

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14676

研究課題名(和文) 高密度SNPを利用した相互作用するストレス耐性分子の理解

研究課題名(英文) Understanding of molecular mechanisms of stress tolerance of plants regulated by epistatic interactions.

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：環境ストレスにより作物の生産性は、本来持つ能力(ポテンシャル能力)よりも低下していることが知られている。環境ストレス(高温、低温、紫外線など)に対する耐性機構を遺伝子レベルで解明して、それを作物の品種改良に結び付けることは、世界の食料生産を向上させるために必要と考えられている。この課題では、分子生物学分野のモデル植物(植物の分子機構研究の材料)であるシロイヌナズナの、高密度遺伝子マーカー情報を活用して、複雑なストレス耐性機構の一端を明らかにした。特に、複数分子が関与するストレス耐性機構に関して、代謝経路が係わる交互作用(複数の遺伝子により耐性が決定する)などを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Increasing yield is important target of crop breeding. Recent progress of DNA sequencing technologies, by combination of population genetics, enable to study genetic factors regulating yield. It is important to understand molecular mechanisms of stress tolerance of plants because it is most severe yield limiting factor in various crops. Using high-density SNPs information in Arabidopsis, we analyzed stress tolerance mechanisms (and its mechanisms of variation), by GWAS and analysis of epistatic interactions. Our analysis identified novel mechanisms of stress tolerance, which is regulated by a combination of epistatic interaction of genes.

研究分野：植物栄養学

キーワード：ストレス耐性 シロイヌナズナ エピスタシス

## 1. 研究開始当初の背景

土壌ストレスは生物生産を阻害する重要なストレス因子で、複雑な耐性機構を分子レベルで理解することは重要な課題である。既にいくつかの重要な遺伝子に関しては遺伝子組換えなども試みられているが、未だに効果は限定的であった。その原因の一つは、耐性機構の多くが「分子 分子相互作用」で制御される(複数の遺伝子で制御される)、単一遺伝子の改良では効果が限定的であるためと考えられる。この多分子相互作用による耐性機構を解明するためには、遺伝子破壊株を用いた逆遺伝学や、網羅的に遺伝子を過剰発現する FOX ( Full-length cDNA Overexpression ) などでは、分子種が複数存在して機能相補される場合や致死性である場合には遺伝子の機能を調べることが困難であった。これらの問題を回避するためには、表現型を量的形質として扱い、さらにゲノムワイドに遺伝子座間の相互作用(エピスタシス; 表現型に寄与している2つの遺伝子座の組み合わせ)を検出することが効果的と考えた。この着想は、申請者が進めてきたシロイヌナズナのナチュラルバリエーション研究を進めるもので、世界的に見ても競争力が高い研究と考慮された。

## 2. 研究の目的

植物は環境ストレスに対して様々な適応戦略をとるが、その中で分子 分子相互作用は重要な役割を担っている。アルミニウム、塩集積などの土壌ストレスに対する適応では、単独で作用する分子は見出されているが、相互作用する分子の多くは未解明である。これは、致死性形質の特定が困難であることや、逆遺伝学解析時の形質相補など分子遺伝学の限界による部分が多い。この研究では、これらの技術的問題を回避するために、「ゲノム遺伝学」の手法であるゲノムワイド関連解析を一步進めて、重要な相互作用遺伝子対を

特定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ゲノム全体で起きる現象を分子レベルで理解することは、形態変異の固定や耐病性のレース検定選抜などに比べて敷居が高い重要形質である、環境抵抗性や収量・品質向上などの育種を効率化するために重要と考えられている。この領域では、既にトランスクリプトームやメタボロームなどの - Omics 研究の統合(システムズ生物学)や、共発現遺伝子ネットワークや転写制御配列予測等の生物情報学研究基盤は整備されている。これにより、ある事象が特定の「系統」で起きる機構に関する理解は急速に進んでいるが、それが表現型に及ぼす影響を評価するためには「形質差が生じる機構」を、同様にゲノム全体で理解する必要がある。これを実現するには、量的形質としてストレス耐性バリエーションが生じる機構を、ゲノムワイドに解明することである。この際、シロイヌナズナではゲノムワイドな SNPs 情報が整備されてきていることから、「ゲノムワイドな分子レベルの理解」を深める強力なツールとなると考えられ、遺伝子相互作用(分子 分子相互作用)の同定に成功した研究が見当たらない状況である。しかし、現在整備が進められている高密度 SNPs や歴史的なゲノム組換えの痕跡からは、これまでよりもできるだけ多系統のシロイヌナズナを用いて精密な表現型解析を行えば、数個の遺伝子に特定できるはずで、さらに大規模データを高速演算すれば(20万 SNPs の総当たりの complete pairwise search)、遺伝子相互作用を可視化することが可能と考えられた。

そこで、シロイヌナズナのアルミニウム耐性及びカドミウム耐性を根長を指標に解析して、高密度 SNP を用いた GWAS を実施し、さらに遺伝子間相互作用の解析(統計学的手法と、代謝 MAP との統合解析)、さら

に次世代シーケンサ解析による系統間比較を実施して、エピスタシスの原因となる遺伝子のいくつかを特定した。

#### 4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの 150 程度のアクセッション(系統)を使って、塩、アルミニウム、カドミウムなどの耐性程度を評価した。遺伝率(ばらつきを示す値)が極めて小さく、エピスタシス解析を実施する上で十分な精度を持つデータセットを獲得することができた。

##### (2) 塩耐性 GWA S の解析

塩の集積は作物の生産性を低下させる重要な環境ストレスである。これを、通常の GWA S で解析すると、およそ 100 個程度の遺伝子で表現型の差の 60% 程度が説明できることがわかった。これを、さらに遺伝子ネットワーク(共発現遺伝子)との関係で調べると、複数の遺伝子が同一のネットワークに属することが明らかとなった。これは、貢献度が小さい遺伝子が複数セットとなることで作用する(同一の代謝、シグナル伝達経路に属する場合は、エピスタシスと見なせる)ことを明確に示す例となった。塩耐性に関しては、細胞壁代謝の関与が明らかとなったが、これは細胞壁の安定化(ペクチンの重合)が、塩により阻害されることなどの、従来の生理学的な予測を裏付ける、遺伝学的な証拠を提供するものである。この成果は、Plant Cell Environment 誌に掲載された。

##### (3) アルミニウム耐性系統間差を説明する分子機構の解明

高密度 SNP の解析からは、プロモーターの変異等、発現レベルに影響する因子の変異が頻繁に生じていることが明らかとなった。これを、系統間の遺伝子発現の直接的な解析(RNA seq)と統合して解析し、さらにゲノム上の多型の頻度との関係を解析すれば、例えば共発現遺伝子ネットワークが、転写因

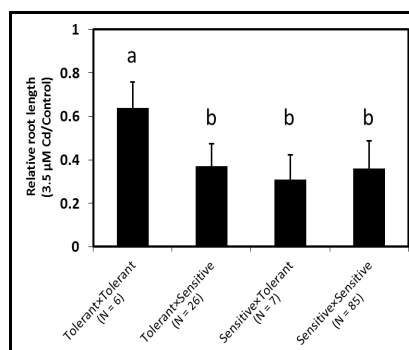
子の変異により生じていることなどが明らかになると予測された。

アルミニウム耐性が異なる 3 系統のシロイヌナズナの根の遺伝子発現を、RNA seq(いわゆる次世代シーケンサ解析の一種)により解析した。十分な量と質の配列解析に基づいて、アルミニウム応答性遺伝子を解析したところ、耐性系統で発現レベルが高いアルミニウム誘導遺伝子の中で、遺伝子を破壊すると感受性になるものを複数同定することに成功した。

この遺伝子の中には、タンパク質の品質管理に関わる ER(小胞体)経路の重要遺伝子や、機能未知の転写因子などが含まれていた。同じような耐性系統で発現レベルが高い遺伝子には、共発現ネットワーク遺伝子が含まれ(ATTED データベース解析による知見)、転写因子やタンパク質活性化因子の変異に基づくことが予想された。実際、共発現により転写が増加している遺伝子では、プロモーター上に変異が集積する傾向がなく、逆に単一で発現レベルが向上する遺伝子には、プロモーター上に変異が集積していることが明らかとなった。

##### (4) カドミウム耐性に対する遺伝子交互作用の影響

カドミウムは重要な障害金属で、食品中の濃度が厳しく制限されている。この耐性に関して、GWA S と検出された遺伝子座の関係を解析した。



その結果、図に示すように、交互作用(2つの遺伝子の組み合わせで形質が決定する)

機構が明らかとなり、これは、銅代謝と関連する遺伝子であることから、カドミウムと銅の相互作用が細胞毒性として存在することを意味している。この現象に関しては、カドミウムの細胞毒性の新しい知見として、公衆衛生（食の安全）に関する新しい概念を提供するものと考えている。尚、詳細に関しては、実験的なエビデンスをそろえてから、公表する予定である。

#### 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2件)

- 1) Kusunoki K, Nakano Y, Tanaka K, Sakata Y, Koyama H and Kobayashi Y: Transcriptomic variation among six *Arabidopsis thaliana* accessions identified several novel genes controlling aluminium tolerance. (2017) Plant Cell Environ. 40: 249-263.
- 2) Kobayashi Y, Sadhukhan A, Tazib T, Nakano Y, Kusunoki K, Mohamed K, Chaffai R, Iuchi S, Sahoo L, Kobayashi M, Hoekenga OA, Koyama H. Joint genetic and network analyses identify loci associated with root growth under NaCl stress in *Arabidopsis thaliana*. (2016) Plant Cell Environ. 39: 918-934.

3)

〔学会発表〕(計0件)

〔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:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 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

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )