

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19380042  
 研究課題名（和文）ミヤコグサの土壌イオンストレス耐性遺伝子の探索とデータベース構築  
 研究課題名（英文）Gene expression profiling of *Lotus japonicus* to various rhizotoxic stressors for constructing microarray database  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

ダイズ等の作物の生産性を高めるための一つの解決策は、環境から受けるストレスに対する耐性を向上させることです。そのためには、どのような耐性機構が働いているか、遺伝子レベルで突き止めることが重要です。この研究では、マメ科のモデル植物がストレスに応答してどのような遺伝子を発現させているか、悪い土壌環境から受けるストレスを中心にDNAチップを使って解析しました。データは一般公開を目的としています。

## 研究成果の概要（英文）：

Improvement of crop tolerance to various environmental stresses is one of the promising approaches to increase food production in the world. Identification of the molecular basis of tolerance would be one reasonable approach to develop efficient breeding strategies to realize above concept. Here, we profiled gene expression in a model legume *Lotus japonicus*, to identify tolerant genes to various stress factors, including stress of rhizotoxic ions. The all data will be released through public database.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 6,800,000  | 2,040,000 | 8,840,000  |
| 2008年度 | 5,000,000  | 1,500,000 | 6,500,000  |
| 2009年度 | 2,600,000  | 780,000   | 3,380,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 14,400,000 | 4,320,000 | 18,720,000 |

研究分野：植物細胞工学

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：ミヤコグサ、マイクロアレイ、ストレス誘導遺伝子、土壌障害、アノテーション

## 1. 研究開始当初の背景

不良土壌で植物は様々なイオンにより、根の発達が阻害される。その耐性を強化することは、早魃などにより収量低下を防ぐとともに

に、植物生産の省資源・省エネルギー化に結びつく。例えば、酸性土壌では膨大な量の石灰を投入して、アルミニウム障害による早魃発生を防いでいる。このような自然環境に存

在するイオンストレス（アルミニウムや塩）に加え、必須栄養素である銅や亜鉛などの重金属でもイオン過剰による根の伸長阻害は生じる。これは、わが国や欧州のように有機農業を含む循環型農業が中心となっている社会では、有機資材中元素の経年蓄積に関わる問題として指摘されている。これを解決するために、植物根のイオンストレス耐性の分子機構を解明して育種に応用する研究は、国内外を通じて盛んに取り組まれていた。

ところで、多くの問題元素による根のイオン障害は、根中の遊離イオンの濃度が閾値をこえることにより生じている。そのため、耐性には1) 分泌物質による排除（有機酸の放出など）、2) 細胞質への取り込みの調節（細胞膜トランスポーターの能力と選択性）、3) 遊離イオンの無毒化（低分子リガンドと金属結合タンパク質）4) 細胞質から導管への排除（トランスロケーターの能力と選択性）が関係し、明らかに複数の遺伝子に支配される現象である。その全体像を効率的に解明するためには、網羅的な解析を中心とするポストゲノム科学的な研究アプローチが極めて有効である。この手法は、2000年にシロイヌナズナのゲノム配列が決定されて以降、植物でも一般化した手法で、トランスクリプトームや、それをメタボロームと組み合わせることが試みられていた。そこで、今回の研究ではマメ科植物のモデル植物であるミヤコグサにおいて、トランスクリプトームを実施して、根のイオン耐性に関わる有用遺伝子群の特定を目的として研究を立案した。なお、本申請が採択された時点で、かずさDNA研究所においては、ミヤコグサゲノムの大まかな解析が終了していた。

## 2. 研究の目的

根は養分・水分を吸収する装置である。そのため、植物の環境抵抗性を向上させるためには、根のイオン耐性を理解する必要がある。また、イオンの吸収・転送にも根のイオン耐性に関与するため、この形質は土壤汚染重金属の除去や可食部の重金属含量を低下させる品種改良には必要不可欠と結びついている。これまでに、シロイヌナズナを中心として進められているゲノム科学研究から、植物の根のイオン耐性には、ゲノムワイドの遺伝子発現が関与するとともに、耐性システムには特異的なものと、ジェネラルなものが存在すると考えられている。この解明には、比較ゲノム研究を進める必要があるため、本研究では整備が遅れているマメ科植物で、イオン応答性遺伝子の特定を目的として、マイクロアレイ解析を実施するとともに、そのデータ解析に必要なデータの集積を目的とする。これにより、マメ科植物の分子改良に必要な情報を提供するとともに、比較ゲノム研究に

