

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02113

研究課題名(和文) 多面的な環境耐性を制御するSTOP1転写制御系と進化の分子的理解に関する研究

研究課題名(英文) Evolution of STOP1 system that regulates multiple 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) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：陸上植物は、様々な環境下で生存する仕組みを進化的に獲得してきたと考えられている。STOP1転写因子は、複数のストレス耐性を制御する、いわば司令塔のような遺伝子であるが、本研究により冠水ストレス耐性を強化する一方で、乾燥ストレス耐性を低下させることが分かった。冠水ストレス耐性は、最初にSTOP1の制御形質であることが突き止められた、酸性土壌耐性機構に含まれる、細胞質酸性化に対する耐性機構を使用していることが分かった。その一方で、酸性土壌耐性機構の一つであるアルミニウム耐性では、冠水や細胞質酸性化防御とは異なる遺伝子を制御し、このようなストレス対応の分化は、コケでも確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物や藻類の全遺伝子配列の解明が急速に進んでいます。このような状況では、作物やその近縁種に限らず、植物全体がどのように環境耐性を獲得して、異なる進化を遂げているかを調べることは、種を超えた画期的な品種改良の基盤となると基盤となると考えられます。この研究では、STOP1転写因子が、酸性土壌耐性、冠水、乾燥耐性や養分吸収を制御することと、その起源がコケ植物の分岐以前であることを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：Sensitive TO Proton Rhizotoxicity1(STOP1), encoding C2-H2 zinc finger transcription factor, regulates different stress tolerance mechanisms. Originally, STOP1 was identified as the critical transcription factor that regulates transcription of Al and proton tolerance genes of the roots of Arabidopsis. These phenotypes are critical for adapting to acid soils, which contain Al and proton rhizotoxicity as major stress factors. In the current study, we found that STOP1 co-regulates other stress tolerance pleiotropically such as hypoxia tolerance and drought tolerance. Chemical genetics and expression GWAS identified that Al-inducible expression of STOP1-regulated genes are coordinately regulated by other transcription factors, which are nearly specific to Al signal. Such combinations, i.e. STOP1 and specific transcription factor for each stress, may allow to harmonize growth and STOP-1 regulated traits. Finally, we found functional STOP1-ortholog in bryophyte.

研究分野：植物栄養学

キーワード：STOP1 転写因子 酸耐性 乾燥耐性 冠水耐性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

酸性土壌は全世界の耕作可能陸地の 40% を占める不良土壌である。その成因は、温帯 ( 温度が比較的高い地域 ) から亜熱帯域では、土壌中の粘土鉱物にイオン交換するアルカリ性塩基の雨水 (  $\text{CO}_2$  飽和により  $\text{pH} 5.5 \sim 5.6$  ) による溶脱により、亜寒帯 ( 温度が低い温帯を含む ) では分解が不十分な有機物 ( 腐食酸などカルボキシル基を持つもの ) の影響を受けて酸性化する。この土壌では、( 1 ) 水素イオン (  $\text{H}^+$  ) 過剰と、粘土鉱物から可溶化するアルミニウムイオン (  $\text{Al}^{3+}$  ) 過剰による根の伸長阻害が生じること、( 2 ) アルミニウム ( もしくは鉄 ) と難溶性塩を形成することによるリン酸施肥の効果が悪くリン酸欠乏を生じやすいこと、( 3 ) その他、 $\text{pH}$  依存で溶解度が増すマンガンの過剰 ( まれにモリブデン欠乏も生じる ) などにより、作物栽培には石灰、リンの多量施肥を行う必要がある土壌である。これは、地球規模課題である持続的な食糧生産の深刻な脅威である。また、熱帯・亜熱帯域の酸性土壌の分布が、発展途上諸国に多いことから、十分な施肥が行なわれないことも多く、貧困化などの深刻な地域課題の原因となっている。このような複合的なストレスを持つ酸性土壌でも、省資源 ( 少ない施肥で生育できるということ ) で生育する品種を育成する素材となる、酸性土壌ストレス耐性遺伝子の特定と利用が、植物ストレス生理学における主要課題の一つとなっていた。

このような状況のもとで、研究代表者らは酸性土壌耐性遺伝子を制御する転写因子 STOP1 を特定して、それが制御する耐性システムの研究を進めていた。2007 年にシロイヌナズナで発見したジンクフィンガー型の転写因子 STOP1 ( Sensitive To Proton-rhizotoxicity 1 ) は、主要なアルミニウム耐性遺伝子である AtALMT1 ( Aluminum-Activated Malate Transporter 1 ) を転写制御するだけでなく、さらに多くの Al 耐性遺伝子や、イオン輸送に関わる遺伝子の転写を制御していることが解明されていた。当初、酸及びアルミニウム耐性を制御する転写因子として認識された STOP1 は、リン酸欠乏時における根の形態変化に関わるなど、複数の形質を制御することが報告され、複数の形質を制御すること ( 多面発現 ) の分子機構と、その進化的な意義を明らかにすることが、ストレス耐性育種の課題として注目されていた。

### 2. 研究の目的

STOP1 転写因子は、様々な環境耐性を制御する転写因子であり、コケ類以上の地上植物が持つことから、陸上植物が陸地環境に適応する際にゲノムに組込んだ、環境耐性モジュールを制御する HUB であると考えられた。( 1 ) その制御する形質を明らかにするために、シロイヌナズナ制御することがわかっている環境耐性形質の分子機構を、逆遺伝学、統合オミクス解析などにより解析し、ゲノム比較などにより他の植物での保存性の有無を調べることを第 1 の目的とした。( 2 ) 一方、Al 耐性を制御するためには、STOP1 に依存する制御系と、非依存の制御系が存在すると考えられるが、その詳細には不明な点が多かった。そこで、薬理遺伝学、生物情報学、集団遺伝学などの複数の手法を統合する解析を行い、アルミニウム依存性シグナルに関するシグナル伝達経路に関する理解を深めることを第 2 の目的とした。( 3 ) 以上の解析で明らかになったシグナル伝達経路や、STOP1 が制御するモジュールをコケなどの植物が保存していることをゲノム比較解析や逆遺伝学解析で明らかにすることを第 3 の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### ( 1 ) 多面発現の分子機構

主にシロイヌナズナ実験系を用いて、乾燥、低酸素ストレス、低カリウムストレスなどでの生育と遺伝子発現を指標に、STOP1 とその被制御遺伝子破壊株の生育を比較した。被制御遺伝子は、RNseq 解析の結果を、過去に実施したマイクロアレイ解析などの結果と比較し、それぞれのストレスにおける STOP1 制御遺伝子を特定するとともに、定量 PCR 解析で遺伝子発現量を調べたり、プロモーターとの STOP1 の結合実験をしたりすることで解析した。

#### ( 2 ) アルミニウム耐性シグナル伝達経路

アルミニウム耐性遺伝子のシグナル伝達経路を、薬理学的解析 ( 創薬研究に用いられるタンパク質リン酸化経路の阻害剤とそのドッキングシミュレーション )、遺伝子発現を指標とした関連性解析 ( eGWAS )、異種植物での Al 特異的遺伝子解析とその農学的利用 ( 遺伝子発現マーカー ) などにより解析した。

#### ( 3 ) ゲノム配列比較による STOP1 経路の保存

ゲノム配列がリリースされたゼニコケやシャジクモなどのゲノム配列に対して、BLAST などの配列解析ツールを用いて STOP1 システムの保存性を解析した。また、ゼニコケにおいてはゲノム編集を用いて、STOP1 相同遺伝子の機能解析を試みた。

### 4. 研究成果

#### ( 1 ) 多面発現の分子機構

STOP1 変異体 ( シロイヌナズナ ) は、低酸素ストレスに暴露すると、野生型に比較して生存することが極めて困難であった。この感受性の表現型はタバコの STOP1 発現抑制システムでも認められたことから、様々な植物で生じる現象であると推定できた。シロイヌナズナのトランスクリプト

トームの解析から、シャペロンタンパク質遺伝子の発現制御や、イオン輸送タンパク質遺伝子の発現制御を調節する、複数の転写因子の発現をSTOP1が転写制御していることが明らかとなった。これは、低酸素ストレス（ハイポキシア）では、ATP依存の水素イオン（ $H^+$ ）輸送経路が抑制され、これにより細胞質が酸性化することがストレスの一因となっているためと考えられた。実際に相補試験（発現が低下する遺伝子を遺伝子組換えにより導入してその機能を調べること）、プロモーターとSTOP1の結合実験（試験管内で実際にSTOP1が標的遺伝子のプロモーターに結合するかどうかを調べる試験）などから、STOP1によるHsfA2とGDHの転写制御による細胞質酸性化抑制が、低酸素耐性に関わることを明らかにした。細胞質の酸性化が低酸素耐性に機能することは、動物細胞（がん細胞）などでは推定されていたが、植物における制御系を解明した最初の例となる成果を獲得した。

