

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22248006

研究課題名(和文) STOP1 転写因子が制御するマルチストレス耐性の理解と分子育種基盤の構築

研究課題名(英文) Molecular Understanding of STOP1-regulating system in plant stress tolerance

研究代表者

小山 博之 (KOYAMA, HIROYUKI)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90234921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,200,000 円、(間接経費) 10,260,000 円

研究成果の概要(和文)：酸性土壌を中心とする酸性ストレスは、植物の生育を阻害する大きな環境要因の一つである。この研究では、STOP1転写因子が発言を制御する遺伝子を特定することや、様々な植物が持つSTOP1の機能を確かめるための一連の実験を実施した。その結果、STOP1が制御する機構は、ヒメツリガネゴケを含む地上植物のすべてが保持する機構で、植物の環境適応に重要な植物免疫にかかわることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：STOP1, a zinc finger protein, regulates transcription of Al and proton tolerance genes in Arabidopsis. We characterized function of orthologous genes in various plant species, including woody plants, grass plants, and bryophyte. All plants conserved functional protein of STOP1-orthologues, which regulate expression of various acid and Alresistant genes. It indicated STOP1-regulating system is ubiquitous among wide range of land plant species. Expression of ALMT1, encoding malate transporter, is strictly regulated by STOP1. Expression of the gene is activated by Al, but is also activated by bacterial elicitors. The former protects root tips from Al toxicity, but the latter recruits veneficial bacteria that induce plant immunity. It indicated that STOP1 and regulating genes are likely a module that has multiple function in stress resistance of higher plants.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：STOP1 植物免疫 酸性土壌耐性

### 1. 研究開始当初の背景

植物の環境抵抗性を強化することは、生産性を向上させるだけでなく、世界的な食料問題の解決と植物生産の省資源・省エネルギー化にも貢献する。例えば、酸性土壌での作物生産には多量の石灰・燐酸肥料を投入する必要がある。これは、経済的に多量の肥料が使えないアフリカ最貧国では飢餓の原因となるとともに(経済的に多量の肥料が使えない)、先進国が展開するプランテーションでの資源の多量消費の原因となっている。そのため、国連のプロジェクト研究が推進されると共に各国で活発に研究されていた。

### 2. 研究の目的

申請者は、上記の背景の中でモデル植物シロイヌナズナを用いて、植物の酸性土壌耐性機構に関する研究を一貫して推進してきた。その過程で、(1) アルミニウム耐性に重要な遺伝子(リンゴ酸トランスポーター遺伝子)をシロイヌナズナで特定し(PNAS 誌 2006 年)、(2) その発現・活性化がリン酸化制御を受けること(Plant Physiol 誌 2007 年)および、(3) 発現を制御する転写因子 STOP1 (Sensitive TO Proton rhizotoxicity1) 遺伝子を発見した(PNAS 誌 2007 年)。STOP1 遺伝子は、本来、酸感受性変異株の原因遺伝子として単離されたが、その後の解析からアルミニウム耐性や、誘導抵抗を介する耐病性、冠水ストレスなどに関わる代謝機構も発現調節することが解かってきた(Plant Physiol 誌 2009)。本申請では、STOP1 が制御する遺伝子の役割と、発現制御の仕組みを解明するとともに、比較ゲノムアプローチによりマルチストレス耐性作物を作出する分子育種基盤を構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

最終的(4年間)に比較ゲノムによる分子育種基盤を構築するために、当初2年は発現制御に異常を持つ変異体の単離と高速マッピング(分子遺伝学、理研・井内)及び濃縮シス配列による下流遺伝子群のグルーピング(バイオインフォマティクス、岐阜大・山本)を実施して、制御系に関わる他の転写制御因子やセンサー遺伝子の特定を目指した。また、STOP1 変異体及びSTOP1 過剰発現シロイヌナズナのフェノーム解析(C/N 利用効率と光合成、東北大・鈴木;代謝マップ統合、岐阜大・小山、かずさDNA 研・櫻井)と、異種植物のSTOP1 相同遺伝子の単離と発現調節組換え体の作成を進め、STOP1 制御システムの植物種比較に着手した。最終的には、コケを含むモデル植物でSTOP1 システムの意義を実験的に評価した。

### 4. 研究成果

本研究の成果は最終年度に報告した5つの論文に集約されている。その成果を中心に説明する。

#### (1) リンゴ酸トランスポーターの複雑制御(論文4に該当)

シロイヌナズナのリンゴ酸トランスポーター遺伝子は、STOP1 が制御する主要遺伝子で、様々なストレス耐性の機能を担っている。これは、植物ホルモンや微生物由来のシグナル誘導物質に反応する複雑な制御を受けるものであることを遺伝子組換え体などを用いて明らかにした。

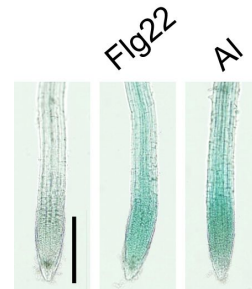


図1 シロイヌナズナ *AtALMT1* 遺伝子プロモーターで駆動する *GUS* 遺伝子は、Al だけでなく鞭毛タンパク質にも応答することが明らかとなった。

#### (2) リンゴ酸トランスポーター遺伝子の発現は細胞膜表面の Al 活動度で説明できる(論文7に相当)

STOP1 制御がどのように制御されるかを、細胞膜表面のアルミニウムイオン活動度で議論した。その結果、その遺伝子の発現は極めて低濃度のアルミニウムで誘導されることや、細胞膜表面電荷がアルミニウム耐性を支配する要因であることなどを含めて、実験的に証明することに成功した。

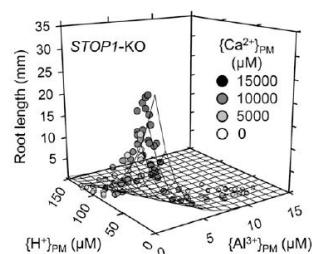


図2. STOP1 変異体のアルミニウム溶液中の生育は、細胞膜表面のアルミニウムイオン濃度で説明できる。

#### (3) リンゴ酸トランスポーターの過剰発現

体の解析 (論文 5 に該当)

シロイヌナズナの AtALMT1 はアルミニウム耐性ばかりでなく、有用菌の根表面へのリクルートにも関係する。シロイヌナズナで作成した過剰発現体では、両方の特性が改善されることが明らかとなった。

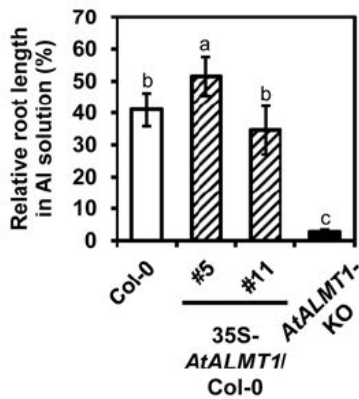


図 3 . シロイヌナズナの AtALMT1 過剰発現体のアルミニウム耐性 過剰発現体では生育が向上している。

( 4 ) S T O P 1 が発現制御する転写因子 S T O P 2 は酸耐性遺伝子の発現を制御する。

シロイヌナズナのゲノム上には S T O P 1 遺伝子のホモログである S T O P 2 が存在する。この遺伝子を破壊したり、過剰発現したりすることによりその機能を調べたところ、アルミニウム耐性には影響を及ぼさないが、酸耐性遺伝子の発現を制御することが明らかとなった。尚、STOP2 自身の発現は STOP 1 に制御されている。

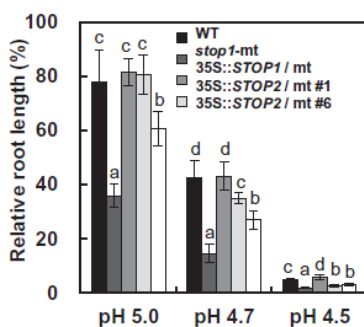


図 4 . STOP2 を STOP1 に変異を持つ植物に導入すると、低 pH 耐性が回復の様子を示している。

( 5 ) STOP1 遺伝子とそれを制御する仕組みは陸上植物は全て保存しているらしい (論文 1、2、6)

シロイヌナズナ STOP1 と相同性を持つ遺伝子は、様々な植物が保存している。この遺伝子を単離して、シロイヌナズナ STOP1 変異体に遺伝子導入した場合、低 pH 耐性に関しては全ての植物のタンパク質で相補することが確認できた。一方、遺伝子を破壊すると、コケ(ヒメツリガネゴケ)や、タバコでは耐性を喪失することが分かった。つまり、この遺伝子は陸上植物の酸耐性を制御する共通の遺伝子であることが実験的に証明できた。

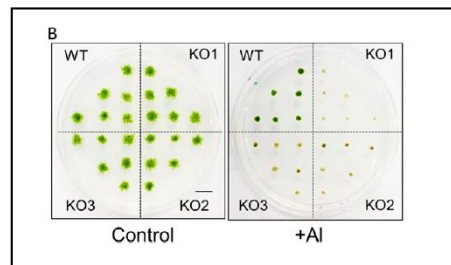


図 5 コケを含む植物で STOP1 相同遺伝子が確認され(上)、その遺伝子を破壊するとアルミニウム感受性になった(下)。

これらの結果から、STOP1 が制御する遺伝子は多くの植物でアルミニウム、低 pH 耐性を制御することが明らかとなった。分子育種では、STOP1 遺伝子を破壊して制御を受ける遺伝子を探索することが有効であると、結論した。

### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 9 件 )

- 1 . Sawaki Y., Kobayashi Y., Kihara-Doi T., Nishikubo N., Kawazu T., Kobayashi M., Kobayashi Y., Iuchi S., Koyama H. & Sato

S. (2014) Identification of a STOP1-like protein in *Eucalyptus* that regulates transcription of Al tolerance genes Plant Sci. (223) 8-15 審査有

2 . Kobayashi, Y., Ohyama, Y., Kobayashi, Y., Ito, H., Luchi, S., Fujita, M., Zhao, C-R., Tanveer, T., Ganesan, M., Kobayashi, M. & Koyama H. (2014) STOP2 activates transcription of several genes for Al- and low pH-tolerance that are regulated by STOP1 in Arabidopsis. Mol Plant 7: 311-322 審査有

3 . Sawaki, Y., Kihara-Doi, T., Kobayashi, Y., Nishikubo, N., Kawazu, T., Kobayashi, Y., Koyama, H. & Sato S. (2013) Characterization of Al-responsive citrate excretion and citrate-transporting MATEs in *Eucalyptus camaldulensis*. Planta 237:979-989 審査有

4 . Kobayashi, Y. Kobayashi, Y., Sugimoto, M., Lakshmanan, V., Luchi, S., Kobayashi, M., Bais, H and Koyama, H. (2013) Characterization of the complex regulation of AtALMT1 expression in response to phytohormones and other inducers. Plant Physiol. 162:732-740. 審査有

5 . Kobayashi, Y., Lakshmanan, V., Kobayashi, Y., Asai, M., Luchi, S., Kobayashi, M., Bais, H. P. & Koyama H. (2013) Overexpression of AtALMT1 in the Arabidopsis thaliana ecotype Columbia results in enhanced Al-activated malate excretion and beneficial bacterium recruitment. Plant Signaling & Behavior, 8(9)e-25565 審査有

6 . Ohyama, Y., Ito, H., Kobayashi, Y., Ikka, T., Morita, A., Kobayashi, M., Imaizumi, R., Aoki, T., Komatsu, K., Sakata, Y., Luchi, S. & Koyama, H. (2013) Characterization of AtSTOP1 orthologous genes in tobacco and other plant species. Plant Physiol. 162: 1937-1946. 審査有

7 . Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Watanabe, T., Shaff J. E., Ohta, H., Kochian, L. V., Wagatsuma, T., Kinraide, T. B. & Koyama H. (2013) Molecular and physiological analysis of Al<sup>3+</sup> and H<sup>+</sup> rhizotoxicities at moderately acidic conditions. Plant Physiol. 163: 180-92 審査有

8 . 大山慶直, 小林佑理子, 井内聖, 小山博之 (2012) 他種由来 STOP1 相同遺伝子を導入した相補組換え体シロイヌナズナの解析.

無菌生物 42:69-72 審査無

9 . Hieno, A., Naznin, A.H. Sawaki, K., Koyama, H., Sakai, S., Ishino, H., Hyakumachi, M. & Yamamoto, Y.Y. (2012) Analysis of environmental stress in plants with the aid of marker genes for H2O2 responses. Methods Enzymol. 527:221-238. 審査有

〔学会発表〕(計 1 件)

1 . Koyama H., Kobayashi Y., Bais H, Luchi S. STOP1 Regulating System; A Root Module for Adapting to Acid Soil Environment, and for Enhancing Plant Immunity 2013.9 中国杭州 第3回国際農業会議

〔図書〕(計2件)

1 . Zhao, C-Z., Yamamoto, Y.Y. & Koyama, H. (2011) Rhizotoxic ions: 'Omics' approaches for studying abiotic stress tolerance in plants. In Omics and Plant Abiotic Stress Tolerance. pp128-132.

2 . Chaffai, R. & Koyama, H. (2011) Heavy metal tolerance in *Arabidopsis thaliana* Advances in Botanical Research 60: 4-20.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小山 博之 (KOYAMA, Hiroyuki)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号: 90234921

(2)研究分担者

山本 義治 (YAMAMOTO, Yoshiharu)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号: 50301784

(3)研究分担者

井内 聖 (IUCHI, Satoshi)

独立行政法人理化学研究所・実験植物開発室・研究員

研究者番号: 90312256

(3)研究分担者

鈴木 雄二 (SUZUKI, Yuji)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号: 80374974

(4)研究分担者

櫻井 望 (SAKURAI, Nozomu)

(財)かずさDNA研究所・植物ゲノムバイオ  
ク室・研究員

研究者番号： 50301784