有用な研究基盤を提供することを目的とする。この際、イオンストレス応答の解析技術を、ゲノム科学研究が進展していたシロイヌナズナを用いて開発することとした。これは、シロイヌナズナでは、ゲノム科学情報（遺伝子の機能や冗長性など）が整備され、先行研究も多く、開発した手法が正しいか否か正確に判断できると考えたからである。

## 3. 研究の方法

### (1) DNAチップの開発

ミヤコグサのかずさDNA研究所で進められていたゲノム情報を元に、①ゲノム配列から予測される機能性遺伝子配列、②EST情報（発現している遺伝子を解析する手法の一つ）から、22000個の遺伝子を識別できるDNA配列（プローブと呼ぶ）を設計することとした。尚、信頼性を向上させるために、1セットのアレイ（プローブを結合させた検出部分）に2連で配置することとした。

### (2) ミヤコグサ水耕栽培系の構築とストレス処理

イオンストレスを処理する強度・時間を検討し、各イオン処理に特異的に応答する遺伝子の発現を調べることにした。対象とするイオンは、酸性土壌で問題となるアルミニウム、重金属として問題となるカドミウム、銅及び塩集積土壌で問題となる塩化ナトリウムである。これらのイオンが、50%阻害及び完全に生育を阻害する濃度で処理して、6及び24時間後に発現が変化している遺伝子を特定した。尚、栄養素欠乏として、リン、窒素、カリウムを、植物ホルモン応答として、IAA、サイトカイニン、アブシジン酸、メチルジャスモン酸などの処理を行った。

### (3) イオンストレス解析手法の開発

イオンストレス応答を解析する手法が開発されていないことを受けて、シロイヌナズナのマイクロアレイデータを用いて、その処理技術を開発することとした。実験設計は基本的にミヤコグサと同じものを用い、遺伝子情報はTAIRデータベースから収集した。

## 4. 研究成果

### (1) ミヤコグサマイクロアレイチップの開発

ミヤコグサアレイには、22000のプローブを搭載したが、そのうち3割程度は発現していない遺伝子であった。これらを除いても15000程度の遺伝子を検出できるチップであることが確かめられた。これらの遺伝子に関しては、シロイヌナズナゲノム配列に対するBLAST検索（配列データを入手した上で、プログラムを作成して自動解析したもの）及び、NCBIの自動検索等により、推定される機能や遺伝子情報を整備した。なお、配列コンセンサスデータベースや、他のマメ科植

物のゲノムプロジェクト(例えばダイズ)で、相同遺伝子が機能推定されている場合、これを取り込むことにより推定機能の情報量を豊かにすることが可能であった。これにより、開発したチップはかずさDNA研究所とのコンタクトで、一般ユーザーが使用することが可能になった。

#### (2) マイクロアレイデータの収集

アルミニウム、塩化ナトリウム、カドミウム及び銅処理に関しては、50%生育阻害及び100%生育阻害濃度で処理して、6時間及び24時間後のデータを獲得した。これらはストレス未処理区とあわせて各3連で行い、都合60点のマイクロアレイデータを獲得した。さらに、IAA、ジベレリン、サイトカニン(キネチン)、メチルジャスモン酸、サリチル酸処理根で、24時間後に誘導される遺伝子を処理し、15点のマイクロアレイデータを獲得した。栄養処理に関しては、リン欠乏、窒素欠乏、カリウム欠乏処理を行い、2週間後の地上部及び根部をサンプリングして、24点のマイクロアレイデータを収集した。都合、99点のマイクロアレイデータから、次項に示すイオン特異的誘導遺伝子を特定するとともに、共発現遺伝子解析に用いる遺伝子発現相関ファイルを作成した。なお、これらの成果は、日本土壌肥料学会(シンポジウム及び年会)で、都合3件の学術発表を行った。データに関しては、適当な成型の後、かずさDNA研究所、KAGIANAデータベースから公表する。

#### (3) イオン応答遺伝子の解析手法の開発

根の伸長を阻害するイオンは様々な遺伝子の発現に作用するが、これには耐性遺伝子の発現(防御機構の作動)と、障害遺伝子の誘導(障害の発生)を反映していると考えられる。このモデルを検証するために、ミヤコグサに比べて、遺伝子情報が格段に整備されているシロイヌナズナを用いて、誘導遺伝子の解析手法を開発した。独立する3連のアレイデータを用いて、再現性がある誘導遺伝子を特定し、さらにベン図解析とクラスター解析により、全てのストレスに応答する遺伝子と、特定のストレスに応答する遺伝子を選び出した。この遺伝子群には、例えば*AtALMT1*(アルミニウム耐性の鍵遺伝子)や*DREB*転写因子(塩耐性の重要転写制御因子)などの特異的遺伝子が特異的な遺伝子として、トレハロース合成や活性酸素消去に関わる遺伝子が共通に応答する遺伝子として含まれていた。同時に、相関解析や代謝マップと統合することにより、ストレスで誘導される現象がより明確に理解できることが明らかとなった。この成果は、BMC Plant Biology誌に掲載されたが、2009年に同誌に出版された論文のうちで、最もダウンロード数が多い論文となり、非常にインパクトが大

きい成果と考えている。なお、この手法をミヤコグサに適用したところ、シロイヌナズナと同様に、特異的な耐性遺伝子と共通するストレス応答遺伝子が動作していることが明らかとなった。

以上の成果は、他の研究者が利用しやすいように加工(相関ファイル化や誘導遺伝子の検索ソフト下での動作が可能加工)を加えて、KAGIANAデータベースで公表する。また、当初計画にあった、品種間差解析手法もシロイヌナズナで開発し、本研究の成果の一部として報告した。

#### 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3件)

① Zhao, CR, Sawaki, Y., Sakurai N., Sshibata, D and Koyama, H (2010) Transcriptomic profiling of major carbon and amino acid metabolism in the roots of *Arabidopsis thaliana* treated with various rhizotoxic ions 査読有 Soil Sci. Plant Nutr. 56:150-162

② Zhao C-R, Ikka, T., Sawaki Y, Kobayashi Y, Suzuki Y, Hibino T, Sato S, Sakurai N, Shibata D & Koyama H. Comparative transcriptomic characterization of aluminum, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana* 査読有 BMC Plant Biol. (2009) 9:31

③ Ikka T, Kobayashi Y, Iuchi S, Sakurai N, Shibata D, Kobayashi M and Koyama H: Natural variation of *Arabidopsis thaliana* reveals that aluminum resistance and proton resistance are controlled by different genetic factors. Theol. Appl. Genet. 査読有 115: 709-719, 2007

[学会発表](計3件)

① 澤木克旦, 趙成日, 一家崇志, 櫻井望, 柴田大輔, 小山博之 ミヤコグサにおけるイオンストレス応答遺伝子の比較トランスクリプトーム解析 日本土壌肥料学会年会(京都) 2009年9月16日

② 趙成日, 澤木宣忠, 一家崇志, 小林佑理子, 小山博之 トランスクリプトームによるシロイヌナズナ根圏イオンストレス応答遺伝子の解析 日本土壌肥料学会年会(京都) 2009年9月16日

③ 和崎 淳, 信濃卓郎, 小山博之 窒素、リン酸、カリウム、イオウ欠乏ミヤコグサにおける遺伝子発現変動の解析 本土壌肥料学会年会(京都) 2009年9月16日

〔図書〕(計1件)

Rhizotoxic ions: '-Omics' approaches for studying abiotic stress tolerance in plants Zhao, C-R, Yamamoto, YY, Koyama, H. In "Omics and Plant Abiotic Stress Tolerance" (Oak Park, USA, Bentham Science Publishers) 査読有 2010 (in press).

## 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

櫻井 望 (SAKURAI NOZOMU)  
かずさ DNA 研究所・ゲノムバイオテック研究室・研究員  
研究者番号: 30392286  
山本 義治 (YAMAMOTO YOSHIHARU)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号: 50301784

### (3) 連携研究者

和崎 淳 (WASAKI JUN)  
広島大学・生物圏科学研究科・准教授  
研究者番号: 00374728