

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780059

研究課題名(和文)チャのアルミニウム耐性に関わる転写因子と誘導遺伝子群の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Isolation and Characterization of STOP1 Ortholog Genes of Tea Plant (*Camellia sinensis* L.)

研究代表者

一家 崇志 (IKKA, Takashi)

静岡大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90580647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：酸性土壌ではアルミニウムイオン ( $Al^{3+}$ ) とプロトン ( $H^+$ ) により根伸長が阻害される。近年、シロイヌナズナにおいて $Al^{3+}$ と $H^+$ 耐性を制御するAtSTOP1 (*Arabidopsis thaliana* sensitive to proton rhizotoxicity 1) 転写因子が発見された。本研究では、酸性土壌において良好な生育を示すチャ (*Camellia sinensis* L.) から2つのSTOP1相同遺伝子 (CsSTOP1およびCsSTOP2) を単離し、その機能解析を行った。その結果、CsSTOP1およびCsSTOP2も酸耐性に重要な遺伝子を制御することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Aluminum (Al) and proton ( $H^+$ ) tolerances are essential traits for plants to adapt to acid soil environments. Recently, in *Arabidopsis* (*A. thaliana*), it was reported that these tolerances are mediated by a zinc-finger transcription factor, sensitive to proton rhizotoxicity1 (AtSTOP1), which regulates the transcription of multiple genes critical for both tolerances. Tea plants (*Camellia sinensis* L.) grow well in strongly acidic soils (less than pH 4) containing high levels of  $Al^{3+}$  and  $H^+$ . However, the mechanisms of both tolerances by tea plants are still poorly clarified. Here, we isolated two STOP1 orthologs (CsSTOP1 and CsSTOP2) from tea plant, and characterized in planta complementation assays. By using CsSTOP1- or CsSTOP2-expressing *Arabidopsis* transgenic lines, it was suggested that several genes, known to be regulated in the AtSTOP1 under  $Al^{3+}$  and  $H^+$  treatments, were also regulated in the CsSTOP1 and CsSTOP2.

研究分野：植物栄養学

キーワード：チャ アルミニウム耐性 STOP1転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

世界の耕作可能陸地面積の約 40% を占める酸性土壌では、根圏に多量に存在するアルミニウムイオン ( $Al^{3+}$ ) により作物の生育が著しく阻害される。このため酸性土壌耐性を強化することは、食料・バイオマス生産適地の拡大、省資源型の作物栽培体系の確立等を通して、世界規模での農林業等に大きなインパクトを与えるものであり、国内外を問わず活発に研究されている。Al 耐性は遺伝子組換えやマーカーアシスト選抜により改良することができるが、そのためには複雑な耐性機構を分子レベルで解明し、耐性遺伝子を単離することが必要である。一般的に、Al は細胞内部や細胞膜等の複数の作用点に障害をもたらす、その耐性程度は植物種によって異なる。これまでに、主な Al 耐性機構として、根からの有機酸放出や、液胞内への Al 隔離などが報告されている。しかしながら、多くの研究は植物種内の耐性差を検出する方法に特化しているため、種内の耐性差を越える Al 耐性機構の発見は困難である。

一方で、種間には種内の耐性差では説明することが出来ない超 Al 耐性植物が存在する。その中でも、チャ (*Camellia sinensis* L.) は、酸性 (pH 4-5) で  $Al^{3+}$  が存在する条件であっても良好な生育を示し、Al を有用元素とする。また、生体内に多量 ( $10,000 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$  以上) の Al を蓄積するなどの特異な性質を持つ好 Al 性植物である。これまでにチャは、Al を輸送および貯蔵する過程で有機酸やカテキン類等と結合させることにより無毒化していることが分かっていたが、これらの耐性機構は分子レベルでは明らかにされていない。つまり、チャが有する Al を多量に吸収しながら良好に生育できる機構を分子レベルで解明することは、他の作物での Al 耐性の向上に大いに貢献すると考えられる。

