

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：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850007

研究課題名(和文) 乾燥ストレス条件下で生育の抑制がなく且つ耐性を向上させた植物の開発

研究課題名(英文) Plant genetic engineering to improve both drought stress tolerance and biomass production

研究代表者

戸高 大輔 (Todaka, Daisuke)

東京大学・農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：10533995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子をコードするDREB1遺伝子を植物に導入し恒常的に過剰発現させると環境ストレス耐性を向上させることができる一方で、生育が抑制されてしまう。本研究では、生育を正に制御する転写因子であるOsPIL1遺伝子を利用し、この生育の抑制を克服することを目指した。DREB1及びOsPIL1両転写因子は互いの転写活性化能に負の影響を与えず独立に転写が正に制御されることを明らかにした。OsPIL1 DREB1A二重過剰発現植物は、DREB1A過剰発現植物と比べその生育が良好になると共に同等のストレス耐性を有していた。これらより、ストレス耐性植物の生育はOsPIL1の利用によって改善できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Transgenic plants overexpressing DREB1A show not only enhanced abiotic stress tolerance but also reduced plant growth. The objective of this study is to create transgenic plants that improve both stress tolerance and growth. We developed transgenic lines overexpressing both DREB1A and OsPIL1, which has been reported as an internode elongation regulator in rice plants. Transactivation activity of OsPIL1 was not changed by DREB1A, suggesting that OsPIL1 and DREB1A appeared to be independent on the transactivation activities to each other in rice protoplasts. Transgenic plants overexpressing both genes showed improved growth and stress tolerance equivalent to DREB1A overexpressors. These results raise a possibility that the OsPIL1 can improve the growth of the DREB1A overexpressors.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：乾燥ストレス イネ 生長

1. 研究開始当初の背景

植物は干ばつなどの乾燥ストレス条件下では生育が抑制され十分に育つことができない。ストレスによるこのような生育抑制の分子レベルの機構はほとんど不明である。一方で植物には乾燥ストレスに曝されると様々な遺伝子の発現を上昇させ、ストレス耐性を高めるシステムが備わっている。

ストレス耐性を向上させる最も重要な遺伝子の一つとして *DREB* 遺伝子が挙げられる。*DREB* 遺伝子はストレスを受けた植物体中で高発現し、ストレス耐性を強化する複数の遺伝子の発現を同時に増加させる。遺伝子改良技術により、多くの植物種においてこの *DREB* 遺伝子を過剰発現させるとストレス耐性が大幅に向上する。しかしながら問題点として、*DREB* 遺伝子を植物体中で過剰発現させると通常生育条件下での生育が抑制されてしまう。この *DREB* 遺伝子による生育抑制の分子レベルの機構は不明である。ストレス応答性プロモーターを用いることで通常生育条件下での生育抑制の問題は解決されるが、長期的なストレス下では *DREB* 遺伝子の発現誘導に伴い生育が抑制されてしまうはずである。そこで、このストレス応答性プロモーターを利用する手法とは異なるアプローチが必要である。

申請者らは本研究開始の前に、*OsPIL1* と名付けた細胞伸長を制御する遺伝子を同定した。この *OsPIL1* 遺伝子をイネに導入すると節間が大幅に伸長し、背丈が増加した。そこで申請者はこの *OsPIL1* 遺伝子に着目した。*OsPIL1* 遺伝子を *DREB* 過剰発現体に導入することで *DREB* 過剰発現体の生育を向上させることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

DREB 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子を同時に過剰発現させた植物体を作製する。作製された二重過剰発現体の生育の影響とストレス耐性の影響を検証する。この検証により、*DREB* 遺伝子過剰発現体における生育の抑制が *OsPIL1* によって改善されるのかを評価する。

3. 研究の方法

(1) *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子の一過的な二重過剰発現の解析

エフェクターとして *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子を同時にイネ葉肉プロトプラスト中で一過的に過剰発現させ、それぞれのリポーター活性を測定し、転写活性化能を解析した。

(2) *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子を同時に過剰発現させた植物体の作製

DREB1 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子を同

時に過剰発現させた二重過剰発現体を作製するため、*DREB1* 過剰発現体と *OsPIL1* 過剰発現体を交配した。交配後得られた種子を栽培し、導入遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により確認した。

4. 研究成果

(1) *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子の一過的な二重過剰発現の解析

エフェクターとして *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子を同時にイネ葉肉プロトプラスト中で一過的に過剰発現させ、それぞれのリポーター活性を測定した結果、*DREB1* 遺伝子のみもしくは *OsPIL1* 遺伝子のみを一過的に過剰発現させた場合と比べ減少しなかった (図1)。従って、両転写因子は互いの転写活性化能に負の影響を与えることなく、独立に転写を正に制御することが明らかになった。

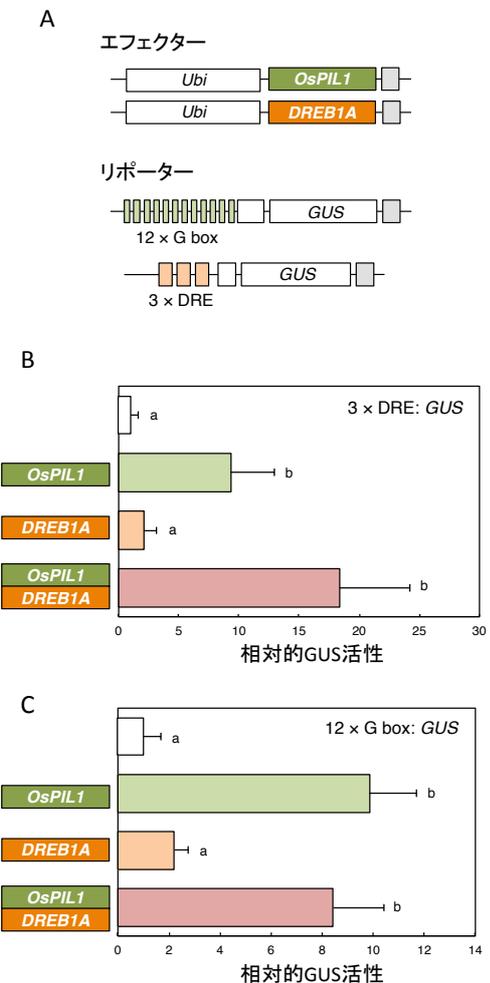


図1. *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子の一過的な二重過剰発現の解析

A. 用いたベクターコンストラクトの模式図

B. DREをリポーターとした際の *DREB1* 転写因子および *OsPIL1* 転写因子の転写活性化能

C. G-boxをリポーターとした際の *DREB1* 転写因子および *OsPIL1* 転写因子の転写活性化能

図中のアルファベットはTukeyの多重比較検定により、異符号間に1%レベルで有意差があることを示す。

(2) *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子を同時に過剰発現させた植物体の作製

DREB1 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子を同時に過剰発現させた二重過剰発現体を作製するため、*DREB1* 過剰発現体と *OsPIL1* 過剰発現体を交配した。交配後得られた種子を栽培し、導入遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により確認した結果、両遺伝子の過剰発現が認められた (図 2)。

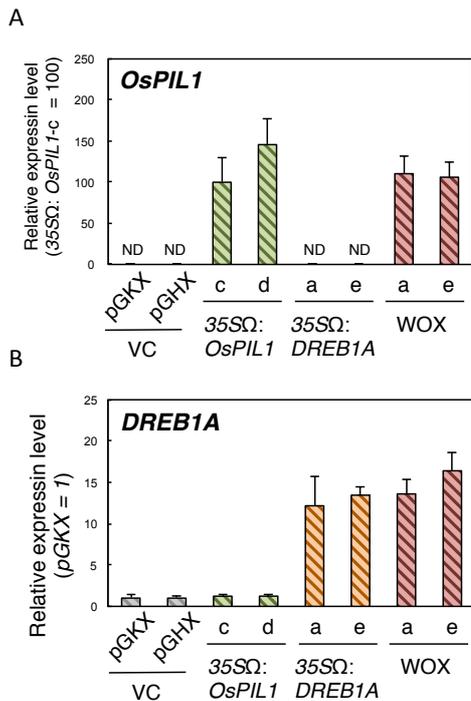


図2. *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子の二重過剰発現体 (WOX) の作製
A. *OsPIL1* 遺伝子の発現量
B. *DREB1A* 遺伝子の発現量
リアルタイムPCR法により導入遺伝子の発現量を調べた。

(3) *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子を同時に過剰発現させた植物体における胚軸の長さ

DREB1 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子を同時に過剰発現させた二重過剰発現体の胚軸の長さを測定したところ、二重過剰発現体においてベクターコントロールや *DREB1* 遺伝子過剰発現体と比べ伸長の促進が見られた。(図 3)。

(4) *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子を同時に過剰発現させた植物体における花茎軸の伸長

DREB1 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子を同時に過剰発現させた二重過剰発現体の花茎軸の生育は、*DREB1* 遺伝子過剰発現体と比べ促進することが明らかとなった (図 4)。

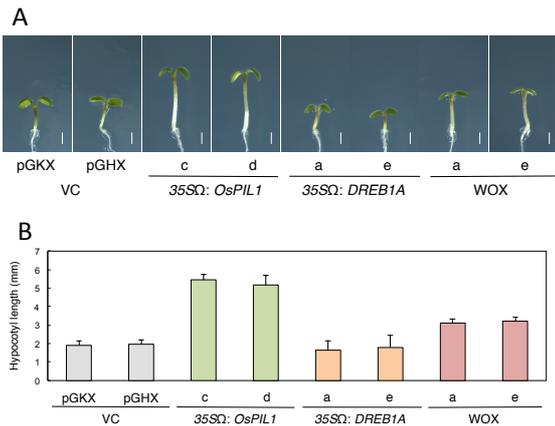


図3. *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子の二重過剰発現体 (WOX) の胚軸の長さ
A. 幼植物体の写真
B. 測定された胚軸の長さ

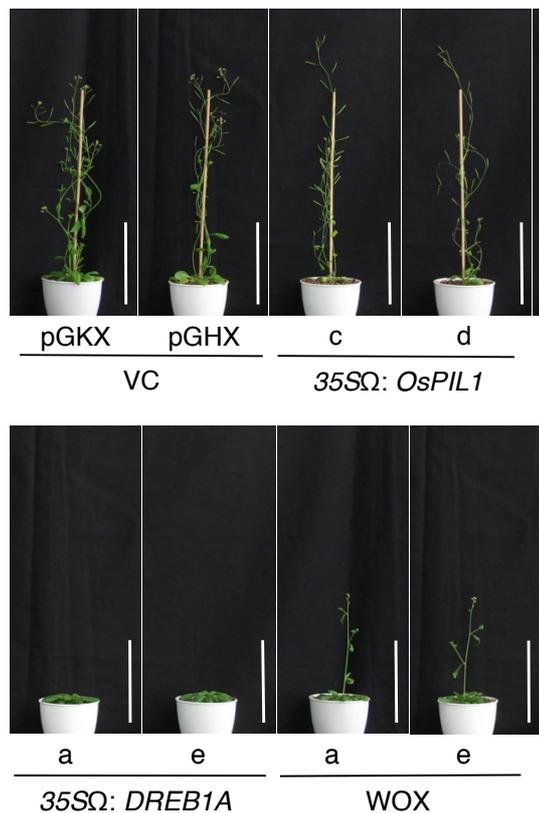


図4. *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子の二重過剰発現体 (WOX) の植物体の様相

(5) *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子を同時に過剰発現させた植物体における乾燥ストレス耐性

DREB1 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子を同時に過剰発現させた二重過剰発現体の乾燥ストレス耐性に関して解析した結

果、*DREB1* 遺伝子過剰発現体と同等の乾燥ストレス耐性を有していることが明らかとなった (図5)。

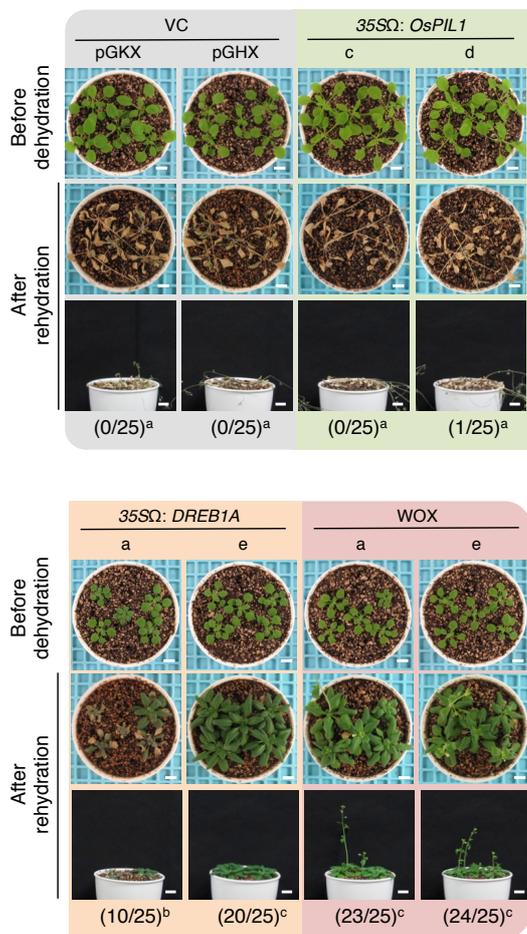


図5. *DREB1* 遺伝子と *OsPIL1* 遺伝子の二重過剰発現体 (WOX) の乾燥ストレス耐性

以上の結果より、*OsPIL1 DREB1A* 二重過剰発現植物は、*DREB1A* 過剰発現植物と比べその生育が良好になると共に高いストレス耐性を有しており、ストレス耐性植物の生育は *OsPIL1* の利用によって改善できる可能性が示された。

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)

- ① Todaka D, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.
Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. *Front. Plant Sci.* 6:84, 2015, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 戸高大輔、趙宇、工藤まどか、篠崎一雄、篠崎和子. 環境ストレス時の生長制御機構の解析. 第 56 回日本植物生理学会年会. 2015 年 3 月 16-18 日. 東京
- ② 工藤まどか、戸高大輔、篠崎和子. バイオマス生産性を向上させた乾燥ストレス耐性植物の創出. 第 56 回日本植物生理学会年会. 2015 年 3 月 16-18 日. 東京
- ③ 戸高大輔、工藤まどか、趙宇、有賀遥平、本多剛志、佐藤輝、篠崎一雄、篠崎和子. 環境ストレス時の細胞伸長と生長制御. 第 55 回日本植物生理学会年会. 2014 年 3 月 18-20 日. 富山

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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]
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸高 大輔 (TODAKA DAISUKE)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教
研究者番号：10533995

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし