

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

(ブラジル連邦共和国)

平成 25 年度実施報告書

代表者: 中島 一雄

独立行政法人国際農林水産業研究センター生物資源・利用領域 プロジェクトリーダー

<平成 21 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。平成24年度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た。また、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した。さらに、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った。現在、ブラジルにおいて、ダイズへ遺伝子導入が実施されている。また、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生育や収穫、ストレス耐性試験等を行っている。さらに、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することにより、ストレス耐性や生育との関係を解明するための研究を実施している。

2. 研究グループ別の実施内容

2.1. 国際農林水産業研究センター・ストレス耐性グループ

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シ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や有用プロモーターを探索する。

②研究実施方法

公開されているダイズの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。その一方で、ダイズのストレス誘導性プロモーターの単離、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

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 *DREB1* 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。

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、それらのシークエンスを行って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た。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。さらに *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。ブラジルにおいて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。

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おこなった。*GmDREB1E2* タンパク質はベクターコントロールと比べ 20.2 倍に *GUS* 遺伝子の発現を上昇させた(図2)。同じ Subgroup2 に属する重要な環境ストレス耐性遺伝子であるシロイヌナズナの *DREB1A* タンパク質は 23.1 倍の上昇であった(図2)。このことから、*GmDREB1E2* タンパク質は高い転写活性化

能を有しており、シロイヌナズナの DREB1A タンパク質と同様にストレス応答における重要な機能を担っている可能性が示唆された。Subgroup3 に属する GmDREB1G1、GmDREB1H2 タンパク質もそれぞれ 15.8 倍、18.4 倍の高い転写活性化能を示した(図2)。

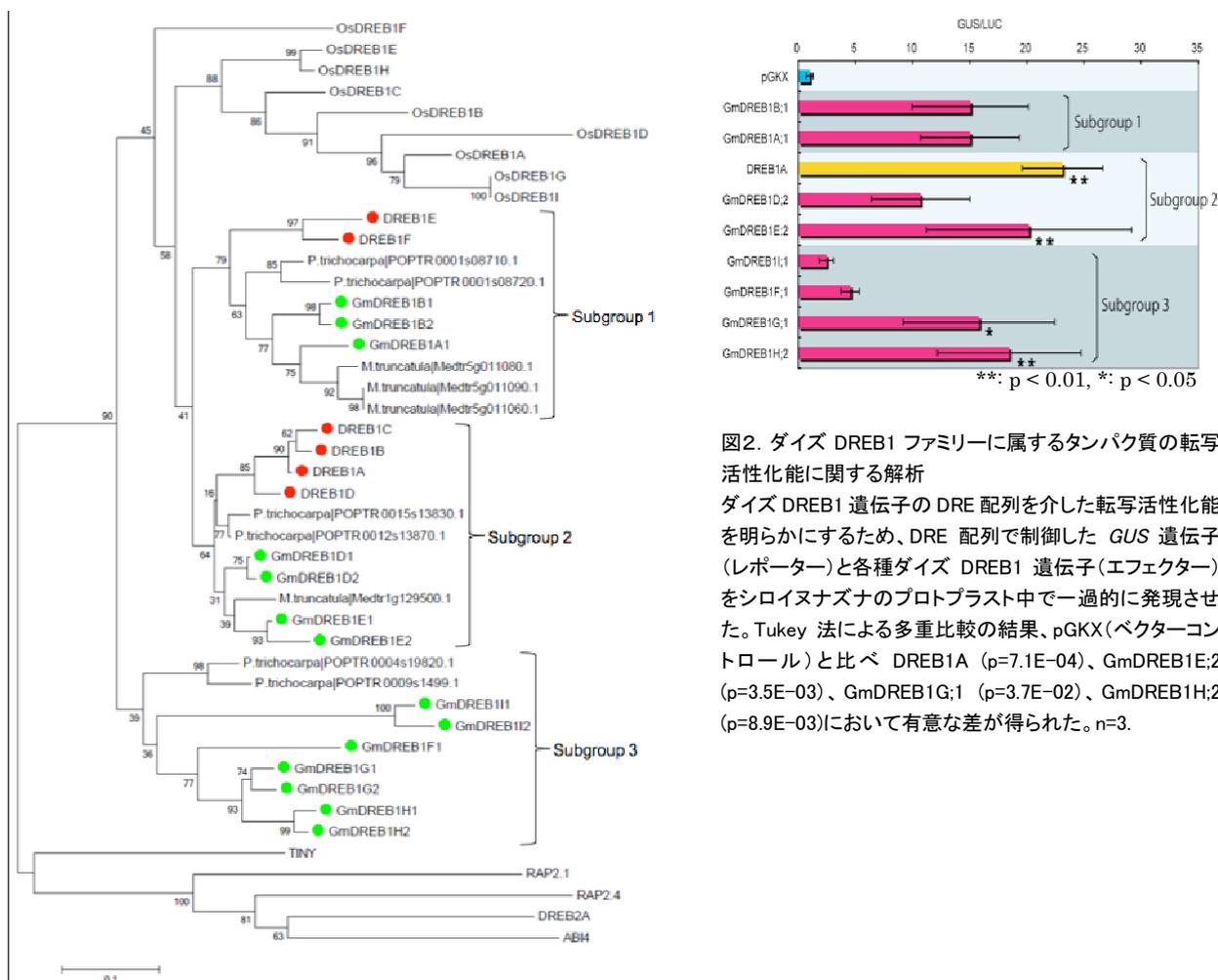


図1. DREB1 ファミリーに属する遺伝子の分子系統樹
 緑丸はダイズの DREB1 遺伝子、赤丸はシロイヌナズナの DREB1 遺伝子を示す。

さらに 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。

24 年度は、ストレス誘導性プロモーターの単離作業を推進した。前年度までに行ったダイズの乾燥応答性遺伝子群の網羅的解析により得られた結果を用いて、プロモーター領域に乾燥ストレス応答性のシス配列を含む4個の遺伝子を新たに抽出した。日本のダイズ栽培品種である農林2号のゲノム DNA を鋳型として PCR 反応を行うことにより、前年度までに選抜した2個の遺伝子を含めて、計6個の遺伝子のプロモーター領域の単離に成功した。さらに、これらのプロモーター領域に GUSレポーター遺伝子を連結した DNA 断片をバイナリーベクター pC3300J に導入することにより、ダイズ形質転換用のコンストラクトを作製した。

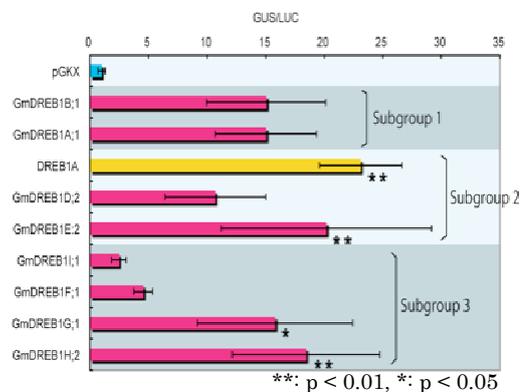


図2. ダイズ DREB1 ファミリーに属するタンパク質の転写活性化能に関する解析

ダイズ DREB1 遺伝子の 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(レポーター)と各種ダイズ DREB1 遺伝子(エフェクター)をシロイヌナズナのプロトプラスト中で一過的に発現させた。Tukey 法による多重比較の結果、pGKX(ベクターコントロール)と比べ DREB1A (p=7.1E-04)、GmDREB1E;2 (p=3.5E-03)、GmDREB1G;1 (p=3.7E-02)、GmDREB1H;2 (p=8.9E-03)において有意な差が得られた。n=3。

さらに 24 年度は、一過的遺伝子発現系によるプロモーター活性の解析を行うために、上記の DNA 断片を pBI221 ベクターに導入したコンストラクトをそれぞれ作製した。これらのコンストラクトをシロイヌナズナの葉肉細胞由来のプロトプラストに導入し、プロモーター領域の活性を測定した結果、既に単離した 3 種類のプロモーター領域、*Gmp3*, *Gmp4*, *Gmp11* において ABA 処理によるプロモーター活性の上昇が認められた(図3)。

25 年度は、前年度までに得られた 5 個の乾燥ストレス誘導性遺伝子について、マイクロアレイデータを用いて、根、茎における発現を解析した。その結果、5 個の遺伝子は全て、葉だけでなく根、茎においても乾燥で顕著に誘導されることを確認した。一方で、ストレス未処理時の各組織における発現は、*Gm2* と *Gm3* が他と比較して低い値を示した。次に、

ダイズプロトプラストの一過的遺伝子発現解析を行い、5 個の遺伝子のプロモーター活性を評価した。ダイズプロトプラストの一過的遺伝子発現実験を季節や気候に影響されず安定して行うため、まず、CO₂ 人工気象器におけるダイズの生育条件およびプロトプラスト単離条件の検討を行った。次に、プロモーターの ABA 応答性を評価した結果、選抜した 5 個のプロモーター領域のうち *Gm2* を除く 4 個は、ABA によりプロモーター活性が上昇することが確認された。以上のデータより、乾燥誘導性の有用遺伝子として *Gm3* を選定した。このプロモーターを用いて、ダイズのアグロバクテリウム形質転換法に適した新しいコンストラクト(*Gm3pro:DREB1A*)を作製し、Embrapa 大豆研究所に送付した。

さらに 25 年度は、Embrapa 大豆研究所から受け取った 35S:AtAREB1ΔQT 組換えダイズを播種し、それらの中から導入遺伝子 AREB1 を高発現しているラインを選抜し、マイクロアレイ解析を行った。35S:DREB1A 組換えダイズについても、マイクロアレイ解析を行った。今後は、マイクロアレイデータを基に発現解析を行う。

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大豆研究所のアマンダ・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。

23 年度は、ブラジル農牧研究公社大豆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おこなった。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大豆研究所のマリアセシリア・アマラル・ソル

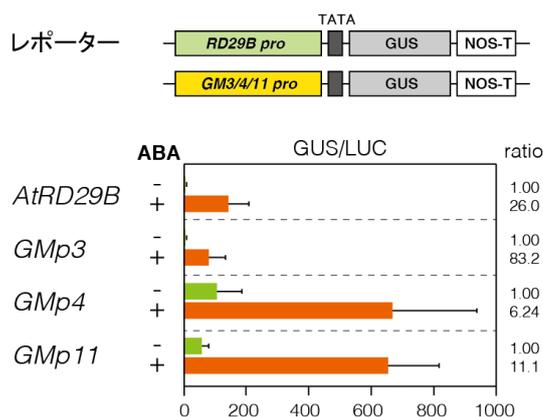


図3. プロモーター活性の評価
シロイヌナズナの葉肉細胞由来のプロトプラストを用いて、無処理及び ABA 処理条件下におけるレポーター遺伝子の活性を評価した。

デラ研究技術員を受け入れ、アグロバクテリア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た。

24 年度は、前年度に引き続き、シベレ・エンゲルス研究員に研修を行っており、ダイズオリゴアレイを用いた乾燥応答性遺伝子の発現解析に使用するサンプルの調製、品質確認に関して技術指導を行った。また、オリゴアレイ解析結果により得られた知見を基に、遺伝子組換え作物の作出に有用なプロモーター候補の選抜、プロモーター領域のクローニング、及び活性評価の手法に関して技術指導を行った。また、2012 年 7 月～8 月にブラジル農牧研究公社大豆研究所のマリアセンリア・アマラル・ソルデラ研究技術員を受け入れ、ダイズの遺伝子組換え技術に有用な分子生物学的手法について研修を行った。

25 年度は、ダイズのアグロバクテリウム法形質転換用プラスミド Gm3pro:DREB1A を提供した。また、2013 年 10～12 月に、リリアーネ・ヘニング研究員を受入れ、35S:AREB Δ QT および 35S:DREB1A 組換えダイズの RNA 抽出、RT-PCR 法による遺伝子発現の解析、マイクロアレイ処理等の実験手法の研修を行った。

- 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

2.2. 理化学研究所・ストレス応答研究グループ

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。

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。

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* を導入した。ダイズ遺伝子の機能解析に関しては、JIRCAS が実施したダイズオリゴアレ解析によるデータとオープン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抽出したダイズ遺伝子の中から、オリゴアレと 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(図2)。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)のサンプルの準備を行った。

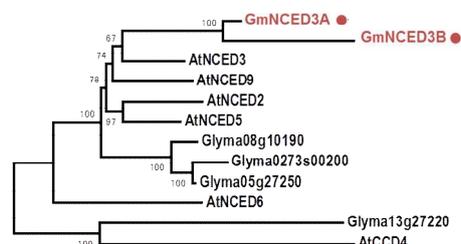


図1 *NCED* 遺伝子群の系統解析

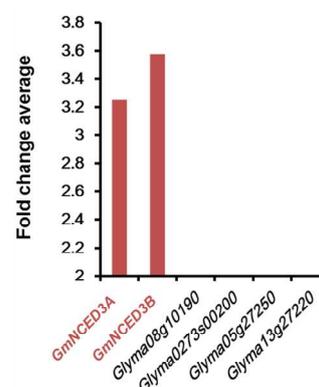


図2 ダイズ *NCED* 遺伝子群の乾燥ストレス応答性発現解析

24 年度はダイズの *NCED* 遺伝子についての機能解析とシロイヌナズナ *Gols2* 遺伝子のパーティクルガン用のコンストラクトを作製しブラジル農牧研究公社大豆研究所へ提供を行った。ダイズの *NCED* に関しては、乾燥による誘導と給水による遺伝子発現の減少が根、茎、葉の組織で起こることを確認した(図3)。*GmNCED3A* のプロモーターの活性を調べるために遺伝子上流配列をクローニングし、*GUS* レポーターと融合したコンストラクトを作製した。

また、*GmNCED3A* の活性の有無を調べる目的で機能相補実験として *GmNCED3A* をシロイヌナズナの *NCED* 機能欠失変異体へ導入した。組換えタンパクを用いて活性を測定するために GST に融合した *GmNCED3A* の精製を行った。パーティクルガン用のコンストラクトに関して、大豆研究所指定の pAC321N ベクターへ恒常のプロモーターと *Gols2* 遺伝子を導入し作製し、大豆研究所に送付した。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ならびに各種植物ホルモンの網羅的解析を行った。

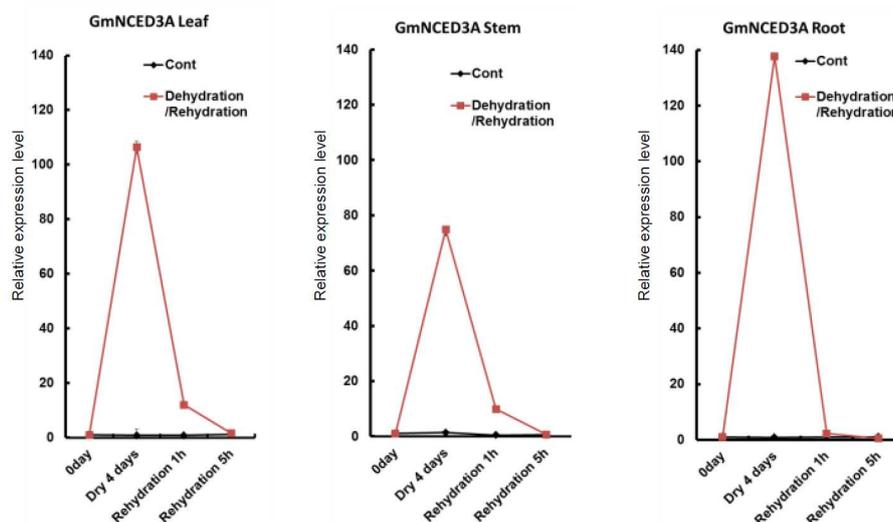


図3 ダイズ *NCED* 遺伝子 *GmNCED3A* の組織ごとの乾燥ストレスおよび給水応答性発現解析

25年度は、ダイズの *NCED* 遺伝子の解析およびメタボロームとトランスクリプトームの統合解析を行った。24年度に作成した *GmNCED3A* プロモーター-*GUS* のコンストラクトをシロイヌナズナへ導入し、形質転換体を選抜した。また、ダイズ形質転換用のコンストラクトとして、*GmNCED3A* プロモーターを pC3300J に導入した。

