

RNA シャペロンを介した植物の耐塩性獲得機構の解明

今井 亮三

農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター寒地作物研究領域

概要 大腸菌は低温にさらされると細胞内に低温ショックタンパク質 (CSP) を蓄積することで、低温下において形成される不都合な RNA2次構造を取り除き、正常な翻訳や転写を促進することが明らかにされている。シロイヌナズナの低温ショックタンパク質 AtCSP3 は大腸菌の CSP と同様に RNA シャペロンとして働き、低温耐性の獲得に必須である。本研究では、過剰発現体及びノックアウト変異体を用いて、塩ストレス耐性における AtCSP3 の機能を解明することを目的とした。まず、AtCSP3 の塩及び乾燥ストレスに対する発現応答を解析した。AtCSP3 の発現は 200 mM の塩ストレスによって徐々に誘導され、12 時間後にピークを迎えた。また、乾燥ストレスによっても 8 時間後をピークとした発現誘導が観察された。また、ABA によっても発現が誘導された。

次に、AtCSP3 の過剰発現株 (35S:AtCSP3) を用いて、耐塩性を検討したところ、200 mM NaCl 培地上での生存率において、供試 3 系統とも野生株に比べて極めて高い生存率を示した。また、塩ストレスによる根の伸長阻害に対する、AtCSP3 高発現の効果調べたところ、3 系統で有意に伸長阻害が緩和されていた。これらの結果から AtCSP3 の過剰発現は耐塩性を付与することが示された。

また、過剰発現体の乾燥耐性について検討した。10 日間の給水停止、再給水後の生存率を調べたところ、AtCSP3 の発現が高かった系統で統計的に有意な耐性が獲得された。また、AtCSP3 のノックアウト変異株を用いて塩ストレス耐性を調べたところ、200 mM NaCl 培地における生存率は *atcsp3-2* において有意に低下していた。また、5 日間の給水停止後の生存率は、*atcsp3-2* 変異体において有意に減少していた。

atcsp3-2 変異体で発現が抑制されている遺伝子の塩ストレス及び乾燥ストレス下における発現誘導を検証した。GSTF7 を除いて、塩ストレスと乾燥ストレスの両者において誘導されることが確認された。次に、AtCSP3 過剰発現体において高まっているのかについて検討した。GSTF7 を除いて AtCSP3 過剰発現系統において発現が上昇していることが観察された。ただし、過剰発現系統間で発現量にばらつきがあり、AtCSP3 発現量との間に相関性は見られなかった。

1. 目的

RNA シャペロンは、RNA 上に形成される2次構造を認識し、2本鎖構造を直鎖状に巻き戻す活性を有するタンパク質であり、RNA の機能発現を調節している。最初の RNA シャペロンは、大腸菌において低温ショックタンパク質 (CSP) として同定された (Graumann and Marahiel, 1998)。大腸菌は低温にさらされると細胞内に CSP を顕著に蓄積する。CSP は、低温下において形成される不都合な RNA2次構造を取り除き、正常な翻訳や転写を促進することが明らかにされている (Xia *et al.*, 2001)。CSP は原

核生物に普遍的に存在することが知られていたが、我々は、高等植物においても大腸菌 CSP と相同な機能を有するタンパク質が存在することを明らかにした (Nakaminami *et al.*, 2006)。また、シロイヌナズナの低温ショックタンパク質 AtCSP3 が、大腸菌の CSP 同様に、低温耐性の獲得に必須であることも明らかにした (Kim *et al.*, 2009)。これまで、CSP の機能は専ら低温耐性との関係で論じられてきたが、我々は、AtCSP3 を過剰発現するシロイヌナズナにおいて、耐塩性が向上している可能性を見出した。これは、RNA シャペロン機能が高塩濃度環境においても重要であるこ

とを示唆する結果であり、RNA シャペロンの細胞内生理機能の解明においても重要な発見である。そこで本研究では、RNA シャペロンの塩ストレス環境下における機能解明と耐塩性作物作出への展開を目指して、シロイヌナズナ *AtCSP3* 過剰発現体及び、変異体を用いた生理学的、分子生物学的解析を行った。

