

博士論文

エクトイン生合成系遺伝子およびナトリウムポンプ遺伝子
を利用した耐塩性植物の分子育種

仲山 英樹

2000年3月24日

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞生物学専攻
植物代謝調節学講座 (新名 惇彦 教授)

本論文は奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科に
博士（バイオサイエンス）授与の要件として提出した博士論文である。

仲山 英樹

審査委員： 新名 惇彦 教授
佐野 浩 教授
横田 明穂 教授
磯貝 彰 教授

エクトイン生合成系遺伝子およびナトリウムポンプ遺伝子を利用した耐塩性植物の分子育種*

仲山 英樹

要旨

【背景および目的】

植物は、生長や生存を制限する各種のストレスを絶えず自然環境から受けている。なかでも、塩ストレスは、乾燥ストレスとともに、植物の生産性を大きく左右する代表的なストレスであり、世界的な砂漠化や食糧減収の要因となっている。そのため、耐塩性植物の分子育種は、砂漠の緑化による地球環境の再生や、塩土および海水の農業利用による食糧増産に役立つ点で非常に意義深い。近年の分子生物学的研究の発展により、細菌や酵母、植物などで、塩ストレスによって発現が誘導される遺伝子群が多数同定され、一部についてはその遺伝子産物が関与する耐塩性機構が推定されている。細胞レベルの塩ストレス応答は、植物と細菌、酵母などで共通している機構の存在も知られており、植物以外の遺伝子であっても、耐塩性植物の分子育種への利用価値は高い。そのため、近縁種以外の植物や微生物などの耐塩性に関わる有用形質を発現するための遺伝子群（代謝系）を植物へ多重導入する「植物代謝工学」により、実用的な耐塩性植物の分子育種が可能になると考えられる。

植物細胞が受ける「塩 (NaCl) ストレス」による損傷は、1) 細胞外の高濃度の塩による「高浸透圧ストレス」と、2) 細胞質ゾルに流入した「Na⁺ のイオン毒性」の 2 つの因子が複合的に作用して引き起こされる。耐塩性植物を分子育種するためには、それぞれの因子に応じた戦略が必要となる。これまでの植物分子生理学的研究から、「高浸透圧ストレス」に対しては適合溶質の生合成系が、「Na⁺ のイオン毒性」に対しては、イオンホメオスタシスを強化するイオン輸送系が、耐塩性に重要であることが知られている。そこで本研究では、1) 「高浸透圧ストレス」に対しては好塩性細菌 *Halomonas elongata* の適合溶質であるエクトインの生合成系の 3 遺伝子 (*ect* 遺伝子: *ectA*, *ectB*, *ectC*) を、2) 「Na⁺ のイオン毒性」に対しては酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のナトリウムポンプ遺伝子 (*ENA1* 遺伝子) を利用することにより、各因子に対する耐性を植物細胞に賦与することを試みた。

【方法および結果】

1) 適合溶質エクトインによる高浸透圧ストレス耐性の賦与

好塩性細菌 *H. elongata* OUT30018 株は、塩ストレス下で適合溶質エクトインを細胞内に高濃度蓄積して浸透圧調節を行い、塩による高浸透圧ストレスに対して耐性を獲得している。これまでに、*H. elongata* OUT30018 株で、エクトイン生合成に機能する 3 種の *ect* 遺伝子が単離され、ポリシストロン性のオペロンを形成していることが明らかにされた。そこで本研究では、カリフラワーモザイクウイルス 35S (CaMV35S) プロモーターに各 *ect* 遺伝子を連結した 3 種の融合遺伝子を直列に挿入したバイナリープラスミドを構築し、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* EHA105) 感染法によって、タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv BY2)、およびタバコ植物体 (*N. tabacum* L. cv SR1) へ導入した。得られた形質転換タバコについて、PCR 法により遺伝子導入を確認した後、ノザン解析によって 3 種の *ect* 遺伝子の発現を確認した。形質転換 BY2 細胞におけるエクトイン蓄積濃度は 14 - 79 nmol/g 新鮮重量 (FW) であったので、一般的な浸透圧調節物質の蓄積濃度が 5 μ mol/gFW 以上であることから考えると、形質転換 BY2 細胞内のエクトインは浸透圧調節に関与しないことが予想された。そこで、形質転換 BY2 細胞について、620 mM マンニトールおよび 500 mM NaCl による一過的な高浸透圧ショックに対する耐性を調べてみると、エクトインの蓄積量に相関して、形質転換 BY2 細胞の高浸透圧ショック耐性が向上していた。さらに、形質転換 BY2 細胞は、200 - 300 mM マンニトールによる継続的な高浸透圧ストレスに対する耐性の向上も認められたことから、エクトインによって BY2 細胞に高浸透圧ストレス耐性を賦与できることが示された。以上の結果から、復活草におけるトレハロースによる高浸透圧ストレス耐性機構と同様に、エクトインが BY2 細胞の膜機能を保護していることが予想された。また、*ect* 遺伝子が発現している形質転換タバコ植物体について、形質転換第 2 世代の芽生えの乾燥や塩による高浸透圧ストレスに対する耐性を調べてみたところ、13 系統中 2 系統が乾燥ストレスに対して顕著な耐性を示した。しかしながら、塩ストレスに対しては顕著な耐性を示す系統が得られなかったことから、高浸透圧ストレス耐性のみではなく、Na⁺ のイオン毒性に対する耐性を賦与することの重要性が示唆された。

2) ナトリウムポンプ *Ena1p* による Na⁺/Li⁺ イオン毒性に対する耐性の賦与

これまでに、植物において、液胞へ Na⁺ を隔離する Na⁺/H⁺ アンチポーターが同定されているが、原形質膜上で Na⁺ を排出するイオン輸送体は同定されていない。しかしながら、細胞質ゾルの Na⁺ を液胞への隔離する一方で、細胞外へ不要な Na⁺ を排出することが Na⁺ のイオン毒性に対する戦略として有効であ

ると考えられる。実際、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、ナトリウムポンプをコードした *ENA1* 遺伝子の発現量によって、細胞の塩ストレス耐性が決定されている。すなわち、Ena1p は Na^+/Li^+ -ATPase として機能し、特異的に Na^+/Li^+ を細胞外へ排出してイオン毒性を抑えることにより、*S. cerevisiae* に塩ストレス耐性を賦与している。そこで本研究では、*S. cerevisiae* の Na^+/Li^+ -ATPase をコードした *ENA1* 遺伝子をゲノム PCR によって単離し、CaMV35S プロモーターに *ENA1* 遺伝子を連結したバイナリープラスミドを構築し、アグロバクテリウム感染法によって、BY2 細胞へ導入した。得られた形質転換 BY2 細胞について、120 mM LiCl を添加した平板培地上で Li^+ のイオン毒性に対する耐性を調べてみると、対照のベクター導入株を含め、ほとんどの形質転換 BY2 細胞は LiCl 感受性であったが、*ENA1* 遺伝子導入株の中に顕著な LiCl 耐性を示す株がみられた。これらの LiCl 耐性株については、PCR 法により遺伝子導入を確認した後、RT-PCR 法によって *ENA1* mRNA の蓄積を検出したが、*ENA1* 遺伝子の発現量は、かなり低いことが示された。しかしながら、平板培養から液体懸濁培養へ系を移しても BY2 細胞の LiCl 耐性が維持されていたことから、BY2 細胞内で *ENA1* 遺伝子が機能的に発現していることが示唆された。また、HA (hemagglutinin) エピトープを融合した Ena1p-3HA を生成させた形質転換 BY2 細胞の anti-HA 抗体を用いた解析により、タバコ培養細胞内で Ena1p-3HA が原形質膜に局在していることが示された。以上の結果から、酵母細胞内と同様に、Ena1p は毒性カチオン Na^+/Li^+ を細胞外へ排出するポンプとして原形質膜上で機能し、 Na^+/Li^+ のイオン毒性に対する耐性を BY2 細胞に賦与することが示された。

【今後の展開】

より高度な耐塩性植物の分子育種として、植物細胞へ *ect* 遺伝子と *ENA1* 遺伝子を多重導入し、「高浸透圧ストレス」と「イオン毒性」の両因子に対する耐性を賦与することが期待される。

*奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 細胞生物学専攻
博士論文, NAIST-BS-DT9781031, 1999年3月24日

目次

第 1 章 耐塩性植物の分子育種概論	1
第 1 節 植物の耐塩性機構	1
第 1 項 植物に対する塩ストレスの影響	1
第 2 項 植物の塩ストレスに対する適応応答	1
第 3 項 適合溶質の性質と機能	3
第 4 項 塩ストレス下での植物細胞のイオンホメオスタシス制御機構	6
第 2 節 耐塩性植物の分子育種	13
第 1 項 耐塩性植物の分子育種に有効な遺伝子	13
第 2 項 適合溶質生合成系の利用	14
第 3 項 一般的なストレス誘導性タンパク質の利用	14
第 4 項 イオン輸送系の利用	14
第 5 項 信号伝達系の利用	15
第 3 節 本研究の目的	17
第 1 項 耐塩性植物を分子育種するための戦略	17
第 2 項 適合溶質エクトインによる高浸透圧ストレス耐性の賦与	17
第 3 項 ナトリウムポンプによる Na^+ のイオン毒性に対する耐性の賦与	17
第 2 章 好塩性細菌 <i>Halomonas elongata</i> のエクトイン生合成系遺伝子を利用した耐塩性植物の分子育種	20
第 1 節 序論	20
第 1 項 <i>Halomonas elongata</i> OUT30018 株のエクトイン生合成経路	20
第 2 項 <i>H. elongata</i> OUT30018 株からのエクトイン生合成系オペロンの単離	20
第 3 項 適合溶質エクトインの機能	21
第 4 項 植物へエクトイン生合成系遺伝子を導入することの意義	21
第 2 節 実験材料および方法	27
第 1 項 使用植物	27
第 2 項 使用菌株とプラスミド	27
第 3 項 培地および培養条件	27
第 4 項 大腸菌の形質転換	28
第 5 項 プラスミド DNA の少量調製	28

第 6 項 <i>H. elongata</i> 由来の <i>ect</i> 遺伝子の PCR による増幅	29
第 7 項 塩基配列の決定	29
第 8 項 植物で <i>ect</i> 遺伝子を発現するためのバイナリープラスミドの構築	29
第 9 項 アグロバクテリウムの形質転換	30
第 10 項 タバコ培養細胞の形質転換	31
第 11 項 ゲノム PCR による遺伝子導入の確認	31
第 12 項 タバコからの RNA 単離	31
第 13 項 DNA プロープの作製	32
第 14 項 ノザン解析	32
第 15 項 エクトインの分析	33
第 16 項 浸透圧計による培地および溶液の浸透圧測定	34
第 17 項 タバコ培養細胞の高浸透圧ショック耐性試験	34
第 18 項 タバコ培養細胞の新鮮重量の測定	34
第 19 項 タバコ培養細胞の細胞生存度の決定	34
第 20 項 タバコ培養細胞の高浸透圧ストレス耐性試験	34
第 21 項 タバコ植物体の形質転換	35
第 22 項 タバコ芽生えの高浸透圧ストレス耐性	35
第 3 節 結果	36
第 1 項 エクトイン生合成系遺伝子のサブクローニング	36
第 2 項 3 種の <i>ect</i> 遺伝子を挿入したバイナリープラスミドの構築	36
第 3 項 アグロバクテリウムへの pBIHectABC の導入	37
第 4 項 3 種の <i>ect</i> 遺伝子を導入した形質転換タバコ培養細胞の作製	37
第 5 項 形質転換タバコ培養細胞内での <i>ect</i> 遺伝子の発現	37
第 6 項 形質転換タバコ培養細胞内でのエクトイン生産	37
第 7 項 形質転換タバコ培養細胞の高浸透圧ショック耐性	38
第 8 項 形質転換タバコ培養細胞の高浸透圧ストレス耐性	39
第 9 項 形質転換タバコ植物体の作製	39
第 10 項 形質転換タバコ植物体の高浸透圧ストレス耐性	40
第 11 項 形質転換タバコ植物体内での <i>ect</i> 遺伝子の発現	40
第 4 節 考察	54
第 1 項 タバコ細胞内での <i>ect</i> 遺伝子の発現	54
第 2 項 タバコ培養細胞の高浸透圧ストレス耐性	54
第 3 項 エクトインによるタバコ培養細胞の高浸透圧ストレス耐性機構	55
第 4 項 タバコ植物体の高浸透圧ストレス耐性	55
第 5 項 今後の展望	56

第 3 章 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のナトリウムポンプ遺伝子を利用した耐塩性植物の分子育種 60

第 1 節 序論	60
第 1 項 出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の耐塩性機構	60
第 2 項 酵母のナトリウムポンプをコードした <i>ENAI</i> 遺伝子	60
第 3 項 植物に <i>ENAI</i> 遺伝子を導入することの意義	62
第 2 節 実験材料および方法	67
第 1 項 使用植物	67
第 2 項 使用菌株とプラスミド	67
第 3 項 培地および培養条件	67
第 4 項 大腸菌の形質転換	68
第 5 項 酵母の形質転換	68
第 6 項 プラスミド DNA の少量調製	68
第 7 項 酵母 <i>ENAI</i> 遺伝子のゲノム PCR による増幅	69
第 8 項 植物で <i>ENAI</i> 遺伝子を発現するためのバイナリープラスミドの構築	69
第 9 項 酵母の <i>ENAI-4</i> 遺伝子欠損変異株を用いた機能的相補性試験	70
第 10 項 タバコ培養細胞の LiCl 感受性試験	70
第 11 項 アグロバクテリウムの形質転換	71
第 12 項 タバコ培養細胞の形質転換	71
第 13 項 ゲノム PCR による遺伝子導入の確認	71
第 14 項 タバコ培養細胞からの RNA 単離	71
第 15 項 DNA プローブの作製	71
第 16 項 ノザン解析	71
第 17 項 RT-PCR 解析	72
第 18 項 HA エピトープカセットの作製	72
第 19 項 塩基配列の決定	72
第 20 項 HA エピトープ融合 <i>Enalp</i> の作製	72
第 21 項 植物で <i>ENAI-3HA</i> 遺伝子を発現するためのバイナリープラスミドの構築	73
第 22 項 酵母細胞からの膜画分の粗調製	73
第 23 項 タバコ培養細胞からの膜画分の粗調製	74
第 24 項 ウェスタン解析	74
第 25 項 共焦点レーザー顕微鏡によるタバコ培養細胞の観察	75
第 3 節 結果	77
第 1 項 酵母 <i>ENAI</i> 遺伝子のゲノム PCR による単離	77

第 2 項 タバコ培養細胞の LiCl 感受性	77
第 3 項 酵母 <i>ENAI</i> 遺伝子を導入した形質転換タバコ培養細胞の作製	77
第 4 項 形質転換タバコ培養細胞内での <i>ENAI</i> 遺伝子の発現	78
第 5 項 形質転換タバコ培養細胞の塩ストレス耐性	78
第 6 項 HA エピトープ融合 Enalp タンパク質の作製	79
第 7 項 HA エピトープを融合した <i>ENAI-3HA</i> 遺伝子を導入した形質転換タバコ培養細胞 の作製	79
第 8 項 タバコ培養細胞における Enalp-3HA の局在性	80
第 4 節 考察	95
第 1 項 塩ストレスに特異的な Na ⁺ のイオン毒性	95
第 2 項 酵母 <i>ENAI</i> 遺伝子の単離	95
第 3 項 タバコ細胞内での <i>ENAI</i> 遺伝子の発現	96
第 4 項 タバコ培養細胞のイオン毒性	96
第 5 項 形質転換タバコ培養細胞の塩ストレス耐性	97
第 6 項 タバコ培養細胞における Enalp-3HA の局在性	97
第 7 項 今後の展望	98
第 4 章 総括	100
第 5 章 謝辞	102
第 6 章 参考文献	103

略語

ADABA	<i>N</i> -acetyl L-2,4-diaminobutyric acid
ASA	L-aspartic- β -semialdehyde
BA	6-benzyladenine
BY2	Bright Yellow 2
bp	base pair
CaMV35S	cauliflower mosaic virus 35S
BSA	bovine serum albumin
d	day
2,4-D	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
DABA	L-2,4-diaminobutyric acid
DAT	L-2,4-diaminobutyric acid transaminase
DAA	L-2,4-diaminobutyric acid acetyltransferase
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ES	L-ectoine synthase
FW	fresh weight
GUS	β -glucuronidase
h	hour
HA	hemagglutinin
HPT	hygromycin phosphotransferase
kDa	kilodalton
kb	kilobase
LB	Luria broth
LC/ESIMS	liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry
LS	Linsmaier and Skoog
min	minute
MOPS	2-(<i>N</i> -morpholino) propanesulfonic acid
mOsm	milliosmole
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige and Skoog
m/z	mass to charge ratio
NAA	α -naphthaleneacetic acid
nt	nucleotide
NPT-II	neomycin phosphotransferase-II
Osm	osmole
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
RNA	ribonucleic acid
s	second
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SSC	sodium chloride-sodium citrate buffer
TIC	total ion chromatogram
Tris	tris(hydroxymethyl)methylglycine

第 1 章 耐塩性植物の分子育種概論

第 1 節 植物の耐塩性機構

第 1 項 植物に対する塩ストレスの影響

植物は、生長や生存を制限する各種のストレスを絶えず自然環境から受けている。なかでも、塩ストレスは、乾燥ストレスとともに、植物の生産性を大きく左右する代表的なストレスである。例えば、しばしば個々の農家に不利益をもたらす病気や害虫による損失は、収穫率で平均 10% 未満の減収であるのに対し、旱魃や塩害など、植物にとって好ましくない物理化学的な環境因子が引き起こす損失は、最高収穫率の平均 65% 以上にも達する (Boyer, 1982)。この状況は今に始まったことではなく、古代文明の歴史的記録から、紀元前 2200 年代の北メソポタミア地方のアッカド帝国は旱魃によって滅亡し (Kerr, 1998)、紀元前 1700 年代の南メソポタミア地方のシュメール文明は連続的な塩害によって崩壊した (Jacobsen and Adams, 1958) ことなどが知られている。乾燥地域の穀物生産は灌漑農業が基本であるため、乾燥ストレスと塩ストレスは密接に関連している。灌漑用水中には、多量に含まれる Ca^{2+} や Mg^{2+} 以外にも、一部 Na^{+} が含まれている。灌漑用水の水分が蒸発して土壌から蒸散すると、主成分であった Ca^{2+} や Mg^{2+} は炭酸塩となって土中に沈殿するが、沈殿しない Na^{+} は土壌溶液中に残存し続けるため、土壌溶液の主成分として Na^{+} が濃縮される結果となる (Ashraf, 1994; Jacobsen and Adams, 1958)。このような累積的な影響が長期間続くことによって、土壌の質は悪化し、植物が生息できない不毛の土地と化していく。また、乾燥と高塩濃度は、細胞外環境の水ポテンシャルを低下させ、細胞の脱水を誘導して膨圧を低下させることで、高浸透圧ストレスによる損傷を引き起こすという点でも深い関連性がある。高浸透圧ストレスによる脱水は細胞内のイオン強度の増大を引き起こすが、それに加えて、塩ストレス下では多量に流入してくる Cl^{-} や Na^{+} のイオン毒性によって細胞内の代謝が阻害されるという塩特異的な問題を抱えている。そのため、植物は塩ストレスによって、高浸透圧ストレスとイオン毒性による複合的な損傷を受けることになる (Fig. 1-1)。

第 2 項 植物の塩ストレスに対する適応応答

植物が耐塩性を獲得するためには、塩ストレスに応答して、高浸透圧ストレスやイオン毒性による損傷を回避するための機構を備えていなければならない (Fig. 1-2)。特に、植物が塩ストレスに適応するためには、水分の確保、浸透圧の調節、そして塩の排除を行う機構が必要である。耐塩性を示す植物には、生育、

形態、生理、および代謝の各レベルで塩ストレスに対して適応するための機構が存在する。

生育レベルでの適応は、植物が種子の発芽時期や開花時期を塩ストレスの強弱に応じて調節することによって生活環を変化させてストレスを回避する適応機構である。例えば、乾燥地域の植物は、過酷な乾期を回避して生育するために、脱水耐性の強い種子の状態ですべて休眠する。

形態レベルでの適応は、植物が塩ストレスを受けたときに形態的に変化することによって行われ、根系の発達、葉の数および面積の減少、単位葉面積あたりの気孔数の減少、気孔の特殊化、葉表皮のクチクラ層の肥厚化や樹脂の集積などのように、水分の蒸散を減らして水分の確保を行うための適応機構が知られている。また、塩生植物には、葉の多肉化によって細胞質内の塩濃度を低く保つ、塩類腺や囊状毛と呼ばれる特殊な器官によって葉の表層から塩を排出する、あるいは、多量の塩類を蓄積した古い葉を落とすことによって塩を除去する機構が存在するものもある (Flowers *et al.*, 1986)。

生理レベルの適応としては、気孔の閉鎖または気孔開口の阻止によって水分の蒸散を抑え、塩類輸送の制御によって、余分な塩類を根や茎の上部、葉柄、花茎に押し止め、分裂組織や発達途中の葉、若い果実には到達する塩類を減らす適応機構が知られている (Jeschke *et al.*, 1992)。植物の細胞レベルでの塩排出系については明らかになっていないが、原形質膜上の Na^+/H^+ アンチポーターの関与が示唆されている (DuPont, 1992)。また、多量の塩類を液胞に取り込んで細胞の膨圧を維持すると同時に、毒性イオンを隔離することによって細胞質ゾルや葉緑体などのオルガネラ内への塩類の蓄積を抑制する機構が知られている (Matoh *et al.*, 1987)。さらに、塩生植物には、通常は C_3 型の光合成を行っているが、塩ストレスを受けると CAM (crassulacean acid metabolism) 型の光合成が誘導されることによって適応しているものもある (Bohnert *et al.*, 1992)。

代謝レベルの適応は、ストレス誘導性タンパク質の合成、浸透圧調節物質 (osmolyte) の合成や取り込みが知られている (Bohnert and Sheveleva, 1998)。ストレス誘導性タンパク質は、LEA (late embryogenesis abundant) タンパク質、RAB (responsive to ABA) タンパク質、およびオスモチンなど、その機能が不明のものがほとんどであるが、プロテアーゼインヒビターや HSP (heat shock protein) など、塩基配列の相同性からその機能が推定されたものもある。高浸透圧ストレス条件下で細胞の膨圧維持に利用される浸透圧調節物質は、その存在が大腸菌から酵母、高等植物に至るまで広く知られており、 K^+ や Na^+ などのイオンおよび高濃度蓄積しても細胞内の代謝を阻害しない適合溶質 (compatible solute) と呼ばれる低分子有機化合物が知られている (Rhodes and Samaras, 1994; Yancey *et al.*, 1982)。適合溶質は、単に浸透圧の調節を行うだけでなく、タンパク質および膜

の安定化、ヒドロキシラジカル (HO•) 消去、核酸の T_m 値低下による DNA 複製や転写、翻訳の保護などの機能を持つことが示唆されており、塩ストレスから細胞を保護するために重要な役割を担っていると考えられている (Smirnoff, 1998; Yancey, 1994) (Fig. 1-3)。

第 3 項 適合溶質の性質と機能

酵素反応は、電荷をもつ基質が酵素の反応中心にある特定の酸性や塩基性のアミノ酸残基に結合することによって可能となる。そのとき、正電荷をもつ基質の結合は Na^+ によって拮抗阻害を受け、負電荷をもつ基質の結合は Cl^- によって拮抗阻害を受ける。さらに高イオン強度下では、酵素の疎水部位が互いに結合して変性する。好塩性の微生物などにみられる耐塩性の酵素は、このような拮抗阻害や変性を受け難いように進化したものであると考えられる。そのような特別な場合を除き、塩ストレス条件では、生物は酵素反応の重要な場となる細胞質ゾルに高濃度蓄積しても酵素に対して阻害作用をもたない (=適合、compatible) 溶質を蓄積し、塩を可能な限り細胞質ゾルに蓄積しないようにしている (Yancey, 1994)。そのため、強い耐塩性を示す生物は、一般に適合溶質の合成能も高い。適合溶質には、糖および糖の誘導体 (マンニトール、オノニトール、ピニトール、トレハロース、フルクタンなど)、アミノ酸およびアミノ酸誘導体 (プロリン、エクトインなど)、第四級アンモニウム化合物のベタイン類 (グリシンベタイン、アラニンベタインなど)、第三級スルフォニウム化合物 (3-ジメチルスルフォニオプロピオネート (DMSP) など) などがある (Fig. 1-4)。適合溶質は、細胞内に高濃度に蓄積するために、水に対する溶解度が高く、分子全体として中性の性質をもつ。また、高濃度蓄積しても重要な 1 次代謝の攪乱をしないように、メチル化された 2 次代謝産物が好まれる。プロリンは 1 次代謝産物であるが、アミノ酸合成経路全体の末端に位置しているため、高濃度蓄積しても代謝系にあまり害を与えないと考えられる。植物種によって蓄積する適合溶質の種類は異なっており、数種類の適合溶質が複合的に蓄積している場合が多い。しかしながら、2 次代謝産物であるピニトール、グリシンベタイン、DMSP などは重複して蓄積することはない。特に、耐塩性の高い植物は、このような特殊な適合溶質を選択的に合成して蓄積している。海洋性の藻類や塩生植物に蓄積している DMSP は、グリシンベタインの窒素 (トリメチル N) が硫黄 (ジメチル S) に置換された化合物であるが、これは N が乏しく S に富んでいる海水の環境に適応して合成された適合溶質であると考えられる。植物種が選択している適合溶質の種特異性は系統樹では説明できず、組織や生育段階によっても適合溶質の種類と蓄積濃度は異なる。適合溶質のストレス耐性機構についてはいくつかのモデルが提唱されているが、詳細な分子機構については今後の研究を待たねばならない。

これまでの研究から、適合溶質は浸透圧調節以外にもさまざまな機能をもつことが示唆されている (Smirnoff, 1998; Yancey, 1994) (Fig. 1-3)。適合溶質の中でも、糖類、グリシンベタイン、プロリンなどの研究は比較的進んでおり、ストレス耐性と適合溶質の機能についてもよく議論されている。糖類の代表としては、マンニトールとオノニトールが挙げられ、遺伝子工学的にタバコやシロイヌナズナの細胞質ゾルや葉緑体へ合成させることで、耐塩性、耐乾燥性、光酸素ストレス耐性の向上が観察された (Sheveleva *et al.*, 1997; Tarczynski *et al.*, 1993)。マンニトールは葉や根に 6 $\mu\text{mol/g}$ 新鮮重量 (FW) (Tarczynski *et al.*, 1993)、オノニトールは葉に 35 $\mu\text{mol/gFW}$ 蓄積されていた (Sheveleva *et al.*, 1997)。浸透圧調節という適合溶質の役割を考えると、その蓄積濃度は重要な意味をもっており、適合溶質が浸透圧調節に機能するためには細胞質ゾルに 100 mM 以上蓄積しなければならないといわれている。液胞に入らないことを仮定しても、平均 5 $\mu\text{mol/gFW}$ 以上蓄積せねばならず、液胞に入る場合はもう 1 桁多い蓄積量が必要となる。この観点からすると、上記のオノニトール蓄積量は浸透圧調節に十分機能し得るレベルといえるが、マンニトールは浸透圧調節には不十分な蓄積量であると考えられ、マンニトールは浸透圧調節以外の機能をもつことが予想された。

実際、マンニトールはタバコの葉緑体内で合成させると、光酸素ストレスに対して顕著な耐性を示すことから、糖類のもつヒドロキシラジカルのラジカル捕捉(消去)能が葉緑体の保護に機能していることが示唆されている (Shen *et al.*, 1997a)。塩や乾燥による高浸透圧ストレス条件下では、気孔の閉鎖に伴い Calvin-Benson サイクルの還元力消費能が低下し、過剰な還元力が酸素に渡され、活性酸素による膜やタンパク質、核酸などの損傷が無視できない。活性酸素種のうち、 O_2^- と H_2O_2 はスーパーオキシドジムスターゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼにより消去される。一方、ヒドロキシラジカルを消去する酵素は見つかっていないが、アスコルビン酸やグルタチオンなどの低分子物質によって消去される。糖がヒドロキシラジカルを消去する機構については不明であるが、マンニトールはホスホリプロキナーゼのように活性中心にチオール基 (-SH 基) をもつ酵素をヒドロキシラジカルによる不活性化から保護することが報告されている (Shen *et al.*, 1997b)。

トレハロースは乾燥地に生息する復活植物に蓄積している適合溶質として知られている。また、酵母もトレハロースを蓄積するので、酵母をモデル細胞としたトレハロースの機能解析が進んでいる (Leslie *et al.*, 1994)。細胞膜の構成要素であるリン脂質二重膜は水分があると液晶構造をとるが、乾燥するとゲル化して損傷を受ける。しかしながら、*in vitro* の実験で、トレハロースの -OH 基とリン脂質膜のリン酸が直接相互作用することで、膜がゲル状になるのを防いで液晶構造を保つというモデルが提唱されている (Crowe *et al.*, 1987; Crowe *et al.*,

1984)。復活植物が乾燥しても復活できるのは、トレハロースが膜構造や膜上タンパク質の保護に機能するためであると考えられている。

グリシンベタインは、アカザ科、イネ科、ナス科などの高等植物だけでなく、大腸菌や耐塩性シアノバクテリアなどにおいても適合溶質として広く存在している。高等植物においてグリシンベタインは安定な 2 次代謝産物で、分解を受け難いと考えられており、塩ストレス下の塩生植物では細胞質ゾルや葉緑体に 1 M ものグリシンベタインが蓄積することもある。グリシンベタインの機能は、浸透圧調節のみならず、塩による酵素の失活を抑える作用もある。また、高塩濃度だけではなく、高温や低温条件下でも細胞内の高分子化合物の高次構造を保持し、タンパク質の水和構造を安定化する作用があると考えられている。シアノバクテリアの系では塩による Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase) や光化学系複合体の失活がグリシンベタインによって抑えられることが示された (Murata *et al.*, 1992; Nomura *et al.*, 1998; Nomura *et al.*, 1995)。また、グリシンベタインは DNA の T_m 値を下げる効果をもっている (Rajendrakumar *et al.*, 1997)。塩濃度が高くなると核酸の T_m 値が上昇するので、DNA の複製や転写、翻訳が阻害されると考えられる。そのため、グリシンベタインは核酸の T_m 値を下げることによって、塩による DNA の複製や転写、翻訳の阻害を抑える効果をもつと予想されている。実際に、*in vitro* でのリボゾームの安定性試験から、RNA 翻訳におけるグリシンベタインの効果が示されている (Brady *et al.*, 1984)。その他に、膜を安定化する作用なども報告されているが、糖類のようなヒドロキシラジカルを消去する機能はもっていない (Shen *et al.*, 1997b; Smirnoff and Cumbes, 1989)。

プロリンは、塩生植物からシロイヌナズナ、タバコなどのモデル植物に至るまで、多くの植物で主要な適合溶質として、乾燥や塩による高浸透圧ストレス条件下で合成されることが知られている (Delauney and Verma, 1993; Hanson and Hitz, 1982; Yancey *et al.*, 1982)。プロリンもまた、浸透圧調節のみならず、タンパク質や膜構造の安定化に作用している (Schobert and Tschesche, 1978)。また、糖のようにヒドロキシラジカルを消去し (Smirnoff and Cumbes, 1989)、グリシンベタインのように DNA の T_m 値を下げる機能をもつ (Rajendrakumar *et al.*, 1997)。しかしながら、*in vitro* でプロリンが 100 mM 以上蓄積すると、アブラナやイネから精製した葉緑体の Rubisco の活性を阻害することが知られており (Sivakumar *et al.*, 1998)、ストレスのない状態でプロリンが過剰に存在すると植物の生長を阻害する可能性が示唆されている。シロイヌナズナでは、プロリンの合成と分解に関わる 2 種類の鍵遺伝子の発現制御によってプロリン含量が調節され、高浸透圧ストレス条件下でのみプロリンを細胞内に蓄積する機構が示されている (Yoshida *et al.*, 1997)。

第4項 塩ストレス下での植物細胞のイオンホメオスタシス制御機構

塩ストレス下の植物細胞では、多量の Na^+ や Cl^- によって、 K^+ や Ca^{2+} などの生理学的に重要なイオン輸送の動力学的な平衡状態が崩される。ある種の塩生植物は、塩ストレスに適応するために塩腺や囊状毛などの特殊な機構を進化の過程で獲得してきたと考えられる (Flowers *et al.*, 1986) が、このような耐塩性機構を植物全般に当てはめて考えることはできない。しかしながら、細胞レベルでのイオンホメオスタシス制御機構は、全ての植物で耐塩性に重要な役割を担っている。植物細胞が塩ストレスに曝されると、細胞外の塩によって水ポテンシャルは減少し、細胞質ゾルには過剰な塩が蓄積する (Binzel *et al.*, 1988)。植物細胞は、適合溶質を合成し、外部の塩を蓄積することによって浸透圧調節を行って水ポテンシャルを中和するが、浸透圧調節の際は外部の塩が細胞質ゾルで高濃度に蓄積することを避け、適合溶質によってイオン毒性を弱められなければならない。植物細胞が塩ストレスに適応するためには、原形質膜を通した外部イオンの流入量は、液胞へ隔離できる許容量に応じた割り合いできちんと制御されなければならない (Binzel *et al.*, 1988)。そのため、 Na^+ の細胞内への取り込みと液胞への隔離に関わる、原形質膜および液胞膜のイオン輸送系タンパク質は、植物細胞がイオンホメオスタシスを維持して塩ストレスに適応するために重要な役割を担っているといえる (Fig. 1-5)。

塩ストレス下で Na^+ が原形質膜から植物細胞内へ流入する機構については明らかになっていないが、 Na^+ は K^+ 摂取を競合阻害する (Schroeder *et al.*, 1994; Watad *et al.*, 1991) ことから、 Na^+ は K^+ と同じ機構によって摂取されると予想されている (Amtmann and Sanders, 1999)。植物の根には、低 K^+ 濃度 (1 mM 未満) で機能する高親和性の K^+ 摂取系 (K_m 値 10-30 μM) と高 K^+ 濃度 (1 mM 以上) で機能する低親和性の K^+ 摂取系の 2 つの K^+ 摂取系が存在する。低親和性の K^+ 摂取系は、高親和性の K^+ 摂取系よりも Na^+/K^+ 選択性が低いので、 Na^+ は主に低親和性の K^+ 摂取系を利用して流入してくると予想されている。イオン輸送系の研究が進んでいる酵母では、高濃度の塩が引き金となって、高親和性の K^+ 摂取系を活性化し、低親和性の K^+ 摂取系を抑制することによって、 K^+ 摂取系の Na^+/K^+ 選択性を高めて塩ストレスに適応する機構が示唆されている (Haro *et al.*, 1993)。この仮定を支持するように、塩ストレスに適応したタバコ細胞では、適応していない野生型細胞と比較して、高親和性の K^+ 摂取系が活性化され、原形質膜で高い Na^+/K^+ 選択性を有していることが示唆された (Watad *et al.*, 1991)。それゆえ、原形質膜上の K^+ 摂取系の Na^+/K^+ 選択性を高めることが、塩ストレスへの適応に重要であると考えられる。

原形質膜や液胞膜を通して細胞質ゾルから能動的に Na^+ を排出する機構は、

Na^+ の細胞内への取り込みや Na^+ の液胞への隔離を制御するために必須である。生理学的および生化学的解析から、植物細胞の原形質膜や液胞膜に存在する Na^+/H^+ アンチポーターがこれらの Na^+ の流れに関与していることが示された (DuPont, 1992)。原形質膜や液胞膜に存在する Na^+/H^+ アンチポーターは、同じ膜上に存在する H^+ ポンプによってつくられるプロトン勾配をエネルギーとして利用している。塩生植物や耐塩性の藻類では、原形質膜の Na^+/H^+ アンチポーターが、塩ストレスによって活性化されることが知られている (Hassidim *et al.*, 1990; Katz *et al.*, 1992)。このとき、原形質膜 H^+ -ATPase の遺伝子発現量が塩ストレスに応じて増加することによって、原形質膜 H^+ -ATPase の活性化が行われることが示された (Niu *et al.*, 1993a; Niu *et al.*, 1993b; Perez-Prat *et al.*, 1994)。また、原形質膜 H^+ -ATPase mRNA の蓄積は、塩ストレスに適応している間だけ誘導されており、その蓄積量と耐塩性には正の相関関係があることが示された (Braun *et al.*, 1986; Niu *et al.*, 1993a; Niu *et al.*, 1993b; Perez-Prat *et al.*, 1994)。

塩ストレス下で、 Cl^- や Na^+ を液胞に隔離する機構は、細胞質ゾルのイオン強度を下げる一方で細胞の浸透圧調節を行うのにも役立つため、耐塩性に重要な役割を担っている (Apse *et al.*, 1999; DuPont, 1992)。液胞膜の Na^+/H^+ アンチポーターもまた、塩ストレスによって活性化することが知られている (DuPont, 1992)。このとき、液胞膜に局在する H^+ -ATPase および H^+ -PPase (H^+ -pyrophosphatase) の活性も塩ストレスに対して適応応答している時にだけ活性化される (Colombo and Cerana, 1993; Narasimhan *et al.*, 1991)。

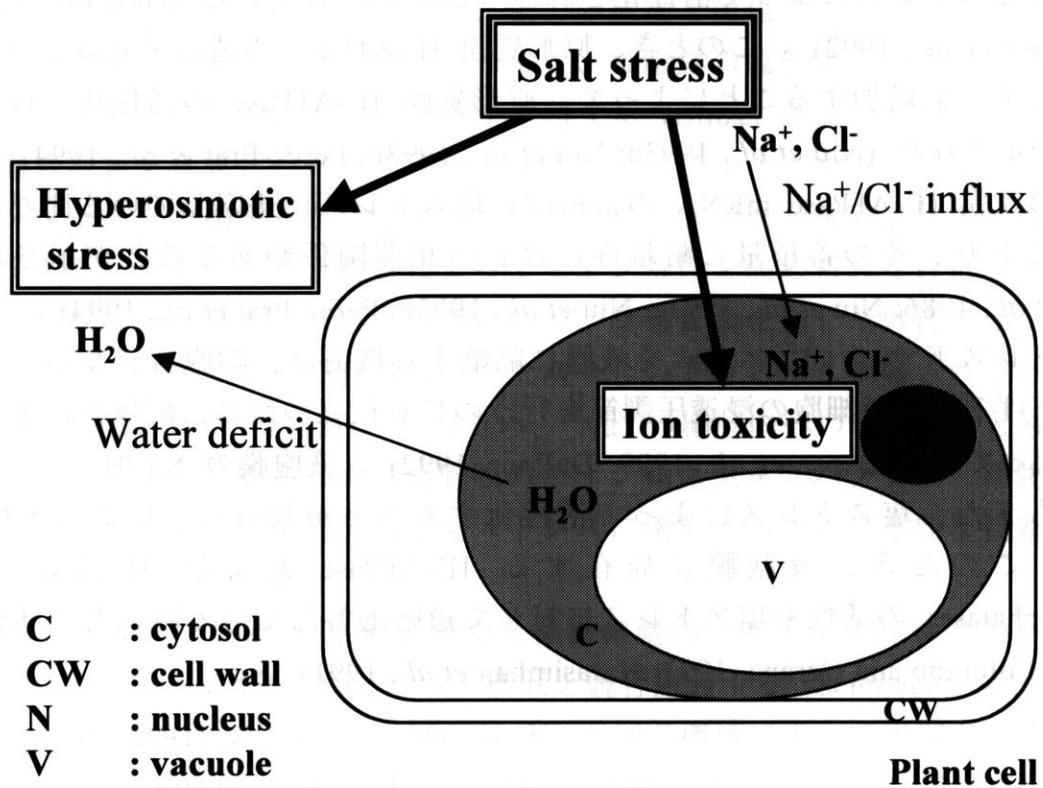


Figure 1-1. Two major harmful effects of salt stress on plant cells: the nonspecific osmotic effect and the specific ion toxicity effect.

