

平成 21 年 4 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570044

研究課題名 (和文) イネ根特異的タンパク質のジャスモン酸とサリチル酸による発現調節機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis on regulatory mechanism of the expression of the protein exclusively expressed in rice roots by jasmonic acid and salicylic acid.

研究代表者

古川 聡子 (FURUKAWA TOSHIKO)

首都大学東京・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：0021565

研究成果の概要：

RSOsPR10 過剰発現イネの各系統の生育特性評価および発現調節機構の解析、トウモロコシへの遺伝子導入系の確立を主要な目的として研究を進めた。RSOsPR10 過剰発現イネ系統を用いた根の生育、養水分吸収、悪環境下での生育について検討したところ、ポット栽培による特定網室内での評価試験では、PR10 過剰発現イネ系統 S3、S4 および S19 系統で明確な乾燥耐性が確認された。また、同系統で根の伸長促進 (根長、根重量) が確認できた。RSOsPR10 遺伝子発現の情報伝達経路については、ジャスモン酸欠損変異体を用いて検討したところ、少なくとも塩処理による RSOsPR10 遺伝子の誘導にはジャスモン酸ではなくエチレンの関与が考えられる。サリチル酸による発現抑制は転写レベルであることも明確になってきたが、これらの内生の調整因子が本遺伝子プロモーター領域のどのようなシス配列とトランス因子によって制御されているのか、今後の重要な課題である。また、PR10 を過剰に生産する酵母を作成し、高浸透圧、塩耐性について検討を加えたところ、酵母で塩、および、ソルビトールに対する耐性の向上が観察されている。これらの結果、本遺伝子が何らかの形でイネの悪環境耐性に重要な働きを有することが明らかになってきている。こうしたことから、本研究では RSOsPR10 遺伝子の発現調節に関わる基盤的研究、本遺伝子の過剰発現体が示す悪環境耐性、本タンパク質の生理的機能を明らかにしていく基本的な知見を蓄積することができた。本研究成果を基盤にして、昨年度より発足した農水省新農業展開プロジェクトへの参画もきまり、より応用に向けた研究にも大きく発展してきている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：環境応答、PR10、植物、環境耐性、発現制御、耐塩性、生理学

1. 研究開始当初の背景

(1) PR10 タンパク質：パセリ、トマト、マメ類、アスパラガス、オオムギ、イネ等双子葉、単子葉ともに多くの植物でその存在が確認されている。このタンパク質は一般的に16kDa前後と比較的分子量の小さい酸性タンパク質であるという共通の特徴を持つ。いくつかのものはそのアミノ酸配列中に核酸結合型タンパク質に見られるモチーフと似たグリシンリッチ配列が見られる。これらはいずれも様々な生物的・非生物的環境ストレスにより誘導される事から植物防御反応に重要であると考えられている。しかしながら、実際の植物における生理的機能についてはほとんど明らかになっていない。(Liu et al, 2003 *Physiol Plant.* 119:544, Park et al. 2004 *Plant J.* 37:186)

(2) 環境ストレス応答と PR タンパク質：JA、SA を介した情報伝達系に関して、双子葉ではシロイヌナズナを中心に解析が進んでおり、JA は塩基性 PR タンパク質発現を誘導し、SA は酸性 PR タンパク質を誘導することが一般的に受け入れられている。しかしながら、単子葉では統括的な知見が得られていない。イネの SA 含有量がシロイヌナズナの 10 倍以上であることや、環境ストレスによるイネ植物体内の SA 含有量の変化が見られないことなどから、単子葉では双子葉とはかなり違った機構が存在すると考えられ、詳細な研究が待たれている。

(3) イネの PR タンパク質および環境応答に関して：PR1、OsPR10a/PBZ1、JI0sPR10 等に関して一定の研究蓄積がある。OsPR10a/PBZ1 に関して最初の報告は、日本(明治製菓)の Midoh らによってなされた(Midoh & Iwata, *PCP*, 1996)。これは長い間不明であったプロベナゾールによるイネへのいもち病菌耐性付与の機構解明の端緒となる画期的な研究である。しかしその後、