2. 方法

2.1 植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 生態型 Columbia (Col-0) を使用した。AtCSP3 機能喪失変異体 *atcsp3-2* (WiscDsLox35G12) は ABRC リソースセンターより取り寄せた。

2.2 ウェスタン解析

発芽 10 日目の実生をタンパク質抽出バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA) を用いて破碎し、可溶性タンパク質を抽出した。タンパク質濃度は Protein assay kit (Bio-Rad) を用いて定量した。30 µg の全タンパク質を SDS-PAGE で分離後、Hybond-C (GE Healthcare) に転写した。転写膜は低温ショックドメインに対して作出したウサギポリクローナル抗体を1次抗体、ペルオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG 抗体を2次抗体として反応させ、ECL kit (GE Healthcare) を用いて化学発光として検出を行った。

2.3 RT-PCR

2 µg の全 RNA を鋳型として High Capacity RNA-to-cDNA Kit を用いて cDNA を合成した。遺伝子特異的なプライマー配列 (Table 1) を用いて PCR 反応を行った。

2.4 耐塩性及び乾燥耐性の評価

発芽 7 日後の実生を 125 mM 及び 200 mM NaCl を含有する MS 寒天培地上に移植し、7 日後の生存率を評価した。塩ストレスの根の伸長に及ぼす影響の評価は、発芽 7 日目の実生を 125 mM NaCl 含有培地に移し、培地を垂直に立てて 7 日後の根の伸長を観察した。乾燥耐性は、発芽 2 週間後の植物をポットに移植し、その 1 週間後から水分供給をストップさせて乾燥処理を与えた後、再給水後の生存個体数で評価した。

3. 結果

2.1 AtCSP3 の発現解析

これまでの研究で、*atcsp3-2* 変異体で発現量が低下している遺伝子をマイクロアレイ解析により同定した。その結果、塩や乾燥など低温以外のストレスの耐性にも関与すると考えられる遺伝子が多量に含まれていた。そこでこれらの遺伝子の発現パターンをシロイヌナズナ eFP browser 発現データベース (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) を用いて解析したところ、実際に、低温に加え、乾燥、塩ストレスに応答して発現誘導される遺伝子であることが分かった (Table 1)。この結果は、AtCSP3 は低温耐性のみならず、塩や乾燥ストレスに対しても耐性を付与する遺伝子である可能性を示唆した。そこで、まず *AtCSP3* の塩及び乾燥ストレスに対する発現応答を解析した (Fig. 1)。AtCSP3 の発現は 200 mM の塩ストレスによって徐々に誘導され、12 時間後にピークを迎えその後漸減した。また、乾燥ストレスによっても 8 時間後をピークとした発現誘導が観察された。また、ABA によっても発現が誘導された (Fig. 1)。従って ABA を介することによって、これらのストレスに共通の発現誘導を示す可能性が考えられ

Table 1. PCR Primers used for RT-PCR analysis

Gene name	Forward primer	Reverse primer
DIN2 (At3g60140)	5'-TCATTCCGATTCAACTGACGAT-3'	5'-CGAAATGTGTCTTATGGTATTC-3'
GSTF7 (At1g02920)	5'-CCACCTTGCTTTAAGAACAAAGTC-3'	5'-CTTTATTCAATCTTCTGATTAAC-3'
EXL7 (At1g35140)	5'-ATGGCTTCTTTTGTGATGGG-3'	5'-TCAAAACAGAGTCGAGCAAG-3'
ASN1 (At3g47340)	5'-ATGTGTGGAATACTTGCCGTG-3'	5'-GTTAGGTGCCTTGTGGAAAT-3'
Flot2 (At5g25250)	5'-GTCCAAATTAATCAAAAG-3'	5'-CTTGCTTCGGTCCGCACCACG-3'
TCH4 (At5g57560)	5'-CAATACAAGAATAGCGACAATGTC-3'	5'-AACAAAAAAGCACATTGTAAC-3'
LRR (At2g34930)	5'-ATGGACCTCAAGCTAAGGCCTAG-3'	5'-CTGCAGATTCCTCAACGATCC-3'
ACSII (At4g08040)	5'-ATGTTGTCAAGCAAAGTTGTTG-3'	5'-TCAACGTTCTGATTCACAAGTAAC-3'
At1g19020	5'-ATCACAATAAACTTCAAAGTAC-3'	5'-AGATGTAATAATTTAAAAATTAAG-3'
DIC2 (At4g24570)	5'-ATGGGAGTCAAAAGTTTCGTTG-3'	5'-TCAAAAATCTCGAAGCAGCTTC-3'

た。

2. 2 *AtCSP3* の過剰発現の塩及び乾燥ストレス耐性

低温(凍結)耐性の場合と同様に *AtCSP3* の発現誘導によりストレス耐性が獲得されている可能性が考えられる。そこで、*AtCSP3* の過剰発現株 (*35S:AtCSP3*) を用いて、塩ストレス、乾燥ストレス耐性を評価した。今回新たに作出した2系統を加え3系統の過剰発現体を供試した。S3-3、S3-29系統では *AtCSP3* の発現量が高く、S3-31系統では *AtCSP3* の発現は低かった (Fig. 2A)。また、これらの系統における *AtCSP3* タンパク質の蓄積も遺伝子発現量とパラレルであった (Fig. 2B)。これらの系統について耐塩性を検討したところ、200mM NaCl 培地上での生存率において、3系統とも野生株に比べて極めて高い生存率を示した (Fig. 2C, D)。また、塩ストレスによる根の伸長阻害に対す

る、*AtCSP3* 高発現の効果調べたところ3系統で有意に伸長阻害が緩和されていた (Fig. 2E, F)。これらの結果から *AtCSP3* の発現は耐塩性を付与することが明らかとなった。

次に、過剰発現体の乾燥耐性について検討した。10日間の給水停止、再給水後の生存率を調べたところ、*AtCSP3* の発現が高かった S3-3、S3-29 の系統で統計的に有意な耐性が獲得されていた (Fig. 3)。S3-31系統では生存率は向上するものの統計的に有意とは判断されなかった (Fig. 3)。

