

平成23年 5月 26日現在

機関番号： 82401

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21870046

研究課題名（和文）

ダイズの乾燥耐性向上に向けたGmNAC転写因子の包括的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of *GmNAC* family in soybean for improvement of drought resistance

研究代表者

TRAN Lam-Son・P (TRAN LAM-SON・P)

独立行政法人理化学研究所・発現調節研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号： 10549009

研究成果の概要（和文）：ダイズの全ゲノム配列より NAC 転写因子である *GmNAC* 遺伝子を包括的に解析し、データベースを作成した。さらに *GmNAC* 遺伝子とその上流因子である 2 成分制御系 (TCS) について詳しい解析を行った。本研究は、乾燥応答性 NAC シグナル伝達経路とそれを制御する 2 成分制御系の基盤研究としてだけでなく、遺伝子組み換え技術をもちいた乾燥耐性ダイズ作製に必要な *GmNAC* 遺伝子および乾燥応答性プロモーターを選抜するためにも役立つものである。

研究成果の概要（英文）：We have identified the repertoire of soybean transcription factor (TFs), within which the GmNAC family and its upstream regulatory two-component systems (TCSs) were analyzed in more details. Our study provides a solid foundation for selection of potential *GmNAC* gene candidates and respective promoters for the improvement of drought resistance in soybean via genetic engineering, and first insight in upstream regulating TCSs of drought-responsive NAC signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,150,000	345,000	1,495,000
2010 年度	940,000	282,000	1,222,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,090,000	627,000	2,717,000

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：ダイズ、転写因子、GmNAC、データベース、シス因子解析、アノテーション

1. 研究開始当初の背景

ダイズは栄養価の高い農作物で、世界中の人々の油分とタンパク質の供給源となっている。さらにバイオディーゼル等の再生可能燃料の原料としても魅力的な農作物となりつつある。しかし近年、世界のダイズ生産地のほ

とんどが深刻な干ばつにより劇的な減収被害を被っている。植物の乾燥耐性についての遺伝学的知見はまだ少ないので、限られた水資源で効率的にダイズを育てるために乾燥応答機構の研究は急務となっている(Tran and Mochida; 2010)。

乾燥等のストレスに応答して植物は様々な防御機構を活性化させ、ストレスによってもたらされ

る悪環境に対抗する。植物では、ストレスで発現誘導あるいは発現抑制される様々な転写因子がストレス応答で大きな役割を果たしている。シロイヌナズナやイネでは50以上の転写因子ファミリーが報告されている

(Riano-Pachon et al. 2007)が、その機能が解析されているものはまだ少ない。今までに機能解析されていない転写因子を解析・利用することで、乾燥ストレス下でも高収量を得られる遺伝子組み換えダイズを作製できる可能性がある (Valliyodan and Nguyen 2006; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006; Tran et al. 2007a; 2007b; Hadiarto and Tran; 2011)。

NAC転写因子は非生物学的ストレス応答を含む様々なプロセスに関わる多機能タンパク質である。NAC転写因子はN末端にDNA結合性NACドメインを持ち、C末端は制御経路で活性化因子あるいは抑制因子として働く転写調節領域を持つ。NAC転写因子が乾燥ストレス応答の制御に関与していることは、シロイヌナズナにおいて初めて報告された。シロイヌナズナのNAC遺伝子過剰発現体は多数のストレス誘導性遺伝子の発現を上昇させ、乾燥耐性を向上させた (Tran et al. 2004; Tran et al. 2006; Tran et al. 2010)。その後、主要農作物にNAC転写因子を利用して乾燥耐性を向上させたと多くの研究結果が報告されている。特にイネではDREB転写因子よりNAC転写因子が乾燥応答で主要な役割を担っていることが知られており、イネの*SNAC1*過剰発現体では野外調査で乾燥耐性が向上していることが確認されている (Hu et al. 2006)。

200以上ある *GmNAC* 遺伝子のうち既に31個の遺伝子については単離・同定し、9個の遺伝子が乾燥誘導性であることを示した (Tran et al. 2009)。

2. 研究の目的

NAC 転写因子ファミリーを含む転写因子が乾燥耐性において重要な役割を担っていることを踏まえて、ダイズの転写因子のカタログ化及び *GmNAC* 転写因子の分子生物学的解析を目的として研究を行った。本研究は、乾燥応答性 NAC シグナル伝達経路とそれを制御する2成分制御系の基盤研究としてだけでなく、遺伝子組み換え技術をもちいた乾燥耐性ダイズ作製に必要な *GmNAC* 遺伝子および乾燥応答性プロモーターを選抜するためにも役立つものである。

3. 研究の方法

(1) 植物の育成、ストレス処理、組織のサンプリング

ダイズ(cv. William 82)の育成は Le et al. (2011a)の方法に従った。2成分制御系(TCS)

及び *GmNAC* 遺伝子の組織特異的発現プロファイルには、播種後12日目のダイズの根と地上部をもちいた。乾燥ストレス処理は Le et al. (2011a)の方法に従い、0、2、10時間で経時的にサンプリングを行った。

(2) ダイズ転写因子のカタログ化とアノテーション

GmNAC ファミリーを含むダイズ転写因子の遺伝子はダイズの全ゲノム配列より自動抽出後、手作業で確認した (Mochida et al. 2009, 2010a)。

(3) 構造解析と系統解析

Tran et al. (2009)の方法に従い、ClustalX と GeneDoc (<http://www.nrbcs.org/gfx/genedoc/>) をもちいて、ダイズ、シロイヌナズナ、イネの配列アライメントを作成した (ClustalX parameter set: gap open penalty = 10, gap extension penalty = 0.2)。さらにその配列アライメントから MEGA4 をもちいて近隣結合法により無根系統樹を作成した。ブートストラップ解析(1000 replicates)により単系統群の信頼水準を測定した。

(4) *In silico* 発現解析

Mochida et al. (2010a) と Le et al. (2011a)の方法に従い、Affymetrix マイクロアレイデータと Illumina の発現データをもちいて TCS 及び転写因子をコードする遺伝子の発現プロファイルをコンピュータ上で予測した。

(5) RNA 抽出、DNaseI 処理、cDNA 合成、定量的リアルタイム PCR 及び統計解析

以上の実験は、Le et al. (2011a)の方法に従った。

(6) 乾燥応答性 *GmNAC* 遺伝子のシロイヌナズナ過剰発現体の作成

乾燥応答性 *GmNAC* 遺伝子をダイズよりクローニングし、*35S*あるいは *RD29A* プロモーターに繋げてシロイヌナズナに形質転換した (Tran et al. 2004; 2009)。

(7) シス因子解析

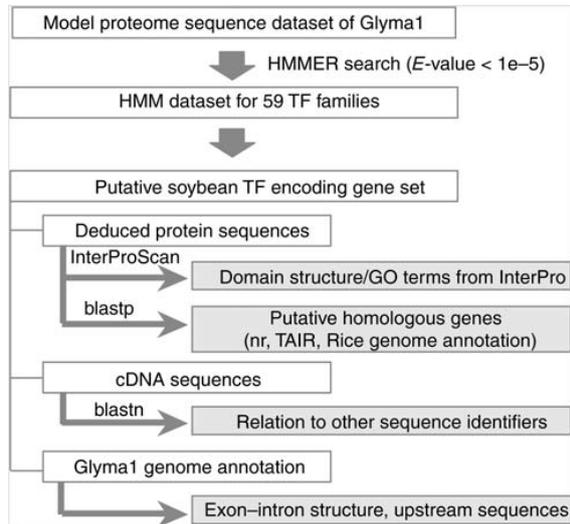
Mochida et al. (2009; 2010a)の方法に従い、TCS 及び転写因子をコードする遺伝子の予測プロモーター領域(1000bp)に存在するストレス応答性シス因子を探索した。

4. 研究成果

(1) ダイズ転写因子のデータベース作成

ダイズ全ゲノム配列転写より転写因子をコードする全ての遺伝子を抽出し、隠れマルコフモデルに基づき DNA 結合ドメインで分類した。4342 遺伝子座に存在する 5035 個の転写因子が 61 個のファミリーに分類された。これらをまとめて、ダイズ的全転写因子を網羅するデータベース、

SoybeanTFDB (<http://soybeanfdb.psc.riken.jp>) を作製した。そこには、機能モチーフ、完全長 cDNA 配列、ドメイン配列のアライメント、プロモーター領域、ゲノム構成、およびシロイヌナズナとの比較分析で得られた遺伝子アノテーションに基づき推定された制御機能などの情報が含まれている（ワークフローチャートは下図参照）。



(2) 非生物学的ストレス応答性ダイズ転写因子探索に向けたシス因子解析

その中から 205 個のダイズ NAC 転写因子 (GmNAC) を含む全ての転写因子遺伝子とそのプロモーター配列を抽出し、PLACE データベースに登録されている全タイプのシス因子と同様にダイズの非生物学的ストレス応答シス因子を同定した。SoybeanTFDB は公開情報リソースとして誰でも利用できるもので、容易にシス因子や遺伝子アノテーションなどの情報にアクセスでき、ダイズ転写因子の機能予測から目的に合った遺伝子を選抜できる (Mochida et al. 2009)。

(3) GmNAC 転写因子の同定、構造解析及び系統解析

SoybeanTFDB より 205 個のダイズ NAC 転写因子 (GmNAC) を同定した。そのうち 152 個は Glyma1 においても完全長 ORF (Open Reading Frame) をコードしていた。全 GmNAC 転写因子とシロイヌナズナ・イネのホモログとのマルチプルアライメント及び系統樹を作成し、系統解析を行った (Le et al. 2011b)。ほとんどの GmNAC 転写因子は 5 つのサブドメインから成る高度に保存された N 末端 DNA 結合領域と、多様な配列を持つ C 末端転写活性化領域を持っていた。さらに NCBI nr と UniProt に登録されている他のマメ科植物、シロイヌナズナ、イネ、ポプラの転写因子との比較解析を行った。データは理化学研究所の SoybeanTFDB 及びマメ科植物の転写因子統合データベース、LegumeTFDB (<http://legumetfdb.psc.riken.jp>)

p/index.pl) で公開している (Mochida et al. 2010a)。

(4) GmNAC 遺伝子の発現プロファイリング

乾燥耐性ダイズ作成に応用するためには、乾燥応答性だけでなく組織特異性（特に根あるいは地上部）が重要なポイントになる。現在公開されているダイズの Affymetrix アレイデータ、Genevestigator、Illumina の transcriptome 解析データなどを包括的に解析し、GmNAC 遺伝子のストレス応答性及び組織特異性を予測した (Mochida et al. 2010a)。

(5) 定量 RT-PCR による GmNAC 遺伝子の乾燥応答性の確認

上記で予測された乾燥応答性 GmNAC 遺伝子の乾燥応答性を確認するため、乾燥ストレス処理したダイズの根と地上部をもちいて定量 RT-PCR を行った (Le et al. 2011b)。ここで乾燥応答性を確認できた GmNAC 遺伝子を以下の遺伝子組み換え体作成にもちいた。

(6) 乾燥応答性 GmNAC 遺伝子のシロイヌナズナ過剰発現体の作成

4 個の GmNAC 遺伝子を恒常発現用プロモーター (35S) とストレス応答プロモーター (RD29A) に繋げて、シロイヌナズナに形質転換した。形質転換体の選抜は現在継続中である。これらの形質転換体は今後の解析にもちいる予定である。

(7) GmNAC 転写因子の上流で働く二成分制御系 (TCS) 因子の探索

TCS が GmNAC 転写因子の上流で働くことは広く知られている。我々はゲノム配列から全てのダイズ TCS 因子を同定した (Mochida et al. 2010b)。予測された TCS 遺伝子のうちいくつかの遺伝子が乾燥応答性を示したことから、これらは乾燥応答性 GmNAC 転写因子の上流となる可能性がある。

参考文献

- Hadiarto T, Tran LS (2011) Plant Cell Reports 30:297-310.
- Hu H. et al. (2006) Proc Natl Acad Sci USA. 103:12987-12992
- Kim HS et al. (2007) J Biol Chem 282:36292-36302
- Le et al. (2011a) DNA Res 18:17-29
- Le et al. (2011b) DNA Res (in preparation)
- Mochida K. et al. (2009) DNA Res 16: 353-369.
- Mochida K. et al. (2010a) Bioinformatics 26: 290-291.
- Mochida K. et al. (2010b) DNA Res 17: 303-324.
- Riaño-Pachón DM et al. (2007) BMC Bioinformatics 8:42
- Tran LS et al. (2004) Plant Cell 16:2481-2498
- Tran LS et al (2006) Plant J 49:46-63
- Tran LS et al. (2007a) Methods in Enzymology 428: 109-128
- Tran et al. (2007b) Plant J. 49:46-63.
- Tran LS et al (2009) Mol Genet Genomics 281:647-64.

Tran LS et al (2010) *GM Crops* 1: 34-41
Tran LS, Mochida K (2010) *Funct Integr Genomics* 10:447-462.
Valliyodan B, Nguyen HT (2006) *Curr Opin Plant Biol* 9:189-95
Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) *Annu Rev Plant Biol* 57:781-803

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 11 件)

Research Papers

- ① Le TD, Nishiyama R, Watanabe Y, Mochida K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS. Genome-wide survey and expression analysis of plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Res* (accepted), 2011年, 査読有
- ② Mochida K, Yoshida T, Sakurai T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS. LegumeTFDB: An integrative database of *Glycine max*, *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* transcription factors. *Bioinformatics* 26: 290-291, 2010年, 査読有
- ③ Mochida K, Yoshida T, Sakurai T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS. Genome-wide analysis of two-component system and prediction of stress-responsive TCS members in soybean. *DNA Res* 17: 303-324, 2010年, 査読有
- ④ Mochida K, Yoshida T, Sakurai T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS. *In silico* analysis of transcription factor repertoire and prediction of stress responsive transcription factors in soybean. *DNA Res* 16: 353-369, 2009年, 査読有

Reviews

- ⑤ Hadiarto T, Tran LS. Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Reports* 30:297-310, 2011年, 査読有
- ⑥ Le TD, Choi J-D, Tran LS. Amino acids conferring herbicide resistance in tobacco acetohydroxyacid synthase. *GM Crops* 1:62-67, 2010年, 査読有
- ⑦ Tran LS, Nishiyama R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. *GM Crops* 1: 34-41, 2010年, 査読有
- ⑧ Tran LS, Mochida K. Functional genomics of soybean for improvement of productivity in adverse conditions. *Funct Integr Genomics* 10:447-462, 2010年, 査読有

Addenda

- ⑨ Tran LS, Mochida K. A platform for functional prediction and comparative analyses of transcription factors of legumes and beyond. *Plant Signal Behav* 5: 550-552, 2010年, 査読無 (Addendum to Mochida K *et al.* *Bioinformatics* 26: 290-291).
- ⑩ Tran LS, Mochida K. Identification and prediction of abiotic stress responsive transcription factors involved in abiotic stress signaling in soybean. *Plant Signal Behav* 5: 255-257, 2010年, 査読無 (Addendum to Mochida K *et al.* *DNA Res* 16: 353-369).
- ⑪ Tran LS, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Role of cytokinin responsive two-component system in ABA and osmotic stress signalings. *Plant Signal Behav* 5: 148-150, 2010年, 査読無 (Addendum to Tran LS *et al.* *PNAS* 104: 20623-8).

[図書] (計 1 件)

Book Chapter

- ① Xin H, Qin F, Tran LS (2011). Transcription factors involved in environmental stress response in plants, in "Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climatic Change", eds. Ahmad P and Prasad MNV. Springer Science, New York, NY 10013, USA (in press)

[その他]

ホームページ等

<http://labs.psc.riken.jp/spru/>

ダイズの全転写因子データベース (SoybeanTFDB)
<http://soybeantfdb.psc.riken.jp>

マメ科植物の転写因子統合データベース (LegumeTFDB)
<http://legumetfdb.psc.riken.jp/index.pl>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
TRAN Lam-Son・P (TRAN LAM-SON・P)
独立行政法人理化学研究所・発現調節研究ユニット・ユニットリーダー
10549009
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし