

# 光誘導型ジンクフィンガー転写因子の導入による強光ストレス耐性の付与

住友化学工業(株) 農業化学品研究所  
飯田 朝子  
大江田 憲治\*

## Improvement of Tolerance to High Irradiation in Plants by Introducing the Light-stress Inducible Zinc Finger Protein Gene.

Sumitomo Chemical Co., Ltd.  
Agricultural Chemicals Research Laboratory  
Asako IIDA  
Kenji OEDA

Dry or semi-dry lands have essentially high potential of CO<sub>2</sub> fixation, because they occupy about one-third of all land surface on earth. In the fundamental study to develop transgenic plants that could survive under severe environmental stress, we are investigating the light-stress tolerance of plants on the molecular basis. The model plant, *Arabidopsis thaliana*, showed increased tolerance to high-intensity light when pre-exposed to medium-intensity light (light acclimation). Among characterized acclimation-induced genes, we identified a zinc finger protein RHL41. The transgenic plants over-expressing the RHL41 gene showed an increased tolerance to high-intensity light. RHL41 could function as a regulatory factor in the acclimation /photo-protective process.

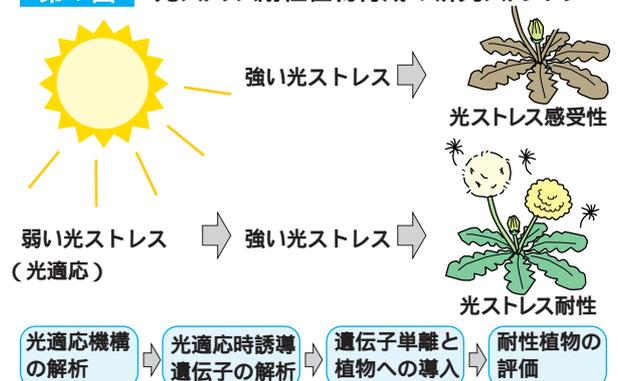
### はじめに

地球温暖化の主要な原因となる二酸化炭素の削減が国際的にも強く求められている。半砂漠地は、潜在的に二酸化炭素を大量に固定化するポテンシャルの高い地域であるが、このような厳しい環境ストレス下(強光、高塩、乾燥等)においても二酸化炭素を固定化することができるようなストレス耐性に優れた植物機能が得られれば、CO<sub>2</sub>削減に貢献できると期待される。植物生理学、分子生物学等の知見を活用して細胞・遺伝子レベルで強光・高塩・乾燥ストレス耐性機構を解明し、耐性植物を育成するための基盤技術を開発することを目標として「植物細胞の砂漠地域適応化技術」開発プロジェクト(経済産業省委託研究)が平成5年度から実施されている。本プロジェクトでは民間5社およびRITEが参加し、その中で私たちは「光ストレス耐性」に焦点を当てて研究を進めてきた。

砂漠では植物はかなり苛酷な環境下におかれており、日中では高温・乾燥・強光によるストレスを、夜間では主に低温ストレスを受けている。植物は移動能力を持たず定着性を有するため、このような劣悪環境に対する適応反応は動物以上に巧妙なものとな

っている可能性がある。光、水、温度に代表されるこれらの環境要因のうち、光は植物にとって極めて重要な因子である。光は光合成の必須要素でありながら、逆に強光や紫外線は植物にとって厳しい傷害ストレスとなる。これまで乾燥、低温、あるいは病害ストレスなどについては分子生物学的に詳細な解析が進められてきた<sup>1,2)</sup>が、光傷害とその防御機構についての遺伝子工学的解析や情報伝達解析については殆どなされていない。そこで私たちは、植物の「光適応」という現象に着目し、適応メカニズムの解析を行う中から「光ストレス耐性付与遺伝子」を探索・単離することから研究を始めた(第1図)。一般に植物は

第1図 光ストレス耐性植物育成の研究ストラテジー



\* 現職：生物環境科学研究所

強光ストレスを直接受けると光傷害を起こすが、一度弱い光ストレスを受けることによりストレスに対して適応機構を獲得し、光傷害が軽減される。この光適応時には光ストレス防御に関連する遺伝子群が発現誘導されると予想される。本研究ではモデル植物であるシロイヌナズナを用いてその光適応反応を調査し、さらに光適応時に誘導される遺伝子群を解析した。その中でジンクフィンガー転写因子と考えられるRHL41遺伝子を見出し、本遺伝子を高発現した組換え植物は強光耐性が向上することを示した<sup>3)</sup>。本稿ではこれらの研究成果について紹介する。

