

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24688009

研究課題名(和文)ゲノムワイド関連解析に基づく酸性土壌耐性の分子的理解

研究課題名(英文)Molecular understanding of acid soil tolerance based on genome-wide association study.

研究代表者

小林 佑理子(Kobayashi, Yuriko)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：40610952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：世界の農耕地に広がる酸性問題土壌では、主にアルミニウム(AI)や酸(H+)が作物の生育を阻害する。本研究では、モデル植物シロイヌナズナ約200系統の約20万個の一塩基多型(SNP)とAIおよびH+ストレス耐性の関連解析(ゲノムワイド関連解析：GWAS)を実施した。その結果、両耐性バリエーションについて、それぞれ約70%を説明する100以上の耐性関連遺伝子領域を検出し、新規AI耐性関連遺伝子を同定した。また、主要AI耐性遺伝子リノゴ酸トランスポーターの転写制御領域におけるいくつかの遺伝子多型がAI耐性に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the acid soil of world arable land, mainly Aluminum and proton inhibit the crop growth of crop. In the present study, we conducted genome-wide association study (GWAS) for AI- and proton stress tolerance using approximately 200,000 SNPs among 200 Arabidopsis accessions. In the results, we detected over 100 gene regions which explain approximately 70% of variation in both AI- and proton-tolerance, and then we identified novel genes associated with the AI tolerance. In addition, we revealed that some polymorphisms in the promoter region of AtALMT1 gene are involved in the AI tolerance.

研究分野：植物栄養学・土壌学

キーワード：アルミニウム耐性 プロトン耐性 酸性土壌耐性 ゲノムワイド関連解析 遺伝子多型 ナチュラルバリエーション シロイヌナズナ AtALMT1

### 1. 研究開始当初の背景

世界耕地面積の約 4-5 割を占める酸性土壌は、世界に分布しており、アジアや南米など経済的貧困国にも広く分布する問題土壌である。そこでは植物生産性の著しい低さに加え、それを改善するための大量の石灰・リン酸肥料投入に伴うコスト面やリン鉱石資源の寿命も問題化している。したがって、資源コストを抑え生産性を向上させるため、酸性土壌ストレスの主要因であるアルミニウム (Al) 耐性の品種改良を目指した研究が世界中で活発に行われている。

酸性土壌ストレスは植物の根の生育を阻害するが、植物は様々な耐性機構を有している。これまでにいくつかの Al 耐性に関わる重要遺伝子が特定されてきた (Kochian et al. 2004)。しかし、関与する多数の遺伝子群やその関係性および、耐性差を生じる分子的な仕組みが解明されていないため、効率的な品種改良の戦略は構築できていない。また、他の主要ストレス要因である酸 ( $H^+$ ) に対する耐性分子機構に関しても未解明な部分が多い。

### 2. 研究の目的

近年のゲノム科学の進展を受け、モデル植物シロイヌナズナの野生系統が世界中から多数収集され、それらの高密度一塩基多型 (SNP) マーカーが整備されている。その結果、ゲノムワイド関連解析 (GWAS: genome-wide association study) では、系統間の全ゲノム SNP と形質値の相関解析から系統間差の原因となる遺伝子座 (SNP) を網羅的かつ高感度にファインマッピングできるようになった (e.g. Atwell et al. 2010)。

本研究では、これまで用いられてきた実験系統のシロイヌナズナの限定的な遺伝的要素を野生系統に拡張させ、シロイヌナズナの酸性土壌耐性のナチュラルバリエーションを利用する GWAS を実施し、酸性土壌耐性に影響している遺伝子群の同定、およびそれらの遺伝効果を分子レベルで明らかにすることを目的とした。具体的には、1) 酸性土壌耐性バリエーションを明らかにする 2) 耐性に影響を及ぼす遺伝子座を明らかにする 3) 耐性関連遺伝子や多型の機能と遺伝効果を明らかにすることとした。

### 3. 研究の方法

(1) 酸性土壌ストレス耐性バリエーション評価: ハイスループットな水耕栽培系を用い (Kobayashi and Koyama. 2002), シロイヌナズナ約 200-300 系統の Al, 酸ストレス及びコントロール区での根長を測定した。コントロール区に対するストレス区での根伸長割合 (RRL: relative root length) を指標に耐性評価を行った。なお、用いた野生株集団の遺伝的構造は STRUCTURE により評価した。

(2) Al は活性酸素ストレスを引き起こすため、同様に過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) ストレス耐性評価も行い、 $H_2O_2$  耐性に関する GWAS も行って Al 耐性 GWAS と比較した。さらに、他の土壌環境ミネラルストレスである塩 (NaCl) 耐性に関する GWAS も実施した。

(3) 耐性の原因となっている原因遺伝子座の同定: (1) で正常に得られた約 200 系統の表現型値とパブリックデータベースから得た約 20 万個の SNP の相関解析を行い、形質に関連する SNPs と耐性への貢献度を検出した。解析には TASSEL ソフトウェア (Bradbury et al. 2007) を用いた。有意に検出されたゲノム領域の中から候補遺伝子群を選抜した。さらに、遺伝子座 (SNP) 間の相互作用についても解析した。

(4) 耐性原因遺伝子及び原因多型の機能と遺伝効果の解明: 候補遺伝子については、T-DNA 挿入遺伝子破壊株シロイヌナズナの根長試験により耐性関連遺伝子の評価を行った。耐性と感受性多型系統間で遺伝子発現量に関連するプロモーター多型については、レポーター遺伝子組換えシロイヌナズナを作製し、多型が転写調節に及ぼす影響を調べた。

### 4. 研究成果

(1) 異なる 6 つの地域 (北欧、南欧、東欧、西欧、北米、中央アジア) に起源をもつ約 200 系統のシロイヌナズナの Al 及び  $H^+$  耐性について、根伸長 (RRL) を指標として評価した。いずれの耐性も高い遺伝率で幅広い分布を示したことから、複数の遺伝子群が耐性に関与していることが強く示唆された。両ストレス耐性 (RRL) 間には相関関係がなかったことから、それぞれ異なる遺伝的要因が関与していることが示唆された。また、遺伝的背景で分集団に分けた場合、分集団間の Al 耐性に有意な差はなかったが (酸耐性は耐性または感受性の集団が見られた)、集団内で有意に異なる系統が存在した。それらは耐性遺伝子の変異が関わっていると考えられるため、今後の原因遺伝子のマッピングの材料となり得る。

(2) 耐性値 (RRL) を用いた GWAS により全ゲノム領域から複数の耐性関連遺伝子座 (SNPs) を検出した (図 1)。ここでは、両耐性バリエーションに関連する 140 及び 160 の SNPs を同定し、それらは互いに異なる SNP であることから関与する主要遺伝子群は異なることが示唆された。一方、リッジ回帰分析から、同 SNPs により各バリエーションのそれぞれ約 70% を説明しうるということが明らかになった (論文投稿中)。

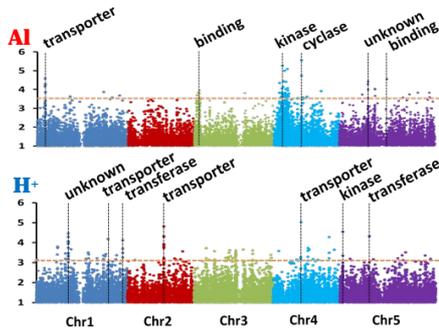


図1 酸性土壌耐性と関連する遺伝子

GWASによりゲノム全域に複数の関連遺伝子座が検出された。縦軸は関連性の高さを示し、横軸はゲノム上での位置を示している。特に関連性の高い遺伝子座に関してその遺伝子機能を示す。

(3) 過酸化水素耐性に関する GWAS 解析では、約 90%の耐性バリエーションを説明できる 90SNPs を検出し、特に強い関連を示す遺伝子領域を特定した。その領域の耐性関連遺伝子の遺伝子配列や発現量解析から、あるトランスporter 遺伝子が過酸化水素耐性に強く貢献していることが明らかになった。同遺伝子は、様々な環境ストレスで誘導される活性酸素ストレスに対する耐性因子として今後の植物ストレス科学研究において重要であると考えられた（論文投稿中）。

NaCl 耐性に関する GWAS では、著しく高い相関を示す SNP は得られなかったが、検出された NaCl 耐性関連遺伝子座には、新規の遺伝子群に加えて、既報の塩耐性遺伝子群が多数存在しておりそれらのアミノ酸変異や発現量差が耐性に貢献していることが示唆された（Kobayashi et al. 2016）。一方、検出された SNPs は、酸性土壌耐性の GWAS 結果と異なっており、それらのストレスは主に特異的な遺伝子群によって支配されていることが示唆された。

(4) H<sup>+</sup>（酸）耐性関連 SNP 近傍には、既報の酸耐性遺伝子 *STOP1* などは存在しなかったが、耐性への関与が示唆されている細胞壁安定関連遺伝子や pH 恒常性維持に関わる分子シャペロン遺伝子などが検出された。一方、Al 耐性では、シロイヌナズナで主要な Al 耐性遺伝子リンゴ酸トランスporter *AtALMT1*（Hoekenga et al. 2006）に加え、耐性への関与が示唆されているテルペノイドやカロースの合成遺伝子が存在した。このように、同定された SNP の近傍には、既知の酸性土壌耐性遺伝子に加え、新規耐性メカニズムへの関与が考えられる遺伝子が複数存在した。

(5) それぞれ 100 弱の遺伝子破壊株シロイヌナズナの耐性をスクリーニングしたところ、いくつかの遺伝子破壊株で感受性が確認された。シロイヌナズナの Al 耐性差に関与する遺伝子群は、*AtALMT1* 遺伝子の発現制御に関与するものが多いと考えられたが、その他の機構に多くの遺伝子群が関与していることが明らかとなった。また、ほとんど明らかになっていない H<sup>+</sup>耐性に関しても新規耐性遺

伝子の関与が示唆された。これらの遺伝子群の機能や系統間差の原因を明らかにすることは、今後の酸性土壌耐性の分子改良に非常に有益であると考えられた。

(6) Al 耐性の GWAS において、*AtALMT1* 遺伝子座に複数の高い関連 SNPs が検出され、系統間の *AtALMT1* 発現量の差が Al 耐性に関連していることを明らかにした。*AtALMT1* プロモーター上の関連 SNP を耐性型にもつ系統群は、感受性型に比べて約 2 倍程度 *AtALMT1* 発現量が高く、多数のシロイヌナズナ系統における Al 耐性への発現量バリエーションの寄与率は 40%程度であった。

プロモーター多型を組換えたシロイヌナズナを評価したところ、トランスポソンの挿入が *AtALMT1* 発現量を介した耐性の原因のひとつであることが明らかとなり、またそれ以外のプロモーター多型が耐性に貢献していることも示唆された。さらに、分集団内の耐性差はこの変異では説明できないことや、検出 SNP と *AtALMT1* 発現量の Al 耐性への貢献度から、プロモーター多型以外の要因が *AtALMT1* 発現量差に関与していることが分かった。

また、*AtALMT1* 上の SNPs と全ゲノム SNPs の相互作用解析から、複数のエピスタシスの関係が検出され、それらが *AtALMT1* の制御機構に関与することが考えられた。このように複雑な *AtALMT1* 転写制御機構が Al 耐性に関与していることが遺伝学的にも明らかになったため、現在は新たな遺伝子ネットワーク解析等と統合して解析を進めている。

(7) (1)で述べたように、シロイヌナズナ集団において著しい耐性または感受性を示す系統群が特定できたため、それらの全遺伝子発現量を調べたり、交配集団によるマッピングを行ったりすることで、原因遺伝子の特定を試みた。これまでに、耐性と感受性間で発現量差を示した遺伝子群の遺伝子破壊株解析から Al 耐性に関与する遺伝子を複数同定した。同手法は GWAS と統合することで耐性遺伝子の同定を加速させることが期待できる（論文投稿中）。

#### <引用文献>

Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., Piñeros M.A. HOW DO CROP PLANTS TOLERATE ACID SOILS? MECHANISMS OF ALUMINUM TOLERANCE AND PHOSPHOROUS EFFICIENCY. Annual Review of Plant Biology, 55, 2014, 459-493.

Atwell, S. 他 35 名. Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. Nature, 465, 2010, 627-631.

Kobayashi, Y. and Koyama, H. QTL Analysis of Al Tolerance in Recombinant Inbred Lines of *Arabidopsis thaliana*.

Plant Cell Physiol, 43, 2002, 1526-1533.  
Bradbury P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Randoss, Y., Buckler, E.S. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics, 23, 2007, 2633-2635.

Kobayashi, Y.他 11 名. Joint genetic and network analyses identify loci associated with root growth under NaCl stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant, Cell & Environment, 39, 2016, 918-934.

Hoekenga, O.A.他 13 名 *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 2006, 9738-9743.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kobayashi, Y., Sadhukhan, A., Tazib, T., Nakano, Y., Kusunoki, K., Mohamed, K., Chaffai, R., Iuchi, S., Sahoo, L., Kobayashi, M., Hoekenga, O.A. and Koyama, H.: Joint genetic and network analyses identify loci associated with root growth under NaCl stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Environ. 査読有 39: 918-934, 2016. DOI: 10.1111/pce.12691

〔学会発表〕(計 9 件)

Kobayashi, Y., Nakano, Y., Kusunoki, K., Iuchi, S., Yamamoto, Y.Y., Kobayashi, M. and Koyama, H.: A genome-wide association study of Aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana*. 9th International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH, 2015.10.18-23. Dubrovnik, Croatia.

楠和隆, 中野友貴, 田中啓介, 坂田洋一, 小林佑理子, 小山博之: RNA-seq を用いたシロイヌナズナ野生種のアルミニウムストレス応答トランスクリプトーム比較解析. 日本土壌肥料学会 2015.9. 9-11. 京都大学(京都府京都市)

楠和隆, 中野友貴, 田中啓介, 坂田洋一, 小山博之, 小林佑理子: RNA-seq によるシロイヌナズナエコタイプのアルミニウム応答性の比較解析. NGS 現場の会第四回研究会, 2015.7.1-3. につくば国際会議場(茨城県つくば市).

中野友貴, 大橋聖, 楠和隆, 時澤睦朋, 山本義治, 井内聖, 小林正智, 小山博之, 小林佑理子: シロイヌナズナにおけるアルミニウム及び低 pH 耐性のゲノムワイド関連解析. 日本土壌肥料学会 2014.9.9-11 東京農工大学(東京都府中市).

中野友貴, 大橋聖, 楠和隆, 時澤睦朋, 山本義治, 井内聖, 小林正智, 小山博之,

小林佑理子: シロイヌナズナにおけるアルミニウムストレスによる根伸長阻害のナチュラルバリエーションの解析. 根研究集会, 2014.9.6-7. 名古屋大学(愛知県名古屋市).

中野友貴, 大橋聖, 山中啓史, 井内聖, 小林正智, 山本義治, 小山博之, 小林佑理子: シロイヌナズナにおけるアルミニウム及び低 pH 耐性のゲノムワイド関連解析. 日本植物生理学会, 2014.3.18-20. 富山大学(富山県富山市).

小林佑理子: シロイヌナズナ野生株集団を用いたゲノムワイド関連解析による環境ストレス耐性機構の理解. 日本植物生理学会 2013.3.21-23 岡山大学(岡山県岡山市).

小林佑理子: ゲノムワイド関連解析によるミネラルストレス耐性の理解. 日本土壌肥料学会 中部支部第 92 回例会, 2012.11.8. じゅうろくプラザ(岐阜県岐阜市).

小林佑理子: ゲノムワイド関連解析から見るミネラルストレス耐性の多様性. 日本土壌肥料学会 2012.9.4-6. 鳥取大学(鳥取県鳥取市).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 佑理子 (KOBAYASHI, Yuriko)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号: 40610952