

機関番号：13901

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19688001

研究課題名（和文） ブラシノステロイドによるイネの生育制御機構の解明と育種的应用

研究課題名（英文） Analysis of the function of brassinosteroid on rice growth regulation

研究代表者

坂本 知昭 (SAKAMOTO TOMOAKI)

名古屋大学・高等研究院・特任講師

研究者番号：00345183

研究成果の概要（和文）：古くから知られているイネ突然変異体「夷大黒（*d2*）」の新規アレルを単離・解析した結果、*d2*変異は「New Plant Type」型の多収形質を発現させ、*d2*が多収遺伝子として実際の育種に利用されていた可能性を示した。一方、遺伝的背景がブラシノステロイド突然変異体の表現型に強く影響することを発見し、その原因としてブラシノステロイド受容体遺伝子 *OsBR11* への *mPing* の挿入が同遺伝子の発現制御に影響を与えている可能性を示した。また *OsBR11* の発現がオーキシン処理により一過的に上昇する現象を発見し、ARF タンパク質を介したオーキシン情報伝達によるブラシノステロイド感受性調節の分子メカニズムを明らかにした。イネから単離したブラシノステロイド不活性化酵素 CYP734As が、これまで報告されていた双子葉植物由来のそれらとは異なり、広い基質特異性を示し、さらに多段階の酸化反応を触媒しうる新機能を獲得していることを明らかにした。ブラシノステロイド非感受性突然変異体の解析から新規のブラシノステロイド情報伝達因子を単離し、同因子を介してブラシノステロイド情報伝達とジャスモン酸情報伝達がクロストークしている可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The major achievement of this research is the finding that weak *d2* mutations have probably been used in breeding programs that generated high-yielding cultivars. I also found an interesting phenomenon, namely that the genetic background controls the phenotypes of rice brassinosteroid-related mutants. I obtained some evidence that an insertion of *mPing* in the promoter of the brassinosteroid receptor gene, *OsBR11*, causes this phenomenon. When I performed comprehensive gene-expression analyses of the brassinosteroid-related genes to identify the phenotype-controlling factor mentioned above, I found that auxin treatment transiently increases *OsBR11* expression. This result led to a striking finding: the auxin signal-transcription factor ARF controls the degree of brassinosteroid perception required for normal plant growth and development. I also found evidence of evolution of the genes for CYP734As, which acquired novel functions in brassinosteroid inactivation after the differentiation of monocot and dicot plants, and then increased in number in the rice genome. These genes are directly applicable for regulating the endogenous bioactive brassinosteroid content, and therefore for controlling rice developmental and physiological processes. I have isolated and characterized a novel brassinosteroid-signaling component, ELF1. This research led to an unexpected finding, namely that brassinosteroid and jasmonate signaling compete for the nuclear protein EIZ1. Although further analyses are needed, this will be a productive starting point from which to understand the extensive crosstalk between brassinosteroids and jasmonate, especially in terms of the mechanisms responsible for how plants acquire stress tolerance after brassinosteroid treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009	5,700,000	1,710,000	7,410,000
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：農学  
科研費の分科・細目：農学・育種学  
キーワード：植物分子育種

### 1. 研究開始当初の背景

作物収量性の飛躍的向上を達成するための理想的な草型の1つとして直立葉が挙げられる。直立葉を示す個体では、下位葉への太陽光が上位葉によって遮蔽されにくくなることにより株当たりの受光効率が向上し、光合成が促され株当たり収量の増加が見込まれる。さらに草型がコンパクトになることから密植栽培にも適しており、単位面積当たりの収量の飛躍的増加につながることを期待される。研究開始当初、植物ホルモンの1種であるブラシノステロイドがイネの直立葉化に関与していることを突き止め、ブラシノステロイド欠損変異体が直立葉を示し収量が増加することを報告していた。

### 2. 研究の目的

本研究は植物ホルモンの1つブラシノステロイドの代謝と情報伝達の時間的および組織・器官特異的な制御から農業的に重要な形質発現に至るまでの過程を、分子遺伝学、分子生物学、生理学および生化学的手法を用いて解明し、得られた知見を新たな育種素材の育成や栽培技術の開発にフィードバックさせることを目的として行う。具体的には、ブラシノステロイド欠損突然変異体*d2*の再評価、遺伝的背景がブラシノステロイド突然変異体の表現型に及ぼす影響、オーキシンによるブラシノステロイド感受性の制御、ブラシノステロイド不活性化酵素の機能解析と育種の応用、新規ブラシノステロイド情報伝達因子の機能解析の5つのテーマについて研究を遂行した。

### 3. 研究の方法

#### ① ブラシノステロイド欠損突然変異体「夷大黒 (*d2*)」の再評価

直立葉を示す多収性の日印交雑中間母本に見つかった *d2* 変異についてその効果を検証するため、この中間母本とコシヒカリを交配し、その自殖後代を圃場に展開して形質評価を行った。また直立葉変異体群から新規の *d2* 変異体弱アリルをスクリーニングし、圃場に展開して形質評価を行った。

#### ② 遺伝的背景がブラシノステロイド突然変異体の表現型に及ぼす影響

*d2* 変異体の表現型が品種の遺伝的背景に影響される現象の原因を明らかにすることを目的として、同一の遺伝子変異を有し親を異とする2系統について、ブラシノステロイド代謝および情報伝達に関わる遺伝子の発現を網羅的に解析し、遺伝子発現レベルで何が起こっているのかを明らかにした。さらにその変化が由来する塩基配列上の差異をゲノムシーケンスにより突き止めた。

#### ③ オーキシンによるブラシノステロイド感受性の制御

②の研究過程で、オーキシン処理によりブラシノステロイド受容体遺伝子 *OsBRI1* の現が一過的に上昇する現象を発見した。そこで *OsBRI1* 遺伝子発現量のオーキシン処理後の経時的变化、濃度依存性を明らかにした。さらにオーキシン情報伝達因子である ARF タンパク質遺伝子およびその変異体をイネから単離し、*OsBRI1* 遺伝子の発現調節に関わる機能について詳細に解析した。

#### ④ ブラシノステロイド不活性化酵素の機能解析と育種的应用

イネゲノムデータベース上に見いだされたブラシノステロイド代謝酵素の候補遺伝子について、組換えタンパク質を用いた酵素活性の測定を行い、基質特異性や代謝活性の特定など、生化学的な機能について詳細な解析を進めた。イネアクチンプロモーターのほか、数種のプロモーターを用いて過剰発現イネを作出し、表現型に及ぼす影響について解析を行った。

#### ⑤ 新規ブラシノステロイド情報伝達因子の機能解析

イネにおけるブラシノステロイド情報伝達経路を解明するために、新規のブラシノステロイド非感受性突然変異体からユビキチン E3 リガーゼ遺伝子を単離した。同遺伝子がコードするユビキチン E3 リガーゼとその標的タンパク質について解析した。ブラシノステロイド受容体とユビキチン E3 リガーゼの関係、およびユビキチン E3 リガーゼの標的タンパク質の単離とその機能について解析を行った。

### 4. 研究成果

#### ① ブラシノステロイド欠損突然変異体「夷大黒 (*d2*)」の再評価

イネの葉関節はブラシノステロイドに対して鋭敏に反応し、濃度依存的に葉身角度を増加させる。したがってブラシノステロイドの機能が低下したイネ変異体は葉関節で葉身が屈曲しない直立葉を示し、受光体勢の向上による物質生産および収量の増加が期待できる。圃場栽培による比較試験に基づく選抜の結果、古くから知られているイネ突然変異体「夷大黒 (*d2*)」の新規アレルは穂数(有効分げつ数)を減少させるものの穂長と一次

枝梗数および一穂あたりの着粒数を増加させ、結果として株あたりの着粒数と籾収量を増加させる傾向が認められた。さらに *d2* 変異は国際イネ研究所によって育成された「New Plant Type」の最初の多収性品種である IR8 にも見つかり、同変異は我が国で育成された多くの多収性品種にも保存されていた。これらの結果は *d2* が多収遺伝子として実際の育種に利用されていた可能性を示している。

#### ② 遺伝的背景がブラシノステロイド突然変異体の表現型に及ぼす影響

ブラシノステロイド関連突然変異体について解析を進める過程で、同一または類似の遺伝子変異を有する日本晴由来と台中 65 号由来の突然変異体では、日本晴由来の突然変異体の方が台中 65 号由来の突然変異体と比べ表現型が明らかにシビアとなり、節間伸長パターンの違いも観察された。その原因となる遺伝子を分子遺伝学的に特定することは困難であったため、ブラシノステロイドの生合成と情報伝達に関わる既知遺伝子について網羅的な解析を行った。その結果、日本晴のブラシノステロイド受容体遺伝子 *OsBRI1* のプロモーター領域にトランスポゾン (*mPing*) の挿入が見つかった。台中 65 号由来の *d2* 突然変異体 *d2-1* では *OsBRI1* の発現は台中 65 号と比べ補償的に増加しているが、日本晴由来の突然変異体 ND4060 では *OsBRI1* の発現量の増加は認められなかった。従って *mPing* の挿入による *OsBRI1* の発現抑制が日本晴と台中 65 号由来の突然変異体の表現型の違いを引き起こしていると考えられた。これらの結果などから、*OsBRI1* プロモーター領域への *mPing* の挿入の有無は、多収遺伝子と考えられる *d2* を導入する標的品種を選定する上で重要な指標の 1 つとなると考えられた。

### ③ オーキシンによるブラシノステロイド感受性の制御

イネ葉身屈曲テストはオーキシンの検定法として開発されたが、ブラシノステロイドはオーキシンと比べはるかに低濃度で葉身屈曲を促進することから、ブラシノステロイドの代表的な微量生物検定法となっている。さらにオーキシン処理はブラシノステロイドによる葉身屈曲作用を高める働きがあることが知られている。興味深いことにオーキシン処理はブラシノステロイド受容体遺伝子 *OsBRI1* の発現を一過的に高め、受容体タンパク質 *OsBRI1* を増加させていた。*OsBRI1* のプロモーター領域にはオーキシン応答配列が存在し、同配列に変異を導入するとオーキシンによる一過的な発現誘導は起こらなくなった。さらに同配列に対しオーキシン情報伝達因子 Auxin Response Factor (ARF) が結合し、イネの *arf* 突然変異体では *OsBRI1* の発現が低下していた。これらの結果などから、オーキシンは ARF を介した *OsBRI1* の発現制御によりブラシノステロイド感受性を調節していると考えられた。

### ④ ブラシノステロイド不活性化酵素の機能解析と育種的应用

内生ブラシノステロイド含量を人為的に調節してイネを直立葉化させ収量の増加に結びつける技術の確立を目的として、ブラシノステロイドの不活性化に関わるC-26水酸化酵素遺伝子を単離し、その酵素活性を明らかにした。その結果、イネ由来のC-26水酸化酵素は他の植物由来の酵素とは異なり、広い基質特異性と多段階の酸化活性を示した。これらの結果から、イネはブラシノステロイド不活性化酵素の遺伝子数を増やすと同時に酵素としての機能もより進化させていることが明らか

となった。また *D2* 遺伝子のプロモーターを用いてC-26水酸化酵素遺伝子を発現させた形質転換イネは、上記の *d2* 突然変異体新規アレルとよく似た表現型を示したことから、直立葉多収系統の育成を目的とした分子育種技術の開発にC-26水酸化酵素遺伝子が有効利用できると考えられた。

### ⑤ 新規ブラシノステロイド情報伝達因子の機能解析

ブラシノステロイド非感受性突然変異体の原因遺伝子として単離した *Erect Leaf 1*

(*ELF1*) はユビキチンE3 リガーゼに特徴的な構造であるU-boxドメインの他にタンパク質-タンパク質相互作用に関わるアルマジロ反復配列を持っていた。酵母two-hybrid法を用いて得られたELF1の標的候補タンパク質の1つとしてZIMドメイン構造を持つ核タンパク質、ELF1-interacting ZIM protein 1 (EIZ1) が得られた。ELF1とEIZ1はZIMドメインを介して結合し、EIZ1のC末端側に存在する機能不詳のドメインは両者の結合に阻害的に働いた。ブラシノステロイド処理したイネ植物体から精製したEIZ1はELF1と結合し、ELF1によるユビキチン化を受けた。さらにEIZ1を過剰発現させた形質転換イネは典型的なブラシノステロイド過剰の表現型を示したことから、EIZ1はブラシノステロイドシグナル依存的にELF1によってユビキチン化され、ブラシノステロイド情報伝達の正の制御因子として機能していると考えられた。

### 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)

[雑誌論文] (計2件)

1. Sakamoto, T., and Matsuoka, M. Identifying and exploiting grain yield genes in rice. *Current Opinion in Plant Biology* 11(2), 209-214, April 2008.
2. Sakamoto, T., Kawabe, A., Tokida-Segawa, A.,

Shimizu, B., Takatsuto, S., Shimada, Y., Fujioka, S., and Mizutani, M. Rice CYP734A5 function as multisubstrate and multifunctional enzymes in brassinosteroid catabolism. *Plant Journal* (in press, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04567.x)

[学会発表] (計 12 件)

1. 坂本知昭・池田真由子・香村敏郎・芦荻基行・北野英己・松岡信. イネ多収性品種育成における *Gn1a* の利用. 日本育種学会第 111 回講演会. 2007. 3. 30. 茨城大学.
2. 池田真由子・林少揚・高師知紀・香村敏郎・坂本知昭・芦荻基行・松岡信・北野英己. イネの収量性に関わる遺伝子 *Gn1* (*Grain number1*) が穂の着粒構造に及ぼす影響. 日本育種学会第 111 回講演会. 2007. 3. 30. 茨城大学.
3. 坂本知昭・松岡信・北野英己. ブラシノステロイド非感受性イネ変異体の解析. 日本育種学会第 112 回講演会. 2007. 09. 22. 山形大学.
4. 坂本知昭・藤岡昭三・北野英己・松岡信. 新規ブラシノステロイド情報伝達因子の単離. 第 49 回日本植物生理学会年会. 2008. 03. 22. 札幌コンベンションセンター.
5. 川邊綾美・清水文一・嶋田幸久・藤岡昭三・坂本知昭・水谷正治. イネ由来ブラシノステロイド不活性化酵素の酵素化学的解析. 第 49 回日本植物生理学会年会. 2008. 03. 22. 札幌コンベンションセンター.
6. 坂本知昭・大西利幸・水谷正治・松岡信・北野英己. イネ *d2* 変異体の解析. 日本育種学会第 113 回講演会. 2008. 03. 29. 明治大学.
7. 坂本知昭・川邊綾美・清水文一・藤岡昭三・水谷正治. イネのブラシノステロイド不活性化酵素遺伝子の解析. 日本育種学会第 114 回講演会. 滋賀県立大学. 平成 20 年 10 月 12 日.
8. 川邊綾美・清水文一・嶋田幸久・藤岡昭三・坂本知昭・水谷正治. イネ由来ブラシノステロイド不活性化酵素の酵素化学的解析. 植物化学調節学会第 43 回大会. 2008. 10. 30. つくばカピオ.
9. 水谷正治・川邊綾美・清水文一・嶋田幸久・藤岡昭三・坂本知昭. 新規ブラシノステロイド不活性化経路の解明. 第 50 回日本植物生理学会年会. 2009. 3. 22. 名古屋大学.
10. 坂本知昭・北野英己. 遺伝的背景がブラシノステロイド変異体の表現型に及ぼす影響. 日本育種学会第 116 回講演会. 2009. 9. 25. 北海道大学.
11. 坂本知昭・藤岡昭三. オーキシンはイネのブラシノステロイド感受性を高める. 第 51 回日本植物生理学会年会. 2010. 3. 18. 熊本大学.

12. 坂本知昭・北野英己. イネ *d2* 変異体の解析. II. 新規アリの単離と育種の利用の可能性. 日本育種学会第 117 回講演会. 2010. 3. 27. 京都大学.

[図書] (計 2 件)

1. 坂本知昭・松岡 信. (2007). イネの多収性育種に貢献する植物ホルモン. *科学* 77, 613-618.
2. Ashikari M, and Sakamoto T. (2008). Rice yielding and plant hormones. In *Rice Biology in the Genomics Era*, Hirano, H.-Y.; Hirai, A.; Sano, Y.; Sasaki, T. (Eds.), Springer, 309-320.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 知昭 (SAKAMOTO TOMOAKI)  
名古屋大学・高等研究院・特任講師  
研究者番号: 00345183

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし