

機関番号：32658  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780242  
 研究課題名（和文） 塩生植物の完全長 cDNA ライブラリーを用いた機能獲得型変異株の単離と解析  
 研究課題名（英文） Identification of stress tolerance related genes via FOX hunting of *Thellungiella halophila* full-length cDNA  
 研究代表者  
 太治 輝昭（TAJI TERUAKI）  
 東京農業大学・応用生物科学部・助教  
 研究者番号：60360583

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、海水程度の塩濃度下でも生育可能な、モデル植物シロイヌナズナ近縁の塩生植物、*Thellungiella* を実験材料に用いて研究を行った。

*Thellungiella* の完全長 cDNA ライブラリーを利用した機能獲得型変異株単離法、Full-length cDNA Overexpressor mutant hunting (FOX hunting)において、塩・浸透圧・高温ストレス耐性を付与できる遺伝子をそれぞれ複数個見出すことに成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

*Thellungiella halophila* has been identified as a model system for understanding abiotic stress tolerance, and it shows extreme salt tolerance. Recently, full-length cDNA library with a total of 9,569 unique genes were constructed from *Thellungiella* plants treated with salinity, cold, freezing stresses or ABA treatment (Taji et al.,2008). Using ectopic expression of full-length cDNAs, a novel gain-of-function system, termed the FOX hunting system (Full-length cDNA Over-eXpressing gene hunting system) was developed. We identified 3 salt-, 2 osmo- and 4 heat-tolerance related genes using the FOX hunting.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：境界農学

キーワード：遺伝子資源・環境ストレス耐性・耐塩性・トランスジェニック植物

## 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化が原因か不明なものの、近年の気候変動は著しく、オーストラリアをはじめ世界中で局所的な旱魃の被害が相次いでいる。これに食糧のエネルギー資源としての利用が重なり、作物の価格高騰など環境問題が私たちの実生活にも影を落としてきた。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になると予想される。植物のストレス応答に関する知見は、モデル植物のシロイヌナズナを中心に明らかとなってきた。近年、申請者らの研究を含みいくつかの耐性植物が作出されている。しかしながらその耐性は、「(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、自然界においては極めて高い耐性を示す植物が存在する。

特に海水程度の高塩濃度でも生育可能な植物を塩生植物といい、マングローブなどが良く知られている。このような実際に高い耐性を示す植物の耐性メカニズムが、モデル植物より明らかとなってきた耐性メカニズムを用いて得られているのか、あるいは独自のメカニズムによって得られているのか非常に興味深い。

これまでも塩生植物を用いた研究はなされているものの、その形態や生活環から、分子レベル、ゲノムレベル、あるいは遺伝学を利用した研究は非常に困難であった。

ところ最近、*Arabidopsis* に近縁の塩生植物、*Thellungiella halophila* が発見された。*Thellungiella* は *Arabidopsis* と同様に、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、*Arabidopsis* と核酸レベルで90%以上の相同性を示し、*Arabidopsis* と同じく、非常に簡便な floral dipping 法によって遺伝子導入を行うことが

できる。

## 2. 研究の目的

*Thellungiella* は、多くの塩生植物で見られる塩腺のような形態的な特性が無いにもかかわらず、海水程度の塩濃度下でも生育可能な程の著しい耐塩性を示すほか、極めて高い凍結耐性、オゾンストレス耐性、さらに私たちの研究によって高温ストレスにも耐性を示すことが明らかとなってきた (Taji et al., 2004 Plant Physiol)。

これまでに申請者らは *Thellungiella* の様々な組織、あるいは塩・低温・凍結ストレス、および植物のストレス応答において重要な役割を担っている ABA 処理を施した植物を用いて、完全長 cDNA ライブラリーを作製した。ライブラリーよりランダムに単離した20,000 クローンについて両端読みシーケンスを行った結果、35,171 のシーケンスを得た。

そこで本研究では、塩・凍結・高温ストレスなどに極めて高い耐性を示す *Thellungiella* のストレス耐性メカニズムを分子レベルで明らかにすること、また耐性作物を作出することを目的として、完全長 cDNA ライブラリーを用いた逆遺伝学的手法および、遺伝学的手法を用いて研究を進めた。

## 3. 研究の方法

*Thellungiella* 完全長 cDNA ライブラリーを利用して、Full-length cDNA Overexpressor mutant hunting (FOX hunting)を行う。FOX hunting はライブラリーが完全長 cDNA であることを利用して、cDNA カセット部分を恒常的に強い遺伝子発現を誘導するプロモーターの下流に繋ぎ換え、目的の表現型(本研究では塩および高温ストレス耐性)を指標に、機能獲得型変異株を得る方法である

(Ichikawa et al., 2006 Plant J. 右図参照)。本研究では FOX hunting を、Arabidopsis および、モデル作物である Micro-Tom を対象に行い、耐塩性を付与することの出来る遺伝子を単離すると同時に、耐塩性作物の作出を試みる。

#### 4. 研究成果

シロイヌナズナ近縁の塩生植物、*Thellungiella halophila* の完全長 cDNA ライブラリーを利用した機能獲得型変異株単離法、Full-length cDNA Overexpressor mutant hunting (FOX hunting)においては、シロイヌナズナに *Thellungiella* の遺伝子を形質転換し、得られた形質転換植物の塩・浸透圧・高温ストレス耐性を評価することによって、これらのストレスに耐性を付与できる遺伝子の探索を行った。これまでにストレス応答の関与が示唆される遺伝子群を中心に、約 700 の遺伝子については、8 系統ずつの形質転換植物を得た。一方、シークエンスを得た 9569 遺伝子をランダムにシロイヌナズナに形質転換する方法を用いて、約 3000 の形質転換体を得た。これらを用いて、上記のストレス耐性を評価した結果、塩ストレス耐性を付与できる遺伝子を 7 個、浸透圧ストレス耐性を付与できる遺伝子を 2 個、高温ストレス耐性を付与できる遺伝子を 3 個見いだすことに成功した。

上記の研究によって得られた塩ストレス、あるいは高温ストレス耐性を付与できる遺伝子を用いた応用研究として、極矮性トマトである Micro-Tom のモデル作物としての適正を検討した。項目として、形質転換方法・Micro-Tom の耐塩性および高温耐性評価方法を検討したところ、形質転換は遺伝子の導入までは確認できたものの、植物個体の完全な再生には至らなかった。一方、耐塩性・高温耐性評価方法についてはそれぞれ 2 つの評価法を確立することができた。

また、*Thellungiella* の種子にイオンビームを照射することによって突然変異を誘導させた種子を用いて、塩ストレスに対して高感受性を示す変異株のスクリーニングを行ったところ、これまでに 10 の塩ストレス高感受性 *Thellungiella* 突然変異株の単離に成功した。

#### 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 5 件)

**Yamamoto, C, Sakata, Y, Taji, T, Baba, T, Tanaka, S** (2008). Unique ethylene-regulated touch responses of Arabidopsis thaliana roots to physical hardness. J. Plant Res. 121, 509-519.

**Taji, T, Sakurai, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Sakaki, Y., Seki, M., Sakata, Y., Tanaka, S., Shinozaki, K.** (2008). Large-scale collection and annotation of full-length enriched cDNAs from a model halophyte, *Thellungiella halophila*. BMC Plant Biol. 12, 1-15.

**Komatsu, K., Nishikawa, Y., Ohtsuka, T., Taji, T., Quatrano, R.S., Tanaka, S., and Sakata, Y.** (2009). Functional analyses of the ABI1-related protein phosphatase type 2C reveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between Arabidopsis and the moss *Physcomitrella patens*. Plant Mol Biol **70**, 327-340.

**Sakata, Y., Komatsu, K., Taji, T., and Tanaka, S.** (2009). Role of PP2C-mediated ABA signaling in the moss *Physcomitrella patens*. Plant Signal Behav **4**, 887-889.

**Katori, T., Ikeda, A., Iuchi, S., Kobayashi, M.,**

**Shinozaki, K., Maehashi, K., Sakata, Y., Tanaka, S., and Taji, T.** (2010). Dissecting the genetic control of natural variation in salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions. *J Exp Bot* **61**, 1125-1138.

〔学会発表〕（計 6 件）

小野寛和、石川智子、南雲美穂、篠崎一雄、坂田洋一、田中重雄、太治輝昭 「*Thellungiella halophila* 完全長 cDNA ライブラリーを用いた *Arabidopsis thaliana* FOX hunting ラインの作成、および耐塩性付与遺伝子の同定」 第 26 回日本植物細胞分子生物学会（吹田）大会・シンポジウム（大阪 2008.9）

石川智子、太治輝昭、坂田洋一、田中重雄 「塩生植物 *T. halophila* を用いた高温ストレス耐性に関する研究」 第 26 回日本植物細胞分子生物学会（吹田）大会・シンポジウム（大阪 2008.9）

池田彬郎、神山綾子、井内聖、小林正智、坂田洋一、田中重雄、太治輝昭 「*Arabidopsis* の natural variation を利用した耐塩性と ABA 感受性メカニズムの解明」 第 27 回日本植物細胞分子生物学会（藤沢）大会・シンポジウム（神奈川 2009.7）

南雲美穂、小野寛和、坂田洋一、田中重雄、篠崎一雄、太治輝昭 「*Thellungiella* 完全長 cDNA ライブラリーを用いた *Arabidopsis* Fox hunting による耐塩性付与遺伝子の探索」 第 27 回日本植物細胞分子生物学会（藤沢）大会・シンポジウム（神奈川 2009.7）

Teruaki Taji, Ono Hirokazu, Miho Nagumo, Tomoko Ishikawa, Kazuo Shinozaki, Yoichi Sakata and Shigeo Tanaka, Identification of stress

tolerance related genes via FOX hunting system of *Thellungiella halophila* full-length cDNA library. Honolulu, Hawaii, July 2009, Plant Biology 2009.

Taku Katori, Akiro Ikeda, Satoshi Iuchi, Masatomo Kobayashi, Kazuo Shinozaki, Yoichi Sakata, Shigeo Tanaka and Teruaki Taji, Large scale evaluation of salt tolerances among *Arabidopsis thaliana* accessions. Honolulu, Hawaii, July 2009, Plant Biology 2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太治 輝昭 (TAJI TERUAKI)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：60360583

### (2) 研究分担者

無

### (3) 連携研究者

無