

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08140

研究課題名(和文) イネの環境ストレス耐性とジャスモン酸シグナリングの制御に関する因子の解析

研究課題名(英文) Analyses of factors involved in environmental stress tolerance and regulation of jasmonate signaling in rice

研究代表者

武田 真 (TAKEDA, Shin)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：00432253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ジャスモン酸(JA)は、植物の成長と発達、生物的ストレスおよび非生物的ストレスに対する応答を調節するホルモンである。本研究では、JAシグナル伝達の制御因子JAZに結合し、転写因子の活性抑制を仲介する因子RSS3とそのホモログRSL1とRSL2が、イネの茎頂分裂組織と葉原基で発現することを示した。また、RSS3欠損変異体と野生型イネの茎頂分裂組織と葉原基組織でのRNA発現プロファイルの解析から、RSS3欠損変異体ではJA応答が亢進することを見出した。これらの結果は、イネの地上部の成長点においてRSS3がJA作用を調節し、成長とストレス応答のバランスをとる役割をもつことを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物はメリステムにおいて産生される細胞が分裂し、分化することで成長するが、ストレス環境下でその活性がどのように制御されるかについては不明な点が多い。植物のストレスホルモンであるジャスモン酸は成長とストレス耐性の両方の制御に関わることが知られているが、本研究ではイネのRSS3が、以前に報告した根の成長点に加え、地上部成長点においてもジャスモン酸応答を制御する役割をもつことを明らかにした。この知見は、単子葉穀物の成長制御と連動したストレス応答・耐性の機構の一端を説明するものである。また、RSS3様因子は植物界に広く保存されていることから、類似の機構が他の植物にも備わっている可能性を提起する。

研究成果の概要(英文)：Jasmonate (JA) is a hormone that regulate growth and development, and responses to biotic and abiotic stresses in plants. In this study, we showed that RSS3 and its homologues RSL1 and RSL2, which bind to JA signaling regulator JAZ and mediate the repression of transcription factor activity, are expressed in the shoot apical meristem (SAM) and leaf primordia in rice. We analyzed RNA expression profiles in the SAM and leaf primordia tissues of RSS3 deficient mutant and wild-type rice, and found that JA response is increased in the RSS3 deficient mutant. These results suggest that RSS3 has a role to modulate JA action to balance the growth and stress responses at the growth point above the ground.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：イネ ジャスモン酸 JAZ因子 成長制御 環境応答 RSS3

1. 研究開始当初の背景

地に根を張る植物は移動できないために、環境変化に適応するための様々なシステムを備えている。こうした適応システムは、環境変化に対する早期の生理応答から、細胞内外のシグナル伝達、細胞分裂や細胞分化の制御にまで及ぶ。成長制御に関していえば、環境ストレスを感知した植物が細胞分裂を停止させる仕組みについて多くの研究がなされている。とくに、細胞周期制御因子を主軸とした研究が進み、細胞周期チェックポイントの概念が広く理解されている。その一方で、ストレス環境下での細胞の分裂活性や分裂能がどのような仕組みで維持されているかについては、殆どわかっていない。同様に、細胞分裂と協調的に制御される細胞分化についても、ストレス環境下でどのようにその進行や能力が保持されるのか、未知なままである。

本課題代表者は、イネの分子遺伝学的解析から、ストレス環境下での植物の成長点の機能保持に関する知見を集積してきた。例えば、塩ストレス環境下で地上部および根の成長が著しく阻害される *rss1* 変異体および根の成長が特に阻害される *rss3* 変異体をそれぞれ同定した (Nature Commun. 2011; Plant Cell. 2013)。 *rss1* 変異体では、分裂活性が、塩ストレス依存的に著しく低下するが、これは機能未知因子 RSS1 の機能欠損により、細胞周期の G1 期-S 期の移行が妨げられることに起因していた。RSS1 は分裂細胞特異的に発現し、細胞周期の M 期から G1 期にかけて分解されること等から、細胞分裂活性の維持に重要な役割を果たすと推定された。これらの結果は、ストレス環境下での成長点の細胞分裂活性を保持するための未知の機構が存在することを示唆した。

一方、*rss3* 変異体では、根端細胞で発現する RSS3 因子の機能欠損により、細胞伸長阻害が起きることが判明した。さらに、RSS3 がジャスモン酸 (JA) シグナリングの負の制御因子である JAZ と正の制御因子である bHLH 型転写因子の両方と相互作用し、過剰な JA 応答を抑制する機能をもつことが解明された。このことは、JA シグナリングの抑制がストレス環境下での根の伸長制御に重要であることを意味した。

JA は生体内でイソロイシン (Ile) と結合した JA-Ile に変換された後、CO11 受容体によって特異的に認識される。JA-Ile の CO11 への結合は、JA シグナリングの抑制因子 JAZ の結合を伴い、JAZ のユビキチン化と 26S プロテアソームによる分解を促進することで、JAZ による抑制制御下にある転写因子群の活性化 (脱抑制) を引き起こす。本課題代表者らは、JA-Ile の不活性化に関わるチトクロム P450 酵素遺伝子 *CYP94C2b* を過剰発現したイネについて、塩ストレス環境下において、葉の老化が遅延すること、成長点での葉の新生能力が高まること、生存能の向上がみられることを報告した (Plant Cell Physiol. 2015)。さらに、同遺伝子を過剰発現させたイネでは野生型に比べて背丈が高くなること、またそれが細胞分裂活性の上昇を伴うことを報告した (Plant Signal. Behav. 2015)。これらのことから、JA の作用がイネの成長やストレス環境下での生存性を制限する要因になり得ると推察された。

そこで、JA シグナリングの構成的な抑制をもたらず変異型 JAZ 因子 (mJAZ) をデザインし、これを過剰発現させたイネを作出したところ、メリステムの転換異常や器官形成を過度に繰り返す「貫生化」と呼ばれる現象が誘発され、また不稔となった (Plant Signal. Behav. 2014)。興味深いことに、このような現象は異常気象などによっても誘発されることが知られている。

これらの一連の知見は、生育環境の変化と JA の作用およびメリステム機能に深い関係があることを予期させた。

2. 研究の目的

本研究では、ストレス環境下での成長点の機能保持に関わる因子、および JA シグナリングの制御に関与するイネ因子について、それらの生体内での特性および役割を明らかにすることで、単子葉植物のストレス耐性機構や成長制御機構の一端を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

単子葉植物のモデルであるイネの環境ストレス耐性と JA シグナリングの制御に関与する因子について、以下の研究を行った。

(A) ストレス環境下でのイネの成長点での細胞分裂活性の維持およびイネ個体の生存能の保持に関わる因子として特定された RSS1 は、未だその機能が解明されていない。本研究では、RSS1 がイネに特有な機能をもつのか、あるいは他の植物種においてもその機能が保存されているのかを調べた。具体的には、RSS1 のコムギホモログ TdRL1 が、イネの RSS1 と同様の特性をもつのか、イネの *rss1* 変異を相補できるのか、ストレス耐性に寄与し得るのかについて調べた。さらにまた、異種植物に発現させた場合の RSS1 ファミリー因子の特性や機能について調べた。

(B) JA シグナリングの鍵ステップは、JA 応答性遺伝子の発現の活性化に関わる転写因子に抑制的にはたらく JAZ 因子が、活性型 JA とともに CO11 受容体に結合することにより、ユビキチン化されて分解されることである。これにより JAZ による転写因子の抑制が解除され、JA 応答性遺伝子の活性化が起きる。本研究では、JA シグナリングの制御とストレス環境下での成長点の機能制御との関係を明らかにするために、以下の解析を行った。

C011 非結合性の変異型 JAZ 因子 (mJAZ) を人為的に発現誘導するイネ系統、より具体的には、デキサメタゾン誘導性プロモーターの下流に種々の mJAZ を連結した融合遺伝子を導入したイネ系統を作出し、mJAZ がストレス存在下での生育にどのような影響を与えるかを調べた。

イネの RSS3 や RSL1、RSL2 に結合する因子を酵母ツーハイブリット法、アルファスクリーン法、および BiFC 法により解析した。

イネの RSS3 やそのホモログ RSL1、RSL2 の地上部の成長点での空間的な発現パターンを、GFP 蛍光タンパク質マーカーを利用して調べた。より具体的には、RSS3、RSL1、RSL2 と GFP レポーターとの融合タンパク質をコードする遺伝子を、RSS3、RSL1、RSL2 それぞれの遺伝子プロモーターにより発現させたイネを作出し、その地上部成長点を含む組織片を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

イネの RSS3 および RSL1、RSL2 の変異体や多重変異体をゲノム編集技術の 1 つである CRISPR-Cas9 システムを用いて作出し、その成長やストレス応答性について調べた。また、RNAseq 法により、野生型イネと RSS3 機能欠損変異体の茎頂分裂組織と葉原基での RNA 発現プロファイルを調べた。具体的には、地上部成長点を含む組織を架橋剤非存在下で固定包埋した後に、これより薄切片を作製し、さらにレーザーマイクロダイセクション法により茎頂分裂組織と葉原基を含む薄組織片を切り出した。これらの薄組織より微量の RNA を抽出・精製して逆転写を行い、得られた cDNA を次世代シーケンサーにより解析した。

イネの JA シグナリングの制御因子の 1 つである JAZ2 を、CFP 蛍光マーカーとの融合タンパク質として植物細胞に一過的に発現させ、その挙動を調べた。

4. 研究成果

(1) RSS1 のコムギホモログ TdRL1 の機能解析

RSS1 は種々の環境ストレス環境下でのイネの生育や生存に寄与する天然変性タンパク質 (intrinsically disordered protein; IDP) であり、成長点の細胞分裂組織で特異的に発現すること、また保存された D ボックスおよび DEN ボックスをもち、APC/Ccdc20 シクロソームによる分解制御を受けることが明らかにされている。また、イネ *rss1* 変異体は塩ストレス存在下において極矮性となる。本研究では、この表現形質をコムギの RSS1 ホモログである TdRL1 を発現させることで抑制できることを示した。また、TdRL1-GFP 融合タンパク質をシロイヌナズナにて過剰発現させると、TdRL1-GFP が根端の分裂細胞に観察されること、また 26S プロテアソームの阻害剤である MG132 の処理により TdRL1-GFP の検出量が増加すること、間期の細胞では核近傍に局在する TdRL1-GFP がストレス処理により核に移行することを見出した。これらの結果は、RSS1 ファミリー因子がイネ以外の植物においても環境ストレス耐性に寄与することを示唆するとともに、その機構解明のための新たな手掛かりを与えるものである。(本成果は、チュニジア Sfax バイオテクノロジー研究所の Hanin 教授らとの共同研究によるものである)

(2) 変異型 JAZ 因子を発現するイネのストレス耐性能

C011 非結合性の変異を導入した JAZ3、JAZ4、JAZ5、JAZ6 および JAZ7 を人為的に発現誘導するイネ系統を作出した。得られた次世代種子を用いて、これらの系統の塩ストレス下での生存性を調べたところ、変異型 JAZ3、変異型 JAZ4 および変異型 JAZ7 の導入系統について、野生型イネよりもしばしば高い生存性が観察された。このことは、これらの JAZ 因子の下流ではたらく因子にストレス耐性能を制御するものがある可能性を提起した。しかしながら、実験による生存率のバラツキが大きく、何らかの要因が変異型 JAZ 因子の作用に干渉すると考えられた。

(3) イネ RSS3 ファミリー因子と結合する因子の特定

RSS3 がいくつかの JAZ 因子、および bHLH 型 DNA 結合性因子と結合し、JA 応答性遺伝子の抑制的制御に関わることを以前に報告していた。本研究では、イネの RSL1 や RSL2 が RSS3 と同様に JAZ との結合能をもつことを示した。また、RSS3、RSL1 および RSL2 が bHLH 型転写因子とは別のタイプの転写因子に結合すること、とくにエチレン応答の制御因子に結合することを示した。これらの結果は、RSS3 ファミリー因子がストレス環境に応答する多様な遺伝子の発現制御に寄与することを示唆するとともに、JA シグナリングとエチレンシグナリングのクロストークに関与する可能性を提起した。(本成果は、名古屋大学遺伝子実験施設の多田安臣教授、野元美佳助教、産業技術総合研究所の光田展隆博士らとの共同研究によるものである)

(4) イネの JAZ 因子に結合する RSS3、RSL1 および RSL2 の地上部成長点での発現部位

RSS3、RSL1、RSL2 の発現部位を、GFP レポーターを利用して解析し、これらがいずれも地上部の茎頂分裂組織や葉原基の細胞で発現することを明らかにした。

(5) RSS3 ファミリー因子の機能欠損変異イネにおける JA 応答性

本課題代表者は、イネの RSS3 の機能欠損変異体は根の伸長が野生型に比べて抑制されるが、その抑制が塩ストレス存在下でより顕在化すること、またこの変異形質が RSL1 を過剰発現させることにより緩和されることを報告していた。本研究では、*rss3* 変異体の根の伸長抑制が JA の存在下において、さらに顕著になることを示した。また、RSS3 ファミリー因子の機能についてさらなる知見を得るために、ゲノム編集技術を用いて RSS3、RSL1、RSL2 の変異体や多重変異体を作成し、種子を得た。これらの変異系統を JA 存在下、および非存在下で生育させたところ、いずれの条件においても、*rss3* の単独変異体は野生型に比べて地上部の生育が抑制されること、*rss3 rs11 rs12* 多重変異体は *rss3* 単独変異体に比べてさらに生育が抑制される傾向を示すことが判明した。ただし、多重変異による効果は限定的であった。

そこで JA 存在下および非存在下において生育させた野生型イネおよび *rss3* 変異体の茎頂分裂組織および葉原基組織から RNA を抽出し、遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果、JA 処理により誘導される遺伝子の発現変動が、*rss3* 変異によって活性化されることが判明した。このことは、RSS3 が根の成長点だけでなく、地上部の成長点においても JA シグナリングの抑制的な制御に関与することを強く示唆した。(本成果は、名古屋大学生命農学研究科の中園幹生教授、高橋宏和准教授、遺伝学研究所の佐藤豊教授らとの共同研究によるものである)

(6) イネ JAZ2 の凝集性

イネの JAZ 因子の 1 つである JAZ2 は、他の JAZ 因子と異なり、保存された COI1 受容体結合性のアミノ酸配列をもたない。したがって、JAZ2 は JA 存在下において分解的な制御を受けないと考えられる。JAZ2 を CFP 蛍光タンパク質と融合させて、プロトプラストで一過的に発現させることでその挙動を調べたところ、予期せぬ結果が得られた：CFP-JAZ2 は核内に局在するパターンを示す一方で、核内外で高い頻度で未知の凝集体を形成した。この JAZ2-CFP 凝集体は、同じ細胞に発現させた mRFP と核もしくは細胞質内において相互に排他的に存在した。さらにまた、核局在化シグナルおよび特定のタグ配列を持つ eYFP を eCFP-JAZ2 とともに共発現させると、eYFP シグナルが eCFP-JAZ2 凝集体に核内で部分的に共局在した。

<引用文献>

Nature Commun.2; 278. (2011) RSS1 regulates the cell cycle and maintains meristematic activity under stress conditions in rice.