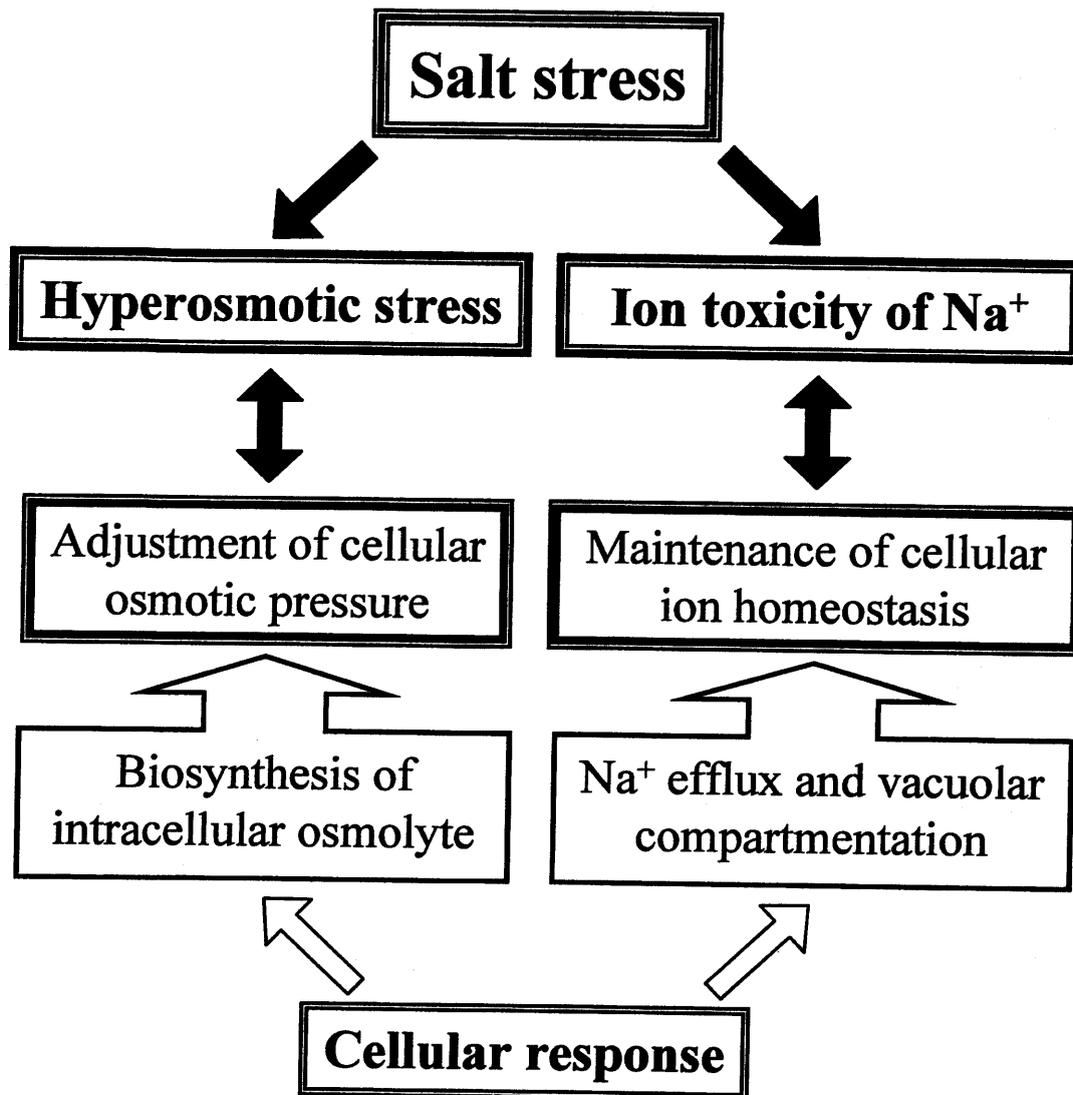


Figure 1-2. Adaptive responses to salt stress in plant cells.

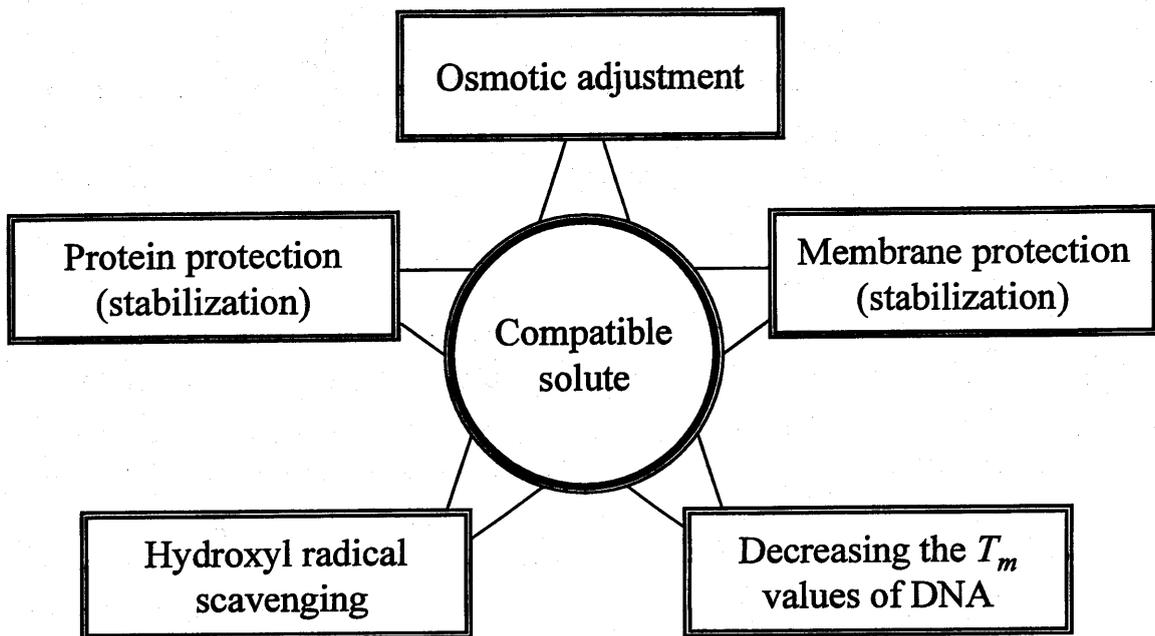
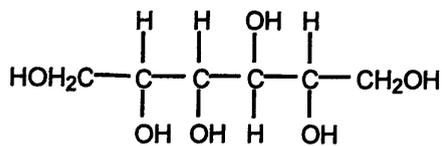
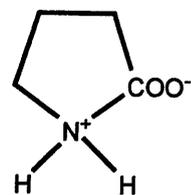


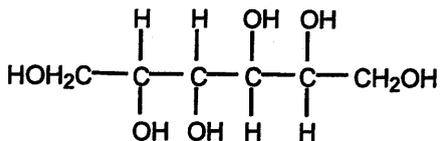
Figure 1-3. Biochemical functions of compatible solutes.



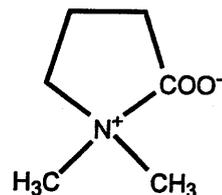
D-Sorbitol



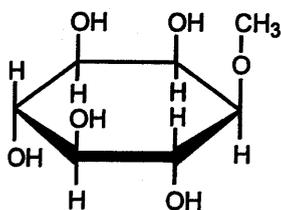
Proline



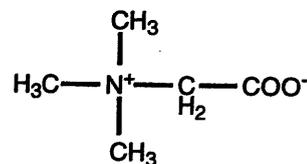
D-Mannitol



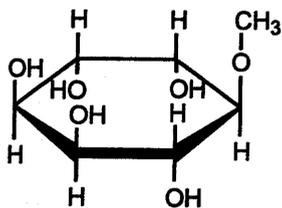
Proline betaine



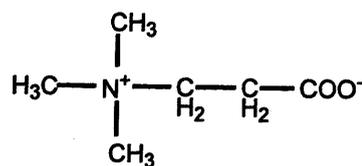
D-Ononitol



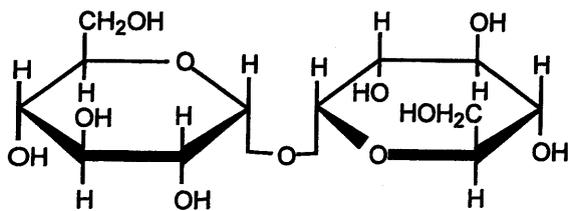
Glycine betaine



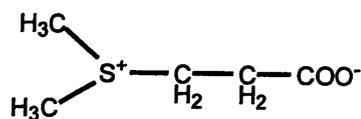
D-Pinitol



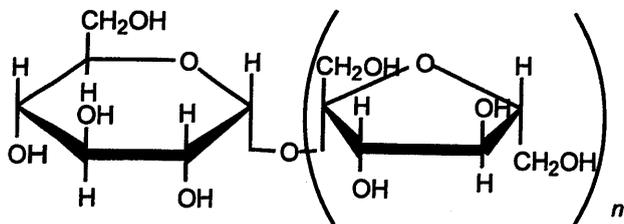
β-Alanine betaine



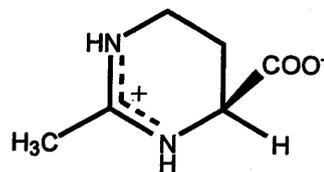
Trehalose



β-Dimethylsulfoniopropionate (DMSP)



Fructan (n=10-200)



Ectoine

Figure 1-4. Structures of common compatible solutes.

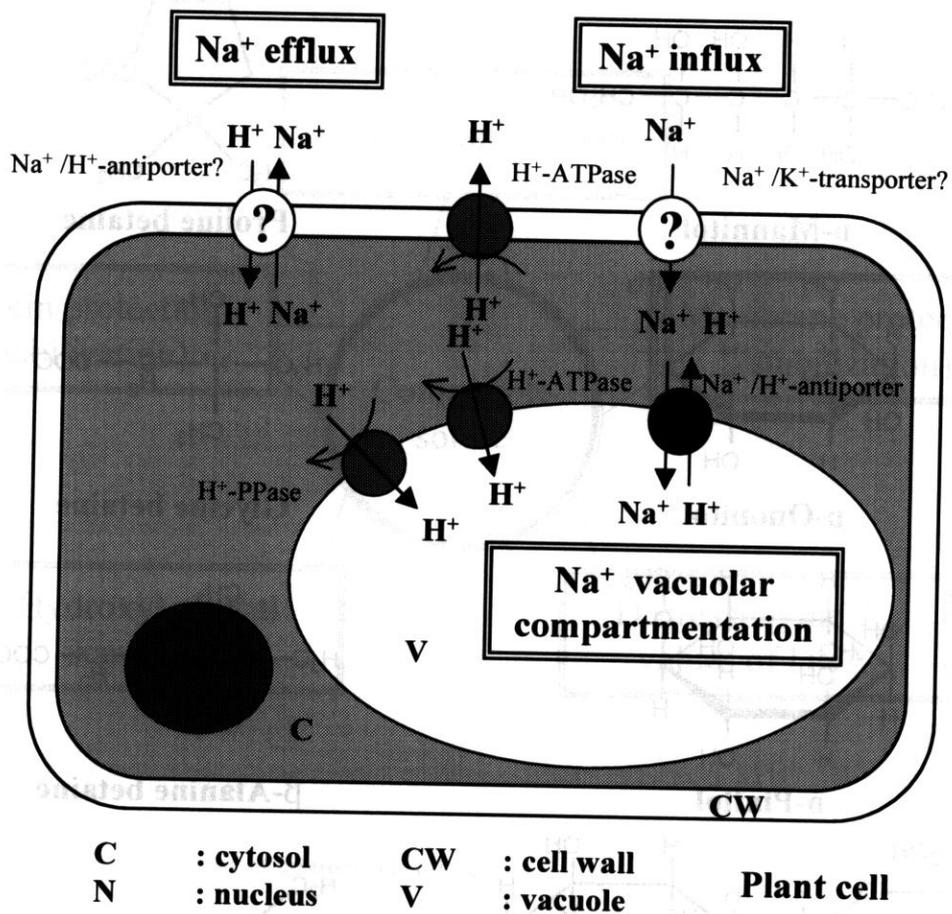


Figure 1-5. Mechanisms of ion homeostasis during salt stress.

第 2 節 耐塩性植物の分子育種

第 1 項 耐塩性植物の分子育種に有効な遺伝子

植物は、食糧や森林資源として直接利用されるだけでなく、光合成を通して二酸化炭素を吸収して酸素を放出し、さらに活発な蒸散活動によって豊かな大気や地表の維持に大きく貢献している。人類は、古くから植物に有用形質を付与するための品種改良を行ってきたが、近縁種の交雑による育種が中心であった。分子生物学に裏打ちされた「植物分子育種技術」は、遺伝子組換え技術を利用して植物の染色体へ外来遺伝子を導入することによって、植物に有用形質を賦与できる画期的な手法である。さらに、近縁種以外の植物や微生物などが有する有用形質を発現するための遺伝子群 (代謝系) を植物へ多重導入することによる「植物代謝工学」によって、実用的な有用植物の分子育種が可能になると考えられる (Kishore and Somerville, 1993; Nuccio *et al.*, 1999)。

砂漠の緑化による地球環境の再生や、塩土および海水の農業利用による食糧増産に役立つ植物の分子育種として、耐塩性植物の分子育種に期待が寄せられている (Barkla *et al.*, 1999; Holmberg and Bülow, 1998)。前節で述べたのように、高等植物は塩ストレスに適応するために種々の機構を備えている。また、分子生物学的研究の発展により、細菌や酵母、植物などから塩ストレスによって発現が誘導される遺伝子群が多数同定され、一部についてはその遺伝子産物が関与する耐塩性機構が推定されている (Ingram and Bartels, 1996; Serrano and Gaxiola, 1994)。細胞レベルの塩ストレス応答は、植物と細菌、酵母などで共通している機構の存在も知られており、植物以外の遺伝子であっても、耐塩性植物の分子育種への利用価値は高い (Nelson *et al.*, 1998; Serrano, 1996)。一方、植物由来であっても、塩生植物でみられる塩腺などの特殊な機構は、分子生物学的知見が乏しく、恐らく複数の遺伝子が関与することから、他の植物へ機能的に賦与することは難しい。これまでに同定された遺伝子の中でも、耐塩性植物の分子育種に有効であると思われるのは、1) 適合溶質生合成系酵素の遺伝子 (Rhodes and Hanson, 1993; Vernon and Bohnert, 1992) (Table 1-1)、2) 一般的なストレス誘導性タンパク質の遺伝子 (Godoy *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 1992; Moons *et al.*, 1997)、3) イオン輸送やイオンホメオスタシス維持に必要なタンパク質の遺伝子 (Fukuda *et al.*, 1999; Gaxiola *et al.*, 1999; Maurel, 1997; Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992)、4) 信号伝達や遺伝子発現を制御するタンパク質の遺伝子 (Bray, 1997; Kudla *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999; Liu and Zhu, 1998; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996)、の 4 つのグループに分類できる。

第2項 適合溶質生合成系の利用

塩ストレスに応答して、植物は細胞内で適合溶質 (Fig. 1-3) を高濃度に蓄積することで、浸透圧調節や細胞内構成分子 (タンパク質や生体膜など) の保護を行っている。このような適合溶質による耐塩性機構については、植物に限らず細菌や酵母においても詳しく研究されている (Smirnoff, 1998; Yancey, 1994)。また、適合溶質の代謝経路もよく知られており、適合溶質生合成の鍵となる遺伝子も同定されている。したがって、適合溶質生合成の鍵となる遺伝子を導入し、植物に適合溶質を蓄積させることによって、耐塩性植物の作製が可能となることが予想される (Nuccio *et al.*, 1999)。すでに、シロイヌナズナやタバコなどのモデル植物だけではなく、イネなどの主要穀物への応用も試みられている (Table 1-1)。

第3項 一般的なストレス誘導性タンパク質の利用

塩だけでなく、高温、低温、活性酸素などさまざまな環境ストレスに応答して、多様なタンパク質が生成することが知られている。そのうち、LEA (late embryogenesis abundant) タンパク質、RAB (responsive to ABA) タンパク質、オスモチン、デヒドリン、HSP (heat shock protein) などは、塩ストレスに応答して生成することが知られている (Godoy *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 1992; Moons *et al.*, 1997)。これらのタンパク質は、各種ストレスによるタンパク質の構造変化や、酵素活性の低下を抑制したり、損傷したタンパク質や生体膜を修復する機能をもつと考えられており、大量に生成させることによって植物の耐塩性が向上すると予想される。これまでに、オオムギの LEA タンパク質の遺伝子をイネに導入し、イネの耐塩性を向上させた例が報告されている (Xu *et al.*, 1996)。

第4項 イオン輸送系の利用

細胞外部の塩濃度が上昇すると、細胞内から水が流出する一方でイオンが細胞内に流入する。その結果、細胞内の Na^+ などのイオン濃度が上昇し、細胞の生理活性や酵素活性が変化して、イオンホメオスタシスが維持できなくなる。これに対する応答機構として、イオンチャネルや水チャネル、原形質膜や液胞に存在する Na^+/H^+ アンチポーター、 H^+ ポンプ、 K^+ 輸送体、MIP (major intrinsic protein) や TIP (tonoplast intrinsic protein) などのアクアポリンファミリーなどの発現が重要な因子と考えられ、これらの遺伝子の単離や塩ストレス応答における役割の解明が試みられている (Fukuda *et al.*, 1999; Gaxiola *et al.*, 1999; Maurel, 1997; Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992)。細胞への水とイオンの出入りを直接制御できる点で、これら膜輸送系タンパク質の遺伝子操作は塩ストレス耐性の向上に効果的であると考えられる。これまでに、シロイヌナズナの液胞膜に存在する Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子を過剰発現させることによって、耐塩性が向上し

た例が報告されている (Apse *et al.*, 1999)。

第 5 項 信号伝達系の利用

塩ストレスや乾燥ストレスで誘導される一群の遺伝子のプロモーターには、シロイヌナズナで同定された DRE (dehydration responsible element) や ABRE (ABA responsible element) などの共通した *cis* 配列が存在している (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997)。また、シロイヌナズナから DRE に結合する転写活性化因子 DREB1A cDNA が単離された (Liu *et al.*, 1998; Shinwari *et al.*, 1998)。この DREB1A cDNA をシロイヌナズナに導入して過剰発現することにより、DRE をプロモーターにもつ塩ストレス誘導性の遺伝子群の転写が一斉に活性化されることが予想され、塩ストレス応答を過敏にすることができると考えられる (Liu *et al.*, 1998)。この転写活性化因子の遺伝子操作は、シロイヌナズナがすでにもっているストレス耐性機構を活性化することによって、短時間でストレスへの適応応答をさせられるので、有効な手法であるといえる (Kasuga *et al.*, 1999)。

Table 1-1. Metabolic engineering of plants to increase the synthesis of compatible solutes.

Compatible solutes	Gene ^a	Source	Host plant	Content	Reference
Mannitol	<i>mtlD</i>	<i>E. coli</i>	Tobacco	1-6 $\mu\text{mol/gFW}^b$	(Tarczynski <i>et al.</i> , 1993)
	<i>mtlD</i>	<i>E. coli</i>	<i>Arabidopsis</i>	0.05-12 $\mu\text{mol/gFW}$	(Thomas <i>et al.</i> , 1995)
Ononitol	IMT1 cDNA	Ice plant	Tobacco	10-60 $\mu\text{mol/gFW}$	(Sheveleva <i>et al.</i> , 1997)
Sorbitol	STPD1 cDNA	Apple	Tobacco	0.2-130 $\mu\text{mol/gFW}$	(Sheveleva <i>et al.</i> , 1998)
Proline	P5CS cDNA	Mothbean	Tobacco	10-60 $\mu\text{mol/gFW}$	(Kishor <i>et al.</i> , 1995)
Glycine betaine	<i>codA</i>	<i>A. globiformis</i>	<i>Arabidopsis</i>	1 $\mu\text{mol/gFW}$	(Hayashi <i>et al.</i> , 1997)
	<i>codA</i>	<i>A. globiformis</i>	Rice	1-5 $\mu\text{mol/gFW}$	(Sakamoto <i>et al.</i> , 1998)
	<i>betA</i>	<i>E. coli</i>	Tobacco	N.D. ^c	(Lilius <i>et al.</i> , 1996)
Trehalose	CMO cDNA	Spinach	Tobacco	0.02-0.05 $\mu\text{mol/gFW}$	(Nuccio <i>et al.</i> , 1998)
	TPS1 cDNA	Yeast	Tobacco	2-9 $\mu\text{mol/gDW}^d$	(Holmström <i>et al.</i> , 1996)
Fructan	<i>sacB</i>	<i>B. subtilis</i>	Tobacco	0.05-0.3 mg/gFW	(Pilon-Smits <i>et al.</i> , 1995)

^a*mtlD*, a gene encoding mannitol-1-phosphatase dehydrogenase; IMT1 cDNA, a cDNA encoding myo-inositol *o*-methyltransferase; STPD1 cDNA, a cDNA encoding sorbitol-6-phosphate dehydrogenase; P5CS cDNA, a cDNA encoding Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase; *codA*, a gene encoding choline oxidase; *betA*, a gene encoding choline dehydrogenase; CMO cDNA, a cDNA encoding choline monooxygenase; TPS1 cDNA, a cDNA encoding trehalose-6-phosphate synthase subunit; *sacB*, a gene encoding levansucrase. ^bFW, fresh weight. ^cN.D., not determined. ^dDW, dry weight.

第 3 節 本研究の目的

第 1 項 耐塩性植物を分子育種するための戦略

植物細胞が受ける「塩 (NaCl) ストレス」による損傷は、細胞外の高濃度の塩による「高浸透圧ストレス」と細胞質ゾルに流入した Na^+ の「イオン毒性」の 2 つの因子が複合的に作用して引き起こされる。両因子に対する植物の耐性機構は異なっており、それぞれの因子に応じた戦略が必要である。高浸透圧ストレスに対しては、適合溶質の生合成系を利用した分子育種を行うことが有効であり、 Na^+ のイオン毒性に対しては、イオンホメオスタシスを強化するイオン輸送系の利用が有力な手段であるといえる (Fig. 1-6)。

第 2 項 適合溶質エクトインによる高浸透圧ストレス耐性の賦与

本研究では、好塩性細菌 *Halomonas elongata* の適合溶質であるエクトインに注目した。エクトインは、好塩性細菌や大腸菌などで適合溶質として機能し、浸透圧調節やタンパク質の保護に機能していることが示唆されている (Ono *et al.*, 1998)。よって、植物細胞においてもエクトインが適合溶質として機能するならば、植物細胞の高浸透圧ストレス耐性が向上することが期待できる (Fig. 1-6)。そこで、第 2 章では、モデル植物であるタバコ (*Nicotiana tabacum*) へ *H. elongata* のエクトイン生合成系遺伝子を導入し、エクトインがタバコ細胞の高浸透圧ストレス耐性を向上させることができるかという課題について検討を行った。

第 3 項 ナトリウムポンプによる Na^+ のイオン毒性に対する耐性の賦与

これまでに、シロイヌナズナとイネから液胞へ Na^+ を隔離する Na^+/H^+ アンチポーターが同定されている (Fukuda *et al.*, 1999; Gaxiola *et al.*, 1999) が、植物の原形質膜上で Na^+ を排出するイオン輸送体は同定されていない。しかしながら、細胞質ゾルの Na^+ を液胞へ隔離する一方で、細胞外へ不要な Na^+ を排出することが Na^+ のイオン毒性に対する戦略として有効であると考えられる。そこで本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Na^+/Li^+ ポンプ Enalp に注目した。*S. cerevisiae* の塩ストレス耐性機構における Enalp の役割は非常に大きく、Enalp をコードした *ENAL1* 遺伝子の発現量によって酵母細胞の塩ストレス耐性が決定される (Garcia-deblas *et al.*, 1993; Haro *et al.*, 1991; Wieland *et al.*, 1995)。よって、植物細胞において Enalp を機能的に生成させられるならば、植物細胞の塩ストレス耐性が向上することが期待できる (Fig. 1-6)。そこで、第 3 章では、モデル植物であるタバコ (*N. tabacum*) へ *S. cerevisiae* の Na^+/Li^+ ポン

プをコードした *ENAI* 遺伝子を導入し、*Enalp* を機能的に生成させることによって、タバコ細胞における Na^+/Li^+ のイオン毒性に対する耐性が向上するかという課題について検討した。

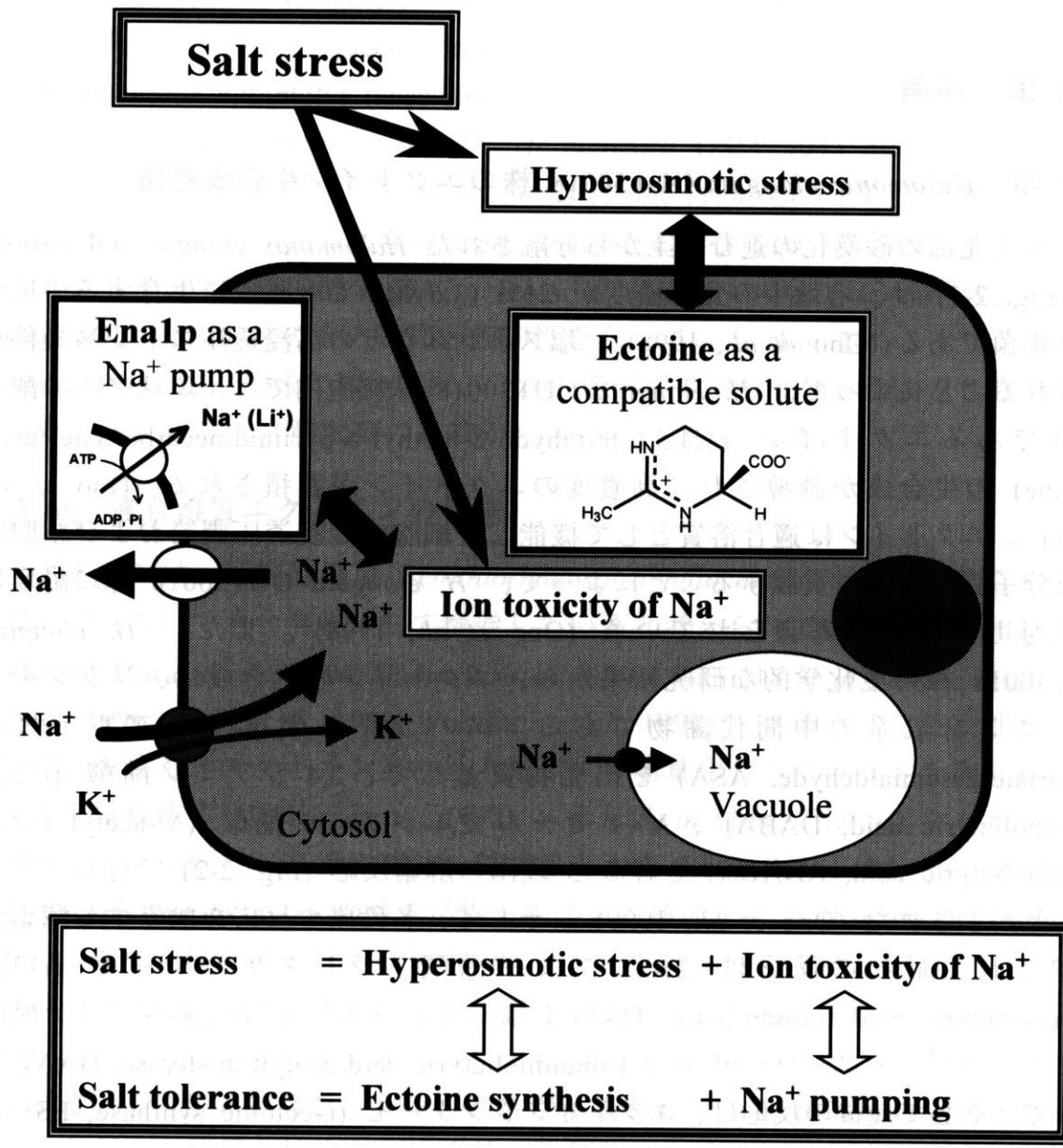


Figure 1-6. Strategies for engineering salt tolerance in plant cell.

第 2 章 好塩性細菌 *Halomonas elongata* のエクトイン生合成系遺伝子を利用した耐塩性植物の分子育種

第 1 節 序論

第 1 項 *Halomonas elongata* OUT30018 株のエクトイン生合成経路

タイ東部の砂漠化の進む塩土から分離された *Halomonas elongata* OUT30018 株 (Fig. 2-1) は、培地中の食塩濃度が 21% (3.6 M) でも旺盛に生育する中度好塩性細菌である (Ono *et al.*, 1998)。塩ストレスなどの高浸透圧ストレス条件に曝されることによって、*H. elongata* OUT30018 株細胞内では、環状アミノ酸の一種であるエクトイン (1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid, ectoine) の生合成が誘導され、高濃度のエクトインが蓄積される (Ono *et al.*, 1998)。エクトインは適合溶質として機能し、細胞内の浸透圧調節および細胞内構成分子保護などに貢献することによって、*H. elongata* OUT30018 株に耐塩性を賦与していると考えられている (Ono *et al.*, 1998)。また、*H. elongata* OUT30018 株の生化学的な研究結果から、エクトインの生合成は、リジンやトレオニン合成系の中間代謝物であるアスパラギン酸- β -セミアルデヒド (aspartate- β -semialdehyde, ASA) を出発物質として、2,4-ジアミノ酪酸 (L-2,4-diaminobutyric acid, DABA)、*N*-アセチル 2,4-ジアミノ酪酸 (*N*-acetyl L-2,4-diaminobutyric acid, ADABA) を経る 3 段階の酵素反応 (Fig. 2-2) で行われていることが示された (Ono *et al.*, 1999)。そして、各段階の反応を触媒する酵素が同定され、最初の反応は 2,4-ジアミノ酪酸トランスアミナーゼ (L-2,4-diaminobutyric acid transaminase, DAT) によって、次の反応は 2,4-ジアミノ酪酸アセチルトランスフェラーゼ (L-2,4-diaminobutyric acid acetyltransferase, DAA) によって、そして最後の反応は、エクトインシンターゼ (L-ectoine synthase, ES) によって触媒されることが明らかにされた (Ono *et al.*, 1999) (Fig. 2-2)。

第 2 項 *H. elongata* OUT30018 株からのエクトイン生合成系オペロンの単離

これまでに *H. elongata* OUT30018 株のエクトイン生合成系酵素が精製され、このうち、最終段階の反応を触媒する ES の N 末端アミノ酸配列をもとにオリゴ DNA プロブを作製し、*H. elongata* OUT30018 株染色体 DNA ライブラリーに対してスクリーニングが行われた。その結果、ES をコードした *ectC* 遺伝子を含むと考えられる約 4.1 kb の染色体 DNA 断片が単離された (Min-Yu *et al.*, 1993)。この染色体 DNA 断片を挿入したプラスミド pECT201 を導入した大腸菌では、エクトインの蓄積が確認され、増殖における耐塩性も上昇した (Min-Yu *et*

al., 1993)。さらに、塩基配列の決定、および欠失 DNA 断片を用いた大腸菌での解析により、約 4.1 kb の染色体 DNA 断片上で、エクトイン生合成系の 3 遺伝子 (*ect* 遺伝子: *ectA*, *ectB*, *ectC*) がポリシストロン性のオペロンを形成していることが明らかにされた (accession no. D88359) (Fig. 2-3)。すでに、*ect* 遺伝子は *Marinococcus halophilus* (accession no. U66614)、*H. elongata* DSM 2581^T 株 (accession no. AF031489)、および *H. elongata* DSM 3043 株 (accession no. AJ011103) からも単離されている (Cánovas *et al.*, 1998; Göller *et al.*, 1998; Louis and Galinski, 1997) が、これらの *ectA*、*ectB*、および *ectC* の各遺伝子がコードするエクトイン生合成系酵素 DAT、DAA、および ES の各アミノ酸配列は、*H. elongata* OUT30018 株のものと高い相同性を有している (Fig. 2-4)。ただし、*H. elongata* DSM 2581^T 株においては、*ectC* 遺伝子の部分配列しか決定されていないため、ES のアミノ酸配列の比較から除外した (Fig. 2-4C)。

第 3 項 適合溶質エクトインの機能

エクトインは、好塩性細菌 *Ectothiorhodospira halochloris* をはじめとした多くの微生物において適合溶質として機能していると考えられている (Bernard *et al.*, 1993; Del-Moral *et al.*, 1994; Farwick *et al.*, 1995; Galinski *et al.*, 1985; Malin and Lapidot, 1996; Ronit *et al.*, 1990; Wohlfarth *et al.*, 1990)。エクトイン生産能がない大腸菌でさえも、エクトイン取り込み系により培地中のエクトインを取り込んで耐塩性を獲得する (Jebbar *et al.*, 1992)。そして *in vitro* では、エクトインはトレハロースと同様に、高温や凍結、乾燥などから LDH (lactic dehydrogenase) や PFK (phosphofructokinase) の酵素活性を保護する機能をもつ (Lippert and Galinski, 1992)。また、根粒菌では、培地中のエクトインにより、グリシンベタインやトレハロースなどの適合溶質の合成が誘導され、耐塩性が向上する (Talibart *et al.*, 1994)。さらに、エクトインが DNA と直接的に結合することが示され、エクトインが遺伝子発現に影響を与える可能性が示唆されている (Malin *et al.*, 1999)。しかしながら、酵母や植物などの真核生物細胞におけるエクトインの適合溶質としての効果については、若干の検討がなされているだけ (Tongpim and Takano, 1988) で、これらの真核細胞におけるエクトインの効果については不明のままである。現時点では、主に原核生物細胞内に高濃度に蓄積されたエクトインが浸透圧調節やタンパク質保護に貢献することによって細胞に高浸透圧耐性を賦与していることが予想されている以外は、エクトインの *in vivo* における分子レベルの機能については未だに明らかにされていない。

第 4 項 植物へエクトイン生合成系遺伝子を導入することの意義

これまでに、植物におけるエクトインの生合成は確認されておらず、植物細

胞におけるエクトインの機能を直接的に調べるのは不可能である。また、植物の培地にエクトインを添加した場合でも、植物細胞にエクトイン取り込み系が存在するか、あるいはエクトインがどれだけ細胞内に取り込まれるかという問題が生じ、植物に対するエクトインの影響を明確に調べることは難しい。そのため、植物細胞におけるエクトインの機能を知るためには、遺伝子組換え技術によって植物細胞へエクトインの生合成系遺伝子を導入する植物代謝工学的手法が有効な手段となる。しかしながら、エクトイン生合成系を植物へ導入するためには、3種の *ect* 遺伝子を多重導入しなければならない。これまでの植物代謝工学は鍵となる単一遺伝子を植物へ導入する試みが主流であったが、耐塩性などの有用形質を決定する因子は複数存在しており、単一遺伝子を導入するだけで実用的な有用植物を分子育種することは難しい。そのため、有用形質を決定している複数の鍵遺伝子を植物へ多重導入して機能的に発現させることは、植物代謝工学に求められている重要な課題の一つである。植物へエクトイン生合成系の鍵となる3種の遺伝子を多重導入することは、植物細胞における適合溶質エクトインの機能を知るという点だけではなく、複数遺伝子の多重導入による植物代謝工学の有効性を示すという点で意義深い。さらに、エクトインが植物細胞内で適合溶質として機能すれば、微生物と同様に植物の耐塩性、特に塩による高浸透圧ストレスに対する耐性が向上することが期待できる。そこで、本章では、モデル植物であるタバコ (*Nicotiana tabacum*) へ好塩性細菌 *H. elongata* 由来のエクトイン生合成系3遺伝子を多重導入し、タバコ細胞内でエクトインを生合成させ、タバコ細胞内で生産されたエクトインにより、タバコ細胞の高浸透圧ストレス耐性が向上するか、という課題について検討を行った。

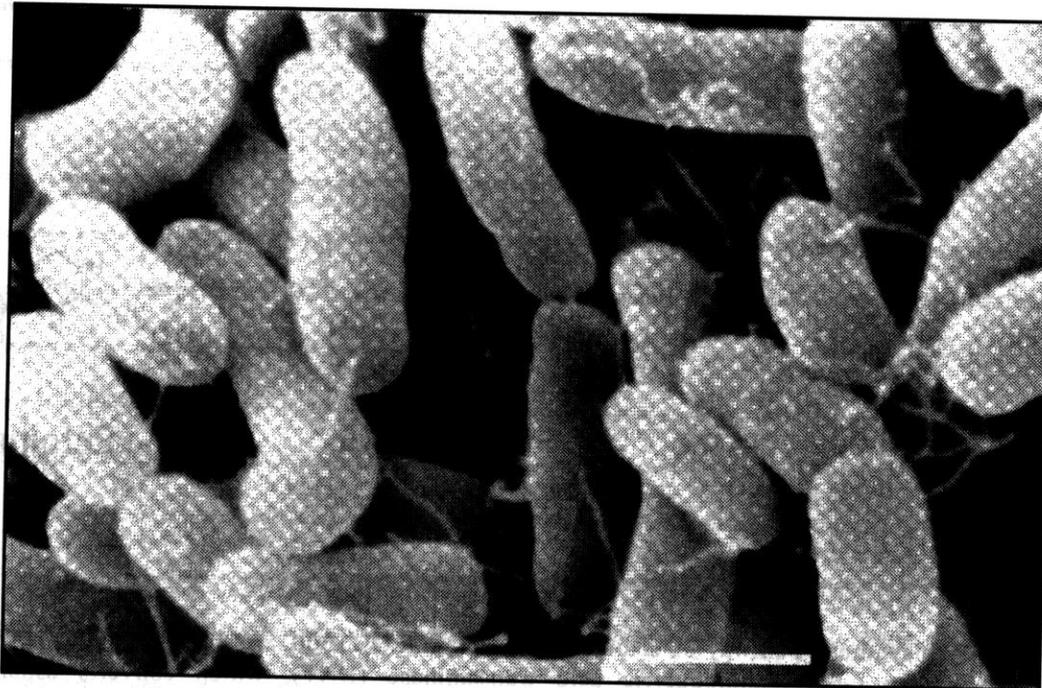


Figure 2-1. Scanning electron micrograph of *Halomonas elongata* OUT30018 (Ono *et al.*, 1998). Cells were grown on M63S-3 agar plates at 37°C and dried using a critical point dryer. The bar indicates 1 μm .

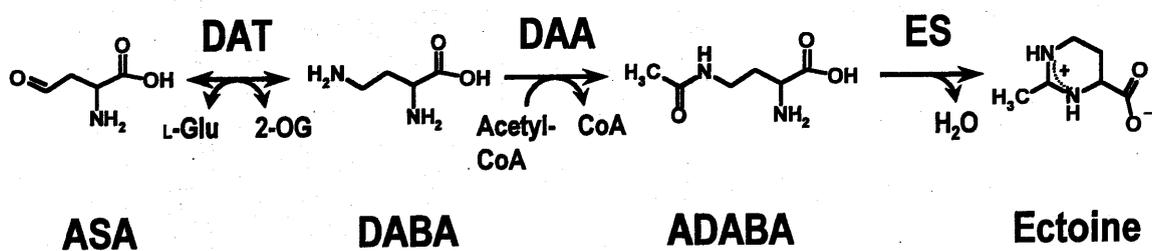


Figure 2-2. The biosynthetic pathway of ectoine in *H. elongata* OUT30018 (Ono *et al.*, 1999). The first step is catalyzed by L-2,4-diaminobutyric acid transaminase (DAT), which converts aspartate-β-semialdehyde (ASA), an intermediate in amino acid metabolism, to L-2,4-diaminobutyric acid (DABA). The second step, which is the acetylation of DABA to N-acetyl L-2,4-diaminobutyric acid (ADABA), is promoted by L-2,4-diaminobutyric acid acetyltransferase (DAA). In the last step, L-ectoine synthase (ES) catalyzes the cyclic condensation of L-2,4-diaminobutyric acid to yield tetrahydropyrimidine ectoine.

第 2 節 実験材料および方法

第 1 項 使用植物

形質転換タバコ培養細胞の作製には、*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow 2 (Nagata *et al.*, 1981) を使用した。また、形質転換タバコ植物体の作製には、*N. tabacum* L. cv Petit Habana SR1 を使用した。

第 2 項 使用菌株とプラスミド

融合遺伝子構築の大腸菌宿主として、*Escherichia coli* DH5 α (*deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*(*r_k⁻m_k⁺*), *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*, Δ (*lacZYA-argFV169*), ϕ 80 δ *lacZ* Δ *M15*, F', λ) (Hanahan, 1983) を使用した。タバコへの遺伝子導入に用いるアグロバクテリウムは、*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株 (Hood *et al.*, 1993) を使用した。

エクトイン生合成系遺伝子 (*ect* 遺伝子: *ectA*, *ectB*, *ectC*) を PCR によって増幅するための鋳型 DNA として、好塩性細菌 *Halomonas elongata* OUT30018 株 (以前は KS3 株としていた) のエクトオペロンを含むゲノム DNA 断片をクローン化したプラスミド pECT201 (Min-Yu *et al.*, 1993) を使用した。

融合遺伝子の構築および塩基配列決定を行うためのベクターとして、pBluescriptII SK- (Stratagene 社) および pUC19 (Messing, 1983) を使用した。また、形質転換タバコ作製のためのバイナリーベクターとして、pBI101HmB (Akama *et al.*, 1992) および pBI121 (Jefferson *et al.*, 1987) を使用した。

第 3 項 培地および培養条件

タバコ培養細胞の培養は、Nagata らの方法 (Nagata *et al.*, 1981) に従い、LS (Linsmaier and Skoog) 培地 (Linsmaier and Skoog, 1965) 中の KH₂PO₄ を 370 mg/L、thiamine HCl を 1 mg/L に増量し、さらに sucrose を 3% および 2,4-D を 0.2 mg/L 添加した改変 LS 培地で行った。また、タバコ植物体は、MS 無機塩 (Murashige and Skoog, 1962) に 3% sucrose、0.3% gellangum (Wako 社) を添加した MS 基本培地で栽培した。タバコ植物体は特に断らない限り、25°C で 16 h 明期および 8 h 暗期で栽培した。

大腸菌の培養は、LB (Luria-Bertani) 培地 (1% trypton, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) を使用し、37°C で行った (Sambrook *et al.*, 1989)。平板培地には、15 g/L の精製寒天末を加えた。また、必要に応じて抗生物質 (アンピシリン 100 mg/L、カナマイシン 50 mg/L、ハイグロマイシン 20 mg/L) を添加した。

アグロバクテリウムの培養は、LB 培地を使用し、28°C で行った。平板培地

には、15 g/L の精製寒天末を加えた。また、必要に応じて抗生物質 (カナマイシン 100 mg/L、ハイグロマイシン 20 mg/L) を添加した。

第 4 項 大腸菌の形質転換

大腸菌のコンピテントセルは、Inoue らの方法 (Inoue *et al.*, 1990) に従い調製した。大腸菌の単一コロニーを 5 mL の LB 培地に白金耳を用いて植菌し、37°C で 1 晩培養した。大腸菌培養液のうち、2 mL を坂口フラスコ内の 200 mL の SOB 培地 (2% triptone, 0.5% yeast extract, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, pH 7.0) に植菌し、660 nm における濁度が 0.4-0.8 になるまで 25-30°C、200 rpm で振盪培養した。培養液を氷中で 5 min 冷却後、遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 4°C) により集菌して上清を捨て、冷却した TB バッファー (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂·2H₂O, 250 mM KCl, 55mM MnCl₂·2H₂O, pH 6.7) を 1/3 容 (約 67 mL) 加えて穏やかに懸濁してから、10 min 氷中に静置した。遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 4°C) により集菌して上清を捨て、再び冷却した TB バッファーを 16 mL 加えて穏やかに懸濁した。続いて 7% (約 1.2 mL) となるように DMSO をゆっくり混ぜながら加えた後、10 min 氷中に静置した。氷上で 200 μL ずつ 1.5 mL 遠心管に分注し、直ちに液体窒素で凍結させ、-80°C で保存した。

コンピテントセルを氷中で解凍後、コンピテントセルの 1/10 容以下 (1-20 μL) の DNA 溶液を加え、氷中に 30 min 静置した。42°C に 45-60 s 置き、直ちに氷中に戻して 2 min 静置した後 800 μL の SOC 培地 (20 mM グルコースを含む SOB 培地) を加え、37°C で 1 h 振盪培養した。スピンドウンして上清を大部分除き、残った培地に菌体を懸濁して適当な抗生物質を含む LB 寒天培地上に広げ、37°C で 1 晩培養した。

第 5 項 プラスミド DNA の少量調製

大腸菌およびアグロバクテリウムからのプラスミド DNA の少量調製は、Birnboim と Doly のアルカリ抽出法 (Birnboim and Doly, 1979) に従った。抗生物質を含む 5 mL の LB 培地で 37°C、1 晩培養 (アグロバクテリウムの場合は 28°C、2 晩培養) した菌体を 1.5 mL 遠心管に移し、遠心分離 (12000 rpm, 1 min, 4°C) により集菌した。この菌体を 100 μL の solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) に懸濁した後、200 μL の solution II (0.2 N NaOH, 1% (w/v) SDS) を加えて穏やかに混ぜ、氷中に 5 min 静置した。続いて 150 μL の solution III (3 M potassium acetate, pH 4.8) を加えてよく混合し、氷中に 15 min 静置した。遠心分離 (15000 rpm, 5 min, 4°C) した後、上清を別のチューブに移し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、TE バッファー (10 mM

Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解した。また、必要に応じて、RNaseA (10 mg/mL) を加え、37°C で 10 min 消化した後、PEG 沈殿を行い、TE バッファー に溶解して -20°C で保存した。

第 6 項 *H. elongata* 由来の *ect* 遺伝子の PCR による増幅

エクトイン生合成系の 3 種類の *ect* 遺伝子は、*H. elongata* OUT30018 株のエクトオペロンを含むゲノム DNA クローン pECT201 (Min-Yu *et al.*, 1993) を鋳型とし、両端に制限酵素切断部位を付加した各 *ect* 遺伝子を特異的に増幅するプライマーセットを用いた PCR によって増幅した (Fig. 2-5)。ここで、*ectA* 遺伝子に対しては *Xba*I 切断部位を付加したフォワードプライマー A1 (5'-GCGAACCTCTAGAATGAACGCAACC-3') および *Sac*I 切断部位を付加したリバースプライマー A2 (5'-CGGCGTCCGAGCTCAGATCTG-3') を、*ectB* 遺伝子に対しては *Bam*HI 切断部位を付加したフォワードプライマー B1 (5'-ACAGGAGGATCCAATGCAGACCC-3') および *Sac*I 切断部位を付加したリバースプライマー B2 (5'-CCTCAGGAGCTCAGCTAAAGGCC-3') を、そして *ectC* 遺伝子に対しては *Bam*HI 切断部位を付加したフォワードプライマー C1 (5'-CACTGGAGGATCCACATGATCGTTC-3') および *Sac*I 切断部位を付加したリバースプライマー C2 (5'-CAGAATAGAGCTCCGGGTTACAGCG-3') を使用した。また、*ect* 遺伝子の PCR は、変性反応を 94°C で 1 min 行った後、変性反応を 98°C で 20 s、アニーリングおよび伸長反応 68°C で 1 min 30 s で 30 サイクル繰り返しを行い、最後に伸長反応を 72°C で 10 min 行った。そして、得られた 3 種類の増幅 DNA 断片を Klenow 酵素で平滑末端化し、各増幅 DNA 断片を pBluescriptII SK- の *Sma*I 部位にそれぞれ挿入した。そして、これらの増幅 DNA 断片の塩基配列を決定し、各増幅 DNA 断片が目的の *ect* 遺伝子であることを確認した。

第 7 項 塩基配列の決定

クローニングベクター pBluescriptII SK- へ挿入した DNA 断片の塩基配列の決定は、Perkin Elmer 社の DNA シーケンシングキットを用い、そのプロトコールに従った。キットは、ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit を用いた。

第 8 項 植物で *ect* 遺伝子を発現するためのバイナリープラスミドの構築

融合遺伝子構築のための基本操作は、Sambrook らの方法 (Sambrook *et al.*, 1989) に従った。バイナリーベクター pBI121 のカリフラワーモザイクウイルス 35S (CaMV35S) プロモーターと *nos* ターミネーターの間に挿入された *GUS* 遺

伝子と、590 bp の *XbaI-SacI ectA* 断片、1276 bp の *BamHI-SacI ectB* 断片、そして 432 bp の *BamHI-SacI ectC* 断片をそれぞれ置き換えたバイナリープラスミド pBIectA、pBIectB、そして pBIectC を構築した。これらのバイナリープラスミドの *HindIII-EcoRI* 断片 (CaMV35S プロモーター-*ect* 遺伝子-*nos* ターミネーターのカセット) を pUC19 の *HindIII/EcoRI* 部位にそれぞれ挿入し、プラスミド pUCectA、pUCectB、そして pUCectC を構築した。そして、pUCectA の *HindIII-SacI* 断片 (CaMV35S プロモーター-*ectA* 遺伝子) をバイナリーベクター pBI101HmB の *HindIII/SacI* 部位に挿入し、バイナリープラスミド pBIHectA を構築した。また、pUCectB および pUCectC の各 *PvuII* 断片 (CaMV35S プロモーター-*ect* 遺伝子-*nos* ターミネーターのカセット) を pBluescriptII SK- の *EcoRV* 部位にそれぞれ挿入し、プラスミド p35SectB および p35SectC を構築した。まず、p35SectB の *HindIII* 断片 (CaMV35S プロモーター-*ectB* 遺伝子-*nos* ターミネーターのカセット) を pBIHectA の *HindIII* 部位へ挿入し、バイナリープラスミド pBIHectAB を構築した。その後、p35SectC の *HindIII* 断片 (CaMV35S プロモーター-*ectC* 遺伝子-*nos* ターミネーターのカセット) を pBIHectAB の *HindIII* 部位へ挿入し、すべての *ect* 遺伝子を挿入したバイナリープラスミド pBIHectABC を構築した (Fig. 2-6)。

第 9 項 アグロバクテリウムの形質転換

アグロバクテリウム単一コロニーを 5 mL の LB 培地に植菌し、28°C で 1 晩振盪培養した。この培養液を、500 mL の LB 培地に植菌し、600 nm における濁度が 0.5 になるまで 28°C で振盪培養した。培養液を遠心分離 (5000 rpm, 10 min, 4°C) により集菌して上清を捨て、菌体を洗浄するため 500 mL の滅菌水を加えて懸濁し、再度遠心分離 (5000 rpm, 10 min, 4°C) により集菌して上清を捨てた。この操作を 2 回繰り返した後、沈殿に 20 mL の冷却した滅菌 10% グリセロール溶液を加えて懸濁し、遠心分離 (5000 rpm, 10 min, 4°C) により集菌して上清を捨てた。沈殿に 3 mL の冷却した滅菌 10% グリセロール溶液を加えて懸濁し、40 μ L ずつ 1.5 mL 遠心管に分注して、液体窒素で凍結させてから -80°C で保存した。

コンピテントセルを氷中で解凍した後、1-2 μ L の DNA 溶液を加え、氷冷しておいた 1 mm キュベット (Gene Pulser[®]/*E. coli* Pulser[™] Cuvette; BIO-RAD 社) に移した。エレクトロポレーター (Gene Pulser; BIO-RAD 社) により電気パルス (1.8KV, 25 μ F, 200 Ω) を与え、DNA を導入した。1 mL の SOC 培地を加えて混合し、1.5 mL 遠心管に移した。そのまま 28°C で 1 h 振盪培養した後、スピンドウンして上清を大部分除き、残った培地に菌体を懸濁して適当な抗生物質を含む LB 寒天培地上に塗布し、28°C で 2 晩培養した。

第 10 項 タバコ培養細胞の形質転換

タバコ培養細胞の形質転換は、An の方法 (An, 1985) を基本にした。カナマイシン 100mg/L を含む 5 mL の LB 培地で 28°C、1 晩培養したアグロバクテリウム培養液 (pBI 系のプラスミドを持つ EHA 105 株) 100 μ L と、培養 4 日目のタバコ培養細胞懸濁液 8 mL を 90 mm 深型シャーレに入れてよく混ぜ、25°C で 2 晩、暗所下で静置して共存培養した。アグロバクテリウムを除くため、シャーレの中の培養液を 15 mL の遠心管に移して遠心 (1000 rpm, 5 min, 4°C) し、上清を取り除いた。新しい改変 LS 培地を入れて遠心 (1000 rpm, 5 min, 4°C) し、細胞を洗浄した。この操作を 4 回繰り返して、アグロバクテリウムを除いた培養細胞をカナマイシン 100 mg/L (必要に応じて、ハイグロマイシン 20 mg/L)、カルベニシリン 250 mg/L の入った改変 LS 寒天培地にまき、25°C で暗黒下に静置して培養した。約 2-3 週間後にカルス化した細胞を新しいプレートに移植し、増殖しているクローンを選択した。最後に、カナマイシン 100 mg/L (必要に応じて、ハイグロマイシン 20 mg/L)、カルベニシリン 250 mg/L を加えた改変 LS 培地 95 mL に移し、継代培養を行った。

第 11 項 ゲノム PCR による遺伝子導入の確認

タバコ培養細胞およびタバコ植物体のゲノム DNA は、Nippon Gene 社の ISOPLANT DNA isolation kit を用いて調製した。形質転換体の遺伝子導入の確認は、調製したゲノム DNA を鋳型とし、*ectC* 遺伝子の特異的に増幅する C1 および C2 のプライマーセットを用いた PCR によって行った。また、PCR は、変性反応を 94°C で 1 min 行った後、変性反応を 98°C で 20 s、アニーリングおよび伸長反応 68°C で 1 min 30 s で 30 サイクル繰り返して行い、最後に伸長反応を 72°C で 10 min 行った。

第 12 項 タバコからの RNA 単離

タバコからの RNA 単離は、ATA (aurintricarboxylic acid) 法に従った (Gonzalez *et al.*, 1980)。タバコ培養細胞またはタバコ植物体組織 (0.1 gFW 程度) をあらかじめ液体窒素を入れておいた乳鉢に入れ、乳棒で粉末状になるまで細胞をすりつぶした。粉砕した細胞を使用直前に 1/1000 容の β -メルカプトエタノールを加えた RNA 抽出バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% (w/v) SDS, 2 mM ATA, 2% TINS (triisopropyl naphthalensulfonic acid sodium salt)) が 1 mL 入った 1.5 mL 遠心管に入れ、緩やかに攪拌し、溶液が均一になったら 3M KCl を 140 μ L 加え混合した。これを氷中で 15 min 以上冷やし、遠心分離 (15000 rpm, 5 min, 4°C) した。上清の約 1.1 mL を新しい 1.5 mL 遠心管に移し、そこへ 10 M LiCl を 440 μ L 加え混合した。これを氷中で 30 min 以

上放置後、遠心分離 (15000 rpm, 20 min, 4°C) した。上清を取り除き、沈殿を 300 μ L の滅菌水に溶解して、フェノール・クロロホルム抽出を 2 回、クロロホルム抽出を 1 回行った。抽出後の上清に 5M NaCl を 40 μ L、エタノールを 850 μ L 加えて混合し、-20°C で 1 h 以上放置後、遠心分離 (15000 rpm, 15 min, 4°C) した。上清を取り除き、沈殿を 70% エタノールでリンスし、30 μ L の滅菌水に溶解した。

第 13 項 DNA プロープの作製

タバコ細胞内での *ect* 遺伝子の発現を検討するノザン解析には、*ectA* 遺伝子の全長約 580 bp、*ectB* 遺伝子の *SacI* DNA 断片約 400 bp、および *ectC* 遺伝子の全長約 420 bp をプロープとして用いた。また、対照プロープとして、イネの *ACT1* 遺伝子を用いた (Sano and Youssefian, 1991)。プロープのラベリングは、TaKaRa 社の *Bca* BEST™ Labeling Kit を用いて行った。まず、1.5 mL 遠心管に鋳型 DNA 25 ng および Random Plimer 液 2 μ L を加えた後、滅菌水を加えて 5 μ L にした反応液を調製し、95°C、3 min 加熱後、水中で急冷した。これに 10x バッファー、dNTPs を各 2.5 μ L、(α -³²P) dCTP (1.85 MBq, 50 mCi) を 5 μ L 加えた後、滅菌水を加えて 24 μ L にし、*Bca* BEST™ DNA Polymerase 1 μ L を加え、55°C で 10 min 保温した後、95°C で 10 min 加熱し、水中で急冷してハイブリダイゼーションプロープ溶液とした。

第 14 項 ノザン解析

ホルマリンアガロース RNA 変性ゲル電気泳動を行うため、無菌水 79 mL に、アガロース 1.5 g、20x MOPS バッファー (400 mM MOPS, 100 mM sodium acetate, 10 mM EDTA, pH7.0) 5 mL を加え、ゲルを溶解した後、16 mL のホルマリンを加えて混合し、6 mm 厚のサブマリン型電気泳動ゲルを作製した。泳動用緩衝液は、1x MOPS バッファー (20 mM MOPS, 5 mM sodium acetate, 0.5 mM EDTA, pH7.0) を用いた。RNA 溶液 (10-20 μ g の RNA を含む) 6 μ L、20x MOPS 1 μ L、ホルマリン 3 μ L、ホルムアミド 10 μ L を混合し、500 μ g/mL エチジウムブロマイドを 1 μ L 加えた後、70°C で 10 min 加熱後、水中で急冷し、泳動用色素液を 2 μ L 加え、46 V で 1 h 電気泳動した後、96 V で 2 h 電気泳動した。

電気泳動で分離した RNA をナイロンメンブレン (Zeta-Probe GT blotting membrane; BIO-RAD 社) にトランスファーした。トランスファーバッファーは、20x SSC (3 M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリウム) を用い、12 h 以上行った。プロットしたメンブレンを、2x SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M クエン酸ナトリウム) で洗浄し、湿ったまま UV クロスリンク (150 mJoule, GS GENE LINLER™ UV Chamber; BIO-RAD 社) した。

メンブレンおよびプレハイブリダイゼーション液 (50% formamide, 0.12 M Na_2HPO_4 (pH7.2), 0.25 M NaCl, 7% (w/v) SDS) を 100 cm^2 のメンブレンに対し 15 mL ハイブリバック (soft, S-1021; COSMO BIO 社) に入れ、43°C で 5 min 程度プレハイブリダイゼーションを行った。その後、DNA プローブを加えて、43°C で 16 h 以上ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、ハイブリバックからメンブレンを、取り出して、洗浄用のトレイに移した。その後、メンブレンを 25°C で 15 min、0.1% (w/v) SDS を含む 2x SSC 中で 1 回、0.1% (w/v) SDS を含む 0.5x SSC 中で 1 回、そして 0.1% (w/v) SDS を含む 0.1x SSC 中で 1 回洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。

第 15 項 エクトインの分析

タバコ培養細胞またはタバコ植物体葉組織の約 1 g 新鮮重量 (FW) を秤量し、室温でアミノ酸抽出バッファー (ethanol:chloroform:water, 12:5:2, v/v) 5 mL 中でホモジナイズし、15 mL 遠心管へ移して遠心分離 (3000 rpm, 5 min, 25°C) した。上清約 5 mL を 50 mL 遠心管へ移してプールし、残った沈殿を再びアミノ酸抽出バッファー 5 mL 中でホモジナイズして遠心分離 (3000 rpm, 5 min, 25°C) した。再び上清約 5 mL を 50 mL 遠心管へ移してプールし、残った沈殿を再びアミノ酸抽出バッファー 5 mL 中でホモジナイズして遠心分離 (3000 rpm, 5 min, 25°C) した。三たび上清約 5 mL を 50 mL 遠心管へ移してプールした後、約 15 mL の抽出液に対してクロロホルム 10 mL および超純水 5 mL を加えてよく攪拌し、遠心分離した (3000 rpm, 5 min, 25°C)。上清約 15 mL を 15 mL 遠心管に移し、80°C で蒸発乾固させた。残留物を超純水 5 mL に溶解し、シリンジフィルター (pore size 1.2 μm ; Whatman 社) に通した。その後、フィルター濾過した抽出液を AG50W-X8 (H^+ form; BIO-RAD 社) を充填したイオン交換カラムにかけ、2 ベッド容の超純水で洗浄した後、3 N NH_4OH で溶出した。溶出液を 80°C で蒸発乾固させ、残留物を超純水 1 mL に溶解した。溶解液を Ultrafree-MC centrifugal filter units (pore size 0.2 μm ; Nihon Millipore 社) に通してフィルター濾過し、LC/ESIMS (liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry) 分析の試料とした。なお、LC/ESIMS 分析には LCMS-QP8000 (Shimadzu 社) を用いた。分析試料は、40°C で分析カラム (YMC-Pack ODS-AQ column, 2 \times 250 mm; YMC 社) にかけて、溶出液として 0.1% ギ酸を用いて流速 0.2 mL/min で 30 min 溶出した。溶出液は LC 装置から直接 ESIMS 分析装置に送り、質量/電荷比 (mass-to-charge ratio, m/z) 100-300 の範囲でイオンを検出した。標準試料には、*H. elongata* OUT30018 株から精製したエクトインを使用した (Ono *et al.*, 1998)。

第 16 項 浸透圧計による培地および溶液の浸透圧測定

本研究に使用した培地および溶液の浸透圧は、氷点浸透圧計 (OM-801; Vogel GMBH 社) を用い、オスモル濃度 (Osm) として決定した。

第 17 項 タバコ培養細胞の高浸透圧ショック耐性試験

培養 5 日目の BY2 細胞を 50 mL 遠心管に移し、遠心分離 (800 rpm, 5 min, 25°C) した。上清の培地を捨て、新たに改変 LS 培地を加えて細胞濃度を 50% (v/v) にした。その後、細胞懸濁液 5 mL を 15 mL 遠心管に移し、遠心分離 (800 rpm, 5 min, 25°C) して上清の培地を捨てた。培地と等張な 180 mM マンニトール溶液 (200 mOsm) 10 mL に細胞の沈殿を懸濁して、遠心分離 (800 rpm, 5 min, 25°C) した後、620 mM マンニトール (700 mOsm) または 500 mM NaCl (900 mOsm) の高浸透圧溶液に懸濁して 20 min 静置した。遠心分離 (800 rpm, 5 min, 25°C) した後、改変 LS 培地に再懸濁して洗浄した。BY2 細胞の高浸透圧ショック耐性は、高浸透圧溶液で処理した細胞の細胞増殖度および細胞生存度を対照の等張液処理した細胞と比較して決定した。

第 18 項 タバコ培養細胞の新鮮重量の測定

BY2 細胞の新鮮重量 (FW) の決定は、遠心分離 (800 rpm, 5 min, 25°C) した後の沈殿した細胞の重量を測定することによって行った。

第 19 項 タバコ培養細胞の細胞生存度の決定

BY2 細胞の細胞生存度は、Ono らの方法 (Ono *et al.*, 1995) に従い、蛍光染色色素の FDA (fluorescein diacetate) を用いて決定した。高浸透圧ショック溶液で処理した BY2 細胞 5 mL を改変 LS 培地で 2 回洗浄した後、改変 LS 培地 5 mL に再懸濁した。アセトンで調製した 0.5% (w/v) FDA 100 μ L を添加し、混合して室温で 20 min 静置した。改変 LS 培地で 2 回洗浄した後、蛍光顕微鏡 (Axiophoto, filter sets: excitation BP450-490, beamsplitter FT510, emission LP520; Zeiss 社) で生存細胞を検出した。

第 20 項 タバコ培養細胞の高浸透圧ストレス耐性試験

培養 5 日目の BY2 細胞を 50 mL 遠心管に移して遠心分離 (800 rpm, 5 min, 25°C) して上清の培地を捨て、新たに改変 LS 培地を加えて細胞濃度を 50% (v/v) にした。その後、懸濁細胞 2 mL を改変 LS 培地に マンニトール (終濃度 100, 200, 300 mM) を添加した高浸透圧ストレス培地 (310, 420, 530 mOsm) 95 mL を入れた 300 mL 三角フラスコに移して培養した。BY2 細胞の高浸透圧ストレス耐性は、マンニトールを含む高浸透圧ストレス培地における細胞増殖度を通常

の改変 LS 培地における細胞増殖度を対照として比較することで決定した。

第 21 項 タバコ植物体の形質転換

形質転換タバコの作製はリーフディスク法 (Horsch *et al.*, 1985) で行った。無菌タバコ葉部の葉脈を含まないように約 1 cm 角の大きさに切り、90 mm シャーレに気孔が上になるように置き、50 µg/mL のカナマイシンを含む LB 培地で 2 晩培養した pBI 系のプラスミドを保持したアグロバクテリウム懸濁液 5 mL をシャーレに注いで 3 min 浸した。葉片を取り出し、余分な菌液を拭き取り、カルス形成培地 (2 mg/L の NAA (α -naphthaleneacetic acid) および 0.2 mg/L の BA (6-benzyladenine) を含む MS 培地) に置床して 25°C で培養した。約 2 日後、葉片を 50 mL 遠心管に移し、滅菌水で 5 回洗浄した後、200 µg/mL のカナマイシンおよび 250 µg/mL のカルベニシリンを含むカルス形成培地に置床し、さらに約 1 週間 25°C で培養した。葉片がカルス化した後、200 µg/mL のカナマイシンおよび 250 µg/mL のカルベニシリンを含むシュート形成培地 (0.02 mg/L の NAA および 1 mg/L の BA を含む MS 培地) に移した。さらに約 4 週間後、莖葉部の発達したシュートを切り取って 200 µg/mL のカナマイシン、250 µg/mL のカルベニシリンを含むルート形成培地に移植し、発根が見られるまで 25°C で培養した。次に植物体の根が十分生長したものを鉢植えに移した。

第 22 項 タバコ芽生えの高浸透圧ストレス耐性

タバコ植物体の乾燥や塩の高浸透圧ストレスに対する耐性を調べるため、発芽後 4 日目のタバコ芽生えを PEG 10,000 や NaCl を添加した 1/2 MS 無機塩培地 15 mL を入れた植物水耕栽培用シャーレ (プランテックス; TOYOBO 社) に移して、その生育を観察した。非常に大きな分子である PEG 10,000 は、植物体の根から取り込まれない (Lawlor, 1970) ため、水耕培地に添加することで均一な擬似的乾燥ストレスを植物体に与えることができる (Pilon-Smits *et al.*, 1995)。よって、植物体への乾燥ストレスには 10% PEG 10,000 を含む 1/2 MS 無機塩培地を使用した。また、塩ストレスには NaCl (150, 200, 250 mM) を含む 1/2 MS 無機塩培地を使用した。

第 3 節 結果

第 1 項 エクトイン生合成系遺伝子のサブクローニング

H. elongata OUT30018 株由来のエクトオペロン塩基配列の解析結果 (Fig. 2-3) から、3 種の *ect* 遺伝子はポリシストロン性の発現をしていると考えられた。しかしながら、植物細胞へ目的遺伝子を導入して発現させるためには、目的遺伝子をバイナリーベクター上の植物発現プロモーターおよびターミネーターの支配下に挿入しなければならない。そこで、各 *ect* 遺伝子の両末端にバイナリーベクターに挿入するための制限酵素部位を付加したプライマー 6 種を設計した。約 0.6 kb の *ectA* 遺伝子の増幅には、*Xba*I サイトを付加したプライマー A1 および *Sac*I サイトを付加したプライマー A2 を使用した。約 1.3 kb の *ectB* 遺伝子の増幅には、*Bam*HI サイトを付加したプライマー B1 および *Sac*I サイトを付加したプライマー B2 を使用した。約 0.4 kb の *ectC* 遺伝子の増幅には、*Bam*HI サイトを付加したプライマー C1 および *Sac*I サイトを付加したプライマー C2 を使用した。そして、*H. elongata* OUT30018 株染色体 DNA 断片上のエクトオペロンが挿入されたプラスミド pECT201 を鋳型 DNA とした PCR を行い、3 種の *ect* 遺伝子に対応する DNA 断片をそれぞれ増幅した (Fig. 2-5)。増幅された各 *ect* 遺伝子の PCR 産物についてアガロースゲル電気泳動を行い、増幅 DNA 断片のサイズを確認した。さらに、大腸菌用発現ベクター pBluescriptII SK- へ各 *ect* 遺伝子の PCR 産物をサブクローニングした後、塩基配列を決定して各 *ect* 遺伝子の塩基配列を確認した (data not shown)。

第 2 項 3 種の *ect* 遺伝子を挿入したバイナリープラスミドの構築

植物へエクトイン生合成系を導入するためには、3 種の *ect* 遺伝子をすべて導入しなければならない。しかしながら、一般的に使用されているバイナリーベクターは、単一遺伝子の導入用に開発されているために複数遺伝子の導入には直接使用できない。そのため、植物へ複数遺伝子を多重導入するために試みられてきたこれまでの手法として、交雑法による目的遺伝子の集積、あるいは複数の異なる選抜マーカー遺伝子を利用した多重遺伝子導入法が用いられてきた。また、近年では直接的な多重遺伝子導入法として、PEG 法、エレクトロポレーション法、あるいはパーティクルガン法により、目的遺伝子を挿入したプラスミドを数種類混合した試料を用いて複数の遺伝子を一度に多重導入する試みもなされている。いずれの方法においても、複数の遺伝子を導入するために多くの時間と手間が費やされなければならない上に、複数の遺伝子を安定的に導入することが難しいという問題点がある。そこで、本研究では単一のバイナリーベクター上に複数

の遺伝子を挿入したバイナリープラスミドを作製し、多重遺伝子を短時間で安定的に導入することを試みた。植物発現用プロモーターとしては CaMV35S プロモーターを、ターミネーターとしてはノパリンシンターゼ (NOS) 遺伝子のターミネーターを使用して、各 *ect* 遺伝子をバイナリーベクター pBI101HmB 上に直列に挿入したバイナリープラスミド pBIHectABC を構築した (Fig. 2-6)。

第 3 項 アグロバクテリウムへの pBIHectABC の導入

エレクトロポレーション法により、アグロバクテリウム (*A. tumefaciens* EHA105 株) へバイナリープラスミド pBIHectABC を導入し、平板 LB 培地上でカナマイシンおよびハイグロマイシン耐性を示す形質転換アグロバクテリウム EHA105/pBIHectABC を選抜した (data not shown)。

第 4 項 3 種の *ect* 遺伝子を導入した形質転換タバコ培養細胞の作製

アグロバクテリウム感染法により、タバコ培養細胞 (BY2 細胞) へアグロバクテリウム EHA105/pBIHectABC を感染させ、エクトイン生合成系遺伝子を導入した。しかしながら、同一の CaMV35S プロモーターを複数の遺伝子に使用したためにジーンサイレンシングが誘導されることが懸念された。そこで、はじめに CaMV35S プロモーターの活性に左右されないカナマイシン耐性の表現型を示す形質転換 BY2 細胞を約 100 クローン選抜した。得られたカナマイシン耐性クローンから任意に選択した 10 クローンについて、ゲノム PCR を行ったところ、すべてのクローンで遺伝子導入を確認した (Fig. 2-7)。続いて、カナマイシンおよびハイグロマイシンを添加した平板改変 LS 培地上で CaMV35S プロモーターが活性を有していると予想されるハイグロマイシン耐性の表現型を示す形質転換 BY2 細胞を選抜した。

第 5 項 形質転換タバコ培養細胞内での *ect* 遺伝子の発現

遺伝子導入を確認したクローンの形質転換 BY2 細胞について、細胞から全 RNA を抽出し、各 *ect* 遺伝子をプローブとしたノザン解析を行い、比較的発現の高い 3 クローン (ECT-1, -24, -80) と比較的発現の低い 2 クローンの計 5 クローンを選抜した (Fig. 2-8)。今後の実験は、形質転換していない野生型 BY2 細胞 (WT) を対照とし、選抜した形質転換 BY2 細胞 5 クローンを用いた。

第 6 項 形質転換タバコ培養細胞内でのエクトイン生産

まず、精製エクトインの標準試料を用いた LC/ESIMS 分析を行ったところ、エクトインの保持時間は 3.66 min であった (Fig. 2-9A)。また、保持時間 3.66 min の画分の MS スペクトル分析結果から、エクトインの質量/電荷 (m/z) 値

は、143 であることが示された (Fig. 2-9D)。そこで、コンピュータ解析より再構築した m/z 143 の MS クロマトグラムで再分析したところ、保持時間 3.66 min にエクトインのピークがはっきりと検出できた (Fig. 2-9G)。続いて同様に、BY2 細胞の遊離アミノ酸抽出液を陽イオン交換樹脂カラムによって精製したサンプルの分析を行ってみたところ、BY2 細胞の遊離アミノ酸抽出試料の MS クロマトグラムでは明瞭なエクトインのピークを検出することができなかった (Fig. 2-9B and C) が、保持時間 3.66 min の画分の MS スペクトル分析を行うと、形質転換 BY2 細胞の試料でのみ m/z 143 のエクトインのシグナルが検出された (Fig. 2-9E and F)。また、コンピュータ解析より再構築した m/z 143 の MS クロマトグラムで BY2 細胞の遊離アミノ酸抽出液を再分析したところ、保持時間 3.66 分にエクトインのピークが形質転換 BY2 細胞でのみはっきりと検出できた (Fig. 2-9H and I)。そこで、精製エクトインを標準試料として分析した後、コンピュータ解析より再構築した m/z 143 の MS クロマトグラムから検量曲線を作成し、形質転換 BY2 細胞に蓄積されたエクトインを定量化した (Fig. 2-10)。その結果、適合溶質が浸透圧調節に機能する濃度が $5 \mu\text{mol/gFW}$ 以上であることから考えると、形質転換 BY2 細胞内のエクトイン蓄積量は $14\text{-}79 \text{ nmol/gFW}$ 程度であり、エクトインが浸透圧調節物質として機能していないことが示唆された。一方、野生型 BY2 細胞のエクトイン蓄積量は、LC/ESIMS 分析の検出限界 (0.1 nmol/gFW) 以下であった。

第 7 項 形質転換タバコ培養細胞の高浸透圧ショック耐性

得られた形質転換 BY2 細胞内でエクトインが浸透圧調節に機能しないことが示唆されたが、第 1 章で述べたように適合溶質には浸透圧調節以外の生化学的な機能が存在することが知られている (Fig. 1-3)。通常、細胞は高浸透圧ストレスに曝されると、初期の高浸透圧ショックにより脱水し、細胞膜機能に損傷を受けて死に至ると考えられるが、トレハロースなどの適合溶質は脱水時の細胞の膜機能を保護することによって細胞に高浸透圧ストレス耐性を賦与している。そこで、脱水時の BY2 細胞におけるエクトインの効果を調べるため、一過的な高浸透圧ショックにより脱水し、原形質分離した BY2 細胞の生存の様子を調べることにした (Fig. 2-11)。まず、マンニトール溶液による 20 min の一過的な高浸透圧ショック処理 (620 mM mannitol , 700 mOsm) により BY2 細胞を原形質分離させ、その後 BY2 細胞を増殖培地に移して増殖を調べた。その結果、野生型の BY2 細胞 (WT) およびエクトイン蓄積量の少ない形質転換 BY2 細胞 2 クローン (ECT-3, -13) では強い増殖阻害がみられたが、エクトイン蓄積量の多い形質転換 BY2 細胞 3 クローン (ECT-1, -24, -80) では増殖阻害がみられず、高浸透圧ショック耐性の表現型を示した (Fig. 2-12A)。そこで、形質転換 BY2 細

胞のエクトイン蓄積量と高浸透圧ショック耐性の関係を調べてみたところ、エクトイン蓄積量が多いクローンほど高浸透圧ショック耐性が強いという正の相関関係がみられた (Fig. 2-12B)。さらに、高浸透圧ショック処理直後の BY2 細胞に FDA (fluorescein diacetate) を取り込ませ、正常な膜透過性を保持した生存細胞を蛍光顕微鏡下で観察することにより、高浸透圧ショック後の細胞生存率を調べた (Fig. 2-13)。その結果、対照として用いた等張液 (180 mM mannitol, 200 mOsm) で処理した細胞はすべて生存していた (Fig. 2-13A) が、マンニトールによる高浸透圧ショック処理 (620 mM mannitol, 700 mOsm) をした場合には、野性型 BY2 細胞 (WT) やエクトイン蓄積量の少ないクローン (ECT-3, -13) で細胞生存率が 40% 以下であったのに対し、エクトイン蓄積量の多いクローン (ECT-1, -24, -80) では細胞生存率が 90% 以上であった (Fig. 2-12B)。また、海水濃度の食塩による高浸透圧ショック処理 (500 mM NaCl, 900 mOsm) をした場合には、野性型 BY2 細胞 (WT) やエクトイン蓄積量の少ないクローン (ECT-3, -13) では細胞生存率が 10% 未満であったのに対し、エクトイン蓄積量の多いクローン (ECT-1, -24, -80) では細胞生存率が 70% 以上であった (Fig. 2-13C)。

第 8 項 形質転換タバコ培養細胞の高浸透圧ストレス耐性

一過的な高浸透圧ショック耐性が継続的な高浸透圧ストレス耐性に与える影響を調べるため、高浸透圧ショック感受性の野生型 BY2 細胞 (WT) と高浸透圧ショック耐性の形質転換 BY2 細胞 (ECT-80) について、マンニトールを添加した高浸透圧培地での増殖を調べた (Fig. 2-14A)。その結果、野生型 BY2 細胞 (WT) では、200 mM 以上の高濃度のマンニトールによる高浸透圧ストレス条件下で対数増殖期への移行に 3 日の遅れが生じているのに対し、形質転換 BY2 細胞 (ECT-80) では高浸透圧ストレス条件下でも対数増殖期への移行時期に変化がみられなかった。さらに、マンニトールを添加しない増殖培地での細胞の増殖量と比較して、細胞の増殖量が 50% に減少するマンニトール濃度 I_{50} (mM) を指標とし、BY2 細胞のマンニトールによる高浸透圧ストレス耐性を調べた (Fig. 2-14B)。その結果、5 日目の相対増殖度で比較すると、形質転換 BY2 細胞 (ECT-80, $I_{50} = 230$) は野生型 BY2 細胞 (WT, $I_{50} = 140$) よりも、およそ 1.6 倍のマンニトールによる高浸透圧ストレスに対する耐性を示した。

第 9 項 形質転換タバコ植物体の作製

タバコ植物体 (*N. tabacum* L. cv SR1) の葉片にアグロバクテリウム EHA105/pBIHectABC を感染させ、*ect* 遺伝子をタバコ植物体へ導入した。そして、カナマイシン耐性およびハイグロマイシン耐性の表現型を示した再生タバコ 13 系統について、ゲノム PCR によって遺伝子導入を確認した (Fig. 2-15)。

第 10 項 形質転換タバコ植物体の高浸透圧ストレス耐性

得られた形質転換タバコ 13 系統について、その形質転換第 2 世代の芽生えを乾燥や塩による高浸透圧ストレス条件下で培養し、高浸透圧ストレス耐性を示すクローンの選抜を行った。その結果、PEG10,000 による乾燥ストレスに対して顕著な耐性を示す 2 系統 (ECT-13, -17) が観察されたが、NaCl による塩ストレスに対する耐性は観察されなかった (Fig. 2-16)。これらの結果より、乾燥ストレスに顕著な耐性を示した 2 系統 (ECT-13, -17)、若干の耐性を示した 2 系統 (ECT-2, -7)、および対照 (pBI121) と同等な 1 系統 (ECT-18) の計 5 系統を選抜し、今後の実験に用いた。

第 11 項 形質転換タバコ植物体内での *ect* 遺伝子の発現

選抜した 5 系統について、葉から全 RNA を抽出し、各 *ect* 遺伝子をプローブとしたノザン解析を行った (Fig. 2-17)。その結果、全ての ECT 系統で、*ect* 遺伝子 mRNA の蓄積を確認した。

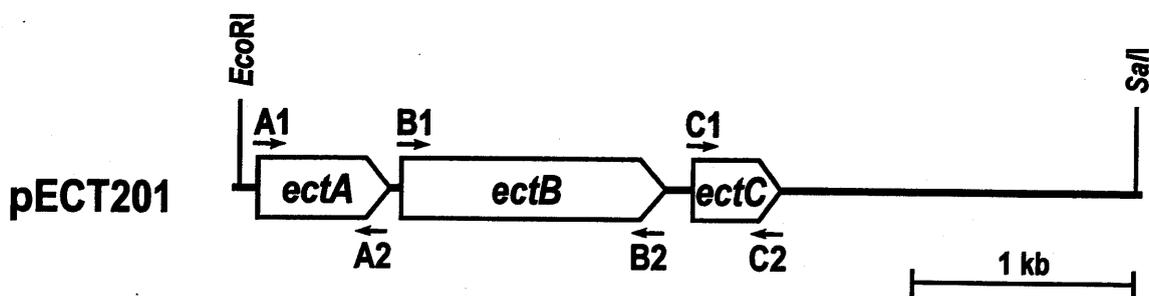


Figure 2-5. Structure of the 4.1-kb DNA fragment containing the *ect* operon. *ectA*, *ectB*, and *ectC* genes encode DAA, DAT and ES, respectively. The arrows show the approximate positions of the PCR primers used to amplify each *ect* gene.

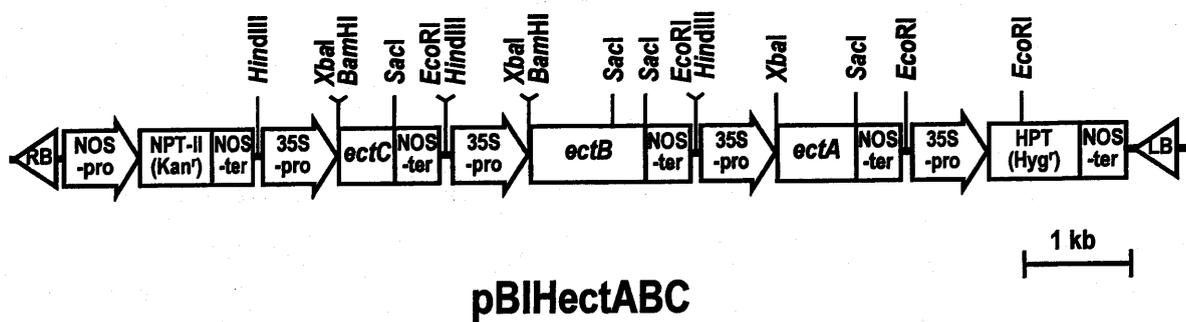


Figure 2-6. Structure of the plasmid pBIHectABC for expression of the *ect* genes in the transgenic BY2 cells. Abbreviations: NPT-II, neomycin phosphotransferase gene; Kan^r, kanamycin-resistance gene; HPT, hygromycin phosphotransferase gene; Hyg^r, hygromycin-resistance gene; 35S-pro, 35S promoter of cauliflower mosaic virus; NOS-pro, nopaline synthase promoter; NOS-ter, nopaline synthase terminator; LB, left border; RB, right border.

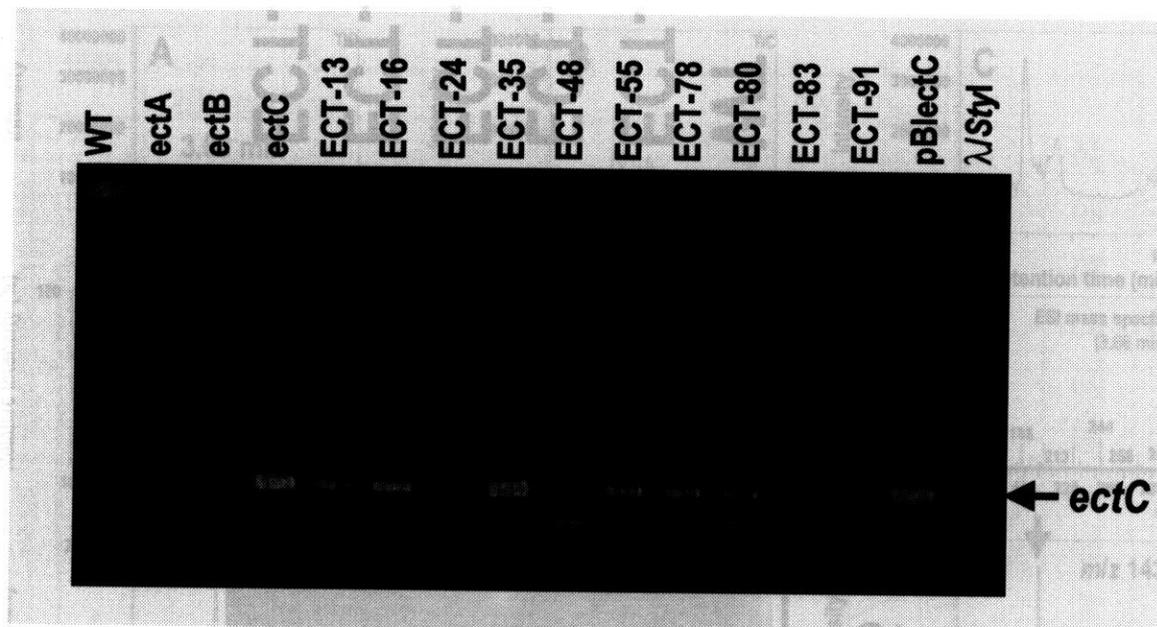


Figure 2-7. Genomic PCR of the transgenic BY2 cells using C1 and C2 primers to confirm the existence of transgene. WT, wild-type BY2 cells; ectA, transgenic BY2 cells harboring *ectA* gene; ectB, transgenic BY2 cells harboring *ectB* gene; ectC, transgenic BY2 cells harboring *ectC* gene; ECT-13, -16, -24, -35, -48, -55, -78, -80, -83, and -91, transgenic BY2 cells, which were randomly selected from kanamycin-resistant clones; pBlectC, control plasmid; λ/StyI, DNA size marker.

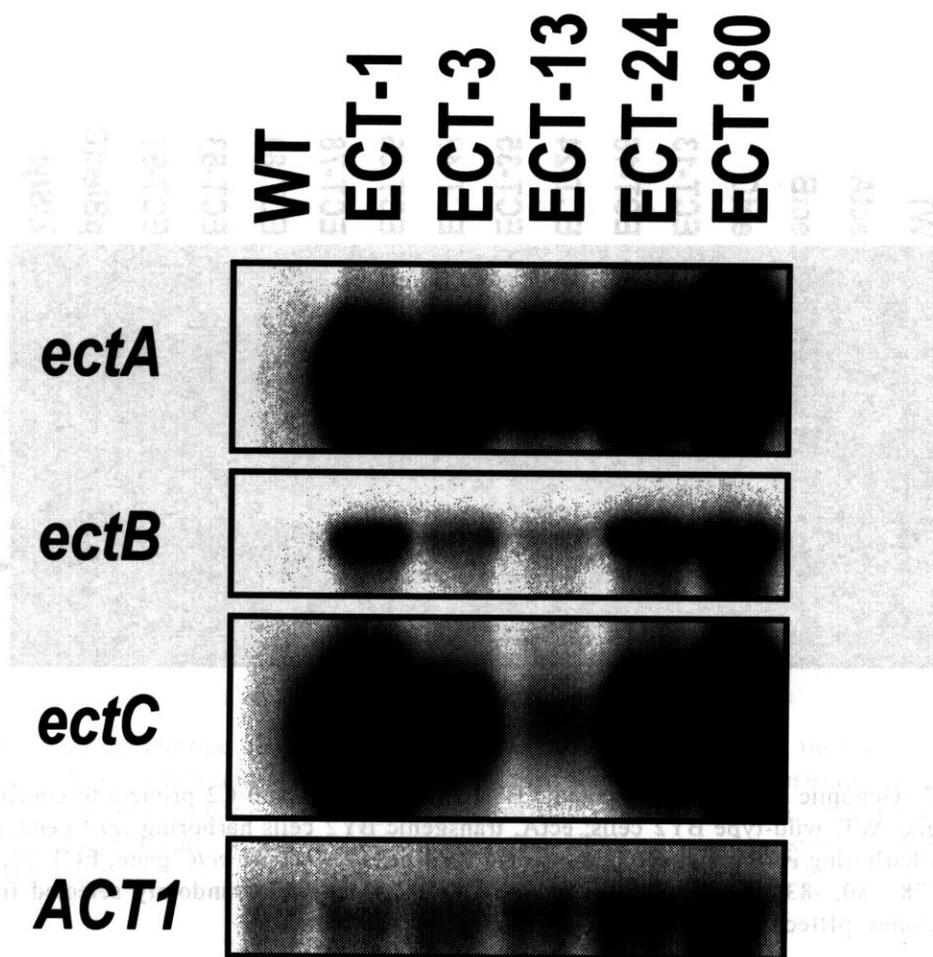


Figure 2-8. Accumulation of *ect* mRNA in the transgenic BY2 cells as detected by Northern hybridization. RNA was isolated from 5-d-old untransformed BY2 cells (WT) and the transgenic clones (ECT-1, -3, -13, -24, and -80). Each lane contains 20 μ g of total RNA. A 32 P-labeled DNA fragment of the *ectA*, *ectB*, or *ectC* genes were used as probes. A rice *ACT1* cDNA (Sano and Youssefian, 1991) was used as the control probe.

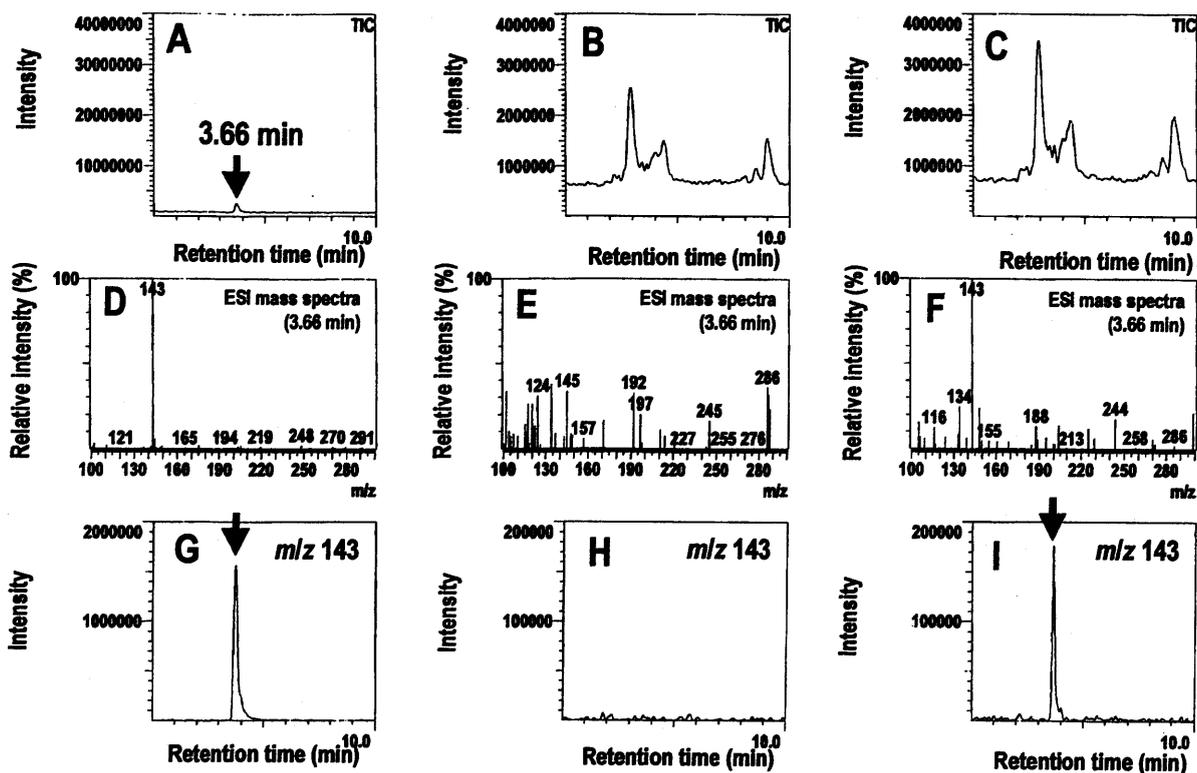


Figure 2-9. Detection of ectoine accumulated in transgenic BY2 cells using LC/ESI-MS. A, Total ion chromatogram (TIC) of standard ectoine. B, TIC of untransformed BY2 cells (WT). C, TIC of the ECT-80 clone. D, ESI mass spectra at 3.66 min of standard ectoine. E, ESI mass spectra at 3.66 min of the WT. F, ESI mass spectra at 3.66 min of the ECT-80 clone. G, Computer-reconstructed mass chromatogram of m/z 143 of standard ectoine. H, Computer-reconstructed mass chromatogram of m/z 143 of the WT. I, Computer-reconstructed mass chromatogram of m/z 143 of the ECT-80 clone. The arrows indicate the ectoine peak.

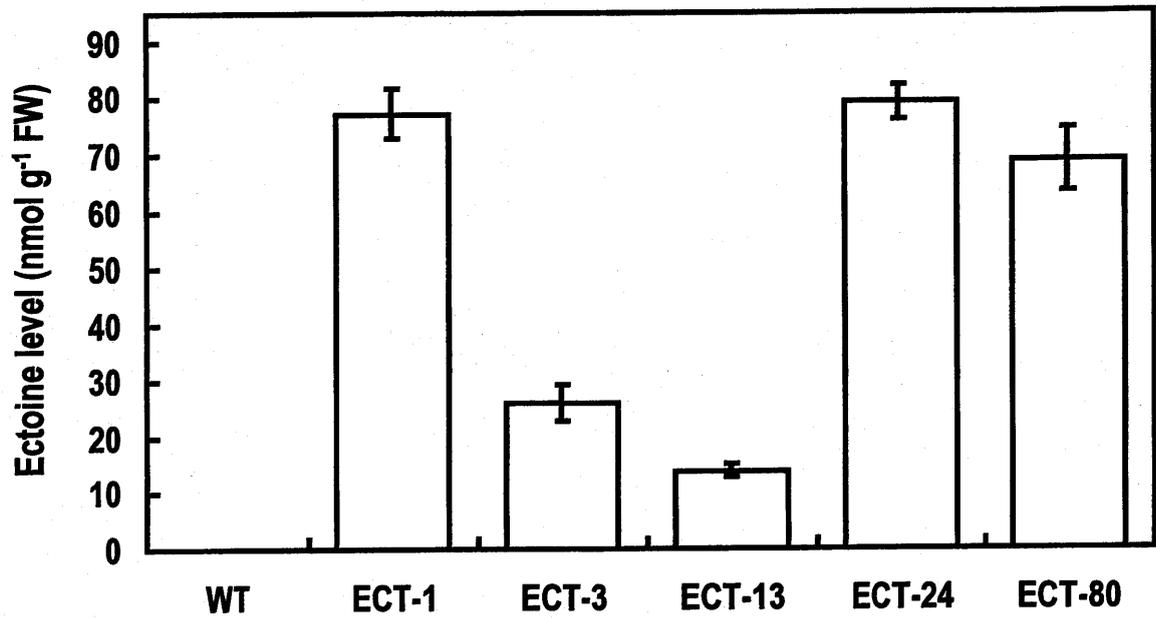


Figure 2-10. Ectoine levels in the untransformed BY2 cells (WT) and transgenic BY2 cells (ECT-1, -3, -13, -24, and -80). Ectoine levels in 5-d-old cultured cells of WT and the five ECT clones are shown. Error bars represent \pm SD ($n = 3$).

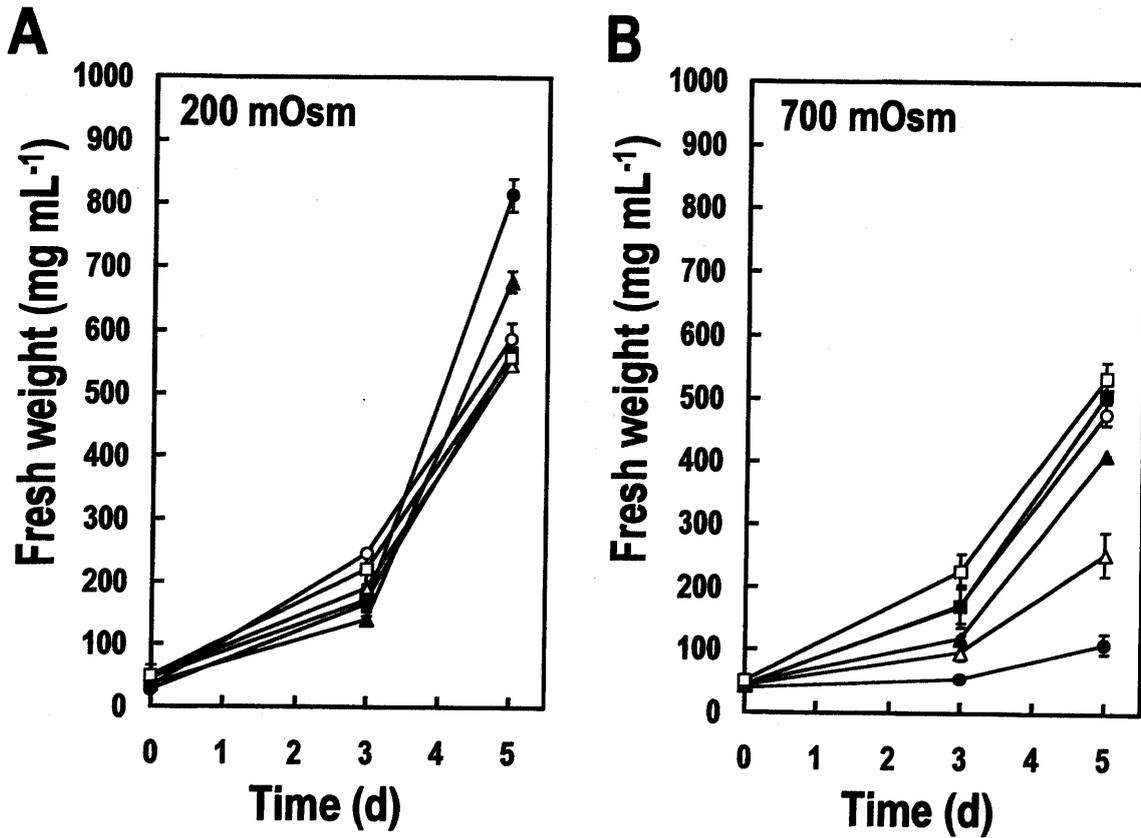


Figure 2-11. Growth inhibition of untransformed BY2 cells (WT) and transgenic BY2 cells after hyperosmotic shock treatment. A, The growth of the WT and the ECT clones after isoosmotic treatment with 180 mM mannitol solution (= 200 mOsm). B, The growth of the WT and the ECT clones after hyperosmotic shock treatment with 620 mM mannitol solution (= 700 mOsm). ●, WT; ○, ECT-1; ▲, ECT-3; △, ECT-13; ■, ECT-24; □, ECT-80. Error bars represent \pm SD ($n = 3$).

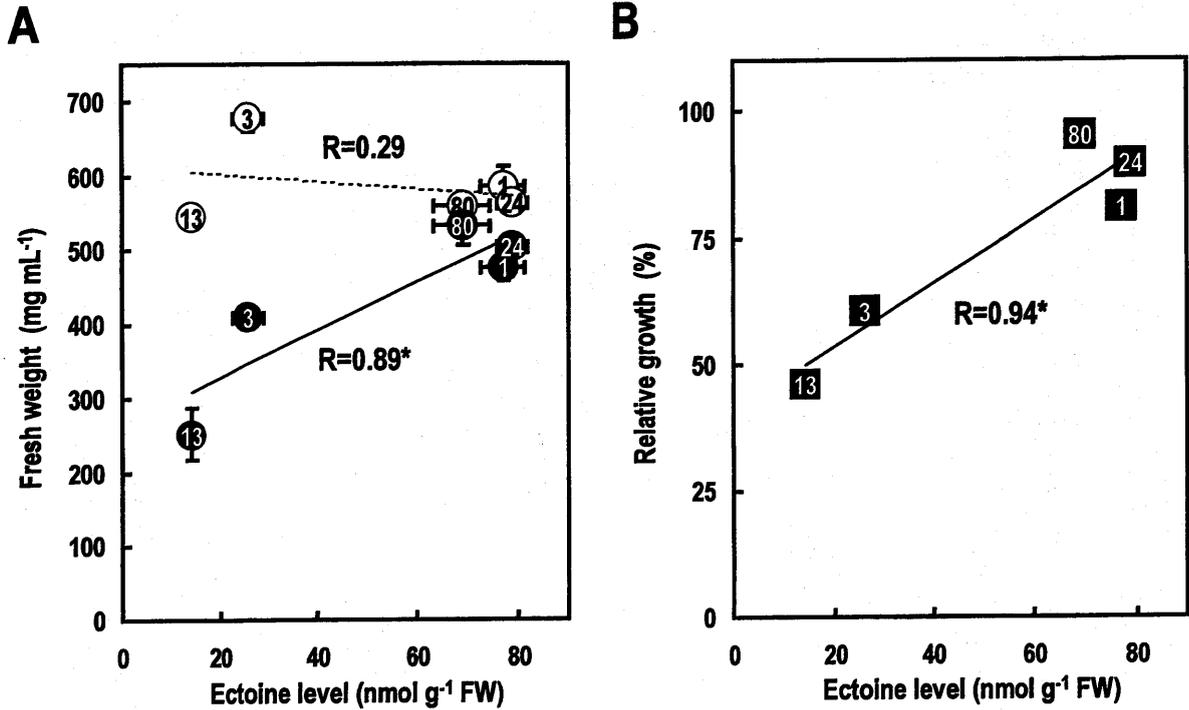


Figure 2-12. The relationship between ectoine level and cell growth in transgenic BY2 cells. A, Fresh weight of BY2 cells was measured at 5 d after isoosmotic treatment with 180 mM mannitol solution (control, open circle), and hyperosmotic shock treatment with 620 mM mannitol solution (closed circle). Data for ectoine level are from Figure 2-10. Error bars represent \pm SD ($n = 3$). B, Relative growth of each clone was determined as the ratio of the fresh weight of cells that had been treated with hyperosmotic shock to the fresh weight of control cells. Asterisks indicate $P < 0.05$. The numbers in circle and square correspond to the ECT clone numbers.

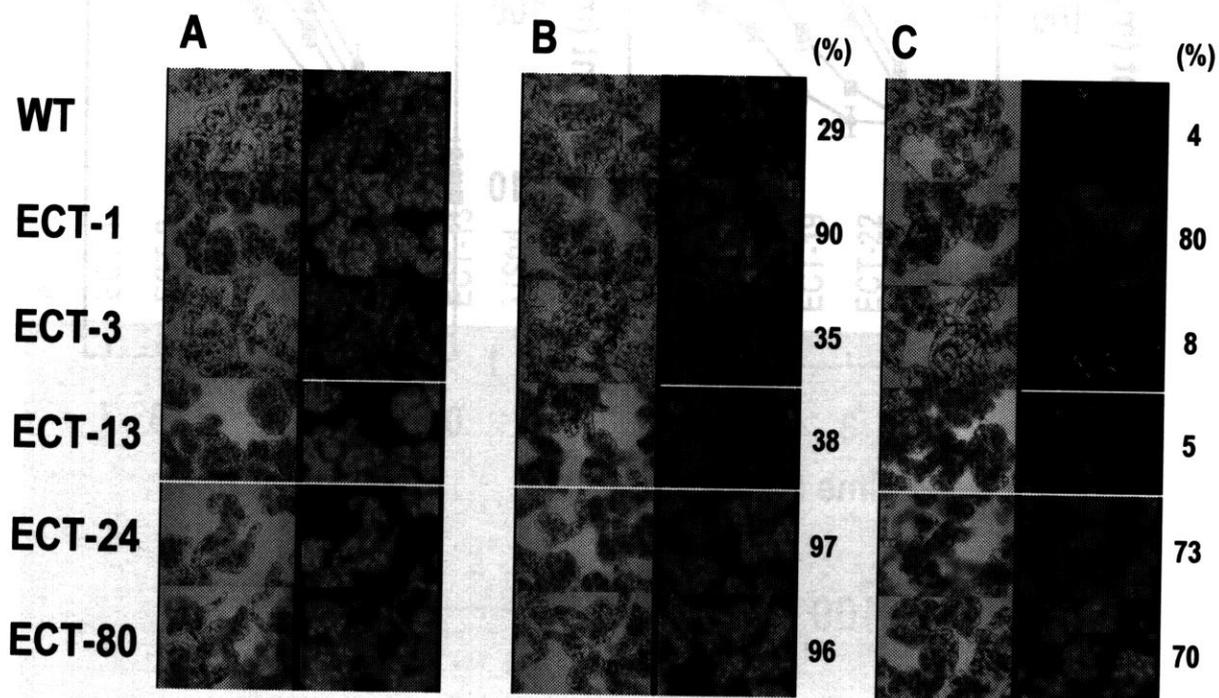


Figure 2-13. Viability of untransformed BY2 cells (WT) and transgenic BY2 cells after hyperosmotic shock treatment. Five-d-old BY2 cells were treated with the same volume of 180 mM mannitol (= 200 mOsm; A), 620 mM mannitol (= 700 mOsm; B), or 500 mM NaCl (= 900 mOsm; C) for 20 min and stained with FDA as described in Materials and Methods. Viable cells with normal membrane permeability were detected in fluorescence micrographs (right image) in compare with corresponding phase-contrast micrographs of the cells (left image). Each value indicates percentage of cell survival quantified from the photographs.

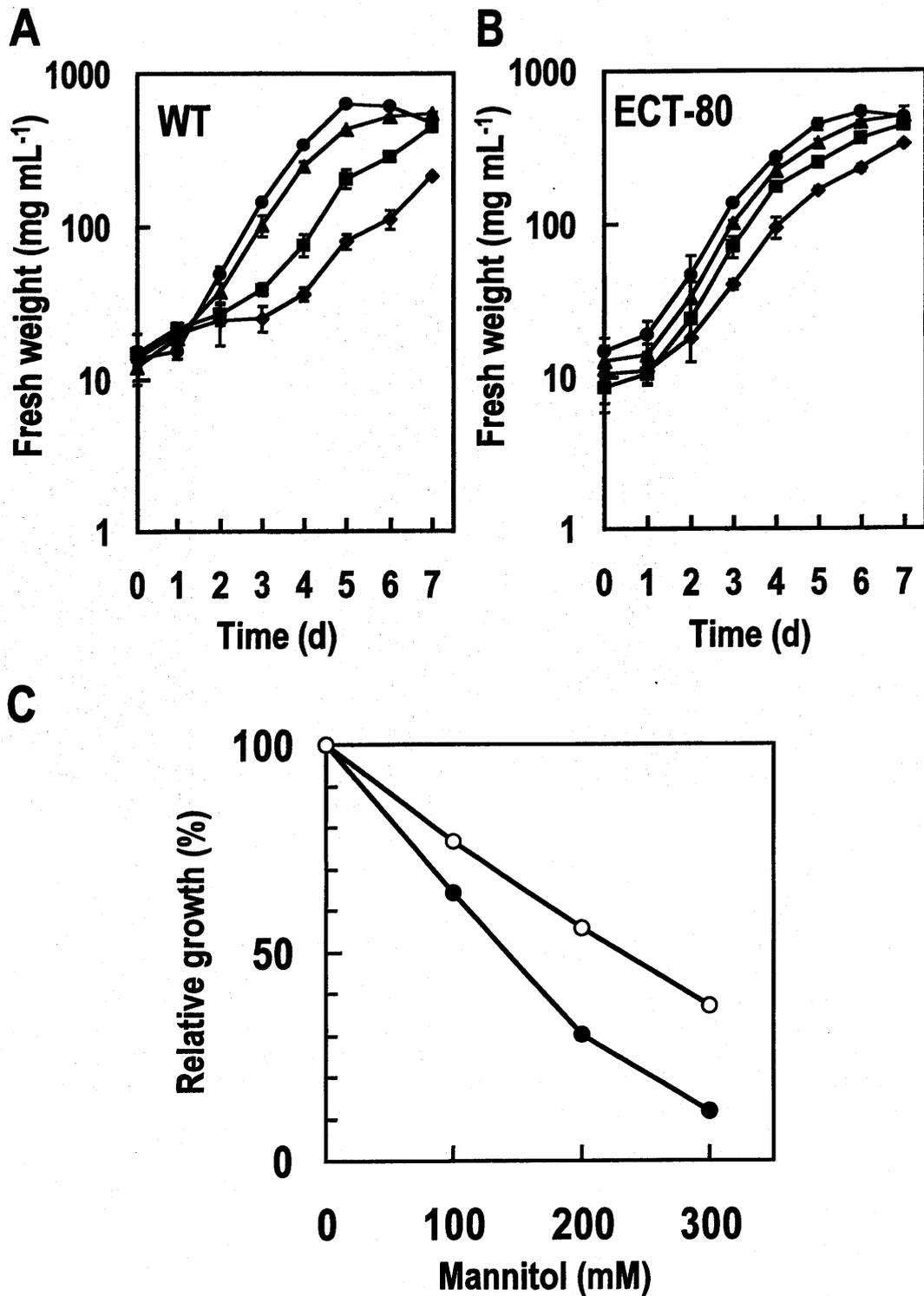


Figure 2-14. Growth of untransformed BY2 cells (WT) and transgenic BY2 cells under hyperosmotic stress. A and B, Growth curve of the WT (A) and the ECT-80 clone (B). ●, modified LS medium (200 mOsm); ▲, modified LS medium containing 100 mM mannitol (310 mOsm); ■, modified LS medium containing 200 mM mannitol (420 mOsm); ◆, modified LS medium containing 300 mM mannitol (530 mOsm). ●, WT; ○, ECT-80. Error bars represent \pm SD ($n = 3$). C, Hyperosmotic stress tolerance of the WT cells and the ECT-80 clone.

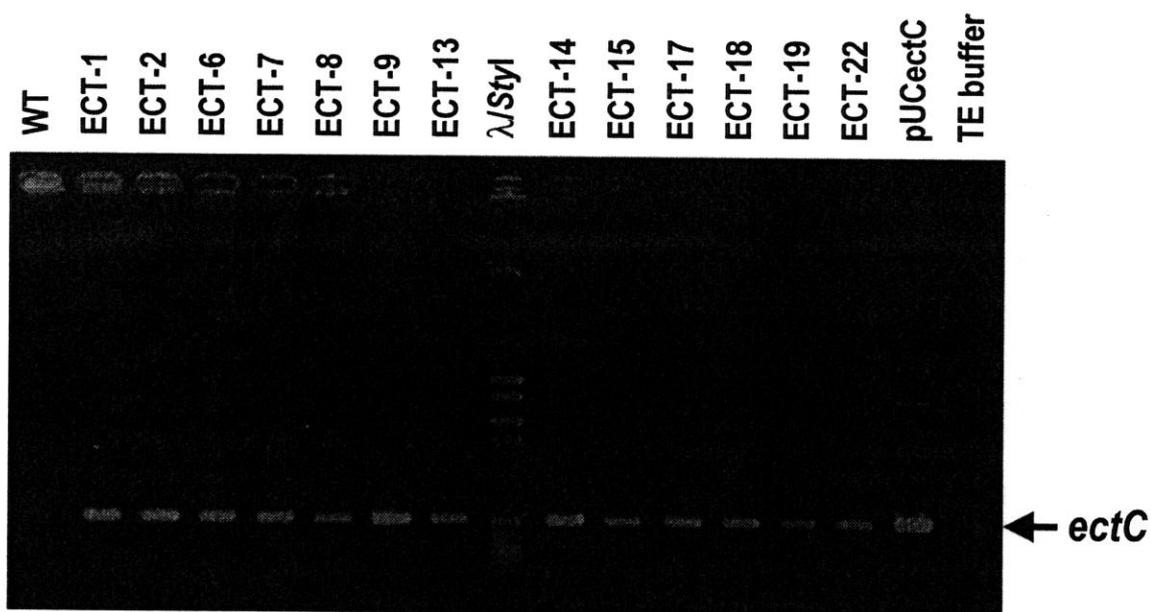


Figure 2-15. Genomic PCR of the transgenic tobacco using C1 and C2 primers to confirm the existence of transgene. WT, wild-type tobacco plant; ECT-1 to ECT-22, transgenic tobacco plants; λ StyI, DNA size marker; pUCectC, control plasmid; TE buffer, negative control with no template DNA.



Figure 2-16. Growth of the transgenic tobacco seedlings under water-stress. A, 4-d old seedlings just after transferring to water-stress media. B, The seedlings, 3 weeks after the transfer. C, The seedlings, 7 weeks after the transfer. D, Graphic representation of position of each conditioned medium. The basal medium used here is 1/2 MS salt medium and water-stress conditions were generated by adding 10% PEG 10,000 or 150-250 mM NaCl to the basal medium.

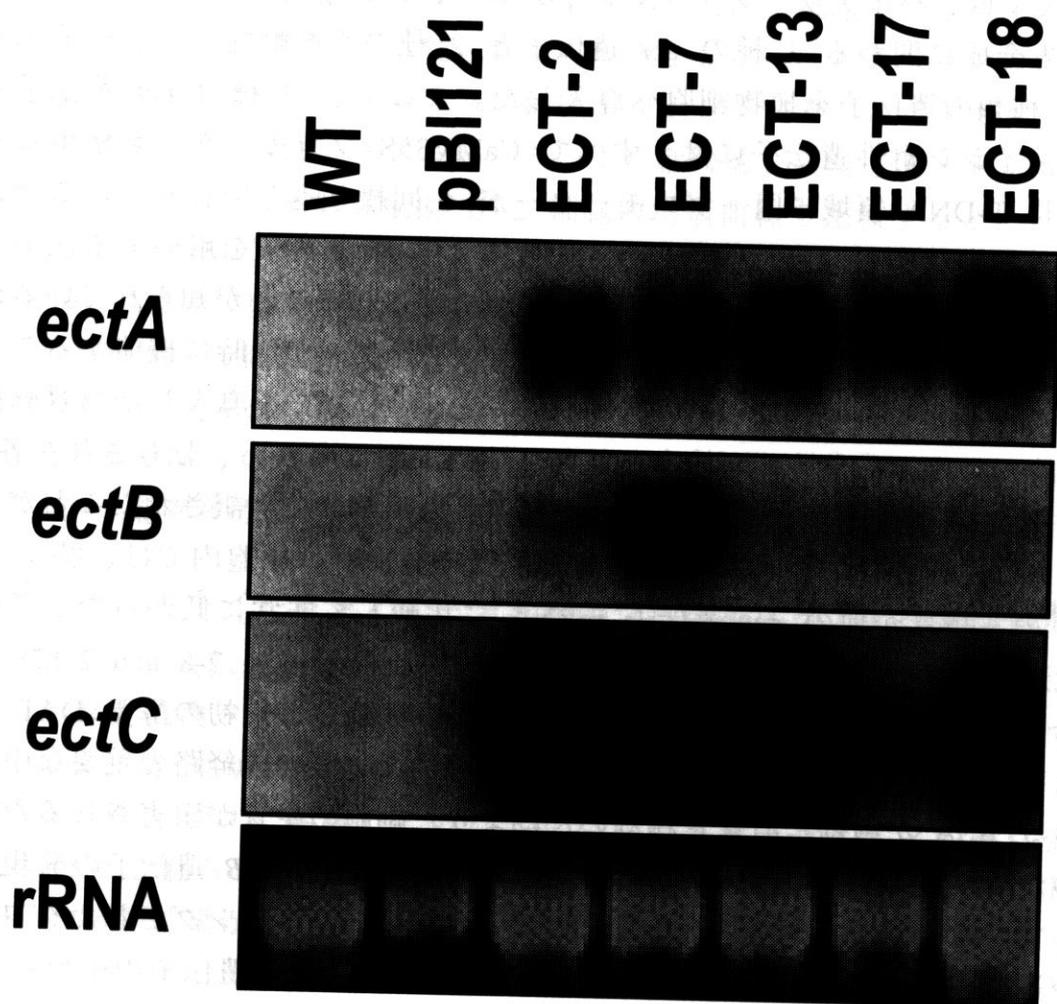


Figure 2-17. Accumulation of *ect* mRNA in the transgenic tobacco plants as detected by Northern hybridization. RNA was isolated from leaves of the wild-type tobacco (WT), control transformed tobacco (pBI121) and the transgenic tobacco (ECT-2, -7, -13, -17, and -18). Each lane contains 20 μ g of total RNA.

第 4 節 考察

第 1 項 タバコ細胞内での *ect* 遺伝子の発現

本研究では、バイナリープラスミド pBIHectABC (Fig. 2-6) を構築し、エクトインの生合成に関わる 3 種の *ect* 遺伝子と 2 種の薬剤耐性マーカー遺伝子の合計 5 種類の遺伝子を植物細胞へ導入した。ここで、3 種の *ect* 遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子には、すべて CaMV35S プロモーターを使用したため、同じ T-DNA 領域に同一プロモーターが 4 回繰り返して存在することになる。形質転換植物細胞内で複数の CaMV35S プロモーターを用いて遺伝子を発現させると、容易にジーンサイレンシングが誘導されることが知られているが、本研究では少なくとも 4 つの CaMV35S プロモーターが同時に機能することが示された。さらに、バイナリープラスミド pBIHectABC を導入した形質転換タバコ細胞でのみエクトインが検出された (Fig. 2-9) ことから、転写された各 *ect* 遺伝子 mRNA から、きちんとエクトイン生合成系酵素に翻訳されたことが示された。しかしながら、本研究で得られた形質転換タバコ細胞内では、特に *ectB* mRNA の蓄積量が他の *ect* 遺伝子 mRNA に比較して非常に低かった。この傾向は、形質転換タバコ植物体においても同様であった (Figs. 2-8 and 2-17)。これは、*ectB* 遺伝子がコードするエクトイン生合成経路の最初の酵素 DAT によって、リジンやトレオニン、メチオニンなどのアミノ酸合成経路の重要な中間物質である ASA が過剰に消費されることにより、細胞の生育が阻害されるためであるのかも知れない (Fig. 2-18)。そのため、結果的に *ectB* 遺伝子の発現を支配するプロモーターのみがメチル化などによってサイレンシングされたクローンのみが選抜されてきたと推察される。あるいは、単に *ect* 遺伝子の中でも *ectB* mRNA の安定性が特に低いなどの理由が考えられる。しかしながら、同一の T-DNA 領域に存在する同一の CaMV35S プロモーターによって発現させた 3 種の *ect* 遺伝子の mRNA 蓄積量に違いが生じる理由については不明である。

第 2 項 タバコ培養細胞の高浸透圧ストレス耐性

植物細胞は、600 mM サッカロースなどの高浸透圧ストレスにより、原形質分離を引き起こし、細胞膜に不可逆的な損傷を受けることが知られている (Adamec, 1984)。本研究においても、620 mM マンニトールや 500 mM NaCl による 20 min の一過的な高浸透圧ショック処理により、BY2 細胞が原形質分離を引き起こし、細胞膜に不可逆的な損傷を受けることが示された (Figs. 2-12 and 2-13)。この結果は、塩や乾燥などの高浸透圧ストレスに曝された細胞は、初期の高浸透圧ショックによる原形質分離によって、細胞膜に致命的な損傷を受ける

ことを示唆している。本研究で得られた形質転換 BY2 細胞のエクトイン蓄積量は 80 nmol/gFW 未満であり、浸透圧調節物質として機能するレベル (およそ 5 μ mol/gFW 以上) には不十分であると予想された。また、野生型 BY2 細胞と形質転換 BY2 細胞の間で、原形質分離を引き起こす細胞外溶液の NaCl 濃度に差が見られなかった (data not shown) ことから、BY2 細胞内の浸透圧調節にエクトインは関与しないことが示唆された。しかしながら、エクトインの蓄積量に応じて BY2 細胞の高浸透圧ショック耐性が向上していることが示された (Figs. 2-12 and 2-13)。さらに、マンニトールによる継続的な高浸透圧ストレス条件下で、野生型 BY2 細胞と形質転換 BY2 細胞の増殖曲線を比較すると、形質転換 BY2 細胞は野生型 BY2 細胞よりも高浸透圧ストレスに対して耐性を示した (Fig. 2-14)。また、野生型 BY2 細胞では高浸透圧ストレスの程度に応じて対数増殖期へ移行する時間に遅れが生じていたが、形質転換 BY2 細胞ではそのような時間の遅れは見られなかった (Fig. 2-14)。これらの結果は、BY2 細胞内に蓄積されたエクトインによって、BY2 細胞の高浸透圧ショック耐性が高まったことにより、継続的な高浸透圧ストレスに適応したことを示唆している。

第 3 項 エクトインによるタバコ培養細胞の高浸透圧ストレス耐性機構

これまでに、遺伝子工学的に適合溶質としてトレハロースやフルクタンを合成させた形質転換タバコの乾燥ストレス耐性が向上した例が報告されている (Holmström *et al.*, 1996; Pilon-Smits *et al.*, 1995; Romero *et al.*, 1997)。しかしながら、形質転換タバコに蓄積していたトレハロースやフルクタンの量は少なく (Table 1-1)、これらの糖は浸透圧調節には影響しないことが予想された。また、*in vitro* の実験結果から、トレハロースやフルクタンはモデル細胞膜と相互作用することが示され、これらの糖には乾燥した膜の流動性を高める機能があることが示唆された (Crowe *et al.*, 1984; Demel *et al.*, 1998)。これらの報告から、形質転換タバコに蓄積された低濃度のトレハロースやフルクタンは、浸透圧調節物質としてではなく、細胞膜機能の保護物質として機能していることが予想される。エクトインが細胞膜と相互作用する証拠はまだないが、FDA 染色の実験結果 (Fig. 2-13) から、細胞内に蓄積されたエクトインは、高浸透圧ショック時に細胞膜の正常な透過性を維持する機能をもつことが示唆された。このことから、エクトインは、トレハロースやフルクタンと同様に、細胞膜機能の保護物質として機能することにより、BY2 細胞の高浸透圧ストレス耐性を高めていることが予想された (Fig. 2-19)。

第 4 項 タバコ植物体の高浸透圧ストレス耐性

本研究で作製した *ect* 遺伝子を発現した形質転換タバコ植物体 13 系統のうち、

PEG10,000 による乾燥ストレスに対して顕著な耐性を示すクローンが 2 系統得られた (Figs. 2-16 and 2-17)。ここでは、*ect* 遺伝子の発現量と表現型に明確な相関関係は見られなかったが、この結果と形質転換 BY2 細胞で得られた結果とを合わせて考えると、エクトインはトレハロースやフルクタンと同様に、植物体レベルでも高浸透圧ストレス耐性を高める機能をもつことが示唆された。しかしながら、塩ストレスに対しては顕著な耐性を示さなかったことから、耐塩性植物を分子育種するためには、エクトインによる高浸透圧ストレス耐性の賦与に加え、塩ストレス特異的なイオン毒性に対する戦略が必要であることが示唆された。

第 5 項 今後の展望

塩や乾燥などの高浸透圧ストレスに曝された植物細胞は、浸透圧センサーによってストレスを感知した後、信号伝達系を経てプロリンなどの浸透圧調節物質の合成を誘導し、細胞質ゾルに高濃度の浸透圧調節物質を蓄積させることによって高浸透圧ストレスに適応すると考えられている (Yancey *et al.*, 1982; Yoshida *et al.*, 1997)。本研究の結果は、高浸透圧ストレスに曝された植物細胞が初期の高浸透圧ショックによる脱水より細胞膜機能に不可逆的な致命的損傷を受けた場合には、高浸透圧ストレスに対する適応応答をする以前に細胞が死に至ってしまうことを示している。すなわち、初期の高浸透圧ショックに耐えて生き残った植物細胞のみが、後の高浸透圧ストレスへの適応応答を行うことができることを示している。植物に高浸透圧ストレス耐性を賦与するためのこれまでの戦略は、遺伝子工学的に浸透圧調節物質を合成させ、植物細胞内で浸透圧調節物質を構成的に高蓄積させることで細胞の脱水を抑制することが主流であった。しかしながら、高浸透圧ストレス下ではない通常条件下で、浸透圧調節物質を高蓄積することは植物細胞にとって好ましい状態ではないので、今後は高浸透圧ストレス誘導性の *rd29A* プロモーター (Kasuga *et al.*, 1999) などを用いて、高浸透圧ストレスにより浸透圧調節物質の合成を誘導する戦略も重要である。この場合、植物細胞の初期の高浸透圧ショックによる脱水に対する耐性が重要な因子となるので、構成的なエクトインの合成と誘導的な浸透圧調節物質の合成を組み合わせることが、高浸透圧ストレスに対するより有効な戦略になると考えられる (Fig. 2-20)。また、塩ストレスに特異的なイオン毒性に対する戦略として、遺伝子工学的にイオン輸送体遺伝子を発現させる場合においても、初期の高浸透圧ショックによる脱水により細胞膜機能に損傷を受けた細胞では、生成させたイオン輸送体タンパク質も機能を発揮できないことが予想される。よって、今後は、構成的なエクトインの合成とイオン輸送体タンパク質の生成を組み合わせることが、塩ストレスに対するより有効な戦略になると考えられる (Fig. 2-20)。さらに、これまでの研究で明らかにされてきた適合溶質による戦略も合わせた複合的な戦略が求められる。

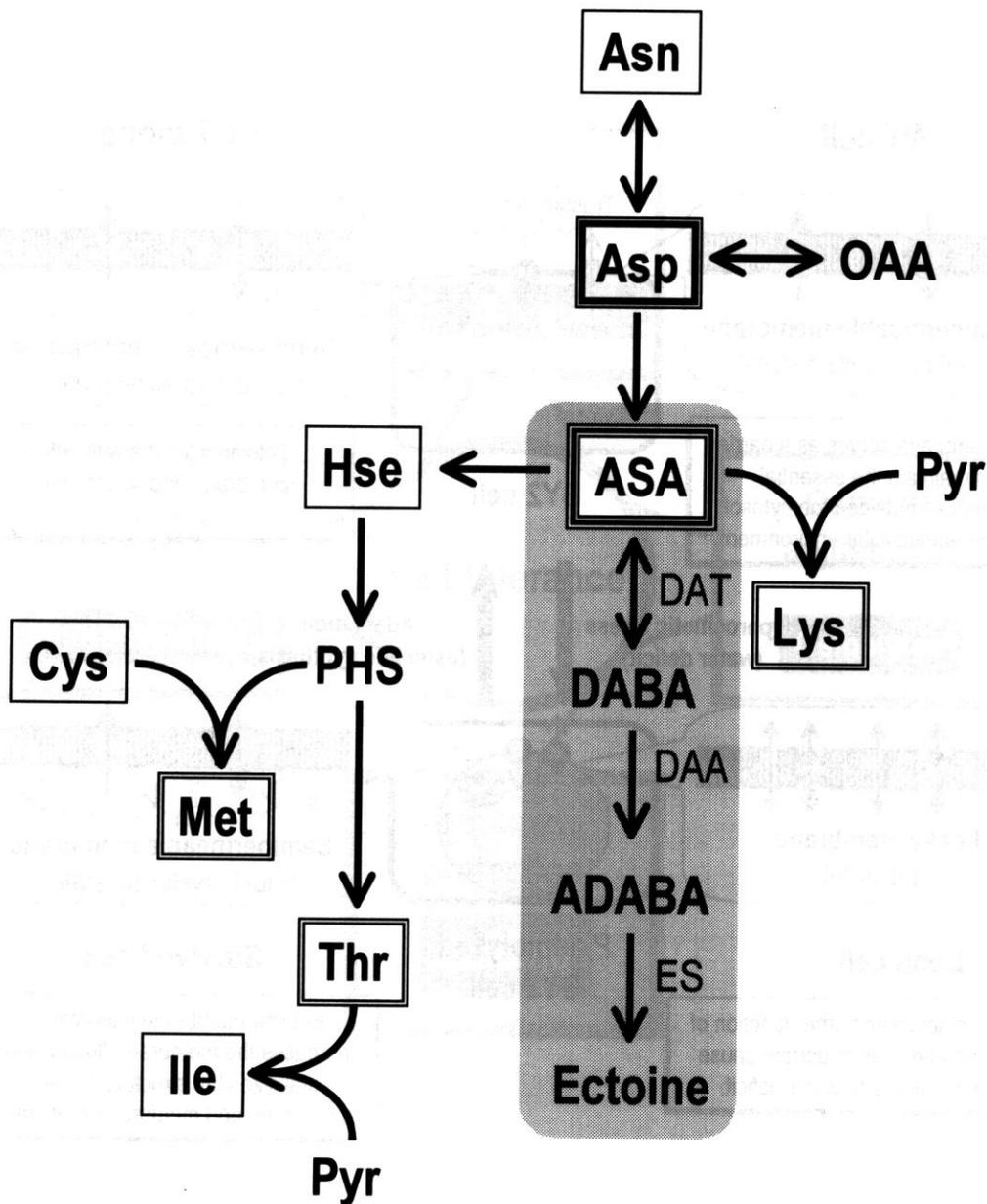


Figure 2-18. The relationship between the biosynthetic pathway of ectoine and that of the amino acids in the aspartate family. Asn, asparagine; Asp, aspartate; OAA, oxaloacetic acid; ASA, aspartate semialdehyde; Lys, lysine; Pyr, pyruvate; Hse, homoserine; PHS, phosphohomoserine; Met, methionine; Cys, cysteine; Thr, threonine; Ile, isoleucine. The ectoine biosynthetic pathway (as in Fig. 2-2) is shown in shadowed box.

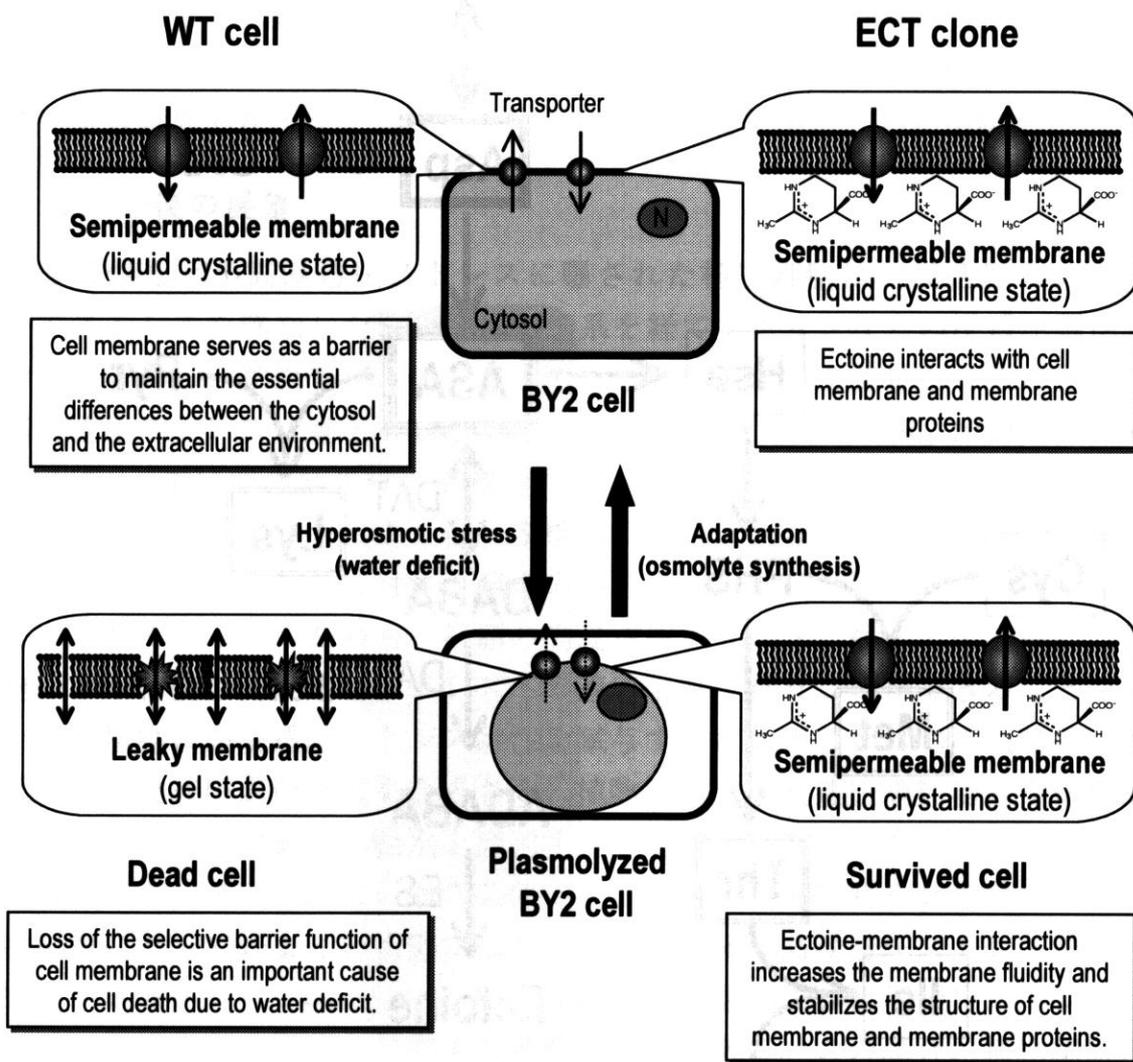


Figure 2-19. Hypothetical model for the function of ectoine on hyperosmotic tolerance in plant cells.

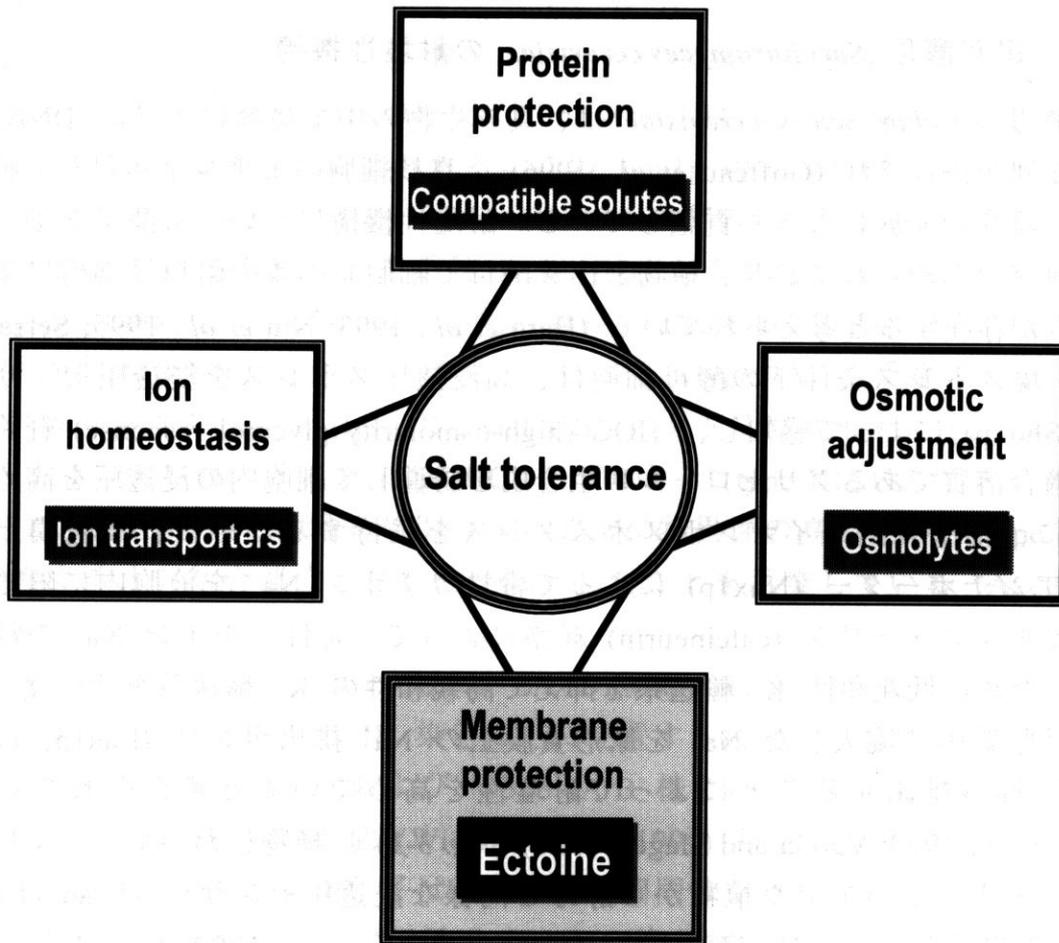


Figure 2-20. Combination strategy for engineering of salt-tolerant plants.

第3章 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のナトリウムポンプ 遺伝子を利用した耐塩性植物の分子育種

第1節 序論

第1項 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の耐塩性機構

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、真核生物の中で最初にゲノム DNA の全塩基配列が決定され (Goffeau *et al.*, 1996)、真核細胞のモデル生物として動物や植物の研究の発展に大きく貢献している。耐塩性機構についても酵母をモデルとした研究が進められており、植物と出芽酵母で細胞レベルの耐塩性機構に多くの共通点が存在すると考えられている (Haro *et al.*, 1993; Niu *et al.*, 1995; Serrano, 1996)。塩ストレス条件下の酵母細胞は、高浸透圧ストレスを浸透圧センサー (Sln1p, Sho1p) によって感知し、HOG (high-osmolarity glycerol response) 経路によって適合溶質であるグリセロールの生合成を誘導して細胞内の浸透圧を高めるとともに、細胞質内のイオンホメオスタシスを維持するために、液胞膜上の Na^+/H^+ アンチポーター (Nhx1p) によって毒性カチオン Na^+ を液胞内に隔離したり、カルシニューリン (calcineurin) 経路によって、毒性カチオン Na^+ の浸入を抑えるために低親和性 K^+ 輸送系を抑えて高親和性の K^+ 輸送系を活性化し、同時に細胞質中に流入した Na^+ を原形質膜上の Na^+ 排出ポンプ (Ena1p) によって細胞外へ排出することによって耐塩性を高めていると考えられている (Serrano *et al.*, 1999; Varela and Mager, 1996) (Fig. 3-1)。植物においても、主にシロイヌナズナなどのモデル植物から酵母と同様な浸透圧センサー (Urao *et al.*, 1999)、液胞膜上の Na^+/H^+ アンチポーター (Fukuda *et al.*, 1999; Gaxiola *et al.*, 1999)、カルシニューリンの調節サブユニット (Kudla *et al.*, 1999; Liu and Zhu, 1998) などの遺伝子が単離されており、植物の耐塩性に重要な役割を担っていると考えられている。

第2項 酵母のナトリウムポンプをコードした *ENA1* 遺伝子

酵母 (*S. cerevisiae*) のナトリウムポンプ遺伝子 (*ENA1*) は、 Na^+ および Li^+ の排出活性が低い野生型株の塩感受性を補う遺伝子として単離された (Haro *et al.*, 1991)。また、*ENA1* 遺伝子を欠失した変異酵母は塩ストレスとアルカリ性 pH に感受性となり、 Na^+ および Li^+ の排出活性が低下した (Haro *et al.*, 1991)。これとは別に、*ENA1* 遺伝子が同定される以前に、原形質膜上の H^+ -ATPase をコードした *PMAl* 遺伝子の相同遺伝子として *PMR2* 遺伝子が単離された (Rudolph *et al.*, 1989)。これら *ENA1* と *PMR2* の両遺伝子は同一の遺伝子であ

り、予想されるアミノ酸配列から P-type ATPase をコードしていると予想された (Fig. 3-2)。もともと *PMR2* 遺伝子は、 Ca^{2+} -ATPase と最も高い相同性を有していたので Ca^{2+} -ATPase をコードしていると考えられていた (Rudolph *et al.*, 1989) が、動物 ATPase との相同性解析だけから機能を予想することは難しく、後の *ENA1* 遺伝子の単離によって、 Na^+/Li^+ -ATPase であると訂正された。この *Ena1p* ATPase が、ATP によって *in vitro* でリン酸化される条件には、異なる一価のカチオン間で差はみられず、 Na^+ に対する K_m 値は 0.2 M より大きかった (Benito *et al.*, 1997)。それゆえ、*Ena*-type ATPase は非特異的なアルカリカチオン ATPase であると考えられる。この *Ena1p* の低親和性と非特異性は、他の P-type ATPase スーパーファミリーの中でも独特のものであり、P-type ATPase の系統樹においても独立した系統 (type IID) に分類されている (Axelsen and Palmgren, 1998)。このことは、進化の過程で *Ena*-type ATPase のカチオンに対する特異性が変性したために、カリウムイオン (type IA)、重金属イオン (type IB)、カルシウムイオン (type IIA and IIB)、ナトリウムイオン (またはプロトン) およびカリウムイオン (type IIC)、プロトン (type IIIA)、マグネシウムイオン (type IIIB) などの輸送に参与する非常に特異性の高い他の P-type ATPase よりもカチオン結合部位の選択性が低下したことを示唆している (Axelsen and Palmgren, 1998)。

菌株によって多少の差はあるが、*ENA1/PMR2* 遺伝子 (今後は *ENA1* のみの表記とする) は、酵母の第 IV 染色体上に位置する隣接した数個の相同遺伝子群 (例えば、DBY764/767 株および W303.1A/B 株では 4 個 (Garcia-deblas *et al.*, 1993)、S288C 株では 5 個 (Wieland *et al.*, 1995) 存在している) の第一番目の遺伝子であり、隣接した遺伝子は互いに高い相同性を有している。特に、最初の *ENA1* および *ENA2* の 2 遺伝子は、DNA 塩基配列がほとんど同一であり、*Ena1p* と *Ena2p* の予想されるアミノ酸配列の長さは等しく、全 1091 アミノ酸中で 13 アミノ酸が異なっているだけであった (Garcia-deblas *et al.*, 1993; Wieland *et al.*, 1995)。しかしながら、*ENA1* 遺伝子と *ENA2* 遺伝子の発現様式は大きく異なっており、*ENA2* 遺伝子は恒常的に低レベルの発現をしているが、耐塩性に大きな影響を与えておらず、耐塩性に重要な役割を果たしているのは *ENA1* 遺伝子のみで、その発現は Na^+ および Li^+ の塩ストレスや高 pH で特異的に誘導される (Garcia-deblas *et al.*, 1993)。この *ENA1* プロモーターの支配下に *ENA2* 遺伝子を融合して発現させることにより、*Ena2p* が *Ena1p* と同様に Na^+/Li^+ -ATPase として機能することが示された (Garcia-deblas *et al.*, 1993; Wieland *et al.*, 1995)。

酵母の耐塩性を左右する *ENA1* 遺伝子の発現制御機構については、高 pH に応答した信号伝達系については明らかになっていないが、塩ストレスに応答した

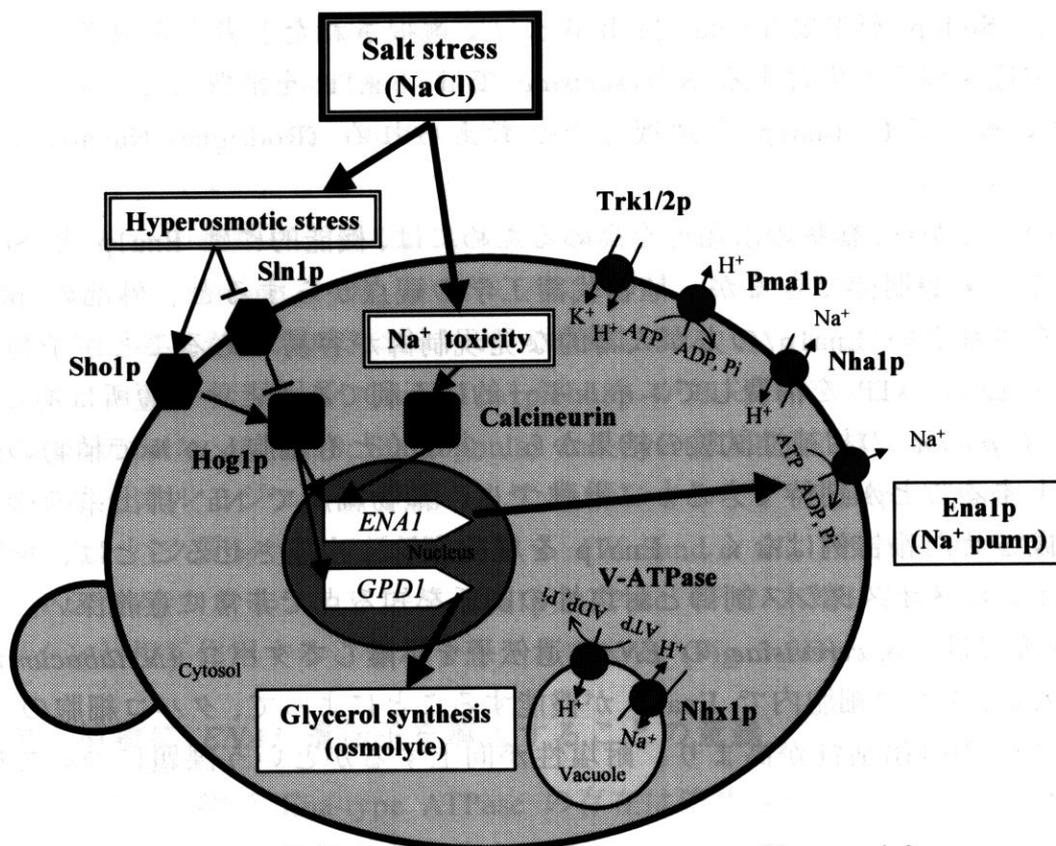
2つの異なる信号伝達系が関与することが明らかにされている (Marquez and Serrano, 1996) (Fig. 3-3)。低塩濃度 (0.1-0.3 M NaCl) の条件下では、非特異的な浸透圧ストレスによって活性化される HOG-MAP リン酸化経路によって *ENA1* 遺伝子の発現が誘導される (Marquez and Serrano, 1996)。この HOG 経路における *ENA1* 遺伝子の発現誘導は、非ストレス条件下で *ENA1* 遺伝子の発現を抑制している bZIP (basic region and leucine zipper) 転写因子 Sko1p を不活性化することによって行われている (Proft and Serrano, 1999)。高塩濃度 (0.6-1 M NaCl) の条件下では、 Ca^{2+} によって活性化されるタンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの経路によって、*ENA1* 遺伝子の Na^+ 特異的な発現が誘導される (Marquez and Serrano, 1996)。カルシニューリンによって直接制御されているのかは不明であるが、カルシニューリン経路による *ENA1* 遺伝子の発現に重要な Zn フィンガー転写因子 Crz1p/Tcn1p/Hal8p が知られている (Matheos *et al.*, 1997; Mendizabal *et al.*, 1998; Stathopoulos and Cyert, 1997)。また、カルシニューリンではなくカルモジュリンが関与した機構によって、Ena1p ATPase は Ca^{2+} によってタンパク質レベルで活性化される (Wieland *et al.*, 1995)。その機構として、カルシウム-カルモジュリンが Ena1p ATPase の C 末端に存在する自己抑制化ドメインと相互作用することが予想されている (Fig. 3-2D)。

第3項 植物に *ENA1* 遺伝子を導入することの意義

これまでに、植物で Ena-type ATPase の存在は確認されておらず、いまだに細胞外へ Na^+ を排出する機能をもつイオン輸送体は同定されていない。そのため、植物の Na^+ 排出機構に関する研究は酵母と比較してかなり遅れている。植物生理学的研究から、植物の Na^+ 排出には Na^+/H^+ アンチポーターが関与していることが示唆されているが、その分子機構についてはほとんど明らかになっていない。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* では、Ena-type ATPase ではなく、 Na^+/H^+ アンチポーターである Sod2p が Na^+ および Li^+ の排出に機能し、耐塩性に深く関与していることが知られている (Jia *et al.*, 1992)。しかしながら、*S. pombe* の *SOD2* 遺伝子を欠失させた塩感受性変異株に、*S. cerevisiae* の *ENA1* 遺伝子を導入して発現させると、 Na^+ および Li^+ の排出活性が相補されて耐塩性が復帰することが示されている (Bañuelos *et al.*, 1995)。また、*S. cerevisiae* の *ENA1-4* 遺伝子を欠失させた塩感受性変異株に、*S. pombe* の *SOD2* 遺伝子を導入して発現させると、 Na^+ および Li^+ の排出活性が相補されて耐塩性が復帰することが示されている (Hahnenberger *et al.*, 1996)。これらの結果は、細胞生理学的に Ena-type ATPase と Na^+/H^+ アンチポーターは置き換え可能であり、耐塩性を向上させるという点では、どちらも有効な機能分子であるといえる。しかしながら、*S. cerevisiae* においても、Sod2p と同様な Na^+/H^+ アンチポーター

Nha1p の存在が知られているが、その発現レベルは低く耐塩性にはほとんど関与していない (Prior *et al.*, 1996)。また、Sod2p/Nha1p は細胞外の pH によって Na⁺ および Li⁺ の排出活性が規定されるため、酸性環境でのみしか機能を発揮できないという特徴をもつ。そのため、生育環境が酸性である *S. pombe* にとっては、Sod2p が主要な Na⁺ 排出系として選択されたと考えられる。その一方で、中性環境でも生育する *S. cerevisiae* では、ATP を消費してエネルギー的に不利であっても Ena1p を選択したと考えられる (Rodríguez-Navarro *et al.*, 1994)。

以上のことから、植物の耐塩性を高めるためには、機能的には Ena1p と Sod2p で同様な効果が期待できるが、植物代謝工学の観点からすると、外部の pH 環境に左右されない Ena1p の方が人為的な発現制御が容易であることが予想される。もちろん、ATP を消費してエネルギー的に不利であるという短所はあるが、上述の *S. pombe* の相補性試験の結果から、少なくとも細胞レベルで植物の耐塩性が向上することが期待できる。これまでに、植物細胞で Na⁺ 排出系の機能分子を生成させた報告例はなく、Ena1p を植物細胞で生成させることは、植物細胞のイオンホメオスタシス制御と耐塩性の関係を知る点で非常に意義深い。そこで、本研究では、*S. cerevisiae* の *ENA1* 遺伝子を単離してタバコ (*N. tabacum*) 細胞へ導入し、タバコ細胞内で Ena1p が機能することによって、タバコ細胞の Na⁺ および Li⁺ の排出活性が高まり、耐塩性が向上するかという課題について検討を行った。



S. cerevisiae

Figure 3-1. Two major inducible responses against salt stress in *S. cerevisiae*: the expression of *GPD1* gene for synthesis of glycerol as an osmolyte and the expression of *ENA1* gene for sodium pumping. Sho1p, osmosensor in the HOG1 MAP kinase, high-osmolarity signal transduction pathway; Sln1p, two-component signal transducer involved in the high-osmolarity MAP kinase signal transduction pathway; Hog1p, MAP kinase (MAPK) central to the high-osmolarity signal transduction pathway; *GPD1*, a gene encoding the key enzyme for glycerol production, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; Trk1/2p, potassium transporter of the plasma membrane; Pma1p, H⁺-transporting P-type ATPase of the plasma membrane; Nha1p, putative Na⁺/H⁺ antiporter; Ena1p, P-type ATPase involved in Na⁺ and Li⁺ efflux, required for Na⁺ tolerance; Nhx1p, late endosomal Na⁺/H⁺ antiporter; calcineurin, protein serine/threonine phosphatase 2B (PP2B); *ENA1*, a gene encoding the Na⁺/Li⁺ pump, Ena1p ATPase.

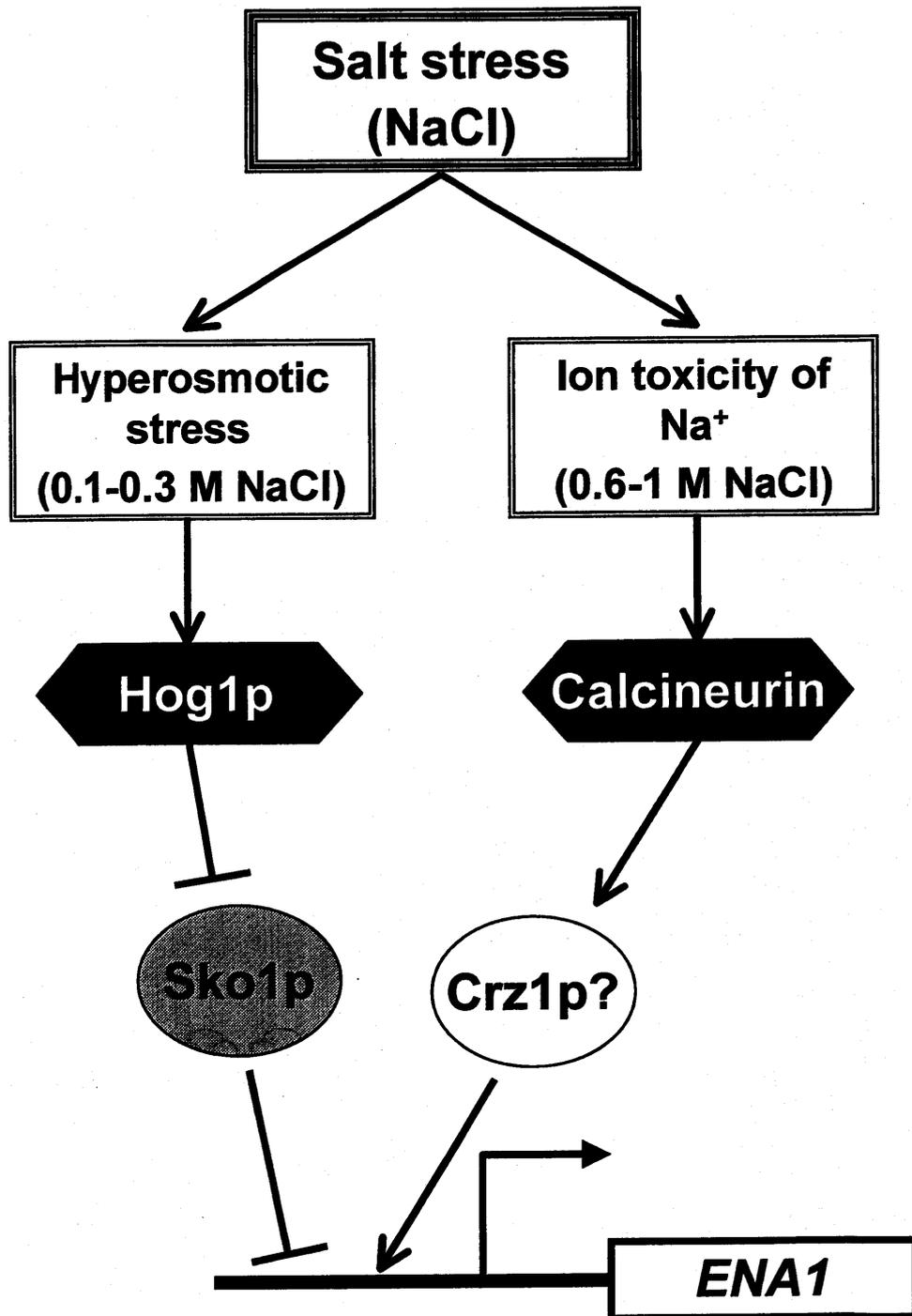


Figure 3-3. Model for salt-induced transcriptional regulation of *ENA1* gene.

第 2 節 実験材料および方法

第 1 項 使用植物

形質転換タバコ培養細胞の作製には、第 2 章第 1 項で示した *Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow 2 を用いた。

第 2 項 使用菌株とプラスミド

融合遺伝子構築のための大腸菌宿主およびタバコ培養細胞への遺伝子導入のためのアグロバクテリウムは、第 2 章第 2 項で示したものを使用した。

酵母のナトリウムポンプ遺伝子 (*ENA1*) 単離のための野生型酵母菌株として *Saccharomyces cerevisiae* W303.1B 株 (*Mat α ade2 his3 leu2 trp1 ura3*) を、酵母における *ENA1* 遺伝子の機能解析には *S. cerevisiae* W303.1B 株の 4 個全ての *ENA* 遺伝子群を欠失変異した *S. cerevisiae* G19 株 (*Mat α ade2 his3 leu2 trp1 ura3 ena1 Δ ::HIS3::ena4 Δ*) (Quintero *et al.*, 1996) を使用した。

融合遺伝子の構築のためのベクターは、第 2 章第 2 項で示したものを使用した。形質転換酵母作製のための発現ベクターとして、pYES2 (Invitrogen 社) を使用した。また、形質転換タバコ培養細胞作製のためのバイナリーベクターとして、pMSH1/2 (Kawasaki *et al.*, 1999) を使用した。

第 3 項 培地および培養条件

大腸菌、アグロバクテリウム、およびタバコ培養細胞の培地および培養条件は、第 2 章第 3 項で示した。

酵母の培養のための基本操作は、Adams らの方法 (Adams *et al.*, 1997) に従った。酵母の通常培養は、完全培地の YPD 培地 (2% glucose, 2% Bacto-peptone (Difco 社), 1% yeast extract) を使用し、30°C で行った。また、pYES2 (マーカ―遺伝子は *URA3*) 系のプラスミドを保持した形質転換酵母の選択には、最少培地の SD 培地 (2% glucose, 0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids (Difco 社)) (Adams *et al.*, 1997) に 0.5% カザミノ酸 (Bacto-casamino acid; Difco 社)、2% 硫酸アデニン、および 4% L-トリプトファンを添加した培地 (SD-Ura 培地) を使用し、30°C で行った。形質転換酵母における pYES2 の *GALI* プロモーターの下流に挿入した *ENA1* 遺伝子の発現誘導には、YPG 培地 (2% galactose, 0.6% sucrose, 2% Bacto-peptone, 1% yeast extract) を使用し、30°C で行った。平板培地には、20 g/L の精製寒天末を加えた。また、塩ストレスを与える場合は、必要に応じて適量の LiCl または NaCl を YPD 培地および YPG 培地に添加した。

第 4 項 大腸菌の形質転換

大腸菌の形質転換方法は、第 2 章第 4 項で示した。

第 5 項 酵母の形質転換

酵母の形質転換は、Gietz らの酢酸リチウム (LiAc) 法 (Gietz *et al.*, 1992) に従った。酵母の単一コロニーを 5 mL の YPD 培地に白金耳を用いて植菌し、30°C で 1 晩培養した。この酵母培養液のうち 500 μ L ずつを 5 mL の YPD 培地 2 本に移し、600 nm における濁度が 0.8 になるまで 30°C で振盪培養した。培養液を 15 mL 遠心管に移し、遠心分離 (1500 rpm, 3 min, 25°C) により集菌して上清を捨て、10 mL の滅菌水に懸濁した。遠心分離 (1500 rpm, 3 min, 25°C) し、ペレットを 1.2 mL の滅菌水に懸濁させ 1.5 mL 遠心管に移した。遠心分離 (3000 rpm, 3 min, 25°C) を行い、ペレットを 1.2 mL の TE/LiAc 溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM lithium acetate (LiAc), pH7.5) に懸濁した。遠心分離 (3000 rpm, 3 min, 25°C) を行い、ペレットを 100 μ L の TE/LiAc 溶液に懸濁した。このうち 50 μ L を分注し、高い形質転換効率を必要とする場合は 50 μ g の一本鎖サケ精子キャリアー DNA を添加し、必要量のプラスミド DNA を添加した後に、300 μ L の PEG 4000 溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, 40% PEG 4000, pH 7.5) を加えた。30°C で 30 min 振盪培養した後、42°C で 15 min 熱ショックを加えた。細胞懸濁液を 5 s スピンダウンし、1 mL の液体 SD-Ura 培地に再懸濁し、30°C で 30 min 振盪培養した後、平板 SD-Ura 培地上に塗布し、30°C で 2 晩培養して形質転換酵母を選抜した。

第 6 項 プラスミド DNA の少量調製

大腸菌およびアグロバクテリウムからのプラスミド DNA の少量調製方法は、第 2 章第 5 項で示した。

酵母からのプラスミド DNA の少量調製は、Hoffman と Minston の簡易ガラスビーズ法 (Hoffman and Winston, 1987) に従った。選択培地で 30°C、1-2 晩培養した菌体を 1.5 mL 遠心管に移し、遠心分離 (10000 rpm, 10 s, 25°C) により集菌した。この菌体を 200 μ L の抽出バッファー (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) に懸濁した後、200 μ L のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1, v/v/v) と酸洗浄ガラスビーズを約 0.3 g 加え、2 min ボルテックスで激しく攪拌した。遠心分離 (12000 rpm, 1 min, 25°C) して上清を別のチューブに移し、エタノール沈殿を行った後、TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解した。

第 7 項 酵母 *ENAI* 遺伝子のゲノム PCR による増幅

酵母のナトリウムポンプをコードした *ENAI* 遺伝子は、簡易ガラスビーズ法 (Hoffman and Winston, 1987) または Nippon Gene 社の ISOPLANT DNA isolation kit を用いて調製した *S. cerevisiae* W303.1B 株のゲノム DNA を鋳型とし、両端に制限酵素切断部位を付加した *ENAI* 遺伝子全長 (3276 bp) を特異的に増幅するプライマーセットを用いたゲノム PCR によって増幅した。ここでは、*S. cerevisiae* の第 IV 染色体 DNA の全塩基配列 (accession no. NC_001136) には、*ENAI* 遺伝子が含まれている (Goffeau *et al.*, 1996) ことから、これらの公開されている塩基配列情報から *ENAI* 遺伝子の特異的に増幅する PCR プライマーセットを設計した。実際のゲノム PCR には、全長 25 nt の *SacII* 切断部位を付加したフォワードプライマー *ENAI-F* (5'-ACCGCGGATGGGCGAAGGAACTACT-3') および全長 45nt の *SacII* 切断部位と *XhoI* 切断部位とを付加したリバースプライマー *ENAI-R* (5'-ACTCGAGCCGCGGTCATTGTTTAATACCAATATTAACCTCTGTAT-3') を使用し、約 3.3 kb の *ENAI* 遺伝子を増幅した。また、*ENAI* 遺伝子の PCR は、変性反応を 94°C で 1 min 行った後、変性反応を 98°C で 20 s、アニーリングおよび伸長反応 68°C で 3 min で 30 サイクル繰り返して行い、最後に伸長反応を 72°C で 10 min 行った。そして、得られた増幅 DNA 断片の制限酵素処理断片の解析を行い、アガロースゲル電気泳動により増幅 DNA 断片が目的の *ENAI* 遺伝子であることを確認した。

第 8 項 植物で *ENAI* 遺伝子を発現するためのバイナリープラスミドの構築

融合遺伝子構築のための基本操作は、Sambrook らの方法 (Sambrook *et al.*, 1989) に従った。ゲノム PCR によって増幅した約 3.3 kb の *ENAI* 遺伝子全長を直接クローニングするのは、エラー PCR の頻度やプラスミドへの連結効率を考慮すると得策ではない。そこで、増幅した約 3.3 kb の *ENAI* 遺伝子全長を Klenow 酵素で平滑化した後、*KpnI* で切断して約 1.2 kb の *ENAI* 遺伝子の 5'-側の DNA 断片 (*Ena_S*) と約 2.1 kb の *ENAI* 遺伝子の 3'-側の DNA 断片 (*eNA_L*) に分断した。まず、*Ena_S* 断片を pBluescriptII SK- の *SmaI/KpnI* 部位に挿入し、pSK*Ena_S* を構築した。次に、*eNA_L* 断片を *SacII* で切断した後、pBluescriptII SK- の *SacII/KpnI* 部位に挿入し、pSK*eNA_L* を構築した。そして、pSK*eNA_L* の *KpnI/SacI* 断片をバイナリーベクター pMSH2 の *KpnI/SacI* 部位に挿入し、バイナリープラスミド pMSHe*NA_L* を構築した。続いて、pSK*Ena_S* の *SpeI/KpnI* 断片をバイナリープラスミド pMSHe*NA_L* の *SpeI/KpnI* 部位に挿入し、カリフラワーモザイクウイルス 35S (CaMV35S) プロモーターと *nos* ターミネ

ーターの間に *ENAI* 遺伝子が挿入されたバイナリープラスミド pMSH2::*ENAI* を構築した。一方で、酵母用の発現ベクター pYES2 を *HindIII/EcoRI* で切断し、Klenow 酵素で平滑化した後に、再連結して不必要な制限酵素切断部位 (*HindIII*, *KpnI*, *SacI*, *BamHI*, *EcoRI*) を除いた。なお、本研究では今後は表記しないが、この不必要な制限酵素切断部位を除いた pYES2 を用いた。そして、pYES2 の *NotI/XhoI* 部位に、pMSH2::*ENAI* の *NotI/XhoI* 断片を挿入し、pYES2::*ENAI* を構築した。そして、酵母の *ENAI-4* 遺伝子欠損変異株 (*S. cerevisiae* G19 株) を用いた機能的相補性試験を行い、ゲノム PCR により増幅した *ENAI* 遺伝子が機能的に発現することを確認した。

第 9 項 酵母の *ENAI-4* 遺伝子欠損変異株を用いた機能的相補性試験

酵母において *ENAI* 遺伝子が機能的に発現しているかを調べるために、*S. cerevisiae* G19 株 ($\Delta ena1-4$) へ pYES2 ベクターの *GAL1* プロモーターの支配下に融合遺伝子を挿入した構築物を導入した形質転換酵母を作製した。そして、YPD または SD-Ura 液体培地を用いて、30°C で 2 d 増殖させた酵母細胞の 5 倍希釈系列を作製し、必要に応じて 20 mM LiCl または 300 mM NaCl を添加した YPD 平板培地または YPG 平板培地上に希釈した細胞懸濁液を 5 μ L ずつスポットし、30°C で 2 d (LiCl および NaCl を含まない培地の場合) または 5 d (LiCl および NaCl を含む培地の場合) の増殖を観察し、*S. cerevisiae* G19 株の耐塩性が導入した遺伝子の発現によって相補されるか調べた。

第 10 項 タバコ培養細胞の LiCl 感受性試験

塩ストレスとして NaCl を用いた場合は、 Na^+ のイオン毒性に加え、高濃度の NaCl による高浸透圧ストレスによりタバコ培養細胞は損傷を受けてしまう。そのため、塩ストレスのうち、特にイオン毒性に対する耐性を評価するためには、NaCl よりもイオン毒性が数倍強い LiCl に対するタバコ培養細胞の耐性を調べるのが合理的である。つまり、LiCl は低濃度で Li^+ のイオン毒性が評価できるため、高浸透圧ストレスの影響を抑えることができるのである (Serrano, 1996)。また、植物の塩ストレス耐性は、培地中の Ca^{2+} 濃度と正の相関関係があり、植物の耐塩性は培地中の Ca^{2+} 濃度が増加するほど向上する (LaHaye and Epstein, 1969)。つまり、培地中の Ca^{2+} 濃度を下げることで、植物の塩ストレス感受性を高めることができるので、高浸透圧ストレスの影響を抑えた低濃度の塩によるイオン毒性の評価が可能となる。よって、塩ストレス下のタバコ培養細胞のイオン毒性に対する耐性を評価するために、様々な濃度の LiCl を添加した改変 LS 培地中の CaCl_2 濃度を低下させた条件でのタバコ培養細胞の生育を調べた。

第 11 項 アグロバクテリウムの形質転換

アグロバクテリウムの形質転換方法は、第 2 章第 9 項で示した。

第 12 項 タバコ培養細胞の形質転換

タバコ培養細胞の形質転換方法は、第 2 章第 10 項で示した。

第 13 項 ゲノム PCR による遺伝子導入の確認

形質転換タバコ培養細胞の遺伝子導入の確認方法は、第 2 章第 11 項で示した。ただし、ゲノム PCR に用いたプライマーセットは、*ENAI* 遺伝子全長を特異的に増幅する ENA1-F および ENA1-R を使用した。

第 14 項 タバコ培養細胞からの RNA 単離

ノザン解析に用いるためのタバコ培養細胞からの RNA 単離方法は、第 2 章第 12 項で示した。

RT-PCR に用いるための RNA 単離は、AGPC (acid guanidinium-phenol-chloroform) 法に従った。まず、使用するプラスチック製の器具はオートクレーブ (121°C, 40 min) により、それ以外の器具は乾熱処理 (180°C, 8 h) により RNase を除去した。約 0.2 g のタバコ培養細胞を 2 mL 遠心管に入れ、液体窒素中で凍らせた。これに GTC 溶液 (4 M guanidine thiocyanate, 0.5% sarcosyl, 0.1 M β -mercaptoethanol, 25 mM sodium citrate, pH 7.0) を 0.5 μ L 入れ、超音波破碎した後 50 μ L の 2 M 酢酸ナトリウムを加えた。さらに、平衡化酸性フェノールを 500 μ L 加え、クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1, v/v) を 100 μ L 加えて、氷上に 15 min 以上放置した後に遠心分離 (15000 rpm, 20 min, 4°C) した。上清を新しい 1.5 mL 遠心管に移し、500 μ L のイソプロピルアルコールを加えてよく混合し、25°C で 10 min 放置した後に遠心分離 (15000 rpm, 10 min, 4°C) した。沈殿を 300 μ L の GTC 溶液に溶解し、イソプロピルアルコール沈殿を行った後、100 μ L の DEPC 水に溶解した。必要に応じて DNase 処理を行い、反応後にフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。

第 15 項 DNA プロープの作製

ノザン解析用の DNA プロープの作製方法は、第 2 章第 13 項で示した。ただし、0.8 kb の *ENAI* 遺伝子の *SacI/KpnI* 断片をプロープとして用いた。

第 16 項 ノザン解析

ノザン解析の方法は、第 2 章第 14 項で示した。

第 17 項 RT-PCR 解析

RNA の逆転写反応は、*Ampli Taq* DNA polymerase kit (Perkin Elmer 社) を用い、添付のプロトコールに従って行った。そして、調製した cDNA を鋳型とし、ENA1-F および ENA1-R のプライマーセットを用いた PCR を行った。この PCR は、変性反応を 94°C で 1 min 行った後、変性反応を 98°C で 20 s、アニーリングおよび伸長反応 68°C で 3 min で 30 サイクル繰り返して行い、最後に伸長反応を 72°C で 10 min 行った。

第 18 項 HA エピトープカセットの作製

全長 9 aa (YPYDVPDYA) の HA (influenza virus hemagglutinin) エピトープ (Wilson *et al.*, 1984) をグリシン (G) リンカーを間に挟んで 3 回繰り返した 3HA エピトープカセットを設計し、2 組の相補鎖となる 4 種類の一本鎖の合成オリゴヌクレオチド (3HA1-U, sense, 5'-TCGAGGGTTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCCGGTTACCCATACGA-3'; 3HA1-B, antisense, 5'-CACGTCGTATGGGTAACCGGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAACCC-3'; 3HA2-U, sense, 5'-CGTGCCAGACTACGCCGGTTACCCATACGACGTGCCAGACTACGCCGGTC-3'; 3HA2-B, antisense, 5'-TCGAGACCGGCGTAGTCTGGCACGTCGTATGGGTAACCGGCGTAGTCTGG-3') を 2 組別々にアニーリングした (3HA1-U/B および 3HA2-U/B)。二本鎖となった 2 種類のアニーリング産物を T4 DNA polynucleotide kinase でそれぞれリン酸化した後、これら 2 種類の二本鎖オリゴヌクレオチドを混合し、T4 DNA ligase で連結した。目的の 3HA 断片を *Xho*I で切り出した後、pBluescriptII SK- の *Xho*I 部位に挿入し、3HA エピトープカセットプラスミド pSK::3HA を構築した。そして、塩基配列を決定し、pSK::3HA の挿入 DNA 断片が目的の 3HA エピトープカセットであることを確認した。

第 19 項 塩基配列の決定

クローニングベクター pBluescriptII SK- へ挿入した DNA 断片の塩基配列の決定方法は、第 2 章第 7 項で示した。

第 20 項 HA エピトープ融合 *Ena1p* の作製

Ena1p の C 末端に 3HA エピトープカセットを挿入するために、PCR によって *ENA1* 遺伝子に変異を導入し、*ENA1* 遺伝子の終止コドンの直前に *Sal*I 切断部位を、終止コドンの直後に *Xho*I 切断部位を付加した *ENA1_{S-X}* 遺伝子を設計した。この PCR は、pYES2::*ENA1* を鋳型 DNA とし、フォワードプライマーとしては ENA1-F を、リバープライマーとしては ENA1_{S-X}-R (5'-CCGCTC-GAGTCAGTCGACTTGTTTAATAACCAATATTAACCTTCTGTATGGATTGTAGTAG-3')

を用いて行った。また、PCR は、変性反応を 94°C で 1 min 行った後、変性反応を 98°C で 20 s、アニーリングおよび伸長反応 68°C で 3 min で 30 サイクル繰り返して行い、最後に伸長反応を 72°C で 10 min 行った。そして、約 3.3 kb の *ENA1_{S-X}* 遺伝子の増幅 DNA 断片を得た。次に、*ENA1_{S-X}* 遺伝子の増幅 DNA 断片を *KpnI/XhoI* で切断し、約 2.1 kb の *KpnI/XhoI ENA1_{S-X}* 遺伝子部分断片を得た。そして、pYES2::*ENA1* を *KpnI/XhoI* で切断して約 2.1 kb の *KpnI/XhoI ENA1* 遺伝子部分断片を除き、*KpnI/XhoI ENA1_{S-X}* 遺伝子部分断片と置換することによって、pYES2::*ENA1_{S-X}* を構築した。そして、酵母の *ENA1-4* 遺伝子欠損変異株 (*S. cerevisiae* G19 株) を用いた機能的相補性試験を行い、Ena1p の C 末端に *SalI* 切断部位由来の 2 aa (VD) が付加した Ena1p-VD をコードした *ENA1_{S-X}* 遺伝子が機能的に発現することを確認した。最後に、pSK::3HA を *XhoI* で切断して得た約 0.1 kb の *XhoI* 3HA エピトープカセット遺伝子断片を、pYES2::*ENA1_{S-X}* の *SalI* 部位に挿入して、pYES2::*ENA1-3HA* を構築した。そして、pYES2::*ENA1-3HA* の制限酵素処理断片の解析を行い、アガロースゲル電気泳動により、3HA エピトープカセット遺伝子のコピー数および挿入方向を確認をした。さらに、*S. cerevisiae* G19 株を用いた機能的相補性試験を行い、Ena1p の C 末端に *SalI/XhoI* 切断部位由来の 4 aa および G リンカーを間に挟んで 3 回繰り返した HA (下線) エピトープの 31 aa を合わせた計 35 aa (VEGYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGLD) を付加した Ena1p-3HA をコードした *ENA1-3HA* 遺伝子が機能的に発現することを確認した。

第 21 項 植物で *ENA1-3HA* 遺伝子を発現するためのバイナリープラスミドの構築

まず、バイナリーベクター pMSH1/2 を *HindIII* で切断して再連結することにより、ハイグロマイシンマーカ遺伝子カセットを除去し、バイナリーベクター pMS1/2 を構築した。そして、pYES2::*ENA1-3HA* の *NotI/XhoI ENA1-3HA* 遺伝子断片を pMS2 の *NotI/XhoI* 部位に連結し、バイナリープラスミド pMS::*ENA1-3HA* を構築した。また、対照として、pBI221 の *XbaI/SacI GUS* 遺伝子断片を pMS1 の *XbaI/SacI* 部位に連結し、バイナリープラスミド pMS::*GUS* を構築した。

第 22 項 酵母細胞からの膜画分の粗調製

ウエスタン解析に用いる酵母細胞の膜画分の粗調製は、基本的に Serrano の方法 (Serrano, 1988) に従った。あらかじめ 2 mL 遠心管に氷冷した 1 mL の TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) を入れ、その中に平板 YPG 培地上で増殖した酵母細胞を適量懸濁した。遠心分離 (2000 rpm, 3 min, 4°C) に

より集菌して上清を捨て、沈殿した細胞の 3 倍容の抽出バッファー (5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 25 mM DTT, 25 mM Tris-HCl, pH 8.5) に懸濁した。細胞懸濁液と等量のガラスビーズを加え、氷上に 1 min 静置した。ボルテックスミキサーの最大スピードでガラスビーズを含む細胞懸濁液を激しく 30 s 攪拌した後、直ちに氷上に戻して 1 min 静置した。この操作を 15 回繰り返して、細胞を破碎した。まず、ガラスビーズと破碎した細胞の不溶物を除くために遠心分離 (2000 rpm, 10 min, 4°C) し、上清を新しい 2 mL 遠心管に氷上で移した。さらに、この上清を遠心分離 (15000 rpm, 20 min, 4°C) して、膜画分の沈殿を得た。最後に、この膜画分の沈殿を 20-50 μ L の抽出バッファーに再懸濁して SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の試料とした。

第 23 項 タバコ培養細胞からの膜画分の粗調製

ウエスタン解析に用いるタバコ培養細胞の膜画分の粗調製は、基本的に Serrano の方法 (Serrano, 1984) に従った。タバコ培養細胞 (1 gFW 程度) を液体窒素を満した乳鉢に入れ、乳棒で粉末状になるまで細胞をすりつぶした。次に、粉碎した細胞を氷冷した 1 mL の抽出バッファー (290 mM sucrose, 25 mM EDTA, 76 mM β -mercaptoethanol, 2 mM PMSF, 250 mM Tris-HCl, pH 8.5) の入った 2 mL 遠心管に移し、ボルテックスミキサーの最大スピードで細胞懸濁液を激しく 30 s 攪拌した後、直ちに氷上に戻して 1 min 静置した。この操作を 5 回繰り返して、破碎した細胞が均一になるように懸濁した。まず、破碎した細胞の不溶物を除くために遠心分離 (2000 rpm, 10 min, 4°C) し、上清を新しい 2 mL 遠心管に氷上で移した。さらに、この上清を遠心分離 (15000 rpm, 20 min, 4°C) して、膜画分の沈殿を得た。最後に、この膜画分の沈殿を 20-50 μ L の抽出バッファーに再懸濁して SDS-PAGE の試料とした。

第 24 項 ウエスタン解析

SDS-PAGE は、Laemmli の方法 (Laemmli, 1970) に従った。SDS-PAGE の試料は、等量の 2x サンプルバッファー (4% (w/v) SDS, 20% (w/v) glycerol, 0.05% (w/v) bromophenol blue, 300 mM β -mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8) と混合し、90°C で 2 min 熱処理した。そして、7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを 2 つ作製し、熱処理後の試料を各 SDS-ポリアクリルアミドゲルのウェルに同様に注入した。そして、これらの SDS-ポリアクリルアミドゲルを 30 mA の定電流で同時に電気泳動した。泳動後、一方の SDS-ポリアクリルアミドゲルは、CCB (Coomassie Brilliant Blue R-250) 染色を行い、分離したタンパク質を可視化した。そして、もう一方の SDS-ポリアクリルアミドゲルは、ウエスタン解析に用いた。ウエスタン解析は、Towbin らの方法 (Towbin *et al.*, 1979) に従った。

SDS-PAGE 後のゲルを転写バッファー (48 mM Tris-HCl, pH 8.3, 39 mM glycine, 20% methanol, 0.037% SDS) 中で 15 min 平衡化した後、セミドライ型の平板転写装置 (NA-1512; Nihon Eido 社) を用いて、転写バッファー中で 1 mA/cm² の定電流で 1 h 通電し、タンパク質を PVDF メンブレン (Hybond-P; Amersham 社) 上に転写した。転写後、メンブレンを TBST (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05% Tween 20) で洗い、次にブロッキング溶液 (3% Skim milk in TBST) に浸して 25°C で 1 h ブロッキングを行った。そして、メンブレンを一次抗体 (rat anti-HA High Affinity (clone 3F10), 1:1000; Boehringer Mannheim 社) を添加したブロッキング溶液中で 25°C で 1 h 処理した。一次抗体処理したメンブレンをブロッキング溶液中で 5 min 洗浄する作業を 3 回繰り返した。洗浄後、二次抗体 (goat anti-rat IgG (H+L) alkaline phosphatase conjugate, 1:8000; Promega 社) を添加したブロッキング溶液中で 25°C で 1 h 処理した。二次抗体処理したメンブレンを TBST で 5 min 洗浄する作業を 3 回繰り返した。洗浄後、15 mL の AP バッファー (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) に 100 μL の NBT 溶液 (0.017% (w/v) nitro blue tetrazolium, 0.23% (v/v) *N,N*-dimethylformamide) および 50 μL の BCIP 溶液 (5% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate *p*-toluidine salt in *N,N*-dimethylformamide) を添加したアルカリフォスファターゼ発色溶液に浸して 1-15 min 反応させ、最後にメンブレンを蒸留水で洗浄した。

第 25 項 共焦点レーザー顕微鏡によるタバコ培養細胞の観察

タバコ培養細胞の蛍光抗体染色は、Banjoko と Trelease の方法 (Banjoko and Trelease, 1995) に従った。タバコ培養細胞 (細胞容で 250 μL 程度) を 2 mL 遠心管に採取し、1 mL の PBS (phosphate-buffered saline; 137 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄) で洗浄し、遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25°C) した。上清を除いた後、1 mL の固定液 (4% formaldehyde (made from paraformaldehyde) in PBS) を加えて細胞を懸濁し、25°C で 1 h 静置した。固定した細胞を遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25°C) して上清を除いた後、1 mL の PBS を加えて 3 回洗浄した。洗浄後、1 mL の酵素液 (0.1% (w/v) pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical 社) in PBS) を加えて混合し、30°C で 2 h 静置した。遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25°C) して上清を除いた後、1 mL の PBS を加えて 3 回洗浄した。洗浄後、1.25 mL の界面活性剤液 (0.3% Triton X-100 in PBS) を加えて混合し、25°C で 15 min 静置して、細胞膜の透過性を高めた。遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25°C) して上清を除いた後、1 mL の PBS を加えて 3 回洗浄した。洗浄後、1 mL の PBS-BSA (1% BSA in PBS) を加えて混合し、25°C で 30 min 静置した。遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25°C) して上清を除いた後、1 mL の一次

抗体 (rat anti-HA High Affinity (clone 3F10), 1:200; Boehringer Mannheim 社) を添加した PBS-BSA を加えて混合し、25°C で 1 h 以上静置した。遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25°C) して上清を除いた後、1 mL の PBS-BSA を加えて 3 回以上洗浄した。洗浄後、1 mL の蛍光標識二次抗体 (Alexa Fluor™ 488 goat anti-rat IgG (H+L) conjugate, 1:200; Molecular Probes 社) を添加した PBS-BSA を加えて混合し、25°C で 1-2 h 静置した。遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25°C) して上清を除いた後、1 mL の PBS を加えて 3 回以上洗浄した。洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510; Zeiss 社) によって細胞を観察した。

第3節 結果

第1項 酵母 *ENA1* 遺伝子のゲノム PCR による単離

簡易ガラスビーズ法により抽出した酵母 (*S. cerevisiae*) のゲノム DNA を鋳型とし、*ENA1* 遺伝子全長を特異的に増幅するプライマーセットを設計してゲノム PCR を行った。その結果、予想通りの長さである約 3.3 kb の *ENA1* 遺伝子の増幅断片を得た。そして、ゲノム PCR により増幅した *ENA1* 遺伝子をバイナリーベクター pMSH2 の CaMV35S プロモーターの支配下に挿入したバイナリープラスミド pMSH2::*ENA1* を構築した (Fig. 3-4)。同時に、酵母用発現ベクター pYES2 の *GAL1* プロモーターの支配下に *ENA1* 遺伝子を挿入したプラスミド pYES2::*ENA1* を構築した (Fig. 3-5A)。そして、pYES2::*ENA1* を導入した *S. cerevisiae* G19 株 ($\Delta ena1-4$) を用いて、塩ストレス感受性を指標とした機能的相補性試験を行い、ゲノム PCR によって単離した *ENA1* 遺伝子が機能的に発現することを確認した (Fig. 3-5B)。

第2項 タバコ培養細胞の LiCl 感受性

タバコ培養細胞 (BY2 細胞) における *Ena1p* の機能を解析するには、塩ストレスが細胞に及ぼす影響のうち、高浸透圧ストレスによる影響を抑えて、イオン毒性が特異的に及ぼす細胞への影響を評価することが重要である。そこで本研究では、BY2 細胞のイオン毒性に対する感受性を評価するために、塩ストレスとして、NaCl よりイオン毒性が数倍強い LiCl を使用することにした。なぜなら、LiCl は低濃度で細胞に対して毒性を示すので、NaCl では無視できない高浸透圧ストレスの影響を抑えることができるからである (Serrano, 1996)。また、植物細胞外の Ca^{2+} 濃度が低くなると、植物細胞の塩ストレス感受性は増大することが知られている (LaHaye and Epstein, 1969)。よって、細胞外部の Ca^{2+} 濃度を低くすることで、より低濃度の LiCl でイオン毒性に対する細胞の感受性を評価できると考えられた。そこで、形質転換していない野生型 BY2 細胞の LiCl 感受性と細胞外の Ca^{2+} 濃度の関係を調べ、BY2 細胞が LiCl 感受性を示す平板培養条件を検討した。その結果、1 mM $CaCl_2$ および 120 mM LiCl を含んだ改変 LS 平板培地上で BY2 細胞はほとんど増殖できないことが示された (Fig. 3-6)。よって、この培地条件下での増殖を調べることにより BY2 細胞における *Ena1p* の機能を解析することができると判断した。

第3項 酵母 *ENA1* 遺伝子を導入した形質転換タバコ培養細胞の作製

まず、エレクトロポレーション法により、アグロバクテリウム (*A. tumefaciens*

EHA105 株)へバイナリープラスミド pMSH2::ENAI を導入し、カナマイシンおよびハイグロマイシンに対して耐性を示す形質転換アグロバクテリウム EHA105/pMSH2::ENAI を選抜した。続いて、BY2 細胞にアグロバクテリウム EHA105/pMSH2::ENAI を感染させ、ENAI 遺伝子を BY2 細胞へ導入した。そして、カナマイシン耐性およびハイグロマイシン耐性の表現型を示した形質転換 BY2 細胞を 42 クローン選抜した。

そして、選抜した 42 クローンを 1 mM CaCl₂ および 120 mM LiCl を含んだ改変 LS 平板培地上へ移植して 4 週間培養し、顕著な LiCl 耐性を示すクローンを再選抜した。その結果、全 42 クローンのうち、顕著な LiCl 耐性を示した 2 クローン (ENAI-1, -2) を得た (Fig. 3-7A)。対照として、GUS 遺伝子を導入した形質転換 BY2 細胞 50 クローンについても、同様に 1 mM CaCl₂ および 120 mM LiCl を含んだ改変 LS 平板培地上へ移植して 4 週間培養したが、顕著な LiCl 耐性を示すクローンは得られなかった (Fig. 3-7B)。平板培地上で LiCl 耐性を示した 2 クローン (ENAI-1, -2) および LiCl 耐性を示さなかった 1 クローン (ENAI-3) について、ゲノム PCR によって ENAI 遺伝子の導入を確認した (Fig. 3-8)。

第 4 項 形質転換タバコ培養細胞内での ENAI 遺伝子の発現

まず、得られた ENAI クローンについて、ATA 法により調製した全 RNA を用いて、ENAI 遺伝子の部分配列をプローブとしたノザン解析を行ったが、シグナルを検出することができなかった (data not shown)。このことから、ENAI クローンでの ENAI 遺伝子の発現量が非常に少ないことが予想された。そこで、AGPC 法により ENAI クローンから全 RNA を調製し、ENAI 遺伝子全長を増幅するプライマーセットを用いた RT-PCR を行った。その結果、得られた ENAI クローンにおいて、ENAI 遺伝子が発現していることを確認した (Fig. 3-9)。

第 5 項 形質転換タバコ培養細胞の塩ストレス耐性

得られた ENAI クローンを液体培養系に移し、塩ストレス下での増殖を調べた。その結果、1 mM CaCl₂ および 120 mM LiCl を含んだ改変 LS 液体培地中で 2 週間培養すると、対照の GUS クローンは全く増殖しなかったが、選抜した ENAI-1 クローンは増殖し、塩ストレス耐性を示した (Fig. 3-10)。同様に、1 mM CaCl₂ および 200 mM NaCl を含んだ改変 LS 液体培地中で 2 週間培養すると、対照の GUS クローンは全く増殖しなかったが、選抜した ENAI-1 クローンは増殖し、塩ストレス耐性を示した (data not shown)。ただし、平板培地上で LiCl 耐性を示していた ENAI-2 クローンは、LiCl ストレスの非存在下で継代培養を続けている間に、LiCl 耐性を示さなくなった。

第 6 項 HA エピトープ融合 Enalp タンパク質の作製

酵母の Enalp が BY2 細胞で機能するためには、生成した Enalp が BY2 細胞の原形質膜上に局在することが重要である。タンパク質の局在性を調べるための有効な手法として、直接的に目的タンパク質の抗体を作製するのではなく、目的タンパク質に短いポリペプチドからなるエピトープを融合したタンパク質を作製し、目的タンパク質ではなくエピトープに特異的な抗体を利用するエピトープタグgingが挙げられる。これまでに、酵母細胞内で Enalp の C 末端に 1 個の HA (hemagglutinin) エピトープを融合した Enalp-HA は、Enalp と同様に Na^+/Li^+ -ATPase として機能し、原形質膜上に局在することが示されており、Enalp の解析に HA エピトープが利用できることが明らかにされた (Wieland *et al.*, 1995)。

そこで本研究では、BY2 細胞内での Enalp の生成と局在を解析するために、HA エピトープを利用することにした。本章第 4 項の ENA1 クローンにおける ENA1 遺伝子の発現解析の結果から、BY2 細胞内で生成している Enalp のタンパク質量が少ないことが予想されたので、HA エピトープを融合した Enalp の検出感度を向上させるために、HA エピトープを 3 回繰り返した 3HA エピトープカセットを作製した (Fig. 3-11A)。そして、Enalp の C 末端に 3 個の HA エピトープを融合した Enalp-3HA (Fig. 3-11B) をコードした ENA1-3HA 遺伝子を設計した。

まず、酵母細胞内で Enalp-3HA が生成し、機能しているのかを調べるため、pYES2::ENA1-3HA を構築し (Fig. 3-12)、*S. cerevisiae* G19 株 ($\Delta enal-4$) へ導入した。その結果、酵母細胞内で Enalp-3HA は、Enalp と同様に機能することが示された (Table 3-1)。さらに、ガラスビーズ法によって、平板 YPG 培地上で増殖した酵母細胞から膜画分を粗調製し、SDS-PAGE および anti-HA 抗体によるウエスタン解析を行った。その結果、pYES2::ENA1-3HA を導入したクローンでのみ、酵母細胞内で生成した Enalp-3HA のシグナルが検出された (Fig. 3-13)。

第 7 項 HA エピトープを融合した ENA1-3HA 遺伝子を導入した形質転換タバコ培養細胞の作製

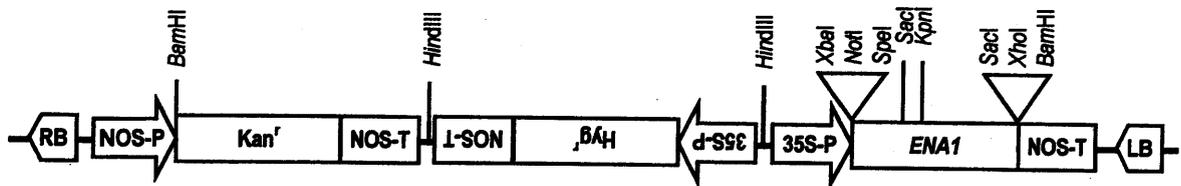
BY2 細胞内における Enalp-3HA の生成および局在を調べるため、バイナリプラスミド pMS2::ENA1-3HA を構築し (Fig. 3-14)、エレクトロポレーション法により、アグロバクテリウム (*A. tumefaciens* EHA105 株) へ導入し、カナマイシンに耐性を示す形質転換アグロバクテリウム EHA105/pMS2::ENA1-3HA を選抜した。続いて、BY2 細胞にアグロバクテリウム EHA105/pMS2::ENA1-3HA

を感染させ、ENAI-3HA 遺伝子を BY2 細胞へ導入した。そして、カナマイシン耐性の表現型を示した形質転換 BY2 細胞を 16 クローン選抜した。

さらに、任意に選択した形質転換 BY2 細胞 6 クローンから膜画分を粗調製し、SDS-PAGE および anti-HA 抗体によるウエスタン解析を行った。その結果、ENAI-3HA 遺伝子を導入したクローンでのみ、対照の GUS 遺伝子を導入したクローンには存在しない BY2 細胞内で生成した Ena1p-3HA のシグナルが検出された (Fig. 3-15)。

第 8 項 タバコ培養細胞における Ena1p-3HA の局在性

形質転換 BY2 細胞内で生成した Ena1p-3HA の細胞内局在性を調べるため、間接蛍光抗体法によって形質転換 BY2 細胞を蛍光抗体染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、蛍光抗体染色した形質転換 BY2 細胞を観察したところ、対照の GUS クローンは全体的に薄く蛍光を発しており、若干核や原形質膜にシグナルが検出されたのに対し、ENAI-3HA クローンでは強い蛍光により原形質膜の輪郭がはっきりと認識できた (Fig. 3-16A)。このことにより、BY2 細胞内で生成した Ena1p-3HA は原形質膜に局在し、毒性カチオン Na^+/Li^+ を細胞外へ排出するポンプとして機能していることが示唆された。



pMSH2::ENA1

Figure 3-4. Structure of the plasmid pMSH2::ENA1 for expressing the yeast *ENA1* gene in BY2 cells. Abbreviations: Kan^r, kanamycin-resistance gene (neomycin phosphotransferase gene); Hyg^r, hygromycin-resistance gene (hygromycin phosphotransferase gene); 35S-P, 35S promoter of cauliflower mosaic virus; NOS-P, nopaline synthase promoter; NOS-T, nopaline synthase terminator; LB, left border; RB, right border.

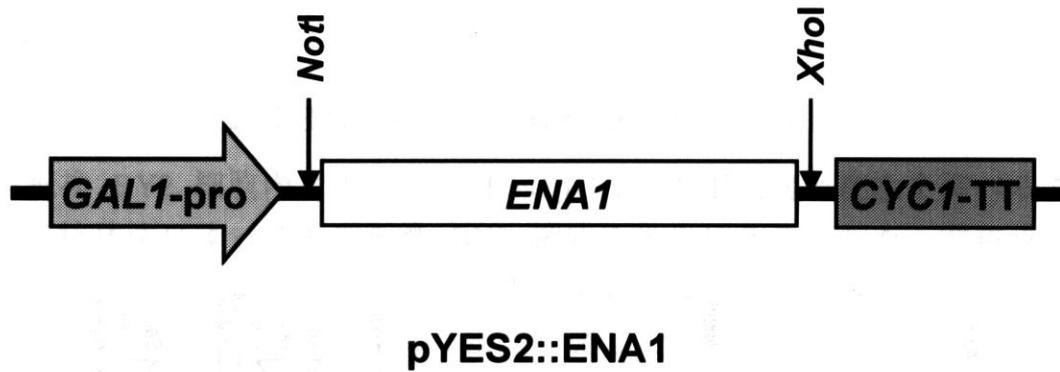
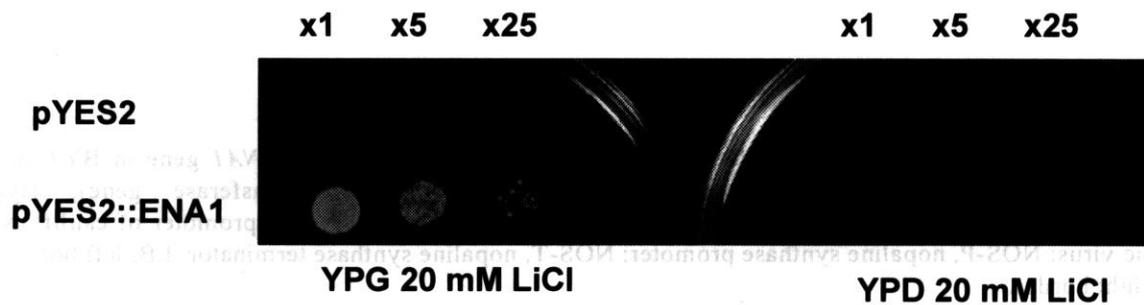
A**B**

Figure 3-5. Expression of *ENA1* gene in yeast *ena* mutant. A, Structure of the plasmid pYES2::ENA1 for expression of the *ENA1* gene cloned by yeast genomic PCR. Abbreviations: *GAL1-pro*, *GAL1* promoter; *CYC1-TT*, *CYC1* transcription terminator. B, Growth of *ena* mutant harboring the vector pYES2 or the plasmid pYES2::ENA1 in the presence of Li⁺ as a toxic cation analog of Na⁺. Five μ L of 5-fold serial dilutions of each strain were spotted on YPD and YPG media with 20 mM LiCl and incubated at 30°C for 5 d.

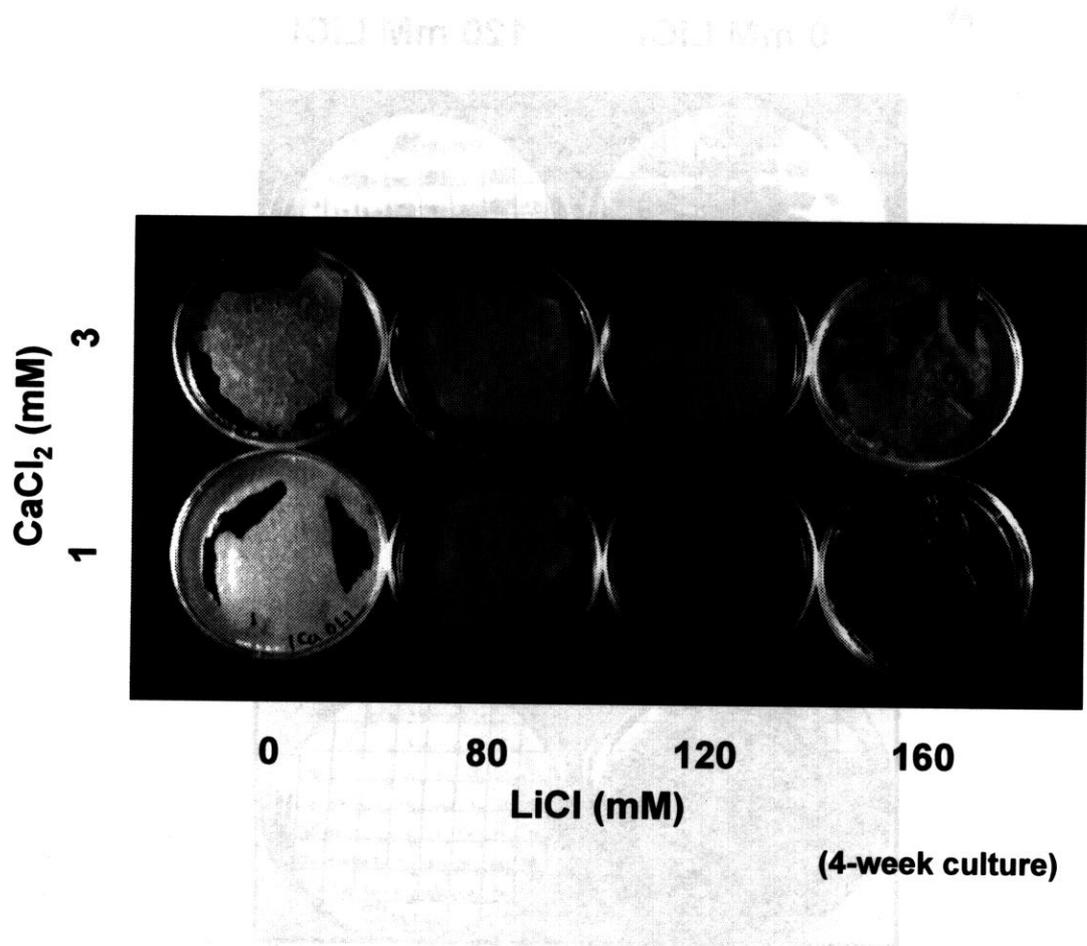
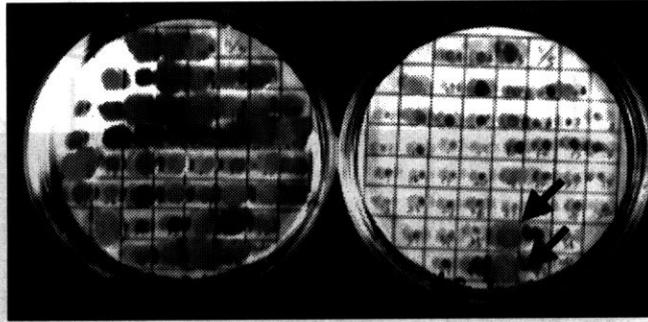
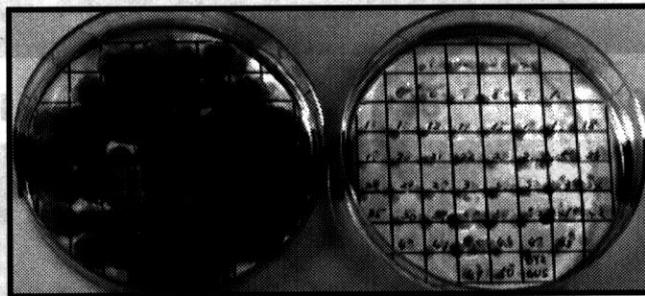


Figure 3-6. Effect of Ca²⁺ on Li⁺ sensitivity of BY2 cells. Exponentially growing BY2 cells were transferred onto LiCl stress media containing 1 mM or 3 mM CaCl₂, and grown at 25°C for 4 weeks.

A 0 mM LiCl 120 mM LiCl



B 0 mM LiCl 120 mM LiCl



**Modified LS medium (1 mM CaCl₂)
4 weeks after transfer**

Figure 3-7. Growth of the BY2 cells transformed with *ENA1* gene (A) and *GUS* gene (B) on the modified LS medium (1 mM CaCl₂) with or without 120 mM LiCl. The kanamycin-resistant cali were transferred on the LiCl stress medium and grown at 25°C for 4 weeks. Arrows indicate the LiCl tolerant clones.

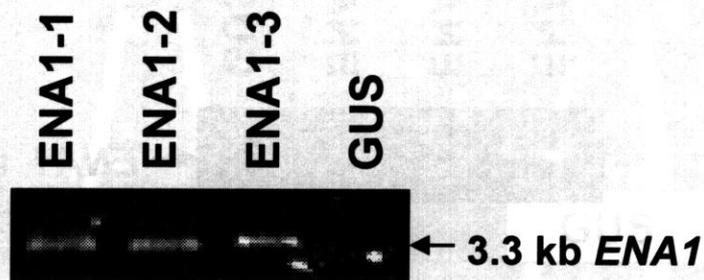


Figure 3-8. Genomic PCR using the ENA-1 F/R primer pair to confirm the existence of the *ENA1* gene in the transgenic BY2 cells with the kanamycin-resistant and LiCl tolerant phenotype. ENA1-1 and ENA1-2, the transgenic BY2 cells with kanamycin-resistant and LiCl tolerant phenotype; ENA1-3, transgenic BY2 cells with kanamycin-resistant and LiCl sensitive phenotype; GUS, BY2 expressing *GUS* gene from 35S promoter (negative control).

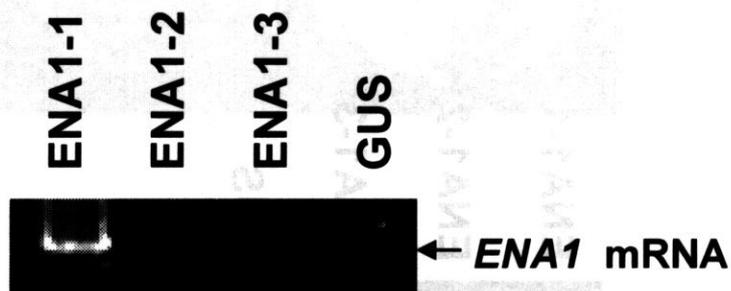
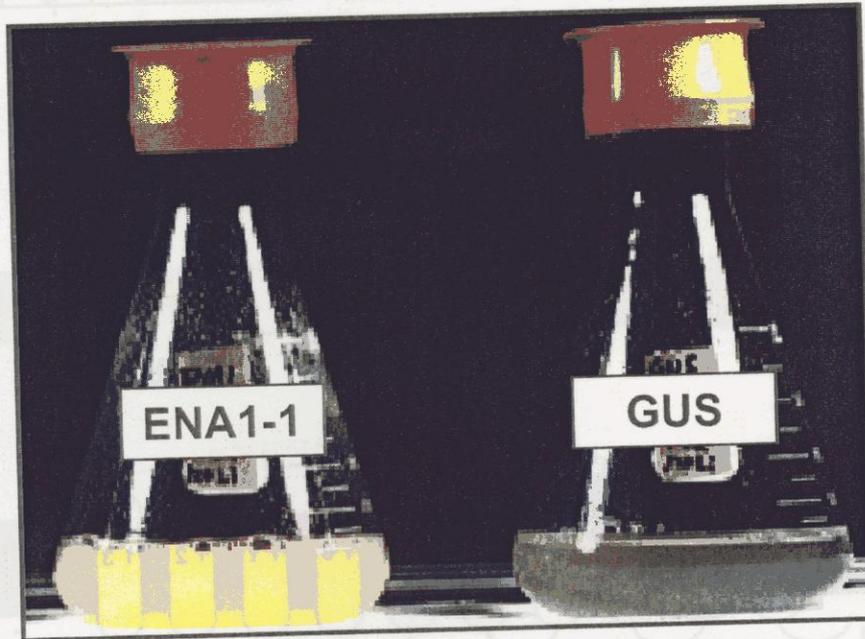


Figure 3-9. RT-PCR of total RNA from the transgenic BY2 cells with *ENA1* gene using the ENA1-F/R primer pair. ENA1-1 and ENA1-2, the transgenic BY2 cells with kanamycin-resistant and LiCl tolerant phenotype; ENA1-3, transgenic BY2 cells with kanamycin-resistant and LiCl sensitive phenotype; GUS, BY2 expressing *GUS* gene from 35S promoter (negative control).

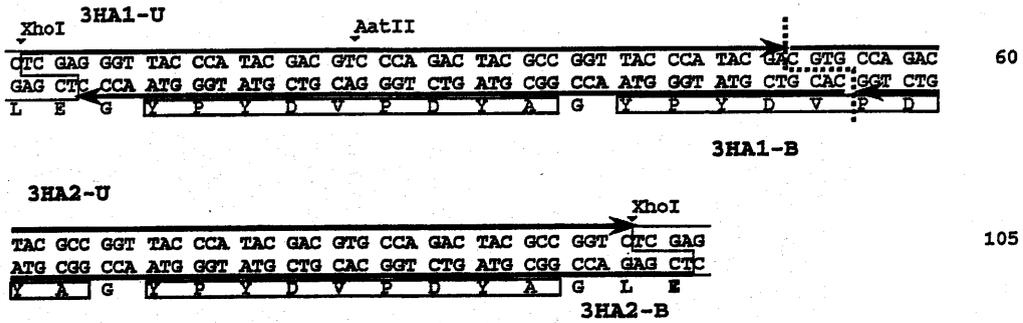
2 weeks after inoculation



Modified LS medium
(1 mM CaCl_2 , 120 mM LiCl)

Figure 3-10. Growth of the transgenic BY2 cells expressing *ENA1* gene in the modified LS medium (1 mM CaCl_2) with 120 mM LiCl. Exponentially growing transgenic BY2 cells were transferred in the LiCl stress medium and grown at 25°C for 2 weeks. Growth of 35S-GUS BY2 cells was used as a negative control.

A



B

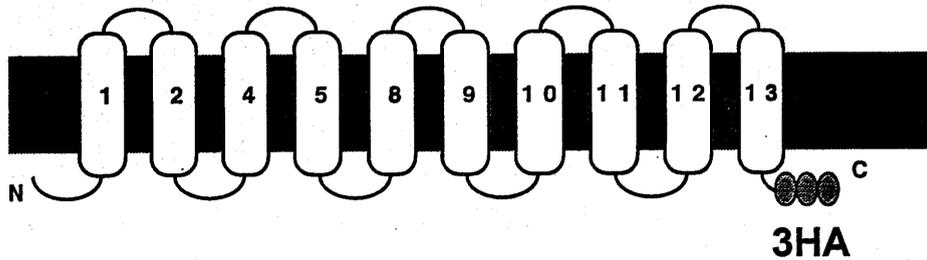


Figure 3-11. Construction of a triple HA cassette. A, Nucleotide and amino acid sequences of triple HA cassette. Each arrow represents individual synthetic oligonucleotide used in annealing reaction. Box indicates the HA epitope sequence. Names of the oligonucleotides are shown over or below the arrows. B, Graphic representation of the HA-epitope-tagged Enalp (Enalp-3HA). The putative trans-membrane domain no. 1-13 of the Enalp and the three HA are shown.

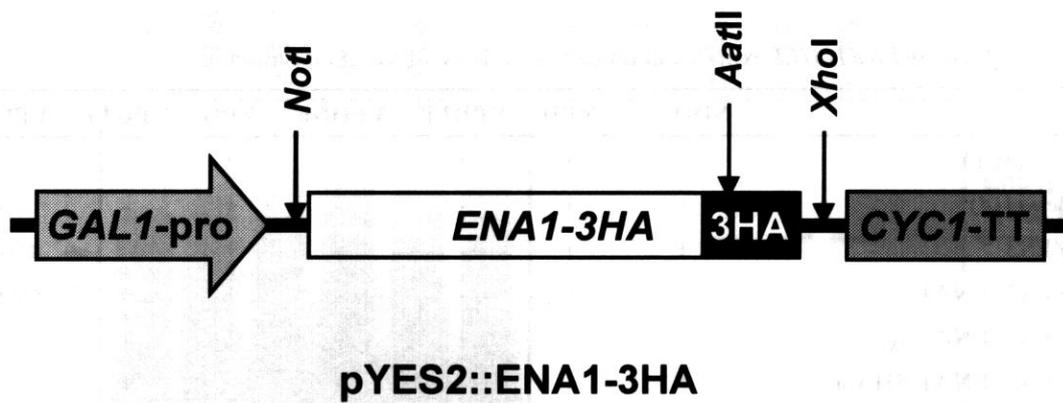


Figure 3-12. Structure of the plasmid pYES2::ENA1-3HA. Abbreviations: *GAL1*-pro, *GAL1* promoter; *CYC1*-TT, *CYC1* transcription terminator, 3HA, triple HA cassette.

Table 3-2. Effects of *ENA1-3HA* expression on salt sensitivity of yeast *ena* mutants.

Clone	SD-Ura	YPD	YPLi ^a	YPDNa ^b	YPG	YPLi ^c	YPGNa ^d
W303.1B (WT)	-	+	+	+	+	+	+
G19 ($\Delta ena1-4$)	-	+	-	-	+	-	-
G19/pYES2	+	+	-	-	+	-	-
G19/pYES2:: <i>ENA1</i>	+	+	-	-	+	+	+
G19/pYES2:: <i>ENA1</i> _{s,x}	+	+	-	-	+	+	+
G19/pYES2:: <i>ENA1-3HA.a</i>	+	+	-	-	+	+	+
G19/pYES2:: <i>ENA1-3HA.b</i>	+	+	-	-	+	+	+
G19/pYES2:: <i>ENA1-3HA.c</i>	+	+	-	-	+	+	+
G19/pYES2:: <i>ENA1-3HA.d</i>	+	+	-	-	+	+	+

^a20 mM LiCl in YPD. ^b300 mM NaCl in YPD. ^c20 mM LiCl in YPG. ^d300 mM NaCl in YPG.
 All clones were grown for 5 d at 30°C (+, grow; -, not grow).

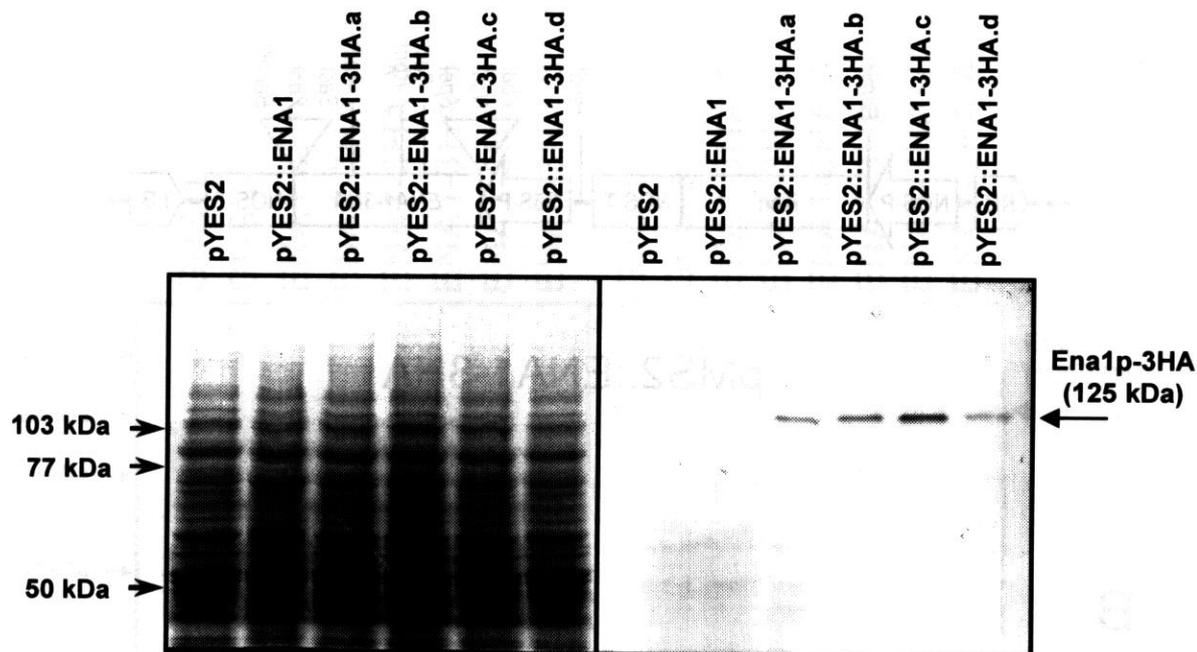


Figure 3-13. Existence of the Ena1p-3HA fusion protein in crude membrane of yeast cells. Crude membrane of yeast *ena* mutant G19 strain transformed with pYES2, pYES2::ENA1, or pYES2::ENA1-3HA were analyzed by SDS-PAGE (left panel) and by Western blot using anti-HA antibody (right panel).

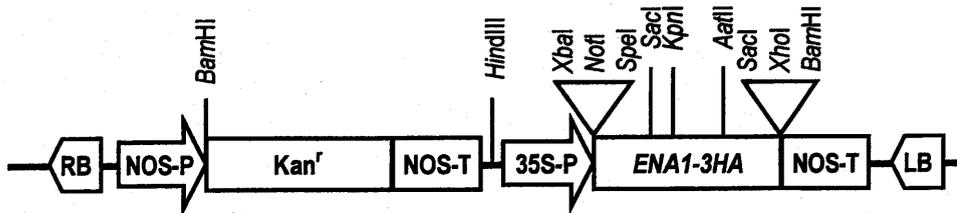
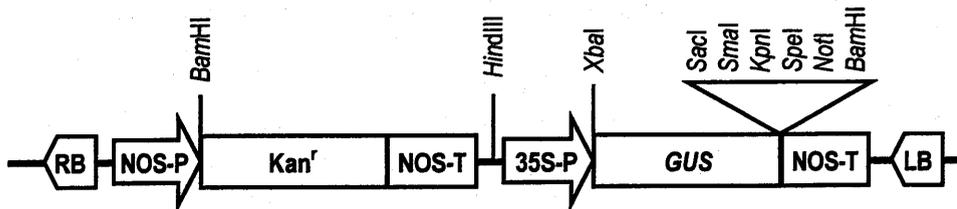
A**pMS2::ENA1-3HA****B****pMS1::GUS**

Figure 3-14. Structure of the plasmid pMS2::ENA1-3HA for production of the Ena1p-3HA fusion protein in BY2 cells. A, The plasmid pMS2::ENA1-3HA for expression of the HA-epitope-tagged Ena1p B, The plasmid pMS1::GUS as a control. Abbreviations: Kan^r, kanamycin-resistance gene (neomycin phosphotransferase gene); 35S-P, 35S promoter of cauliflower mosaic virus; NOS-P, nopaline synthase promoter; NOS-T, nopaline synthase terminator; LB, left border; RB, right border.

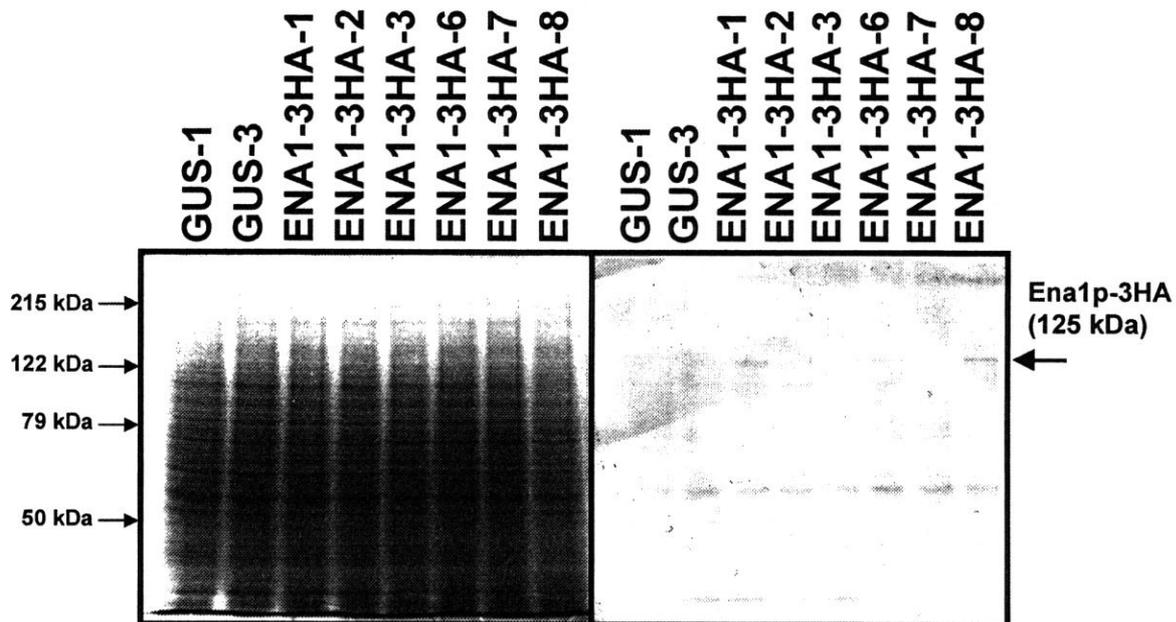


Figure 3-15. Existence of the Ena1p-3HA fusion protein in crude membrane of the transgenic BY2 cells. Crude membrane of BY2 cells transformed with pMS2::ENA1-3HA or pMS1::GUS were analyzed by SDS-PAGE (left panel) and by Western blot using anti-HA antibody (right panel).

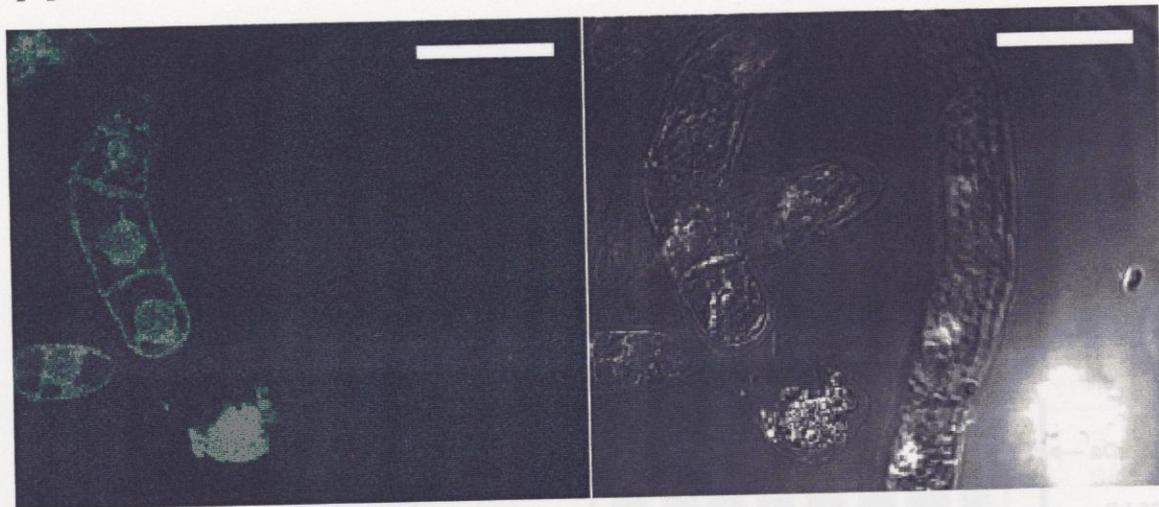
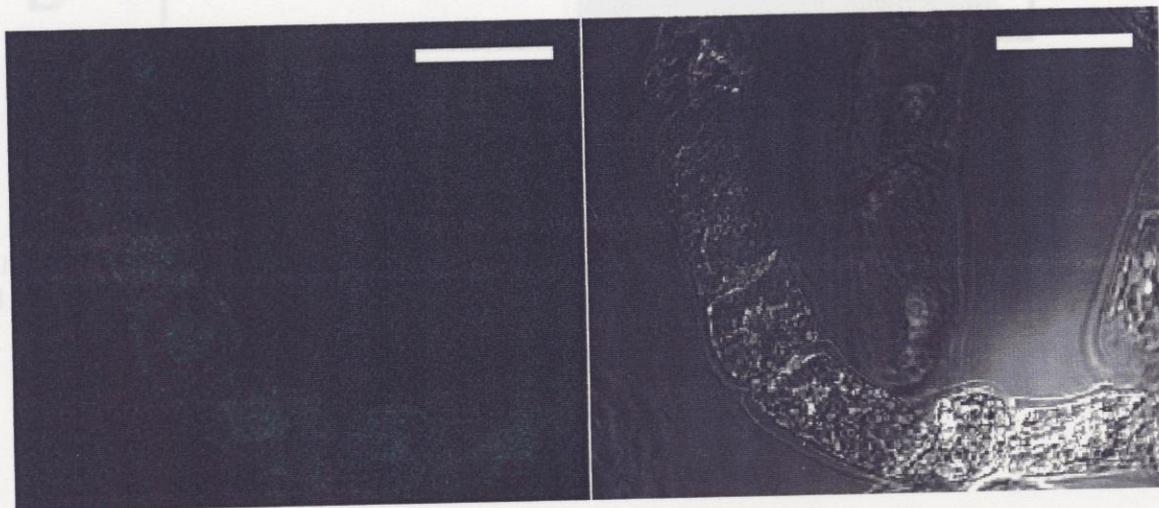
A**B**

Figure 3-14. Structure of the plasmid pMS2::ENALP-3HA for production of the Enalp-3HA fusion protein

Figure 3-16. Localization of HA-tagged Enalp at the plasma membrane of BY2 cells as detected by confocal microscopy. Enalp-3HA was visualized with rat anti-HA primary antibodies (3F10) and goat Alexa Fluor™ 488-conjugated anti-rat IgG secondary antibodies (left image). A, Confocal photomicrograph of transgenic BY2 cells expressing Enalp-3HA, which was localized to the plasma membrane. B, Confocal photomicrograph of transgenic BY2 cells expressing GUS as a control. White bar indicates 50 μ m. Each right image indicates phase-contrast photomicrograph of the BY2 cells.

