

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580145

研究課題名(和文) イネのジャスモン酸情報伝達を担う鍵転写因子の機能と発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Function and transcriptional regulation of key factors in jasmonic acid signaling pathway in rice

研究代表者

岡田 憲典 (Okada, Kazunori)

東京大学・生物生産工学研究センター・准教授

研究者番号：20312241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、JAシグナル伝達経路の鍵転写因子であるRERJ1によって発現制御を受ける標的遺伝子を探索し、proteinase inhibitor (PI) 遺伝子やモノテルペン・リナロールの合成酵素遺伝子(LIS)、JAシグナル伝達においてリプレッサーとして働くJAZ遺伝子等がRERJ1の制御下にあることを示した。また、アワヨトウ食害におけるRERJ1の重要性と、活性型JA-isooleucineがRERJ1の発現誘導に必要なことを示し、RERJ1がproteinase inhibitor 遺伝子などの発現誘導を介して虫害抵抗性を発揮する際に重要な役割を果たす転写制御因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we surveyed target genes of RERJ1, a key transcription factor in the jasmonic acid (JA) signaling pathway in rice, and provided the gene list for the RERJ1-target candidates includes proteinase inhibitor gene, monoterpene linalool synthase gene, and a JAZ repressor protein gene in the JA signaling under wound stress. We also found that RERJ1 plays an important role on resistance against insect herbivory, and that inductive RERJ1 expression is highly dependent on the JA-isooleucine, an active form of JA. Based on these findings, we propose that RERJ1 is one of the key regulators involved in herbivory resistance through the positive regulation of wound-inducible genes including proteinase inhibitor gene in the JA signaling in rice.

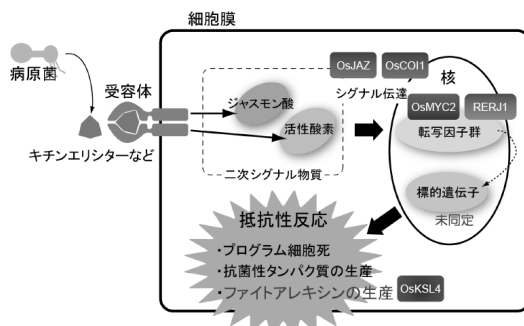
研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物有機化学

キーワード：ジャスモン酸 bHLH型転写因子 虫害抵抗性

1. 研究開始当初の背景

病原体に感染した植物は、病原体の細胞表層由来の物質などを感染シグナル物質（エリシター）として細胞膜上の受容体により認識する。その後、このエリシター受容が引き金となり、JA、活性酸素、ホスファチジン酸等の二次シグナル物質の生成、エリシター応答性の転写因子群の活性化を経て、最終的に抗菌性タンパク質生産、ファイトアレキシンと総称される抗菌性二次代謝産物の生産など様々な抵抗性反応が誘導される。これらの抵抗性発現の中でも、イネにおける病原菌感染後の迅速なファイトアレキシンの誘導的生産においては、エリシターの認識後に JA の一過的な蓄積が必須であることが明らかとなっている。これまでに、ファイトアレキシン生合成遺伝子群 (*OsKSL4* など) のエリシター応答性を含めた機能解析 (Okada *et al.*, 2007; Shimura *et al.*, 2007) やこれらの生合成遺伝子の発現制御を担う bZIP 型転写因子 *OsTGAP1* の単離にも成功しており (Okada *et al.*, 2009)、エリシター受容 ジャスモン酸生成 ファイトアレキシン生産といったシグナル伝達が示唆されていた。さらに申請者らは、イネのエリシター誘導性の JA 生合成遺伝子 *OsOPR7* (12 オキソフィトジエン酸還元酵素遺伝子) の同定 (Tani *et al.*, 2008)、JA 類がイネの鋭敏な病害抵抗性発現に必要であることの証明、また、イネの JA 早期誘導性 bHLH 転写因子 *RERJ1* の機能解析 (Kiribuchi *et al.*, 2004, 2005) 等を通して、JA シグナルとイネの病害抵抗性発現との間には密接な関係があることを示してきた (下図)。



