

地球規模課題対応国際科学技術協力

(生物資源研究分野 「生物資源の持続可能な利用に資する研究」 領域)

地球環境劣化に対応した環境ストレス耐性作物の作出技術の開発

(ブラジル連邦共和国)

平成 22 年度実施報告書

代表者： 篠崎 和子

国際農林水産業研究センター・生物資源領域・特定研究主査

<平成 21 年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

ブラジルではダイズが重要な作物となっているが、近年干ばつによって多大な被害を受けている。本研究では、シロイヌナズナなどのモデル植物を用いた環境ストレス耐性遺伝子群に関する研究結果や急激に進展しているダイズのゲノム解析技術を基盤として、ダイズの乾燥などの環境ストレスに対する耐性獲得に関与する遺伝子群やその発現を制御するプロモーターを明らかにし、これらの遺伝子群やプロモーターをダイズに導入することで干ばつに強い品種を開発する。さらに、圃場条件において乾燥ストレスに対する耐性などを評価し、耐性レベルが向上した形質転換系統を選抜することを目指す。21～22 年度は、シロイヌナズナを用いてシロイヌナズナのストレス耐性遺伝子の機能解析を進めたり、ダイズの相同遺伝子の同定を進めたりした。また、ダイズオリゴマイクロアレイを用いてダイズ遺伝子の発現解析を網羅的に行うとともに、さらにダイズゲノムの新たな情報を活かしたダイズオリゴアレイの作製にも着手した。今後はさらにシロイヌナズナやダイズの有用遺伝子の機能解析を進めるとともにストレス誘導性プロモーターの単離同定などの研究の進展を図る。また、これらの遺伝子を用いたコンストラクトを作製してブラジルに送り、遺伝子導入を開始する。

2. 研究グループ別の実施内容

(1) 研究機関名・研究代表者名:国際農林水産業研究センター・生物資源領域・篠崎 和子

研究題目:環境ストレス耐性制御遺伝子群の探索とストレス耐性ダイズの分子育種技術の開発

① 研究のねらい

シロイヌナズナやイネ等を用いてこれまで明らかにしてきた環境ストレス耐性遺伝子群に関する研究成果をもとに、現在急速に進展しているダイズのゲノムシーケンス解析およびマイクロアレイ等の発現解析技術を利用して、ダイズ等から乾燥等の環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子を探索する。

② 研究実施方法

ダイズの公開されている全ゲノム配列情報とこれまでに整備してきたダイズの完全長 cDNA データベースの情報をもとに作製したダイズオリゴアレイを用いて、ダイズの環境ストレス応答性遺伝子群の発現応答を網羅的に解析してきた。得られたデータをもとに探索されたダイズの AP2/ERF タイプの転写因子 *DREB1* をコードする遺伝子に関して、環境ストレスに対する発現応答をリアルタイム RT-PCR によって解析する。また、ダイズ *DREB1* タンパク質の細胞内局在性と転写活性化能に関してシロイヌナズナ葉肉細胞を用いて解析する。同様に探索されたダイズの bZIP タイプの転写因子 *AREB* に関して、cDNA のクローニングを行ない配列を解析する。さらに、これらのダイズの bZIP タイプの転写因子 *AREB* の転写活性化能に関してシロイヌナズナ葉肉細胞を用いて解析する。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子を同定するため、21 年度は、これまでに作製したダイズオリゴアレイを用いて日本のダイズ栽培品種である農林2号の環境ストレス応答性遺伝子群の発現応答を網羅的に解析した。22 年度は、昨年度実施したこのアレイ解析によるデータとオープンソースである全ゲノム配列情報により、ダイズの AP2/ERF タイプの転写因子 *DREB* をコードする遺伝子を見出した。見出されたダイズの *DREB* 遺伝子の環境ストレスに対する発現応答をリアルタイム RT-PCR を用いて詳細に解析した。*DREB1* ファミリーに属する *GmDREB1A;1* 遺伝子は、地上部において低温ストレスにより発現が著しく上昇した。塩ストレス条件下では根において顕著な発現の増加が認められた。また、*GmDREB1A;1* タンパク質の細胞内局在性を解析するため、GFP との融合タンパク質をシロイヌナズナ葉肉細胞中で一過的に発現させたところ、核において GFP のシグナルが安定的に検出された。従って、*GmDREB1A;1* タンパク質はシロイヌナズナのプロトプラストにおいて核に局在していることが示唆された。さらに、*GmDREB1A;1* タンパク質の DRE 配列を介した転写活性化能を明らかにするため、シロイヌナズナのプロトプラストを用いた一過的遺伝子発現系により解析した。DRE 配列で制御した *GUS* 遺伝子をレポータープラスミドベクターとして用いた場合、コントロールに比べ *GUS* 活性が有意に増加した。これらの結果から、*GmDREB1A;1* タンパク質は DRE 配列を介した転写活性化能を

