

ポプラ SnRK2 プロテインキナーゼの異所的発現がシロイヌナズナの気孔調節に与える影響

松本 真純（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）

【背景】

Sucrose NonFermenting-1 (SNF1) - Related Kinase (SnRK) は、真核生物で広く保存されているキナーゼファミリーの一つである。SnRK ファミリーは大きく 3 グループに分類され、SnRK1 は真核生物で広く保存され、糖代謝の制御に関連する一方、SnRK2 及び SnRK3 は植物に特異的であり環境ストレス応答に関連することが知られる。さらに SnRK2 は、アブシジン酸 (ABA) 非依存的にはたらくサブクラス I とアブシジン酸 ABA 依存的にはたらくサブクラス II 及び III の 3 つに分類される。シロイヌナズナでは、サブクラス III SnRK2 が ABA に応答した気孔調節にそれぞれ関連することがわかっている (Fàbregas *et al.*, 2020)。一方、サブクラス II SnRK2 である *AtSnRK2.8* を過剰発現させたシロイヌナズナでは、ABA 応答性遺伝子ストレス応答性遺伝子の発現上昇により環境ストレス耐性が強化されたことから、ABA 応答性の転写制御因子の活性化を介してストレス応答に関与することが示唆されている (Umezawa *et al.* 2004)。

樹木のモデル生物のポプラにおいても、SnRK2 の 3 つのサブクラス全てが保存されている (Song *et al.*, 2015)。しかし、ポプラのサブクラス II SnRK2 を発現させた組換えシロイヌナズナでは、弱いストレス耐性向上はみられるものの *AtSnRK2.8* 過剰発現シロイヌナズナで発現変動がみられた遺伝子の発現に変化がないこと (Song *et al.*, 2016) や、シロイヌナズナのサブクラス II SnRK2 を過剰発現させた組換えポプラでも同様、弱いストレス上昇は観察されるものの *AtSnRK2.8* 過剰発現シロイヌナズナで発現変動がみられた遺伝子の相同遺伝子に発現の変化ないことが報告されている (Yu *et al.*, 2017) 一方で、私の所属する研究室では、シロイヌナズナのサブクラス II SnRK2 を過剰発現させた組換えポプラで気孔の数や開度に異常が生じていることを確認した (Horvat *et al.*, 2024)。これらの結果は、ポプラのサブクラス II SnRK2 の機能が ABA 応答性遺伝子発現を調整する転写因子の活性制御ではなく、気孔の調節に関連している可能性を示唆している。そこで本研究では、ポプラにおけるサブクラス II SnRK2 と気孔調節の関係を明らかにするため、ポプラ由来のサブクラス II SnRK2 をシロイヌナズナに導入し、気孔に現れる表現型を解析することで本仮説の検証を試みることにした。

【材料】

(1) 植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) Col-0 株を植物材料とした。

(2) TA プラスミドベクター構築

先行研究より、ポプラゲノムデータベース (Populus trichocarpa v4.1) には、SnRK2 のホモログが 11 遺伝子存在し、このうち 5 遺伝子がサブクラス II に分類されることが報告さ

れている (Song *et al.*, 2015)。本研究では、その中の PtriSnRK2.7 (Ptri.005G162500) をポプラのサブクラス II SnRK として選定した。同様に、ポプラゲノム中に 3 遺伝子あるサブクラス III の一つである PtriSnRK2.11 (Ptri.009G106900) を比較対照として選定した。植物への形質転換に用いるバイナリープラスミドベクターは、各標的遺伝子のコード配列の 3' 側に GFP 遺伝子のコード配列を結合した断片を人工合成し、pRI201-AN の NdeI/SalI サイトに導入することで調製した。

(3) 形質転換体の作成

調製したプラスミドベクターは、アグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter* EHA101 株) に形質転換し、シロイヌナズナの若い花序に感染させ、種子を採種した (T1 種子)。T1 種子は、カナマイシンを含む 0.5xMS 寒天培地上で発芽させ、耐性個体を示す個体を選抜した。耐性個体は鉢上げ、生育し、種子を採種した (T2 種子)。同様に選抜、採種を繰り返し、形質転換体を選抜した。

(4) 形質転換体の評価

得られた形質転換体について、まず、ゲノミック PCR 解析および逆転写 PCR 解析により、遺伝型の評価を行う。併せて、GFP 蛍光を観察し、導入遺伝子が発現していることの確認を進める。遺伝子の導入および発現が確認できた個体を用い、葉の気孔の数および開度を中心に表現型解析を行う。

【結果】

これまでに、PtriSnRK2.7 (サブクラス II SnRK2)、および PtriSnRK2.11 (サブクラス III SnRK2) を導入したカナマイシン耐性シロイヌナズナ T1 世代をそれぞれ 3、および 2 個体が得られた。さらに、選抜した T1 個体から採種した T2 種子が取得されている。現在、T2 植物の育成を進めている。これらの解析結果については、報告会で報告する。

【展望】

今後、これまでに得られた組換え体系統の選抜・世代更新を繰り返し、ホモ個体の取得を目指す。また、未だ選抜を行っていない T0 種子から新たな形質転換候補の取得も目指す。得られた形質転換体の気孔の数や開度やストレス応答性等について詳しく調査をすすめることで、ポプラの SnRK2 の機能評価や SnRK2 の植物進化における機能分化について考察したい。

【参考文献】

- Horvat, B. *et al.* (2024) Life (Basel) **14**: 161.
Fàbregas, N. *et al.* (2020) Nature Communications **11**: 6184.
Song, X. *et al.* (2015) Plant Biotechnol. **32**: 337-341.
Song, X. *et al.* (2016) Frontiers Plant Sci. **7**: 612.
Umezawa, T *et al.* (2004) PNAS **101**: 17306-17311
Yu, X. *et al.* (2017) Mol Breeding **37**: 57.