

原著論文

低酸素ストレスに対するイネの初期応答遺伝子群の解析

守谷智恵¹⁾, 小田賢司²⁾, 坪井誠二¹⁾ *

¹⁾ 就実大学薬学部生化学研究室, ²⁾ 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

Analysis of putative transcription factors genes response against low oxygen stress at early stage in rice

Chie Moritani¹⁾, Kenji Oda²⁾, Seiji Tsuboi¹⁾ *

¹⁾ *Laboratory of Biochemistry, Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Shujitsu University,*

²⁾ *Research Institute for Biological Sciences, Okayama Prefectural Technology Center for Agriculture*

(Received 13 December 2013; accepted 7 January 2014)

Abstract

The metabolic and morphological adaptations against low-oxygen stress in plant cells have been investigated extensively. However, the molecular mechanisms of the hypoxic response, especially at early stage, are poorly understood. We have previously identified about 800 genes as hypoxia inducible in rice root. To characterize the molecular components that mediate the hypoxia response in rice, we analyzed expression profiles of ten genes for putative transcription factors (*OsHRTF1* to *OsHRTF10*), which showed high responsiveness in the microarray experiment. *OsHRTF3* was induced the most among these genes, at 30 min after submerged in N₂ gas-bubbled solution. The expression levels of most genes increased within 20 min, reached maximum level at 30-40 min, and decreased thereafter. The responses of these genes were earlier than that of *ADH1* or *PDC1* that have been known as hypoxia-inducible gene. *OsHRTF3*, *OsHRTF8*, *OsHRTF9* and *OHRsTF10* genes were unaffected by salinity, drought, or cold stresses. The expression profile of *OsHRTF3* and *OsHRTF7* showed oxygen concentration dependency. *OsHRTF* may be candidates for transcription factor mediating the hypoxia response at early stage.

Key words : 低酸素ストレス, イネ, 転写因子, 遺伝子発現

緒言

移動することのできない植物にとって環境条件は生育を左右する主要な因子であり, 作物種

によっては最高収量の約三分の一が環境ストレスによって失われていると言われる. 冠水や土壌の過湿は植物にとって深刻な環境ストレスの一

つであり、例えば東南アジアから南アジア地域では、雨季における冠水が農業産生にしばしば大きな打撃を与えている¹⁾。わが国でも水はけの悪い旧水田地を畑地として利用した場合、ダイズ、トウモロコシ、コムギ、オオムギなどに湿害がしばしば見受けられる。

冠水や土壌の過湿により引き起こされる最大の問題は、酸素不足である。植物の低酸素ストレス耐性機構としては、エネルギー産生系の調節が知られている。すなわち、酸素不足に陥ると、電子伝達系による ATP の産生から酸素を必要としない解糖やアルコール発酵による ATP 産生へと代謝機構が変化する。また、イネやトウモロコシにおいては、根の通気組織の形成、節間部や葉柄の伸長、不定根の発達などにより酸素の吸収や分散の効率を上げるなど酸素不足に適応するための形態的变化も知られている^{1,2,3,4)}。低酸素ストレスの情報伝達については、植物ホルモンのエチレンや、細胞内の ATP 量の低下、pH の低下、Ca²⁺濃度の上昇、活性酸素の発生、RHO-like GTPase などが関わることを見出されている^{3,5)}。関与する転写因子としては、シロイヌナズナの MYB2⁶⁾や冠水ストレス耐性のイネで特異的に発現する Sub1A⁷⁾などが同定されている。これまでに、代謝系の調節や形態の変化といった植物の最終的な順応については詳細な研究がなされているが、その上流であるシグナルの感受から転写調節に至るまでの初期の植物の応答に関する報告は少ない。

イネは多くの作物と異なり湛水条件で生育できるため、低酸素ストレスに対する耐性機構が発達していると考えられる。これまでにイネを材料としマイクロアレイ解析を用いて、低酸素ストレスの初期に根において約 800 の遺伝子が誘導されることを明らかにしてきた⁸⁾。そこで、これらの遺伝子群の中から転写因子遺伝子に注目し、低酸素応答性およびその他のストレスに対する応答性について解析を行ったので報告する。

方法

イネの栽培

イネ（日本晴）の水耕栽培は、Kimura's B solution⁹⁾中、28°C、暗下で2日間で発芽させた後、同様の培地で28°C、16時間明所8時間暗所の条件下で行った。寒天培地での培養は、1/2x ムラシゲ・スクーグ (MS) 培地用混合塩類（和光純薬工業株式会社）、1/2xMS ビタミン、0.2%ゲルライトを含む寒天培地上で発芽させた後、0.5%ゲルライトを含む寒天培地に移植し、縦置きで培養した。

