

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012 年度

課題番号：22658106

研究課題名（和文） イネが潜在的に持つ極限環境耐性の解明

研究課題名（英文）Molecular basis of potential extreme stress tolerance in rice

研究代表者 今井 亮三（IMAI RYOZO）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・寒地作物研究領域・
上席研究員

研究者番号：90291913

研究成果の概要（和文）：

ジベレリン欠損株が示す乾燥耐性について、欠損株では、野生株と比べてむしろ水分蒸散速度が高く、脱水回避能力が高いことが乾燥耐性の原因ではなかった。発現プロファイルの比較から、KAO 欠損株においては既知の乾燥耐性獲得の機構とは異なるメカニズムで、乾燥耐性が獲得されている可能性が示唆された。GA 代謝酵素遺伝子(OsGA2ox1)をストレス応答性のプロモーター制御下に発現するような融合遺伝子を構築し、形質転換体を作成した。

研究成果の概要（英文）：

Extreme drought tolerance exhibited by a GA deficient mutant of rice was investigated. The mutant does not show drought avoidance but overexpress unique genes for drought tolerance. GA metabolizing gene was placed under drought inducible promoter and introduced into rice plants in order to create drought tolerant transgenic rice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	0	1,700,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	420,000	3,520,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学・環境農学

キーワード：イネ、ジベレリン、環境ストレス、代謝酵素

1. 研究開始当初の背景

植物にとって、水分の吸収および保持は、生育に極めて重要であり、水環境の悪化により致命的な影響を受ける。一般的に、高等植物は、種子などの一部組織を除いて乾燥ストレスに対して感受性が高いと考えられているが、これは野生株についてである。変異株を含めた潜在的な乾燥耐性に関しては十分に検討されているとはいえない。我々はイネのジベレリン生合成酵素カウレン酸酸化酵

素（KAO）の変異株は GA 欠損のため、植物体が矮化し、細胞も小さくなるなど野生株と比べて形態的な違いは大きい。光合成を行い、養分を吸収し、葉、根等の栄養組織を増殖させる能力は維持している。従って、KAO 欠損株が野生株に比べて圧倒的に強い乾燥耐性を発揮できるというのは驚きである。これまでに、極限的乾燥耐性は *Craterostigma* や *Myrothamnus* といった砂漠に生息する、いわゆる復活草と呼ばれる対乾燥性植物を用い

て研究されてきたが、そのような特殊な植物でなくても、相当なレベルの乾燥耐性を潜在的にもっているということは、新しい発見であり、従来の概念を完全に覆すものである。また従来 GA は、生長ホルモンとして捉えられており、ストレス耐性との関係を論じられることはほとんど無かった。ストレス耐性の制御という視点による GA の機能に関しては、全く未開拓な分野であり、その機構の解明は極めて興味深い。またその解析過程では、乾燥からの保護タンパク質、保護物質等の発見や、生体膜の適応、イオンホメオスタシス等の生理現象に対する新たな知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

本研究では GA 欠損株が示す高度の乾燥耐性のメカニズムを解明することを目指す。KAO 欠損株を用いて、野生株とのゲノムレベルの遺伝子発現プロファイリングを行い、乾燥耐性獲得に関わる遺伝子を特定する。また、ストレスを受けた時にのみ GA 量を低下させるような GA 分解遺伝子をストレス特異的プロモーターを利用して構築し、形質転換体に導入する。

3. 研究の方法

(1) 乾燥耐性試験

ヘテロ接合体由来種子から分離されるホモ接合体は矮性形質で同定した。同じ生育ステージにある野生株及びホモ接合体の給水を7日間停止しその後給水を開始した。再給水開始後7日後の植物体の様子を比較した。

(2) 水分蒸散の定量

野生株及び KAO 欠損株の葉身を切り取り、実験室内で乾燥させた。経時的に葉身の重量を計測し、水分蒸散量を求めた。

(3) RNA の調整

野生型イネ(品種 ゆきひかり)種子及び、ジベレリン欠損株 (Δ GA) 種子を滅菌処理した。シャーレ上で滅菌水に浸し、20°C、暗所で3日間吸水させた。植物体はセルトレーに成苗培土 H (くみあい) を用い、日長制御室で 25°C、長日条件下で2週間生育させた。その後、2日間給水を停止する形で、乾燥ストレス処理を施した。野生株ないし形質転換体の組織を回収し、RNeasy mini kit (Qiagen) を用いてマニュアルに準じて RNA 抽出、精製を行った。

(4) cDNA 合成

cDNA は Qiock Amp Labeling Kit fro two colors (Agilent) を用いて合成した。RNA 0.4 μ g に T7 promoter primer を 1.2 μ l 加え、滅菌水をさらに加えて 11.5 μ l とした。これ

を 65°C、10 分間処理した後、水中に入れ急冷した。これに cDNA 合成ミックス 8.5 μ l 加え 40°C、2 時間保温し、cDNA を合成した。65°C、15 分間処理することにより反応を停止し、水中に 5 分間静置した。これに 10 mM Cyanine3 CTP または Cyanien5 CTP を 2.4 μ l 加えさらに Transcription mix を 57.6 μ l 加え、40°C、2 時間保温し、標識 RNA を合成した。以降 RNeasy mini kit を使用し精製した。精製した標識 RNA の濃度、色素の取り込み率を測定した。蛍光標識 RNA をそれぞれ 0.825 μ g、10 x Bolcking Agent 11 μ l と 2.2 μ l の 25 x フラグメンテーション緩衝液にたいして滅菌水を加え最終液量 55 μ l とし、60°C、30 分間処理した。これに 55 μ l の 2 x GE Hybridization Buffer HI-RPM を加え、ハイブリダイゼーション液とした。

(5) マイクロアレイ解析

アジレント社製 44K イネマイクロアレイを用いて 65°C で 17 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションを行ったスライドガラスを室温で Gene Expression 洗浄バッファ 1、0.05% Triton X-102 で 1 分間、Gene Expression 洗浄バッファ 2 で 1 分間、アセトニトリル中で 30 秒洗浄した後に、Agilent Stabilization and Drying Solution で洗浄した。アジレント社製マイクロアレイスキャナーで遺伝子の発現レベル情報を読み込み、同社製解析ソフトウェア、スキャナーコントロールソフト ver. 7 により、発現レベルの差を解析した。対象区としては、野生型乾燥ストレス処理/野生型未処理、変異体乾燥ストレス処理/変異体未処理、変異体未処理/野生型未処理、変異体乾燥ストレス処理/野生型未処理の 4 つの対象区を比較し、発現レベルの差を指標にして、乾燥ストレス処理により誘導される遺伝子を特定した。

4. 研究成果

(1) KAO欠損株の分離およびその乾燥耐性生

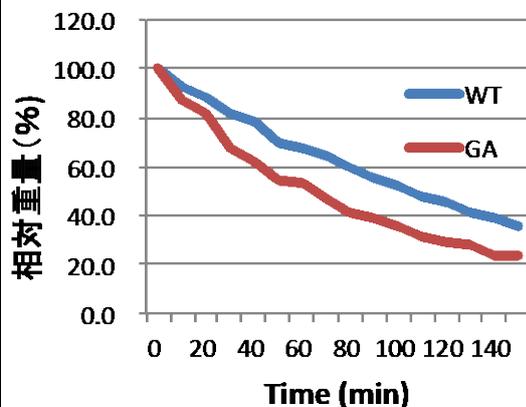


図1. 野生株 (WT) と KAO 欠損株 (GA) における水分蒸散量

理，形態学的解析

KAOホモ接合体は不稔であるため，変異種子はヘテロ接合体で維持される．実験に供する個体を分離するため，発芽後の初期生育で，ホモ接合体が分離可能であることを確認した．次に分離されたホモ接合体を用いて野生株との乾燥耐性比較を行った．幼苗段階における給水停止による乾燥ストレスでは，明らかに欠損株で高い乾燥耐性が観察された．次に，欠損株が示す乾燥耐性と関連する生理，形態学的特徴を明らかにするため，乾燥時の葉重量の変化を比較し，脱水回避能力に違いがあるかどうかを検討した．欠損株では，野生株と比べてむしろ水分蒸散速度が高く，脱水回避能力が高いことが乾燥耐性の1つの要因である可能性は否定された（図1）．

(2) KAO 欠損株と野生株間の遺伝子発現比較

KAO 欠損株と野生株間で見られる遺伝子発現プロファイルの違いについて，マイクロアレイを利用して明らかにするため，十分に水分を供給した条件で栽培した野生株，KAO 欠損株の葉組織より RNA を抽出した．また，乾燥ストレス後の両植物体サンプルからも RNA を抽出した．比較サンプルをそれぞれ Cy3 及び Cy5 でラベル化し，イネ 44K オリゴ DNA アレイ（アジレント）を用いて，発現解析を行った（図 2A）．KAO 欠損株と野生株（WT）において，乾燥ストレス処理後の発現プロファイルからは極めて多数の遺伝子の発現がダイナミックに変化していることが明らかになった．この中には図 2B に示すような乾燥誘導性転写因子 DRE binding protein 2, デハイドリン, LEA タンパク質等が含まれており，それらの発現は，乾燥ストレスで数十～数百倍に誘導されていた．また，これらの遺伝子の発現誘導は野生株，KAO 欠損株と同様に見られた．従って，KAO 欠損株が示す乾燥耐性にはこれらの遺伝子の乾燥誘導性もしくはその誘導レベルに起因するものではないことが判明した．野生株と KAO 欠損株の乾燥耐性の違いが乾燥ストレス処理前の状態で異なっていると仮定すると，非ストレス条件下で野生株と KAO 欠損株において見られる遺伝子発現の違いがその原因と考えられる．より多様な代謝経路が変動している中で，乾燥耐性を付与する可能性のある遺伝子を見出すため，野生株で乾燥により誘導される遺伝子に着目した（図 2A, B），乾燥ストレス耐性と密接に関わる DRE binding protein 2 (DREB2) 遺伝子やその下流で制御される Dehydrin, LEA タンパク質群について，野生株と KAO 欠損株の間で発現量の違いがあるのかを調べた結果，乾燥耐性の強い KAO 欠損株でこれらの遺伝子が高まっているという結果は得られなかった（図 2B）．つまり，KAO 欠損株に

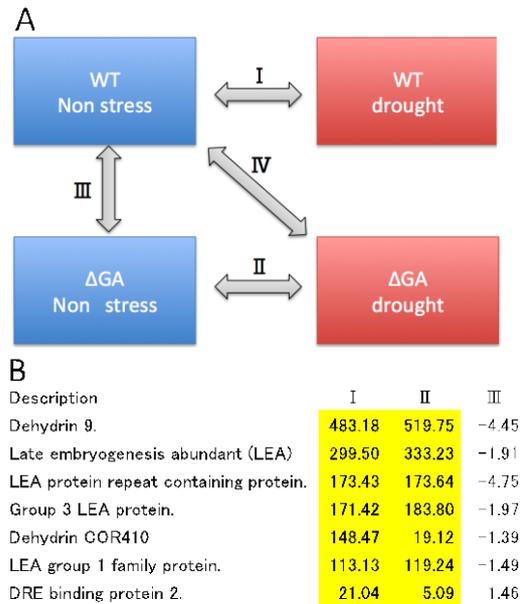


図2. 野生株とGA (KAO) 欠損株間のトランスクリプトーム解析

においては既知の乾燥耐性獲得の機構とは異なるメカニズムで，乾燥耐性が獲得されている可能性が示唆された．

(3) GA 代謝酵素遺伝子を制御発現する形質転換イネの作出

ストレス耐性獲得に GA レベルの減少が有効であると考えられたので，ストレス下に置かれた場合のみ GA 代謝酵素遺伝子 (OsGA2ox1) を発現させるようなコンストラクトを作成した（図 3）DREB1B 遺伝子は，乾燥，低温等のストレスにより顕著に誘導される遺伝子であり，そのプロモーターはカリュに置かれた遺伝子をストレス誘導的に発現する．GA の不活性化は GA の 2 位の OH 基を導入することで行われることから，この反応を触媒する酵素遺伝子 GA2 oxidase 遺伝子を単離した．ストレス応答性のプロモーター制御下に発現するような融合遺伝子を構築した．既知の配列を基にプライマー設計し，RT-PCR 法により OsGA2ox1 を単離した．既に単離されているストレス誘導性 DREB1B プロモーター下に，OsGA2ox1 を発現するバイナリーベクターを構築し，アグロバクテリウムを介してイネ品種ゆきひかり由来のカルスに形質転換した．再分化個体から T1 種子を得た．

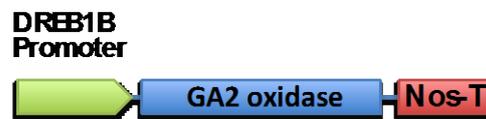


図3. ストレス誘導性GA分解遺伝子の構築

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)

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

今井 亮三 (IMAI RYOZO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・寒地作物研究領域・上席研究員

研究者番号：19380063