## 光適応機構の解析

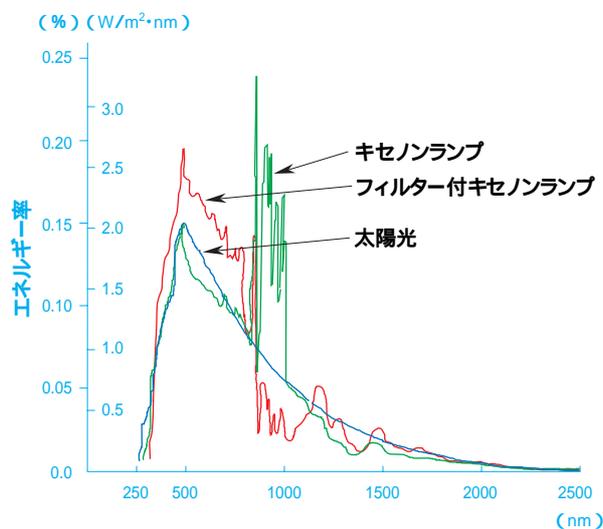
### 1. 光環境シミュレーターの設計・開発

まず、砂漠環境の強光条件を再現する光環境シミュレーターを設計・開発した(第2図)。本装置はキセノンランプを光源とし、供給電流量と減光フィル

第2図 光環境シミュレーター



第3図 分光分布比較



ターによる制御により $2,000 \mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$ までの照度を連続的に可変できる。アリゾナの砂漠地帯の最強照度は $1,800 \sim 2,000 \mu\text{E} / \text{m}^2$ なので、本装置は砂漠地帯の強光条件を十分に満たしていると考えられる。1号機では、5灯のランプを用いたため照度分布が不均一であったが、2号機では1灯の大型ランプを用いることにより、30cm四方のエリアに均一に照射することが可能となった。また、キセノンランプの分光分布に特有である $800 \sim 1000\text{nm}$ 付近のピークを除去するためのフィルターが装着されており、太陽光に近似した分光分布を得ることができる(第3図)。さらに、光に付随する輻射熱の影響を最小限に抑えるため、熱エネルギーの最大の原因である赤外線領域の波長を除くフィルターも装着されている。

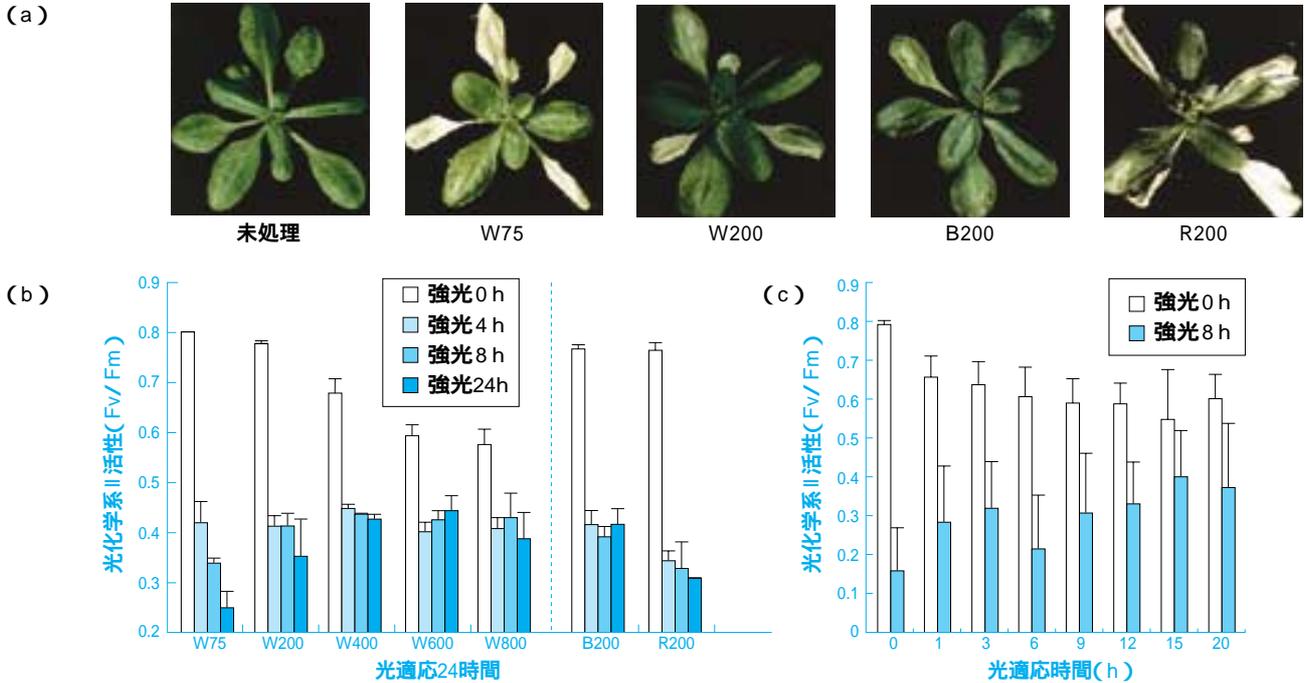
### 2. シロイヌナズナを用いた光適応条件の検討

私たちは植物材料としてシロイヌナズナを選定した。アブラナ科の植物であるシロイヌナズナは、遺伝子の単離・同定、機能の推定などが非常に容易であること、ライフサイクルが短く種子獲得までの栽培期間が6週間であること、光応答に関する突然変異体が多数単離されていることなど多くの利点がある。最近になって全ゲノム配列が決定され、急速に研究成果の蓄積が進んでいる。

まず、シロイヌナズナが光適応反応を示すかどうかを調査した(第4図(a))。通常の光条件で生育させた植物に直接 $2,000 \mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$ の強光を8時間照射すると、葉のブリーチング(白化現象)が起こり、光傷害が顕著であった(W75)が、あらかじめ $200 \mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$ の白色光を24時間照射して“光適応処理”した植物では、強光照射後もこのようなブリーチングは見られず(W200)、光ストレス耐性を獲得していることが明らかであった。

次に光適応反応に影響する種々の条件について、光合成能力の指標となるクロロフィル蛍光値(光化学系II活性)を測定して評価した(第4図(b)(c))。適応時の光強度を200から $800 \mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$ に変えて処理した後、強光を照射して光合成能を比較した(第4図(b))。その結果、光適応の最適光強度は $600 \mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$ であることが明らかとなった。また、適応処理時間を1から20時間に変えて処理した後、強光を照射して光合成能を比較した。その結果、光適応反応は処理1時間後には起こり、15~24時間処理でplateauに達することが判った(第4図(c))。また、適応反応を引き起こす光質について調査した。その結果、青色光で光適応処理した場合は強光耐性の向上が認められた(B200)が、赤色光の場合は効果が極めて低く(R200)、青色光が光適応反応に効果的であることが明らかとなった(第4図(a)(b))。

第4図 光適応による光ストレス耐性の向上



3. 光適応時に誘導される遺伝子群の解析とクローニング

私たちは、光適応の過程で光ストレス防御に関連する遺伝子群が誘導・発現した結果、植物の強光耐性が向上したと考え、光適応時に誘導される遺伝子群について解析することにした。ディファレンシャル・ディスプレイ(DD)法を用いて、600 μE / m<sup>2</sup>s の白色光を10分~15時間照射した時に特異的に誘導される遺伝子を解析した結果、光合成関連遺伝子であるD2タンパク質、クロロフィルa/b結合タンパク質、活性酸素除去系の酵素カタラーゼ、転写制御因子と予想されるジンクフィンガータンパク質RHL41、翻訳制御因子である酸性リボソームタンパク質P1、低温ストレス誘導タンパク質COR15などの遺伝子が同定された(第1表)。

第1表 DD法により同定された光適応時誘導遺伝子

- 転写制御因子遺伝子
  - ・RHL41(ジンクフィンガータンパク質)
- 翻訳制御因子遺伝子
  - ・酸性リボソームタンパク質P1
- ストレス誘導タンパク質遺伝子
  - ・トリプシンインヒビター様タンパク質
  - ・カタラーゼ
  - ・COR15(低温ストレス誘導タンパク質)
- 光合成関連遺伝子
  - ・D2タンパク質
  - ・クロロフィルa/b結合タンパク質
- 窒素代謝関連遺伝子
  - ・硝酸還元酵素

これ以降は、転写因子と予想されるRHL41遺伝子に焦点を当てて解析を進めた。RHL41は光ストレス防御あるいは光適応における情報伝達経路の調節遺伝子である可能性が考えられたからである。RHL41は2つのジンクフィンガーモチーフを持つジンクフィンガータンパク質であり、その構造からDNA結合性を有すると考えられる(第5図)。同様の構造を持つジンクフィンガータンパク質として、酵母に塩耐性を付