Plant Cell.25; 1709-1725. (2013) RICE SALT SENSITIVE 3 forms a ternary complex with JAZ and class-C bHLH factors, and regulates JA-induced gene expression and root cell elongation.

Plant Cell Physiol.56; 779-789. (2015) Elevated levels of CYP94 family gene expression alleviate the jasmonate response and enhance salt tolerance in rice.

Plant Signal. Behav.10; e1046667. (2015) Overexpression of a CYP94 family gene CYP94C2b increases internode length and plant height in rice.

Plant Signal. Behav.9; e970414. (2014).Overexpression of the JAZ factors with mutated Jas domains causes pleiotropic defects in rice spikelet development.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mahjoubi Habib, Tamari Yutaka, Takeda Shin, Bouchabke-Coussa Oumaya, Hanin Moez, Herzog Etienne, Schmit Anne-Catherine, Chaboute Marie-Edith, Ebel Chantal	4. 巻 37
2. 論文標題 The wheat TdRL1 is the functional homolog of the rice RSS1 and promotes plant salt stress tolerance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1625 ~ 1637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00299-018-2333-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 古謝良人、上嶋有羽、郷遥香、袴田凧沙、加瀬田日向子、服部束穂、武田真
2. 発表標題 植物の凝集性タンパク質を用いた人為的非膜系オルガネラの構築に関する研究
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上嶋有羽、袴田凧沙、加瀬田日向子、服部束穂、武田真
2. 発表標題 イネのJAZ2タンパク質の凝集性に関する研究
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshida, Y., Numa H., Takeda, S. and Habu, Y.
2. 発表標題 Involvement of jasmonate signaling and chromatin regulation in abiotic stress responses in rice.
3. 学会等名 16th International Symposium on Rice Functional Genomics. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上嶋有羽、袴田凧沙、加瀬田日向子、服部束穂、武田真
2. 発表標題 イネのJAZタンパク質因子の凝集性の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaseda, H., Toda, Y., Hayashi, K., Handa, N., Tanaka, M., Kurotani, K., Ogawa, D., Hattori, T. and Takeda, S.
2. 発表標題 Exploring factors expressed in shoot and root apices and required for growth and viability under stressful conditions in rice
3. 学会等名 The Cold Spring Harbor Asia conference on Latest Advances in Plant Development & Environmental Responses (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 加瀬田日向子、服部束穂、武田真
2. 発表標題 イネJAZ 相互作用因子RSS3 のホモログの機能解析
3. 学会等名 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Gene to provide environmental stress tolerance and the use thereof	発明者 武田真、服部束穂、 黒谷賢一、市川裕章	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、15/399,214 (米国)	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ハニン モエツ (Hanin Moez)	スファクスバイオテクノロジーセンター・教授	(チュニジア)
研究協力者	多田 安臣 (TADA Yasuomi)	名古屋大学・遺伝子実験施設・教授	
研究協力者	野元 美佳 (NOMOTO Mika)	名古屋大学・遺伝子実験施設・助教	
研究協力者	光田 展隆 (MITSUDA Nobutaka)	産業技術総合研究所・研究グループ長	
研究協力者	中園 幹生 (NAKAZONO Mikio)	名古屋大学・生命農学研究科・教授	
研究協力者	高橋 宏和 (TAKAHASHI Hirokazu)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授	
研究協力者	佐藤 豊 (SATO Yutaka)	遺伝学研究所・教授	
連携研究者	上田 実 (UEDA Minoru) (60265931)	東北大学・理学(系)研究科(研究院)・教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	土井 一行 (DOI Kazuyuki) (80315134)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授 (13901)	
連携研究者	服部 束穂 (HATTORI Tsukaho) (10164865)	名古屋大学・生命農学研究科・教授 (13901)	
連携研究者	平野 博之 (HIRANO Hiroyuki) (00192716)	東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授 (12601)	