



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

モデル植物のSTOP1転写因子を用いたアルミニウム
及び低pHストレスの機能生物学的解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2016-12-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大山, 慶直 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/49108

モデル植物の STOP1 転写因子を用いたアルミニウム及び
低 pH ストレスの機能生物学的解析

2013 年

岐阜大学大学院 連合農学研究科

生物資源科学

(岐阜大学)

大山 慶直

モデル植物の STOP1 転写因子を用いたアルミニウム及び
低 pH ストレスの機能生物学的解析

大山慶直

目次

序章	3 頁
第 1 章 タバコ植物体における <i>NtSTOP1</i> 転写抑制株を用いた AI 及び低 pH ストレス耐性機構の解析	9 頁
第 2 章 異種植物 STOP1 の単離・同定及びそれを用いた相補組換え体シロイヌナズナの機能解析	44 頁
第 3 章 総合考察	60 頁
第 4 章 実験結果の要約と結論、総評	67 頁
引用文献	71 頁

序論

近年特に世界規模で懸念されている問題のひとつに資源・エネルギーの枯渇があげられる。我々近代を生きる人類にとって主要なエネルギー源として広く認知され利用されているのは石油等の化石燃料だが、経済的に使用可能な量は限られている。そのために従来の化石燃料の使用を控え、バイオマス燃料やバイオエタノールなどによる代替エネルギー資源の導入や移行が励行されてきている。しかしこのバイオエタノールに関する問題のひとつとして、2007年にメキシコでバイオエタノール生成用のために原料であるトウモロコシ競合的栽培のために価格が高騰したとして抗議の声をあげたのは記憶に新しい。また海外ではGMO作物の導入を国家が推奨し、積極的にプロジェクトを進める国もある。このような問題を解決するひとつの方法として、農業経済学的見解も重要ではあるのと同時に、不良土壌における作物や資源植物の、効率的な低コスト化栽培を目指し有効活用することが重要な課題であるといえる。不良土壌には重金属により汚染された土壌、アルカリ性土壌、酸性土壌などが含まれるが、この中の酸性土壌は世界の農耕が可能な土地の30%以上を占め、面積にして約4億haと言われている(Baligar and Ahlrichs, 1998)。この内の多くはアジアやアフリカなどに多く分布するが、実際に利用されているのはわずかな面積に過ぎない(松本英明, 2003)。また、一般的に酸性土壌は降雨量の多い国や地域に生成しやすく、日本にも広く分布している。雨水は大気中の二酸化炭素を吸収し、弱酸である炭酸となる。このような雨水が土壌に浸透すると、雨水中のプロトンが土壌中のカルシウムイオンやマグネシウムイオンといった陽イオンの溶出を引き起こし、逆にプロトンが土壌に残存し塩基飽和度が低下するためである。また、土壌の酸性化は土壌自身にも起因するところがある。これは現代農業での使用が主流となっている多量の窒素質肥料による硝酸の生成や、陰イオンに対し植物が陽イオンを多く吸収することが主な理由である。

さて上記の理由から起きる栄養欠乏による障害も深刻だが、酸性土壌中では過剰な可溶性アルミニウム(Al)が土壌中のリン酸と結合し植物体内への取り込みを阻害することと Al の毒性そのものによる組織や根の伸長障害が発生するため作物の生産性は低下する。もともと pH が中性付近の土壌中の Al のほとんどは不溶性の「ケイ酸アルミニウム」の形で存在しているが、土壌の pH が低下し、特に pH が 4.5 を下回ると障害が発生する。これは土壌溶液中に、毒性の高い Al^{3+} が多く存在するようになるためと考えられる。しかし、実際に酸性土壌障害は pH5.5 以下でも表れることから、酸性土壌における害とは Al だけでなく、Al とプロトンの両者であることが言える。したがって酸性土壌の改良のためには、リン石灰などの散布により土壌の pH を上昇させ、この Al^{3+} やプロトン濃度を減少させる必要がある。しかし、石灰資材は再生不可能な資源であり、経済寿命が世界規模であると 50 年ほどであることが指摘されているため、土壌改良剤や必要施肥量を少しでも削減できることが望ましい。この Al が植物自身に及ぼす生理的な影響を調べるためには、植物体内における Al の活動について研究する方法が手っ取り早い。しかし、主な理由として、植物が吸収するために適した Al の放射性同位体元素がないことから、障害を可視化し直に確認することは困難であるとされている。そのため、確実な手段だと、植物の細胞内のオルガネラレベルでの現象から、分子レベルでのダイナミクスである耐性機構を理解するというアプローチの研究も多くみられる。Al が根の根端部分に集積すると、根の伸長域細胞伸長が抑制されカロースやリグニンといった細胞壁の構成成分が蓄積されるといわれている(松本 2003) ため、細胞壁が Al 障害を受けやすい有力候補であった。しかし、比較的新しいもので、タバコ細胞を使った実験系で、Al 処理によって細胞膜が破壊され細胞伸長ができなくなり細胞死が起きるといった報告もある(Yamamoto et al.,2010)。さらに山本らは糖と Al の関係についても植物の生育との相関を示しているが、ただ、糖は植物に同化され栄養になるので、Al そのものが糖の取り込みを阻害するものか、Al による生育障害と

等に依る生育促進作用の差引、すなわち見かけ上の阻害かの判断ができない。ともあれこのような報告から、植物が Al ストレス下に晒されると、Al が細胞壁を透過し細胞膜上のリン脂質に吸着することで、Al が細胞膜を破壊し、細胞死を導く結果となる。このような報告らから、当初は細胞壁が Al 障害のターゲットとされてきたが、細胞膜も同様に Al ストレスのターゲットとなると考えられてきた。逆に、酸性土壌で生育の有用性についても研究されている。これはリン酸過剰害を受けやすい植物種においてみられる事象で、いくつかの植物種で、Al がリン酸と不要性複合体を形成することで過剰な取り込みを抑制すると言われている。また経験的に、適当な範囲の pH では Al による生育促進も認められる。根長試験における対照区となる pH 設定は、シロイヌナズナの場合は、5.5 程度と比較的中性よりである。このときの Al 濃度によってはシロイヌナズナは、Al を栽培条件に含まない対照区よりも、根伸長の成長率が 20 %程度増すことがわかっている。これは栽培条件の pH の設定の為に毒性を持つ Al の存在比が少なく、毒性を失った Al が Ca イオンと同様の機能を示すためと考えられるが、植物の細胞壁や細胞膜表面での挙動を黙視することが難しいこともあり、憶測に過ぎない。

酸性土壌で植物の被害に対して、植物は取り込んでしまった Al による害を極力減少しようとする「内的耐性機構(Internal Tolerance)」と、Al を取り込まないように努めるための「排除機構(Exclusion Mechanism)」をもつことが言われている(Taylor, 1991)。前者、「内的耐性機構」の例にはチャ (*Camellia sinensis*) があげられる。チャは体内にカテキンを大量に含んでおり、これが取り込んでしまった Al とキレート結合を形成し、無毒化するシステムを持っている。他にもシロイヌナズナでは、ABC トランスポーター様のタンパク質をコードすると思われる ALS3 (Aluminum Sensitive 3) 遺伝子(*ALS3*)が関与している (Larsen et al., 1997, 2005)。比較的新しい報告では、STAR1 及び 2 (for sensitive to Al rhizotoxicity1, 2)とよばれる耐性をコード

する遺伝子があげられる (Huang et al., 2009)。このうち STAR2 と AtALS3 遺伝子配列からみて高い相同性を示すこともわかっている。これらの耐性遺伝子がコードするタンパク質は地上部への Al の転移に関与すると考えられるが、その生理的な役割については調べられてない。他方、植物のもつ「排除機構」には、植物が根圏に有機酸を放出し Al イオンをキレート化し無毒化する機構が存在することが知られている。例えばトウモロコシ(*Zea mays*) では Al に応答してクエン酸を根圏から放出する (Pellet et al., 1995)。全ゲノム情報の解読プロジェクトが進められたことで知られるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Columbia-0) では、リンゴ酸トランスポーター (AtALMT1; Al-activated malate transporter 1) を介したリンゴ酸放出が Al 耐性に大きく貢献している (Hoekenga et al., 2006)。ALMT1 は複数回細胞膜を貫通する細胞膜局在型タンパクで、シロイヌナズナの受ける Al ストレス下では、根部の中間域 (distal part of the transition zone: DTZ) から下の伸長域において強く発現し、Al ストレス特異的にリンゴ酸を放出する (Kobayashi et al., 2007)。このことからシロイヌナズナにおける Al ストレス耐性に大きく寄与していると考えられる。また、コムギ (*Triticum aestivum*) でも同じく Al 障害に対するリンゴ酸放出が確認されており (Delhaize et al., 1993)、近年同じく ALMT タイプのトランスポーターがリンゴ酸放出に関係していることが報告された。このように、放出される有機酸の種類は植物種ごとに異なる可能性が示唆されており、放出に寄与しているトランスポーター (輸送体) のファミリーも異なっている。しかしどの植物種が、どのトランスポーターを使って Al ストレスに応答して特異的な有機酸を放出するかを一目で判断することは困難であり、全ての候補トランスポーターを調べることは非常に効率が悪い。

酸性土壌におけるもうひとつの害、低 pH ストレスについては、Al 障害とは区別できる根の伸長阻害や細胞膜の破壊を伴う障害が確認されている (Kinraide TB, 1998,2003、Koyama et al., 2001)。だが STOP1 の下流に位置する候補遺伝子群につ

いて、個々で単一遺伝子破壊株を作製し、のちに記述する根長試験で低 pH ストレス下での根伸長についての相補を検定したが、回復の兆候は見られなかった。Al の耐性に比べ、耐性に関する遺伝子や耐性機構については情報が少ないのが現状である。

これまでは酸性土壌におけるストレスに対する植物の防御機構に関する研究を抜粋してみたが、この *AtALMT1* 遺伝子 (*AtALMT1*) と *AtALS3* は STOP1 (Sensitive TO Proton rhizotoxicity 1) という転写制御因子により発現が制御されていることが明らかになっている (Iuchi et al., 2007)。STOP1 は恒常的にも植物体内で発現する性質をもつが、低 pH または Al ストレス条件で、耐性に必須な遺伝子の転写を制御する転写因子として機能する。この転写制御因子 STOP1 はシロイヌナズナから単離・同定されたのに引き続いて、イネでも相同タンパクが Al 耐性遺伝子を制御していることが報告された (Yamaji et al., 2009)。このような状況ではあるが、*AtSTOP1* が Al 耐性だけでなく低 pH 耐性も支配することに着目すると STOP1 変異体 (*stop1*) は低 pH 耐性を解明する手がかりとなると考えられる。

今回の研究で用いる供試植物は、モデル植物として使われることも多い。タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. *xanthi*) はナス科の植物で、植物的な特性として組換え体の作製が比較的安易であり、また無菌栽培等の技術、試薬の組成などの研究にもよく使われたためと言われる。他にもミヤコグサ (*Lotus japonicas*) はマメ科のモデル植物として知られる。ヤナギ科のヨーロッパクロヤマナラシ (黒ポプラとも呼ばれる、*Populus nigra*) は樹木としても研究に使われている。そしてヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) はゲノムにおける相同組換えが人工的に起こしやすい下等植物としてよく用いられ、ゲノムの解読も進められている。ツバキ科のチャノキはモデル植物という見方がされることは多くはないが、チャのもつ成分や二次代謝に関する生物学的情報を求め世界の各地で研究が進められている。これまでに多くの研究で報じられているように、植物における有機酸放出という Al 耐性機構には共通点はあるが、

どの植物がどのような種類の有機酸放出を行うか、それに関する遺伝子は同植物内に存在するのかなど、植物毎の特性についてははっきりとしたことが言えない。そのため排除機構による耐性を知ることを目的としていくつかの植物種から *STOP1* 相同遺伝子を単離・同定し、それを介した有機酸放出関与遺伝子を解明する研究が進められている。本研究では、*NtSTOP1* 相同遺伝子 (*NtSTOP1*) について同種植物で作成した、すなわち、タバコ *NtSTOP1*-RNAi(RNA interference; RNA 干渉)による転写抑制株と野生株とを比較し下流遺伝子との相関を示すことでこれらの遺伝子を評価した。また、*stop1* シロイヌナズナを宿主として各 *STOP1* 相同遺伝子の評価を目的とした相補組換え実験を行い、シロイヌナズナにおける AI 耐性遺伝子の転写誘導の挙動を解析した。

第1章 タバコ植物体における *NtSTOP1* 転写抑制株を用いた AI 及び低 pH ストレス耐性機構の解析

1-1 緒言

特に近年は、植物のもつゲノムや遺伝子に関する研究が盛んに行われ、今や特定の遺伝子を増幅し単離する方法がえられた。この特定の遺伝子は、数多くの遺伝子組換え技術の発達や手段の確立により、用途に応じて、大腸菌や酵母、植物などの宿主に導入することができるようになった。またこのような歴史の過程で、生体内で遺伝子からタンパクが作り出されることが知られ、様々な遺伝子の機能や構造を知ることができるようになった。この遺伝子研究はモデル生物について重点的に行われ、その研究成果を基に他種の動植物に適用し理解しようとする動きが多い。植物界においてはシロイヌナズナがモデル植物として広く用いられる。シロイヌナズナはライフサイクルが比較的短く、遺伝子の組換え体を作製するには都合がよい。またゲノム解読プロジェクトの甲斐あってか、今日では染色体上の多くの遺伝子の役割を理解することができることもあり、シロイヌナズナは植物における遺伝子やゲノムに関する研究ではとても重要なポジションにある。

さて、*STOP1* は、シロイヌナズナを用いた逆遺伝学的手法により偶然的に単離・同定されたが、これがシロイヌナズナとは異なる植物種にも保存されているかということが植物界のスケールから見た今回の研究の重要なところである。井内らの研究では、*STOP1* の ORF (Open reading frame; 読み取り枠) の 798 番目の塩基、シトシンがチミンに置換され、266 番目のアミノ酸、His が Tyr に誤って翻訳されたことで、このミスセンスが生じている変異系統では酸性土壌を想定した条件下では根伸長は著しく阻害

される (Figure 1)。そして、Al 耐性遺伝子である *ALMT1* を転写することが困難となることもわかり、*STOP1* はシロイヌナズナにおける低 pH・Al ストレス耐性遺伝子を制御する転写制御因子と考えられ、これをコードする遺伝子の変異株を *STOP1* 変異株 (*stop1*) として単離した (Figure 2)。組織化学的な実験では、*ALMT1* の発現量は根部で増加している (Kobayashi et al., 2007) が、*STOP1* は茎部を除く地上部でも発現する (Kobayashi et al., 2013) こともわかっている。一方で、翻訳されてからの *STOP1* のポストゲノミックな特徴は調べられておらず、*STOP1* は非ストレス区においてもある程度の転写されていること、大過剰のストレスを与えない限り、シロイヌナズナにとって重度の Al や低 pH ストレス処理の範囲でも転写量がほとんど変化しないことが示されている (Iuchi et al., 2007)。またタンパク中でドメイン検索をすると C2H2 (それぞれ、必須アミノ酸であるシステイン ; Cysteine とヒスチジン ; histidine を指す) タイプのジンクフィンガードメインを有することが分かった。そのためこの塩基置換が入ったことにより、植物体内中で亜鉛との配意結合ができなくなり適切な高次構造をとれず、ターゲットとなる塩基配列に結合することが困難となり結果として *STOP1* は失活すると考えられる。ジンクフィンガーは、様々な生物種において、いくつかタイプがある亜鉛との結合により機能する転写因子に見られる、C4 タイプや、同位体が存在しており (Vallee et al., 1991)、これらはドメイン内のフォールディングの様式についても様々な構造タイプが存在することが報告されている (Krishna et al., 2003)。シロイヌナズナ内でも C2H2 タイプのジンクフィンガードメインをもつタンパクは多数存在するが、ターゲット配列との結合様式に関するアミノ酸配列で相同性を調べると、*STOP1* と同じタイプのアミノ酸配列をもつサブファミリーは一つのみであることがわかった (Englbrecht et al., 2004)。このホモログは *STOP2* と名付けられ、シロイヌナズナにおける CaMV35S プロモーター (カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター ; Liu et al., 1998) による At*STOP2* の過剰発現体では、幾分か低 pH スト

レス耐性に寄与していることが示された (Kobayashi et al., 2013)。同様に、この *AtSTOP2* を CaMV35S プロモーターでも、*STOP2* プロモーターでもなく、*AtSTOP1* プロモーターで制御したカセットによる相補組換え体を用いて *ALMT1* の転写レベルを確認したが、Al ストレス下であっても転写レベルは増加しなかった (Kobayashi et al., 2013)。*STOP2* は *STOP1* とはターゲット配列との結合に使われているジンクフィンガードメイン中のアミノ酸配列が異なっていることから、*STOP1* と異なる結合様式をもち、異なる下流遺伝子の転写制御に関係していることが考えられた。この点から見ても *STOP1* はシロイヌナズナにおいて *ALMT1* の転写制御に代替が効かない、必須の転写因子である可能性が高い。

また、*STOP* は植物種を越えて保存されることが示唆されており、イネにおいても、*ART1* (Al resistance transcription factor 1 : Os12g0170400) と名づけられたオーソログが単離・同定され類似した機能をもつことが報告されている (Yamaji et al., 2009)。したがってシロイヌナズナ同様に、有機酸放出に関与する遺伝子を制御する、機能的な *STOP1* 相同遺伝子が植物界に広く存在する可能性は高いと考えられる。この *ART1* の遺伝子変異株を使ったマイクロアレイ解析では *AACT1* (Al-activated citrate transporter 1 : Os10g0206800) が Al 処理による細胞内での発現レベルを変化させていることが示唆されたが、イネを使った、*AACT1* についての逆遺伝学的な表現型解析や *AACT1* を介した根圏へのクエン酸放出は報告されておらず、また、*STAR1* 及び 2 が寄与する植物体内での生理的な障害も説明されていない。コムギにおいても *STOP1* 相同遺伝子は単離されているが、酵母による相補検定であり、植物の実験系による *TaSTOP1* のシステムを介した有機酸の放出の検定はされていない (Garcia-Oliveira et al., 2013)。このようにシロイヌナズナ以外の植物種からも *STOP* の相同遺伝子が単離・同定されているが、*STOP1* を介した植物の生理的な耐性機構については、当初シロイヌナズナで確認された、*STOP1* が Al ストレス下で十分に機能すれば植物種ごと

に特有の有機酸を放出するという事象以外の情報は未だ皆無である。

そこで今回の研究では、まずタバコについて、後述する degenerate-PCR と RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法により *STOP1* 相同遺伝子の単離を行った。そして、これを使った RNAi によるタバコ植物体における *STOP1* 転写抑制株 (NtSTOP1-KD) を作製し、NtSTOP1 の表現型への影響を検定した。次に有機酸放出量を測定しタバコという植物の AI 耐性を評価するとともに、NtSTOP1 を介した、適当な有機酸放出トランスポーター遺伝子の転写制御を調べることでタバコの AI ストレス耐性機構を理解することにした。

RNAi とは、端的に言えば、生体内で二本鎖 RNA が配列特異的に分解されるため、結果としてその遺伝子の発現が抑制される現象を指す。この現象は植物のみならず線虫や昆虫、菌類などの生物種間で保存されていることが示されており、また、発現の抑制効果が大きいため、様々な研究分野に使われている。今回の研究でも、*NtSTOP1* のサイレンシングによる機能評価を目的として活用した。

2-2 材料及び方法

total-RNA 抽出用の植物体の栽培

プラスチックマウントでナイロンメッシュを挟み、その上に播種し水耕栽培を行った。水耕溶液には通常の 1/50 濃度の MGRL (Fujiwara et al., 1992) の組成を一部改変したもの (*MGRL*) にリン酸ナトリウム (NaH_2PO_4 と Na_2HPO_4 との混合物) を添加した (Table. 1)。藤原らの MGRL から *MGRL* への改変内容は、リン酸ナトリウムを添加しなかったこと、硝酸カルシウム ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) に換えて塩化カルシウム (CaCl_2) と硝酸ナトリウム (NaNO_3) を相当量加えたこと、である。まず、適量の種子を 4 °C で 4 日間吸水させた後にプラスチックマウントに播種した。これらのマウントを明期 / 暗期が 12 h / 12 h、気温 22 °C の環境で、pH5.5 に調製した *MGRL* 溶液を 2 日置きに交換しながら 10 日間水耕栽培した。最後に、植物体の根部のみをサンプリングし液体窒素により凍結し -80 °C で保存した。

植物体からの total-RNA 抽出

鈴木らの RNA 抽出法に対し、若干の修正を加え抽出した (Suzuki et al., 2004)。最終的な抽出バッファの組成を、100 mM Tris-HCl、10 mM EDTA、5 % 2-メルカプトエタノール、2 % LDS、0.6 M NaCl、0.4 M クエン酸ナトリウムから、100 mM Tris-HCl、25 mM EDTA、1.4 M NaCl、2 % (w/v) CTAB (臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、cetyl trimethyl ammonium bromide) に変更して使用した。サンプリングした植物体を液体窒素で冷却しながらハンドドリル及びペッスルを用いて磨砕し抽出バッファを 600 μl 加え、手で暖めながらペッスルにて懸濁し、5 分常温で放置した後に、15000 rpm、常温の条件で 5 分間遠心分離した。この上清と等量のクロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1) を加え転倒混和によりよく混ぜた後、14,000

rpm、4 °Cの条件で 10 分間遠心分離した。次に水層のみに対し、等量のフェノールミックスを加えてボルテックスで混合し、3 分常温で放置してから、さらに加えたフェノールミックス (35 % GTC、0.2 M 酢酸ナトリウム、pH4.0、水飽和フェノール溶液) の半分量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1) を加え同様にボルテックスで混合してから、これを 14,000 rpm、4 °Cの条件で 10 分間遠心分離した。なお、適切に進行しているときは、このボルテックス後には均等な溶液になるが、白濁した層と透明な層の 2 層に分かれることがあり、このときは 66 % GTC (guanidine thiocyanate) 溶液を少量ずつ足して、透明な均一層を得てから次の作業課程に進んだ。以下の操作から RNA が RNase に対してむき出しになることから、特に RNase に注意して操作を行った。遠心後の水層に 0.6 倍量のイソプロパノールを加えボルテックスによる混合後 15 分常温で放置した後に、16,000 rpm、常温の条件で 20 分間遠心分離した。最後にイソプロパノールを除去してから、沈殿に対し 75 %のエタノールを 150 µl 添加し、再び 16,000 rpm、常温の条件で 20 分間遠心分離した。沈殿はすぐ後の DNase 処理の都合のため、RNase-free の水 42.5 µl で溶解した。

また、これら RNase-free の課程の操作で使用した試薬及び使い捨てタイプのチップやエッペンドルフチューブなどの機材はすべて事前に 250 °C、2 時間の乾熱滅菌か DEPC (Diethylpyrocarbonate) により RNase を不活性化したものを使用した。

DNase 処理

上記の方法で RNA を抽出した場合、DNA の混入が懸念され、逆転写の際に阻害を招くことが懸念されるため、DNase 処理を施した。この過程で使用した器具および試薬も、RNase-free のものを使用した。

42.5 µl の RNA 溶液に×10 DNase バッファーを 5 µl、RNase 阻害剤 (20 U) を 0.5 µl、DNase I (10 U) を 2 µl 加え 37 °Cで 45 分放置した。反応後、RNase free の水 250

μl、水飽和フェノール 150 μl、クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1) 150 μl を加えボルテックスにて混合し、13,000 rpm、常温の条件で 5 分間遠心分離した。続いて上清に 3 M の酢酸ナトリウム (NaOAc) を 30 μl、イソプロパノールを 300 μl 加え、ボルテックスで混合してから室温で 10 分放置した後に、16,000 rpm、4 °C の条件で 20 分間遠心分離した。そして RNA 抽出操作同様に、イソプロパノールを除去してから、沈殿に対し 75 % のエタノールを 150 μl 添加し、再び 16,000 rpm、常温の条件で 20 分間遠心分離した。最後に沈殿を 20 μl の RNase free の水で溶解し、後の過程に使用しない分は -80 °C で保存した。

塩化リチウム処理

鈴木らの方法はシロイヌナズナから RNA を抽出することに適しているが、タバコは同期間の栽培でもシロイヌナズナよりも植物体が大きくなり、そのため細胞壁由来の糖分など、多くの代謝産物を含む。このとき、植物は強いストレスを受けると糖を多く集積することが知られていることもあり、抽出した RNA 中に糖多く含まれる糖により逆転写及び転写の阻害が予想されるため、DNase 処理後に、塩化リチウム処理を行うことで糖を除去した。

まず、total-RNA 溶液 150 μl に対し、8 M の塩化リチウム溶液を 50 μl 加え -80 °C の環境で一晩静置した。翌日、これを常温で融解してから 16,000 rpm、4 °C の条件で 30 分遠心分離した。上清を捨て、沈殿に 75 % エタノールを 150 μl 加えてから 16,000 rpm、4 °C の条件で 5 分遠心分離を行った。続いて沈殿に RNase-free の水を 50 μl、3 M の NaOAc を 30 μl、イソプロパノールを 300 μl 加え、室温で 10 分放置した後に、16,000 rpm、4 °C の条件で 20 分間遠心分離した。そして RNA 抽出操作同様に、イソプロパノールを除去してから、沈殿に対し 75 % のエタノールを 150 μl 添加し、再び 16,000 rpm、常温の条件で 20 分間遠心分離した。最後に沈殿を 15 μl の RNase-free

の水で溶解した。

濃度・純度測定

上の操作で得られた DNase 処理済み RNA 溶液の濃度及び純度を測定した。測定に使用した装置は NanoDrop 1000 (LMS 社) である。濃度についてのサンプルは、後の逆転写の際に用いる鋳型 RNA 量が 1 μg であるため、100 ng / μl 以上のものを使用基準とした。純度については波長 260 nm (A_{260}) 及び波長 280 nm (A_{280}) でのスペクトルの高さの比 A_{260}/A_{280} が 1.9 以上であり、かつ、 A_{260} と波長 230 nm (A_{230}) の比 A_{260}/A_{230} が 2.2 以上のものを使用基準とした。

逆転写反応

はじめに、RNA を 1 μg 分、10 μM プライマーを 1 μl をとり、RNase-free の滅菌水を用いて 17.5 μl にメスアップしたあと、70 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間 RNA を熱変性し、氷上で 2 分ほど冷却した。これに 10 mM dNTP を 1 μl 、 $\times 5$ RTbuffer を 5 μl 、RNase-inhibitor を 0.5 μl 、RTase を 1 μl を予め混合物としておいたものを加え (Table. 2)、となるように加え、42 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分のインキュベーションのあと、70 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間インキュベーションし、cDNA を合成したのちに酵素を失活させた。最後に 4 U 分の RNaseH を加え 37 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分インキュベーションし、反応終了後は -30 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。逆転写に使用したプライマーは、3'RACE の目的では oligo dT AP を、5'RACE の目的では RNase-free の Rv1 を遺伝子特異的プライマー (GSP) として使用し伸長を行った。リアルタイム PCR による転写解析を目的とした場合には oligo dT プライマーを使用した。このあと、5'RACE に使用するものは、ヌクレオチドのテーリング反応を行った。なお、このときの温度設定は全てサーマルサークルで行い、RTase の失活までに使った器具や試薬も RNase-free である。

ポリ C テーリング反応 (dC-tailing) 反応

5' RACE では、遺伝子上流の未知領域の配列を調べる目的であるため、調べたい塩基配列がわからない以上、Fw プライマーが作れない。そこでアンカー配列を故意に付加し、このアンカー配列の相補配列から Fw プライマーを作製し PCR に用いた。

テーリング反応の前に、RNaseH 処理後の cDNA を、WizardSV Gel and PCR Clean-Up System (promega 社) で精製し、50 μ l の nucleotide-free の水で抽出した。この cDNA 溶液の 10 μ l に、 $\times 5$ TdT buffer を 5 μ l、0.1 % BSA (bovine serum albumin) を 2.5 μ l、2 mM dCTP を 2.5 μ l を加え、滅菌水で 24 μ l にメスアップしてから、94 $^{\circ}$ C で 2 分インキュベートした。これを 2 分間氷冷してから、1 μ l の TdT (ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ) を添加し、37 $^{\circ}$ C で 10 分、65 $^{\circ}$ C で 10 分のインキュベートを行い、反応終了後は -30 $^{\circ}$ C で保存した。これらのインキュベートは PCR 用のサーマルサイクラーで行った。

NtSTOP1 相同遺伝子の単離

コドン表をみればわかるように、合成されるアミノ酸が 20 種類であるのに対し、3 つの塩基配列の組み合わせは 4 の 3 乗で 64 通り存在するが、この現象を、遺伝暗号の縮重または縮退 (degeneration) という。すでに書いたように、STOP のジンクフィンガードメインにおけるアミノ酸配列の相同性が高いため、ゲノムデータベースを使って、このドメインから予想される塩基配列についてこの縮重を利用して作製した degenerate-プライマー (Table 3) を用いて degenerate-PCR を行った。設計した degenerate-プライマー配列及び *STOP1* 相同遺伝子単離の際に使用したプライマー配列は Table 3. に記す。degenerate-PCR 及び RACE 法では 1stPCR 産物を使用し、nested プライマーにより 2ndPCR を行うが、2ndPCR に使われる鋳型 DNA の初期濃

度が過剰に濃いために、非特異的な鎖の増幅が起こりうる。これに対応するために、PCR プログラムをステップダウン方式にし、1stPCR 後の産物を 100 倍に希釈して 2ndPCR を行った。このステップダウン方式では、通常の 3 ステップ PCR (スタンダードとも呼ばれる) に似た方式をとるが、異なる点として、アニーリング温度をプライマーの T_m 値よりも少し高めに設定し、PCR 開始から初めの数ステップで徐々に下げしていく (Figure 3)。これにより特異的なアニーリングの確率を高めることができ、非特異的な増幅鎖を減らすことを目的とした。なお、1stPCR は 10 μ l の系で、2ndPCR は 50 μ l の系で行った。溶液組成は、10 μ l の系で、 $\times 10$ Ex taq buffer を 1 μ l、2 mM dNTP を 0.8 μ l、5 μ M Fw 及び Rv プライマーを 1 μ l、鋳型 DNA を 1 μ l、滅菌水を 5.15 μ l を混合したあとに、Ex taq (Takara 社) を 0.05 μ l 加え PCR に使用した (Table. 4)。5'RACE のときのプライマーは 1st PCR で oligo dG AAP、2ndPCR では AUAP というプライマーを使用した。3'RACE のときには 2 回とも oligodT プライマーを使用した。PCR 溶液の系を増加した際には、試薬も等倍に加え溶液を調整した。

エタノール沈殿による DNA の濃縮

大抵の場合のように、PCR 産物の量は形質転換に用いるには薄いため、のちの実験の使用に適した核酸濃度に上げるためにエタノール沈殿による DNA 濃縮を行った。まず、先の DNA 溶液を滅菌水で 100 μ l にメスアップし、3 M の NaOAc を 10 μ l、100 % エタノールを 200 μ l 加え、ボルテックスで混合して室温で 15 分放置した後に、16,000 rpm、4 $^{\circ}$ C の条件で 20 分間遠心分離した。遠心後の沈殿に 70 % エタノールを 150 μ l 加え再度 16,000 rpm、4 $^{\circ}$ C の条件で 20 分間遠心分離した。最後に上清を捨て、残留したエタノールを減圧乾燥したのちに、10 μ l の滅菌水で濃縮した。次の形質転換用のインサート DNA にはこれを使用した。

STOPI 相同遺伝子単離時の大腸菌 (*Escherichia coli*) への形質転換

1.5 ml チューブに、濃縮したインサート用 DNA 2 μ l とベクター 1 μ l、DNA Ligation Kit ver2.1 (Takara 社) の solution I を 3 μ l を取り、16 $^{\circ}$ C で 6 時間インキュベートすることでライゲーションを行った。PCR で使用した Ex taq には TdT 活性があるため、PCR 産物の 3' 端に合成される塩基の突出を考慮し、ベクターは pT7Blue-Tvector (Takara 社: Figure 4) を用いた。ライゲーション後の 1.5 ml チューブに、50 μ l のコンピテントセル (E.coli JM109 株) を加え 30 分ほど氷上で静置した。次に 42 $^{\circ}$ C のウォーターバスで 45 秒のヒートショックを行い、終了後すぐに 2 分間氷上に静置した。その後、SOC 培地を 250 μ l 加え、1 時間ほど 37 $^{\circ}$ C でインキュベートし、適量の X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside: ナカライテスク社)、及び IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside: ナカライテスク社)、最終濃度を 100 ng/ μ l としたアンピシリン (ampicillin ; Amp: ナカライテスク社) を含む LB 寒天培地にこの大腸菌懸濁液の適量を塗布し、37 $^{\circ}$ C で一晩静置培養した。

プラスミドベクター調整

LB 培地上のコロニーをピックアップし 10 μ l の滅菌水で懸濁し、このうちの 1 μ l を鋳型 DNA に用いた PCR を行いインサートの存在を確認した。このとき pT7Blue-Tvector (Figure 5) 上に配列が存在する、T7 for PT7 プライマーと (5'-AGCTCTAATACGACTCACTATAGG-3') M13M4 プライマーで (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3') 増幅した。PCR プログラムはスタンダード PCR で、94 $^{\circ}$ C / 20 sec、58 $^{\circ}$ C / 20 sec、72 $^{\circ}$ C / 60 sec (3' RACE) または 90 sec (5' RACE) で行った。インサートが確認できた菌体から、3' 側と 5' 側でそれぞれ 4 個体をランダムに選び、菌体懸濁液を適量のアンピシリンを含んだ LB 溶液に 2 μ l 加え 37 $^{\circ}$ C の恒温槽で一晩振とう培養した。次の日に菌体を回収し、QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン

社)を使用してプラスミドを抽出した。

シーケンス反応による塩基配列解読

得られたプラスミドの適量を鋳型 DNA にして Big Dye Terminator ver3.1 (Applied Biosystems 社) のプロトコルに従い PCR を行った後、DNA シーケンサー ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems 社) によりシーケンス反応を行い、Finch TV ver4.1 のソフトウェアにより塩基配列を解読した。この過程の後に、完全長 cDNA 配列に再度シーケンス反応を行い、配列の正確性が確認されたものを GenBank に登録した。このときの cDNA は、PCR における、エラーの少ない、正確な二本鎖 DNA 鎖の増幅効果が期待できる Prime STAR Max (Takara 社) を使った PCR で増幅された。

NtSTOP1 による RNAi ベクターの作製

目的どおりに RNAi を誘発させるために重要なことは、対象遺伝子のみターゲットングであり、つまり選択する塩基配列の特異性である。この特異性は 21 または 22 bp の SiRNA (short interfering RNA) と名付けられた二本鎖 RNA が細胞内でガイドの役割を果たすことで発揮される。RNAi を引き起こさせてやるには、SiRNA を細胞に直接導入してやる方法と RNAi 発現用ベクターを利用して SiRNA を作らせる方法がある。また、RNAi 発現用ベクターの作り方には大きく分けてヘアピン (ステムループ) 型とタンデム型の二つのどちらかが使われるが、今回は植物体における長期的な *NtSTOP1* の発現抑制を目的としたため、バイナリーベクターである pBI121 のマルチクローニングサイト上の制限酵素 Xba I と Sma I (どちらも TOYOBO 社) の間にヘアピン型の遺伝子カセットをつなぐ方法で作製した。この際 RNAi の効果を安定させるため、シロイヌナズナの細胞質内イソクエン酸脱水素酵素 (CICDH: cytosolic iso-citrate dehydrogenase; At1g65930) の 1 つ目のイントロン配列をループ配列に利

用した (Figure 6)。

一般に、mRNA の UTR (un-translational region) 配列はそれぞれの遺伝子ごとに個体内での塩基配列の特異性が高く、特定の遺伝子のターゲティングに利用するには有利である。そこでまず、*NtSTOP1* 上の、開始 ATG を 0 とした、-87 から 225 までの 312 塩基を PCR で増幅するため、5' 側に制限酵素の切断と認識のためのアダプター配列を付加したプライマーを作製した。PCR taq には Prime STAR Max を使った。アンチセンス鎖には Sma I 用の配列を付加したプライマーで、また CICDH のイントロン配列を BamH I 用の配列を付加したプライマーを使って増幅してから、これらの増幅鎖を融合させた DNA 断片を得た。この断片と pBI121 を、プロトコルに従って、順番に制限酵素処理してから、DNA Ligation Kit ver2.1 (Takara 社) を用いてつないだ。次いで、センス鎖には Xba I、Sac I 用の配列を付加し PCR で増幅した。この断片と、先のアンチセンス-CICDH イントロン配列をつないだ pBI121 ベクターも *NtSTOP1* 単離時と同様のライゲーション手法でつなぎ、RNAi 用ベクターは完成した。このベクターを一度大腸菌 (*Escherichia coli*, DH5 α 株) に導入し、100 ng / μ l のカナマイシン (ナカライテスク社) を含む LB 培地で 1 晩 37 °C で静置培養し増幅した。翌日、QIAprep Spin Miniprep Kit を使用してプラスミドベクターを抽出し、シーケンズ反応による塩基配列解読、の項と同じ方法で塩基配列を解読し、配列にエラーのなかったものを後の実験過程に使用した。

NtSTOP1-KD ラインの作製

上述のエレクトロポレーション法により *NtSTOP1*-KD ベクターが形質転換されたアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404 株) をリーフディスク法 (Horsch et al., 1985) により感染させた。感染後の植物個体らはカナマイシン (ナカライテスク社) を含む無菌 MS (Murashige&Skoog) 培地上でスクリーニングされながら、

22 °C、明期 / 暗期が 12 時間 / 12 時間となる環境で育てられ、組換え体の種子が得られた。しかし、この時点では感染していても、遺伝形質は、*NtSTOP1* についてヘテロ変異系統、劣性変異系統の二つが存在しうるため、これらを自家交配させ劣性変異系統を得た。後述する KD 系統は全てこの劣性変異系統を使ったものである。また、これらの KD 系統における *NtSTOP1* の転写抑制の効果を、Actin 遺伝子 (*NtAct*) を内部標準遺伝子として半定量的 PCR (semi-quantitative PCR) により評価した (Figure 6B)。PCR 後の産物はアガロース電気泳動後に SYBR Nucleic Acid Gel Stain (invitrogen 社) で染色を行い、ゲルの撮影は AE-6932GXES-US (アトー社) で行った。

根長試験によるタバコのイオンストレス強度及び低 pH ストレス耐性レベルの評価

RNA 抽出の際と同様に、プラスチックマウント上で生育させる水耕栽培法で行った。遮光し 4 °C で 4 日間吸水させたタバコの種子を野生株、KD ラインとも 15 粒ずつ播種した。KD ラインは 3 ライン選択した。イオンを含む栽培溶液は 1/50 濃度 *MGRL* 溶液をベースに、植物における重金属障害の原因イオンともなっているカドミウム (4 μM Cd^{2+})、 Al^{3+} と同じ 3 価のカチオンであるランタン (0.4 μM La^{3+})、酸性土壌において植物への取り込み阻害がマンガン (200 μM Mn^{2+})、そして AlCl_3 (4 μM Al^{3+}) を別個で加え、それぞれについて耐性を評価した。また、ストレスフリーを想定したコントロール区は pH5.0 に調製された上記のイオン種を含まない 1/50 濃度 *MGRL* 溶液を使った。

イオンストレス強度の変化に伴う、段階的な表現型の変化を見るための dose 試験では、Al ストレスには pH5.0 で最終濃度が 2 または 4 μM となるような塩化アルミニウム (AlCl_3) を含む 1/50 濃度 *MGRL* 溶液、低 pH ストレスには AlCl_3 を加えず pH を 5.2、5.0 または 4.7 に HCl で調製した 1/50 濃度 *MGRL* 溶液を使用した。水耕栽培の *MGRL* 溶液は、溶液に在中する無機栄養の枯渇や空気中の二酸化炭素が溶解されることによ

る水耕溶液の pH 及び水温の変化、そして二次的な根の伸長による正確な測定の防止等を考慮し 2 日毎に溶液を交換し、7 日間栽培した幼植物体の根長を測定した。このときのストレスフリーを想定したコントロール区は pH5.5 に調製された、 AlCl_3 を含まない 1/50 濃度 *MGRL* 溶液を使った。根長の測定は、スライドガラスに幼植物体を乗せ、顕微鏡 (Pico Scopeman、KENIS、Tokyo、Japan) と微小計測ユニット (MC-300、KENIS) により、モニターの画像上で行った。測定後、各溶液で栽培した個体のうち、コントロール区の平均値に対し、各ストレス区の各上位 5 個体の絶対長の割合を示したものを相対長とし、標準偏差を算出し同様に図示化した。また、低 pH ストレス区については根伸長から見て上位 5 個体の平均値及び標準偏差を求め、絶対長を図示化した。

Al ストレス応答式に放出される有機酸測定

まず野生株と *NtSTOP1-KD* 系統のタバコの種子を、事前にオートクレーブ滅菌したプラスチックマウントに播種し、1%ショ糖を含む、pH5.5 に調節した 150 ml の 1/50 濃度 *MGRL* 溶液上で、マウント同様にオートクレーブ滅菌した無菌ポッドの中で 2 週間栽培した。こののち、6 穴シャーレの注いだ 2 ml の 1%ショ糖と 20 μM の AlCl_3 を含む pH 5.0 に調節した同様の滅菌済み溶液上にマウントごと移して 24 時間栽培し Al ストレス処理を行った。対照区には AlCl_3 を含まない溶液を使った。これらの処理溶液中に有機酸が放出されているので、この溶液を各系統とも 1 ml 採取し、Hampp による NADH / NAD⁺ サイクリング法で測定した (Hampp et al., 1984)。無処理区、処理区ともに、測定は各系統とも 3 区ずつ行った。

NtMATE 及び *NtALS3* の単離

サンプリングの前に、それまで水耕栽培していた幼植物体のプラスチックマウントを

20 μM の AlCl_3 を含む pH 5.0 に調節した *MGRL* 溶液に 24 時間の間移し Al ストレス処理を行ったこと以外は *NtSTOP1* の単離の際と同じように degenerate-PCR 及び RACE 法で単離した。MATE、ALS とも同一植物種内でサブファミリーを形成している可能性が高いため、Al ストレスにより誘導されるもののみを単離できることが望ましい。その点を考慮し、*AtALS3* と *AtMATE* の配列を基に GenBank から相同性の高い遺伝子群を選んだ。これらの遺伝子群の塩基配列のクラスタリングにより、相同性の高い配列を選択し degenerate プライマーは作製された (Table 3)。これらのプライマーを使った degenerate-PCR と RACE 法を組み合わせ *NtALS3*、*NtMATE* は単離された。

リアルタイム PCR (RT-real time PCR) によるタバコにおける Al ストレス耐性遺伝子の転写解析

野生株、KD の 3 系統について、既に記した、*NtMATE* 及び *NtALS3* の項と同様の手法で逆転写反応を行い、得られた cDNA をテンプレートとして、Power SYBR Green PCR master mix の使用プロトコルに従って *NtMATE* と *NtALS3* について転写解析を行った。リアルタイム PCR 用の装置には ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems 社) を使った。このとき使用したプライマーは、Primer3 ver0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) というウェブ上のツールを利用して設計した (Table 5)。解析は 3 回反復され得られた結果を図示化した。

1-3 実験結果及び結果に対する考察

NtSTOP1 の単離

プラスミドベクター上の各 *STOP1* 相同遺伝子の断片をシーケンスすると、塩基配列が部分的に異なる断片や（原因は *Ex taq* の正確性と推測）、サイズが異なる断片（遺伝子の重複のためと推測）が単離された。塩基配列が異なる断片は、CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) で共通塩基配列を選び出した。これにより単離された *NtSTOP1* は 514 個のアミノ酸で構成されており cDNA の全長は 1761bp であった。この得られた配列を NCBI における BLAST 検索を利用して *AtSTOP1* との相同性の比較を試みると、cDNA 配列で 76 %、全長アミノ酸配列で 54 %、ジンクフィンガードメイン (*NtSTOP1* aa.266-385) のみでの比較は 90 %であった。また、同じ手法でナス科植物であるトマト (*Solanum lycopersicum*) のもつ *STOP1* 候補と比較してみると、相同性は cDNA (XM_004250324.1) で 88 %、全長アミノ酸配列 (XP_004250372) で 86 %、ジンクフィンガードメイン間の比較では 99 %を示し、どの比較パターンもシロイヌナズナより同じ科の植物であるトマトとの近いことがわかった。*NtSTOP1* について、総合的なバイオインフォマティクスサイトである EMBL-EBI (InterPro: protein sequence analysis & classification ; <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) を利用してドメイン検索を行った結果、*AtSTOP1* と同じく C2H2 タイプ（もしくは C2H2 様）のジンクフィンガードメインが検出された。さらにウェブツール、WoLF PSORT (<http://wolfpsort.org/>) を利用して細胞内局在についても検定した。検定方法は、このツールが利用できる、局在先のわかっているリファレンスタンパクのアミノ酸配列の相同性で判断するタイプである。リファレンスに選ばれた 14 個のうち 12 個が核内に局在する性質をもつものであったことから、*NtSTOP1* も核内に局在する確率が高いことが示された。

NtSTOP1-KD 株を使った根長試験による表現型の解析

実験当初、タバコにおける Al 及び低 pH ストレス耐性強度は未知数であり、また NtSTOP1 が介入する耐性機構が果たして Al 及び低 pH ストレス特異的かどうかを判断する必要があったため、 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 、 La^{3+} 、のそれぞれのイオン種を含む水耕溶液で KD 株を生育させた (Figure 7)。これら 4 種類のイオンストレス種についての耐性評価では、Al ストレス下において、NtSTOP1-KD 株は野生株よりも根伸長阻害が強く表れた。そこでイオン種を Al に限定し、段階的なストレス強度変化で見えていくと、KD 株では 2 μM の Al 濃度でも伸長阻害が表れ始める系統が見られ、伸長阻害の差分からみても野生株よりも、見るからに、KD 株系統のほうが受ける阻害の強さは大きい (Figure 8)。NtSTOP1 の作用が Al 特異的に表れたことから、酸性土壌におけるもうひとつの主要な障害要因である低 pH ストレスについても調べることにした。対照区である pH5.5 から少しずつ pH が下降していくにつれ、野生株も KD 株も発育が悪くなっていったが、こちらは Al ストレス下と違って顕著な差が表れなかった (Figure 8 & 9)。

なお、Figure 8 のデータには記載されていないが、pH5.0 環境では、6 μM の Al 濃度によって野生株は 50 %程度の、12 μM の Al 濃度で 80 %以上の根伸長阻害を受けることが予備実験で確認されている。同様の予備実験で、低 pH ストレスについても、pH4.75 の地点で 50 %程度の根伸長阻害を受け、pH4.0 に至ると、90 %ほどの根伸長阻害が生じることが分かった。至適 pH を模索する中で、逆に pH6.0 での根長試験も試みられたが、これは pH5.5 での生育結果よりも良くならなかった。

Al ストレス応答性の有機酸放出測定

序論でも述べたように、Al ストレスによって根圏へ放出される有機酸の種類は植物種によって異なる。しかし、植物におけるメジャーな報告例はリンゴ酸若しくはクエン

酸の放出であり、また、この 2 種類に関係するトランスポーターとそれをコードする遺伝子に関する分子生物学的な情報がそれぞれ豊富であることから、これら 2 つについてタバコでは AI ストレスによって誘導されるかを検定した。クエン酸について、野生株ではどの KD 系統における誘導よりも大きく、AI ストレス処理によって 10 倍以上の根圏への放出量が観測された (Figure 10, left)。他方、リンゴ酸は野生株であっても根圏へ放出される絶対量が少なく、AI による放出の誘導もクエン酸のように大きく変化するものではなかった。また、KD 系統であっても、絶対放出量が野生株よりも下回る動きはあまり見受けられなかった (Figure 10, right)。このことから、AI ストレス環境において、クエン酸はタバコから放出される主要な有機酸であることが理解できた。

NtALS3、*NtMATE* の単離

これらの単離は上記の有機酸放出測定の結果を確認してから行われた。*NtSTOP1* の単離のときのように、*AtALS3* と *AtMATE* の配列を基に GenBank から相同性の高い遺伝子群を選んだ。これらの保存性の高い塩基配列から、Table 3 に記したプライマーを作製し、degenerate-PCR と RACE 法を組み合わせると *NtALS3*、*NtMATE* は単離された。単離されたこれらの相同遺伝子は *NtMATE* ; GenBank AB811784, *NtALS3* ; GenBank AB811783 として GenBank に登録された。

リアルタイム PCR による *NtALS3* と *NtMATE* の転写解析

無処理区の野生株における遺伝子の転写量を 1 として、無処理区の KD 系統、AI 処理区の野生株と KD 系統における転写レベルの変化を解析した。野生株における *NtMATE* は AI ストレス処理の有無で 100 倍以上の転写誘導が起きており、先のクエン酸の放出の誘導を示唆していることが分かった (Figure 11A)。そして KD 系統においてこの遺伝子の転写レベルは野生株と有意に差が出たことから、*NtSTOP1* は

NtMATE の転写制御を司っていることが理解された。対して AI ストレス処理による *NtALS3* の転写誘導は *NtMATE* に比べて変化が圧倒的に小さいが、野生株に対して KD 系統では *NtALS3* の転写レベルは有意に低いことから、*NtALS3* もまた *NtSTOP1* による転写制御を受けているものと考えられた (Figure 11B)。

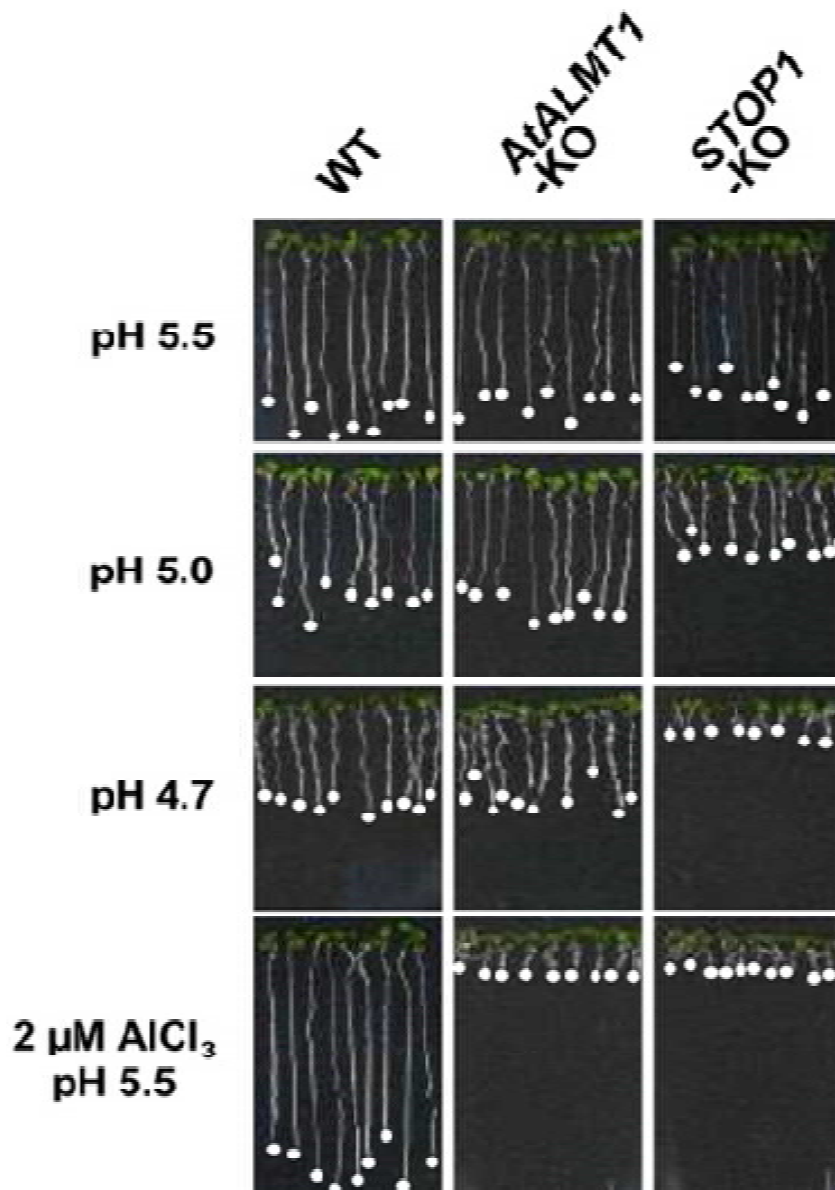


Figure 1

Growth response of compared with that of *STOP1*-KO and *AtALMT1*-KO with Al and H⁺ rhizotoxicities. In *STOP1*-KO, distracted *STOP1* gene plant, root growth is greatly inhibited in low-pH, such as pH4.7, conditions and as *ALMT1*-KO, distracted *ALMT1* gene plant, could not elongate their roots. Therefore, *STOP1* is the necessary factor to gain Al and low pH stress tolerance. (Iuchi et al., 2007)

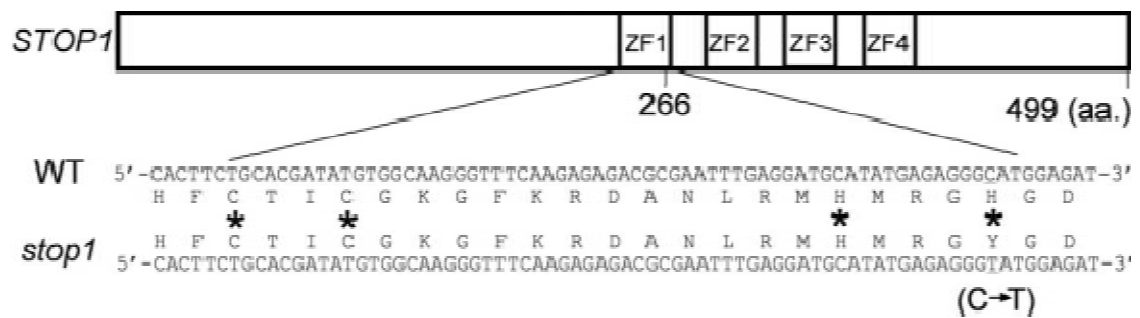


Figure 2

Schematic representation of the overall domain structure and *stop1* mutation. The four zinc-fingers (ZF1–ZF4) and the position of the *stop1* mutation are also indicated. Asterisks indicate conserved motif of zinc-fingers. STOP1 could not to link with Zn^{2+} because of substitution of 266th amino acid residue His to Tyr.