メタボロームとトランスクリプトームの統合解析に関して、一次代謝物質の器官による乾燥ストレス時の変動を詳細に解析した。同定した 92 個の代謝物質の中で、分枝アミノ酸のバリン、ロイシン、イソロイシンやプロリンが、乾燥ストレス後半の4日目に、V1、V2葉にて顕著に蓄積することが明らかになった。一方、2糖のトレハロース、オリゴ糖のラフィノースやその前駆体のガラクトキノールは乾燥前半3日目の根で顕著に蓄積した。

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

2.3. 東京大学・ストレス受容研究グループ

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。

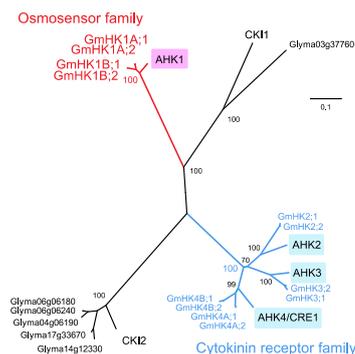


図1. シロイヌナズナ及びダイズのヒスチジンキナーゼファミリーの分子系統樹
シロイヌナズナ及びダイズのヒスチジンキナーゼファミリーよりキナーゼドメインとレシーバードメインを含む保存領域を用いて分子系統樹を作成した。浸透圧センサーファミリーを赤字で、サイトカニンレセプターファミリーを青字でそれぞれ示す。

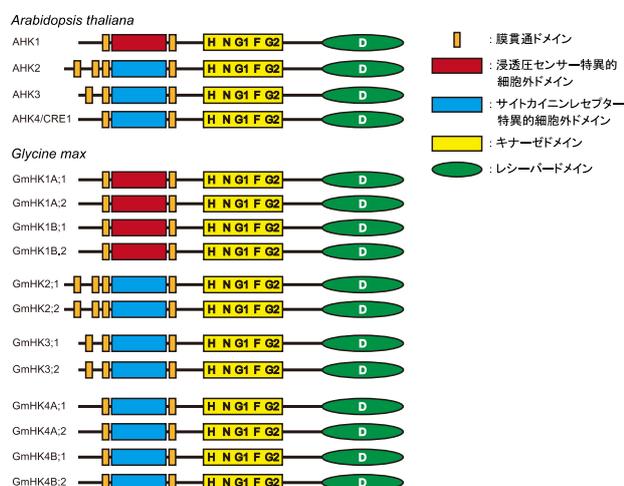


図2. シロイヌナズナ及びダイズのヒスチジンキナーゼファミリーの模式図

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。

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 を送付した。

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。

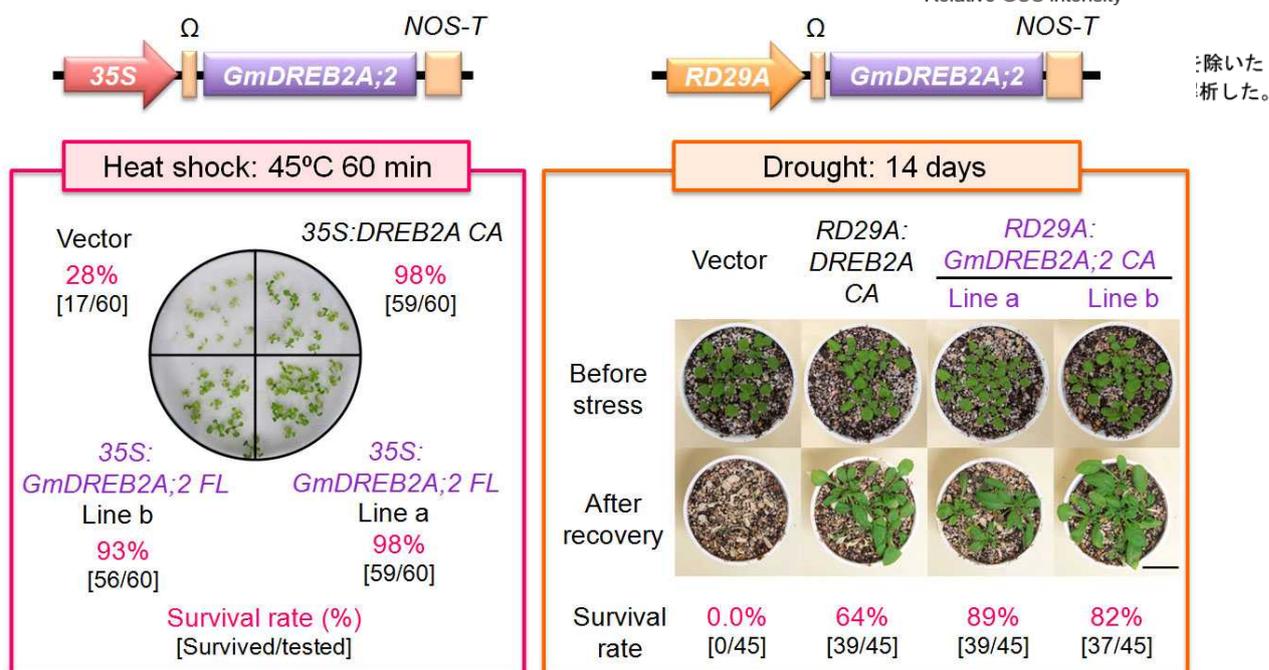
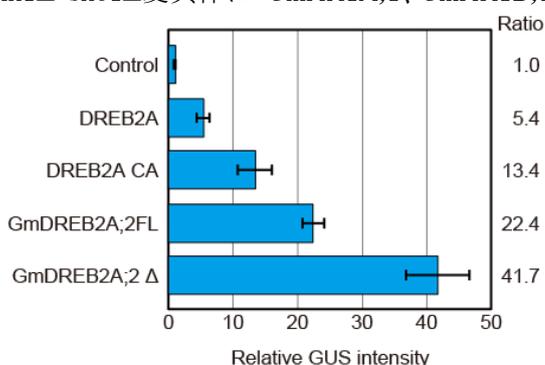


図4. *GmDREB2A;2* 形質転換植物のストレス耐性試験

左: *35S::GmDREB2A;2 FL* 植物における高温耐性の向上; 右: *RD29A::GmDREB2A;2 CA* 植物における乾燥耐性の向上。

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。GmDREB2A;2 は、DREB2A の NRD と同様に、タンパク質の安定性に関与する PEST 配列を持つことから、全長の GmDREB2A;2 (GmDREB2A;2FL) からこの配列を除去した GmDREB2A;2 (GmDREB2A;2Δ) について一過的遺伝子発現系により転写活性化能を解析した。その結果、GmDREB2A;2Δ は DRE をつないだレポーターの活性を、GmDREB2A;2FL よりもさらに増加させた (図3)。そこで、シロイヌナズナ中で GmDREB2A;2FL および GmDREB2A;2Δ を過剰発現させるベクターを作製した。

24 年度は、23 年度に作製した GmHK1 または GmDREB2A;2 を異所的に発現させるベクターをそれぞれシロイヌナズナに形質転換した。GmDREB2A;2 FL を 35S プロモーター制御下で恒常的に発現させた植物 (35S:GmDREB2A;2 FL) は正常に生育したが、GmDREB2A;2Δ (以降 GmDREB2A;2 CA と呼ぶ) を同様に 35S プロモーター制御下で恒常的に発現させた植物 (35S:GmDREB2A;2 CA) では、生育が著しく抑制された。一方、GmDREB2A;2 を乾燥誘導性の RD29A プロモーターの制御下で発現させた場合 (RD29A:GmDREB2A;2 CA) では、生育は抑制されなかった。次に、正常に生育する植物を使って、ストレス耐性試験を行った。その結果、35S:GmDREB2A;2 FL は、高温耐性が向上し、RD29A:GmDREB2A;2 CA は、乾燥ストレス耐性が向上していた (図4)。以上のことから、GmDREB2A;2 は、植物体においてシロイヌナズナの DREB2A と同様に機能し、高温および乾燥ストレスに耐性を付与する能力があることが示された。

25 年度は、GmHK1 を異所的に発現させるベクターを導入したシロイヌナズナについて導入遺伝子の発現を確認し、試験に用いる系統を選抜した。一方、ストレス耐性が向上することが示された GmDREB2A;2 FL および GmDREB2A;2 CA を恒常的に発現させた形質転換シロイヌナズナについては遺伝子発現解析を行い、これらの植物では、ストレス応答性遺伝子の発現が強くなっていることを確認した。しかしながら、個々の下流遺伝子の発現パターンに着目すると、シロイヌナズナの DREB2A を発現させた場合と比べて強いものと弱いものがあり、DREB2A と GmDREB2A;2 の間で、下流の認識が部分的に異なっている可能性が考えられた。また、昨年度の生育シーズンにブラジル農牧研究公社大豆研究所に赴き、圃場にて生育しているダイズ (ブラジル品種、BR16) から抽出した RNA を用い、GmDREB2A;2 の発現解析を行った。GmDREB2A;2 遺伝子の発現は、灌水区と比較して、乾燥ストレス下に置かれているレインアウトシェルター内の植物において高くなっており、GmDREB2A;2 がブラジルにおける圃場のストレス条件下で発現していることが確かめられた (図5)。したがって、GmDREB2A;2 は、圃場においてストレスを受けたダイズにおいて実際に機能していると考えられる。ブラジル農牧研究公社大豆研究所には、ダイズ形質転換用のバイナリーベクター pC3300J に 35S あるいは、RD29A プロモーター制御下で GmDREB2A;2FL あるいは GmDREB2A;2 CA を発現するカセットを導入したコンストラクトを既に送付している。

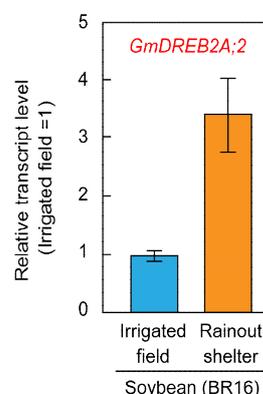


図5. ブラジル農牧研究公社大豆研究所の圃場における GmDREB2A;2 の発現。灌水区およびレインアウトシェルター内のダイズの葉における GmDREB2A;2 の発現量を解析した。

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コンストラクトを送付した。

- 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

2.4. ブラジル農牧研究公社・ダイズ形質転換グループ

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あたり、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、JICA 専門家として本プロジェクトに参画している国際農林水産業研究センターの金森主任研究員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。平成25年10月よりパーティクルガン法は中止し、アグロバクテリウムによる形質転換法のみ専念することになった。

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 が平成23年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 が平成24年10月まで代理リーダーを務め、平成24年11月からはバイオテクノロジー部の Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor が代理リーダーを務めた。また、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ている。平成25年9月に Dr. Nepomuceno が大豆研究所に戻った。

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: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、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 BR 16 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使い、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 (*35S:AREB1*, *35S:Gols2*) 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

DREB 遺伝子に関しては、*RD29A:DREB1A*, *RD29A:DREB2Aca*, *35S:DREB1A*, *35S:DREB2Aca* 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 *DREB2Aca* 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 *DREB2Aca* 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。

大豆研究所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 (*DREB1A*) 系統と品種 BR 16 と BRS 184A の間で行われ、12 の交雑種の選抜実験がおこなわれた。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 種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:DREB1A* 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開始した。*35S:DREB1A* 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 個体のみ発現が確認できた。現在種子を増殖しているところである。

RD29A:DREB2Aca 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 BR 16 (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:DREB2Aca* 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: DREB2Aca* 系統の研究に関しては、シベレ・エンゲルス研究員が、大豆研究所で開発された *DREB2* 系統を用いて、JIRCAS の研究室で解析を行った。

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。その結果、10 個体の *pBI35S-Ω-AREB1*、18 個体の *pBI35S-Ω-AREB1ΔQT*、10 個体の *pBI35S-Ω-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。*AREBM8* 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した。

DREB1, *DREB2* 導入ダイズのうち、PCR によりポジティブなダイズの優良系統は、マイクロアレイ等の遺伝子発現解析を行うために日本へ送付した (平成 22~24 年度)。*AREB* 導入ダイズについては 25 年度に第 1 回目の種子を日本へ送付した。現在、第 2 回目の種子の MTA が締結され、平成 26 年 5 月、日本に種子が送付された。

平成 24 年度は *RD29: DREB2Aca* と *35S:AREB1M8* コンストラクトを用いた形質転換体作出に重点が置かれた。*RD29:DREB2Ac* では T_0 世代で一つのイベントがポジティブであると確認され、今後の研究のために温室で種子を増殖した。

平成 25 年 10 月から、商業化に非実用的でないパーティクルガン法を中止し、アグロバクテリウム法による形質転換のみを行なうことになった。

35S:AREB1 コンストラクトを持つ系統の分子解析の結果—性状と転写コピー数と導入遺伝子の表現型

AREB1 導入系統 A2889 では、qPCR 解析による内在性リファレンス 2 コピーとの比較から、3 コピーの導入遺伝子が含まれることが示された。サザンブロット解析結果と合わせると、これらのデータは、この系統のすべての子孫において、これらの系統が単一挿入であり、同様な単一バンドのパターンが観察されることを示している。

A24 系統の大豆では、定量法により 5 個の導入遺伝子が検出された。すなわち、内因性レクチン遺伝子の 2.5 倍である。このように A24 系統は、半数体ゲノムあたり 3 個の導入遺伝子を持っていることが推測される。サザン

プロット データは T_0 及び T_1 サイズ両方で 3 つの挿入パターンを示した。

A2057 系統が qPCR 解析された系統では最も高いコピー数を持っていて、2 個の T_1 系統では 100 コピー以上の導入遺伝子を持っていた。サザン解析では挿入を定量することは出来ないが、この系統は qPCR の結果と一致して、タンデムに複数のコピーで、10 個以上の挿入があると推定された。

RT-qPCR 解析は、解析した系統で導入遺伝子が過剰発現していることを明らかにした。最も高い相対発現レベルは、A2889.04 と A2889.07 を除き、A2889 と A24 系統でみられた。予想されたように、最も低い発現レベルは導入遺伝子の複数コピー持っている A2057 系統でみられた。これらすべての解析 (qPCR, RT-qPCR, サザン解析) を考慮すると、A2889.12 と A24.10 系統の T_1 世代が、同様なコピー数と相対遺伝子発現レベルであったので、今後の解析対象として選ばれた。A2057.03 系統も、サイレンシングメカニズムの為と思われるが、最も低い発現を示したので、比較解析のために選ばれた。

35S:AREB1ΔQT コントラストを持つ系統の分子解析結果—挿入コピー数と導入遺伝子の発現

A2639 系統の T_0 植物では、定量法により、5 個の導入遺伝子が検出された。すなわち、2.5 倍の内因性レクチン遺伝子量である。サザン解析の結果も考慮に入れると、これらのデータは、A2639 系統が半数体ゲノムあたり 4 個の挿入遺伝子と 4 コピーの導入遺伝子を持っていることを示している。

T_1 世代では、A2639-1 系統は 5 コピーの導入遺伝子と 4 個の挿入を有していることから、4 個の *AtAREB1* 遺伝子が挿入されていることが推測された。このように、5 個のコピーが検出されたので一個のコピーがタンデムに挿入されたかもしれない。別のイベントの A2639-11 では、定量法で 5 コピーが、サザン法で 5 個の挿入が検出されたが、このイベントは少なくとも 5 個コピーの導入遺伝子、または内因性レクチンの 2.5 倍量がゲノムに挿入されたことを示している。

とくに、ポジティブ系統 A2639-22 では標準物質より、3 倍の挿入コピー数があり、6 コピーであった。この A2639-22 系統は半数体ゲノムあたり、3 個のコピーを有するようであり、ホモ接合体の場合 6 個、ヘミ接合体の場合 3 個の対立遺伝子のコピーを持つ。このイベントの別の系統では、サザン法では挿入コピーを推測することは出来なかった。従って、定量的な方法でこれらの植物のコピー数は 1~3 であることが示された。これらの植物の接合性は、 T_2 世代で 1:6 というかなり複雑な分離が観察されたため、確認することができなかった。それは、予想されるメンデルの法則の 3:1 に従わず、これらの 4 個の挿入は、異なる遺伝子座に挿入されたことが示唆され、複製または再編成が起こったことを示している。

A2651 イベントの T_0 植物では、定量法のデータとサザン解析のデータとの一貫性が無かったため、導入遺伝子コピー数を決定することは出来なかった。しかし、 T_1 系統では定量法により、2~5 コピーが検出された。サザン解析結果と合わせると、2~3 個の挿入が起こったことが推測された。これらの植物の接合性は、複雑な 2:3 分離パターンのため決定することは出来ず、これらの挿入が同じ遺伝子座に起こったのではないことが示唆される。

A2654 イベントの T_0 世代では、定量分析により 12 コピーが検出され、内在性遺伝子よりも 6 倍多い導入遺伝子であることを示している。4 個の挿入が検出されたサザンのデータと合わせて、このイベントでは 12 個のコピーがタンデムに挿入されたことが推測され、このことはバンドの濃度から確認された。 T_1 系統は T_0 植物と同じバンドパターンを示し、すべての植物で 3:1 の比率で分離する 10 コピー以上の導入遺伝子が検出された。

予期されたように、RT-qPCR 解析結果は、解析した系統において導入遺伝子が過剰発現されていることを明らかにした。内在性リファレンスと比較し、最も高い相対発現レベルは、すべての選抜された A2639-14, A2651-2, A2651-14 系統で見られた。すべての分子解析の結果を考慮に入れ、同じコピー数であったが、高

い発現レベルであったが、A2639.14, A2651.2 系統 T₁ 世代が更なる解析のために選ばれた。A2654-14 系統も、コピー数が多いにもかかわらず、同様に高い発現レベルを示していたので選んだ。

DREB1A 系統の温室での実験結果

乾燥ストレス条件下での *DREB1A* 組換えダイズと BR 16 の生存率はそれぞれ 70% (P58), 60% (P1142)、40% (BR 16)であった。

水欠乏期間において、BR 16 と比較して、*DREB1A* 組換えダイズは低い草丈、同数の節、わずかに葉の数と面積が多い(C/DS-P58)という結果になった。しかし、これらのデータの統計解析では有意差が無く、*RD29A* プロモーターで制御した *DREB1A* 遺伝子形質転換ダイズは、形質転換ダイズの成長に遅滞を起こさないことを示している。

ストレスレベルの定量は、気孔コンダクタンスによって評価した。植物は気孔コンダクタンスが① $\geq 0.2 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ② $= 0.1 \text{ a } 0.2 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ③ $\leq 0.1 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の時、それぞれ①制御されている(十分な水やり)、②中等度および③重度の水ストレスと判断した。コントロール条件下での気孔コンダクタンス値は 0.16 から 0.2 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の間で変動したことから、十分な水分条件であった。同様に、植物は水ストレス下で気孔コンダクタンス値は予想された値であった。これらの結果は実験に供与した植物が給水停止後、同レベルのストレスが与えられていることを示した。十分な給水下とストレス下の植物のガス交換(光合成と気孔コンダクタンス)に統計的な有意差が見られたが、各処理の中での遺伝子型による違いは無かった。また、BR 16 と異なり、*DREB1A* 組換えダイズは中程度の水ストレスでは乾燥の症状を示さなかったが、重度の水ストレス下では、BR 16 同様にしおれた。

コントロールと水ストレス下の蒸散を測定したところ、P58 系統の蒸散は、植物の要求量の水が十分に供給されるコントロール条件下で他の 2 つの遺伝子型より低かった。遺伝子型間では、水ストレス期間開始を除き、水ストレス条件下での差は無かった。温室条件下における蒸気圧不足分析で遺伝子型の中では蒸気圧不足が高い時に差が見られた。高度の蒸気圧不足(2.3 kPa)では、P58 系統は BR 16 より低い蒸散であることを確認した。しかし、水ストレス期間の終わりでは、BR 16 の蒸散は *DREB* 導入ダイズより低かった。水ストレス期間の間の蒸散データと乾物量の増加から蒸散効率が計算され、*DREB* 導入ダイズは BR 16 より高い蒸散効率があることが見出された。BR 16 のネガティブな蒸散効率は、反復実験において、最終乾物重量-初期乾物重量(水ストレス始めに得られた)がネガティブな値になったのは、これらの植物が呼吸代謝により重量を失ったことを示していることにより、説明できるかもしれない。光合成に代わり、呼吸が起こったことは、Li-Cor 機器による光合成測定により検証された。得られた結果から、水ストレス下におけるコントロール条件下の植物に対する相対成長率ならびに成長減少率を計算したところ、コントロール条件下において、P58 系統の植物はわずかに低い相対成長率があったが、水ストレス下では、いずれの形質転換体もわずかに高い相対成長率があった。統計的な有意差は無かったが、これらの相違は コントロール条件下で *DREB1A* 導入ダイズはよりゆるやかな成長パターンを持ち、水ストレス下においてもわずかに成長することを示している。

35S:AREB1 系統の温室での実験結果

35S:AREB1 組換えダイズ A24.10 系統において、十分な水が与えられた場合でも水ストレス状態でも節数には影響なかった。この系統は A2889.12 系統と導入遺伝子の発現が類似していることを考慮すると、その成長は導入遺伝子の挿入部位により影響を受けていると考えられた。また、A2057.03 系統の成長が BR 16 と差が無いことは、導入遺伝子の発現との関連が予想された。実験に使用した 35S:AREB1 の中で、A2889.12 と

A24.10 系統は、5 日間のストレス期間生存することができ、再給水後、葉のダメージが見られなかったことから、乾燥耐性能を持つと考えられる。A2057.03 では BR 16 同様に葉のダメージが見られた。さらに、A2889.12 と A24.10 では、BR 16 と比較して、ストレス条件下で成長を続けることができた。最終給水後、葉のダメージの無い植物の割合は A2889.12 と A24.10 系統では 100%、A2057.03 系統で 60%、BR 16 で 40%であった。ガス交換測定では、ストレス下で A2889.12 と A24.10 系統はわずかに高い気孔コンダクタンスがあり、光合成はそれぞれ 1.9 倍と 2.5 倍と高い値を示した。水欠乏処理前の光合成活性は遺伝子表現型の間で類似しており、気孔コンダクタンス値は A2057.03 系統でわずかに低かった。データの統計解析は各遺伝子型につき 20 検体から計算される総平均値が比較される時だけ統計的有意差が見られた。全体的に、A24.10 系統は節間が短いことにより草丈が短く、葉の数が少なく、気孔コンダクタンスと光合成レートが高かった。

平成 25 年度に温室で *AREB* ポジティブ系統と非組換え品種の BR 16 を用いて生理学的および農学的データの収集および分子解析のため、2 つの実験を実施した。すべての遺伝子型の苗 - BR16 および 3 種の *AREB1* 系統を、1 リットルポットに入れた土と砂の混合土 (1:1) で、温室条件(平均温度 23.6°C、平均相対湿度 71.8%)において育成した。各ポットには 1 つの苗が植えられた。実験系は 9 回の反復で 4×4 の要因配置法(遺伝子型×給水条件)で完全な無作為で行われた。給水条件はそれぞれ、厳しいストレス(SS)、水分補給(R)とそれらの対照群であった(CSS および CR)。温室条件下で、SS および CSS 群からの同じ遺伝子型について、収量パラメーターを評価した。恒常的プロモーターである 35S プロモーターを用いて乾燥耐性遺伝子を恒常的に過剰発現された場合には、成長異常を起こす事が多いが、35S:*AtAREB1* 遺伝子導入大豆は、評価した収量パラメーターに対する悪影響がなかった。

35S:*AREB1ΔQT* 系統の温室における実験結果

35S:*AREB1ΔQT* 組換えサイズの表現型解析では、水が十分与えられた状態でも、水ストレス下でも、BR 16 より、節間が短くわずかに草丈が低いことから、導入遺伝子挿入が成長特性に影響を与えることが示唆されたが、葉の数と節数には影響がなかった。実験に供したすべての 35S:*AREB1ΔQT* は、BR 16 と異なり、給水停止後 10 日間生存することが出来、再給水後、葉の損傷が殆ど無かった。さらに、A2639.14 系統だけがストレス下で成長を続けた。再給水したすべての形質転換サイズは 100% の回復を示したのに対し、BR16 は 40% の回復であった。葉のダメージの無い植物は A2639.14、A2654.14、A2651.02 系統で 80%、BR 16 で 10% であった。形質転換植物の水欠乏によるダメージは BR 16 に比較して軽度であると考えられた。BR 16 と比較して、水分制限下で、A2651.02 と A2654.14 系統はわずかに高い気孔コンダクタンスを有することが確認されたが、A2639.14 系統は非常に低い気孔コンダクタンス値を示した。すべての形質転換系統における光合成は BR 16 と比較してはるかに高く、A2639.14、A2651.2 系統で 19.7 倍、A2654.14 系統で 5.32 倍それぞれ高かった。蒸散速度はコントロール条件下で A2639.14、A2654-14 系統、BR16 で同じであったが、A2651.12 系統では、わずかに高かった。しかし、ストレス条件下では、*AtAREB1A* 系統は非形質転換植物よりも大きな蒸散速度を維持したが、すべての形質転換体と BR 16 では蒸散速度が低下した。細胞内炭酸ガス濃度は形質転換系統と BR 16 で減少しなかったが、ストレス下では、BR 16 でより高かった。対照的に、すべての形質転換体の水利用効率はストレス下で BR 16 よりはるかに良かった。十分な給水条件下では、BR 16 と比較して、形質転換系統の気孔コンダクタンスは減少し、その結果 BR 16 の光合成率がより高くなることが予測された。統計的な有意差はなかったが、水ストレス下で、BR 16 の気孔コンダクタンスは形質転換系統よりも低かった。この条件下でこの品種の高い炭酸ガス蓄積と光合成率が 6~8 倍低いことは興味深いことである。水ストレス下では、形質転換植物はこの条件で葉の数が多いため、炭素源を葉の構築に使用しているものと考えられた。BR 16 は、形質転換植

物より長い平均節間長により草丈が高く、より多い葉面積があった。とくに、*35S:AREB1ΔQT* コンストラクトのイベントでは、少ない葉面積が高い生存率と水欠乏回復後の葉のダメージが無いことの主な原因であると考えられた。葉面積が少ないことが、生産量に影響を及ぼすかは今後評価する必要がある。

大豆研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:DREB1A* 系統の相対的生育度と蒸散を測定した。

ブラジル南部では 2011/2012 年のダイズ作期に開花—種子形成時期の重要な時に干ばつに見舞われたため、*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。形質転換に用いている乾燥に感受性を示す BR 16 と比較すると、*DREB* コンストラクトの導入した遺伝子組換えダイズで、落葉が遅れることが観察された(図 1)。この視覚観察は予備的であり、収穫後に干ばつ時に組換えダイズが開花や鞘形成中断を減少させ BR 16 と比較して減収しないことを確認することが必要である。

さらに、組換えダイズの乾燥耐性が確認された場合、大豆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 (*DREB1A*) 系統と品種 BR 16 と BRS 184A の間で行われた。選抜試験は P58×BR 16 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:DREB1A* 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 ダイズが更なる圃場試験のために増種のために選抜された。

DREB1A と *AREB1* 系統の圃場条件下における成長と生産量の評価

圃場条件下と水ストレスをシミュレートする効果的なシステムとして認められているレインアウトシェルターの実験では P58 系統植物が緩やかなしおれの表現型を示した。圃場条件下では、P58 系統および交雑系統 09D-0077 の成長に重要な差は無かった。生産量に関して、節数を除き、表現型の間での重要な差は無く、無給水処理の P58 系統で、栄養成長期の水ストレス下における 09D-0077 交雑種で高かった。

しかし、栄養成長期に水ストレスを与えると、P58 系統と 09D-0077 交雑種と比較して、BR 16 の生産量(種子数と鞘数)が明らかに減少する傾向があったことは注目すべきである。



図 1. 大豆研において 2011/2012 年作期に RD29:DREB1A および DREB2A 系統の野外試験が行われた。

2012/2013 作期には、10 種類の遺伝子型 (BRS 184、BRS 284、BRS 232、BRS 283、BRS 295RR、Embrapa 48、BR 16、P58 *DREB1A*、09D-0077、P2193 *DREB2A*) が評価された。最後の 5 つの遺伝子型に成長期および生殖期に干ばつストレスをかけた。2012/2013 作期は、雨が多かった (図 2)。いくつかの生理学的パラメーターにおいて、供試された遺伝子型の間で違いが見られた。現在、データを詳細に解析中である。

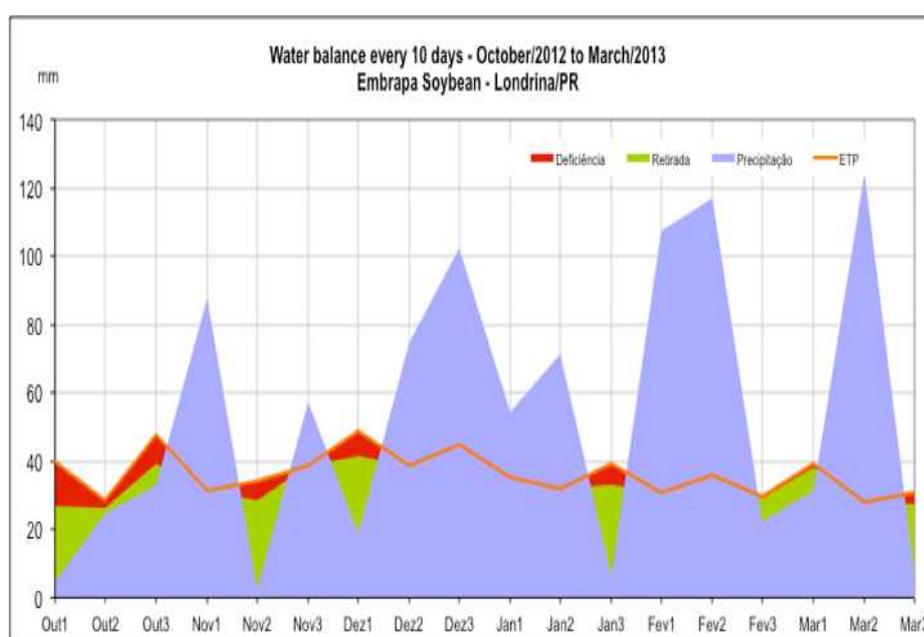


図 2. 2012/2013 作期における大豆研圃場の水バランス

2013/2014 作期には、2012/2013 作期に使用された系統のうち代表的なものに加え、新たな組換え系統についても圃場試験に供試された。実験圃場では 12 月 5 日から 49 日間降雨が無く、高温(例年より 3°C 高かった)であった。試験に供試した 1 種の組換えダイズ系統では緑色で枯れた様子も無く、視覚的に良かった。また葉に虫による食害が極めて少ないということが観察された。結果については現在解析中である。

アグロバクテリウム法

35S:AtAREB1 組換えダイズ

これまでに成功したダイズ形質転換法(Kanamori et al. (2011) JIRCAS Working Report)を用いて、日本から送付されたコンストラクト(35S:AREB1)の遺伝子を導入し、2 系統(1Ea15 および 1Ea2939)を得た。

アグロバクテリウム形質転換系の改善

アグロバクテリウム法を用いて 35S:AtAREB1 ダイズ 2 系統を得る事に成功したが、形質転換効率は 0.1%と低かった。アグロバクテリウム形質転換系の改善として、多くの研究室が採用し、形質転換効率が高いことが報告されている子葉軸を用いた形質転換系の条件を検討した。ブラジルのダイズ品種 BR 16, BRS 184, BRS 232, BRS 257, BRS 262, BRS 283, BRS 284, BRS 317, BRS 361 の 9 品種から感染効率及びシュート形成率の高い BRS 184 を選び、35S:GUS の形質転換を開始した。

