

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：23303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780005

研究課題名(和文) ブラシノステロイドによるイネのストレス耐性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Functions of brassinosteroid in stress tolerance of rice

研究代表者

坂本 知昭 (Sakamoto, Tomoaki)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：00345183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：オーキシンとブラシノステロイドは共力的に機能することが知られているが、この現象はブラシノステロイドの機能を利用したストレス耐性の付与に活用できる。オーキシンはオーキシン情報伝達因子ARFを介したブラシノステロイド受容体遺伝子の発現制御によりブラシノステロイド感受性を調節していることを明らかにした。また遺伝的背景がイネのブラシノステロイド関連突然変異体の表現型に影響していることを見出し、その原因を特定した。さらにブラシノステロイド情報伝達に関わると考えられる新規遺伝子ELF1を同定し、同遺伝子産物がブラシノステロイドと他の植物ホルモンの交互作用に関わっている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The phytohormones auxin and brassinosteroid are both essential regulators of physiological and developmental processes, and it has been suggested that they act interdependently and synergistically. I showed that auxin stimulates brassinosteroid perception by regulating the amount of brassinosteroid receptors. Next, I found that genetic background influences brassinosteroid-related mutant phenotypes in rice and these phenomena are caused by a transposon insertion into the promoter of brassinosteroid receptor gene. Finally, I isolated a novel positive regulator of brassinosteroid signaling in rice. This protein encodes an U-box E3 ubiquitin ligase, and probably functions in interaction between brassinosteroid and another phytohormone.

研究分野：作物生理学

キーワード：イネ オーキシン 突然変異体 発現制御 ブラシノステロイド ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

ブラシノステロイドが発見された 1980 年代から、ブラシノステロイド処理がイネにストレス耐性を付与することが示されていたが、構造が複雑で合成が難しいため植物生長調節剤としての実用化には到っていなかった。研究代表者は作物収量性を向上させる理想的な草型の 1 つである直立葉化がイネの場合ブラシノステロイドによって制御されていることを示していた。

2. 研究の目的

ブラシノステロイドによるイネのストレス耐性獲得機構を明らかにするため、本研究ではイネ植物体におけるブラシノステロイドの機能について解析を進める。研究代表者はこれまでブラシノステロイドを利用したイネの多収性研究で一定の成果を収めており、将来的にはブラシノステロイドの機能を多面的に応用し、ストレス耐性も付与した安定多収品種の育成に結びつける。

3. 研究の方法

ブラシノステロイド関連突然変異体を利用して新規の関連遺伝子の単離を目指すほか、それら突然変異体を用いた生理・生化学的解析を進めることにより、ブラシノステロイドの代謝に関わる酵素や情報伝達に関わる因子の機能を明らかにする。またオーキシンとブラシノステロイドは共力的に機能することが知られているが、この現象はブラシノステロイドの機能を利用したストレス耐性の付与に活用できる。そこでこの共力作用のメカニズムを、オーキシン情報伝達因子およびその当然変異体を利用することで明らかにする。

4. 研究成果

(1) ブラシノステロイド生合成酵素 CYP90D2 の機能解析

ブラシノステロイド生合成酵素 CYP90D2 は、突然変異体イネを用いたフィーディング実験により、C-3 脱水素酵素として機能していると考えられていた。本研究では、CYP90D2 とその同祖遺伝子由来の CYP90D3 について、昆虫培養細胞系を用いて組換えタンパク質を発現・精製し、同タンパク質を用いてブラシノステロイド代謝活性を生化学的に解析した。その結果、CYP90D2 と CYP90D3 はともに C-3 脱水素酵素としてではなく、C-23 水酸化酵素として機能していることを明らかにした。さらに CYP90D2 の機能欠失突然変異体イネにおいて C-23 水酸化中間代謝物が減少していることも示した。これらの結果から、CYP90D2 と CYP90D3 はイネにおいてブラシノステロイドの C-23 水酸化に冗長的に機能していると考えられた。

(2) イネ *d2* 突然変異体の解析

イネのブラシノステロイド欠損突然変異体 *d2-1* の新規アリルとして *d2-3*、*d2-4*、*d2-6* を単離した。*d2-1* はブラシノステロイド生合成酵素 CYP90D2 の機能欠失突然変異体で、活性型ブラシノステロイド含量の低下など、典型的なブラシノステロイド欠損表現型を示すことが報告されているが、3 つの新規アリルは活性型ブラシノステロイド含量が増加するなど、ブラシノステロイド欠損とともに非感受性の表現型も同時に示すことを明らかにした。これらの結果から、これら 3 アリルが由来する日本晴の遺伝的背景には、ブラシノステロイドの感受性に関わる何らかの因子に障害が起きていると考えられた。

(3) イネ *d61* 突然変異体の解析

イネのブラシノステロイド関連突然変異体では、非感受性突然変異体 *d61* と欠損突然変異体 *d2* のどちらも野生品種“台中 65 号”を遺伝的背景とした突然変異体より“日本晴”を遺伝的背景とした突然変異体の方がより強い表現型を示すことを見出した。関連遺伝子の網羅的な解析の結果、“日本晴”のブラシノステロイド受容体遺伝子 *OsBR11* のプロモーター領域に MITE 型トランスポゾン *mPing* の挿入が見つかり、その結果として *OsBR11* の転写調節が“日本晴”で正常に働いていないことを明らかにした。

(4) イネオーキシン非感受性突然変異体の解析

OsARF24 はオーキシン情報伝達における抑制因子として機能していると考えられている。*OsARF24* 遺伝子にレトロトランスポゾン *Tos17* が挿入した突然変異体 *osarf24-1* を単離し詳細に解析したところ、*osarf24-1* はオーキシンの感受性が低下していることを明らかにした。*osarf24-1* において *OsARF24* タンパク質は C 末端ドメインが一部欠損している。転写抑制因子型 ARF タンパク質の C 末端ドメインの機能はこれまで明らかにされていなかったが、本研究の結果から、転写抑制因子型 ARF タンパク質の C 末端ドメインは転写抑制機能の安定化に寄与していることが明らかとなった。

(5) ブラシノステロイドとオーキシンのクロストークに関する研究

オーキシンとブラシノステロイドは共

力的に機能することが知られている。本研究はオーキシンがイネのブラシノステロイド受容体遺伝子 *OsBRI1* の発現を誘導し、受容体タンパク質 *OsBRI1* を増加させることにより、ブラシノステロイド応答を高めていることを明らかにした。さらにこの発現誘導にはオーキシン情報伝達因子 Auxin Response Factor (ARF) が関与し、*OsBRI1* のプロモーター領域に存在するオーキシン応答配列依存的に起こっていることを明らかにした。これらの結果からオーキシンは ARF を介した *OsBRI1* の発現制御によりブラシノステロイド感受性を調節していると考えられた。同様にオーキシン処理がシロイヌナズナのブラシノステロイド受容体遺伝子 *BRI1* の発現を誘導し、ブラシノステロイド応答を高めていることを明らかにした。さらにこの発現誘導が、シロイヌナズナにおけるオーキシンとブラシノステロイドの共力的な作用に関与することを明らかにした。これらの結果からオーキシンによる ARF を介したブラシノステロイド受容体遺伝子発現およびブラシノステロイド感受性の調節は単子葉植物と双子葉植物で共通していることが明らかとなった。

(6) イネ *elf1-1* 突然変異体の解析

新規のイネ突然変異体 *elf1-1* は暗形態形成が起こらない、ブラシノステロイド投与で鞘葉が伸長しない、カステステロンが蓄積するなどの典型的なブラシノステロイド非感受の表現型を示したことから、ELF1 タンパク質はブラシノステロイド情報伝達の正の制御因子であると推測した。*elf1-1* の原因遺伝子は第3染色体に座乗し、U-box 型の E3 リガーゼをコードしていたことから、ELF1 タンパク質は未知の標的タンパク質をユビキチン化することによりその機能に何らかの影響を与え、ブラシノステロイド情報伝達を調節していると考えた。ELF1 の機能を明らかにすることを目的として、その機能が欠失した突然変異体イネ *elf1-1* とブラシノステロイド受容体 *OsBRI1* の機能抑制突然変異体イネ *d61-12* の幼苗における網羅的遺伝子発現比較解析をマイクロアレイ法により行った。常法に従い両突然変異体の親品種である日本晴を対照として相対発現量が倍以上あるいは半減以下となっていた遺伝子をリスト化したのち、プロファイル解析を行った。さらに *elf1-1* と *d61-12* の双方で増加、*elf1-1* のみで増加、*elf1-1* では増加したものの *d61-12* では減少、など 8 カテゴリに分類し、該当するプローブ数と遺伝子数を求めた。また *elf1-1* と *d61-1* (*d61-12* とは別の

OsBRI1 機能抑制突然変異体イネ)の二重突然変異体を作成し、遺伝学的、形態学的解析を行った。これらマイクロアレイ解析と二重突然変異体の解析結果から、ブラシノステロイド受容体 *OsBRI1* を中心としたブラシノステロイド情報伝達系における ELF1 の位置づけと関わり方について考察した。

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 8 件)

Asahina M, Tamaki Y, Sakamoto T, Shibata K, Nomura T, and Yokota T. (2014). Blue light-promoted rice leaf bending and unrolling are due to up-regulated brassinosteroid biosynthesis genes accompanied by accumulation of castasterone. *Phytochemistry* 104, 21-29. (査読有)

Sakamoto T (責任著者), Kitano H, and Fujioka S. (2013). An E3 ubiquitin ligase, ERECT LEAF1, functions in brassinosteroid signaling of rice. *Plant Signaling & Behavior* 8, e27117. (査読有)

Sakamoto T (責任著者), and Fujioka S. (2013). Auxins increase expression of the brassinosteroid receptor and brassinosteroid-responsive genes in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* 8, e23509. (査読有)

Sakamoto T (責任著者), Morinaka Y, Inukai Y, Kitano H, and Fujioka S. (2013). Auxin signal transcription factor regulates expression of brassinosteroid receptor gene in rice. *Plant Journal* 73, 676-688. (査読有)

Sakamoto T (責任著者), Kitano H, and Fujioka S. (2013). Genetic background influences brassinosteroid-related mutant phenotypes in rice. *American Journal of Plant Sciences* 4, 212-221. (査読有)

Sakamoto T (責任著者), and Inukai Y. (2013). Characterization of a *Tos17* insertion mutant of rice auxin signal transcription factor gene, *OsARF24*. *American Journal of Plant Sciences* 4, 84-91. (査読有)

Sakamoto T (責任著者), Morinaka Y, Kitano H, and Fujioka S. (2012). New alleles of rice *ebisu dwarf* (*d2*) mutant show both brassinosteroid-deficient and -insensitive phenotypes. *American Journal of Plant Sciences* 3, 1699-1707. (査読有)

Sakamoto T (責任著者), Ohnishi T, Fujioka S, Watanabe B, and Mizutani M. (2012). Rice CYP90D2 and CYP90D3 catalyze C-23 hydroxylation of brassinosteroids *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry* 58, 220-226. (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 知昭 (Sakamoto Tomoaki)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：00345183

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし