

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05753

研究課題名（和文）アルミニウム耐性遺伝子のシグナル伝達を介した転写活性化機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of transcriptional activation of aluminum tolerance gene through a signal transduction pathway

研究代表者

小林 佑理子 (Kobayashi, Yuriko)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：40610952

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：シロイヌナズナにおいて、主要Al耐性遺伝子の発現量と全ゲノム塩基多型（SNP）の関連解析（ゲノムワイドアソシエーション解析：GWAS）による発現制御遺伝子の同定と発現制御機構の解析を行った。その結果、複数の主要なAl耐性遺伝子の発現制御に関与するプロモーター領域のシス因子に加え、転写因子などの複数の上流因子とシグナル伝達経路を特定した。一方、多数の野生株群のトランスクリプトームデータから、GWASで特定した遺伝子を含むAl耐性遺伝子と共発現する遺伝子群および、系統間共発現する遺伝子のプロモーター配列にトランス因子結合領域を検出した。また、転写応答システムは集団間で異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本を含む世界に分布する酸性土壌では、主に可溶化するAlが植物の生育を著しく阻害するため、安定した植物生産のためには中和石灰などの大量の施肥が必要になる。したがって、植物のAl耐性改良は低資源、低エネルギー投入での生産性向上に貢献できると考えられる。Al耐性は複数の遺伝子に制御されているが、それらの発現制御調節は育種上有用であると考えられる。しかしその発現制御機構であるAlストレス感知や転写活性化機構は未解明な部分が多い。本研究では、ゲノムワイド関連解析やトランスクリプトーム解析から、Al耐性に寄与する遺伝子群や遺伝要因を新規に同定し、未解明であった発現制御機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In *Arabidopsis thaliana*, the expression-regulated genes and their expression regulation mechanisms of major Aluminum (Al) tolerant genes were studied by association analysis of whole-genome single nucleotide polymorphisms (SNPs) with expression levels of major Al tolerant genes (i.e. genome-wide association analysis: GWAS). As a result, in addition to cis factors in promoter regions involved in the regulation of expression of several major Al tolerant genes, upstream factors such as transcriptional regulators of those tolerant genes and their signaling pathways were identified. On the other hand, transcriptome data of many natural accessions revealed trans-factor binding regions in the promoter sequences of a group of genes co-expressed with Al tolerant genes, including the genes identified by GWAS, and genes co-expressed between strains. The results also suggested that transcriptional response systems differ among populations of the accessions.

研究分野：植物栄養学

キーワード：酸性土壌 アルミニウムストレス ゲノムワイド関連解析 転写因子 シグナル伝達 リン脂質シグナル 一酸化窒素シグナル シロイヌナズナ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 酸性土壌は世界に広がる不良土壌であり、酸性下で可溶化する AI のストレスが問題となっている。そのため中和石灰など大量の施肥がない限り耕作地に適さない。そのため低資源投入での生産性向上に向けた植物の酸性土壌耐性改良を目指した研究が世界中で進められている。多くの植物がもつ有機酸分泌による AI 耐性機構に加えて、複数の耐性遺伝子の発現制御機構が解明されれば、より効果的な AI 耐性の付与が期待できることから、それは重要な品種改良 (分子改良) のターゲットとなると考えられている。

(2) AI 耐性遺伝子が多数同定される一方で、それらの発現調節を担う上流遺伝子同定は多くなく、AI 感知やシグナル伝達機構のほとんどは未解明のままである。主要な AI 耐性遺伝子リンゴ酸トランスポーター *AtALMT1* の遺伝子発現は、複数のストレス耐性に対応する複雑制御を受け、シグナル伝達を介した転写活性化制御を受けていること (Tokizawa et al. 2015)、トランスクリプトーム解析や、QTL 解析や GWAS などから、*AtALMT1* 以外にも、シグナル伝達関連遺伝子を含む非常に多くの遺伝子が AI ストレスに応答発現し、AI 耐性に関与していることも明らかにしていた (Kusunoki et al. 2017)。

### 2. 研究の目的

遺伝子型が異なる多数のシロイヌナズナ系統において、AI 耐性と発現相関がある遺伝子に関し、転写活性化を担うストレス受容やシグナル伝達および転写因子を同定する。それを通じて AI 耐性遺伝子の転写活性化機構を解明する。具体的には、主要な AI 耐性遺伝子や多系統の AI 耐性と発現相関がある遺伝子の発現量と全ゲノム多型の関連解析 (GWAS) による発現制御遺伝子の同定と発現制御の解析および、多系統の AI 耐性と発現相関がある遺伝子群のネットワーク解析とシス配列推定による転写因子の同定と発現制御の解析を通じて、AI 耐性遺伝子の発現制御機構に含まれる因子を同定する。

### 3. 研究の方法

(1) ケミカルスクリーニング、耐性関連解析 (GWAS) から転写制御遺伝子の同定。先行研究において、シグナル伝達に関与すると考えられる受容体様タンパク質やタンパク質修飾酵素および転写因子などをコードする数個の候補遺伝子に関して、機能欠損おける AI 耐性遺伝子の発現制御を解析した。

(2) 主要 AI 耐性遺伝子や多系統の AI 耐性と発現相関がある遺伝子をターゲットとし、それらの発現量と全ゲノム多型の関連解析によるターゲット遺伝子の発現制御遺伝子の同定。*AtALMT1* を含む AI 応答発現し、耐性への影響が大きい遺伝子について、AI ストレス下のシロイヌナズナ約 30 系統のトランスクリプトーム解析データから AI 耐性と発現相関を示した遺伝子群も AI 耐性候補遺伝子とし、それらの発現量をシロイヌナズナ約 100 系統において調べ、発現量とゲノム多型の関連解析を実施した。

(3) 多系統の AI 耐性と発現相関がある遺伝子群のネットワーク解析とシス配列推定による転写因子の同定。AI 耐性と発現相関を示した遺伝子群で共発現ネットワークを形成する遺伝子群のプロモーターに高確率に存在するシス配列を推定し、実験的に確認された転写因子結合領域データベースから転写因子を推定した。

### 4. 研究成果

(1) 先行して実施したケミカルスクリーニング (Wu et al. 2019) から同定した、AI シグナルに関与するプロテインキナーゼ遺伝子群の解析を進めたが、それらの機能欠損株おける AI 耐性遺伝子の発現制御は確認できなかった。それらの相同遺伝子の機能性の報告やリダンダンシーの問題から、更なる解析の必要があった。AI 耐性関連の GWAS から、少なくとも関連 SNP を 140 推定し、16 遺伝子について AI 耐性への寄与が遺伝学的に証明された。そこには transcription regulator activity や kinase activity 機能を持つ遺伝子、signal transduction プロセスに含まれる遺伝子が含まれていた。

(2) GWAS で特定された TRX は、AI 耐性に寄与しており ROS-status と ROS-signaling を調整するといわれているが、その発現量にはバリエーションがあったため (発現量多型) その制御因子同定のため発現量 GWAS を実施したところ、そのプロモーター領域に原因多型が検出され、その発現量多型にはシス制御の関与することが強く示唆された。また、*AtALMT1* の発現量 GWAS からは、シスおよびトランス因子を含む少なくとも 7 か所に発現量関連 SNP が特定された。シス因子については、トランスポゾン挿入による STOP1 転写因子結合領域への影響が示された (Nakano et al. 2020a)。また、AI 耐性遺伝子クエン酸トランスポーター *AtMATE* の発現量 GWAS は、*AtALMT1* 同様に、シスおよび複数のトランス因子がその発現制御に関与していることを示した (Nakano et al. 2020b)。

さらに、AI 耐性遺伝子である、ポリガラクトツロナーゼ阻害タンパクをコードする PGIP1 遺伝子の発現量ゲノムワイド関連解析を行った。その結果、リン脂質シグナルや一酸化窒素 (NO)

シグナル系の下流で働く NAC や MYB 転写因子やシグナル伝達系因子を同定した (Agrahari et al. 2021). それらの発現量多型は Al 耐性と相関を示した. それら遺伝子群は地上部では機能するが, 地下部では同じ制御系には含まれなかった. また PGIP1 を含め, それらの調節遺伝子の破壊株は, 短期間の根生育よりも長期間の地上部生育において Al 感受性を示し, Al 耐性に寄与していることが示された. 一方, PGIP1 は他の植物のトランスクリプトーム解析においてシロイヌナズナと同様に STOP1 制御を受けていたことから同様な制御系が存在すると考えられた. また, Al 耐性遺伝子である ABC トランスポーター遺伝子 (ALS3) の発現量 GWAS から, ホスファチジルイノシトール代謝や Ca シグナルなどのストレスシグナル伝達に関する遺伝子と関連し, 共発現ネットワークで相互に関係していることが示唆された (Sadhukhan et al. 2021). さらに, それらに含まれる *PLC9*, *CDPK32*, *ANAC071* の機能欠損株は, *ALS3* の発現を抑制した.

(3) シロイヌナズナ野生株 28 系統の Al ストレス下におけるトランスクリプトームデータから, 耐性系統または感受性系統で高発現する発現変動遺伝子を解析した. 約 150-480 遺伝子認められたが, いずれも 4 集団間で重複するものが少なかった. また, 耐性系統での高発現遺伝子の GO タームは, 中央ヨーロッパ, アジア集団に特異的なものがエンリッチされた. また, 耐性系統と感受性系統間で有意な発現差が認められた既知 Al 耐性遺伝子群は, 集団間で異なっており, アジア集団では殆ど認められなかった. これらの結果から, シロイヌナズナが Al の根毒性に対して, 各集団で異なる転写応答システムを獲得していることが示唆された. したがって, それらのデータを用いて, GWAS で特定した遺伝子を含む Al 耐性遺伝子と共発現する遺伝子特定した. Al 耐性遺伝子と系統間共発現する遺伝子のプロモーター配列に統計的に有意に高頻度で出現する k-mer から転写因子結合シス配列を推定することで, 既知の結合領域を検出できることを確認した. *AtALMT1* 遺伝子についても, 転写因子結合データベースとの統合解析で少なくとも 5 か所に転写因子結合サイトが推定された. 本方法によって, Al 耐性遺伝子の転写因子結合領域を包括的に検出することができると考えられ, Al に応答するトランスクリプトームの包括的な転写制御機構の理解に結びつくことが期待された.

#### < 引用文献 >

Tokizawa M, Kobayashi Y, Saito T, Kobayashi M, Satoshi I, Nomoto M, Tada Y, Yamamoto YY, Koyama H. SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY1, CALMODULIN BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR2, and other transcription factors are involved in ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER1 expression. (2015) Plant Physiol. 167: 991-1003.

Kusunoki K, Nakano Y, Tanaka K, Sakata Y, Koyama H and Kobayashi Y: Transcriptomic variation among six Arabidopsis thaliana accessions identified several novel genes controlling aluminium tolerance. (2017) Plant Cell Environ. 40: 249-263.

Liuji Wu, Ayan Sadhukhan, Yuriko Kobayashi, Naohisa Ogo, Mutsutomo Tokizawa, Raj Kishan Agrahari, Hiroki Ito, Satoshi Iuchi, Masatomo Kobayashi, Akira Asai, Hiroyuki Koyama. Involvement of phosphatidylinositol metabolism in aluminum-induced malate secretion in Arabidopsis. (2019) J. Exp. Bot. 70(12):3329-3342.

Yuki Nakano, Kazutaka Kusunoki, Owen A Hoekenga, Keisuke Tanaka, Satoshi Iuchi, Yoichi Sakata, Masatomo Kobayashi, Yoshiharu Y Yamamoto, Hiroyuki Koyama, Yuriko Kobayashi. Genome-Wide Association Study and Genomic Prediction Elucidate the Distinct Genetic Architecture of Aluminum and Proton Tolerance in Arabidopsis thaliana. (2020) Front. Plant Sci. 1:405.

Yuki Nakano, Kazutaka Kusunoki, Haruka Maruyama, Takuo Enomoto, Mutsutomo Tokizawa, Satoshi Iuchi, Masatomo Kobayashi, Leon V. Kochian, Hiroyuki Koyama, Yuriko Kobayashi. A single population GWAS identified AtMATE expression level polymorphism caused by promoter variants is associated with variation in aluminum tolerance in a local Arabidopsis population. (2020) Plant Direct 4(8): e00250.

Raj Kishan Agrahari, Takuo Enomoto, Hiroki Ito, Yuki Nakano, Emiko Yanase, Toshihiro Watanabe, Ayan Sadhukhan, Satoshi Iuchi, Masatomo Kobayashi, Sanjib Kumar Panda, Yoshiharu Y Yamamoto, Hiroyuki Koyama, Yuriko Kobayashi. Expression GWAS of PGIP1 Identifies STOP1-Dependent and STOP1-Independent Regulation of PGIP1 in Aluminum Stress Signaling in Arabidopsis. (2021) Front Plant Sci 12:774687.

Ayan Sadhukhan, Raj Kishan Agrahari, Liuji Wu, Toshihiro Watanabe, Yuki Nakano, Sanjib Kumar Panda, Hiroyuki Koyama, Yuriko Kobayashi. Expression genome-wide association study identifies that phosphatidylinositol-derived signalling regulates ALUMINIUM SENSITIVE3 expression under aluminium stress in the shoots of Arabidopsis thaliana. (2021) Plant Sci. Jan; 302:110711.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakano Yuki, Kusunoki Kazutaka, Maruyama Haruka, Enomoto Takuo, Tokizawa Mutsutomo, Iuchi Satoshi, Kobayashi Masatomo, Kochian Leon V., Koyama Hiroyuki, Kobayashi Yuriko	4. 巻 4
2. 論文標題 A single population GWAS identified AtMATE expression level polymorphism caused by promoter variants is associated with variation in aluminum tolerance in a local Arabidopsis population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e00250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pld3.250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sadhukhan Ayan, Agrahari Raj Kishan, Wu Liujie, Watanabe Toshihiro, Nakano Yuki, Panda Sanjib Kumar, Koyama Hiroyuki, Kobayashi Yuriko	4. 巻 302
2. 論文標題 Expression genome-wide association study identifies that phosphatidylinositol-derived signalling regulates ALUMINIUM SENSITIVE3 expression under aluminium stress in the shoots of Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 110711 ~ 110711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plantsci.2020.110711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakano Yuki, Kobayashi Yuriko	4. 巻 8
2. 論文標題 Genome-wide Association Studies of Agronomic Traits Consisting of Field- and Molecular-based Phenotypes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reviews in Agricultural Science	6. 最初と最後の頁 28 ~ 45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7831/ras.8.0_28	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yuki Nakano, Kazutaka Kusunoki, Owen A. Hoekenga, Keisuke Tanaka, Satoshi Iuchi, Yoichi Sakata, Masatomo Kobayashi, Yoshiharu Y. Yamamoto, Hiroyuki Koyama, Yuriko Kobayashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Genome-Wide Association Study and Genomic Prediction Elucidate the Distinct Genetic Architecture of Aluminum and Proton Tolerance in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.00405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川 莉子, 榎本 拓央, Raj Kishan Agrahari, 伊藤 弘樹, 井内 聖, 小林 正智, 小山 博之, 小林 祐理子
2. 発表標題 ストレス耐性における転写因子STOP1の多面発現と核集積および制御遺伝子の関係
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 多井 紫織, 中野 友貴, 小山 博之, 小林 祐理子
2. 発表標題 シロイヌナズナのアルミニウムストレスに応答する根系構造のナチュラルバリエーション解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山 春花, 渡邊 ひかり, 井内 聖, 小林 祐理子, 小山 博之
2. 発表標題 転写因子STOP1の制御する植物のアルミニウム耐性機構の起源と進化
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊 ひかり, 伊藤 清貴, 丸山 春花, 井内 聖, 小林 祐理子, 小山 博之
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるSTOP1相同遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河口 弘聖・中野友貴・小山博之・小林佑理子
2. 発表標題 GWASによるAtMATE 遺伝子発現制御に関わる遺伝子の探索
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野友貴・楠 和隆・丸山春花・小山博之・小林佑理子
2. 発表標題 シロイヌナズナ野生系統を用いたAtMATE発現量多型の解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度静岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠 和隆・中野友貴・田中啓介・坂田洋一・井内 聖・小林正智・小山博之・小林佑理子
2. 発表標題 アルミニウムストレスに対するシロイヌナズナ野生系統の多様な転写応答
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度北海道大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------