BRS184 の種子より 172 個の子葉軸を取り出した。その子葉軸にアグロバクテリウムを 5 日間感染させてシュート誘導培地にて培養した後、6 mg/ml グルホシネートを含むシュート伸長培地にて培養を継続し、伸長したシュートをグルホシネート含有の発根培地に移植した。その後 10cm 程度に成長した植物体をポットに移植してさらに生育させた。植物体の葉の一部を用いて GUS 染色を行ったところ、遺伝子導入を示す青色染色が確認できた。生長した植物体の葉から DNA を抽出した後、GUS のプライマーを用いた PCR を行ったところ、T₀ 世代 3 系統から遺伝子導入を示すバンドが検出できた。

35S:GolS2 および 35S:NCED3 の形質転換

BRS184 の 1,215 個の子葉軸に 35S:GolS2 コンストラクトを持つアグロバクテリウムを感染させ、1478 個の子葉軸に 35S:NCED3 コンストラクトを持つアグロバクテリウムを感染させた。発根した植物体をポットに移植した植物体の葉から DNA を抽出して PCR を行ったところ、GolS2 ダイズ 7 系統、NCED3 ダイズ 3 系統(どちらも T₀ 世代)を得た。収穫した T₁ 種子は既に播種し、温室にて育成している。

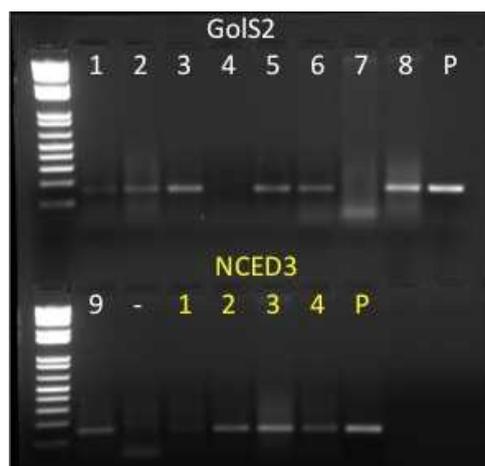


図 組換え体(T₀世代)の遺伝子導入確認。

これまでの形質転換の結果。

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:DREB1A</i>	11 events - P58/P1142/P59/P3069/P1378/ P27/P45/P345/P382/P3075/ P1333
<i>RD29A:DREB2Aca</i>	02 events - P2193/P1397
<i>35S:DREB1A</i>	28 events in T ₀ / 03 identified in T ₁ / others need to be tested
<i>35S:DREB2Aca</i>	05 events in T ₀ / 01 identified in T ₁ / others need to be tested
<i>AREB1 FL</i>	09 events in T ₀ / 03 identified in T ₁ / others need to be tested
<i>AREB1 ΔQT</i>	13 events in T ₀ / 06 identified in T ₁
<i>AREB1 M8</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:NCED3</i>	03 events in T ₀
<i>35S:GoIS2</i>	07 events in T ₀
<i>35S:AREB1 WT</i>	15 events in T ₀ generation/ 02 identified in T ₁

AtGoIS2 と AtNCED3 遺伝子の結果

35S:AtGoIS2 と *35S:AtNCED3* コンストラクトを用い、*Agrobacterium tumefaciens* 転換法でいくつかの系統が作出された。これまで T₁ 世代で 3 個の *AtGoIS2* 遺伝子が確認された: 2Ia1 (28 植物体), 2Ia2 (04 植物体) および 2Ia4 (02 植物体)。 *AtNCED3* 遺伝子では、T₀ 世代で 2Ha12 (01 植物体) がポジティブであることが確認された。2Ha11 (03 植物体) と 2Ha10 (02 植物体) の系統はすでに T₁ 世代である。すべてのこれらの系統については、生理学的、農学的、分子学的データを収集するための実験が行なわれることになっている。

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)

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セザー・シルヴェイラ、ラリッサ・ジロット、マリアセシリア・アマラル・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)

2013/2014 作期の圃場試験において、試験に供試した1種の組換えダイズ系統において、目的の干ばつおよび高温耐性以外に虫による食害が極めて少ないことが観察された。実験室での予備試験でもこのことが確認され、更なる詳細実験を始めた。現在ブラジルでは虫による食害被害が大きな問題となっている。

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 20件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0件、海外 64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. 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.
8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Kuromori, T., Shinozaki, K. (2010) ABA transport factors found in *Arabidopsis* ABC transporters. *Plant Signaling Behav.* 5, 1124–1126.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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.
32. 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.
33. Uraji, M., Katagiri, T., Okuma, E., Ye, W., Hossain, M. A., Masuda, C., Miura, A., Nakamura, Y., Mori, II, Shinozaki, K. and Murata, Y. (2012) Cooperative function of PLDdelta and PLDalpha1 in ABA-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 159, 450-60.
34. 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.
35. Kim, J.-S., Mizoi, J., Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakajima, J., Nakashima, K., Mitsuda, N., Takiguchi, Y., Ohme-Takagi, M., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Matsui, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) Arabidopsis GROWTH-REGULATING FACTOR 7 functions as a transcriptional repressor of ABA- and osmotic stress-responsive genes including DREB2A. *Plant Cell* 24, 3393-3405.
36. Mizoi, J., Ohori, T., Moriwaki, T., Kidokoro, S., Todaka, D., Maruyama, K., Kusakabe, K., Osakabe, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) GmDREB2A;2, a canonical DREB2-type transcription factor in soybean, is post-translationally regulated and mediates DRE-dependent gene expression. *Plant Physiol.* 161, 346-361.
37. Barbosa, E.G.G., Leite, J.P., Marin, S.R.R., Marinho, J.P., Carvalho, J.F.C., Fuganti-Pagliarini, R., Farias, J.R.B., Neumaier, N., Marcelino-Guimarães, F.C., Oliveira, M.C.N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Nakashima, K., Maruyama, K., Kanamori, N., Fujita, Y., Yoshida, T., Nepomuceno, A.L. (2012) Overexpression of the ABA-dependent AREB1 transcription factor from Arabidopsis thaliana improves soybean tolerance to water-deficit. *Plant Mol. Biol. Rep.* 31, 719-730.
38. Rodrigues, F.A., Marcolino-Gomes, J., Carvalho, J.F.C., Nascimento, L.C., Neumaier, N., Farias, J.R.B., Carazzolle, M.F., Marcelino-Guimarães, F.C., Nepomuceno, A.L. (2012) Subtractive libraries for prospecting differentially expressed genes in the soybean under water deficit. *Genet. Mol. Biol.* 35, 304-314.
39. Santos, E.L., Cattelan, A. J., Prete, C.E.C., Neumaier, N., Oliveira, M.C.N., Farias, J.R.B., Nepomuceno, A.L., Carvalho, J.F.C. (2012) Estresse hídrico afetando nodulação, óleo, proteína e produtividade de dez cultivares de soja. *Global Sci. Technol.* 5, 109-120.
40. Benko-Iseppon, A.M., Nepomuceno, A.L., Abdelnoor, R.V. (2012) GENOSOJA - the Brazilian soybean genome consortium: high throughput genomics and beyond. *Genet. Mol. Biol.* 35, i-iv.
41. Neves-Borges, A.C., Nepomuceno, A.L., Grossi-De-Sá, M.De.F., Loureiro, M.E., Cruz, F., Mesquita, R.O., Alves-Ferreira, M., Guimarães-Dias, F., Romano, E., Nepomuceno, A.L. (2012) Expression pattern of drought stress marker genes in soybean roots under two water deficit systems. *Genet. Mol. Biol.* 35, 212-221.
42. Guimarães-Dias, F., Neves-Borges, A.C., Viana, A.A.B., Mesquita, R., Oliveira, M.C.N., Romano, E.,

- Grossi-De-Sá, M.De.F., Nepomuceno, A.L., Loureiro, M.E., Alves-Ferreira, M. (2012) Expression analysis in response to drought stress in soybean: shedding light on the regulation of metabolic pathway genes. *Genet. Mol. Biol.* 35, 222-232,.
43. Soares-Cavalcanti, N.M., Belarmino, L.C., Kido, E.A., Wanderley-Nogueira, A.C., Bezerra-Neto, J. P., Cavalcanti-Lira, R., Pandolfi, V., Nepomuceno, A.L., Abdelnoor, R.V., Nascimento, L.C. Benko-Iseppon, A.M. (2012) In silico identification of known osmotic stress responsive genes from *Arabidopsis* in soybean and *Medicago*. *Genet. Mol. Biol.* 35, 315-321.
44. Osakabe, Y., Arinaga, N., Umezawa, T., Katsura, S., Nagamachi, K., Tanaka, H., Ohiraki, H., Yamada, K., Seo, S.-U., Abo, M., Yoshimura, E., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013) Osmotic stress response and plant growth controlled by the potassium transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 609-624.
45. Marcolino-Gomes, J, Rodrigues, F.A., Oliveira, M.C.N., Farias, J.R.B., Neumaier, N., Abdelnoor, R.V., Marcelino-Guimarães, F.C., Nepomuceno, A.L. (2013) Expression patterns of GmAP2/EREB-like transcription factors involved in soybean responses to water deficit. *PLoS One* 8, e62294.
46. Nakayama, T.J., Rodrigues, F.A., Neumaier, N., Marcelino-Guimarães, F.C., Farias, J.R.B., Oliveira, M.C.N., Borém, A., Oliveira, A.C.B., Emygdio, B.M., Nepomuceno, A.L. (2013) Reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in soybean plants under hypoxic conditions. *Genet. Mol. Res.* 13, 860-871.
47. Engels, C., Fuganti-Pagliarini, R., Marin, S.R.R., Marcelino-Guimarães, F.C., Oliveira, M.C.N., Kanamori, N., Mizoi, J., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Nepomuceno, A.L. (2013) Introduction of the *rd29A:AtDREB2A* CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in the leaves and roots during dehydration. *Genet. Mol. Biol.* 36, 556-565.
48. Morimoto, K., Mizoi, J., Qin, F., Kim, J.-S., Sato, H., Osakabe, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013) Stabilization of *Arabidopsis* DREB2A is required but not sufficient for the induction of target genes under conditions of stress. *PLoS One* 8, e80457.
49. Sakurai, T., Yamada, Y., Sawada, Y., Matsuda, F., Akiyama, K., Shinozaki, K., Hirai, M. Y. and Saito, K. (2013) PRIME update: innovative content for plant metabolomics and integration of gene expression and metabolite accumulation. *Plant Cell Physiol.*, 54, e5.
50. Myouga, F., Akiyama, K., Tomonaga, Y., Kato, A., Sato, Y., Kobayashi, M., Nagata, N., Sakurai, T. and Shinozaki, K. (2013) The chloroplast function database II: a comprehensive collection of homozygous mutants and their phenotypic/genotypic traits for nuclear-encoded chloroplast proteins. *Plant Cell Physiol.*, 54, e2.
51. Behnam, B., Iuchi, S., Fujita, M., Fujita, Y., Takasaki, H., Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kobayashi, M. and Shinozaki, K. (2013) Characterization of the promoter region of an *Arabidopsis* gene for 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase involved in dehydration-inducible transcription. *DNA Res.*, 20, 315-324.
52. Mochida, K., Uehara-Yamaguchi, Y., Takahashi, F., Yoshida, T., Sakurai, T. and Shinozaki, K. (2013) Large-scale collection and analysis of full-length cDNAs from *Brachypodium distachyon* and integration

- with pooideae sequence resources. *PloS one*, 8, e75265.
53. Sakurai, T., Mochida, K., Yoshida, T., Akiyama, K., Ishitani, M., Seki, M. and Shinozaki, K. (2013) Genome-wide discovery and information resource development of DNA polymorphisms in cassava. *PloS one*, 8, e74056.
 54. Umezawa, T., Sugiyama, N., Takahashi, F., Anderson, J. C., Ishihama, Y., Peck, S. C. and Shinozaki, K. (2013) Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Signal*, 6, rs8.
 55. Britto-Kido, S. A., Neto, J. R. C.F., Pandolfi, V., Marcelino-Guimarães, F. C., Nepomuceno, A. L. , Abdelnoor, R. V., Benko-Iseppon, A. M., Kido, E.A. (2013) Natural Antisense Transcripts in Plants: A Review and Identification in Soybean Infected with *Phakopsora pachyrhizi* SuperSAGE Library. *The Scientific World J.* 1-14.
 56. Lopes-Caitar, V. S., De Carvalho, M. C., Darben, L.M., Kuwahara, M.K., Nepomuceno, A.L., Dias, W. P., Abdelnoor, R.V., Marcelino-Guimarães, F. C. (2013) Genome-wide analysis of the Hsp20 gene family in soybean: comprehensive sequence, genomic organization and expression profile analysis under abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics*.14,577,1-17.
 57. Kido, E.A., Ferreira Neto, J. R.C., Silva, R. L., Belarmino, L. C., Bezerra Neto, J. P. Soares-Cavalcanti, N. M., Pandolfi, V., Silva., M.D., Nepomuceno, A. L., Benko-Iseppon, A. M. (2013) Expression dynamics and genome distribution of osmoprotectants in soybean: identifying important components to face abiotic stress. *BMC Bioinformatic.* 14,1471-2105.
 58. de Paiva Rolla, A.A., Carvalho, J.F.C., Fuganti-Pagliarini, R., Engels, C., do Rio, A., Marin, S.R.R., de Oliveira, M.C.N., Marcelino-Guimarães, F.C., Farias, J.R.B., Neumaier, N., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Nepomuceno, A.L. (2014) Phenotyping soybean plants transformed with rd29A:AtDREB1A for drought tolerance in the greenhouse and field. *Transgenic Res.* 23, 75-87.
 59. Kuromori, T., Sugimoto, E. and Shinozaki, K. (2014) Inter-tissue signal transfer of abscisic acid from vascular cells to guard cells. *Plant Physiol.*,
 60. Nakabayashi, R., Yonekura-Sakakibara, K., Urano, K., Suzuki, M., Yamada, Y., Nishizawa, T., Matsuda, F., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K., Michael, A. J., Tohge, T., Yamazaki, M. and Saito, K. (2014) Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant J.*, 77, 367-379.
 61. Marcolino-Gomes, J., Rodrigues, F.A., Fuganti-Pagliarini, R., Bendix, C., Nakayama, T. J., Celaya, B., Molinari, H. B. C., De Oliveira, M. C. N., Harmon, F. G. , Nepomuceno, A. L.(2014) A. Diurnal Oscillations of Soybean Circadian Clock and Drought Responsive Genes. *PLoS One*, 9, 1-13.
 62. Nakayama, T. J., Rodrigues, F. A., Neumaier, N., Marcelino-Guimaraes, F. C., Farias, J. R. B., Oliveira, M. C. N., Borem, A., Oliveira, A. C. B., Emygdio, B., Nepomuceno, A.L. (2014) Reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in soybean plants under hypoxic conditions. *Genet. Mol. Res.* 13, 860-871.
 63. Oliveira,A.B., Brito Junior,S.L., Marcelino-Guimaraes, F.C., Polizel, A., Nepomuceno, A. L.,

Stolf-Moreira, R., Binneck, E., Abdelnoor, R. (2014) Análise da expressão de genes relacionados a estresses em soja em resposta ao fungo *Phakopsora pachyrhizi*. *Tropical Plant Pathol. in press.*

64. Cabreira, C., Cagliari, A., Bucker-Neto, L., Wiebke-Strohm, B., Freitas, L. B., Marcelino-Guimarães, F. C., Nepomuceno, A. L., Margis-Pinheiro, M. M. A. N., Bodanese-Zanettini, M. (2013) The Lesion Simulating Disease (LSD) gene family as a variable in soybean response to *Phakopsora pachyrhizi* infection and dehydration. *Funct. Integrative Genomics. in press.*

(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: 中島 一雄 (国際農林水産業研究センター・プロジェクトリーダー)
- 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 (理化学研究所環境資源科学研究センター・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大豆研究所・主任研究員)

日本側代表者: 中島 一雄 (国際農林水産業研究センター・プロジェクトリーダー)

2011年9月から2012年10月まで、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大豆研究所・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大豆研究所・主任研究員)がサブリーダーとして、プロジェクトを進行した。

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。

2012年11月から、2013年9月15日まで Ricardo Vilela Abdelnoor が代行リーダーとなった。Alexandre Nepomuceno は2013年9月16日に大豆研に戻り、ブラジル側プロジェクトリーダーに復帰した。

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