

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780305

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耐塩性メカニズムの解明

研究課題名（英文） Dissecting the salt-tolerance mechanisms of natural variation in salt tolerance of plants

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）：*Thellungiella salsuginea* は、シロイヌナズナと近縁種にも関わらず、海水程度の塩濃度下でも生育可能な他、凍結や高温にも高い耐性を示すことから、植物のストレス耐性を研究する上で非常に優れた遺伝子資源である。本研究では、*Thellungiella* 由来の完全長 cDNAs を用い、機能獲得型スクリーニングとして開発された FOX hunting により、耐塩性あるいは高温耐性を付与する遺伝子の同定を試みた。塩・高温ストレス関連遺伝子群、転写因子、トランスポーターの計 450 遺伝子について耐性評価を行った結果、3 個の耐性付与遺伝子の単離に成功した。

研究成果の概要（英文）：*Thellungiella salsuginea* (previously *Thellungiella halophila*) is used as a model system for understanding abiotic stress tolerance. It shows tolerance not only to extreme salinity stress, but also to chilling, freezing, and ozone stresses. In this study, we identified salt or heat tolerance genes from *T. salsuginea* full-length cDNAs via FOX hunting, a novel gain-of-function gene hunting system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：塩生植物、完全長 cDNA、耐塩性、トランスジェニック植物、高温耐性

1. 研究開始当初の背景

近年、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。なかでも旱魃や灌漑に伴う農耕地の塩類集積は深刻で、その被害は100カ国以上に及び、(Rengasamy, 2006 *J.*

Exp. Bot.)。

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。塩ストレス応答に関しては、耐塩性に必須の遺伝子群の他、耐塩性を付与することの出来る遺伝子も明らかとなり、近年、申請者らの研究を含みいくつかの耐塩性植物が作出されている(Taji *et al.*, 2002 *Plant J.*, Taji *et al.*, 2006 *Subcellular Biochemistry review*)。しかしながら、これらの成功例は、特に耐性を示さない *Arabidopsis* の耐塩性メ

カニズムに関する遺伝子を導入することによるものがほとんどであり、「(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、自然界には塩に対して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。ところが最近、*Arabidopsis* に近縁の塩生植物、*Thellungiella salsuginea* 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。

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*; Inan *et al.*, 2004 *Plant Physiol*; Li *et al.*, 2006 *Plant Cell Environ*; 挿入図参照)。これらの事実は *Thellungiella* が植物の非生物ストレス耐性を研究する上で、非常に優れた遺伝子資源であることを示している。

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植物ホルモン、ABA を処理した植物を用いて、完全長 cDNA ライブラリーを作製した。20,000 クローンについて両端読みシークエンスを行い、そのアノテーション情報を日本 DNA データバンク (DDBJ) に登録し (申請者が first author)、2008 年 10 月より情報公開した (Taji *et al.*, 2008 *BMC Plant Biology*)。

2. 研究の目的

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.* 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 (極矮性トマト) を対象に行い、耐塩性および高温耐性を付与することの出来る遺伝子を単離すると同時に、耐性作物の作出を試みる。

3. 研究の方法

20,000 クローンをを用いた両端読みシークエンスの結果、この 20,000 クローンに関しては、9,569 の独立したクローンを含むことが明らかとなった。そこで、FOX hunting の高速化・効率化を図るため、これまでに報告されている *Thellungiella* のストレス応答に関する論文 (主にマイクロアレイより得られたデータ) を中心に、以下の遺伝子群を抽出した。

- (1) 塩ストレス関連遺伝子 (433 遺伝子)
- (2) 高温ストレス関連遺伝子 (264 遺伝子)
- (3) 転写因子 (374 遺伝子)
- (4) トランスポーター (90 遺伝子)

先行研究において、上記の合計 1,161 遺伝子のうち、450 遺伝子について、1 遺伝子 8 ラインの FOX hunting ラインの整備が終了していた。そこで本研究では、全遺伝子のライン整備を進める一方、得られたラインから順次、耐性試験を行った。

4. 研究成果

平成 22 年度内に、耐塩性付与遺伝子と高温耐性付与遺伝子を 1 個ずつ、FOX hunting により同定することに成功した。1 個の高温耐性付与遺伝子については、転写因子をコードしており、マイクロアレイ解析の結果、高温誘導生遺伝子群が顕著に発現誘導されていることが明らかとなった。乾燥耐性に関わることが知られている遺伝子が顕著に高発現していたことから、乾燥耐性に供したところ、顕著な乾燥耐性も示すことが明らかとなった。論文に必要なデータが出そろったため、現在投稿準備中である。耐塩性付与遺伝子についても、転写因子であったことから、本遺伝子が遺伝子発現制御している下流遺伝子群を明らかにするために、マイクロアレイ解析を行った。しかしながら、非ストレス条件の野生型植物とトランスジェニック植物を比較したところ、大きな違いは認められなかったことから、ストレス処理により活性化される転写因子であることが示唆された。実際にいくつかの遺伝子についてストレス条件下における野生型とトランスジェニック植

物の発現解析を行ったところ、違いが認められた。さらに平成 23 年度に行ったスクリーニングにより、耐塩性および高温耐性の両方を付与する遺伝子を 1 個見いだすことに成功した。

本課題で得られた高温・乾燥耐性付与遺伝子は、極めて高い耐性を付与することが明らかとなった。これは不慣れな実験者が試験に供しても差が認められるほどで、非常に応用が期待される。現在、論文作成とともに特許申請を進めている。また当該遺伝子についてはモデル作物である Micro-Tom に遺伝子導入しており、高温・乾燥耐性作物の作出が期待される。

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 3 件)

Kaku T, Baba K, Taniguchi T, Kurita M, Konagaya K, Ishii K, Kondo T, Serada S, Iizuka H, Kaida R, Taji T, Sakata Y, Hayashi T. Analysis of leaves from open field-grown transgenic poplars overexpressing xyloglucanase. J Wood Sci., 査読有, 2012, in press
DOI: 10.1007/s10086-011-1247-1

Taji T, Komatus K., Katori T., Kawasaki Y., Sakata Y., Tanaka S., Kobayashi M., Toyoda A., Seki M., Shinozaki K. Comparative genomics by analyzing of 1,047 completely sequenced cDNAs from an Arabidopsis related model halophyte, *Thellungiella halophila*. BMC Plant Biology, 査読有, 10, 2010, 1-10
DOI: 10.1186/1471-2229-10-261

Y. Sakata, I. Nakamura, T. Taji, S. Tanaka, R. S. Quatrano. Regulation of the ABA-responsive Em promoter by ABI3 in the moss *Physcomitrella patens*: role of the ABA response element and the RY element. Plant Signal Behav., 査読有, 10, 2010, 1-6
DOI: 10.4161/psb.5.9.11774

[学会発表](計 16 件)

太治輝昭 他、耐塩性シロイヌナズナが有する塩馴化機構の解明、日本植物生理学会、平成 24 年 3 月 16 日、京都

神山綾子、太治輝昭 他、*A. thaliana* accessions 間における Li 耐性バリエーションの解析、日本植物生理学会、平成 24 年 3 月 16 日、京都

東由佳理、太治輝昭 他、FOX hunting に

より得られた *T. salsuginea* 熱耐性付与転写因子の解析、日本植物生理学会、平成 24 年 3 月 16 日、京都

新岡祥平、太治輝昭 他、シロイヌナズナ accessions におけるセシウム吸収メカニズムの解明、日本植物生理学会、平成 24 年 3 月 16 日、京都

上杉晴輝、太治輝昭 他、*Thellungiella* 完全長 cDNA を用いた耐塩性 FOX hunting により同定された AP 型転写因子の機能解析、日本植物生理学会、平成 24 年 3 月 16 日、京都

有賀裕剛、太治輝昭 他、耐塩性 *Arabidopsis thaliana* Zu-0 の SOS1 変異株より明らかとなった耐塩性における塩馴化能の重要性、日本植物細胞分子生物学会、平成 23 年 9 月 6 日、福岡

東由佳理、太治輝昭 他、FOX hunting により得られ *Thellungiella* 熱耐性付与転写因子の解析、日本植物細胞分子生物学会、平成 23 年 9 月 6 日、福岡

新岡祥平、太治輝昭 他、Cs 吸収抑制法の健闘及び吸収メカニズムの解明、日本植物細胞分子生物学会、平成 23 年 9 月 6 日、福岡

上杉晴輝、太治輝昭 他、*Arabidopsis* への耐塩性付与が確認された AP2 型転写因子の機能解析、日本植物細胞分子生物学会、平成 23 年 9 月 6 日、福岡

Ariga H., Taji T et al., Important roles of salt acclimation ability in plant salt tolerance revealed from *sos1* mutant of *Arabidopsis thaliana* Zu-0., Strategies of Plants against Global Environmental Change, 平成 23 年 12 月 8 日、Okayama

東由佳理、太治輝昭 他、FOX hunting を用いた *Thellungiella halophila* 熱耐性付与遺伝子の探索、日本植物生理学会、平成 22 年 3 月 21 日、仙台

新岡祥平、太治輝昭 他、*Arabidopsis thaliana* accessions を用いた Cs ストレス耐性メカニズムの解明、日本植物生理学会、平成 22 年 3 月 21 日、仙台

鈴木江莉菜、太治輝昭 他、モデル塩生植物 *Thellungiella halophila* の転写因子を用いた耐塩性付与遺伝子の探索、日本植物生理学会、平成 22 年 3 月 21 日、仙台

静秀人、太治輝昭 他、*T. halophila* 完全長 cDNA 9569 クローンを用いた *A. thaliana* への FOX hunting、日本植物生理学会、平成 22 年 3 月 21 日、仙台

堀口茜、太治輝昭 他、耐塩性シロイヌナズナおよび塩生植物 *Thellungiella* のイオンビーム照射種子を用いた塩高感受性変異株の単離、高崎量子応用研究シンポジウム、平成 22 年 10 月 15 日、高崎

鈴木江莉菜、太治輝昭 他、*Thellungiella halophila* 転写因子を用いたストレス耐性遺伝子の Full-length cDNA overexpressor gene hunting、日本植物細胞分子生物学会、平成 22 年 9 月 3 日、仙台

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：