

発表番号 11

アブシジン酸様活性を有する新規植物耐塩性機構活性化物質の開発

助成研究者：秋山 康紀 (大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科)

共同研究者：林 英雄 (大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科)

植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)は塩類ストレスを始めとする水分ストレスに対する植物の耐性機構を活性化することがこれまでの研究により明らかにされている。このため、ABAは植物に水分ストレス耐性を与え得る化学物質として期待されてきたが、外からABAを植物に投与しても植物自身の強いABA代謝活性によって速やかに非活性体に変換されてしまうため、耐塩性向上のような期待される効果は得られない。興味深いことにABAは糸状菌によっても生産されることが古くから分かっている。このことは微生物の生産物を探索源とすればABA様活性を示す新規な化合物が発見でき、このような化学物質によって植物の耐塩性を向上させることができる可能性を示唆している。そこで本研究では、植物における塩類ストレス誘導性プロモーターの活性化度を指標とする新たなバイオアッセイを構築し、このアッセイを用いてABA様活性を有する新規植物耐塩性機構活性化物質を微生物二次代謝産物に求めてランダムスクリーニングを行い、得られた菌株の生産する活性物質の分離・精製を行った。

バイオアッセイには塩類ストレスやABA処理によって誘導されるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の*rd29A*遺伝子のプロモーター領域をホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子上流に連結した融合遺伝子を導入したトランスジェニックシロイヌナズナを用いた。本植物体におけるサンプル処理時のルシフェラーゼレポーターによる化学発光を高感度CCDカメラにより検出し、その強度によりプロモーターの活性化度を判定した。

土壌より分離した放線菌820株、糸状菌100株を培養し、その培養産物メタノール抽出物を供試サンプルとしてスクリーニングを行ったところ、放線菌5株に*rd29A*プロモーターを活性化する活性が見られた。この菌株の中で活性物質の生産性、菌の生育安定性が優れていたTM-07株とTM-55株について活性物質を精製することにした。これら菌株をそれぞれ坂口フラスコで培養し、得られた培養物を濾過し、菌体と培養濾液に分けてアッセイしたところ、両菌株とも活性物質は培養濾液にのみ存在した。この培養濾液をヘキサン、酢酸エチル、ブタノールで順次分配抽出し、それぞれの抽出画分をアッセイに供したところ、両菌株とも活性はブタノール画分に見られた。

今後、TM-07株とTM-55株それぞれについてラージスケールで培養を行い、活性物質を精製・単離し、その化学構造をスペクトル解析により決定すると共に、これら活性物質が実際に植物の耐塩性を向上させるかどうかについて検討していく予定である。

18

助成番号 0218

アブシジン酸様活性を有する新規植物耐塩性機構活性化物質の開発

助成研究者名：秋山 康紀 (大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科)

共同研究者：林 英雄 (大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科)

1. 研究目的

植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)は塩類ストレスを始めとする水分ストレスに対する植物の耐性機構を活性化することがこれまでの研究により明らかにされている。これには気孔閉鎖やデハイドリンなど水分ストレスから細胞を保護するタンパク質の生合成の活性化などが挙げられる。実際、ABA 生合成に異常をきたし、ABA を生産できない植物変異体は高湿度条件下でのみで生存でき、通常環境では萎え枯死してしまうことが報告されている¹⁾。このため、ABA は植物に水分ストレス耐性を与え得る化学物質として期待されてきたが、外からABA を植物に投与しても植物自身の強いABA 代謝活性によって速やかに非活性体であるファゼイン酸に変換されてしまうため、耐塩性向上のような期待される効果は得られない (Fig. 1)。これを受けて、これまでに有機合成法によって代謝に対して抵抗性の高いABA アナログが作り出され、種子発芽阻害や胚軸伸長阻害などABA の示す他の生理活性について調べられた。その結果、アナログ体は元の天然型ABA よりも持続的な活性を示すことが明らかになった²⁾。しかし、アナログ体の耐塩性機構活性化能については調べられていない。以上の事実はABA のような低分子化合物によって植物の耐塩性機構を活性化でき、このような化学物質によって植物の耐塩性を向上させることができる可能性を示唆している。興味深いことにABA は糸状菌(カビ)によっても生産されることが古くから分かっている。このことは微生物の生産物を探索源とすればABA 様活性を示す新規な化合物が発見できることを強く示唆している。そこで本研究では、植物における塩類ストレス誘導性プロモーターの活性化度を指標とする新たなバイオアッセイを構築し、このアッセイを用いてABA 様活性を有する新規植物耐塩性機構活性化物質を微生物二次代謝産物に求めてランダムスクリーニングを行い、得られた菌株の生産する活性物質の分離・精製を行った。

2. 研究方法

2.1. *rd29A* プロモーター-ルシフェラーゼレポーター融合遺伝子を有するトランスジェニックシロイヌナズナを用いた植物耐塩性機構活性化物質のバイオアッセイ (Fig. 2)

2.1.1. *rd29A* プロモーター-ルシフェラーゼレポーター融合遺伝子を有するトランスジェニックシロイヌナズナの播種・生育

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *rd29A* 遺伝子は理化学研究所の篠崎一雄氏、国際農林水産業研究センターの篠崎和子氏により発見された遺伝子で、LEA (Late Embryogenesis Abundant) タンパクをコードし、NaCl 処理や乾燥など植物が水分ストレスに曝されると遺伝子発現が活性化される³⁾。本遺伝子プロモーターには NaCl 処理や乾燥などの水分ストレスに対する応答に必須の DRE (dehydration-responsive element) と環境・傷害ストレスシグナルを伝える ABA 応答に必須の ABRE (abscisic acid-responsive element) があるため、ABA 処理によっても強く発現することが明らかになっている⁴⁾。この遺伝子プロモーター領域約 900bp をルシフェラーゼレポーター遺伝子上流に連結した融合遺伝子をアグロバクテリウム法により核 DNA に組み込んだトランスジェニック (Tg) シロイヌナズナがこれまでに篠崎らにより作り出されている。ルシフェラーゼレポーター系はルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による化学発光を検出するもので、非破壊的に植物からの化学発光を検出できるため、植物にストレスを与えることなく、簡便かつ短時間でプロモーターの活性化度を判定できる。よって本研究ではこのトランスジェニック体を用いた植物耐塩性機構活性化物質のバイオアッセイの構築を行った。

シロイヌナズナの種子をエッペンチューブに入れ、70 % エタノールで 5 分間、0.2 % Tween20 を含む 1% 次亜塩素酸で 15 分間滅菌処理した後、滅菌水で 4 回すすいだ。その後 0.1 % 寒天溶液に懸濁して、ピペットマンを用いて 12 穴マイクロプレートに分注した発芽培地上 (1 x MS salt, sucrose 3%, kanamycin 30 µg/ml, 寒天 1%, pH 5.7) に置床し、しばらく蓋をせずに風乾させた。その後、サージカルテープで密閉して 4 °C で 2~3 日間春化処理を行った後、植物インキュベーター (24 °C 16 h light / 22 °C 8 h dark) 内で 2~3 週間生育させた。

2.1.2. ABA 処理とルシフェリン / ルシフェラーゼ反応による化学発光の測定

2.1.1. 項により生育させた植物体にアトマイザーを用いて ABA 溶液を噴霧し、遮光して植物インキュベーター (24 °C 16 h light / 22 °C 8 h dark) 内に静置した。タイムコース実験では 100 µM のラセミ体 ABA を用い、ルシフェリン溶液噴霧から逆算して、36, 24, 12, 6, 3 時間前に ABA 溶液をアトマイザーで植物体に噴霧した。ドースレスポンス実験では 1, 10, 100, 1000 µM のラセミ体 ABA 溶液を噴霧し、3 時間インキュベーター内で静置した。ABA はメタノールにまず溶解し、その後、水で所定の濃度に希釈した。メタノールの終濃度は 1% とした。対照区の植物には 1% メタノールを噴霧した。化学発光測定は、0.01 % Triton X-100 を含む 1mM ルシフェリン溶液をアトマイザーで植物体に噴霧してから 30 分間遮光して室温で静置した後、ルミノ・イメージアナライザー LAS-1000 (富士フィルム) で 15~20 分間露光することにより行った。

2. 2. *rd29A* プロモーターを活性化する物質を生産する微生物菌株のスクリーニング

2. 2. 1. 土壌からの糸状菌および放線菌の分離

近畿各地で採取した土壌試料をそれぞれ数 mg ずつ試験管に取り、約 10 ml の滅菌水で懸濁し、その上澄みを菌分離用培地 (arginine-glycerol-salt medium; glycerol 1.25%, L-arginine 塩酸塩 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, NaCl 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.0001%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001%, $MnSO_4 \cdot 6H_2O$ 0.0001%, 寒天 1.5%, pH 7.0) に 2 白金耳塗布した。このプレートを 25 °C で 4 日間培養し、プレートに生じた糸状菌および放線菌コロニーを Waksman 斜面培地 (glucose 1%, peptone 0.5%, meat extract 0.5%, NaCl 0.3%, 寒天 1.5%, pH 7.0) に釣菌し、25 °C で 4 日間培養した。その後、雑菌汚染がないことが確認された菌株に番号を付し、スクリーニングに用いた。

2. 2. 2. 分離菌の培養およびアッセイサンプルの調製

分離した放線菌を試験管 (φ 25 × 200 mm) に入れたグルコースブイオン液体培地 (glucose 1%, peptone 1%, meat extract 1%, NaCl 0.3%, pH 7.0) 10 ml に植菌し、30 °C で 3~4 日間往復振盪培養した。培養液にメタノール 20 ml を加え、7 日間抽出して抽出液を得た。エバポレーターを用いて溶媒を減圧留去し、1%メタノール水溶液に溶解したものをアッセイに供した。

糸状菌は試験管 (φ 25 × 200 mm) に入れたオカラ 10 g に植菌し、25 °C で 14 日間培養した。菌培養物にメタノール 10 ml を加え、7 日間抽出して抽出液を得た。エバポレーターを用いて溶媒を減圧留去し、1%メタノール水溶液に溶解したものをアッセイに供した。

2. 2. 3. *rd29A* プロモーター活性化試験

2. 1. 1. 項により生育させたマイクロプレートの各ウェル中の植物体にアッセイサンプル溶液をアトマイザーで植物体に噴霧、あるいはピペッターで各ウェルに入れて植物体を溶液に浸すことによりサンプル溶液処理した。過剰の溶液を除いた後、アルミホイルで遮光してインキュベーター (24 °C 16 h light / 22 °C 8 h dark) 内に静置した。およそ 6 時間後に 0.01% Triton X-100 を含む 1 mM ルシフェリン溶液をアトマイザーで植物体に噴霧し、アルミホイルで遮光して約 30 分間室温で静置した後、化学発光を検出した。100 μM 天然型 ABA による発光をポジティブコントロール、1% メタノール水溶液による発光をネガティブコントロールとして *rd29A* プロモーターの活性化能を評価した。

2. 3. 活性物質生産菌放線菌 TM-07 株および TM-55 株の坂口プラスコ培養

TM-07 株および TM-55 株をそれぞれ試験管 (φ 25 × 200 mm) に入れたグルコースブイ

ヨン液体培地 10 ml に植菌し、30 °Cで 3~4 日間往復振盪し、種培養を行った。これを 500 ml 容坂ロフラスコに入れたグルコースブイヨン液体培地 100 ml に植菌し、30 °Cで 3~4 日間往復振盪培養した。得られた培養物を濾過して菌体と培養濾液に分け、菌体をメタノールに浸漬して抽出した。菌体のメタノール抽出液を濃縮した後、得られた濃縮物を水で希釈した後、ヘキサソール、酢酸エチル、水飽和 γ -ブタノールで順次分配抽出した。培養濾液も同様にして分配抽出を行い、それぞれ得られた各抽出画分をメタノール、あるいはアセトンに溶解し、水で所定の濃度に希釈したものを 2. 2. 3. 項に従い *rd29A* プロモーター活性化試験に供した。

3. 研究結果

3. 1. シロイヌナズナの塩類ストレス誘導性遺伝子 *rd29A* プロモーターの活性化度を指標とする植物耐塩性機構活性化物質のバイオアッセイの構築

ホタルルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして組み込んだトランスジェニックシロイヌナズナを 12 穴マイクロプレート中で 2~3 週間生育させ、ABA を *rd29A* プロモーター活性化物質として用いアッセイ条件の検討を行った。まず、*rd29A* プロモーターの活性化のタイムコースについて調べたところ、100 μ M ABA で処理した後 6~12 時間の間に活性のピークがあった。このプロモーター活性は徐々に弱まり、36 時間後には非常に低レベルになった (Fig. 3)。ドーズレスポンスについて調べたところ、1~1000 μ M の範囲で濃度依存的に活性化強度が強くなることが分かった (Fig. 4)。ラセミ体と天然型では活性強度および継時的変化にほとんど差はなかった。また、ABA の代謝非活性化体であるファゼイン酸を 100 μ M の濃度で試験したところ、ほとんど活性を示さなかった (Fig. 5)。

以上の実験結果からこのトランスジェニックシロイヌナズナを被検植物としたアッセイ系によって、*rd29A* プロモーターを活性化する化学物質を短時間のうちに小スケールで、且つ特異的に検出できることが示された。

3. 2. *rd29A* プロモーターを活性化する物質を生産する微生物菌株のスクリーニング

前項での結果を元に、微生物培養産物由来の ABA 様活性物質のスクリーニング時のサンプル溶液処理時間を 6 時間とし、その時点における化学発光強度がポジティブコントロールとして用いる 100 μ M 天然型 ABA と同等レベルであるものを活性有りと判定することにした。近畿各地の土壌より分離した放線菌 820 株、糸状菌 100 株を培養し、その培養産物メタノール抽出物を供試サンプルとしてスクリーニングを行った。その結果、放線菌 TM-07, TM-55, EB-1032, EB-1042, EB-1061 の 5 つの菌株に *rd29A* プロモーターを活性化する活性が見られた (Fig. 6)。糸状菌では活性菌株は見出されなかった。これら 5 菌株について活性物質生産の再現性や安定性、生育の安定性について検討したところ、TM-07 株

と TM-55 株が特に優れていたため、以後、これら 2 菌株の生産する活性物質について追求することにした。

3. 3. 放線菌 TM-07 株および TM-55 株の生産する *rd29A* プロモーター活性化物質の培養生産条件の検討

TM-07 株および TM-55 株の生産する *rd29A* プロモーター活性化物質を精製・単離するにあたり、まず中スケール培養に用いる坂口フラスコでの活性物質の生産性と活性物質の局在について調べた。両菌株をまず試験管で種培養した後、500 ml 容坂口フラスコで培養し、得られた培養物を濾過して、菌体と培養濾液に分け、菌体はそのメタノール抽出物を、培養濾液はそのままアッセイに供したところ、活性は培養濾液のみに見られた。この培養濾液をヘキサン、酢酸エチル、n-ブタノールで順次分配抽出し、それぞれの画分についてアッセイを行ったところ、活性物質はブタノール画分に存在することが分かった。

