

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658001

研究課題名(和文)拮抗的なbHLH型転写因子対が関わるイネ穀粒長・穀粒重制御ネットワークの解明

研究課題名(英文)Genetic network involving antagonistic pair of bHLH genes that regulate grain size/weight of rice

研究代表者

佐々 英徳 (Sassa, Hidenori)

千葉大学・園芸学研究科・准教授

研究者番号：50295507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、イネの粒長と粒重の負の制御因子として働くAPGと命名したbHLH型転写因子と、それと結合し拮抗的に働く粒長と粒重の正の制御因子であるPGL1と命名したHLH型転写因子を見出した。本研究では、この制御経路に関わる遺伝子ネットワークの解明を試みた。

ユビキチンプロモーターを用いてPGL1を全身で過剰発現させたところ、顕著な粒長の増大を見せた形質転換体は結実率が低下していた。これは、PGL1と同様にbHLH型転写因子をコードし、ブラシノステロイド情報伝達への関与が示唆されているBU1の過剰発現個体と類似した表現形であり、PGL1とBU1の機能的類似の可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Grain size is a major yield component in rice, and partly controlled by the sizes of the lemma and palea. We have previously shown that an antagonistic pair of basic helix-loop-helix (bHLH) proteins is involved in determining rice grain length by controlling cell length in the lemma/palea. Overexpression of an atypical bHLH, named POSITIVE REGULATOR OF GRAIN LENGTH 1 (PGL1), in lemma/palea increased grain length and weight in transgenic rice. PGL1 is an atypical non-DNA-binding bHLH and found to function as an inhibitor of a typical DNA-binding bHLH which was named ANTAGONIST OF PGL1 (APG). In this study, we produced transgenic rice plants overexpressing PGL1 under the control of ubiquitin promoter. The transgenic plants showing prolonged grains exhibited reduced seed fertility. Similar phenotype has been reported for a brassinosteroid signaling bHLH gene BU1, suggesting the functional relationships between PGL1 and BU1.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：イネ 粒長 bHLH転写因子

1. 研究開始当初の背景

bHLH (basic helix-loop-helix) 遺伝子は植物において二番目に大きな転写因子遺伝子ファミリーを形成しているが、イネにおいてはその多くの遺伝子の機能は不明のままである。我々は機能未知の非典型的bHLH 遺伝子を逆遺伝学的手法で解析したところ、過剰発現イネにおいて穀粒長の増大とそれに伴う種子重の増大 (最大で>40%) が生じることを見出し、この遺伝子をPGL1(Positive regulator of Grain Length 1)と命名した (日本育種学会第119 回講演会、120 回講演会)。更に、PGL1 と相互作用し、PGL1 と拮抗的に働く穀粒長の負の制御因子である典型的bHLH タンパク質も見出し、APG (Antagonist of PGL1)と命名した (日本育種学会第120 回講演会)。穀粒重は重要な収量構成要素であるが、その調節に関わる遺伝子は当時ほとんど明らかになっておらず、粒長については、単離されている遺伝子はわずか2 種類であった。穀粒長の増大したPGL1 の過剰発現形質転換体およびAPG の発現抑制形質転換体において、既知の2 つの穀粒長制御遺伝子の発現は変動していなかった (未発表)。このことは、PGL1 とAPG の関与する経路は新規の穀粒長制御経路であることを示している。従って、これらによって発現の制御を受ける下流の標的遺伝子や、PGL1 とAPG と協働して機能する遺伝子またはその上流の遺伝子を特定し、その機能解析を行うことで、穀粒長・穀粒重の調節に関わる新規の遺伝子ネットワークを明らかにできると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、我々の発見した新規の穀粒長制御遺伝子 PGL1、APG の関わる遺伝子ネットワークを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

APG は DNA 結合領域を持つ典型的 bHLH であ

るのに対し、PGL1 は DNA 結合領域を持たないことから APG や他の典型的 bHLH とヘテロ二量体を形成することでその機能を阻害する役割があると推定されている。また、APG はその推定アミノ酸配列より、G-box と呼ばれるモチーフに結合する可能性が高いことが示唆されている (未発表)。そこで APG によって直接制御を受けている下流遺伝子を同定するため、APG と発現の挙動が類似した遺伝子を選び出し、さらにそのうち開始コドンから上流の 2 kb 程度の範囲内に G-box を持つ遺伝子を APG の下流候補遺伝子とする。候補遺伝子については、ChiP などの方法によって実際に下流遺伝子であるかを実験的に解析する。

APG や PGL1 と共同して機能する他の転写因子を探索するため、APG、PGL1 と相互作用するタンパク質をイーストツーハイブリッド法によって探索する。

PGL1 の穀粒長制御以外の機能を解析するため、イネの全身で PGL1 を過剰発現する形質転換体を作成し、その表現型を解析する。

4. 研究成果

イネの遺伝子共発現データベースを用い、APG と発現パターンの類似した遺伝子を探索したところ、1 つの遺伝子が共発現遺伝子として検出された。この遺伝子は開始コドンの上流に G-box を 1 つ含むことも確認された。APG の下流候補遺伝子が実際に APG によって直接転写調節を受けているかどうかを解析するため、グルココルチコイド受容体 (GR) 融合 APG を過剰発現する形質転換イネを作成した。形質転換イネは、ステロイドホルモンの一種デキサメタゾン (DEX) 存在下でのみ GR-APG 融合タンパク質が核移行し、APG に制御される下流遺伝子の転写が変動すると期待される。DEX と同時にタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX) を併せて処理することで、直接の下流遺伝子のみを発現変動

遺伝子として捕らえることが可能となる。この系を用い、共発現遺伝子として同定された APG 下流候補遺伝子の発現変動を解析したところ、DEX の有無によって有意な発現変動は見られなかった。従って、この遺伝子は APG の下流遺伝子ではない可能性が高いと考えられた。APG と共発現を示すことから、APG と共同してあるいは上流で機能する遺伝子の可能性もあり、今後これらの可能性を解析する必要がある。また、本研究で作出された GR-APG 過剰発現イネを用い、DEX の有無で発現の変動する遺伝子をマイクロアレイなどを用いて網羅的に解析することで、APG に直接制御を受ける遺伝子を特定することが可能になると考えられた。

イーストツーハイブリッド法 (Y2H) による解析の準備として、APG を DNA 結合ドメインを持つ Y2H 用ベクターに挿入して酵母に導入した。その結果、APG 単独でレポーターの発現が見られたことから、APG は酵母での転写活性化能を持ち、そのままでは Y2H による相互作用因子のスクリーニングはできないことが判った。今後は、転写活性化能を示す領域を特定し、その領域を欠失した APG をスクリーニングに用いる必要がある。

PGL1 を全身で過剰発現するイネ形質転換体を作出したところ、発現量の高い個体は従来のように葉身傾斜角の増大に加え、稔性の低下が見られた。こうした表現型は、PGL1・APG と同様に bHLH 型転写因子でブラシノステロイド情報伝達への関与が示唆される BU1 の過剰発現個体の形質と類似しており、PGL1・APG と BU1 のシグナル伝達系の関連を示唆する結果となった。

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 3 件)

Heang, D. and Sassa, H. Antagonistic actions of HLH/bHLH proteins are involved in

grain length and weight in rice. **PLoS ONE** 7: e31325 (2012) doi: 10.1371/journal.pone.0031325 査読有

Heang, D. and Sassa, H. An atypical bHLH protein encoded by *POSITIVE REGULATOR OF GRAIN LENGTH 2* is involved in controlling grain length and weight of rice through interaction with a typical bHLH protein APG. **Breed. Sci.** 62: 133-141 (2012) DOI: 10.1270/jsbbs.62.133 査読有

Heang, D. and Sassa, H. Overexpression of a basic helix-loop-helix gene *ANTAGONIST OF PGL1 (APG)* decreases grain length of rice. **Plant Biotech.** 29: 65-69 (2012) DOI: 10.5511/plantbiotechnology.12.0117a 査読有

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々 英徳 (SASSA, Hidenori)

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号：50295507

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：