

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07571

研究課題名(和文) イネ突然変異系統13-45における白未熟粒発生機構の解明

研究課題名(英文) Analyses on the molecular mechanism underlying the chalkiness of the rice mutant 13-45

研究代表者

田中 朋之(勝部朋之)(Tanaka, Tomoyuki)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：50224473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネ白未熟粒発生機構の解明を目指して、白未熟粒多発突然変異系統13-45の解析を行った。RNA-seq解析により、高温下で熱ストレスタンパク質遺伝子の発現上昇、種子貯蔵タンパク質プロラミンの発現低下を認めた。一方、大腸菌発現系で調製した組換えcpHsp70-2のATPase活性は、13-45型は野生型に比べ最大活性が23%減少していた。また、cpHsp70-2と相同な分子シャペロンDnaKを欠損した大腸菌の相補試験により、13-45型のcpHsp70-2はその機能を損ねていることが分かった。すなわち、cpHsp70-2の機能低下が、13-45における白未熟粒発生要因であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、イネ登熟期の高温・低日射により白未熟粒の発生が問題となっている。白未熟粒が増えると、外観品質が劣るだけでなく、食味の低下、精米歩留まりの低下による実質的な収量低下など、様々な負の影響をもたらす。そのため、白未熟粒発生機構を解明し、白未熟粒を生じにくい品種の育成や栽培技術の開発が求められる。本研究では、高温下でのみ著しく白未熟粒を生じる突然変異体13-45を用いて、その発生原因の解明を試みた。その結果、熱ストレスタンパク質の一種cpHsp70-2の機能低下が乳白化の原因であることが示唆された。本研究の成果は、野生型における白未熟粒発生機構の解明に向けて、有用な知見になると期待される。

研究成果の概要(英文)：High temperature during a grain filling of rice produces chalky grains which diminish grain quality as well as productivity. In this study, we analyzed the novel chalky rice mutant 13-45, the possible causal gene of which is plastid heat shock protein 70-2 (cpHsp70-2). In RNAseq analysis under high temperature, upregulation and downregulation of genes were detected for some heat stress proteins and seed storage proteins, respectively. The intrinsic ATPase activity of recombinant cpHsp70-2 was lower by 23% in the mutant type than the wild type. Besides, the growth of DnaK (Hsp70 homologue)-defective Escherichia coli (E. coli) cells complemented with DnaK with 13-45 type mutation was significantly reduced at 37 °C. The growth of DnaK-defective E. coli cells complemented with wild type DnaK was not reduced at 37 °C. Taken together, these results suggest that the lowered function of the cpHsp70-2 is involved with the chalkiness of the mutant 13-45.

研究分野：作物生産学

キーワード：イネ 白未熟粒 高温ストレス 熱ストレスタンパク質 突然変異体

1. 研究開始当初の背景

近年、イネ登熟期の高温や低日射により白未熟粒が多く発生し問題となっている。白未熟粒とは、胚乳細胞内のデンプン粒が密に充填しないため空隙を多く生じ、光が散乱するために白濁して見える米粒のことである。白未熟粒が増えると、外観品質が劣るだけでなく、食味の低下、精米歩留まりの低下による実質的な収量減少など、様々な負の影響をもたらす。白濁が生じる部位の違いにより、腹白粒、背白粒、基白粒、心白粒、乳白粒などと分類され、特定の環境要因との関連性を指摘する報告もあるが、その発生機構には不明な点が多い。研究代表者らは、品種「日本晴」に重イオンビームを照射した約 1,000 系統のイネ変異集団より、高温となる圃場条件下で白未熟粒を多発する突然変異系統 13-45 を分離した (図 1)。13-45 は、低気温環境下で栽培すると白未熟粒の発生割合が低下し、野生型と同程度の白未熟粒割合を示す。そのため、13-45 は高温に対する感受性が高くなった系統であり、その高温ストレス応答機構を解明すれば、白未熟粒発生機構の解明に資するものと推察された。これまでにプロテオーム解析等により原因候補遺伝子であるプラスチド型 70kDa 熱ストレスタンパク質 2 遺伝子 (*cpHsp70-2*) を同定し、その第二エキソン部に一塩基置換を見出したものの、その発現量には差異は認められなかった。

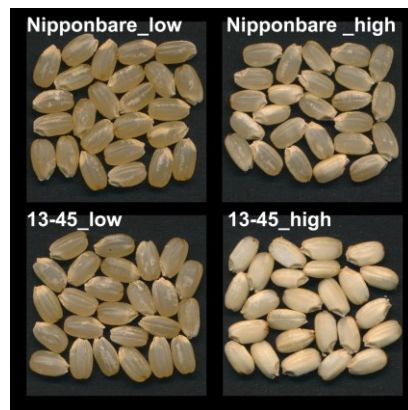


図 1 野生型と突然変異体 13-45 の外観品質の変化。

2. 研究の目的

本研究では、以下の3つの解析を行うことを目的とした。すなわち、(1) 白未熟粒多発変異体 13-45 と野生型品種「日本晴」において、高温処理をした登熟中未熟種子における RNA-seq 解析を行うことにより、13-45 変異体の原因候補遺伝子以外の発現変化を網羅的に調べ、白未熟化との関連性を探る。一方、(2) 13-45 変異体と野生型の *cpHsp70-2* の大腸菌発現系を構築し、発現タンパク質の機能解析を行う。すなわち、組換え *cpHsp70-2* が有する ATPase 活性の差異を調べる。さらに、(3) *cpHsp70-2* と相同な分子シャペロン DnaK を欠損した大腸菌の常温・高温下での相補試験により、13-45 型の *cpHsp70-2* のシャペロン機能を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RNA-seq による網羅的な遺伝子の発現挙動解析

野生型品種「日本晴」と突然変異系統 13-45 を、N:P:K=0.36g:0.36g:0.36g を施肥した 1/5000a ワグネルポットにて、ファイトトロン内で栽培した。開花後 5 日目より 1 週間高温処理 (日平均気温平均値 29°C) をした穂と常温 (日平均気温平均値 25°C) で育てた穂を得た。温度処理後の穂を液体窒素で速やかに凍結させた後、全 RNA を抽出した。その後、DNase I 処理とカラム精製をした。RNA の濃度と品質は Nanodrop と Agilent 2100 Bioanalyser で分析した。RNA-seq 解析用のライブラリーは、Illumina Truseq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit で調製し、Illumina HiSeq (Paired End, 100 base/read, 4 Giga base/sample) で解析を行った。イネゲノム (Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0) に対して DNA Data Bank of Japan (<https://p.ddbj.nig.ac.jp/pipeline/Login.do>) のパイプラインにある TopHat2 (2.0.9) でマッピングを行なった。データの二次解析は SeqMonk software (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/seqmonk/>) を用いて行なった。GO (gene ontology) term 解析は Gene Ontology Consortium (www.geneontology.org/) にて行なった。

(2) 大腸菌発現系による組換え型 *cpHsp70-2* の機能解析

突然変異体 13-45 では、*cpHsp70-2* の ATP 分解酵素ドメインに 1 アミノ酸置換が生じている。そこで *cpHsp70-2* の大腸菌発現系を構築し、発現タンパク質の機能解析を行った。まず、以下に示す通り *cpHsp70-2* をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として大腸菌内で発現させ、GST カラムを用いて高純度に精製した。その後、補酵素や基質を含まない条件下で ATPase 活性を調べた。

cpHsp70-2 のコード領域 (nucleotide binding domain (NBD) and substrate binding domain (SBD)) を PCR プライマー (FW: pGEX-*cpHsp70-N*, TTTGAATTCGCGATGCGGGTGGCGTG and RV: pGEX-*cpHsp70-CL-rc*, TTTGCGGCCGCTTCAGTTGCTTCTCAGTC) と RT-PCR 産物 (the wild type and the mutant 13-45 cDNAs) で増幅した。増幅産物は、EcoRI と NotI で消化し、発現ベクター pGEX-6P-1 (GE Healthcare) の EcoRI/NotI サイトに挿入した。発現プラスミドを大腸菌 BL21 に導入し、37°C にて LB 培地で予備培養した後、600 nm の吸光度が 0.6 になった時に 1 mM の isopropyl-1-thio-β-D-galactoside (IPTG) を加えて 12 時間 25°C にて発現を誘導した。発

現誘導後の大腸菌を回収し、超音波破碎後、20%, 40%, 60% 飽和硫酸アンモニウムにて分画した。脱塩後、GST Trap FF column (GE Healthcare) と PreScission Protease を用いて、組換え型 cpHsp70-2 を精製した。

組換え型 cpHsp70-2 の ATPase 活性は、Chang et al (2010)の方法に従い、co-chaperones と substrate protein の非存在下で測定した。ATPase 反応は、1.1 μ g の組換え型 cpHsp70-2 と、50-1600 μ M ATP, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂ で 37 °C にて 18 時間反応させた (Luo et al (2010))。反応は、2.5% (w/v) SDS と 1% (w/v) KCl の添加で停止した。上清に遊離した無機リン酸を malachite green reagent (1 mM malachite green, Tween20 (0.17% w/v), and ammonium heptamolybdate tetrahydrate (3% w/v) in 4.7 N H₂SO₄) と 20 °C で 90 分間反応させ、620 nm の吸光度を Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific)で測定した。

(3) 原因候補遺伝子と相同な遺伝子を欠損した大腸菌の常温・高温下での相補試験

大腸菌はHsp70のホモログである DnaK を有しており、高温下での増殖に必要と考えられている。この DnaK を欠損した大腸菌変異株が調製されている (Baba T. et al. (2006) Mol Systems Biol, doi:10.1038/msb4100050, a Keio collection (Systematic single-gene knock-out mutant of E coli K-12, JW ID 0013))。そこで、DnaK expression plasmid (ASKA clone (-): JW0013-AM, National BioResource Project-E.coli, National Institute of Genetics, Mishima, Japan) と、その変異型プラスミドをDnaK欠損変異株に導入し、相補性を調べた。イネ変異体13-45の cpHsp70-2に生じている変異に相当するD201V変異を有する DnaK (D201V) 発現プラスミドは、インバースPCR (FW: DnaK_D201V_F, TTCTATTATCGAAATCGACGAAGTTGACGGCG and RV: DnaK_D201V_R, ATAaCGAAAGTACCACCACCCAGTTCATAAACC) で調製した。DnaK欠損株は DnaK発現プラスミドまたは DnaK (D201V) 発現プラスミドで形質転換し、0.1 mM IPTG を含むLB液体培地またはLB寒天培地にて、30 °C, 37 °Cにて 20 時間まで培養した。

4. 研究成果

(1) 登熟中未熟種子におけるRNAseq解析により、両品種・系統ともに高温処理により様々な熱ストレスタンパク質遺伝子の発現が上昇し、種子貯蔵タンパク質の一つであるプロラミンの発現量が低下した (Table 1)。またGO term解析を行ったところ、response to copper ion (GO:0046688), ethanol (GO:0045471), cadmium ion (GO:0046686), arsenic-containing substance (GO:0046685), hydrogen peroxide (GO:0042542), heat (GO:0009408)に分類される遺伝子の発現が高温下で上昇した (Fold Enrichment > 100)。しかしながら、変異体13-45に特異的な遺伝子発現変化と乳白化の関連性は見出されず、さらに詳細な解析が必要と考えられた。

Table 1. RNA-seq data analyzed with SeqMonk (intensity difference p<0.01).

<u>Upregulated genes related with heat shock proteins under high temperature</u>	
<u>ID</u>	<u>Description</u>
Os01g0136000	Similar to Cytosolic class I small heat-shock protein HSP17.5
Os01g0136050	Similar to 16.9 kDa heat shock protein
Os01g0136200	16.9 kDa class I heat shock protein 1
Os01g0184100	Similar to 17.5 kDa class II heat shock protein
Os01g0606900	Heat shock protein DnaJ, N-terminal domain containing protein
Os02g0782500	Similar to Small heat stress protein class CIII
Os03g0245800	Similar to Heat shock protein 26
Os03g0266300	Class I low-molecular-weight heat shock protein 17.9
Os03g0266900	Low molecular mass heat shock protein Oshsp17.3
Os03g0267000	Low molecular mass heat shock protein Oshsp18.0
Os03g0267200	Low molecular mass heat shock protein Oshsp17.7
Os04g0107900	Similar to Heat shock protein 82
Os04g0445100	Similar to 22.7 kDa class IV heat shock protein precursor
Os05g0428600	Similar to HSP70 precursor
Os06g0253100	Heat shock protein Hsp20 domain containing protein
Os09g0526600	Similar to Isoform 2 of Heat stress transcription factor B-2c
<u>Downregulated genes related with seed storage proteins under high temperature</u>	
<u>ID</u>	<u>Description</u>
Os05g0328333	Similar to Prolamin
Os05g0328800	Prolamin 7
Os05g0329200	Similar to Prolamin
Os05g0329350	Prolamin
Os05g0329400	Similar to Prolamin
Os05g0329700	Similar to Prolamin
Os05g0330150	Similar to Prolamin
Os05g0331532	Similar to Prolamin
Os05g0331800	Similar to Prolamin
Os05g0332000	Similar to Prolamin precursor
Os02g0248800	Similar to Glutelin type-B 2 precursor

(2) cpHsp70-2の大腸菌発現系を構築し、発現タンパク質の機能解析を行った。すなわち、cpHsp70-2をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として大腸菌内で発現させ、GSTカラムを用いて高純度に精製した。その結果、SDS-PAGEにおいてほぼ単一のバンドになるまで発現タンパク質を精製することが出来た。組換えcpHsp70-2が有するATPase活性を調べたところ、13-45型は野生型に比べ、補酵素や基質を含まないときの最大活性 V_{max} が23%減少し、 K_m はやや低下していた (図2)。

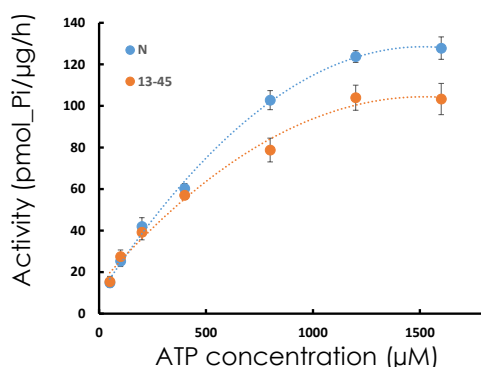


図2 野生型(N)と変異型(13-45)の組換えcpHsp70-2のATPase活性.

(3) cpHsp70-2と相同な分子シャペロンDnaKを欠損した大腸菌の常温・高温下での相補試験により、DnaK(D201V)を発現するDnaK欠損株は37°Cでの増殖が著しく抑制された。このことから、13-45型のcpHsp70-2はその機能を損ねていることが明らかになった。以上のことから、13-45型cpHsp70-2のタンパク質機能低下が、白未熟粒発生の主要因であることが示唆された。

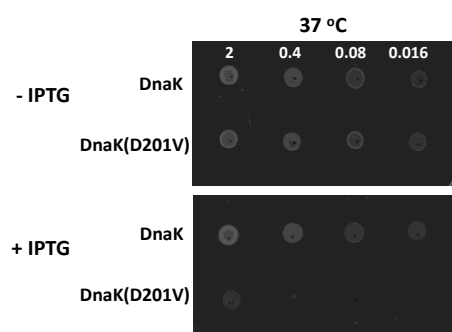


図3 野生型DnaKと変異型DnaK(D201V)の発現プラスミドを用いたDnaK欠損大腸菌株の相補性試験。
培養温度：37°C。 図中の数字は培養開始時の菌濃度(OD₆₀₀)を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

① T. Katsube-Tanaka, R. Tabassum, T. Dosaka, C. Masuoka, M. Tsuyama, Y. Mukai, C. Nukigi, H. Ichida, R. Morita, and T. Abe. (2019) Isolation of the chalky grain mutant 13-45 in rice (*Oryza sativa* L.), Riken progress report. In press. 査読あり

〔学会発表〕 (計 3 件)

① 田中朋之・Rehenuma Tabassum・道坂怜生・阿部知子 (2018) イネ突然変異系統13-45における白未熟粒発生機構の解析第5報：原因候補遺伝子産物の機能解析. 日本作物学会

② Rehenuma Tabassum, Tomoyuki Katsube-Tanaka, Tomoko Abe. (2018) Analysis on White Immature Grains of the Rice Mutant Line 13-45. IV. Quantitative comparison among cultivars. Japanese Society of Crop Science

③ 田中朋之・Rehenuma Tabassum・阿部知子 (2017) イネ突然変異系統13-45における白未熟粒発生機構の解析第3報：温度応答性の定量的比較. 日本作物学会

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。