

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 21 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。本年度は、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、ダイズの有用遺伝子解析のための基礎データを得た。また、ダイズのゲノムプロジェクトに寄与するとともに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い、今後のプロジェクト進展のための基礎データを得た。今後はこれらの成果を基盤として有用遺伝子や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。

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ズ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

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解析する。また、シロイヌナズナやイネで解析してきた環境ストレスに対する耐性獲得に関与する転写因子や機能遺伝子などの機能相同遺伝子をダイズのゲノム情報をもとに探索し、それらのストレス応答性をアレイ解析により得られた発現データなどにより明らかにする。

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、本年度は、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た。このアレイ解析により、ダイズの環境ストレス応答性遺伝子群の発現データを網羅的に得ることに成功した。低温ストレス処理2時間により発現が上昇した遺伝子は56個、低温ストレ

ス処理 24 時間により発現が上昇した遺伝子は 513 個、乾燥ストレス処理 2 時間により発現が上昇した遺伝子は 874 個、乾燥ストレス処理 24 時間により発現が上昇した遺伝子は 2384 個、高塩ストレス処理 2 時間により発現が上昇した遺伝子は 165 個、高塩ストレス処理 24 時間により発現が上昇した遺伝子は 20 個見出された。

当初の計画で対象としていたダイズにおける AP2/ERF タイプの転写因子 DREB や bZIP タイプの転写因子 AREB の探索にも着手した。シロイヌナズナ DREB1 と DREB2 の過剰発現体は乾燥や高温ストレス耐性が向上することが示されているが、最初に、これらの過剰発現体を用いて、メタボローム解析やマクロアレイ解析を行い、変化する代謝産物や遺伝子発現を網羅的に解析して、ダイズの DREB 遺伝子の解析のための基礎データを得た (Maruyama et al. Plant Physiology 2009 等)。ABA による遺伝子発現制御で機能する転写因子である AREB に関しては三重変異体を作製して、標的遺伝子の同定を行った (Yoshida et al. Plant J. 2010 等)。一方、ダイズの遺伝子に関しては、ダイズゲノム情報からの探索の結果、ダイズの AP2/ERF タイプの転写因子 DREB が 108 個見出された。それらのうち、ストレス耐性獲得に重要とされる DREB1 タイプは 14 個、DREB2 タイプは 20 個であった。ダイズの bZIP タイプの転写因子 AREB は 26 個見出され、シロイヌナズナのストレス耐性獲得に重要とされる AREB1/AREB2/ABF3 タイプは 4 個であった。これら見出されたダイズの転写因子 DREB、AREB のストレス応答性に関してオリゴアレイを用いた解析データを用いて調べた結果、DREB1 タイプの遺伝子 14 個中 9 個、DREB2 タイプの遺伝子 20 個中 4 個、AREB1/AREB2/ABF3 タイプの遺伝子 4 個中 1 個において環境ストレス応答性が示された。これらストレス応答性を示すダイズの転写因子 DREB と AREB は、ダイズのストレス耐性を高める有用遺伝子の候補遺伝子として有望である。

④ カウンターパートへの技術移転の状況

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。

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。また、ダイズのゲノム情報を有効に活用するために、ダイズゲノム上の遺伝子領域を予測・決定し、機能注釈をつける。研究チームが整備してきたダイズの完全長 cDNA コレクションの情報を最大限に活用する。

③ 当初の計画（全体計画）に対する現在の進捗状況

シロイヌナズナを用いたストレス応答性遺伝子の機能解析について、本年は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）。この解析によって、環境ストレス耐性に関連があると推測される新規の代謝経路および代謝関連遺伝子の同定に成功した。また、タンパク質リン酸化酵素および脱リン酸化酵素の機能解析を進め、ABA の主要な細胞内情報伝達経路を明らかにした（Umezawa et al. PNAS 2009）。この情報伝達経路はダイズにおいても保存されていると考えられ、環境ストレス耐性を制御するための有望なターゲットである。また、米国のダイズゲノムプロジェクトに協力して、ダイズ完全長 cDNA の情報をもとにしたダイズゲノムの遺伝子マッピングおよび機能注釈の作業を行い、約 46000 の遺伝子を検出した（Schmutz et al. Nature 2010）。今後、この成果によるダイズ、ミヤコグサ、タルウマゴヤシのゲノム情報を利用して環境ストレス応答制御遺伝子群を探索していく。

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う。

③ 当初の計画（全体計画）に対する現在の進捗状況

本年度は、シロイヌナズナのヒスチジンキナーゼのうち、浸透圧ストレス応答を正に制御することが示されている *AHK1* と負に制御することが示されている *AHK2* および *AHK3* について (Tran et al. PNAS, 2007)、ダイズにおける相同性遺伝子を探索した。その結果、*AHK1* には4つ、*AHK2* および *AHK3* にはそれぞれ2つずつのオルソログが見いだされた。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の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ブに含まれていた4遺伝子の中で、*AHK3* のオルソログの1つについて乾燥ストレスに対する誘導性が見られた。今後、マイクロアレイのプローブに含まれていなかったものを含めた候補遺伝子の環境ストレスに対する応答性を定量的 RT-PCR 法などを用いて解析していく。また、これらの遺伝子の活性を酵母の相補実験を用いて解析する。

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. 成果発表等

(1) 原著論文：国内0件、国際 11件

1. Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and Jackson, S.A. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean, *Nature* 463, 178–83.
 9. Mochida, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. and Tran, L.S. (2010) LegumeTFDB: An integrative database of Glycine max, Lotus japonicus and Medicago truncatula transcription factors. *Bioinformatics*, 26, 290–291.
 10. Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K. and 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. and Shinozaki, K. (2010) ABC transporter AtABCG25 is involved in

abscisic acid transport and responses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 2361-2366.

(2) 特許出願：なし

4. プロジェクト実施体制

(1) 「ストレス耐性」グループ

(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研究グループリーダー：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)

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

(環境ストレス応答制御遺伝子群の探索)

①研究グループリーダー： 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

(環境ストレス受容関連遺伝子群の探索)

①研究グループリーダー： 篠崎 和子 (東京大学農学生命科学研究科・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 (ストレス受容関連遺伝子) 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

(形質転換ダイズの作出と環境ストレス耐性評価)

①研究グループリーダー： 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)

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