

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850002

研究課題名(和文) イネ細胞壁の芳香族化合物蓄積を制御するWRKY型転写因子の機能解析とその利用

研究課題名(英文) Functional analysis of WRKY-transcriptional factor involved in accumulation of aromatics in rice cell wall

研究代表者

西内 俊策 (Nishiuchi, Shunsaku)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：30726980

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)：本研究の目的は、イネ転写因子OsWRKY23がイネの細胞壁に含まれる芳香族成分の蓄積にどのように関わるのかを明らかにし、植物の形質に与える影響を明らかにする事であった。

OsWRKY23-SRD系統では長鎖脂肪酸の生合成に関与する遺伝子やリグニン、スベリンモノマーの重合に働く遺伝子の発現の変動が見られたが、PAM配列に隣接する領域に変異を導入したOsWRKY23欠損変異体では、期待したASFT11の発現減少は見られず、芳香族成分の蓄積への直接の関与は確認されなかった。本解析から、OsWRKY23が芳香族成分の蓄積に間接的に関与することが示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify how the rice transcription factor OsWRKY23 is involved in the accumulation of aromatic components contained in the cell wall of rice and to clarify the influence on plant traits.

In the OsWRKY23-SRD transgenic plants, there were alterations in the expression of genes involved in the biosynthesis of long-chain fatty acids and of genes acting on polymerization of lignin and suberine monomers, but in the OsWRKY23 deficient mutant in which the mutation was introduced in the region adjacent to the PAM sequence, the expected decrease in the expression of ASFT11 was not observed and no direct involvement in the accumulation of the aromatic component was confirmed. From this study it was shown that OsWRKY23 is indirectly involved in the accumulation of aromatic components.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：イネ 細胞壁 芳香族成分 ROLバリア

## 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化や化石燃料の枯渇が問題視される中、稲わらの様な非可食部バイオマス为原料としてバイオ燃料や樹脂を製造する次世代バイオリファイナリー技術に注目が集まっている。植物の幹、茎、葉といった非可食部バイオマス資源の利用効率に關与する要素の1つに、細胞壁の物性が上げられる。イネの細胞壁は主に、多糖類であるセルロースとヘミセルロース、そして ferulic acid (FA: フェルラ酸) と para-coumaric acid (p-CA: パラ-クマル酸) を含む芳香族の高分子化合物であるリグニンから構成されている。芳香族成分は共有結合による接着的役割を持ち、リグニンに含まれる芳香族成分 FA の含量は、酵素を用いた細胞壁からの糖分の抽出効率と逆相関を示し、多糖類繊維の強固な結合に關与していると考えられている (Casler and Jung, 2006; Lynd et al., 2008)。一方で、FA と p-CA はリグニン以外にもクチンやワックス、スベリン等の細胞壁構成要素に含まれ、モノマー間の架橋により細胞壁の空隙を埋めることで、水分・溶質の透過性を減少させると考えられている (Gou et al., 2009)。このように、細胞壁に含まれる芳香族成分は、細胞壁の物性やそれに基づく植物の環境耐性において機能的であるが、細胞壁への芳香族成分の蓄積の制御はまだ研究が進んでいない。

申請者はこれまでにイネを材料に用い、根のアポプラスティックバリア形成に關与する転写因子の探索を行っており、その過程で OsWRKY23 転写因子をアポプラスティックバリア形成に關与する遺伝子として見出した。OsWRKY23 遺伝子にリプレッサードメイン (SRD: strong repression domain) を繋いだキメラタンパクを発現させ、転写活性化能の抑制をするキメラリプレッサー融合タンパクの発現系統 (OsWRKY23-SRDX) では、UV 照射下で見られる根の細胞壁の自家蛍光が減少していた。UV 照射下で見られる自家蛍光はリグニンに含まれる芳香環によるものであり、この結果から、OsWRKY23 は、細胞壁中の芳香族化合物である FA もしくは p-CA の蓄積制御に關与していると考えられた。

OsWRKY23 遺伝子の発現調節により、イネの細胞壁中の芳香族成分の蓄積制御が出来れば、FA と p-CA の蓄積によるアポプラスティックバリア強化によるイネの塩・乾燥ストレス耐性の強化だけでなく、非可食部バイオマス資源としての稲わらの質的向上が見込める。

## 2. 研究の目的

OsWRKY23 がイネの細胞壁中での芳香族成分の蓄積経路に關与するのかを明らかにし、OsWRKY23 を用いて細胞壁中の芳香族成分の蓄積量を改変することにより、塩・乾燥ストレス耐性の向上、及びバイオマス資源としての質的向上が行えるかどうかの評価を行う。

(1) OsWRKY23 遺伝子の抑制系統で減少する芳香族成分の取り込み先の候補として考えられるワックスやスベリン、リグニンについて抽出を行い、その定量と成分分析を行う。これにより、OsWRKY23 遺伝子がどの細胞壁構成成分での芳香族成分の蓄積に關与しているかを明らかにすると同時に、蓄積している芳香族成分が FA なのか p-CA なのかを同定する。

(2) OsWRKY23 過剰発現体と野生型イネを材料に、マイクロアレイ解析を行い sWRKY23 転写因子の下流遺伝子の同定を行う。これにより、OsWRKY23 転写因子による芳香族成分の蓄積制御に關与する遺伝子の同定を行う。

(3) OsWRKY23 の過剰発現体、もしくは OsWRKY23 の下流遺伝子を過剰発現を作成し、地上部や根において FA 及び p-CA の含量が増加するかどうかを評価する。

(4) OsWRKY23 の過剰発現体、及び発現抑制体を用い、芳香族成分量の調節によるイネの塩・乾燥ストレス耐性向上について評価する。また、芳香族成分の蓄積量を減少させることで、細胞壁からの糖の抽出効率が向上するかどうかを評価する。

## 3. 研究の方法

(1) OsWRKY23 遺伝子の形質転換イネ、野生型イネを材料としたマイクロアレイ解析  
OsWRKY23 遺伝子は転写因子であり、下流の遺伝子の発現を調節することにより細胞壁中の芳香族成分の蓄積を制御していると仮定した。

(2) OsWRKY23 形質転換イネの芳香族成分の蓄積部位の確認  
形質転換体等の解析から、OsWRKY23 が具体的にどの組織へ、どのような芳香族成分の蓄積を制御しているのかを明らかにする。

(3) 上記の解析に基づいた芳香族成分を高蓄積、または低蓄積する形質転換イネの作出

(4) OsWRKY23 形質転換イネからの細胞壁からの糖の抽出効率の評価

細胞壁中の芳香族成分の蓄積量を変化させた場合、一般的な酵素処理において、糖の抽出効率にどのような影響が出るかを評価する。

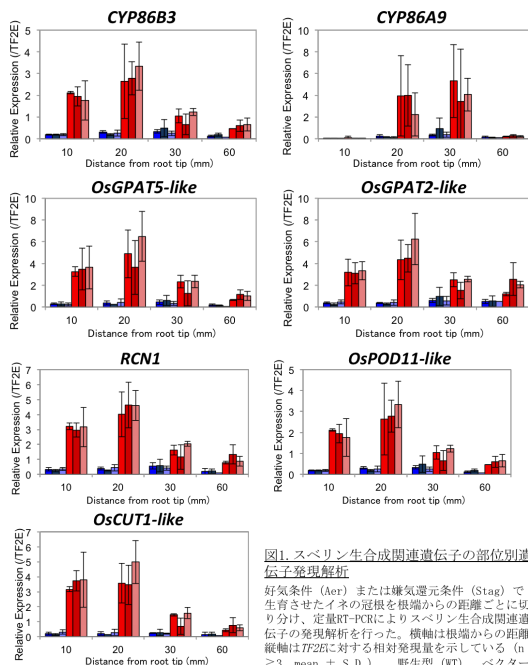
(5) OsWRKY23 形質転換イネ、及び 3 の形質転換イネを用いた乾燥・塩ストレス耐性評価  
芳香族成分は、リグニンやスベリンの構成成分であり、モノマー間での架橋により細胞壁の透過性を低減させ、細胞間隙を水や塩が透過しにくくする機能を担うと考えられている。これにより、乾燥による根や地上部からの水の喪失や、根からの塩の侵入を抑えることで、乾燥ストレスや塩ストレスへの耐性に貢献すると考えられる。そこで、各形質転換イネを用い、芳香族成分の蓄積が乾燥・塩ストレス耐性に貢献するかどうか、アポプラスティックバリアの形成度合いや乾燥耐性を指標に評価する。

#### 4. 研究成果

本研究ではまず、OsWRKY23 の転写活性化能の抑制をするキメラリプレッサー融合タンパクの発現系統 (OsWRKY23-SRDX) を作出し、その詳細な発現解析を行った。その結果、長鎖脂肪酸の生合成に關与する遺伝子やリグニン、スベリンモノマーの重合に働く遺伝子の発現の変動が確認され、また N1, N5, N10-trihydroxyferuloyl spermidine の生合成に關与する OsASFT11 の発現の減少が見られ、根の外皮細胞壁の自家蛍光が減少することから、イネの細胞壁に含まれる芳香族成分の蓄積への關与が疑われた。

しかし、続いて作成した OsWRKY23-RNAi 系統の発現解析からは同様の結果を得ることが出来ず、また嫌氣的な環境で生育させた場合の根のアポプラスチックバリアの形成に野生型と差異が確認できなかった。

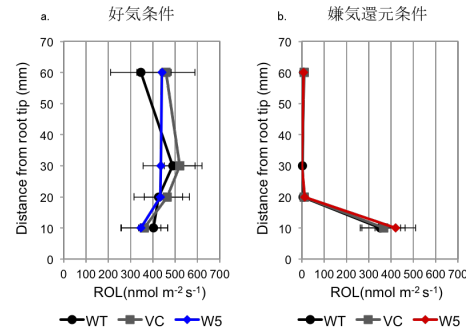
OsWRKY23-SRDX 系統、OsWRKY23-RNAi 系統の発現解析から、仮説を支持する結果が得られなかったため、より詳細な解析を行う為に PAM 配列 (標的配列の認識に關わる) に隣接する領域をターゲットとし、ゲノム配列上の任意の場所に変異を起こすことが出来る CRISPR/Cas9 システムを用いて、OsWRKY23 欠損変異体を作成した。その結果、OsWRKY23 のアミノ酸配列に変異をもつ形質転換体を作成できた。その変異体の評価を行ったが、OsWRKY23-SRDX 系統で見られた長鎖脂肪酸の生合成に關与する遺伝子やリグニン、スベリンモノマーの重合に働く遺伝子の発現の変動は確認されなかった (図 1)。



RNA-seq による網羅的な発現解析を行った結果、根で発現する NAC 型転写因子等の発現減少が見られたが、ASFT11 の発現減少は見られなかった。

また同 OsWRKY23 欠損変異体系統では、

水や酸素の根の外皮細胞壁の透過性に関わるアポプラスチックバリアの形成に変化は見られず、透過性試験からは乾燥耐性の向上を示唆する結果は得られなかった (図 2)。



野生型 (WT)、ベクターコントロール (VC)、OsWRKY23変異体 (W5) の3系統について、それぞれの冠根からのROL量を測定した。横軸はROL量、縦軸は根端からの距離を示している (n = 3, mean ± S.D.)。a. 播種後、好気条件下で9日間生育させ、さらに14日間好気処理を行ったイネを用いた。b. 播種後、好気条件下で9日間生育させ、その後14日間嫌気還元処理を行ったイネを用いた。

本解析の OsWRKY23-SRDX 系統と OsWRKY23-CRISPR/Cas9 系統の発現解析から、OsWRKY23 が、細胞壁モノマー間の結合を担うと考えられる N1, N5, N10-trihydroxyferuloyl spermidine の生合成に間接的に關与することが示された。SRDX 配列を導入したことによるリプレッサー化が ASFT11 やリグニン、スベリンモノマーの重合に働く遺伝子の発現変動に繋がったこと、欠損変異体では NAC 型転写因子等の発現変動に關与し上記の遺伝子群の発現変動が見られなかったことを考慮すると、OsWRKY23 はイネの根の細胞壁におけるリグニン、スベリンモノマーの重合とそこの芳香族化合物の蓄積のフィードバック制御機構に關与していることが推測されたが、本研究期間内にこの新たな仮説を追試するために必要な形質転換体を作成することは出来なかった。

解析途中において、当初の仮説とは異なる結果がえられ、予定していた試験を実施出来ない状況となった。研究期間内に、根においてカスパー線形成に關与すると報告のアルペプチドシグナル等の關与も報告されており、今後は新たな知見を視野にいれ、根における細胞壁に關する研究を継続したいと考えている。

#### 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]

A major locus involved in the formation of the radial oxygen loss barrier in adventitious roots of teosinte *Zea mays* is located on the short-arm of chromosome 3.

Watanabe K, Takahashi H, Sato S, Nishiuchi S, Omori F, Malik AI, Colmer TD, Mano Y, Nakazono M.

Plant Cell Environ. 2017 Feb;40(2):  
304-316.  
(計1件)

〔学会発表〕

(1) 佐藤彩織・渡邊宏太郎・西内俊策・中園  
幹生 嫌気還元条件下の根で誘導される  
OsWRKY23 の発現解析 第22回育種学会中部  
地区談話会 2014年11月22日 岐阜大学  
(岐阜県・岐阜)  
(計1件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西内 俊策 (NISHIUCHI, Shunsaku)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：30726980

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

渡邊宏太郎 (WATANABE, Kohtaro)