持っていることが示された。

これまでに引き続き、ダイズの bZIP タイプの転写因子 AREB に関する機能解析も進めた。21 年度に見出したダイズの *AREB1/AREB2/ABF3* タイプの遺伝子の cDNA クローニングを行なった。*GmAREB1*、*GmAREB2*、*GmAREB3* cDNA クローニングが完了し、それらのシーケンスを行い塩基配列を明らかにした。クローニングされたこれら GmAREB タンパク質の転写活性化能を明らかにするため、シロイヌナズナ葉肉細胞を用いた一過的遺伝子発現系により解析したところ、レポーター遺伝子の有意な活性の上昇が ABA 依存的に認められた。従って、これら GmAREB タンパク質は ABA 存在下のシロイヌナズナ葉肉細胞において高い転写活性化能を有していることが明らかとなった。

22 年度は、公開されているダイズ全ゲノム配列情報をもとにしたダイズオリゴアレイを設計し、日本のダイズ栽培品種である農林2号を用いて環境ストレス応答性遺伝子群の発現応答の網羅的な解析のための準備も進めた。また、細胞内局在性や転写活性化能を解析する上で有効であるシロイヌナズナ葉肉細胞を用いた一過的遺伝子発現系を応用し、ダイズ葉肉細胞を用いて同様の系の確立を進めている。ダイズのアレイ解析で得られた情報等をもとに候補遺伝子を選抜する準備を進め、ブラジルでダイズに形質転換に利用する遺伝子・ベクターコンストラクトの構築に関して情報交換を行なった。2010 年はまず *AREB* 遺伝子のコンストラクトを提供することが決まり、ブラジル・グループで主流であるパーティクルガン用のコンストラクトを3種準備し提供した。キックオフ・ミーティングでは今後のコンストラクト作製に用いるベクター系について協議、選定し、金森が形質転換法の確立を進めているアグロバクテリウム法用のコンストラクトを3種提供した。また、新たに、異なる選択マーカー遺伝子を有するパーティクルガン用の3種のコンストラクトを作製し提供した。

④ カウンターパートへの技術移転の状況

招へい外国人研究員として、2010 年 6 月～2011 年 1 月にブラジル農牧研究公社大豆研究所のアマンダ・パイバ研究員を受入れ、乾燥耐性獲得の分子レベルでの解析技術、解析に用いる機材に関する適切な使用方法について研修を行なった。また、2010 年 8 月～11 月にはブラジル農牧研究公社大豆研究所のシルヴァーナ・マリン研究員を受入れ、ダイズマイクロアレイ解析結果を用いたストレス誘導性プロモーターの単離技術、ソフトウェア、特殊な機材の適切な使用方法について研修を行なった。

今期は、*AREB* 遺伝子のパーティクルガン用のコンストラクトを3種と、アグロバクテリウム法用のコンストラクトを3種提供した。さらに、異なる選択マーカー遺伝子を有するパーティクルガン用のコンストラクトを作製し、3種を提供した。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況 なし

(2) 研究機関名・主たる共同研究者名： 理化学研究所・植物科学研究センター 篠崎 一雄

研究題目：環境ストレス応答制御遺伝子群の探索

① 研究のねらい

シロイヌナズナやダイズのゲノム情報や発現情報をもとに、乾燥耐性の付与に役立つ遺伝子を探索する。特に、植物ホルモンの ABA の合成や分解に関わる酵素遺伝子や ABA のシグナル伝達に関わる遺伝子(ストレス応答制御遺伝子)を探索してそれらの機能を解析する。乾燥ストレス誘導性の遺伝子に着目して遺伝子を絞り込むとともに、ゲノムシーケンス情報を用いて他の植物ゲノムと比較解析を行い、可能性の高い候補遺伝子を抽出するバイオインフォマティクスによる解析技術の開発を目指す。

② 研究実施方法

シロイヌナズナのストレス応答性遺伝子の機能解析を進めるために、形質転換植物や遺伝子破壊変異体等について、トランスクリプトームやメタボロームといった最新の技術を活用しつつ、遺伝学および生化学的な手法も併用しながら、ストレス耐性付与に有効な遺伝子を探索する。選抜した遺伝子をダイズ発現用のプラスミドベクターに組み込み、ブラジル農牧研究公社大豆研究所に提供する。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

21 年度までに、シロイヌナズナを用いたストレス応答性遺伝子の機能解析について、マイクロアレイ解析やメタボローム解析を行い、植物ホルモンアブシジン酸(ABA)によって制御される代謝経路を統合的に解析した(Urano et al. Plant J. 2009)。また、ABA シグナル伝達経路における主要なプロテインキナーゼおよびプロテ