第5図 ジンクフィンガータンパク質RHL41のアミノ酸配列

RHL41	1: MVAIS-EIKSTVDVT-----AA-----MEFSEDSIDHTLV--FKGKRSKRPRQLSPDIY	16
EPF1	1: -----MEFSEDSIDHTLV--FKGKRSKRPRQLSPDIY	30
EPF2-4	1: ---MTLETLSK-----SSTPKTKPTIPLPKPIINDAIDHKRKRKRPR---IETP	46
STZ	1: ---MALEALTS-----PRLASPI-PLPFEDSVFVGHVHTKGRSKRSRDFHHQN	48
WZF1	1: MSSAMEALHALIPEQHLDVEAAAAVSSATSGEESGHVLOGIAKRRSRQR-----	53
RHL41	17: -----NCLMLLRSGVQENVDGSD-QK-----RV-----	38
EPF1	31: SSSSTSTTQI SSSSSREDEEDMANCLL LAQSGQSHKQKFSRKFETATSTGKA-----	85
EPF2-4	47: PS-----EKEFLALCLMLLARSQ-GKNPTTPTTITNEPLQVQEPINKPL	90
STZ	49: LT-----EEEELAFCLMLLARDN-----RQPPPPAV-----	75
WZF1	54: -S-----EEENLALCLMLLRSQKQVQAPQPPFAAPVPAE-----	89
RHL41	39: -----FTCKTLKQFHSFDALGGHRAHKK-PNND-----AL--	69
EPF1	86: -----GFYVYECKTQNRITFPSPDALGGHRTSHKSKTI AAEKTSITLEDHQQQERVAQE	139
EPF2-4	91: QVQEPINEQSYKQNVQNKSFHSYDALGGHKAHNRKNLSTTTVS-----YDD-	137
STZ	76: ---EKL SYKQSVQDKTFSYDALGGHKAHNRKNLSQTLSSG-----GDD-	116
WZF1	90: -----FKQSVQKQFHSYDALGGHKTSLR-----AAAP	127
RHL41	70: -----SSG--LMKKVKTSSHPQIPGVFPPMCOALGGHRRRNRNES-	108
EPF1	140: EGEFIKIIPSI STQI INKGNMQSNFNKSKIHEDAI CGAEFTSBOALGGHRRRNPPTI	199
EPF2-4	138: ---TNPSTNS-----LNPSGRFHEDSI QHCKHSSBOALGGHRRRHYEGLN	180
STZ	117: ---HSTSSAT-----TTSAV---TTGSGKSHVCTI QNKSPSBOALGGHRRRHYEGLN	163
WZF1	128: LVALPAVAAILPSAEPATSSSTAASSDGATNRVHRSQKKEFPTBOALGGHRRHYDGGV	187
RHL41	109: GAAGGALVTRALLPE-PTVTTLKK-----SSGKR--VACLDI SLGMVDNL-NLKLELG	158
EPF1	200: TANI TNTKVTLSSTIDDTSNYTSSESHDYDEI KEKPRI ILSLDLNLPPAPPE-----	250
EPF2-4	181: G-----GVSRGDTVI SSEGGGSAV-----IRR-----DFDLNLPSPPELTLGMSVDC	223
STZ	164: N-----INTSSVS-----NSEGAGSTSHVSSSHR-----GFDLNI PPI PEF---SM---	201
WZF1	188: GAAASSTELAAAAAESEVGSTGNG-----SSAAR-----AFDLNI PAVPEFWRPKCAKG	237
RHL41	159: RTVY	162
EPF1	251: ---DDHHSNDTKDFDSGNKQCLVFSAAALVDCHY	281
EPF2-4	224: ERKSQLSGEEVESPMPTKKPRFLAFRIDGN	253
STZ	202: ---VNGDEVMSPPAKKPRFDFPVKQL	227
WZF1	238: KMMME--DDEEVQSLPAFKPRLLTA	261

与するSTZ、ペチュニアの花弁特異的に発現する5'-エノールピルピルシキミ酸3リン酸合成酵素遺伝子プロモーターに結合する転写因子EPF1/FPE2-4、コムギのヒストン遺伝子プロモーターに結合する転写因子WZF1などが報告されている。しかしこれらの転写因子とRHL41はモチーフ以外の領域のアミノ酸配列は相同性が低く、異なるグループに属すると考えられる。

RHL41 遺伝子の光ストレス応答性をさらに詳細に調べるため、ノザン解析を行った(第6図)。通常の生育条件である $75 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ の光強度ではRHL41 遺伝子はほとんど発現していないが、 $600 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ の白色光照射による光適応処理後、1時間で発現誘導が見られ、16時間まで同レベルの誘導発現が認められた(第6図(a))。また、 $1,900 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ の強光を5時間照射すると、光適応処理1時間で誘導発現される量の10倍以上の顕著な発現誘導が認められた。これらの結果から、RHL41 遺伝子は光ストレスにตอบสนองして高発現する遺伝子であることが確認され、光ストレス耐性と何らかの関連があることが強く示唆された。また、赤色光と青色光の両方で誘導され、光ストレス適応反応のシグナルである可能性の高い青色光による誘導の方がやや強いことが判った。次に $1,900 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ の強光照射による発現誘導の経時変化を調査した(第6図(b))。照射0.5時間後には発現誘導が認められ、徐々に発現量は増加して5~7時間後には最大となった。また、強光照射を止めて通常の光条件下に植物体を戻すことにより、光ストレス状態を解除すると、0.5時間後には発現量は最大時の半分以上に減少した。しかし、光ストレス解除16時間後にもわずかながら発現が認められた。さらに、 $300 \sim 2,000 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ に光強度を変化させて発現量を調べた結果、RHL41 遺伝子は光強度の増加に伴い発現量が

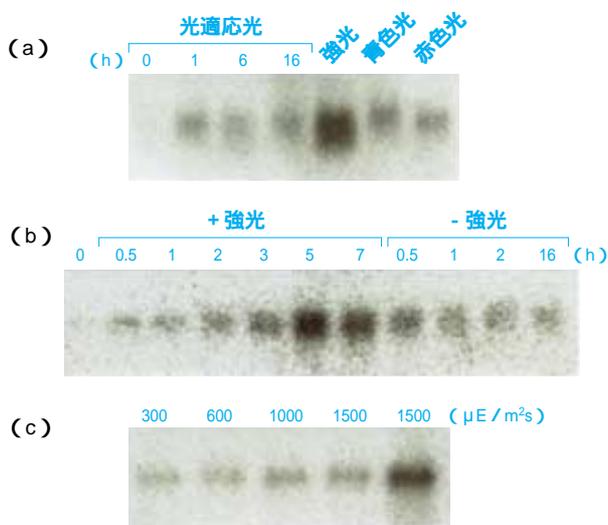
増加し、 $2,000 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ の場合に特に顕著な発現誘導が観察された(第6図(c))。このように、RHL41 遺伝子は光ストレスに迅速にตอบสนองする転写因子型の発現を示し、また光強度に依存した発現パターンを示すことが明らかとなった。また、RHL41 遺伝子は塩、高温、低温などのストレスによっても誘導され、広く環境ストレスにตอบสนองする遺伝子である可能性が示唆された(データ示さず)。

## 転写因子RHL41 遺伝子を導入した組換え植物の作出と解析

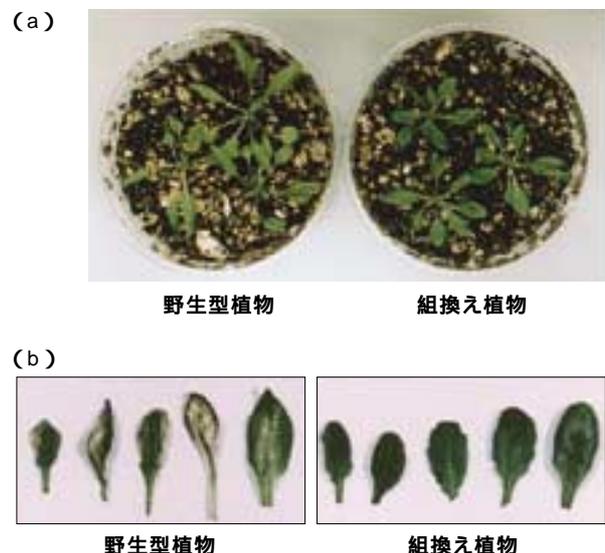
### 1. 組換え植物における光ストレス耐性評価

RHL41 遺伝子が実際に光ストレス防御あるいは光適応反応に関与しているかどうかを確認するため、本遺伝子を導入した組換え植物を作出した。植物の全組織で恒常的に発現させるためにカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35Sプロモーターを用い、その下流にRHL41cDNAを挿入した発現ベクターを構築した。本ベクターをルート法によりシロイヌナズナに導入し、ハイグロマイシンを含む培地で選抜して、独立した組換え植物を51株得た。選られた組換え植物は通常の光条件下で生育させた場合でも、野生型植物と比較して、緑色が濃くなる傾向が認められた。(第7図(a))。これらの組換え植物は、全て抽台して開花・結実した。組換え植物に $2,000 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ の強光を8時間照射後に葉のブリーチングの程度を観察した結果、野生型では葉のブリーチングが認められ光傷害がかなり進んでいるのに対し、RHL41 導入組換え植物では、葉のブリーチングはほとんど認められず、光ストレス耐性が向上していることが明らかであった(第7図(b))。

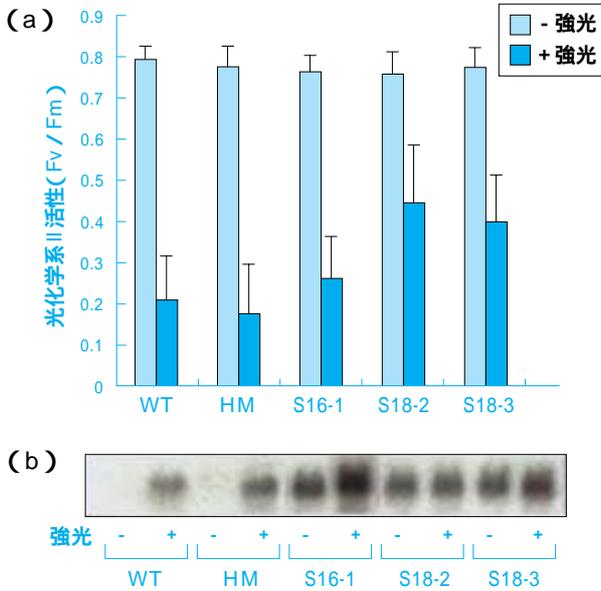
第6図 RHL41遺伝子の光ストレス応答



第7図 RHL41 発現組換え植物の育成



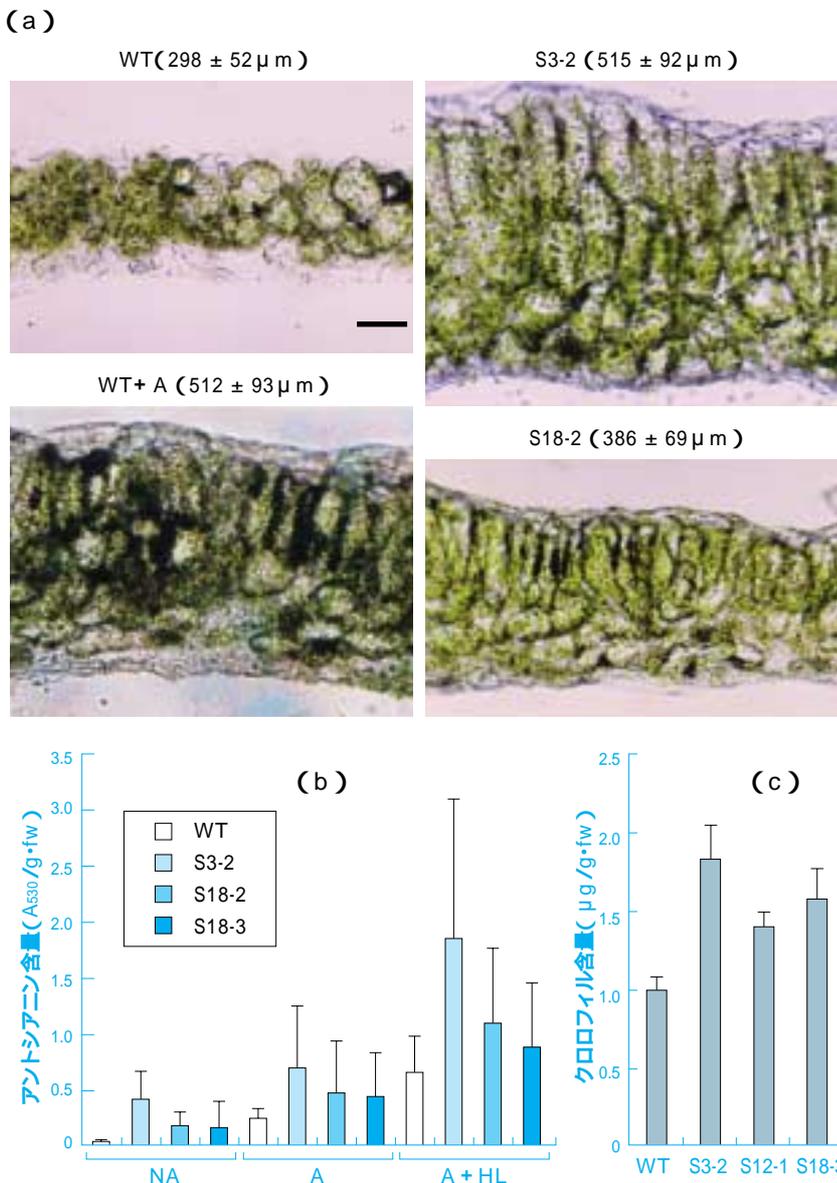
第8図 組換え植物における光ストレス耐性の向上



さらに、野生型および組換え植物に、 $2,000 \mu E / m^2 s$ の強光を5時間照射した後、光合成能力の指標となるクロロフィル蛍光値(光化学系II活性: PSII)の変化を調査した(第8図(a))。その結果、組換え植物(S16-1、S18-2、S18-3)は野生型(WT)あるいはコントロールベクターを導入した組換え植物(HM)と比較して有意に高いPSII活性を示した。またノザン解析によりRHL41遺伝子の発現誘導を調べた結果、組換え植物では通常の光条件下でも導入遺伝子由来の発現が認められ、強光照射により、さらに内在遺伝子由来の発現量の増加が認められた(第8図(b))。

以上の結果から、ジンクフィンガータンパク質RHL41遺伝子を恒常的に発現させることによって、シロイヌナズナに光ストレス耐性を付与できることが示された。RHL41は転写因子として光適応あるいは光ストレス防御に関する遺伝子群の発現を制御していることが強く示唆された。

第9図 組換え植物の表現型の解析



2. 組換え植物の表現型の解析

組換え植物は野生型と比較して葉の緑色が濃くなる傾向が見られたことから、葉の厚み、色素の蓄積量などについて調査した。その結果、播種後20日目の野生型植物における葉の厚みは $298 \pm 52 \mu m$ であるのに対し、組換え植物は $515 \pm 92 \mu m$ (S3-2)あるいは $386 \pm 69 \mu m$ (S18-2)であり、組換え植物の葉が肉厚であることが判った(第9図(a))。野生型は細胞2~3層からなる未分化な状態であるのに対し、組換え植物は柵状組織、海綿状組織からなる分化の進んだ状態であった。一般に陽葉植物は陰葉植物に比べ葉が分厚く、強光耐性能が大きいことから、組換え植物において葉が分厚いことは、強光耐性を付与する一要因であると考えられる。さらに、組換え植物で認められるような柵状組織の発達が光適応反応の1つであることを証明するため、より長期の光適応処理を野生型植物に施して調査した。その結果、2週間の光適応処理した野生型植物(WT + A)では、柵状組織の発達による葉の肉厚化が観察された。光適応処理条件下では

RHL41 遺伝子が恒常的に発現していることから、本遺伝子は光適応反応の1つと考えられる柵状組織の発達に関わっている可能性が考えられた。

また、光ストレス防御に関する色素アントシアニン含量についても調査した(第9図(b))。その結果、通常の光条件下で生育させた場合、野生型ではアントシアニンの蓄積は殆ど認められないのに対して、組換え植物では顕著な蓄積が認められた(NA)。さらに、光適応処理(A)、さらに強光処理(A+HL)することにより、その蓄積量はさらに増加することが判った。これらの結果から、RHL41はアントシアニン合成経路の遺伝子発現に関与する可能性が示唆された。アントシアニンの蓄積も組換え植物に強光耐性を付与する一要因として働いていると推察される。さらにクロロフィル含量について調査した結果、組換え植物は野生型の1.5~1.8倍のクロロフィルを有することが明らかとなり、組換え植物において光合成装置が密である柵状組織が発達している観察結果と一致した(第9図(c))。クロロフィルの増加により過剰の光エネルギーをより効率良く利用できるようになり、強光耐性が向上したと考えられる。

## RHL41の機能解析

### 1. RHL41の細胞内局在性

次にRHL41が転写因子であることを確認するため、RHL41が細胞内の核に局在するかどうかを調査した。35Sプロモーター下流に自家蛍光タンパク質であるGFPとRHL41との融合遺伝子を接続した発現ベクターを構築した。本ベクターをタマネギ表皮細胞にパーティクルガンを用いて導入し、一過的に発現した融合タンパク質の細胞内局在性について調べた(第10図)。その結果、コントロールであるGFPタンパク質単独の場合、細胞質全体が蛍光を発するのに対し、GFP/RHL41融合タンパク質では核のみが蛍光を発

し、核に局在することが確認された。この結果から、RHL41ジンクフィンガータンパク質は核に存在して、転写因子として機能していると考えられた。

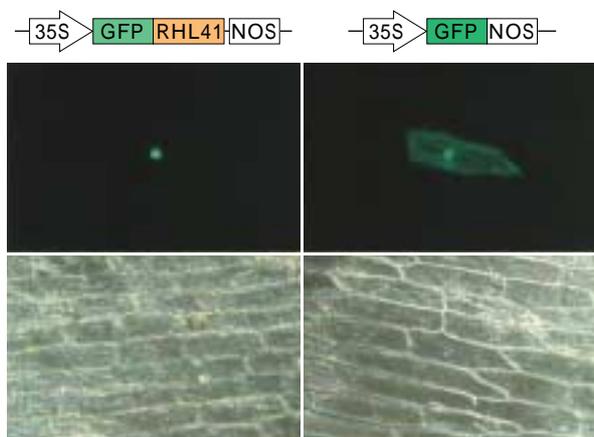
## おわりに

私たちは、モデル植物であるシロイヌナズナの光適応反応について解析し、光阻害、活性酸素消去、翻訳制御、低温ストレス防御、転写制御などに関わる遺伝子が光適応時に誘導発現することを示した。その中で、転写制御因子と予想されるジンクフィンガータンパク質について解析を進めた。RHL41遺伝子は光強度に依存して迅速に光ストレス応答し、本遺伝子を高発現した組換え植物は強光耐性が向上することが示された。組換え植物では光適応反応の1つである柵状組織の発達が見られ、アントシアニン・クロロフィルなどの色素含量も増加していた。また、RHL41は細胞内の核に局在することも判ってきた。

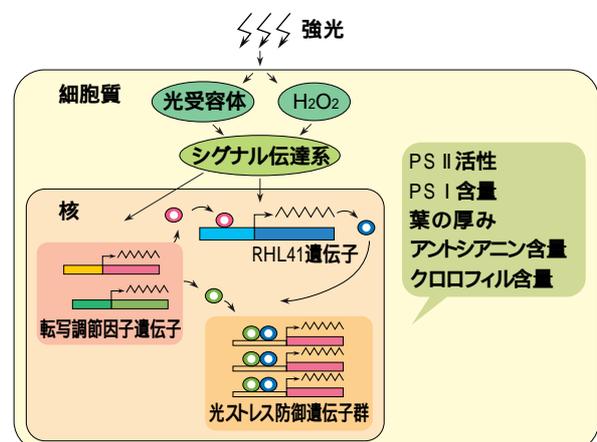
これらの結果から、RHL41は光ストレス防御あるいは光適応反応の情報伝達経路の初期調節遺伝子として機能していることが予想される(第11図)。植物が強光ストレスを受けると、何らかの光受容体あるいは $H_2O_2$ がそのシグナルを受け取り、情報伝達が始まると考えられる。最終的にはRHL41遺伝子よりもさらに上流にある転写調節因子遺伝子に情報伝達され、RHL41遺伝子の発現が誘導されると予想される。さらにRHL41は下流に存在する転写因子あるいは防御遺伝子群の発現を制御していると考えられる。今後は、RHL41高発現組換え植物がどのようにして強光耐性を獲得したかについて、(1)RHL41が制御する標的遺伝子群の解析 下流の解析、(2)RHL41遺伝子発現を制御する因子の解明 - 上流の解析、の2つの方向で研究を進める予定である。

標的遺伝子群の解析については、現在、プロテーム解析およびマイクロアレイ解析により、組換え植物

第10図 RHL41の細胞内局在性



第11図 RHL41の予想される機能



特異的に誘導発現するタンパク質群あるいは遺伝子群を調査中であり、いくつかの興味深い遺伝子が同定されつつある。

また、RHL41 遺伝子発現を制御する因子の解析として、まずRHL41 遺伝子そのものの発現制御を担うプロモーター領域をクローニングし、解析を進めている。現在、RHL41 プロモーター制御下にレポーター遺伝子が働くように構築した発現ベクターをシロイヌナズナに導入し、組換え植物を作成中である。組換え植物におけるレポーター遺伝子の種類のストレスに対する発現応答、あるいは組織特異的発現などについて調査することにより、RHL41 遺伝子発現の植物体内での挙動が詳細に解析できると考えている。また、RHL41 プロモーター/レポーター遺伝子を発現する組換え植物を利用して、光ストレス応答の情報

伝達メカニズムに関する新たな知見が得られると期待される。これらの解析の中から新規光ストレス耐性付与遺伝子の候補を見出すことができると考えている。

#### 引用文献

- 1) K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki : Curr. Opin. Biotechnol., 7, 161(1996)
- 2) M. F. Thomashow : *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. In *Arabidopsis*. pp.807(1994)
- 3) A. Iida, T. Kazuoka, S. Torikai, H. Kikuchi, K. Oeda : *The Plant J.*, 24(2), 191(2000)
- 4) 平成9年度 生物機能利用砂漠地域二酸化炭素固定化技術開発事業成果報告書

#### PROFILE



飯田 朝子

Asako IIDA

住友化学工業株式会社  
農業化学品研究所 アグリバイオG  
主任研究員  
農学博士



大江田 憲治

Kenji OEDA

住友化学工業株式会社  
生物環境科学研究所 生化学G  
主席研究員  
理学博士