

水利用効率に関わる膜輸送体の大豆オーソログの機能解析

黒森 崇*・杉本 絵理子・篠崎 一雄

理化学研究所環境資源科学研究センター機能開発研究グループ

A Soybean Ortholog of the Membrane Transporter Involved in Water Use Efficiency

Takashi KUROMORI*, Eriko SUGIMOTO and Kazuo SHINOZAKI

RIKEN, Center for Sustainable Resource Science, Gene Discovery Research Group,
Saitama 351-0198

ABSTRACT

It is important to apply our understanding of plant science to address sustainable development goals (SDGs). For example, due to climate change, cultivated land will be affected, and the use of water is becoming a serious global problem. Abscisic acid (ABA) is an ordinary phytohormone, described as a stress hormone responsible for coping with various environmental stresses in plants. Under the systemic distribution of stress signals, ABA may be a mobile molecule within the plant. Recently, ABA transport systems in plants have been investigated, and several types of ABA transporters have been reported. We previously found that AtABCG25 is a membrane transporter related to ABA intercellular transport in *Arabidopsis thaliana*. We also observed that *AtABCG25* expression enhanced water-use efficiency in this model plant. However, the presence of AtABCG25 orthologs in different plant species has not been analyzed extensively. Here, we identified and carried out the functional characterization of an ortholog of AtABCG25 in *Glycine max* (soybean), viz. as GmABCG25. We tested the ABA transport activity of GmABCG25 and examined ABA-related phenotypes of *GmABCG25*-expressing *Arabidopsis* plants. Results suggest that GmABCG25 is a possible functional homolog of AtABCG25. Regulating intercellular ABA signaling using such ABA transporters may represent a novel strategy for the breeding of commercially important crops. *Soy Protein Research, Japan* **23**, 17-21, 2020.

*〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1

Key words : ABC transporter, abscisic acid, *Glycine max*, phytohormone, water use efficiency

アブシジン酸 (ABA) は、植物が環境ストレスを受けた時に働くホルモンであり、植物体内で可動性シグナル分子として働くと考えられています。最近、植物内でのABA輸送において、膜輸送体が重要な調節因子の一つであることが分かってきました¹⁾。実際に、ここ10年ほどで数種類の膜輸送体がABA膜輸送体として報告されています^{1, 2)}。私たちは、実験モデル植物のシロイヌナズナを材料として、ABA輸送に関与する膜輸送体の一つであるAtABCG25を同定しました³⁾。AtABCG25は、ほとんどの生物種で高度に保存されているATP-Binding Cassette (ABC) トランスポーターファミリーに属しています⁴⁾。ゲノムにコードされるABCトランスポーターの数を調べると、一般に植物では動物よりも数倍存在することが分かっており、多くのABCトランスポーターは植物固有の機能を持っている可能性があることが示唆されています^{5, 6)}。

さて、環境・エネルギー問題が全世界規模で深刻化している状況で、例えば、地球温暖化への対策に植物のもつ生存戦略や独自の機能を役立てることは有効な対策の一つです。気候変動下では地球全体で耕作地などが影響を受け、また乾燥地帯やそれに準ずる地域では水の利用がこれまで以上に切迫します。私たちは、生体膜機能を活用することで、植物の個体レベルでの水利用率向上という新しい有用形質に着目しています。既に、水分蒸散に関わる植物ホルモンABAに注目した研究において、膜輸送体AtABCG25を過剰発現した植物個体では水利用率が向上する結果が得られています⁷⁾。大豆*Glycine max*は、最も重要なマメ科穀物の一つです。本研究では、AtABCG25に対応する大豆の相同因子をクローニングして機能を調べました。モデル植物で得られた結果を実用植物に応用して、耐性と生長をバランス良く制御できる技術の創生を目指します。

