

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580493

研究課題名(和文) ストレス環境下における植物メリステムの細胞分裂活性維持機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms for maintenance of cell division activity in plant meristems under stressful conditions

研究代表者

武田 真 (Takeda, Shin)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：00432253

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)：ストレス環境下におかれた植物が成長し、生存し続けるためには成長点の活性や機能を維持する必要がある。本研究では、イネを対象として、塩ストレス環境下での細胞分裂活性の維持および根の伸長制御にそれぞれ関わるRSS1因子とRSS3因子について、その特性や機能を解析した。RSS1が熱変性を受けにくいタンパク質であること、RSS3がDNA結合性bHLH因子およびジャスモン酸シグナリングの制御因子JAZと結合し、ジャスモン酸に対する過剰応答の抑制に寄与することを明らかにした。また、ジャスモン酸シグナルの不活性化に関わる酵素遺伝子の過剰発現によりイネの耐塩性が向上することを示した。

研究成果の概要(英文)：In plants, maintenance of meristem function is critical to sustain the growth and viability under stressful conditions. We have aimed to understand the underlying mechanisms for such maintenance in rice. Previously, we reported that RSS1 is required for maintenance of cell division activity under stressful conditions. In this research project, we found that recombinant RSS1 protein was less denatured after heat treatment and retained binding activity to the protein phosphatase 1. We also revealed that another factor RSS3, controlling root elongation at the root tip, formed a ternary complex with bHLH and JAZ factors and had a role to repress a portion of JA-inducible genes. Moreover, over-expression of a gene encoding the CYP94C family enzyme alleviated jasmonate responsiveness and resulted in enhanced salt tolerance. The results advocate that regulation of JA responses is important for growth and viability of rice under salinity conditions.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：植物成長 メリステム イネ 環境ストレス ジャスモン酸

1. 研究開始当初の背景

ストレス環境下におかれた植物が成長し、生存し続けるためには成長点の活性や機能を維持する必要がある。こうした維持機構に関する知見は極めて乏しいが、イネではストレス環境下での地上部および根のメリステム領域における細胞分裂活性の維持に必要な因子として RSS1 が特定されている。

RSS1 の欠損変異体 (*rss1*, *rice salt sensitive1*) は、塩や低温、高温ストレスといった環境ストレスに高い感受性を示す。塩ストレス下においては、細胞周期の G1-S 期の移行が進まず、分裂細胞の数が減少する。RSS1 はそのアミノ酸配列から、高次構造をとりにくいタンパク質をつくると予想されている他、細胞周期の M 期から G1 期にかけて分解されること、タンパク質脱リン酸化酵素 PP1 と相互作用することが判っているが、その特性や分子機能は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、ストレス環境条件下におかれたイネのメリステム領域での細胞分裂活性の維持機構や、周縁組織での細胞分化と協調した制御に関して、新たな知見を得ることを目指した。具体的には、ストレス環境下での成長と生存に必要なイネ因子の機能や特性を明らかにすることを目的として、次の2つを行うこととした。

(1) ストレス環境下での細胞周期の制御メカニズムの解明

RSS1 の特性や分子機能を明らかにするとともに、RSS1 とその結合因子、あるいは細胞周期制御因子がどのように作用することで、ストレス環境下での細胞分裂活性が維持されているのかを明らかにする。

(2) 細胞周期制御因子の改変による細胞分裂活性の人為的制御

細胞周期制御因子を改変し、細胞の分裂や分化にどのような影響が及ぶかを調べると同時に、その人為的制御に必要な情報を得る。

また、当初の研究に加えて以下を行った。

(3) 根の成長点ではたらく RSS3 の機能の解析、およびジャスモン酸 (JA) の不活性化と塩ストレス環境下での生存能に関する解析

3. 研究の方法

(1) ストレス環境下での細胞周期の制御メカニズムの解明

塩ストレス下での細胞分裂活性の維持に

関わる RSS1 因子の特性および機能の解析を進めるため、RSS1 と PP1 との結合を酵母 2 ハイブリッド系で調べるとともに、リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* 結合アッセイ系による解析を行った。

(2) 細胞周期制御因子の改変による細胞分裂活性の人為的制御

細胞周期制御因子 Rb のイネホモログについて変異体を利用した機能解析を行った。また、Rb の機能抑制因子 RepA を発現させたイネを作出し、その効果を調べた。

(3) 根の成長点ではたらく RSS3 の機能の解析、および JA の不活性化と塩ストレス環境下での生存能に関する解析

根の成長点で発現し、根の伸長制御に関わる RSS3 因子の機能解析、および JA の不活性化に關与する因子の過剰発現イネの解析を行った。

4. 研究成果

(1) RSS1 の熱安定性および機能特性

RSS1 はイネのタンパク質脱リン酸化酵素 OsPP1 (OsPP1a) に結合する。イネには OsPP1a 以外に 4 つの PP1 があるが、それらのうちで幼苗期で発現する OsPP1b, OsPP1c, OsPP1e が RSS1 と結合できること、OsPP1a が最も強い RSS1 結合性を示すこと、また PP1 に結合する RSS1 のアミノ酸配列領域が RSS1 の機能に必要な領域内にあることを明らかにした。

RSS1 の PP1 への結合が、PP1 の活性に直接影響するのかを調べるため、大腸菌内で発現させた RSS1 の精製を進めた。その過程で、大腸菌の全可溶性タンパク質を熱処理すると、大部分のタンパク質が変性し、凝集して沈殿をつくるのに対し、リコンビナント RSS1 では熱変性が起こりにくいことを見出した。また、熱処理後の RSS1 は、熱処理していない RSS1 と同等の PP1 結合活性を有すること、イオン強度の高い溶液中でも RSS1 が PP1 と結合できることを見出した。

これらの結果は、植物が塩ストレスや高温ストレスにさらされて、細胞内のタンパク質が変性しやすい条件となっても RSS1 が機能しうることを示唆しており、RSS1 の分子機能を考える上で興味深い。しかしながら、RSS1 が PP1 の活性にどのように影響するのかわくについては、明確な結果を得るには至らなかった。

(2) Rb のイネホモログの役割と RepA の作用

Rb のイネホモログの 1 つ OsRBR1 の変異体が、生育阻害を起こすこと、花粉形成異常、不稔性を示すことを見出した。また、OsRBR1

および OsRBR2 に結合する RepA タンパク質をコードする遺伝子を人為的に発現させることで、イネの地上部と根に顕著な生育阻害が起きることを示した。このとき、根端では、細胞分裂領域が小さくなるのに対して、細胞伸長領域が大きくなること、また細胞分裂領域では細胞数が減少し、伸長領域では細胞数が増加することを見出した。Rb への結合に必要なアミノ酸を欠失させた変異型 RepA を発現させた場合には、生育阻害は観察されなかった。これらの結果は、RepA が細胞の分裂から分化への移行を促進する作用をもつことを示唆した。

(3) 根の成長点ではたらく RSS3 の機能の解析

塩ストレス環境下での根の伸長に必要な核内因子として特定された RSS3 が、JA シグナリングの負の制御因子である JAZ および DNA 結合性の bHLH 因子と結合し、JA に対する過剰応答の抑制に関わることを示した。このことは、過剰な JA 応答の抑制が、塩ストレス環境下での根の持続的な伸長成長に必要なであることを示唆した。

RSS3 は根端の細胞分裂領域、および細胞伸長領域の分裂領域に隣接した部位で特異的に発現する。一方、RSS3 の機能欠損体では、根の根端から基部側にかけて、RSS3 発現部位より広い領域で異常形質がみられた。とくに塩ストレス存在下では根の全体で柔軟性が失われていた。これは、変異体では根端細胞で JA 応答が過剰に起こることで、細胞壁の性質が変化し、組織の剛直性が変化するためと考えられた。

(4) JA シグナルの不活性化と塩ストレス環境下での生存能

JA は植物体内で活性型の JA-IIIe に変換されるが、JA-IIIe の不活性化に関わる CYP94C2b を過剰発現させたイネでは、JA 応答性が低下し、また塩ストレス環境下での生存能が向上した。後者では、葉の老化遅延やシュートの成長点の機能保持を伴っていた。これらより、イネにおいては、JA に対する応答性が塩ストレス耐性に強く影響すると推察された。

また、CYP94C2b の過剰発現イネでは節間が伸びて背丈が高くなった。これは、細胞伸長の増大を伴わなかったため、伸長した細胞の数の増加に起因すると推定された。

さらにまた、Nona Bokra や Pokkali を含むいくつかの耐塩性イネ品種において、CYP94C2b の発現レベルが標準品種である日本晴よりも高いことを見出した。このことは、CYP94C2b 発現量の改変による耐塩性の強化が遺伝子組換え操作によらずとも実現可能であることを意味する。

一方、JA は病傷害応答を仲介するホルモンとして知られており、こうした働きに干渉せずに耐塩性をより向上するのが望ましいと

考えられた。そのためには、JA シグナリングの下流ではたらく因子のうちで、どの因子が耐塩性に関与するのかを知る必要があると考えられた。

そこで、JA の存在下で分解される JA 応答抑制因子 JAZ のアミノ酸の一部を置換し、JA 存在下でも分解されない変異型 JAZ (mJAZ) をデザインした。mJAZ を過剰発現させることで、JA シグナリングの一部を不活性化することを試みた。mJAZ 過剰発現イネでは、予期せぬことに、小穂の貫生化 (小穂・小花様器官の繰返し形成) を誘発した。また、鱗皮の伸長、穎の数の増加やアイデンティティーの欠如、雌蕊様モザイク器官形成など、多面的な異常が引き起こされた。このような異常形質は、メリステムの分裂異常やメリステム転換の異常、有限性の欠如、器官アイデンティティーの欠如を反映していると考えられた。これらの結果は、JA シグナリングが、幼苗期でのストレス耐性や成長制御のみならず、小穂の発達過程においても重要な役割をもつことを示唆した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8件)

Kurotani K., Yamanaka K., Toda Y., Ogawa D., Tanaka M., Kozawa H., Nakamura H., Hakata M., Ichikawa H., Hattori T., Takeda S. Stress-tolerance profiling of a collection of extant salt-tolerant rice varieties and transgenic plants overexpressing abiotic stress tolerance genes. *Plant Cell Physiol.* 56; 1867-1876. (2015) DOI: 10.1093/pcp/pcv106. 査読有

Kurotani K., Hattori T., Takeda S. Overexpression of a CYP94 family gene *CYP94C2b* increases internode length and plant height in rice. *Plant Signaling & Behavior.* 10; e1046667 (2015) DOI: 10.1080/15592324.2015.1046667. 査読有

Kurotani K., Hayashi K., Hatanaka S., Toda Y., Ogawa D., Ichikawa H., Ishimaru Y., Tashita R., Suzuki T., Ueda M., Hattori T., Takeda S. Elevated levels of CYP94 family gene expression alleviate the jasmonate response and enhance salt tolerance in rice. *Plant Cell Physiol.* 56; 779-789 (2015) DOI: 10.1093/pcp/pcv006. 査読有

Hori Y., Kurotani K., Toda Y., Hattori T., Takeda S. Overexpression of the JAZ factors with mutated Jas domains causes pleiotropic defects in rice spikelet development. *Plant Signaling & Behavior.* 9; e970414. (2014) DOI:

10.4161/15592316.2014.970414. 査読有

Ismail A., **Takeda S.**, Nick P. Life and death under salt stress: same players, different timing? **J. Exp. Bot.** 65: 2963-2979 (2014) DOI: 10.1093/jxb/eru159 査読有

Toda Y., Tanaka M., Ogawa D., Kurata K., Kurotani K., Habu Y., Ando T., Sugimoto K., Mitsuda N., Katoh E., Abe K., Miyao A., Hirochika H., **Hattori T.**, **Takeda S.** RICE SALT SENSITIVE 3 forms a ternary complex with JAZ and class-C bHLH factors, and regulates JA-induced gene expression and root cell elongation. **Plant Cell** 25; 1709-1725. (2013) DOI: 10.1105/tpc.113.112052. 査読有

Toda Y., Yoshida M., **Hattori T.**, **Takeda S.** RICE SALT SENSITIVE3 binding to bHLH and JAZ factors mediates control of cell wall plasticity in the root apex. **Plant Signaling & Behavior**. 8; e26256. (2013) DOI: 10.4161/psb.26256. 査読有

Ogawa D., Morita H., **Hattori T.**, **Takeda S.** Molecular characterization of the rice protein RSS1 required for meristematic activity under stressful conditions. **Plant Physiol. Biochem.** 61; 54-60. (2012). DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.09.006. 査読有

〔学会発表〕(計 6件)

廣川拓也、佐藤大輔、田中若奈、黒谷賢一、畑中彩希、高牟禮逸朗、**武田真**、平野博之。イネ小穂の発生を制御する遺伝的機構とジャスモン酸作用。日本育種学会第129回講演会(横浜)2016.3.21-22.

黒谷賢一、林憲志、畑中彩希、戸田陽介、小川大輔、市川裕章、石丸泰寛、田下諒、鈴木健史、上田実、**服部束穂**、**武田真**。CYP94ファミリー遺伝子の発現上昇はイネの塩処理条件下での生存能を高める。第56回日本植物生理学会年会(東京)2015.3.16-18.

堀佑太郎、黒谷賢一、戸田陽介、**服部束穂**、**武田真**。Jas ドメインに変異をもつ JAZ 因子の発現によるイネ小穂の貫生化の誘発。イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ2014(東京)2014.7.11-12.

Ogawa D., Abe K., Miyao A., Kojima M., Sakakibara H., Mizutani M., Morita H., Toda Y., Hobo T., Sato Y., **Hattori T.**, Hirochika H., **Takeda S.** RSS1 required for maintenance of cell proliferation activity under stress conditions ensures

G1-S transition in rice. 10th International Congress on Plant Molecular Biology (Jeju, Korea) 2012.10.21-26.

Toda Y., Tanaka M., Ogawa D., Kurata K., Kurotani K., Habu Y., Sugimoto K., Yano M., Mitsuda N., Ohme-Takagi M., Tsuchida-Mayama T., Ichikawa H., Abe K., Miyao A., Hirochika H., **Hattori T.**, **Takeda S.** RSS3 forms a complex with JAZ and bHLH factors, and controls adaptive root growth under salinity stress in rice. 10th International Congress on Plant Molecular Biology (Jeju, Korea) 2012.10.21-26.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称:環境ストレス耐性を付与する遺伝子及びその利用

発明者:**武田真**、**服部束穂**、黒谷賢一、市川裕章

権利者:名古屋大学、農業生物資源研究所

種類:特許(国内優先権主張出願)

番号:2014-235085(2015-142503)

出願年月日:2014/11/19(2015/7/16)

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

武田 真(Takeda Shin)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号:00432253

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

服部 束穂(Hattori Tsukaho)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号:10164865