura *et al.*, 2010) に、酵母のツーハイブリッド解析に用いる場合は pEG202-gw、もしくは pJG4-5-gw (Holt *et al.*, 2005) にそれぞれ LR clonase II (Invitrogen) を用いた Gateway recombination 法にて導入した。シロイヌナズナの *ProDH*、*γVPE* のプロモーター領域は、ゲノム DNA を鋳型にして PCR により増幅後、同様に BP clonase II と LR clonase II を用いた Gateway recombination 法により、エントリークローンを作成し、pUGW35 (Nakagawa *et al.*, 2007) へと導入した。また、*ProDH* のプロモーター領域は pDONR P4-P1R (Invitrogen) へも導入し、*AtbZIP10*、もしくは *AtbZIP53* の全長 ORF を含むエントリークローンと共に、R4pGWB613 (Nakamura *et al.*, 2010) へと LR clonase II を用いた Gateway recombination 法により導入した。アミノ酸リンカーで繋いだ *AtbZIP10* と *AtbZIP53* のキメラタンパク質をコードする遺伝子を作成するために、PCR で増幅した *AtbZIP10*、もしくは *AtbZIP53* の全長 ORF 断片、及びリンカー部分を用い、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (Clontech) によりこれらを連結した断片 (*AtbZIP53*-*AtbZIP10*) を pDONRzeo に導入した。このキメラ遺伝子は、上記と同様の方法で pGWB605、もしくは

R4pGWB613 へと導入した。PCR に使用したプライマーの配列は Table 1 に示す。

pGWB605、もしくは R4pGWB613 を基に作られた遺伝子コンストラクト (Fig. 3A) を含むプラスミドをアグロバクテリウム (*Rhizobium tumefaciens*) GV3101::pMP90 株へと導入後、これらのコンストラクトを Floral-dip 法によりシロイヌナズナの野生型に導入した。形質転換体の選抜は Nakamura ら(2010)の方法に従って行った。

## 2.3 シロイヌナズナの一過的発現系、蛍光/発光レポーターアッセイ

シロイヌナズナの葉肉プロトプラストを用いた一過的遺伝子発現系の実験は Yoo ら(2007)の方法に従って行った。遺伝子導入後のプロトプラストにおける各蛍光タンパク由来の蛍光シグナルの検出は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV-10i-O (Olympus) を用いて行った。遺伝子導入後のプロトプラストにおける発光レポータータンパク質であるホタルルシフェラーゼ (LUC) とウミシイタケルシフェラーゼ (RLUC) それぞれの活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) とルミノメーター (ルミテスター C-110: キッコマン) を用いて測定した。

## 2.3 酵母のツーハイブリット解析、イムノブロット解析

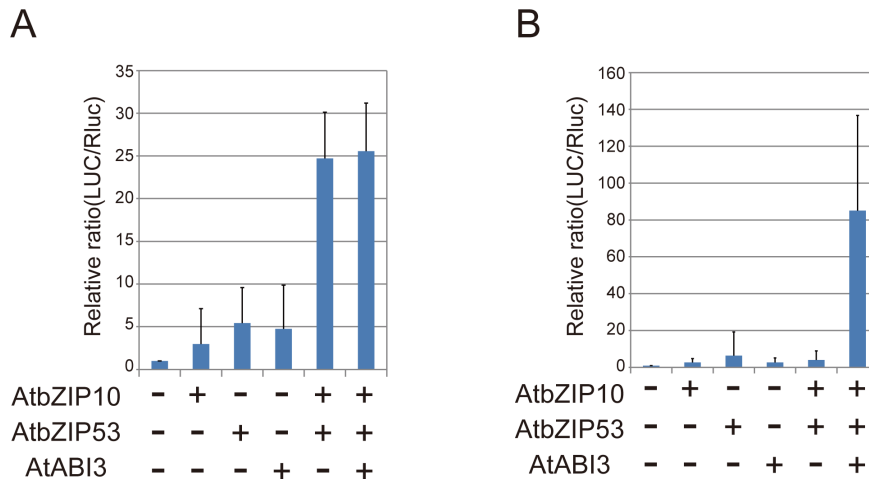
酵母のツーハイブリット解析は、Kaminaka ら(2006)の方法に従って行った。イムノブロット解析による GFP 融合タンパク質の検出は、各植物サンプルから抽出 Buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1X protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)] により抽出後のタンパク質を SDS-PAGE (10%) により分離後、1次抗体として抗-GFP抗体 (Roche Applied Science)、2次抗体として抗-マウス IgG-HRP (Sigma-Aldrich) を反応後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) とイメージアナライザー (LAS-4000 EPUV mini: FUJI film) を用いて行った。

## 2.4 半定量 RT-PCR による発現解析

Total RNA の抽出は Total RNA Extraction Kit Mini (Plant) (RBC) を利用し、逆転写反応は PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TAKARA) を用いて行った。逆転写後の PCR 反応は GoTaq Green Master Mix (Promega) を用いて行った。PCR に使用したプライマーの配列は Table 1 に示す。

**Table 1.** Nucleotide sequences of primers used in this study

Primer name	Sequence (5'>3')	Note
AtbZIP10fullBPGW-F	GGCTTCACCATGAACAGTATCTTCCATTGACGA	For <i>AtbZIP10</i> cDNA cloning into pDONRzeo.
AtbZIP10fullBPGW-R	GAAAGCTGGGTCGTCACGCATTTTTTCGGCCATGCTG	
AtbZIP53BPGW-F	GGCTTCACCATGGGTCGTTGCAAAATGCAAAACAAG	For <i>AtbZIP53</i> cDNA cloning into pDONRzeo.
AtbZIP53BPGW-R	GAAAGCTGGGTCGCAATCAAACATATCAGCAGAAGCTC	
AtABI3BPGW-F	GGCTTCACCATGAAAAGCTTGCATGTGGCGGCCAAC	For <i>AtABI3</i> cDNA cloning into pDONRzeo.
AtABI3BPGW-R	GAAAGCTGGGCTTTAACAGTTTGAGAAGTTGGTG	
AtProDHproBPGW-F	GGCTTCACCATGACTAAAGACTAAACAGTGATAAAG	For <i>ProDH</i> promoter region (1,500bp) cloning into pDONRzeo.
AtProDHproBPGW-R	GAAAGCTGGGTCAAAATTCAAAGATTTTGTTTTTG	
pProDH-BP4GW-F	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTGCACTAAAGACTAAACAGTGATAAAG	For <i>ProDH</i> promoter region (1,500bp) cloning into pDONR P4-P1R.
pProDH-BP1GW-R	GGGGACTGCCTTTTTGTACAAAACCTGGCATAAAATTCAAAGATTTTGTTTTTG	
pAtgammaVPEBPGW-F	GGCTTCACCATGGAATGGTGTGTGTCGTTGAATAAAAG	For $\gamma$ <i>VPE</i> promoter region (1,095bp) cloning into pDONRzeo.
pAtgammaVPEBPGW-R	GAAAGCTGGGTCAGCCGGCAGTGATGATGATAGGAATC	
FelxLink-Inf-F	GATATGTTTGATTGCTTGGGAGGTGGTGGAAAGTGGTGG	For <i>AtbZIP53</i> -(linker)- <i>AtbZIP10</i> cloning into pDONRzeo.
FelxLink-Inf-R	GAAGATACTGTTTCATAGCTGCTGCATCTCCACCTCCACC	
bZIP10-Inf-F	GGAAGTGCAGCAGCTATGAACAGTATCTTCCATTGAC	
bZIP10-Inf-R	CAAGAAAAGCTGGGTCGTCACGCATTTTTTCGGCCATG	
FlexLinker	TTGGGAGGTGGTGGAAAGTGGTGGTGGAGGATCAGTGGAGGTGGAAAGTGCAGCAGCT	
GWUniF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATG	
GWUniR	AGATTGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC	
AtbZIP10RT-F	CACAGGTTAATGATCTAAAAGG	For RT-PCR analysis of <i>AtbZIP10</i> gene.
AtbZIP10RT-R	GTCCACGCATTTTTTCGGCCATG	
ProDHRT-F	CACATAACGCTGATTCGGGGAG	For RT-PCR analysis of <i>ProDH</i> gene.
ProDHRT-R	CTCCTCTTAAGTCCATCCTC	
AtSTZRT-F	ATGGCGTCGAGGCTCTTAC	For RT-PCR analysis of <i>STZ</i> gene.
AtSTZRT-R	TCCTTCGTAGTGGCACCCG	
GPX6RT-F	ACGTTGCTTCTCAATGTGGC	For RT-PCR analysis of <i>GPX</i> gene.
GPX6RT-R	CAACTTCTTCCATCCTTCTC	
HSP17.6RT-F	GAGAACTCAGCGATCGTGAAC	For RT-PCR analysis of <i>HSP17.6</i> gene.
HSP17.6RT-R	AGAGATCTGAATAGACTTAAC	
AtgammaVPERT-F	GTTCATTTTTGGGAAAAGTACC	For RT-PCR analysis of $\gamma$ <i>VPE</i> gene.
AtgammaVPERT-R	CAAATGCGAAGACGGTTTAGG	
AtEF-1RT-F	GATGATTTGCTGTTGAACAAGATG	For RT-PCR analysis of <i>EF1<math>\alpha</math></i> gene.
AtEF-1RT-R	ATACCACCAATCTTGTAGACATCC	



**Fig. 3.** Transcriptional activation of *AtbZIP10/AtbZIP53* target genes mediated by *AtbZIP10*, *AtbZIP53* and/or *AtABI3*. Firefly luciferase (LUC) reporter activity of (A)  $P_{ProDH}::LUC$  or (B)  $P_{\gamma VPE}::LUC$  was measured in transiently transformed *Arabidopsis* mesophyll protoplasts after co-transfection of the effector constructs indicated and  $P_{35S}::Rluc$  (*Renilla* LUC) plasmid used as internal control. GFP-fused *AtbZIP10*, *AtbZIP53* and *AtABI3* are expressed under CaMV35S promoter. LUC activity was normalized using *Rluc* activity and shown as relative ratio (data in no effectors was used as 1). Given are mean values and standard deviation.

### 3. 研究結果

#### 3. 1 *AtbZIP10* と *AtbZIP53* による *ProDH* 遺伝子の転写活性化

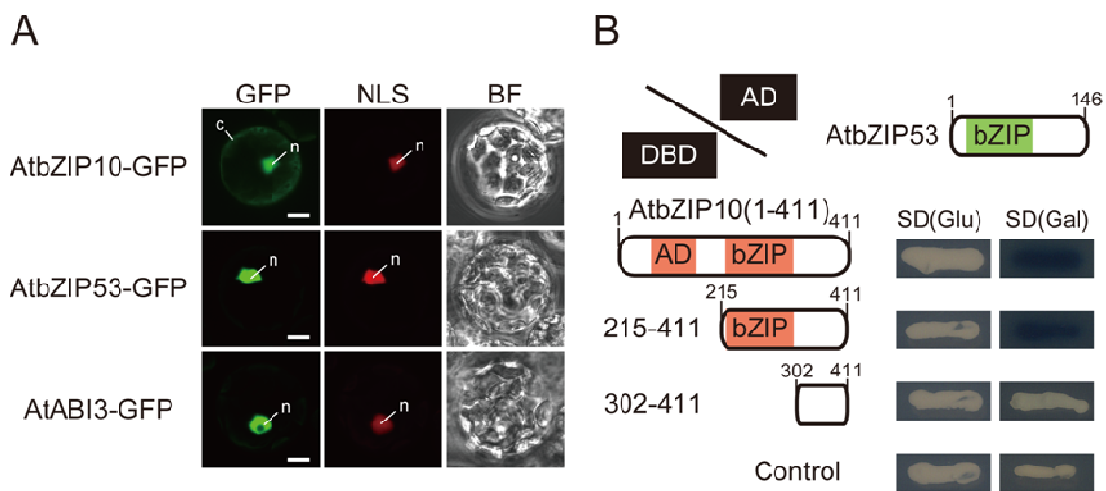
*AtbZIP10* と *AtbZIP53*、及びこれらの標的遺伝子である *ProDH* 遺伝子のプロモーター領域を用いた bZIP 型転写因子の自己活性化を利用した遺伝子コンストラクトを塩耐

性植物の分子育種目的に利用するためには、AtbZIP10とAtbZIP53のみで*ProDH*遺伝子の転写活性化が十分行える必要がある。最近、AtbZIP10とAtbZIP53の標的遺伝子として、グロブリンをコードする2*S2*遺伝子が同定されており、この遺伝子の転写活性化にはこれらbZIP型転写因子だけでなく、B3型DNA結合ドメインを有する転写因子AtABI3が必要であることが示されている(Alonso *et al.*, 2009)。そこで、まずAtbZIP10、AtbZIP53、及びAtABI3による*ProDH*遺伝子の転写活性化を、シロイヌナズナの葉肉プロトプラストを用いた一過的発現系を用いて調べた(Fig. 3A)。その結果、2*S2*遺伝子の場合とは異なり、*ProDH*遺伝子はAtbZIP53とAtbZIP10を同時に発現させた場合に強く転写活性化されることがわかった。また、この強い転写活性化にAtABI3の機能は必要ないことも明らかになった。一方、共発現解析データベースATTED-II (<http://atted.jp/>)を利用して新規に同定したAtbZIP10の標的遺伝子、 $\gamma$ VPE (vacuolar processing enzyme: Kinoshita *et al.*, 1999)についても同様の実験を行った(Fig. 3B)。その結果、*ProDH*遺伝子の場合とは異

なり、 $\gamma$ VPE遺伝子の強い転写活性化にはAtbZIP10、AtbZIP53だけでなく、AtABI3の機能も必要であることを明らかにした。

### 3.2 AtbZIP10とAtbZIP53の細胞内局在とタンパク質間相互作用

本研究でその機能を利用するAtbZIP10とAtbZIP53が細胞内で機能する分子機構を明らかにするために、細胞内局在部位とタンパク質間相互作用について調べた。シロイヌナズナの葉肉プロトプラストを用いた一過的発現系を用いて、AtbZIP10とAtbZIP53の細胞内局在部位を融合したGFPの蛍光を指標に調べたところ、AtbZIP53はAtABI3や核のオルガネラマーカーであるNLS-tdTomatoと同じように核のみに局在しているのに対し、AtbZIP10は核と細胞質の両方に局在していることを明らかにした(Fig. 4A)。また、AtbZIP10とAtbZIP53間の相互作用を酵母のツーハイブリッド解析により調べたところ、AtbZIP10はbZIPドメインを介してAtbZIP53と相互作用していることを明らかにした(Fig. 4B)。



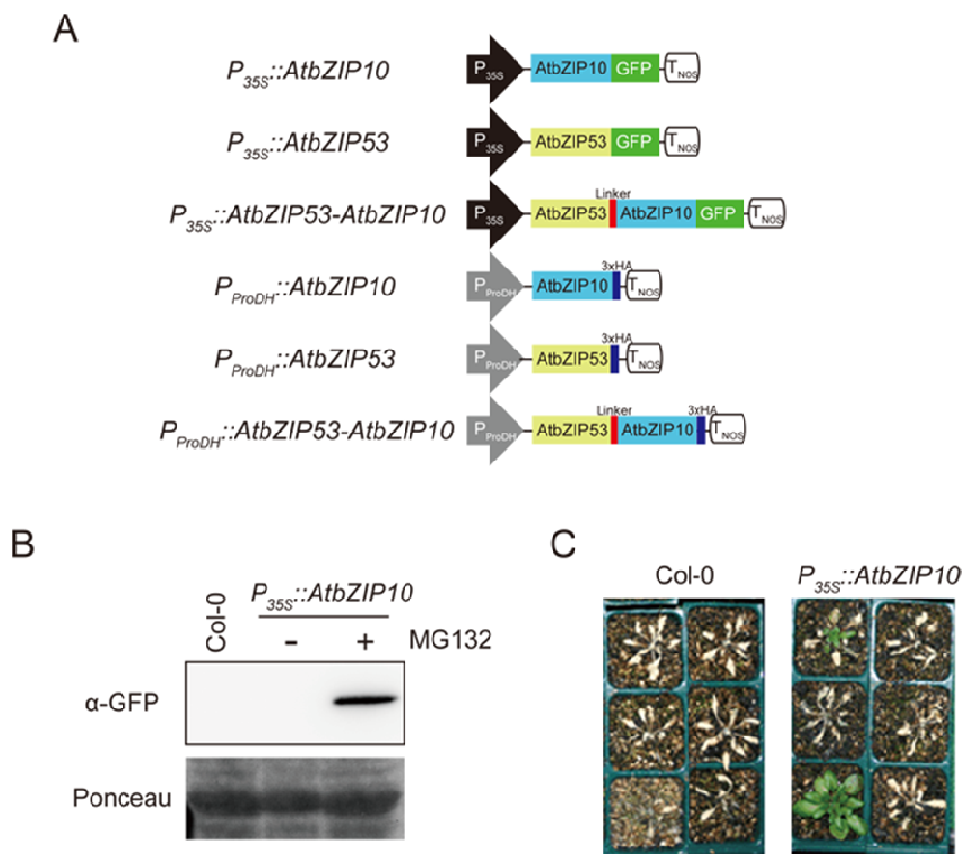
**Fig. 4.** (A) Subcellular localization of AtbZIP10 AtbZIP53 and AtbABI3. GFP fusions of AtbZIP10 AtbZIP53 and AtbABI3 were transiently expressed in Arabidopsis mesophyll protoplasts. NLS-tdTomato was co-introduced as a nucleus marker and a control for transformation. GFP, NLS, and BF (top) represent GFP and tdTomato fluorescence and bright field images, respectively. n: nucleus, c: cytosol. Bars = 10  $\mu$ m. (B) Detection of the interaction between AtbZIP10 and AtbZIP53 by yeast two-hybrid assays. Yeast (EGY48::pJK103 [*3lexAop-lacZ*]) cells were co-transformed with bait plasmid including LexA DNA-binding domain (DBD)-AtbZIP53 fusion in pEG202 and prey plasmid including activation domain (AD)-AtbZIP10 fusions in pJG4-5. To observe the interaction in each transformant, semi-quantitative  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) activity assay was carried out by plating transformants on galactose and raffinose base selection medium (Gal) containing X-gal. Negative control experiments were performed using glucose base selection medium (Glu).



### 3.3 AtbZIP10とAtbZIP53を用いた遺伝子組換え植物 作出用の遺伝子コンストラクトと形質転換体の作出

植物において AtbZIP10、AtbZIP53 をそれぞれカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターを用いて過剰発現させるためのコンストラクト  $P_{35S}::AtbZIP10$  と  $P_{35S}::AtbZIP53$ 、及びこれら転写因子の標的遺伝子である *ProDH* 遺伝子のプロモーター領域を用いて発現を制御する  $P_{ProDH}::AtbZIP10$  と  $P_{ProDH}::AtbZIP53$  を作出した。また、アミノ酸リンカーにより AtbZIP10 と AtbZIP53 を繋いだキメラタンパク質の遺伝子 *AtbZIP53-AtbZIP10* を完成させ、同様のコンストラクト  $P_{35S}::AtbZIP53-AtbZIP10$  と  $P_{ProDH}::AtbZIP53-AtbZIP10$  を作出した。作出したコンストラクトの

詳細は Fig. 5A に示す。アグロバクテリウム法を用いてこれらのコンストラクトをシロイヌナズナに導入した。 $P_{35S}::AtbZIP10$  については形質転換体の後代の植物が得られたが、他のコンストラクトを導入した形質転換体は形質転換実験後の時間が短いため後代がまだ得られておらず、以後の実験には用いることができなかった。 $P_{35S}::AtbZIP10$  植物に関しては、導入遺伝子の発現をイムノブロット解析により調べた (Fig. 5B)。その結果、タンパク質分解に関わる 26S プロテアソームの阻害剤である MG132 を処理した場合のみ、導入遺伝子由来のタンパク質 AtbZIP10-GFP を検出することができた。



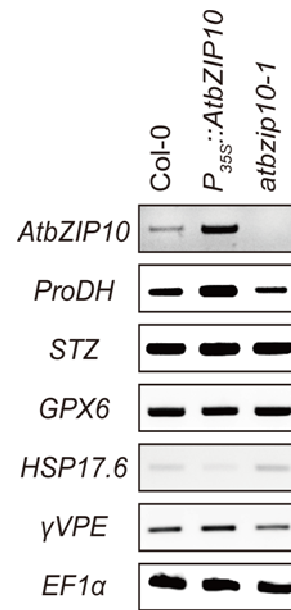
**Fig. 5.** (A) Schematic representation of the constructs used for making transgenic *Arabidopsis*.  $P_{35S}$ : CaMV35S promoter,  $P_{ProDH}$ : Promoter region of *ProDH* gene, AtbZIP10: AtbZIP10 coding region, AtbZIP53: AtbZIP53 coding region, Linker: Amino acid linker for translational fusion, GFP: Green fluorescent protein, 3xHA: 3xHemagglutinin-tag, T<sub>NOS</sub>: Nopaline synthase terminator. (B) Immunoblot analysis of AtbZIP10-GFP. GFP-tagged AtbZIP10 protein in wild-type (Col-0),  $P_{35S}::AtbZIP10$  and 10 μM MG132-treated  $P_{35S}::AtbZIP10$  plants was detected using an α-GFP antiserum. (C) The increased tolerance of  $P_{35S}::AtbZIP10$  against osmotic stress induced by re-watering after drought treatment. Representatives of wild-type (Col-0) and  $P_{35S}::AtbZIP10$  plants after dehydration treatments followed by re-watering. Photographs were taken 7 days after re-watering.

### 3. 4 *AtbZIP10* 過剰発現体のストレス耐性とストレス関連遺伝子の発現解析

導入遺伝子の発現を確認できた  $P_{35S}::AtbZIP10$  植物について、塩ストレスと同じ浸透圧の劇的な変化が起こる乾燥ストレス後の給水による回復時のストレス耐性を野生型植物 (Col-0) と比較した (Fig. 5C)。その結果、野生型植物が全く回復しないようなストレス条件下でも、 $P_{35S}::AtbZIP10$  植物の一部は枯死せず生き残った。しかしながら、乾燥ストレス処理、及び塩ストレス処理をしている間では、両植物間に優位な差は見られなかった (data not shown)。また、 $P_{35S}::AtbZIP10$  植物と *AtbZIP10* 遺伝子の T-DNA 挿入 loss-of-function 変異体である *atbzip10-1* におけるストレス関連遺伝子の発現解析を、半定量逆転写 (RT)-PCR 法を用いて行った (Fig. 6)。その結果、 $P_{35S}::AtbZIP10$  植物において標的遺伝子である *ProDH* 遺伝子の発現量が増加していた。また、塩ストレスのマーカー遺伝子である *STZ* 遺伝子、及び新規に同定した標的遺伝子  $\gamma VPE$  遺伝子の発現量もわずかであるが増加が見られた。塩ストレス時に増加する活性酸素による酸素ストレスのマーカー遺伝子である *GPX6* 遺伝子と *HSP17.6* 遺伝子の発現量は変化しないか、もしくは減少していた。*atbzip10-1* におけるこれら遺伝子の発現量の顕著な変化は観察されなかった。

### 4. 考 察

bZIP 型転写因子である *AtbZIP10* と *AtbZIP53* は共役して浸透圧の制御に関わる遺伝子や種子の登熟期に発現する遺伝子の転写活性化を行っているが、別の転写因子 *AtABI3* がその転写活性化に必須であるという報告もある (Weltmiret *et al.*, 2006, Alonso *et al.*, 2009)。一過的発現系を用いて *ProDH* 遺伝子と  $\gamma VPE$  遺伝子の転写活性化について調べた結果、これらの2つの遺伝子の転写活性化のメカニズムが異なることが明らかになった (Fig. 3)。*ProDH* 遺伝子は、2つの bZIP 型転写因子だけで十分転写活性化されるのに対し、*2S2* 遺伝子と同様に  $\gamma VPE$  遺伝子は *AtABI3* も転写活性化に必要であった。これまでの報告から、*2S2* 遺伝子のプロモーター領域上の G-box がこれら bZIP 型転写因子の結合サイトである (Alonso *et al.*, 2009) のに対し、*ProDH* 遺伝子のプロモーター領域への結合には G-box は関わっていない (Weltmiret *et al.*, 2006)



**Fig. 6.** Semi-quantitative RT-PCR analysis of stress-responsive genes in overexpressor and loss-of-function mutant of *AtbZIP10*. The detached leaves of the wild type (Col-0),  $P_{35S}::AtbZIP10$  and *atbzip10-1* plants were subjected to semi-quantitative RT-PCR analysis. *EF1α* was used as an internal control.

ことから、これらの違いがそれぞれの遺伝子の転写活性化メカニズムの違いを生んでいると考えられる。つまり、プロモーター領域上の結合するシス配列が、転写活性化のメカニズムを決める要素であると示唆される。*AtbZIP10* と *AtbZIP53* は他の bZIP 型転写因子と同様に核に局在し、bZIP ドメインを介して結合している (Fig. 4)。*AtbZIP10* は核だけで細胞質にも局在することから、これらの bZIP 型転写因子による標的遺伝子の転写活性化には、*AtbZIP10* の細胞質から核への移行が関与している可能性も示唆される。

形質転換体の解析が唯一可能であった *AtbZIP10* の過剰発現体である  $P_{35S}::AtbZIP10$  植物における導入遺伝子由来の *AtbZIP10*-GFP タンパク質についてイムノブロット解析を行った結果、26S プロテアソームの阻害剤である MG132 の添加時にのみ目的タンパク質が検出できた (Fig. 5B)。26S プロテアソームはユビキチン化タンパク質の分解に関わっていることから、*AtbZIP10* タンパク質は細胞内でユビキチン化され、積極的に (恒常的に) 分解されていると考えられる。転写因子の多くはその存在量が産生と分

解により精緻に制御されていることから、様々な生体反応に関わる *AtbZIP10* がこの様な制御を受けていることは何ら不思議では無い。ただ、植物内で *AtbZIP10* を始めとする転写因子を強く発現する植物体の作出には、*CaMV35S* プロモーターを用いた過剰発現のアプローチは適していないことが明らかになった。この結果からも、*bZIP* 型転写因子とその標的遺伝子 *ProDH* 遺伝子のプロモーターを用いた自己活性化のシステムの利用は、耐塩性植物の作出技術開発において非常に有効であると考えられる。

*AtbZIP10* 遺伝子と *AtbZIP53* 遺伝子の発現は低浸透圧時に高く、高浸透圧時に低い (Weltmeier *et al.*, 2006)。また、*ProDH* 遺伝子も同様の発現パターンを示し、かつその代謝対象であるプロリンは適合溶質の一つとして細胞内の浸透圧を高める役割をもつ。これらを総合すると、*AtbZIP10*、もしくは *AtbZIP53* の機能強化により期待できるのは、塩や乾燥によるストレスそのものに対してではなく、ストレスから回復する際に必要な細胞内の浸透圧の低下の促進や過剰な適合溶質によるダメージの軽減である。予想通り、*P<sub>35S</sub>::AtbZIP10* 植物は乾燥ストレス処理後の給水による回復時でのみ、野生型と比較して有意なストレス耐性の差が見られた (Fig. 5C)。塩ストレスから回復する際も同様に急激な浸透圧の低下がうまくいかない障害を受けると考えられることから、*AtbZIP10* と *AtbZIP53* の機能を効率的に利用した形質転換体作出のアプローチにより、塩ストレスに関しても同様の結果が得られると考えられる。これらの転写因子の標的遺伝子である *ProDH* 遺伝子と  $\gamma$ VPE 遺伝子だけでなく、*STZ* 遺伝子の発現の誘導も弱いながら観察された結果 (Fig. 6) も、本アプローチが有効であることをサポートしている。

## 5. 今後の課題

本研究結果から、*AtbZIP10* と *AtbZIP53* の機能を利用することで、当初の狙い通り植物における浸透圧変化に起因する傷害の緩和が可能であることが明らかになった。しかしながら、形質転換体の作成には時間がかかるため、1年間では本研究の最終目的である「浸透圧調節に関わる転写因子の効率的利用による耐塩性植物の分子育種技術の開発」をクリアに証明できる成果を出すまでには至らなかった。今後は現在作出中の残りの形質転換体の後代の植物における導入遺伝子の発現の確認と、浸透圧・

塩ストレス耐性の評価が必要となる。特に塩耐性が向上した植物を作出することが最終目標であるので、まだ条件が確立できていない塩ストレス処理実験の条件検討、特に塩ストレス後の給水による回復時のストレス耐性が評価しやすい条件の決定が必須となる。また、*ProDH* 遺伝子のプロモーター領域を利用した *bZIP* 型転写因子の自己活性化システムや、*AtbZIP53-AtbZIP10* キメラタンパク質の機能についても一過的発現系を用いて証明する必要がある。さらに、発現解析の実験も定常状態での結果であるため、塩ストレス処理時、及び給水後の回復時における塩ストレス等のマーカー遺伝子の発現解析を行う必要がある。この様に目標達成にはまだ多くの実験を行う必要があるが、本研究を更に進めていくことで、新しい耐塩性植物の分子育種技術の開発が可能であると期待される。

## 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。また本研究を行うにあたり、Gateway recombination 法に用いることができるクローニング用ベクターを提供いただきました島根大学の中川強先生と基礎生物学研究所の真野昌二先生、並びにシロイヌナズナの種子と遺伝子クローンを提供いただきました Arabidopsis Biological Resource Center と理化学研究所バイオリソースセンター実験植物開発室に御礼申し上げます。

## 参考文献

- Alonso, R., Onate-Sanchez, L., Weltmeier, F., Ehlert, A., Diaz, I., Dietrich, K., Vicente-Carbajosa, J., and Droge-Laser, W. (2009) A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor *bZIP53* in the regulation of Arabidopsis seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation. *Plant Cell*, 21, 1747–1761.
- Eltayeb, A.E., Kawano, N., Badawi, G.H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Morishima, I., Shibahara, T., Inanaga, S. and Tanaka, K. (2006) Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Physiol. Plant.*, 127, 57-65.



- Eltayeb, A.E., Kawano, N., Badawi, G.H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Shibahara, T., Inanaga, S. and Tanaka, K. (2007) Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta*, 225, 1255-1264.
- Holt III, B.F., Belkadir, Y. and Dangl, J.L. (2005) Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science*, 309, 929-932.
- Kaminaka, H., Näke, C., Epple, P., Dittegen, J., Schütze, K., Chaban, C., Holt III, B.F., Merkle, T., Schäfer, E., Harter, K. and Dangl, J.L. (2006) bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in Arabidopsis following infection. *EMBO J.*, 25, 4400-4411.
- Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A. (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.*, 7, 193-195.
- Kinoshita, T., Yamada, K., Hiraiwa, N., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (1999) Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J.*, 19, 43-53.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. and Kimura, T. (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.*, 104, 34-41.
- Nakamura, S., Mano, S., Tanaka, Y., Ohnishi, M., Nakamori, C., Araki, M., Niwa, T., Nishimura, M., Kaminaka, H., Nakagawa, T., Sato, Y. and Ishiguro, S. (2010) Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, *bar*, as a selection marker for plant transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1315-1319.
- Uddin, M.I., Qi, Y., Yamada, S., Shibuya, I., Deng, X.P., Kwak, S.S., Kaminaka, H. and Tanaka, K. (2008) Overexpression of a new rice vacuolar antiporter regulating protein OsARP improves salt tolerance in tobacco. *Plant Cell Physiol.*, 49, 880-890.
- Weltmeier, F., Ehlert, A., Mayer, C.S., Dietrich, K., Wang, X., Schütze, K., R. Alonso, Harter K., Vicente-Carbajosa, J., Droge-Laser, W. (2006) Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *EMBO J.*, 25, 3133-3143.
- Yoo, S., Cho, Y. and Sheen, J. (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.*, 2, 1565-1572.

## Establishment of Molecular Breeding Technique for Conferring Salt-Stress Resistance to Plants by Efficient Utilization of Transcription Factors Involved in Osmoregulation

Hironori Kaminaka, Youhei Koizumi, Saori Onda, Mai Suetsugu, Ayumi Nakamura

School of Agricultural, Biological and Environmental Sciences Faculty of Agriculture  
Tottori University

### Summary

Development of salt-tolerant plants as well as improvement of production technology is required for the increased production of crops on salt-rich field. The genetic engineering method for plants can accelerate the development of plants with new characters. Since utilization of transcription factors, which can regulate the function of a lot of genes, is more efficient for this purpose, we focused on the bZIP transcription factors, AtbZIP10 and AtbZIP53, involved in osmoregulation, which is related to salt stress. The utilization of self-activation system by using function of AtbZIP10 and AtbZIP53, and their target gene, *ProDH*, seems to be expected to dramatically increase the expression level of these transcription factors. In this study, we tried to establish the molecular breeding technique for conferring salt-stress tolerance to plants by the efficient utilization of these transcription factors. The experiment of transcriptional activation using transient expression system in *Arabidopsis* protoplasts demonstrated that both AtbZIP10 and AtbZIP53 are enough to fully activate the transcription of *ProDH* gene. Both AtbZIP10 and AtbZIP53 are localized in nucleus, and interact each other through their bZIP domains. Since AtbZIP10 protein is constitutively degraded in the transgenic plants overexpressing *AtbZIP10* driven by CaMV35S promoter ( $P_{35S}::AtbZIP10$ ), utilization of self-activation system with these transcription factors and the promoter region of *ProDH* gene, would be better approach for overexpression of transcription factors than using CaMV35S promoter.  $P_{35S}::AtbZIP10$  plants demonstrated the enhanced tolerance against osmotic stress in recovery period by re-watering after salt stress treatment. Because the reduction of damages from dramatic changes of osmotic pressure in recovery period after salt or drought stress is expected by strengthening of AtbZIP10 and/or AtbZIP53 function, the approach of making transgenic plants by efficient utilization of both AtbZIP10 and AtbZIP53 could give plants similar effects against the salt stress, too. Therefore we suggest that the establishment of molecular breeding technique for making salt stress tolerant plants would be possible by utilization of function of these transcription factors.