インキナーゼの働きを明らかにした (Umezawa et al. PNAS 2009)。以上の研究から、ABA の生合成やシグナル伝達を人為的に制御することで、植物のストレス耐性を改変するアプローチが有効であると考えられた。そこで、22 年度は ABA 生合成の鍵酵素である *NCED3* 遺伝子をダイズに組み込むことを決定し、その準備を進めた。一方、オリゴ糖の生合成に関わるガラクトキノール合成酵素 (*AtGols2*) は本研究室で単離された遺伝子であり、近年他の作物等で実績を上げている。そこで、*AtGols2* をダイズのストレス耐性改良に利用することを決定し、その準備を進めた。ダイズ形質転換用のバイナリーベクター pC3300J-35S に *NCED3* または *Gols2* を導入する作業が終了し、1 月下旬にブラジル農牧研究公社大豆研究所に DNA を送付した。さらに、ストレス応答に関わる遺伝子を探索するために、引き続きシロイヌナズナを用いて大規模な遺伝子発現解析を行なっている。

④ カウンターパートへの技術移転の状況

シロイヌナズナを用いた研究やダイズゲノムプロジェクトで得られた情報をもとに候補遺伝子を選抜し、ブラジルでダイズに形質転換するための準備を進めた。形質転換に利用する遺伝子・ベクターコンストラクトの構築に関して情報交換を進めた。

- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況なし

(3) 研究機関名・主たる共同研究者名：東京大学・農学生命科学研究科 ・ 篠崎 和子

研究題目：環境ストレス受容関連遺伝子群の探索

① 研究のねらい

東京大学グループでは、シロイヌナズナ等において乾燥ストレスシグナルの受容に関わる膜タンパク質やトランスポーターの解析を行ってきた。これらの成果を生かして、シロイヌナズナやダイズのゲノム情報や遺伝子発現情報をもとに、乾燥等の環境ストレスの受容に関連した遺伝子群を明らかにする。

② 研究実施方法

これまで行ってきたシロイヌナズナの乾燥ストレスシグナルの受容に関わる膜タンパク質やトランスポーターに関する研究成果を生かして、シロイヌナズナやダイズのゲノム情報や発現情報をもとに、乾燥耐性の付与に役立つ遺伝子を探索し、その機能を解析する。特に浸透圧センサーやトランスポーターなどに注目して解析を行なう。

③ 当初の計画 (全体計画) に対する現在の進捗状況

シロイヌナズナ及びダイズのヒステジンキナーゼファミリーより、キナーゼドメインとレシーバードメインを含む保存領域を用いて作成した分子系統樹から浸透圧センサーファミリーである *AHK1* 及びサイトカニンレセプターファミリーであり、浸透圧ストレスを負に制御する *AHK2*、*AHK3*、*AHK4* (Tran et al. PNAS, 2007) のオルソログをそれぞれ探索した結果、*AHK1* には 4 個 (*GmHK1A;1*、*GmHK1A;2*、*GmHK1B;1*、

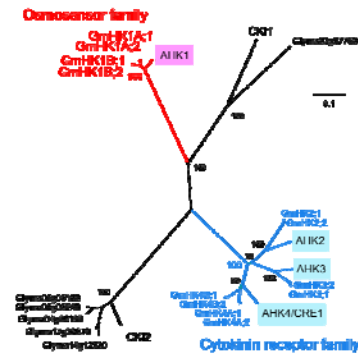


図 1. シロイヌナズナ及びダイズのヒステジンキナーゼファミリーの分子系統樹
シロイヌナズナ及びダイズのヒステジンキナーゼファミリーよりキナーゼドメインとレシーバードメインを含む保存領域を用いて分子系統樹を作成した。浸透圧センサーファミリーを赤字で、サイトカニンレセプターファミリーを青字でそれぞれ示す。

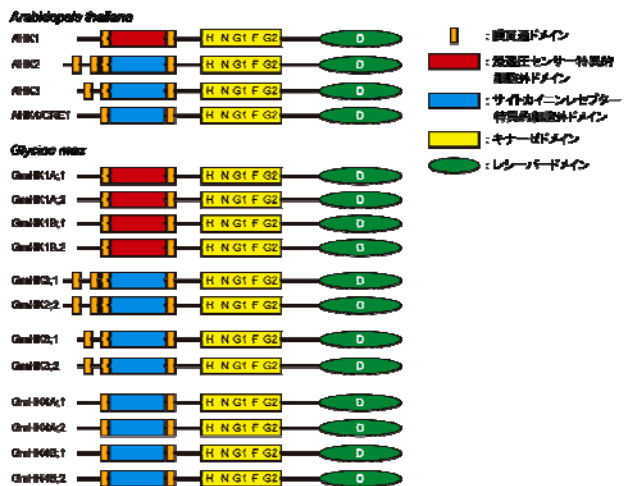


図 2. シロイヌナズナ及びダイズのヒステジンキナーゼファミリーの模式図

シロイヌナズナおよびダイズの浸透圧センサーファミリー及びサイトカニンレセプターファミリーの構造の模式図を示す。キナーゼドメイン内の H,N,G1,F,G2 は His-Asp リン酸リレーに必要なヒステジン残基とそれを含む H,N,G1,F,G2-box の保存された 5 つのモチーフをそれぞれ示し、レシーバードメイン内の D は His-Asp リン酸リレーに必要なアスパラギン酸残基を示す。

*GmHK1B;2*のオルソログが、*AHK2*、*AHK3*、*AHK4* にはそれぞれ2個(*GmHK2;1*、*GmHK2;2*)、2個(*GmHK3;1*、*GmHK3;2*)、4個(*GmHK4A;1*、*GmHK4A;2*、*GmHK4B;1*、*GmHK4B;2*)のオルソログが見出された(図1)。これらダイズヒスチジンキナーゼのタンパク質一次構造をアミノ酸配列より推定したところ、全てのヒスチジンキナーゼが、シロイヌナズナにおけるそれぞれのオルソログと同様の膜貫通ドメインを有しており、キナーゼドメイン内には His-Asp リン酸リレーに必要なヒスチジン残基とそれを含む H,N,G1,F,G2-box の保存された5つのモチーフを有するとともに、レシーバドメイン内にも His-Asp リン酸リレーに必要なアスパラギン酸残基を有していた(図2)。また、それ以外の領域では浸透圧センサーファミリーとサイトカニンレセプターファミリーそれぞれに特異的な配列が保存されていた。*GmHK1*ファミリーは浸透圧センサーである*AHK1* 特異的な細胞外ドメインを、*GmHK2*、*GmHK3*、*GmHK4* ファミリーはサイトカニンレセプターファミリー特異的な細胞外ドメインをそれぞれ有していた(図2)。これらの遺伝子について、国際農林水産業研究センターグループによって開発されたダイズオリゴマイクロアレイを用いて環境ストレス下での発現解析を行なった。マイクロアレイのプロープに含まれていた4遺伝子の中で、*AHK3* のオルソログについて乾燥ストレスに対する誘導性が見られた。また、ダイズ形質転換用のバイナリーベクターpC3300Jに *AHK1* 遺伝子を導入したコンストラクトを作製したので、ブラジル農牧研究公社大豆研究所に DNA を送付する予定である。

ヒスチジンキナーゼによる浸透圧ストレス感受の下流のシグナル伝達経路に関わると考えられる転写因子 *DREB2A* は、シロイヌナズナにおいて浸透圧ストレスに応答して ABA 非依存的に活性化する。ダイズにおける *DREB2A* 転写因子のストレス耐性の獲得に関わる機能を明らかにすることを目的とし、ダイズのゲノム情報より *DREB2A* 相同遺伝子の探索を行った。その結果、ダイズには *DREB2* 型転写因子が 21 個存在しており、*DREB2A* と相同性が特に高く、ドメイン構造も保存されている新規遺伝子 *GmDREB2A;2* を見出した。今後 *GmDREB2A;2* についてその転写活性の解析を行なう。

④ カウンターパートへの技術移転の状況

シロイヌナズナを用いた研究やダイズゲノムプロジェクトで得られた情報をもとに候補遺伝子を選抜し、ブラジルでダイズに形質転換するための準備を進めた。形質転換に利用する遺伝子・ベクターコンストラクトの構築に関して情報交換を進めた。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況 なし

(4) 研究機関名・主たる共同研究者名： ブラジル農牧研究公社 ・ Alexandre L. Nepomuceno

研究題目：形質転換ダイズの作出と環境ストレス耐性評価

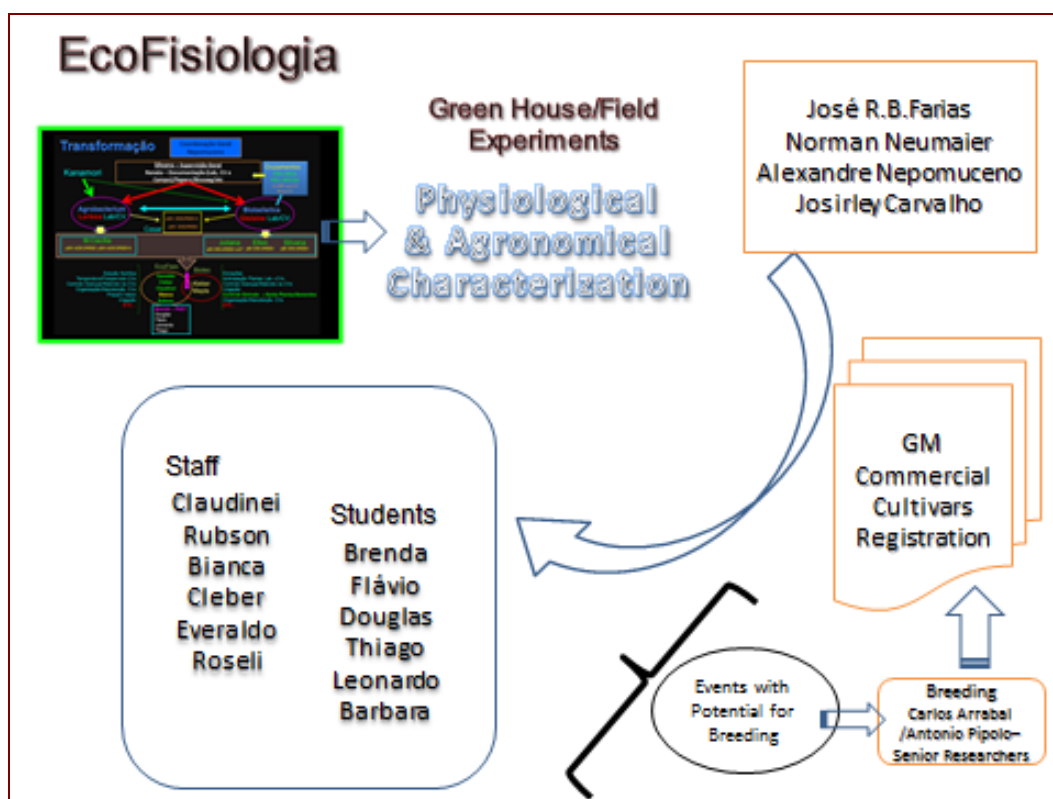
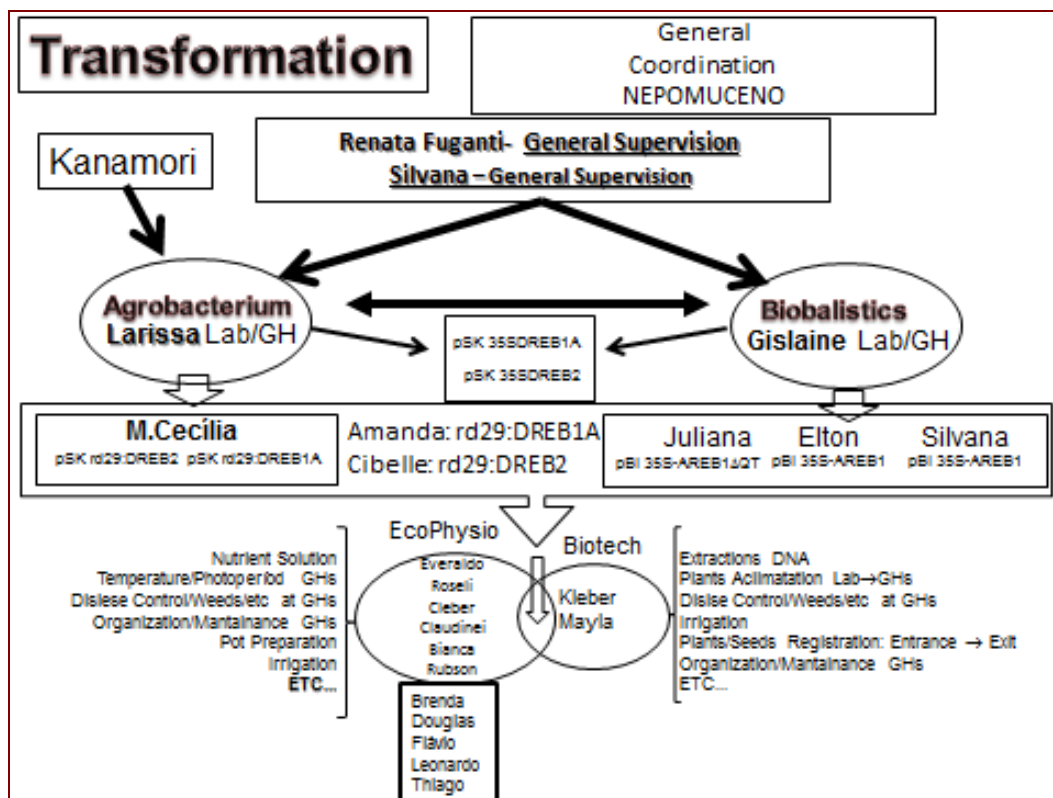
① 研究のねらい

本プロジェクトでは、ブラジル農牧研究公社が特許を持ちこれまで大豆研究所で行われてきたパーティクルガン法と、国際農林水産業研究センターの金森 JICA 専門家によるアグロバクテリウムによる形質転換法の二つの方法を試みる。

