

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02928

研究課題名(和文) トウジンビエの環境ストレス耐性機構の解明

研究課題名(英文) Study on tolerance mechanisms of pearl millet to environmental stresses

研究代表者

高野 哲夫 (Takano, Tetsuo)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：30183057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ICRISATから提供されたトウジンビエ系統を用いて、トウジンビエの持つ強い環境ストレス耐性の分子機構を明らかにするための解析を行なった。データベースの解析、RNA-seq解析およびGWAS解析により抽出し、それらの遺伝子について機能解析を行なった。3種類の転写因子(NAC転写因子、SUQUAMOSA promotor binding protein(SBPs)、DOF転写因子)について網羅的な解析を行い、環境ストレス耐性機構との関わりを考察した。またPgPERK7が高温耐性に、PgPM19とPgDHNが塩ストレス耐性に関与することを示唆することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、トウジンビエの高度の環境ストレス耐性の分子機構について初めて詳細に解析された。3種類の転写因子について網羅的に解析され有用な知見が得られたし、さらにトウジンビエ転写因子全般についても網羅的解析が進行中であり、今後も有用な知見が蓄積されることが期待できる。またいくつかの遺伝子については機能解析も行われ、環境ストレス耐性育種の現場でも活用されることも期待される。

研究成果の概要(英文)：Using the pearl millet lines provided by ICRISAT, studies to understand the molecular mechanisms of pearl millet to tolerate severe environmental stresses have been carried out. The genes related to the tolerant mechanisms were selected by data base analysis, RNA-seq and GWAS, and the function of these genes were analyzed. Comprehensive analysis of tree transcription factor families (NAC, SUQUAMOSA promotor binding protein and DOF) revealed the significance of these gene families in the tolerance to environmental stresses. It was shown that PgPERK7 is related to high temperature tolerance, and that PgPM19 and PgDHN are related to salt tolerance of pearl millet.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：トウジンビエ 環境ストレス耐性 転写因子 高温耐性 トランスクリプトーム 耐塩性 乾燥耐性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

トウジンビエと同様に強い環境ストレス耐性を持つ穀物としてソルガムが知られている。ソルガムでは 2009 年に全ゲノム配列が解読され、完全長 cDNA データベースやトランスクリプトームデータベースも整備されており、ゲノム編集の成功例も報告されている。一方でトウジンビエはソルガムより優れた環境ストレス耐性を持つが、ゲノム情報の整備が遅れていた。2017 年にトウジンビエの全ゲノム配列が公開され、トウジンビエについてもソルガムと同じように分子生物学的解析が進行すると考えられたが、これまで色々な作物で行われて来た研究の蓄積があるので、より効率的にそして急激に研究が進行すると考えられる。研究代表の研究室では、トウジンビエの実験材料の取得と環境ストレス耐性の評価、栽培方法やストレス処理方法の検討が終了している。また野生植物を用いてトランスクリプトーム解析を実施した実績があるので、世界に先がけてトウジンビエの分子生物学的解析を進める環境が整っていた。

### 2. 研究の目的

トウジンビエはイネ科チカラシバ属に属する一年生草本植物で、世界中で広く栽培される雑穀の一つである。乾燥、高濃度塩、高温、貧栄養等の不良環境条件に極めて強い耐性を持つので、コムギやトウモロコシを栽培することができない地域で栽培されることが多い。本研究では、分子生物学的手法を駆使してトウジンビエの環境ストレス耐性機構に關する遺伝子を抽出し、それらの機能を解析することにより、トウジンビエの環境ストレス耐性の機構について分子レベルで新しい知見を得ることが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

本研究では、乾燥ストレス耐性および塩ストレス耐性に違いがあるトウジンビエ系統を利用して、RNA-seq 解析及び small RNA-seq 解析によるトランスクリプトーム解析、メタボローム解析及びゲノムワイド関連解析 (GWAS) および公開されているデータベースの情報を解析し、環境ストレス耐性に關する遺伝子を抽出し、それらの遺伝子の機能を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) トウジンビエの NAC 転写因子遺伝子に関する網羅的解析

NAC[NAM (No Apical Meristem), ATAF1 (*Arabidopsis thaliana* Activation Factor 1), and CUC2 (Cup-shaped Cotyledon)]転写因子遺伝子は、植物の転写因子の中で最も大きなファミリーを形成していて、植物の生育や環境ストレス耐性機構に大きく關与することが知られていたが、トウジンビエの NAC 転写因子遺伝子についてはほとんど知見がなかったため、網羅的な解析を行なった。公開されているデータベースを解析した結果、トウジンビエゲノムに 151 種類の NAC 遺伝子 (*pgNACs*) が同定された。系統発生的な解析により、*pgNACs* は 11 種類のグループに分類されることがわかった。そのうち 3 種類の *pgNACs* タンパク質 (*pgNAC073*、*pgNAC29* および *pgNAC151*) は膜に存在する転写因子であることが予想された。*pgNACs* には 17 種類の保存されたモチーフがあることがわかった。他の植物種の NAC 転写因子との比較により、*pgNACs* の機能が予測された。また 59 の *pgNACs* に計 88 ヶ所のマイクロ RNA 認識部位があることがわかった。これまでに行なった RNA-seq 解析の結果から、30 種類の *pgNACs* が塩ストレスに応答し、42 種類の *pgNACs* が乾燥ストレスに応答することが示された。それらからランダムに選択した 36 の *pgNACs* の発現をリアルタイム PCR により解析し、結果の確認も行った。これらの遺伝子の多くは、地上部と根とで塩ストレスや乾燥ストレスに対する発現応答のパターンが異なっていた。これらの結果から、トウジンビエの NAC 転写因子が環境ストレス耐性機構に關与することが強く示唆された。

この研究成果については、BMC Genomics 誌に発表した (Dudhate ら、2021)。

#### (2) トウジンビエの *SUQUAMOSA* promotor binding protein (SBPs)に関する網羅的な解析

*SUQUAMOSA* promotor binding protein (SBPs) は植物特異的な転写因子で、植物の生長や分化及びストレス応答に重要な役割を果たすことが知られているが、トウジンビエ SBPs については解析が行われていなかった。公開されているデータベースを解析した結果、SBP 領域の共通性からトウジンビエのゲノムに 18 の SBPs 遺伝子が同定された (*PgSBPs1-18*)。全ての *PgSBPs* の SBP ドメインには 1 つか 2 つのジンクフィンガー様ドメインと核極材シグナル (NLS) があることがわかった。18 の *PgSBPs* うち 14 遺伝子は染色体上に広く分布し、4 遺伝子が scaffold 上にあることがわかった。*PgSBPs* は系統樹的に 7 つのグループ (I-IV) に分類され、それぞれのグループにはエクソン/イントロン構造や重要なモチーフの構成に共通性があった。グループ V とグループ VII の *PgSBPs* は、それぞれ *PgmiR156q* と *PgmiR529b* の標的となっていることが予想された。いくつかの *PgSBPs* のプロモーター領域にはアブシシン酸 (ABA) 応答配列や環境ストレス応答配列が存在し、それらの遺伝子発現は環境ストレスに応答して上昇し、ABA 処理により減少した。

この研究成果については、Plant Gene 雑誌に発表した (Yu ら、2021)。

### (3) トウジンビエの高温耐性機構に関する解析

ICRISAT から分譲を受けたトウジンビエ 系統について、高温耐性について評価する試験を行った。高温処理によって減少する穂あたりの粒数を指標として高温耐性を評価し、高温耐性以外の形質について差が大きい系統 (高高温耐性系統: ICMB00333、および低高温耐性系統: ICMB00555) を選択し、以降の実験に供試した。高温処理方法として、グロースチャンバーを用いる方法と穂を湯につける方法とを用いた。高温の影響は生殖期に最も大きく受けることが知られていたが、生殖期のどの時期が重要であるか明らかでなかったため、穂ばらみ期、出穂期、薬期に高温処理を施した植物体から小穂を回収し、RNA を抽出した。その RNA を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果、2 系統間で、高温ストレスに対する遺伝子発現の応答が大きく異なることがわかった。高高温耐性系統では高温ストレスに応答して発現が上昇する遺伝子がより多く検出された。高高温耐性系統 ICMB00333 でストレス処理に応答して発現が顕著に上昇する 2 つの遺伝子 *PgPERK7* および *PgTPS21* に着目し、これらの相同遺伝子を欠失したシロイヌナズナ変異系統 *perk7* および *tps21* を入手した。変異系統に高温ストレス処理を行い、生育状況を解析した。*tps21* 変異体では野生型と比較して差がなかったが、*perk7* は野生型と比較して高温ストレスによる障害が顕著に大きかった。この結果から、*PgPERK7* (PROLINE-RICH EXTENSIN-LIKERECEPTOR KINASE 7) がトウジンビエの高温耐性に関与することが示唆された。

この研究成果については、日本育種学会で発表し (楼ら、2021) 投稿準備中である。

### (4) 環境ストレスに応答する膜タンパク遺伝子 *PgPM19* の機能解析

非生物的ストレスに応答して遺伝子発現が上昇することが RNA-seq 解析で明らかになっている膜タンパク質である *PgPM19* に着目し、非生物的ストレス耐性機構への関与について解析した。*PgPM19* は細胞膜に局在することが確認され、乾燥ストレス、塩ストレス及び ABA 処理によって葉と根において遺伝子発現が著しく上昇することがわかった。*PgPM19* 遺伝子をシロイヌナズナに導入して高発現させた系統 (*PgPM19\_OE*) では野生型と比較して塩ストレス耐性が向上した一方、*PgPM19* の相同遺伝子を欠失したシロイヌナズナ変異体 (*pm19L1*) では塩ストレス耐性が劣化していた。RNA-seq 解析により *PgPM19\_OE*、野生型及び *pm19L1* における遺伝子発現について網羅的に解析したところ、ABA に関連する多くの遺伝子 (*PYL6*, *SnRK1.7*, *DERBs*, *ERFs*, *ABIs*, *RAB18*, *RAB28*, *RD29A/B* など) の発現が *PgPM19\_OE* で野生型より減少していたため、*PgPM19* が ABA のシグナル伝達に関与する可能性があることが示された。

この研究成果については、日本育種学会で発表し (于ら、2020) 投稿準備中である。

### (5) トウジンビエの DOF 転写因子に関する網羅的解析

植物固有の転写因子である DOF 転写因子 (*PgDOFs*) に関して、網羅的な解析を行なった。トウジンビエゲノムには 12 個の *PgDOF* 遺伝子があり、それぞれが環境ストレスに応答して発現が変化し、遺伝子発現は葉で上昇し根で減少する傾向があった。

この研究成果については、日本育種学会で発表し (曲ら、2020) 投稿準備中である。

### (6) トウジンビエのデヒドリン遺伝子 (*PgDHNs*) の機能解析

トウジンビエのデヒドリン遺伝子 (*PgDHNs*) をクローニングし解析した。*PgDHN* 遺伝子は環境ストレスに応答して発現が上昇し、遺伝子を導入した酵母やシロイヌナズナの環境ストレス耐性を強化することがわかった。

この研究成果については、日本育種学会で発表し (曲ら、2020) 投稿準備中である。

### (7) ポリガラクチュロナーゼ遺伝子ファミリー (*PgPGs*) の解析

GWAS 解析によって種子重との関連が示唆されたポリガラクチュロナーゼ遺伝子ファミリー (*PgPGs*) について解析した。*PgPGs* は 3 つのクラスターに分類され、約 65% が分泌タンパク質であると予想された。またファミリーに属する *PgPGX3* の相同遺伝子である *AtPGX3* を欠失したシロイヌナズナ変異体では子葉の形態が異常になり、根長とロゼット葉の径長が減少することから、*PGX3* は細胞壁の構造に関わることで器官の大きさや植物の形態に関与することが示された。

この研究成果については投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ambika Dudhate, Harshraj Shinde, Pei Yu, Daisuke Tsugama, Shashi Kumar Gupta, Shenkui Liu, Tetsuo Takano	4. 巻 22
2. 論文標題 Comprehensive analysis of NAC transcription factor family uncovers drought and salinity stress response in pearl millet ( <i>Pennisetum glaucum</i> )	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Genomics	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） 10.1186/s12864-021-07382-y	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 Pei Yu, Harshraj Shinde, Ambika Dudhate, Daisuke Tsugama, Shashi Kumar Gupta, Shenkui Liu, Tetsuo Takano	4. 巻 27
2. 論文標題 Genome-wide investigation of SQUAMOSA promoter binding protein-like transcription factor family in pearl millet ( <i>Pennisetum glaucum</i> (L) R. Br.)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Gene	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） 10.1016/j.plgene.2021.100313	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 楼 希超, 津釜 大侑, グプタ ク マル, 高野 哲夫
2. 発表標題 トウジンビエの高温応答の評価と 高温耐性に関与する遺伝子の探索
3. 学会等名 日本育種学会 第139回講演会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 津釜大侑, Shashi K Gupta, Rajeev K Varshney, 高野哲夫
2. 発表標題 ICRISAT のトウジンビエとヒヨコマメの形質デー タを用いたゲノムワイド関連解析
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 于培, Harshraj SHINDE, Ambika DUDHATE, 津釜大侑, 柳参奎, 高野哲夫
2. 発表標題 トウジンビエの熱ストレス応答に関与する熱ショックプロテインPgshSP17.6
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曲英イ, Harshraj SHINDE, Ambika DUDHATE, 津釜大侑, 柳参奎, 高野哲夫
2. 発表標題 トウジンビエの pgDOF 転写因子の遺伝子の構造、分類および遺伝子発現
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 于培, Harshraj SHINDE, Ambika DUDHATE, SK GUPTA, 津釜大侑, 柳参奎, 高野哲夫
2. 発表標題 トウジンビエの膜タンパク質遺伝子であるPgPM19は乾燥ストレス応答と塩ストレス応答に関与する
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 曲英イ, Ambika DUDHATE, Harshraj SHINDE, SK GUPTA, 津釜大侑, 柳参奎, 高野哲夫
2. 発表標題 トウジンビエのデヒドリン遺伝子の単離と機能解析
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020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	津釜 大侑  (Tsugama Daisuke)  (10726061)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授   (12601)	

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
---------	---------