

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07845

研究課題名(和文) ナチュラルバリエーションを利用した植物の高温耐性付与遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of heat tolerant genes using natural variation in heat tolerance of plants

研究代表者

太治 輝昭 (Taji, Teruaki)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：60360583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では(1) *Eutrema salsugineum*完全長cDNAを用いた耐性付与遺伝子の探索、(2) シロイヌナズナaccession間に見られる高温耐性バリエーションのQTL解析の2つの研究を進めた。(1)は、転写因子と高温ストレス発現変動遺伝子をターゲット遺伝子とし、組換え植物を整備・スクリーニングすることで、高温耐性付与遺伝子を単離した。得られた遺伝子はモデル作物Micro-Tomに導入後、作物での耐性を評価した。(2)は、シロイヌナズナEi-2(高温感受性)とDa(1)-12(高温耐性)のQTL解析より、高温耐性QTLを検出後、NILsを用いてQTLのファインマッピングを行った。

研究成果の概要(英文)：High temperature is one of the most important abiotic stresses because it can greatly affect plant growth and crop production. Many accessions of *Arabidopsis thaliana* have large genetic variations in phenotypic traits such as stress tolerance. We previously performed QTL analysis using recombinant inbred lines generated by crossing between Da (1)-12 and Ei-2 and found a major QTL for heat tolerance on chromosome 1. To identify the QTL, we developed NILs which carried different sized small chromosomal segments from Ei-2 containing the QTL region in the genetic background of Da (1)-12. As a result of genotyping for the NILs, the QTL was narrowed down into 140 kbp including 34 genes.

HsfA1d was identified as a gene that was able to confer heat tolerance to plants. We here generated HsfA1d-overexpressing tomato plants. These HsfA1d-overexpressing tomato plants shows highly expression levels of heat-response marker genes including HSPs compared with the wild type plants.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：高温耐性 シロイヌナズナ accession ナチュラルバリエーション

1. 研究開始当初の背景

高温は作物の生長や収量に大きな影響を及ぼす重大なストレスである。地球規模では、ここ 30 年の温度上昇により、主要穀物である小麦やトウモロコシにおいて 3-5%も収量が減少したと報告されており (Lobell *et al.*, 2011 *Science*)。今後安定した食糧供給を望む上でも、植物の環境ストレス耐性の解明、耐性植物の作出が植物科学の重要な課題とされている。

これまでに多くの植物生理に関する分子レベルでの知見が、モデル植物の *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) を中心に明らかとなってきた。高温ストレス応答に関しては、耐性に必須の遺伝子群の他、耐性を付与することの出来る遺伝子も明らかとなり、申請者らの研究を含め、いくつかの高温耐性植物が作出されている。しかしながら、これらは、特に耐性を示さないモデル植物の耐性メカニズムに關与する遺伝子を導入したものであり、「(弱い)野生型と比較して」というレベルにとどまっているのが現状である。

一方、自然界には高温に対して極めて高い耐性を示す植物が存在する。このような実際に高い耐性を示す植物のメカニズムは非常に興味深いものの、これまでに全く明らかとされていない。また、高温耐性については良いモデルとなる耐性植物自体がなかった。

申請者らは先行研究において、シロイヌナズナ近縁の塩生植物 *Thellungiella salsuginea* (以下 *T. salsuginea*) が、塩ストレス耐性同様、高温ストレスに対しても、植物個体レベルのみならず、細胞レベルでも非常に高い耐性を示すことを明らかにした (Higashi *et al.*, 2013 *Molecular Plant*)。 *T. salsuginea* はシロイヌナズナと同様、植物体が小さい、生活環が 3 ヶ月と短い、種子多産と遺伝学に向く形質を示すほか、シロイヌナズナと核酸レベルで 90%以上の相同性を示すことから比較ゲノム解析が可能である (Taji *et al.*, 2004 *Plant Physiol*)。さらに *T. salsuginea* は 2012 年にゲノムシーケンスが公開されたほか、申請者らの先行研究において *T. salsuginea* の様々な組織、あるいは様々なストレス処理した植物由来の完全長 cDNA ライブラリーが作製されている。これまでに 20,000 クローンについて両端読みシーケンスを公開し (Taji *et al.*, 2008 *BMC Plant Biology*)、ストレス応答に關連すると予想される 1,047 クローンについて全長シーケンスを決定した (Taji *et al.*, 2010 *BMC Plant Biology*)。

またシロイヌナズナは世界中に 1,000 種を超える accessions (エコタイプ) が存在し、ストレス耐性に大きなバリエーションが觀察されることが明らかとなってきた (Atwell *et al.*, 2010 *Nature*)。先行研究においてシロイヌナズナ 170 accessions の高温耐性を評価したところ、高温耐性にも大きなバリエーションが見られた。

2. 研究の目的

本研究では、モデル植物シロイヌナズナの近縁種にもかかわらず、極めて高い高温耐性を有する *Thellungiella salsuginea* の遺伝子資源を用いて、高温耐性付与遺伝子を網羅的に探索し、耐性作物の作出を試みる。また、シロイヌナズナのエコタイプ間には、高温耐性に大きなバリエーションがあることが分かった。本研究では、この高温耐性のナチュラルバリエーションに寄与する遺伝子座を GWAS や QTL 解析といった遺伝学的手法を用いて同定する。

3. 研究の方法

本研究では(1)「*T. salsuginea* 完全長 cDNA を用いた耐性付与遺伝子の探索 (FOX hunting)」と(2)「シロイヌナズナ accessions 間に見られる高温耐性バリエーションの QTL 解析」の 2 つを柱に研究を進めた。(1)は、転写因子と高温ストレス発現変動遺伝子の合計 638 遺伝子をターゲット遺伝子とし、1 遺伝子につき 8 ラインの組換え植物を整備・スクリーニングすることで、高温耐性付与遺伝子を単離した。得られた遺伝子はモデル作物 Micro-Tom に導入後、作物での耐性を評価した。(2)は、Ei-2 (高温感受性 accession) x Da(1)-12 (高温耐性 accession) RILs を用いた QTL 解析より、高温耐性 QTL を検出後、NILs を用いて QTL のファインマッピングを行った。

4. 研究成果

(1) *T. salsuginea* 完全長 cDNA を用いた耐性付与遺伝子の探索 (FOX hunting)

シロイヌナズナ近縁の塩生植物、*Eutrema salsugineum* の完全長 cDNA をシロイヌナズナに過剰発現させた、Full-length cDNA Overexpression (FOX) 系統 (以下、FOX ライン) を保有している。この FOX ラインを用いて浸透圧耐性試験を行った結果、FOX351 系統が野生型植物と比較して耐性を示すことが明らかとなった。FOX351 はタンパク質の保護などに関わる事が知られる因子をコードしていたことから、塩馴化後浸透圧ストレス時に ABA 非依存的に、耐性獲得に重要なタンパク質を保護することで耐性の獲得に寄与することが考えられた。

本研究では、*HsfA1* をトマト (Micro-Tom) へ導入してその応用効果を調べることに、また *HsfA1* が制御する下流遺伝子群の探索を目的に、野生型 Micro-Tom を用いて RNAseq 解析を行った。RNAseq 解析の結果、Micro-Tom でも他植物と同様、高温ストレス下で多くの HSP 群を含む遺伝子発現を誘導することが明らかとなった。トマトのゲノム上には、*HsfA1* ホモログ遺伝子が 5 個存在する。これらのうち、*SlHsfA1b_1* が唯一高温誘導性を示すことが明らかとなった。そこで、先行研究により得られた *E. salsugineum* 由来の *EsHsfA1d* に加え、そのオースログ遺伝子であ

る *SIHsfA1d* と高温誘導性を示した *SIHsfA1b_1* について Micro-Tom 過剰発現体を作成した。これまでに *EsHsfA1d* 導入系統を 6 ライン、*SIHsfA1b_1* 導入系統を 4 ライン、*SIHsfA1d* 導入系統を 3 ライン得ることに成功した。得られた系統について、導入遺伝子および *HsfA1d* の下流遺伝子を予想された *HSP21* および *HSP101* 遺伝子の発現量をノーザン解析により確認した。その結果、*SIHsfA1b_1* 導入系統の 2 ラインについては導入遺伝子の高発現および *HSP21*、*HSP101* の高発現が確認されたことから、目的の形質転換が得られたことが明らかとなった。

(2) シロイヌナズナ accessions 間に見られる高温耐性バリエーションの QTL 解析

高温耐性 accession Da(1)-12 と感受性 accession Ei-2 から作出された recombinant inbred lines (RILs) を用いて QTL 解析を行ったところ、第一染色体上に高温耐性が高い寄与度を示す QTL が存在することが明らかとなった。この高温耐性 QTL を同定するため、QTL 領域を Ei-2 に置き換えた NIL を作出した結果、原因遺伝子領域を 140 kbp、34 遺伝子まで絞り込むことに成功している。原因遺伝子領域 140 kbp のシーケンスを決定したところ、Col-0 や Da(1)-12 とは異なる配列が Ei-2 で存在することが明らかになった。高温条件下での遺伝子発現量を網羅的に見るために Da(1)-12 と感受性の NIL1 を用いて RNA シークエンスを行った。その結果、NIL1 よりも 2 倍以上発現の高い Da(1)-12 の遺伝子は 44 遺伝子のみだった。その 44 遺伝子は活性酸素の消去酵素の遺伝子だった。この結果から原因遺伝子は活性酸素種の消去酵素の働きを活性化させる、または消去酵素を作る働きをしていることが予想された。

Da(1)-12 と Ei-2 の原因遺伝子領域 140 kbp についてサンガー法によるシーケンス解析を行ったところ、Da(1)-12 は広く実験に用いられる Col-0 と高い相同性を示す一方、Ei-2 はそれらと比較して特異的に有する遺伝子や遺伝子の欠落が見つかった。高温感受性を示した NIL-1 と Col-0 を掛け合わせて作出した F1 は Col-0 と Da(1)-12 同様に高温耐性を示すことから、Da(1)-12 同様に Col-0 はこの原因遺伝子座が耐性型であることが示唆された。そこで Ei-2 特異的、あるいは Da(1)-12 特異的遺伝子が原因遺伝子であるか確認するため Ei-2 特異的遺伝子は高温耐性を示す Col-0 に遺伝子導入、Da(1)-12 特異的遺伝子は高温感受性を示す NIL-1 に遺伝子導入し、相補性試験を行った。その結果、どちらの特異的遺伝子導入株も高温耐性はそれぞれの野生株と変わらず、いずれも原因遺伝子ではないことが示唆された。特異的遺伝子が原因遺伝子ではなかったことから、耐性の違いを生じる原因は Ei-2 と Da(1)-12 および Col-0 間に存在する非同義置換による可能性が示唆さ

れた。

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 4 件)

1, Ariga H, Katori T, Tsuchimatsu T, Hirase T, Tajima Y, Parker JE, Alcázar R, Koornneef M, Hoekenga O, Lipka AE, Gore MA, Sakakibara H, Kojima M, Kobayashi Y, Iuchi S, Kobayashi M, Shinozaki K, Sakata Y, Hayashi T, Saijo Y, *Taji T: NLR locus-mediated trade-off between abiotic and biotic stress adaptation in *Arabidopsis*. *Nature Plants* 2017; 26; 3: 17072. 査読有

2, Yotsui I, Serada S, Naka T, Saruhashi M, Taji T, Hayashi T, Quatrano RS, Sakata Y. Large-scale proteome analysis of abscisic acid and ABSCISIC ACID INSENSITIVE3-dependent proteins related to desiccation tolerance in *Physcomitrella patens*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 18:471(4):589-95. 査読有

3, Sako K, Kim JM, Matsui A, Nakamura K, Tanaka M, Kobayashi M, Saito K, Nishino N, Kusano M, Taji T, Yoshida M, Seki M.: Ky-2, a Histone Deacetylase Inhibitor, Enhances High-Salinity Stress Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2016; 57: 776-83. 査読有

4, Ariga H., Tanaka T., Ono H., Sakata Y., *Taji T: CSP41b, a protein identified via FOX hunting using *Eutrema salsugineum* cDNAs, improves heat and salinity stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015; 464: 318-323. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1, 日本植物生理学会年会(盛岡) 2016 年 3 月 16-20 日, K. Nakamura, H. Ariga, S. Iuchi, M. Kobayashi, Y. Sakata, T. Hayashi, T. Taji, Natural variation in heat tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions

2, 日本植物学会(沖縄) 2016 年 9 月 16-29 日, 内田康平, 吉原亮平, 長谷純宏, 鳴海一成, 野澤樹, 井内聖, 小林正智, 坂田洋一, 林隆久, 太治輝昭, 耐塩性 *Arabidopsis thaliana* Bu-5 を用いた塩馴化後浸透圧耐性欠損変異株の単離と解析

3, 日本植物学会(沖縄) 2016 年 9 月 16-29 日, 中村浩太郎, 有賀裕剛, 井内聖, 小林正智, 坂田洋一, 林隆久, 太治輝昭, *Arabidopsis thaliana* のナチュラルバリエーションを利用した高温耐性メカニズムの解析

4, 日本植物生理学会年会 (鹿児島) 2017 年 3 月 16-18 日、Junpei Narushima, Hirotaka Ariga, Keisuke Tanaka, Yoichi Sakata, Takahisa Hayashi, Teruaki Taji, Global identification of genes contributing to acquired osmotolerance in Arabidopsis via ABA-independent pathway

5, 日本植物生理学会年会 (鹿児島) 2017 年 3 月 16-18 日、Kouhei Uchida, Keisuke Tanaka, Shigeki Nozawa, Yoshihiro Hase, Issay Narumi, Yoichi Sakata, Takahisa Hayashi, Teruaki Taji, Isolation and genetic dissection of acquired osmotolerance-defective mutants in Arabidopsis thaliana Bu-5, an osmotolerant accession

6, 日本植物生理学会年会 (鹿児島) 2017 年 3 月 16-18 日、Erina Sato, Hirotaka Ariga, Kotaro Nakamura, Luis Barboza, Keisuke Tanaka, Yoichi Sakata, Takahisa Hayashi, Teruaki Taji, Genetic dissection of heat tolerance between Arabidopsis thaliana Da (1)-12 and Ei-2

7, 日本植物細胞分子生物学会 (さいたま) 2017 年 8 月 29-31 日、内田康平, 田中啓介, 矢嶋俊介, 野澤樹, 長谷純宏, 鳴海一成, 坂田洋一, 太治輝昭, 耐塩性 Arabidopsis thaliana Bu-5 を用いた塩馴化後浸透圧耐性欠損変異株の単離と遺伝学的な解析

8, 日本植物細胞分子生物学会 (さいたま) 2017 年 8 月 29-31 日、Erina Sato, Hirotaka Ariga, Kotaro Nakamura, Luis Barboza, Keisuke Tanaka, Shunsuke Yajima, Yoichi Sakata, Teruaki Taji, Transcriptome analysis of heat tolerance between Arabidopsis thaliana Da(1)-12 and Ei-2

9, 日本植物生理学会年会 (札幌) 2018 年 3 月 28-30 日、内田康平, 田中啓介, 矢嶋俊介, 野澤樹, 長谷純宏, 鳴海一成, 坂田洋一, 太治輝昭, Functional analysis of acquired osmotolerance-defective mutant in aod13

10, 日本植物生理学会年会 (札幌) 2018 年 3 月 28-30 日、Erina Sato, Hirotaka Ariga, Kotaro Nakamura, Luis Barboza, Keisuke Tanaka, Shunsuke Yajima, Yoichi Sakata, Teruaki Taji, シロイヌナズナ accession を用いた長期高温耐性バリエーションを制御する遺伝子座の探索

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

1, 日経産業新聞 2017 年 6 月 1 日「耐乾・耐病性決める遺伝子」太治輝昭ら

2, 科学新聞 2017 年 6 月 10 日「植物の環境適応遺伝子を発見」太治輝昭ら

3, 農業協同組合新聞 2017 年 6 月 10 日「水分取るか病害耐性選ぶか決定関与の遺伝子発見」太治輝昭ら

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太治 輝昭 (TAJI, TERUAKI)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：60360583

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

有賀 裕剛 (ARIGA, HIROTAKA)

中村 浩太郎 (NAKAMURA, KOTARO)

國武 悟 (KUNITAKE, SATORU)

磯野 一帆 (ISONO, KAZUHO)

内田 康平 (UCHIDA, KOHEI)

成島 純平 (NARUSHIMA, JUMPEI)

佐藤 瑛梨奈 (SATO, ERINA)

齋藤 雄一 (SAITO, YUICHI)