4. 考察

塩ストレスは植物の生育を著しく阻害する。このような生育環境の具体例としては塩類集積地や海岸線、河川河口付近などが挙げられる。このような土地で植物を生育させる技術が開発できれば、食糧を増産できるだけでなく、緑地も回復できるので、人間の生活環境の改善・向上に役立つ。近年の植物分子生物学の進歩により、植物の塩ストレスに対する耐性機構が遺伝子レベルで明らかになってきており、それを応用して耐塩性を向上させた遺伝子組換え植物が生み出されている^{5),6)}。しかし、遺伝子組換え植物の安全性に対する危惧から、このようにして創り出された植物が一般農場や生態系で利用されるのにはまだ時間がかかると思われる。そこで本申請研究では、これまでに農薬などに代表される充分な使用実績のある低分子有機化合物に着目し、植物の耐塩性を強める化合物を新たに開発することを試みた。植物は塩ストレスを受けるとそれに対する防御反応を誘導してストレスに耐えようとする。このストレスシグナルは内在性の低分子植物ホルモンである ABA によって仲介され、種々のストレス耐性反応が誘導される。このことは ABA 様活性を有する化学物質を発見できれば、それをを用いることにより植物の塩ストレス耐性を強めることができることを示唆している。本研究ではこのような ABA 様活性を有する化学物質を開発するためのリソースとして、これまでに多くの有用な生理活性物質が発見されてきた微生物培養産物を用い、そのランダムスクリーニングによって活性物質生産菌を発見しようとした。

まず、ランダムスクリーニングに適したバイオアッセイの構築を行った。従来、塩ストレス耐性の評価は植物をポットなどで生育させ、その個体に塩水処理などによりストレスを与えた後、数日から数週間後に生存した個体をカウントする、というような非常に時間

と労力がかかる方法で行われてきた。このような方法では多検体について調べねばならないスクリーニングは困難である。本研究において構築したアッセイ法はトランスジェニック植物を利用してストレス耐性遺伝子のプロモーター活性をレポーター遺伝子によりモニターする方法で、従来法とは異なり、極めて短時間で、且つ小スケールでバイオアッセイを行えることが特徴である。植物の代表的な水分ストレス耐性遺伝子である *rd29A* 遺伝子のプロモーター領域をレポーター遺伝子であるホタルルシフェラーゼ遺伝子に結合したプロモーター-レポーター融合遺伝子を作製し、これをモデル植物として知られるシロイヌナズナに遺伝子導入して作出したトランスジェニック植物をアッセイに用いた。シロイヌナズナは大変小さく、取り扱いも容易である。この植物体に塩ストレスや ABA を与えると、導入したプロモーターが数時間内に活性化され、その下流のレポーター遺伝子の発現を誘導する。この植物体にルシフェリンを与えるとルシフェリン/ルシフェラーゼ反応による化学発光が起こるため、植物は微弱な光を放つ。この発光を高感度の CCD カメラによって検出することで、非破壊的にプロモーター活性を評価することができる。アッセイの再現性を保つには個体間・アッセイロット間での植物の生育環境条件をできるだけ均一にする必要があるため、12穴マイクロプレートを用い、この中で植物体を生育させた。ABA を用いてアッセイ条件の検討を行ったところ、プロモーターは3時間ですでに強く活性化されており、6~12時間にピークを迎え、その後徐々に弱くなっていった。ABA の代謝非活性化体であるファゼイン酸では非常に弱い活性しか見られず、このアッセイの特異性の高さが示された。

土壌より分離した放線菌 820 株、糸状菌 100 株を培養し、その培養産物メタノール抽出物を供試サンプルとしてスクリーニングを行ったところ、放線菌 TM-07, TM-55, EB-1032, EB-1042, EB-1061 の5つの菌株に *rd29A* プロモーターを活性化する活性が見られた。この中でも TM-07 株と TM-55 株の2菌株は活性物質の生産性、菌の生育安定性も優れていたため、これら菌株の生産する *rd29A* プロモーター活性化物質を精製・単離することにした。これら菌株をそれぞれ坂口フラスコで培養し、得られた培養物を濾過し、菌体と培養濾液に分けてアッセイしたところ、両菌株とも活性物質は培養濾液のみに存在した。この培養濾液の有機溶媒による分配抽出物のアッセイの結果、両菌株とも活性物質はブタノール層に存在したことから活性物質は比較的高極性の低分子化合物であると推測される。

5. 今後の課題

活性物質を単離し、その化学構造を決定するには少なくとも数 mg オーダーの量が必要である。よって、現在、TM-07 株と TM-55 株それぞれについてモノセルカルチャーを行い、シングルコロニーを数十個釣り直し、これらの中から活性物質の生産能が高い菌株を再取得しようとしている。高生産菌株が得られたら、ラージスケールでの培養を行い、得られた培養濾液より各種クロマトグラフィーによって活性物質を単離し、その化学構造を NMR

やMSなどのスペクトル解析により決定する。また、この活性物質が実際に植物の耐塩性を向上させるのかどうかについても塩水灌注法などのポット試験により検討していきたいと考えている。

6. 文献等

- 1) Chak, R. K. F., Thomas, T. L., Quatrano, R. S., and Rock, C. D. (2000). The genes *ABI1* and *ABI2* are involved in abscisic acid- and drought-inducible expression of the *Daucus carota* L. Dc3 promoter in guard cells of transgenic *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.. *Planta*, 210, 875-883.
- 2) Todoroki, Y., Hirai, N., and Koshimizu, K. (1995). 8',8'-Difluoro- and 8',8',8'-trifluoroabscisic acids as highly potent, long-lasting analogs of abscisic acid. *Phytochemistry*, 38, 561-568.
- 3) Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1993). Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29A gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.*, 236, 331-340.
- 4) Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1994). A Novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6, 251-264.
- 5) Sakamoto, A. and Murata, N. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J. Exp. Bot.*, 51, 81-88.
- 6) Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol.*, 17, 287-291.

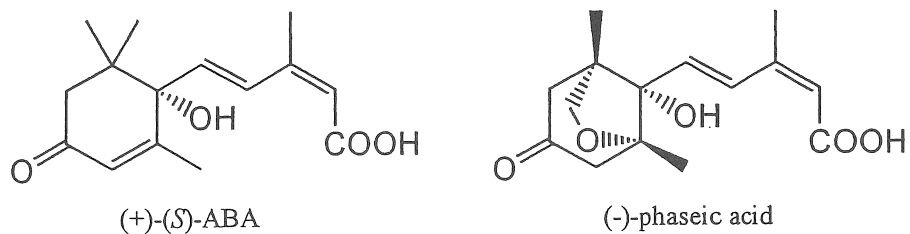


Fig. 1 Chemical structures of abscisic acid (ABA) and phaseic acid

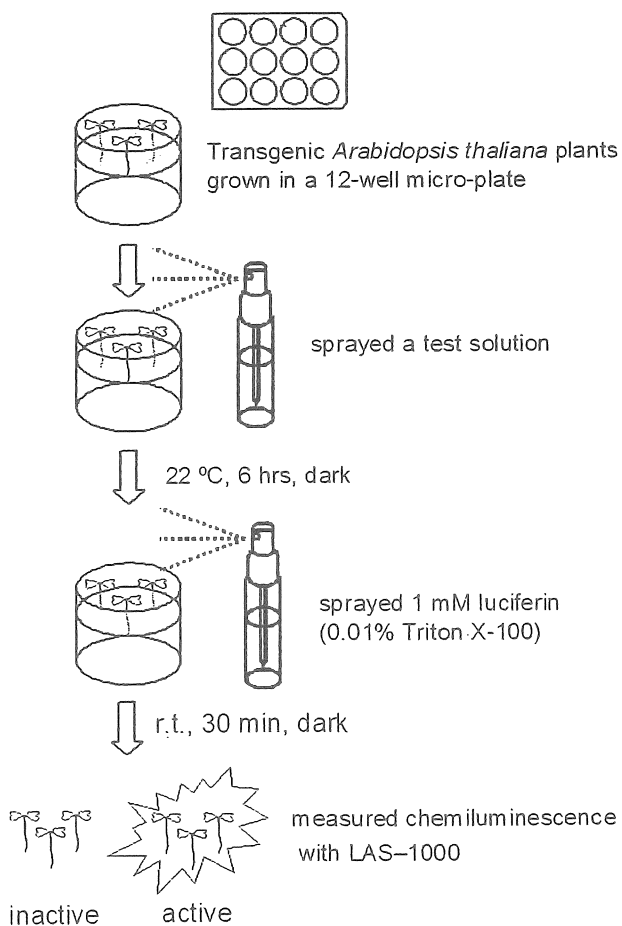


Fig. 2 Bioassay for rd29A promoter-activating compounds using transgenic *Arabidopsis thaliana* plants containing pRD29A-firefly luciferase (LUC) reporter gene fusion.

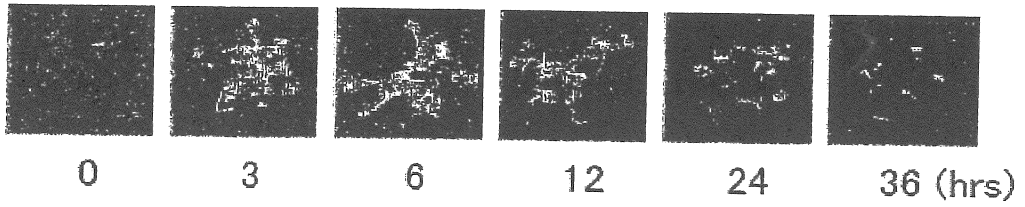


Fig. 3 Time-course of pRD29A-LUC expression in response to ABA

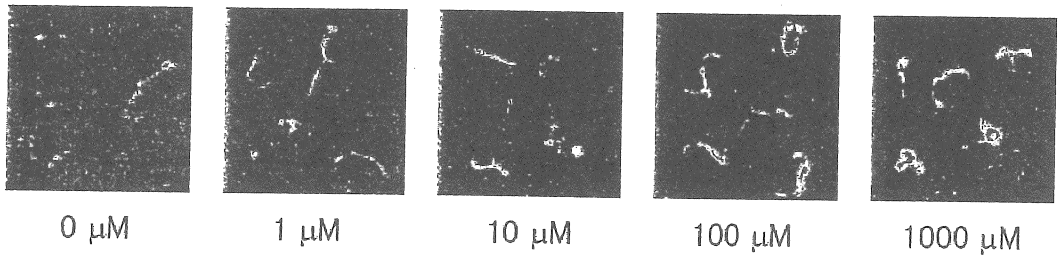


Fig. 4 Dose dependency of ABA in pRD29A-LUC expression

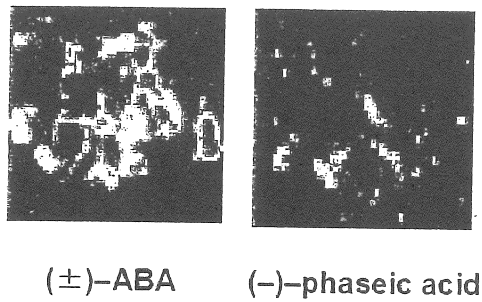


Fig. 5 pRD29A-LUC expression in response to ABA and phaseic acid

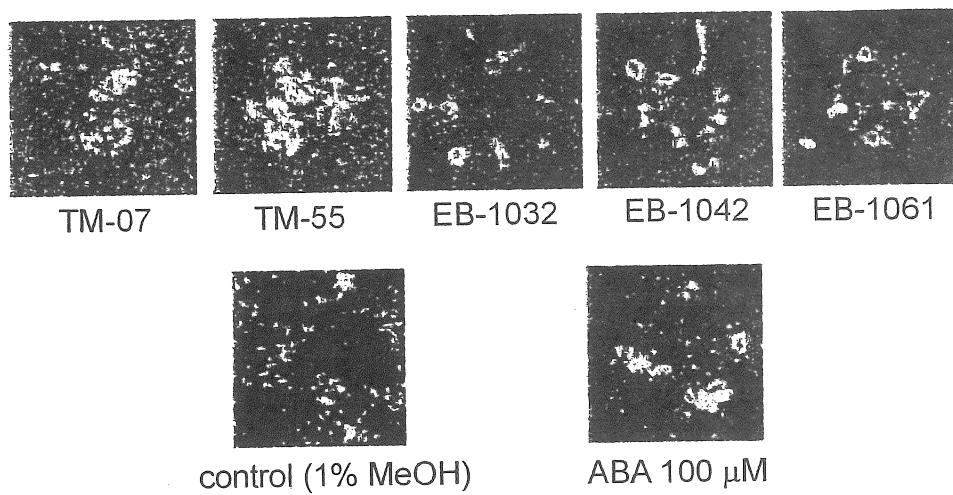


Fig. 6 Activation of *rd29A* promoter by MeOH extracts from *Streptomyces* sp. TM-07, TM-55, EB-1032, EB-1042, and EB-1061

Screening of microbial secondary metabolites that act as an abscisic acid mimetic in plants

Kohki Akiyama and Hideo Hayashi

Graduate School of Agriculture and Biological Sciences, Osaka Prefecture University

Summary

Plants respond to high-salt and drought stresses, and induce the expression of numerous genes associated with stress tolerance. The plant hormone abscisic acid (ABA) mediates the expression of most of the salt-stress-responsive genes, as evidenced by the finding that these genes can be induced by exogenous ABA treatment. However, externally-applied ABA only induces the transient expression of ABA-responsive genes, and fails to improve salt tolerance of plants owing to its rapid metabolism to the inactive phaseic acid. It was shown that several phytopathogenic fungi such as *Botrytis cinerea* produce ABA, and that many soil microbes produce plant-growth-regulating compounds as their fermentation products, prompting us to screen for microbial secondary metabolites that act as an ABA mimetic in plants.

To discover ABA mimetic compounds from soil microbes by screening of their fermentation products, we designed a new bioassay with transgenic *Arabidopsis thaliana* plants containing *pRD29A*-firefly luciferase (*LUC*) reporter gene fusion. The *RD29A* promoter contains the ABA-responsive element and can be activated by ABA treatment or high-salt stress. The *LUC* reporter gene expression in plants can be measured noninvasively by real-time luminescence imaging, making it practical to screen a large number of test samples prepared from microbial fermentations. Through extensive screening of methanol extracts from 820 strains of *Streptomyces* sp. and 100 strains of fungi, we isolated five *Streptomyces* sp. strains that produce *RD29A* promoter activators in their fermentations. Methanol extracts from *Streptomyces* sp. TM-07, TM-55, EB-1032, EB-1042, and EB-1061 culture broths induced *RD29A-LUC* expression to a level comparable to that induced by 100 μ M ABA. Among these strains, *Streptomyces* sp. TM-07 and TM-55 was selected for further purification of the *RD29A* promoter activator. The activity was found only in the culture filtrates, but not in the mycelium after filtration of their broths. The culture filtrates of each strain were successively extracted with *n*-hexane, ethyl acetate, and water-saturated *n*-butanol. The activity was found in the *n*-butanol extract, suggesting that the active compounds are relatively polar. Purification of the active compounds is now in progress.