

ソナレシバの高温耐性遺伝子の同定

Identification of high temperature tolerance genes from *Sporobolus virginicus*

川崎 玲史 , 佐藤 孝成

指導教員 多田 雄一

東京工科大学 応用生物学部 応用生物学科 植物工学研究室

キーワード: ソナレシバ, 高温耐性, 地球温暖化, 遺伝子組換え

1. はじめに

高温ストレスは植物の生理現象に様々な影響を与え、日焼けや、枯死、光合成速度低下なども引き起こし、農作物の収量減少や品質低下につながっている。近年では地球温暖化の影響により、気温が上昇傾向にあり、今後も植物への高温ストレスによる影響が大きくなると予想される。そのため、植物の高温耐性を向上させる技術の開発が必要である。そこで当研究室ではソナレシバという亜熱帯に自生する野生のシバが持つ高温耐性に着目し、ソナレシバ遺伝子(cDNA)を網羅的(ランダム)に導入した組換えシロイヌナズナ集団から、高温耐性が向上した系統を選抜し、さらにその系統に導入されたソナレシバ遺伝子を同定した。本研究では、これらの遺伝子を改めて導入した組換えシロイヌナズナの高温耐性を検証することで、ソナレシバの高温耐性遺伝子を同定することを目的とする。



図 1. ソナレシバ

2. 実験方法

①高温耐性組換え植物の選抜

ソナレシバ cDNA を網羅的に導入した組換えシロイヌナズナ 6000 系統を作出し、非組換え植物が白化(枯死)する高温処理(45℃, 3h)で生き残った系統を選抜した。それらの系統の次世代個体を用いて同条件の高温処理で二次スクリーニングを行い、再現性よく高温耐性を持つ組換え体を選抜した。

②ソナレシバ遺伝子の同定と再検定

高温耐性を持つ組換え体に導入されているソナレシバ遺伝子を PCR 法で増幅し、塩基配列の解読と相同性検索による同定を行った。これらの遺伝子をシロイヌナズナに再び導入し、高温耐性の向上を検証することでソナレシバの高温耐性遺伝子の同定を行った。高温ストレス耐性試験は 7 日齢の個体に高温処理(45℃, 3h)を行い、さらに 7 日経過後の生死で判断した。

3. 結果

約 6000 系統の組換えシロイヌナズナから一次スクリーニングで 101 系統、二次スクリーニングで 7 系統の高温耐性系統を選抜した。

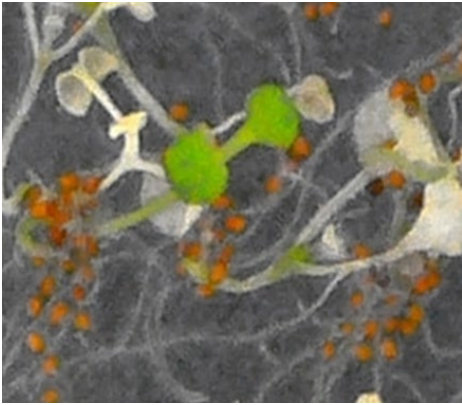


図 2. 高温ストレス耐性を確認した組換え体

これら 7 系統の高温耐性シロイヌナズナに導入されていた 9 種のソナレシバ遺伝子のうち、遺伝子配列の解読ができた 6 種について、データベースで相同性検索を行い、遺伝子を同定した(表 1)。

表 1. 選抜したソナレシバ遺伝子の解析結果

選抜系統名	全長(bp)	相同性がある遺伝子	相同性(%)
Sht5-5	750	<i>P. halli</i> 60SRibosomal Protein	80
Sht12-5-2	700	<i>Sorghum bicolor</i> 60SRibosomal Protein	89
Sht13-3	1500	<i>Oryza sativa japonica</i> ncRNA(部分配列)	80
Sht13-8-2	400	<i>Sorghum bicolor</i> photosynthetic NDH(部分配列)	91
Sht19-1	350	<i>Setaria viridis</i> Domancy-associated protein1	86
Sht23-1	1700	<i>Zea mays</i> MAPK1(部分配列)	88

表 1 の 6 種の遺伝子を改めてシロイヌナズナに導入して、組換えシロイヌナズナの高温耐性を検証した。そのうち、Sht13-3(ノンコーディング RNA) 及び Sht19-1(休眠関連タンパク質)を導入した組換えシロイヌナズナでは、高温処理後に緑色を保って生存している個体が確認された。従って、ソナレシバ遺伝子の Sht13-3 と Sht19-1 は、高温耐性を向上させる機能があることが示された。



図 3. 緑色を保持した Sht13-3 組換え体(左)
完全に白化した非組換え植物(右)



図 4. 緑色を保持した Sht19-1 組換え体(左)
完全に白化した非組換え植物(右)

4. 考察

本研究では、ノンコーディング RNA、休眠関連タンパク質を導入した組換え体で高温耐性が確認された。これらの遺伝子によって高温耐性が向上する機構については、これらの組換え体で発現が変化している遺伝子の検索、ストレス耐性に関与する酵素の活性測定、クロロフィル量の測定などを行うことで明らかにする必要がある。また、現在行っている高温処理の条件はスクリーニングにも用いた 45°C, 3h で、非組換え植物がすべて白化する高強度のストレス処理であるため、ストレス強度を弱めた条件でも生存率の比較を行う必要があると考える。

今後も、実験結果の再現性の確認や新たな高温耐性遺伝子の同定を行うことで、温暖化という環境問題の改善に貢献していきたい。