

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18780078

研究課題名 (和文)

植物の生産性向上のための環境ストレス耐性植物開発および生育促進

研究課題名 (英文)

Engineering of environmental stress tolerance and growth enhancement in plants

研究代表者

森田 重人 (MORITA SHIGETO)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：20295637

研究成果の概要：本研究では、植物の環境ストレス耐性の上昇と生育促進を目的として、ストレス耐性に関わりの深い活性酸素防御遺伝子に関する研究を行った。具体的には、イネにおいて活性酸素防御遺伝子を調節する転写因子の遺伝子単離を試みた。また活性酸素消去酵素であるミトコンドリア型スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)を過剰発現させたタバコで、低温、高温、強光の各ストレスに対する耐性が上昇した、またミトコンドリア型 SOD を高発現するイネにおいて、発芽・生育の促進が見られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	330,000	3,830,000

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：活性酸素、ストレス耐性、スーパーオキシドディスムターゼ、シス-エレメント、イネ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物は移動する能力を持たないため、高温・乾燥・強光・塩害等の環境ストレスに曝されている。植物の生産性は環境ストレスにより大きく低減しており、これによる収量損失は約 65%にも上る。一方で、世界的な温暖化・乾燥化に伴う耕地の減少、人口増加によ

る食糧増産・バイオマス増産の必要から、作物の収量を増加させることが急務である。

このような状況を背景として、本研究では植物の環境ストレス耐性と生育速度を上昇させることを目指した。

(2) 環境ストレス条件下では植物体内での

活性酸素の生成が増大するため、植物は活性酸素の毒性により、光合成阻害、生育阻害等の障害を受ける。よって、活性酸素に対する防御機構を解明することは、植物のストレス耐性機構の理解にとって不可欠である。

筆者（研究代表者）は、植物の活性酸素防御に関わる遺伝子の発現調節機構を解析しており、本研究開始時点で以下のような知見を得ていた。

①イネにおいて活性酸素に応答する新規シス-エレメント CORE を発見した。また CORE がスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 遺伝子を初めとする 3 個の活性酸素防御遺伝子を共通に制御していることを明らかにした。

② 筆者は、環境ストレス耐性上昇を目的として、活性酸素消去酵素を過剰発現する形質転換植物の作出・解析を行った。その過程で、ミトコンドリア型 SOD 遺伝子の過剰発現によりタバコにおいて発芽および生長が促進されることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、活性酸素応答に関わる遺伝子群を制御する転写調節因子を同定し、それを利用して植物のストレス耐性を上昇させることを目的とした。

具体的には、活性酸素ストレス応答性シス-エレメント CORE に結合する転写因子をクローニングし、これを形質転換により過剰発現させることを試みた。

(2) 本研究ではミトコンドリア型 SOD の過剰発現による生育促進効果に着目し、ミトコンドリアにおける活性酸素消去活性の上昇によって、植物にどのような影響が見られるかを調査した。また、この手法がタバコ以外の

他の植物にも応用できるかどうかを検討するために、イネにおいてミトコンドリア型 SOD を過剰発現させた。

## 3. 研究の方法

(1) CORE に結合する転写因子をクローニングするため、yeast one-hybrid スクリーニングを行った。CORE 配列を最小プロモーターの上流に連結した *HIS3* レポーター遺伝子 (CORE-*HIS3*) を構築して酵母に導入した。一方、活性酸素ストレス処理を行ったイネ芽生えより RNA を調製し、cDNA ライブラリーを構築した。このライブラリーを CORE-*HIS3* 導入株酵母に導入し、スクリーニングを行った。また既に保有しているファージ発現ベクターで構築した cDNA ライブラリーを用いて、Southwestern 法によるスクリーニングも平行して行った。

また、CORE による遺伝子発現調節機構をさらに詳細に解析するために、CORE 配列をプロモーター領域に持つ遺伝子をデータベースで検索した。またそれらの遺伝子の活性酸素に対する発現応答を RT-PCR によって調べた。

(2) ミトコンドリア型 SOD 遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコに、低温、高温、強光の各ストレス処理を行い、クロロフィル蛍光を測定することにより、ストレス耐性を評価した。

またミトコンドリア型 SOD 遺伝子をイネに導入し形質転換体の作出を行った。イネにおいてミトコンドリア型 SOD を過剰発現する導入遺伝子を構築し、これをアグロバクテリウムを用いてイネに導入した。得られた形質転換体において、遺伝子導入および SOD 活性の上昇を確認した後、野生型と比べ生育促進が見られるかどうかを調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 上記転写因子のクローニングを目指して、cDNA ライブラリーのスクリーニングを試みた。スーパーオキシド発生剤であるパラコート処理を行ったイネ芽生えよりポリ A<sup>+</sup> RNA を調製し、cDNA ライブラリーを構築した。これを用いて yeast one-hybrid スクリーニングを行った。またファージ発現ベクターで構築したイネ緑葉由来 cDNA ライブラリーについて、CORE 配列をプローブに用いて Southwestern スクリーニングを行った。しかしながらいずれのスクリーニングにおいても、ポジティブクローンの単離には至らなかった。

一方、CORE によって調節を受ける遺伝子が、SOD 等の 3 個の遺伝子以外にも存在するかどうかを検討するために、CORE 配列を持つ遺伝子の検索を行った。イネゲノム配列データベースを検索した結果、プロモーター領域に CORE 配列を持つ発現遺伝子は、9 個存在した。またそれらの遺伝子のパラコートに対する応答を RT-PCR により調べたところ、ストレス応答性 Zn フィンガータンパク質遺伝子 *OsISAPI* が活性酸素ストレスにより誘導が見られたことから、CORE による発現調節を受けている可能性が示唆された。

(2) これまでに活性酸素消去酵素を過剰発現させた形質転換植物でストレス耐性の上昇が多数報告されているが、それらは葉緑体や細胞質において活性酸素消去酵素を発現させており、ミトコンドリアで過剰発現させた例はこれまでなかった。今回、ミトコンドリア型 SOD を過剰発現させた形質転換タバコが環境ストレスに対して耐性を示すかどうかを検討した。その結果野生型に比べ、低温

(10℃)、高温 (45℃)、強光の各ストレスに対する耐性が上昇していることが明らかとなった。またこの実験ではクロロフィル蛍光測定を行っており、葉緑体の光化学系 II の阻害をストレスによる障害の指標としていることから、本研究結果によりミトコンドリアの活性酸素消去系が葉緑体での活性酸素ストレスの防御に寄与していることが示された。

またイネにミトコンドリア型 SOD 遺伝子を導入し形質転換体の作出を行った。得られた形質転換体において、遺伝子導入および SOD 活性の上昇を確認した。イネに関しては特に低温条件での高い発芽特性が求められていることから、低温条件での発芽・生長が促進されているかどうかを調査した。形質転換イネと野生型イネの種子をそれぞれ MS 固形培地に播種し発芽を比較した結果、形質転換体のいくつかの系統で、常温 (28℃) および低温 (18℃) においてそれぞれ発芽・生育の促進が見られた。この結果から、イネにおいてもミトコンドリア型 SOD の高発現により生育促進効果が確認された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 7 件)

- ①植田瞳、森田重人、荻原保成、増村威宏、佐藤茂：イネ酸素ストレス応答性シスエレメント CORE の生理的機能解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 27 日～29 日、福岡国際会議場
- ②山下裕樹、森田重人、細木彩夏、矢部知里、I Nengah Suwastika、佐藤雅彦、荻原保成、

増村威宏、佐藤茂：イネグルタレドキシンの抗酸化機能と細胞内局在、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 27 日～29 日、福岡国際会議場

③森田重人、戸高理恵、山下裕樹、藤木政良、細木彩夏、矢部知里、増村威宏、田中國介、荻原保成、佐藤茂：イネグルタレドキシンの酸素ストレス防御における機能解析、日本植物生理学会 2009 年度年会、2009 年 3 月 21 日～24 日、名古屋大学

④加藤真人、林清音、森田重人、増村威宏、佐藤茂、寺地徹：アスコルビン酸ペルオキシダーゼを過剰発現する葉緑体形質転換タバコのストレス耐性、第 26 回植物細胞分子生物学会、2008 年 9 月 1 日～2 日、大阪大学

⑤加藤真人、林清音、森田重人、増村威宏、佐藤茂、寺地徹：アスコルビン酸ペルオキシダーゼを過剰発現する葉緑体形質転換タバコの解析、2008 年度日本農芸化学会関西支部大会、2008 年 9 月 13 日、京都学園大学

⑥森田重人、加藤真人、中山陽介、横山英史、増村威宏、田中國介、佐藤茂：ミトコンドリア型Mn-SOD過剰発現タバコにおける低温ストレス耐性、日本農芸化学会 2007 年度大会、2007 年 3 月 25 日～27 日、東京農業大学

⑦ Shigeto Morita, Masayoshi Fujiki, Kazuyoshi Kawamura, Takehiro Masumura, Kunisuke Tanaka. The expression of glutaredoxin in rice seeds. ISPMB 2006 (8th International Congress on Plant Molecular Biology), 2006 年 8 月 21～25 日, Adelaide, Australia

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森田 重人

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：20295637

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし