

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580026

研究課題名(和文) イネの窒素レベルに応答した転写因子DREBによる光合成の制御に関する研究

研究課題名(英文) Regulation of photosynthesis by DREB transcription factors in response to nitrogen levels in rice

研究代表者

斉藤 和幸 (Saitou, Kazuyuki)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00215534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：イネにおいて、転写因子OsDREB1EおよびOsDREB1GによりRubisco小サブユニット遺伝子OsRBCS3のプロモーターが活性化された。この活性化にはOsRBCS3プロモーターに存在する二つのDRE因子が必要であった。また、OsDREB1EおよびOsDREB1GはOsRBCS3プロモーターのDRE因子と直接相互作用した。さらに、OsDREB1EおよびOsDREB1G遺伝子は窒素レベルの上昇にともなって発現レベルが高まったことから、OsDREB1EおよびOsDREB1Gは窒素レベルに応答してOsRBCS3遺伝子の転写を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In rice, a promoter of Rubisco small subunit gene, OsRBCS3, was activated by transcription factors OsDREB1E and OsDREB1G. Two DRE factors which existed in the OsRBCS3 promoter were necessary for this activation. In addition, OsDREB1E and OsDREB1G interacted with the DRE factors in the OsRBCS3 promoter directly. Furthermore, the expression of OsDREB1E and the OsDREB1G genes was induced in response to nitrogen supply. These results suggest that OsDREB1E and OsDREB1G regulate the transcription of the OsRBCS3 gene in response to nitrogen levels.

研究分野：作物学

キーワード：転写因子 光合成 窒素 イネ

1. 研究開始当初の背景

イネは世界の主要な食料源であり、人口増大に対する食糧確保といった点においても重要な作物である。これまでは大量の窒素肥料を投入することで十分な収量を確保してきた。しかし、その一方で過剰な窒素施肥による河川の富栄養化や地下水の汚染等の環境汚染が生じており、自然環境に配慮した低投入持続型農業の実現が求められている。そのためには低窒素条件下においても十分な収量をあげることのできる新しい品種が必要である。

植物にとって窒素は必要不可欠な元素であり、光合成に関与するタンパク質を構成する。その中でもリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) は炭酸固定系の鍵酵素であり、葉の可溶性タンパク質の 30~50% を占めている。そのため低窒素条件下では Rubisco 含量が低下し、光合成速度の低下が生じると考えられてきた。そこで、Rubisco を構成する Rubisco 小サブユニット (rbcS) 遺伝子の発現を高め、Rubisco 含量を増加させることにより光合成速度を向上させることが試みられてきたが、Rubisco 含量は増加しても光合成速度は変化しない (Suzuki ら, 2007) など十分な成果は得られていない。従って、光合成速度の向上には Rubisco だけでなく複数の遺伝子を包括的に制御することが重要となる。

一般に、遺伝子発現はプロモーター領域 (遺伝子の転写開始点の上流領域) の特定配列を転写因子が認識・結合することで活性化され、同調的に発現する遺伝子群は共通した転写因子により発現が調節される。光合成に関わる多くの遺伝子は窒素により発現が誘導される。従って植物には窒素に応答して光合成に関わる遺伝子の発現を調節している転写因子が存在していると考えられ、その転写因子を制御することにより光合成速度が高まることが期待される。

光合成に関わる遺伝子についてプロモーター領域を調べてみると、いくつかの遺伝子のプロモーターに CCGAC (DRE 因子) が存在していた。DRE 因子には DREB 転写因子が結合することが知られている (Yamaguchi-Shinozaki と Shinozaki, 1994)。そこで、イネに存在する OsDREB 遺伝子について発現に及ぼす窒素の影響を DNA マイクロアレイにより検討したところ、OsDREB1E、OsDREB1D、OsDREB1G 遺伝子の発現が窒素により大きく高まることが分かった。したがって、これらの転写因子が窒素レベルに応答して光合成関連酵素遺伝子の発現を制御していることが期待された。

2. 研究の目的

本研究では、転写因子 OsDREB1E と OsDREB1G が窒素レベルに応答して Rubisco 小サブユニット遺伝子 OsRBCS3 の転写を制御していること、および、

OsDREB1E と OsDREB1G の OsRBCS3 遺伝子に対する転写活性化様式の違いを明らかにすることを目的とした。さらに、OsRBCS3 以外の炭酸固定系および光化学系に関わる酵素およびタンパク質の遺伝子についても、OsDREB1E が転写を包括的に制御しているのかを明らかにする目的で行った。

3. 研究の方法

(1) 供試材料

植物材料として、イネ (*Oryza Sativa* L.) 品種日本晴を用いた。滅菌水中で 1 時間脱気した種子を 0.1% [v/v] ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートを含む 1% [v/v] 次亜塩素酸ナトリウムで 1 時間殺菌した後、12 時間日長、室温 25℃、明期の光強度 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、相対湿度 70% に設定したグロースキャビネット内で水耕栽培をした。

(2) 遺伝子導入

目的遺伝子を 1.0 μg の金粒子 (1.0 Micron Gold BIO-RAD 製) に附着させ、650psi、25inch Hg の条件で Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (BIO-RAD 製) によりイネ葉身細胞に導入した。

マイクロキャリアは 70% エタノール及び滅菌水で洗浄した後、50% グリセロールを加え 60 mg/ml とした。1 M CaCl_2 と 16 mM スペルミジンを含む溶液中でマイクロキャリア 0.6 mg に DNA をコーティングさせた。エフェクター遺伝子とレポーター遺伝子をモル比 1:0.05 の割合で導入した (参考表 3)。金粒子が導入された細胞数や遺伝子導入効率が撃ち込みごとに異なるため、内部標準化のコントロールとして *-90CaMV35S Ω ::Luc* を用いた。

発芽処理後 7 日間蒸留水で栽培し、7 日目に 1/4 濃度の水耕液に交換し、1 週間栽培後、15 日目に 1/4 濃度の水耕液、あるいは 0.5mM NH_4NO_3 を加えた 1/4 濃度の水耕液に交換し、2 日間栽培したイネの第三葉葉身を撃ち込みに用いた。ターゲット台上に、中央に半径 1 cm の円を描いたシャーレを置き、イネ葉身を半径 1 cm の円内にセロハンテープで固定した。ストップングスクリーンはラブチャーディスクの 3 cm 下に、ターゲット台はストップングスクリーンの 5 cm 下に設置した。撃ち込み後は 12 時間日長、室温 25℃、明期の光強度 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、相対湿度 70% に設定したグロースキャビネット内で 18 時間生育させた。

(3) ルシフェラーゼ活性の測定

暗黒条件下で GloMax™ 20/20n Luminometer (Promega 製) を用いて Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega 製) によりルシフェラーゼ活性を測定した。

第三葉葉身を採取し、蒸留水で洗浄後、12

倍量の 1×Passive Lysis Buffer を加え、乳鉢と乳棒を用いて素早く磨砕した。これを 1.5 ml マイクロチューブに移し、4℃、15,000rpm、5 分間遠心分離し、上清を採取した。上清 10 µl に Luciferase Assay Reagent (Luciferase Assay Substrate を含む Luciferase Assay Buffer) を 50 µl 加え、ピペティングにより混和した。マイクロチューブをルミノメーターに設置し、10 秒間あたりのホタルルシフェラーゼの発光量を測定 (Luciferase Assay Reagent を混和して 15 秒後) した。その後、Stop&Glo[®] Reagent (Stop&Glo[®] Substrate を含む Stop&Glo[®] Buffer) を 50 µl 加え、ボルテックスにより混和した。マイクロチューブをルミノメーターに設置し、Stop&Glo[®] Reagent を混和して 20 秒後、10 秒間あたりのウミシイタケルシフェラーゼの発光量を測定した。

(4) リアルタイム PCR 法

OsDREB1E, *OsDREB1G*, *OsDREB1D* および *OsRBCS3* 遺伝子の塩基配列をもとに、プライマーを作成した。また、内部標準として *OsActin1* を使用した (McElroy ら, 1990)。1 mg の全 RNA を ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (東洋紡製) を用いて逆転写し、得られた cDNA を 5 倍, 25 倍, 125 倍, 625 倍, 3125 倍に希釈して、PCR 反応に用いた。

リアルタイム PCR は、THUNDER Bird qPCR Mix (東洋紡製) を用いて、MyiQ Single-Color リアルタイム PCR 解析システム (Bio-Rad 製) により行った。PCR は *OsDREB1E*, *OsDREB1D* および *OsRbcS6* 遺伝子では 95℃、30 秒間の熱処理後、95℃、5 秒間、60 度、10 秒間、72℃、10 秒間のサイクルを 40 サイクル行い、*OsDREB1G* 遺伝子では 95℃、30 秒間の熱処理後、95℃、5 秒間、55 度、10 秒間、72℃、10 秒間のサイクルを 40 サイクル行った。また反応終了後、融解曲線を求めた。各遺伝子の検量線を求め、発現量を算出した。

(5) GFP 融合タンパク質の細胞内局在

GFP の cDNA と *OsDREB1E* の cDNA を連結したプラスミドを 2.0 µg の金粒子 (1.0 Micron Gold Bio-Rad Laboratories 製) に附着させ、1100 psi、25 inch Hg の条件で Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad Laboratories 製) によりタマネギの鱗葉の表皮細胞に導入した。

マイクロキャリアは 70% エタノールおよび滅菌水で洗浄した後、50% グリセロールを加え 60 mg/ml とした。1M CaCl₂ と 16 mM スペルミジンを含む溶液中でマイクロキャリア 0.6 mg に DNA 2 µg をコーティングさせた。これを 1 つの表皮細胞あたり 2 回ずつ撃ち込んだ。

撃ち込みに用いたタマネギは、20℃ の暗黒条件下で 2 日間吸水させたものを、外側から 2, 3 枚目の鱗葉を取り出し 1.2 cm × 1.2 cm の穴をあけたシャーレに表皮細胞の表面を上

に配置した。ストップングスクリーンはラプチャーディスクの 3 cm 下に、タマネギの切片を入れたシャーレがストップングスクリーンの 1 cm 下になるように配置した。撃ち込み後、3% スクロースを含む 0.22% ムラシゲ & スクーグ・ガンボーク B5 培地 (Duchefa 製)、pH 5.7 を満たしたシャーレに移し、室温 25℃ の暗黒下で 20 時間静置した。GFP の蛍光は、DIGITAL ECLIPSE C1si-Ready (Nikon 製) で検出し、画像化した。

(5) ゲルシフトアッセイ

OsDREB1E の cDNA を LigaFast[™] Rapid DNA Ligation System (Promega 製) により pGEX KG ori-Hisx6 に連結し、大腸菌 BL21 に形質転換した大腸菌をアンピシリンを含む L-broth 9 ml に 37℃、16 時間で培養した。培養後、アンピシリンを含む L-broth 90 ml に植え継ぎ、37℃ で 45 分間培養した後 0.1 mM になるよう IPTG を加えた。これを 37℃ で 2 時間培養し、遠心用チューブに移して 4℃ 条件下に 5 分置いた。その後 4℃、5000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清液を除去後 Lysis Buffer (1× PBS, 10% グリセロール, 0.5% TritonX-100, 0.05% β-メルカプトエタノール) を加えソニケーションを行った。4℃、5000rpm で 5 分間遠心分離し、上清液を回収した。

