

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04468

研究課題名(和文) 植物の酸関連ストレス耐性のコアモジュールSTOP1転写制御システムの分子的理解

研究課題名(英文) Molecular characterization of STOP1-regulating acid soil tolerant mechanisms in plants

研究代表者

小山 博之 (KOYAMA, Hiroyuki)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90234921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物は様々な環境下で生存するために、環境耐性機構を進化させてきた。本研究で取り組んだ、STOP1とはモデル植物シロイヌナズナで同定された、ジンクフィンガータイプの転写制御因子で、アルミニウム耐性多雨地域に多い酸性土壌耐性遺伝子群を制御する転写因子である。この研究では、STOP1がその制御する遺伝子群と構成する「モジュール」をマメ科植物などで同定すると共に、シロイヌナズナにおける主要な標的遺伝子であるAtALMT1の転写機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plants have evolved “tolerance module”, which is consisted of a set of tolerance genes regulated by core transcriptional regulator. STOP1 is a zinc-finger protein of Arabidopsis, and regulates modules for acid and aluminum tolerance, which are essential for surviving in acid soils. Current study, we identified “STOP1-regulating module” from pigeon pea, which is consisted of citrate-transporting MATE and ALS3. In addition, we identified molecular mechanisms of regulatory mechanisms of STOP1, including transcriptional regulation of AtALMT1.

研究分野：植物栄養学

キーワード：STOP1 酸性土壌耐性 転写制御

1. 研究開始当初の背景

作物の生産性を向上させる分子改良では、特定のストレスを制御する耐性遺伝子を過剰発現する遺伝子組み換えや、品種間差の遺伝解析と組み合わせた多型(耐性遺伝子の発現量やタンパクレベルの相違で耐性差を生じているもの)を利用する、マーカーアシスト選抜等が実用化されていた。このようなアプローチでは、耐性機構を構成する遺伝子群の相互作用や耐性遺伝子群の発現を制御するマスタースイッチ転写制御因子の制御など、より上流の因子を標的とすることが効果的とも考えられていたが、それ(マスタースイッチ転写因子とそれが制御する遺伝子群から構成される“モジュール”)自体の複雑な制御機構や植物種間差などを研究することが、種の壁を超える画期的な品種改良を行うための前提の一つとなっていた。このような視点から見ると、シロイヌナズナのなどで研究が進む STOP1 制御システムは、典型的な環境耐性モジュールの一つと考えられ、その理解を深めることが必要と考えられた。

2. 研究の目的

申請者がシロイヌナズナで発見した STOP1 ジンクフィンガータンパク質は、酸・アルミニウム耐性に関わる重要遺伝子群の転写を制御する。その遺伝子の中には、環境適応のマスタースイッチとして根圏有用微生物を介した植物免疫の獲得と、リン・鉄などの養分吸収に貢献する有機酸トランスポーターや、窒素・硫酸代謝を介して細胞質 pH 維持に関わる遺伝子群が含まれる。この制御システムはコケを含む陸上植物が保存する環境耐性の基本モジュールと考えられ、その活性化機構とストレス耐性の進化過程を解明することは、不良環境耐性の作出に貢献するだけでなく、生物学的なインパクトが大きい。主に研究の対象とする酸性土壌ストレスとは、東南アジア・南アジアの多雨熱帯地域や、地質年代が古く塩基(Ca)が溶脱したアフリカなどの地域の土壌で問題となるものでその鍵となる植物の酸耐性を制御して対応する必要がある。本研究では、未だ明らかとなっていない STOP1 モジュールの活性化の仕組みとこれを組込んで、植物が進化させた環境耐性機構の全体像を明らかにすることを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

この研究では、マメ科などの植物での STOP1 の機能解析、バイオフィンフォマティクスによる AtALMT1 遺伝子を中心とするシロイヌナズナの STOP1 転写制御システムに関する研究を実施した。これに際しては、キマメとジャトロファの遺伝子組換え系の構築(毛状根システムの利用)、ゲノムワイドでの転写開始点情報の整備、遺伝子共発現とシス情報

の融合解析などの技術基盤研究に加えて、実際にキマメなどの STOP1 遺伝子の機能解析を実施した。

使用した主な技術要素を以下に列挙する。詳細については、関連して発表した論文に記載している。

- 1) 遺伝子組換え(個体及び毛状根)
- 2) 比較マイクロアレイ及び RNAseq 解析
- 3) 共発現遺伝子解析
- 4) SAGE 法(転写開始点解析)
- 5) 土耕・水耕栽培
- 6) 蛍光タンパク解析

4. 研究成果

1) STOP1 システムでの遺伝子発現制御

転写開始点情報とマイクロアレイ解析に基づくプロモーターバイオフィンフォマティクス研究により、シロイヌナズナの STOP1 制御系が、カルシウムシグナル、ABA 制御など複数のシグナルインデューサーの制御化にあることが明らかとなった。カルシウムシグナルは、CAMTA (Calmodulin Transcription Activator) などの典型的なカルシウムシグナル分子が関与するもので、これは STOP1 システムと他の耐性経路がクロストークする原因になると考えられた。

実際に、シロイヌナズナの比較マイクロアレイで検証した地上部でのアルミニウム誘導性遺伝子には、ALS3 (ALUMINUM SENSITIVE 3) などの STOP1 により制御される遺伝子とが含まれ、これはタバコでも STOP1 依存的制御を受けるものであるが、同時に、乾燥耐性シグナル伝達経路のコア転写因子である DREB1A も誘導されることが明らかとなった。DREB1A の転写では、CAMTA が関与することから、乾燥ストレスとアルミニウムシグナルのクロストークを担う分子が CAMTA である可能性が高いことが明らかとなった。

2) アルミニウム応答性遺伝子ネットワークにおける STOP1 システムの制御に関する研究

STOP1 は複数のアルミニウム耐性遺伝子を転写制御する因子であるが、ストレス強度との関連性については明らかでなかった。この点について、ストレス強度を変えて獲得したマイクロアレイデータを、それぞれの強度で比較解析して STOP1 システム転写制御の頑健性を検証した。

高強度のストレスを負荷した場合、塩では明確にコア転写因子の誘導が生じる。一方、低強度で処理した場合には、トランスポーター遺伝子などが転写応答する(つまり中身が変わる)。重金属では、ROS 応答遺伝子の転写誘導が生じるが、強度により内容が異なっている。このような状況で、アルミニウムはストレス強度によらず、STOP1 制御遺伝子の多くが転写誘導され、転写制御機構が頑健であ

ることが分かった。同様な応答は他の植物種でも観察されることから、アルミニウム応答はSTOP1自体の制御(例えばタンパク構造)に依存していることが推測された。

3)作物のSTOP1転写制御システムに関する研究

キマメは灌木を形成するマメ科作物で、貧栄養状態での生育が良い作物である。一般に、機能性を持つタンパク質の解析では、変異体での相補実験やその宿主内での、逆遺伝学実験により実施する。キマメの場合は、多年性であるため通常の遺伝子組換えによる解析は困難で、毛状根を用いた解析系を構築してから研究を進める必要があった。そこで、*Agrobacterium rhizogenes*を用いて遺伝子を組換えることとし、遺伝子組換え系の樹立、組換え毛状根での分子生物学解析系の検討などを実施し、さらにSTOP1自体の解析を進めた。

キマメSTOP1をRNA干渉法で発現抑制すると、キマメはアルミニウム感受性となり、これはSTOP1がクエン酸放出型MATEを制御することにより感受性となるためであることがわかった。キマメにおけるSTOP1の核局在やMATEの発現様式はシロイヌナズナと類似するものであった。注目される点は、MATE(キマメ)とシロイヌナズナでSTOP1転写制御をうけるALMT1は全く起源が異なる遺伝子であるにも関わらず、その転写制御配列(15塩基程度)が保存されていたことである。これは、転写因子の相同性が保持される状況では、プロモーター側の配列進化の最適化が生じていることを示唆するものである。

4)STOP1転写制御系の誘導遺伝子の栽培管理技術への応用に関する研究

不良環境耐性品種を品種改良により育成して生産性の向上を図ることに加えて、施肥管理の最適化などの従来からある技術の最適化により食料生産の向上を図ることも重要である。窒素肥料の生産には化石燃料の10%程度を消費する状況があるが、酸性土壌で必要となる石灰肥料は1ヘクタール当たり10トンを使用する場合もあるため、窒素の場合と同様にエネルギー効率の観点からは非常に深刻な問題といえる。

石灰肥料の施肥レベルを変えた条件で、シロイヌナズナとタバコを栽培して、地上部でのSTOP1制御遺伝子の発現を解析すると、前項にあるようにALS3の転写誘導がアルミニウム特異的に生じることがわかった。この転写発現レベルは、アルミニウム害の消長と相関し、十分な施肥が行われた場合には、発現誘導がほぼ生じないことがわかった。つまり、この遺伝子発現をマーカーとすれば、適切な施肥管理が実現できると考えられた。実用技術とするためには、このマーカーの発現を指標として、近赤外解析などの安価な分析方法の信頼性を高めることが必要と考えられ、パ

ターン認識のAI技術との組み合わせなどが今後期待できると考えられた。

尚、今回の研究では、STOP1タンパクの解析も実施したが、想定以上に複雑な制御(細胞内局在の調節、分解調節、リン酸化調節など)が存在するとともに、タンパク構造内部にAI検知機構が立体的に存在することも明らかとなった。この構造は、2017年に解明されたゼニゴケや藻類の遺伝子情報との比較では、陸上植物だけが保持している可能性もある。今後は、分子内部のドメインの進化など、タンパクの制御についてさらに研究を進めることが期待される。

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9件)

1)Kusunoki Kazutaka, Kobayashi Yasufumi, Kobayashi Yuriko, Koyama Hiroyuki
Comparative characterization of aluminum responsive transcriptome in Arabidopsis roots: comparison with other rhizotoxic ions at different stress intensities (2018) Soil Science and Plant Nutrition (64) 1-13 査読有

2)Beier Marcel P., Obara Mitsuhiro, Taniai Akiko, Sawa Yuki, Ishizawa Jin, Yoshida Haruki, Tomita Narumi, Yamanaka Tsuyoshi, Ishizuka Yawara, Hayakawa Toshihiko
(2018) Plant J (93) 992-1006. 10.1111/tpj.13824 査読有

3)Daspute Abhijit A., Sadhukhan Ayan, Tokizawa Mutsutomo, Kobayashi Yuriko, Panda Sanjib K., Koyama Hiroyuki
Transcriptional Regulation of Aluminum-Tolerance Genes in Higher Plants: Clarifying the Underlying Molecular Mechanisms (2017) Frontiers in Plant Science (8) 1-12 10.3389/fpls.2017.01358 査読有

4)Tadao Wagatsuma, Eriko Maejima, Toshihiro Watanabe, Tomonobu Toyomasu, Masaharu Kuroda, Toshiya Muranaka, Kiyoshi Ohyama, Akifumi Ishikawa, Masami Usui, Shahadat Hossain Khan, Hayato Maruyama, Keitaro Tawaraya, Yuriko Kobayashi, Hiroyuki Koyama
Dark conditions enhance aluminum tolerance in several rice cultivars via multiple modulations of membrane sterols. (2017) Journal of Experimental Botany, (69) 567-577, <https://doi.org/10.1093/jxb/erx>

5) Daspute Abhijit Arun, Kobayashi Yuriko, Panda Sanjib Kumar, Fakrudin Bashasab, Kobayashi Yasufumi, Tokizawa Mutsutomo, Iuchi Satoshi, Choudhary Arbind Kumar, Yamamoto Yoshiharu Y., Koyama Hiroyuki Characterization of CcSTOP1; a C2H2-type transcription factor regulates Al tolerance gene in pigeonpea. (2017) Planta, (247) 201~214

<https://doi.org/10.1007/s00425-017-2777-6> 査読有

6) Mutsutomo Tokizawa, Kazutaka Kusunoki, Hiroyuki Koyama, Atsushi Kurotani, Tetsuya Sakurai, Yutaka Suzuki, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Yoshiharu Y Yamamoto (2017) Identification of Arabidopsis Genic and Non genic Promoters by Paired end Sequencing of TSS Tags. (2017) Plant J (90) 587-605. 10.1111/tbj.13511 査読有

7) Katsunobu Sawaki, Yoshiharu Sawaki, Chen-Ri Zhao, Yuriko Kobayashi, Hiroyuki Koyama Specific transcriptomic response in the shoots of Arabidopsis thaliana after exposure to Al rhizotoxicity: - potential gene expression biomarkers for evaluating Al toxicity in soils. (2016) Plant Soil 409, 131-142 査読有

8) Devendra Kumar Maravi, Sanjeev Kumar, Prabin Kumar Sharma, Yasufumi Kobayashi, Vaibhav V Goud, Nozomu Sakurai, Hiroyuki Koyama, Lingaraj Sahoo (2016) Biotechnology for Biofuels 226:1-12 <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0642-7> 査読有

9) Kusunoki K, Sakata Y, Koyama H, Kobayashi Y Transcriptomic variation among six Arabidopsis thaliana accessions identified several novel genes controlling aluminium tolerance (2017) Plant Cell Environ (40) 249-263. 10.1111/pce.12866 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Hiroyuki Koyama

STOP1, SENSITIVE TO PTOTON RHIZOTOXICITY 1, regulating Al and proton tolerant system in Arabidopsis 9th International Symposium in Plant Soil Interaction at low pH (招待講演)(国際学会) 2015年10月18日~2015年10月24日 クロアチア(ドブロブニク)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 博之 (KOYAMA, Hiroyuki)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号: 90234921

(2) 研究分担者

櫻井 望 (SAKURAI, Nozomu)
公益財団法人かずさ DNA 研究所・植物バイオ
テク室・チーム長
研究者番号: 30392286

山本 義治 (YAMAMOTO, Yoshiharu)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号: 50301784

早川 俊彦 (HAYAKAWA, Toshihiko)
東北大学・農学研究科・准教授
研究者番号: 60261492

井内 聖 (IUCHI, Satoshi)
国立研究開発法人理化学研究所・バイオリ
ソースセンター・専任研究員
研究者番号: 90312256

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし