

バラの低温耐性遺伝子のクローニング[†]

中山 明*, 越谷未央**, 嶋村果倫**

Cloning of cold resistance genes from rose

Akira Nakayama*, Mio Koshiya** and Karin Shimamura**

Rose is a garden species loved all over the world and is designated as “the flower of Maebashi-shi”. The production of roses with wonderful flowers requires to some extent the regulation of temperature. On the other hand, the cost of fuels has gone up in recent years. Therefore, the balance of maintaining high quality and productivity of roses in winter and keeping down the cost of cultivation is a big issue. In this study, we have cloned two cDNA fragments probably related to cold resistance of rose. One fragment (691 bp) encodes a putative cold shock protein (CSP) which is up-regulated by cold stress and functions as an RNA chaperone through the binding to RNA molecules under conditions of low temperature. The other cDNA fragment (524 bp) encodes a putative plant-specific transcription factor, DREB. DREB is stress-inducible transcription factor which induces various stress-resistance genes. In some species such as Arabidopsis and rice, high level of *DREB* gene expression has conferred augmented stress tolerance on the plant. We expect that regulating the expression of isolated genes through the genetic modification technique will enable us to breed novel roses which are highly resistant to cold stress.

Key words : Rose, Cold resistance, DREB, Cold shock protein (CSP)

1 はじめに

バラは古くから世界中で愛好されている園芸種であり、品種改良が繰り返されてきたことにより極めて多様な品種が存在する。また、「前橋市の花」として指定され、市内にはバラ専門の栽培農家も存在する。バラの栽培においては、様々な病気や環境ストレスによる品質や生産性の低下が問題となっており、克服すべき重要な課題である。バラの品質や生産性に影響を与える環境要因の一つとして温度が挙げられるが、中でも冬期の栽培における品質の維持が重要な課題となっている。バラは元々低温に比較的強い植物種であるが、品種の多様化に伴い、冬期における品質の維持に一定の温度管理を要する品種も少なくない。また、近年の燃料費の高騰などにより、温度管理そのものにかかりのコストがかかるという問題もある。そこで、比較的低温耐性の強い品種に備わるメカニズムを解析・活用することにより、低温における傷害を和らげることができれば、品種に関わらず低コストで高品質なバラの栽培が可能になると期待される。

植物が低温にさらされたときに引き起こされる傷害には様々なものがある。このうち最も被害の大きいものは、細胞内凍結である。極度の低温により細胞内に

氷晶が形成されることで、細胞内の構造や機能が破壊され、致命的なダメージを受ける。しかしながら、通常、細胞内凍結に至る前に、細胞外に氷晶が形成される。このとき、細胞外を満たす溶液の濃度が上昇するため、細胞外の水ポテンシャルが低下し、細胞内から細胞外へ水が移動する。すなわち、細胞内は「凍結脱水」状態に陥る。また、脱水に伴う収縮により、生体膜どうしが接近して不規則に融合するため、本来の細胞構造や機能が損なわれるようになる。これが、植物が被る最も一般的な低温傷害である。この他にも、細胞内の酸性化に伴う各種酵素活性の低下などが主な低温傷害として挙げられる。それに対して植物は、様々な反応により傷害を回避・低減しようとする。このときの一連の反応を低温順化という。低温順化には、生体膜の構成成分を変化させて流動性を維持することにより膜どうしの不規則な融合を抑制したり、オリゴ糖などを細胞内に蓄積して浸透圧を上げることにより細胞内脱水を抑制することなどが含まれる。

植物の低温耐性に直結する低温順化の過程には、細胞内の様々なシグナル因子が関与している。その中でも重要なものに、ストレス応答性の転写因子である DREB がある。DREB は、低温だけでなく乾燥や塩ストレス

[†] 原稿受理 平成 27 年 2 月 27 日 Received February 27, 2015

* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

** 生物学科学生 (Department of Biotechnology)

など様々な環境ストレスによって発現誘導される転写因子であり、生体膜の保護や細胞内浸透圧の上昇などに関わる遺伝子の発現誘導に重要な役割を担っている。一方で、低温により機能が低下した RNA に結合してその機能補助を担う低温ショックタンパク質 (CSP) も、植物の低温耐性において重要である。本研究では、バラからは未だ取得されていない *DREB* 遺伝子および *CSP* 遺伝子を取得するとともに、これらの遺伝子の発現制御を通じて、新たな低温耐性バラの作出に向けた基盤作りを目指す。

2 実験方法

2・1 材料

遺伝子取得用の検体として、「マダム・ヴィオレ」、「プリンセス・ド・モナコ」の2品種のバラを用いた。検体はいずれも前橋市敷島公園バラ園より頂いたもので、冬期に屋外にて栽培された植物体の一部（剪定後の枝葉）である。

2・2 cDNA 溶液の調製

「マダム・ヴィオレ」および「プリンセス・ド・モナコ」それぞれの葉（葉身のみ）を10枚程度ずつ切り取り、即座に液体窒素で凍結させて粉状にすりつぶした後、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いて各品種の全 RNA 溶液を得た。得られた全 RNA 溶液をもとに逆転写反応を行い、cDNA 溶液を得た。逆転写反応は、Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche)を用いて行った。

2・3 遺伝子断片の取得

まず、PCR による各遺伝子断片の増幅に使用するため、既知の *DREB* および *CSP* のアミノ酸配列情報をもとに、ディジェネレートプライマーを設計した。ディジェネレートプライマーの配列は以下の通りである。

DREB-FW: 5'- GARRTBAGRGARCCMAACAA -3'

DREB-RV: 5'- TCVGSGAAGTTGAKVCWBGC -3'

CSP-FW: 5'- TGGTTYRRCGHYRSMAARGG -3'

CSP-RV: 5'- GTRACKTCVRHGGCCTTRGT -3'

また、PCR の反応条件は、95°Cで2分間維持した後、「95°Cで30秒→45°Cで45秒→72°Cで30秒」の一連の反応を43回繰り返してから、72°Cで5分間維持した。目的遺伝子断片の増幅をアガロースゲル電気泳動により確認した後、回収した DNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)により精製した。精製した DNA を T-vector に導入後、大腸菌 (DH5α) に形質転換した。DNA 断片が正しく挿入されたプラスミドを持つ大腸菌を選抜・培養後、プラスミドを抽出し、塩基配列の解析に供した。

2・4 RACE 法

まず、2・2項で得られた cDNA を精製し、その5'側末端に対して、dA-tailing 反応を行った。cDNA の精製は High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)を用いて、dA-tailing 反応は 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche)を用いて行った。dA-tailing 反応を

終えた cDNA を鋳型とし、2・3項の方法で得られた遺伝子断片の塩基配列情報をもとに設計したプライマーを用いて、PCR を行った (5'-RACE および 3'-RACE)。さらに、2・3項と同様にして、PCR による増幅断片の塩基配列を解析した。

3 結果と考察

3・1 バラ *DREB* 遺伝子断片の取得と性状解析

ディジェネレート PCR および RACE 法により、バラの品種「マダム・ヴィオレ」由来の *DREB* 相同遺伝子断片 (524 bp) を取得した。また、「プリンセス・ド・モナコ」からもディジェネレート PCR において同様の遺伝子断片 (126 bp) が得られた。「マダム・ヴィオレ」由来の遺伝子断片がコードしているポリペプチドは、139個のアミノ酸残基から成り、C末端側についてはアミノ酸配列を全て決定している。一方で、N末端側については、既知の *DREB* タンパク質のアミノ酸配列情報から、30個程度のアミノ酸から成ると推定される領域 (配列) が未知のままである。

明らかになったバラ *DREB* 相同タンパク質のアミノ酸配列を Fig. 1 に示す。*DREB* は前述のように転写因子として機能する。タンパク質は細胞質で合成されるが、転写因子は核内で機能するため、細胞質で作られた *DREB* タンパク質は核に移動しなければならない。そのために、*DREB* を含めた核タンパク質は「核移行シグナル」とよばれる塩基性アミノ酸に富んだ領域を持っている。また、既知の *DREB* タンパク質の多くは、中央付近に DNA に結合するための領域を、C末端側にアスパラギン酸(D)やアスパラギン(N)、グルタミン酸(E)に富んだ「転写活性化領域」を持つ。Fig. 1 に示すアミノ酸配列から、本研究で取得したバラの *DREB* 相同タンパク質も、核で転写因子 *DREB* として機能するための必要最低限の領域を含むことが明らかになった。

```
LE[KRKKR]QHEHDDNQEKPYPYRGIRMRKW  
GKWVAEIREPNKRSRIWLGSYTPVAAAR  
AYDTAVFYLRGSPARLNFPELVFQEGQLH  
DMSSASIRKKATEVGAQVDAVQTALRSPS  
SQSKTGSQIKPDLNECPDPENSDDN
```

Fig. 1 Partial amino acid sequence of *DREB* protein from rose

Region disclosed by a box represents a putative nuclear localization signal required for the translocation of the protein to the nucleus.

「マダム・ヴィオレ」由来の当該ポリペプチドと既知の *DREB* タンパク質のアミノ酸配列を比較したところ、シロイヌナズナやイネなどのように相同性が40%前後

のものがある一方で、ブドウやワタなどのように 70% を越えるものもあった。アミノ酸配列の相同性をもとに、UPGMA 法により作成した系統樹を Fig. 2 に示す。系統樹で近い位置にあるタンパク質ほどアミノ酸配列上の相同性が高いことを示す。この系統樹からも DREB タンパク質がアミノ酸配列上 2 つのグループに大別され、このうちバラの当該タンパク質 (RhDREB) は、ワタやブドウ、ポプラなどと同じグループに含まれることを確認した。

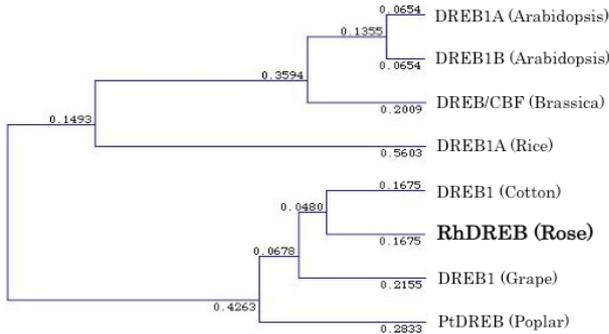


Fig. 2 Phylogenetic tree of DREB proteins

3・2 バラ CSP 遺伝子断片の取得と性状解析

DREB 遺伝子の場合と同様に、ディジェネレート PCR および RACE 法により、品種「マダム・ヴィオレ」由来の CSP 相同遺伝子断片 (691 bp) を取得した。本遺伝子断片がコードするポリペプチドは、165 個のアミノ酸残基から成っており、N 末端側に配列未決定の領域が残っているものの、C 末端側については全てのアミノ酸配列を決定している。本遺伝子断片がコードするポリペプチドのアミノ酸配列を Fig. 3 に示す。CSP は一般に、N 末端側に低温ショックドメイン (CSD) と呼ばれる植物種をこえてよく保存されたアミノ酸領域を持っている。また C 末端側には、グリシンに富んだ「グリシンリッチ領域」と「CCHC ジンクフィンガー領域」が交互に繰り返される領域を有している。CSP は前述のとおり、低温により機能が低下した RNA に結合し、その機能補助を担う。「グリシンリッチ領域」と「CCHC ジンクフィンガー領域」は、RNA や他のタンパク質との相互作用に重要な役割を担うと考えられている。さらに、本ポリペプチドには「グリシンリッチ領域」と「CCHC ジンクフィンガー領域」が 2 カ所ずつ存在していることが明らかになったが、これらの領域の数や配置のパターンの違いが結合する RNA の配列特異性に関与していると考えられている²⁾。

```

LFVHQSSIRTEGFRTLGDGESVEFQIESD
NDGRTKAVDVTGPEEGPVQGRGSGGGGR
GGGRRGGRRGRRGGGSYGGGGYGGGG
GGYGGGGGGGNCFKCGEAGHMARDC
SEGGGSYGGGRRGGGGYGGGGDGRYSG
GGGGGGASGGCYQCGETGHFARECP
NRG

```

Fig. 3 Partial amino acid sequence of CSP from rose. Region disclosed by a box represents a putative CSD (cold shock domain) highly conserved among CSPs. Glycine-rich regions (underlined) and CCHC zinc finger regions (enlarged) are probably involved in the binding to nucleic acids or other proteins.

本研究でアミノ酸配列が明らかになった当該ポリペプチドと既知の CSP のアミノ酸配列をもとに相同性を確認したところ、バラと同じ双子葉植物であるシロイヌナズナばかりでなく、単子葉植物であるイネやコムギ、裸子植物であるマツ科のトウヒの CSP とも、50~60% の相同性を示した。さらに、アミノ酸配列の相同性をもとに UPGMA 法により作成した系統樹を Fig. 4 に示す。

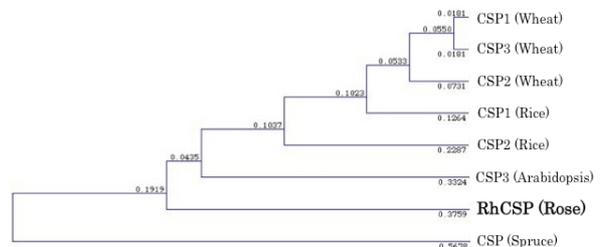


Fig. 4 Phylogenetic tree of plant CSPs

4 今後の展望

本研究でバラから取得した DREB および CSP 各相同遺伝子は、いずれもバラの低温ストレス耐性において重要な役割を担っていると考えられる。

まず、バラを含めた植物の環境ストレス耐性には、多くの耐性遺伝子群が関与しており、単一のストレス耐性遺伝子の発現を制御するだけでは十分な耐性が得られないことが予想される。一方で、植物の環境ストレス応答では、数百にのぼるストレス耐性遺伝子の発現をわずかに数種の転写因子が制御しているという報告もある³⁾。低温や乾燥などの環境ストレスに応じて発現する転写因子である DREB は、多くのストレス耐性遺伝子の発現を

同時に制御している可能性が高く、*DREB* 遺伝子の発現を制御することが新たな低温ストレス耐性バラの作出に極めて有効な手段であると考えられる。

DREB が様々な環境ストレス応答における「司令塔」のような役割を担うのに対し、*CSP* は低温ストレスにおいて機能する「主要な実働部隊」の一つと考えられる。ストレス耐性に関わるものに限らず遺伝子が発現する際に *RNA* は極めて重要な役割を担うが、一般に低温によりその機能は低下する。*RNA* の構造維持や機能補助に関わる *CSP* は、低温ストレス下において代謝や様々な生理作用を正常に進めるうえで、*DREB* とは異なる形で、極めて重要な役割を担っていると考えられる。

今後、まずはバラから取得した *DREB* および *CSP* 相同遺伝子の完全長 cDNA のクローニングと性状および機能の解析を進める。さらに将来的には、これらの遺伝子をバラにおいて低温ストレス誘導的に発現させることにより、生育への影響が少ない新規の低温耐性バラの作出を目指す。

参考文献

- 1) Q. Liu, M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki, *Plant Cell*, 10, 1391 - 1406 (1998).
- 2) K. Sasaki and R. Imai, *Frontiers in Plant Sci.*, 2, 116 (2012).
- 3) K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 781 - 803 (2006).