

2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

① 温度に依存した新規シグナル伝達機構に対して影響しうる化合物の探索

化合物ライブラリー

化合物ライブラリーを所有する機関に交渉を進め、名古屋大学 ITbM から 20,000 以上からなるライブラリーの供与を受けることができた。ここから以下の二つのスクリーニングを開始した。

高温徒長を抑制する化合物の探索

化合物を培地に含ませると発芽阻害活性がある場合には徒長への効果を検証できない。また、ライブラリーに含まれる個々の化合物の量は限られている。従って培地に添加して播種することは適切ではないと判断し、まずシロイヌナズナでのスクリーニングの条件検討を行った。その結果、0.1 mL の糖含有寒天培地で常温発芽させ、播種 2 日後に 25 μ L の 0.1 mM の化合物を投与して高温でさらに 3 日間栽培するというマイクロタイタープレートで実施可能な条件を決定した。この条件で ITbM ライブラリーから 2017 年 3 月現在、約 2,500 の化合物から一次スクリーニングを行っており、陽性の化合物が 74 得られている。今後も同じ頻度でヒットすると仮定すると 500~600 の一次陽性化合物が得られる計算になる。次年度は二次スクリーニングの条件検討を行う必要がある。

低温等の環境ストレスによる耐病性低下を抑制する化合物の探索

化合物を探索するためにまず WRKY45 遺伝子にレポーター遺伝子 GUS を連結したレポーター系統を得、スクリーニング系を構築した。WRKY45 は SA に応答して短時間（転写産物量は ~2 時間で最大に近づく）で発現が誘導される。このことは、多数の化合物から探索を行う際に試料間のハンドリング時間差が無視できないレベルになる可能性を懸念させる。そこで、十分な時間レポーター遺伝子活性が持続できる条件を検討した。その結果、内在性 WRKY45 転写産物量とレポーターの活性は、細部は異なっていたもののいずれもサイトカイニンによって正の影響を受けることがわかった（図 1）。この結果から、ABA およびサイトカイニンの量を調節することでスクリーニング条件を調節することが技術的に可能になった。レポーター系統はイネ植物体であり、世代促進に時間を要すことから種子数の確保が本年度終盤にずれ込んだがなんとか年度内にスクリーニングを開始することができた。2017 年 3 月現在、約 1,200 の化合物を調査しているが顕著な効果のある化合物はまだヒットしていない。

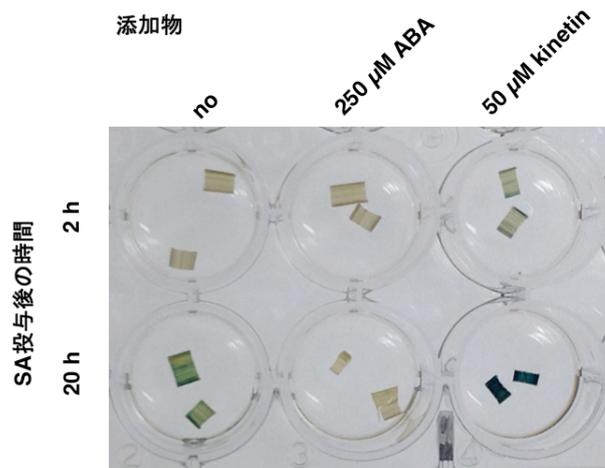


図 1 レポーター系統 WRKY45-GUS の発現条件
サイトカイニン(50 μ M kinetin)が共存すると GUS 活性が増強されることがわかった。

② 温度応答性に異常を示す変異植物の探索

研究の概要

コムギやオオムギは、生育初期の高温により徒長し、冬越しに適さない軟弱形態となる。これが、初冬まで播種時期を待たねばならない主因である。このようにムギ類は、冬越しに適した「硬化型」と適していない「軟弱型」の二つの葉の形態を示す。申請者は、これまでの岡山大学のオオムギの 273 標準系統に対して、異なる温度条件下での伸長成長具合を評価するスクリーニングを行った。その結果、「高温による徒長を示さない系統」、「低温を感知できない系統」、そして「温度応答性が顕著な系統」を見出すことに成功した。

材料及び方法

これまでの共同研究の取り組みによってすでに候補系統として 2 系統を単離しているが、ほかにも応答性を示さない系統（17 系統）や、逆に強く示す系統（9 系統）などを見いだすことに成功している（表 1）。

表 1 異なる温度での伸張成長（単位は mm）

系統	12℃	28℃	28℃/12℃
1	62.66667	41	0.65425532
2	92.4	90.6	0.98051948
3	56	65.25	1.16517857
4	130.8333	161.8333	1.23694268
5	119	150.5	1.26470588
6	101	129.8571	1.28571429
7	151.5714	195.7143	1.29123468
8	100	129.3333	1.29333333
9	146.4286	190.1429	1.29853659
10	103.8	136.2857	1.31296449
11	103.2857	136.8571	1.32503458
12	134	182.4286	1.36140725
13	92.14286	127.2857	1.38139535
14	117	162.2	1.38632479
15	149.3333	210.8333	1.41183036
16	37.5	53	1.41333333
17	27	41	1.51851852
18	40	124.25	3.10625
19	37.66667	119	3.15929204
20	48.75	157	3.22051282
21	38.75	126	3.2516129
22	49.75	162.3333	3.26298157
23	41.25	136.1667	3.3010101
24	43.57143	158.3333	3.63387978
25	33.42857	158.4286	4.73931624
26	28.5	147.4286	5.17293233

これらが、既知の矮性形質である uz などの遺伝子座と関係するものかどうか、栽培実験に

よって各種生理特性を調査する。

すでに得られている系統の温度応答性データをもとに Genome Wide Association (GWAS) 解析を行うことで、座乗候補位置を明らかにするとともに、シロイヌナズナにおいて先行する分子生物学的な解析結果と併せて、オオムギ系統におこった変異を推定する。

結果及び考察

① 候補 2 系統の性状解析

これまでのスクリーニング結果から、標準系統のなかでも幼苗期の高温応答性の不全を示す 2 つの系統を単離した。これらはともに 6 条性を示したが、同様に 6 条の系統でかつゲノムシーケンスが明らかにされた「Morex」を掛け合わせの相手方として交配を行い、F1 種子および F2 種子を入手した。

標準系統が栽培されている岡山とは独立に、龍谷大学の温室においてもこれらの系統を栽培し、次世代種子を入手した。この次世代種子では、期待している高温応答性の不全が認められず、この表現型の安定性に問題を見いだした。

この予期せぬ事態により、マッピングによる座乗位置の同定が困難となったが、再現性を示す条件を探し出した後に、改めてマッピング作業を行う。

次世代種子での再現性が認められなかった事態については、この研究期間内には原因を求めるには至らなかった。分譲された種子ロットでの再現性は確認できていたことから、その種子ロットに起こったエピジェネティックな効果などの関与が考えられる。

② 上記以外の候補系統の生育調査

大気温度感受性は、高温 (28℃) あるいは低温 (12℃) に暴露後の第一葉の葉身の長さを測定し、それぞれの値で除した値 (28℃/12℃) をもって評価した。この場合、高温で伸びない系統とともに、低温で伸びてしまう系統も原理的に区別せずに含まれる。

17 系統の栽培試験によって、高温で伸びない 5 系統 (表中の灰色背景で示した 5 系統) には、uzu である 3 系統が含まれることがわかった。これらの 5 系統については、葉の幅が広く緑が濃いそして矮性を示す特徴が共通した。オオムギにおける uz の原因遺伝子は、ブラシノステロイド受容体であることが明らかにされている (図 1)。



系統1 Morex 系統2

	系統1	Morex	系統2
幅	21.6	12.9	11.8
長さ	158	210	290
厚み	0.31	0.25	0.23

図 1 葉の形態的特徴 (左図; 左、uzu 性を示す系統、中、比較のためのコントロール系統 Morex、右、低温で伸びる系統)。右図; それぞれの葉の幅、長さ、厚みを測定した。

また、近年、シロイヌナズナを用いた研究から、高温徒長に中心的に寄与すると明らかにされている転写因子 PIF4 と、ブラシノステロイドシグナルに関わる転写因子 BZR1 が物理的に結合し、高温時の徒長現象に共同的に機能することが明らかにされている。オオムギにおいても PIF4 ととの相互作用をシロイヌナズナのデータも考慮しつつ検討してみたい。それ以外の高温応答性不全の 12 系統（表中 4-15）は、低温で伸びてしまうことが主因であることが明らかとなった。またこの 12 系統のうち 5 系統において「葉が細く、分けつが進む」共通する性質を見いだした。

温度応答性の高い 9 系統（表中 18-25）は、すべて低温条件でよく矮性を示した。この特徴が 28℃/12℃の比に反映される結果であることが判明した。これは「低温をよく感知する系統」として再評価できる。

③ GWAS 解析

佐藤和広先生との共同で、測定に供した標準系統のうち発芽率に問題がなかった系統を選抜したデータをもとに、GWAS 解析を行った。ゲノム場に複数の候補座乗位置を見いだすことができた。それぞれの遺伝子の特定と、候補としての有望性の評価を引き続き行いたい。

3. 収支報告

(非公開)

4. 研究発表等(研究代表者及び研究分担者)

< 発表論文 (査読有り) >

1. Ueno, Y., Matsushita, A., Inoue, H., Yoshida, R., Jiang, C.-J., and Takatsuji, H. (2017) WRKY45 phosphorylation at threonine 266 acts negatively on WRKY45-dependent blast resistance in rice. *Plant Signal. Behav.* 12(8):e1356968.
2. Hayashi, M., Inoue, S., Ueno, Y., and Kinoshita, T. (2017) A Raf-like protein kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening. *Scientific Reports* 7:45586.

< 学外資金獲得状況 >

古本 強

研究領域 新光合成：光エネルギー変換システムの再最適化

研究課題/領域番号 16H06557

研究種目

新学術領域研究(研究領域提案型)