その一方で、STOP1システムが、乾燥耐性には負に働くことをシロイヌナズナで明らかにした。この知見は、ハイポキシア耐性と乾燥耐性がトレードオフの関係にあることを証明するとともに、それらがABAやエチレンシグナルで追加的に制御されるように進化したことを示唆するものである。乾燥耐性を負に制御する仕組みは、カリウム輸送体の活性化調節タンパク質の転写制御によるもので、STOP1は、リンに加えてカリウムの吸収・代謝も制御することを明らかにした。

尚、この間に、海外のグループも窒素吸収関連の制御がSTOP1に調節されることや、その制御分子に乾燥耐性を制御するCIPK23（タンパク質リン酸化酵素）が含まれることを報告したことから、次のようなモデルを提唱することができた。

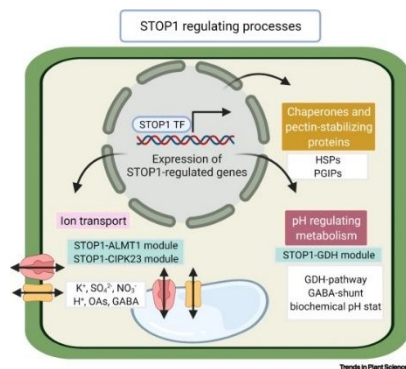


図1 STOP1転写因子が制御する多面発現の分子機構

Trends in Plant Science より（Open access; Sadukhan et al., 2021）

## （2）アルミニウム耐性シグナル伝達経路

薬理解析により、アルミニウムシグナルの上流にはPIシグナル（Phosphoinositide signaling）が含まれることが明らかとなった。ヒトのPI4K（Phosphatidylinositol 4-kinase）阻害剤や、PI3K阻害剤は、シロイヌナズナのそれらの酵素にも高い親和性を持つことが、*in silico*ドッキング解析で明らかとなった。これらの阻害剤は、STOP1の核局在やSTOP1制御のアルミニウム耐性遺伝子を阻害するとともに、アルミニウム誘導されるSTOP1経路に属さない遺伝子発現も抑制した。すなわち、STOP1のアルミニウム活性化には、Phosphoinositide signalingが含まれることがわかった。この経路は、STOP1制御下のALS3でも、カルシウムシグナル伝達経路と協調して制御することが明らかとなった。このSTOP1依存のALS3の発現は、マメ科植物（大豆）のアルミニウム応答分子マーカーとして、施肥管理に利用できることも分かった。

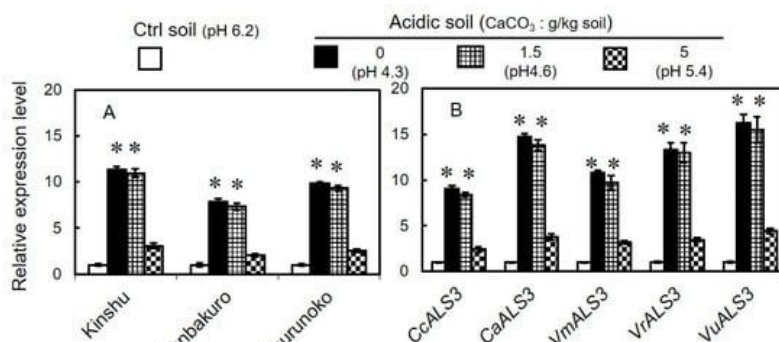


図2 STOP1制御経路の遺伝子発現の例（大豆、バイオマーカー）

Agrahari et al., 2019 Agronomy, Open Access

転写シグナル経路が、複数の活性化機構を持つことは、1) で述べたような相反する形質（例えば、乾燥耐性と低酸素耐性）を制御する場合や、種分化の過程で様々な環境条件に進出

する場合に有利であると考えられる。

### (3) ゲノム比較解析によるSTOP1システムの起源の特定

STOP1システムの保存をゲノム配列比較から推定すると、ゼニゴケ、シャジクモがともにジンクフィンガー領域を持つことが明らかとなった。これらの内、ゼニゴケは2つある分子種の内一つを破壊すると、アルミニウム感受性になることから、少なくともゼニゴケにおいてもSTOPシステムをアルミニウム耐性に取り入れていることが分かった。

トランスクリプトーム解析の結果では、例えばゼニゴケが持つSTOP1相同遺伝子は、1つのみがアルミニウム耐性や低酸素耐性に貢献することが示された。もう一つの分子種は、制御する標的遺伝子が明らかに異なり、表現型は形態の変化として観察された。これは、同じ起源と思われる転写因子の分子進化に、新しい知見を与えるものと考えられる。

以上の結果から、STOP1システムの多面発現機構、ゲノム進化の様子など作物の品種改良に結びつく理解を深めることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sadhukhan Ayan, Enomoto Takuo, Kobayashi Yuriko, Watanabe Toshihiro, Iuchi Satoshi, Kobayashi Masatomo, Sahoo Lingaraj, Yamamoto Yoshiharu Y., Koyama Hiroyuki	4. 巻 60
2. 論文標題 Sensitive to Proton Rhizotoxicity1 Regulates Salt and Drought Tolerance of Arabidopsis thaliana through Transcriptional Regulation of CIPK23	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2113 ~ 2126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Awasthi Jay Prakash, Saha Bedabrata, Panigrahi Jogeswar, Yanase Emiko, Koyama Hiroyuki, Panda Sanjib Kumar	4. 巻 9
2. 論文標題 Redox balance, metabolic fingerprint and physiological characterization in contrasting North East Indian rice for Aluminum stress tolerance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45158-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakano Yuki, Kusunoki Kazutaka, Hoekenga Owen A., Tanaka Keisuke, Iuchi Satoshi, Sakata Yoichi, Kobayashi Masatomo, Yamamoto Yoshiharu Y., Koyama Hiroyuki, Kobayashi Yuriko	4. 巻 11
2. 論文標題 Genome-Wide Association Study and Genomic Prediction Elucidate the Distinct Genetic Architecture of Aluminum and Proton Tolerance in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wu Liujie, Kobayashi Yuriko, Wasaki Jun, Koyama Hiroyuki	4. 巻 64
2. 論文標題 Organic acid excretion from roots: a plant mechanism for enhancing phosphorus acquisition, enhancing aluminum tolerance, and recruiting beneficial rhizobacteria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 697 ~ 704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2018.1537093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Daspute Abhijit A, Yunxuan Xian, Gu Minghua, Kobayashi Yuriko, Wagh Sopan, Panche Archana, Koyama Hiroyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Agrobacterium rhizogenes-mediated hairy roots transformation as a tool for exploring aluminum-responsive genes function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Future Science OA	6. 最初と最後の頁 FS0364 ~ FS0364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4155/fsoa-2018-0065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Enomoto Takuo, Tokizawa Mutsutomo, Ito Hiroki, Iuchi Satoshi, Kobayashi Masatomo, Yamamoto Yoshiharu Y, Kobayashi Yuriko, Koyama Hiroyuki	4. 巻 70
2. 論文標題 STOP1 regulates the expression of HsfA2 and GDHs that are critical for low-oxygen tolerance in Arabidopsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 3297 ~ 3311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/erz124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sadhukhan Ayan, Kobayashi Yuriko, Iuchi Satoshi, Koyama Hiroyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Synergistic and antagonistic pleiotropy of STOP1 in stress tolerance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trends in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1014 ~ 1022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tplants.2021.06.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Agrahari Raj Kishan, Kobayashi Yuriko, Borgohain Pankaj, Panda Sanjib Kumar, Koyama Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Aluminum-Specific Upregulation of GmALS3 in the Shoots of Soybeans: A Potential Biomarker for Managing Soybean Production in Acidic Soil Regions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Agronomy	6. 最初と最後の頁 1228 ~ 1228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/agronomy10091228	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sadhukhan Ayan, Agrahari Raj Kishan, Wu Liujie, Watanabe Toshihiro, Nakano Yuki, Panda Sanjib Kumar, Koyama Hiroyuki, Kobayashi Yuriko	4. 巻 302
2. 論文標題 Expression genome-wide association study identifies that phosphatidylinositol-derived signalling regulates ALUMINIUM SENSITIVE3 expression under aluminium stress in the shoots of Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Science	6. 最初と最後の頁 110711 ~ 110711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plantsci.2020.110711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tokizawa Mutsutomo, Enomoto Takuo, Ito Hiroki, Wu Liujie, Kobayashi Yuriko, Mora-Maci?as Javier, Armenta-Medina Dagoberto, Iuchi Satoshi, Kobayashi Masatomo, Nomoto Mika, Tada Yasuomi, Fujita Miki, Shinozaki Kazuo, Yamamoto Yoshiharu Y, Kochian Leon V, Koyama Hiroyuki	4. 巻 72
2. 論文標題 High affinity promoter binding of STOP1 is essential for early expression of novel aluminum-induced resistance genes <i>GDH1</i> and <i>GDH2</i> in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 2769 ~ 2789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/erab031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hiroyuki Koyama
2. 発表標題 Early aluminum signaling in Arabidopsis thaliana. - integration of eGWAS and chemical genetics uncover complex mechanism of Al-signaling and its cross-talk
3. 学会等名 ICGEB Workshop - Plant responses to light and stress: emerging issues in climate change 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井内 聖  (Iuchi Satoshi)  (90312256)	国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・専任研究員   (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------