

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02945

研究課題名(和文)低温ストレス応答の分子メカニズムを基盤とした低温耐性トマトの開発

研究課題名(英文) Development of cold tolerant tomato through understanding the molecular mechanism of cold stress response

研究代表者

RAHMAN ABIDUR (RAHMAN, ABIDUR)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：30447114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：プロジェクトを通じて、次のことを実証した、1) トマトではABAとGAが寒冷ストレス下での花分裂組織の発達に拮抗的な機能を果たしている、2) トマト GNOMがトマトの発育と寒冷ストレス応答に主要な役割を果たしている、3) 野生型、寒冷感受性変異体、および寒冷耐性系統の比較プロテオーム解析により、病因関連タンパク質ファミリー(PR)がGNOM制御寒冷ストレス経路に関連している、4) アクチンのアイソバリエントであるACT8は、寒冷ストレス応答経路の調節に主要な役割を果たしていることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意に、我々は本研究プロジェクトを通じて、寒冷ストレス反応経路の新規調節因子をいくつか特定した。ACT8、GNOM、およびPRファミリータンパク質は、植物の低温ストレス応答の制御に重要な役割を果たす新たに同定されたタンパク質である。

社会的意義としては、新たに同定された遺伝子は、将来的にさまざまな耐寒性作物を開発するための分子育種プログラムの潜在的なターゲットとなる可能性があり、これは飢餓ゼロというSDGs目標の達成に役立つだろう。

研究成果の概要(英文)：This research project was aimed to develop cold tolerant tomato by understanding the molecular and cellular mechanisms of cold stress response pathway using Arabidopsis and tomato. This research demonstrated that 1) for floral meristem development under cold stress ABA and GA play antagonistic function in tomato, 2) Using CRISPR-Cas9 generated mutant in tomato, we found that like Arabidopsis, tomato GNOM plays a major role in tomato plant development and cold stress response, 3) comparative proteomic analysis of Arabidopsis wild type, cold sensitive gnomb/E mutant, and cold resistant GNOM-OX line, revealed that pathogenesis related protein family (PR) is linked to GNOM regulated cold stress pathway, and 4) actin isovariant, ACT8 was found to be a major player in regulating cold stress response pathway through modulating specific protein trafficking that are required to combat the cold stress.

研究分野：植物の分子および細胞生理学

キーワード：低温ストレス 花の分裂組織の発達 GNOM 比較プロテオミクス 植物ホルモン アクチン

1. 研究開始当初の背景

低温ストレスは、世界中で作物の生産性を制限する主要な非生物的ストレスである。特に低温ストレスは植物の成長を抑制し、作物の生産量低下の原因になる。日本における、作物の低温被害による損失額は、年間数億円規模に及ぶ (Rahman, 2013; Shibasaki and Rahman, 2013)。さらに、世界規模での異常変動を踏まえ、低温ストレス耐性作物の開発は重要課題の一つである。植物が低温ストレスに応答する仕組みとして二つの異なる経路、C-Repeat Binding Factor (CBF) 依存的経路と CBF 非依存的経路が存在する。我々は CBF 非依存的経路において、低温ストレスで成長ホルモンのオーキシンが細胞内に蓄積して伸長領域への輸送量が減少し、成長停止や開花抑制が生じるということも明らかにした。(Shibasaki et al., 2009; Rahman 2013; Shibasaki and Rahman, 2013, Hong et al., 2017)。さらに、低温時にオーキシンの輸送量が減少するのは、リサイクリングエンドサイトーシスが低温ストレスで抑制されるためオーキシンの輸送担体である PIN2 と呼ばれるタンパク質が細胞膜へ運ばれなくなる為であった。しかし、花の抑制のメカニズムは不明である。GNOM と呼ばれるグアニンヌクレオチド交換因子タンパク質の機能欠損株は低温において、野生株に比べて著しい成長抑制を示すことを明らかにした (Ashraf and Rahman, 2018, 2019)。つまり GNOM は CBF 非依存的経路の開始を制御する調節因子である。野生株の約 10 倍 GNOM を高発現するシロイナズナの変異体を低温下でも成長して開花低温耐性変異体であることを見出すことができた。しかし GNOM 依存的なリサイクリングエンドサイトーシスで輸送され低温耐性獲得に機能する PIN2 以外のタンパク質は全く未同定であり、オーキシン以外の植物ホルモンの関与も全く分かっていない。様々な低温耐性作物を開発する為には、解明の進んでいない CBF 非依存的経路の全容解明に加えてシロイナズナ以外の植物でも GNOM 高発現体が低温耐性を獲得することも実証する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、以下の 3 課題に焦点を当てることにより本研究では植物の低温ストレス応答機構の全容を分子レベルで解明し、低温ストレス耐性作物を開発する技術基盤の確立を目指す:

1. 低温耐性に機能するタンパク質とホルモンを特定する。
2. 比較プロテオミクス分析を通じて、GNOM に依存する低温ストレス応答メカニズムを理解する。
3. CRISPR-cas9 ゲノム編集システムで生成された変異体を使用して、トマトの低温ストレス応答と発達における GNOM の役割を理解する。

3. 研究の方法

1) 表現型解析

土壌栽培の植物は、制御された植物インキュベーター内で最適な低温ストレス条件下で指定された時間処理され、表現型分析が行われた。

2) ホルモン分析

最適な寒冷ストレス条件下で栽培されたトマト植物が収穫された。サンプルは、以前に記載されているように (Salem et al., 2020) 変更を加えて調製された。凍結芽組織 (100 mg) を粉砕して微粉末にし、ホルモン分析のために LC-ESI-MS/MS に供した。

3) 比較プロテオミクス分析

野生型、gnom B/E および GNOM 過剰発現変異体を 3 週間増殖させ、4 で 7 日間の低温ストレスにさらした。低温ストレスの後、植物を収穫し、総タンパク質を単離した。対照として、23 で生育した植物から総タンパク質を単離した。比較プロテオミクス分析は、以前に記載されているように LC-MS/MS を使用して実行された (Ahsan et al., 2023)。

4) CRISPR-Cas9 を使用したトマトの GNOM 変異体の生成

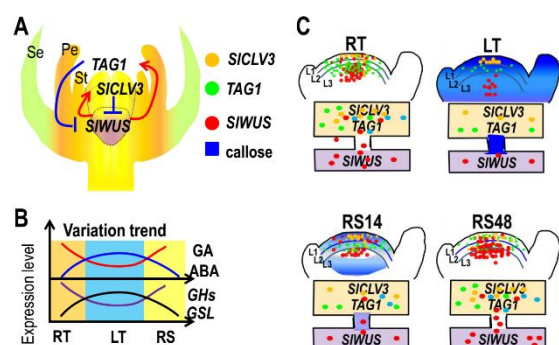
SIGNOM SEC7 ターゲット sgRNA 1、2、および 3 は、高い「オンターゲットスコア」と低い「オフターゲット特異性」を備えたベンチリングソフトウェア (<https://www.benchling.com/>) を使用して設計され、効率的な活性に適した条件を維持した。sgRNA 配列を、Golden Gate クローニング手順 (Engler et al., 2008) によって BsaI 部位間のベクター pHEE401E (Wang et al., 2015) に挿入した。各 sgRNA は、機能を部分的に失わせるために個別にクローン化された。

4. 研究成果

a) 低温ストレスによる奇形果実形成の分子・細胞機構の解明

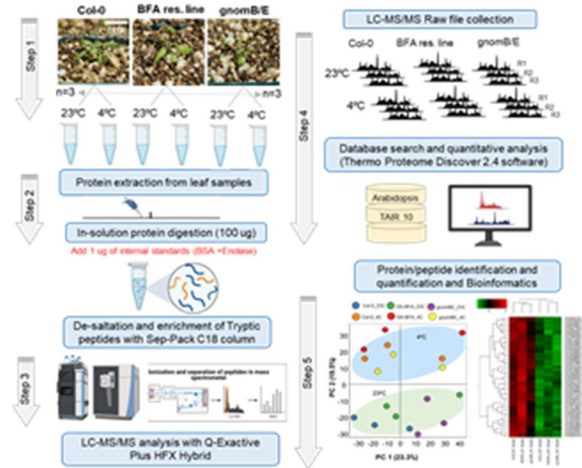
果実の奇形は世界中の果実生産における大きな制約となっており、多大な経済的損失をもたらしている。農家たちは何十年も前から、開花前の気温の低下により果実の形が奇形になることが多いことに気づいていたがこの現象の根底にある分子機構は不明である。

分子分析とホルモン分析を使用して我々は、1) WUSCHEL および CLAVATA を介したフィ

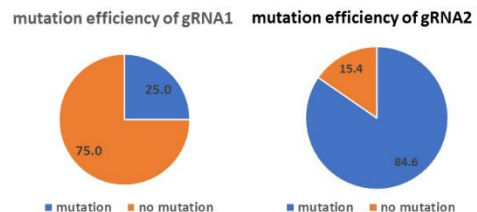
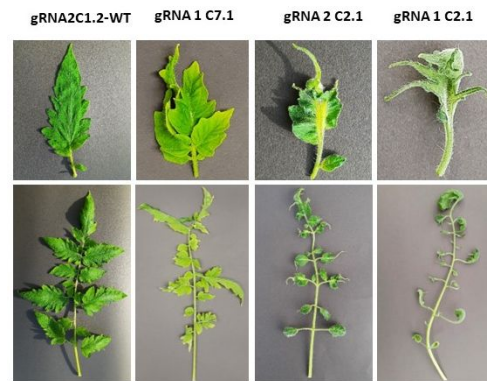


ードバック ループが低温ストレスによって壊れ、異常なカロースの蓄積と花のマーアイテムの発達の変化を引き起こすことを実証した、2) 植物ホルモン GA と ABA は、低温ストレス下でのカロースの沈着と異常な花分裂組織の形成を制御するために拮抗的に作用する。これらの発見は *New Phytologist* に掲載された (Wu et al., 2022, *New Phytologist*)。

b) GNOM 調節された低温ストレス応答は PR ファミリータンパク質に関連している比較プロテオミクスにより、GNOM が調節する寒冷ストレス応答機構には病因関連タンパク質ファミリー PR が関与していることが明らかになった。一貫して、*pr1*、*pr5*、および *nudt6* 変異体は、低温ストレスに対する感受性の増加を示す。これは新しい発見であり、将来の耐寒性植物の開発に役立つと考えられる。現在、投稿に向けて原稿を準備中である。



c) トマトの GNOM は、成長と発育および低温ストレス反応の調節に機能する。トマトの CRISPR *gnom* 変異体を特徴付けることにより、シロイヌナズナと同様に、GNOM がトマトの発育に重要な役割を果たしていることを確認した。GNOM の Sec7 ドメインの突然変異は、根の発育の変化、葉の発育の異常、花の発育の異常、および矮性植物を引き起こす。また、結実異常、結実なし、種なし果実も観察された。さらに、種子を生成する CRISPR *gnom* 変異体の一部は、低温ストレスに対する感受性の増加を示す。この結果は、GNOM が低温ストレスの普遍的な調節因子である可能性があることを示唆している。現在、トマトの耐寒性を高めるための GNOM 過剰発現系統の開発を行っている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 10件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Wu J, Sun W, Sun C, Xu C, Li S, Li P, Xu H, Zhu D, Li M, Yang L, Wei J, Hanzawa A, Tapati SJ, Ueonoyama R, Miyazaki M, Rahman A*, Wu S*	4. 巻 237
2. 論文標題 Cold stress induces malformed tomato fruits by breaking the feedback loops of stem cell regulation in floral meristem	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 2268-2283
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.18699	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 Numata T, Sugita K, Rahman AA, Rahman A*	4. 巻 73
2. 論文標題 Actin isovariant ACT7 controls root meristem development in Arabidopsis through modulating auxin and ethylene responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Exp. Bot	6. 最初と最後の頁 6255-6271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erac280	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 Rahman J, Sultana F, Fatima K, Hasan MM, Gani N, Hossain MS, Chowdhury AK, Rahman A	4. 巻 54
2. 論文標題 Genetic diversity of field mustard (Brassica Rapa L.) and their saturated and unsaturated fatty acids association	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 SABRAO Journal of Breeding and Genetics	6. 最初と最後の頁 249-266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.54910/sabrao2022.54.2.4	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 Ashraf MA, Rahman A	4. 巻 11
2. 論文標題 Cellular protein trafficking: a new player in low temperature response pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 933
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants11070933	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 ラーマン・アビドゥール*, 伊藤 圭汰	4. 巻 779
2. 論文標題 Cs を効率的に取り込む植物タンパク質を世界で初めて同定 - 放射性セシウムで汚染された土壌を植物で浄化する手法の開発に前進	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Isotope News	6. 最初と最後の頁 42-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Sumaya P, Rahman A*	4. 巻 22
2. 論文標題 Actin isovariant ACT7 modulates root thermomorphogenesis by altering intracellular auxin homeostasis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22147749	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 Ashraf MA, Rahman A	4. 巻 11
2. 論文標題 Cellular protein trafficking: a new player in low temperature response pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants11070933	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 ラーマン・アビドゥール*、伊藤 圭汰	4. 巻 779
2. 論文標題 Cs を効率的に取り込む植物タンパク質を世界で初めて同定 - 放射性セシウムで汚染された土壌を植物で浄化する手法の開発に前進	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Isotope News	6. 最初と最後の頁 42-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Ashraf Mohammad Arif, Akihiro Takashi, Ito Keita, Kumagai Sayaka, Sugita Ryohei, Tanoi Keitaro, Rahman Abidur	4. 巻 14
2. 論文標題 ATP binding cassette proteins ABCG37 and ABCG33 function as potassium-independent cesium uptake carriers in Arabidopsis roots	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Plant	6. 最初と最後の頁 664 ~ 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molp.2021.02.002	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 Rahman Tawhidur, Shao Mingxuan, Pahari Shankar, Venglat Prakash, Soolanayakanahally Raju, Qiu Xiao, Rahman Abidur, Tanino Karen	4. 巻 22
2. 論文標題 Dissecting the Roles of Cuticular Wax in Plant Resistance to Shoot Dehydration and Low-Temperature Stress in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1554 ~ 1554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22041554	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 Aslam Mohammad, Sugita Kenji, Qin Yuan, Rahman Abidur	4. 巻 21
2. 論文標題 Aux/IAA14 Regulates microRNA-Mediated Cold Stress Response in Arabidopsis Roots	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8441 ~ 8441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228441	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 Rahman Arifa, Kawamura Yukio, Maeshima Masayoshi, Rahman Abidur, Uemura Matsuo	4. 巻 61
2. 論文標題 Plasma Membrane Aquaporin Members PIPs Act in Concert to Regulate Cold Acclimation and Freezing Tolerance Responses in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 787 ~ 802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa005	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

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Aya Hanzawa, Abidur Rahman
2. 発表標題 ACTIN ISOVARIANT ACT8 REGULATES THE COLD RESPONSE IN ARABIDOPSIS ROOT
3. 学会等名 American Association for the Advancement of Science (AAAS) Annual meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Sugita, Abidur Rahman
2. 発表標題 RIC2 AND RIC4 ACT REDUNDANTLY TO REGULATE THE ACTIN MEDIATED DEVELOPMENTAL PROCESS
3. 学会等名 American Association for the Advancement of Science (AAAS) Annual meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Abidur Rahman
2. 発表標題 Using newly discovered cesium and arsenite transporters for phytoremediation
3. 学会等名 International Biotech Symposium 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Abidur Rahman
2. 発表標題 Integration of auxin, protein trafficking, and actin in low-temperature stress response pathway: a paradigm shift
3. 学会等名 Graduate course seminar-University of Saskatchewan (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Abidur Rahman
2. 発表標題 ntegration of auxin, protein trafficking, and actin in low-temperature stress response pathway: a paradigm shift
3. 学会等名 Biology Seminar- University of Masscahusetts (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Abidur Rahman
2. 発表標題 Identification of regulatory gene network for molecular breeding and genome editing to develop abiotic stress resilient crops: linking basic to applied research
3. 学会等名 Day long international symposium of Bangladesh Plant Breeding Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keita Ito, Yuhi Ino, Takashi Akihiro, Keitaro Tanoi, and Abidur Rahman
2. 発表標題 The ATP Binding Cassette subfamily G protein 36 (ABCG36) is not a functional cadmium exporter
3. 学会等名 63rd Annual meeting of Japanese society of plant physiologists (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aya Hanzawa, Marika Yamauchi, and Abidur Rahman
2. 発表標題 Actin isovariant ACT2-mediated cellular auxin homeostasis regulates lateral root organogenesis
3. 学会等名 63rd Annual meeting of Japanese society of plant physiologists (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 土壌中の放射性セシウムの除染に必要な成分の特定	発明者 アビドゥール ラーマン、秋廣 高志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2023-58203	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

AAAS Annual Meeting 2021 でポスター発表3位を受賞 https://www.iwate-u.ac.jp/info/news/2021/04/004038.html AAAS Annual Meeting 2021 でポスター発表2位を受賞 https://www.iwate-u.ac.jp/info/news/2021/04/004037.html セシウム吸収 植物の力 岩手大の准教授ら、タンパク質 2 種発見 https://www.iwate-np.co.jp/article/2021/2/17/92217 岩手大など、セシウムを効率的に取り込む植物タンパク質を同定 https://tenbou.nies.go.jp/news/jnews/detail.php?i=31325 セシウムを効率的に取り込む植物タンパク質を世界で初めて同定 https://www.iwate-u.ac.jp/cat-research/2021/02/003917.html

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
研究 分 担 者	宮崎 雅雄 (Masao Miyazaki) (20392144)	岩手大学・農学部・教授 (11201)	

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
---------	---------