

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380001

研究課題名(和文)植物型糖鎖修飾によるイネのストレス耐性機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of rice beta 1,2-xylosyltransferase in the abiotic stress responses

研究代表者

加藤 清明(KATO, KIYOAKI)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：60271748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：地球温暖化に伴い、世界各地で頻発する異常気象により食料安全保障が脅かされている。本課題では、イネのベータ1,2-キシロシルトランスフェラーゼ遺伝子の欠損突然変異体を使って、タンパク質の糖鎖修飾が、低温、熱、塩、低酸素などの環境ストレスへの応答に重要な役割を担っていることを明らかにし、複合ストレス耐性を強化するための基礎を築いた。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated that rice beta 1,2-linked xylose residues on N-glycans are critical for plant development and growth under conditions of abiotic stress. Here, our characterization of the rice mutant reduced culm number11(rcn11) showed that RCN11 controls growth of plants exposed to abnormal temperature, salinity and drought conditions. Molecular studies showed that the rcn11 mutation resulted from a 966-bp deletion that caused loss of function of beta 1,2-xylosyltransferase. This enzyme is located in the Golgi apparatus where it catalyzes the transfer of xylose from UDP-xylose to the core beta-linked mannose of N-glycans. RCN11 promoter activity was observed in the basal part of the shoot containing the shoot and axillary meristems and in the base of crown roots. The level of RCN11 expression was regulated by multiple phytohormones and various abiotic stresses suggesting that plant specific N-glycosylation is regulated by multiple signals in rice plants.

研究分野：植物育種学

キーワード：糖鎖 N-グリカン 1,2-キシロシルトランスフェラーゼ 低温ストレス 熱ストレス 塩ストレス
浸透圧ストレス 低酸素ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖鎖は、核酸やタンパク質とともに、生命現象の根幹を支える鎖状の生体分子で第3の「生命鎖」とも呼ばれる。酵母やカビから動植物に至る全ての真核生物は、多様な構造の糖鎖を合成し、それらをタンパク質や脂質に結合させることで高機能性を付与した生体分子を創り出す。これらの糖タンパク質や糖脂質は、多細胞生物の発生・分化・成長過程で重要な役割を担うとともに、アレルギーやがんなどの様々な疾病に深く関わっていることがわかりはじめています。植物の糖タンパク質には β 1,2-キシロースとコア α 1,3-フコースを含む植物型糖鎖修飾がみられる。この植物型糖鎖修飾には、それぞれ β 1,2-キシロース転移酵素と α 1,3-フコース転移酵素が関わる。このうち前者をコードする β 1,2-キシロース転移酵素遺伝子(*XyIT*)を1遺伝子しかもたないシロイヌナズナのノックアウト系統は、正常な表現型となり(Strasserら2004)、個体レベルにおける植物型糖鎖修飾の役割はまだ未解明のままである。

(2) 植物型糖鎖修飾の制御は、医療用糖タンパク質の植物での生産に欠かせない。従来の医療用糖タンパク質は、大腸菌、酵母、動物細胞などを用いて組換えタンパク質として生産されてきたが、太陽光エネルギーを利用することでコストが安く、哺乳類が感染するウイルスやプリオンなどに汚染されずに組換えタンパク質を生産できることから、近年、植物生産システムの確立に期待が高まっている。但し、植物細胞で生産される組換え医療用糖タンパク質はヒトと異なる植物型糖鎖修飾を受けるため、植物特有の糖鎖がアレルギー源となる可能性が指摘されている。そこで、 β 1,2-キシロース転移酵素と α 1,3-フコース転移酵素活性を欠損させた植物体の作出が必要となる(Paulus et al., 2011)。

(3) 申請者らは、水田ストレス条件下でシュートと根の成長が著しく阻害される突然変異体をイネ品種「しおかり」の γ 線照射後代から選抜し、原因遺伝子の単離を進めてきた(科学研究費補助金 基盤研究(C)(一般)代表者 平成18~20年度; 特定領域代表者 平成20~21年度; 基盤研究C(一般)代表者 平成21~22年度)。これまでにATP結合カセットトランスポーターのRCN1/*OsABCG5*が、ストレス下でのシュートと根の成長に欠かせないことを報告してきた(Yasuno et al., 2009; Ureshi et al., 2012)。RCN1/*OsABCG5*を介したストレス耐性機構の解明を進める過程で、機能的な関連性を予想してRCN1/*OsABCG5*の変異体と表現型の酷似する変異体をスクリーニングしてきた。その中の1系統が、最近になって*XyIT*のイネのオーソログ*OsXyIT*の第2エキソンの欠失した変異体であることを特定した(未発表)。*OsXyIT*

が、イネのゲノム中には単一コピーで、「しおかり」では発現していることと変異体では第2エキソンを欠失した遺伝子が発現していることを確認した。また、水田栽培した*OsXyIT*欠失変異体は、シュートも根系も成長が著しく劣り、その抑制程度がガラス室内でポット栽培した場合と比較すると著しいことが示された。すなわち、*OsXyIT*に依存した植物型糖鎖修飾がイネの成長に重要なこと、また北海道の水田栽培環境下でのストレス耐性に欠かせないことが示された。

2. 研究の目的

(1) 申請者は、植物型糖鎖修飾酵素の一つ β 1,2-キシロース転移酵素の欠失したイネの突然変異体を同定した。この変異体の成長は、ストレス下で著しく低下することもわかった。本申請課題では、 β 1,2-キシロースの修飾がストレス耐性にどのようなインパクトをもつのか、またその耐性機構を明らかにし、ストレス耐性を強化したイネの開発の基盤を確立する。また、近年注目されている組換え医療用糖タンパク質の植物生産システムに利用できる植物型糖鎖修飾の欠損したイネの開発の基盤を確立する。

(2) 植物型糖鎖修飾の β 1,2-キシロースを含む糖鎖が、どのような種類のストレスにどのように関わるのか、以下の4点を明らかにする。

- ①*OsXyIT*の糖鎖修飾における機能と制御：*OsXyIT*の欠失変異および過剰発現が糖鎖修飾に与える影響。
- ②糖鎖修飾のストレス耐性における機能と制御：*OsXyIT*の欠失変異および過剰発現がどのようなストレスに影響するのか。
- ③*OsXyIT*の発現制御と機能：*OsXyIT*遺伝子の発現がどのようなストレスで誘導されるのか、また、その発現制御は植物ホルモンを介しているのか。また小胞体に局在するのか。
- ④ABCトランスポーターRCN1/*OsABCG5*を介したストレス耐性経路との関連性：各変異体で相互に遺伝子発現量に影響するのか、二重変異体の形質発現が相加的になるのか。

3. 研究の方法

(1) *OsXyIT*欠失変異体の糖鎖分析
*OsXyIT*欠失変異が、糖鎖中の β 1,2-キシロース転移に影響するのかを検証するために実施した。イネ品種「しおかり」と「しおかり」由来の*OsXyIT*欠失変異体を用いて、MALDI(マトリックス支援レーザー脱離イオン化法; Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization)-TOF MS(Time of Flight Mass Spectrometry; 飛行時間型質量分析法)により全N-グルカンと比較分析し、キシロース残さの有無を検討した。

(2) *OsXyIT*欠失変異体のストレス耐性評価
 β 1,2-キシロース含有糖鎖がどのような

ストレス耐性に関わるのかを明らかにするために実施した。供試材料は(1)と同じ。1/4MS液体培地(pH5.8)上で16時間28°C明/8時間24°C暗条件で7日間培養した。8日目から引き続き同条件で培養するコントロール区の他に以下の各ストレス処理下で7日間培養し、シュート長、種子根長、冠根長と数、側根長と数、根毛の有無、乾物重を調査し、ストレス耐性を評価した。浸透圧ストレス処理としてNaClストレス(150mM)、D-ソルビトール、マンニトール、栄養ストレス処理として0MS培地、1/4MS培地、1MS培地、温度ストレス処理として18°C/15°C、23°C/19°C、33°C/29°C、38°C/34°C、低酸素ストレス処理としてスタグナント培地を用いて培養した。

(3) *OsXyIT* 遺伝子発現の RT-PCR 法による組織特異性

当該遺伝子の発現の組織特異性を特徴付けるために実施した。イネ品種「しおかり」を用いた。葉と根における当該遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法で解析した。

(4) *OsXyIT* 遺伝子の相補性系統のストレス耐性評価

OsXyIT 遺伝子の欠失が当該変異体の原因であることを遺伝子組換え体を用いて検証するために実施した。正常型イネの *OsXyIT* 遺伝子の完全長 cDNA を *OsXyIT* のプロモーター *Pro_{XyIT}* に連結させて *OsXyIT* 欠失変異体に遺伝子導入した。得られた相補性系統を用いて、(2)と同じ方法で各種のストレスを処理し、成長量を測定した。

(5) *OsXyIT* 遺伝子発現のストレス・植物ホルモン応答性

OsXyIT 遺伝子の発現がどのようなストレス処理により誘導されるのか、また植物ホルモンを介して制御されているのかを明らかにするために実施した。

供試材料に「しおかり」を用いる。コントロール区として1/4MS液体培地(pH5.8)上で16時間28°C明/8時間24°C暗条件で7日間培養した。(2)と同じ非生物的ストレス下で培養し、処理前、処理後3時間のシュートと根での *OsXyIT* 遺伝子の発現量を定量 RT-PCR 法で解析した。コントロール遺伝子を *OsUBQ* とした。

培地中にオーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、サルチル酸、エチレン、ブラシノステロイドに添加して、処理後3時間の *OsXyIT* の発現量を定量 RT-PCR 法で解析した。コントロール遺伝子を *OsUBQ* とした。

(6) *OsXyIT* と *RCN1/OsABCG5* との相互作用

突然変異体の表現型が酷似する *OsXyIT* と *RCN1/OsABCG5* の機能的な関連性を遺伝子発現と遺伝学的な相互作用から考察するために実施した。

① *OsXyIT* 欠失変異体における *RCN1/OsABCG5*

遺伝子の発現量の解析

コントロール条件で栽培した10日齢の「しおかり」と「しおかり」由来の *OsXyIT* 欠失変異体を用いた。定量 RT-PCR 法により *RCN1/OsABCG5* 遺伝子の発現量を解析した。

② *RCN1/OsABCG5* と *OsXyIT* の二重変異体の表現型解析

イネ品種「赤室」由来の *rcn1* 変異体 (*rcn1-1*) と「しおかり」由来の *OsXyIT* 欠失変異体 (*rcn11*) 間の交雑後代から作出した両遺伝子の二重変異体と各単一変異体およびそれぞれの原系統を供試した。水田とガラス室内のポット栽培で表現型を評価した。

(7) *OsXyIT* 遺伝子発現およびタンパク質局在解析

発現組織の特異性と形質発現との関連性から、当該遺伝子の機能を考察するために実施した。 *Pro_{XyIT}* に GUS 遺伝子をつなげて、イネに形質転換し、GUS 染色により *OsXyIT* のプロモーターの組織特異な活性を特徴付けた。

Pro_{XyIT} 制御下で *OsXyIT::GFP* 融合遺伝子を発現させたイネ形質転換体を作成し、 *OsXyIT* タンパク質の細胞内局在を特定した。

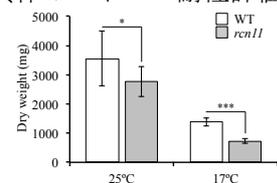
4. 研究成果

(1) *OsXyIT* 欠失変異体の糖鎖分析

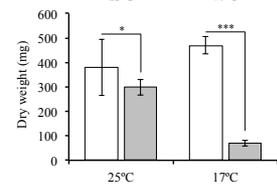
正常型(イネ品種「しおかり」)と *OsXyIT* 欠失変異体 (*rcn11*) の葉から調整した糖タンパク質の MALDI-TOF MS 分析による N-グルカンの定量解析の結果、 *rcn11* では、 β -1,2-キシロース修飾が欠損していることを明らかにした。

(2) *OsXyIT* 欠失変異体のストレス耐性評価

①低温(17°C)下でのシュート(乾物重(右図上)と根の乾物重(右図下)の低下が、顕著であった。

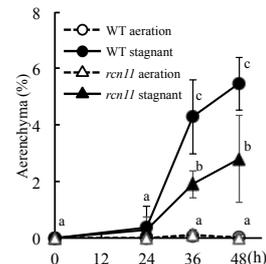


②42°Cの熱ストレス下での根の成長が、 *OsXyIT* 欠失変異体 (*rcn11*) では顕著に低下した。



③塩ストレスならびに PEG 処理による高浸透圧ストレス下で、 *OsXyIT* 欠失変異体 (*rcn11*) の成長が低下した。

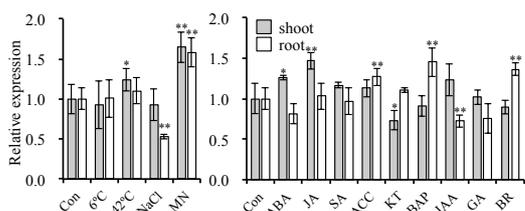
④低酸素ストレス (stagnant 処理) で根に誘導される通気組織の形成が、正常型イネ (WT) と比較して、 *OsXyIT* 欠失変異体 (*rcn11*) で低下していた (右図)。



(3) *OsXyIT* 遺伝子の発現解析

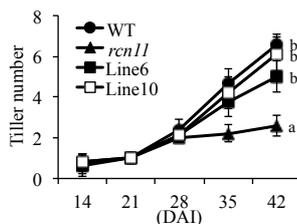
①イネの幼苗の葉と根の双方で同程度の発現が確認された。Rr_{RCN11}::GUS 形質転換体を使って、*OsXyIT* が、冠根の付け根で高発現するものと結論された。

②42°C処理と高浸透圧ストレス (MN; マンニトール) 処理により、植物体の葉と根の双方で発現亢進した。また、アブシジン酸 (ABA)、ジャスモン酸 (JA)、サイトカイニン (BAP)、ブラシノステロイド (BR) によって発現が誘導された。



(4) *OsXyIT* 遺伝子の相補性系統のストレス耐性評価

正常型イネの *OsXyIT* 欠失変異体 (*rcn11*) に *OsXyIT* 遺伝子を導入した相補性系統 (右図 Line 6 と Line10) では、17°Cでの分けつ伸長が正常型イネ (WT) と同程度に復帰した。



(5) *OsXyIT* と *RCN1/OsABCG5* との相互作用 *RCN1/OsABCG5* の発現量に *OsXyIT* の機能の有無が影響しないことと二重変異体の表現型解析から、*RCN1/OsABCG5* とは独立の経路で低温下での分けつ伸長と根の成長を制御するものと結論された。

(6) *OsXyIT* タンパク質局在解析 タバコ BY2 培養細胞での一過性の発現解析からゴルジ体に局在することが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

①Takano S, Matsuda S, Funabiki A, Furukawa J, Yamauchi T, Tokuji Y, Nakazono M, Shinohara Y, Takamure I, Kato K The rice *RCN11/OsXyIT*, β 1,2-xylosyltransferase, is involved in plant development and growth in response to multiple abiotic stresses and ABA sensitivity during seed germination. *Plant Science* 236:75-88 2015 査読有り.
doi:10.1016/j.plantsci.2015.03.022

②Funabiki A, Takano S, Matsuda S, Tokuji,

Y Takamure, I, Kato K The rice *REDUCED CULM NUMBER11* gene controls vegetative growth under low-temperature conditions in paddy fields independent of *RCN1/OsABCG5*. *Plant Science* 211:70-76 2013 査読有り
doi: 10.1016/j.plantsci.2013.06.011.

[学会発表] (計1件)

高野 翔, 船引厚志, 古川潤一, 松田修一, 篠原康郎, 高牟禮逸朗, 加藤清明. イネの β 1, 2-キシロシルトランスフェラーゼ遺伝子は非生物的ストレス下での生育に関わる. 日本育種学会・作物学会北海道談話会 2014年12月6日 酪農学園大学 (北海道江別市)

[その他]

ホームページ等

http://www.obihiro.ac.jp/ichiran/katouk_25.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 清明 (KIYOAKI Kato)
帯広畜産大学畜産学部教授
研究者番号: 60271748

(2) 研究分担者

大西 一光 (KAZUMITSU Onishi)
帯広畜産大学畜産学部准教授
研究者番号: 50526704