

平成23年5月30日現在

機関番号： 82401

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20570052

研究課題名（和文）

酸性土壌耐性必須転写因子STOP1が制御する遺伝子の特定

研究課題名（英文） Identification of the gene that regulated by STOP1

研究代表者

井内 聖 (IUCHI SATOSHI)

独立行政法人理化学研究所・実験植物開発室・専任研究員

研究者番号： 90312256

研究成果の概要（和文）：

植物の酸性土壌耐性機構を分子レベルで調べるために、酸性土壌耐性に必要な因子であるSTOP1に着目し、その制御機構について解析を試みた。STOP1が関連する制御機構の全体像をマイクロアレー解析から明らかにした。これらの因子を用いたトランスジェニック植物を作製し解析した。この解析結果から、STOP1は同時に複数の下流因子を制御して酸感受性の機構に関与していることが示された。

研究成果の概要（英文）：

To understand the low pH tolerance at molecular level in plant, the mechanisms which by regulated STOP1 were studied. The factors that contribute acid tolerance were determined by micro-array analysis. These factors drive by 35S promoter were introduced to stop1 mutant. These transgenic plants showed same response to stop1 mutants under low pH conditions. These data suggested that the STOP1 simultaneously regulated many factors, and these many factors contribute to acid tolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：STOP1、酸性土壌、ジンクフィンガータンパク質、マイクロアレー

## 1. 研究開始当初の背景

近年、土壌が酸性化し作物の収量が低下している。土壌の酸性化は、植物が利用可能な様々なミネラルイオンの量を変化させ生育に悪影響を与えるマルチストレスである。これらの変化の中でアルミニウムイオン ( $Al^{3+}$ ) の増加がもっとも大きな生育阻害要因とされている。一方、土壌 pH の低下も植物の成長を阻害することが知られていた。しかし、これまで分子レベルでの高等植物の低 pH ストレス応答についてほとんど知見が得られていなかったが、実施者らは低 pH ストレスおよび  $Al^{3+}$  ストレス耐性の両方を制御している鍵遺伝子である酸性土壌耐性必須因子 STOP1 を同定した。

モデル実験植物を用いて低 pH ストレス応答の分子機構の解明を試みる。これまで酸性土壌耐性の研究においては  $Al^{3+}$  ストレス耐性を主たる対象に進められており、低 pH ストレス応答は農業上重要な形質にも関わらずこれまでほとんど解析されていなかった課題である。申請者は情報やリソース、技術が整備されたモデル実験植物を用いることによりこの研究領域に急速な発展をもたらすことが期待できると考え研究を開始し、鍵因子 STOP1 を世界で始めて同定した。そこで引き続き本研究課題を実施することにより STOP1 が制御する新規の低 pH 耐性と  $Al^{3+}$  耐性に関わる因子を効率的に同定し、耐性獲得機構の全貌を解明したい。そしてその成果を将来作物研究に応用してゆきたいと考えている。実際、STOP1 はイネなどの作物にも存在していることが明らかになっており、本研究の成果は食糧問題の解決など社会に大きな貢献をもたらすと考えている。

## 2. 研究の目的

土壌の酸性化によって世界の耕作地の 40% 以上において作物の収量が低下している。土壌の酸性化は、植物が利用可能な様々なミネラルイオンの量を変化させ生育に悪影響を与えるマルチストレスであるが、中でもアルミニウムイオン ( $Al^{3+}$ ) の増加が最も大きな生育阻害要因とされている。一方、土壌 pH の低下そのもの、即ち過剰なプロトンも植物の成長を阻害することが知られているが、低 pH ストレス応答の分子機構についてはこれまでほとんど知見がなかった。以上の背景から申請者はモデル植物シロイヌナズナを用い、低 pH ストレス応答に

関する研究を開始した。はじめに低 pH によるシロイヌナズナの生育阻害の有無を検討した結果、pH4 付近で顕著な根の伸長阻害が認められたことから根の伸長量を指標に評価を行なうことにした。次に低 pH に対する反応が野生株と異なる変異体を選抜した結果、低 pH に対して高感受性を示す変異体 (stop1) を得た。引き続き stop1 の原因遺伝子を解明するためポジショナルクローニング法による解析を進め、表現型と連鎖する 1 塩基の変異を C2-H2 タイプのジンク・フィンガータンパク質 (STOP1) 遺伝子内に見出した。そこで相補試験および T-DNA 挿入変異体を用いた解析を行ない、STOP1 遺伝子が低 pH 感受性を制御していることを明らかにした。これに加え、stop1 変異体は  $Al^{3+}$  に対しても高感受性を示すことも明らかとなった。野生株に  $Al^{3+}$  処理を行なうとリンゴ酸トランスポーター遺伝子 (AtALMT1) の発現誘導とリンゴ酸放出量の増加が起こり  $Al^{3+}$  耐性が獲得されるが、stop1 変異株では  $Al^{3+}$  処理による AtALMT1 の発現誘導とリンゴ酸放出量の増加が認められずこのことが  $Al^{3+}$  耐性の低下の一因である。これらの結果から STOP1 遺伝子が低 pH ストレスおよび  $Al^{3+}$  ストレス耐性の両方を制御している鍵遺伝子であることを明らかにした。

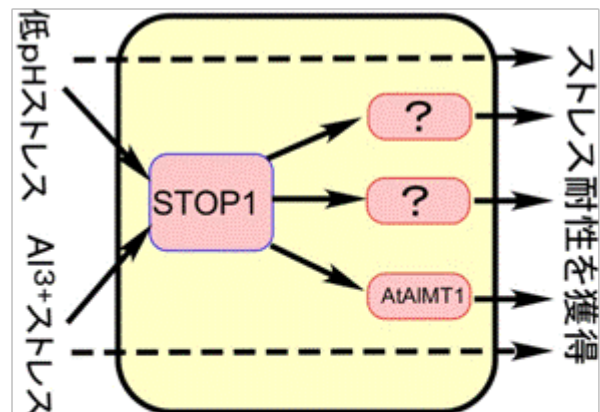


図1 酸性土壌耐性必須転写因子STOP1による制御系の予想模式図

以上の成果に基づき本研究では低 pH ストレスおよび  $Al^{3+}$  ストレス耐性の両方を制御する鍵遺伝子である STOP1 遺伝子がどのような下流因子を制御しているのかを明らかにする。STOP1 は、転写因子として働きうるジンク・フィンガータンパク質であることからストレス応答の下流に位置する遺伝子群

の発現を制御することによってストレス耐性を制御していると考えられ、耐性獲得機構の解明のため下流遺伝子の解明は急務である。

### 3. 研究の方法

酸性土壌耐性必須転写因子 STOP1 によって制御される酸性土壌耐性に必要な因子の同定を行い酸性土壌耐性の分子機構の解明を行う。まず、低 pH ストレス処理や A13+ ストレス処理によって遺伝子発現が誘導あるいは抑制される遺伝子群を選ぶ。これら遺伝子の中から stop1 変異体で発現誘導レベルが野生株と異なる遺伝子を同定する。これらの候補遺伝子の破壊株を取得し、または過剰発現するように野生株あるいは stop1 変異体に導入する。得られた破壊株や形質転換体の低 pH 耐性と A13+ 耐性の評価を行い STOP1 によって制御される酸性土壌耐性に必要な因子の同定を行う。

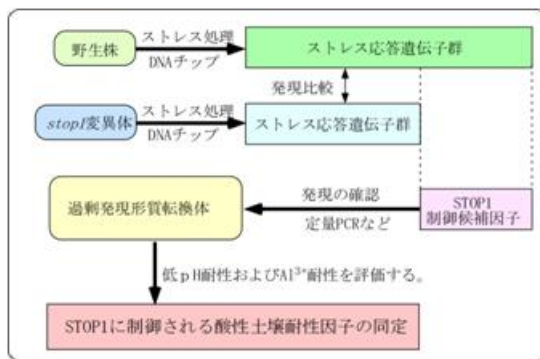


図2 研究の手法を示す概略図

STOP1 によって制御される低 pH ストレス処理や A13+ ストレス処理によって発現が誘導されてくる遺伝子群を取得する。具体的には、野生株および stop1 変異体をそれぞれ低 pH ストレス処理または A13+ ストレス処理を行う。処理した植物から mRNA を単離しラベリング反応を行なって DNA チップ (ATH1、アフィメトリックス社) を用いて遺伝子発現のデータを取得する。これらのデータを解析ソフトウェア (gene spring) で解析し、stop1 変異体で発現誘導レベルが野生株と異なる遺伝子を決定する。マイクロアレーデータと配列情報からターゲット遺伝子を 50 遺伝子以内に絞り込んだ後、野生株および stop1 変異体にストレス処理を行い経時的にサンプリングし、遺伝子発

現の変化を定量 PCR 法やノーザンハイブリダイゼーション法を用いて調べる。候補遺伝子の配列データと発現解析データから候補遺伝子を 30 遺伝子以内にして、次年度以降の解析を行う。

STOP1 によって遺伝子発現が制御されている遺伝子と酸性土壌耐性の関係を調べる。まず、前年度に着目した候補遺伝子を stop1 変異体で過剰発現させた植物を作製し、その形質転換植物の低 pH 耐性と A13+ 耐性データから耐性に関与する遺伝子を同定する。STOP1 遺伝子に変異を持つ stop1 変異株は、酸ストレス耐性や A13+ ストレス耐性の低下により、野生株に比べ酸ストレス処理や A13+ ストレス処理に対して高感受性を示す。stop1 変異体に STOP1 下流因子を過剰発現することによって、もし候補下流因子が耐性に寄与している遺伝子であるのならば、形質転換体の耐性が stop1 変異株より向上し野生株に近い表現形を示すと考えられる。候補遺伝子を stop1 変異体で過剰発現させた植物の酸ストレス耐性や A13+ ストレス耐性について、申請者がこれまでに確立した耐性評価方法を用いて耐性の評価を行う。このようにして同定した遺伝子は、STOP1 によって制御され低 pH 耐性と A13+ 耐性に貢献していると考えられる。しかし、これは STOP1 に変異が認められる stop1 変異株での話であるので、STOP1 に変異が認められない野生株を用いて候補遺伝子発現と耐性との関係を明らかにする。そのために stop1 変異体で過剰発現させた植物の耐性評価から絞り込んだ候補遺伝子を野生株で発現を変化させたときに耐性がどうなるのかを評価する。目的遺伝子を過剰に発現するような遺伝子を作製して野生株へ導入する。得られた挿入変異体、発現抑制体や過剰発現体の低 pH 耐性と A13+ 耐性を評価する。この結果、候補遺伝子の発現量と耐性の間で相関が認められれば、その候補遺伝子は低 pH 耐性と A13+ 耐性に非常に重要であることを示せる。

### 4. 研究成果

2008 (平成 20) 年度は、STOP1 によって制御される下流因子の同定を行うために、遺伝子発現を網羅的に解析できるマイクロアレー解析技術を用いて STOP1 変異体と野生株で遺伝子発現レベルの異なる遺伝子群の同定を試みた。

その結果、STOP1 変異体で野生株に比べ遺伝子発現レベルの減少する遺伝子群を同定した。図 3 に発現変動量の大きかった遺伝子の数を示した。この遺伝子群の中には、A13+ ストレス耐性に関わるリンゴ酸トランスポーター遺伝子 (AtALMT1) が含まれていたことから、今回行ったマイクロアレー解析から得られた遺伝子群は、低 pH ストレスある

いはAl3+ストレス耐性に関わる重要な因子が含まれていると評価した。

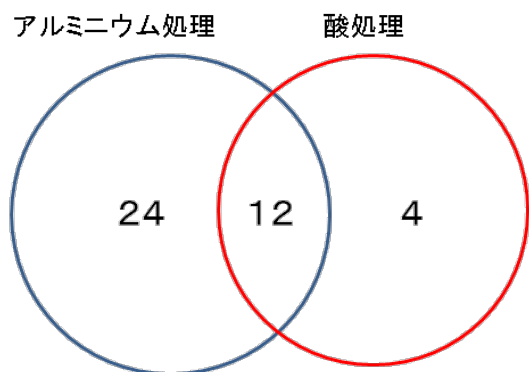


図3 比較マイクロアレー解析によるStop1変異体で野生株に比べて発現が減少している遺伝子の数。

2009（平成21）年度は、STOP1によって制御される制御機構を調べるために、STOP1制御系にかかわっていると考えられる因子を植物に導入した。

具体的には、STOP1変異体と野生株間で遺伝子発現レベルの異なる遺伝子群をマイクロアレーで解析を行っていた。特にストレス条件下で野生株に比べて変異体で発現量の減少が認められる因子に着目した。さらに本研究では、制御系を知るためにSTOP1によって発現が制御される遺伝子群の中でも、特に転写因子に着目した。表1に示す遺伝子を3.5Sプロモーター下流に配置した人工遺伝子を作製し、アグロバクテリウムを用いてSTOP1変異体へ導入し形質転換植物を作製した。

2010（平成21）年度は、候補因子をSTOP1変異体に導入した形質転換植物のストレス耐性評価を行った。

具体的にはSTOP1によって制御される下流因子（ストレス処理においてSTOP1変異体で野生株と比較した場合遺伝子発現レベルが減少している遺伝子の中で、特に転写制御因子遺伝子群に着目した）をマイクロアレー解析データから選抜し、これら遺伝子の機能を解析するために、stop1変異体植物へ過剰発現するように導入した。STOP1変異体は、酸ストレス処理に対して感受性を示すが、これら因子を導入した形質転換体が酸ストレス処理に対して耐性を示せば導入した因子によってストレス耐性が付与されたと考えられる。実際に作製した組み換

え植物の、低pHストレス処理に対する応答を寒天プレート法で調べたところ、顕著なストレス耐性の相補が認められなかった。この結果から、STOP1が制御する低pHストレス応答は、一つの制御因子で制御される単純なものではなくて複数の因子が同時に関わる複雑な制御システムであると考えられた。

表1 STOP1変異体へ導入した遺伝子の一覧

Name	遺伝子産物
Gene01	glutamate dehydrogenase 1 (GDH1) ((GDH1))
Gene02	glutamate dehydrogenase 2 (GDH2) ((GDH2))
Gene03	MADS-box family protein
Gene04	DNA-binding protein-related
Gene05	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
Gene06	zinc finger homeobox family protein / ZIPHD homeobox family protein
Gene07	myb family transcription factor
Gene08	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
Gene09	zinc finger (C2H2 type) family protein
Gene10	homeobox-leucine zipper protein 7 (HAT7) / HD-ZIP protein 7 / HD-ZIP protein (HB-3) ((ATHE-3, HAT7))
Gene11	WRKY family transcription factor ((WRKY30))
Gene12	homeobox-leucine zipper protein, putative / HD-ZIP transcription factor, putative
Gene13	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
Gene14	zinc finger (CCHC-type) family protein / RNA recognition motif (RRM)-containing protein
Gene15	TCP family transcription factor, putative
Gene16	scarecrow transcription factor family protein
Gene17	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
Gene18	myb family transcription factor
Gene19	zinc finger (Fam-binding) family protein
Gene20	myb family transcription factor
Gene21	zinc finger (Fam-binding) family protein
Gene22	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
Gene23	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
Gene24	myb family transcription factor (MYB40)
Gene25	myb family transcription factor
Gene26	zinc finger homeobox family protein / ZIPHD homeobox family protein
Gene27	myb family transcription factor (MYB19)
Gene28	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
Gene29	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein ((FL3))
Gene30	bZIP transcription factor family protein
Gene31	zinc finger (GATA type) family protein
Gene32	WD-40 repeat family protein / zfw2 protein (ZFW2), putative
Gene33	basic helix-loop-helix protein / bHLH protein
Gene34	myb family transcription factor

本研究から次の重要な結果を得た。

(1) STOP1が関連する制御機構をマイクロアレー解析から明らかにした。

(2) STOP1は同時に複数の下流因子を制御して酸感受性の機構に関与していることが示された。

## 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)

①Sawaki Y<sup>1</sup>, Iuchi S<sup>1</sup>, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Ikka T, Sakurai N, Fujita M, Shinozaki K, Shibata D, Kobayashi M, Koyama H. (2009) STOP1 regulates multiple genes that protect arabidopsis from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol.* **150**:281-294.



<sup>1</sup>These authors contributed equally to the article. 査読あり

②Tazib T, Kobayashi Y, Ikka T, Zhao CR, Iuchi S, Kobayashi M, Kimura K, Koyama H. (2009) Association mapping of cadmium, copper and hydrogen peroxide tolerance of roots and translocation capacities of cadmium and copper in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*. 2009 **137**:235-248. 査読あり

③ Iuchi S, Kobayashi Y, Koyama H, Kobayashi M (2008) STOP1, a Cys2/His2 type zinc-finger protein, plays critical role in acid soil tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior* **3**:128-130. 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

①小林安文・井内聖・小林佑理子・澤木宣忠・小林正智・小山博之 シロイヌナズナ STOP1 転写因子が制御する遺伝子群によるアルミニウム及び低pH耐性機構の解析. 日本土壤肥料学会 2009年09月15日、京都市

②小林安文・井内聖・小林佑理子・澤木宣忠・小林正智・小山博之. シロイヌナズナ低pH超感受性変異体 *stop1* の解析. 日本土壤肥料学会 2008年09月09日、名古屋

〔図書〕(計1件)

①小林佑理子・井内聖 (2011)イオン輸送機構制御による高ミネラル含量作物の作出に向けたトランスポーター研究とバイオリソースの利用,日本土壤肥料学雑誌 **82**:155-161

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

井内 聖 (IUCHI SATOSHI)

独立行政法人理化学研究所・実験植物開発室・専任研究員

90312256

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者