

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580155

研究課題名(和文) イネのジテルペン環化酵素遺伝子群の進化・分化に関する研究

研究課題名(英文) Studies on evolution and functional differentiation of diterpene cyclase genes in rice.

研究代表者

豊増 知伸 (TOYOMASU, Tomonobu)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：60272085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：栽培イネ(*Oryza sativa*)は、植物ホルモンのジベレリンだけでなく、フィトカサン、モミラクトン、オリザレキシンといったフィトアレキシンなど多様なジテルペノイドを生合成することが知られている。本研究では、それらの生合成初期段階に關与する酵素遺伝子は、生長制御あるいは病害抵抗といった生理的役割に応じて発現場所が異なることを示した。さらに、フィトアレキシンのモミラクトンとフィトカサンの生合成は野生イネ*Oryza rufipogon*でも検出され、それらの生合成は、人類による栽培化や育種以前に存在していたことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cultivated rice (*Oryza sativa*) produces not only diterpene phytohormone gibberellins but also labdane-related diterpene phytoalexins, including momilactones, phytocassanes and oryzalexins. Our studies indicated that enzyme genes responsible for early-step biosynthesis of these diterpenoids express according to their biological roles, one is growth regulation and another is defense. Our studies also showed that momilactones and phytocassanes were accumulated in leaf blade samples of wild species *Oryza rufipogon*.

研究分野：分子生物学・生物有機化学

キーワード：イネ ジテルペン 生合成 酵素 機能分化 進化 ファイトアレキシン ジベレリン

1. 研究開始当初の背景

イネ (*Oryza sativa*) は、植物ホルモンのジベレリン以外にも多様な labdane 関連ジテルペノイドを生産することが知られており、その中にはフィトアレキシンであるモミラクトン、フィトカサン、オリザレキシンが含まれる。これら labdane 関連ジテルペノイドの基本炭素骨格は、ジテルペノイド共有の炭素数 20 個のプレニル基質、ゲラニルゲラニル 2 リン酸 (GGDP) より、*ent*-コパリル 2 リン酸 (*ent*-CDP) あるいはそのジアステレオマーの *syn*-CDP を経て生合成される。それらの生成段階はジベレリン生合成に關与する異なる 2 種のジテルペン環化酵素、*ent*-CDP 合成酵素 (CPS) と *ent*-kaurene 合成酵素 (KS) のパラログによって連続的に触媒され、その遺伝子は研究代表者らにより全て機能同定されていた; *OsCPS1* (*ent*-CDP 合成酵素), *OsCPS2* (*ent*-CDP 合成酵素), *OsCPS4* (*syn*-CDP 合成酵素) と *OsKS1* (*ent*-kaurene 合成酵素), *OsKSL4* (*syn*-pimara-7,15-diene 合成酵素), *OsKSL7* (*ent*-cassa-12,15-diene 合成酵素), *OsKSL8* (*stemer*-13-ene 合成酵素), *OsKSL10* (*ent*-sandaracopimaradiene 合成酵素) 中でも、*OsCPS1* と *OsCPS2* は、ともに GGDP から *ent*-CDP への段階を触媒するが、前者はジベレリン生合成に、後者はフィトアレキシンのフィトカサンとオリザレキシン A-F の生合成に關与すると考えられていた。それは、*OsCPS1* が機能喪失した突然変異体はジベレリン欠損の極矮性形質を示すこと、さらに UV 照射などフィトアレキシン生産誘導条件では *OsCPS2* の転写物蓄積量は著しく増加すること、などからそのように考えられていた。

一方、モデル双子葉植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ゲノムでは、ジテルペン環化酵素遺伝子は、ジベレリン生合成に關与する *AtCPS* と *AtKS* の 1 ペアしか存在せず、イネは独自に多様な CPS と KSL パラログを獲得してきたと考えられていた。

2. 研究の目的

本研究では、以下の 2 つのテーマを追究し、イネのジテルペン環化酵素遺伝子の分化と進化に関する知見を提供することを目的とした。

(1) *OsCPS1* と *OsCPS2* の発現場所の比較組織レベルでの発現解析

OsCPS1 プロモーター配下の *OsCSP2* による *OsCPS1* 欠損変異体の相補実験

(2) 野生イネを材料とした検討

CPS と KSL パラログ探索

フィトアレキシン生産の検討

3. 研究の方法

(1) *OsCPS1* と *OsCPS2* の発現場所の比較組織レベルでの発現解析

発現解析の材料は、イネ芽生えの第 2 葉鞘における上部 2 cm 部位と生長点を含む下部 2 cm 部位、さらに第 2 葉鞘切片より laser micro dissection により切り取った維管束組織、表皮組織、その他の葉肉組織とした。それぞれの試料より得られた RNA について、逆転写により調製した cDNA を鋳型として、定量 RT-PCR を行った。組織サンプルについては、逆転写反応時に増幅反応により鋳型を複製したものを用いた。定量は、標準プラスミドを利用して作成した検量線により行い、ハウスキープングとしての 18S rRNA 量で標準化して相対量として評価した。

OsCPS1 プロモーター配下の *OsCSP2* による *OsCPS1* 欠損変異体の相補実験

上流約 2 kbp の *OsCPS1* のプロモーターにレポーター遺伝子 *GUS* を連結し、*GUS* 染色によりプロモーターが駆動する組織を確認した。そのプロモーターに *OsCPS2* の cDNA を連結し、*OsCPS1* 欠損突然変異体 (*Tos17* 挿入) に導入し、表現型を観察した。*OsCPS1* 欠損変異体については、ホモ系統は生育が困難であったことから、ヘテロ系統に目的コンストラクトを導入し、次世代の遺伝子型判定により相補体や野生戻りを取得して実験に用いた。目的遺伝子の発現は、定量 RT-PCR により確認した。

(2) 野生イネを材料とした検討

CPS と KSL パラログ探索

野生イネの *Oryza rufipogon* は、栽培イネ *O. sativa* の直接の先祖と考えられている。そこで、その野生イネの 2 種のアクセッションである W1943 (ジャポニカイネと近縁) と W0106 (インディカイネと近縁) を国立遺伝学研究所より購入し、それより調製した cDNA を鋳型として、*O. sativa* の目的環化酵素遺伝子の塩基配列に基づくプライマーを用いて RT-PCR を行った。増副産物はクローニングベクターにサブクローニングして得られたいくつかのクローンについて、塩基配列を決定した。UV 誘導性の発現解析は、UV 処理、あるいは mock の葉身より調製した cDNA を鋳型とした定量 RT-PCR により行った。

フィトアレキシン生産の検討

2 種のアクセッション、それぞれの芽生えに UV 処理し、処理後 2~3 日で葉身をサンプリングした。その葉身の 80%メタノール抽出液について LC-MS/MS 分析を行った。それぞれのフィトアレキシンは、標品と比較することで同定した。

4. 研究成果

(1) *OsCPS1* と *OsCPS2* の発現場所の比較組織レベルでの発現解析

イネ芽生えの第 2 葉鞘上部では *OsCPS1* も *OsCPS2* も同等量で発現していたが、生長点を含む第 2 葉鞘下部では *OsCPS1* 転写物は上部

と同等に蓄積していたが *OsCPS2* 転写物はほとんど蓄積していなかった。この生長点付近の発現の差異が、*OsCPS1* 欠損を *OsCPS2* が相補できない理由の一つと考えられた。また、Laser Microdissection 法により調製した組織別の発現解析により、*OsCPS1* 転写物は維管束組織に主に蓄積し、過去に報告済みのシロイヌナズナの *AtCPS* と同様であったが、*OsCPS2* 転写物は外界ストレスに直面する表皮組織で主に蓄積していた。また、フィットアレキシン生合成遺伝子の比較として *OsCPS4* についても同様の解析を行ったところ、*OsCPS2* と同様に転写物は表皮組織で主に蓄積していた。この組織レベルでの発現場所の違いが *OsCPS1* 欠損変異体の極矮性を説明すると考えた。

OsCPS1 プロモーター配下の *OsCSP2* による *OsCPS1* 欠損変異体の相補実験

OsCPS1 と *OsCPS2* の発現場所が異なることが明らかになったので、それを遺伝学的手法により検証した。*OsCPS1* のプロモーターは GUS を利用して前述した発現解析結果のように維管束で駆動することを確認した後、その下流に *OsCPS2* の cDNA を連結し、*OsCPS1* 欠損変異体に導入したところ、極矮性形質は相補された。その相補体では、*OsCPS2* 転写物が、本来 *OsCPS1* 転写物が蓄積している第 2 葉鞘下部（成長点を含む）に蓄積していることも確認した。

以上の結果から、イネにおける 2 種の *ent*-CDP 合成酵素遺伝子は、それぞれの生理的役割に応じて発現組織が異なることが明らかになった：成長制御の *OsCPS1* は維管束組織、病害抵抗の *OsCPS2* は表皮組織。

(2) 野生イネを材料とした検討

CPS と *KSL* パラログ探索

W1943 と W0106 において、*OsCPS1*, 2, 4 と *OsKSL1*, *KSL4*, 7, 8, 10 全ての cDNA は獲得することができ、それらは *Os* の配列と比べて推定アミノ酸配列で 96~99% のホモロジーであった。また、W0106 では、*OsCPS2*, 4, *OsKSL4*, 7 は UV 処理後に発現量が増加し、ストレス誘導性も保存されていることがわかった。*O. rufipogon* は、栽培前の野生イネで栽培イネの直接の先祖と考えられていることから、上の結果は、多様なジテルペン環化酵素遺伝子パラログは、人類による栽培化・育種される以前よりイネゲノムに存在していたことを示唆した。

フィットアレキシン生産の検討

それを裏付けるように、W1943 と W0106 の葉身において LC-MS/MS によるフィットアレキシン分析を行った結果、モミラクトンとフィットカサンは十分量生産されることが確認された。しかしながら、オリザレキシンは両アクセションで検出できず、モミラクトンと

フィットカサンの生合成の方が広範に保存されている可能性も考えられた。

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 1件)

Toyomasu, T., Usui, M., Sugawara, C., Kanno, Y., Sakai, A., Takahashi, H., Nakazono, M., Kuroda, M., Miyamoto, K., Morimoto, Y., Mitsuhashi, W., Okada, K., Yamaguchi, S. and Yamane, H. (2015) Transcripts of two *ent*-copalyl diphosphate synthase genes differentially localize in rice plants according to their distinct biological roles. *Journal of Experimental Botany* 66: 369-376. (査読有)
DOI:10.1093/jxb/eru424

[学会発表](計 2件)

坂井亜莉里、菅原千都、臼井雅美、高橋宏和、中園幹生、宮本皓司、岡田憲典、黒田昌治、森本優、山口信次郎、山根久和、三橋渉、豊増知伸 (2013): イネにおける 2 種の *ent*-コパリル 2 リン酸合成酵素遺伝子 -第 2 報-、植物化学調節学会第 48 回大会、新潟大学付属図書館(新潟県新潟市)
菅原千都、臼井雅美、高橋宏和、中園幹生、岡田憲典、黒田昌治、花田篤志、山口信次郎、山根久和、三橋渉、豊増知伸 (2012): イネにおける 2 種の *ent*-コパリル 2 リン酸合成酵素遺伝子、植物化学調節学会第 47 回大会、山形大学農学部(山形県鶴岡市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊増 知伸 (TOYOMASU, Tomonobu)
山形大学・農学部・教授
研究者番号: 60272085

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

岡田 憲典 (OKADA, Kazunori)

東京大学・生物生産工学研究センター・准教授

研究者番号：20312241

黒田 昌治 (KURODA, Masaharu)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター作物開発研究領域・主任研究員

研究者番号：30355581

中園 幹生 (NAKAZONO, Mikio)

名古屋大学大学院・生命農学研究科・教授

研究者番号：70282697