



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（理学）
報告番号	甲第1657号
学位記番号	第18号
氏名	應 夢超
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	オオムギ低温応答性遺伝子 CISP の機能 Function of novel cold-induced CISP genes in barely
論文審査担当者	主査： 木藤 新一郎 副査： 田上 英明、櫻井 宣彦、中園 幹生

博 士 論 文

# オオムギ低温応答性遺伝子 *CISP* の機能

名古屋市立大学大学院 システム自然科学研究科

理学情報専攻

提出日 2018年1月11日

学籍番号 157801

氏 名 應 夢超

指導教員 木藤 新一郎

第一章 緒論 .....	1
第二章 <i>CISP</i> 遺伝子の構造と特徴.....	3
1. 研究背景と目的.....	3
2. 材料と方法.....	3
3. 結果と考察.....	5
(1) <i>CISP</i> 遺伝子の構造 .....	5
(2) オオムギ <i>CISP</i> 遺伝子のゲノム DNA 構造.....	6
(3) 相同遺伝子の検索と比較 .....	7
(4) <i>CISP</i> の系統樹 .....	9
第三章 <i>CISP</i> 遺伝子の器官別発現様式.....	11
1. 研究背景と目的 .....	11
2. 材料と方法.....	11
(1) オオムギの栽培 .....	11
(2) Total-RNA の抽出 .....	11
(3) Total-RNA の精製 (DNaseI 処理) .....	12
(4) cDNAs の合成.....	13
(5) Real-time-PCR (qPCR) 法で発現解析 .....	14
3. 結果と考察.....	15
(1) <i>CISP</i> 遺伝子の器官別発現様式.....	15
第四章 低温環境における <i>CISP</i> の発現様式と機能解析 .....	17
1. 研究背景と目的.....	17
2. 材料と方法.....	17
(1) オオムギの栽培と低温処理.....	17
(2) シロイヌナズナの栽培 .....	17
(2) Total-RNA の抽出と cDNAs の合成.....	18
(3) Real-time-PCR (qPCR) 法で発現解析 .....	18
(4) RT-PCR 法で発現解析 .....	18
(5) <i>in situ</i> hybridization .....	19
(6) オオムギタンパク質の抽出.....	20
(7) 大腸菌で <i>CISP</i> タンパク質を発現させるためのプラスミドの構築 .....	20

(8) 大腸菌によるタンパク質の発現 .....	21
(9) GST-tag 融合 CISP タンパク質の精製回収 .....	22
(10) His-tag 融合 CISP タンパク質の精製回収 .....	22
(11) SDS-PAGE とタンパク質の染色 .....	23
(12) Western blot 法 .....	23
(13) ssRNA の合成と Gel Shift Assay .....	24
3. 結果と考察 .....	24
(1) CISP 遺伝子の低温応答性 .....	24
(2) CISP 遺伝子の酸化ストレス応答性 .....	27
(3) 低温から室温回復後の発現様式 .....	28
(4) CISP 遺伝子の根における局在解析 .....	29
(5) オオムギ CISP タンパク質の検出 .....	30
(6) 各種タグ融合 CISP タンパク質の検出 .....	31
(7) His タグ融合 CISP タンパク質の核酸結合性 .....	32
(8) CISP1 過剰発現シロイヌナズナの確認 .....	33
(9) 形質転換シロイヌナズナの凍結耐性解析 .....	34
第五章 過剰な塩や重金属環境における CISP の発現様式と機能解析 .....	36
1. 研究背景と目的 .....	36
2. 材料と方法 .....	36
(1) オオムギの栽培とストレス処理 .....	36
(2) タンパク質および RNA の抽出と検出 .....	37
(3) Real-time-PCR (qPCR) 法で発現解析 .....	37
(4) Western blot 法 .....	37
(5) 発現部位の観測 .....	37
(6) リーフディスクアッセイ .....	37
(7) 植物組織の灰化处理 .....	37
(8) 原子吸光分析法による金属含量の測定 .....	38
3. 結果と考察 .....	38
(1) CISP 遺伝子の塩ストレスに対する応答性 .....	38
(2) CISP 遺伝子の重金属ストレスに対する応答性 .....	39

(3) <i>CISP</i> 遺伝子の重金属欠乏ストレスに対する応答性.....	42
(4) <i>CISP-GFP</i> 過剰発現イネの解析.....	43
(5) <i>CISP-GFP</i> 過剰発現イネの重金属耐性解析.....	46
(6) <i>CISP-GFP</i> 過剰発現イネにおける重金属含有量の測定.....	47
第六章 総合考察.....	49
謝辞.....	55
特記事項.....	55
参考文献.....	56
用語説明及び略記.....	59

## 第一章 緒論

低温は植物の生長に影響を与える環境因子の一つであり、低温環境におかれたイネでは、発芽率低下、成長遅延、種子の不稔などが生じる[1]。よって、低温は低温耐性の弱いイネなど暖地型作物の栽培や収穫に悪影響を及ぼす[2]。これに対して、オオムギなどのムギ類は、低温順化(Cold acclimation)や低温春化(Vernalization)と呼ばれる低温環境に適応するための優れた仕組みを備えており、低温に対する影響を受けにくい。

低温順化とは、秋から冬にかけて気温が徐々に低下する過程で適合溶質が細胞内に蓄積したり、膜の脂質が飽和脂肪酸から不飽和脂肪酸へと変化することで低温耐性が上昇する機構である。低温順化していないライムギは $-5^{\circ}\text{C}$  までしか生存できないが、低温順化したライムギは $-20^{\circ}\text{C}$  まで枯死せず生存することができる[3, 4]。低温順化の過程で細胞内に蓄積する適合溶質には、デハイドリンなどの可溶性タンパク質、プロリンをはじめとするアミノ酸、そして、糖などがある。このうち、可溶性タンパク質は、主にコムギやライム、オオムギなど低温耐性が強い植物に蓄積することが報告されており[5-14]、植物の脱水損傷を防止する役割を担っていると考えられている。また、糖やアミノ酸は浸透圧の調節に役立っていると考えられている[15]。一方、低温順化の過程で進行するリン脂質の不飽和化は、低温環境における膜の流動性維持に関与することが知られている[16]。これらの変化により、低温に伴う植物細胞からの脱水や膜の流動性低下が抑制され、細胞機能の恒常性が維持されることで低温耐性が上昇する。以上の低温耐性機構は主に外気温の影響を受ける葉で生じる生理現象であると一般に考えられてきたが、近年、土壤中に位置するため外気温の影響を受けにくい根にも低温耐性の仕組みが存在することが分かってきた。例えば、シロイヌナズナの低温応答性遺伝子 *AtCSP3* は、低温に伴って根で発現誘導され凍結耐性に関与することが報告されている[17]。

一方の低温春化は、冬の間には花が咲いて種子形成や発芽した実生の生長が抑制されるのを防止する低温回避の仕組みで、春化要求性を持つ多くのムギ類は冬の寒さを乗り越えて温暖な春にならないと花を咲かせない。低温春化は低温順化と同じ低温に対処するための生理機構であるが、この二つは多くの点で異なっている。例えば、低温順化は植物の葉を中心とした組織で起きるが、低温春化は茎頂分裂組織で特異的に起きる生理的反応である。また、低温春化に関わる遺伝子の多くは低温順化より長期の低温で誘導される。この低温春化の機構は長い間不明であったが、近年シロイヌナズナの変異株を用いた研究で、*VRN1*、*VRN2*、*VIN3* と呼ばれるタンパク質が主に働いていることが明らかとなった[18]。これらのタンパク質は、花芽形成の抑

制因子である *FLC* の発現を低温依存的に低下させ、その結果として花芽形成の抑制システムを解除する。これによって、日長や温度条件が整った時点で *FT* や *SOC1* など花の分裂を決定する遺伝子の発現量が上がり、花芽形成が誘導される。しかし、シロイヌナズナの春化機構で中心的な役割を担っている *VRN1*、*VRN2*、*VIN3* など遺伝子は、同じ低温春化の形質を持つイネ科植物(ムギ類など)には存在しないことがわかっている。また、低温順化の機構に関しても、植物間で同一でなく差異があると考えられている。よって、イネ科植物の低温耐性機構を明らかにする為には、シロイヌナズナではなくイネ科の植物を実験材料に研究を展開する必要がある。

このような背景のもと、当研究室では二倍体で遺伝子レベルの解析が比較的容易なイネ科植物のオオムギを用いて、HiCEP (High Coverage Expression Profiling) 法により低温と関連する遺伝子の単離・同定を進めてきた。HiCEP 法はトランスクリプトーム解析のために開発された新技術で、既存の DNA マイクロアレイ法と異なり遺伝子単離が進んでいない生物種でも全遺伝子の発現を網羅的に解析できるという利点を持つ[19]。また、既知の遺伝子だけでなく、未知遺伝子や non-coding transcripts も解析対象となることから、特定の組織や特別な生理条件下でのみ発現する未知の転写産物を単離同定する手法としても優れている。本研究では、この HiCEP 法を用いてオオムギで単離した新規低温応答遺伝子 *CISP1* (Cold-induced Small Protein 1) のオオムギにおける機能解明に挑んだ。

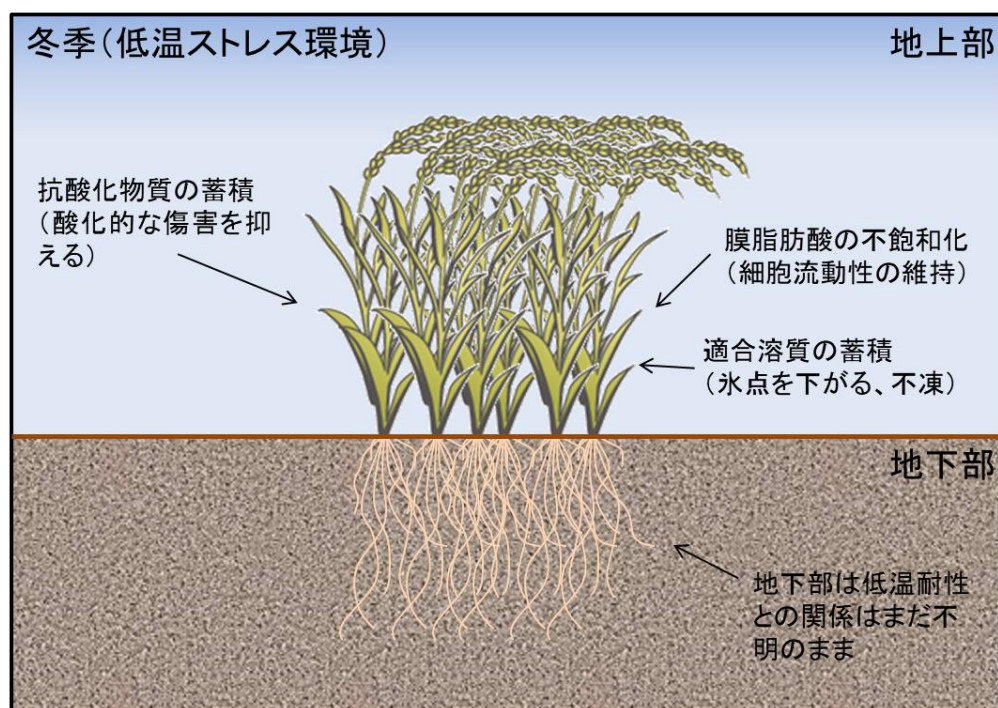


図 1-1 植物が持つ既知の低温耐性機構

## 第二章 *CISP* 遺伝子の構造と特徴

### 1. 研究背景と目的

遺伝子の塩基配列やその翻訳産物であるタンパク質のアミノ酸配列情報は、当核遺伝子の機能推定につながる様々な情報を含んでいる。よって、はじめにオオムギから単離した3種類の *CISP* 遺伝子 (*CISP1*, *CISP2*, *CISP3*) の機能推定を目的に、ネット上のデータベースを利用してそれらのホモロジー検索やドメイン検索を行った。また、推定アミノ酸配列を用いて *CISP* タンパク質の構造や機能ドメインの検索を行ない、その機能推定も試みた。

### 2. 材料と方法

情報検索には、3種類のオオムギ *CISP* 遺伝子 (*CISP1*, *CISP2*, *CISP3*) ORF 領域の塩基配列 (表 2-1) と塩基配列から推定されるアミノ酸配列 (表 2-2) を用いた。

既知遺伝子に対する相同性は、NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) と DDBJ (<http://old-blast.ddbj.nig.ac.jp/blast/blastn?lang=ja>) の Web サイトを通じて BLAST プログラムで検索した。また、分子系統樹は検索結果で得られた配列を用いて Clustal X2 で作成したアライメント情報をもとに近隣結合法で作成した。オオムギのゲノム情報は IPK Barley BLAST Server (<http://webblast.ipk-gatersleben.de/barley/viroblast.php>) の Web サイトを利用して検索した。

表 2-1 3種類のオオムギ *CISP* 遺伝子 ORF 領域の塩基配列

*CISP1*\_ORF (Accession number: LC192538)

---

1 ATG CAC ACA CAC ACA CAG ACG AAG AAG AAG ATG GGT CAG AGC CCC CTG  
ATC CGG CTG CCA GAG GCG GAG CAA GTT CAG CCA CTA GTG GCG ATC CGT  
GGC AGC AAC AGG ATG GAA CAA CTT GGA AAG TCT ACA AAG GCT ATG AAC  
AAA TAC TAC AAA AGC TCA AGC AAG GAC GAT CTT GTT TTG AGG GCG ACA  
CTA GAC TCG ATA ACT AGA ATG GGA TAA 219 nt



*CISP2\_ORF* (Accession number: LC192539)

---

1 **ATG** GGT CAG AGT CCC CTC ATC CGG CTA CCA GTG GCA GAG CAG GTT CAG  
CCG GAG GTG GCG ACC GGT GGC AGC AAC AGG AAG GAA CAG CCT GGC AAG  
TCT ACA AAA GCT ACA AAT AAA TAC TAC AAA AAC TCA AGC AAA GAC GAT  
CTA GTT TTA AGG GCG ACG CTT GAC TCA ATT ACT AGA ATT GGA **TGA** 189 nt

*CISP3\_ORF* (Accession number: LC192540)

---

1 ATG GGT CAG TGC CCC TCG ATC CGG CAG CCT GAG GCA GAG TAT GTA CGC  
CTG ATG GCG GCA CCC GGC GGC AAA AAC AGA AAC GAG CAA ACC GGC AAA  
TCT ACA AAG GCC ATG ACC AAA TAC TAT AAA AGA TCA AGC AAG GAC GAT  
CTG GTT ATG AGG GCG ACA CTA GAA TCA ATC ACG AGA ATT GGA **TAA** 189 nt

表 2-2 3 種類のオオムギ *CISP* 遺伝子がコードするタンパク質の推定アミノ酸配列

*CISP1* (pI: 10.16 Mw: 8.13 kDa)

---

1 MHTHTQTKKKMGQSPLIRLPEAEQVQPLVAIRGSRMEQLGKSTKAMNKYYKSSS  
KDDLVLRLATLDSITRMG 72 aa

*CISP2* (pI: 9.77 Mw: 6.74 kDa)

---

1 MGQSPLIRLPVAEQVQPEVATGGSNRKEQPGKSTKATNKYYKNSSKDDLVLRLATLDS  
ITRIG 62 aa

*CISP3* (pI: 9.91 Mw: 6.95 kDa)

---

1 MGQCPSIRQPEAEYVRLMAAPGGKNRNEQTGKSTKAMTKYYKRSSKDDLVMRATL  
ESITRIG 62 aa

### 3. 結果と考察

#### (1) *CISP* 遺伝子の構造

図 2-1 に 3 種類のオオムギ *CISP* 遺伝子の塩基配列での相同性と *CISP1* の推定アミノ酸配列を示した。3 種類の *CISP* 遺伝子は全体に高い相同性を持つが、*CISP1* は *CISP2* および *CISP3* より 5'側が 30 塩基長いことが明らかとなった。これら 3 つの *CISP* 遺伝子は低分子(推定分子量 6.95 ~ 8.13 kDa)の塩基性タンパク質 (pI: 9.77 ~ 10.16) をコードしていた。

<i>CISP1</i>	ATGCACACACACACAGACGAAGAAGAAGATGGGTCAGAGCCCCTGATCCGGCTGCCA	60
<i>CISP2</i>	ATG.....T.....C.....A...	30
<i>CISP3</i>	ATG.....T.....TC.....A...T	30
	***** * *** ***** **	
<i>CISP1</i>	M H T H T Q T K K K M G Q S P L I R L P	
<i>CISP1</i>	GAGGCGGAGCAAGTTCAGCCACTAGTGGCGATCCGTGGCAGCAACAGGATGGAACAACCTT	120
<i>CISP2</i>	.T...A.....G.....GGAG.....C.G.....A.....G.C.	90
<i>CISP3</i>	...A...T.T.A.GC.TGA.G.C...ACC.G.C...AA...A.AC..G...ACC	90
	* ** * ** * ** * * * ** * * ** * ** * ** * ** * ** *	
<i>CISP1</i>	E A E Q V Q P L V A I R G S N R M E Q L	
<i>CISP1</i>	GGAAAGTCTACAAAGGCTATGAACAAATACTACAAAAGCTCAAGCAAGGACGATCTTGTT	180
<i>CISP2</i>	..C.....A...CA..T.....A.....A.....A...	150
<i>CISP3</i>	..C..A.....C...C.....T....A.....G...	150
	** ** * ** * ** * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
<i>CISP1</i>	G K S T K A M N K Y Y K S S S K D D L V	
<i>CISP1</i>	TTGAGGGCGACACTAGACTCGATAACTAGAATGGGATAA	219
<i>CISP2</i>	..A.....G..T....A..T.....T...TGA	189
<i>CISP3</i>	A.....A...A..C..G....T...TAA	189
	* ** * ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** *	
<i>CISP1</i>	L R A T L D S I T R M G (73aa)	

図 2-1 3 種類のオオムギ *CISP* 遺伝子の塩基配列の比較と *CISP1* のアミノ酸配列

オオムギで単離した 3 種類 *CISP* 遺伝子(ORF 領域)の塩基配列を比較した。アライメント上のドット(・)は同じ塩基を、そして米印(\*)はすべての遺伝子に共通の塩基を示した。

## (2) オオムギ *CISP* 遺伝子のゲノム DNA 構造

*CISP1* の塩基配列を用いて IPK Barley BLAST Server で検索を行った結果、3 種類の *CISP* 遺伝子のゲノム配列情報が得られ、*CISP1* はオオムギの 7 番染色体に、*CISP2* は 4 番染色体に、そして *CISP3* は 2 番染色体に局在することが明らかとなった。図 2-2 はゲノム構造の模式図を示した。*CISP1* 遺伝子に関しては、5' UTR 領域が 9 nt と短いことやその直前に TATA-BOX が存在することから、*CISP1* の開始コドン は *CISP2* 及び *CISP3* と同じ位置にある 2 番目の ATG から始まる可能性も考えられる。一方、3' UTR 配列に関しては、*CISP1* と *CISP2* の間で相同性が確認できるものの (図 2-2)、*CISP3* はこれら 2 つの遺伝子と相同性を示さなかった。よって、*CISP1* と *CISP2* は *CISP3* より近縁であると考えられる。また、当研究室ではブラキポディウムより *CISP2* の相同性遺伝 (*BdCISP2-1* と *BdCISP2-2*) を単離しているが、それらはブラキポディウムの 4 番染色体に位置することが確認できた。ブラキポディウムの 4 番染色体は、オオムギの 4 番と 5 番染色体から派生したことが分かっていることから、オオムギの *CISP* 遺伝子は 4 番染色体に存在する *CISP2* が最も古く、その後、*CISP1* と *CISP3* が重複して生じた可能性が高いと考えられる。





#### (4) CISP の系統樹

CISP ホモログの分子系統樹を作成した結果、イネ科植物の CISP 遺伝子は 3 つのグループ (グループ A、グループ B、グループ C) に分類されることが明らかとなった (図 2-4)。B グループは推定アミノ酸配列の N 末端側に VSD ドメイン (液胞への輸送シグナル) がないタイプで、CISP3 はグループ B に分類された。一方、グループ C は VSD ドメインを持ち、CISP1 と CISP2 はグループ C に分類された。他の寒冷地適応型の植物にも同様にこれら 2 つのグループに属する CISP 相同遺伝子が存在することから、2 つのグループはそれら植物の祖先種において遺伝子が重複して形成されたと考えられる。また、グループ A には *Setaria italica* (アワ)、*Sorghum bicolor* (モロコシ)、*Zea mays* (トウモロコシ)、*Oryza punctata* (イネの野生種)、*Oryza glumipatula* (イネの野生種)、*Oryza brachyantha* (イネの野生種)、*Leersia perrieri* (サヤヌカグサ属) などの暖地型イネ科植物由来で CISP とは相同性の低い遺伝子が位置した。これらグループ A に属する遺伝子とグループ B 及び C に属する遺伝子は C 末端のみに弱い相同性が見られた (図 2-5)。