イネの各種ストレス処理

イネの冠水による低酸素ストレス処理は、播種後8日目のイネ全体を、窒素ガスをバブリングさせた Kimura's B solution 中でインキュベーションし冠水させることで行った。処理は光照射下、28°C で行った。コントロールには空気を送りバブリングを行った。窒素ガスを用いた低酸素処理は、寒天培地上で培養した5日目の植物をアネロパック（三菱ガス化学株式会社）内に入れ、パック内の気体を置換することで行った。塩、乾燥、低温処理は、水耕栽培8日目のイネを、それぞれ250 mM NaCl を含む Kimura's B solution、ろ紙、4°C に移すことで行った。処理時間はそれぞれ1時間とした。新たな Kimura's B solution に移したものをコントロールとした。

イネのシクロヘキシミド処理

水耕栽培したイネを 10 μM シクロヘキシミドを含む Kimura's B solution 中で3時間インキュベーションした。その後、イネ全体を空気あるいは窒素ガスをバブリングさせた同様の溶液に30分間冠水させた。

RNA の抽出と定量的 RT-PCR

各処理を行ったイネの根を回収し、total RNA の抽出を行った。Total RNA の抽出には RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いた。逆転写反応は2 μg の total RNA から、StrandScript First-Strand Synthesis System (STRATAGENE) を用い random primer により行った。逆転写反応液を20倍希釈

し, 2 μ l を定量的 PCR 反応に用いた. 定量的 PCR 反応は Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用い, Sequence Detector 7700 (Applied Biosystems) により定量した. 各遺伝子の発現量は 18S rRNA の測定値で補正した.

結果・考察

冠水ストレスによって誘導された推定転写因子遺伝子

マイクロアレイ解析の結果, 2 倍以上に発現の上昇が見られた約 800 遺伝子について Gene Ontology に従って分類したところ, 転写因子と推定される遺伝子や情報伝達に関わると予測される遺伝子がそれぞれ約 1 割含まれていた⁸⁾. 転写因子と推定される遺伝子について分類を行ったところ, Zinc finger タイプが最も多く, 続いて Myb ファミリーに属するものが多かった (図 1). イネの転写因子の構成比と比較すると¹⁰⁾, bZIP, ERF (ethylene response transcription factor) ファミリーに属するものがやや多いものの全体的には良く似た傾向にあった. エチレンシグナルが通気組織の形成や不定根の出現などの形態的变化に関与することが知られている^{1,3)}. ERF 型転写因子にはエチレン応答配列に結合するものが知られており, エチレンを介した形態的応答に関与するものが含まれている可能性が示唆された. 一方, 低酸素で誘導が知られているイネの転写因子 Myb7¹⁰⁾ や Sub1B⁷⁾, シロイヌナズナ AtMYB2⁶⁾ の相同遺伝子の誘導は見られなかった.

冠水ストレスによる推定転写因子遺伝子の発現誘導の経時変化

マイクロアレイ解析の結果, 10 倍以上の強い発現誘導が見られた 10 遺伝子について解析を進めた. 発現誘導の高かったものから, これらの遺伝子を *OsHRTF1* から *OsHRTF10* (Hypoxia-responsive transcription factor) とした (表 1). これらの遺伝子について, 冠水処理による発現誘導の経時変化について real-time PCR を用いて調べたところ, ほとんどの遺伝子で発現

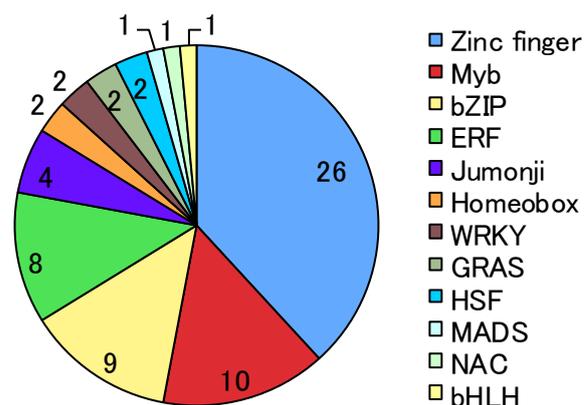


図 1 マイクロアレイ解析において, 冠水ストレスにより発現の誘導がみられた推定転写因子遺伝子の分類

遺伝子数を数字で示した.

は 30-40 分で最大となり, その後低下するという変動を示した. 図 2 には, *OsHRTF3*, *OsHRTF7*, *OsHRTF10* の結果を示した. 調べた 10 遺伝子中, *OsHRTF3* が最も大きく誘導され, 冠水処理後 30 分で処理前の約 165 倍, 空気バブリング処理との比較では約 275 倍に誘導された. *OsHRTF5*, *OsHRTF8*, *OsHRTF9* については, 2 時間後に元のレベルにまで発現が低下していたが, その他の遺伝子については 2 倍以上の発現の誘導が続いていた. また, いずれの遺伝子も 10-20 分で誘導が始まり速い応答を示した. 中でも *OsHRTF7* は応答が速く 10 分後に誘導が最大となった. 低酸素条件下で誘導される代謝酵素であるアルコールデヒドロゲナーゼ (*ADHI*) やピルビン酸デカルボキシラーゼ (*PDC1*) は, それぞれ 40 分, 1 時間でそれぞれ約 100 倍, 約 10 倍と発現誘導が最大となることが報告されている⁸⁾. 今回調べた転写因子遺伝子はこれらの代謝酵素より速く誘導されることから, 初期の応答に重要であることが示唆された. 発現誘導のパターンから *OsHRTF5*, *OsHRTF7*, *OsHRTF8*, *OsHRTF9* のような発現の持続時間が短い遺伝子については,

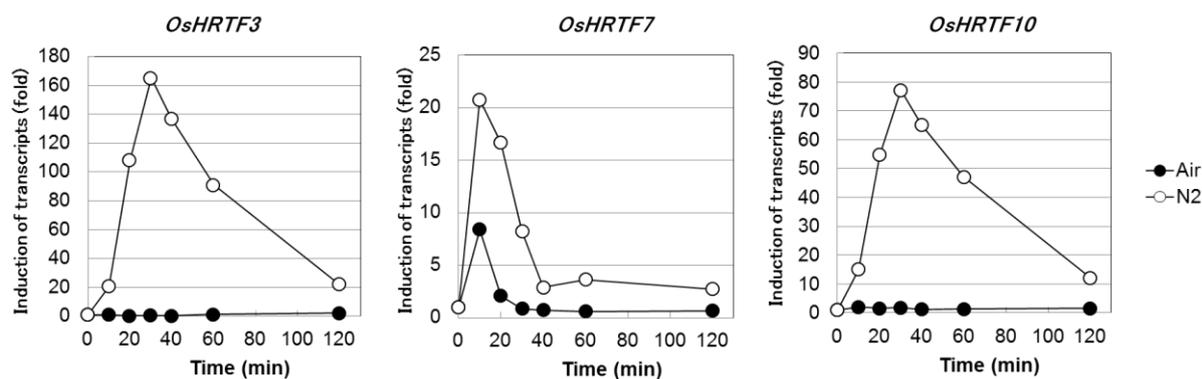


図2 *OsHRTF3*, *OsHRTF7*, *OsHRTF10* の冠水ストレスによる誘導
0時間の発現量を1として相対値で示した。

表1 *OsHRTF1*~*OsHRTF10* の冠水, 乾燥, 塩, 低温ストレスに対する応答

Annotation	Representative Public ID	Microarray		Real-time PCR		
		冠水	冠水	乾燥	塩	低温
<i>OsHRTF1</i>	BE230287	162.6, 103.3	41.4	3.8	3.8	2.7
<i>OsHRTF2</i>	9629.m01103	136.0	33.5	1.7	9.0	0.5
<i>OsHRTF3</i>	AK108249.1	88.7	275.2	1.2	2.6	1.9
<i>OsHRTF4</i>	9636.m04399	74.0	78.9	0.4	11.6	0.1
<i>OsHRTF5</i>	AK108311.1	62.0	15.0	1.6	3.9	1.3
<i>OsHRTF6</i>	AY297447.1	53.6	77.3	7.5	43.5	1.5
<i>OsHRTF7</i>	AY345233.1	28.3	9.4	15.8	133.6	13.2
<i>OsHRTF8</i>	NM_190762.1	15.5, 13.0, 10.9	12.8	1.2	2.7	0.9
<i>OsHRTF9</i>	AK105882.1	11.5	22.4	0.4	0.4	1.1
<i>OsHRTF10</i>	U25284.2	10.5	44.3	1.0	1.0	1.0

冠水ストレスについては30分間, 乾燥, 塩, 低温処理については1時間処理を行った. それぞれの遺伝子の発現量は, コントロール処理を1として相対値で示した.

