

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580483

研究課題名(和文) 塩生植物の完全長cDNAを用いた耐塩性・高温耐性付与遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of genes responsible for heat and salinity stress tolerances via FOX hunting among collection of *E. salsugineum* cDNAs

研究代表者

太治 輝昭 (Taji, Teruaki)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：60360583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナ近縁の塩生植物 *Eutrema salsugineum* は、海水と同程度の塩濃度下でも生育可能な耐塩性を示すほか、凍結、酸化ストレスなどに耐性を示す。本研究では、*E. salsugineum* が高温ストレスにも耐性を示すことを明らかにした。*E. salsugineum* の完全長cDNAライブラリーを利用し、機能付加による網羅的な遺伝子探索技術であるFOX hunting (Full-length cDNA overexpressor gene hunting) を用いて、シロイヌナズナに熱耐性を付与する遺伝子の探索を行った。その結果、高温耐性付与遺伝子としてTsHsfA1dを同定した。

研究成果の概要(英文)： *Eutrema salsugineum* (also known as *TheIlungiella salsuginea*), a species closely related to *Arabidopsis thaliana*, shows tolerance not only to salt stress, but also to chilling, freezing, and high temperatures. To identify genes responsible for stress tolerance, we conducted Full-length cDNA Over-expressing gene (FOX) hunting among a collection of *E. salsugineum* cDNAs that were stress-induced according to gene ontology analysis or over-expressed in *E. salsugineum* compared with *A. thaliana*. In this study, we identified *E. salsugineum* HsfA1d (TsHsfA1d) via the FOX hunting as a gene that can confer marked heat tolerance on *A. thaliana*. Transgenic *A. thaliana* overexpressing TsHsfA1d showed constitutive up-regulation of many genes in the *A. thaliana* AtHsfA1 regulon under normal growth temperature. We propose that the products of TsHsfA1d function as positive regulators of *A. thaliana* heat-stress response and would be useful for the improvement of heat-stress tolerance in other plants.

研究分野：植物遺伝子工学

キーワード：塩生植物 完全長cDNA 耐塩性 高温耐性 トランスジェニック植物 シロイヌナズナ *TheIlungiella Eutrema salsugineum*

## 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、作物の高温ストレス耐性は近年の大きな課題となっている。

一般的に、至適温度から 10-15°C 上昇すると植物の生育阻害が起こる。植物は高温ストレスから身を守るために高温ストレス応答を誘導し、タンパク質の熱変性を防ぐ Heat Shock Protein (HSP) などの遺伝子発現を誘導する。HSP は高温耐性に重要な役割を果たしており、HSP を欠損した植物体では高温に弱くなることや、逆に、HSP を高発現させた植物体では高温耐性が高まることが知られている。この HSP の遺伝子発現は、転写因子である Heat Shock Factor (Hsf) により制御されており、中でも *HsfA1* グループが重要であると考えられている。しかしながら、各 *HsfA1* 遺伝子が制御する遺伝子群やその機能については不明な点が残されている。

高塩濃度や凍結ストレスについては、シロイヌナズナ近縁の *Eutrema salsugineum* (*Thellungiella salsuginea* としても知られる。以下、*E. salsugineum*) が、シロイヌナズナと核酸レベルで 90%程度の相同性を有するにも関わらず、これらのストレスに極めて高い耐性を示すことから、ストレス耐性植物のモデルとして、ゲノムシーケンスをはじめとする研究基盤が整えられつつあった。

## 2. 研究の目的

本研究では、*E. salsugineum* について、細胞レベルあるいは個体レベルにおける高温ストレス耐性について調べる。また、*E. salsugineum* の遺伝子資源を用いて、耐塩性・高温耐性付与遺伝子の網羅的な探索、および耐性作物の作出を試みることを目的とした。

## 3. 研究の方法

20,000 クローンを用いた両端読みシーケンスの結果、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。

塩ストレス関連遺伝子 (433 遺伝子)  
高温ストレス関連遺伝子 (74 遺伝子)  
転写因子 (374 遺伝子)  
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 971 遺伝子中、約 700 遺伝子について、1 遺伝子 8 ラインの FOX hunting ライン(過剰発現株)の整備が進んでいた。本課題では、900 遺伝子を

目標にトランスジェニック植物を作成し、得られたラインから順次、耐性試験を行った。

## 4. 研究成果

(1) *E. salsugineum* がシロイヌナズナと比較して、植物個体レベルでも、細胞レベルでも著しい高温耐性を示すことを明らかにした。

(2) ライブラリーに含まれる *E. salsugineum* 遺伝子の中から、高温ストレス応答への関与が示唆される遺伝子群を 78 個選抜し、それぞれの遺伝子を高発現するようにシロイヌナズナへ導入後、その高温耐性を評価した。その結果、シロイヌナズナの *HsfA1d* と核酸レベルで相同性の高い遺伝子、*TsHsfA1d* (*E. salsugineum*/*T. salsuginea HsfA1d*) を導入した植物が、野生型植物と比較して顕著な高温耐性を示すことが明らかとなった。なお、本遺伝子を導入した植物は、通常生育条件下においては、野生型植物と同様の生育を示したことから、植物の正常な生育を阻害すること無く、顕著な高温耐性を付与することが明らかとなった。

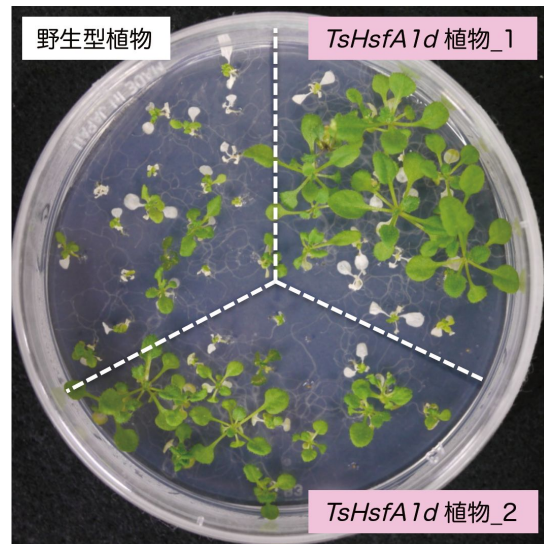


図 1 野生型植物と *TsHsfA1d* 植物の高温耐性

次に *TsHsfA1d* が制御する遺伝子群を明らかにする 15 ために、マイクロアレイ解析を行った。その結果、45 個の遺伝子群が野生型植物と比較して、4 倍以上も高発現していることが明らかとなった。これら遺伝子群のほとんどは高温ストレスによって発現が誘導される遺伝子群であり、その中には、HSP をコードする遺伝子群や、同じ *Hsf* である *HsfA2*、熱・乾燥・塩ストレス耐性への関与が知られている *MBF1c* や、*GolS1* が含まれていた。また、*hsfA1a/b/d* の三重変異体において、遺伝子発現が低下していた遺伝子群と比較したところ、82%の遺伝子が、*TsHsfA1d* 遺伝子によって制御されていることが明らかとなった。以上の結果から、*TsHsfA1d* は非常に多くの高温ストレス誘導を示す遺伝子群の発現

を誘導することにより、通常の生育に影響を与えず、高温耐性を著しく強化することが明らかとなった。

(3) 塩ストレス関連遺伝子(433 遺伝子)を対象にした FOX hunting により、耐塩性付与遺伝子を1つ同定した。本遺伝子はトランスポーターをコードする遺伝子であったが、ストレス耐性などについて報告例が無く、新規の耐塩性付与遺伝子であることが示唆された。

*E. salsugineum* は、完全長 cDNA ライブラリー、マイクロアレイ、ゲノムシークエンス情報などの研究ツールが整えられており、かつ、シロイヌナズナと同様、サイズが小さく、生活環が短く、遺伝子導入方法も確立されていることから、今後も、高温耐性に関わる有用遺伝子の単離が期待される。特に研究グループが有する完全長 cDNA ライブラリーは、ストレス耐性を付与するための貴重な遺伝子資源と言える。また、*TsHsfA1d* 導入植物は植物の正常な成長に影響すること無く、顕著な高温耐性を付与したことから、高温耐性作物の開発が期待される。

#### 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 5 件)

Group A PP2Cs evolved in land plants as key regulators of intrinsic desiccation tolerance. Komatsu K, Suzuki N, Kuwamura M, Nishikawa Y, Nakatani M, Ohtawa H, Takezawa D, Seki M, Tanaka M, Taji T, Hayashi T, Sakata Y. Nat Commun. 2013;4:2219.

doi: 10.1038/ncomms3219

Arabidopsis *sos1* mutant in a salt-tolerant accession revealed an importance of salt acclimation ability in plant salt tolerance. Ariga H, Katori T, Yoshihara R, Hase Y, Nozawa S, Narumi I, Iuchi S, Kobayashi M, Tezuka K, Sakata Y, Hayashi T, Taji T. Plant Signal Behav. 2013 Jul;8(7):e24779.

doi: 10.4161/psb.24779

ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 regulates abscisic acid-responsive gene expression with the nuclear factor Y complex through the ACTT-core element in *Physcomitrella patens*. Yotsui I, Saruhashi M, Kawato T, Taji T, Hayashi T,

Quatrano RS, Sakata Y. New Phytol. 2013 Jul;199(1):101-109.

doi: 10.1111/nph.12251

HsfA1d, a protein identified via FOX hunting using *Thellungiella salsuginea* cDNAs improves heat tolerance by regulating heat-stress-responsive gene expression. Higashi Y, Ohama N, Ishikawa T, Katori T, Shimura A, Kusakabe K, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishida J, Tanaka M, Seki M, Shinozaki K, Sakata Y, Hayashi T, Taji T. Mol Plant. 2013 Mar;6(2):411-22.

doi: 10.1093/mp/sst024

A novel *abi5* allele reveals the importance of the conserved Ala in the C3 domain for regulation of downstream genes and salt tolerance during germination in *Arabidopsis*. Tezuka K, Taji T, Hayashi T, Sakata Y. Plant Signal Behav. 2013 Mar;8(3):1-8.

doi: 10.4161/psb.23455

[学会発表](計 7 件)

笹生保孝, 高村知世, 三浦智貴, 江面浩, 坂田洋一, 林隆久, 太治輝昭, *Thellungiella salsuginea* Heat shock factor A1d (*TsHsfA1d*) 過剰発現トマトの高温耐性評価、日本植物生理学会、2015年3月16-18日、東京

Fukuuchi T, Seki M, Shinozaki K, Sakata Y, Hayashi T, Taji T. Identification of salt tolerance genes via FOX hunting system using 9,569 *Thellungiella* full length cDNA clone. 日本植物生理学会、2014年3月18-20日、富山

Nagashima Y, Seki M, Shinozaki K, Sakata Y, Hayashi T, Taji T. Functional analysis of a transporter gene conferring salt tolerance to *Arabidopsis* via FOX hunting using *Thellungiella* cDNAs. 日本植物生理学会、2014年3月18-20日、富山

福内琢也, 関原明, 篠崎一雄, 坂田洋一, 林隆久, 太治輝昭、塩生植物 *Thellungiella* 由来の完全長 cDNA ライブラリーを用いた耐塩

性付与遺伝子の FOX hunting、日本植物細胞分子生物学会大会、2013 年 9 月 10-12 日、札幌

長島由布子、関原明、篠崎一雄、坂田洋一、林隆久、太治輝昭、塩生植物 *Thellungiella* cDNA を用いた FOX hunting より得られた耐塩性付与遺伝子の解析、日本植物細胞分子生物学会大会、2013 年 9 月 10-12 日、札幌

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
プレスリリースなど  
「植物の高温耐性を強化する遺伝子を発見」

[http://www.nodai.ac.jp/hojin/upload/News\\_Release\\_20130208.pdf](http://www.nodai.ac.jp/hojin/upload/News_Release_20130208.pdf)

環境緑化新聞(2013年2月15日)

科研費 NEWS 2013 年度 Vol.1

## 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・准教授  
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) 協力研究者

東 由佳里 (HIGASHI, Yukari)  
有賀 裕剛 (ARIGA, Hirotaka)  
笹生 保孝 (SASO, Yasutaka)  
長島 由布子 (NAGASHIMA, Yuko)  
福内 琢也 (FUKUUCHI, Takuya)