方 法

Sf9昆虫培養細胞を用いたGmABCG25輸送アッセイ

人工合成した*GmABCG25* ORFを、GATEWAYシステムのエントリープラスミドに挿入しました (pENTR-*GmABCG25*)。次に、以前に記載した方法⁸⁾で、バキュロウイルス発現システム (Invitrogen) を使用して*Spodoptera frugiperda* (Sf) 9細胞で発現さ

せました。Sf9細胞 (1×10^6 細胞/mL) に対して、同じタイターに対応するウイルスを感染させ、4%FBS (Gibco)・100ユニット/mLペニシリン・100 μ g/mLストレプトマイシンを含む液体培地Sf-900 III SFM (Gibco) を振とう培養器100 rpmの速度で、28°Cで48時間培養しました。その後、細胞培養液を1,000 rpmで5分間の遠心分離によって収集し、培養液で2回洗浄し、最終濃度25 mg/mLで再懸濁しました。[3H]アブシジン酸 (GE Healthcare, またはAmerican Radiolabeled Chemicals, Inc.) の放射性同位体溶液を加え、室温で16分間インキュベートしました。各サンプルから100 μ lを0.45 μ mメンブレンフィルター (Millipore) に通してろ過しました。フィルター上に残った細胞の放射性カウントを、液体シンチレーションカウンター (ALOKA) により測定しました。

シロイヌナズナ植物を用いたGmABCG25の機能解析

植物内で遺伝子を発現させるために、人工合成した*GmABCG25* ORFを含むクローン (pENTR-*GmABCG25*) を、以前の実験³⁾ で用いた過剰発現ベクターに組み込み、35S :: *GmABCG25* プラスミドを生成しました。35S :: *GmABCG25* プラスミドをアグロバクテリウムにエレクトロポレーションにより導入し、さらにフローラルディッピング法によってシロイヌナズナ形質転換植物体を作製しました。ABA感受性テストは、1% (w/v) スクロース・0.8% (w/v) 寒天と、記載されているABA濃度を含むMS培地上で種子を発芽させ、植物生育チャンバー (トミー精工) において、22°Cで16時間明期/8時間暗期サイクルで生育させました。

結果と考察

大豆におけるAtABCG25のオーソログ

大豆のオーソログを選別するために、AtABCG25 (662アミノ酸, NCBI ID: NP_565030.1) と相同性が高いたん白質配列を検索しました。BLASTサーチ (NCBI) により、ABC transporter G family member 25 [*Glycine max*] (NCBI ID: XP_003535544.1) と登録されているたん白質配列が、最も相同性の高いものとしてヒットしました。たん白質配列のアライメントにより、AtABCG25と比較して、同一アミノ酸

が415/670 aa (62%), 機能類似アミノ酸が510/670 aa (76%) の相同性を示しました (Fig. 1). ここでは、この大豆のたん白質をGmABCG25と記述します。

ABA輸送アッセイにおけるGmABCG25の機能分析

GmABCG25とAtABCG25の機能的相同性を確認するために、まずGmABCG25に対応した遺伝子配列をクローニングしました。次に、GmABCG25がAtABCG25と同様のABA輸送活性を有するか調べるために、Sf9昆虫培養細胞でGmABCG25を発現させました。細胞培養液にABAアイソトープを添加した後、一定時間インキュベートし、細胞のみを残すようにろ過しました。ろ過後の細胞内に残った放射性カウントを測定したところ、GmABCG25を発現したSf9昆虫細胞は、空のベクターを含む対照細胞よりも

低いことが分かりました (Fig. 2)。また、この減少レベルはAtABCG25を発現するSf9昆虫細胞と同程度のレベルでした。この結果は、ABA膜輸送に関してGmABCG25がAtABCG25と同様のたん白質機能を持ち、細胞内から細胞外への排出活性をもつことを示唆しています。

GmABCG25を発現させたシロイヌナズナにおけるABA感受性

次に、植物内でのGmABCG25の機能を調べるために、シロイヌナズナ植物体に導入してGmABCG25の発現作用を調べました。以前に、AtABCG25をシロイヌナズナで過剰発現させた際、培地に加えられたABAに対して有意に非感受性を示し、排出活性をもつABA輸送体であるという結果をサポートしました³⁾。こ

AtABCG25	2	SAFDGVENQMNGPDS--PRLSQDPREPRLLSSSCFPITLKFVDVVCYRVKIHGMSNDSC	59
		+ F GVE NG S+ P Q+ R+ LS S +PITLKF+DV YR+KI +	
GmABCG25	10	AVFGGVETP-NGDSSNTKPHPKQESRDLSPLSCL-YPITLKFIDVAYRLKIEDKQKNGG	67
	60	NIKKLLGLKQK-PSDE---TRSTEERTILSGVTGMISPGEFMAVLGSPSGSKSTLLNAVA	115
		+IK+ + PSD+ +++ERTIL GVTG+ PGE +AVLGPSPSGSKSTLLNA+A	
	68	SIKRFFTPHESSPSDQSGRAGASQERTILKGVGTGIAHPGEILAVLGPSPSGSKSTLLNALA	127
	116	GRLHGSNLTGKILINDGKITKQTLKRTGFVAQDDLLYPHLTVRETLVFAALLRPLRSLR	175
		GRLHG LGT IL N K+TK L+RTGFV QDD+LYPHLTVRETLV F+A+LRLPR+L R	
	128	GRLHGHGLTGTILANSSKLTKPVLRRTGFTQDDLLYPHLTVRETLVFCAMRLRPLRPLR	187
	176	DVKLRAAESVISELGLTKCENTVVGNTFIRGISGGERKRVIAHELLINPSSLVLDEPTS	235
		K+ AE+ I+ELGL KCE+T++GN+FIRG+SGGERKRVIAHE+L++PSSL+LDEPTS	
	188	AAKIAVAEAAIAELGLGKCEDTIIGNSFIRGVS GGERKRVIAHEMLVDPSSLILDEPTS	247
	236	GLDATAALRLVQTLAGLAHGKGTWVTSIHQPSSRVFQMFDTVLLSEGKCLFVGKGRDA	295
		GLD+TAA RLV TL LA KGKTV+TS+HQPSRRV+QMFV VL+LSEG+CL+ GK DA	
	248	GLDSTAARHLVWTLGSLAK-KGKTVTSVHQPSRRVYQMFQKVLVLESEGQCLYFGKGS DA	306
	296	MAYFESVGFSPAFPMNPADFLDLANGVCQTDGVTREKPNVRQTLVTAYDTLLAPQV-K	354
		M YF+SVGF+P+FPMPADFLDLANGVC DG +E+++PN++Q L+ +Y+T+L P+V	
	307	MRYFQSVGFAPSPMPADFLDLANGVCHVDGQSEKDRPNIKQNL IHSYNTILGPKVTA	366
	355	TCIEVSHFPQDNARFVKTRVNGG---GITTCIATWFSQCLILLHRLKERRHESFDLLRI	411
		C++ ++ P N +++ + WF Q ILL R LKER+HESF+ LR+	
	367	ACMDSTNVPSRNTHPLRSNSSKEFRNRDRVSFFDWFYQFRILLQRSLKERKHESFNTRLV	426
	412	FQVVAASILCGLMMWHSYRDVHDLGLLFFISIFWGLVPSFNAVTFPQERAIIFTRERA	471
		QV+AA++L GLMMWHSYR++ DRGLGLLFFISIFWGV PSFN+VF FPQERAI F+ERA	
	427	CQVIAAALLAGLMWHSYRNIQDRGLGLLFFISIFWGVFPSFNSVFAFPQERAI FMKERA	486
	472	SGMYTLSSYFMAHVLGSLMELVLPASFLTFTYWMVYLRPGIVPFLTLVLLVLLVYVLA SQ	531
		SGMYTLSSYFMA++G L MEL+LP FL TYWM L+P + FLLTL V+L YV+ SQ	
	487	SGMYTLSSYFMARIVGDLPELILPTIFLIVTYWMGGLKPDWAFLLTLVLLVLYVYVLA SQ	546
	532	GLGLALGAAIMDAKASTIVTMLAFVLTGGYYVNVKVPSPGMVWMMKYVSTTFYCYRLLVA	591
		GLGLALGAAIMDAK+AST+ VTMLAFVLTGGYYV+KVPS M W+KY+STTFYCYRLL	
	547	GLGLALGAAIMDAKQASTVAAVTMLAFVLTGGYYVHKVPSMAMIKYISTTFYCYRLLTR	606
	592	IQYSGSEEILRMLGCDKSGKQASAAATSAGCRFVEEEVIGDVGMMWTSVGVFLFMFFGYRV	651
		IQY G++I +LGC + K GC FVEE+V+G +G +GVL MF YR+	
	607	IQYEDGKISYLLGCYQRDK-----GGCSFVEEDVVGQIGTLGIGVLLFMFFVYRLL	658
	652	LAYLALRRIK 661	
		LAYLALRRIK	
	659	LAYLALRRIK 668	

Fig. 1. Protein sequence alignment of AtABCG25 and GmABCG25. A result of the BLAST search is shown. The upper sequence is from AtABCG25, the bottom sequence is from GmABCG25, and middle sequence is conserved and similar amino acids.

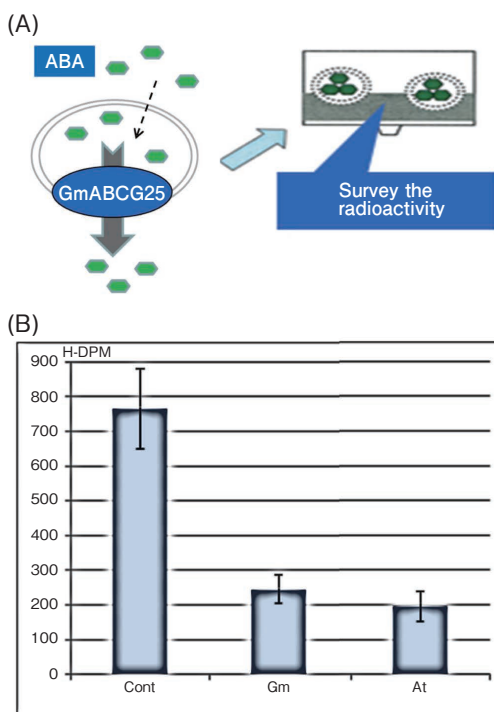


Fig. 2. Transport assay of ABA efflux activity in *GmABCG25*-expressing Sf9 culture cells. (A) The transport assay is illustrated. *GmABCG25* was expressed in Sf9 cells using a baculovirus expression system. Isotope solution of [3H] abscisic acid was added, and cells were filtrated. The radioactivity was counted by a liquid scintillation counter. (B) ABA efflux activity was measured in Sf9 culture cells containing *GmABCG25* vector (Gm), *AtABCG25* vector (At), and empty vector (Cont) after 16 minutes incubation with isotope-labeled ABA. Each bar represents the mean \pm SD (n = 4). H-DPM, 3H-disintegrations per minute.

ここでは、先ず35S :: *GmABCG25*ベクターを有する形質転換シロイヌナズナ植物を作製しました。そして、ABA応答性をテストするために、2つの独立した形質転換系統について、発芽後のABA感受性を確認しました。その結果、*GmABCG25*を導入した形質転換系統では、ABA感受性が大幅に減少しました (Fig. 3)。以上の結果から、大豆の*GmABCG25*はシロイヌナズナの*AtABCG25*と同様の、植物内での生理的機能をもつことが示唆されました。

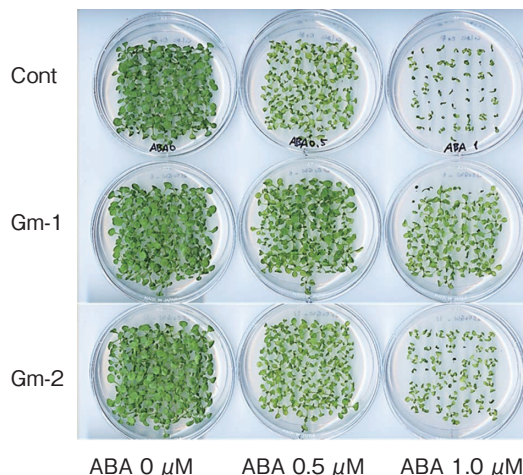


Fig. 3. Post-germinative growth of *GmABCG25*-expressing *Arabidopsis* plants under ABA treatment. Seedlings of controls (Cont) and two transgenic lines (Gm-1 and Gm-2) bearing the 35S :: *GmABCG25* transgene were grown for 14 days in ABA concentrations (0, 0.5, and 1.0 μM).

要 約

食糧として豆類の中で最も重要な大豆の生産を維持するために、植物科学の知見を利用し役立てることは有力な手法の一つです。例えば、気候変動下では耕作地が影響を受け、また乾燥地帯では水の利用がこれまで以上に切実な問題となっています。本研究では、生体膜機能を活用することで、植物に個体レベルでの水利用効率向上という新しい有用形質を付与し、地球環境変動下においても作物の生産を安定維持することを目的としています。これまでもストレス耐性のような有用形質を付与する試みが行われてきましたが、植物体の生育そのものが阻害されてしまう副作用が起こることが多く、耐性と生長のバランスが問題となっていました。本研究では、植物個体として水利用効率を高めることを指標に、生長と反応のバランスを重視することで問題の解決を目指します。特に、膜輸送体に注目することで、これまでモデル植物で得られている結果を活用します。具体的には、モデル植物において気孔開閉を制御する植物ホルモンの膜輸送体を植物に導入することで、植物体の水利用効率が向上する結果が得られています。この成果を利用して、まず大豆のオーソログに相当する遺伝子をクローニングしました。次に、この大豆オーソログ因子が、モデル植物と同様のホルモン輸送活性をもつことを確かめました。さらに、モデル植物へ導入することで植物体への効果について調べ、植物体内での機能についても相同性があることが分かりました。生体内での活性物質の輸送を調節して、耐性と生長をバランス良く制御できる技術の創生を目指しています。

文 献

- 1) Kuromori T, Seo M and Shinozaki K (2018): ABA Transport and Plant Water Stress Responses. *Trends Plant Sci*, **23**, 513-522.
- 2) Boursiac Y, Leran S, Corratge-Faillie C, Gojon A, Krouk G and Lacombe B (2013): ABA transport and transporters. *Trends Plant Sci*, **18**, 325-333.
- 3) Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Shimizu H, Sugimoto E, Kamiya A, Moriyama Y and Shinozaki K (2010): ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 2361-2366.
- 4) Sánchez-Fernández R, Davies TG, Coleman JO and Rea PA (2001): *The Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem*, **276**, 30231-30244.
- 5) Hwang JU, Song WY, Hong D, Ko D, Yamaoka Y, Jang S, Yim S, Lee E, Khare D, Kim K, Palmgren M, Yoon HS, Martinoia E and Lee Y (2016): Plant ABC transporters enable many unique aspects of a terrestrial plant's lifestyle. *Mol Plant*, **9**, 338-355.
- 6) Do THT, Martinoia E and Lee Y (2018): Functions of ABC transporters in plant growth and development. *Curr Opin Plant Biol*, **41**, 32-38.
- 7) Kuromori T, Fujita M, Urano K, Tanabata T, Sugimoto E and Shinozaki K (2016): Overexpression of AtABCG25 enhances the abscisic acid signal in guard cells and improves plant water use efficiency. *Plant Sci*, **251**, 75-81.
- 8) Kuromori T, Sugimoto E and Shinozaki K (2014): Intertissue signal transfer of abscisic acid from vascular cells to guard cells. *Plant Physiol*, **164**, 1587-1592.