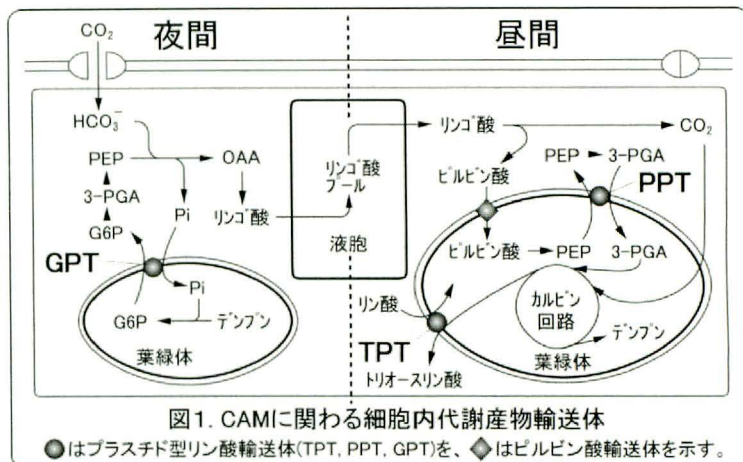


通性 CAM 植物アイスプラントの水ストレス応答に必要な転写調節領域の決定

プロジェクト代表者：是枝 晋 (科学分析支援センター・講師)

1 研究の背景

乾燥地域の植物の多くは、多肉植物型酸代謝 (CAM) を発達させ、光合成の水利用効率を上げることで、乾燥耐性を獲得している。CAM 植物葉緑体は C3 植物葉緑体よりも大量のデンプンを蓄えられ、デンプン代謝能も高く、さらに、光エネルギーでピルビン酸を能動的に取り込みリン酸化できるという、C3 植物葉緑体にはない機能を持つ。CAM 経路のうち、昼間のトリオースリン酸の輸送には、C3 植物葉緑体の場合と同じく、プラスチド型リン酸輸送体の一つ、トリオースリン酸/リン酸輸送体 (TPT) が関与している (図 1)。



一方、CAM 植物葉緑体への昼間の PEP の輸送、および夜間のグルコース 6-リン酸 (G6P) の輸送には、C3 植物葉緑体では非常に低い活性しかない PEP/リン酸輸送体 (PPT) と G6P/Pi 輸送体 (GPT) とが、それぞれ関与している (Neuhaus, et al. 1988, Neuhaus and Schulte 1996, Kore-eda and Kanai 1997)。このように、CAM 植物葉緑体は、C3 植物葉緑体とは異なる固有の代謝産物輸送特性を持っている。

通性 CAM 植物アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) は、好適な条件では C3 光合成を行うが、乾燥ストレスや塩ストレスなどの水ストレスを受けると CAM 経路を誘導し (CAM 化)、このようなストレス条件下でも継続的に光合成を行うことができるようになる。この CAM 化に伴い、多くの遺伝子の転写産物量が増加することがすでに知られている。中でも CAM 特異的炭酸固定酵素、PEP カルボキシラーゼの遺伝子・*McPPC1* はいち早くクローン化され、レポーターとして GUS を用いてプロモーター領域の機能解析が試みられた (Cushman and Bohnert 1992, Schaeffer et al. 1995) が、その転写調節に必要なシス因子やトランス因子の同定には至っていない。

アイスプラントには、上記の 3 つのプラスチド型リン酸輸送体アイソザイム (TPT、PPT、GPT) をコードする遺伝子として、*McTPT1*、*McPPT1*、*McGPT1*、*McGPT2* の 4 つが存在し (Häusler et al. 2000, Kore-eda et al. 2005)、CAM 化の際、4 つのリン酸輸送体遺伝子それぞれの発現調節が互いに異なることが分かっている。これらのうち、*McTPT1* は CAM 化の過程で転写産物量は変化せず、*McPPT1* と *McGPT1* とはやや増加した。一方、*McGPT2* は *McPPC1* と同程度、あるいはそれ以上に顕著な CAM 特異的発現を示したことから、このようなプロモーター領域の機能解析に向いている。リン酸輸送体ファミリーのプロモーター領域の機能的な解析・比較は、代謝産物輸送能制御機構の解明だけでなく、アイスプラントでのストレス応答遺伝子の転写制御機構の研究として、重要な知見を得られると期待される。

2 これまでの経過と研究の目的

すでに我々は、PCR 法を応用した「Cassette-ligation mediated 法」により、*McGPT2* 遺伝子上流領域約 2.8 kb を単離している (Kore-eda et al. 2007)。この領域には、非常に長い逆相配列が見られる (図 2A)。本研究では、*McGPT2* 遺伝子上流領域が転写活性を持ち、さらにこれが塩ストレスで促進されることを確かめることを目的とした。アイスプラントではまだ再現性の高い形質転換法は確立していない。そこで、*McGPT2* 遺伝子上流領域をレポーター遺伝子につなぎ、アイスプラント葉組織で一過性発現解析を行うこととし、以下のような目標を立てた。

A. *McGPT2* 遺伝子上流領域の構造

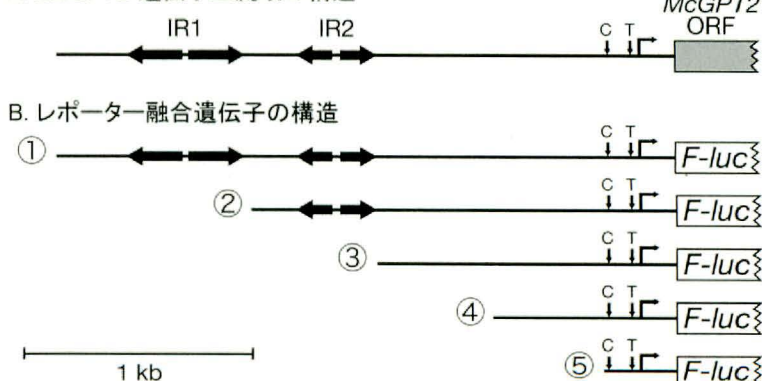


図2. *McGPT2* 遺伝子上流領域とレポーター融合遺伝子の構造

A. *McGPT2* 遺伝子上流領域の構造。ORF の上流 2.2 kb 付近 (IR1) と 1.6 kb 付近 (IR2) とに非常に長い逆相配列が見られる。C は CAT box, T は TATA box と思われる配列の位置をそれぞれ示し、■は、5' RACE 法で得られた cDNA の 5' 端に相当する位置を示す。

B. *McGPT2* 遺伝子上流領域-レポーター融合遺伝子の構造。様々な長さの *McGPT2* 遺伝子上流領域 (① 2.8 kb, ② 1.8 kb, ③ 1.4 kb, ④ 0.9 kb, ⑤ 0.4 kb) と、ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*F-luc*) の ORF をレポーターとして結合し、融合遺伝子を構築した。

- イ) アイスプラント葉組織を用いた一過性発現解析の系を確立する。
- ロ) 様々な長さの *McGPT2* 遺伝子上流域をレポーター遺伝子につないだ融合遺伝子を作成する。
- ハ) *McGPT2* 遺伝子上流域に塩ストレスで促進されるプロモーター活性があるかどうか明らかにする。

3 本研究の成果

イ) Cushman らのグループがレポーターとして用いた GUS は、検出感度が比較的低く、十分な活性を得るには、遺伝子導入後、葉組織を寒天プレート上で 2~3 日間培養する必要がある。予備実験の結果、当研究室の培養条件では、C3 型アイスプラントの葉組織を 3 日間培養すると乾燥ストレスを受けて CAM 誘導が起きる場合があることが分かった。そこで、本研究では GUS に比べ検出感度の高いルシフェラーゼをレポーターとすることで、遺伝子導入後の培養時間を短くできないか検討した。レポーターとしてホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*F-luc*) をタバコモザイクウイルス 35 S プロモーター (P-35S) 構成的に高発現するようにした一過性発現用ベクター pBI221-luc+ を用いた。これを金粒子 (直径 1.6 μ m) ヘコートし、パーティクルガン PDS1000/He (BioRad) で C3 型および CAM 型アイスプラントの葉組織へ遺伝子導入を行った。ラブチャーディスクは 1,100 psi のものを用いた。その結果、遺伝子導入後の培養時間は 4~6 時間で十分であることが分かった。また、*McGPT2* は光合成細胞で特異的に発現すると予想されるので、確実に葉肉細胞に遺伝子導入するため、遺伝子導入前に葉組織から表皮を取り除いておく必要があった。葉組織から表皮を取り除くと、乾燥ストレスを被る可能性があったが、C3 型葉組織から表皮を取り除き、前述の条件で培養しても、内生の *McGPT2* の転写産物は蓄積してこないことを RT-PCR 法で確かめた。

ロ) 次に、図 2B に示すような様々な長さの *McGPT2* 遺伝子上流域を PCR 法で増幅した。これらの増幅断片を、pBI221-luc+ の *F-luc* 上流の P-35S と入れ換えて挿入し、テストコンストラクト①~⑤とした。

ハ) 一過性発現解析では、組織への遺伝子導入効率により、発現レベルが一定でもレポーター活性が実験毎に大きく変動することが知られている。そこで、P-35S でウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (*R-luc*) を発現するプラスミド pBI221-Rluc を内部標準とした。テストコンストラクトまたは pBI221-luc+ と、pBI221-Rluc とを質量比 2:1 で金粒子 (直径 1.6 μ m) ヘコートし、パーティクルガン PDS1000/He (BioRad) で C3 型および CAM 型アイスプラントの表皮を除いた葉組織へ遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、葉組織を明所で 6 時間静置後、抽出液を調製し、Dual-Luciferase Assay System (Promega) で *F-luc* 活性及び *R-luc* 活性を測定した。各コンストラクトでの測定を 4 回以上行い、*F-luc* 活性の *R-luc* 活性に対する比を求めたあと、これらの値をさらに、pBI221-luc+ と pBI221-Rluc とを同時に導入して測定したときの *F-luc* 活性/*R-luc* 活性比で割ることで標準化して比較した (図 3)。これらのテストコンストラクトのうち、少なくとも②は、CAM 化に伴ってプロモーター活性が上昇することが分かった。

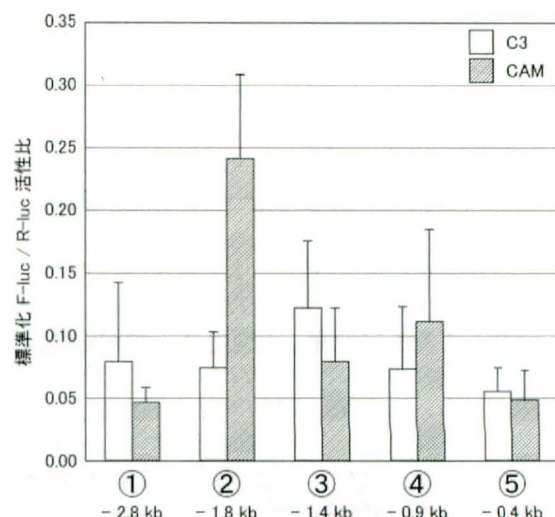


図3. 一過性発現解析による *McGPT2* 遺伝子上流域プロモーター活性の比較

図 2 に示したテストコンストラクト①~⑤を内部標準 (P-35S::R-luc をもつ pBI221-Rluc) とともにアイスプラントの葉組織に導入し、*F-luc* 活性及び *R-luc* 活性を測定した。

現在までのところ、*F-luc* 活性/*R-luc* 活性比の実験の変動が大きく、②以外のコンストラクトでは明確な差が見いだされていない。今後、この実験毎の変動の原因を突き止めこれを少なくするか、もっと差の大きくなるような実験条件を工夫する必要がある。

4 参考文献

- Cushman JC, Bohnert HJ (1992) *Plant Mol Biol* 20: 411-424
- Häusler RE, Baur B, Scharke J, Teichmann T, Eicks M, Fischer KL, Flugge U-I, Schubert S, Weber A, Fischer K (2000) *Plant J* 24: 285-296
- Kore-eda S, Kanai R (1997) *Plant Cell Physiol* 38: 895-901
- Kore-eda S, Noake C, Ohishi M, Ohnishi J, Cushman JC (2005) *Funct Plant Biol* 32: 451-466
- Kore-eda S, Morita K, Nakamata K, Ohnishi J (2007) *Plant Cell Physiol* 48, s175, ポスターNo.034
- Neuhaus HE, Holtum JA, Latzko E (1988) *Plant Physiology* 87: 64-68
- Neuhaus HE, Schulte N (1996) *Biochem Journal* 318: 945-953
- Schaeffer HJ, Forsthoefel NR, Cushman JC (1995) *Plant Mol Biol* 28: 205-218