第 4 節 考察

第 1 項 塩ストレスに特異的な Na^+ のイオン毒性

第 1 章で述べたように、これまで塩や乾燥などのストレスに対して植物に耐性を賦与するために、適合溶質の様々な機能に着目した研究が精力的に進められてきた。そして、適合溶質の生合成系を導入した植物の分子育種が、植物のストレス耐性を向上させる戦略として有効であることが示された。しかしながら、塩ストレスに特異的な Na^+ のイオン毒性は、適合溶質では解決され得ない問題であり、より高度な耐塩性を分子育種するためには、植物のイオンホメオスタシスを制御する機構について研究を進める必要がある。これまでに、植物のイオン輸送に関わる遺伝子が多数単離されてきたが、イオン毒性の原因となっている Na^+ のイオン輸送に関わるものが証明されているものは少なく、耐塩性を高めるために重要な Na^+ 排出に関わるイオン輸送分子はいまだに同定されていない。

そこで本研究では、耐塩性に関与するイオンホメオスタシス制御機構の研究が進んでいる、モデル真核生物の酵母 (*S. cerevisiae*) に着目し (Fig. 3-1)、酵母の耐塩性に最も重要なナトリウムポンプをコードした *ENA1* 遺伝子 (Fig. 3-2) を植物細胞で発現させ、塩ストレスに特異的な Na^+ のイオン毒性を抑えることによる、耐塩性植物の分子育種を試みた。

第 2 項 酵母 *ENA1* 遺伝子の単離

公開されている酵母ゲノムの全塩基配列情報から、*ENA1* 遺伝子はイントロンを持たない全長 3276 bp の遺伝子であることが明らかにされている (Fig. 3-2)。そこで本研究では、ゲノム PCR 法によって酵母ゲノムから *ENA1* 遺伝子を増幅し、単離した。ゲノム PCR によって単離した *ENA1* 遺伝子が機能的に発現することを確認するため、*ENA1-4* 遺伝子欠損変異酵母 G19 株を宿主とした機能的相補性試験を行った (Fig. 3-5)。大腸菌内で *ENA1* 遺伝子が発現すると生育阻害が引き起こされることから、*ENA1* 遺伝子を挿入した融合遺伝子の構築を行う際は、酵母 G19 株による機能的相補性試験を行うことが必要であると考えられた。

酵母は、モデル真核生物として、ヒトや植物で単離された遺伝子の機能を探るための道具として研究に利用されており、ヒトや植物の遺伝子を酵母で発現させる研究が盛んに行われている。しかしながら、公開されている酵母ゲノムの全塩基配列情報を遺伝子の相同性解析に利用するのみではなく、植物代謝工学的な視点で情報を解析することで、酵母の有用遺伝子を植物の分子育種に利用することも重要な戦略であると考えられる。

第 3 項 タバコ細胞内での *ENAI* 遺伝子の発現

本研究では、ゲノム PCR によって単離した酵母の *ENAI* 遺伝子を挿入したバイナリープラスミド pMSH2::*ENAI* を構築 (Fig. 3-4) し、アグロバクテリウム感染法により、*ENAI* 遺伝子をモデル植物細胞である BY2 細胞へ導入した。植物細胞内で構成的に強く発現する CaMV35S プロモーターの制御下に *ENAI* 遺伝子を連結したにも関わらず、得られた形質転換 BY2 細胞 (*ENAI* クローン) における *ENAI* mRNA の蓄積量は非常に少なく、RT-PCR によって検出される程度であった (Fig. 3-9)。このことから、BY2 細胞内で *ENAI* 遺伝子が高発現すると、大腸菌の場合と同様に、生育阻害が引き起こされることが予想された。この原因としては、膜に局在するタンパク質が過剰生産されることによる細胞膜機能の損傷、あるいはナトリウムポンプの過剰生成によるイオンホメオスタシス制御系の攪乱が考えられる。そう考えると、恒常的な発現をする CaMV35S プロモーターではなく、誘導可能なプロモーターによって *ENAI* 遺伝子の発現を制御することが重要であるといえるが、植物細胞で厳密な on-off 制御が可能な実用的な良いプロモーターは少ない。また、BY2 細胞内のイオンホメオスタシス制御系を攪乱しない最適な *ENAI* 遺伝子の発現量も不明であるため、形質転換 BY2 細胞のゲノム上に挿入された *ENAI* 遺伝子の位置効果による発現量のばらつきを利用することにした。そのため、多数の形質転換 BY2 細胞から、耐塩性を指標として優良 *ENAI* クローンの選抜を行う必要があるといえる。本研究では、全 42 クローン中 2 クローンが選抜されたが、統計的に実証するためには、さらに多数の形質転換体の選抜を行う必要がある。しかしながら、*ENAI* 遺伝子は変異を生じる可能性が高いので、*ENAI* mRNA の蓄積量だけで *Enalp* が機能していると判断するのは難しく、タンパク質レベルで *Enalp* を解析することが重要である。

第 4 項 タバコ培養細胞のイオン毒性

本研究では、特に塩によるイオン毒性に対する耐性を植物細胞に賦与することを目的としているため、塩による高浸透圧ストレスの影響を抑えて、イオン毒性の影響を明確に評価する必要がある。そこで、耐塩性の研究で塩といえば、一般に NaCl のことであるが、酵母におけるイオンホメオスタシス制御の研究では、Na⁺ のアナログとして Li⁺ が研究に用いられている。細胞に対する LiCl 毒性は NaCl の数倍であるので、高浸透圧ストレスの影響が少ない低濃度の LiCl を用いることにより、より明確なイオン毒性に対する耐性試験が可能となる (Serrano, 1996)。また、植物の耐塩性に関わるイオンホメオスタシス制御系では、セカンドメッセンジャーとして知られている Ca²⁺ による信号伝達系が重要な役

割を担っており (Liu and Zhu, 1998)、植物の耐塩性と培地中の Ca^{2+} 濃度には正の相関関係があることが示されている (LaHaye and Epstein, 1969)。

以上のことを踏まえて、BY2 細胞で明確なイオン毒性に対する耐性試験を行うための条件を検討した。高浸透圧ストレスの影響を極力抑えるため、塩として LiCl を使用し、さらに培地中の Ca^{2+} 濃度を低下させることで、細胞の塩感受性を増加させることにした。その結果、BY2 細胞は 120 mM LiCl および 1 mM CaCl_2 を含む改変 LS 平板培地上では生育できないことが示された (Fig. 3-6)。よって、この培養条件を用いて、ENA1 クローンの選抜を行うことにした。ここで示した結果は、イオンホメオスタシスに関連した植物体の塩ストレス応答と BY2 細胞のようなカサの塩ストレス応答は、ほぼ同様であることを示唆しており、BY2 細胞で得られた成果を植物体へ展開することの有効性を支持している。

第 5 項 形質転換タバコ培養細胞の塩ストレス耐性

本研究で、 Li^+ のイオン毒性に対して顕著な耐性を示した ENA1 クローンは、42 クローン中 2 クローン (4.8%) であった (Fig. 3-7A) が、対照とした GUS クローンでは、50 クローン全てが Li^+ のイオン毒性に対して感受性であった (Fig. 3-7B)。そして、耐塩性の 2 クローン (ENA1-1 and -2)、対照として塩感受性の 1 クローン (ENA1-3) および GUS クローン (GUS) を選抜した。平板培地上では、均一なストレス処理が困難であるため、これらのクローンはすべて液体培養の系に移して、さらに塩ストレス耐性を調べた。その結果、ENA1-1 クローンは継代を繰り返しても耐塩性の表現型を維持してしたが (Fig. 3-10)、ENA1-2 クローンは塩ストレスの無い条件下で継代を繰り返している間に耐塩性の表現型が消失した。RT-PCR では、ENA1-2 クローンと ENA1-3 クローンで同程度の微弱なシグナルが検出されていた (Fig. 3-9) ので、ENA1-2 クローンは誤って選抜されたクローンであるのかも知れない。あるいは、継代中に *ENA1* 遺伝子が発現していたクローンが淘汰された、もしくは *ENA1* 遺伝子に変異が生じたなどの原因が考えられる。得られた ENA1-1 クローンは、LiCl に加えて、NaCl に対しても耐性を示したことから、*ENA1* 遺伝子が BY2 細胞内で機能的に発現していることが示唆された。

第 6 項 タバコ培養細胞における *Enalp*-3HA の局在性

ENA1 クローンを用いた解析では、*ENA1* 遺伝子の発現と BY2 細胞の耐塩性の表現型から *ENA1* 遺伝子が BY2 細胞内で機能的に発現していることが示唆された。しかしながら、実際に *Enalp* が BY2 細胞で生成し、原形質膜に局在していることが示されれば、*ENA1* 遺伝子が BY2 細胞で機能していること

のより直接的な証拠となる。そこで本研究では、酵母において Enalp の C 末端に HA エピトープを融合しても、その機能と原形質膜への局在性に影響しない (Wieland *et al.*, 1995) ことから、BY2 細胞における Enalp の生成と局在性の解析に HA エピトープを利用することにした。特に、ENA1 クローンでは、ENA1 遺伝子の発現量が低かったことから、Enalp の生成量も少ないことが予想された。そこで、生成したタンパク質の検出感度を増大させるために、HA エピトープを 3 回繰り返して Enalp の C 末端に融合させた Enalp-3HA を用いて解析を行うことにした (Fig. 3-11)。まず、プラスミド pYES2::ENA1-3HA を構築し (Fig. 3-12)、酵母 G19 株に導入して機能的相補性試験を行って見たところ、Enalp-3HA が酵母細胞内で Na^+/Li^+ -ATPase として機能することが示された (Table 3-1)。また、ウエスタン解析によって、酵母細胞内で生成した Enalp-3HA は、anti-HA 抗体によって検出可能であり、膜画分に存在することが示された (Fig. 3-13)。このことから、Enalp を直接検出する代わりに、Enalp-3HA を用いて実験を進めることの有効性が示された。

そこで、バイナリープラスミド pMS2::ENA1-3HA を構築し (Fig. 3-14)、BY2 細胞内で Enalp-3HA を生成させることを試みた。ウエスタン解析の結果から、ENA1-3HA クローンでのみ (ENA1-1, -2, 6, -8)、対照の GUS クローンには存在しない、Enalp-3HA のシグナルが検出された。ここで、Enalp-3HA では C 末端に HA エピトープが融合されていることから、突然変異によってフレームシフトなどが生じた場合はシグナルとして検出されないので、mRNA レベルでの解析よりも信頼度が高い結果であるといえる。このことから、BY2 細胞内で酵母の Enalp はタンパク質レベルで正常に生成していることが示された。続いて、ウエスタン解析で Enalp-3HA のシグナルが検出された ENA1-3HA クローンを用いて、BY2 細胞の蛍光抗体染色を行い、Enalp-3HA の細胞内局在性を調べた。その結果、対照の GUS クローンでは、明確な原形質膜特異的な蛍光を検出することができなかったが、ENA1-3HA クローンでは、明確な原形質膜の輪郭が蛍光として検出された (Fig. 3-16)。このことから、酵母細胞内と同様に、BY2 細胞内でも Enalp が原形質膜上に局在して Na^+/Li^+ -ATPase として機能し、細胞質ゾルからの Na^+/Li^+ 排出に貢献していることが示唆された。

第 7 項 今後の展望

これまでの耐塩性植物の分子育種を目指した研究は、乾燥と同様に塩が引き起こす高浸透圧ストレスに関する研究が先行してきたため、塩に特異的な Na^+ のイオン毒性に関する研究は遅れているようである。しかしながら、シロイヌナズナの液胞膜に局在する Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子を高生産させることで、耐塩性が向上した例が報告されており (Apse *et al.*, 1999)、イオンホメオスタシス

を強化することも耐塩性植物の分子育種の戦略として重要であるといえる。さらに、本研究により、酵母のナトリウムポンプをコードした *ENA1* 遺伝子によって、細胞質ゾルの Na^+ を細胞外に排出することによっても、植物細胞の耐塩性が向上することが初めて示された。今後は、イオンホメオスタシス強化するために、液胞膜に局在する Na^+/H^+ アンチポーターによって膨圧維持に必要な Na^+ を液胞に隔離する一方で、原形質膜に局在するナトリウムポンプによって細胞質ゾルの不要な Na^+ を排出することが重要な戦略として考えられる。

しかしながら、塩による高浸透圧ストレスによって、細胞膜系に損傷を受けた細胞では、イオンホメオスタシス制御に直接関わるイオン輸送体の機能が損なわれてしまう。そのため、イオン毒性に対する戦略のみでは、実用的な耐塩性植物の分子育種は不可能であり、高浸透圧ストレスとイオン毒性のそれぞれに適した戦略を組み合わせていくことが今後の課題である。特に、本研究のように原形質膜上に局在するイオン輸送タンパク質は、高浸透圧ストレスによって損傷を受ける危険性が高いといえる。よって、第 2 章で示したエクトインの合成によって、高浸透圧ストレスから膜機能を保護することが、塩ストレス下でナトリウムポンプの機能を最大限に発揮させる有効な戦略であると考えられる (Fig. 2-20)。本研究で、*Enalp* を発現した BY2 細胞が示した 120 mM LiCl に対する耐性は、イオン毒性の観点からすると LiCl は NaCl の数倍高い毒性を示すことから、海水レベル (500 mM NaCl) のストレスをクリアしているということもできる。しかしながら、実際には 200 mM NaCl 以上の条件で、高浸透圧ストレスの影響により、BY2 細胞は生育阻害を受けてしまう (data not shown)。よって、これまでの研究で明らかにされてきた、適合溶質による浸透圧調節やタンパク質の保護の戦略も当然組み合わせることが重要であろう (Fig. 2-20)。

第 4 章 総括

深刻化する環境問題や食糧問題の解決に役立つ植物の育種として、耐塩性植物の育種に期待が寄せられている。乾燥地における農業は灌漑農業が主流であるが、乾燥地での灌漑水散布は土壌中の塩を濃縮し、塩害を引き起こす。それゆえ、乾燥と塩は密接に関係した問題として、これまで研究が進められてきた。そして乾燥と塩は高浸透圧ストレスによって、細胞を脱水させて損傷を与えることが重大な問題として考えられてきた。しかしながら、塩特異的な問題として、細胞内に侵入した Na^+ のイオン毒性による細胞内代謝の阻害が挙げられる。そのため、細胞は、塩ストレスによって、細胞外に蓄積した高濃度の塩による「高浸透圧ストレス」と細胞質ゾルに蓄積した Na^+ の「イオン毒性」の両因子により複合的な損傷を受けることになる。

第 1 章では、植物の耐塩性機構について概説し、耐塩性植物の分子育種に関係するこれまでの知見についてまとめた。塩生植物には特殊な耐塩性機構が備わっているが、その分子機構は明らかにされておらず、おそらく多数の遺伝子が関与した複雑な機構であることから、その特殊な機構を中生植物に適用することは難しい。これまでの研究から、耐塩性植物の分子育種に有用な遺伝子は、適合溶質生合成系の遺伝子、一般的なストレス誘導性タンパク質の遺伝子、イオン輸送系の遺伝子、そして信号伝達系の遺伝子の 4 つのグループに分類できる。特に種々の適合溶質の生合成が、植物の耐塩性向上に効果的であることが示されている。さらに、適合溶質の機能は多岐に渡っており、適合溶質は塩以外にも種々のストレスに対して効果的であることが明らかにされつつある。一般的なストレス誘導性タンパク質は機能が未知のものが多いが、ストレス条件で細胞の生理活性を保護することが知られている。イオン輸送系の利用は、細胞内のイオンホメオスタシス制御に直接的に機能することから、塩特異的なイオン毒性に対して効果的であるといえる。また、信号伝達系の利用は、ストレスに対する応答を過敏にすることでストレスに対する適応応答を促進することができる。実用的な耐塩性植物を分子育種するためには、これらの遺伝子を利用することで、塩による高浸透圧ストレスとイオン毒性の両因子に応じた戦略をとることが必要である。

第 2 章では、特に、高浸透圧ストレスに対する戦略として、好塩性細菌 *H. elongata* の適合溶質エクトインを植物細胞内で生産させることを試みた。これまでに植物細胞におけるエクトインの蓄積例は報告されておらず、細菌類の耐塩性向上に有用なエクトインが植物細胞の高浸透圧ストレス耐性に及ぼす影響を調べるために、*H. elongata* の 3 種のエクトイン生合成系遺伝子をタバコ培養細胞へ導入した。その結果、タバコ培養細胞内でエクトインを生産させることに成

功した。さらに、エクトインの蓄積量とタバコ培養細胞の高浸透圧ストレス耐性には正の相関関係がみられ、高浸透圧ストレスによるタバコ培養細胞の生体膜機能への損傷がエクトインによって保護されることが示唆された。また、3種のエクトイン生合成系遺伝子を発現したタバコ植物体においても、乾燥耐性を示す結果が得られたことから、トレハロースやフルクタンと同様に植物体においても乾燥耐性を賦与できることが示唆された。

第3章では、特に、イオン毒性に対する戦略として、酵母 *S. cerevisiae* のナトリウムポンプを植物細胞内で生成させることを試みた。公開されている酵母ゲノム DNA の全塩基配列の情報を利用し、ゲノム PCR によりナトリウムポンプをコードした *ENAI* 遺伝子を単離した。イオン毒性の研究では、高浸透圧ストレスの影響を抑えるために、 Na^+ のアナログとして、より毒性の高い Li^+ が利用される。実際に、*Ena1p* は、 Na^+/Li^+ -ATPase として機能することが知られている。そこで、タバコ培養細胞へ *ENAI* 遺伝子を導入し、タバコ培養細胞の LiCl 耐性を調べた。その結果、*ENAI* 遺伝子を発現したクローンに顕著な LiCl 耐性を示すクローンが得られた。このクローンは NaCl に対しても耐性を示したことから、*Ena1p* が生成し、機能していることが示唆された。さらに、HA エピトープを融合した *Ena1p*-3HA を生成させた形質転換タバコ培養細胞の anti-HA 抗体を用いた解析より、タバコ培養細胞内で *Ena1p*-3HA が生成し、原形質膜上に局在していることが示された。これらの結果から、タバコ培養細胞内で酵母のナトリウムポンプ *Ena1p* が機能し、タバコ培養細胞のイオン毒性に対する耐性を向上させることが示された。

今後は、エクトインなどの適合溶質やナトリウムポンプなどのイオン輸送タンパク質を組み合わせることで、塩による高浸透圧ストレスとイオン毒性の両因子に対して効果的な戦略が可能になると考えられる。本研究の結果から、高浸透圧ストレス条件下でエクトイン生合成により生体膜機能を保護した細胞にナトリウムポンプを生成させる戦略は有効であると予想されるので、本研究のさらなる発展が強く望まれる。

以上、本論文では、耐塩性植物の分子育種を目指して、適合溶質エクトインによる高浸透圧ストレス耐性およびナトリウムポンプによる Na^+/Li^+ のイオン毒性に対する耐性を植物細胞に賦与することを試みた。適合溶質エクトインの蓄積により、植物細胞の高浸透圧ストレス耐性が向上した。また、ナトリウムポンプの生成により、植物細胞の毒性カチオン Na^+/Li^+ に対する耐性が向上した。塩ストレスの主要因である高浸透圧ストレスとイオン毒性に対する耐性を向上させる研究に、本論文の結果が寄与することを期待する。

第 5 章 謝辞

本研究を終えるにあたり、懇篤なる御指導を賜りました新名惇彦教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、有益な御助言並びに御指導を賜りました大阪大学工学部の高野光男名誉教授並びに大阪大学大学院工学研究科の室岡義勝教授に深く感謝いたします。また、本研究を遂行するにあたり、適切な御助言と御教示を賜りました佐野浩教授、横田明穂教授、磯貝彰教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、直接懇切なる御指導を賜り、さらに本論文の作成にあたり、終始適切な御助言を賜りました吉田和哉助教授に心より御礼申し上げます。

本研究の実験材料、実験器具を快く提供して下さり、さらに大変貴重な御助言と御指導を賜った大阪大学大学院工学研究科の小野比佐好先生に厚く御礼申し上げます。また、エクトインの定量分析について、適切な御助言と御指導を賜った大阪大学大学院工学研究科の小林昭雄教授、福崎英一郎助教授、梶山慎一郎先生に厚く御礼申し上げます。

本研究で用いたバイナリーベクター pMSH1/2 を頂いた島本功教授に厚く御礼申し上げます。また、酵母 *ena* 変異株を頂いた Universidad Politécnica de Madrid の Alonso Rodoriguez-Navarro 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の具体的な実験操作について、適切な御助言と御指導を賜った関根政実先生、加藤晃先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行のために、貴重なエクトインサンプルを提供して頂いた大日本製薬株式会社食品化成品部の皆様に心より感謝いたします。

耐塩性植物の分子育種を目指した共同研究者として、御協力頂きました堀江智明氏、中川篤氏、與那嶺育子氏、奈倉理絵氏、菅原満男氏に心より感謝します。

本論文の英語表現に関して適切な助言を頂いた Pulla Kaothien 氏に心より感謝いたします。

また、本研究を進めるにあたり、いろいろとお世話になりました植物代謝調節学講座の皆様に心より感謝いたします。

大阪大学時代に研究の基礎を御指導頂き、本研究を遂行する際にも常に叱咤激励して下さった大阪大学大学院工学研究科の藤田正憲教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を終えるにあたり、これまで常に支え続けてくれた家族に深く感謝します。

第 6 章 参考文献

- Adamec, L. (1984) The effect of plasmolysis and deplasmolysis on the permeability of plant membranes. *Biologica Plantarum*, **26**, 128-131.
- Adams, A., Gottschling, D.E., Kaiser, C.A. and Stearns, T. (1997) *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. 1997 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Akama, K., Shiraishi, H., Ohta, S., Nakamura, K., Okada, K. and Shimura, Y. (1992) Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana*: comparison of the efficiencies with various organs, plant ecotypes and *Agrobacterium* strains. *Plant Cell Rep*, **12**, 7-11.
- Amtmann, A. and Sanders, D. (1999) Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Adv Bot Res*, **29**, 75-112.
- An, G. (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol*, **79**, 568-570.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A. and Blumwald, E. (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, **285**, 1256-1258.
- Ashraf, M. (1994) Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **13**, 17-42.
- Axelsen, K.B. and Palmgren, M.G. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol*, **46**, 84-101.
- Banjoko, A. and Trelease, R.N. (1995) Development and application of an *in vivo* plant peroxisome import system. *Plant Physiol*, **107**, 1201-1208.
- Bañuelos, M.A., Quintero, F.J. and Rodríguez-Navarro, A. (1995) Functional expression of the ENA1(PMR2)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta*, **1229**, 233-238.
- Barkla, B.J., Vera-Estrella, R. and Pantoja, O. (1999) Towards the production of salt-tolerant crops. *Adv Exp Med Biol*, **464**, 77-89.
- Benito, B., Quintero, F.J. and Rodríguez-Navarro, A. (1997) Overexpression of the sodium ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: conditions for phosphorylation from ATP and Pi. *Biochim Biophys Acta*, **1328**, 214-226.
- Bernard, T., Jebbar, M., Rassouli, Y., Himdi-Kabbab, S., Hamelin, J. and Blanco, C. (1993) Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J Gen Microbiol*, **139**, 129-136.
- Binzel, M.L., Hess, F.D., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (1988) Intracellular

- compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol*, **86**, 607-614.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bohnert, H.J. and Sheveleva, E. (1998) Plant stress adaptations--making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol*, **1**, 267-274.
- Bohnert, H.J., Vernon, D.M., DeRocher, E.J., Michalowski, C.B. and Cushman, J.C. (1992) Biochemistry and molecular biology of CAM. In Wray, J.L. (ed.) *Inducible plant proteins*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 113-137.
- Boyer, J.S. (1982) Plant productivity and environment. *Science*, **218**, 443-448.
- Brady, C.J., Gibson, T.S., Barlow, E.W.R., Speirs, J. and Wyn Jones, R.G. (1984) Salt tolerance in plants: 1. Ions, compatible organic solutes and the stability of plant ribosomes. *Plant Cell Environ*, **7**.
- Braun, Y., Hassidim, M., Lerner, H.R. and Reinhold, L. (1986) Studies on H⁺-translocating ATPase in plants of varying resistance to salinity. 1. Salinity during growth modulates the proton pump in the halophyte *Atriplex nummularia*. *Plant Physiol*, **81**, 1050-1056.
- Bray, E.A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci*, **2**, 48-54.
- Cánovas, D., Vargas, C., Calderón, M.I., Ventosa, A. and Nieto, J.J. (1998) Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst Appl Microbiol*, **21**, 487-497.
- Colombo, R. and Cerana, R. (1993) Enhances activity of tonoplast pyrophosphatase in NaCl-grown cells of *Daucus carota*. *J Plant Physiol*, **142**, 226-229.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F. and Aurell Wistrom, C. (1987) Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J*, **242**, 1-10.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M. and Chapman, D. (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, **223**, 701-703.
- Del Moral, A., Severin, J., Ramos-Cormenzana, A., Trüper, H.G. and Galinski, E.A. (1994) Compatible solutes in new moderately halophilic isolates. *FEMS Microbiol Lett*, **122**, 165-172.
- Delauney, A.J. and Verma, D.P. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J*, **4**, 215-223.
- Demel, R.A., Dorrepaal, E., Ebskamp, M.J.M., Smeekens, J.C.M. and de Kruijff, B. (1998) Fructans interact strongly with model membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1375**, 36-42.
- DuPont, F.M. (1992) Salt-induced changes in ion transport: Regulation of primary

- pumps and secondary transporters. In Cooke, D.T. and Clarkson, D.T. (eds.), *Transport and receptor proteins of plant membranes*. Plenum Press, New York, pp. 91-100.
- Farwick, M., Siewe, R.M. and Krämer, R. (1995) Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, **177**, 4690-4695.
- Flowers, T.J., Hajibagheri, M.A. and Clipson, N.J.W. (1986) Halophytes. *Q Rev Biol*, **61**, 313-336.
- Fukuda, A., Nakamura, A. and Tanaka, Y. (1999) Molecular cloning and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochim Biophys Acta*, **1446**, 149-155.
- Galinski, E.A., Pfeiffer, H.P. and Trüper, H.G. (1985) 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur J Biochem*, **149**, 135-139.
- Garciadeblas, B., Rubio, F., Quintero, F.J., Bañuelos, M.A., Haro, R. and Rodríguez-Navarro, A. (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **236**, 363-368.
- Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S.L. and Fink, G.R. (1999) The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhxl and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1480-1485.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R.A. and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1425.
- Godoy, J.A., Lunar, R., Torres-Schumann, S., Moreno, J., Rodrogo, R.M. and Pintor-Toro, J.A. (1994) Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol Biol*, **26**, 1921-1934.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 546-567.
- Göller, K., Ofer, A. and Galinski, E.A. (1998) Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett*, **161**, 293-300.
- Gonzalez, R.G., Haxo, R.S. and Schleich, T. (1980) Mechanism of action of polymeric aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein--nucleic acid interactions. *Biochemistry*, **19**, 4299-4303.
- Hahnenberger, K.M., Jia, Z. and Young, P.G. (1996) Functional expression of the *Schizosaccharomyces pombe* Na⁺/H⁺ antiporter gene, *sod2*, in *Saccharomyces*

- cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5031-5036.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hanson, A.D. and Hitz, W.D. (1982) Metabolic response of mesophytes to plant water deficits. *Annu Rev Plant Physiol*, **33**, 163-203.
- Haro, R., Bañuelos, M.A., Quintero, F.J., Rubio, F. and Rodríguez-Navarro, A. (1993) Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiol Plant*, **89**, 868-874.
- Haro, R., Garciadeblas, B. and Rodríguez-Navarro, A. (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett*, **291**, 189-191.
- Hassidim, M., Braun, Y., Lerner, H.R. and Reinhold, L. (1990) Na⁺/H⁺ and K⁺/H⁺ antiport in root membrane vesicles isolated from the halophyte *Atriplex* and the glycophyte cotton. *Plant Physiol*, **94**, 1795-1801.
- Hayashi, H., Alia, Mustardy, L., Deshnum, P., Ida, M. and Murata, N. (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J*, **12**, 133-142.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-272.
- Holmberg, N. and Bülow, L. (1998) Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends Plant Sci*, **3**, 61-66.
- Holmström, K.O., Mäntylä, E., Welin, B., Mandal, A., Palva, E.T., Tunnela, O.E. and Londesborough, J. (1996) Drought tolerance in tobacco. *Nature*, **379**, 683-684.
- Hong, B., Barg, R. and Ho, T.H. (1992) Developmental and organ-specific expression of an ABA- and stress- induced protein in barley. *Plant Mol Biol*, **18**, 663-674.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res*, **2**, 208-218.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. and Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, **227**, 1229-1231.
- Ingram, J. and Bartels, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **47**, 377-403.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Jacobsen, T. and Adams, R.M. (1958) Salt and silt in ancient mesopotamian agriculture.

- Science*, **128**, 1251-1258.
- Jebbar, M., Talibart, R., Gloux, K., Bernard, T. and Blanco, C. (1992) Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J Bacteriol*, **174**, 5027-5035.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, **6**, 3901-3907.
- Jeschke, W.D., Wolf, O. and Hartung, W. (1992) Effect of NaCl salinity on flows and partitioning of C, N, and mineral ions in whole plants of white lupin, *Lupinus albus* L. *J Exp Bot*, **43**, 777-788.
- Jia, Z.P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S. and Young, P.G. (1992) Gene amplification at a locus encoding a putative Na⁺/H⁺ antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *EMBO J*, **11**, 1631-1640.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol*, **17**, 287-291.
- Katz, A., Pick, U. and Avron, M. (1992) Modulation of Na⁺/H⁺ antiporter activity by extreme pH and salt in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol*, **100**, 1224-1229.
- Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H. and Shimamoto, K. (1999) The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10922-10926.
- Kerr, R.A. (1998) Sea-floor dust shows drought felled Akkadian empire. *Science*, **279**, 325-326.
- Kishor, P.B.K., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, C.A. and Verma, D.P.S. (1995) Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol*, **108**, 1387-1394.
- Kishore, G.M. and Somerville, C.R. (1993) Genetic engineering of commercially useful biosynthetic pathways in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol*, **4**, 152-158.
- Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Gruissem, W. and Luan, S. (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4718-4723.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, **157**, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- LaHaye, P.A. and Epstein, E. (1969) Salt tolerance by plants: Enhancement with calcium. *Science*, **166**, 395-396.
- Lawlor, D.W. (1970) Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth. *New Phytol*, **106**, 201-216.
- Lee, J.H., Van Montagu, M. and Verbruggen, N. (1999) A highly conserved kinase is an essential component for stress tolerance in yeast and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5873-5877.
- Leslie, S.B., Teter, S.A., Crowe, L.M. and Crowe, J.H. (1994) Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochim Biophys Acta*, **1192**, 7-13.
- Lilius, G., Holmberg, N. and Bülow, L. (1996) Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Biotechnology*, **14**, 177-180.
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, **18**, 100-127.
- Lippert, K. and Galinski, E.A. (1992) Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol*, **37**, 61-65.
- Liu, J. and Zhu, J.K. (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, **280**, 1943-1945.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1391-1406.
- Louis, P. and Galinski, E.A. (1997) Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology*, **143**, 1141-1149.
- Malin, G., Iakobashvili, R. and Lapidot, A. (1999) Effect of tetrahydropyrimidine derivatives on protein-nucleic acids interaction. Type II restriction endonucleases as a model system. *J Biol Chem*, **274**, 6920-6929.
- Malin, G. and Lapidot, A. (1996) Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J Bacteriol*, **178**, 385-395.
- Marquez, J.A. and Serrano, R. (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett*, **382**, 89-92.
- Matheos, D.P., Kingsbury, T.J., Ahsan, U.S. and Cunningham, K.W. (1997) Tcn1p/Crz1p,

- a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **11**, 3445-3458.
- Matoh, T., Watanabe, J. and Takahashi, E. (1987) Sodium, potassium, chloride, and betaine concentrations in isolated vacuoles from salt-grown *Atriplex gmelini* leaves. *Plant Physiol*, **84**, 173-177.
- Maurel, C. (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **48**, 399-429.
- Mendizabal, I., Rios, G., Mulet, J.M., Serrano, R. and de Larrinoa, I.F. (1998) Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett*, **425**, 323-328.
- Messing, J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol*, **101**, 20-78.
- Min-Yu, L., Ono, H. and Takano, M. (1993) Gene cloning of ectoine synthase from *Halomonas* sp. *Annu Rep Int Center Cooperative Res Biotechnol Jpn*, **16**, 193-200.
- Moons, A., De Keyser, A. and Van Montagu, M. (1997) A group 3 LEA cDNA of rice, responsive to abscisic acid, but not to jasmonic acid, shows variety-specific differences in salt stress response. *Gene*, **191**, 197-204.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, **18**, 473-497.
- Murata, N., Mohanty, P.S., Hayashi, H. and Papageorgiou, G.C. (1992) Glycinebetaine stabilizes the association of extrinsic proteins with the photosynthetic oxygen-evolving complex. *FEBS Lett*, **296**, 187-189.
- Nagata, T., Takabe, I. and Matsui, C. (1981) Delivery of tobacco mosaic virus RNA into plant protoplasts mediated by reverse-phase evaporation vesicles (liposomes). *Mol Gen Genet*, **184**, 161-165.
- Narasimhan, M.L., Binzel, M.L., Perez-Prat, E., Chen, Z., Nelson, D.E., Singh, N.K., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (1991) NaCl regulation of tonoplast ATPase 70-kilodalton subunit mRNA in tobacco cells. *Plant Physiol*, **97**, 562-568.
- Nelson, D.E., Shen, B. and Bohnert, H.J. (1998) Salinity tolerance--mechanisms, models and the metabolic engineering of complex traits. *Genet Eng*, **20**, 153-176.
- Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Pardo, J.M. (1995) Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol*, **109**, 735-742.
- Niu, X., Narasimhan, M.L., Salzman, R.A., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (1993a) NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. *Plant Physiol*, **103**, 713-718.
- Niu, X., Zhu, J.K., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (1993b) Plasma-membrane H⁺-ATPase gene expression is regulated by NaCl in cells of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Planta*, **190**, 433-438.

- Nomura, M., Hibino, T., Takabe, T., Sugiyama, T., Yokota, T., Miyake, H. and Takabe, T. (1998) Transgenically produced glycinebetaine protects ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from inactivation in *Synechococcus* sp. PCC7942 under salt stress. *Plant Cell Physiol*, **39**, 425-432.
- Nomura, M., Ishitani, M., Takabe, T., Rai, A.K. and Takabe, T. (1995) *Synechococcus* sp. PCC7942 transformed with *Escherichia coli bet* genes produces glycine betaine from choline and acquires resistance to salt stress. *Plant Physiol*, **107**, 703-708.
- Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D. and Hanson, A.D. (1999) Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 128-134.
- Nuccio, M.L., Russell, B.L., Nolte, K.D., Rathinasabapathi, B., Gage, D.A. and D., H.A. (1998) The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant J*, **16**, 487-496.
- Ono, H., Okuda, M., Tongpim, S., Imai, K., Shinmyo, A., Sakuda, S., Kaneko, Y., Murooka, Y. and Takano, M. (1998) Accumulation of compatible solutes, ectoine and hydroxyectoine, in a moderate halophile, *Halomonas elongata* KS3 isolated from dry salty land in Thailand. *J Ferment Bioeng*, **85**, 362-368.
- Ono, H., Sawada, K., Khunajakr, N., Tao, T., Yamamoto, M., Hiramoto, M., Shinmyo, A., Takano, M. and Murooka, Y. (1999) Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *J Bacteriol*, **181**, 91-99.
- Ono, K., Yamamoto, Y., Hachiya, A. and Matsumoto, H. (1995) Synergistic inhibition of growth by aluminium and iron of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells in suspension culture. *Plant Cell Physiol*, **36**, 115-125.
- Perez-Prat, E., Narasimhan, M.L., Niu, X., Botella, M.A., Bressan, R.A., Valpuesta, V., Hasegawa, P.M. and Binzel, M.L. (1994) Growth cycle stage-dependent NaCl induction of plasma membrane H⁺-ATPase mRNA accumulation in de-adapted tobacco cells. *Plant Cell Environ*, **17**, 327-333.
- Pilon-Smits, E.A.H., Ebskamp, M.J.M., Paul, M.J., Jeuken, M.J.W., Weisbeek, P.J. and Smeekens, S.C.M. (1995) Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol*, **107**, 125-130.
- Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L. and Sychrova, H. (1996) Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **387**, 89-93.
- Proft, M. and Serrano, R. (1999) Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol*, **19**, 537-546.

- Quintero, F.J., Garcíadeblas, B. and Rodríguez-Navarro, A. (1996) The *SAL1* gene of *Arabidopsis*, encoding an enzyme with 3'(2'),5'- bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. *Plant Cell*, **8**, 529-537.
- Rajendrakumar, C.S., Suryanarayana, T. and Reddy, A.R. (1997) DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process. *FEBS Lett*, **410**, 201-205.
- Rhodes, D. and Hanson, A.D. (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **44**, 357-384.
- Rhodes, D. and Samaras, Y. (1994) Genetic control of osmoregulation in plants. In Strange, K. (ed.) *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation*. CRC Press, Boca Raton, pp. 347-361.
- Rodríguez-Navarro, A., Quintero, F.J. and Garcíadeblas, B. (1994) Na⁺-ATPases and Na⁺/H⁺ antiporters in fungi. *Biochim Biophys Acta*, **1187**, 203-205.
- Romero, C., Bellès, J.M., Vayá, J.L., Serrano, V.R. and Culiáñez-Macia, F.A. (1997) Expression of the yeast *trehalose-6-phosphate synthase* gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*, **201**, 293-297.
- Ronit, R., Peri, I., Gilboa, H. and Avi-Dor, Y. (1990) ¹³C NMR study of the interrelation between synthesis and uptake of compatible solutes in two moderately halophilic eubacteria: bacterium Ba1 and *Vibrio costicola*. *Arch Biochem Biophys*, **278**, 106-112.
- Rudolph, H.K., Antebi, A., Fink, G.R., Buckley, C.M., Dorman, T.E., LeVitre, J., Davidow, L.S., Mao, J.I. and Moir, D.T. (1989) The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ ATPase family. *Cell*, **58**, 133-145.
- Sakamoto, A., Murata, A. and Murata, N. (1998) Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Mol Biol*, **38**, 1011-1019.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sano, H. and Youssefian, S. (1991) A novel ras-related *rgp1* gene encoding a GTP-binding protein has reduced expression in 5-azacytidine-induced dwarf rice. *Mol Gen Genet*, **228**, 227-232.
- Schobert, B. and Tschesche, H. (1978) Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochim Biophys Acta*, **541**, 270-277.
- Schroeder, J.I., Ward, J.M. and Gassmann, W. (1994) Perspective on the physiology and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: biophysical implications

- for K⁺ uptake. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **23**, 441-471.
- Serrano, R. (1984) Purification of the proton pumping ATPase from plant plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, **121**, 735-740.
- Serrano, R. (1988) H⁺-ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution. *Methods Enzymol*, **157**, 533-544.
- Serrano, R. (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol*, **165**, 1-52.
- Serrano, R. and Gaxiola, R. (1994) Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci*, **13**, 121-138.
- Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Marquez, J.A., de Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R. and Montesinos, C. (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J Exp Bot*, **50**, 1023-1036.
- Shen, B., Jensen, R.G. and Bohnert, H.J. (1997a) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol*, **113**, 1177-1183.
- Shen, B., Jensen, R.G. and Bohnert, H.J. (1997b) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol*, **115**, 527-532.
- Sheveleva, E., Chmara, W., Bohnert, H.J. and Jensen, R.G. (1997) Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol*, **115**, 1211-1219.
- Sheveleva, E.V., Marquez, S., Chmara, W., Zegeer, A., Jensen, R.G. and Bohnert, H.J. (1998) Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco. High amounts of sorbitol lead to necrotic lesions. *Plant Physiol*, **117**, 831-839.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol*, **7**, 161-167.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*, **115**.
- Shinwari, Z.K., Nakashima, K., Miura, S., Kasuga, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1998) An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **250**, 161-170.
- Sivakumar, P., Sharmila, P. and Saradhi, P.P. (1998) Proline suppresses Rubisco activity in higher plants. *Biochem Biophys Res Commun*, **252**, 428-432.
- Smirnov, N. (1998) Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotechnol*, **9**, 214-219.

- Smirnoff, N. and Cumbes, Q.J. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, **28**, 1057-1060.
- Stathopoulos, A.M. and Cyert, M.S. (1997) Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev*, **11**, 3432-3444.
- Talibart, R., Jebbar, M., Gouesbet, G., Himdi-Kabbab, S., Wróblewski, H., Blanco, C. and Bernard, T. (1994) Osmoadaptation in Rhizobia: ectoine-induced salt tolerance. *J Bacteriol*, **176**, 5210-5217.
- Tarczynski, M.C., Jensen, R.G. and Bohnert, H.J. (1993) Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science*, **259**, 508-510.
- Thomas, J.C., Sepahi, M., Arendall, B. and Bohnert, H.J. (1995) Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, **18**, 801-806.
- Tongpim, S. and Takano, M. (1988) Effect of ectoine extracted from a halo-tolerant bacterium on the salt resistance of some bacteria, yeast and plant cells. *Annual Reports of ICBiotech*, **11**, 295-301.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T. and Shinozaki, K. (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell*, **11**, 1743-1754.
- Varela, J.C.S. and Mager, W.H. (1996) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity. *Microbiology*, **142**, 721-731.
- Vernon, D.M. and Bohnert, H.J. (1992) A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J*, **11**, 2077-2085.
- Watad, A.A., Reuveni, M., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (1991) Enhanced net K⁺ uptake capacity of NaCl-adapted cells. *Plant Physiol*, **95**, 1265-1269.
- Wieland, J., Nitsche, A.M., Strayle, J., Steiner, H. and Rudolph, H.K. (1995) The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J*, **14**, 3870-3882.
- Wilson, I.A., Niman, H.L., Houghten, R.A., Cherenon, A.R., Connolly, M.L. and Lerner, R.A. (1984) The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell*, **37**, 767-778.
- Wohlfarth, A., Severin, J. and Galinski, E.A. (1990) The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *J Gen Microbiol*,

136, 705-712.

- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T.-H.D. and Wu, R. (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water-deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*, **110**, 249-257.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S. and Shinozaki, K. (1992) Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol*, **33**, 217-224.
- Yancey, P.H. (1994) Compatible and counteracting solutes. In Strange, K. (ed.) *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation*. CRC Press, Boca Raton, pp. 81-109.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. and Someron, G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte system. *Science*, **217**, 1214-1222.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1997) Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol*, **38**, 1095-1102.

論文目録

学位論文の主たる部分を公表した論文

(題目、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. Nakayama H, Yoshida K, Ono H, Murooka Y, Shinmyo A (2000) Plant Physiology in press.

参考論文

(題目、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

植物のストレスへの応答—乾燥および塩. 吉田和哉, 堀江智明, 仲山英樹 (1999)
横田明穂編「植物分子生理学入門」, 学会出版センター, 199-209.

特許出願準備中

名 称: パン酵母のナトリウムイオン排出ポンプ遺伝子を発現可能な状態で導入
した耐塩性植物

発明者: 新名惇彦、吉田和哉、仲山英樹