低酸素ストレスに対する早急な応答に, 一方発現誘導の持続時間が長い遺伝子については初期の応答からストレスに対する順応を含めた応答に関わる可能性が示唆された. *OsHRTF3* は, 2つ

の CCCH タイプのジンクフィンガーをもつ 255 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていた. イネのゲノムデータベース検索の結果, 葉の老化抑制に働く核タンパク質として報告されて

いる *OsDOS*¹²⁾と、ジンクフィンガーモチーフを2ヶ所含む57-159アミノ酸領域において高い相同性(70.9%)があることが示された。しかしながら、この領域以外において相同性が低いこと、*OsDOS*は386アミノ酸残基からなるタンパク質で分子量に違いがあることなどから、機能の関連性は推測できなかった。*OsHRTF7*は、乾燥、塩、低温などで発現が誘導されること、また、シロイヌナズナで過剰発現させると乾燥・塩・凍結耐性を示すことが明らかとなっている *DREB1A*¹³⁾であることが明らかとなった。

低温、塩、乾燥ストレスに対する応答

冠水による低酸素ストレス以外の種々ストレスに対する各遺伝子の応答を調べた(表1)。その結果、7つの遺伝子について塩による誘導が見られた。*OsHRTF7*については、これまでに明らかにされているように、今回調べたいずれのスト

レスに対しても応答が見られた。*OsHRTF3*, *OsHRTF8*, *OsHRTF9*, *OsHRTF10*については、冠水ストレス以外のストレスに対し応答がない、あるいは応答が弱いことから、これらは低酸素に特異的に応答する遺伝子であると予想された。

OsHRTF3, *OsHRTF7* 発現誘導に対する酸素濃度の影響

低酸素で発現の誘導が見られたもののうち、発現誘導の大きかった *OsHRTF3* および早い応答を示した *OsHRTF7* について、遺伝子発現に対する酸素濃度の影響を調べた。*OsHRTF3* の発現誘導において30分後の誘導は5%酸素処理の方が大きかったものの、全体としては発現誘導に酸素濃度依存性が見られた(図3)。また、15%酸素濃度

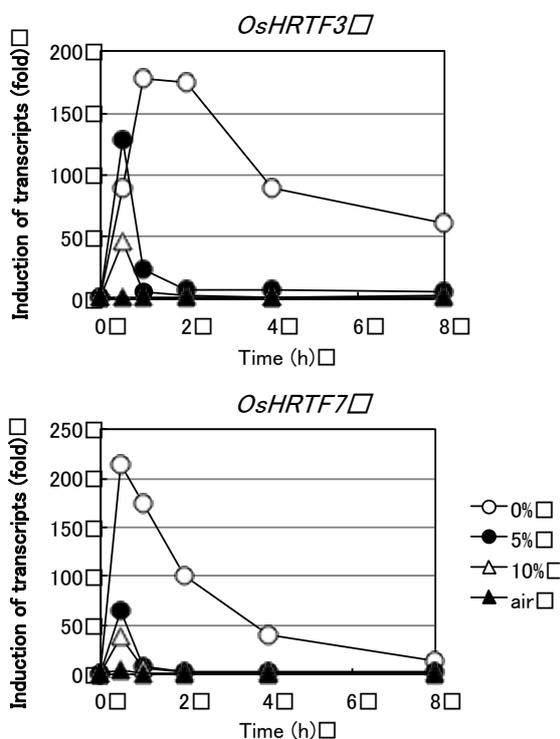


図3 *OsHRTF3*, *OsHRTF7* 発現誘導の酸素濃度依存性
0時間の発現量を1として相対値で示した。

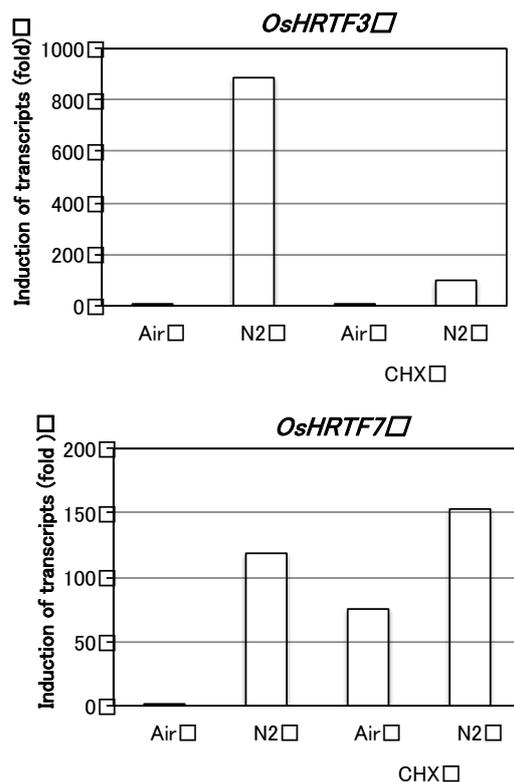


図4 *OsHRTF3*, *OsHRTF7* 発現誘導に対するCHXの影響
空気によるバブリング処理を行った場合の発現量を1として相対値で示した。10 μM CHXであらかじめインキュベーションした後に、冠水処理を行った。

で発現誘導を調べたところ、これらの遺伝子の発現誘導は見られなかった (データ非掲載)。これらのことから、15%以下の酸素濃度に応答して発現誘導が起こることが示唆された。また、2つの遺伝子において5%酸素濃度では2時間後には発現誘導がほとんど見られなくなることから、これらの遺伝子の持続した誘導は5%以下の酸素濃度でみられると予測された。

OsHRTF3, OsHRTF7の低酸素応答に対するタンパク合成阻害剤の影響

これらの遺伝子の発現応答にタンパク質合成が関与するかどうかを調べるため、シクロヘキシミド (CHX) 処理の発現誘導に対する影響を調べた。OsHRTF3については、CHX処理により冠水ストレスによる発現誘導が抑えられたが、OsHRTF7では発現誘導の抑制はみられなかった (図4)。OsHRTF7はタンパク質合成を介さず、発現が誘導されている可能性が考えられた。これは、OsHRTF7の低酸素ストレスに対する応答が早いこととも関連していると考えられた。

以上のように、低酸素ストレスに対し初期に応答する推定転写因子群について、冠水ストレス応答および乾燥、塩、低温ストレスに対する応答を明らかにすることができた。中でも、OsHRTF3は低酸素に対し応答が大きく、低酸素特異的な応答を示した。低酸素特異的に応答する転写因子の候補といえる。一方、OsHRTF7/DREB1Aは、植物が劣悪な環境に置かれたときに応答する環境耐性に関わる遺伝子群の働きを調節している転写因子の一つと考えられている¹³⁾。これまで、乾燥、塩、低温ストレス応答について解析が進められてきているが、これらのストレスに加えて低酸素でも応答が見られることを明らかにすることができた。このことはOsHRTF7/DREB1Aがストレス応答の鍵となる転写因子であり、異なるストレスに対しても植物は初期には共通した応答

を示すことを示唆しているのかもしれない。今回解析を行った遺伝子について、転写因子としての機能の解析、下流応答遺伝子の同定、エチレン、活性酸素、細胞内Ca²⁺濃度の上昇などとの関連性の解析、OsHRTF過剰発現体の解析などをすすめることで、低酸素の初期応答における分子機構に関する情報を得ることが期待される。

引用文献

1. Bailey-Serres J, Fukao T, Gibbs DJ, Holdsworth MJ, Lee SC, Licausi F, Perata P, Voesenek LA, van Dongen JT, (2012) *Trends Plant Sci.*, 17, 129-38.
2. Bailey-Serres J, Chang R, (2005) *Ann. Bot. (Lond)*, 96, 507-518.
3. Fukao T, Bailey-Serres J, (2004) *Trends Plant Sci.*, 9, 449-456.
4. Subbaiah CC, Sachs MM, (2003) *Ann. Bot. (Lond)*, 91, 119-127.
5. Subbaiah CC, Bush DS, Sachs MM, (1994) *Plant Cell*, 6, 1747-62.
6. Hoeren FU, Dolferus R, Wu Y, Peacock WJ, Dennis ES, (1998) *Genetics*, 149, 4794-90.
7. Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ, (2006) *Nature*, 10, 705-708.
8. Otsuka C, Minami I, Oda K, (2010) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 74, 2463-2469.
9. Sato H, Imiya Y, Ida S, Ichii M, (1996) *Plant Science*, 119, 39-47.
10. Kikuchi S et al. (2003) *Science*, 301, 376-379.
11. Menguzzato E, Valle G, Coraggio I, (1995) *Plant Gene Register* PGR95-104.
12. Kong Z, Li M, Yang W, Xu W, Xue, (2006) *Plant Physiol.*, 41, 1376-88.
13. Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, (2003) *Plant J.*, 33, 51-63.