

平成23年 5月 17日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780057

研究課題名 (和文) イネのアルミニウム応答性遺伝子発現機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of aluminum response gene expression mechanism in rice

研究代表者

山地 直樹 (YAMAJI NAOKI)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：00444646

研究成果の概要 (和文)：

酸性土壌におけるアルミニウムイオン毒性に対して、イネではAl耐性遺伝子群の発現が誘導される。本研究ではイネ新規転写調節因子ART1がAl耐性遺伝子*STAR1*のプロモーター領域に結合してAl応答を制御していることを明らかにし、そのシス配列を決定した。また、ART1遺伝子を高発現する形質転換イネを作成し、*ART1*および*STAR1*などの耐性遺伝子群の発現の著しい増大を確認したが、高いAl感受性を示した。

研究成果の概要 (英文)：

Expressions of many Al-tolerance genes are induced by ionic Al in rice. In this study, we found that a rice Al tolerance gene, *STAR1*, was regulated by a transcription factor, ART1 and further identified a cis-acting element recognized by ART1. We also produced transgenic rice over-expressing ART1. Although the transgenic lines showed increased expression level of *ART1* and many downstream tolerance genes, the sensitivity to Al was enhanced compared to the wild type.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

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：植物成長・生理、アルミニウム、イネ、転写因子、耐性

1. 研究開始当初の背景

アルミニウムは土壌中に普遍的に存在

し、最も多く含まれる金属元素である。中性土壌 (pH 5 以上) では Al は不溶性であり、植物に対して生理的な活性を持たないが、酸性土壌 (pH 5 以下) では Al³⁺イオンとして溶出し植物の生育を著しく阻害する。一部の植物は Al 毒性に対する耐性機構を発達させているがその分子メカニズムはほとんど解明されていなかった。代表者のグループは、主要な作物のうち最も Al 耐性が高い植物種の一つであるイネから、複数の Al 感受性変異体をスクリーニングし、原因遺伝子の単離と解析を進めてきた。本研究開始当初は転写調節因子をコードする新規 Al 耐性遺伝子 *ART1* を単離し、Al 応答性遺伝子発現に関与することを確かめていた。

2. 研究の目的

本研究では転写調節因子ART1が認識するシス配列を決定するとともに、ART1と相互作用するタンパク質因子の探索を行なう。これらの研究を通じてAl応答性遺伝子発現のメカニズムを理解し、高Al耐性作物の作出するための端緒とすることを目的とした。

3. 研究の方法

転写調節因子ART1と下流のAl応答性遺伝子の1つ*STAR1*のプロモーターとの相互作用を酵母one-hybrid法とゲルシフトアッセイによって解析した。ゲルシフトアッセイに用いたART1タンパク質はコムギ胚芽無細胞タンパク質発現系を用いて調製した。また、酵母two-hybrid法によってART1と相互作用するタンパク質因子のスクリーニングを行った。*ART1*を過剰発現する形質転換イネを作成し、下流遺伝子の発現とAl耐性の評価を行った。

4. 研究成果

酵母one-hybrid法によってART1が制御するAl耐性遺伝子の1つである*STAR1*のプロモーター領域において、ART1の認識するシス配列が転写開始点上流-436~-297の約260 bpの範囲

に含まれることを確かめた。また、ART1は根のほぼ全ての細胞においてAlに応答せず構造的に発現し、核に局在すること、転写活性化能を有することなどの研究成果とともに論文に発表した(Yamaji et al., Plant Cell, 2009)。さらにゲルシフト法によるより詳細な解析を行った。コムギ胚芽無細胞タンパク質発現系で調製したART1タンパク質と*STAR1*プロモーターに基づく種々のプローブおよびコンペティターとの相互作用解析から、ART1が結合するシス配列

GGN[T/g/a/C]V[C/A/g]S[C/G]を特定した。さらにこのシス配列について、タバコ葉肉細胞プロトプラストを用いた一過的発現系においてART1依存的な遺伝子発現を確認した

(Tsutsui et al., Plant physiology 2011)。

また、ART1と相互作用する因子をプルダウンするため、HaloTagを付加したART1融合タンパク質のコンストラクトを作成し、まず無細胞タンパク質発現系を用いた融合タンパク質の発現と*STAR1*プロモーター配列への結合活性を確認した。しかし、このコンストラクトを導入した形質転換イネを作成したが、融合タンパク質の発現は検出されなかった。そこで別のアプローチとして酵母two-hybrid screeningを行い、機能未知のタンパク質をコードする候補遺伝子1つを見出した。現在その機能解析を行っている。

また、ユビキチンプロモーターおよび*STAR1*プロモーター制御下にART1遺伝子を高発現するコンストラクトを作成し、イネ植物体に導入した形質転換イネ系統を複数作成した。これらの形質転換イネにおいてはART1およびその下流のAl耐性遺伝子である*STAR1*、*STAR2*などの発現が著しく増大していることを確認した。*STAR1*プロモーター制御下に*ART1*遺伝子を導入した系統では、野生型とは異なり*ART1*の発現がAlによって増大することを確認した。

しかし、これらの形質転換イネのAl耐性の評価を行ったところ、予想に反してこれらの形質転換系統は野生型イネ系統よりも高いAl感受性を示した。イネの高いAl耐性には耐性遺伝子群の高度なバランスが重要であると推測された。

本研究の成果は、酸性土壌における植物の主要なストレスであるアルミニウムイオンに対する植物の応答に関して、耐性遺伝子とそれを制御する転写調節因子の関係を直接的に証明し、シス配列を初めて決定した。これらの成果は今後、植物のアルミニウム応答機構を包括的に理解するための第一歩であり、また、イネのアルミニウム耐性の一層の強化や他の植物種への応用に向けた礎となる重要な知見である。

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 Tomokazu Tsutsui, Naoki Yamaji, Jian Feng Ma (2011) Identification of a cis-acting element of ART1, a C2H2-type zinc finger transcription factor for aluminum tolerance in rice. *Plant Physiol.* published online doi: 10.1104/pp.111.175802. (査読有り)

- ② Naoki Yamaji, Chao Feng Huang, Sakiko Nagao, Masahiro Yano, Yutaka Sato, Yoshiaki Nagamura, Jian Feng Ma (2009) A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* **21**: 3339-3349. (査読有り)

[学会発表] (計3件)

- ① 筒井友和、山地直樹、馬建鋒 イネアルミニウム応答性転写調節因子ART1のシス配列の決定 日本植物生理学会 2011年3月20日 東北大学(東日本大震災のため東北大学での年会は中止さ

れたが、要旨集の公開を持って成立となった)

- ② 山地直樹 土の主成分アルミニウムと植物の関わりは謎だらけ 日本土壌肥科学会北海道大会 公開サテライトシンポジウム 2010年9月6日 北海道大学
- ③ Naoki Yamaji Identification of a transcription factor regulating high Al resistance in rice. 7th International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH 2009年5月19日 Guangzhou, China

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/plant.str ess/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山地 直樹 (YAMAJI NAOKI)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：00444646