

氏名(本国籍)	一家崇志(福井県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第497号
学位授与年月日	平成20年9月10日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	シロイヌナズナナチュラルバリエーションを用いた アルミニウム及び低pH耐性機構に関する研究
審査委員会	主査 岐阜大学 教授 小山博之 副査 岐阜大学 教授 百町満朗 副査 静岡大学 教授 森田明雄 副査 信州大学 教授 伴野 潔

### 論文の内容の要旨

アルミニウム (Al) 耐性及び低 pH 耐性を分子レベルで理解することは、酸性土壌耐性を対象とする分子改良に大きく貢献する。しかしながら、その両ストレスにおける阻害プロセスの分子機構には未解明な点が多く、複合的に存在するストレス因子の把握と個々の要因に対する耐性遺伝子の単離が必要である。モデル植物であるシロイヌナズナには、遺伝的背景の異なる多数のアクセッション(野性株)が存在する。シロイヌナズナの酸性土壌障害に対するナチュラルバリエーションを調査することは、シロイヌナズナを用いた各種生理試験に応用することで、各イオンストレス耐性に関わる分子生物学的機構を解明するための基礎となると考えられる。

#### 1) シロイヌナズナの Al 及び低 pH 耐性に関する QTL 解析

QTL 解析では野生株や品種の遺伝子型と形質値を比較することから、それらの形質値差を規定している遺伝子座を特定することができる。そこで、2つのシロイヌナズナ Col×Kas 及び Ler0×Col-4 RILs (Recombinant Inbred Lines) を用いて、ゲノム科学に対応する遺伝学的アプローチである QTL (Quantitative trait locus) 解析を行い、Al 及び低 pH 耐性に関する QTL の推定を試みた。その結果、Col/Kas RILs で検出された Al 耐性 QTL は、シロイヌナズナの Al 耐性に大きく貢献するリンゴ酸放出を担う *AtALMT1* 遺伝子の QTL 領域には検出されず、Col/Kas RILs の Al 耐性差はリンゴ酸放出に依存しない Al 耐性機構により制御されていることがわかった。一方、Col/Kas 及び Ler/Col RILs を用いた低 pH 耐性に関する QTL 解析の結果、それぞれ2つの単因子 QTL 並びに5組または6組のエピスタシスが検出された。これら2つの RILs 間で検出された低 pH 耐性 QTL が共通しなかったことから、低 pH 耐性を支配する遺伝要因は複数存在することが考えられた。さらに、主要な Al 及び低 pH 耐性 QTL がそ

れぞれ異なる染色体上に検出されたことから、少なくともこれら3つのRI集団においては、Al及び低pH耐性が異なる主導遺伝子により制御されていることが示唆された。

### 2) QTLピラミッティングによるAl及び低pH耐性機構の検証

Al及び低pHで検出されたQTLが遺伝的にそのストレスに特異的であるかを調査するため、ナトリウム(Na)、カドミウム(Cd)及び銅(Cu)耐性QTL解析の結果を用いて、QTLピラミッティングを行った。同じ染色体位置に検出されたQTLは、生理的に共通する形質に関与するものであれば、同一である可能性が高い。また、その場合はその共通する生理的現象に関連する候補遺伝子を推定することも可能である。その結果、低pHで第2染色体上に検出されたQTL(QTL2)はNaとCdで、Alで第5染色体上に検出されたQTL(QTL5)はCdとCuで検出されたQTL位置と重複していた。QTL2に関しては、カルシウム(Ca)チャネル阻害剤として知られているランタン(La)、Verapamil及びガドリニウム(Gd)耐性に関するQTL解析の結果、QTL2に共通したQTLが検出されたことから、QTL2の原因遺伝子はCaに関連するものであることが示唆された。一方、QTL5はSODやAPXなどの、abioticストレス耐性に共通する活性酸素消去系の遺伝子に制御されていることが考えられた。このことは、Ler/Col RILsにおける根端の活性酸素集積量を調べた結果、QTL5をCd耐性型にもつCd耐性ラインの活性酸素集積量はCd感受性ラインよりも少なかったことから裏付けられた。

### 3) シロイヌナズナアクセッションを用いたAl及び低pH耐性機構の解明

260シロイヌナズナアクセッションを用いて、Al及び低pHストレスに対する種内の耐性差を水耕栽培による表現型解析法により調べたところ、各耐性を支配する遺伝的要因は多様であることがわかった。しかしながら、両形質間の相関を調べたところ、両ストレス間に単純な遺伝的関連性は存在しなかった。一方、階層的クラスタ解析を従来のストレス生理学では分別が困難であったAlと低pHストレスに適用したところ、明確に特異的応答を示すアクセッション群の抽出に成功し、Alと低pHストレスを生理学的に分別することに成功した。また、低pH耐性に特異的応答を示すアクセッションを用いた酸性土壌での生育試験の結果、低pH耐性が酸性土壌における作物生産性を改善するための重要な育種ターゲットであることを証明した。さらに、酸性土壌での生死を決める鍵遺伝子である*STOP1*のナチュラルバリエーションに及ぼす影響を調査した。その結果、アクセッション間において*STOP1*転写レベルには有意な差は認められなかったが、アミノ酸レベルでの多型が存在した。この多型はAl及び低pH耐性アクセッションで多く見られたことから、このハプロタイプが耐性差を生んでいる可能性が示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

酸性土壌はアフリカ最貧国やバイオマス資源の生産国である、ブラジル・東南アジアを含む、熱帯・亜熱帯諸国に広く分布する不良土壌である。この土壌での耐性を強化した作物を育種することは、食糧・バイオマス資源の持続的な生産に大きく貢献すると考えられる。申請者は、QTL解析をはじめとするいわゆるバリエーション研究を展開して、分子育種に必要な酸性土壌ストレス耐性の分子機構の一端を明らかにした。その概要は以下の3点にまとめられる。

### 1) シロイヌナズナの Al 及び低 pH 耐性に関する QTL 解析

酸性土壌では、アルミニウム (Al) 過剰が最も主要なストレス因子とされているが、水素イオン過剰 (つまり、低 pH 自体) でも生産性は著しく低下する。しかし、両者が区別できるストレスであることを示した研究は少なく、その相互関係も吟味されていなかった。申請者は複数の RI ラインを用いて両ストレスの比較 QTL 解析を行い、両者の関係を遺伝学的に調べた。その結果、Al 耐性と低 pH 耐性の遺伝学的構造は異なり、Al 耐性に関しては、従来報告された ALMT1 を含む QTL1 遺伝子座以外に染色体 5 番上部 (QTL5) が関与し、低 pH 耐性に関しては、染色体 2 番 (QTL2) の中央部が関与することを明らかにした。

### 2) QTL ピラミディングによる QTL5 と QTL2 の解析

遺伝子と表現型の関係は 1 対 1 対応ではなく、ある遺伝子が複数の形質と関与することがあるが、これは多面発現と呼ばれる現象である。学位申請者は、これを利用して他のストレスで QTL 解析を行いピラミディングを行うことにより、QTL の原因遺伝子を推定した。Al 耐性に関与する QTL5 は、カドミウムや銅などのほかのイオンストレスと一致し、これは活性酸素の除去能力に依存するためと推定した。一方、QTL2 は希土類や既知のカルシウムチャネル阻害剤の耐性 QTL と一致することから、Ca 欠乏が関与する遺伝子座であると推定した。これらは、蛍光染色による ROS 集積や溶液科学から推定される Ca 排除理論から支持された。

### 3) シロイヌナズナアクセッションを用いた Al 及び低 pH 耐性機構の解明

個別の QTL 解析では、原理的に 2 種の対立遺伝子の違いを検出することしかできない。そこで、シロイヌナズナのアクセッション 260 系統を用いて表現型クラスター解析を実施して、Al 耐性と低 pH 耐性が区別できる形質であることを明確に示すことに成功した。これは、Al 耐性に貢献度が高い、ALMT1 遺伝子が低 pH 耐性に関与しないことから支持される。一方、酸感受性により特定された転写因子 STOP1 は、AtALMT1 の発現調節を介して Al 耐性も支配する。この表現型クラスターの分離と、STOP1 ハプロタイプの分離は一致し、両耐性は異なる遺伝子が同じシグナル伝達系で協調的に制御される形質であることを明らかにした。

以上の 3 点は、モデル植物で展開した実用形質に関する研究として、新規性・拡張性が高く評価できる。このことから、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

#### (基礎論文)

1) Ikka, T., Kobayashi, Y., Iuchi, S., Sakurai, N., Shibata, D., Kobayashi, M. and Koyama, H. (2007) Natural variation of *Arabidopsis thaliana* reveals that aluminum resistance and proton resistance are controlled by different genetic factors. *Theor. Appl. Genet.* 115, 709-719.

2) Ikka, T., Kobayashi, Y., Tazib, T. and Koyama, H. (2008) Aluminum tolerance QTL in Columbia/Kashmir inbred population of *Arabidopsis thaliana* is not associated with aluminum responsive malate excretion. *Plant Sci.* doi:10.1016/j.plantsci.2008.06.001

(関連論文)

- 1) Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, Kobayashi Y, Ikka T, Hirayama T, Shinozaki K, Kobayashi M. Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:9900-9905. 2007
- 2) Kobayashi Y, Ikka T, Kimura K, Yasuda O and Koyama H: Characterization of lanthanum toxicity for root growth of *Arabidopsis thaliana* from the aspect of natural genetic variation. *Func. Plant. Biol.* 34:984-994, 2007