一方、シロイヌナズナにおいては、主に海外の研究グループによって JA 応答性に变化を示す変異体の解析が進められてきた。JA に

対し顕著な非感受性を示す *coi1* 変異体の原因遺伝子は、タンパク質分解系で働く E3 ユビキチンリガーゼ複合体内の F-box タンパク質をコードし、JA-Ile 受容体であることが報告されている。また JA 受容後のシグナル伝達因子として、bHLH 型転写因子の AtMYC2 が鍵転写因子として同定されており、その欠損により、多くの JA 誘導性遺伝子の発現が起これなくなることを示されている。さらに最近、JA シグナル伝達の抑制を担う JAZ ファミリータンパク質が、抑制因子として知られる TOPLESS タンパク質および新規相互作用因子 NINJA と共に AtMYC2 へ物理的に結合し、その転写活性化能を抑制していることが示された。この複合体形成による抑制状態は、JA-Ile 依存的な COI1 による JAZ タンパク質のプロテアソーム分解により解除され、AtMYC2 が転写因子としての機能を発揮し JA 応答性遺伝子の発現が誘導されるものと理解されている。

2. 研究の目的

このようなシロイヌナズナの情報から、COI1 など JA シグナル伝達の鍵因子がイネの病害抵抗性発現においても重要な役割を果たすと推測されたため、平成 20~22 年度にかけて科研費若手 B「イネにおけるジャスモン酸情報伝達の分子機構の解明」において、イネ COI1 ホモログや MYC2 および RERJ1 転写因子等の JA シグナル伝達・病害抵抗性発現への関与について解析に着手した。これにより、*RERJ1* が一部の JAZ ファミリー遺伝子の発現誘導に影響を与えること、傷害誘導性のモノテルペン生産や虫害抵抗性に関与すること等を示した。しかしながら、植物種を問わず、MYC2 や *RERJ1* などの JA シグナル伝達の鍵転写因子により直接制御される遺伝子は明らかにされておらず、下流へのシグナル伝達部分に関しては未解明の点が多い。そこで本研究では、イネの JA シグナル伝達経路での寄与が示された *RERJ1* とイネでは機能未知である *OsMYC2* ホモログとの 2 種の鍵転写因子について、下流標的遺伝子の網羅的同定と当該転写因子自体の発現・作用機構の解明を行い、*RERJ1* と *OsMYC2* を介したイネの JA シグナル伝達機構の総合的理解を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、RERJ1、MYC2 の直接的な標的遺伝子の同定を行うため、それぞれの変異体を用いた解析を進める方針をとった。特に、すでに *Tos17* 変異体が取得されていた *RERJ1* を中心的に進めた。まず *rerj1-Tos17* 変異体を用いて、JA の生産が誘導される傷害処理時のトランスクリプトーム解析を行い、標的候補遺伝子の絞り込みを行った。得られた標的候補遺伝子の情報から、RERJ1 の果たす生理機能を追究すると同時に、変異体に対し *RERJ1* 遺伝子とその上流配列を含むゲノム領域を用いて相補株を作製し、RERJ1 を欠損した場合に見られる標的遺伝子発現の変化が回復するかどうかを検討した。RERJ1 の植物体における発現誘導様式を解析するため、RERJ1 promoter-GUS 形質転換体を用いたストレス応答時の組織化学染色解析を行った。また、RERJ1 による直接的な標的遺伝子の制御領域への結合については、クロマチン免疫沈降 (ChIP) を計画し、作製したペプチド抗体による条件検討を進めた。また、レポータージーンアッセイによる RERJ1 のトランスアクチベーション活性を指標に、標的候補遺伝子への影響を確かめた。さらに、アワヨトウを用いた食害試験を実施し、RERJ1 の虫害抵抗性への寄与を調べた。OsMYC2 については、韓国 POSTECH より T-DNA 挿入変異体の候補を取得し解析を進めた。

4. 研究成果

RERJ1 により制御を受ける遺伝子群を網羅的に同定するため、播種後 3 週間の野生型株および変異株の最大展開葉に対し剣山を用いて均一に傷害処理を与え、処理前と処理後 30 分、120 分の 3 点におけるトランスクリプトームを解析した。その結果、傷害処理後 30 分、120 分の野生型株において傷害応答性を示す遺伝子群のうち、*rerj1* 変異体においてその発現レベルが 1 / 2 以下に低下する候補を 152 遺伝子取得した。さらに、傷害処理前後での発現誘導倍率が 1 / 2 に低下する遺伝子を絞り込んだ結果、92 遺伝子が、*rerj1* 依存的に転写変動する遺伝子として同定された。この候補遺伝子の中には、傷害処理後

120 分での転写変動が顕著な proteinase inhibitor や multi antimicrobial extrusion protein 等の病虫害応答に関与する遺伝子が含まれていた。また、傷害応答性の酵素としては kinase の他、脂肪酸合成に関わる phospholipase D をコードする遺伝子などが多く見られた。特に OsPLD 4 としてすでに機能解析が行われ同族の OsPLD 5 と共に虫害ストレス時の JA 生合成を促進することが報告されている酵素の遺伝子が含まれていた。さらに、JA シグナル伝達のリプレッサーである JAZ の 1 種 *OsJAZ2* も標的候補遺伝子として選抜されたことから、RERJ1 が JA シグナル伝達のリプレッサータンパク質である JAZ の誘導を促し、負のフィードバックに関与する可能性が示された。これらの候補遺伝子の発現変動は、これまでに行ってきた JA 処理後のトランスクリプトーム結果とも照らし合わせることで、JA 応答性についても検討し、また、定量的 RT-PCR によっても発現変動が確認された。このような RERJ1 の標的遺伝子の絞り込みの過程で、bHLH 型転写因子により制御を受ける可能性の高いキチナーゼ遺伝子 *Chia4a* のプロモーター解析を進め、JA 応答性シスエレメントを同定したが、RERJ1 により制御を受けるという直接的な結果には至らなかった。このキチナーゼは JA 応答性であるので、今後さらに詳細に解析することで、RERJ1 による制御の有無が明らかになるものと思われる(業績 3, Miyamoto *et al.* 2012)。

OsJAZ2 以外の JAZ タンパク質や JA 応答性の bHLH 型転写因子 OsMYC2, OsbHLH148 においても、傷害処理後 120 分での *rerj1* 変異体での誘導性が低下する傾向が見られており、RERJ1 の発現が JA シグナル伝達に関わるこれらの遺伝子の発現量に間接的な影響を及ぼす可能性が考えられる。これらの遺伝子の発現変動についても定量的 RT-PCR による詳細な確認が必要である。また、RERJ1 promoter-GUS 形質転換体を用いた解析により、RERJ1 は傷害部位のごく近傍でのみ発現しており、その発現場所と JA の蓄積部位が良く一致することが明らかになった(業績 2, Miyamoto *et al.* 2013)。上記のトランスク

リプトーム解析から見えてきた RERJ1 依存的な発現変動を示す遺伝子は、イネ葉身を剣山により傷害処理した条件で発現に変動が見られたものである。RERJ1 の傷害誘導的な発現は、傷害を与えた限られた部位に局在することから、トランスクリプトーム解析に用いる組織を、できる限り傷害部位のみに限定することで、より RERJ1 に直接制御を受ける標的遺伝子の取得が可能となるかもしれない。

rerj1 変異体を用いたトランスクリプトーム解析において発現誘導に影響が見られた遺伝子の中には、虫害抵抗性に寄与すると考えられる proteinase inhibitor が存在した。そこで、実際にアワヨトウ幼虫による摂食試験を行った。野生型株と *rerj1* 変異体にアワヨトウ 3 齢幼虫を 1 匹与え、8 日間摂食させた後に体重増加量を測定した。季節を合わせ 2 回行った試行において、*rerj1* を摂食させた幼虫では野生型を摂食させた場合と比較して有意に体重増加が認められた (t -test ($p < 0.05$))。また、異なる試行において、同様に 2 日間摂食させた場合の試験では、イネ葉身の食害面積にも差が認められ、*rerj1* 変異体で有意に食害量の増加が認められた。

これらの結果から、RERJ1 は食葉性昆虫に対する抵抗性発現に必要であることが示され、この抵抗性には RERJ1 依存的に発現誘導する proteinase inhibitor の寄与が考えられた。昆虫の摂食に対する直接的な防御応答としては、昆虫の消化を阻害する proteinase inhibitor 以外にも、昆虫に対して毒性をもつグルコシノレート、アルカロイド、フェノール化合物や、間接的な応答として食害昆虫の天敵を誘引する揮発性テルペンの合成などが報告されている。

そこで、イネにおいて虫害により発現誘導が報告されているリナロール合成酵素遺伝子 (*OsLIS*) について、RERJ1 変異体での発現プロファイルを定量的 RT-PCR により調べた。*OsLIS* 遺伝子の傷害処理時における発現誘導は、先述のトランスクリプトーム解析においては転写変動 2 倍以上の閾値のため選抜されなかったが、再度、傷害処理後 0, 30, 60, 120, 240 分における *OsLIS* 遺伝子の

発現変動を経時的に解析したところ、野生型株で見られた傷害処理後 120 分で最大となる発現誘導が、*rerj1* 変異体では明白な抑制が認められた。今後、傷害により生産されるリナロール量が、*rerj1* 変異体において、実際にどの程度減少しているかどうかについて、GC-MS による分析を行う必要がある。

これまでに得られた *rerj1* 欠損変異株における表現型が、RERJ1 欠損によるものであることを確認するため RERJ1 相補株の作製を行い解析に用いた。相補株の作出には RERJ1 上流域約 2kb を含む遺伝子領域のゲノム配列を own promoter により発現するように設計したプラスミドを作製し用いた。*rerj1* 変異体をバックボーンとして得られた 5 系統の相補株では、傷害未処理時には RERJ1 の発現は認められず、傷害処理後 30 分における発現が野生株と同等かそれ以上となったが、ベクターコントロール株では変異体と同様に RERJ1 の誘導は認められなかった。このような野生型株と似た誘導性を示す RERJ1 相補株を用い、トランスクリプトーム解析で選抜された RERJ1 依存的な傷害応答を示す遺伝子 (proteinase inhibitor, phospholipase, OsJAZ, leucine zipper domain containing protein) について、傷害処理時の発現誘導を確かめたところ、複数のラインで発現が野生型と同等に回復することを確認した。この結果から、RERJ1 の欠損が、proteinase inhibitor をはじめとするこれら遺伝子の傷害処理時の発現誘導の欠如の原因であることが示された。今後、この相補株を用いてアワヨトウによる食害耐性の評価や揮発性成分の分析など、さらなる追究が必要であると考えられる。

次に、RERJ1 による標的候補遺伝子に対する転写制御をより明確に示すため、標的候補遺伝子のプロモーターを含むと考えられる上流域に対し、RERJ1 をエフェクターとした場合の影響をレポーター遺伝子アッセイにより解析した。プロモーターには、proteinase inhibitor と leucine zipper domain containing protein を先ず用いた。エフェクターとして RERJ1 あるいはコントロールの GUS を保持したプラスミドを用いてイ

ネ葉身にパーティクルガンにより一過的に導入し、ルシフェラーゼ活性をもとに転写活性化能を評価した。しかし、これら2つのプロモーターに対する有意な転写活性化は認められなかった。本解析では、パーティクルガンによる打ち込みそのものが、傷害ストレスとなる可能性も考慮し、RERJ1の傷害による誘導が起らない、JA-Ile(活性型JA)の生合成変異体 *osjar1* を用いた実験も行ったが同様な結果を得た。すなわち、現状ではRERJ1をエフェクターとして加えただけでは、対象とした遺伝子のプロモーターに対する転写活性化はみられていない。RERJ1がこれらの遺伝子の発現制御に間接的に影響を与えている可能性もあるが、今後、ジャスモン酸処理などの誘導条件下における試行についても検討する必要があると思われる。なお、本研究の過程で *osjar1* 変異体の解析を進め、RERJ1がJA-Ile依存的に発現誘導を受けることを明らかにし、RERJ1がJAシグナル伝達下流で働く因子であることを明確に示した(業績1, Shimizu *et al.* 2013)。

RERJ1がプロモーターに結合し直接的に転写制御を行う標的遺伝子を明らかにするために、RERJ1ペプチド抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)実験を計画し、抗体の評価を行った。大腸菌発現系において調製したMBP-RERJ1とコムギ無細胞系を用いて調製したHis-RERJ1に対し、ウエスタンブロッティングにより十分な抗体力価および特異性を保持することが確認できたため、次に、RERJ1過剰発現培養細胞におけるRERJ1タンパク質の発現を調べた。しかし、この培養細胞から調製した粗タンパク質および核タンパク質を用いて行ったウエスタンブロッティングでは、RERJ1の発現を検出することができなかった。転写レベルでのRERJ1の過剰発現は確認されていることから、翻訳後にタンパク質が速やかに分解されている可能性も考えられる。今後はエピトープタグ付加型のRERJ1を発現する形質転換体を作成し、タンパク質レベルでの発現プロファイルを確認しつつ、ChIP解析を進める必要がある。

以上のように、本研究課題ではRERJ1が直接に制御する標的遺伝子の同定には至らな

かったものの、RERJ1がイネの防御応答において特にJAシグナル伝達により制御される虫害抵抗性への寄与や、揮発性テルペン化合物の生産へのインパクトを持つことが明らかになった。JAシグナル伝達におけるリプレッサータンパク質JAZの発現誘導に対する関与の可能性も出てきたことから、当初の研究目的に沿って、OsMYC2との関係を明らかにしていくことが、RERJ1のJAシグナル伝達経路における役割を明確に示すための重要な課題であると考えられる。

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 3 件)

1) Shimizu T, Miyamoto K, Miyamoto K, Minami E, Nishizawa Y, Iino M, Nojiri N, Yamane H, Okada K. OsJAR1 mainly contributes to biosynthesis of the stress-induced jasmonoyl-isoleucine that is involved in defense responses in rice. *Biosci Biotechnol Biochem.* (2013) 77:(7), 1556-1564. 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.130272>

2) Miyamoto K, Shimizu T, Mochizuki S, Nishizawa Y, Minami E, Nojiri H, Yamane H, Okada K. Stress-induced expression of the transcription factor RERJ1 is tightly regulated in response to jasmonic acid accumulation in rice. *Protoplasma* (2013) 250(1):241-249. 査読有り
doi: 10.1007/s00709-012-0400-z

3) Miyamoto K, Shimizu T, Lin F, Sainsbury F, Thuenemann E, Lomonosoff G, Nojiri H, Yamane H, Okada K. Identification of an E-box motif responsible for the expression of jasmonic acid-induced chitinase gene *OsChia4a* in rice. *Journal of Plant Physiology*, (2012) 169 (6), 621-627. 査読有り doi: 10.1016/j.jplph.2011.12.008.

[学会発表](計 7 件)

河村 奈央子、岡田 憲典、野尻 秀昭、山根 久和「イネのジャスモン酸早期応答性bHLH型転写因子RERJ1のX線結晶構造解析に向けた精製」日本農芸化学会 2012.3.25(京都)

Ioana Valea、岡田 憲典 他6名「イネの

JA 応答性 bHLH 型転写因子 RERJ1 と相互作用する JA 情報伝達因子の探索」日本農芸化学会 2012.3.25(京都)

清水 崇史、宮本 皓司、岡田 憲典、山根 久和「イネの防御応答におけるジャスモン酸の生理機能」日本農芸化学会 2012.3.25(京都)

Naoko Kawamura, Koji Miyamoto, Rika Ozawa, Junji Takabayashi, Akio Miyao, Hirohiko Hirochika, Hideaki Nojiri, Hisakazu Yamane, Kazunori Okada「Involvement of the JA-inductive bHLH transcription factor RERJ1 in rice defense responses」XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions 2012.7.29 (京都)

河村 奈央子、宮本 皓司、小澤 理香、高林 純示、宮尾 安藝雄、廣近 洋彦、野尻 秀昭、山根 久和、岡田 憲典「イネの病虫害抵抗性発現における JA 応答性 bHLH 型転写因子 RERJ1 の役割」植物化学調節学会 第 47 回大会 2012.10.27 (鶴岡)

河村 奈央子、宮本 皓司、小澤 理香、高林 純示、宮尾 安藝雄、廣近 洋彦、野尻 秀昭、山根 久和、岡田 憲典「イネのジャスモン酸早期応答性 bHLH 型転写因子 RERJ1 の虫害抵抗性における役割」日本農芸化学会 2013.3.25(仙台)

河村 奈央子、宮本 皓司、小澤 理香、高林 純示、宮尾 安藝雄、廣近 洋彦、野尻 秀昭、山根 久和、岡田 憲典「イネの虫害抵抗性発現における JA 応答性 bHLH 型転写因子 RERJ1 の役割」日本植物生理学会 2014.3.20 (富山)

〔図書〕(計 0 件)

〔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://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biotec-re-s-ctr/kampo/index.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者

岡田 憲典 (OKADA KAZUNORI)
東京大学・生物生産工学研究センター・准教授

研究者番号：20312241