アグロバクテリウムによる形質転換法では、導入遺伝子の再編成が少なく、1コピーもしくは2コピーの遺伝子を導入できる。これにより短期間で固定系統を得ることができるなど、現行のパーティクルガン法に比べて利点が多い。今後、本プロジェクトで行う遺伝子導入を効率よく進めるために、ブラジルのダイズ品種のアグロバクテリウムによる形質転換系の確立が必要である。

② 研究実施方法

プロジェクトに関与する研究員とその役割を下図に示す。



DREB および *AREB* コンストラクト (*rd29A:DREB1A*, *rd29A:DREB2*, *35S:DREB1A*, *35S:DREB2*, *35S-AREB1*, *35S-AREB1 Δ QT*, *35S-AREB1M8*)を用いて、パーティクルガン法による形質転換とその確認を行った。形質転換後、全てのダイズ胚は、植物体にダメージを与えることなく葉をサンプリングできるまで育成した。ポジティブである可能性がある植物から DNA を抽出し、一連の挿入遺伝子検出用プライマーを用い

た PCR により挿入遺伝子を検出した。確認後、ポジティブな系統を温室に移し、種子増殖を行なった。それらの形質転換ダイズの種子は次世代の耐乾性実験や分子特定に使用する。

アグロバクテリウム EHA105 を用いて、ブラジルのダイズ品種 BR16 の形質転換系の確立を試みた。 β -グルクロニダーゼ(GUS)をレポーター遺伝子として用い、感染用植物組織として成熟種子から取り出した胚を用いて形質転換系の確立実験を行い、さらに形質転換用コンストラクトの導入を開始した。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

rd29A::AtDREB1A, *rd29A::AtDREB2A*, *35S::AtDREB1A*, *35S::AtDREB1A* コンストラクトを用いた形質転換を行なった。*rd29A* ストレス誘導性プロモーターと融合した *DREB1A* あるいは *DREB2A* 遺伝子コンストラクトを用いてポジティブな系統を作出し、特定化した。

35S 恒常的プロモーターと融合した *DREB1A* あるいは *DREB2A* 遺伝子コンストラクトを用い、8,000 以上のダイズ胚の形質転換を行ない、DNA 抽出と PCR により、ポジティブな植物を特定化している。

AREB 遺伝子に関しては、7,000 以上のダイズ胚を *AREB* コンストラクト (*35S-AREB1*, *35S-AREB1* Δ *QT*, *35S-AREB1M8*) を用いて形質転換し、これまでに 1,000 以上の幼植物をパーミキュライト混合土壌に移した。近々葉をサンプルし、PCR によりポジティブなダイズを特定化することになっている。

以上の系統は T_1 世代では遺伝子受け継ぎの確認はされておらず、 T_0 ポジティブダイズは現在も種子増殖中である。 T_1 種子を収穫次第植え付け、 T_0 植物から T_1 植物への遺伝子の受け継ぎを確認する。

200 成熟種子より胚を取り出してアグロバクテリウムを感染させたところ、アグロバクテリウムの感染が確認できた(図左)。シュート伸長培地にて伸長したシュートを発根培地に移植して発根培地にて培養を続けたところ、6植物体から発根が見られた(図中央)。さらに、発根した植物体の葉を GUS 染色により遺伝子導入を確認したところ、3つの植物体の葉において青色染色が確認され(形質転換効率 1.5%)、生育が良い2ラインについてサザンハイブリダイゼーション法を用いて遺伝子導入を確認したところ、遺伝子導入を示すバンドが確認できた(図右)。形質転換体から得られた種子は GUS 染色したことから、次世代(T_1)に遺伝子が移行していることが確認できた。本年度の計画は予定通り進行している。現在、確立した形質転換法を用いて、日本から送付されたコンストラクト(*35S:AREB1*)の遺伝子導入を開始した。

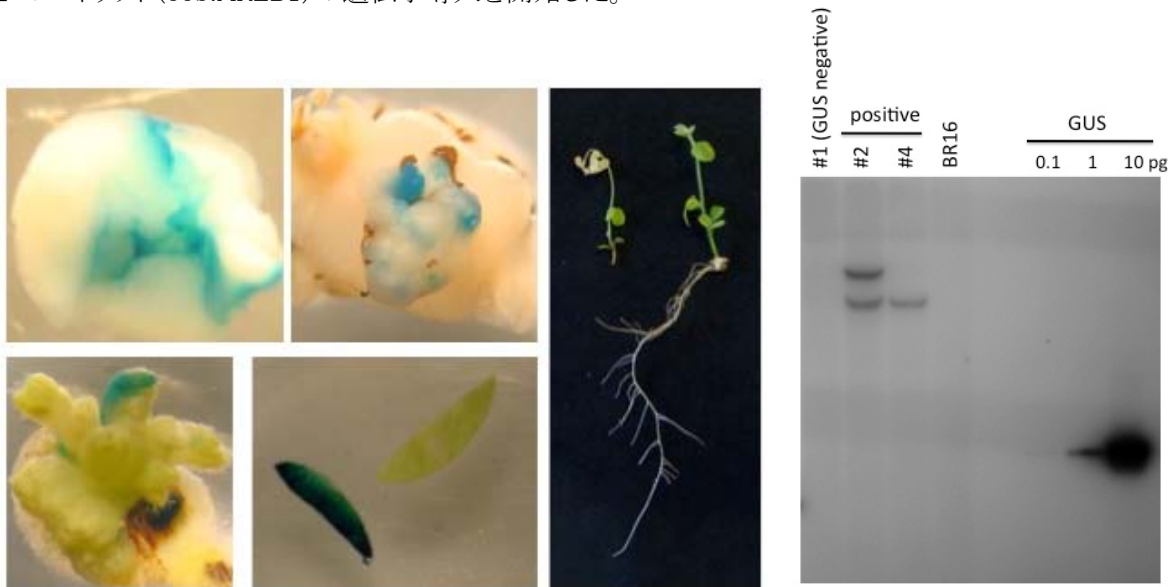


図. 左)アグロバクテリウム感染ダイズの GUS 染色、および発根培地にて発根した形質転換ダイズ。右)サザンハイブリダイゼーションによる GUS 遺伝子導入の確認。

④ カウンターパートへの技術移転の状況

JICA プロジェクトでは環境ストレス耐性ダイズの作出技術の開発を目標としている。本開発に必要な技術として、サザンハイブリダイゼーション法およびアグロバクテリウムを用いたダイズの形質転換法がある。サザンハイブリダイゼーション法を博士課程学生のアマンダ・パイバおよびシベール・エンゲルスに、アグロバクテリウムを用いた形質転換法を技術員ラリッサ・ジロット、マリア・セシリア・ソルデラにそれぞれ技術移転した。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況なし

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

- ① 本年度発表総数(国内 0件、国際 11件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0件、海外 24件)
- ③ 論文詳細情報
 1. Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3 involved in ABA-signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol.* 50, 1345-1363.
 2. Maruyama, K., Takeda, M., Kidokoro, S., Yamada, K., Sakuma, Y., Urano, K., Fujita, M., Yoshiwara, K., Matsukura, S., Morishita, Y., Sasaki, R., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant Physiol.* 150, 1972-1980.
 3. Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., Shinozaki, K. (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 17588-17593.
 4. Mochida, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.-S.P. (2009) *In silico* analysis of transcription factor repertoire and prediction of stress responsive transcription factors in soybean. *DNA Res.* 16, 353-369.
 5. Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakashima, K., Imura, Y., Narusaka, Y., Shinwari, Z.K., Osakabe, Y., Fujita, Y., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates *DREB1* expression under circadian control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151, 2046-2057.
 6. Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50, 2123-2132.
 7. Matsukura, S., Mizoi, J., Yoshida, T., Todaka, D., Ito, Y., Maruyama, K., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Comprehensive analysis of rice *DREB2*-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Mol. Genet. Genomics.* 283, 185-196.
 8. Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G.D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M.K., Sandju, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X-C., Shinozaki, K., Nguyen, H.T., Wing, R.A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R.C., Jackson, S.A. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463, 178-183.
 9. Mochida, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.S. (2010) LegumeTFDB: An integrative database of Glycine max, Lotus japonicus and Medicago truncatula transcription factors. *Bioinformatics* 26, 290-291.
 10. Yamada, K., Osakabe, Y., Mizoi, J., Nakashima, K., Fujita, Y., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Functional analysis of an *Arabidopsis thaliana* abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides. *J. Biol. Chem.* 285(2), 1138-1146.

11. Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J.* 61, 672–685.
12. Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., Shinozaki, K. (2010) ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 2361–2366.
13. Osakabe, Y., Mizuno, S., Tanaka, H., Maruyama, K., Osakabe, K., Todaka, D., Fujita, Y., Kobayashi, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Overproduction of the membrane-bound receptor-like protein kinase1, RPK1, enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 285(12), 9190–9201.
14. Mizoguchi, M., Umezawa, T., Nakashima, K., Kidokoro, S., Takasaki, H., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2010) Two closely related subclass II SnRK2 protein kinases cooperatively regulate drought-inducible gene expression. *Plant Cell Physiol.* 51, 842–847.
15. Mochida, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.-S. P. (2010) Genome-wide analysis of two-component systems and prediction of stress-responsive two-component system members in soybean. *DNA Res.* 17, 303–324.
16. Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H., Sawa, S. (2010) RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*. *Development.* 137, 3911–3920.
17. Betsuyaku, S., Takahashi, F., Kinoshita, A., Miwa, H., Shinozaki, K., Fukuda, H., Sawa, S. (2010) Mitogen-activated protein kinase regulated by the CLAVATA receptors contributes to the shoot apical meristem homeostasis. *Plant Cell Physiol.* 52, 14–29.
18. Mitsuda, N., Ikeda, M., Takada, S., Takiguchi, Y., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Fujita, M., Shinozaki, K., Matsui, M., Ohme-Takagi, M. (2010) Efficient yeast one-/two-hybrid screening using a library composed only of transcription factors. *Plant Cell Physiol.* 51, 2145–2151.
19. Taji, T., Komatsu, K., Katori, T., Kawasaki, Y., Sakata, Y., Tanaka, S., Kobayashi, M., Toyoda, A., Seki, M., Shinozaki, K. (2010) Comparative genomic analysis of 1047 completely sequenced cDNAs from an *Arabidopsis*-related model halophyte, *Thellungiella halophila*. *BMC Plant Biol.* 10, 261.
20. Kuromori, T., Shinozaki, K. (2010) ABA transport factors found in *Arabidopsis* ABC transporters. *Plant Signaling Behav.* 5, 1124–1126.
21. Sakurai, T., Kondou, Y., Akiyama, K., Kurotani, A., Higuchi, M., Ichikawa, T., Kuroda, H., Kusano, M., Mori, M., Saitou, T., Sakakibara, H., Sugano, S., Suzuki, M., Takahashi, H., Takahashi, S., Takatsuji, H., Yokotani, N., Yoshizumi, T., Saito, K., Shinozaki, K., Oda, K., Hirochika, H., and Matsui, M. (2011). RiceFOX: A database of *Arabidopsis* mutant lines overexpressing rice full-length cDNA that contains a wide range of trait information to facilitate analysis of gene function. *Plant Cell Physiol.* 52, 265–273.
22. Mochida, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.-S. P. (2010) Genome-wide analysis of two-component systems and prediction of stress-responsive two-component system members in soybean. *DNA Res.* 17(5): 303–324.
23. Le, D.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., and Tran, L.S. (2011). Genome-wide expression profiling of soybean two-component system genes in soybean root and shoot tissues under dehydration stress. *DNA Res.* 18, 17–29.
24. Takahashi F., Mizoguchi T., Yoshida R., Ichimura K. and Shinozaki K. (2011) Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*, *Mol. Cell* 41, 649–660.

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳 (国内 0件、海外 0件、特許出願した発明数 0件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数 (国内 0件、海外 0件)

4. プロジェクト実施体制

(1) 「ストレス耐性」グループ

(研究題目) 環境ストレス耐性制御遺伝子群の探索とストレス耐性ダイズの分子育種技術の開発

- ① 研究者グループリーダー名: 篠崎 和子 (国際農林水産業研究センター・特定研究主査)
- ② 研究項目
 - ・ 環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子(ストレス耐性制御遺伝子)を同定する。
 - ・ ストレス応答性プロモーターの単離と有用遺伝子との組合せの最適化を行なう。
 - ・ 環境ストレス耐性を示す組換えダイズ系統を選抜する。

(2) 「ストレス応答」グループ

(研究題目) 環境ストレス応答制御遺伝子群の探索

- ① 研究者グループリーダー名: 篠崎 一雄 (理化学研究所植物科学研究センター・センター長)
- ② 研究項目
 - ・ 環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子(ストレス応答制御遺伝子)を同定する。
 - ・ ストレス応答性プロモーターの単離と有用遺伝子との組合せの最適化を行なう。
 - ・ 環境ストレス耐性を示す組換えダイズ系統を選抜する。

(3) 「ストレス受容」グループ

(研究題目) 環境ストレス受容関連遺伝子群の探索

- ① 研究者グループリーダー名: 篠崎 和子 (東京大学・教授)
- ② 研究項目
 - ・ 環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子(ストレス応答制御遺伝子)を同定する。
 - ・ ストレス応答性プロモーターの単離と有用遺伝子との組合せの最適化を行なう。
 - ・ 環境ストレス耐性を示す組換えダイズ系統を選抜する。

(4) 「ダイズ形質転換」グループ

(研究題目) 形質転換ダイズの作出と環境ストレス耐性評価

- ① 研究者グループリーダー名: Alexandre Nepomuceno (ブラジル農牧研究公社ダイズ研究所・主任研究員)
- ② 研究項目
 - ・ プロモーターと有用遺伝子の組合せが導入されたダイズ系統を作出する。
 - ・ 環境ストレス耐性を示す組換えダイズ系統を選抜する。

以上