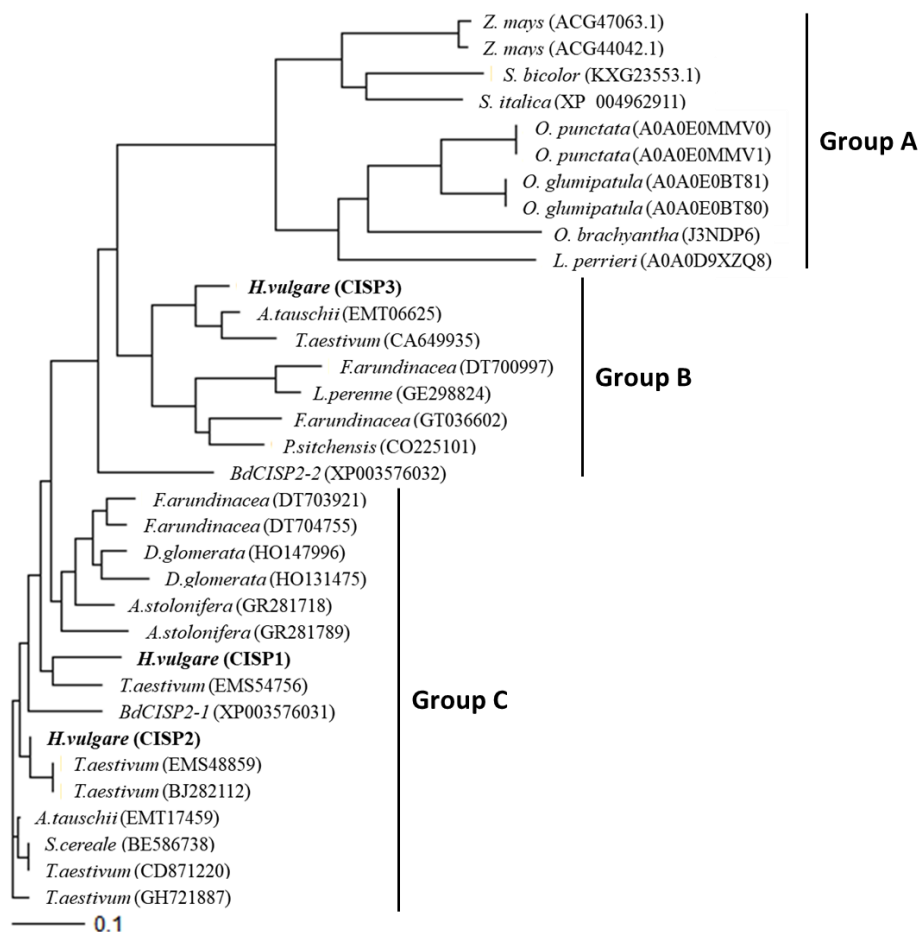


図 2-4 イネ科植物が持つ CISP 相同遺伝子の分子系統樹

<i>H. vulgare</i> (CISP1)	MGQ-SP-----LIRLPEAEQV---QPLVAIRGSN--RMEQ-----LGKS-----
<i>Z. mays</i> (ACG47063.1)	MGQCSS-----S-QHPEAEQQKQQKQAACVDIQKSCRQE-----LRKK-----
<i>Z. mays</i> (ACG44042.1)	MGQCSS-----S-QHPEAEQQKQQKQAACVDIQK--RQE-----LRKK-----
<i>S. bicolor</i> (KXG23553.1)	MGQCSS-----SSQHPKAEQ--KQPAAGVDTQK--RQE-----LRKAA-----
<i>S. italica</i> (XP_004962911)	MGQRSS-----S-QKPEAEQV-QQPAAASVDSQK--RQE-----QRKAV-----
<i>O. punctata</i> (A0A0E0MMV0)	MGQYCS-----SSSRQPVADHG-AAAAAATDGF-----RKQ-----PEPEKKVAAG--PPRR
<i>O. punctata</i> (A0A0E0MMV1)	MGQYCS-----SSSRQPVADHG-AAAAAATDGF-----RKQ-----PEPEKKVAAG--PPRR
<i>O. glumipatula</i> (A0A0E0BT81)	MGQYCS-----SSYRQPVADHGAAAAAAAADGF-----RKQ-----PEPEKKVAAG--PPRR
<i>O. glumipatula</i> (A0A0E0BT80)	MGQYCS-----SSYRQPVADHGAAAAAAAADGF-----RKQ-----PEPEKKVAAG--PPRR
<i>O. brachyantha</i> (J3NDP6)	MGQYCS-----SSRQ-VAGHG--AAVAGDDGFKSCRQKQQQQQPETGKRAA--PPRR
<i>L. perrieri</i> (A0A0D9XZQ8)	MGQYFS-----SSSRKTVADHAGGGATAAGGDFK--WQE-----LEK-----R
<b>Consensus amino acid</b>	MGQ . . . A . . . . Q . . . .

<i>H. vulgare</i> (CISP1)	-TKAMNKYYKSSSKDDLVL RATLDSITRMG-----
<i>Z. mays</i> (ACG47063.1)	AAAHMNQPYQASSNDELVLVSLDSITKIG-----
<i>Z. mays</i> (ACG44042.1)	AAAHMNQPYQASSNDELVLVSLDSITKIG-----
<i>S. bicolor</i> (KXG23553.1)	AAAHMNQPYQASSNDELVLVSLDSITKIG-----
<i>S. italica</i> (XP_004962911)	AAAHMNQPYHASSNEELVLVSLDSITKIG-----
<i>O. punctata</i> (A0A0E0MMV0)	AAAHMNQPYHASSYDEMVLVSLDSITKIM-----
<i>O. punctata</i> (A0A0E0MMV1)	SRKAMRHAYDASSHGDLVLVSLDSITKIGL-----
<i>O. glumipatula</i> (A0A0E0BT81)	SRKAMRHAYDASSHGDLVLVSLDSITKIG-----
<i>O. glumipatula</i> (A0A0E0BT80)	SRKAMRHAYDASSHGDLVLVSLDSITKIG-----
<i>O. brachyantha</i> (J3NDP6)	SRKAMRHAYDASSHGDLVLVSLDSITKIGLKKKFQDWKIISADHFESIHP
<i>L. perrieri</i> (A0A0D9XZQ8)	--KAMKHAYDASGQDLVLVSLDSITKIG-----
<b>Consensus amino acid</b>	SRKGMKHAYDASNKDDLVLVSLDAITKIGWRAAWFLGDGVSSISPARALS
	M..Y..S. ..VL ..LD.IT...

## 図 2-5 CISP1 とグループ A に属する相同遺伝子のアミノ酸配列の比較

CISP1 とグループ A に属する相同タンパク質の推定アミノ酸配列を比較した。高い相同性のアライメントを作成する上で欠落するアミノ酸の部位は、ダッシュ(-)で示した。

### 第三章 CISP 遺伝子の器官別発現様式

#### 1. 研究背景と目的

オオムギには構造の異なる3種類のCISP遺伝子(CISP1, CISP2, CISP3)が存在する。よって、それら遺伝子の機能的な違いの有無を確かめるため、器官別の発現様式を調べた。

#### 2. 材料と方法

##### (1) オオムギの栽培

実験には、六条オオムギの栽培品種であるミノリムギ(*Hordeum vulgare* L. cv. Minorimugi)を用いた。種子の滅菌は、2%高度さらし粉( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ )溶液に種子を移し、スターラーを利用して30分間攪拌することで行った。その後、種子をザルにあけて滅菌液を捨て、流水で滅菌液の臭いがなくなるまで洗浄した。滅菌した種子は、タオル(ぬるま湯で洗い、適度に絞る)の間に挟み、密閉できるタッパに入れて25°Cの暗所で48時間放置することで発芽させた。発芽したオオムギの実生は、1mM  $\text{CaCl}_2$  溶液(pH5.5)に浮かべた網に移植し、アルミホイルで遮光した状態で1~2日間放置して根の伸長を促した。その後は、 $\text{CaCl}_2$  溶液から1/5 Hoagland 液体培地に交換し、20°Cの長日条件下(16h明所、8h暗所、光条件は  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ )で水耕栽培した。

表 3-1 1/5 Hoagland 液体培地

$\text{KNO}_3$	1.2 mM	$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.8 mM	$\text{CuSO}_4$	0.04 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.08 mM	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.08 mM
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.04 mM	$\text{H}_2\text{MoO}_4$	0.01 mM
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.6 mM	Fe(III) -EDTA	800 mM

##### (2) Total-RNA の抽出

Total-RNA の抽出には発芽後2週目のオオムギを用いた。植物体を根、基部、葉鞘、葉身に



分け、それぞれの組織(約 2.5 g)を乳鉢と乳棒を使って液体窒素で粉末にし、そこに表 3-2 に記載した Elution buffer 10 ml と 10 % Sodium lauroyl sarcosinate 0.5 ml 溶液を加え、液状になるまですり潰した。その後、遠心管にサンプルを移して 15 ml の水飽和フェノール:クロロホルム=1:1 を加え、1 分間激しくボルテックスした。次に、遠心分離(12,000 rpm、10 min、4 °C)を行い、核酸を含んだ上清を新しいチューブに回収し、そこに 10 ml のクロロホルムを加えて再度攪拌と遠心分離の操作を行った。そして、最終的に得られた上清に対して 1/10 容量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液と 2.5 倍量のエタノールを加えて攪拌し、遠心分離(12,000 rpm、10 min、4 °C)で核酸を沈殿させた。その後、70 %エタノールで洗浄して乾燥させた。回収した核酸は 1 ml の TE 溶液に溶かし、分光光度計で濃度を測定するとともにアガロース電気泳動法で分解の有無を確認した。

**表 3-2 Elution buffer**

Guanidinium thiocyanate	4 M
Tris-HCl, pH 7.5	0.1 M
2-mercaptoethanol	1 %

### (3) Total-RNA の精製 (DNaseI 処理)

抽出した核酸溶液に混入する DNA を完全に除去させるため、DNaseI で核酸溶液を処理して DNA を分解させた。

マイクロチューブに表 3-3 に記した組成で各々の溶液を入れ、37 °C で 15 分間反応させた。その後、反応液に 150  $\mu$ l の MQ 水と 200  $\mu$ l のフェノール:クロロホルム溶液を加えて激しく攪拌し、遠心分離(12,000 rpm、5 min、4 °C)で分離させて上清を回収した。次に、上清に 200  $\mu$ l のクロロホルムを加えて同様の処理を行った後、常法通りにエタノール沈殿を行い Total-RNA を回収した。回収した Total-RNA は 10 ~ 20  $\mu$ l の TE 溶液に溶かし、分光光度計で濃度を測定するとともにアガロース電気泳動で分解の有無を確認し、使用時まで冷凍保存した。

**表 3-3 DNaseI 処理反応液**

T-RNA (10 µg)	x µl
MQ 水	y µl
10 x buffer	5 µl
DNaseI	1 µl
Total volume	50 µl

**(4) cDNAs の合成**

cDNAs の合成には、逆転写酵素 ReverTra Ace (TOYOBO) を用いた。マイクロチューブに表 3-4 に記した試薬を入れ、95 °C で 2 分間処理した後に氷中に移して急冷させ、RNA の分子内二次構造を解消させた。その後、30 °C で 10 分間放置することでプライマーを RNA にアニールさせ、表 3-5 に記載した酵素反応液を加えて攪拌し、42 °C で 1 時間反応させて cDNAs を合成した。最後に、99 °C で 5 分間熱処理することで酵素を失活させ、氷中に移して急冷させた。そして、PCR による発現解析の鋳型とした。

**表 3-4 逆転写の反応組成 1**

1 µg/µl Total-RNA	2.5 µl
5 pmol/µl Oligo (dT) <sub>12-18</sub>	0.5 µl
5 x RT buffer	2 µl
10 mM dNTPs	1 µl
MQ 水	2 µl

**表 3-5 逆転写の反応組成 2**

100 mM DTT	1 µl
RNase インヒビター	0.5 µl
RevarTra Ace	0.5 µl

### (5) Real-time-PCR(qPCR)法で発現解析

Real-time-PCR 法による発現解析は、イルミナ社製のサーマルサイクラー (Eco Real-Time PCR System) を用いた。発現解析の内部コントロールには *HvEF-1 $\alpha$*  ないしは *HvActin* の遺伝子を用い、3 種類のオオムギ *CISP* 遺伝子の発現を調べた。表 3-6 には反応液の組成を、表 3-7 には標的遺伝子を増幅する為に使用したプライマーの配列を記載した。

表 3-6 Real-time PCR の反応組成

逆転写産物	0.5 $\mu$ l
MQ 水	1 $\mu$ l
qF primer	0.5 $\mu$ l
qR primer	0.5 $\mu$ l
SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes	2.5 $\mu$ l

表 3-7 解析に使用した Primer の塩基配列

#### *CISP1*

Forward primer	5'-CGGAGCAAGTTCAGCCACT-3'
Reverse primer	5'-CGTCCTTGCTTGAGCTTTTG-3'

#### *CISP2*

Forward primer	5'-TACTGGCGATTGCACGAATA-3'
Reverse primer	5'-AGTACATGGCTGGGAGTTGC-3'

#### *CISP3*

Forward primer	5'-TAGAAGGGCAAGGATGGGTC-3'
Reverse primer	5'-TTGTAGATTTGCCGTTTGC-3'

### *HvEF-1α*

---

Forward primer	5'-ATTCAAGTATGCCTGGGTGC-3'
Reverse primer	5'-TAAGCACAGCACAATCAGCC-3'

### *HvActin-1α*

---

Forward primer	5'-GCCGTGCTTTCCTCTATG-3'
Reverse primer	5'-GCTTCTCCTTGATGTCCCTTA-3'

## 3. 結果と考察

### (1) *CISP* 遺伝子の器官別発現様式

発芽後常温条件で栽培されたオオムギを根、基部、葉鞘、葉身に四分割し、それぞれの組織から抽出した Total-RNA を鋳型に Real-time-PCR 法で 3 種類の *CISP* の発現量を調べた。図 3-1 は、それらの発現様式である。その結果、通常の生育条件下では *CISP1* と *CISP3* は根と葉身、*CISP2* は根で発現していることが明らかとなった。ただし、それらの発現量には大きな差があり、根で比較すると *CISP2* の発現は高いものの、*CISP3* はあまり発現していないことが明らかとなった。また、葉身での発現は *CISP1* が一番高いことが明らかとなった。よって、通常の生育条件下では、*CISP1* が葉身で、*CISP2* が根や分裂組織を含む基部で機能していると推測できる。

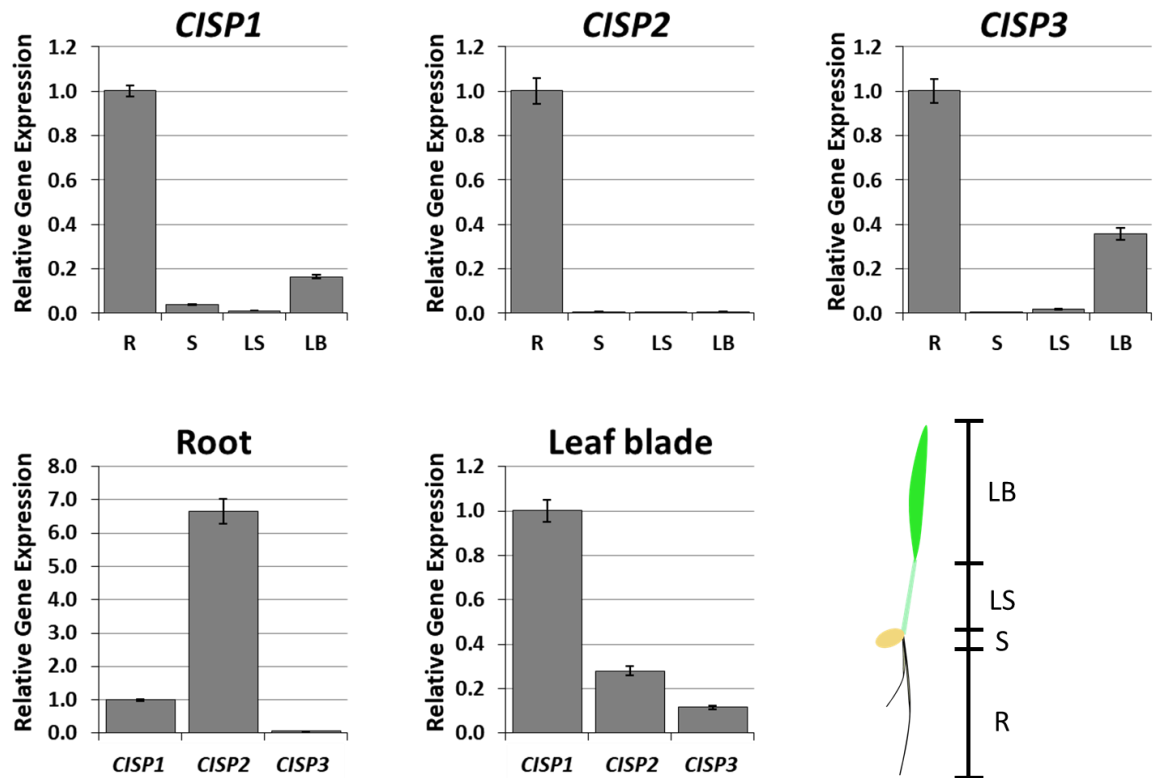


図 3-1 オオムギ *CISP* 遺伝子の器官別発現様式

常温下で栽培したオオムギにおける3種類の *CISP* 遺伝子の器官別発現様式を qPCR 法で解析した結果を示した。R: 根、B: 基部、LS: 葉鞘、LB: 葉身。

## 第四章 低温環境における *CISP* の発現様式と機能解析

### 1. 研究背景と目的

*CISP* は、オオムギの低温応答性遺伝子を HiCEP 法でスクリーニングする過程で単離され、相同な遺伝子が低温耐性を持つイネ科の植物にしか存在しないことが明らかとなっている。これらの結果は、*CISP* がオオムギの低温応答に関与することを示唆していると期待できる。本章では、*CISP* 遺伝子の低温応答性について詳細な発現解析を行うと共に、転写された mRNAs の植物体における局在やタンパク質レベルの機能解析を通じて、低温条件下における *CISP* の役割について解析した。

### 2. 材料と方法

#### (1) オオムギの栽培と低温処理

実験に使用したオオムギの品種とその滅菌・栽培方法は、第三章に記載の通りである。低温処理は、発芽 1 週目のオオムギ実生を低温室 (5 °C) に移し、蛍光灯 (明期 16 時間/暗期 8 時間に設定、光条件は 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 下で栽培することで行った。なお、解析には、低温室で 1 日、27 日間、49 日間 1/5 Hoagland 液体培地で水耕栽培したオオムギを用いた。酸化ストレスの処理は、発芽 1 週目のオオムギ実生を 2 mM の  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加した液体培地 (1/5 Hoagland 液体培地) に移し、蛍光灯 (明期 16 時間/暗期 8 時間に設定、光条件は 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 下で 1 日水耕栽培することで行った。また、低温から常温への温度回復処理は、1/5 Hoagland 液体培地で 27 日低温処理したオオムギを室温 (20 °C) に移すことで行った。また、室温に移す際にはあらかじめ 20 °C に保温した培地に交換した。解析には、室温に戻して 1 時間及び 3 時間経過したオオムギを用いた。

#### (2) シロイヌナズナの栽培

シロイヌナズナの種子に 1 ml の 70% エタノールを加えて攪拌した後、1 ml の滅菌液 (有効塩素濃度 0.5%、次亜塩素酸ナトリウム溶液に Triton X-100 又は Tween 20 を一滴加えたもの) に交換してローテーターで攪拌しながら 15 分間の滅菌処理を 2 回行った。その後、軽く遠心して

滅菌液を除去し、代りに 1 ml の滅菌水を加えて攪拌することで種子を洗浄した。再度滅菌水で洗浄後、種子を表 4-1 に示した MS 培地のプレートに播種した。プレートはサージカルテープでシールするとともにアルミホイルで遮光し、発芽を誘導するために 4 °C の低温室で 2 日間低温処理した。その後、プレートを 20 °C の連続光 (300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 下に移し、発芽して双葉が展開した段階で培土が入ったポットに移して栽培した。

**表 4-1 MS 培地 (pH 5.7)**

Murashige and Skoog basal salt mixture	0.43 %
Surcrose	2.00 %
MES	0.05 %
ビタミン類 (イノシトール、ニコチン酸、グリシン、塩酸ピリドキシン、塩酸チアミン)	1.00 %
gellan gum	0.30 %

## (2) Total-RNA の抽出と cDNAs の合成

低温処理したオオムギを地上部の葉と基部及び地下部の根に分け、各々の組織から Total-RNA を抽出した。Total-RNA の抽出と cDNAs の合成は第三章に記載した方法で行った。また、形質転換シロイヌナズナに於ける *CISP* 遺伝子の発現は RT-PCR 法で確認した。RT-PCR 法に使用した cDNAs は第三章に記載した方法で合成し、解析には表 3-7 に記載したプライマーセットを用いた。PCR 後の増幅産物は、2% アガロースで電気泳動し、常法通りエチジウムブロマイドで染色して UV 照射下で観察した。

## (3) Real-time-PCR (qPCR) 法で発現解析

Real-time-PCR (qPCR) 法による発現解析は、第三章に記載の方法で行った。

## (4) RT-PCR 法で発現解析

RT-PCR 法は本章材料と方法 (2) で合成された cDNA を使用し、表 4-1 に記載した反応液組成と表 4-2 に記載した条件で行った。コントロールには *HvActin* の遺伝子を用い、3 種類のオオムギ *CISP* 遺伝子の発現を調べた。標的遺伝子を増幅する為に使用したプライマーは、第三章

の表 3-7 に記載したものを使用した。

**表 4-1 RT-PCR の反応組成**

逆転写産物	1 $\mu$ l
MQ 水	4.8 $\mu$ l
qF primer	1 $\mu$ l
qR primer	1 $\mu$ l
dNTPs	1 $\mu$ l
10x Buffer	1 $\mu$ l
pTAQ	0.2 $\mu$ l

**表 4-2 RT-PCR の反応条件**

94 °C	2 min	} 26 cycles
94 °C	30 sec	
59 °C	30 sec	
72 °C	1 min	

### (5) *in situ* hybridization

低温処理したオオムギの根を表 4-3 に記載した FAA 固定液に入れ、一晩真空に放置することで組織を固定した。固定した組織は 50、60、70、85、95 %のエタノールに順次移し、各々 30 分ずつ浸漬することで脱水し、その後 100%エタノールに移して一晩放置した。翌日、組織を 100 %エタノール、75 %エタノール:25 %キシレン、50 %エタノール:50 %キシレン、25 %エタノール:75 %キシレン、100 %キシレンで順次 30 分ずつ処理し、組織から完全に脱水させた。脱水した組織は新しいキシレンに移して 42 °C に保温し、パラフィン (Paraplast Plus: Sigma) を少しずつ添加して溶かした。最後は 63 °C で溶かしておいた 100 %のパラフィンに組織を移し、4 時間おきにパラフィンを 6 回以上交換した後で室温にもどし、組織をパラフィンに包埋した。組織はマイクロトームで 8  $\mu$ m の切片に切ってスライドガラス (MATSUNAMI, Japan) に載せた。組織切片は



100 %キシレンで脱パラした後、100、95、85、70、60、50、30、0 %のエタノールに順次移し、各々10分間ずつ放置することで再度水和させた。水和した切片は proteinase K (Wako, Japan) を用いて 37 °C で 30 分間反応させ、タンパク質の分解処理を行った。その後、Proteinase K 処理した切片を 30、50、60、70、85、95、100 %のエタノールに順次移して再び脱水させ、真空で 1 時間乾燥させた。*in situ* hybridization で使用するプローブの作成には、*CISPI* の ORF を pSPT18 プラスミドベクターに連結したプラスミドを使用した。*CISPI* のセンスとアンチセンスプローブは DIG RNA Labeling Kit (Roche, Switzerland) を使って作成した。ハイブリダイゼーションのシグナルは DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche) を用いて検出した。

表 4-3 FAA 固定液

Formaldehyde	3.7 %
Acetic acid	5 %
Ethanol	50 %

#### (6) オオムギタンパク質の抽出

ミノムギの各組織 50 mg を乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で粉碎し、100  $\mu$ l のタンパク質抽出 buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM KCl、0.5 mM EDTA $\cdot$ 2Na、5 % Glycerol) とプロテアーゼ阻害剤 (4 mM DTT と 4 mM PMSF) を加えて液体になるまですり潰し、破碎液をチューブに移して遠心分離 (15,000 rpm、10 °C、10 分) を行った。上清を再度遠心分離 (15,000 rpm、10 °C、10 分) した後で回収し、Bradford 法を利用してタンパク質の濃度を測定した。

#### (7) 大腸菌で *CISP* タンパク質を発現させるためのプラスミドの構築

発現ベクターにはタカラ社の pCold GST と pCold I を使用した。制限酵素 *Nde*I と *Bam*HI で開環させた各々の発現ベクター各 1  $\mu$ l に、末端に *Nde*I と *Bam*HI の認識配列を付加した *CISPI*\_ORF を 3  $\mu$ l ずつ加え、各々に 4  $\mu$ l の ligation mix を加えて 16 °C で 30 分間反応させた。同法で末端に *Nde*I と *Eco*RI の認識配列を付加した *CISPI*\_N 断片と末端に *Xho*I と *Eco*RI の認識配列を付加した *CISPI*\_C 断片も同様に発現ベクターに連結させた。得られた各ライゲーション産物 8  $\mu$ l を 100  $\mu$ l の大腸菌 XL1-blue のコンピテントセルと混合した後、全量を LB 培地(アン

ピシリン終濃度 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) に播き、生育したコロニーから常法でプラスミドを抽出した。*CISP1\_ORF*、*CISP1\_N* 断片と *CISP1\_C* 断片のインサートが挿入されたプラスミドはシーケンスで塩基配列を確認し、変異が入っていないクローン選択して以下の実験に使用した。図 4-1 に作成したプラスミドのマップを示した。

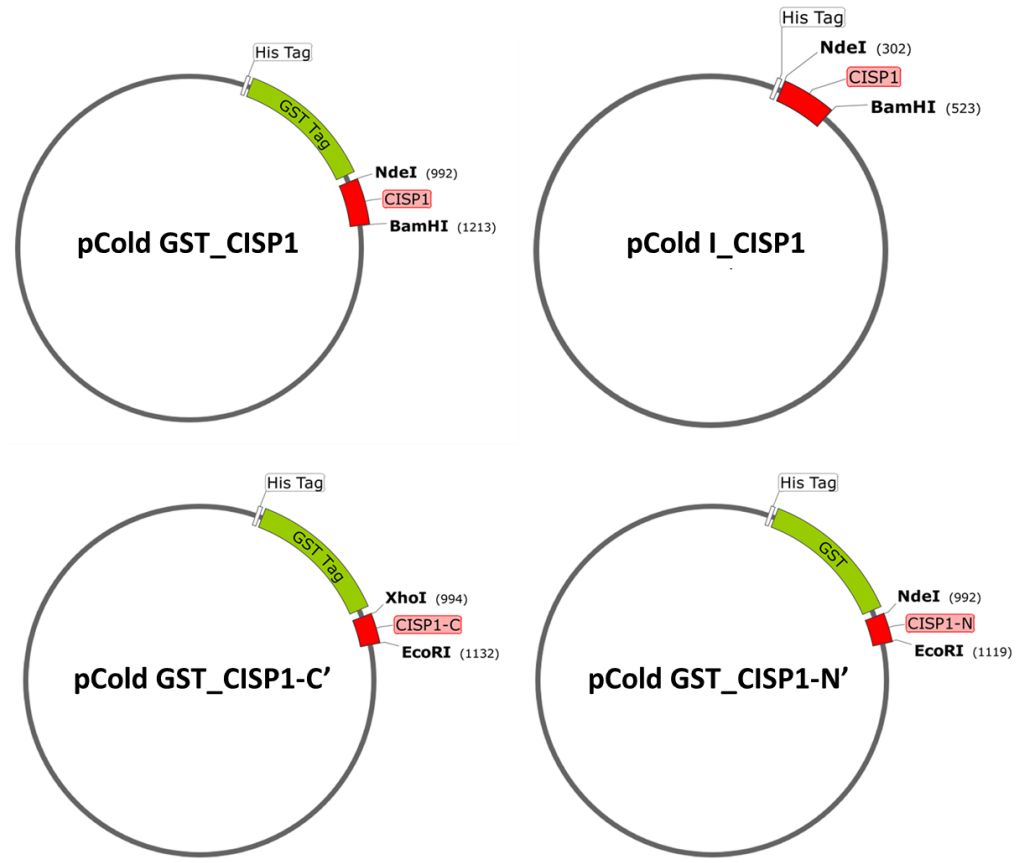


図 4-1 作成した *CISP* タンパク質発現用プラスミドのマップ

*CISP* タンパク質を大腸菌で発現させるために作成したプラスミドのマップ。大腸菌の発現ベクター pCold I に *CISP1* の ORF 領域を連結すると共に、pCold GST に *CISP1* の ORF 領域、N 末端領域、C 末端領域をそれぞれ連結した。

#### (8) 大腸菌によるタンパク質の発現

本章 2-(6) で作成したプラスミド 1  $\mu\text{l}$  を大腸菌 BL21 株のコンピテントセルと混合し、形質転換した。また、コントロールには、空の発現ベクターで形質転換した大腸菌 BL21 株を用いた。

少量の種菌を 4 ml 液体 LB 培地 (アンピシリン終濃度 50  $\mu\text{g/ml}$ ) に植菌して 37  $^{\circ}\text{C}$  で一晩振盪培養した後、100  $\mu\text{l}$  の培養液を 30 ml の液体 LB 培地 (アンピシリン終濃度 50  $\mu\text{g/ml}$ ) に植菌して 37  $^{\circ}\text{C}$  で  $\text{OD}_{600} = 0.5$  になるまで振盪培養した。次に、培養液を氷上で 30 分ほど冷やした後、培地に終濃度 0.1 mM の IPTG を添加して 15  $^{\circ}\text{C}$  で 72 時間振盪培養し、タンパク質の発現を誘導した。誘導後の菌体は遠心分離 (15,000 rpm、10  $^{\circ}\text{C}$ 、5 分) で集菌し、100  $\mu\text{l}$  の 1x PBS を加えてソニケーターで細胞を破碎した。その後、遠心分離 (15,000 rpm、10  $^{\circ}\text{C}$ 、10 分) を行い、上清を可溶性分画、そして沈殿を不溶性分画として回収した。

#### (9) GST-tag 融合 CISP タンパク質の精製回収

500  $\mu\text{l}$  の Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) にフィルターで濾過した可溶性 CISP タンパク質抽出液を添加し、時々穏やかに懸濁しながら低温で 1 時間以上放置した。続けて 2.5 ml の溶解 buffer (PBS, 0.5 % Triton X-100, pH 7.3) と 2.5 ml の洗浄 buffer (PBS, pH 7.3) をカラムに順次添加して樹脂を洗浄した。樹脂に結合した GST-tag 融合 CISP タンパク質の回収は、1 ml の溶出 buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM reduced glutathione, pH 8.0) を添加することで行った。溶出液は 100  $\mu\text{l}$  ずつマイクロチューブに回収し、タンパク質濃度の高い画分を集めて実験に使用した。使用後のカラムは 3M NaCl 溶液と結合 buffer で洗浄し、最後に保存 buffer (1x PBS, 20 % EtOH) を添加して 5  $^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### (10) His-tag 融合 CISP タンパク質の精製回収

500  $\mu\text{l}$  の His60 Ni Superflow Resin (Clontech) を詰めたカラムにフィルター濾過した可溶性タンパクの抽出液 (5  $\mu\text{g}$  以下) を添加し、時々穏やかに懸濁しながら低温で 1 時間以上放置した。続けて 2.5 ml の溶解 buffer (50 mM sodium phosphate, 6 M guanidine-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4) と 2.5 ml の結合 buffer (50 mM sodium phosphate, 6 M guanidine-HCl, 300 mM NaCl, 40 mM imidazole, pH 7.4) をカラムに順次添加して樹脂を洗浄した。樹脂に結合した His-tag 融合 CISP タンパク質の回収は、2.5 ml 溶出 buffer (50 mM sodium phosphate, 6 M guanidine-HCl, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, pH 7.4) で行った。溶出液は 100  $\mu\text{l}$  ずつマイクロチューブに回収し、タンパク質濃度の高い画分を集めて実験に使用した。使用後のカラムには EDTA 溶液と結合 buffer で十分に洗浄し、最後に保存 buffer (1x PBS, 20 % EtOH) を添加して 5  $^{\circ}\text{C}$  で保存した。

## (11) SDS-PAGE とタンパク質の染色

上記実験で得られた各種 tag 融合 CISP の溶出画分に等量の 2x SDS Sample buffer (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 0.0014 mM Bromophenol blue, 20 % Glycerol, 5 % DW) と 1/10 量の 2-Mercaptoethanol を加え、100 °C で 5 分間熱処理した。そして 12 % ポリアクリルアミドゲルにアプライして 1x SDS 泳動 buffer (25 mM Tris, 0.2 Glycine, 0.1 % SDS) を用いて電気泳動を行った。電気泳動後のゲルは、CBB 染色と銀染色を行いタンパク質の分離パターンを確認した。銀染色は以下の手順で進めた。まず、ゲルを固定液 (45 % メタノール、5 % 酢酸) で 1 時間振盪し、純水と交換して 10 分間の振盪を 2 回行った。次に、増感液 (0.126 mM チオ硫酸ナトリウム) に移して 1 分間振盪し、純水と交換して 1 分間の振盪をさらに 2 回行った。その後、銀染色液 (0.1175 mM 硝酸銀) で 30 分間振盪し、純水と交換して 1 分間の振盪を 2 回行った。最後にドラフト内で現像液 (0.041 % ホルマリン、18.8 mM 炭酸ナトリウム) と置換してバンドが出現するまで手で振盪し、バンドが適当な濃さになった時点でゲルを停止液 (2 % 酢酸) に移して反応を停止させ、水洗後にタンパク質のバンドパターンを観察した。

## (12) Western blot 法

はじめに、Hybond-P PVDF メンブラン (Amersham 社) をメタノールに浸した後、電気泳動したゲルと共に転写 buffer (25 mM Tris, 0.2 M Glycine, 0.1 % SDS, 20 % メタノール) に 30 分間浸し、セミドライブロッキング装置に濾紙 3 枚、ゲル、メンブラン、濾紙 3 枚の順で重ね、ガラス棒で空気を完全に抜いてから通電し、タンパク質をメンブランに転写した。転写後の PVDF メンブランはブロッキング液に浸して室温で 1 時間振盪した後、TBS-T で 2 回リンスし、新しい TBS-T で 15 分間、さらに液を交換して 5 分間の振盪洗浄を 2 回行った。そして、メンブランを TBS-T で 5,000 倍に希釈した抗 CISP ペプチド抗体の溶液に移して 1 時間振盪した後、TBS-T で 15 分間、さらに 5 分間の洗浄を 3 回行った。次に TBS-T で 20,000 倍に希釈した HRP 標識 2 次抗体の溶液にメンブランを移して 1 時間振盪した後、TBS-T で 15 分間の洗浄と、5 分間の洗浄をあわせて 4 回行った。洗浄後、PVDF メンブランに ECL plus (Amersham 社) 検出液をかけて均一にのばした後、暗室で X 線フィルムを重ねてカセットに収納し、数分から数時間露光した。図 4-2 に実験に使用した 3 種類の抗 CISP ペプチド抗体を作成するのに利用したペプチドの配列と CISP のアミノ酸配列上の位置を示した。

CISP1	1	MHTHTQTKKKMGQSPLIRLPEAEQVQPLVAIRGSNRMEQLGKSTKAMNKYYKSSSKDDLVLRLATLDSITRMG	72
Anti-CISP1-N		MGQSPLIRLPVAEQVQP	
Anti-CISP1-M		RGSNRMEQLGKSTKAMNKY	
Anti-CISP1-C		KSTKAMNKYYKSSSKDDLVL	

図 4-2 抗 CISP1 ペプチド抗体作成に使用したアミノ酸配列

### (13) ssRNA の合成と Gel Shift Assay

CISP タンパク質の核酸結合解析は、His6-GST と His6-CISP2 タンパク質を精製して使用した。ssRNA (一本鎖 RNA) は、約 2,000 bp の塩基配列を持つ *CsIF* が連結された pT7Blue-2 T-Vector を鋳型にして常法に従って T7 RNA Polymerase (SIGMA) で合成した。タンパク質と核酸との結合反応は 1x PBS (pH 7.4) に精製したタンパク質と ssRNA を混合し、氷中で 20 分間インキュベートすることで行った。インキュベートした混合液は 2% アガロースを用いて電気泳動した。

## 3. 結果と考察

### (1) CISP 遺伝子の低温応答性

低温室 (5 °C) で 0、1、27、49 日間処理したオオムギの根より抽出した RNA を用いて解析を行った結果、3 種類の CISP 遺伝子は全て低温処理に伴って発現が誘導されることや、その発現量が処理期間の長さに依存して上昇することが明らかとなった (図 4-3)。ただし、発現パターンは 3 種類の遺伝子で異なり、CISP1 と CISP3 が 49 日まで発現が上昇し続けるのに対して、CISP2 の発現は 27 日以降に顕著な上昇が確認できなかった。よって、CISP2 は発現の応答性が高く、一定の発現レベルに到達すると恒常的に発現が維持されることがわかった。図 4-4 は 3 種類の CISP 遺伝子の発現レベルを低温処理 49 日目の根で比較した結果であるが、CISP3 は CISP1 や CISP2 と比較すると、その発現レベルは極めて低いことが明らかとなった (図 4-4)。また、図 4-5 は RT-PCR 後の産物を電気泳動して確認した結果である。PCR の増幅が一部最大に達しているため発現量の差を正確に示すものではないが、CISP2 の発現が CISP1 と CISP3 に比べて高いことが同時に確認できた。

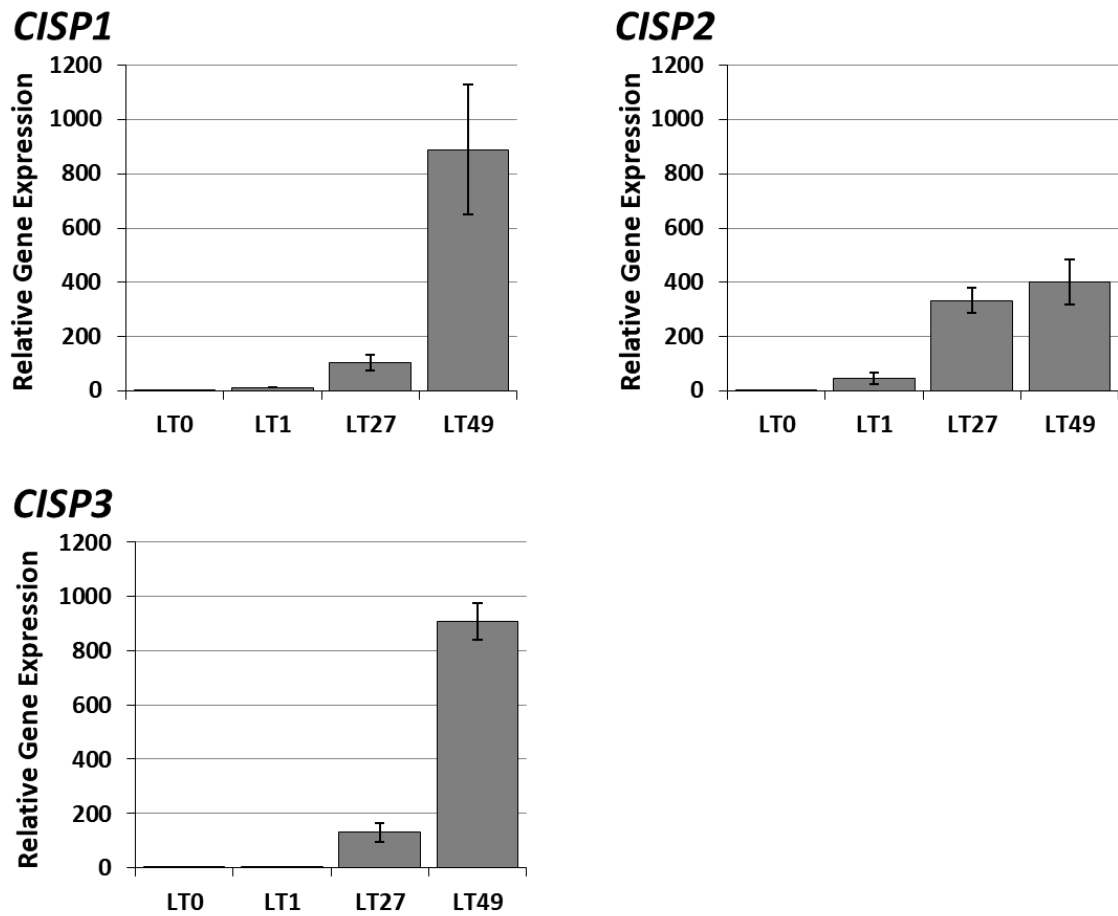


図 4-3 *CISP* 遺伝子の低温に対する発現応答(根、qPCR 法)

低温 (5°C) 処理したオオムギの根における3種類の *CISP* 遺伝子の発現様式を qPCR 法で解析した結果を示した。LT0:低温未処理、LT1:低温処理 1 日目、LT27:低温処理 27 日目、LT49:低温処理 49 日目。

## LT49 日

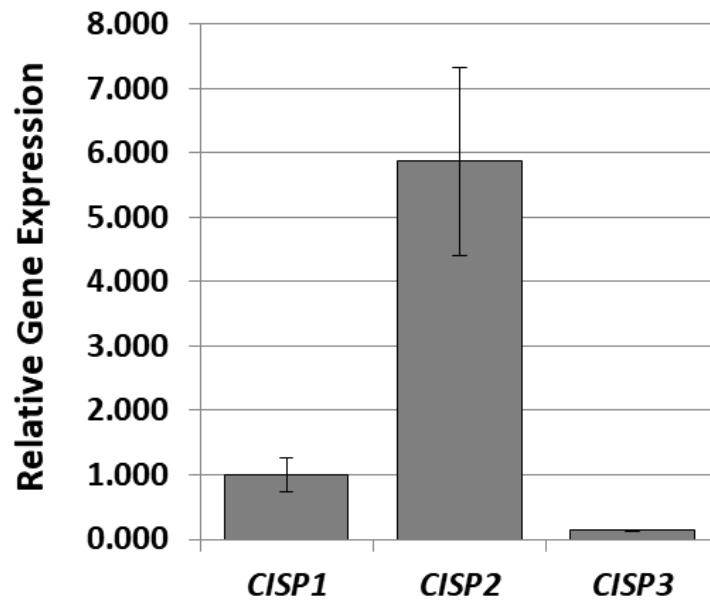


図 4-4 3 種類の *CISP* 遺伝子の相対的な発現レベル(根、qPCR 法)

49 日間低温(5°C)処理したオオムギの根における3種類の *CISP* 遺伝子の発現様式を qPCR 法で解析した結果を示した。

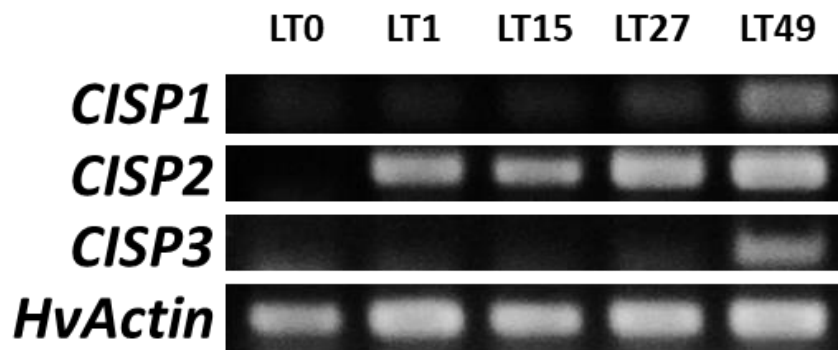


図 4-5 *CISP* 遺伝子の低温に対する発現応答(根、RT-PCR 法)

低温(5°C)処理したオオムギの根における3種類の *CISP* 遺伝子の発現様式を RT-PCR 法で解析し、アガロース電気泳動で視覚化した結果を示した。LT0:低温未処理、LT1:低温処理 1 日目、LT15:低温処理 15 日目、LT27:低温処理 27 日目、LT49:低温処理 49 日目。

また、葉における *CISP* 遺伝子の低温応答性を調べた結果(図 4-6)、*CISP1* と *CISP2* も低温処理に伴って発現上昇することが明らかとなった。しかし、*CISP3* に関しては、発現が検出できなかった。これらの結果から、葉に於ける *CISP* 遺伝子の低温応答は、根と同じ傾向であるものの上昇レベルは根ほど高くないことが明らかとなった。よって、*CISP* 遺伝子の主な作用部位は根であることが明らかとなった。

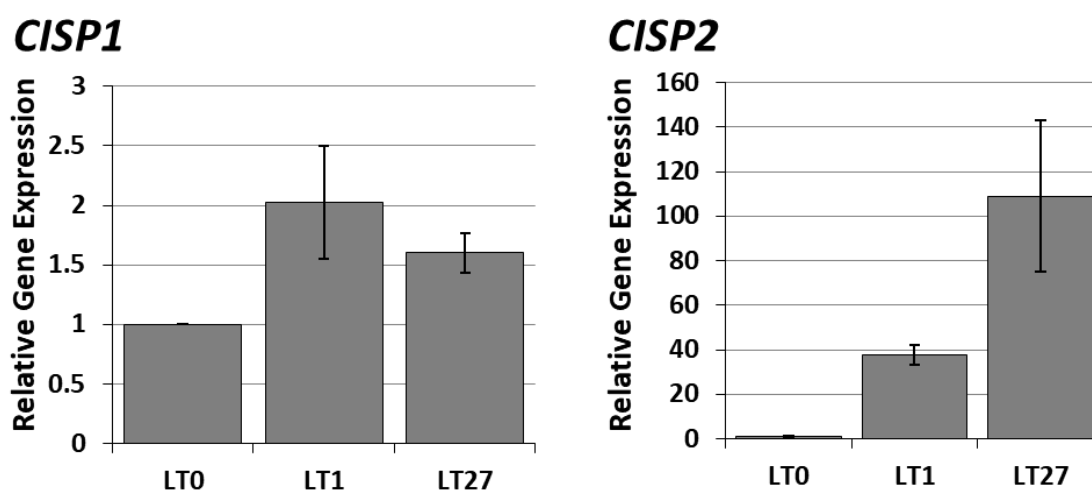


図 4-6 *CISP* 遺伝子の低温に対する発現応答(葉、qPCR 法)

低温 (5°C) 処理したオオムギの葉における *CISP1* 遺伝子と *CISP2* 遺伝子の発現様式を qPCR 法で解析した結果を示した。LT0: 低温未処理、LT1: 低温処理 1 日目、LT27: 低温処理 27 日目。

## (2) *CISP* 遺伝子の酸化ストレス応答性

長期にわたって低温下で植物を栽培すると光合成能力が低下し、酸化ストレスを受けることが知られている。よって、*CISP* 遺伝子の低温応答が酸化ストレスによる影響である可能性が考えられるため、その影響を調べた。オオムギのシードリングを 2 mM の過酸化水素を添加した培地に移して 1 日処理することで酸化ストレスを与え、*CISP* 遺伝子の発現を調べた。その結果、*CISP* の発現は上昇せず低下することが確認できた(図 4-7)。発現低下は植物体の代謝が酸化ストレスで低下したためと考えられる。また、この処理による植物体自体のダメージ(葉の黄化等)は見られなかった。よって、長期の低温による *CISP* の発現上昇は、酸化ストレスに関係なく低温特異



的な応答であることが明らかとなった。

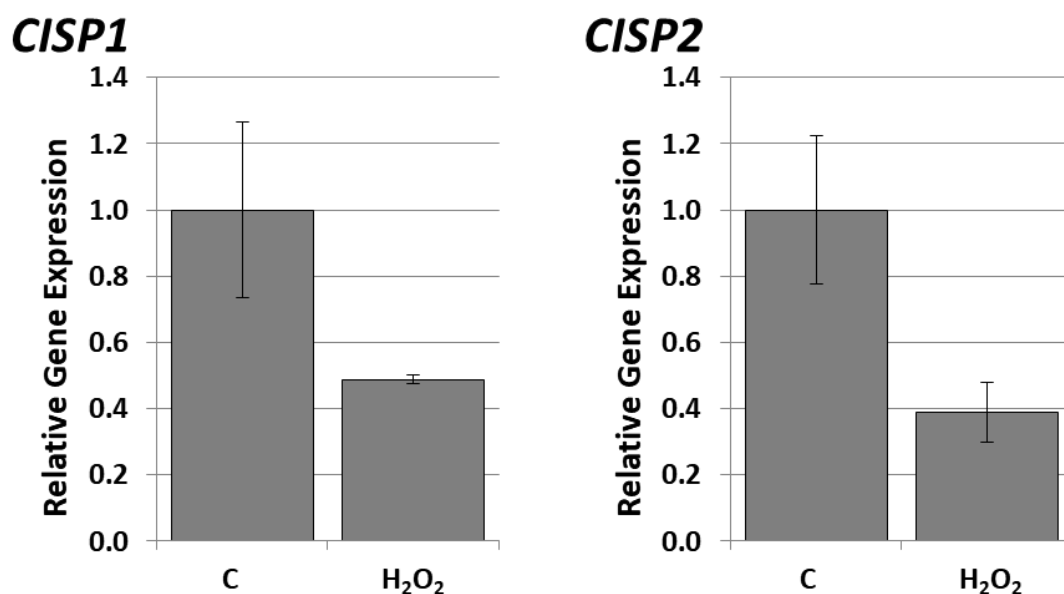


図 4-7 *CISP* 遺伝子の酸化ストレスに対する発現応答(根、qPCR 法)

過酸化水素で処理したオオムギの根における *CISP1* 遺伝子と *CISP2* 遺伝子の発現様式を qPCR 法で解析した結果を示した。C:コントロール(過酸化水素無添加の培地で処理)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:2 mM の過酸化水素添加培地で処理。

### (3) 低温から室温回復後の発現様式

低温応答性遺伝子は、低温ストレスが解消された後で二つの発現パターンを示す。一つは、ストレスが解消されたと同時に発現応答が止まり、転写された mRNA が時間と共に徐々に減少して応答前のレベルに戻るパターンである。ほとんどの低温応答性遺伝子はこの発現様式を示す。もう一つは、春化に関与する遺伝子に見られる発現パターンで、低温ストレスが解消された後も、その発現レベルが一定に維持されるタイプである。本実験では、*CISP* 遺伝子の低温応答がどちらのタイプに分類されるのかを調べた。27 日間低温処理したオオムギを室温 (20°C) に移して、0、1、3 時間後の根における *CISP* の発現を調べた結果、*CISP* の発現レベルは常温に移して 1 時間以内にはほぼ低温処理前のレベルに戻ることが明らかとなった。この結果から、おそらく *CISP* は低温環境下では不可欠であるが、逆に常温環境下では植物にとって不都合な作用をするタンパク質であると考えられる。急速な発現低下はその対処に重要であると推測した。

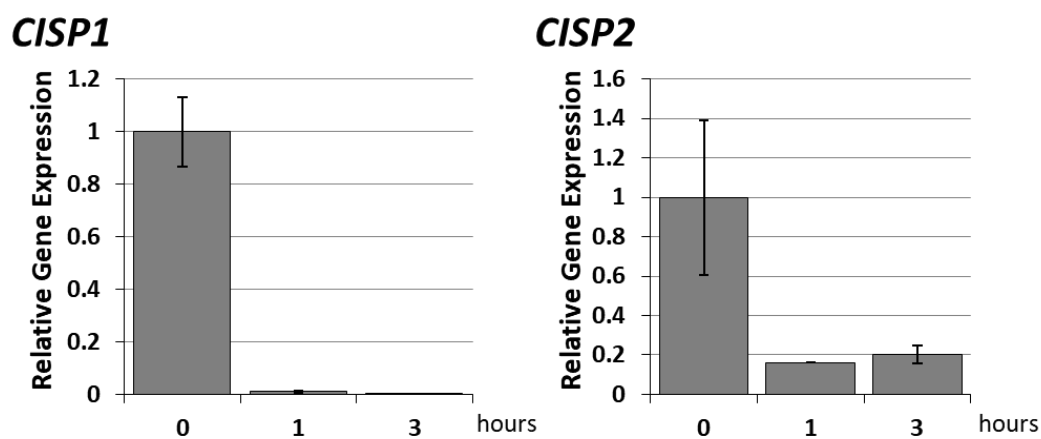


図 4-8 *CISP* 遺伝子の常温回復に伴う発現変化(根、qPCR 法)

5 °C で 27 日低温処理したオオムギを常温 (20 °C) に戻した後で *CISP1* 遺伝子と *CISP2* 遺伝子の発現様式を qPCR 法で解析した結果を示した。0:低温処理 27 日目、1:常温に戻して 1 時間後、3:常温に戻して 3 時間後。

#### (4) *CISP* 遺伝子の根における局在解析

低温処理したオオムギの根における *CISP1* mRNA の局在を確認した。図 4-9 は、その結果である。図に示したように、*CISP1* mRNAs のシグナルは根の根端や側根の分裂組織に観察された。また、そのシグナルは *CISP1* のセンスプローブ(コントロール)では検出されなかった。よって、*CISP* は根の分裂組織が低温下でダメージを受けなくするための恒常性維持や保護に関与している可能性が高いと考えられる。

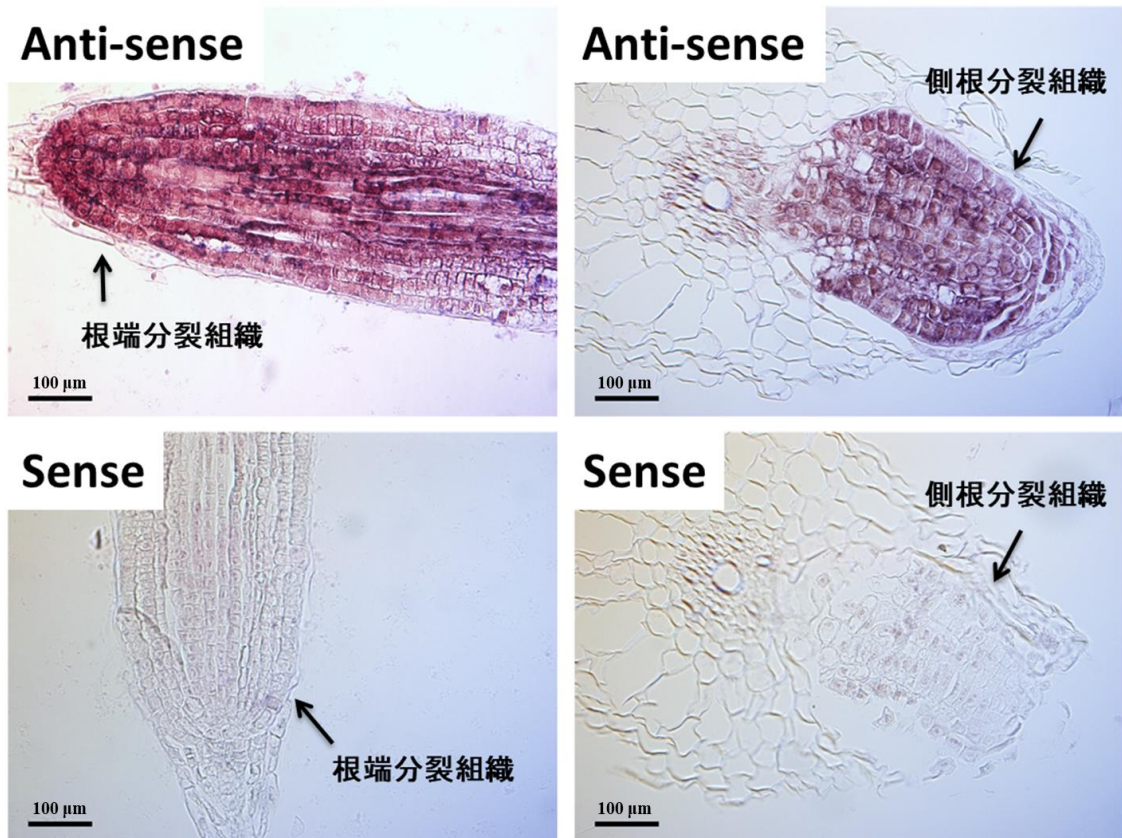


図 4-9 *CISP1* mRNA の局在解析(根)

低温処理したオオムギの根における *CISP* mRNAs の局在を *in situ* hybridization 法で解析した結果を示した。anti-sense: anti-sense probe を使って *CISP* mRNAs を検出したシグナル。sense: sense probe を使って検出したシグナル(コントロール)。

#### (5) オオムギ *CISP* タンパク質の検出

*CISP1* 遺伝子の発現が低温に顕著に応答することか明らかになったことから、次にタンパク質レベルでの発現応答を調べた。実験には、*CISP1* 遺伝子の発現が顕著に誘導される低温処理 10 週目のオオムギから抽出したタンパク質と低温処理 8 週目のオオムギの根と根端から抽出したタンパク質を用いた。実験には *CISP1* の推定アミノ酸配列の情報をもとに作成した抗ペプチド抗体(anti-*CISP1*-N, anti-*CISP1*-M, anti-*CISP1*-C)を使用し、ウエスタンブローティング法で解析した。その結果、三種類の抗体いずれを利用してても予想サイズの 7.5 kDa 周辺に *CISP1* の特異的なバンドは確認できなかった(図 4-10)。よって、*CISP1* タンパク質が植物体内で修飾を受けている可能性や、*CISP1* が分解されやすいタンパク質である可能性が示唆された。

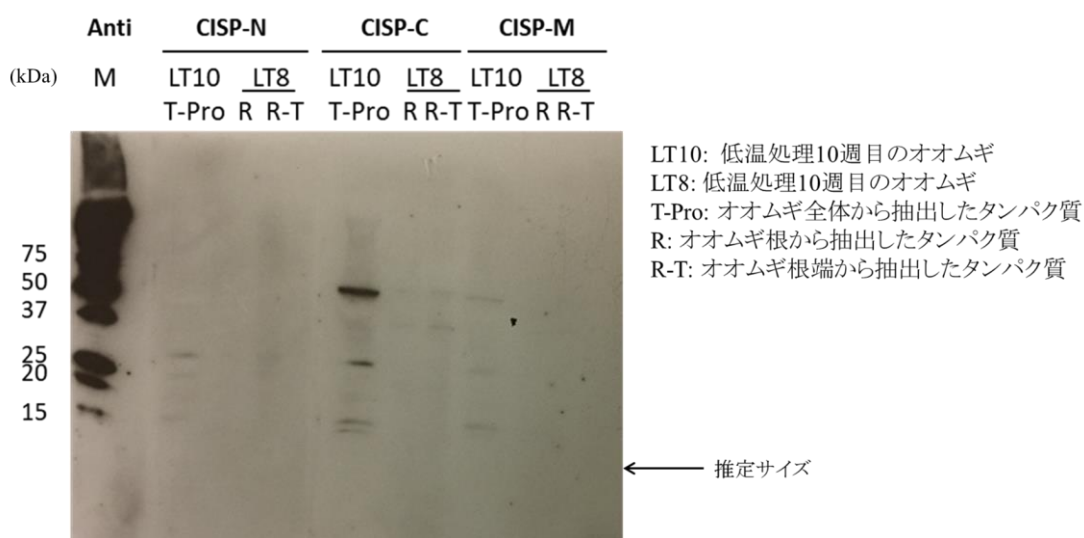


図 4-10 CISP1 タンパク質の検出

低温処理したオオムギから抽出した粗タンパク質を用いて CISP タンパク質を Western Blot 法で検出した結果を示した。

CISP-N: anti-CISP-N 抗体で検出、CISP-C: anti-CISP-C 抗体で検出、CISP-M: anti-CISP-M 抗体で検出、M: サイズマーカー。

#### (6) 各種タグ融合 CISP タンパク質の検出

大腸菌で発現誘導させた GST 融合 CISP1 タンパク質をアクリルアミド電気泳動法で分離し、anti-GST, anti-His, anti-CISP-M と anti-CISP-C を用いてウエスタンブロット解析を行った結果、GST 融合 CISP1 タンパク質が検出された(図 4-11)。これは、anti CISP-M と anti CISP-C 抗体に CISP タンパク質の認識能力があることを示している。しかし、大腸菌で発現したタンパク質が分解したようなパターンが見られたので、図 4-10 で CISP1 が検出できなかったのは、植物体内では CISP1 タンパク質が分解されたことが原因であると考えられる。

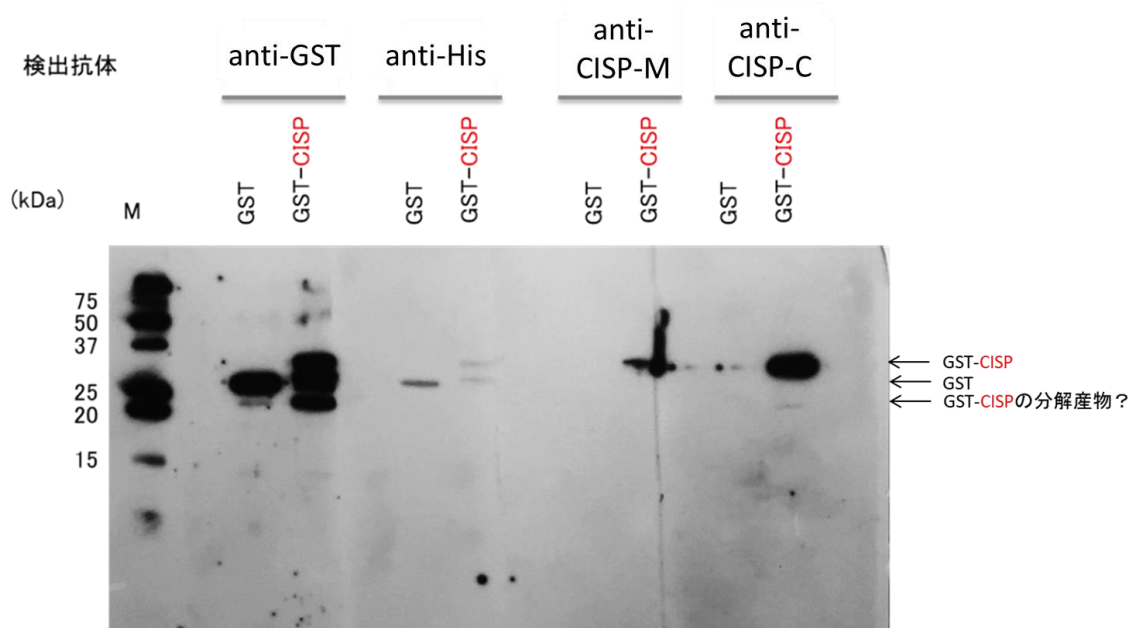


図 4-11 Western blot 法による CISP 検出

大腸菌で人工合成した CISP タンパク質を Western Blot 法で検出した結果を示した。

anti-GST: anti-GST 抗体、anti-His: anti-His 抗体、anti-CISP-M: anti-CISP-M 抗体、anti-CISP-C: anti-CISP-C 抗体。M: サイズマーカー

一。GST: 大腸菌で発現させた GST タンパク質を泳動、GST-CISP: 大腸菌で発現させた GST-CISP タンパク質を泳動。

### (7) His タグ融合 CISP タンパク質の核酸結合性

通常、低温応答性遺伝子の翻訳産物の機能は主として以下 3 つに分類される。第一は、デハイドリンのように糖やアミノ酸などと共に適合溶質として働き、細胞内の脱水を防止する働きである。第二は、細胞膜を組成する飽和脂肪酸の不飽和化を進める働きである。そして第三は RNA シャペロンである。RNA シャペロンとして機能するタンパク質は低温下で細胞内の mRNA と結合し、mRNA が低温下で二次構造を形成するのを抑制するとともに、形成した mRNA の分子内二次構造を解離することで翻訳活性を維持する働きを持つと考えられている。CISP1 タンパク質は親水性の低分子塩基性タンパク質であることから、3 つの機能の中では RNA シャペロンとして働いている可能性が最も高いと考えられる。よって、この仮説を検証するため、大腸菌で His タグ融合 CISP1 タンパク質を人工合成し、RNA との結合を確認した。図 4-12 は、ゲルシフトアッセイを行った結果である。転写した RNA に 0、1、10、100、500、700 pmol の CISP1 タンパク質を添加し、アガロースゲル電気泳動を行った。その結果、100 pmol 以上の CISP1 を添加した場合

にRNAのバンドシフトが確認できた。一方、同様のバンドシフトはGSTタンパク質(コントロール)では確認できなかった。低温環境下で合成される核酸結合能を持つタンパク質の中にはRNAシャペロンとして働くタンパク質もあり[20]、CISP1タンパク質も同様の機能を持ち低温環境下でmRNAの分子内二次構造の形成阻害に関わる可能性のあることが明らかとなった。

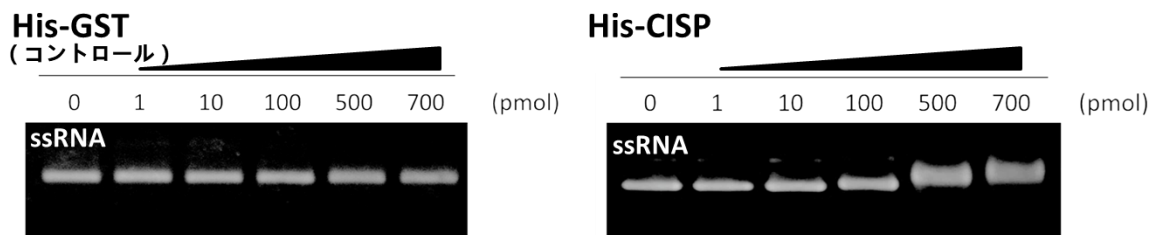


図 4-12 ゲルシフトアッセイによる CISP と ssRNA の結合解析

精製した GST タンパク質と CISP タンパク質に対する一本鎖 RNA の結合をゲルシフト法で解析した。His-GST: His-GST タンパク質を用いた解析結果(コントロール)、His-CISP: His-CISP タンパク質を用いた解析結果。ssRNA: 一本鎖 RNA。

### (8) CISP1 過剰発現シロイヌナズナの確認

実験に使用した形質転換シロイヌナズナで *CISP1* 遺伝子が発現していることを確認するため、PCR で導入した *CISP1* 遺伝子の有無を確認した。その結果、図 4-13 に示したように *CISP1* に特異的なバンドが確認できた。ただし、オオムギと同様、当研究室が持つ 3 種類の抗体はタンパク質の検出は出来なかった。よって、強制的に発現させても多くは分解されている可能性が高いと思われる。そのためか、形質転換植物の表現型については、野生型と比べて顕著な生長や形態の差が見られなかった。

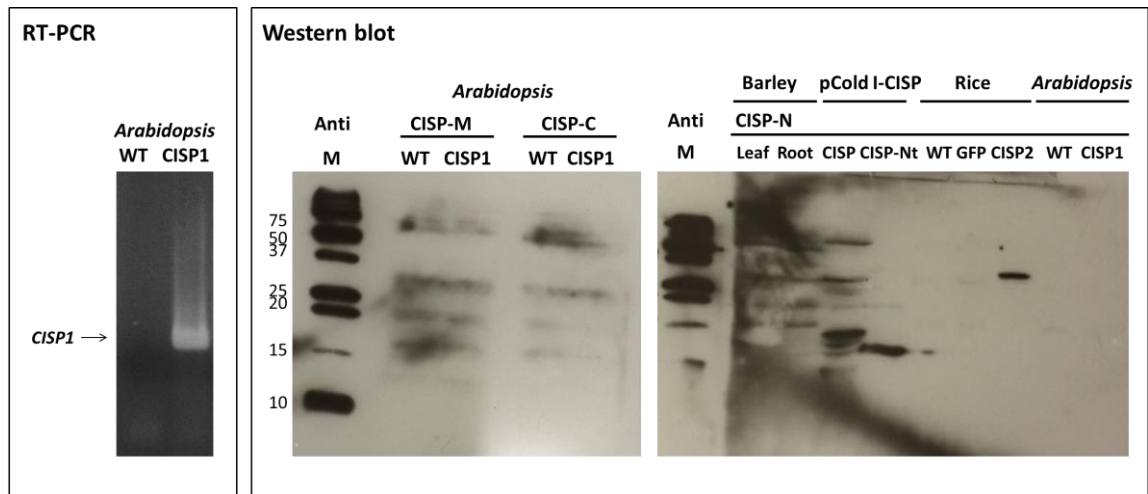


図 4-13 形質転換シロイヌナズナにおける *CISP* 遺伝子とタンパク質の発現確認

*CISP* を過剰発現させたシロイヌナズナから抽出した粗タンパク質を用いて Western blot 法で *CISP* タンパク質の解析を行った結果を示した。Arabidopsis: シロイヌナズナから抽出した粗タンパク質、Barley: オオムギから抽出した粗タンパク質、pCold I-*CISP*: 大腸菌で人工合成した *CISP* タンパク質、Rice: イネから抽出した粗タンパク質。CISP-N: anti-CISP-N 抗体で検出、CISP-C: anti-CISP-C 抗体で検出、CISP-M: anti-CISP-M 抗体で検出。M: サイズマーカー。WT: 野生型(コントロール)、CISP1: *CISP1* タンパク質を過剰発現させた植物、Leaf: 低温処理したオオムギの葉から抽出した粗タンパク質、Root: 低温処理したオオムギの根から抽出した粗タンパク質、CISP: *CISP1* タンパク質、CISP-Nt: *CISP1* の N 末端側タンパク質、GFP: GFP タンパク質、CISP2: *CISP2* タンパク質。

### (9) 形質転換シロイヌナズナの凍結耐性解析

低温順化していない野生のシロイヌナズナは $-4^{\circ}\text{C}$ までの低温に耐えられるため、 $-4^{\circ}\text{C}$ 以下の温度で凍結耐性実験を行った。図 4-14 は $-7^{\circ}\text{C}$ で処理して二日目の結果である。完全に枯れた植物は白い枠で囲んだ。結果は、*Col-0*と比べて *CISP1* 過剰発現シロイヌナズナは生存個体が多く、低温耐性が上がっていることが明らかとなった。更に、プレート上で発芽させた野生型と *CISP1* 過剰発現シロイヌナズナを7日低温順化した後に凍結耐性実験を行った結果(図 4-15)、低温順化していない場と同じ、コントロールの *Col-0*と比べて *CISP2* 過剰発現シロイヌナズナでは葉が黄化していない個体が多く、低温耐性が上がっている傾向がみられた。

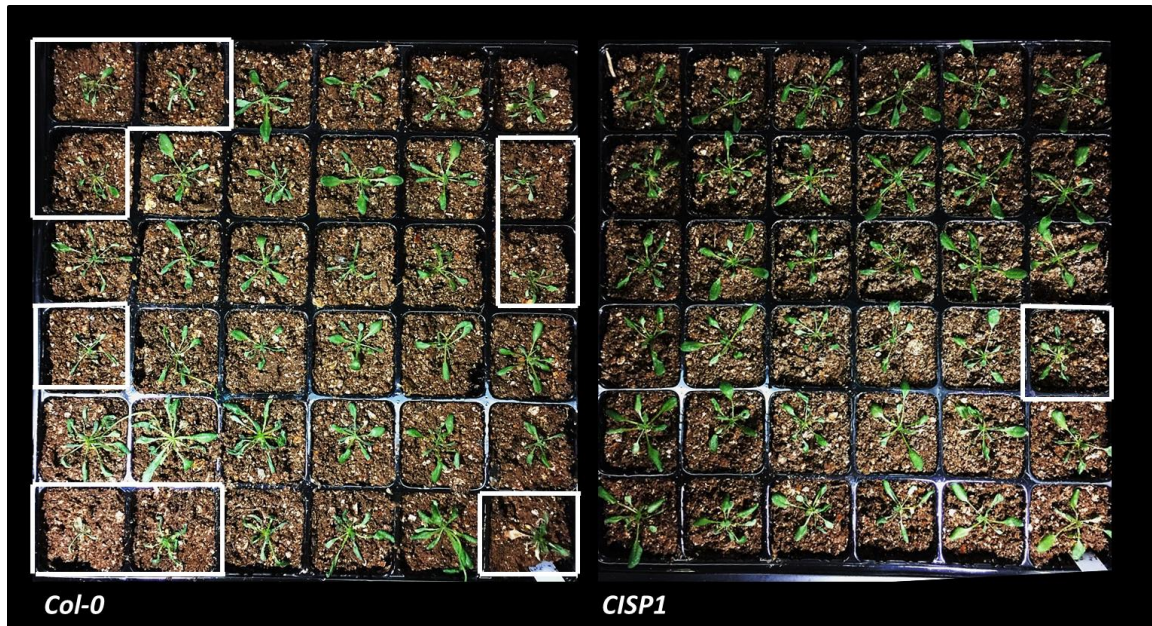


図 4-14 未低温順化の形質転換植物 (*CISP* 過剰発現シロイヌナズナ) を持いた凍結耐性

低温させていないシロイヌナズナを用いて凍結耐性実験を行った結果を示した。枯死したシロイヌナズナは白枠で囲った。*Col-0*: 非形質転換シロイヌナズナ (コントロール)、*CISPI:CISPI* を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナ。

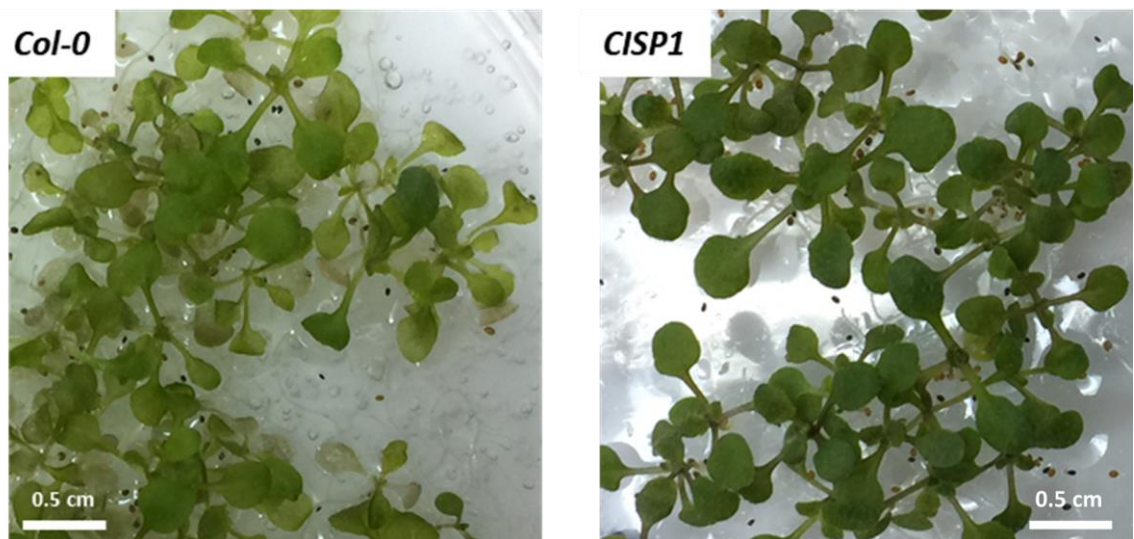


図 4-15 低温順化した形質転換植物 (*CISP* 過剰発現シロイヌナズナ) を持いた凍結耐性

5°Cで一週間低温順化させたシロイヌナズナを用いて凍結耐性実験を行った結果を示した。*Col-0*: 非形質転換シロイヌナズナ (コントロール)、*CISPI:CISPI* を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナ。



## 第五章 過剰な塩や重金属環境における *CISP* の発現様式と機能解析

### 1. 研究背景と目的

これまで植物で単離されている低温応答遺伝子の多くは、塩や乾燥などのストレスに対しても発現応答することが知られている。よって、本章では、過剰な塩や重金属に対する *CISP* の発現様式を詳細に調べた。

### 2. 材料と方法

#### (1) オオムギの栽培とストレス処理

実験に使用したオオムギ品種とその滅菌・栽培方法は、第三章に記載の通りである。過剰な塩ストレスと重金属ストレスの処理は、発芽 1 週目のオオムギ実生に正常な生育に必要な量の 5 倍量と 25 倍量の NaCl (0.2 mM と 1 mM), CuSO<sub>4</sub> (2 μM と 10 μM), ZnCl<sub>2</sub> (4 μM と 20 μM), MnCl<sub>2</sub> (5 μM と 25 μM) を 1/5 Hoagland 液体培地にそれぞれ添加することで与えた。発現解析は、根と葉に分けて行なった。また、重金属欠乏ストレスは、CuSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> を各々含まない培地にオオムギを移し、0、1、7 日水耕栽培することで与えた。

本実験には、ユビキチンプロモーターで *CISP*-GFP 融合タンパク質を過剰発現させた形質転換イネ 3 系統 (*CISP*-GFP\_line1, *CISP*-GFP\_line17, *CISP*-GFP\_line22) も用いた。コントロールには、GFP のみを発現させた形質転換イネ 1 系統 (GFP) と非形質転換イネ (WT) を用いた。一穂用籾摺器 (藤原製作所) を使って脱穀した各イネの種子を 70 % エタノールで 1 分間処理した後、1,000 倍に希釈した農薬 (ベンレート) を用いて通常の方法で滅菌した。そして、濾紙を敷いたシャーレに種子を移し、種子が半分つかるぐらいまで 1,000 倍希釈のベンレートを加え、人工気象器 (27 °C、暗所) で発芽するまで放置した。滅菌に使用した 1,000 倍希釈のベンレートは翌日水道水に置換して取り除いた。なお、シャーレの水は発芽するまで毎日交換した。発芽したイネは、バーミュキュライトをつめたポットに移植し、温室 (25 °C) で栽培した。肥料には、1,000 倍希釈のハイポネックスを使用した。また、重金属の吸収を測定するために用いたイネは、バーミュキュライトをつめたポットに植物体を植え、10 μM の CuSO<sub>4</sub> と MnCl<sub>2</sub> を添加したハイポネックスを与えて、14 日間栽培した。

## (2) タンパク質および RNA の抽出と検出

タンパク質および RNA の抽出は、第三章と同じ方法で行った。また、形質転換イネに於ける *CISP* 遺伝子の発現は RT-PCR 法で確認した。RT-PCR 法による解析に使用した cDNAs は第三章に記載した方法で合成し、解析には表 3-7 に記載したプライマーセットを用いた。PCR 後の増幅産物は、2%アガロースで電気泳動し、常法通りエチジウムブロマイドで染色して UV 照射下で観察した。

## (3) Real-time-PCR (qPCR) 法で発現解析

Real-time-PCR (qPCR) 法による発現解析は、第三章に記載した方法で行った。

## (4) Western blot 法

Western blot 法によるタンパク質発現解析は、第四章に記載した方法で行った。

## (5) 発現部位の観測

*CISP-GFP* を発現された形質転換イネにおける GFP の蛍光シグナルは、実体蛍光顕微鏡 (OLYMPUS SZX16) と共焦点レーザー走査型顕微鏡 (OLYMPUS FV10i-LIV) を使って観察した。

## (6) リーフディスクアッセイ

バーミュキュライトをつめたポットで栽培した植物の葉を回収し、ホールベンチを使ってリーフディスクを作成した。そして、リーフディスクを 1 mM の重金属溶液 ( $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{MnCl}_2$ ) や 1 mM の NaCl を添加した水で満したシャーレに浮かべ、葉の変化を経時的に観察した。

## (7) 植物組織の灰化处理

過剰な重金属で 14 日間処理したイネから葉を回収し、120 °C で 3 時間処理して組織を乾燥させた。次にマッフル炉 (FP31、ヤマト科学) を用いて 750 °C で三回乾燥させた坩堝 (重さを記録) にハサミで切ったイネの乾燥葉を入れ、マッフル炉で 250 °C 1 時間、続けて 550 °C で 5 時間処理することで組織を灰化させた。灰化处理した組織の入った坩堝は室温に冷やして重さを測定した後、灰化組織を 1 ml の 60 % の分析用硝酸溶液に溶かして注意深く回収した。回収し

た組織溶液は原子吸光分析法に用いて金属含量を測定した。

### (8) 原子吸光分析法による金属含量の測定

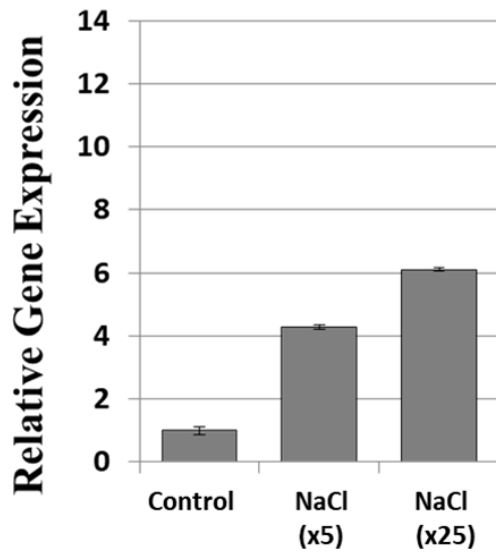
重金属含量測定は島津 AA-6300 原子吸光光度計 (SHIMADZU) を用いた。測定には SR ランプ法を使い、検量線は関東化学の標準液により作成した。銅とマンガンは各々 324.8 nm と 279.4 nm の吸収ピークで測定した。

## 3. 結果と考察

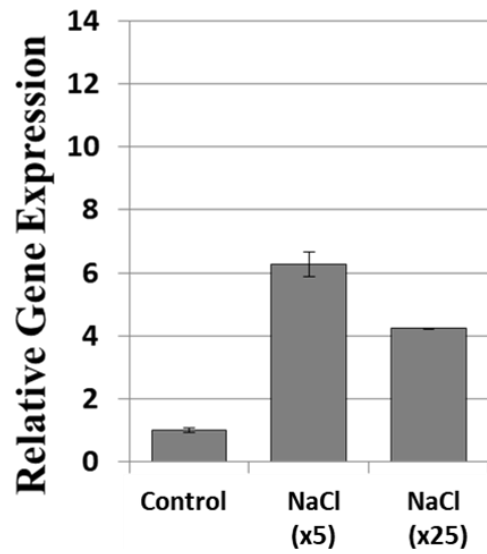
### (1) *CISP* 遺伝子の塩ストレスに対する応答性

オオムギの実生に過剰な塩ストレスを与え、1 日処理した根を用いて解析を行った。その結果、図 5-1 に示したように、*CISP1* と *CISP2* の発現は塩ストレスによって上昇することが確認できた。根における *CISP1* の発現は通常の 5 倍量 (0.2 mM) の NaCl で約 4 倍に、そして 10 倍量 (1 mM) の NaCl で約 6 倍へと上昇するのに対し、*CISP2* は *CISP1* と比較すると NaCl に対する応答性は低く、5 倍量の NaCl で約 3 倍、10 倍量の NaCl で約 2 倍であった。また、葉における *CISP1* の発現が 5 倍量の NaCl で約 6 倍、10 倍量の NaCl で約 4 倍へと上昇するのに対して、*CISP2* は 5 倍量の NaCl で約 11 倍、10 倍量の NaCl で約 5 倍に発現上昇していた。以上の結果より、過剰な塩に対する発現応答は根よりも地上部の葉で顕著であることが明らかとなった。これは低温に対する応答が根で顕著であった結果とは異なるが、根から吸収された NaCl が維管束を通過して地上部に運ばれ、葉で多量に蓄積した影響を反映した結果であると考えられる。

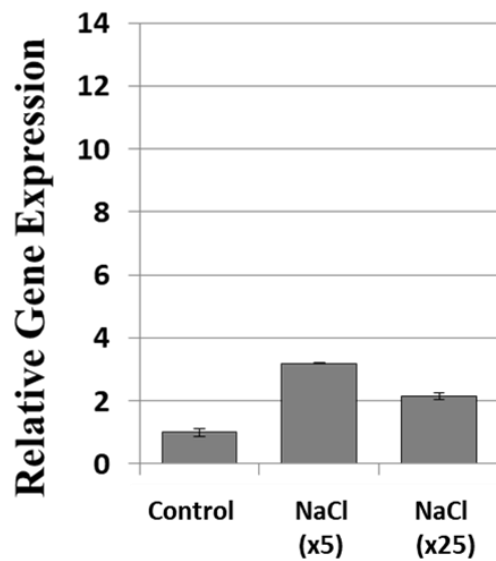
### *CISP1* Roots



### *CISP1* Leaves



### *CISP2* Roots



### *CISP2* Leaves

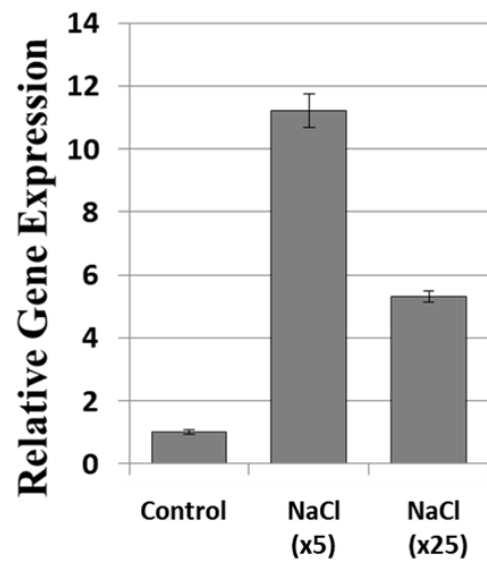


図 5-1 *CISP* 遺伝子の過剰な NaCl に対する発現応答

過剰な NaCl で処理したオオムギにおける *CISP1* 遺伝子と *CISP2* 遺伝子の発現様式を qPCR 法で解析した結果を示した。Control:

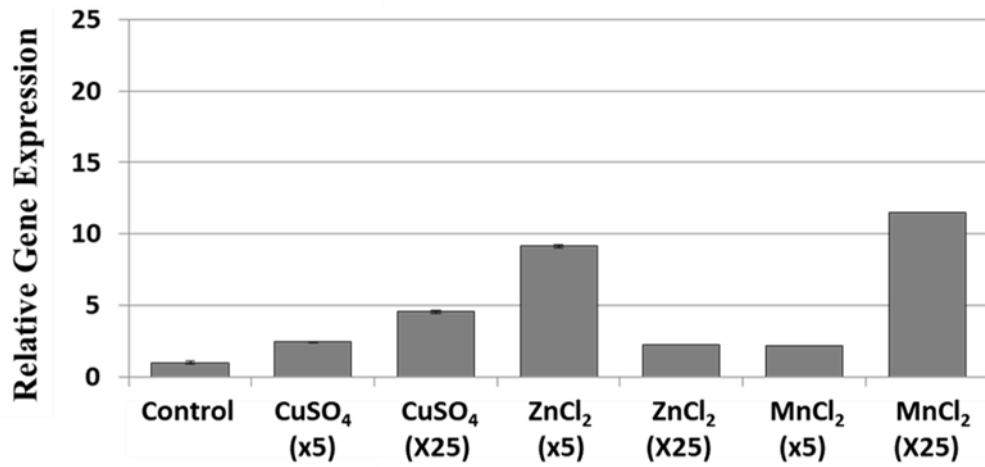
過剰な NaCl 無添加、NaCl (x5): 0.2 mM NaCl を添加、NaCl (x25) : 1 mM NaCl を添加。

#### (2) *CISP* 遺伝子の重金属ストレスに対する応答性

本章の 2.1 に記載した *CISP* 遺伝子は過剰な塩に対する応答性を示した。よって、塩と同じく

植物の根に直接作用する重金属ストレスに対する *CISP* の応答性を調べた。本実験では、植物の光合成や根の伸長に重要な銅、亜鉛、マンガンを対象にして実験を行った。その結果、銅、亜鉛、マンガンによる発現応答に多少の差はあるものの、*CISP1* と *CISP2* は共に過剰な重金属に対して発現上昇することが明らかとなった(図 5-2、図 5-3)。また、重金属に対する発現応答は低温に対する発現応答に比べるとかなり低いものの、塩ストレスとはほぼ同じレベルであった。また、重金属に対する *CISP* の発現応答部位は根より葉で高いことが確認できた。特に過剰な銅に対する応答性が亜鉛やマンガンと比べて高い点は興味深い。この様に、*CISP* の発現が過剰な重金属に対しても応答することから判断することから、*CISP* は単に低温耐性に関わるだけでなく、様々なストレスに対して植物に耐性を付与する多機能な能力を持つタンパク質である可能性も期待できる。

## **CISP1** (根の応答)



## **CISP1** (葉の応答)

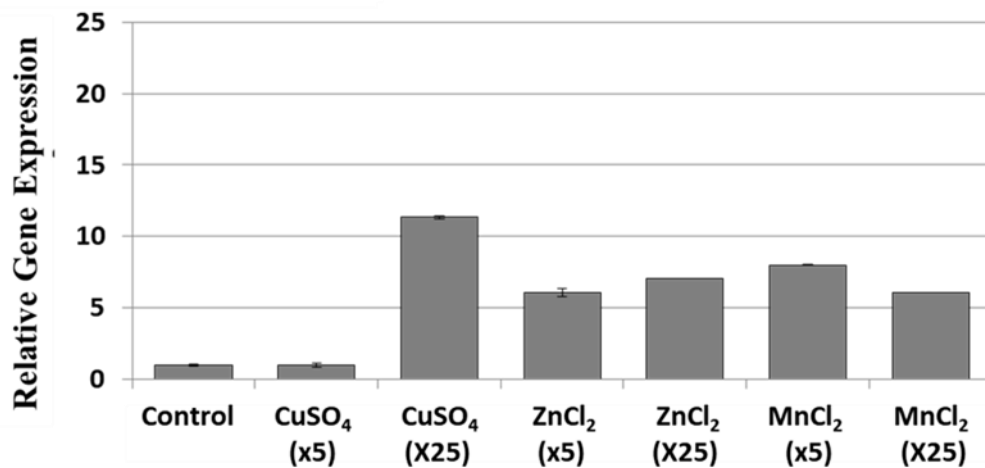
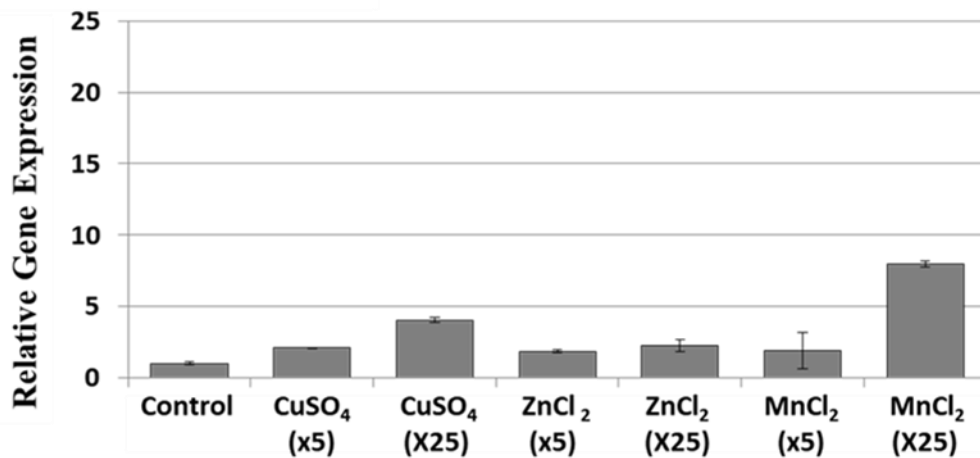


図 5-2 **CISP1** 遺伝子の過剰な重金属ストレスに対する発現応答

過剰な銅、亜鉛とマンガンで処理したオオムギの根と葉における **CISP1** 遺伝子の発現様式を qPCR 法で解析した結果を示した。

Control: 過剰な重金属無添加、CuSO<sub>4</sub> (x5): 2 μM CuSO<sub>4</sub> を添加、CuSO<sub>4</sub> (X25): 10 μM CuSO<sub>4</sub> を添加、ZnCl<sub>2</sub> (x5): 4 μM ZnCl<sub>2</sub> を添加、ZnCl<sub>2</sub> (X25): 20 μM ZnCl<sub>2</sub> を添加、MnCl<sub>2</sub> (x5): 5 μM MnCl<sub>2</sub> を添加、MnCl<sub>2</sub> (X25): 25 μM を添加。

## CISP2 (根の応答)



## CISP2 (葉の応答)

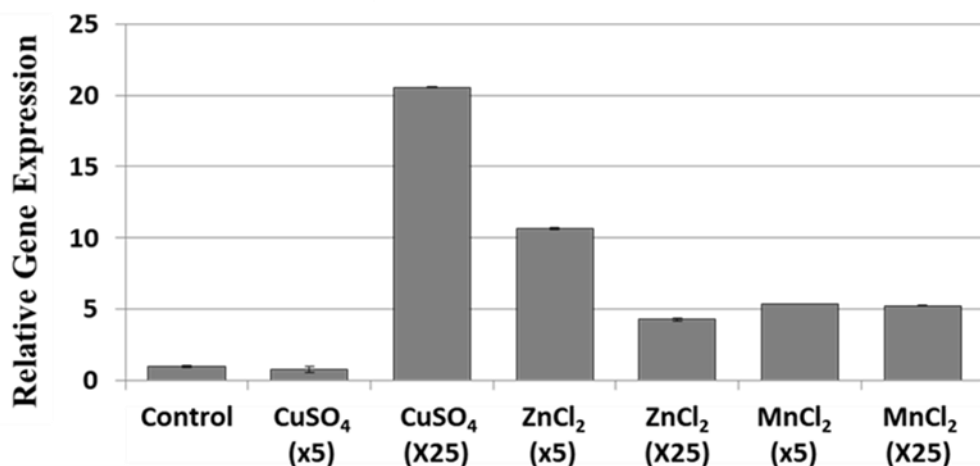


図 5-3 CISP2 遺伝子の過剰な重金属ストレスに対する発現応答

過剰な銅、亜鉛とマンガンで処理したオオムギの根と葉における CISP2 遺伝子の発現様式を qPCR 法で解析した結果を示した。

Control: 過剰な重金属無添加、CuSO<sub>4</sub> (x5): 2 μM CuSO<sub>4</sub> を添加、CuSO<sub>4</sub> (X25): 10 μM CuSO<sub>4</sub> を添加、ZnCl<sub>2</sub> (x5): 4 μM ZnCl<sub>2</sub> を添加、ZnCl<sub>2</sub> (X25): 20 μM ZnCl<sub>2</sub> を添加、MnCl<sub>2</sub> (x5): 5 μM MnCl<sub>2</sub> を添加、MnCl<sub>2</sub> (X25): 25 μM を添加。

### (3) CISP 遺伝子の重金属欠乏ストレスに対する応答性

図 5-4 に銅、亜鉛、マンガンが欠乏した培地で栽培したオオムギの根における CISP 遺伝子の発現応答を示した。欠乏処理 1 日目では CISP1 の発現にほぼ変化が見られなかったが、CISP2

の発現は若干下がっていた。また、一週間重金属欠乏処理を行った結果では、*CISP1* と *CISP2* は共に発現レベルが大きく低下していた。これは、重金属の欠乏により植物体の代謝が低下した結果であると考えられる。よって、重金属欠乏ストレスに対して *CISP* 遺伝子の発現は応答性がなく、過剰な場合にのみ応答することが明らかとなった。よって、*CISP* は重金属の吸収には関係がないと考える。

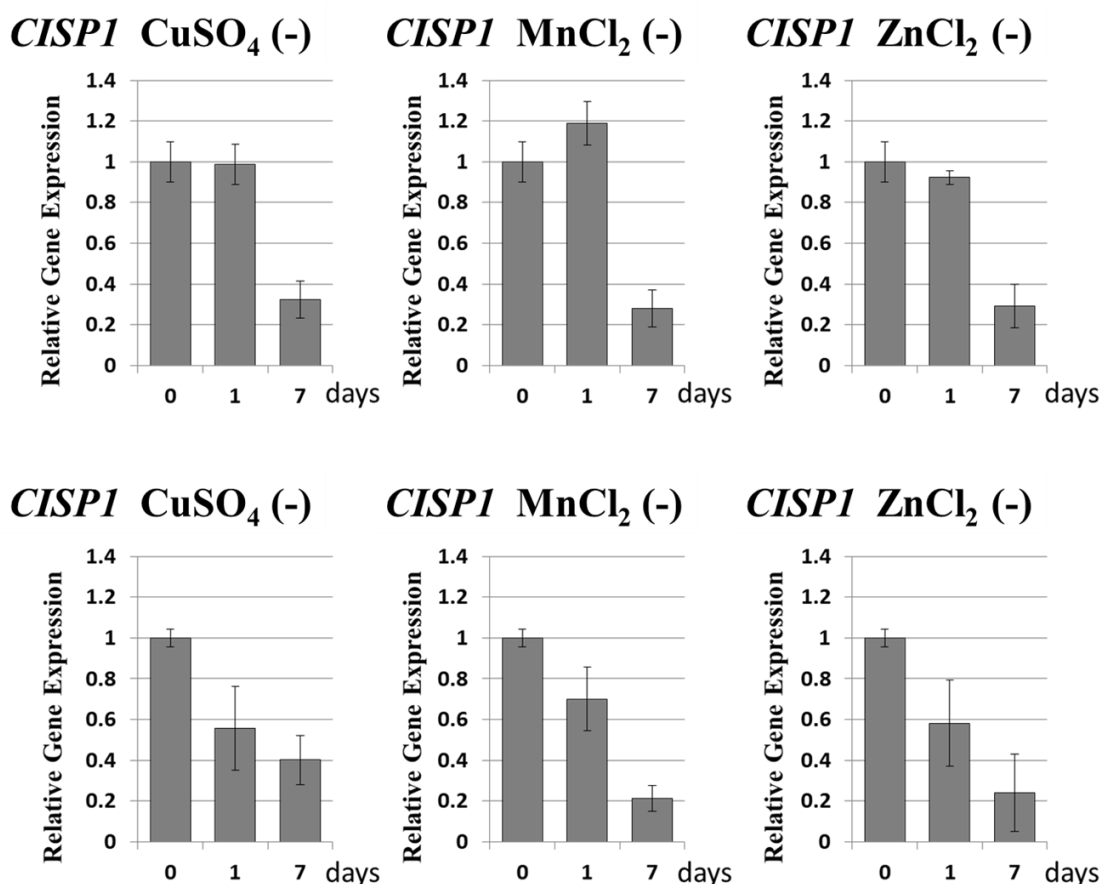


図 5-4 *CISP* 遺伝子の重金属欠乏に対する発現応答

各種の重金属が欠乏した培地で生育させたオオムギの葉における *CISP1* 遺伝子の発現様式を qPCR 法で解析した結果を示した。

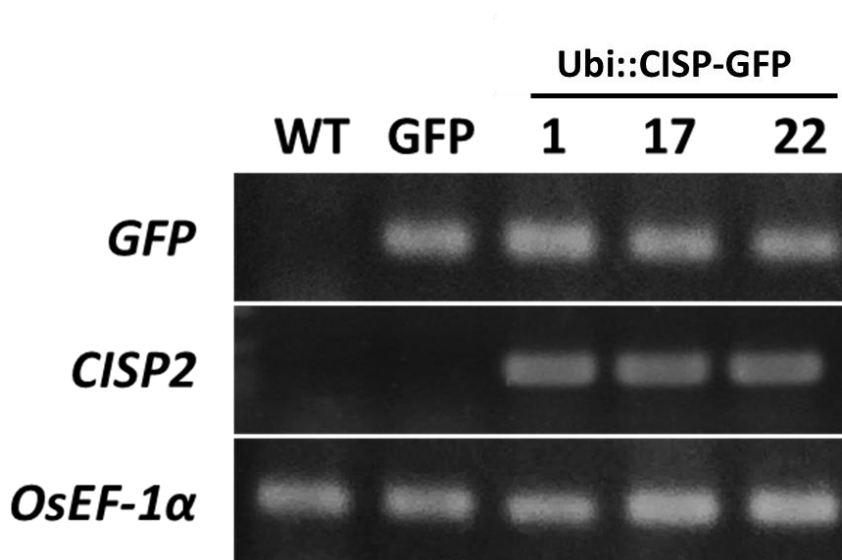
CuSO<sub>4</sub>(-):CuSO<sub>4</sub>を除去、ZnCl<sub>2</sub>(-):ZnCl<sub>2</sub>を除去、MnCl<sub>2</sub>(-):MnCl<sub>2</sub>を除去、0:処理0日目、1:処理1日目、7:処理7日目。

#### (4) *CISP*-GFP 過剰発現イネの解析

実験に使用した形質転換イネで *CISP*-GFP 融合タンパク質が発現していることを確認するため、植物体から Total-RNA を抽出して *CISP* 遺伝子の発現を確認した。コントロールには、全組

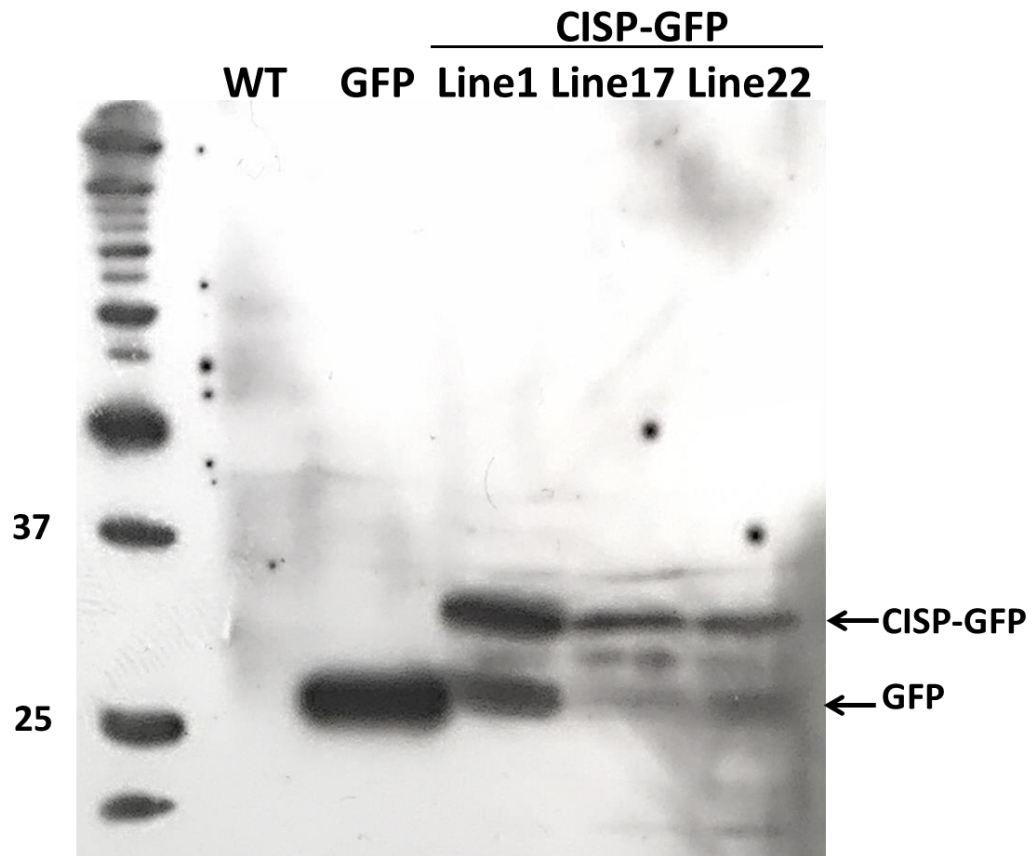


織で恒常的に発現している *OsEF-1α* の遺伝子を用いた。また、Western blot で CISP-GFP タンパク質の発現も確認した。図 5-6 に結果を示したが、形質転換イネ 3 系統 (CISP-GFP\_line1、CISP-GFP、CISP-GFP\_line22) で共に *CISP* 遺伝子の発現が見られると同時に、タンパク質への翻訳も確認できた (図 5-5)。そこで、タンパク質の局在部位を確認するため、共焦点レーザー走査型顕微鏡を利用して GFP のシグナルを調べた。その結果、GFP タンパク質のシグナルは根の根端分裂組織と維管束で見られた (図 5-7)。この結果は、分裂組織における局在は、低温環境において *CISP* 遺伝子が発現する部位と一致しており、CISP-GFP タンパク質が根の分裂組織で機能することが示唆された。



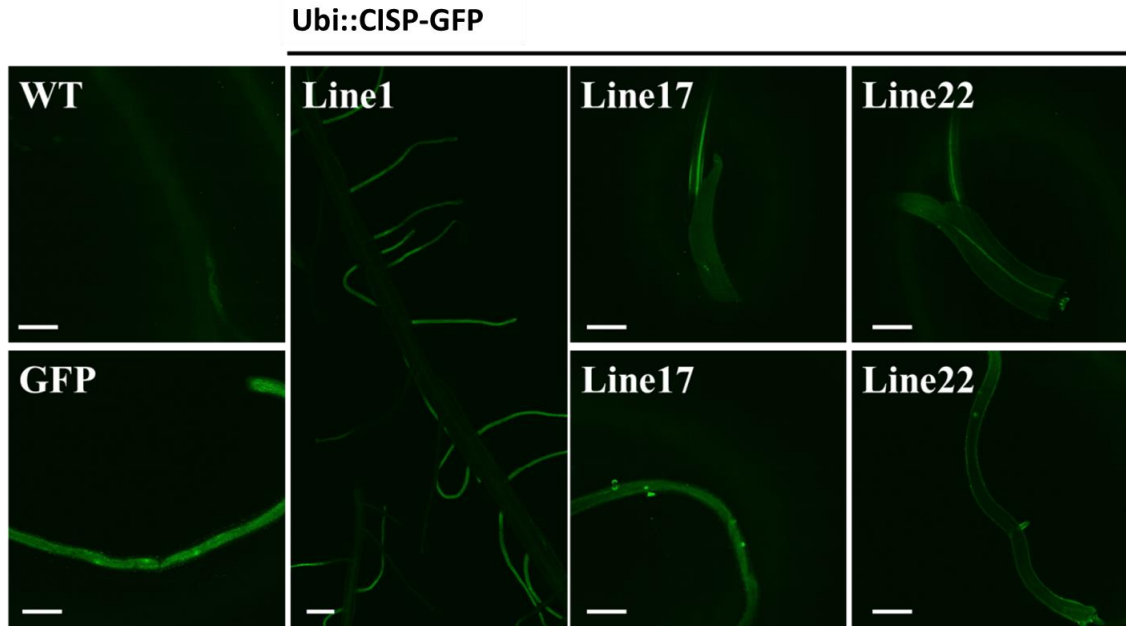
**図 5-5 CISP-GFP 形質転換イネ (Ubi::CISP-GFP) における *CISP* 遺伝子の発現確認 (RT-PCR)**

作成した形質転換イネにおける *GFP* および *CISP* 遺伝子の発現を RT-PCR 法で確認した結果を示した。WT: 非形質転換イネ (コントロール)、GFP: GFP 過剰発現イネ、Ubi::CISP-GFP: CISP-GFP 過剰発現イネ、1: CISP-GFP 過剰発現イネ系統 1、17: CISP-GFP 過剰発現イネ系統 17、22: CISP-GFP 過剰発現イネ系統 22、*GFP*: *GFP* 遺伝子、*CISP2*: *CISP2* 遺伝子、*OsEF-1α*: *OsEF-1α* 遺伝子 (リファレンス)。



**図 5-6 CISP-GFP 形質転換イネにおける CISP-GFP タンパク質の発現 (Western Blot)**

作成した形質転換イネにおける GFP および CISP タンパク質の発現を Western Blot 法で確認した結果を示した。WT: 非形質転換イネ (コントロール)、GFP: GFP 過剰発現イネ、CISP-GFP: CISP-GFP 過剰発現イネ、Line1: CISP-GFP 過剰発現イネ系統 1、Line 17: CISP-GFP 過剰発現イネ系統 17、Line 22: CISP-GFP 過剰発現イネ系統 22、CISP-GFP: 推定される CISP-GFP タンパク質、GFP: 推定される GFP タンパク質。



**図 5-7 根における CISP-GFP タンパク質の局在**

レーザー顕微鏡を用いて CISP-GFP タンパク質を検出した結果を示した。WT: 非形質転換イネ(コントロール)、GFP: GFP 過剰発現イネ、Ubi::CISP-GFP: CISP-GFP 過剰発現イネ系統、Line 17: CISP-GFP 過剰発現イネ系統 17、Line 22: CISP-GFP 過剰発現イネ系統 22。

#### (5) CISP-GFP 過剰発現イネの重金属耐性解析

ホールベンチを使って温室で1ヶ月間栽培した形質転換イネの葉からリーフディスクを作成し、1 mM の重金属を含む溶液に浸して経時的に観察した結果、銅とマンガンに浮かべた形質転換イネの葉は、野生型や GFP を発現させたコントロールに比べて葉の黄化が進み、重金属に対する影響が顕著であった(図 5-8)。よって、CISP の過剰発現個体では重金属の含有量が増加している可能性が考えられた。

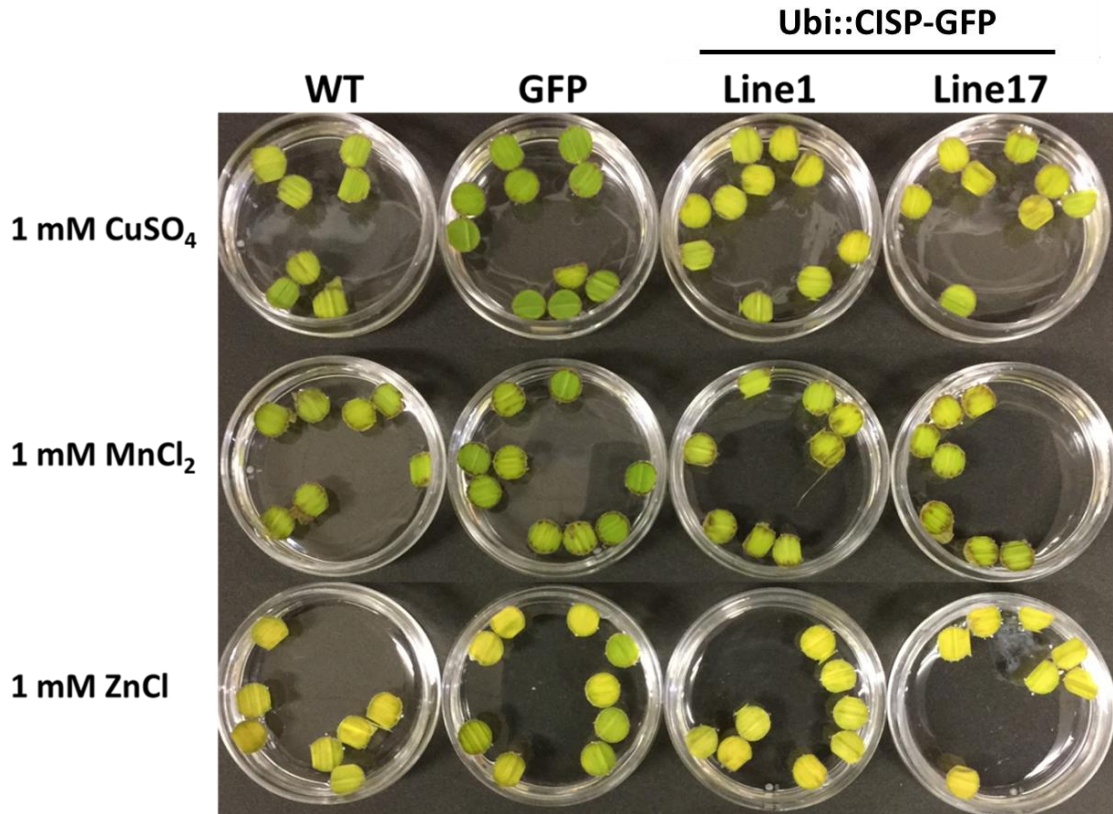


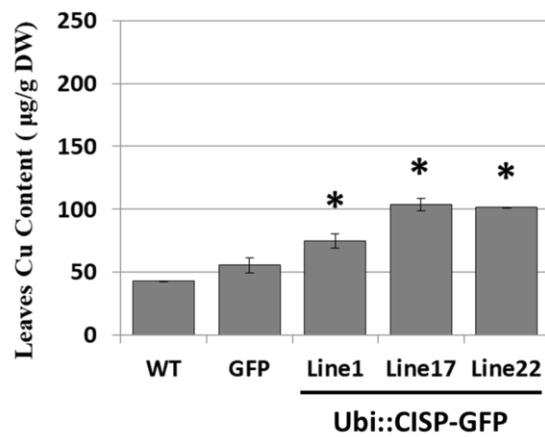
図 5-8 リーフディスクアッセイ

リーフディスクアッセイ法を用いてCISP発現イネの過剰な重金属ストレスに対する耐性を調べた結果を示した。WT:非形質転換イネ(コントロール)、GFP:GFP 過剰発現イネ、Ubi::CISP-GFP:CISP-GFP 過剰発現イネ系統、Line 1:CISP-GFP 過剰発現イネ系統 1、Line 17:CISP-GFP 過剰発現イネ系統 17。

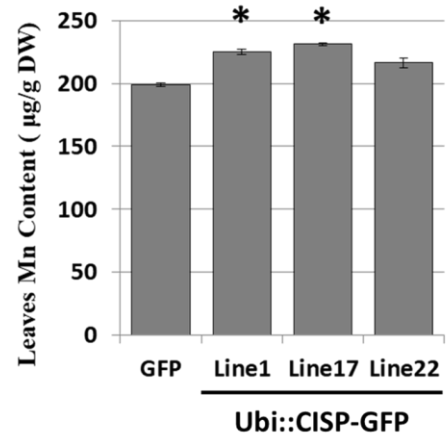
### (6) CISP-GFP 過剰発現イネにおける重金属含有量の測定

リーフディスクアッセイの結果からCISP-GFP形質転換イネは重金属に対する影響を受けやすく、重金属の吸収や蓄積が上昇している可能性が高まった。そこで過剰な重金属で2週間処理したイネの葉を回収し、原子吸光分析法により葉に含まれる重金属の含量を測定した。結果は図5-9に示したように、過剰な銅の存在下で形質転換イネ3系統の銅含量がコントロールに比べて有意に上昇していることが明らかとなった。また、過剰なマンガンの存在下では形質転換イネの1と17の系統で有意なマンガン含量の上昇がみられた。これらの結果より、CISPは重金属を多量に蓄積していることが明らかとなった。

# Cu



# Mn



\*:  $p < 0.05$

図 5-9 CISP-GFP 形質転換イネの葉における銅とマンガンの含有量

原子吸光分析法により CISP 発現イネの重金属含有量を調べた結果を示した。WT: 非形質転換イネ (コントロール)、GFP: GFP 過剰発現イネ、Ubi::CISP-GFP: CISP-GFP 過剰発現イネ系統、Line 1: CISP-GFP 過剰発現イネ系統 1、Line 17: CISP-GFP 過剰発現イネ系統 17、Line 22: CISP-GFP 過剰発現イネ系統 22。有意差は t-検定により判定した。\*:  $p < 0.05$ 。

## 第六章 総合考察

ストレス環境に於かれた植物の細胞内では、ストレスに対処するために働く遺伝子が発現している。そして、それらは植物が過酷なストレス環境下でも枯死せず生存するために役立っている。もちろん、低温環境におかれた植物でも低温に適応するために作用するための遺伝子が発現している。それら低温応答性遺伝子の一部については機能が解明されているが、すべての低温応答性遺伝子が単離同定され機能解明されているわけではなく、未だその全体像は明らかとなっていない。よって、新規の低温応答性遺伝子の単離と機能解析は、植物が持つ低温耐性機構の解明にとって非常に重要である。当研究室で単離された *CISP* も低温応答性を示す機能未知遺伝子の一つで、オオムギが低温に適応する為に役立っていると期待できる。本研究では、オオムギにおける *CISP* の機能解明を目指して様々な解析に取り組んだ。

当研究室で単離したのは *CISP1* であるが、データベースを用いたホモロジー検索により、オオムギには *CISP1* 以外に 2 種類のコホモログ (*CISP2*、*CISP3*) が存在することが明らかとなった。それら 3 種類の *CISP* 遺伝子は共に ORF が短く (*CISP1* は 219 bp、*CISP2* および *CISP3* は 189 bp)、親水性の塩基性タンパク質をコードしていた。また、これら *CISP* 遺伝子と全体を通じて相同な遺伝子はムギ類をはじめとした寒冷地適応型のイネ科植物にしか存在しないことが明らかとなった。よって、*CISP1* とそのコホモログは、寒冷地適応型イネ科植物の低温耐性に重要な役割を果たしていると考えられる。

系統樹を用いた解析では、オオムギが持つ 3 種類の *CISP* 遺伝子のうち、*CISP1* と *CISP2* は同じグループに属するものの、*CISP3* は別のグループに分類される進化的に離れた遺伝子であることが明らかとなった。実際、ゲノム構造を比較すると、*CISP1* や *CISP2* と異なり、*CISP3* はエキソン 2 とエキソン 3 の間のイントロンや共通の 3' UTR 領域が欠損していた。また、転写調節領域に存在する cis-element の構造も *CISP3* では完全に保存されていないことが明らかとなった。これらの結果から、おそらく *CISP3* は遺伝子の重複後に変異が生じ、それが *CISP3* の発現が *CISP1* や *CISP2* と比べて低い原因になっていると考えられる。しかし、両者に機能的な差異があるか否かについては、今後の詳細な解析が必要である。

*CISP1* とそのコホモログは推定分子量約 8 kDa の小さなタンパク質をコードしており、その C 末端には塩基性アミノ酸富んだコンセンサス配列が存在する。この C 末端側の共通領域には、ヒストン H3 が持つアセチル化配列 (KxxKxxxK) [21] とロイシンリッチの NES 核外輸出シグナル (LxLxxxL) [22] が存在する。この特徴から、*CISP* タンパク質は核酸と結合する能力を持つ可能

性があると推測できるが、実際に *CISP1* と核酸との結合が確認できた。ただし、*CISP* のアミノ酸配列には典型的な NLS 核移行シグナルが存在しないことから、*CISP* は核内の DNA ではなく、細胞質に移行した mRNA と結合することで機能するタンパク質であると推察できる。また、*CISP* には核外輸出シグナルが保存されているが、これは分子サイズの小さな *CISP* タンパク質が核膜孔を通過して核内に移行した際に細胞質へと逆輸送されるために機能していると考えられる。

本研究では、オオムギの各組織における *CISP* 遺伝子の発現を調べ、その発現部位も特定した。低温環境におかれた植物では、地上部にある葉や茎頂分裂組織が直接低温にさらされるため、当初はそれら組織で *CISP* の発現が上昇すると予測していた。しかし、実際には *CISP* の発現は根で特異的であった。データベースに登録されている *CISP1* のホモログのうち CA649935 (*T. aestivum*)、BJ282112 (*T. aestivum*)、GT036602 (*F. arundinacea*)、DT700997 (*F. arundinacea*)、DT703921 (*F. arundinacea*)、GE298824 (*L. perenne*)、BE587776 (*S. cereale*)、BE586738 (*S. cereale*)なども根由来の cDNA で単離されていることから、*CISP* 及びそのホモログが主に根で機能するのは間違いないと思われる。

次に、オオムギが持つ3種類の *CISP* 遺伝子の低温応答性を調べた。その結果、すべての遺伝子が長期の低温に対して発現上昇することが明らかとなった。また、低温下では、通常の生育条件下で発現が見られなかった地上部の葉でも僅かながら発現応答することがわかった。ただし、その量は根に比べると極僅かであり、この結果も *CISP* の主な作用部位が根であることを裏付けている。長期の低温環境は、植物体内に活性酸素を増加させ酸化ストレスを誘導する。よって、一部の低温応答性遺伝子は酸化ストレスにも発現応答する。そこで、*CISP* 遺伝子の発現と酸化ストレスとの関係を調べた。その結果、*CISP* 遺伝子は酸化ストレスに伴って発現上昇しないことを確認した。よって、低温実験で確認された *CISP* 遺伝子の発現応答は、長期の低温特異的に誘導されていることが明らかとなった。オオムギは21日程度の低温処理で低温順化して低温耐性を獲得することが報告されている[23]が、*CISP* 遺伝子の発現もほぼ同じ時期に上がることから、*CISP* 遺伝子は低温順化の過程で機能する可能性が高いと期待できる。

発現解析により *CISP* 遺伝子が根で特異的に発現することが確認できたことから、*in situ* ハイブリダイゼーションで根における mRNA の局在を詳しく調べた。その結果、*CISP1* の mRNA は根端分裂組織と側根分裂組織に局在することが明らかとなった。これらの結果から、*CISP* タンパク質は低温に伴うダメージから根の分裂組織を保護するために機能するタンパク質である可能性が考えられる。一般に、植物の低温耐性は外気温に直接さらされる地上部の葉で生じると考えられており、Kobayashi ら[24]により低温順化過程で働く遺伝子として単離された *Cor/Lea* 遺

伝子もコムギの葉で発現することが報告されている。これに対して *CISP* の様に根で特異的に発現する低温応答遺伝子の報告例はほとんどない。ただし、根は植物にとって大切な吸水器官であり、水分とともにタンパク質や核酸の構成元素である窒素や硫黄、リンをはじめとした様々な養分を土壌中から吸収し、それらの代謝や地上部へ運搬、そして貯蔵に重要な役割を任っている。加えて植物体の支持や環境センサーとしても根は重要であると考えられている。低温環境下で根が正常に機能しなければ植物は枯死するため、根の低温耐性に関わる遺伝子も存在すると考えられる。事実、イネの根で特異的に発現するアクアポリンは、イネの低温耐性に役立っていると報告されている[25]。この様なタンパク質は他にも多数存在するはずであり、低温環境におかれた植物の根で特異的に発現する *CISP* タンパク質もその候補の一つであると考えられる。

本研究では、植物が低温から常温に戻る過程における *CISP* 遺伝子の発現様式も調べ、その結果、オオムギを低温 (5 °C) から常温 (20 °C) にもどすと *CISP* 遺伝子の発現が 1 時間以内に低下することが明らかとなった。この結果から、*CISP* タンパク質は通常の生長条件下において植物に有害な作用をすると考えられる。これは、*CISP* タンパク質が低温下で mRNA と結合しシャペロンとして働いているという仮説にも結び付く。

低温は RNA の分子内二次構造の形成を誘導し[26]、タンパク質合成の阻害を誘発する。そこで、この悪影響を緩和するために重要なタンパク質が細菌の研究で発現された RNA シャペロンである。大腸菌の RNA シャペロンをコードする遺伝子 (*CSPI*) は低温環境下で発現上昇し、RNA 結合ドメインを介して mRNA と結合して mRNA の分子内二次構造の形成を阻害する[27]。植物にも類似のタンパク質が存在しており、コムギから単離された *WCSP1* は大腸菌の *CSP1* と同じドメインを持つことや、RNA シャペロンとして機能することが示唆されている。面白いことに、*WCSP1* はオオムギの *CISP* 遺伝子と同様に根の分裂組織周辺で発現することが報告されている。ただし、*WCSP1* と *CISPI* は低温に伴う発現誘導時期が異なり、*WCSP1* が低温処理 24 時間以内に発現誘導されるのに対して[20]、*CISPI* は低温処理期間が長くなるほど発現が上昇する。この低温応答の違いから、*WCSP1* と *CISP* は同じ RNA シャペロンとしての機能を持つが(図 8-1)、植物の低温耐性にとって異なる役割を担っていると考えられる。



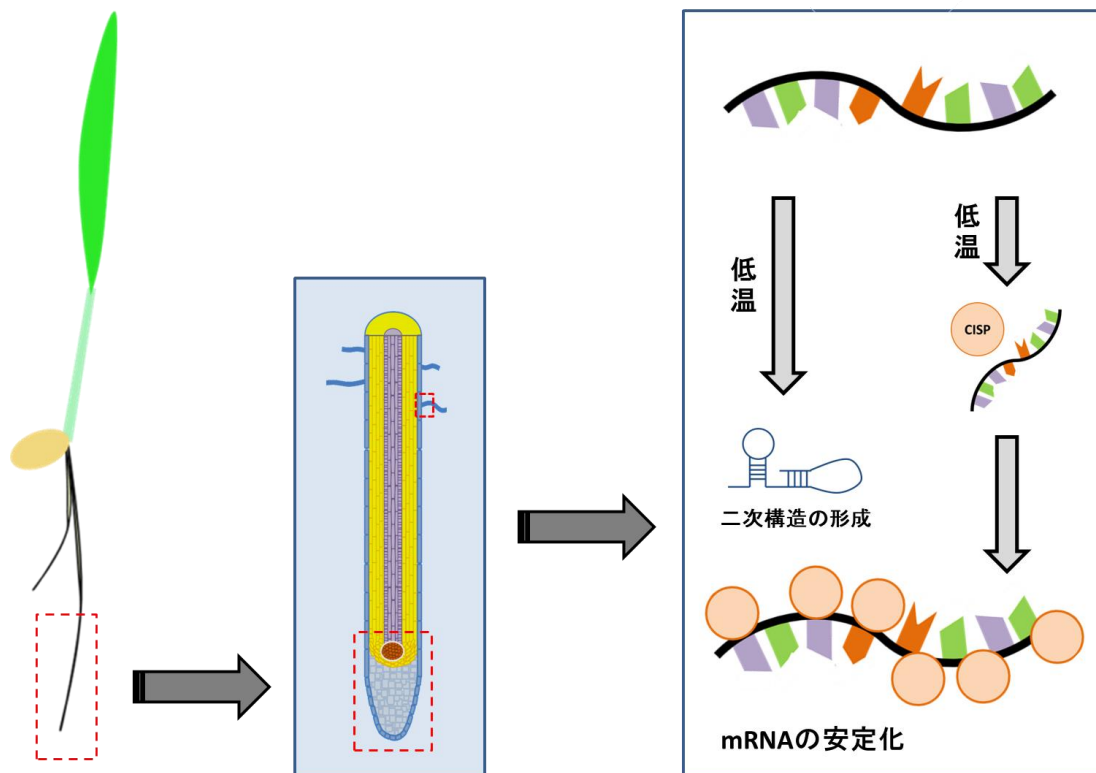


図 8-1 低温環境下における CISP 機能(仮説)

一方、先行実験で *CISP* 遺伝子が低温以外のストレスにも発現応答する可能性が示唆されていたため、本研究では過剰な塩や重金属に対する *CISP* 遺伝子の発現応答を解析した。その結果、*CISP* 遺伝子はそれらのストレス条件に対しても発現応答することや、その応答部位が低温に対する応答とは異なり、葉であることが明らかとなった。この結果は、*CISP* タンパク質がそれらストレスに対する耐性にも関与することを示唆するが、発現部位が異なることや応答レベルが低いことから、RNA シャペロン以外の機能で対処しているとも考えられる。

重金属に対する耐性を持つ植物は、細胞内にメタロチオネインやフィトケラチンと呼ばれる金属結合性のタンパク質を合成して過剰な重金属と結合し、それらを隔離することが知られている [28]。ただし、*CISP* には金属との結合に必要なタンパク質の立体構造を形成するためのシステインが無く、類似の機能を持つとは考えにくい。一般に、重金属ストレスに対して発現上昇する

遺伝子の機能は金属イオンの吸収、排出、輸送、代謝などに関わっていると考えられる。そのうち、CISP がどの機能に関わっているから不明であるが、リーフディスクアッセイの結果で、CISP を過剰発現させると植物の重金属耐性が低下することが確認できたことから、CISP は重金属の蓄積に関与する可能性が最も高いと考えられる。そこでこの推測を証明するため、コントロールと共に CISP を過剰発現させたイネを過剰な重金属を含む培地で 2 週間栽培した後、それら葉を回収して原子吸光分析法により重金属の含有量を測定した。その結果、コントロールに比べて、CISP の過剰発現系統では銅やマンガンの含有量が増加していることが確認できた。この結果から、CISP は直接重金属イオンと結合する可能性は低く、根から吸収した金属の蓄積に関与する可能性の高いことが明らかとなった。更に、最近の研究[29]から、重金属環境下で栽培したイネ科植物は根端分裂組織に金属イオンを貯蔵し、維管束を通して葉に輸送していることが報告されている。CISP の局在も根端分裂組織であることから、金属イオンの蓄積(図 8-2)に関わっている可能性が期待できる。

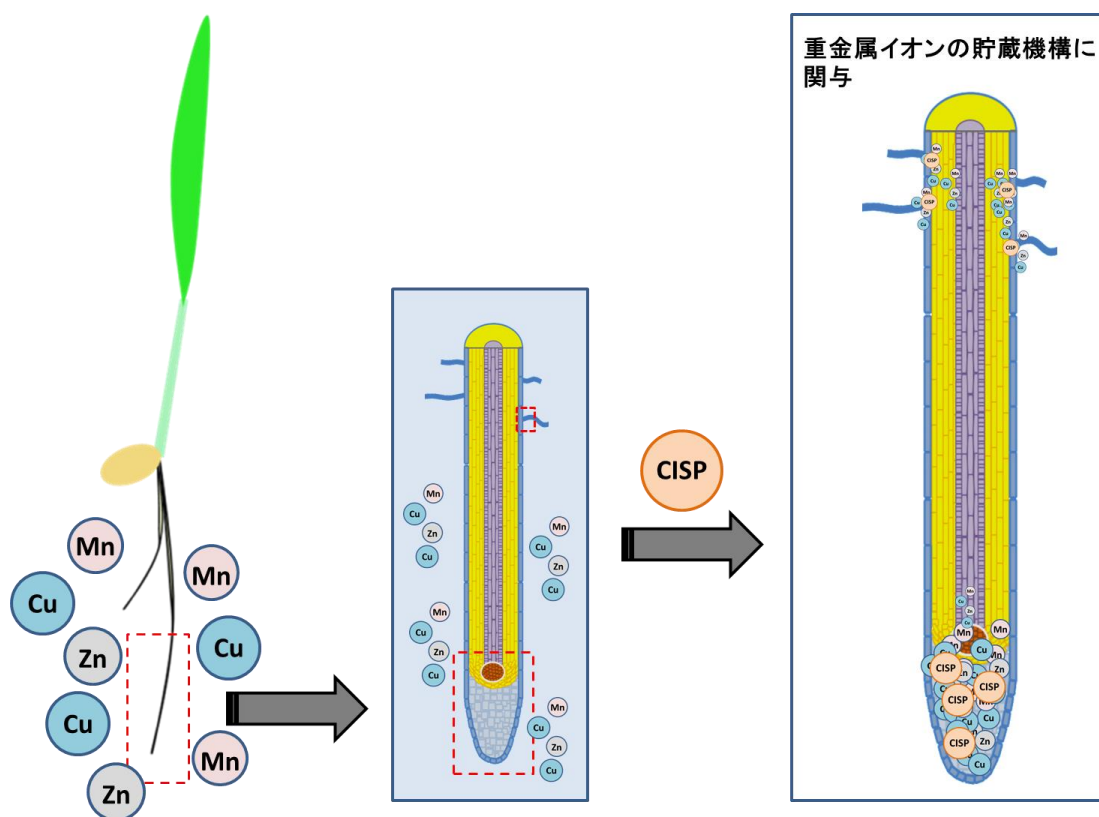


図 8-2 重金属環境下における CISP 機能(仮説)

以上の結果から、本研究では **CISP** がオオムギで二つの機能を持つ可能性を導き出した。一つは根の低温耐性の向上であり、低温下で発現誘導された **CISP** が細胞内の mRNA と結合し、分子内二次構造の形成を阻害することで翻訳活性を維持する可能性(図 8-1)である。

もう一つは、金属イオンの貯蔵(図 8-2)に関与する可能性であるが、残念ながら本研究ではその詳細な分子機構を推察するための解析結果を得られなかった。ただし、金属イオンの吸収や貯蔵は植物の養分吸収にとって非常に重要な機構であり、**CISP** がその促進に関与することは明らかである。今後 **CISP** の研究が進んでさらに詳細な機能が明らかとなれば、作物生産の向上にも繋がると期待できる、本研究はその礎となる重要な知見を見出したと考えている。

## 謝辞

本論文を作成するにあたり、丁寧かつ熱心にご指導頂いた指導教員の木藤新一郎教授に感謝致します。また、実験方法に関してご指導頂いた櫻井宣彦准教授に深く感謝いたします。そして、日常やセミナーのディスカッションを通じて多くのアドバイスを頂いた木藤研究室の横山悠理先輩、奥川紗代さん、タオダビリゲさん、宮崎由麻さんをはじめ、実験材料の提供や実験方法に関するアドバイスを頂いた農研機構北海道農業研究センターの保田浩博士に深く感謝いたします。

## 特記事項

本研究で行った遺伝子組換え実験は、名古屋市立大学遺伝子組換え実験等安全委員会の承認(承認番号 14-303)を経て適切に行われた。

## 参考文献

- [1] **B.G. De Los Reyes, S.J. Yun, V. Herath, F. Xu, M.R. Park, J. Il Lee, K.Y. Kim,** Phenotypic, physiological, and molecular evaluation of rice chilling stress response at the vegetative stage, *Methods Mol. Biol.* 956 (2013) 227–241. doi:10.1007/978-1-62703-194-3-16.
- [2] **A. Mukhopadhyay, S. Vij, A.K. Tyagi,** Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 6309–6314. doi:10.1073/pnas.0401572101.
- [3] **M.S. Webb, M. Uemura, P.L. Steponkus,** A Comparison of Freezing Injury in Oat and Rye: Two Cereals at the Extremes of Freezing Tolerance., *Plant Physiol.* 104 (1994) 467–478.
- [4] **M.F. Dowgert, P.L. Steponkus,** Behavior of the Plasma Membrane of Isolated Protoplasts during a Freeze-Thaw Cycle., *Plant Physiol.* 75 (1984) 1139–51. doi:10.1104/pp.75.4.1139.
- [5] **B.Y.C.J. Howarth, H.J. Ougham,** Tansley Review No. 51 Gene expression under temperature stress, *New Phytol.* 125 (1993) 1–26.
- [6] **M.A. Hughes, M.A. Dunn,** The molecular biology of plant acclimation to low temperature, *J. Exp. Bot.* 47 (1996) 291–305. doi:10.1093/jxb/47.3.291.
- [7] **F. Sarhan, F. Ouellet, A. VazquezTello,** The wheat wcs120 gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals, *Physiol. Plant.* 101 (1997) 439–445. doi:10.1034/j.1399-3054.1997.1010226.x.
- [8] **A.V. Kolesnichenko, G.B. Borovskii, V.K. Voinikov,** Changes in the content of protein 310 kD under cold hardening of winter wheat seedlings, *Physiol. Biochem. Cultivated Plants (Ukr.).* 29 (1997) 383–383.
- [9] **A.V. Kolesnichenko, V.V. Zykova, V.K. Voinikov,** A comparison of the immunochemical affinity of cytoplasmic, mitochondrial and nuclear proteins of winter rye (*Secale cereale* L.) to a 310 kD stress protein in control plants and during exposure to cold stress, *J. Therm. Biol.* 25 (2000) 203–209. doi:10.1016/S0306-4565(99)00023-6.
- [10] **C. Crosatti, E. Nevo, A.M. Stanca, L. Cattivelli,** Genetic analysis of the accumulation of COR14 proteins in wild (*Hordeum spontaneum*) and cultivated (*Hordeum vulgare*) barley, *Theor. Appl. Genet.* 93 (1996) 975–981. doi:Doi 10.1007/Bf00224101.

- [11] **C. Crosatti, P. Polverino de Laureto, R. Bassi, L. Cattivelli**, The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene *cor14b* and the accumulation of the corresponding protein., *Plant Physiol.* 119 (1999) 671–680. doi:10.1104/pp.119.2.671.
- [12] **L. Cattivelli, C. Crosatti, M. Grossi, P. Baldi, E. Giorni, F. Rizza, A.-M. Stanca**, Genes and gene products regulated by low temperature to improve winter hardiness of barley, *Acta Agron. Hungarica.* 45 (1997) 271–278.
- [13] **L. a. Bravo, T.J. Close, L.J. Corcuera, C.L. Guy**, Characterization of an 80-kDa dehydrin-like protein in barley responsive to cold acclimation, *Physiol. Plant.* 106 (1999) 177–183. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.106205.x.
- [14] **C. Yue, H.L. Cao, L. Wang, Y.H. Zhou, Y.T. Huang, X.Y. Hao, Y.C. Wang, B. Wang, Y.J. Yang, X.C. Wang**, Effects of cold acclimation on sugar metabolism and sugar-related gene expression in tea plant during the winter season, *Plant Mol. Biol.* 88 (2015) 591–608. doi:10.1007/s11103-015-0345-7.
- [15] **S. Hayat, Q. Hayat, M.N. Alyemeni, A.S. Wani, J. Pichtel, A. Ahmad**, Role of proline under changing environments: a review., *Plant Signal. Behav.* 7 (2012) 1456–66. doi:10.4161/psb.21949.
- [16] **D. V Lynch, P.L. Steponkus**, Plasma Membrane Lipid Alterations Associated with Cold Acclimation of Winter Rye Seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma) ., *Plant Physiol.* 83 (1987) 761–7. doi:10.1104/pp.83.4.761.
- [17] **M.-H. Kim, K. Sasaki, R. Imai**, Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*., *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 23454–23460. doi:10.1074/jbc.M109.025791.
- [18] **B. Trevaskis, M.N. Hemming, E.S. Dennis, W.J. Peacock**, The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals, *Trends Plant Sci.* 12 (2007) 352–357, doi:10.1016/j.tplants.2007.06.010
- [19] **R. Fukumura, H. Takahashi, T. Saito, Y. Tsutsumi, A. Fujimori, S. Sato, K. Tatsumi, R. Araki, M. Abe**, A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) e94, doi:10.1093/nar/gng094.
- [20] **D. Karlson, K. Nakaminami, T. Toyomasu, R. Imai**, A cold-regulated nucleic acid-binding

- protein of winter wheat shares a domain with bacterial cold shock proteins, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 35248–35256. doi:10.1074/jbc.M205774200.
- [21] **W.Y. Chen, L.J. Juan, B.C. Chung**, SF-1 (nuclear receptor 5A1) activity is activated by cyclic AMP via p300-mediated recruitment to active foci, acetylation, and increased DNA binding, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 10442–10453. doi:10.1128/MCB.25.23.10442-10453.2005.
- [22] **T. la Cour, L. Kiemer, A. Mølgaard, R. Gupta, K. Skriver, S. Brunak**, Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals, *Protein Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 527–536. doi:10.1093/protein/gzh062.
- [23] **A. Janská, A. Aprile, J. Zámečník, L. Cattivelli, J. Ovesná**, Transcriptional responses of winter barley to cold indicate nucleosome remodelling as a specific feature of crown tissues, *Funct. Integr. Genomics.* 11 (2011) 307–325. doi:10.1007/s10142-011-0213-8.
- [24] **F. Kobayashi, S. Takumi, M. Nakata, R. Ohno, T. Nakamura, C. Nakamura**, Comparative study of the expression profiles of the Cor/Lea gene family in two wheat cultivars with contrasting levels of freezing tolerance, *Physiol. Plant.* 120 (2004) 585–594. doi:10.1111/j.0031-9317.2004.0293.x.
- [25] **A. Ahamed, M. Murai-Hatano, J. Ishikawa-Sakurai, H. Hayashi, Y. Kawamura, M. Uemura**, Cold stress-induced acclimation in rice is mediated by root-specific aquaporins, *Plant Cell Physiol.* 53 (2012) 1445–1456. doi:10.1093/pcp/pcs089.
- [26] **A. Polissi, W. De Laurentis, S. Zangrossi, F. Briani, V. Longhi, G. Pesole, G. Dehò**, Changes in *Escherichia coli* transcriptome during acclimatization at low temperature, *Res. Microbiol.* 154 (2003) 573–580. doi:10.1016/S0923-2508(03)00167-0.
- [27] **W. Jiang, Y. Hou, M. Inouye**, CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 196–202. doi:10.1074/jbc.272.1.196.
- [28] **Emamverdian A, Ding Y, Mokhberdoran F, Xie Y**, Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Scientific World Journal* 2015, 1–18.
- [29] **Lu L, Xie R, Liu T, Wang H, Hou D, Du Y, He Z, Yang X, Sun H, Tian S**, Spatial imaging and speciation of Cu in rice (*Oryza sativa* L.) roots using synchrotron-based X-ray microfluorescence and X-ray absorption spectroscopy. *Chemosphere* 175 (2017), 356–364.

## 用語説明及び略記

**NCBI:** 国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information, NCBI)。アメリカ合衆国の国立衛生研究所 (NIH) の下の国立医学図書館 (National Library of Medicine; NLM) の一部門として 1988 年 11 月 4 日に設立された機関。

**DDBJ:** 日本 DNA データバンク (DNA Data Bank of Japan)。日本の国立遺伝学研究所が作成している DNA 塩基配列のデータベース。

**分子系統樹:** 生物の遺伝子やアミノ酸配列から進化的な分岐関係を表した図。

**ClustalW:** 塩基やアミノ酸配列を対応する部分が並ぶように整列させるプログラム。解析結果は分子系統樹の作成に利用される。

**近隣結合法:** 分子系統樹を作成する手法の一つで、系統樹の枝の長さの総和が最小になるように作成される特徴を持つ。

**Total-RNA:** 総 RNA。細胞内で転写されているすべての RNA。

**mRNA:** DNA の遺伝情報を基に合成される RNA のうち、アミノ酸配列の設計図となる RNA。

**転写:** RNA ポリメラーゼによって DNA の遺伝情報から RNA が合成される過程。

**cDNAs:** mRNA から逆転写酵素を用いて合成された DNA。

**翻訳:** リボソーム上で mRNA の配列情報に基づきタンパク質が合成される過程。

**プロモーター領域:** 遺伝子の転写調節領域。この領域に RNA ポリメラーゼが結合することでタンパク質をコードする下流の遺伝子が転写される。



**イントロン**:DNA の塩基配列のうち、転写後のスプライシングで除去される領域。

**エキソン**:DNA の塩基配列のうち、転写後のスプライシングで除去されず連結する領域。リボソームと結合し、タンパク質合成の鋳型となる。

**遺伝子暗号(コドン)**:アミノ酸を規定する3つの連続した塩基配列。

**開始コドン**:mRNA 上に存在するタンパク質の合成開始点。通常はメチオニンのコドンである AUG が使われる。

**終止コドン**:mRNA 上に存在するタンパク質合成の終結点。UAA、UAG、UGA の3種類がある。

**ORF**:オープンリーディングフレーム。タンパク合成の読み取り枠で、終止コドンを含まない。

**ストレス応答性遺伝子**:細胞や個体に、物理的ないしは化学的負荷が掛けられたときに発現が誘導される遺伝子の総称。

**制限酵素**:特定の塩基配列を認識し切断する酵素。

**PCR**:ポリメラーゼ連鎖反応、短時間で DNA を大量に増幅する手法。

**Primer**:PCR において合成の開始に必要な短い DNA 断片。

**RT-PCR**:逆転写ポリメラーゼ連鎖反応。mRNA を鋳型に合成した cDNAs を元に PCR で DNA を増幅し、mRNA の転写量を調べる方法。

**Real-time-PCR**:蛍光色素を用いて PCR による増幅をリアルタイムで測定する方法。増幅率に基づいて鋳型に用いた DNA を定量することができる。RT-PCR と同様、mRNA の転写量を調べる方法として利用されている。

**ベクター**: 目的の細胞に外来 DNA を運搬する為の DNA。ファージやプラスミドをもとに作成され、細胞内で複製する能力を持つ。

**プラスミド**: 微生物の細胞内に存在する染色体外 DNA。

**コンピテントセル**: 外来の DNA を取り込める状態の細胞。

**因子**: 特定の生化学反応に関わるタンパク質。

**GST**: グルタチオン-S-トランスフェラーゼ。可溶性で精製が容易なため、大腸菌の細胞内で特定のタンパク質を人工合成する際のタグとして利用される。

**PAGE**: ポリアクリルアミドゲル電気泳動。アクリルアミドの重合体であるポリアクリルアミドのゲルを使用して、タンパク質や核酸を分離する方法。

**SDS-PAGE**: 陰イオン系界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) でタンパク質分子の電氣的性質を消し、分子量依存的にタンパク質を電気泳動する手法。

**GST プルダウン法**: 特定タンパク質に GST のタグを付け、GST がグルタチオンに結合することを利用して特定タンパク質が細胞内で形成する複合体を回収・検出する手法。

**GFP**: 緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein)。分子量約 27kDa の蛍光タンパク質で緑色の蛍光を発する。特定タンパク質にタグとして付加することで、その細胞内局在を調べることができる。

**メタロチオネイン**: 金属結合性のタンパク質。分子内の金属結合ドメインで重金属イオンと結合し、最大 7-12 個の重金属イオンと結合できる。

**フィトケラチン**: 植物、真菌、線虫と全ての藻類に存在する金属結合性のタンパク質。細胞内で

キレート剤として働き、重金属元素の解毒に役立っている。