Table 1. constitution of custom-MGRL(*MGRL*) mediate

Element	final-concentration
$(\text{NH}_4)_6\text{MO}_4\text{O}_7$	24 nM
H_3BO_4	30 nM
CoCl_2	130 nM
ZnSO_4	1.0 μM
CuSO_4	1.0 μM
FeSO_4	8.6 μM
MnSO_4	10.3 μM
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	67 μM
MgSO_4	1.5 mM
CaCl_2	2.0 mM
KNO_3	3.0 mM
NaNO_3	4.0 mM

Table 2. solution of reverse-transcription for RACE

reagent	volume(μ l)
10 mM dNTP	1
\times 5 RTase buffer	5
10 μ M oligo dT primer	1
RNase-free water] 17.5
template-RNA	
20 U/ μ l RNase inhibitor	0.5
100 U/ μ l RTase	1
total	25

Table 3. Sequence information of PCR primes for degenerated PCR

PCR category	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
STOP1-like protein 1st PCR	TGYGGIAARGGITYAARMSIGAYGC	GAYGCI AAYYTIHSIATGCAYATG
STOP1-like protein 2nd PCR	CCRCARTGYTTYTCRTGIGT	GAYGCI AAYYTIHSIATGCAYATG
	I...inosine R...AorG Y...CorT S...CorG M...AorC	
Citerate transporting MATE 1st PCR	GSIGGIGTIGGIGTWTCIATWGC	TTIAYCCRTCIAAIAACAAAIGGIA
Citerate transporting MATE 2nd PCR	TMACRACITCITTYGTIGCIGA	GCIARIGAIARIAIAIWGCIGGIG
ALS3-like protein 1st PCR	ATIGGITYGTIYTSAITTCAT	GTRAARAAGMIGGCCAICAIAAG
ALS3-like protein 2nd PCR	TGGATCITICTIGYITAYITYTTCA	AICATRTTCATTIACIACIATYTG
oligo dG-AP (Fw)	GGCCACGGTCGACTAGTACGGIIGGGIIGGIG	
AUAP (Fw)	GGCCACGGTCGACTAGTAC	
oligo dT primer (Rv)	CTGATCTAGAGGTACCGGATCCTTTTTTTTTTTTTT	

3step-stepdown-PCR for degenerate PCR and RACE

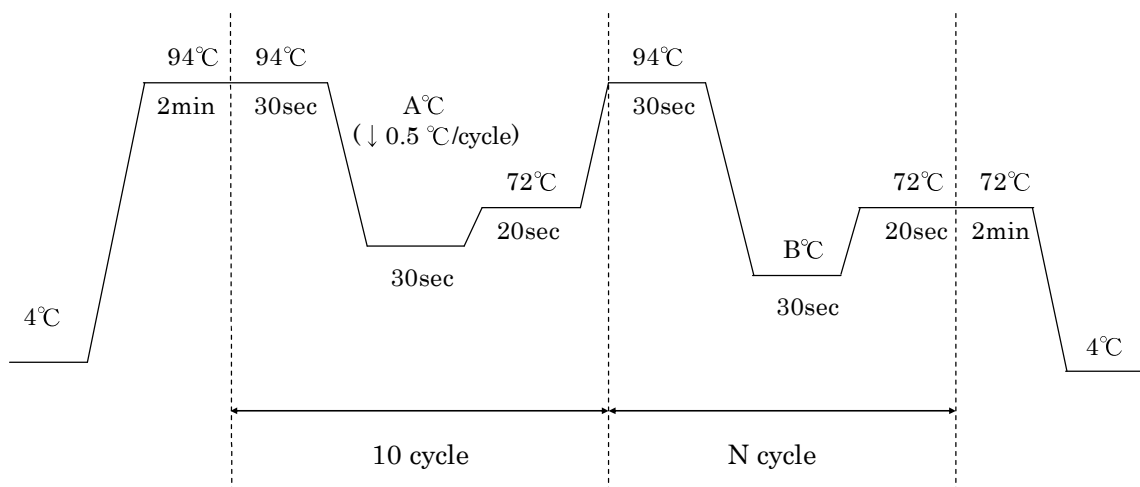


Figure 3

Scheme of step-down PCR program for RACE or degenerate-PCR.

Table 4. constitution of PCR solution

reagent	volume($\mu\text{l}/10 \mu\text{l}$)
2 mM dNTP	0.8
$\times 10$ Ex buffer	1
5 μM Forward primer	1
5 μM Reverse primer	1
Ex taq	0.05
H ₂ O	5.15
template-DNA	1
total	10

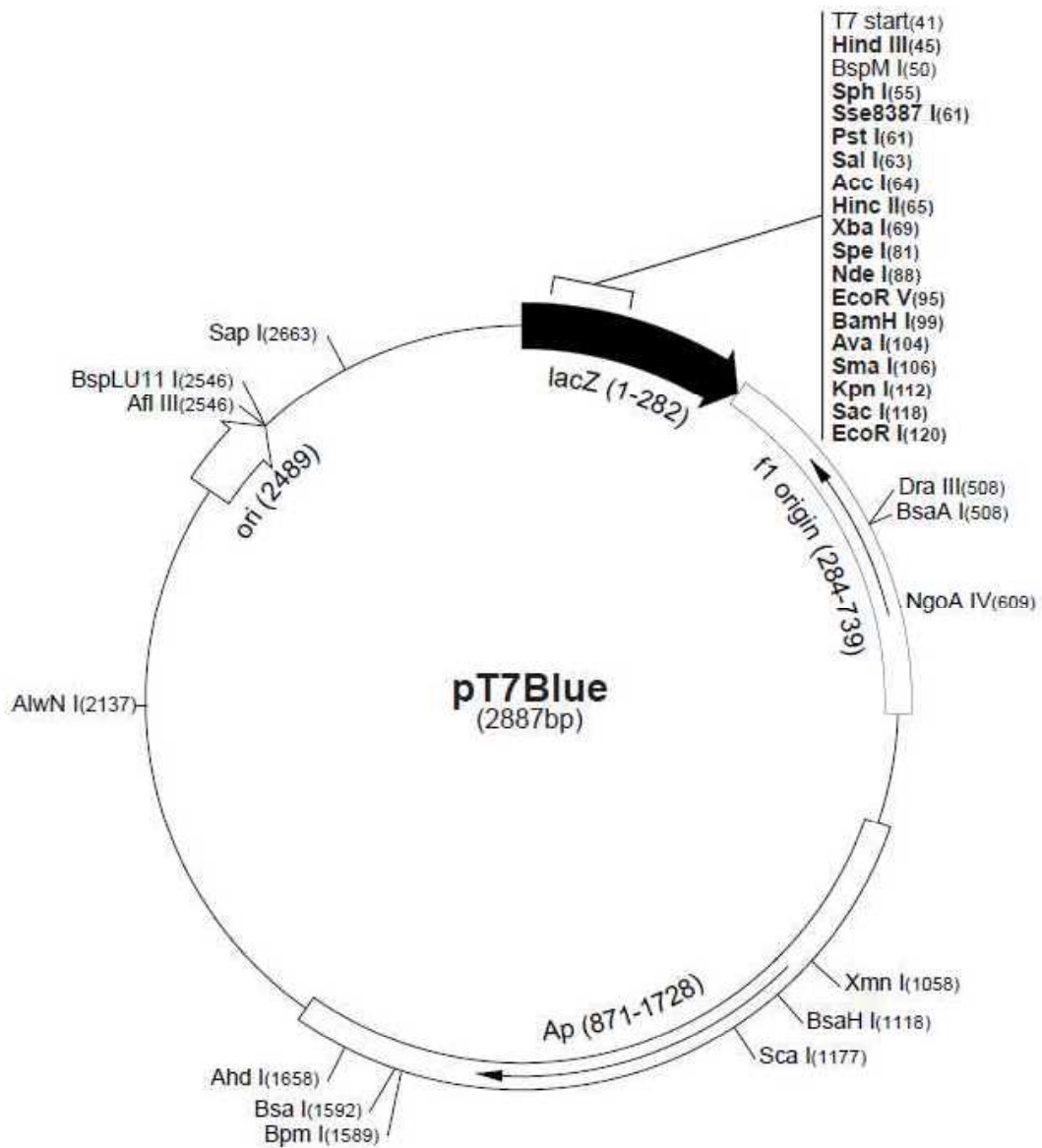


Figure 4

The whole genomic map of pT7Blue vector. The black arrow's part contains multiple-cloning-site (MCS). This vector was used for transformation to E.coli. This image can be downloaded from Novagen's website.

(http://www.merckmillipore.jp/life-science-research/vector-table-novagen-pt7blue-vector-table/japanese/c_HICb.s1Ozp8AAAAEhEV0Ldcaf)

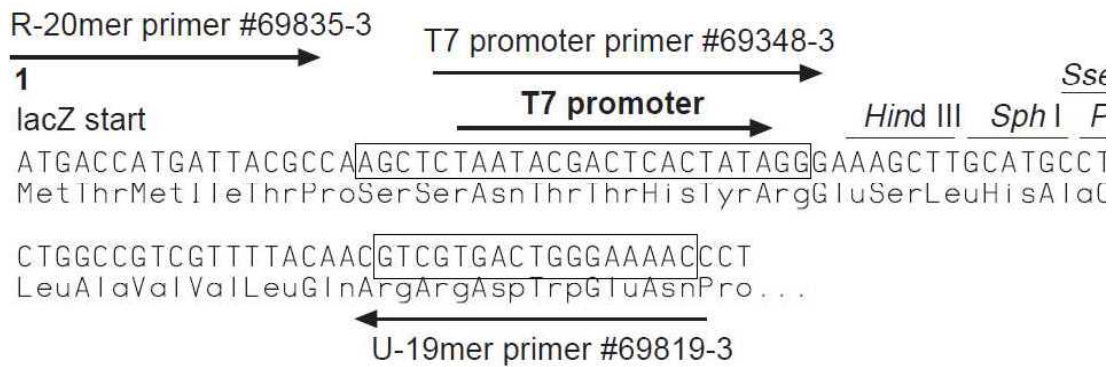


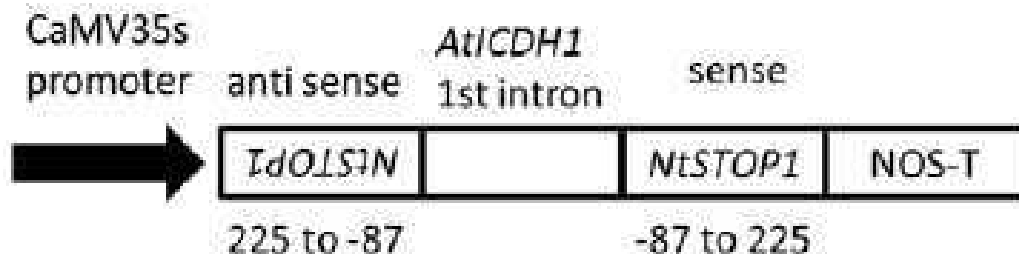
Figure 5

Sequences of T7 for pT7 primer and M13M4 primer and possession of lacZ region in pT7Blue vector. Both primers were used with colony-PCR for confirming presence of insert DNA fragment, and sequencing. The distance between T7 for pT7 and M13M4 is about 144bp.

Table 5. Sequence information of PCR primers for RT-PCR

PCR category	Sequence (5' to 3')	
	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
<i>NtMATE</i>	CAGCATTGTGTTCTTGCTCATTG	GCCTATCCTCCCGAAACCA
<i>NtALS3</i>	TCGCGATGACATCAAGATACAA	CAGGAGATAGAGCAA TAACCAACGA
<i>NtAct</i>	AACCCCAAGGCCAATAGAGAA	GAGACACCATCACCAGAAATCCA
<i>AtALMT1</i> (At1g08430)	GGCCGACCGTGCTATACGAG	CATGAGTCCTGTGAACTCCC
<i>ALS3</i> (At1g08430)	TATCGATCCTTGCCGGGACTTCA	GCTTGCTTGGCGTTGCTCCTA
<i>AtMATE</i> (At1g51340)	CCTTAGCGTTTGTGTTTCGATGGAG	ACCATGAGTCGATGAGAGGAAGAG
<i>Ubq1</i> (At3g2590)	AGAGCTGTCAACTGCAGGAAGAA	ACAAGAAAACAACCCCTATCAAAGG

A



B

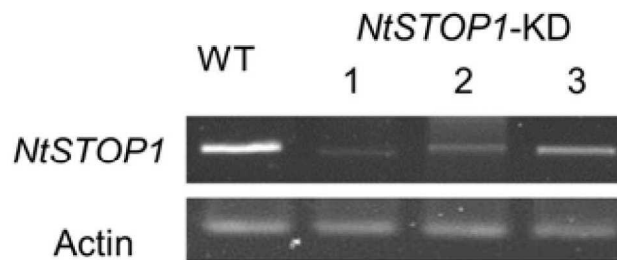


Figure 6

Transgenic tobacco plants with *NtSTOP1* suppressed by RNAi inhibition. These were obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation using a vector carrying an *NtSTOP1* RNAi construct. Partial cDNA of *NtSTOP1* sandwiched the first intron of NADP-ICDH of *Arabidopsis*, and the gene construct was driven by the Cauliflower mosaic virus 35S promoter (A). Suppression of *NtSTOP1* was analyzed in T3 seed progeny of three independent transgenic lines (*NtSTOP1*-KD1, 2, and 3) by RT-PCR using *Actin* as the internal control (B).

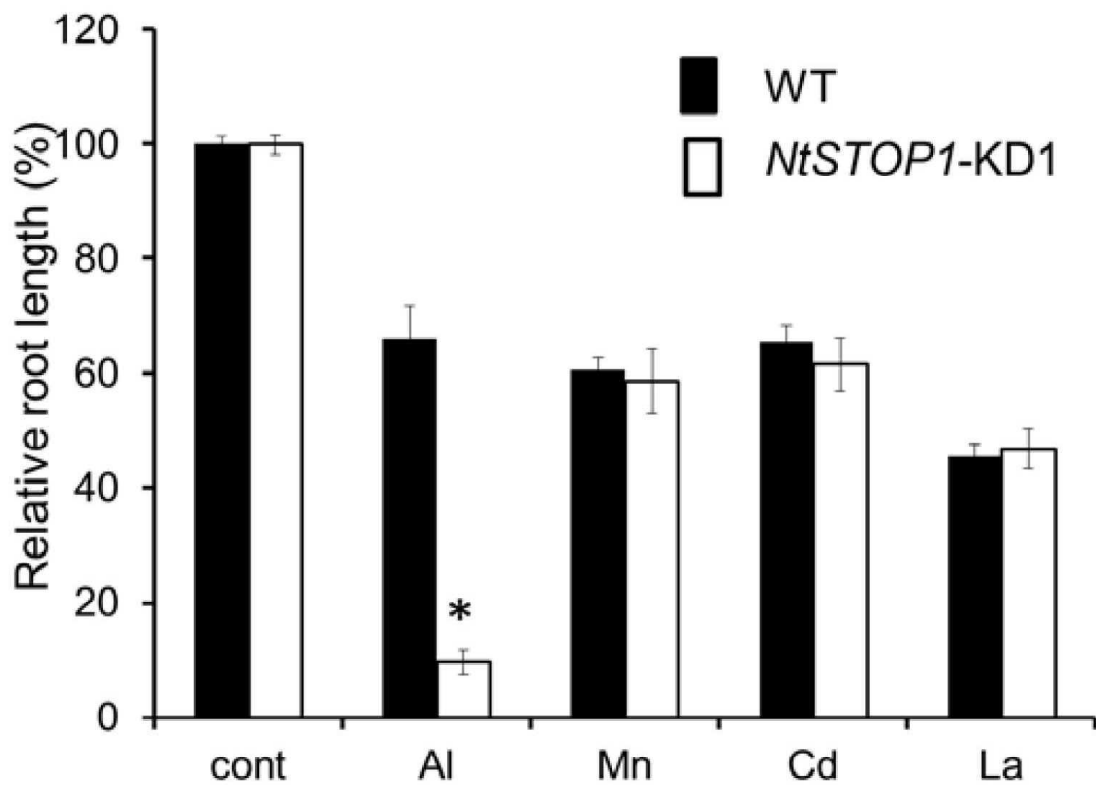


Figure 7

Tolerance of *NtSTOP1*-KD1 to rhizotoxic metals was compared with that of WT. Means and SD of relative root length (+toxicants/control) are shown ($n = 5$). Tolerance to toxic metals was tested by adding the following compounds to control (pH 5.0, no toxicant) solution: 4 μM CdCl_2 , 0.4 μM LaCl_3 , 200 μM MnSO_4 , or 4.0 μM AlCl_3 . Asterisks indicate significant difference as compared with WT (t -test, $p < 0.05$)

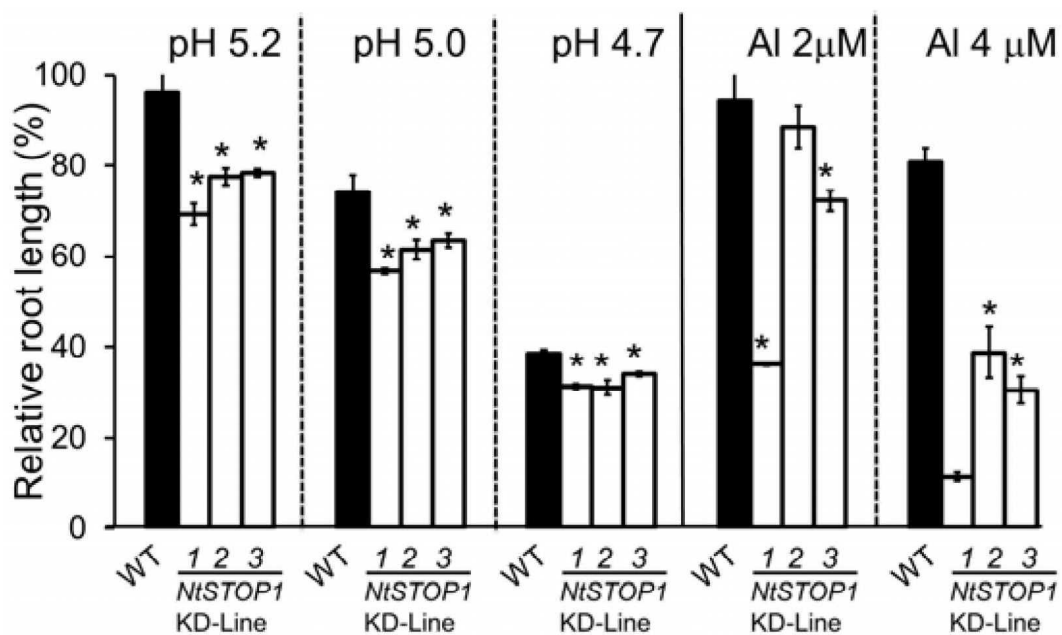


Figure 8

Al- and H⁺-tolerance of transgenic tobacco plants with *NtSTOP1* suppressed by RNAi inhibition. Transgenic tobacco was obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation using a vector carrying an *NtSTOP1* RNAi construct. Seedlings of T3 seed progenies of *NtSTOP1*-KD and wild-type (WT) were grown hydroponically for 1 week in Al-toxic solutions (pH 5.0, 2 and 4 μM) and different levels of H⁺ toxicity (pH 5.2, 5.0, and 4.7). Means and SD of relative values (% of control; pH 5.0, 0Al for Al, pH 5.5 for pH from five seedlings are shown.

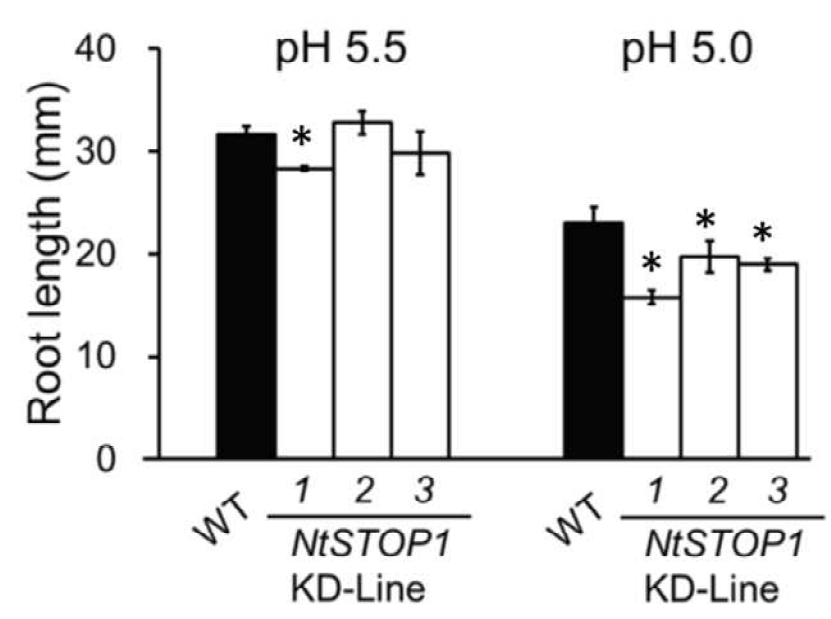


Figure 9

Root growth of tobacco seedlings in hydroponic culture at pHs 5.5 and 5.0. Wild type and NtSTOP1-KD lines were grown in hydroponic solutions at pHs 5.5. and 5.0 for 1 week. Root length at pH 5.5 was used as control for evaluating H⁺ tolerance, while that at pH 5.0 was used as control for evaluating Al-tolerance. Asterisks indicate significant difference as compared with WT (*t*-test, $p < 0.05$)

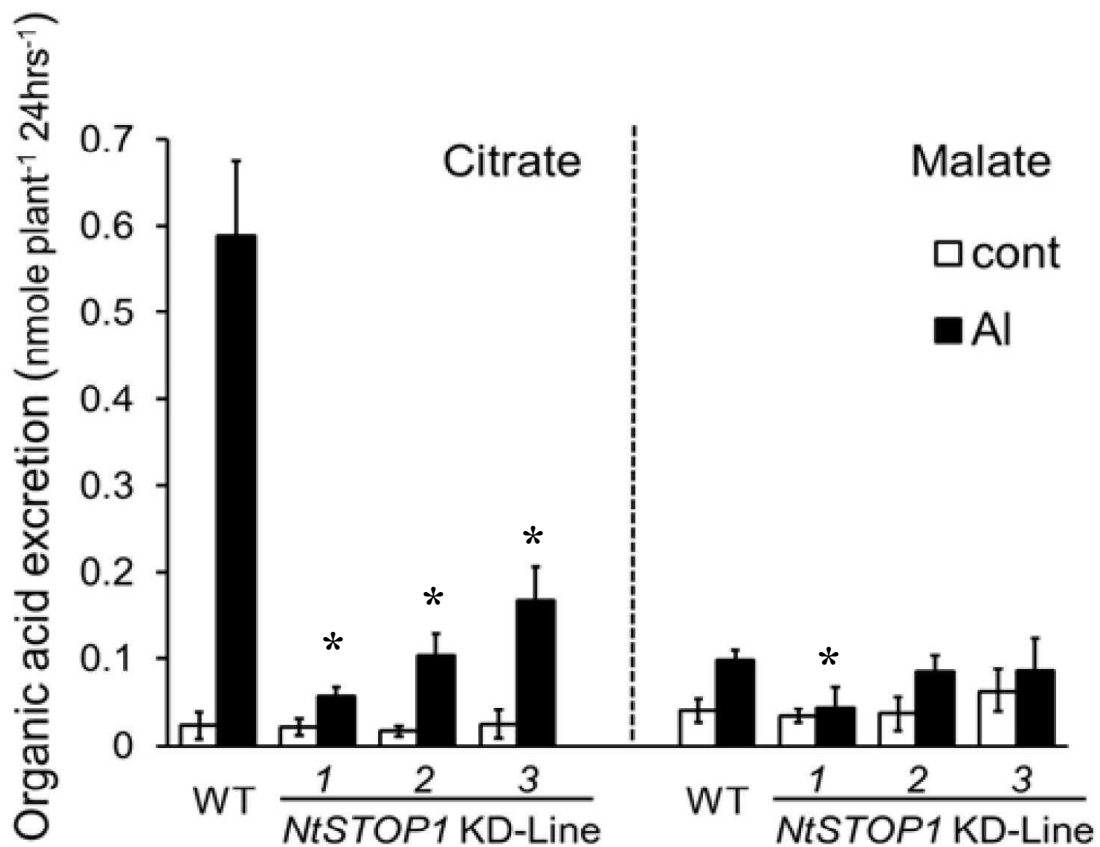
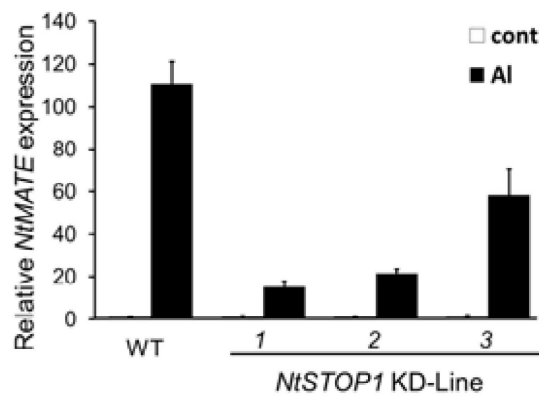


Figure 10

Aluminum accumulation in root tip and organic acid excretion in response to Al. Citrate and malate excretion from roots of WT and *NtSTOP1*-KD lines in control (pH 5.0, Al 0) and Al-containing (20 μ M, pH 5.0) solutions for 24 h. White bars, mean values in control solution (\pm SD). Black bars, mean values in Al solutions ($n = 3$). Asterisks indicate significant difference between complemented line and WT in either conditions respectively. (t -test, $p < 0.05$)

A



B

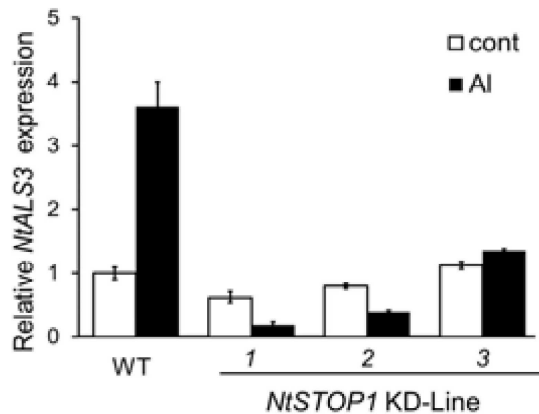


Figure 11

Transcript levels of genes orthologous to those associated with Al tolerance in *Arabidopsis* in *NtSTOP1-KD* lines. Seedlings were incubated in Al-toxic (pH 5.0, 20 μ M Al) or control (pH 5.0, no Al) solution for 24 h, and root samples were used for transcript analyses. Transcript levels of citrate-transporting MATE, *NtMATE* (homologous to *AtMATE*) (A), and *NtALS3* (homologous to *AtALS3*) (B), were compared between *NtSTOP1* KD lines and wild-type (WT). Transcript levels were relatively quantified by real-time PCR using *Actin* as the internal control, and then fold-change (relative to WT control) values were calculated. Means and SD of three replications are shown.

第2章 異种植物 STOP1 の単離・同定及びそれを用いた相補組換え体シロイヌナズナの機能解析

2-1 緒言

1章でしめされたように、タバコは STOP1 相同転写因子、NtSTOP1 を介した Al 耐性機構を持っていた。しかしその主要な耐性機構はシロイヌナズナが ALMT1 トランスポーターを經由したリンゴ酸を放出するのと異なり、タバコは MATE トランスポーターを經由したクエン酸放出機構をもっていた。ここまでは、今までの世界中の多くの研究報告から示されてきたように、何ら驚くようなことではないが、異なる耐性機構のどちらもがオーソログス (orthologous) な関係にある共通の転写因子によって制御されているという事実は興味深い事である。そこで一つの疑問がわいてきた。Al ストレス耐性機構が STOP1 の種類によって変化するか、言い換えれば、放出される有機酸の種類は STOP1 の一次構造によって決定されているかということである。ここで改めて、シロイヌナズナにおける Al ストレス耐性の獲得に関係する遺伝子を確認してみる。シロイヌナズナでは、Al ストレスによる ALMT1 の転写誘導の変化に伴うリンゴ酸放出量の増減が 2007 年に小林らによって報告されていることから、ALMT1 の転写誘導によって各相補組換え体ラインの相補程度が説明できる。また、MATE を介したクエン酸放出も、放出量そのものは少ないが、MATE の転写レベルの増減に伴って起きている (Liu et al., 2009) ため、MATE についても同様の説明ができることと考えられる。リンゴ酸とクエン酸以外の有機酸種が放出されるどうかは示されていないが、ALS3 変異株を使った実験で生育が阻害されると言われているから、ALS3 が関わる耐性機構も示唆されている (Larsen et al., 1997 and 2005)。これらは AtSTOP1 の存在によって転

写レベルが誘導されることが分かっているが、異種 STOP1 の存在によって誘導されるか否かは定かではない。

かたや、Al ストレスとは別に、低 pH ストレスについても研究成果を簡潔に列挙してみると、低 pH 環境が植物にもたらすストレスというものの実態は、分子生物の比較的微視的なスケールでは情報は未だに少ない。植物が低 pH ストレスを受けると、細胞レベル・分子レベルにおいて様々な理由で根伸長が阻害されることが報告されている。植物の細胞内の pH は、オオムギを用いた実験で知られるように、 K^+ の濃度調節で正常に保たれており (Walker D.J. et al., 1998)、植物体内における pH 変化としては、例えば細胞膜上の H^+ -ATPase の活性、加水分解型 ATPase の作用、プロトンポンプ (Yan et al., 1998) など、細胞のプロトン濃度勾配を調節する役割に参与するものから多くみられる。このプロトン濃度勾配は、水耕栽培溶液などの外部環境からの受動的流入により細胞内 pH の低下を生じさせることも報告されている (Bose et al., 2010) が、植物における低 pH ストレス障害の全貌は報告されていないし、もちろん生理的な耐性機構を説明することのできる遺伝子群も発見されていない。いずれにせよ、 H^+ の活動度 (活量ともいう) が植物の生育不良に大きく関与していることがいえる。植物は短時間 (1~2 時間) の低 pH ストレス処理でも低 pH による生育阻害を受け、また、 Ca^{2+} 濃度の増加により軽減されることがわかっている (Koyama et al., 2001)。また、違う説としては、細胞膜表面上の陽イオンの電荷ポテンシャルによる障害が考えられ (Kinraide et al., 2003)、これについて Ca^{2+} 濃度以外のイオン種の電荷についても調べられたが (Shomer et al., 2006、Kinraide and Wang, 2010)、結局のところ、生理的な障害はよくわかっていない。すると、シロイヌナズナで低 pH ストレス耐性を相補した STOP1 の制御化にある遺伝子群の中に、低 pH ストレス耐性遺伝子が存在しており、生理的な障害もその遺伝子の分子機能に関係したものとするのが合理的である。しかし、2009 年に澤木らが *stop1* を使った比較マイクロアレイ解析でリストに挙がってきた遺伝子群につ

いての単一遺伝子破壊株と過剰発現株を用いて行った根長試験では、STOP1 相同遺伝子として見られた *STOP2* 以外のどの遺伝子についても、どちらも低 pH ストレス条件に対して変化を示さなかった (Kobayashi et al., 2013)。このことから、低 pH ストレスとは様々な条件が関与している複合的ストレスとも、これらの遺伝子群は低 pH ストレス下での植物の根伸長の向上に影響をもたらさないとも考えられるため、とても判断が難しい。従って、今一度、低 pH という環境ストレスそのものと、その環境に対する STOP1 という転写因子の機能を正確に理解することが必要になってくると考えられる。ここで、1 章でのタバコにおける実験結果を振り返ってみると、NtSTOP1 の低 pH ストレス耐性への寄与については、シロイヌナズナにおけるような AtSTOP1 のようにはっきりしたものではなかった。この理由が、タバコの植物にもたらす NtSTOP1 の分子的機能に関係するのを見るべく、低 pH ストレス耐性の程度が比較的わかっているシロイヌナズナを使って吟味する手法が考えられた。

そこで以上のことを調べることを目的に、NtSTOP1 による相補組換え体シロイヌナズナの表現型解析と転写解析を行った。このときタバコ以外にも、作業仮説も目的もなくミヤコグサ、ヒメツリガネゴケ、チャノキ、ヨーロッパクロヤマナラシの植物体からも *STOP1* 相同遺伝子を単離し、シロイヌナズナを宿主植物とした相補組換え体も作製されたので、*NtSTOP1* 相補組換え体と共に解析に使うことにした。

2-2 材料及び方法

total-RNA 抽出用の植物体の栽培

1 章に記述されたものと同じ手法で行った。

植物体からの total-RNA 抽出操作

鈴木らの RNA 抽出法に従い抽出した (Suzuki et al., 2004)。具体的な流れは 1 章に記した通りである。

DNase 処理

RNA の抽出後に、1 章に記した方法で行った。なお、塩化リチウム処理は省略した。

濃度・純度測定

DNase 処理後に、1 章に記した方法で行った。

逆転写反応

DNase 処理を経て得られた RNA について、1 章に記した方法で行った。

ポリ C テーリング反応 (dC-tailing) 反応

5' RACE の際に、1 章に記した方法で行った。

STOP1 相同遺伝子の単離

1 章に記した方法で行った。

エタノール沈殿による DNA の濃縮

1 章に記したものと同一方法で行った。

STOP1 相同遺伝子単離時の大腸菌 (*Escherichia coli*) への形質転換

1 章に記したものと同一方法で行った。

シーケンス反応による塩基配列解読

1 章に記したものと同一方法で行った。

植物体への形質転換用バイナリーベクターの作製

初めに、学術的根拠の示されていない *AtSTOP1* プロモーター (2848bp) 及び *AtSTOP1* 下流 (626bp) 配列の上流に、制限酵素 Sfi I の切断用のアダプター配列をつけたプライマーを作製した。このプライマーを使って *AtSTOP1* のプロモーター配列で制御した各 *STOP1* 相同遺伝子の CDS 配列を Prime STAR Max (Takara 社) のプロトコルに従って増幅した。単離された各 *STOP1* 塩基配列と、バイナリーベクター pBE2113 に付けた Sfi I の認識配列 5'-GGCCNNNN[^]NGGCC-3' を 50 °C で 4 時間反応させ切断し、上記と同じ方法でライゲーション反応から大腸菌 (DH-5α 株) への形質転換を行いスクリーニング用に終濃度が 100 ng/μl のカナマイシンを含む LB 培地上に塗布し 1 晩 37 °C で静地培養した。得られた大腸菌中の感染用ベクター (Figure 12) は 1 晩振盪培養されたのちに QIAprep Spin Miniprep Kit によってプラスミドベクターが抽出された。こうして完成したベクターを、シーケンス反応による塩基配列の確認を行った後塩基配列のエラーが無いものについてグリセロールストックにして -80 °C で保存した。

植物体への形質転換

上の方法で作製した各 *STOP1* 相補組換え体ベクターを、エレクトロポレーション法を用いてアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 株に形質転換、Floral dip 法 (Clough and Bent, 1998) によりシロイヌナズナの *stop1* 株へ組み込んだ。これにより感染した種子の世代を T0 世代とし、自家交配を繰り返し T2 世代を得た。以下の実験における相補組換え体とはこの T2 世代の系統を指す。

根長試験による表現型評価

STOP1 相補組換え体シロイヌナズナの表現型について、根長試験により耐性を評価した。このとき、各ストレス耐性の相補及び AtSTOP1 と比較した各 STOP1 の性能を明確に評価するために野生株 (Col-0) と *stop1*、並びに、*stop1* に AtSTOP1 プロモーターで制御した *AtSTOP1* 相補組換え体 (*AtSTOP1-comp*) と共に栽培し試験を行った。この Col-0 及び *stop1* の系統は、3 回戻し交配をかけて遺伝子を安定させたものを使用した (BC3F5)。また対照区となる溶液の pH は 5.5 に調整した。これは過去に行われていた根長試験から、pH5.0 の条件では、*stop1* と野生株間での比較から、低 pH ストレス環境下では伸長の阻害を受けていることが判明し、またシロイヌナズナは、Al 毒性活動度が低下する pH5.5 の条件でも Al ストレスによる根の伸長阻害が起きているためである。この根長試験ではそれぞれの相補組換え体系統について予備実験で生育結果が良かった上位 2 ラインを解析に使用した。

total-RNA 抽出用の植物体を準備した時と同様に水耕栽培用プラスチックマウントを作製し、遮光した状態で 4 °C で 4 日間吸水させた後に、各ラインとも 30 粒ずつ播種した。Al ストレスには pH5.5 で最終濃度が 2 μ M となるよう AlCl₃ を含む 1/50 濃度 MGRL 溶液、低 pH ストレスには AlCl₃ を加えず pH を 4.7 に調製した 1/50 濃度 MGRL 溶液を使用した。水耕栽培の MGRL 溶液は、栄養の枯渇や養分が吸収されることによ

る水耕溶液の pH の上昇、そして二次的な根の伸長による正確な測定の防止等を考慮し 2 日毎に溶液を交換し、5 日間栽培した幼植物体の根長を測定した。根長の測定は、スライドガラスに幼植物体を乗せ、顕微鏡 (Pico Scopeman、KENIS 社) と微小計測ユニット (MC-300、KENIS 社) により、モニターの画像上で行った。根長試験では、相補組換え体の各ラインとも上位 5 個体の平均値及び標準偏差を求め、絶対長を図示化した。また、コントロール区の平均値に対し、両ストレス区の上位 5 個体の絶対長の割合を示したものを相対長とし、標準偏差を算出し同様に図示化した。

リアルタイム PCR による Al 耐性候補遺伝子の転写変動量の解析

終濃度が 10 μM となるように AlCl_3 を添加した水耕溶液上で、Al ストレス処理を施した相補組換え体の系統から得られた RNA をサンプルとして、解析は 3 回反復して行われた。1 章に記した、植物体からの total-RNA 抽出とリアルタイム PCR による *NtALS3*、*NtMATE* の転写解析と同じ手法で行った。使用したプライマーは Primer3 ver0.4.0 ツールを利用して設計した。内部標準遺伝子として用いた *UBQ1* 遺伝子 (*UBQ1: At3g52590*) の転写量から見た各候補遺伝子群の相対量で評価した。各候補遺伝子群は、様々な植物種で研究された結果から、Al 耐性遺伝子として報告されている、*ALMT1* (At1g08430)、*ALS3* (At2g37330)、*MATE efflux* (At1g51340) について解析した。

2-3 実験結果及び結果に対する考察

各 *STOP1* 相同遺伝子の単離

1章における *NtSTOP1* の単離時同様、ウェブツール CLUSTALW で共通塩基配列を選び出した。そして得られた全ての断片の塩基配列を基に、やはり Prime STAR Max を使った PCR でそれぞれの *STOP1* 相同遺伝子の完全長 cDNA を単離し、再度、シーケンスにて塩基配列を確認されてから各 *STOP1* 相同遺伝子は Genbank に登録された。LjSTOP1 の全長は 510 個のアミノ酸で、PnSTOP1 は全長 509 個で、そして PpSTOP1 全長 588 個で構成されていた。これらについて NCBI 上で AtSTOP1 を使った BLAST 検索を行うことで各 STOP1 との配列の相同性を比較したところ、アミノ酸配列間では、PnSTOP1 とは 62 %、CsSTOP1 とは 59 %、PpSTOP1 とは 57 %、LjSTOP1 とは 55 %、と判定された。またジンクフィンガードメイン (AtSTOP1 aa.246-385) 間での比較では PnSTOP1 とは 91 %、CsSTOP1 とは 91 %、PpSTOP1 とは 74 %、LjSTOP1 とは 90 %の相同性が確認された。続いてドメイン検索でもこれらすべての STOP1 相同タンパク質は AtSTOP1 と類似した C2H2 タイプのジンクフィンガードメインを持つことが示された (Figure 13)。WoLF PSORT による細胞内局在の判定では、14 個のリファレンスタンパクのうち、LjSTOP1 については 12 個、PpSTOP1 では 2 個、CsSTOP1 では 13 個、PnSTOP1 では 13 個が核内局在を示唆していた。なお、AtSTOP1 の場合では 14 個のうち 13 個が核内局在を示した。

このドメイン中の、対象とする下流遺伝子のもつゲノム配列との結合に関与すると予測されるアミノ酸についても AtSTOP1 と同じポジションであることから、これらは *AtSTOP1* の相同遺伝子、つまり各々の異種 STOP1 転写因子と考えられた。そしてこの時点で、機能し得るかはさておき、STOP1 という転写因子は種や属を越えて存在し地上植物という枠で保存されていることが推測された。また、ここで使った各

STOP1 相同遺伝子とデータベースで検出された候補遺伝子群について系統樹を作製すると、まず大きく双子葉植物とそうでないかで分かれ、次に単子葉植物とコケ植物とに分かれるように見られた (Figure 14)。もしこの傾向がより多くの植物種の STOP1 相同タンパク質で作製された系統樹でも表れたとすれば、STOP1 という転写因子の相同性は、植物の生育形態と何か関係があるのかもしれない。

相補組換え体の根長試験による表現型解析及び転写解析結果

転写解析では低 pH ストレス区については、リファレンスラインである *AtSTOP1* 相補組換え体と、ポジティブコントロールである、Col-0 とネガティブコントロールである *stop1* は、それぞれ、相対長にして 20 %、30 %、及び 80 % 程度の伸長阻害を受けた。これに対し、各 *STOP1* 相補組換え体 (*STOP1-comp*) では、伸長阻害が 30 % から 50 % 程度と、*stop1* よりも根伸長が回復したと言える (Figure 15B)。1 章では、タバコは *NtSTOP1* の存在下でも、*NtSTOP1-KD* 株との根伸長にほとんど違いが見られなかったが、*NtSTOP1* による相補組換え体は *stop1* と比べて 30 % 程度の相補を示した。

一方、Al ストレス区では、由来する *STOP1* 相同遺伝子の種類によって根伸長の相補の傾向は様々であった。根伸長については、*stop1* からみてほとんどのラインで相補は認められたが、Col-0 と比較した場合の、いうならば実際の栽培をイメージした場合の相補は、*PpSTOP1* の相補ライン以外は根伸長の回復が不十分であった (Figure 15A)。具体的に見て見ると、相補の程度が一番大きい *PpSTOP1* による相補ラインは *ALMT1* と *MATE* の転写レベルが Col-0 並みに誘導されていた。逆に、ほとんど相補が認められなかった *CsSTOP1* 相補ラインでは、下流に位置する Al 耐性遺伝子群の転写誘導がほとんど見られなかった。*LjSTOP1* 相補ラインについては、3 つの Al 耐性遺伝子の転写能でみると、*CsSTOP1* 相補ラインと類似しているが、根長試験では、決して多くはないが、*CsSTOP1* 相補ラインよりも根伸長は相補していた。*PnSTOP1* のものでは、

根伸長の回復が認められ、*ALMT1* のみの転写レベルが増加していたことから *ALMT1* による耐性機構が発現していると考えられた。以上の事より、植物の獲得する AI ストレス耐性能は *STOP1* の 1 次構造によって大きく異なることが考えられた。要点をまとめると低 pH ストレス下では、シロイヌナズナにおいては、異種 *STOP1* は *AtSTOP1* と同じように機能し根伸長の相補に寄与することができるが、AI ストレス下では、全ての異種 *STOP1* が *AtSTOP1* と同じように *ALMT1* 等の AI 耐性遺伝子の転写を制御することはできるわけではなく、AI 耐性遺伝子群を部分的に若しくはその一部のみを制御することができると理解された。このことは、異種 *STOP1* はシロイヌナズナの中で *AtSTOP1* を演じようとしているのではなく、あくまで、異種の *STOP1* としてシロイヌナズナの中で役割を代替して機能していると言いかえることができる。



Figure 12

Indicating figure of the cassettes for transgenic STOP compliment in pBE2113 *AtSTOP1* promoter fragment was connected STOP1 orthologue to regulate their transcription, as called cassette. Then, the STOP1 orthologue cassettes were transformed to pBE2113 for making STOP compliment lines by the T-DNA method.

L.japonicus	1	-----DSEKSSDATTAKAEEGLTTSATNGLQTNIEADSP-----SLPQDGLHHCNENPPELDTGVRE	62
Black poplar	1	-----MEPKDGLDANAPD-----SSDGLPQPALENT-----SPTNMLDQDGRKUTSLAVGIRI	57
Tea	1	-----MDLR-----THSE-----APDREDEKVPYDHC-----SLANMLDQYQDGRLEPFDGHPRI	49
Tabacco	1	-----MDPDSGSEDPTKFK-----SGDILKIVFSDNH-----SPTNMLH-----ACKDGGTYLLDQDTEI	55
Arabidopsis (STOP1)	1	-----KATDGLDQCNHGGSS-----SKSREKSSDQGN-----TFAGDTS-----GAKDANLLEVMV	53
Rice (ART1)	1	----------MIDRDMINTHRDQAA-----NLTSPLFFTYFFMALLALLGMAPPF	41
P.patens	1	MGGWQQPAPSPTHSSTLAFLLHQLTQQITSDRQNTPLSSSLGFSMGNAQDQSRTHMIGDQIQDMLDGGG	80
L.japonicus	63	LAFLQGG-----QPSGAGTLLPCTDNKKIKIP-----DQENCPLS-----GCO-TRHLGNDP-SVHLNLSPELNT	134
Black poplar	58	PPFRFN-----QAESEYLLSNCNQPVEL-----DQEDGQNGALO-TSKLQDQDGRMLDMLDQFLEQ	129
Tea	50	QFSEFN-----QPSNPSSVSSDFSNQAKILP-----DQEDGQNGALO-TSKLQDQDGRMLDMLDQFLEQ	124
Tabacco	56	QQFQGT-----QPSNT-----YQDQDQNGMMDRD-STDTFMRNLNLSLQFLEQ	115
Arabidopsis (STOP1)	54	PLGL-----QESIQAVDVLQGVKADKDFPMLNLSLQFLEQ	101
Rice (ART1)	42	COLLFSV-----LQDGLDQDGRMLDMLDQFLEQ	80
P.patens	81	HAQVGRSGESPSGLPQHLCQNRDNLNLCQDQFNYETNQLFSNVLNGLVQCRVPSITENLQDGLDQDGR	160
L.japonicus	135	IVGRIQ-----INEIVTGLDGLTDTLSTIIQLDGLAALN-----DQTLINGNPLVGLDGL	192
Black poplar	130	IVRQDQALGGQDQVTCQDGLTADLSTIIQLDGLAALN-----DQTLINGNPLVGLDGL	190
Tea	125	IVRQDQVWQSDMLAGDQDGLTADLSTIIQLDGLAALN-----DQTLINGNPLVGLDGL	185
Tabacco	116	IVRQDQTLQGNDEIVQDGLTADLSTIIQLDGLAALN-----DQTLINGNPLVGLDGL	177
Arabidopsis (STOP1)	102	IVRQDQTLQGNDEIVQDGLTADLSTIIQLDGLAALN-----DQTLINGNPLVGLDGL	161
Rice (ART1)	81	MAGRRAS-----SASAATFQDQVNADETLQDGLAALN-----DQTLINGNPLVGLDGL	138
P.patens	161	QLSLRFQ-----NEGNVLADQVNADETLQDGLAALN-----DQTLINGNPLVGLDGL	237
L.japonicus	193	-----CGLAVDQDGRMLDMLDQFLEQ	237
Black poplar	191	-----DGLLDFPLALMHCVPQDQDGRMLDMLDQFLEQ	235
Tea	186	-----DGVLE-----SPTNMLNATRP-----NVDLSGTCTDTC	216
Tabacco	178	-----DGVTVGATCTNGGGLPCHDQDGVTVGVDQDGRMLDMLDQFLEQ	223
Arabidopsis (STOP1)	162	-----LEAVDQVREANVVAEGQDQDGRMLDMLDQFLEQ	205
Rice (ART1)	139	-----SACAVSLAAGESSGARNNEHREDEEQQDGRMLDMLDQFLEQ	184
P.patens	238	HDLRAPHMHHMKELGSSVAASEGVNAALTRGNDLDFDQDGRMLDMLDQFLEQ	317
L.japonicus	238	-----MEREYKSE-DAQGLSPLDGS-----VEL	261
Black poplar	236	-----IHEHDEEEDADQDGRMLDMLDQFLEQ-----VEL	260
Tea	217	-----TEKELMDEEEDQDGRMLDMLDQFLEQ-----VEL	241
Tabacco	224	-----VDGHEDEEEDQDGRMLDMLDQFLEQ-----VEL	240
Arabidopsis (STOP1)	206	-----VHEHDEEEDQDGRMLDMLDQFLEQ-----VEL	230
Rice (ART1)	185	GA-----MLDQDGRMLDMLDQFLEQ	215
P.patens	318	MENMIGKDFGSLDQDGRMLDMLDQFLEQ	393
L.japonicus	242	EQEKERILAEIHPFCGCKGPKRDANLMMNRGSGEYKAAALANRRE--SDEE-MLEIAYDCHVQCKRMK	338
Black poplar	241	EQEKERILAEIHPFCGCKGPKRDANLMMNRGSGEYKAAALANRRE--PDEE-VIIRAYDCHVQCKRMK	337
Tea	242	EQEKERILAEIHPFCGCKGPKRDANLMMNRGSGEYKAAALANRRE--SDEE-MLEIAYDCHVQCKRMK	316
Tabacco	249	EQEKERILAEIHPFCGCKGPKRDANLMMNRGSGEYKAAALANRRE--PDEE-VIIRAYDCHVQCKRMK	325
Arabidopsis (STOP1)	231	EQEKERILAEIHPFCGCKGPKRDANLMMNRGSGEYKAAALANRRE--SDEE-MLEIAYDCHVQCKRMK	309
Rice (ART1)	216	EQEKERILAEIHPFCGCKGPKRDANLMMNRGSGEYKAAALANRRE--PDEE-VIIRAYDCHVQCKRMK	295
P.patens	394	VENDATEILAEIHPFCGCKGPKRDANLMMNRGSGEYKAAALANRRE--SDEE-MLEIAYDCHVQCKRMK	471
L.japonicus	339	FLKTLGVKNHYRHHKCKVYVYVSVADLQTHKRCCKDWLCSGDTFPRKDKLQDGLDQDGR	418
Black poplar	338	FLKTLGVKNHYRHHKCKVYVYVSVADLQTHKRCCKDWLCSGDTFPRKDKLQDGLDQDGR	417
Tea	319	FLKTLGVKNHYRHHKCKVYVYVSVADLQTHKRCCKDWLCSGDTFPRKDKLQDGLDQDGR	398
Tabacco	324	FLKTLGVKNHYRHHKCKVYVYVSVADLQTHKRCCKDWLCSGDTFPRKDKLQDGLDQDGR	405
Arabidopsis (STOP1)	318	FLKTLGVKNHYRHHKCKVYVYVSVADLQTHKRCCKDWLCSGDTFPRKDKLQDGLDQDGR	389
Rice (ART1)	296	FLKTLGVKNHYRHHKCKVYVYVSVADLQTHKRCCKDWLCSGDTFPRKDKLQDGLDQDGR	375
P.patens	472	FLKTLGVKNHYRHHKCKVYVYVSVADLQTHKRCCKDWLCSGDTFPRKDKLQDGLDQDGR	551
L.japonicus	419	EDSFE-----ENRWGEM--SCLVDS--PSTENGVQNIIMARANIDDEITLSDQDGRMLDMLDQFLEQ	480
Black poplar	418	EDSFEPSVSCD--KVDGNEASRQVYDTR--FELGSD--AGSSGAGQVIVKEDADDEASTFSDCTHSHGDEE	493
Tea	399	LDHVKG-----SASVEPTNVEYVAG--LNFQSD--MNSTVNGVENIVKGMADDEASTFSDCTHSHGDEE	468
Tabacco	404	LDHSHGAS-----TRDQGTSEYVMAKRCDFVY--KSHNEFDQFVDESAADQDGRMLDMLDQFLEQ	439
Arabidopsis (STOP1)	390	LDHSHGASSTSTQDQDGRMLDMLDQFLEQ	465
Rice (ART1)	376	PPPPPP-----TQGRRRDDEEPE--PTNDSGQDNEFLDQVQTAGVSGGQDGRMLDMLDQFLEQ	437
P.patens	552	LDHSHG-----QVSDR--LIVDKQDQDGRMLDMLDQFLEQ	588
L.japonicus	481	FFPFLSSSPTFMGHT-----NFSSSDRNIL--	510
Black poplar	494	FPDQSSSPTFMGHT-----NFSSSDRNIL--	509
Tea	469	FPFQDSTSPDPLDQDGRMLDMLDQFLEQ	505
Tabacco	488	FPFQDSTSPDPLDQDGRMLDMLDQFLEQ	514
Arabidopsis (STOP1)	466	FPFQDSTSPDPLDQDGRMLDMLDQFLEQ	499
Rice (ART1)	438	FPFQDSTSPDPLDQDGRMLDMLDQFLEQ	465
P.patens	588	-----	588

Figure 13

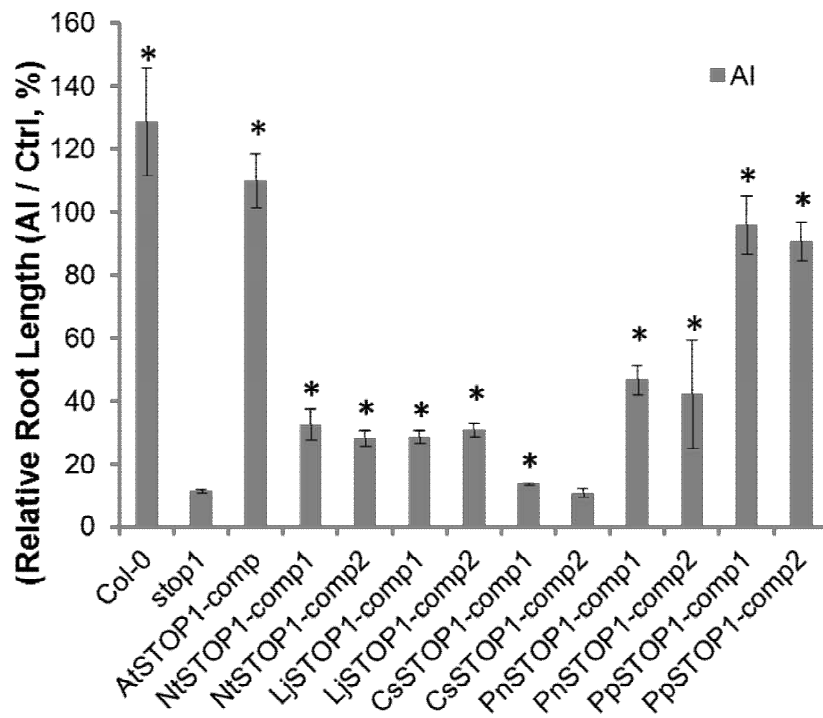
Deduced amino acid alignment of STOP1-like proteins from various plant species. Strictly conserved amino acids are highlighted with black, while residues belonging to conserved amino acid groups are highlighted in gray. Alignment was carried out using a WEB program ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).



Figure 14

Phylogram of STOP1-1 like proteins in various plant species. Distance indicator shows relatedness of proteins. Bold font indicates that function of protein has been supported by experiments using mutants [*Arabidopsis thaliana*, *AtSTOP1* (GenBank ID, NM_103160); *Oryza sativa*, *ART1* (NM_001072803)], RNAi suppression [*Nicotiana tabacum*, *NtSTOP1* (AB811781)], gene knock-out [*Physcomitrella patens*, *PpSTOP1* (AB811779)], and/or *in planta* complementation assays [*Camellia sinensis* (tea), *CsSTOP1* (AB811780); *Populus nigra* (black poplar), *PnSTOP1* (AB811779); *Lotus japonicas*, *LjSTOP1* (AB811782)]. Putative orthologs are shown in regular font: *Brassica rapa* (AC232513.1); *Arabidopsis lyrata* (XM_002891054.1); *Glycine max* (XM_003556158), *Vitis vinifera* (XM_002270160), *Picea glauca* (BT117929), *Vigna unguiculata* (TC13125), *Solanum lycopersicum* (AK320912), *Jatropha curcas* (Jcr4S27000.20), *Oryza sativa* (NM_001051470), *Malus × domestica* (HM122494), *Brachypodium distachyon* (XM_003564671), *Hordeum vulgare* (AK252406).

A



B

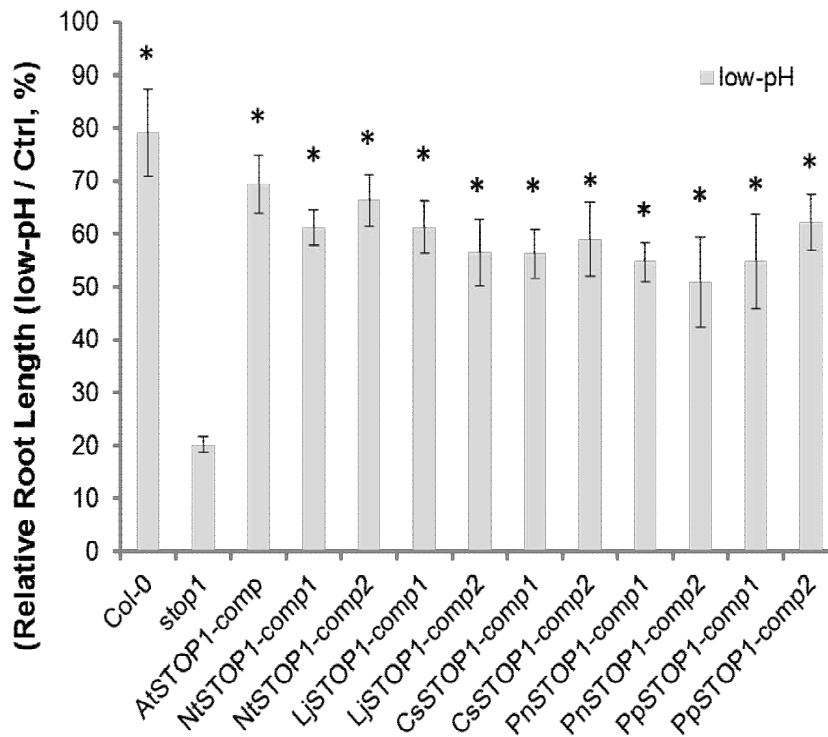


Figure 15

Relative root length (% of that in WT) of complemented lines is shown in Al-toxic (A, pH 5.5, 1 μ M, -EDTA) and low-pH stress (B, pH 4.7) conditions. Complemented lines carried *AtSTOP1* or *AtSTOP1* like proteins [from tobacco (*NtSTOP1*), black poplar (*PnSTOP1*), tea (*CsSTOP1*), *Lotus japonicas* (*LjSTOP1*), or *Physcomitrella patens* (*PpSTOP1*)]. Values are means \pm SE ($n = 3$). Asterisks indicate significant difference between complemented lines and *stop1* (t -test, $p < 0.05$).

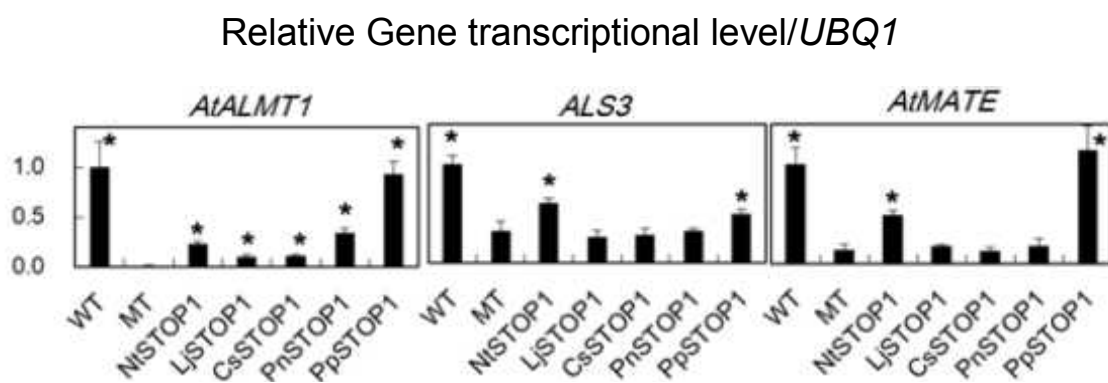


Figure 16

Recovery of transcriptions of suppressed genes in *Atstop1*-mutant (Sawaki et al., 2009) was analyzed in complemented lines after exposure to Al-toxic (10 μ M Al, pH 5.0 for 24 h) conditions. Transcript levels of *AtALMT1* (*Arabidopsis thaliana* AL-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1), *ALS3* (ALUMINUM SENSITIVE 3), *AtMATE* (*Arabidopsis thaliana* MULTI DRUGS AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION 1), were quantified by real-time PCR. Mean values \pm SE ($n = 3$) are shown. Asterisks indicate significant difference between complemented line and *Atstop1* (MT) (t -test, $p < 0.05$).

第3章 総合考察

STOP1 の分子構造と AI 耐性遺伝子及び有機酸放出との関係について

STOP1 は、放出する有機酸の種類を問わず、植物が AI ストレス応答性の有機酸放出トランスポーターの転写制御を司っていることが示唆されたが、その転写能は様々であった (Figure 15A, 16)。このことから、植物毎に放出する有機酸の種類を選択し決定する要因については、各 *STOP1* 相同遺伝子の由来植物毎の AI ストレス耐性に応じた有機酸放出に適したトランスポーターを転写するのに適した STOP1 のアミノ酸配列を形成している、と考えることもできる。これは後述する、STOP1 システムを介した AI 耐性植物の作製の重要な戦略としても関係する。また、*stop1* からみて根伸長が回復しており、かつ、*ALMT1* の転写が誘導されていることでシロイヌナズナではリンゴ酸放出は保障されていると判断してしまっている以上、リンゴ酸放出を測定するメリットは限りなく少なかったが、*ALMT1* の転写誘導に相関的なリンゴ酸の放出量が確認できた (Figure 16, S1)。これは二章で述べたような、*stop1* における AtSTOP1 の代替を果たしているイメージにも合致する。このとき、STOP1 のアミノ酸配列について着目すると、ジンクフィンガードメイン以外の配列では異なっている部分が多く存在する (Figure 13)。ほとんどの場合、転写因子は単独では機能せず、リガンド分子の結合、リン酸化などの化学修飾、または何らかのタンパク分子との相互作用をすることで機能することが多いことを考えると、アミノ酸配列における相同性の低い部分が転写活性に影響していると考えられる。

転写因子には幾つかの DNA 結合様式に分かれた転写因子群が存在するが、ロイシンジッパータイプに見られるように転写活性が起きる際、ホモダイマーを形成するタイプのものもある。ジンクフィンガーの基本的な DNA 結合様式は、亜鉛と配位結合したシステインとヒスチジン (ジンクフィンガーのタイプによってはそのどちらかだけで

構成されている)が二本鎖DNAにおける、ねじれの大きい側(主溝;major grooveと呼ばれる)に結合し、DNAを挟み込むような結合様式ではないことが広く認知されている。今回の各STOP1についてのドメイン検索結果ではジンクフィンガードメイン以外のタンパクドメインは検出されなかったことを考慮すると、STOP1はヘテロダイマーを形成して転写活性を調節するのだろうと思われる。また転写因子は、大きく分けるとアクチベータータイプとリプレッサータイプの2種が存在するが、*stop1*株ではAIストレス耐性遺伝子の転写制御は困難になることから、AIストレス耐性を獲得するためには必須な存在である、つまりAIストレス下ではターゲットとするDNAに結合して転写活性が起きていると予想される。他にも、転写因子の活性量調節には細胞内局在が関係するものもあり、STOP1の場合だと、AIストレスを受けたときの植物を用いた実験系で証明されることが望ましいだろう。

シロイヌナズナ以外での植物種におけるSTOPサブファミリーの存在

イネにおいてはART1以外にもSTOP1様のジンクフィンガードメインをもつタンパク及びそれをコードする遺伝子Os01g0871200(aa.522)と、STOP2に類似した配列のそれとOs03g0838800(aa.385)が存在することがゲノムデータベース検索の結果からわかっている。これらについては調べられてないが、アミノ酸配列の相同性がAtSTOP1やその他の異種STOP1に近いことから考えて、イネにおけるAIストレス耐性遺伝子の転写制御能を有することは十分に考えられる。これに似た現象はイネ以外にも確認できた。かずさDNA研究所(<http://www.kazusa.or.jp/lotus/blast.html>)が公開しているミヤコグサのゲノムデータベースでLjSTOP1のアミノ酸配列を基にしたBLAST検索を行うと、AtSTOP1やLjSTOP1と類似したドメイン構造を持つ、C2H2ジンクフィンガーのスーパーファミリーに属する別個のタンパクが検索後のリストに存在していた(chr5.CM1667.240.r2.a)。つまり単子葉植物に限らず、双子葉植

物種にも STOP 転写因子群のサブファミリーを形成するうち、STOP1、2（にあたる物）以外のタンパクが存在することが示唆された。これらの存在意義についての判断には情報が足りないが、それぞれがどのような条件で誘導されるかを調べることで、STOP のサブファミリーが、Al ストレス耐性以外にも植物内でどのような役割を持っているのか理解できると期待できる。

STOP1 を使った Al ストレス耐性強化作物の可能性について

STOP1 が Al ストレス耐性のすべてに寄与しているとは考えにくいですが、仮に異種植物由来の STOP1 を使った植物の Al ストレス耐性の強化作物の作出を考案してみると、まず、導入してやる STOP1 相同遺伝子とそれを導入する宿主との組み合わせは、両者が放出する主な有機酸の種類で合わせてやるのが肝要と思われる。例えばモロコシ (*Sorghum bicolor*、ソルガム、コーリャンともいう) は Al ストレスに応答してクエン酸を放出することが知られていることから (Magalhaes et al., 2007)、ソルガムの STOP1 相同タンパクは根圏へのクエン酸トランスポーターを制御する可能性が十分にあるだろうし、これをタバコ植物体などのクエン酸放出型の Al 耐性機構をもつ植物種に導入した場合にも分子的機能の相補は期待できる。さて STOP1 を使った場合の植物育種のメリットは植物種ごとに特有の有機酸放出能の向上であるが、それに伴う Al ストレスに対する植物毎の耐性強度について、放出までの時間や絶対量が関係しているとも思われた。しかし上のモロコシの例では、耐性品種と感受性品種とを使った研究で、クエン酸の放出量に明らかな有意差が表れるまでに、Al 処理から 3 日程度の時間を要することが示されている (Magalhaes et al., 2007)。タバコにおける野生株と NtSTOP1-KD の根長試験では、Al ストレス下でも有意差が見られないラインも確認されたが、有機酸の放出量については明確な差が確認できた (Figure 10)。従って植物の根伸長は単純な放出量や応答速度にのみ依存されるものではないと考えられる。ま

た、単純にトランスポーターの量を増やしたからと言って、それ自体の生産速度は変わらないならば有機酸放出能は頭打ちになるし、単純に放出量を増やすことについても植物にとっては生合成した養分を失い続けるため、栄養価の乏しい、かろうじて生きているだけの植物となりえるのではないだろうか。さらに少し先の話では、将来的に人類にとって都合が良い生態系で塗り替えられた自然環境を創っておいて興味を持ってない部分には関知しないという身勝手さ、無責任さは直接農業に携わらないことを理由にする机上理論者の傲慢からくるものかもしれない。

ところで、Al ストレスに対応するために有機酸の生合成が追い付かずに無毒化しきれないことが懸念されるが、コムギの Al 耐性品種と感受性品種との比較実験では、耐性品種でリンゴ酸の放出量は増加したにもかかわらず、リンゴ酸の細胞内の含量の差分は小さく、品種間であまり違いが見られなかった (Delhaize., et al 1993)。つまり放出する分のリンゴ酸を供給するため、少なくともリンゴ酸の合成に関わる経路のいくつかは活性化していることが想像できる。マイナーな有機酸放出の例では、ハウレンソウは Al ストレスを受けると根圏へシュウ酸を放出することが知られている (Yang et al., 2005)。シュウ酸の生合成には、グリシン、セリン、トレオニンの代謝経路や、グリオキシル酸回路などが関わっており、こちらもこれらの回路の機能が活性化されているものと想像できる。

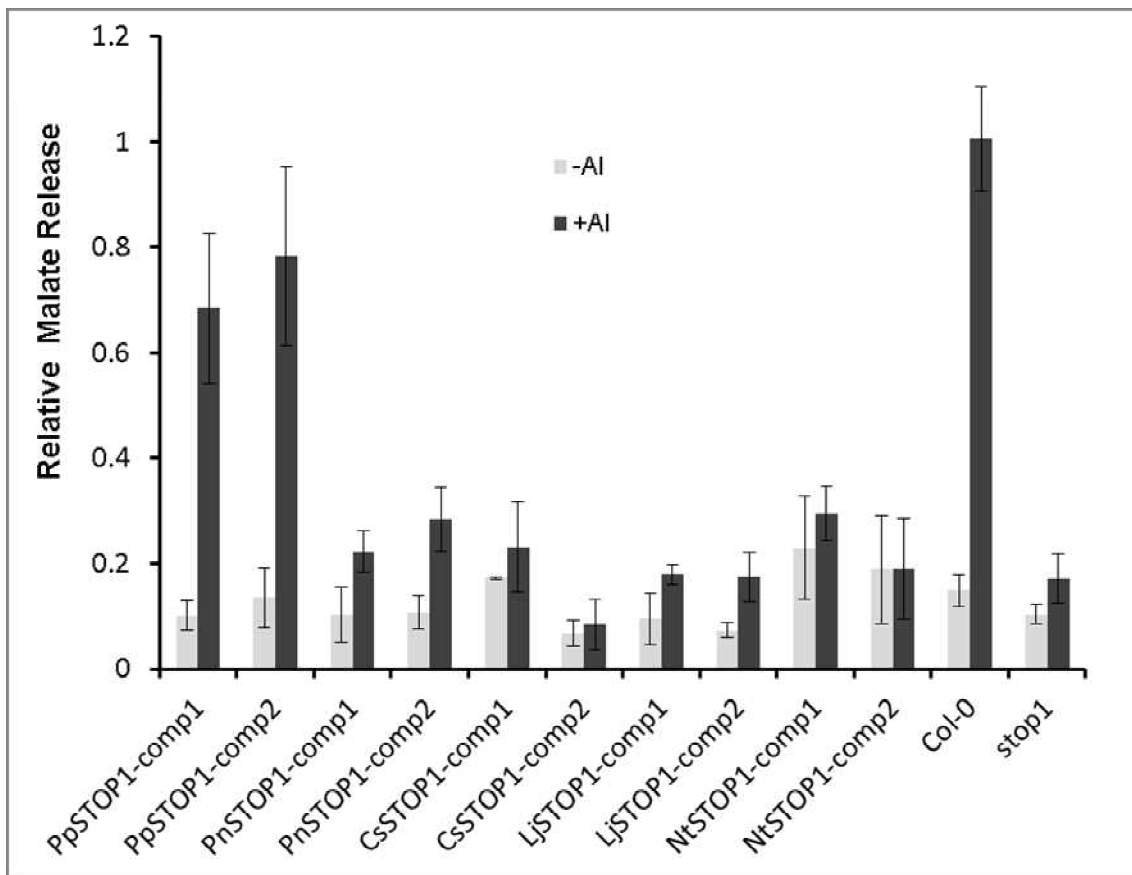
余談として、シロイヌナズナでは Al ストレス以外にも有機酸を放出することが確認できる。例えば、硝酸ニッケルを使ったストレス処理をシロイヌナズナに行い、GUS 染色による ALMT1 の組織内発現を調べた研究では、ALMT1 は転写の段階から誘導されていないにもかかわらず、リンゴ酸の放出量が増加していたことが記されている (Agrawal et al., 2012)。こちらは ALMT1 以外のトランスポーターの作用か、トランスポーターを介さない機構によるものと推察される。ニッケルストレス時と Al ストレス時に生じる植物の生理障害の類似点と相違点のグルーピングにより、STOP1 の Al

特異的に作用する理由がわかるかもしれない。

低 pH ストレス下での STOP1 の機能について

タバコは植物体の大きさからみてもシロイヌナズナより大きい、同じ低 pH4.7 の条件下での水耕栽培では相対根長でシロイヌナズナよりも小さい。これによりタバコの低 pH ストレス耐性がシロイヌナズナより小さいことを言い換えることができる。またタバコでは、野生株が 50 %程度の根伸長阻害を受ける低 pH ストレス条件においては、STOP1-KD と野生株との有意差はほとんど見られず、STOP1 が植物界全体において低 pH ストレスに寄与していることを支持するには、曖昧な、歯切れの悪い結果を得ることになった。似たような傾向はイネにおける ART1 遺伝子破壊株を用いた実験でも、Al によるストレスでのみ根伸長の変化が確認できている (Yamaji et al., 2009)。また予備的に行われたタバコ野生株と STOP1-KD 株をもちいた実験においても、一切の根伸長変化は認められなかった(データ掲載せず)。これらのことから、なんでもかんでも STOP1 による寄与であると都合よく解釈されてきたが、STOP1 が関与している耐性制御は Al のような根伸長阻害に対するものであり、シロイヌナズナの植物種以外では低 pH ストレスには作用しないと考えられた。もし仮にこれが真実だとすれば、低 pH ストレスにより、これまで植物の Al ストレスについて報告されてきたような事象は起きえないのだろう。逆に考えると、低 pH ストレスにも作用するという事は組織における生理的障害何らかの共通点が存在するのではないかと思われる。つまり、たとえば、Al ストレス時のカロースの分泌のように、仮に低 pH により何らかの代謝産物が分泌され、それが Al ストレスのシグナル経路のどこかで合流するならば、低 pH ストレスにも作用すると考えられるのではないだろうか。この場合、低 pH ストレスと呼ばれているものは、酸のように植物に直接作用するものではなく、低 pH 環境での栽培に伴い、無機栄養の取り込み阻害が起きるかも知れないことや植

物体内で生じる分泌物やイオンのバランスの不均衡といったものがストレスの原因と
なっていると考えられる。いずれにせよ今回の研究から **STOP1** に対する認識を改める
必要があるのかもしれない。



Supplemental figure 1

Al inducible malate exudation of WT (Col-0) and *AtSTOP1* complemented *stop1* lines. Same complemented lines in figure 15 were used for experiment. A method of experiment was implemented in relation to in the 1st chapter. 7d *Arabidopsis* plants were treated at non-Al stress (pH 5.0, -Al) and Al stress (pH 5.0, 10 μ M Al), and independently used for each stress condition group for measurement. Values are means \pm SE ($n = 3$). .

第4章 実験結果の要約と結論、総評

STOP1 はシロイヌナズナだけでなく植物種を越えて地上植物種にも存在することが示された。STOP1 相同タンパク質は 500 から 600 個程度のアミノ酸で構成されており、これらのアミノ酸レベルでの構造は、C2H2 タイプジンクフィンガードメインについては、90 %程度の高い相同性が示された。

タバコ植物体における AtSTOP1 転写因子の相同タンパク質、NtSTOP1、が転写レベルで制御する Al ストレス耐性機構は、シロイヌナズナでは ALMT1 を介したリンゴ酸放出であるのに対し、MATE タイプの有機酸放出トランスポーターを介したクエン酸放出であった。つまりタバコは、NtSTOP1 の存在下では、Al ストレスを感知することで根圏へクエン酸を放出することで Al ストレス耐性を獲得することができることが理解された。

タバコの低 pH ストレス耐性については、シロイヌナズナの系で定めた pH4.7 というストレス強度から比較すると、2 章におけるシロイヌナズナを使った根長試験では、根伸長が 75 %程度で、1 章の根長試験ではタバコは 40 %の根伸長を示したことから、タバコのもつ低 pH ストレス耐性能はシロイヌナズナよりも低いことがわかった。また、低 pH ストレス環境では NtSTOP1 の耐性への作用はシロイヌナズナよりも小さいものであった。

シロイヌナズナにとっての異種 STOP1 によって作成された相補組換え体は、低 pH ストレス耐性を相補させた。低 pH ストレス耐性機構は植物種で類似しているものと考えられた。また、2 章の転写解析の結果から、各 STOP1 による相補組換え体ごとに STOP が制御する Al ストレス耐性遺伝子の転写量が増減することから、各 STOP1 の分子的機能は一樣ではなく、由来する植物種のもつ各 STOP1 のアミノ酸配列によって異なることが分かった。

今回の例では、タバコという植物種を用いることにより **STOP1** の分子生物学的な制御メカニズムを考えるとという路線変更が行われたが、これも、あまりにも強引な関連付けで、つながりの見出しにくいものであった。植物界全体から見ようという理想も決して悪くはなかったが、あれもこれもと手を出しすぎたせいでいくつかの下流遺伝子の転写誘導を検証するに留まってしまった。何より、四方八方から無造作に寄せ集めてくるので情報の摺合せや消火に大変時間がかかりすぎて、結局「いくつかの植物種に類似した候補遺伝子が存在するらしい」という面白みに欠ける漠然とした主張にしか発展できなかった。もとをただせば、共同研究者からの情報提供の沈滞があったこともそうだが、無計画的かつ、私の修士論文における成果から目的を絞り込めないまま、協力も十分に仰げずに進めようとしたことが無謀であった。せめて使用するモデル植物の栽培方法先行的に完了しておくべきであった。これまで **STOP** 遺伝子に関係したプロジェクトにおいて、分子生物学的な方向性に行きたかったのか、もはやすべて省略して、実地試験に向けた単なる組換え体の量産をしたかったのかといったことは明言されていなかった。そのためか、計画性もなく虫食い状に展開していったために採取データが無意味なものになったこと、それをさけようと関連が遠い話題に無理やりねじ込もうとされたために、予定が遅延したことや元の話の内容から空中分解してしまった恐れがあることは猛省すべき点であるといえよう。そしてさらには、環境に結果が左右されるなど、実験設計においても不安定であったまま進めざるを得なかったことこれらにより本来先に見るべきであった **STOP1** システムの分子モデルの提案につながるデータを多く満たせなかったことは大変無念である。

このようなことについて本来あるべきではないと思われるが、ほかにも当事者間で知らない間に予定にないデータの採取や出所が不明なサンプルの使用、証明内容への戦術や方法の十分な説明がなされていないまま単純作業に従事させるようとすることや、「ポジティブな成果の場合、本来博士課程生のみが得られるべき業績を、相対的に

総合的な能力の劣る学部生や留学生にも必ず無条件に与える」等の理由にプロジェクトに無関係な協賛者を巻き込み共著者として論文に名前をエントリーさせる傾向もしばしば見受けられたことから、自らを管理できず、また他者からの指摘を無視しきれなかったことにも起因していると推測される。このような社会的な地位による権力の私物化ともとれる必要悪でもない振舞いは容認されるべきではない姿勢には、一人の科学者として激しい嫌悪を表すのもであると同時にくれぐれも繰り返してはならない、見直すべき点として学ぶことができるだろう。

最後に、酸性土壌という環境ストレスによる植物の生理的な障害とその耐性機構を知るうえで STOP1 の分子レベルでの機能を明らかにすることは重要なアプローチとして期待されるが、STOP を介した植物の持つ AI ストレス耐性機構の詳細まで理解するには、遺伝子という核酸の量を想像することだけではなく、細胞全体の挙動を観察することが必要になってくるだろうといえる。それは、少なくとも植物種間における AI ストレス耐性に主に関与する制御遺伝子さえも異なるのだから、元の一つの分子生物学的制御メカニズムが理解されていなければどこまでがそれら植物種ごとに特異的な制御機構であるかを判別することは困難であると思われるからである。たとえば、シロイヌナズナのリンゴ酸放出に対してタバコのクエン酸放出は機能的に上書きされたものなのか、それとも有機酸を放出するという同一の事象を置き換えられただけだろうか。植物種ごとに異なる有機酸放出用トランスポーターが選択されているならばシグナルカスケードについても、省略されているのか、分岐があるのだろうか、または経路として存在しないのだろうか。このような理解は、分子生物学的実験にも有利で、また、遺伝子との相互検証も十分に可能たり得るシロイヌナズナで先に STOP1 システムのモデルの確立を優先すべきであり、それを基にして各種植物における違いを比較すべきであったと私は主張する。

低 pH ストレスというものにも、この環境で生育する植物内で起きている事象から

メスを入れる必要もあるだろう。それは、比較的低 pH ストレスや酸ストレスについて扱った分子生物スケールでの研究報告は多くはないと思われるからと言って、情報を増やすこと努力をすることなく、あてずっぽうに低 pH ストレスについて理解を進めようとしするのは学術的に見ても堅実とは言えないし、農業分野の技術発展に貢献しているとも言い難いからである。これまで混同されてきた節があるが酸によるストレスと区別せねばならない。このとき、低 pH とは特に不明瞭な定義であることも関係しているから、主張したい事柄だけを優先して当てはめていくと、辻褄を合わせるために実験条件を設定するというなんとも実験的公平性に欠けた証明にしかなりかねない。したがって、なんらかの直接的な観察または測定によりイメージをつかむとともに、考えられる大まかな可能性をいくつかの段階的な消去法で絞っていくという手法ならば、酸性土壌における極めて狭い範囲であるが、確かな学術的前進を果たすことができたであろう。

引用文献

Abdel-Basset R, Ozuka S, Demiral T, Furuichi T, Sawatani I, Baskin TI, Matsumoto H, and Yamamoto Y (2010)

Aluminium reduces sugar uptake in tobacco cell cultures: a potential cause of inhibited elongation but not of toxicity

J Exp Bot. **61-6**, :1597–1610

Baligar VC. and Ahlrichs, J.L. (1998)

Nature and Distribution of Acid Soils in the World.

In: *Proceedings of a Workshop to Develop a Strategy for Collaborative Research and Dissemination of Technology in Sustainable Crop Production in Acid Savannas and other Problem Soils of the World.* (Schaffert, R.E., ed.),

Purdue University, West Lafayette, IN pp: 1-11

Becher M, Talke IN, Krall L, and Krämer U (2004)

Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*

Plant J **37**: 251–268

Bose J, Babourina O, Shabala S, and Rengel Z (2010)

Aluminium-induced ion transport in *Arabidopsis*: the relationship between Al tolerance and root ion flux

J Exp Bot **61**: 3163–3175

Coelho CM, Trick HN and Kochian LV (2007)

A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum

Nat genet **39**: 1156–1161

Delhaize E, Ryan PR, and Randall PJ (1993)

Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.)? Aluminum stimulated excretion of malic acid from root apices.

Plant Physiol **103**: 695–702

Engbrecht Claudia C, Schoof Heiko, and Böhm Siegfried (2004)

Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome

BMC Genomics **5-39**: 1471-2164

Gabrielson KM, Cancel JD, Morua LF and Larsen PB (2006)

Identification of dominant mutations that confer increased aluminium tolerance through mutagenesis of the Al-sensitive *Arabidopsis* mutant, als3-1

J Exp Bot **57**: 943–951

Garcia-Oliveira AL, Benito C, Prieto P, Menezes RdeA, Rodrigues-Pousada C, Guedes-Pinto H and Martins-Lopes P (2013)

Molecular characterization of TaSTOP1 homoeologues and their response to aluminium and proton (H⁺) toxicity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)
BMC Plant Biology **13** / **134**:471-2229

Hoekenga OA, Maron LG, Piñeros MA, Cançado GMA, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, Matsumoto H, Yamamoto Y, Koyama H, and Huang J, and Bachelard EP (1993)

Effects of aluminium on growth and cation uptake in seedlings of *Eucalyptus mannifera* and *Pinus radiata*
Plant and Soil **149**: 121-127

Horsch R, Fry J, Hoffmann N, Eichholtz D, Rogers Sa, Fraley R (1985)

A simple and general method for transferring genes into plants.
Science **227**: 1229-1231

Huanga CF, Yamajia N, Mitani N, Yano M, Nagamura Y, Ma JF (2009)

A Bacterial-Type ABC Transporter Is Involved in Aluminum Tolerance in Rice
The Plant Cell **21-2**: 655-667

Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, Kobayashi Y, Ikka T, Hirayama T, Shinozaki K, and Kobayashi M (2007)

Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **104**: 9900–9905

Kinraide TB (2003)

Interactions among Ca^{2+} , Na^+ and K^+ in salinity toxicity: quantitative resolution of multiple toxic and ameliorative effects

J Exp Bot **50**: 1495–1505

Kinraide TB and Wang P (2010)

The surface charge density of plant cell membranes (σ): an attempt to resolve conflicting values for intrinsic σ

J Exp Bot **61**: 2507–2518

Kobayashi Y, Hoekenga OA, Itoh H, Nakashima M, Saito S, Shaff JE, Maron LG, Piñeros MA, Kochian LV, and Koyama H (2007)

Characterization of AtALMT1 Expression in Aluminum-Inducible Malate Release and Its Role for Rhizotoxic Stress Tolerance in Arabidopsis

Plant Physiol **145**: 843–852

Kobayashi Y, Ohshima Y, Kobayashi Y, Ito H, Iuchi S, Fujita M, Zhao CR, Tanveer T, Ganesan M, Kobayashi M, and Koyama H

STOP2 Activates Transcription of Several Genes for Al³⁺- and Low pH-Tolerance that Are Regulated by STOP1 in *Arabidopsis*

Molecular plant (doi:10.1093/mp/sst116)

Kochian LV (2005)

AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **103**: 9738–9743

Koyama H, Toda T, and Hara T (2001)

Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to the growing root in *Arabidopsis thaliana*: pectin–Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity

J Exp Bot **52**: 361–368

Krishna SS, Majumdar I, and Grishin NV (2003)

Structural classification of zinc fingers SURVEY AND SUMMARY

Nucleic Acids Research **2**·**31**:532-50

Larsen PB, Kochian LV, and Howell SH (1997)

Al inhibits Both Shoot Development and Root Growth in *als3*, an Al-Sensitive Arabidopsis Mutant

Plant Physiol. **114**: 1207-1214

Larsen PB, Geisler MJB, Jones CA, Williams KM, and Cancel JD (2005)

ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis

Plant J **41**: 353–363

Liu J, Magalhaes JV., Shaff J, and Kochian LV (2009)

Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis

aluminum tolerance

Plant J **57**: 389–399

Magalhaes JV, Liu J, Guimarães CT, Lana UGP, Alves VMC, Wang YH, Schaffert RE, Hoekenga OA, Piñeros MA, Shaff JE, Klein PE, Carneiro NP, Coelho CM, Trick HN, and Kochian LV (2007)

A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers

aluminum tolerance in sorghum

Nat Genet **39**, 1156 - 1161

松本英明 (2003)

酸性土壌とアルミニウムストレス

根の研究(Root Research) 12(4):149-162

Pellet DM, Grunes DL, and Kochian LV (1995)

Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.)

Planta **196**:788-795

Schaffert RE, Hoekenga OA, Piñeros MA, Shaff JE, Klein PE, and Carneiro NP (2007)

A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum

Nat Genet **39**: 1156–1161

Sawaki Y, Iuchi S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Ikka T, Sakurai N, Fujita M, Shinozaki K, Shibata D, Kobayashi M, and Koyama H (2009)

STOP1 Regulates Multiple Genes That Protect Arabidopsis from Proton and Aluminum Toxicities

Plant Physiol. **150**: 281–294

Shomer I, Novacky AJ, Pike SM., Yermiyahu U, and Kinraide TB (2003)

Electrical Potentials of Plant Cell Walls in Response to the Ionic Environment

Plant Physiol. **133**: 411–422

多比良 和誠, 宮岸 真, 川崎 広明, 明石 英雄 (2003)

注目のバイオ実験シリーズ RNAi 実験プロトコール

高効率で簡便な遺伝子ノックアウトの新技术がわかる!

2003年4月1日 第1刷

羊土社

Vallee BL, Coleman JE, and Auld DS (1991)

Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88**: 999-1003

Wang P, Zhou D, Kinraide TB, Luo X, Li L, Li D, and Zhang H (2008)

Cell Membrane Surface Potential Plays a Dominant Role in the Phytotoxicity of
Copper and Arsenate

Plant Physiol. **148**: 2134–2143

Walker DJ, Black CR, and Miller AJ (1998)

The role of cytosolic K⁺ and pH in the growth of barley roots

Plant Physiol **118**: 957–964

Yamaji N, Huang CN, Nagao S, Yano M, Sato Y, Nagamura Y, and Maa JF (2009)

A Zinc Finger Transcription Factor ART1 Regulates Multiple Genes Implicated in
Aluminum Tolerance in Rice

Plant Cell **21**: 3339–3349

Yan F, Feuerle R, Schäffer S, Fortmeier H, and Schubert S (1997)

Adaptation of Active Proton Pumping and Plasmalemma ATPase Activity of Corn
Roots to Low Root Medium pH

Plant Physiol. **117**: 311–319

Yang JL, Zheng SJ, He YF and Matsumoto H

Aluminium resistance requires resistance to acid stress: a case study with spinach
that exudes oxalate rapidly when exposed to Al stress (2005)

J Exp Bot: **56**, 414, 1197–1203