上清液 1 ml に 50% GS4B (75% GS4B 1 ml, Washing Buffer 750 µl) 30 µl を加え 4℃ で 1 時間ローテイトした後、4℃、3000 rpm で 3 分間遠心分離して上清を除去した。その後 Washing Buffer (1× PBS, 0.5M NaCl, 0.1% TritonX-100, 0.05% β-メルカプトエタノール) を 400 µl 加え、再び 4℃、5 分間 rotate し、4℃、3000rpm で 3 分間遠心分離を行い、上清を除去するサイクルを 3 回繰り返した。

Elution Buffer for GS4B (0.5M NaCl, 0.1% TritonX-100, 0.1%, 20% グリセロール, 50mM Tris-HCl, pH8, 0.05% β-メルカプトエタノール) 20 µl を加え室温で 10 分間静置後、4℃、3000 rpm で 3 分間遠心分離して上清液を回収するサイクルを 3 回繰り返し、*OsDREB1E* 融合タンパク質を精製した。

DIG-Gel shift kit 2nd Generation (Roche 製) を用いてゲルシフトアッセイを行った。1 レーンあたり *OsDREB1E* タンパク質 0.6 pmol とプローブ 15.5 fmol、場合によってはさらにプローブの 10 倍および 100 倍の競合 DNA を反応させた後、電気泳動した。泳動後、ゲルをメンブレンに転写した。メンブレンの転写した面を UV で 5 分間照射し、化学発光の検出を行った。

4. 研究成果

(1) 光合成関連遺伝子のプロモーター活性に及ぼす *OsDREB1E* の影響

OsRBCS3, *OsRBCS5*, *SBPase*, *Lhcb1-2*, *Lhcb1-3* および *OsG1k2P* 遺伝子のプロモーターに *hRluc* 遺伝子を結合させた DNA をレポー

ター遺伝子，ユビキチンプロモーターに *OsDREB1E* 遺伝子を結合させた DNA をエフェクター遺伝子とし，レポーター遺伝子とエフェクター遺伝子を 1:0.05 のモル比で第三葉葉身に導入した．ウミシイタケホタルルシフェラーゼ活性はホタルルシフェラーゼ活性に対して標準化した．*OsRBCS3* 遺伝子のプロモーターは *OsDREB1E* によって転写活性が約 10 倍高まったが，そのほかの遺伝子のプロモーターでは *OsDREB1E* による影響はほとんど認められなかった．

(2) 光合成関連遺伝子のプロモーター領域に存在する DRE 因子

OsDREB1E により転写が調節される光合成関連遺伝子のプロモーター領域を検討するため，*OsRBCS3*，*OsRBCS5*，*SBPase*，*Lhcb1-2*，*Lhcb1-3* および *OsGlk2* 遺伝子のプロモーター領域を PLACE (Higo ら，1999) を用いて解析を行った．*OsDREB1E* によりプロモーター活性が高まった *OsRBCS3* 遺伝子のプロモーター領域には，DRE 配列が 2 つ存在した．一方 *OsDREB1E* による影響が見られなかったその他の遺伝子では，DRE 配列が 1 つ，もしくは存在していなかった．このことから *OsDREB1E* 転写因子によりプロモーター活性が高まる，即ち，*OsDREB1E* による転写調節を受けるためには，光合成関連遺伝子のプロモーターに DRE 配列が 2 つ必要である可能性が考えられた．

(3) DRE 因子の変異が *OsDREB1E* の転写活性化に及ぼす影響

プロモーター領域に存在する DRE 因子の変異が *OsDREB1E* の転写活性化能力に及ぼす影響を調べるため，プロモーター領域に 2 つ存在する DRE 因子のいずれにも変異を加えていない *OsRBCS3* プロモーター（以下 *2DRE*）および変異を加えた *OsRBCS3* 遺伝子のプロモーター（以下 *DRE/dre*，*dre/DRE* および *2dre*）に *hRluc* 遺伝子を結合させた DNA を第三葉葉身へ導入した．2 つの DRE 因子を持つプロモーターでは *OsDREB1E* により約 4 倍にルシフェラーゼ活性が増加した．片側あるいは両側の DRE 因子に変異を加えたプロモーターではルシフェラーゼ活性の増加が認められなかった．これらのことから *OsDREB1E* による転写活性化には DRE 因子が 2 つ必要であることが明らかとなった．

