

耐塩性ラン藻の分子シャペロニン遺伝子導入によるポプラの 生長促進作用

Growth enhancement of poplar plant transformed with molecule chaperone gene from a halotolerant cyanobacterium.

日比野 隆 名城大学理工学部 准教授

Takashi HIBINO, Faculty of Science & Technology, Meijo University, Associate Professor

研究の概要

分子シャペロニンは細胞内の様々な蛋白質の生合成反応に関与する蛋白質であると同時に様々な環境ストレスに曝された時に、細胞内の蛋白質が変性・失活するのを保護する作用があると考えられている。これまでに、地中海の死海で生育している耐塩性ラン藻 (*Aphanothece. halophytica*) から分子シャペロニン *dnaK* 遺伝子をタバコに導入し、その性質を調べた結果、コントロール株と比較して CO₂ 取り込み速度が高く、光合成活性が高いことが明らかとなった。さらに、高温ストレスに対して遺伝子導入植物は 発芽率が高く、光合成活性が向上し、初期成長が早いことが明らかとなった。そこで本研究課題である *dnaK* 遺伝子を導入したポプラを作出した。遺伝子導入ポプラは、通常の生育条件下において遺伝子導入ポプラは明らかに成長促進効果が見られている。

Abstract

The DnaK/HSP family is a molecular chaperone that binds non-native states of other proteins and assists them to reach a functional conformation. Molecular chaperones function in many biochemical processes such as protein synthesis, transport of proteins across membrane, and protection of proteins against inactivation under several abiotic stresses.

We isolated a chaperone gene *dnaK* from a halotolerant cyanobacterium

Aphanothece halophytica. We constructed transgenic tobacco plants overexpressing *dnaK* gene (DnaK-tobacco plants). Transgenic plants exhibited higher CO₂ uptake rate and higher photochemical activity than the wild-type plants. Under high temperature stress condition, DnaK tobacco plants showed higher rate of germination, higher photosynthetic activity and higher growth rate of young seedlings than the wild-type plants. Transgenic poplar trees overexpressing *dnaK* gene were also constructed. The overexpression of DnaK enhanced the growth of transgenic poplar even under normal environmental condition.

1. 研究目的

DnaK/Hsp70 ファミリーは、分シャペロンとも呼ばれタンパク質の生合成に関与するだけでなく、様々な環境ストレスでタンパク質が失活するのを防ぐ原ら気がある。これまでに耐塩性ラン藻 (*Aphanothece halophytica*) から *DnaK* 遺伝子 (*ApDnaK*) を単離し、大腸菌発現システムにより *ApDnaK* のユニークな性質を明らかにしてきた。さらに、*ApDnaK* をタバコに導入した結果、発芽時期・栄養成長期・生殖成長期において耐塩性・高温耐性が向上することを明らかにしてきた。そこで今回、このポプラ (*Populus alba*) に *ApDnaK* 遺伝子導入し、その解析を行った。また、同時にイネに *ApDnaK* 遺伝子導入し、その解析を行ったところ興味深い結果が得られたのであわせて報告する。

2. 研究経過

遺伝子導入ポプラ

ApDnaK 遺伝子をバイナリーベクター (pEL2 Ω -MCS) に組み込んだ pEL2 Ω -DnaK を

構築した。これをアグロバクテリア (LBA4404) に導入した。ポプラの葉および茎からカルスを誘導し、遺伝子導入したアグロバクテリアを感染させた。抗生物質を含んだ培地で遺伝子導入カルスを選抜し、シュート誘導を行った。茎が 5 cm くらいで切断し発根誘導を行い、以下のストレス条件での生育を試みた。通常のポプラの生育は人工気象器 (25 °C、16-時間明所 (70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、8-時間暗所) で生育させた。遺伝子導入ポプラは PCR 法により *ApDnaK* 遺伝子の導入を確認し、ウエスタンブロッティング法により発現効率が高い TTP1、TTP2 の 2 種類の株を選抜して以下の研究を行った。

これまでに作出した *dnaK* 遺伝子導入タバコ、イネの解析の経験を参考にして、

1) *dnaK* 遺伝子導入ポプラが、栄養成長期・生殖成長期の生育促進効果があるかどうか調べる。

2) *dnaK* 遺伝子導入ポプラが、塩・乾燥・高温・低温ストレスなどに対して、耐性が付与されているかどうか調べる。

3) *dnaK* 遺伝子を導入することにより、

成長促進あるいは環境ストレスに対して防御機構にどのように関与しているか総合的に評価する。

3. 研究成果

通常生育条件における遺伝子導入ポプラ

野生型ポプラの生育と比較して、40日後から遺伝子導入ポプラの方が生育が早く、60日後には明らかな生育促進が認められた。乾燥葉重量および乾燥茎重量は野生株と比較して約1.5倍であり、葉の数も野生株では21枚であったが、遺伝子導入株では約31 - 35枚であった。また、葉の面積もわずかに野生株より大きいという結果が得られた。さらに、光合成活性を比較したところ、遺伝子導入株で明らかな活性の増加が見られ、野生株の約1.3倍であった。また、糖含量を上葉、中葉、下葉、茎に区別して測定したところ、いずれの画分においてもわずかに野生株より高い値を示していた。このことから、*ApDnaK* 遺伝子を過剰発現させたポプラは光合成活性を高め、結果として糖含量の蓄積を高め、成長促進の効果が得られたと思われる。

ストレス条件における遺伝子導入ポプラ

3週間通常条件で生育させ野生株と遺伝子導入株を塩、乾燥、低温ストレスで生育させ比較した。

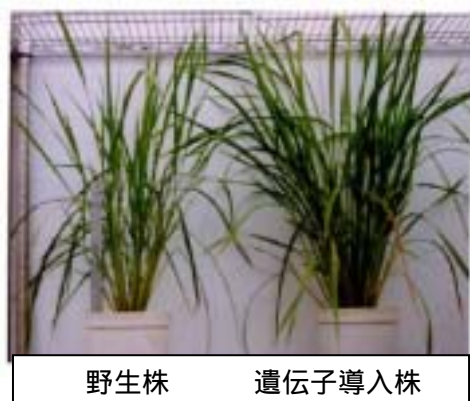
40日後から遺伝子導入ポプラの方が生育が早く、60日後には明らかな生育促進

が認められた。乾燥葉重量および乾燥茎重量は野生株と比較して約1.5倍であり、葉の数も野生株では21枚であったが、遺伝子導入株では約31 - 35枚であった。また、葉の面積もわずかに野生株より大きいという結果が得られた。さらに、光合成活性を比較したところ、遺伝子導入株で明らかな活性の増加が見られ、野生株の約1.3倍であった。また、糖含量を上葉、中葉、下葉、茎に区別して測定したところ、いずれの画分においてもわずかに野生株より高い値を示していた。このことから、*ApDnaK* 遺伝子を過剰発現させたポプラは光合成活性を高め、結果として糖含量の蓄積を高め、成長促進の効果が得られたと思われる。また、各種ストレス処理後通常生育条件に戻し、その回復を光化学系の電子伝達活性反応を測定した。その結果、いずれのストレス条件からの回復においても野生株と比較して明らかに遺伝子導入株の電子伝達活性が高いことが明らかとなった。

通常生育条件における遺伝子導入イネ

これまでに作出した *dnaK* 遺伝子導入イネの解析をすすめていたところ、通常生育条件化においても明らかな成長促進効果が認められ(下図)、発芽時期・栄養成長期のみで無く種子形成能が極めて高くなっていることを明らかにした。具体的には、野生株より分げつ数が多くなり、乾燥重量も約1.3倍になった。また種子含量も約1.3倍となった。ショ糖やフルクトー

スなどの糖類が増加しており、細胞内浸透圧が高くなっていることを明らかにした。



4. 今後の課題と発展

耐塩性ラン藻 (*Aphanothece halophytica*) 由来の *dnaK* 遺伝子 (*ApDnaK*) は他の生物種の *dnaK* と比較しても過酷な条件化でも高いシャペロン活性を有しており、その *ApDnaK* 遺伝子を導入した植物は各種環境ストレスに対しても耐性が向上したことを明らかにしている。しかしながら、一方で、*ApDnaK* は細胞内のさまざまなタンパク質保護に関わると予想されるが具体的な機構が明らかにされていない。今後、その作用機構を明らかにしていきたいと考えている。

ApDnaK 遺伝子導入ポプラは、通常の生育条件化でも生育が早く成長促進効果が認められた。これは、大気中の CO₂ 取り込み活性が高く (CO₂ 削減に貢献)、光合成活性が高く (光エネルギーを有効利用)、環境ストレスに強く (地球温暖化・砂漠化の防止に貢献)、早い成長 (都市緑化、植林に貢献) が期待される。

5. 発表論文リスト (印刷中を含む)

Rungaroon WADITEE, Md. Nazmul H. BHUIYAN, Emi HIRATA, Takashi HIBINO, Yoshito TANAKA, Masamitsu SHIKATA, Teruhiro TAKABE:

Metabolic engineering for betaine accumulation in microbes and plants.

[J. Biol. Chem., 282, 34185-34193 (2007)]

Md. Nazmul H. BHUIYAN, Akira HAMADA, Nana YAMADA, Vandna RAI, Takashi HIBINO, Teruhiro TAKABE:

Regulation of betaine synthesis by precursor supply and choline monooxygenase expression in *Amaranthus tricolor*.

[J. Exp. Bot., 58, 4203-4212 (2007)]

Akio UCHID, Takashi HIBINO, Takiko SHIMADA, Masahiko SAIGUSAS, Tetsuko TAKABE, Etsuko ARAKI, Hiroshi KAJITA, Teruhiro TAKABE

Overexpression of DnaK chaperone from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* increases seed yield in rice and tobacco

[Plant Biotechnol. , 25, 141-150 (2008)]

Takashi HIBINO, Akio UCHIDA, Masashi FUJITA, Koji YAMANE, Takiko SHIMADA, Shiro MITSUYA, Tetsuko TAKABE, Teruhiro TAKABE:

Co-expression of cytosolic-DnaK and chloroplastic-fibrillin from halotolerant organisms increased salt tolerance of tobacco plants

[J. Res. Inst. Meijo. Univ., 6, 105-114 (2007)]