2. 3 *atcsp3-2* のノックアウト変異体の塩及び乾燥ストレス耐性

AtCSP3 のノックアウト変異株 *atcsp3-2* (Kim *et al.* 2009) を用いて塩ストレス耐性を調べた。200 mM NaCl 培地に

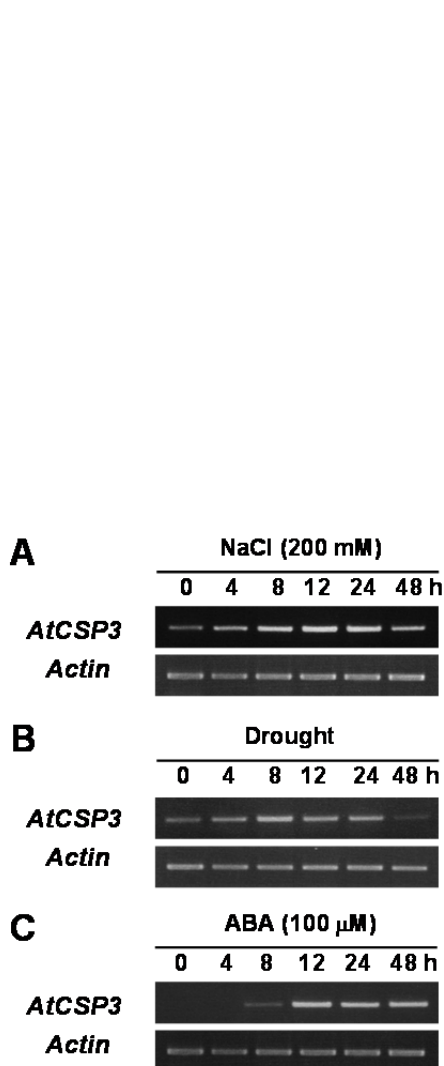


Fig. 1

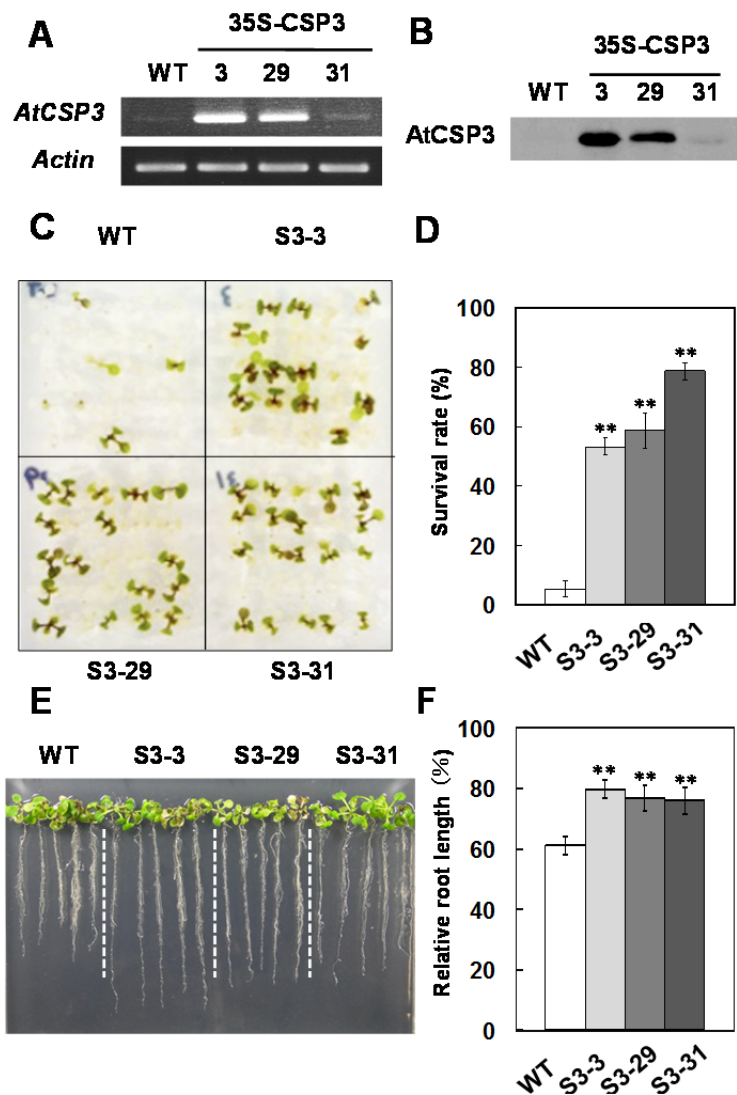


Fig. 2

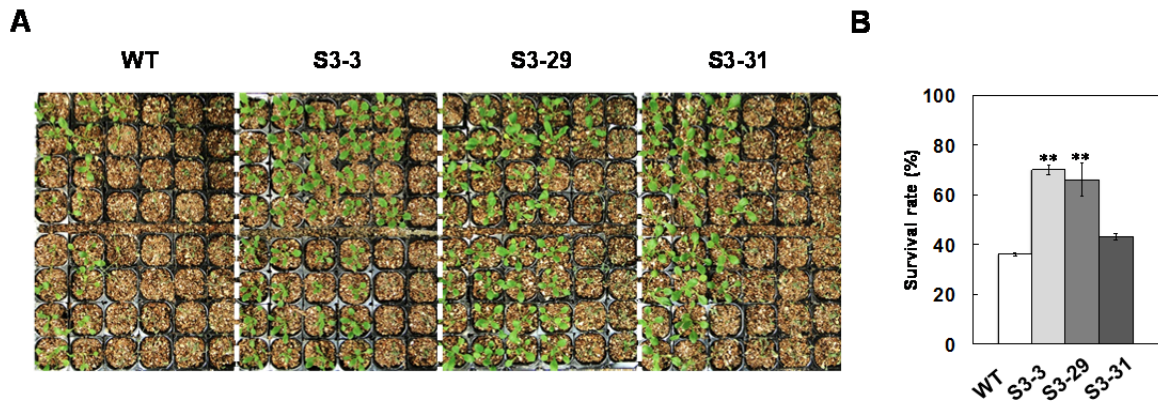


Fig. 3

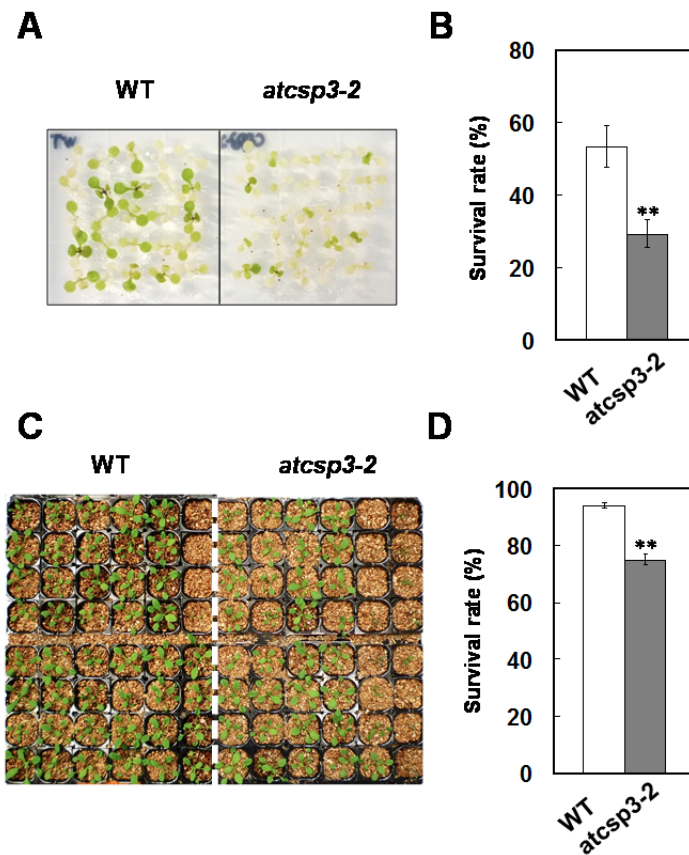


Fig. 4

おける生存率は *atcsp3-2* において有意に低下していることが明らかとなった (Fig. 4A, B)。また 5 日間の給水停止後の生存率について調べたところ、*atcsp3-2* 変異体において有意に減少していた (Fig. 4C, D)。

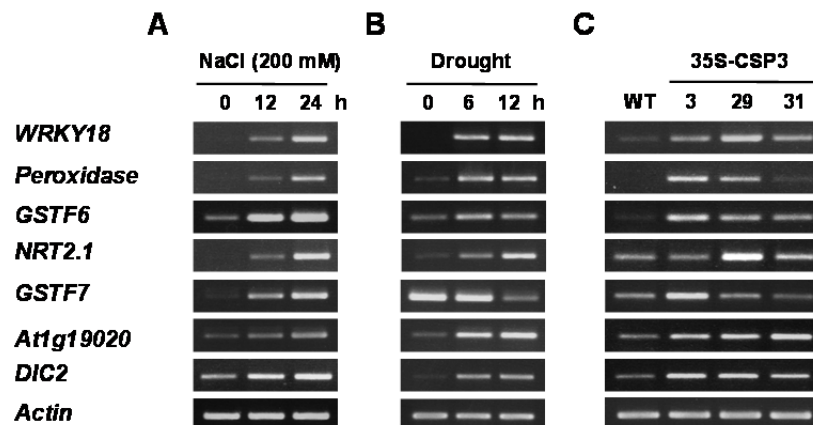
2. 4 AtCSP3 の過剰発現にはストレス耐性遺伝子の発現量を上昇させる

我々の結果は、AtCSP3 がシロイヌナズナの環境ストレス耐性に深く関与することを示唆している。Table 2 に示し

た *atcsp3-2* 変異体で発現が抑制されている遺伝子は、AtCSP3 が直接あるいは間接的に遺伝子発現を正に調節していると考えられる。そこで、これらのターゲット候補遺伝子の塩ストレス及び乾燥ストレス下における発現誘導を実際に RT-PCR 法により検証した。*GSTF7* を除いて、塩ストレスと乾燥ストレスの両者において誘導されることが確認された (Fig. 5A, B)、次にこれらの遺伝子の発現が *AtCSP3* 過剰発現体において高まっているのかについて

Table 2. Genes that are down-regulated in *atcsp3-2* mutant and their responses to abiotic stresses

AGI code	Gene description	Average folds			
		CSP3/csp3	Salt	Drought	Cold
At2g17870	cold-shock DNA-binding family protein (CSP3)	12.2	1.5	1.5	2.1
At5g39580	peroxidase 62	5.47	16.91	2.83	8.81
At3g60140	beta-glucosidase 30 (BGLU30)/dark inducible 2 (DIN2)/senescence-related gene 2 (SRG2)	5.32	9.64	4.27	2.64
At1g08090	nitrate transporter 2:1 (ATNRT2:1/ACH1)	5.1	2.33	2.47	3.85
At1g02920	glutathione S-transferase 11 (GST11/GSTF7)	5.02	4.94	10.15	8.83
At1g30730	FAD-binding and BBE domain-containing protein	4.63	2.28	3.1	9.14
At5g57220	cytochrome P450 (CYP81F2)	4.55	6.37	14.48	22.47
At1g02930	glutathione S-transferase (GST1/GSTF3/GSTF6)/early responsive to dehydration 11 (ERD11)	4.42	4.94	10.15	8.83
At5g40590	cysteine/histidine-rich C1 domain family protein	3.7	4.23	3.37	3.45
At1g35140	phosphate-responsive 1-like protein (PHI-1)/exordium like 7 (EXL7)	3.66	9.24	3.86	7.64
At3g47340	glutamine-dependent asparagine synthetase 1 (ASN1)	3.62	17.85	9.38	23.27
At4g21680	nitrate transporter 1.8 (NRT1.8)	3.58	9.65	2.54	2.48
At5g64120	peroxidase 71 (Atperox P71)	3.42	3.16	5.9	1.96
At1g30720	FAD-binding and BBE domain-containing protein	3.19	2.62	3.1	9.14
At5g25250	flotillin-like protein 2	3.15	22.67	32.45	39.22
At5g57560	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22 (XTH22/TCH4)	3.04	22.44	4.38	18.38
At2g18690	unknown protein	2.81	5.04	3.1	8.57
At3g45970	expansin-like A1 (EXLA1/EXPL1)	2.72	10.52	2.45	89.67
At2g34930	disease resistance-like protein/LRR domain-containing protein	2.66	22.7	23.45	32.55
At4g31800	WRKY transcriptional factor 18 (WRKY18)	2.64	15.1	10.62	46.44
At4g08040	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 11 (ACS11)	2.6	50.87	15.52	36.37
At1g19020	unknown protein	2.57	6.54	10.3	18.99
At1g24140	matrix metalloprotease domain-containing protein	2.5	13.3	5.23	5.76
At5g43520	cysteine/histidine-rich C1 domain family protein	2.46	2.15	3.54	5.44
At4g25810	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 23 (XTH23)/xyloglucan endotransglycosylase 6 (XTR6)	2.46	19.91	2.35	3.91
At4g24570	dicarboxylate carrier 2 (DIC2)	2.42	51.96	10.39	73.1
At1g72900	toll-interleukin-resistance (TIR) domain-containing protein	2.34	5.11	2.94	6.59
At5g18470	curculin-like (mannose-binding) lectin family protein	2.32	5.54	7.61	2.85
At1g30700	FAD-binding and BBE domain-containing protein	2.31	9.71	5.84	3.07

**Fig. 5**

検討した。Fig. 5C に示すように、GSTF7 を除いて *AtCSP3* 過剰発現系統において発現が上昇していることが観察された。ただし、過剰発現系統間で発現量にばらつきがあり、*AtCSP3* 発現量との間に相関性は見られなかった。

4. 考察

植物の低温ショックドメインタンパク質は RNA シャペロン活性を持ち、RNA の2次構造を解きほぐす活性により、翻訳や転写制御に関与すると考えられている。本研究では *AtCSP3* が低温のみならず、塩ストレスや乾燥ストレスによっても誘導されることを明らかにした。これは、コムギの低温ショックタンパク質 WCSP1 が低温特異的に誘導されるという結果 (Karlson *et al.*, 2002) と対照的であるが、本タンパク質の機能が低温適応に限定されないことを強く示唆している。これまで、低温適応に関して植物の CSD タンパク質と細菌の CSD タンパク質 (CSP) との機能保存性について論じてこられた (Nakaminami *et al.*, 2006) 細菌の CSP で塩ストレス適応に関与するものは報告がないが、細菌 CSP には栄養ストレス等低温ストレス以外のストレスによって誘導されるものもあるため、その機能は低温に限定されないとは言えるであろう。興味深い報告として、Castigilioni らは枯草菌の CspB を植物中で過剰発現させると、植物の乾燥耐性が向上することを報告している (Castigilioni *et al.*)。当初この結果に関しては、細菌が持つ RNA シャペロン活性を植物に導入することで、ストレス環境下における RNA 代謝が正常に保たれ、そのため耐性が獲得されたためであろうと考えられていた。しかし、実際には植物中にも RNA シャペロン活性を持つ *AtCSP3* のような CSD タンパク質が存在しているため、この結果については CspB が植物中で植物 CSD タンパク質の機能を補う形で働いたと考えることもできるであろう。今回 *AtCSP3* 機能が耐塩性や乾燥耐性に関与することが明らかになったことから、この機能を補完あるいは強化している可能性が考えられる。

AtCSP3 がどのようにして遺伝子発現を制御するのかに関しては今後の課題であるが、いくつかの仮説を提唱することは可能である。1つめは mRNA 分解機構と相互作用することにより mRNA の安定性レベルの調節に関与しているとする仮説。2つめは、スプライシング、ポリ A 付加など核内 mRNA プロセッシング機構に関与し、成熟 mRNA 量

の調節に働くという仮説、また、細胞質において転写因子等の翻訳制御に働く可能性も考えられる。

AtCSP3 の下流において発現変動する遺伝子がいくつか明らかにされた。*AtCSP3* の過剰発現で誘導される WRKY18 及び *At1g19020* は *Zat10* の過剰発現体でも誘導されている (Rossel *et al.*, 2007)。*AtCSP3* の作用点は *Zat10* を介した経路かも知れない。興味ある点として、WRKY18 (Xu *et al.*, 2006)、GSTF6 (Wagner *et al.*, 2002)、GSTF7 (Sappl *et al.*, 2009; Sappl *et al.*, 2004) 及び NRT2.1 (Camanes *et al.*, 2012) は病害応答遺伝子として報告されておりその発現にはサリチル酸が関与していると考えられている。*AtCSP3* と病害抵抗性に関しては今回は解析しなかったが、今後の検討点として興味深い。

5. 今後の課題

今回の研究で、低温ショックドメインタンパク質 *AtCSP3* がこれまでに明らかにされていた耐凍性の向上に関する機能に加えて、塩ストレスや乾燥ストレスに対する耐性も付与する機能を持つことが明らかとなった。また、ストレス耐性と相関する遺伝子の発現変動も明らかになり、遺伝子の発現調節を介した効果であることが示唆された。今後の展開としては2つの方向性が考えられる。1つは、*AtCSP3* のタンパク質機能と遺伝子発現変動を結びつける分子基盤の解明である。*AtCSP3* の機能は RNA シャペロンであり、mRNA のプロセッシングや分解において働く可能性がある。もう1つは、作物へのストレス耐性付与にむけての本遺伝子利用技術の開発である。*AtCSP3* と同じ低温ショックドメインタンパク質はイネには2種類、コムギには3種類、ダイズには4種類見いだされている。それらの中から実際にストレス耐性を付与する遺伝子を特定し、その過剰発現を行うことにより、マルチストレス耐性作物の作出が可能になるのではないかと思われる。

文献等

Castigilioni P, Warner D, Bensen RJ, Anstrom DC, Harrison J, Stoecker M, Abad M, Kumar G, Salvador S, D'Ordine R, Navarro S, Back S, Fernandes M, Targolli J, Dasgupta S, Bonin C, Luethy MH, Heard JE (2008) Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited

- conditions. *Plant Physiol* 147: 446-455
- Camanes G, Pastor V, Cerezo M, Garcia-Andrade J, Vicedo B, Garcia-Agustin P, Flors V (2012) A deletion in NRT2.1 attenuates *Pseudomonas syringae*-induced hormonal perturbation, resulting in primed plant defenses. *Plant Physiol* 158: 1054-1066
- Graumann PL, Marahiel MA (1998) A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem Sci* 23: 286-290
- Karlson D, Nakaminami K, Toyomasu T, Imai R (2002) A cold-regulated nucleic acid-binding protein of winter wheat shares a domain with bacterial cold shock proteins. *J Biol Chem* 277: 35248-35256
- Kim MH, Sasaki K, Imai R (2009) Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 284: 23454-23460
- Nakaminami K, Karlson DT, Imai R (2006) Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 10122-10127
- Rossel JB, Wilson PB, Hussain D, Woo NS, Gordon MJ, Mewett OP, Howell KA, Whelan J, Kazan K, Pogson BJ (2007) Systemic and intracellular responses to photooxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 4091-4110
- Sappl PG, Onate-Sanchez L, Singh KB, Millar AH (2004) Proteomic analysis of glutathione S-transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid-induced expression of the plant-specific phi and tau classes. *Plant Mol Biol* 54: 205-219
- Sappl PG, Carroll AJ, Clifton R, Lister R, Whelan J, Harvey Millar A, Singh KB (2009) The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *Plant J* 58: 53-68
- Wagner U, Edwards R, Dixon DP, Mauch F (2002) Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol Biol* 49: 515-532
- Xia B, Ke H, Inouye M (2001) Acquisition of cold sensitivity by quadruple deletion of the *cspA* family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 40: 179-188
- Xu X, Chen C, Fan B, Chen Z (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell* 18: 1310-1326

RNA Chaperone-Mediated Salt Stress Tolerance in Plants

Ryozo Imai

Crop Breeding Research Division, NARO Hokkaido Agricultural Research Center

Summary

Plants and microbes have common adaptation mechanisms to abiotic stresses such as cold, salt, and drought. In response to cold, *E. coli* produces cold shock proteins (CSPs) that have essential roles in cold adaptation by function as RNA chaperones. Arabidopsis COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 (AtCSP3) shares a domain with bacterial CSPs and is involved in acquisition of freezing tolerance. Here, we characterize *AtCSP3* function in salt and drought stress tolerance. Expression analysis revealed that AtCSP3 is induced by salt, and drought stresses and ABA treatments. Transgenic plants overexpressing AtCSP3 showed improved tolerance against salt and drought stresses. A knockout mutant of AtCSP3, *atcsp3-2*, was sensitive to salt and drought stresses. Down regulated-genes in the *atcsp3-2* mutant identified by a microarray analysis showed elevated expression in *AtCSP3*-overexpressing lines. These AtCSP3-regulated genes were inducible upon salt and drought stresses, suggesting their functions in the stress tolerance. Together, our data revealed that AtCSP3 is an important determinant for adaptation to salt and drought stress tolerance as well as cold stress. We propose that AtCSP3 functions as a RNA chaperone to regulate RNA processing and alter gene expression of stress-related proteins.