(4) *OsDREB1E* タンパク質の細胞内局在

OsDREB1E タンパク質の植物細胞内での局在を検討するため，*GFP* 遺伝子に *OsDREB1E* 遺伝子を結合させた DNA を作成し，タマネギの鱗葉表皮細胞にパーティクルガンで導入した．*GFP* は細胞全体に存在したが，*GFP* に *OsDREB1E* を融合させたタンパク質は核に局在した．このことから，*OsDREB1E* は核

局在タンパク質であることが示された．

(5) *OsDREB1E* と相互作用するシス因子

OsRBCS3 遺伝子プロモーター領域内の DRE 因子と *OsDREB1E* 転写因子との直接的な相互作用を検討するためゲルシフト法を行った．*OsDRE1E* 転写因子は 5' 側および 3' 側のいずれの DRE 配列とも結合した．

(6) イネにおける *OsDREB1E*，*OsDREB1G*，*OsDREB1D* および *OsRBCS3* 遺伝子の器官別発現に及ぼす NH_4NO_3 の影響

OsDREB1E，*OsDREB1G*，*OsDREB1D* および *OsRBCS3* 遺伝子の発現に及ぼす NH_4NO_3 の影響を検討した．発芽処理後無窒素条件下で栽培したイネについて，さらに 4 日間無窒素水耕液および 0.5 mM NH_4NO_3 を含む水耕液で栽培したイネの第三葉葉身，葉鞘および根から全 RNA を抽出し，リアルタイム PCR により発現レベルを比較した．

OsDREB1E 遺伝子は NH_4NO_3 により葉身での発現レベルが約 2.5 倍高まり，その他の器官では NH_4NO_3 により発現レベルが低下した．*OsDREB1G* 遺伝子は NH_4NO_3 により葉身での発現レベルが約 4 倍高まり，その他の器官では NH_4NO_3 により発現レベルが低下した．*OsDREB1D* 遺伝子は発現が確認できなかった．*OsRBCS3* 遺伝子は NH_4NO_3 により葉身での発現レベルが約 12 倍高まり，葉鞘では発現レベルが低下した．地上部の器官における *OsRBCS3* 遺伝子の NH_4NO_3 によるこの発現様式は *OsDREB1E* 遺伝子および *OsDREB1G* 遺伝子のものとよく一致した．

(7) *OsDREB1E* 及び *OsDREB1G* による *OsRBCS3* プロモーターの転写活性化に及ぼす NH_4NO_3 の影響

発芽処理後 16 日間無窒素条件下で栽培した後，無窒素水耕液あるいは 0.5 mM NH_4NO_3 を含む水耕液で 2 日間栽培したイネの第三葉葉身に，*OsRBCS3* 遺伝子のプロモーターに *hRluc* 遺伝子を結合させた DNA と同時にユビキチンプロモーターに *OsDREB1E* および *OsDREB1G* 遺伝子を結合させた DNA をエフェクター遺伝子とし，1:0.05 のモル比で第三葉葉身に導入した．*OsDREB1E* では， NH_4NO_3 処理に関わらず *OsDREB1E* によりプロモーター活性が約 14 倍に高まった．一方，*OsDREB1G* では，窒素源を含まない水耕液で栽培した植物体においてはルシフェラーゼ活性に及ぼす *OsDREB1G* の影響が認められなかったが，0.5 mM NH_4NO_3 を含む水耕液で栽培した植物体では *OsDREB1G* により *OsRBCS3* プロモーターの転写活性が約 3 倍に上昇した．

(8) まとめ

OsDREB1E および *OsDREB1G* は窒素レベルに応答して遺伝子の発現レベルが高まり，*OsRBCS3* 遺伝子のプロモーター中に存在する二つの DRE 因子に直接結合することにより

OsRBCS3 遺伝子のプロモーターの転写を活性化することが明らかとなった。また、*OsDREB1E* と *OsDREB1G* による *OsRBCS3* プロモーターの転写活性化様式は窒素レベルによって異なること、さらに、*OsDREB1E* と *OsDREB1G* は *OsRBCS3* 以外の炭酸固定系および光化学系に関わる酵素およびタンパク質の遺伝子の転写には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

<引用文献>

- Higo, K. et al. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research*, 27: 297-300.
- Suzuki, Y. et al. (2007) Increased Rubisco content in transgenic rice transformed with the 'sense' *rbcS* gene. *Plant and Cell Physiology*, 48: 626-637.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsive to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*. 6: 251-264.

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 5件)

Nobuo Miyazaki, Osamu Ueno and Kazuyuki Saitou, Effect of nitrogen on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit multigene family members in rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Production Science*, 査読有, 2013, 16: 37-40, <http://dx.doi.org/10.1626/pp.16.37>

齋藤和幸、八尋衣里奈、古野晶子、大和亜矢子、上野修、*OsZIP62* 転写因子による窒素に応答したイネ Rubisco スモールサブユニット遺伝子、*OsRBCS3* の転写制御機構、日本作物学会紀事、査読無、第 82 巻別号 1、2013、pp.376-377、https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jcsproc/235/0/_contents/-char/ja/?from=3

齋藤和幸、原田和佳、上野修、シロイヌナズナの窒素応答反応における MYB 様転写因子、*AtMYBN1* の役割、日本作物学会紀事、査読無、第 83 巻別号 1、2014、pp.400-401、https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jcsproc/237/0/_contents/-char/ja/?from=3

Natsuhi Kita, Tomomi Kuroishi, Yuki

Nakashima, Osamu Ueno and Kazuyuki Saitou, Alterations of histone H3 modifications and expression of Rubisco small subunit genes in response to nitrogen supply in *Oryza sativa* L., *AFFLSA*, 査読無, 2014, p. 144

Miki Nakao, Tomokazu Hamagami, Waka Harada, Daiki Nagakura, Osamu Ueno and Kazuyuki Saitou, Role of a single-repeat MYB transcription factor, *AtMYBN1*, in response to nitrogen supply in Arabidopsis, *AFFLSA*, 査読無, 2014, p.145

[学会発表](計 5件)

齋藤和幸ら、*OsZIP62* 転写因子による窒素に応答したイネ Rubisco スモールサブユニット遺伝子、*OsRBCS3* の転写制御機構、日本作物学会、2013年3月28日、明治大学農学部(神奈川県川崎市)

齋藤和幸ら、シロイヌナズナの窒素応答反応における MYB 様転写因子、*AtMYBN1* の役割、日本作物学会、2014年3月29日、千葉大学(西千葉キャンパス)総合校舎(千葉県千葉市)

Natsuhi Kita ら、Alterations of histone H3 modifications and expression of Rubisco small subunit genes in response to nitrogen supply in *Oryza sativa* L., International symposium on agricultural, food, environmental and life sciences in Asia, 2014年10月29日、Chuncheon-si (Korea)

Miki Nakao ら、Role of a single-repeat MYB transcription factor, *AtMYBN1*, in response to nitrogen supply in Arabidopsis, International symposium on agricultural, food, environmental and life sciences in Asia, 2014年10月29日、Chuncheon-si (Korea)

喜多夏日ら、イネ Rubisco 小サブユニット遺伝子、*OsRBCS3* におけるヒストン H3 の窒素供給に応答したリジン修飾の変化、日本作物学会、2015年3月27日、日本大学生物資源科学部湘南キャンパス(神奈川県藤沢市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyushu-u.ac.jp/lab/shokusei/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 和幸 (SAITOU, Kazuyuki)

九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：00215534