

5 「植物リソースの利用者から」

シロイヌナズナ野生系統を用いて ストレス耐性の多様性を解明 ——耐性のことは耐性植物に聞け

太治 輝昭 *Teruaki Taji*

東京農業大学 生命科学部バイオサイエンス学科
教授

有賀 裕剛 *Hiroataka Aniga*

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
遺伝資源研究センター 研究員

「環境ストレスに耐性を示す植物は、なぜ耐性なのか？」という疑問に答えるため、理研BRCに収集されたシロイヌナズナ野生系統を用いて、浸透圧（水欠乏）耐性の多様性を決定するACQOS遺伝子を発見した。シロイヌナズナにおいてACQOSの有無が病害耐性と浸透圧耐性のトレードオフにより維持されてきたことがわかった。

1 はじめに

この写真は、スイスでの旅行中に見つけたシロイヌナズナ近縁の雑草である。場所は標高3,100m山頂。周りは永久氷河に囲まれ、寒くて年間を通じてほとんど雨が降らない環境にも関わらず、たくましく生きている。どうしてこのような劣悪環境でも生育できるのか？ もし、この劣悪環境でも耐え抜くメカニズムがわかれば、乾燥や寒さに対して耐性を示す作物の作出に役立つに違いない。この「環境ストレスに耐性を示す植物は、なぜ耐性なのか？」という疑問は、おそらく遙か昔から考えられてきたと思われる。遺伝子の本体がDNAであると発見されて70年。最近、ようやくこの疑問に対して遺伝子レベルで答える研究成果が出始めた。

分子生物学の分野では、普遍的な生命現象を明らかにすることを目的に広く使われる生物をモデ

ル生物という。植物の分子生物学研究ではシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) が研究材料として広く用いられるが、一般にシロイヌナズナといえばCol-0 (Columbia) という実験系統を指す。この30年間、シロイヌナズナ=Col-0を用いた研究により、植物のさまざまな表現型に関するメカニズムが遺伝子レベルで明らかになってきた。また、シロイヌナズナで明らかになった分子メカ



スイスで見つけたシロイヌナズナ近縁の雑草

ニズムは、他の植物にも当てはまることがわかって来た。その一方、自然界には高い環境ストレス耐性を示す植物が存在するが、その耐性メカニズムがシロイヌナズナの研究から明らかになってきたものと共通しているのか、それとも異なるのかについては依然として不明な点が多い。

2000年頃、シロイヌナズナ近縁の塩生植物、*Eutrema salsugineum* (以前は *Thellungiella halophila*, *Thellungiella salsuginea* と名づけられていた) が中国とカナダの沿岸付近で発見された。塩生植物とは、海水と同程度の塩濃度でも生活環を全うできる植物を指し、ヤエヤマヒルギ (マンダロウ) などがその代表例として知られる。ほとんどの植物種は塩に弱く、動物には必須のナトリウムイオン (Na^+) は植物にとって毒でしかない。大昔の地球は全面海に覆われていたため、土壌の下には塩が多分に存在する。内陸の農業は水を定期的に散布する灌漑農業が主流だが、散布した水は地中の塩を溶かし、その塩水が乾燥に伴い地表に上昇する。水は地表から蒸発するが塩は地表に残るため、これを繰り返す灌漑農業では塩が地表に蓄積する。時に干ばつなど激しい乾燥に曝されると、一気に塩が地表を覆い、植物が生存できない砂漠と化す。このことから、塩害は砂漠化の主要原因となっており、農作物の減収を引き起こす大きな問題となっている。*E. salsugineum* が見出された当時、この植物を用いれば「耐性植物は、なぜ耐性なのか？」という疑問に答えられるのではと期待が高まった。私達のグループだけでも、**完全長 cDNA**^{*} ライブラリーの作成と全長シーケンスの決定 (理研バイオリソースセンター_実験植物開発室との共同事業)、**マイクロアレイ解析**^{*} や完全長 cDNA を用いた **FOX hunting**^{*} による有用遺伝子の単離をおこなってきた^{1)~6)}。しかしながら *E. salsugineum* の野生系統間には耐塩性に大きな差がなく (いずれの系統も耐塩性が極めて高い)、耐性を示す植物と示さない植物の違いを決定する遺伝子やそのメカニズムを明らかにする材料としては不向きであった。

そのような折、2001年に理研バイオリソースセンター (以降、理研BRC) が設立。2003年ごろ、実験植物開発室にシロイヌナズナの野生系統 (エコタイプ, accession) が寄託され、このシロイヌナズナ野生系統を扱う機会を得た。

2 シロイヌナズナ野生系統の耐塩性

シロイヌナズナは日本にも自生種が数種類あるように、世界中のさまざまな地域に生息し、現在までに2000系統以上収集されている。これらはさまざまな環境条件に適応した結果、同じ種でありながらそれぞれ地理的にも遺伝的にも分化したと考えられる。当時も二つの野生系統間に見られる表現型の違い (たとえば開花時期や種子サイズな

用語解説 Glossary

【完全長 cDNA】

ゲノムから転写される mRNA を鋳型として逆転写酵素により作成される DNA (Complementary DNA; cDNA) のうち、機能しうるタンパク質を翻訳するための完全な長さを持つ cDNA を完全長 cDNA とよぶ。遺伝子の機能を調べるために用いられ、転写開始点を決定するために用いられる。

【マイクロアレイ解析】

ゲノムに存在する大多数もしくは全遺伝子を対象とした網羅的な遺伝子発現を解析する手法の一つ。スライドガラス上に遺伝子特異的な 25~50塩基のオリゴDNA を貼り付け、そこに蛍光で標識した RNA サンプルをハイブリダイゼーションし、強光シグナル強度を測定することで遺伝子発現量を数値化する。

【FOX hunting】

Full-length cDNA overexpressing (FOX) hunting の略。完全長 cDNA がタンパク質を翻訳する全長を持つことを利用し、この完全長 cDNA を過剰発現ベクターへ移し替え、これらをバルク (たとえば100遺伝子分をまとめて)、あるいは個別に生物に導入し、たとえばストレス耐性が向上するといった目的表現型を示す個体を選抜 (hunting) する。

【QTL 解析】

QTL とは、quantitative trait loci の略で、量的形質 (さまざまな表現型、たとえばストレス耐性や種子の数など) を支配する遺伝子が座乗する染色体上の場所 (領域) を指す。QTL 解析とは、目的の量的形質と染色体上の場所が明らかになっているマーカーとの相関 (連鎖) を調べる、またその QTL の効果の大きさを推定する解析を指す。

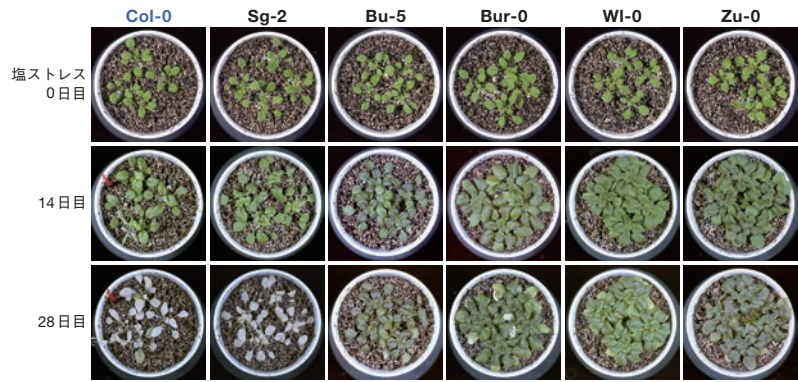
ど)に関するQTL解析*が報告されていたものの、ある程度の母集団で共通する多様性や、その背景でどのような遺伝子が働いているのかに関しては不明であった。

そこではじめに、理研BRC_実験植物開発室に寄託された350系統の耐塩性を評価した。その結果、シロイヌナズナ野生系統間には耐塩性に大きな多様性が観察されること、驚くべき

ことに海水と同程度の塩濃度でも耐性を示す野生系統が存在することを明らかにした(図1)。その後の解析から耐塩性系統は、生育に影響を与えない程度の塩ストレスを一定期間経ることで、海水程度の浸透圧ストレス(水が吸えない水分ストレス)にも耐性を示す、「塩馴化後浸透圧耐性」に優れていることが明らかとなった⁷⁾。この塩馴化後浸透圧耐性は実験系統Col-0では認められないことから、従来の画一的な実験材料=Col-0では明らかにできないメカニズムの解明に繋がると予想された。

3 シロイヌナズナ野生系統を用いた集団遺伝学的解析

近年のシークエンス技術の発展は目覚ましく、シロイヌナズナを取り巻く研究環境も大きく変わってきた。2007年にシロイヌナズナ野生系統間における25万カ所の一塩基多型(SNP)データが公開され、2010年、200系統のシロイヌナズナを用いて、107項目の表現型に関するゲノムワイド関連解析(GWAS)*が実施された⁸⁾⁹⁾。GWAS解析は、多様性を制御する遺伝子特定の強力なツールとなっており、特にヒトの表現型(たとえば身長など)に関わる遺伝子座の同定で大きな成果をあげている¹⁰⁾。さらにシロイヌナズナ1001



【図1】 シロイヌナズナ野生系統に見られる耐塩性の多様性

[文献7)より改変]

ゲノムプロジェクトとよばれるコンソーシアムが組成され、2016年、シロイヌナズナの1135系統について全ゲノム情報が公開された¹¹⁾。これにより、シロイヌナズナにおいてもGWASをはじめとする集団遺伝学的解析が可能となった。

塩馴化後浸透圧耐性の多様性に寄与する遺伝子座の特定を目的に、200系統のシロイヌナズナについて耐性評価を実施し、そのデータをGWAS解析に供した。その結果、第5染色体下腕の1遺伝子座が塩馴化後浸透圧耐性の多様性を制御していることがわかった。この遺伝子座を浸透圧馴化耐性の英語、*ACquired OSmotolerance*より、*ACQOS* 遺伝子座と命名した[図2(a)]。GWASは偽陽性も検出しうるため、最終的な遺伝子同定までには、準同質遺伝子系統(NIL)の作成や相補試験による確認が必要となる。詳細は割愛するが、塩馴化後浸透圧耐性を示す系統であるBu-5と、Col-0の交配によりNILを作出し、その耐性と遺伝子型の解析より、極めて狭い遺伝子領域にまで*ACQOS* 遺伝

用語解説 Glossary

【GWAS 解析】

GWASとは、Genome wide association studyの略で、ゲノム上に存在する(一般に)数十万箇所の一塩基多型(SNP)と目的の量的形質との相関(連鎖)を調べることににより、その量的形質を支配する遺伝子が座乗する染色体上の位置を調べる解析。

子座を絞り込むことに成功した。絞り込んだ遺伝子領域の全多型を検出するためにBu-5由来のBACライブラリー(ゲノムDNAを100 kbpほどの大きさに分割し、クローニングしたプラスミドDNAの集合体)を構築し、ACQOS 遺伝子座を含むBACクローンのシーケンスを実施した。その結果、Col-0は植物の免疫受容体として働くNB-LRRを4遺

伝並んだ形で持つのに対して、Bu-5では1遺伝子のみ持っている箇所を発見した。これらの遺伝子について解析した結果、Col-0が持つ一つのNB-LRRが浸透圧耐性を著しく抑制することがわかった。浸透圧耐性を抑制する遺伝子であるため、Col-0にてこのNB-LRRを欠損させた変異株は著しい浸透圧耐性を獲得した[図2(b)]。すなわちシロイヌナズナ間の浸透圧耐性の多様性を決めるACQOS 遺伝子の本体はこのNB-LRRであることが証明された。

ACQOS 遺伝子は浸透圧応答に関わる遺伝子ではなく、免疫受容体のNB-LRRをコードする遺伝子である。NB-LRRは病原菌が放出するエフェクター(植物の免疫応答を阻害する因子)やエフェクターにより変性したタンパク質を認識し、植物免疫応答の中心であるEDS1/PAD4と協調して免疫応答を誘導する(図3)。私達が用いる試験系は無菌環境であり、ACQOSを持たないシロイヌナズナは浸透圧ストレス下で免疫応答を誘導しない。しかしながらACQOSを持つシロイヌナズナは、浸透圧ストレス下においてサリチル酸(植物の病害応答に重要なホルモン)を蓄積し、病害応答遺伝子群の遺伝子発現を誘導することが明らかとなった。ACQOSを持つシロイヌナズナにおいてEDS1/PAD4のどちらか一方を欠損させて免疫応答を止めると、ACQOSを持たないシロイヌナズナ同様

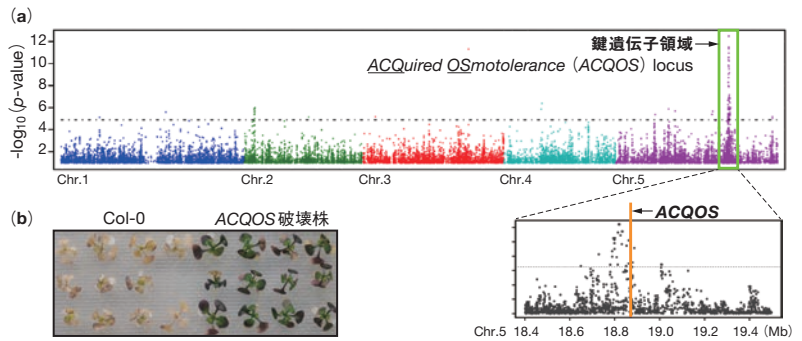


図2 塩馴化後浸透圧耐性のGWAS解析

(a) GWAS解析とACQOS 遺伝子座
(b) Col-0のACQOS破壊株は浸透圧(水欠乏) 耐性を示す

[文献12]より改変]

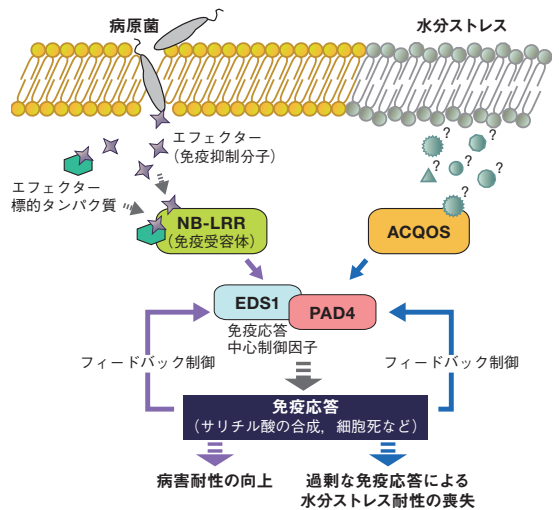


図3 ACQOS 遺伝子の役割とモデル図

に浸透圧耐性を示したことから、ACQOSは病原菌ではなく浸透圧により免疫応答を誘導し、過剰に免疫応答が亢進した結果、浸透圧耐性が損なわれることがわかってきた(図3)。

最後にACQOSを持つ利点があるのか調べるため、ACQOSの病害耐性への寄与について調べた。その結果、ACQOSを持つシロイヌナズナは、ACQOSを持たないシロイヌナズナと比較して病原細菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strain DC3000)に耐性を示すことがわかった。

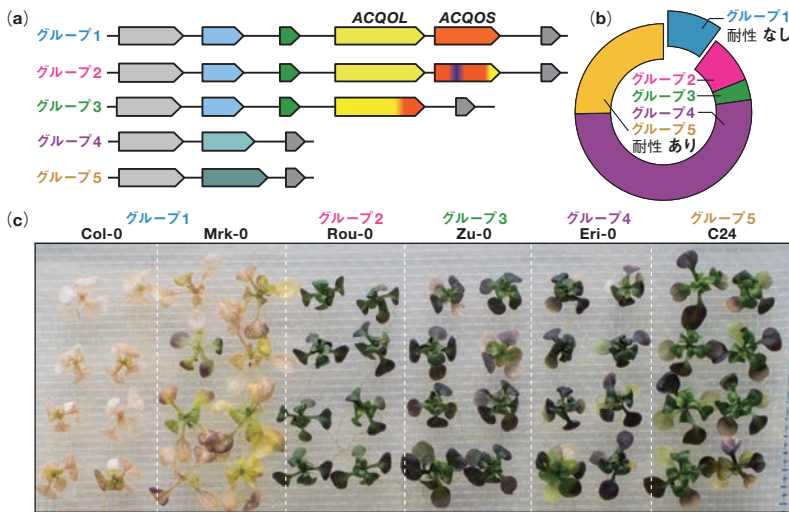


図4 ACQOS遺伝子座の多様性

[文献12]より改変]

4 ACQOS遺伝子座の多様性と進化について

ACQOS遺伝子座の多様性と進化を探るため、79のシロイヌナズナ野生系統についてACQOS遺伝子座をシークエンスしたところ、5種類のグループに分けられた(図4)。Col-0はACQOS遺伝子に隣接してACQOSと非常によく似たACQOS like (ACQOL) 遺伝子を持つ。5グループの内訳は、ACQOSとACQOLの両方を持っていない遺伝子型(グループ4, 5)が最も多く(72%)、ACQOS遺伝子を持つ遺伝子型(グループ1)は10%と少数派で、その他はACQOS遺伝子を持つものの塩基置換が複数箇所に認められる遺伝子型(グループ2)、あるいはACQOL遺伝子のみ持つ遺伝子型(グループ3)だった。ACQOS遺伝子を持つ、グループ1と2についてACQOS遺伝子周辺の塩基多様性を調べると、ACQOS遺伝子内の塩基多様性はゲノムの平均的な塩基多様性と比較して著しく高く、ACQOS遺伝子に選択圧がかかっていることが示唆された。実際に、グループ2のACQOS遺伝子は、機能不全(変異型)になっていた。これらの結果は、グループ1のシロイヌナズナ系統

においてACQOS遺伝子が誕生した後、グループ2, 3の系統のようにACQOS遺伝子内に点変異や欠失が生じたことで浸透圧耐性を改めて獲得した進化の存在を示唆した。ヨーロッパにおけるシロイヌナズナの分布をグループごとに調べると、グループ1が非常に近接した地域のみで生息する一方、ACQOS遺伝子に変異が生じたグループ2やACQOS遺伝子が欠失したグループ3はヨーロッパの広範囲に分布する(図5)。ACQOS

遺伝子は何らかの病害に対して有利に働く一方、浸透圧耐性に対しては不利である。グループ2, 3の系統はACQOS遺伝子の変異や欠失により浸透圧耐性を再獲得した結果、生息地域を広げたのかもしれない。

以上より、シロイヌナズナにおいてACQOSの有無が病害耐性と浸透圧耐性のトレードオフによ

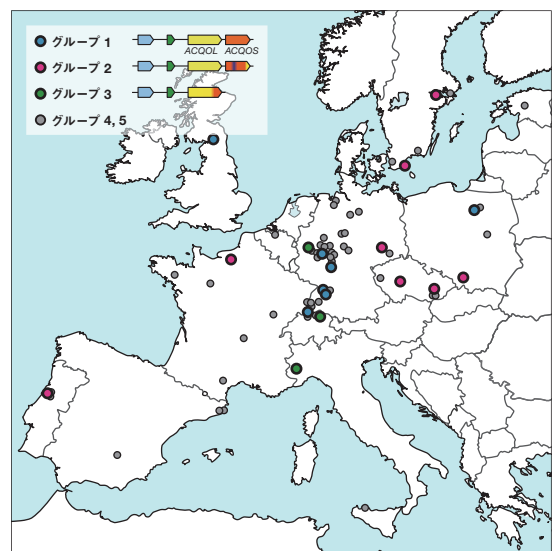


図5 ACQOS遺伝子座のグループごとにおけるヨーロッパ分布

り維持されてきたこと、すなわち、生息する環境の違いにより、*ACQOS* 遺伝子が選択圧を受けてきたことが示唆された¹²⁾。

さて、シロイヌナズナ以外の植物種でも *ACQOS* 遺伝子の有無が浸透圧耐性の多様性に関わっているのだろうか。理研BRC_実験植物開発室ではシロイヌナズナ近縁の植物種についても種子の提供をおこなっている。そこで、シロイヌナズナ近縁の *Capsella rubella*, *Cardamine hirsuta*, *Arabis alpina* について、浸透圧耐性と *ACQOS* 遺伝子のホモログを調べたところ、いずれも塩馴化後浸透圧耐性を示し、かつ系統樹上、*ACQOS* や *ACQOL* と同じ節に属するホモログは認められなかった (図6)。用いた植物種にも野生系統は複数あるため、一つの野生系統から推察できないものの、*ACQOS* 遺伝子はシロイヌナズナで見られるユニークな遺伝子かもしれない。

5 今後の展開

ACQOS 遺伝子は持てば病害耐性を獲得し、欠損させれば著しい浸透圧耐性を獲得する。今回示した私達の研究結果では、*ACQOS* 遺伝子を持つシロイヌナズナ近縁種は見つからなかった。しかしNB-LRRは植物のゲノム中に多数(シロイヌナズナ:150 遺伝子, イネ:600 遺伝子)存在することから、他の植物種には *ACQOS* 遺伝子と同様に浸透圧耐性を抑制するNB-LRRがあるかもしれない。そのような植物においては、水田や植物工場のような乾燥にさらされない環境では *ACQOS* 遺伝子を持たせることで病害耐性を向上させ、逆に乾燥が頻繁に起こる圃場では、*ACQOS* をなくすことで著しい浸透圧耐性を向上させることが期待される。

この研究を通じて *ACQOS* が浸透圧耐性を抑制するという、塩馴化後浸透圧耐性を示さないシロイヌ

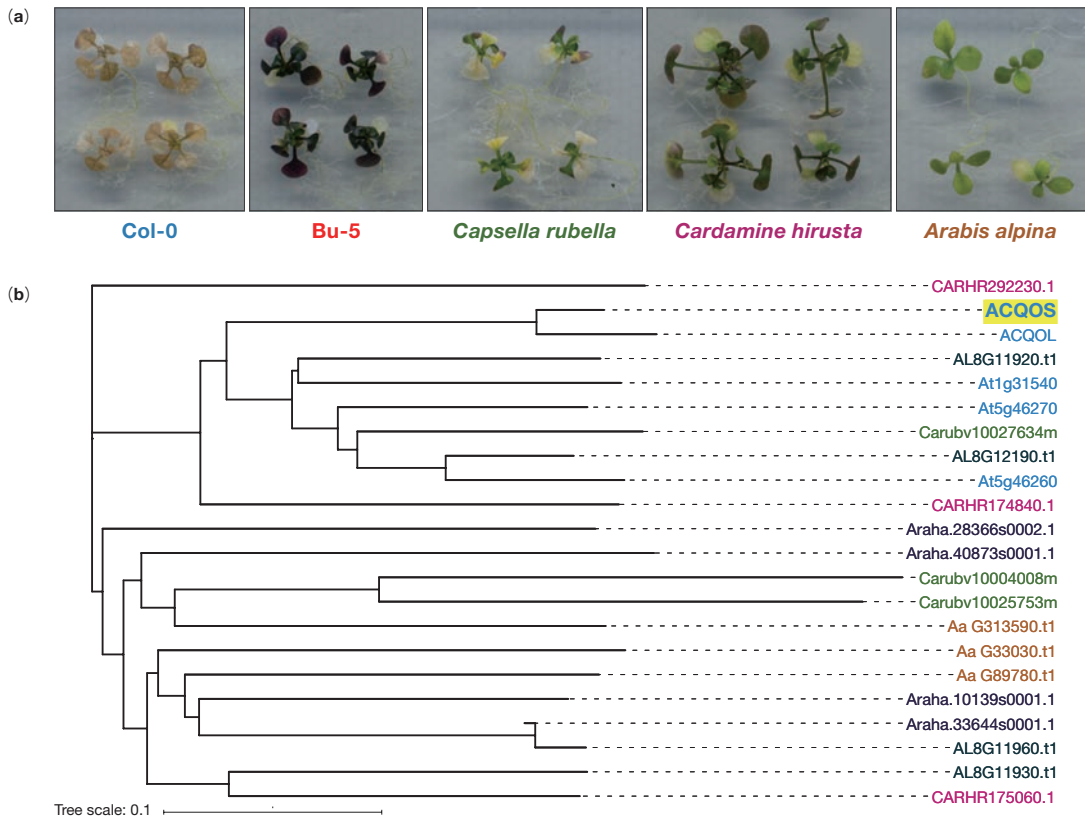


図6 シロイヌナズナ近縁植物の塩馴化後浸透圧耐性と *ACQOS* 遺伝子ホモログ系統樹

ナズナ野生系統の原因が明らかとなったものの、浸透圧耐性を示す野生系統の耐性メカニズムは未だ不明である。この謎を解くために、私達のグループでは、塩馴化後浸透圧耐性を示すBu-5の種子に突然変異処理をおこない、耐性欠損変異株を取得した。いくつかの変異株については原因遺伝子も明らかとなり、その耐性メカニズムが明らかになりつつある。

このようにシロイヌナズナ野生系統は多様性メカニズム解明の強力な材料となっている。ここで紹介した塩馴化後浸透圧耐性のように、広くシロイヌナズナとして用いられているCol-0だけを扱っては見えてこない、新しい分野を切り開くこともあり、興味は尽きない。

6 これからの理研BRCに期待すること

理研BRC_実験植物開発室からは、シロイヌナズナ野生系統の種子、野生系統同士を交雑したF2種子、完全長cDNAといった材料のほか、形質転換などの技術講習でも強力に支援いただいていた。この場をお借りして感謝申し上げる。基礎研究を推進する上で、バイオリソースセンターの担う役割は極めて大きい。今後も継続してこれらの材料提供をお願いしたい。また、ゲノムシーケンスが身近になったからこそ、突然変異株の単離・遺伝子同定・機能解析がますます有効な手段となってきた。野生系統の突然変異処理種子など、オーダーメイド的な材料作成もニーズが高いように思う。このほか、研究者にさまざまな技術の登録をしていただき、研究者と研究者をつなぐ、人的・技術的リソースの展開も期待したい。

[文献]

- 1) Higashi, Y. *et al.* HsfA1d, a Protein Identified via FOX Hunting Using *Thellungiella salsuginea* cDNAs Improves Heat Tolerance by Regulating Heat-Stress-Responsive Gene Expression. *Molecular plant* **6**, 411-422 (2013).
- 2) Ariga, H. *et al.* CSP41b, a protein identified via FOX hunting using *Eutrema salsugineum* cDNAs, improves

heat and salinity stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and biophysical research communications* 1-6 (2015) doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.151.

- 3) Wu, H.-J. *et al.* Insights into salt tolerance from the genome of *Thellungiella salsuginea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 12219-12224 (2012).
- 4) Taji, T. *et al.* Comparative genomic analysis of 1047 completely sequenced cDNAs from an *Arabidopsis*-related model halophyte, *Thellungiella halophila*. *BMC plant biology* **10**, 261 (2010).
- 5) Taji, T. *et al.* Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and a *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant physiology* **135**, 1697-1709 (2004).
- 6) Taji, T. *et al.* Large-scale collection and annotation of full-length enriched cDNAs from a model halophyte, *Thellungiella halophila*. *BMC plant biology* **8**, 115 (2008).
- 7) Katori, T. *et al.* Dissecting the genetic control of natural variation in salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions. *Journal of experimental botany* **61**, 1125-1138 (2010).
- 8) Atwell, S. *et al.* Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* **465**, 627-631 (2010).
- 9) Kim, S. *et al.* Recombination and linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **39**, 1151-1155 (2007).
- 10) Yengo, L. *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~700000 individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet* **27**, 3641-3649 (2018).
- 11) Consortium, T. 1001 G. 1,135 Genomes Reveal the Global Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **166**, 481-491 (2016).
- 12) Ariga, H. *et al.* NLR locus-mediated trade-off between abiotic and biotic stress adaptation in *Arabidopsis*. *Nature Plants* 1-8 (2017) doi:10.1038/nplants.2017.72.



太治 輝昭 Teruaki Taji

東京農業大学 生命科学部 バイオサイエンス学科 教授

博士(理学, 筑波大学)。理化学研究所基礎科学特別研究員を経て現職。Plant and Cell Physiology 編集委員。Frontiers in Plant Science 編集委員。専門分野は、植物分子遺伝学。



有賀 裕剛 Hiroataka Ariga

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 遺伝資源研究センター 研究員

2014~2016年, 日本学術振興会 特別研究員(DC2)。2016年, 東京農業大学大学院農学研究所 博士課程修了, 博士(バイオサイエンス)。農業・食品産業技術総合研究機構でのポストドク, 日本学術振興会 特別研究員(PD)を経て, 2020年より現職。専門分野は、遺伝育種科学。