

機関番号：82104

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780006

研究課題名 (和文) 環境ストレス耐性に関わるイネの転写因子 *OsDREB1* ファミリーの網羅的解析研究課題名 (英文) Comprehensive analysis of rice *DREB1/CBF*-type transcription factors

研究代表者

伊藤 裕介 (イトウ ユウスケ)

独立行政法人国際農林水産業研究センター・生物資源領域・研究助手

研究者番号：30399373

研究成果の概要(和文):イネは10個の転写因子 *OsDREB1* 遺伝子を持つ。多くの *OsDREB1* 遺伝子は低温ストレスで特異的に誘導されるが、一部は高塩・乾燥ストレスによっても誘導された。*OsDREB1D* 以外の全ての *OsDREB1* は転写活性化能を持つが、DNA結合特性には違いが見られた。転写活性化能が高い *OsDREB1G* の過剰発現は多くの遺伝子の発現を誘導するが、*OsDREB1A* との共通性も見られた。これらの結果からイネは複数の *OsDREB1* を持つが、様々なストレスに応じてこれらの遺伝子を精妙に利用していることがわかった。

研究成果の概要(英文): The transcription factors DRE (dehydration responsive element) binding protein 1s (*DREB1s*)/ C-repeat (CRT) binding factors (CBFs) specifically interact with the DRE/CRT *cis*-acting element and control the expression of many stress-inducible genes in *Arabidopsis thaliana*. Rice (*Oryza sativa*) has 10 genes for *DREB1* orthologues, *OsDREB1s*. We analyzed the 10 *OsDREB1* genes comprehensively. Many *OsDREB1* genes were induced by cold stress (4 °C) specifically, and some *OsDREB1* genes were also induced by high-salinity (250mM NaCl) or drought stresses. Although all the *OsDREB1s* except for *OsDREB1D* have transactivation activity, there is a difference of DNA binding preference among the 10 *OsDREB1s*. Overexpression of *OsDREB1G* which has the highest transactivation activity among the 10 *OsDREB1s* affected expression of many genes in transgenic rice plants which contain the *OsDREB1G* controlled under a promoter responsive to an animal hormone, dexamethasone (DEX) and some of the downstream genes were also regulated by *OsDREB1A*. These results indicate that rice has some *DREB1* genes and utilizes these genes elaborately according to various stresses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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、環境ストレス、発現制御、転写因子、遺伝子組換え

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナの乾燥・高塩・低温ストレス応答に関わる制御配列としてシス因子 Dehydration Responsive Element (DRE) が同定され (Yamaguchi-Shinozaki, K and Shinozaki. (1994) *Plant Cell* 6, 251-264)、シス因子 DRE に結合するタンパク質として DRE-Binding protein (DREB) が単離された (Liu et al. (1998) *Plant Cell* 10, 1391-1406)。DREB は構造的に二種類 (DREB1, DREB2) に分類された。DREB1 を植物内で過剰発現させることにより、多数のストレス耐性遺伝子の発現を誘導し、多大な環境ストレス耐性が付与されることが示されたため、現在では世界中の研究者が DREB1 の研究に取り組んでいる。

DREB1 の研究の中心はシロイヌナズナであるが、私はイネの *DREB1* の単離・同定を試みている。イネは日本の基幹作物であるだけでなく、多くの作物が属するイネ科、さらには単子葉植物のモデル植物であるので、詳細に研究する必要がある。私はこれまでにイネに存在する低温応答性の *OsDREB1A* 遺伝子が形質転換シロイヌナズナにおいて転写因子として機能すること (Dubouzet et al., 2003)、さらに各種 *DREB1* 遺伝子をイネで過剰発現することにより、下流遺伝子の転写誘導を引き起こし、それに伴いストレス耐性が向上すること (Ito et al., 2006, 右図) を明らかにした。

2. 研究の目的

近年のゲノム研究の進展により、*DREB1* 遺伝子ファミリーがシロイヌナズナで 6 個 (Sakuma et al. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 998-1009)、イネで 10 個 (Skinner et al. (2005) *Plant Mol. Biol.* 59, 533-551) の遺伝子から構成されていることが明らかになっている。シロイヌナズナでは *DREB1* 遺伝子ファミリーの総合的な解析が行われており、イネでもこれら複数の *OsDREB1* 遺伝子がお互いどのように役割分担・相互作用しているか明らかにすることは、イネにおける環境ストレス応答システムの解明に役立ち、環境ストレス耐性植物の作出に貢献する。

シロイヌナズナでは *DREB1E*, *DREB1F* は特徴的なアミノ酸配列を DNA 結合領域内に持ち、下流遺伝子がかかなり異なることがわかっている。これは結合するシス配列の違いによると予想される。一方、イネの 10 個の *OsDREB1* ファミリーでは、*OsDREB1F* が *DREB1E*, *DREB1F* と同様の特徴を持っており、イネでも *OsDREB1F* は既知の *OsDREB1A* とは異なる下流遺伝子を持つことが予想される。またこれまで解析されていた *OsDREB1* 遺伝子は低温誘導性という点

では共通しているが、その局在や標的遺伝子の違いなどで機能分担している可能性がある。本研究では上記の特徴に着目し、機能が明らかにされていない *OsDREB1* 遺伝子ファミリーの機能解析を進める。

3. 研究の方法

(1) 10 個の *OsDREB1* 遺伝子の環境ストレス応答性を調べるため、播種後 14 日目のイネに無処理、250mM NaCl、乾燥、4°C で処理し、それぞれ 0, 2, 5, 24 時間後にサンプリングし、全 RNA を抽出し、特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR により各 *OsDREB1* 遺伝子の発現レベルを調べた。

(2) 各 *OsDREB1* タンパク質の転写活性化能を調べるために、シロイヌナズナの培養細胞 (T87 cell) を用いてトランジェントアッセイを行った。レポーター遺伝子としては 3 種類のシス因子で制御した *GUS* 遺伝子を用いた。シス因子は①シロイヌナズナの *DREB1A* 下流遺伝子である *rd29A* プロモーターの DRE を含む領域、②イネの *OsDREB1A* の下流遺伝子である *lip9* の DRE を含む領域、③転写因子 GAL4 の結合配列を用いた。イフェクタープラスミドには①・②に関しては CaMV *35S* プロモーターで各 *OsDREB1* 遺伝子の ORF を制御したものを用い、③に関しては各 *OsDREB1* 遺伝子の ORF に転写因子 GAL4 の結合領域を融合したものを CaMV *35S* プロモーターで制御したものを用いた。

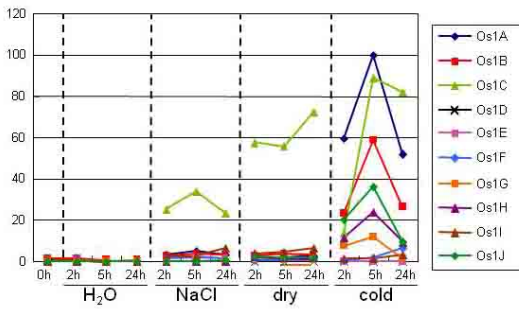
(3) DNA 結合特性を調べるため、シロイヌナズナの *DREB1A* 下流遺伝子である *rd29A* プロモーターの DRE を含む領域をプローブに用いてゲルシフトアッセイを行った。実験に用いた *OsDREB1* タンパク質は C 末端領域を削除した断片に GST タンパク質を融合させたものを用いた。

(4) 転写活性化能が特に高い *OsDREB1G* の下流遺伝子を調べるために、動物ホルモンデキサメタゾン (DEX) 誘導性プロモーターで *OsDREB1G* の発現を制御したイネを用いてアジレント社の 44k マイクロアレイを用いてマイクロアレイ解析を行った。DEX 処理は 5 μM で 24 時間処理した。

4. 研究成果

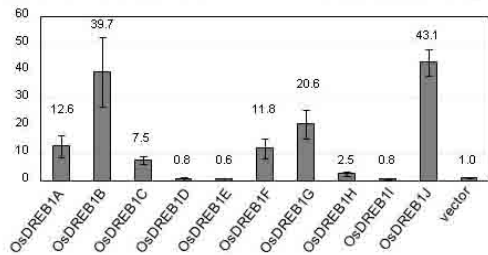
(1) 10 個の *OsDREB1* 遺伝子の環境ストレス応答性をリアルタイム PCR によって調べた結果、*OsDREB1A*, *OsDREB1B*, *OsDREB1F*, *OsDREB1G*, *OsDREB1H*, *OsDREB1J* は低温ストレス (4°C) によって特異的に発現が誘導された。一方 *OsDREB1C*, *OsDREB1I* は低温ストレスだけでなく乾燥ストレス、高塩ストレス (250mM NaCl) によっても誘導された。*OsDREB1E* は低温ストレスでは誘導されず、乾燥ストレス・高塩ストレスによって誘導された。*OsDREB1D* はストレス応答性はなかった。また発現レベルも遺

伝子間で違いがあり、*OsDREB1A*, *OsDREB1B*, *OsDREB1C*は非常に高く、*OsDREB1G*, *OsDREB1H*, *OsDREB1J*は中程度、*OsDREB1E*, *OsDREB1F*, *OsDREB1I*は弱く発現した。*OsDREB1D*はほとんど発現していなかった。

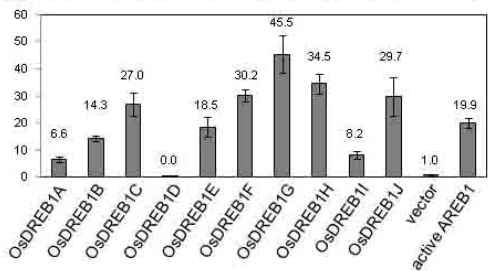


(2) 各 *OsDREB1* タンパク質の転写活性化能を調べるために、シロイヌナズナの培養細胞 (T87 cell) を用いてトランジェントアッセイを行った結果、*rd29A* プロモーター由来の DRE で制御したレポータープラスミドを用いた際には、多くの *OsDREB1* は高い転写活性化能を示したが、*OsDREB1D*, *OsDREB1E*, *OsDREB1I* は転写活性化能を示さず、*OsDREB1H* の転写活性化能は非常に低かった。一方転写因子 GAL4

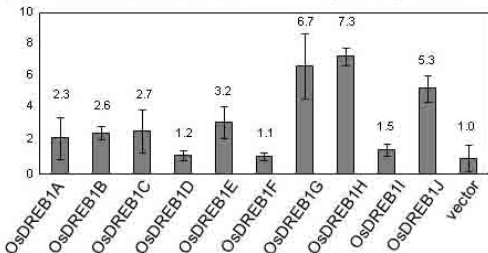
(A) effector: 35S:*OsDREB1s* reporter: 3x*DRE*:*GUS*



(B) effector: 35S:*GAL4-BD*+*OsDREB1s* reporter: 9x*GAL4*:*GUS*

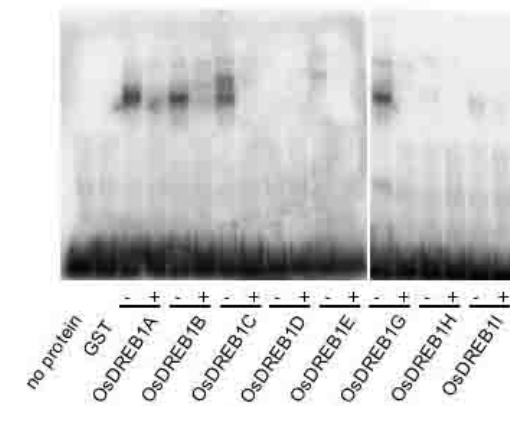


(C) effector: 35S: *OsDREB1s* reporter: *lip9*:*GUS*

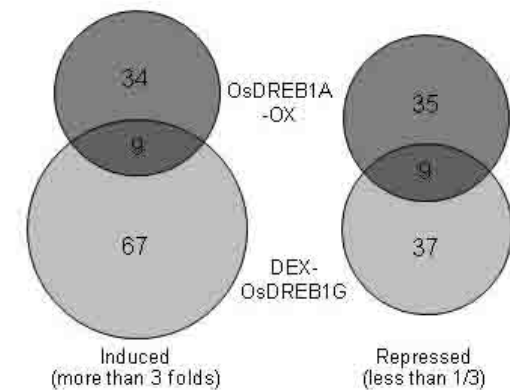


の結合配列で制御したレポータープラスミドを用いた際には、*OsDREB1D*を除く全ての

OSDREB1 は転写活性化能を示した。*OsDREB1G* は特に高い転写活性化能を示した。この原因は *OsDREB1E*, *OsDREB1H*, *OsDREB1I* は *rd29A* 遺伝子由来の DRE 配列への結合特性が低いためと予想された。一方イネの *lip9* の DRE を含む領域で制御したレポータープラスミドを用いた際には、多くの *OSDREB1* は高い転写活性化能を示したが、*OsDREB1D*, *OsDREB1F*, *OsDREB1I* は転写活性化能を示さず、特に *OsDREB1G*, *OsDREB1H*, *OsDREB1J* は高い転写活性化能を示した。この結果は *rd29A* プロモーター由来の DRE で制御したレポータープラスミドを用いた結果と異なった。このことは各 *OsDREB1* の結合特性が異なることを示唆した。(3) DNA 結合特性を調べるため、シロイヌナズナの *DREB1A* 下流遺伝子である *rd29A* プロモーターの DRE を含む領域をプローブに用いてゲルシフトアッセイを行った。*OsDREB1A*, *OsDREB1B*, *OsDREB1C*, *OsDREB1G* は強く結合を示したが、*OsDREB1E*, *OsDREB1H*, *OsDREB1I* は弱い結合を示した。



(4) 転写活性化能が特に高い *OsDREB1G* の下流遺伝子を調べるために、DEX 誘導性プロモーターで *OsDREB1G* の発現を制御したイネを用いてアジレント社の 44k マイクロアレイを用いてマイクロアレイ解析を行った結果、76 遺伝子が *OsDREB1G* の過剰発現により誘導され、46 遺伝子が *OsDREB1G* の過剰発現により



抑制された。以前行った OsDREB1A の過剰発現体を用いたマイクロアレイ解析では 43 遺伝子が OsDREB1A の過剰発現により誘導され、44 遺伝子が OsDREB1A の過剰発現により抑制されていたが、両 OsDREB1 に共通に誘導される遺伝子は 9 遺伝子、共通に抑制される遺伝子は 9 遺伝子であった。

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 3 件)

- ① Takasaki, H., Maruyama, K., Kidokoro, S., Ito, Y., Fujita, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Nakashima, K.. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol Genet Genomics*, Vol.284, 173-183 (2010) 査読有
- ② Matsukura, S., Mizoi, J., Yoshida, T., Todaka, D., Ito, Y., Maruyama, K., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Mol. Genet. Genomics*, Vol.283, 185-196 (2010) 査読有
- ③ Nakashima, K., Ito, Y. and Yamaguchi-Shinozaki, K.. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiol.*, Vol.149, 88-95 (2009) 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 伊藤裕介, 高崎寛則, 圓山恭之進, 篠崎一雄, 篠崎和子. イネの *DREB1/CBF* ファミリー遺伝子の網羅的解析. 日本植物生理学会第 51 回年会, 2010 年 3 月, 熊本大学 (熊本)
- ② Yusuke Ito, Kyonoshin Maruyama, Kazuo Shinozaki, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. Comprehensive analysis of *DREB1/CBF* family genes involved in abiotic-stress responsive gene expression in rice. 6th International Rice Genetics Symposium, 2009 年 11 月, Manila Hotel (Manila, Phillipine)
- ③ 伊藤裕介, 圓山恭之進, 篠崎一雄, 篠崎和子. イネの *DREB1/CBF* ファミリー遺伝子の網羅的解析. 日本植物生理学会第 50 回年会, 2009 年 3 月, 名古屋大学 (名古屋)
- ④ 伊藤裕介, 篠崎一雄, 篠崎和子. イネの *DREB1* ファミリー遺伝子の網羅的解析. 日本育種学会第 114 回講演会, 2008 年 10 月, 滋賀県立大学 (彦根)