

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生産・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)

平成 23 年度実施報告書

代表者：篠崎 和子

(独) 国際農林水産業研究センター 生物資源・利用領域・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成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、乾燥などの環境ストレスに対する耐性獲得に関与するダイズの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。21～23 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、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を作製して乾燥等のストレス誘導性遺伝子を同定した。さらに、選抜したストレス誘導性遺伝子のプロモーター領域を単離した。今後はシロイヌナズナやダイズの有用遺伝子の機能解析を継続して進めるとともに、単離したストレス誘導性プロモーターを用いたベクター系を構築して、有用遺伝子の発現系を開発する。また、これらのベクター系や単離同定した有用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、ダイズへ遺伝子導入する。これまでに得られた組換えダイズを用いて、ブラジルにおいて温室や圃場で成育や収穫、ストレス耐性試験等を行う。ブラジルで作出した組換えダイズを日本に輸入して、導入遺伝子や耐性遺伝子の発現を解析して、ストレス耐性や成育との関係を解明する。

2. 研究グループ別の実施内容

(1) 国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域 ・ 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利用してこれまでに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、ダイズ等から乾燥などの環境ストレスに耐性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 bZIP タイプの転写因子 AREB と AP2/ERF タイプの転写因子 *DREB1* をコードする遺伝子に関してそれらの機能解析を進める。

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、前年度に実施したこのアレイ解析によるデータとオープンリ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。

21 年度に引き続き、22 年度は、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 クローニングを行った。*GmAREB1*、*GmAREB2*、*GmABF3* 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になった。

また 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った。22 年度はまず *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。

23 年度は、ダイズの全ゲノム配列 (<http://www.phytozome.net/soybean>) から AP2/ERF タイプの転写因子である *DREB1* ファミリーに属する遺伝子を網羅的に見出し、分子系統樹を作成した(図1)。*DREB1* ファミリーに属するダイズ遺伝子は全部で 14 個見出された。このうち *GmDREB1A1*、*GmDREB1B1*、*GmDREB1B2* の3個のダイズ *DREB1* 遺伝子は、シロイヌナズナの *DREB1E*、*DREB1F* が含まれる Subgroup1 に属した。*GmDREB1D1*、*GmDREB1D2*、*GmDREB1E1*、*GmDREB1E2* の4個のダイズ遺伝子は、シロイヌナズナの *DREB1A*、*DREB1B*、*DREB1C*、*DREB1D* が含まれる Subgroup2 に属した。*GmDREB1F1*、*GmDREB1G1*、*GmDREB1G2*、*GmDREB1H1*、*GmDREB1H2*、*GmDREB1I1*、*GmDREB1I2* 遺伝子は、Subgroup1、Subgroup2 のどちらにも属さず、新たに Subgroup3 を形成することが明らかとなった。また、これら見出されたダイズ *DREB1* 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、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解析を行った。

23年度は、ダイズオリゴアレイを用いたダイズの環境応答性遺伝子群の解析結果から得られた知見をもとに、ストレス誘導性プロモーターの単離に向けた解析作業に着手した。はじめに、環境ストレスにより発現が誘導される遺伝子群の中から、プロモーター領域に乾燥や高温ストレス応答性のシス配列を有する遺伝子を探索し、乾燥誘導性および高温誘導性を示す2個の候補遺伝子を抽出することに成功した。現在、環境ストレス下の植物体におけるそれらの遺伝子の発現部位の解析準備、およびプロモーター領域のクローニングを進めている。

④カウンターパートへの技術移転の状況 (日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

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ダイズ研究所のアマンダ・パイバ研究員を受け入れ、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った。また、2010年8月～11月には同研究所のシルヴァーナ・マリン研究技術員を受け入れ、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、特殊な機器の適切な使用方法について研修を行った。

22年度は、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。

これまでに引き続き23年度は、ブラジル農牧研究公社ダイズ研究所で進められている形質転換ダイズの作出に関して情報交換を行った。また、形質転換ダイズを用いた圃場試験の今後の計画やこれまでの解析結果に関して情報の提供を受けた。さらに、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進めた。

また、23年度は、2011年10月～12月にブラジル農牧研究公社ダイズ研究所のマリア・セシリア・ソルデラ研究技術員を受け入れ、アグロバクテリウムを用いたシロイヌナズナやイネの形質転換法をはじめ、植物のストレス処理、およびRNAの抽出や遺伝子発現の解析などの分子生物学的手法について研修を行った。また、2011年12月から同研究所のシベレ・エンゲルス研究員を受け入れており、ブラジルのダイズ品種を用いて、乾燥や高温ストレス応答機構の解明に必要な実験手法の研修を進めている。

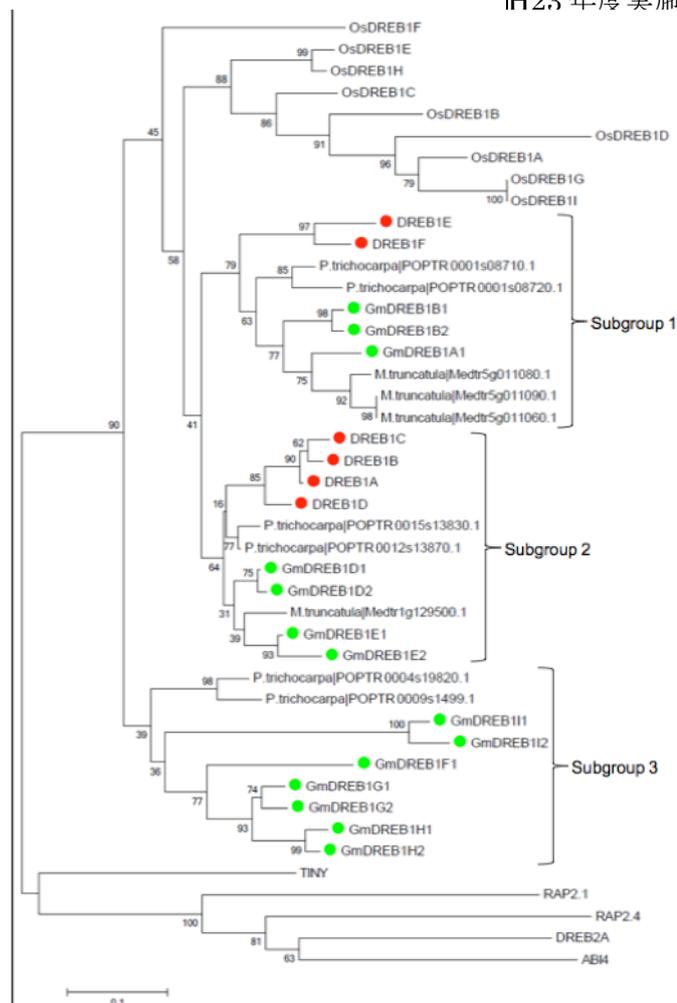


図1. DREB1 ファミリーに属する遺伝子の分子系統樹
緑丸はダイズの DREB1 遺伝子、赤丸はシロイヌナズナの DREB1 遺伝子を示す。

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(あれば)なし

(2) 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ダイズ研究所に提供する。

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シン酸(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その働きを明らかにした(Umezawa et al. PNAS 2009)。さらに、ABCトランスポーターのABCG25が乾燥ストレス時のABA輸送に関わることを明らかにした(Kuromori et al. 2010)。以上の研究から、ABAの生合成、輸送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NCED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ダイズ研究所にDNAを送付した。

23年度はABA輸送に関わるABAトランスポーターABCG25遺伝子をダイズに組み込むことを決定し、バイナリーベクターpC3300J-35SにABCG25を導入し、1月上旬にブラジル農牧研究公社ダイズ研究所にDNAを送付した。ダイズ遺伝子の機能解析に関しては、国際農林水産業研究センターが実施したダイズオリゴアレイ解析によるデータとオープンリソースであるダイズのゲノム情報より、ダイズにおけるNCED遺伝子の探索を行った(図1)。シロイヌナズナのNCED3遺伝子の配列情報を元に

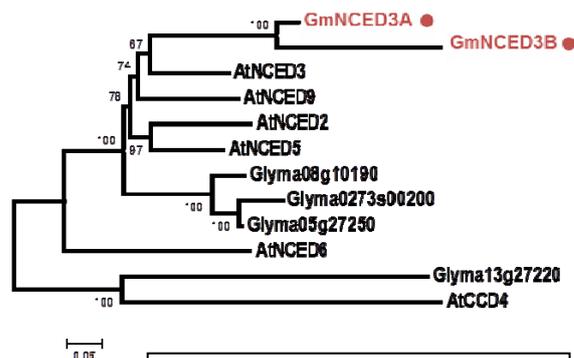


図1 NCED遺伝子群の系統解析

抽出したダイズ遺伝子の中から、オリゴアレイと RT-PCR を用いて乾燥誘導性のダイズ *NCED* 遺伝子 *GmNCED3A*, *GmNCED3B* を選抜した。引き続き、この *GmNCED* 遺伝子に関して機能解析を行う。さらに、内生の ABA 量を制御する技術開発として、合成酵素である NCED に加えて ABA の不活化酵素である CYP707A の利用についても検討を行う。また、ダイズの器官特異性、および乾燥ストレス応答性の代謝物質の網羅的解析(メタボローム)を行う予定であり、そのサンプルの準備を行った。現在までに、GC-TOF/MS、CE-TOF/MS、LC/MS/MS を用いたダイズ抽出液の分析条件の検討を終了した。今後は同様の質量分析器を用いた代謝物質の同定とダイズオリゴアレイを用いた遺伝子発現解析を行い、メタボロームとトランスクリプトームの統合解析を行う予定である。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

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(あれば)

なし

(3) 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

これまでに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、前年度までに、ダ

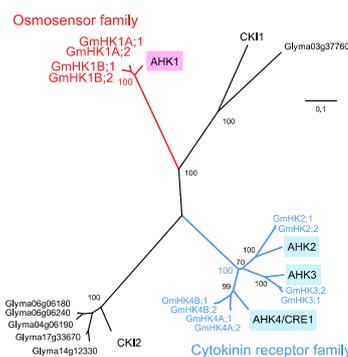


図 1. シロイヌナズナ及びダイズのヒスチジンキナーゼファミリーの分子系統樹
シロイヌナズナ及びダイズのヒスチジンキナーゼファミリーよりキナーゼドメインとレシーバードメインを含む保存領域を用いて分子系統樹を作成した。浸透圧センサーファミリーを赤字で、サイトカニンレセプターファミリーを青字でそれぞれ示す。

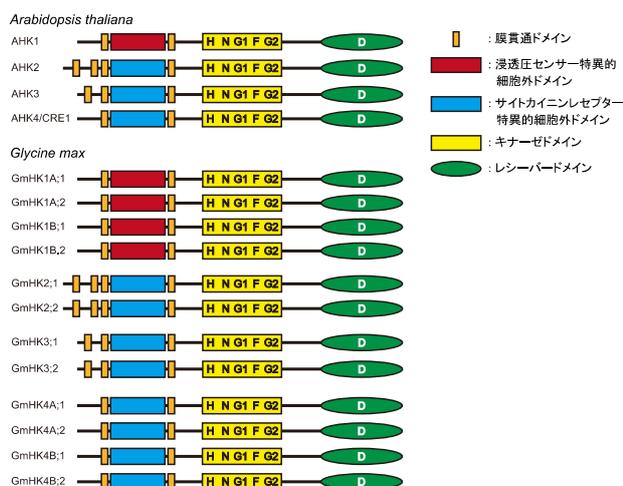


図 2. シロイヌナズナ及びダイズのヒスチジンキナーゼファミリーの模式図

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。

イズにおけるヒスチジンキナーゼ遺伝子 *AHK1* の相同遺伝子として単離した *GmHK1*、およびストレス誘導性の転写因子遺伝子 *DREB2A* の相同遺伝子として単離した *GmDREB2A;2* に注目して解析を行う。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

22 年度は、シロイヌナズナおよびダイズのヒスチ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* およびサイトカイ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 (*GmHKA;1*、*GmHKA;2*、*GmHKB;1*、*GmHKB;2*)、*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、すべ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、レシーバードメイン内にも 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イ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イ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ダイズ研究所に 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。

23 年度は、前年度までに見出した *AHK1* のダイズの相同遺伝子群 *GmHK1* ファミリーの cDNA クローニングを行い、*GmHK1A;1*、*GmHK1B;1* のクローニングが完了した。*GmHK1A;1* および *GmHK1B;1* がヒスチジンキナーゼおよび浸透圧センサーとしての機能できるかを明らかにするため、出芽酵母の変異体を用いた相補試験を行った。酵母では通常生育条件下ではヒスチジンキナーゼ *SLN1* によって浸透圧ストレス応答経路である *HOG1* 経路が抑えられており、高浸透圧条件下においては *SLN1* と *SHO1* がそれぞれ浸透圧センサーとして *HOG1* 経路を制御している(Posas et al. 1996)。そのため *sln1Δ* 変異体では *HOG1* 経路が恒常的に活性化されることにより、通常生育条件下において生育が阻害される。また、*sln1Δ sho1Δ* 変異体では高浸透圧条件下においても *HOG1* 経路が恒常的に活性化されることにより生育が阻害される。*GmHK1A;1* および *GmHK1B;1* のヒスチジンキナーゼとしての機能を評価するため、*sln1Δ* 変異体に *GmHK1A;1*、*GmHK1B;1* を導入した。その結果、*GmHK1A;1*、*GmHK1B;1* 形質転換体はともに通常生育条件下での生育が見られたことから、*GmHK1A;1*、*GmHK1B;1* がヒスチジンキナーゼとして機能し得ることが明らかになった。また、*GmHK1A;1*、*GmHK1B;1* の浸透圧センサーとしての機能を評価するため、*sln1Δ sho1Δ* 変異体に *GmHK1A;1*、*GmHK1B;1* を導入した。その

結果、*GmHK1A;1*、*GmHK1B;1* 形質転換体はともに高浸透圧条件下で生育が見られたことから、*GmHK1A;1*、*GmHK1B;1* が浸透圧センサーとして機能し得ることが明らかになった。植物体において *GmHK1A;1* および *GmHK1B;1* が浸透圧応答に関わるかを解析するため、シロイヌナズナ中で *AHK1* のプロモーターによって *GmHK1A;1* または *GmHK1B;1* を発現させるベクターを作製した。

また、*GmDREB2A;2* について環境ストレスに対する発現応答をリアルタイム RT-PCR を用いて解析した。*GmDREB2A;2* の発現量は、低温、高温、乾燥、高塩濃度の各ストレスにより著しく増加した。*GmDREB2A;2* 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 のシグナルが検出された。また、同様に一過的遺伝子発現系により *GmDREB2A;2* の転写活性化能を解析したところ、*GmDREB2A;2* を発現させることにより DRE をつないだレポーターの活性の増加が見られた。従って、*GmDREB2A;2* はシロイヌナズナ葉肉細胞において核に局在し、高い転写活性化能を有していることが明らかになった。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

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(あれば)

なし

(4) ブラジル農牧研究公社・ダイズ研究所 ・ 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

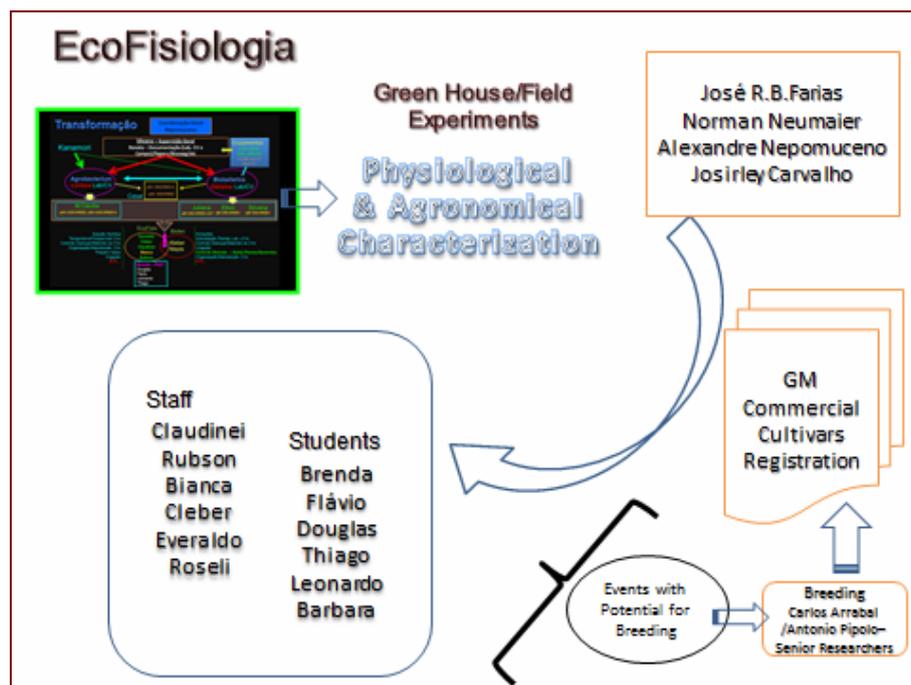
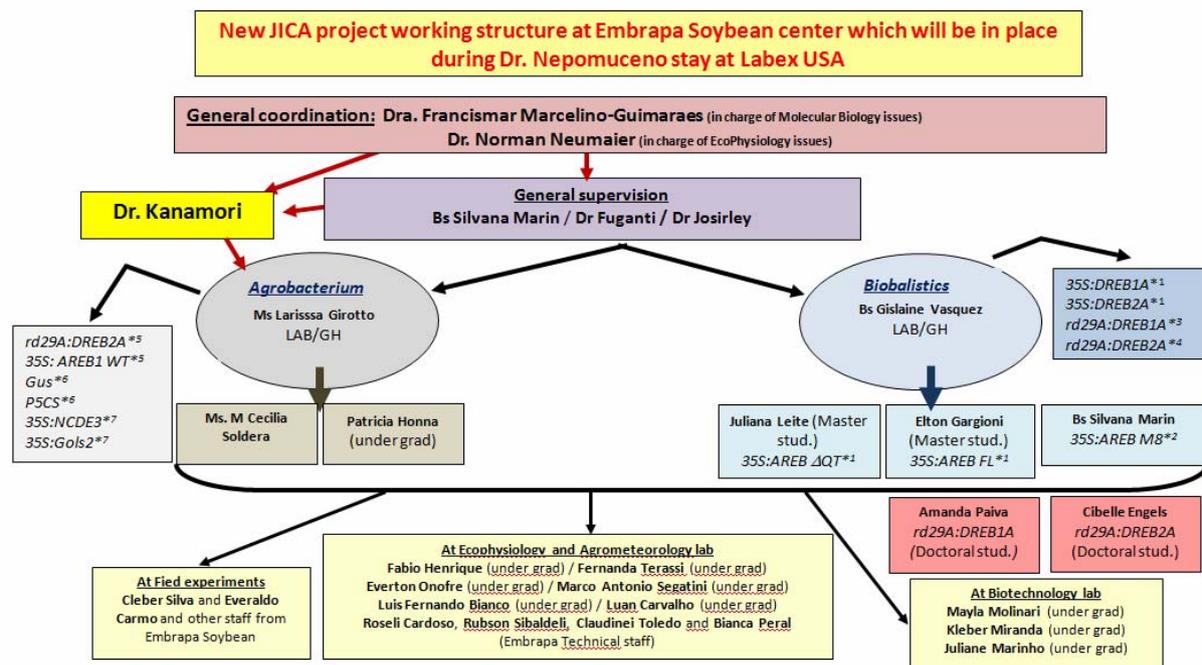
①研究のねらい

本プロジェクトでは、ダイズの形質転換に当たり、ブラジル農牧研究公社が特許を持ちこれまでダイズ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。これにより短時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

ブラジルのプロジェクトリーダーの Dr. Nepomuceno が9月5日から LABEX USA に出向となった。出向中、バイオテクノロジー部の Dr. Francismar が代理リーダーを務め、生態生理部の Dr. Norman が補佐役となってプロジェクトを進めることになった。9月5日以降の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:DREB2A*, *35S:DREB1A*, *35S:DREB2A*, *35S:AREB1*, *35S:AREB1ΔQT*, *35S:AREBIM8*)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、すべてのダイズ胚は、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-グルコ

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

パーティクルガン法

rd29A:AtDREB1A, *rd29A:AtDREB2A*, *35S:AtDREB1A*, *35S:AtDREB2A* コンストラクトを用いた形質転換を行った。*rd29A* ストレス誘導性プロモーターと融合した *DREB1A* または *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* または *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:AREB1ΔQT*, *35S:AREB1M8*) を用いて形質転換し、これまでに 1,000 以上の幼植物をバーミキュライト混合土壌に移した。近々葉をサンプリングし、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。優良系統は日本へ送ることになっている。これらすべての *rd29:DREB1A* 系統は自家受粉し、同型接合を检查した。

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。

選抜実験が P58 (*AtDREB1A*) の GM ラインと BRS184 品種の 12 の交雑種の種子を用いて行われた。これらのダイズは普通の給水状態で栽培された後、給水が止められた。給水停止 18 日後、8 個の異なる交雑種のうちの 11 のダイズが生存することが示され、これらの植物中には *rd29A:AtDREB1A* コンストラクトの存在することが確認された。これらの植物を用いて圃場実験を行う予定である。*35S:AtDREB1A* を導入した 28 個体の T_0 ダイズで導入遺伝子の存在が確認された。しかし、 T_1 世代では 3 個体しか、発現が確認できなかった。現在種子を増殖しているところである。

rd29A:AtDREB2A を導入した P2193 と P1397 の 2 ラインが作製された。これらの 2 ラインとコントロールとして BR16 (乾燥感受性品種) と Embrapa 48 (乾燥耐性品種) を用いた乾燥耐性試験が温室で行われた。生育後、乾燥状態に置き、各種の生理パラメーターを測定したデータを得る計画になっている。P2193 ラインの植物体を乾燥状態に置き、葉と根で発現する遺伝子を分析することも計画している。また、高温ストレスに関しても同様の実験を計画している。*35S:AtDREB2A* を導入したダイズでは T_0 世代で 5 個体に遺伝子が導入されていることが確認されたが、 T_1 世代で確認されたのは 1 個体だけであった。*RD29A: DREB2A* 系統の研究に関しては、シベレ・エンゲルス研究員が、ブラジル農牧研究公社・ダイズ研究所で開発された *DREB2* 系統を用いて、国際農林水産業研究センターの研究室で解析を行っている。

パーティクルガン法で *AREB* コンストラクトを用いて 10 ヶ月間に 7,296 個の胚の形質転換を試みた。その結果、10 個体の *pBI35S-Q-AREB1*、18 個体の *pBI35S-Q-AREB1ΔQT*、10 個体の *pBI35S-Q-AREB1M8* コンストラクトが導入された T_0 ダイズが確認された。これらのダイズの T_1 世代の植物体を得て実験を行った結果、*AREB1FL* コンストラクトでは、供試された 9 個のうち、6 種の異なるラインが検出された。*AREB1M8* コンストラクトでは、2 個の T_0 植物からの T_1 種子が用いられたが、遺伝子が導入されている個体はなかった。このため、形質転換を引き続き行っている。*AREBΔQT* コンストラクトでは、 T_1 世代の 3 個体で遺伝子が導入されていることが確認された。現在、*AREB* の導入が確認されたすべての T_0 と T_1 世代を用いて qPCR とサザンブロッティングで挿入コピー数を解析中である。

ダイズ研究所では、遺伝子組換えダイズの耐乾性メカニズムは水分保持力と関係があると考え、圃場での生

理的、農学的な性状検査のために *rd29A:AtDREB1A* 系統の相対的生育度と蒸散を測定した。

ダイズ研究所では初めて DREB1A と DREB2A の組換え体を圃場で水不足の条件下で試験することに成功した。ブラジル南部では 2011/2012 年のダイズ作期に開花—種子 (Grain) 形成時期の重要な時に干ばつに見舞われた。形質転換に用いている乾燥に感受性を示す BR16 と比較すると、DREB コンストラクトを導入した遺伝子組換えダイズで、その Senescence が遅れることが観察された (図3)。この視覚観察は予備的であり、収穫後に干ばつ時に DREB コンストラクトがダイズの開花や鞘形成中断を減少させ BR16 と比較して減収量が少なくなることを確認することが可能である。

さらに、組換えダイズの乾燥耐性が確認された場合、ダイズ研の育種プログラムに DREB 系統を導入するステップを予測して、12 の交雑が GMP58 (*AtDREB1A*) 系統と品種 BR16 と BRS184A の間で行われた。選抜試験は P58 × BR16 交雑種からの F2 種子を用いて行われた。水切り 18 日後、F1 交雑ダイズの 11 個体が生存し *rd29A:AtDREB1A* コンストラクトが確認された。両実験で共通の同じ F1 ダイズ由来の F2 ダイズが更なる野外試験のために増種のために選抜された。



図 3. ダイズ研究所において 2011/2012 年作期に *rd29:DREB1A* および DREB2A 系統の野外試験が行われた。

アグロバクテリウム法

これまでに成功したダイズ形質転換法 (方法①、Kanamori et al. (2011) JIRCAS Working Report) および、改変してパーティクルガン法と同じ手順にした形質転換法 (方法②) の 2 種類を用いて、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。

それぞれ 3000 種子を用いて形質転換を行い、形質転換効率および次世代種子の有無により今後用いる形質転換法を判断することとした。現在、方法①、方法②を用いた選抜により、35S:AREB1 遺伝子組換え体候補

のダイズが得られており、温室にて培養を行っている(図4、5)。

35S:AREB1 soybean (T₀)

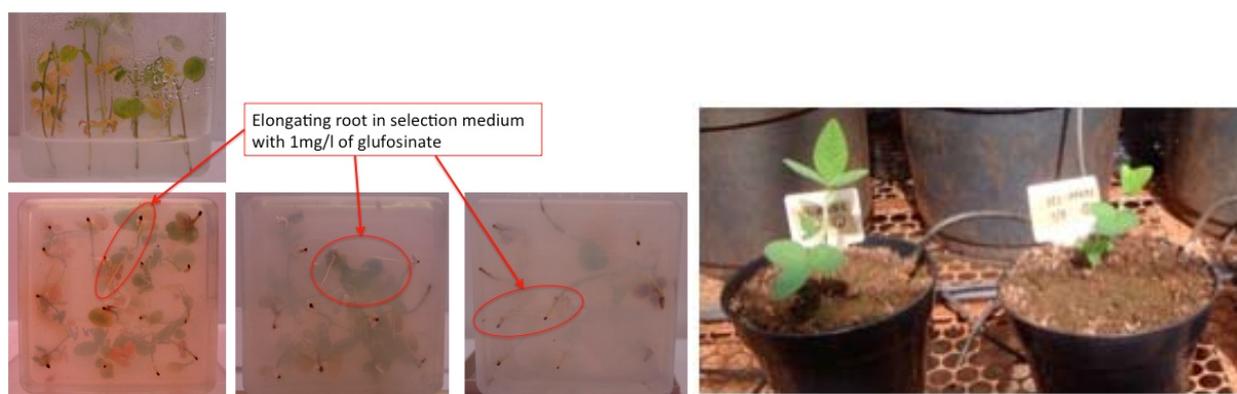


図4. 方法①により得られた 35S:AREB1 遺伝子組換えダイズ候補



図5. 方法②により得られた 35S:AREB1 遺伝子組換えダイズ候補

①法を用いた場合、T₀ 世代でポジティブを示す個体は 3 系統、②法を用いた場合は 1 系統であった。①法を用いた場合の形質転換効率は 0.1%、②法を用いた場合は 0.03%であり、①法を用いた β-グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子の形質転換効率 (1.5%) に比べ非常に低かった。他方、パーティクルガン法を用いて 35S:AREB1 を形質転換した場合、形質転換効率は 0.44% (2704 植物体を用いて 12 系統を取得) であった。さらに、12 系統のうち 6 系統は T₁ 世代に導入遺伝子が移行していることから、これまで通りパーティクルガン法による遺伝子導入も継続して進めるのが望ましいと考えられる。アグロバクテリウム法は形質転換効率が低い原因を究明し、パーティクルガン法程度にまで形質転換効率を上げる必要がある。1Ea2 系統の次世代種子 (T₁) 8 粒を播種し、PCR により遺伝子導入を調べた。遺伝子が導入されたことを示す PCR バンドが確認できなかったため、1Ea2 系統はカメラで遺伝子導入されていることが考えられた。得られた他の系統の種子についても確認を行う予定である。

これまでの *DREB* と *AREB* の形質転換の結果。

導入したコンストラクト	ポジティブな植物の数
	パーティクルガン法

<i>rd29A:AtDREB1A</i>	11 events - P58/P1142/P59/P3069/P1378/ P27/P45/P345/P382/P3075/ P1333
<i>rd29A:AtDREB2A</i>	02 events - P2193/P1397
<i>35S:AtDREB1A</i>	28 events in T ₀ / 03 identified in T ₁ /others need to be tested
<i>35S:AtDREB2A</i>	05 events in T ₀ / 01 identified in T ₁ /others need to be tested
<i>35S:AREB1 FL</i>	09 events in T ₀ / 03 identified in T ₁ /others need to be tested
<i>35S:AREB1 ΔQT</i>	13 events in T ₀ / 06 identified in T ₁
<i>35S:AREBM8</i>	02 events in T ₀ / none in T ₁ /transformed embryos need to be tested
アグロバクテリウム法	
<i>35S:GUS</i>	02 event in T ₀ generation - T ₁ seeds stored
<i>35S:AREB WT</i>	04 events confirmed by PCR in T ₀ generation/ 18 new putative events (still need to be confirmed using different sets of primers)

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

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アマダ・パイバおよびシベレ・エンゲルス研究員に、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(あれば)

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 19件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0件、海外 44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, 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, 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 contributeds 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., 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., 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., Shinozaki K. (2011) Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in Arabidopsis. *Mol. Cell* 41, 649-660.
25. Le, D.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.S. (2011) Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Res.* 18, 263-276.
26. Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D.T., Kojima, M., Werner, T., Vanková, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmölling, T., Tran, L.-S.P. (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and ABA responses, and ABA biosynthesis. *Plant Cell* 23, 2169-2183.
27. Mochida, K., Uehara-Yamaguchi, Y., Yoshida, T., Sakurai, T., Shinozaki, K. (2011) Global landscape of a

- co-expressed gene network in barley and its application to gene discovery in Triticeae crops, *Plant Cell Physiol.* 52, 785-803.
28. Nanjo, Y., Maruyama, K., Yasue, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Komatsu, S. (2011) Transcriptional responses to flooding stress in roots including hypocotyl of soybean seedlings. *Plant Mol. Biol.* 77, 129-144.
 29. Kuromori, T., Sugimoto, E., Shinozaki, K. (2011) Arabidopsis mutants of *AtABCG22*, an ABC transporter gene, increase water transpiration and drought susceptibility. *Plant J.* 67, 885-894.
 30. Kuromori, T., Ito, T., Sugimoto, E., Shinozaki, K. (2011) Arabidopsis mutant of *AtABCG26*, an ABC transporter gene, is defective in pollen maturation. *J. Plant Physiol.* 168, 2001-2005.
 31. Kodaira, K., Qin, F., Tran, L.-S.P., Maruyama, K., Kidokoro, S., Fujita, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) Arabidopsis C2H2 zinc-finger proteins AZF1 and AZF2 negatively regulate ABA-repressive and auxin-inducible genes under abiotic stress conditions. *Plant Physiol.* 157, 742-756.
 32. Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., Maruyama, K., Kim, J.-M., Seki, M., Todaka, D., Osakabe, Y., Sakuma, Y., Schöffl, F., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Mol. Genet. Genomics* 286, 321-332.
 33. Mochida, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. and Tran, L. S. (2011) *In silico* analysis of transcription factor repertoires and prediction of stress-responsive transcription factors from six major gramineae plants. *DNA Res.* 18, 321-332.
 34. Polizel, A.M., Medri, M.E., Nakashima, K., Yamanaka, N., Farias, J.R.B., Neves de Oliveira, M.C., Marin, S.R.R., Abdelnoor, R.V., Marcelino-Guimarães, Fuganti, F.C.R., Rodrigues, F.A., Stolf-Moreira, R., Beneventi, M.A., Rolla, A.A.P., Neumaier, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carvalho, J.F.C., Nepomuceno, A.L. (2011) Molecular, anatomical and physiological properties of a soybean genetically modified line transformed with *rd29A:AtDREB1A* for the improvement of drought tolerance. *Genet. Mol. Res.* 10, 3641-3656.
 35. Kim, J.-S., Mizoi, J., Yoshida, T., Fujita, Y., Nakajima, J., Ohori, T., Todaka, D., Nakashima, K., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the *DREB2A* gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 52, 2136-2146.]
 36. Qin, F., Kodaira, K., Maruyama, K., Mizoi, J., Tran, L.-S.P., Fujita, Y., Morimoto, K., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) *SPINDLY*, a negative regulator of GA signaling, is involved in the plant abiotic stress response. *Plant Physiol.* 157, 1900-1913.
 37. Yamada, K., Kanai, M., Osakabe, Y., Ohiraki, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) The monosaccharide absorption activity of Arabidopsis roots depends on the expression profiles of transporter genes under high salinity conditions. *J. Biol. Chem.* 286, 43577-43586.
 38. Maruyama, K., Todaka, D., Mizoi, J., Yoshida, T., Kidokoro, S., Matsukura, S., Takasaki, H., Sakurai, T., Yamamoto, Y.Y., Yoshiwara, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) Identification of cis-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional

- pathways in Arabidopsis, rice and soybean. *DNA Res.* 9, 37-49.
39. Tanaka, H., Osakabe, Y., Katsura, S., Mizuno, S., Maruyama, K., Kusakabe, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) Abiotic stress-inducible receptor-like kinases negatively control ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.* 70, 599-613.
40. Kurusu, T., Nishikawa, D., Yamazaki, Y., Gotoh, M., Nakano, M., Hamada, H., Yamanaka, T., Iida, K., Nakagawa, Y., Saji, H., Shinozaki, K., Iida, H. and Kuchitsu, K. (2012) Plasma membrane protein OsMCA1 is involved in regulation of hypo-osmotic shock-induced Ca²⁺ influx and modulates generation of reactive oxygen species in cultured rice cells. *BMC plant biology*, 12, 11.
41. Nishiyama, R., Le, D. T., Watanabe, Y., Matsui, A., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. and Tran, L. S. (2012) Transcriptome analyses of a salt-tolerant cytokinin-deficient mutant reveal differential regulation of salt stress response by cytokinin deficiency. *PLoS one*, 7, e32124
42. Uraji, M., Katagiri, T., Okuma, E., Ye, W., Hossain, M. A., Masuda, C., Miura, A., Nakamura, Y., Mori, H., Shinozaki, K. and Murata, Y. (2012) Cooperative function of PLDdelta and PLDalpha1 in ABA-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 159, 450-60.
43. Kawaguchi, S., Iida, K., Harada, E., Hanada, K., Matsui, A., Okamoto, M., Shinozaki, K., Seki, M. and Toyoda, T. (2012) Positional correlation analysis improves reconstruction of full-length transcripts and alternative isoforms from noisy array signals or short reads. *Bioinformatics* 28, 929-937.
44. Fujita, M., Fujita, Y., Iuchi, S., Yamada, K., Kobayashi, Y., Urano, K., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2012) Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in Arabidopsis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 6343-6347.

(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)

9月から Alexandre Nepomuceno がアメリカ出向のため、Francismar Corrêa Marcelino (ブラジル農牧研究公社ダイズ研究所・主任研究員)が代行リーダーとして、Norman Neumaier (ブラジル農牧研究公社ダイズ研究所・主任研究員)がサブリーダーとして、プロジェクトを進行する。

2012年1月からシルヴァーナ・マリン研究技術員が Agrobacterium による形質転換を開始した。

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