

アイスプラント由来の RNA シャペロンの異所的発現がポプラの浸透圧ストレス応答に与える影響

長谷川 子龍（筑波大学生物学類）

指導教員：小口 太一（筑波大学生命環境系）

【導入】

乾燥は、植物の成長に影響を与える環境ストレスの1つであり、強い乾燥ストレス下では生育が抑制され、最終的には枯死する。地球温暖化の進行により、乾燥に晒されるリスクは増大しており、環境ストレス耐性の高い植物の需要が増している。ポプラは、商業的に利用されている木本植物の1種であるが、乾燥ストレスへの感受性が高いことが知られる。

McRBP 遺伝子は、塩生植物であるアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) から機能スクリーニング法によって単離された新規の耐塩性遺伝子である¹。*McRBP* 遺伝子は、RNA シャペロン活性をもつタンパク質をコードする。先行研究で *McRBP* 遺伝子を異所的に発現させたユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) は耐塩性が向上することが報告されている¹。一方、RNA シャペロンタンパク質は、多様な環境ストレス耐性に関与することが知られているが、*McRBP* のストレス以外の環境ストレス応答への関与はこれまで報告がない。そこで本研究では、*McRBP* 遺伝子を導入した組換えポプラを用い、*McRBP* と浸透圧ストレス耐性の関係性を評価した。

【植物材料】

交雑ポプラ (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) T89 株の非組換え体と、同系統に対してアグロバクテリウム媒介法で以下の T-DNA を導入された組換え系統 19 系統 (RBP1, 2, 4~20) を用いた。

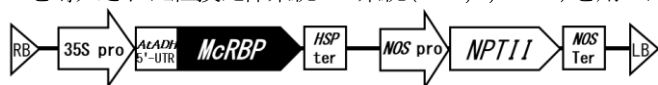


図1 *McRBP*組換えポプラに導入されたT-DNAのポンチ絵

【方法】

(1) 組換えポプラの遺伝子型の確認

ゲノムDNAの遺伝子導入の確認は、ポプラ培養物の葉から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、qPCR法によって *RBP* 遺伝子の導入を確認した。また、ポプラ培養物から抽出した全RNAからRT-qPCRによって、*RBP* 遺伝子の発現レベルを確認した。

(2) 栽培評価

継代培養するポプラを培土(元氣くん1号)が入ったスリット鉢(ロング6号)に植え替え、培養室(25℃、16時間明期/8時間暗期)で約1か月馴化した後、特定網室に移動した。特定網室に移動後、さらに2週間の馴化した後、1か月間(2024. 10. 22~11. 19)浸透圧ストレス処理を行った。浸透圧ストレス処理は、PEG600(以降、PEGと記す)20%、15%、0% (w/v)を隔日で底面給水処理することで行った。ストレス処理期間中、QYおよびSPADを週3回、樹高および基部直径を週1回計測した。

(3) イオン漏出量の測定

ストレス処理終了時の葉を採取、リーフディスクを各個体3枚ずつ作成し、MilliQ水中で振とうし、漏出するイオン量をコンダクタンスメーターで測定した。

(4) 遺伝子発現量解析

ストレス処理終了後の葉から、全RNA抽出し、RT-qPCRによって、ストレス応答性遺伝子の発現解析を行った。

【結果】

(1) 組換えポプラの確認

qPCRによる導入 *McRBP* 遺伝子と内生 *eIF4A* 遺伝子の定量比から導入遺伝子の数が1、2、3コピー以上の系統が、それぞれ13、5、1系統と推定された。また、RT-qPCRの結果、19系統全てから *McRBP* 遺伝子の発現が確認された。遺伝子導入数と発現量解析の

結果から、挿入遺伝子が3コピー以上で発現量の高いRBP2系統と1コピーで中程度の発現量のRBP11系統の2系統を以降の実験に供試することとした。

(2) 栽培評価

20%PEG区では、T89株では処理後9日目以降QYの低下がみられ、21日後には0.12(平均値、以降同じ)まで低下したので、21日目でストレス処理を停止した。一方、組換え系統ではQYの低下は14日目以降から観察されたが、21日後も0.31および0.34であった。15%処理区では、約2週間後からQYの低下がみられ、28日後NTでおおよそ0.20、組換え系統で0.35および0.34であった。対照区では、期間を通じてQYは0.65以上で高く保たれた。

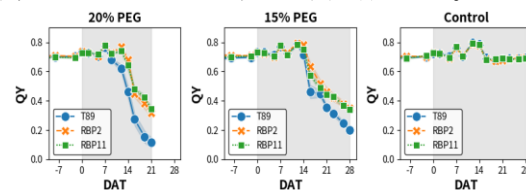


図2 PEG処理による浸透圧ストレス処理によるQYの変動

(3) イオン漏出量の測定

20%および15%PEG区では、組換え系統のI1は、T89株よりも低い傾向が観察された。

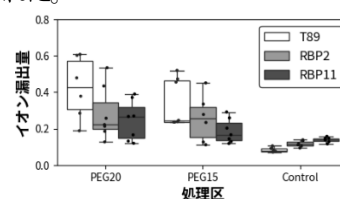


図3 塩ストレス処理終了時に計測した葉のイオン漏出

(4) 遺伝子発現量解析

卒業研究発表会にて報告する。

【考察・展望】

PEG処理による浸透圧ストレス試験の結果から、*McRBP* の発現がポプラの浸透圧ストレス耐性の向上に寄与することが示唆された。これは *McRBP* が塩ストレス以外の環境ストレス耐性に関与することを示した初めての報告となる。また、イオン漏出測定の結果からRNA結合タンパク質である *McRBP* がRNAシャペロンとして働くことでタンパク質の立体構造を維持し、遺伝子発現などの恒常性を保つことで浸透圧ストレスの影響を受けにくいと示唆される。そのため、現在、*McRBP* の恒常性への影響の確認として、PEG溶液処理による非組換え体と組換え体の乾燥・浸透圧ストレス耐性に関連する遺伝子の発現量評価を行っている。現在解析を進めているストレス関連遺伝子の発現解析等を通じ、*McRBP* による浸透圧ストレス耐性向上の作用機序の解明を進めたい。

今回の研究では、先行研究で確認されていた *McRBP* がユーカリの耐塩性向上に寄与することに加えて、浸透圧ストレス耐性向上にも影響することが示唆された。今後は、乾燥ストレスなどの他の環境ストレス耐性や屋外圃場でのストレス耐性等を検証したい。

【参考文献】

¹Tran NHT *et al.* (2019) Plant Biotech. J. 17: 801-811