

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07263

研究課題名(和文) イネにおける brassinosteroid と jasmonate の crosstalk に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the crosstalk between brassinosteroid and jasmonate signaling in rice

研究代表者

坂本 知昭 (Sakamoto, Tomoaki)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：00345183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： brassinosteroid 情報伝達因子 ELF1 の突然変異体 *elf1* と brassinosteroid 受容体の突然変異体 *d61* の二重変異体で示した表現型は両者が同一の情報伝達経路上にないことを示した。マイクロアレイ解析では、*elf1* と野生型で発現量に差があった遺伝子の過半は *d61* と野生型で同様の変化を示さなかった。特に *elf1* と *d61* で対照的な発現量の変化を示した遺伝子にはストレス関連遺伝子が多く、そのほとんどが jasmonate 処理により発現が誘導された。これら結果から ELF1 は既知の経路とは異なる brassinosteroid 情報伝達経路で、jasmonate などとの相互作用を介してストレス応答に関わっている可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)： ERECT LEAF 1 (ELF1) was identified as a component of brassinosteroid signaling in rice. A double mutant obtained by crossing *elf1* with the brassinosteroid receptor mutant *d61* did not show epistasis. Microarray analysis showed that fewer than half of genes differentially expressed between the wild-type and *elf1* showed similar differences in *d61* relative to the wild-type. These results indicate that less than half of ELF1-regulated genes in rice seedlings are affected by the receptor, and suggest that ELF1 acts in a rice brassinosteroid signaling pathway different from that initiated by the receptor. Gene expression analysis showed that some stress response-related genes were induced in *elf1* but not in *d61*, and 8 of 9 genes oppositely regulated in *elf1* and *d61* were significantly up- or down-regulated in both *elf1* and jasmonate-treated wild-type. These results suggest that ELF1 may be involved in the brassinosteroid-mediated suppression of jasmonic acid response in rice.

研究分野：作物生理学

キーワード：イネ brassinosteroid jasmonate 情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

ブラシノステロイドは細胞の分裂や伸長、光形態形成、維管束の分化、ストレス耐性など様々な生理現象に関与している。作物を対象とした研究では、低温、高温、乾燥、塩類等の環境ストレスによるイネの生長阻害がブラシノステロイドの投与により回避できること、ブラシノステロイドがイネの免疫システムに働き病害抵抗性を誘導すること、オオムギの短桿化に大きく貢献した「渦性」がブラシノステロイド受容体遺伝子の機能抑制であったことが示されている。

申請者はイネのブラシノステロイド関連突然変異体の解析を進めており、ブラシノステロイドの生合成または情報伝達が部分的に抑制されたイネ突然変異体の典型的な表現型は葉の直立(直立葉)であり、直立葉突然変異体と密植栽培の組み合わせが収量および地上部バイオマスを増加させることを示した。さらにブラシノステロイド生合成酵素遺伝子の機能が失われたイネの自然変異体「夷大黒(d2)」が特徴的な表現型を示したことから、新たにd2突然変異体の弱アレルを単離し、それらが直立葉のほか穂長の増加、枝梗数の増加、着粒数の増加、稈強度の増加といったNew Plant Typeの多収品種に特徴的な形質を発現することを示し、調査した範囲のほとんどのNew Plant Type品種にd2遺伝子変異を見出した。これらの結果は、緑の革命において別種の植物ホルモンであるジベレリンが重要な働きをしたように、作物生産のさらなる安定多収化にブラシノステロイドの制御が大きく貢献しうる可能性を示している。

一方、申請者はイネのブラシノステロイド代謝系および情報伝達系に関わる突然変異体や遺伝子についての解析を進めてきた。これまでにブラシノステロイド生合成酵素遺伝子はシロイヌナズナと比べイネは高い遺伝的冗長性を示すこと、イネのブラシノステロイド不活性化酵素は生化学的機能を含め他の植物由来の酵素とは異なる分子進化を遂げていることを明らかにした。また同不活性化酵素遺伝子を用いてイネ植物体内のブラシノステロイド含量を空間的、時間的、量的に制御することにより、上記の多収形質を形質転換イネに付与できることを示している。

イネのブラシノステロイド情報伝達系については、遺伝的背景がブラシノステロイド関連突然変異体の表現型に影響を与えており、その原因が非自律性トランスポゾン*mPing*の挿入によるブラシノステロイド受容体遺伝子*OsBR11*の発現制御異常によることを明らかにした。またオーキシン処理により*OsBR11*遺伝子の発現が一過的に上

昇し、その結果としてブラシノステロイド感受性が高まること、その発現制御にはオーキシン情報伝達因子ARFタンパク質が関わっていることなどを示した。さらにこの知見を応用し、イネ実生に対するオーキシンとブラシノステロイドの共処理がブラシノステロイド単独処理と比べより高濃度の塩水処理にも耐性を与えることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

申請者が単離したブラシノステロイド非感受性突然変異体イネ*erect leaf1 (elf1)*の原因遺伝子*ELF1*はユビキチン化酵素をコードしており、このユビキチン化酵素*ELF1*はブラシノステロイド情報伝達の正の制御因子であることを示した。さらに*ELF1*の標的タンパク質候補として*EIZ1*を得ていた。シロイヌナズナの*EIZ1*オルソログはジャスモン酸存在下でユビキチン化されプロテアソームにより分解されると考えられていたことから、イネではブラシノステロイドとジャスモン酸がそれぞれの情報伝達経路において*EIZ1*をユビキチン化しているのではないかと考えられた。これはブラシノステロイドとジャスモン酸がクロストークしていることを強く示唆しているが、この2つの植物ホルモンの関係については現在のところ明確になっていない。ジャスモン酸は植物のストレス応答に関与していることが広く知られている。一方でブラシノステロイドがストレス耐性の獲得に機能することも数多くの研究で明らかにされている。従ってこの2つの植物ホルモンを結びつけ、その相互作用を詳細に解析することにより、植物のストレス応答とその耐性獲得メカニズムを解明する研究に新たな展開をもたらすことができるのではないかと期待できた。

本研究では*ELF1*および*EIZ1*がそれぞれブラシノステロイドおよびジャスモン酸の情報伝達系の中でどのような役割を担っているのかについて明らかにすることを目的として行った。具体的にはブラシノステロイドあるいはジャスモン酸シグナルが*ELF1*および*EIZ1*に対してどのように働きかけ、シグナルを受けた*ELF1*および*EIZ1*はその後どのような機能を発現するのかなどについて明らかにすることにより、ブラシノステロイドとジャスモン酸のクロストークの骨組みをつかみたいと考えた。

## 3. 研究の方法

本研究は内容を*ELF1*の解析、*ELF1*の標的タンパク質*EIZ1*の解析、*ELF1*と標的タンパク質*EIZ1*の相互作用の解析、3つに分けて進めた。*ELF1*の解析では、*ELF1*がブラシノステロイド情報伝達系の

中でどのような役割を担い、それにジャスモン酸シグナルがどう影響を与えるのかを明らかにするため、*elf1-1* 突然変異体の詳細な解析を行った。具体的には、*elf1-1* 突然変異体とブラシノステロイド受容体遺伝子の突然変異体 *d61-1* の二重変異体を作成し、その表現型を解析したほか、野生型イネ、*elf1-1* 突然変異体、*elf1-1* 突然変異体と同程度の形態異常を示すブラシノステロイド受容体遺伝子の突然変異体 *d61-12* の 3 系統を用いてマイクロアレイ解析を行い、突然変異体中で発現量が変化した遺伝子を網羅的に解析した。ELF1 の標的タンパク質候補 EIZ1 の解析では、酵母や大腸菌で発現させた ELF1 および EIZ1 組換えタンパク質を用いて両者の相互作用の有無と ELF1 による EIZ1 のユビキチン化について確認した。さらに標的タンパク質 EIZ1 のイネ植物体内における発現消長を、各種植物ホルモン処理した野生型イネおよび *elf1-1* 突然変異体で解析することにより、それらタンパク質とジャスモン酸情報伝達の間を明らかにした上で、ブラシノステロイド情報伝達に対しどう関与しているのかを明らかにしようとした。ELF1 と標的タンパク質の相互作用の解析では、植物体内で ELF1 が標的タンパク質をユビキチン化すること示し、ブラシノステロイドシグナルおよびジャスモン酸シグナルがその反応にどう影響を与えるのかを明らかにしようとした。

#### 4. 研究成果

##### (1) ブラシノステロイド非感受性突然変異体イネ *erect leaf1 (elf1)* の解析

ブラシノステロイド情報伝達因子 ELF1 の機能欠失突然変異体 *elf1-1* とブラシノステロイド受容体の機能抑制突然変異体 *d61-1* の二重変異体が示した表現型は両者が同一の情報伝達経路上にないことを示した。マイクロアレイ解析では、*elf1-1* と野生型で発現量に差があった遺伝子の過半は *d61-12* (*d61-1* のアレルで *elf1-1* と同程度の形態変化を示す) と野生型で同様の変化を示さなかった。特に *elf1-1* と *d61-12* で対照的な発現量の変化を示した遺伝子にはストレス関連遺伝子が多く、そのほとんどがジャスモン酸処理により発現が誘導され、エチレン処理で誘導される遺伝子も多く認められた。これら結果から ELF1 は既知の経路とは異なるブラシノステロイド情報伝達経路で、ジャスモン酸やエチレンなどとの交互作用を介してストレス応答に関与している可能性があると考えられた。

##### (2) ELF1 の標的タンパク質候補の解析

Yeast two-hybrid スクリーニングにより ELF1 の標的タンパク質候補を複数得た。

このうちまずジャスモン酸情報伝達に関与していると考えられた EIZ1 について、ELF1 との相互作用に関わっているドメイン構造を Yeast two-hybrid 法を用いて特定した。

さらに大腸菌内で発現、精製した ELF1 および EIZ1 タンパク質を用いて *in vitro* ユビキチン化実験を行い、EIZ1 が ELF1 によりポリユビキチン化されることを示した。

次にイネ植物体内における EIZ1 タンパク質の発現解析を行うため、HA タグとの融合タンパク質の形で *EIZ1* 遺伝子を過剰発現させた形質転換イネを作成し、市販の抗 HA 抗体を用いて EIZ1 タンパク質の検出を試みた。ところが形質転換イネからのタンパク質抽出液を用いて行ったウェスタンブロット解析では融合タンパク質を検出することはできず、プロテアソーム阻害剤 MG132 を処理した形質転換イネからのタンパク質抽出液を用いて行ったウェスタンブロット解析でも融合タンパク質は検出できなかった。

そこで FLAG、*c-myc*、HAT などタグの種類を変え、さらに融合部位も EIZ1 の N 末端側と C 末端側の両方を試みた形質転換イネを作成した。いずれの場合も導入遺伝子が高発現していることは定量的 PCR 解析により確認できたが、ウェスタンブロット解析で融合タンパク質を検出することはできなかった。

ところが、ポリユビキチン化を受けると想定される EIZ1 の C 末端領域を削るとウェスタンブロット解析で融合タンパク質が検出できるようになったことから、形質転換体で過剰に発現させた場合であっても、EIZ1 はプロテアソームにより迅速に分解されていると結論づけた。したがって当初予定していたタグ付きタンパク質を利用した発現解析や相互作用解析は断念せざるを得なくなった。

EIZ1 のほかに得られた 2 種類の標的タンパク質候補についても同様に HAT タグとの融合タンパク質の形で過剰発現させた形質転換イネを作成し、市販の抗 HAT 抗体を用いて融合タンパク質の検出を試みたが、EIZ1 の場合と同様に全く検出されないか、極めて薄いシグナルしか得られなかった。これらの結果から、ELF1 の標的と考えられるタンパク質はイネ植物体内において極めて迅速に代謝されていると考えられ、これらのタンパク質の発現消長やタンパク質間の相互作用を解析するためには別の方法を用いなければならないことが明らかとなった。

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 1 件 )

Sakamoto T ( 責任著者 ) , Kitano H, and  
Fujioka S. (2017). Rice ERECT LEAF 1  
acts in an alternative  
brassinosteroid signaling pathway  
independent of the receptor kinase  
OsBRI1. *Plant Signaling & Behavior* 12,  
e1396404. ( 査読有 )

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 知昭 ( Sakamoto Tomoaki )  
石川県立大学・生物資源環境学部・准教  
授  
研究者番号 : 00345183

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし