

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塩ストレス応答に与える影響

今北 美穂（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】

地球温暖化は人類共通の問題であり、大気中への二酸化炭素排出量の急激な増加が、その主な原因のひとつと考えられている¹。森林は陸上の炭素循環において重要な役割を果たしており、地球規模の炭素収支の改善のための解決策のひとつとなり得る。しかし、世界の森林面積は2010年から2020年までに470万ヘクタール失われた。そのため、植林面積を増やす必要がある。一方で、世界中で塩害地が拡大しており、このままでは2050年までに農業用地の50%以上が失われると推定されている²。そこで私は、塩ストレスに強い樹木の開発が植林地の拡大に貢献できると考えた。

ポプラは生長が早く、バイオマス生産能力が高いため、植林に広く利用されている³。また、樹木の中では研究が進んでいる種類であり、モデル樹木となっている⁴。*McRBP* は、塩生植物であるアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) から機能性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。私の所属する研究室では *McRBP* を導入した組換えユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) において耐塩性が有意に向上することを報告している⁵。また、ポプラ (*Populus tremula*×*P. tremuloides*, T89 株) に *McRBP* が導入された組換えポプラも作出されているが、評価は未実施であった⁶。本研究では、*McRBP* 導入ポプラの塩ストレス耐性への評価を目的とした。

【植物材料】

ポプラ T89 株 (*Populus tremula*×*P. tremuloides*) の非組換え体 (NT) と、同 T89 株に対して *McRBP* を導入した組換え体システムを用いた。ポプラは、25℃、16h 明期/ 8h 暗期で制御された培養室において、0.5xMS 寒天培地 (組換えシステムについては 50 mg/L Kanamycin を含む) で無菌培養により維持された。

【方法】

1. 塩ストレス耐性評価に用いる *McRBP* 導入ポプラシステムの選抜

McRBP 導入組換え体 19 システムから、発現量解析などを行い塩ストレス耐性評価試験に用いる組換え体システムの選抜を行った。

まず、無菌栽培の各システムポプラから DNA を抽出し、定性 PCR により *McRBP* の発現を確認した。次に、RNA を抽出、cDNA の合成を行い、RT-qPCR により *McRBP* の発現量をポプラ内生遺伝子である *Ptelf4A* の発現量との比として定量、比較した。

2. 植物体の調整

寒天培地で無菌培養していたポプラを培土 (元気くん 1 号) が入ったスリット鉢 (ロング 6 号) に移植し、栽培室で約 1 カ月間の馴化を行った。鉢への灌水は、水道水を 1 cm ほど張ったプラスチック容器にポットを置き、底面給水により行った。

3. 塩ストレス処理

塩ストレス処理は、底面から 200 mM または 100 mM NaCl 水溶液を給水することで実施した。また、継続して水道水を給水した処理区を対象区とした。各システム・処理区の個体数は、6~7 であった。

4. 計測・解析

植物の健全度の指標として、光合成量子収量 (QY) を処理直前、処理開始から 2 日後、7 日後に Fluor Pen 100 を使用して計測を行った。7 日後、植物の上位および中位から葉を採取し、葉に含まれる Na⁺イオン及び K⁺イオンの量を LAOUAtwim (Na-11/K-11) を用いて計測した。

【結果・考察】

1. *McRBP* 導入ポプラシステムの選抜

ゲノム DNA 中の *McRBP* 遺伝子と内生 *elf4A* 遺伝子の存在比から導入遺伝子の数が 1,2,3 コピー以上のシステムは、それぞれ 13,5,1 システムと推定した (図 1 左)。また RT-qPCR により、全システムにおいて *McRBP* の発現が確認され、RBP2、8、10 システムで発現量が高い傾向があった (図 1 右)。以上の結果から、発現量が高く、またマルチコピーで遺伝子が入っていると考えられる RBP2 システムと、発現量が中程度であった RBP11 システムを組換えシステムとして選抜した。

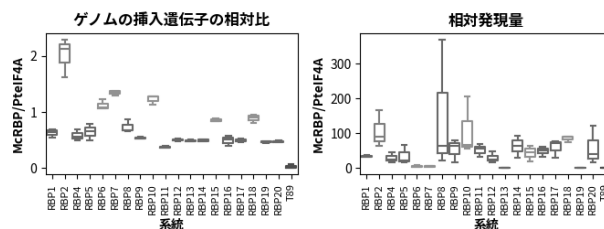


図 1 *McRBP* 組換えシステムの遺伝子挿入数と発現量の比較

2. 塩ストレス耐性評価

対照区と 100 mM NaCl 区では、処理期間中に QY の低下およびシステム間の比較は観察されなかった (図 2 左中)。200 mM NaCl 区では、T89 株および RBP2 システムでは 7 日目に QY の有意な低下が観察された一方、RBP11 システムでは低下が観察されなかった (図 2 右)。

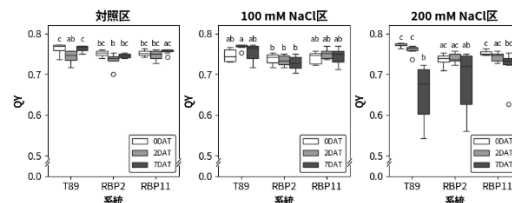


図 2 塩ストレス処理による QY の変化

3. 葉のイオン恒常性

塩処理終了後の葉に含まれる Na⁺イオンおよび K⁺イオンの比は、組換えシステムで T89 株よりも小さい傾向が観察された。

【考察と展望】

McRBP 組換えポプラ (RBP11 システム) で 200 mM NaCl 処理区における QY 低下の有意な抑制がみられたことから、*McRBP* は塩ストレスによる傷害を低減することが示唆された。また、塩ストレス処理後の、[Na⁺]/[K⁺]比が組換えシステムで T89 株よりも低い水準を維持していたことから、*McRBP* による塩ストレス耐性の向上には、イオンの恒常性の維持が関与すると推察された。

本研究では気温や光量が一定の栽培室での試験であった。今後は、より実際の生育環境に近い特定網室等の実験条件での塩ストレス耐性への影響を調べたい。

【参考文献】

- UNFCCC : 世界気象機関 (2021)
- Jamil et al. (2011) *Critical Reviews in Plant Sciences* 30:435-458.
- Fang et al. (2007) *J. Environmental Management* 85:672-679
- Polle & Douglas (2010) *Plant Biology* 12:239-241
- Tran NHT et al. (2019) *Plant Biotechnology J.* 17:801-811
- 鹿倉 (2023) 修士論文