

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19780002
研究課題名（和文） 超高効率手法による植物の有用形質制御因子の探索と機能解析
研究課題名（英文） High-throughput functional screening and characterization of useful genotypes regulated-genes <i>in planta</i>
研究代表者 高橋 芳弘 (TAKAHASHI YOSHIHIRO) 東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：20390891

## 研究成果の概要：

本研究の目的は、植物ウイルスの能力を利用した迅速な過剰発現／発現抑制スクリーニング法を用いて植物の有用形質制御因子を網羅的に探索すると共に、単離した遺伝子の詳細な機能解明を行うことである。このスクリーニングにより、過剰発現又は発現抑制した際に致死となる因子、葉の形態形成を制御している因子、植物体の大きさを制御している因子、葉色を制御している因子、環境ストレス耐性に関与する因子等を網羅的に単離し、一部の遺伝子に関しては詳細な特徴付けを行った。

## 交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

研究分野:農学

科研費の分科・細目:農学・育種学

キーワード:植物分子育種

## 1. 研究開始当初の背景

フォワードジェネティクスは、重要因子を発見する上で非常に有効な手法であり、現在までに様々な形質を示す植物体が単離され、原因遺伝子の同定と詳細な分子機能の解明がなされている。この解析法における特徴の一つとして、

ランダムな遺伝子変異体種子プールを用いたスクリーニングが挙げられる。変異体種子プールを作製するには、EMS 等のアルキル化剤を用いた点突然変異を誘発する方法、T-DNA やトランスポゾンを用いる遺伝子操作法、X-線、ガンマ線、中性子線などのエネルギー線照射法などが挙げられるが、目的形質のスクリーニングを終

えてから遺伝子単離までが非常に時間がかかる上に、植物の発生分化等において重要な役割を担っている遺伝子の多くは致死遺伝子として単離できない可能性が高い。そこで本研究は、上記欠点を補うスクリーニング法を用いて、従来の手法では発見されていない有用形質制御因子を網羅的に単離することを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究の最大の特徴は、ウイルスの特性を生かして、迅速かつ効率的な有用形質制御因子の探索と未知遺伝子の機能解析を行うことである。具体的には、植物遺伝子 cDNA ライブラリーを作製し、この cDNA ライブラリーを保持したウイルスを成熟葉もしくは幼植物体葉に感染させる。感染したウイルスは一週間前後で感染部周辺へ、その後、ウイルスの上位葉移行性質により植物体全体に広がると同時に、挿入遺伝子の向きにより遺伝子の過剰発現/内生遺伝子の発現抑制を引き起こす。その際、形態形成等に関与している重要な因子は表現形の変化として観察され、さらには、表現形の観察を終えた植物体を用いて環境ストレス耐性を調査する。また、原因遺伝子の同定は、感染ウイルス中に挿入されている植物遺伝子配列を確認するだけであるため非常に迅速である。そのため、本手法では、従来の手法では単離が困難であった致死遺伝子や発生分化に関与する遺伝子等を効率的に単離できると共に、ストレス応答に関与する遺伝子に関しても網羅的に単離できる。

## 3. 研究の方法

### (1) cDNAライブラリーの作製

タバコ及びベンサミアナタバコの健全葉、老化葉、花、茎、根、病原体に感染した葉、様々な非生物学的ストレスを与えた葉から抽出した RNA を用いて、cDNA ライブラリーを作製した。過剰発現用ベクターとして、レフトボーダー (LB)・ライトボーダー (RB) 間にポテトウイルス X (PVX) のレプリコンが挿入されているベクターを用い、cDNA ライブラリーをセンス向きに挿入した。また、内生遺伝子発現抑制用ベクターとして、タバコラットウイルス (TRV) ベースのベクターを用い、cDNA ライブラリーをアンチセンス向きに挿入した。

### (2) スクリーニング

上記方法で作製した過剰発現用・発現抑制用 cDNA ライブラリーをそれぞれアグロバクテリウム

に導入した。アグロバクテリウムは、保持ベクターの LB・RB 間を植物の核内に輸送する性質を保持しているため、このアグロバクテリウムを植物細胞に感染させるだけで、ウイルスの転写・翻訳が引き起こる。その後、ウイルス自身が自己増殖すると同時に周辺部位へ広がることで、ウイルスが保持している植物遺伝子の強発現が引き起こされる。

過剰発現用 PVX ベクターでは、得られたアグロバクテリウムコロニーを爪楊枝で植物葉に接種し、1~2 週間後に表現形を観察した。

内生遺伝子発現抑制用 TRV ベクターでは、得られたアグロバクテリウムコロニーの終夜培養液を注射器で 4 葉期の幼ベンサミアナタバコ植物葉に注入し、約 3~4 週間後に表現形の観察を行った。さらに、表現形観察を終えた植物体を用いてストレス耐性を調査するため、ベンサミアナタバコに非宿主抵抗性反応を引き起こす植物病原菌 *Pseudomonas cichorii* を感染させ、抵抗性の強度をバクテリアの増殖量から判断した。

こうして得られたクローンの原因遺伝子を同定するため、アグロバクテリウムに導入されているプラスミドを単離し、cDNA 配列を DNA シークエンサーにより確認した。

### (3) 遺伝子の特徴付け

上述したスクリーニング法で単離された遺伝子は、組織別、様々なストレスを受けた際の遺伝子発現レベルをノーザン解析にて行った。さらに、それぞれの遺伝子に合わせた機能解析を分子生物学的、生化学的手法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 過剰発現スクリーニング

過剰発現した際に植物葉に変化を引き起こす遺伝子を網羅的にスクリーニングした。図 1 に見られる様に、赤矢印で示したような細胞死を引き起こすクローン、葉色を変化させるクローン等を網羅的に単離した。細胞死を引き起こすクローンの原因遺伝子として、ユビキチン-プロテアソームに関与する遺伝子群、タンパク質のトラフィッキングに関与する遺伝子群、シグナル伝達経路に関与する遺伝子、転写因子、機能未知遺伝子など、様々な因子が単離された(実験手法及び得られたクローンの詳細に関しては、研究業績欄[図書]①に発表した)。

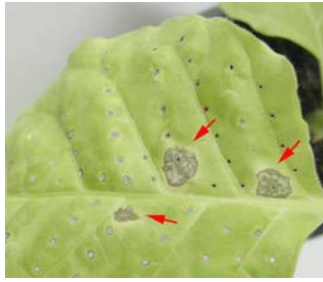


図 1. タバコ葉を用いた過剰発現による細胞死誘導因子のスクリーニング。赤矢印で示した物が細胞死誘導因子の候補クローンである。

### (2) 内生遺伝子発現抑制スクリーニング

内生遺伝子を発現抑制した際に表現形の変化を引き起こす因子を網羅的に単離した。本スクリーニングで単離された形質の一部を図 2 にまとめた。それぞれをコードする遺伝子は、(1) Phytoene desaturase (2) Unknown protein (3) Serine palmitoyltransferase (4) Clathrin heavy chain (5) SNARE protein (6) Unknown protein であった。

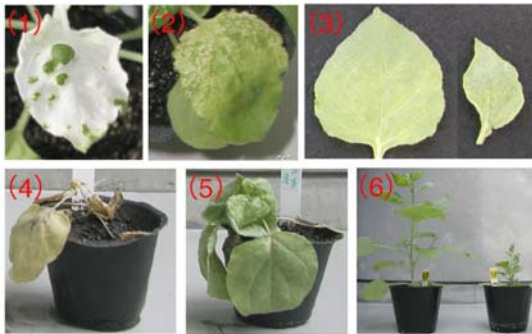


図 2. 内生遺伝子発現抑制スクリーニングによって単離された様々な表現形を示す植物。上: 植物葉 下: 植物体。

(3) 及び(6)の写真は、左側がコントロール植物、右側がサイレンス植物である。

### (3) ストレス耐性能の評価

表現形の観察を終えた遺伝子発現抑制植物体、もしくは、過剰発現によって細胞死を引き起こした遺伝子の発現抑制植物体を用いて病原体感染試験を行い、抵抗性反応の強弱を病原体の増殖量から検討し、ストレス耐性能に関する遺伝子を網羅的に同定した。

### (4) セリンパルミトイルトランスフェラーゼサブユニット *NbLCB2* の機能解析

過剰発現した際に細胞死誘導を引き起こす因子として単離し、その後、内生遺伝子発現抑制時には葉の形態形成を制御する因子として、スフィンゴ脂質合成経路の第一段階に関する因子、セリンパルミトイルトランスフェラーゼの

*LCB2* サブユニットをコードする遺伝子を単離した。

環境ストレス時の遺伝子発現量を調査した結果、ベンサミアナタバコに対して非宿主抵抗性反応を引き起こす病原菌 *Pseudomonas cichorii* 感染によって強い発現誘導が観察されたが、宿主病原菌である *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* での応答性はほとんど無かった(図 3)。また、病原体抵抗能力を調査した結果、*LCB2* 発現抑制植物体においては、*P. cichorii* に対する抵抗能力が著しく低下していることを発見した。一方、*P. syringae* pv. *tabaci* に対する抵抗能力に変化は無かった(図 4)。

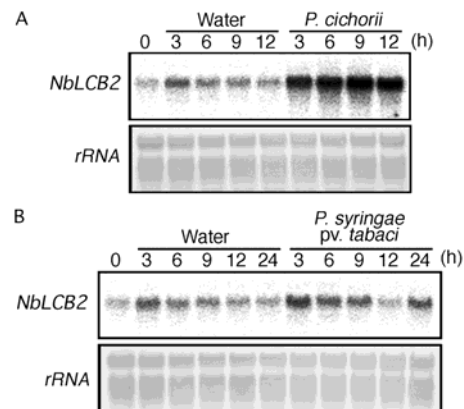


図 3. *NbLCB2* の病原体感染時の遺伝子発現量の変化。(A)非宿主病原菌である *P. cichorii* を感染させた際。(B)宿主病原菌である *P. syringae* pv. *tabaci* を感染させた際。

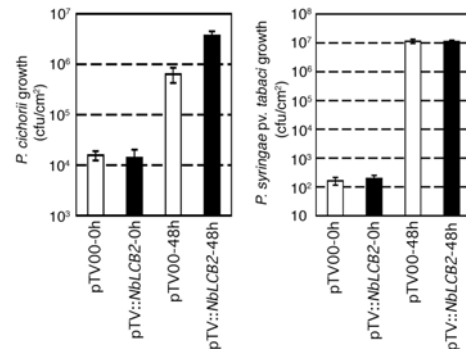


図 4. *NbLCB2* 発現抑制植物体を用いた病原体増殖量の調査。(左) *P. cichorii* 増殖量の変化。(右) *P. syringae* pv. *tabaci* 増殖量の変化。白棒グラフはコントロール植物体での病原体増殖量を表しており、黒棒グラフは *NbLCB2* 発現抑制植物体での病原体増殖量を表している。

その他、ミトコンドリア孔の外膜構成因子である voltage-dependent anion channels 及び、小

胞体ストレス応答に関与する転写因子 *bZIP60*、ADP-ribosylation factor に関しても特徴付けを行うと共に、学会発表及び発表論文〔雑誌論文〕②、③、④として成果報告を行った。

#### 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 4 件)

① Takahashi, Y., Berberich, T., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Kusano, T. and Terauchi, R. Serine palmitoyltransferase, the first step enzyme in sphingolipid biosynthesis, is involved in nonhost resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 31-38. (2009) 査読有

② Tateda, C., Yamashita, K., Takahashi, Y., Kusano, T. and Takahashi, Y. Plant voltage-dependent anion channels are involved in host defense against *Pseudomonas cichorii* and Bax-induced cell death. *Plant Cell Rep.* 28, 41-51. (2009) 査読有

③ Tateda, C., Ozaki, R., Onodera, Y., Takahashi, Y., Yamaguchi, K., Berberich, T., Koizumi, N. and Kusano, T. NtbZIP60, an endoplasmic reticulum-localized transcription factor, plays a role in the defense response against bacterial pathogens in *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Res.* 121, 603-611. (2008) 査読有

④ Coemans, B., Takahashi, Y., Berberich, T., Ito, A., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Tsuda, S., Kamoun, S., Sagi, L., Swennen, R. and Terauchi, R. High-throughput *in planta* expression screening identifies an ADP-ribosylation factor (ARF1) that is involved in non-host resistance and *R* gene mediated resistance. *Mol. Plant Pathol.* 9, 25-36. (2008) 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

① Takahashi, Y., Berberich, T., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Kusano, T. and Terauchi, R. Serine palmitoyltransferase is involved in pathogen defense response in *Nicotiana benthamiana*. 18<sup>th</sup> International Symposium on Plant Lipids, 2008 年 7 月 20～25 日 ボルドー, フランス

② Tateda, C., Kusano, T. and Takahashi, Y.

Plant mitochondrial porin regulates defense response against bacterial pathogen and Bax-induced cell death. *Plant Neurobiology* 2008, 2008 年 6 月 6～9 日 九州大学

③ Tateda, C., Kusano, T. and Takahashi, Y. Role for plant VDACS in plant innate immune systems. International Conference on Biotic Plant Interactions, 2008 年 3 月 27～29 日 ブリスベン, オーストラリア

④ 高橋芳弘, Berberich Thomas, 神崎洋之, 松村英生, 齋藤宏昌, 草野友延, 寺内良平. 新規細胞死誘導因子 *NbLCB2* は病原体抵抗性反応に関与する. 日本農芸化学会 2008 年 3 月 26～29 日 名城大学

⑤ 高橋芳弘, 小野寺悠, 館田知佳, 尾崎玲, Berberich Thomas, 小泉望, 草野友延. スペルミン誘導性転写因子 *bZIP60* の機能解析. 日本ポリアミン研究会 2008 年 1 月 24～25 日 崇城大学

⑥ 高橋芳弘, Berberich Thomas, 神崎洋之, 松村英生, 齋藤宏昌, 草野友延, 寺内良平. バクテリア抵抗性反応に関与する Serine Palmitoyltransferase の機能解析. 日本植物学会東北支部第 20 回秋田大会. 2007 年 12 月 8～9 日. 秋田県立大学

〔図書〕(計 1 件)

① Berberich, T., Takahashi, Y., Saitoh, H. and Terauchi, R. The Handbook of Plant Functional Genomics. Edited by Günter Kahl and Khalid Melsem, Chapter 6. High-throughput functional screening of genes *in planta*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 113-136. (2008)

〔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:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.ige.tohoku.ac.jp/outou/index-j.htm>  
|

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高橋 芳弘(TAKAHASHI YOSHIHIRO)  
東北大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号:20390891