

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657037

研究課題名(和文)紫外線受容体解明への挑戦

研究課題名(英文)Challenge to uncovering the UV-B receptor in rice

研究代表者

飯野 盛利(IINO, Moritoshi)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50176054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ジャポニカ型のイネは紫外線B特異的なシグナル伝達機構をもち、これにより幼葉鞘の成長抑制とムラサキイネ系統におけるアントシアニン蓄積を制御していることを遺伝学および生理学的研究により証明した。これらの紫外線B特異的な反応は、インディカ型のイネでは弱まっていることも明らかになった。また、これらの生理現象に対応するように発現が制御される未知遺伝子の存在も明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated genetically and physiologically that japonica rice has a UV-B specific signaling system with which coleoptile growth inhibition and anthocyanin accumulation (in purple strains) are induced. In addition, it was shown that these UV-B-specific responses are weakened in indica rice strains. Furthermore, expression of some genes was found to be regulated in parallel to these physiological responses.

研究分野：植物生理学

キーワード：イネ 紫外線B 受容体 突然変異体

### 1. 研究開始当初の背景

紫外線 B (UV-B : 300 nm 近傍の紫外線) は DNA を損傷して様々な機能障害をもたらすことが知られており、一方で、成長抑制など、低線量 UV-B による生理反応も古くから研究されてきた。2000 年以降、シロイヌナズナ突然変異体を用いた研究が進展し、光形態形成に關与する HY5 や COP1 が UV-B 応答にも關与することが示された。また、UV-B 応答に特異的に働くタンパク質 UVR8 が同定されて、UV-B シグナル伝達系の存在が裏付けられた。さらに、UVR8 は UV-B 受容体として機能しうることが示唆され (Rizzini et al., Science 332, 2011)、本研究に着手したころ、少なくともシロイヌナズナにおいては、UVR8 が UV-B 受容体として働いていることが報告された (Wu et al., Nature 484, 2012)。

シロイヌナズナを用いた研究が進展していた当時、研究代表者は、UV-B 受容体の分離も視野にいれて、UV-B 応答のイネ突然変異体を分離する研究に着手した。トウモロコシなどイネ科植物の芽ばえは、光・UV-B に応答してアントシアニンを蓄積し、紫色になる。この反応は肉眼で容易に観測できるので、突然変異体の選抜には打ってつけである。しかし、一般的な栽培イネはアントシアニンを蓄積しない。そこで、ムラサキイネとして維持されてきたイネ系統に注目して調べたところ、幼葉鞘・初葉が可視光および UV-B に応答してアントシアニンを蓄積すること、可視光による反応には連続照射が必要であるが、UV-B では、極めて低い線量を短時間投与するだけで、可視光を上回る反応が誘発されること (UV-B 特異的な反応が存在すること) を見出した。この結果を受けて、線量で突然変異を誘発したムラサキイネ突然変異系統をスクリーニングし、UV-B によるアントシアニン蓄積反応が欠損した突然変異体を 17 系統分離した。

### 2. 研究の目的

シロイヌナズナを用いた近年の分子遺伝学的研究により、UV-B に特異的に応答するシグナル伝達系の存在が明らかにされ、UV-B 受容体が解明されるに至った。本研究の目的は、イネを材料にして、UV-B 特異的なシグナル伝達系の存在を証明し、それに関与する受容体・シグナル因子を明らかにすることにある。

研究代表者は、ムラサキイネとして知られるジャポニカイネが低光量の UV-B に特異的に反応して幼葉鞘・初葉にアントシアニンを蓄積することを見出し、この反応を指標にして、線量で突然変異を誘発したムラサキイネからアントシアニン蓄積反応を示さない突然変異体を分離した (上記参照)。本研究では、UV-B シグナル伝達機構の解析にこれらの突然変異体を利用するとともに、成長調節および遺伝子発現調節の視点からも研究を進展させる。

### 3. 研究の方法

(1) 芽ばえの調整 : 連続赤色光下 ( $3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で育成した芽ばえを UV-B 照射実験に用いた。

(2) 芽ばえの UV-B 照射 : UV-B 照射には 290-nm LED (Sensor Electronic Technology 社) と紫外透過可視吸収フィルター (HOYA) を組み合わせた照射装置を用いた (図 1)。青色光照射には 449 nm LED を用いた。

(3) アントシアニンの抽出・定量 : アントシアニンは、摩砕した組織から塩酸メタノールで抽出し、抽出液に水とクロロフォルムを加えて二相分配した後、メタノール相の吸光度 (527 nm) から定量した。

(4) 幼葉鞘の成長解析 : 赤色光照射下の芽ばえを一眼レフデジタルカメラで 1 時間毎に撮影し、写真像から幼葉鞘の伸長成長を解析した。

(5) マイクロアレイ解析 : イネ・オリゴ DNA マイクロアレイ 4 X 44K (アジレント・テクノロジ) を用いた。

(6) 遺伝子発現解析 : real-time PCR と遺伝子特異的なプライマーを用いて解析した。

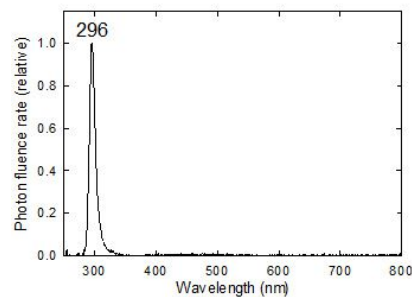


図 1 UV-B 光源の波長分布

### 4. 研究成果

#### (1) UV-B 応答突然変異体の解析

先行研究により分離した突然変異体 (M3 世代) のホモ系統種子 (不稔の突然変異体についてはヘテロ系統種子) を増やして、突然変異体の形質を詳細に解析する研究を進めた (図 2)。その結果、アントシアニン蓄積および形態的形質に単純な遺伝法則では説明できないばらつきが見られた。その後、選抜と育成を繰り返し、M5 世代において全ての芽ばえが安定した突然変異形質を示す 5 系統を分離することができた。

得られたホモ突然変異系統の芽ばえを用いて、UV-B による幼葉鞘の成長抑制反応 (下記参照) を解析し、少なくとも 1 系統は、アントシアニン蓄積反応の欠損に加え、成長反応も欠損していることを明らかにした。両反応が欠損した突然変異体は、UV-B シグナル伝達の上流因子の変異体であると考えられる。

分離した突然変異体の原因遺伝子をマップベースクローニングにより同定するためには、突然変異体と掛け合わせるインディカ型のムラサキイネを入手する必要がある。しかし、ムラサキの形質を示すという情報に基づいて入手した系統の芽ばえは全て明確

なムラサキの性質を示さなかったり、日本の野外では日長の違いから出穂しなかったり、マップベースクローニングによる原因遺伝子解析のための準備が大幅に遅れることになった。ようやく、本研究最終年度になって、候補になるインディカイネ (UV-B に特異的なアントシアニン蓄積反応を示すインディカイネ) を 1 系統同定することができた。

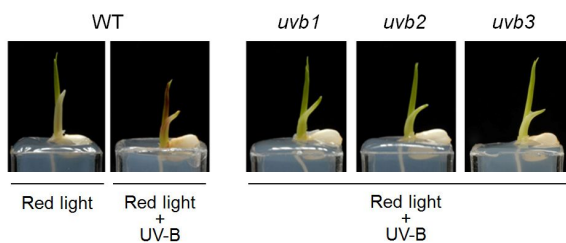


図 2 UV-B 応答突然変異体

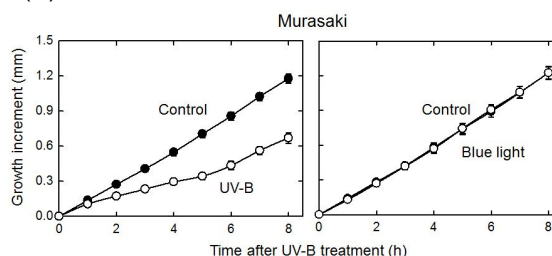
WT: 野生型系統 (ムラサキイネ)、*uvb1*~*uvb3*: UV-B 応答突然変異体。Red light: 赤色光 ( $2.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で照射。Red light + UV-B: 赤色光に UV-B ( $0.13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) を加えて照射

### (2) イネ幼葉鞘の UV-B による成長抑制反応の解析

赤色光下で育てたムラサキイネ芽ばえの幼葉鞘の成長は、短時間 (10 分以下) の UV-B 照射 ( $< 0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) により顕著に抑制されることを見出した。さらに、青色光の短時間照射では、 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の強光を用いても、成長抑制はほとんど起こらないこと、すなわち、UV-B による成長抑制は UV-B 特異的な反応であることが明らかになった (図 3A)。また、同様の成長抑制反応は、ムラサキイネに限らず、ニホンバレ、ニホンマサリなど、ジャポニカ型イネで一般に見られることを明らかにした。一方、数系統のインディカイネを解析したところ、UV-B による成長抑制反応はほとんど示さない (あるいは僅かな反応しか示さない) ことが判明した (図 3B)。

この発見に基づき、インディカイネ (ハバタキ) を供与親とするジャポニカ型イネ (ササニシキ) の CSSL 系統を用いて、反応に関与するゲノム領域の解析を行った (研究協力者: 農業生物資源研究所・矢野昌裕博士)。その結果、2~3 の候補領域を見出した。さらに、染色体断片置換系統を用いた QTL 解析を継続し、ジャポニカイネとインディカイネの UV-B 反応性の違いの原因になる遺伝子は染色体 1 と 12 に座位することを示す結果を得た。

### (A)



### (B)

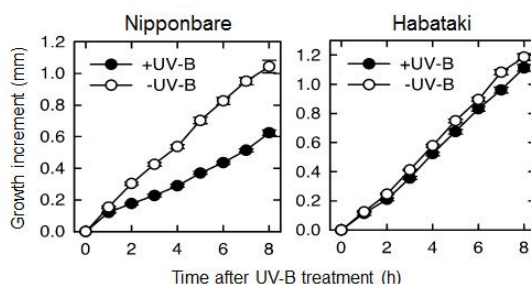


図 3 UV-B による幼葉鞘の成長抑制

(A) 赤色光下で育てたムラサキイネを UV-B ( $0.065 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) あるいは青色光 ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) を 10 分間照射。

(B) 赤色光下で育てたニホンバレ (*japonica*) とハバタキ (*indica*) の芽生えを UV-B ( $0.065 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で 10 分間照射。照射開始時点からの成長を測定。

### (3) UV-B パルス照射により発現制御を受ける遺伝子のマイクロアレイ解析

シロイヌナズナでは UV-B で発現が誘導される遺伝子が幾つか知られているが、これらの遺伝子のイネホモログについて UV-B 応答性を調べたところ、明確な反応は見い出せなかった。そこで、UV-B 特異的に発現が制御される遺伝子を特定するために、マイクロアレイ解析を行い、UV-B で敏速かつ顕著に制御される遺伝子 (ほとんどは未解析遺伝子) を特定した。UV-B 照射により発現が増加した遺伝子の数は、UV-B 照射処理後 20 分では 200 遺伝子であったが、60 分では 1000 以上に増加した。また、UV-B 照射により発現が減少した遺伝子の数は、UV-B 照射処理後 20 分では 20 遺伝子、60 分では 200 遺伝子と少なく、それらの遺伝子の多くはオーキシン応答に関与するものであった。さらに、それらの遺伝子の real-time RT-PCR 解析により、UV-B に特異的なもの (青色光の影響を受けないもの) を選抜した (図 4)。これらの結果から、イネには UV-B シグナル伝達により特異的な発現制御を受ける新規遺伝子が存在することが示された。

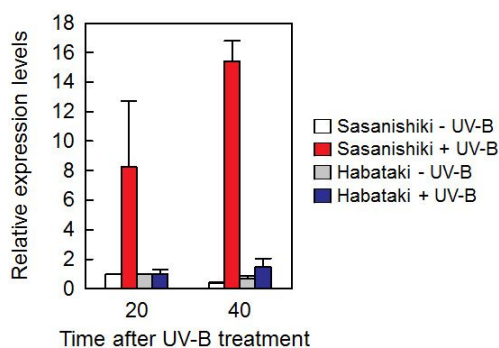


図4 UV-B 特異的に発現が制御される遺伝子の例

UV-B ( $0.065 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) を 10 分間照射し、照射後 20 分と 40 分の幼葉鞘から抽出した RNA を用いて解析。ササニシキ (*japonica*) で見られる顕著な発現誘導はハバタキ (*indica*) では見られない。

### 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)

[学会発表](計2件)

Jiang, L., Iino, M., UV-B-specific photomorphogenesis in rice and different UV-B responsiveness between japonica and indica cultivars、日本光生物学協会年会、2014年8月22日、大阪市立大学(大阪府大阪市)

Jiang, L., Iino, M., UV-B-specific photomorphogenesis in rice and different UV-B responsiveness between japonica and indica rice、The 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology、2013年11月12日、シドニー(オーストラリア)

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

飯野 盛利 (IINO, Moritoshi)  
 大阪市立大学・大学院理学研究科・教授  
 研究者番号：50176054