イネにおける PBZ1 の役割に関する研究報告はない。国外では Moons 等(*Plant Cell*, 1997)の研究によりイネの耐病性誘導機構や情報伝達系に関する研究が、国内では Rakwal、小松ら(*Electrophoresis*, 2000)による PR1a の研究により、様々な環境ストレスでの PR タンパク質誘導に関する報告など、研究が蓄積している。なお、同種の PR10 タンパク質に関して、双子葉植物のピーナツ(Jain et al, *Plant Physiol. Biochem*, 2006)、セイヨウアブラナ(Strivastava et al, *PCP*, 2005)で塩耐性への関与に関する研究の報告がある。しかし、これらに関する詳細な研究は行われていない。

2. 研究の目的

本研究は、申請者らが行っているイネ根特異的 PR タンパク質 RSOsPR10 を介した環境ストレス耐性機構の解明の中で、特にジャスモン酸 (JA)、エチレンを介した遺伝子発現機構の詳細を細胞・組織レベルの解析を含めて検討を加えるとともに、サリチル酸 (SA) の抑制効果が明確になってきているためこれら 2 つのホルモンのクロストークについても分子レベルで明らかにすることを主な目的とする。また、プロモーターにおけるシス配列とトランス因子に関しても研究を進める。これらの研究を通して、本遺伝子の悪環境(高塩、乾燥、貧栄養など)に対する耐性への関与を分子レベルで明らかにし、本遺伝子発現の人為的操作による環境耐性を有する有用植物の開発につながることを長期的目標としている。

3. 研究の方法

イネ(日本晴)野生型(日本晴; *Oryza sativa* L cv Nipponbare)、および、RSOsPR10 過

剩発現体種子を発芽、生育し、乾燥等の悪環境に対する耐性を比較した。種子は 0.025% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で滅菌後、20°C、12 時間明暗周期条件下で水耕培養により発芽生育した。ジャスモン酸の関与に関しては、欠損変異体 (*hebiba*, *cpm1*, *cpm2*) については、その表現型を確認してホモ個体のみを実験に使用した。この時の対象はバックグラウンドである日本マサリ (*O. sativa* L cv Nihonmasari) を使用した。NaCl、ACC (エチレン前駆体)、乾燥、ジャスモン酸等の処理は、処理後の経時変化も含めて 0~24 時間の観察を行った。RSOsPR10 遺伝子、および、タンパク質の発現は、ノーザン、RT-PCR、ウェスタン、免疫組織化学等により解析した。内生のジャスモン酸、サリチル酸の根における量については、LC-MS/MS を用いて測定した。塩処理後、乾燥処理後根の組織を低温化で裁断し直ちに液体窒素で凍結保存し、分析にまわした (分析は、理研、軸丸博士らの協力)。エチレンに関しては、イネに変異体がないため、エチレン作用阻害剤である AVG、STS、MCP (北興化学、名古屋大学森教授より分与) を用いた。

4. 研究成果

RSOsPR10 過剰発現イネの各系統の生育特性評価および発現調節機構の解析、トウモロコシへの遺伝子導入系の確立を主要な目的として研究を進め、(1) RSOsPR10 過剰発現イネ系統を用いた根の生育、養水分吸収、悪環境下での生育などの生育特性について検討したところ、水耕培養での幼苗の生育状態、乾燥、塩耐性は、野生型と有意な差は見られなかった。しかし、ポット栽培による特定網室内での評価試験では、PR10 過剰発現イネ系統 S3、S4 および S19 系統で明確な乾燥耐性が確認された。また、同系統で根の伸長促進 (根長、根重量) が確認できた。(2) RSOsPR10 遺伝子発現の情報伝達経路について特にジャスモン酸経路について、ジャスモン酸欠損変異体を用いて検討を加えたところ、少なくとも塩処理による RSOsPR10 遺伝子の誘導にはジャスモン酸の合成は必要のない可能性が高いことが明らかになった。このためエチレンを介した経路の可能性

を考える必要がでてきた。(3) エチレン作用阻害剤 (AVG、STS、MCP) 処理による発現を見たが、振れが大きく、現時点では正確な結果は得られていない。しかし、プロモーター上流 2 kb 付近に GCC ボックスが 2 個存在すること、また、2 kb までのプロモーターには、明確な根特異性や環境応答性が見られていないことから、エチレンを介した制御がある可能性が考えられる。(4) これまでの 35S プロモーターでのライン以外に、REX、ユビキチンプロモーターを用いた過剰発現ラインの作成に取り組んだ。(5) PR10 を過剰に生産する大腸菌、酵母を作成し、高浸透圧、塩耐性について検討を加えたところ、酵母で塩、および、ソルビトールに対する耐性の向上が観察された。(6) シバ、シロイヌナズナ、ダイズ、トウモロコシ他の有用植物への遺伝子導入についても同時に進行している。

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] (計 2 件)

① Umemura, K., Satoh, J., Iwata, M., Uozumi, N., Koga, J., Kawano, T., Koshihara, T., Anzai, H., Mitomi, M. (2008) Contribution of salicylic acid glucosyltransferase, OsSGT1, to chemically-induced disease resistance in rice plants. *Plant J.* 57: 463-472. (2009)(査読有)

② Feng, Y.W., *Komatsu, S., Furukawa, T., Koshihara, T., Kohno, Y. Proteome analysis of proteins responsive to ambient and elevated ozone in rice seedlings. *Agric. Ecosys. Environ.* 125: 255-265. (2008)(査読有)

[学会発表] (計 7 件)

① 大田幸士、長谷川久和、寺川輝彦、小松節子、小柴共一 (2008) 環境ストレス応答性 RSOsPR10 遺伝子を導入した形質転換ベントグラスの作出および評価. 2008 年度育種学会 (東京)

② 石井紀子、仲島夕貴、大田幸士、長谷川久和、寺川輝彦、小柴共一 (2008) 植物に環境ストレス耐性を付与するタンパク質 RSOsPR10 の発現制御機構の解析. 植物化学調節学会第 43 回大会 (筑波)

- ③. Hatakeyama, A., Ishii, N., Nick, P., Furukawa, T., Koshiba, T. (2007) RSOsPR10 is abundantly expressed in cortex cells surrounding central cylinder in rice roots after salt stress. 19th Annual Meeting of the International Plant Growth Substances Association (Puerto Vallarta, Mexico)
- ④. 小柴共一 (2007) イネの悪環境耐性付与に關与する *RSOsPR10* の発現調節. 農研機構・作物研セミナー (筑波)
- ⑤. 石井紀子、畠山惇、古川聡子、小柴共一 (2007) イネの根特異的 PR タンパク質 *RSOsPR10* のジャスモン酸、エチレン、サリチル酸による発現制御の解析. 植物化学調節学会第 42 回大会 (静岡)
- ⑥. 畠山惇、石井紀子、Nick, Peter、古川聡子、小柴共一 (2007) イネの根特異的 PR タンパク質 *RSOsPR10* の発現調節と組織レベルの局在の解析. 第 48 回日本植物生理学会 (松山)
- ⑦. Furukawa, T., Hashimoto, M., Terakawa, T., Okamoto, T., Komatsu, S., Koshiba, T. (2006) Analysis of RSOsPR10, PR protein exclusively expressed in rice roots. Joint Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists and the Canadian Society of Plant Physiologists (Boston, USA) (Mimi symposium)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

ストレス応答性遺伝子が導入された形質転換植物 特願 2006-018661

国際出願 PCT/JP2007/208928, 50522

発明者: 小柴共一、寺川輝彦、長谷川久和、小松節子、岡本龍史、古川聡子、島谷健太郎
出願人: 首都大学、北興化学工業 (株)、(独) 農業生物資源研

○取得状況 (計 1 件)

ストレスに応答する根特異的遺伝子 特許第 3731048 号 (平成 17 年 10 月 21 日)

発明者: 小松節子、小柴共一、澤進一郎、橋本誠
出願人: (独) 農業生物資源研

[その他]

- ①. 石井紀子、畠山惇、大田幸士、長谷川久和、小松節子、岡本龍史、寺川輝彦、小柴共一 (2008) 「イネ感染特異的タンパク質 (*RSOsPR10*) は植物に塩や乾燥ストレス

耐性を付与する」イノベーションジャパン 2008 (有楽町国際フォーラム)

- ②. 石井紀子、仲島夕貴、小柴共一「植物に悪環境への耐性を付与するイネのストレス応答タンパク質」(2008) 大学院教育改革プログラム 首都大バイオコンファレンス 2008、(首都大)

- ③. Koshiba, T. “Using plants to rescue our planet from serious environmental and food crises on Earth” (「地球レベルの環境、食糧問題の根本解決を目指す植物戦略」) C40 気候変動東京会議、2008, 10. 23 (都庁)

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川 聡子 (FURUKAWA TOSHIKO)
首都大学東京・大学院理工学研究科・助教
研究者番号: 00221565

(2)研究分担者

小柴 共一 (KOSHIBA TOMOKAZU)
首都大学東京・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 80117704

(3)連携研究者

なし