これまでに研究代表者らの研究グループは、シロイヌナズナの主要な Al 耐性機構である有機酸放出を担う Al 耐性遺伝子 (リンゴ酸トランスポーター遺伝子) の発現を制御する、*AtSTOP1* (*Arabidopsis thaliana* sensitive to proton rithotoxycity1) 転写因子を発見した。また、*AtSTOP1* 転写因子のシステムバイオロジー的研究 (トランスクリプトーム解析とメタボローム解析を統合した研究) により、既知の酸性土壌耐性に関わる遺伝子群 (細胞内外の Al 耐性に関与する遺伝子) や、代謝経路 (グルタミン酸脱水素酵素、GABA シヤント経路、生化学的 pH 制御機構等) およびイオンホメオスタシスを制御する主要遺伝子を統合的に制御していることをつきとめた。さらに、*STOP1* 相同遺伝子が様々な植物種で存在することを報告している。最近イネにおいても、*AtSTOP1* と相同性の高い転写因子が単離され、イネの Al 耐性に大きく貢献していることが報告されており、*STOP1* 遺伝子が酸性土壌耐性付与に重要である事が示されてきた。このような状況の中、研究代表者はチャ

から 2 種類の *STOP1* 相同遺伝子 (*CsSTOP1* および *CsSTOP2*) を単離することに成功した。これまでの実績では、各植物種にそれぞれ存在する *STOP1* 相同遺伝子が植物種固有の Al 耐性を制御していることが報告されていることから、超 Al 耐性植物であるチャにおける *CsSTOP1* の制御機構を解明することにより、酸性土壌耐性植物の分子改良に多大な貢献をもたらす事が期待できる。

### 2. 研究の目的

チャから単離した 2 種類の *CsSTOP1* 相同遺伝子が、シロイヌナズナやイネと同様に Al 耐性に関わる重要な遺伝子の発現制御機能を持つと推測している。本研究では、正逆遺伝学・遺伝子組換え等の分子生物学的解析方法を駆使し、*CsSTOP1* 転写因子による Al 耐性遺伝子制御システムの解明と、その下流に存在すると推定される Al 誘導型遺伝子を特定することにより、酸性土壌耐性作物作出のための分子育種の基盤構築を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) *CsSTOP1* 相同遺伝子のクローニングおよびその他相同遺伝子の探索

*AtSTOP1* 遺伝子にはそのホモログである *AtSTOP2* 遺伝子が存在しており、これまでに研究代表者が単離した 2 種類の *CsSTOP1* 相同遺伝子もそれぞれ *AtSTOP1* と *AtSTOP2* の相同遺伝子であることが推定されている。イネにおいても複数の *STOP1* 相同遺伝子が存在することなどから、上記 2 種類の *CsSTOP1* 相同遺伝子以外にもホモログ遺伝子が存在する可能性が考えられる。まず、チャ標準水耕液 (0.4 mM Al, pH 4.2) で水耕栽培したチャ (*Camellia sinensis* L. cv. やぶきた) 一年生挿し木苗の葉と根から total RNA を抽出し、PCR 法により上記 2 種類の *CsSTOP1* 相同遺伝子 (*CsSTOP1*, *CsSTOP2*) 全長配列の増幅を行った。一方、Degenerate PCR および RACE (rapid amplification of cDNA ends) PCR 法によりその他 *CsSTOP1* 相同遺伝子の単離を試みた。

(2) *CsSTOP1* 相同遺伝子組換え体の作製と組換え体の機能解析および耐性評価

上記 (1) でクローニングを行った *CsSTOP1* および *CsSTOP2* 相同遺伝子について、シロイヌナズナ *AtSTOP1* 遺伝子破壊株 (*stop1-K.O.*, *Atstop1*) への組換え植物体を作製した。Agrobacterium 法により形質転換を行いホモ個体の選抜を行った。T<sub>2</sub> 植物体を用いて、*CsSTOP1* および *CsSTOP2* 相補組換え体 (*CsSTOP1-comp* および *CsSTOP2-comp*)、対照として Col-0 と *Atstop1* を用いて、Al (4  $\mu\text{M}$ , pH 5.0) と低 pH (pH 4.7) ストレス下での根長試験を行った。相補試験により根伸長の回復が認められた個体について、低 pH ストレス耐性に関与する *polygalacturonase inhibiting protein1* (*PGIP1*), *calcineurin B-like protein*

*interacting protein kinase23 (CIPK23)* および *STOP2*, Al ストレス耐性に關与する *A. thaliana aluminum-activated malate transporter1 (AtALMT1)*, *aluminum sensitive3 (ALS3)*, *A. thaliana multidrug and toxic compound extrusion (AtMATE)*, *glutamate dehydrogenase1 (GDH1)* および *probable polyol transporter3 (PLT3)* 発現量を real-time PCR により定量した. 対照として, シロイヌナズナ野生型 (Col-0) と *Atstop1* を用いた.

### (3) Al 処理により特異的に転写誘導される遺伝子群の特定

*STOP1* 転写因子 (または相同遺伝子) による Al および低 pH 耐性制御機構には複数の遺伝子が關与するが, それらの制御遺伝子の種類は植物種間で異なることが報告されている. そこで, 上記 (2) で調査した遺伝子群以外の *CsSTOP1* 制御遺伝子群の調査を網羅的に行うため, *CsSTOP1*-comp または *CsSTOP2*-comp ラインを用いたマイクロアレイ解析を行った. 2% MGRL 培地 (pH 5.0) で 10 日間栽培した *CsSTOP*-comp ラインを, 24 時間 Al 処理 (10  $\mu$ M, pH 5.0) または低 pH 処理 (pH 4.5) を行い, 1 色法によりマイクロアレイ解析 (Arabidopsis ver. 4, Agilent) を行った. なお, Control 処理は pH 5.0 とした.

### (4) RNA-seq 解析を用いた Al 誘導型遺伝子群の解析

チャ 'やぶきた' 茎切片から無菌的に誘導した培養根を, 処理開始時まで 1/2 MS 培地 (pH 5.0) で継代培養を行った. 0.4 mM Al を添加した単純培地 (0.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 4.2) で 24 時間処理した培養根 (根端~1 cm) から total RNA を抽出し, 次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) を用いた RNA-sequence 解析を行った. 読まれたリードを Trinity プログラムによりアセンブルし, EdgeR によってマッピングおよび発現差解析を行った. さらに, BLASTN, BLASTX プログラムおよび GO (gene ontology) 解析によってアノテーションを付加した.

## 4. 研究成果

ディジェネレート PCR および RACE 法により, チャから 2 種類の *CsSTOP1* 相同遺伝子 (*CsSTOP1* と *CsSTOP2*) を単離した. *CsSTOP1* は *AtSTOP1* とアミノ酸レベルで 58%, *CsSTOP2* は *AtSTOP2* とアミノ酸レベルで 50%の相同性を示した. また, *CsSTOP1* は葉と根で, *CsSTOP2* は根のみで発現していることが分かった.

*CsSTOP1*-comp ラインの  $T_2$  世代を用いた解析を行ったところ, 低 pH 処理による *PGIP1*, *CIPK23*, *AtSTOP2* 発現量の回復がみられたが, Al 処理による *AtALMT1*, *ALS3*, *AtMATE*, *GDH1*, *PLT3* 発現量の回復は見られなかった. また, 根伸長の回復を指標とした相補性試験を行ったところ, *CsSTOP1*-comp 並びに

*CsSTOP2*-comp とともに低 pH ストレスに対しては 60%以上の根伸長の回復が認められたが, Al ストレスに対する根伸長の回復は認められなかった. 以上の結果から,  $\text{H}^+$ 耐性に關与する遺伝子群より Al 耐性に關与する遺伝子群の転写活性の方が, *STOP1* 転写因子のタンパク質構造に依存していることが示唆された.

一方, 相補が確認された *CsSTOP1*-comp または *CsSTOP2*-comp ラインについて, Al および低 pH ストレスに対する遺伝子発現をマイクロアレイ解析により比較したところ, *CsSTOP1*-comp ラインでは Al 処理または低 pH 処理によりそれぞれ 1,310, 441 遺伝子の発現量が Control 処理に対して 2 倍以上有意に増加し, 457, 134 遺伝子発現量がそれぞれ 1/2 以下に有意に減少した. 詳しくみると, *AtSTOP1* 制御下の *AtALMT1* は Al 処理により約 20 倍発現量が増加した. また, *AtMATE*, *ALS3*, *AtTDT*, *PGIP1* についても 2 倍以上発現増加が見られた. 一方, *GDH*, *GAD*, *ME*, *CIPK23*, *AKT1*, *SULTR3;5* は Al 処理による大きな発現変動は見られなかった. 低 pH 処理では, *AtALMT1*, *AtMATE* 発現量が増加したが, その他 *AtSTOP1* 制御系遺伝子については発現変動が見られなかった. 同様に, *CsSTOP2*-comp ラインでは Al 処理または低 pH 処理によりそれぞれ 854, 389 遺伝子の発現量が 2 倍以上有意に増加し, 457, 134 遺伝子発現量がそれぞれ 1/2 以下に有意に減少した. 詳しく見ると, Al 処理により *AtALMT1* 発現量が 2 倍以上増加したが, *RALFL27*, *STOP2* 発現量はそれぞれ 1/11, 1/5 程度に減少していた. 一方, 低 pH 処理においては, Al 処理と同様に *RALFL27* 発現量が 1/4 程度に低下しており, *PGIP1* 発現量が 2 倍以上増加していたが, その他の遺伝子発現量に大きな変動は見られなかった. 以上のことから, *CsSTOP1* または *CsSTOP2* の発現制御機構は *AtSTOP1* と異なる制御応答を示すことが示唆された.

さらに, 次世代シーケンサーを用いたチャ培養根の Al 処理に対する RNA-sequence 解析を行ったところ, これまでに単離した 2 種類の *STOP1* 相同遺伝子のほかにも, 数種類のオーソログが存在することが明らかとなった. *De novo* アセンブリの結果, 57,100 個のコンティグが得られた. BLASTX および BLASTN によってそれぞれ 9,922, 24,643 個のコンティグにアノテーションが付加された. Al 処理によって放出が見られた有機酸の代謝に關与する TCA cycle 関連酵素については, Al 処理による発現変動が見られなかった. GO 解析により, 酸化還元反応, 生体膜の構成, タンパク質の結合に關与する遺伝子の発現変動が多く見られた. 物質輸送に關与する 16 の遺伝子が発現増加しており, そのうち 5 つの遺伝子は BLAST によるアノテーションが付加されなかった.

## 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1件)

Tomoko Matsuda, Yoshinao Ohyama, Hiroyuki Koyama, Chiemi Iwata, Akio Morita, Takashi Ikka, Isolation and Characterization of STOP1 Ortholog Genes of Tea Plant (*Camellia sinensis* L.), Proceedings of 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science, 査読無, 2014, PR-P-36

〔学会発表〕(計6件)

田中靖乃, 久保智也, 片山博史, 一家崇志, 森田明雄, チャ (*Camellia sinensis* L.) 培養根を用いたアルミニウム誘導性有機酸放出機構の解析, 茶学術研究会, 2015年03月17日, ホテルアソシア静岡(静岡県静岡市)

田中靖乃, 久保智也, 片山博史, 森田明雄, 一家崇志, チャ培養根を用いたアルミニウム誘導性有機酸放出機構の解析, 静岡ライフサイエンスシンポジウム, 2015年3月7日, 静岡大学(静岡県静岡市)

田中靖乃, 一家崇志, 松田知子, 小林佑理子, 井内聖, 小林正智, 小山博之, 森田明雄, チャ (*Camellia sinensis* L.) の STOP1 相同遺伝子の解析, 中部土壤肥料学会, 2014年11月13日, プラザ萬象(福井県敦賀市)

松田知子, 大山義慶, 小山博之, 岩田千衣美, 森田明雄, 一家崇志, チャ (*Camellia sinensis* L.) の STOP1 相同遺伝子の単離と機能解析, 茶学術研究会, 2014年03月14日, ホテルアソシア静岡(静岡県静岡市)

Tomoko Matsuda, Yoshinao Ohyama, Hiroyuki Koyama, Chiemi Iwata, Akio Morita, Takashi Ikka, Isolation and Characterization of STOP1 Ortholog Genes of Tea Plant (*Camellia sinensis* L.), The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science, Nov. 7, 2014, Granship Shizuoka (Shizuoka, Japan)

大山義慶, 小林佑理子, 井内聖, 小林正智, 一家崇志, 小山博之, 相補組換えシロイヌナズナを用いた STOP1 の機能解析, 日本土壤肥料学会, 2012年09月04日, 鳥取大学(鳥取県松江市)

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

なし

○取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

一家 崇志 (IKKA, Takashi)

静岡大学大学院農学研究科・助教

研究者番号: 90580647