

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870262

研究課題名(和文) アイスプラントの耐塩性分子機構解明への挑戦

研究課題名(英文) Elucidation of salt tolerance mechanism in the ice plant.

研究代表者

塚越 啓央 (Tsukagoshi, Hironaka)

名古屋大学・PhD登龍門推進室・特任講師

研究者番号：30594056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：地球上の耕地面積の約1/3が塩害被害を受け、作物の生産性が著しく低下している。高塩土壌でも生育可能な耐塩性植物アイスプラントがどのようにして耐塩性を獲得しているかを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

高速シーケンサーを用いたRNAseq解析から、アイスプラントのmRNAデータベースを構築し、さらに非耐塩性植物のシロイヌナズナとの比較解析を行った。その結果、アイスプラントは固有の遺伝子発現制御を通じて耐塩性を獲得していると示唆された。

今後はこのデータベースから耐塩性に関わる重要な遺伝資源が獲得されると期待される。

研究成果の概要(英文)：Nowadays, high saline environment become very serious problem for the agriculture all over the world. To elucidate the salt tolerance mechanisms that halophyte possess originally is very important for the plant science field. To gain this knowledge, we investigated gene expression profile in the ice plant. Ice plant is known as the halophyte and this plant relatively easy to handle in the lab. We treated ice plant with various concentration of the salt and had done the RNAseq analysis. Then we performed comparison analysis between our data sets and Arabidopsis expression data sets. As the result of our analysis, we found that ice plant showed the unique gene expression under the high salt condition. By using our data sets, we will find new gene regulatory network that involves in salt tolerances.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：アイスプラント 非モデル植物 耐塩性 転写制御

1. 研究開始当初の背景

土壌環境は重要で直接作物生産性に影響を与えている。特に塩害克服は重要な作物生産性の維持向上における課題で、植物は高塩条件下では生育が制限され植物全体が矮小化し、枯死してしまう。砂漠化の進行や、洪水による冠水により、土壌中に塩が濃縮されてしまうことで多くの耕作地が高塩土壌もしくは、植物生育に適さない塩濃度を含む土壌になってしまっている。FAO の報告ではこのような土壌は世界耕地面積の 3 分の 1 を超えているという。このような塩害を乗り越える植物の新しい機能解析は作物生産性を考えた上で非常にプライオリティの高い研究課題といえる。

2. 研究の目的

土壌変化は植物の根が最初に検知することから、根の成長制御機構や高塩耐性機構を解明することは植物全体の大きさを制御するのに重要であるといえる。植物の根は地下部から植物体全体を支える重要な支持器官としてだけでなく、土壌中の水分や成長に必須な栄養素を吸収し、植物体全体に循環させるという役割を持つ。一般的に根の大きさを十分に担保することができれば、植物体全体の大きさを制御することが可能で、根の成長戦略を研究することは植物バイオマス、生産性の向上の観点から重要である。そこで本研究課題では高塩条件下でも根の成長を進めることができるような新たな遺伝資源を包括的に検索し、その機能を解析することを第一の目的とした。

現在までに植物科学で広く研究が進められていたモデル植物シロイヌナズナは耐塩性植物ではなく、その遺伝子操作による耐塩性の獲得の度合いは劇的なものではない。そこで、本研究においては耐塩性植物のアイスプラントを使用し、野生種が持つ強力な耐塩性機構を応用できる基盤技術の解明を目的とした。アイスプラントは 2 倍体でありゲノムサイズが比較的小さく、かつ幼植物体は合成培地上で生育可能である。また、そのため顕微鏡を用いた解剖学的解析を進めることができ、耐塩性のモデル植物として適していると考えられる。我々はその特性を生かし、アイスプラントの幼植物体を 0, 140, 250, 500 mM の NaCl 処理を施し、そこから RNA を抽出して高速シーケンサーを用いた包括的な RNAseq 解析を進めていた。このデータセットからデータベースを構築し、広く植物科学者が使用できるようにすることも本研究課題の目的の一つである。また、このデータベースからアイスプラント中で NaCl によってその遺伝子発現が変化する遺伝子を選択し、耐塩性に関わる新たな遺伝資源の獲得とその機能解析を進めることとした。

3. 研究の方法

(1) アイスプラント中の遺伝子発現ネットワークの解明

アイスプラント RNAseq データを用い、データベースを構築しシロイヌナズナとの遺伝子発現ネットワークの比較解析を行う。この比較解析から得られた知見をまとめアイスプラントの持つ耐塩性遺伝子発現ネットワークの概要を明らかにする。

(2) アイスプラント遺伝子を用いた耐塩性獲得機構の解明

アイスプラント発現データベースから、NaCl に顕著に応答するような遺伝子を検索し、それらの遺伝子をクローニングして機能解析を進める。アイスプラントを用いた形質転換方は確立されていないため、選抜した候補遺伝子群をシロイヌナズナ中で過剰発現することにより、その形質評価を行う。また、候補遺伝子群に関してはアイスプラントの根での発現を *in situ hybridization* を用いてそれらの発現部位や時期を特定する。

4. 研究成果

(1) アイスプラント中の遺伝子発現ネットワークの解明

アイスプラントはゲノムが解読されていないため、RNAseq で得られたデータを Trinity によってアッセンブルし、53,516 のコンティグを得た。その後、シロイヌナズナのオーソログ遺伝子として 10,818 を同定しさらなる解析に用いた。まず、この一万遺伝子の発現変動を DEseq により明らかにした。この発現変動データセットを用い、公開データベースからシロイヌナズナの NaCl 処理によるトランスクリプトームデータとの比較解析を行った。その結果、シロイヌナズナとアイスプラントでは遺伝子発現様式が大きく異なることがわかった。また、アイスプラントデータベースの信頼性を確認するために、独立に RNA を抽出したサンプルを用い、RT-qPCR 解析を進めたところ、任意に抽出した約 20 の遺伝子で RNAseq の結果と一致した。この結果は本アイスプラントの発現データと mRNA シークエンス情報の信頼性の高さを示している。

興味深いことに、アイスプラントでは "peroxidase activity" に関わる遺伝子群は NaCl で発現低下するが、シロイヌナズナでは発現低下しない。peroxidase 遺伝子群は根の伸長において重要な役割を担い、シロイヌナズナでのペルオキシダーゼ発現上昇が根の伸長促進を起こすことが知られている。アイスプラントでの "peroxidase activity" 遺伝子の発現低下は高塩濃度下で観察される根の伸長の抑制と一致する。さらには、このカテゴリーはシロイヌナズナのデータセットにおいて塩処理により発現が上昇し、RT-qPCR の結果少なくとも 2 つのペルオキシダーゼ遺伝子 (*At1g30870* と

At1g05260) がシロイヌナズナとアイスプラントでは正反対の制御を受けることが分かった。*Mcr016912.000* はシロイヌナズナ RCI3 ペルオキシダーゼ遺伝子(*At1g05260*) のオルソログであり、NaCl 処理に反応しアイスプラント内で発現量が減少していた。シロイヌナズナにおいて RCI3 の過剰発現株は、塩ストレス下では成長が抑制されることから、異なる様式でシロイヌナズナとアイスプラントはペルオキシダーゼ発現を調節していると考えられた。しかしながら、今回の blast 解析でアノテートされなかった遺伝子の中に RCI3 と同様の機能を持つアイスプラント遺伝子が存在することも否定できず、今後はアイスプラント中で新奇の RCI3 様ペルオキシダーゼの解析を進める必要がある。

DREB2A CA OX のトランスクリプトームデータと本研究のアイスプラントのトランスクリプトームのデータセットを比較すると、両方の種で有意に影響を受けた遺伝子の数は極めて少なかった。アイスプラント遺伝子の 1 つ、cationic peroxidase は、シロイヌナズナ *At1g308870* のオーソログであり、強く発現誘導されたが、DREB 2A OX では発現上昇を示さなかった。これらのデータも同様に、アイスプラントが塩ストレスに反応する際に、シロイヌナズナとは異なる機構を用いている可能性を示唆している。シロイヌナズナでは DREB 2A に加えて、耐塩性に関わる複数の転写因子が数多く報告されている。アイスプラントの RNAseq のデータセットを DREB2A 以外の転写因子を用いたトランスクリプトーム解析等と比較することは耐塩性メカニズムの更なる詳細の解明に役立つだろう。シロイヌナズナの研究で同定された耐塩性遺伝子は、植物が塩ストレスに晒されていないときでさえ、既にアイスプラント内では高レベルで発現している可能性も存在する。この理由から、アイスプラントは 140 mM の塩処理に耐性を示し、根は伸長を続けることができるかもしれない。今後はこの点も踏まえて、耐塩性に関わる遺伝子群の絶対的な発現の解析や、タンパク質の挙動を解析していく必要が考えられた。

アイスプラントとシロイヌナズナ中で発現様式が異なる遺伝子が存在する一方で、本研究で解析している遺伝子のいくつかは、シロイヌナズナとアイスプラントの両方で塩に反応して同じ発現様式を示した。しかしながら、シロイヌナズナで塩反応時に濃縮された 31 の GO カテゴリーのうち、わずか 5 つの GO カテゴリー、"response to heat"、"response to cold"、"response to water deprivation"、"response to high light intensity"、"response to abscisic acid stimulus"のみが、シロイヌナズナとアイスプラントの両方で発現上昇していた。塩処理はアイスプラントの根においてもシロイヌナズナと同様に、内在性の ABA レベルを上昇させることが知られている。この知見

と、RNAseq から得た遺伝子発現データを合わせて考えると、ABA がアイスプラントとシロイヌナズナの両方での塩ストレス応答に、シグナル分子として重要な役割を担うことが考えられる。今回の解析でも "response to abscisic acid stimulus" がアイスプラント中でも発現誘導を受けていることから、今後は ABA に関するアイスプラントでの解析を進める必要がある。

耐塩性に関連のある遺伝子座を同定するために、シロイヌナズナの耐塩性の QTL 解析が行われ、シロイヌナズナのアクセッション 350 系統が調査されている。耐塩性試験の中で強い耐塩性を示した系統 Bu-5 が発見され、Bu-5 を用いたトランスクリプトーム解析が行われている。その結果 -1-pyrroline-5-carboxylate synthetase 1(P5CS1;At2g39800) の発現が上昇していることが示された。P5CS はプロリン生合成の律速段階を制御する酵素であり、植物はストレス応答時にプロリンを蓄積すると知られている。先行研究で、アイスプラントの根で塩処理に反応してプロリンの蓄積が起こることも示されており、実際に今回の RNAseq データセットにおいても P5CS1 のオルソログが発現上昇を示した。以上の結果から、ストレス応答時のプロリンの蓄積に関しては広く植物種を超えて保存されていると考えられた。

表現型を指標にした QTL 解析から得られた Bu-5 だけでなく、各アクセッションのゲノム情報を用いたシロイヌナズナアクセッションに関する耐塩性に関わる遺伝子座の解析も行われている。Arabidopsis 1001 genome データを用いた GWAS 解析から、ナトリウムトランスポーター HKT1 をコードする遺伝子に SNP が同定されている。HKT1 はナトリウムイオンを根から地上部(葉)への輸送を調節し、塩耐性に関わる輸送体である。シロイヌナズナの *hkt1* 変異株は葉への異常な Na⁺ の蓄積を示し、塩耐性が著しく下がる。一方、アイスプラントでは、塩を根から地上部へと輸送し、葉の表面にある epidermal bladder cell に蓄積する機構が耐塩性の要因の一つであると報告されている。本研究では、アイスプラントにある *AtHKT1;1* のオーソログ *Mcr004515.000* が NaCl 処理に反応して有意に発現低下していた。シロイヌナズナとアイスプラントで、塩処理に反応した時の *AtHKT1;1* とそのアイスプラントオーソログ *Mcr004515.000* の発現様式は類似しており、このことはアイスプラントの耐塩性において、超過量のナトリウムイオンを輸送し細胞内で隔離する能力も重要な役割を果たすことを示唆している。今後は様々な塩濃度で処理したアイスプラントの、根と地上部におけるナトリウムイオンの蓄積量を比較することで、HKT1 を介した塩耐性機構が保存されているかどうかを調べることも重要であろう。

本研究ではアイスプラント (*M. crystallinum*) 根を用いての NaCl への応答についての包括的なトランスクリプトーム解析を行った。RNAseq によって得られたアイスプラントの発現データベースを用いて、マイクロアレイを用いた先行研究のシロイヌナズナの遺伝子発現データと比較解析を行った。これらの解析から、アイスプラントとシロイヌナズナの2種類の塩ストレスに応答した遺伝子発現と、それらの発現様式が異なることを示すことができた。アイスプラントは一般に用いられるモデル植物種ではなく、全長ゲノム配列も解読されていない。しかし、RNAseq により作製したアイスプラントの各 NaCl 処理時のトランスクリプトームのデータセットを用いることで、アイスプラントの塩耐性に関わる新しい遺伝子発現様式を追うことが可能となった。また、全く不明であったアイスプラントにの遺伝子の推定 cDNA 配列が得られたことで、その配列に含まれる機能ドメインの情報や BLAST 検索による同源性検索の結果から、耐塩性に関与している可能性のある候補遺伝子を選定することが可能となった。(主な発表論文 1)。

(2)アイスプラント遺伝子を用いた耐塩性獲得機構の解明

実験項目(1)で構築したデータベースを用い、候補遺伝子群の絞り込みを行った。DEseq 解析の結果 0 mM NaCl コントロールと比較して発現が 2 倍以上もしくは 1/2 以下になり、FDR(False Discovery Rate)が 0.05 未満になる遺伝子を選抜した。その結果 2 倍以上に発現上昇する遺伝子は、140 mM で 28 個、250 mM で 203 個、500 mM で 163 個存在した。また 1/2 以上に発現低下する遺伝子は、140 mM で 72 個、250 mM で 78 個、500 mM で 20 個存在した。選抜した遺伝子の中でも、各塩濃度で発現変動が特に大きかった上位 30 番目までの遺伝子を以降の解析対象とした。さらに候補遺伝子を選抜するために、アミノ酸配列についての全生物種を対象にした BLAST 検索を行った。耐塩性に関わるタンパク質は、何らかの機能を持つと考え、遺伝子が指定するタンパク質の持つ機能ドメインに着目した。アイスプラントの各遺伝子の塩基配列を、本研究のアイスプラントのトランスクリプトーム解析データをまとめた WEB 上のデータベースである PoTHoS(<http://dandelion.liveholonics.com/pothos/Mcr/assembly/view>)から取得し、推定 ORF 領域のアミノ酸配列を BLAST 検索にかけ、機能ドメインの有無を調べた。これらの中でも特に転写制御因子に着目し、MADS box 様の DNA 結合ドメインを持つ遺伝子 Mcr015283.000 の過剰発現体をまず作成した。過剰発現をさせる際には、その細胞内局在や根での発現場所を容易にトレースできるように C 末端側に GFP を融合させる形で作成した。過剰発現させた Mcr015283.000 は、シロ

イヌナズナに複数コピーが導入されている可能性もあるが、T₁においても表現型の確認は可能であるため、まず T₁で生理試験を行った。薬剤選抜で生き残った個体のうち、GFP 蛍光の観察された個体を 3 日間 MS 培地で育て、50 mM となるように NaCl を加えた MS 培地に移して 3 日間生育させ、その様子を観察した。コントロールとして、薬剤選抜にも関わらず GFP 蛍光の観察されなかった個体を同様に 3 日間 MS 培地で育て、50 mM NaCl を含む MS 培地に移して 3 日間観察した。50 mM NaCl の 72 時間処理後において、Mcr015283.000 過剰発現株はコントロールに比べ根毛の発達と根の伸長が抑制された。また、これらの形質転換体においては GFP の蛍光が核のみで観察されたことから、Mcr015283.000 は転写制御因子として核内で働くことが示唆された。このことから Mcr015283.000 は塩ストレス下で遺伝子発現を調節し、根の成長制御に関わる可能性が示唆された。

ついで Mcr015283.000 のアイスプラントでの発現を調べるために、アイスプラントの根で whole mount in situ hybridization を行った。Mcr015283.000 の配列の一部に相補的な約 400 base の Anti-sense プローブと、その Anti-sense プローブに相補的な Sense プローブの、2 つの RNA プローブをそれぞれアイスプラントに反応させた。0 mM では、根端の推定メリステムゾーンでわずかに発現していた。また、140 mM の NaCl 培地で生育させたアイスプラントでは、推定メリステムゾーンで強く発現した。また、RNAseq のデータと RT-qPCR によって発現量を確認すると、確かに 140 mM の NaCl で発現が上昇していた。この結果からも Mcr015283.000 がアイスプラントの根で塩ストレスに応答して成長制御をしている可能性が示唆された。

Mcr015283.000 に対する BLAST の結果から、他にもワタ等の植物種がいくつか見つかったため、この遺伝子が他のどのような植物に保存された遺伝子であるかを解析するために、Mcr015283.000 に着目した進化的系統樹の作成を試みた。BLASTn 検索でヒットした各種の植物に存在する Mcr015283.000 のオーソログと考えられる遺伝子の DNA 配列と、Mcr015283.000 自身の DNA 配列から、MEGA(<http://www.megasoftware.net/>)を使用して進化的な系統樹を作成した。BLASTn の結果から、Mcr015283.000 の DNA 配列と相関性が高い遺伝子を上位から数えて 20 遺伝子まで採用した。選択する際、同じ植物種の遺伝子は最も上位に出てきた一つのみ採用した。その結果、アイスプラントの転写因子様遺伝子 Mcr015283.000 からみた進化的系統樹で、テンサイ (*Beta vulgaris ssp.*)、リクチメン (*Gossypium hirsutum*)、ワタ (*Gossypium raimondii*) といった植物の遺伝子が Mcr015283.000 と近縁であるという結

果が出た。テンサイ、リクチメン、ワタは、耐塩性の強い植物であるという報告がある。*Mcr015283.000* に着目した進化的な解析によってこれらの耐塩性を持つ植物の遺伝子がアイスプラントと近縁だという結果が出たことから、アイスプラントの転写因子様遺伝子 *Mcr015283.000* は、耐塩性に関する機能を持っていて、それがいくつかの耐塩性を持つ植物種の中で保存された機能を持つ可能性が考えられた。

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 1 件)

(1) H.Tsukagoshi, T.Suzuki, K. Nishikawa, S.Agarie, S. Ishiguro, T.Higashiyama, RNA-seq analysis of the response of the halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum* (ice plant) to high salinity. PLoS One 10, e0118339 (2015) 査読あり、doi: 10.1371/journal.pone.0118339.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 西川航軌, 鈴木孝征, 東江栄, 石黒澄衛, 東山哲也, 塚越啓央. *Mesembryanthemum crystallinum* を用いた植物耐塩性分子機構の解明. 第 57 回日本植物生理学会年会、岩手、2016.3 (口頭)

(2) 西川航軌, 鈴木孝征, 東江栄, 石黒澄衛, 東山哲也, 塚越啓央. *Mesembryanthemum crystallinum* を用いた植物耐塩性分子機構の解明. 第 56 回日本植物生理学会年会、東京、2015.3 (口頭)

〔その他〕

ホームページ等

アイスプラント発現データベース

PoTHoS(<http://dandelion.liveholonics.com/pothos/Mcr/assembly/view>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚越 啓央 (TSUKAGOSHI HIRONAKA)

名古屋大学・PhD 登龍門推進室・特任講師

研究者番号：30594056