

根圏ミネラルストレスに応答する植物地上部の
転写変動に関する研究

2016 年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物資源科学

(岐阜大学)

澤木克亘

根圏ミネラルストレスに応答する植物地上部の
転写変動に関する研究

澤木克亘

目次

序論	1 頁
第1章 モデル植物地上部を用いた栄養欠乏応答性の 遺伝子発現バイオマーカーの作成	5 頁
第2章 シロイヌナズナ地上部の根圏毒性イオン応答性の トランスクリプトームプロファイリング	43 頁
第3章 <i>Penicillium phinophilum</i> 接種によるイネおよび シロイヌナズナの病害抵抗性の評価	77 頁
総合考察	86 頁
結論	90 頁
謝辞	91 頁
引用文献	92 頁

省略記号

ABA : abscisic acid アブシジン酸

CTAB : Cetyltrimethyl ammonium bromide

DNA : deoxyribonucleic acid

ET : ethylene エチレン

FC : Fold change

GO : Gene Ontological

GTC : Guanidine Thiocyanate

GWAS : Genome Wide Association Study

JA : jasmonic acid ジャスモン酸

mRNA : messenger RNA

NCBI : National Center for Biotechnology Information

PCR : polymerase chain reaction

RNA : ribonucleic acid

RT-PCR : reverse transcription- polymerase chain reaction

qRT-PCR : quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

SA : salicylic acid サリチル酸

TAIR : The Arabidopsis Information Resource

TE : Tris EDTA

Tris : tris(hydroxymethyl) aminomethane

序論

植物は地球上に約 30 万種存在しているとされているが，そのなかでトウモロコシ (*Zea mays*) やイネ (*Oryza sativa*) ，コムギ (*Triticum aestivum*) をはじめとした穀物は食料源として人間社会の根幹を支える植物種である．植物は食料資源としてのみならず飼料や繊維，建築資材などの工業原材料として多岐に渡って利用されておる．それぞれの用途に適する形質を獲得するため紀元前より人為交配によって多様な植物種の品種改良を行ってきたが，交配による品種改良は目的形質を獲得するには複雑かつ時間がかかる手法である．逆遺伝学的解析や量的形質座位 (QTL) 解析，ゲノムワイド関連解析 (GWAS) などの分子生物学的手法の発達により様々な形質に関与する遺伝子および，その機能の特定が可能になり形質転換技術による目的形質の導入が容易になった．分子育種の研究は究極的には植物の遺伝子機能の変化による生理機構の強化であるといえる．植物の生理応答機構を解明し環境ストレス抵抗性を向上させた植物体を作成することで穀物収量の増産や有用物質の生産量増加に繋がると考えられ，実際に環境ストレス耐性を獲得した形質転換作物が作出されている (Bülowa et al., 1999; Taji et al., 2002)．

作物生産として作物の品種改良，農業の機械化，化学肥料や農薬の開発といった農業技術の革新により，過去 40 年から穀物生産量は緑の革命などを経て 7.4 倍となり大きく上昇した．1960 年代以降の穀物生産量の伸びは先進国よりも発展途上国において顕著であり 1961 年から 2000 年にかけて途上国の穀物生産は 3 倍となり，これは人口増加率 (2.3 倍) を上回っている．世界の穀物の耕作面積は約 16 億 ha，牧草地が 3.8 億 ha であるが，FAO によると凍土や内陸の河川，湖沼を除く内地面積は約 130 億 ha で，この約 15% の面積で 70 億人の食料を生産していることになる (Foley et al., 2011)．作物生産のうち 62% は人間の食料として，35% は家畜の食料として生産されている．1985 年から 2005 年の間に耕作地と牧草地は約 3% の 154 万 ha 拡大し穀物生産量は 47% 増加している．油化作物は生産面積を 43%，生産量を 57% 増加しているが飢餓は一向に減少していない．2013 年に世界人口は 70 億人を突破し 2050 年には約 90 億人になると推測され，今後の人口増加に伴って世

界的に食料需要が高まり、現在生産されている作物の 2 倍量が必要とされている (Alexandratos, 1999; Cassman, 1999; Federoff and Cohen, 1999; Godfray et al., 2010; Lutz and Samir 2010). また近年の農耕地の拡大のために草原の 70%, サバンナの 50%, 温帯落葉樹林の 45%, 熱帯雨林の 27%が開拓されており、これにより生物の生息地や多様性や土壌の状態に著しい悪影響を与え、さらに不適切な灌漑をはじめ、過耕起や過放牧の末、土壌が劣化し耕作放棄地となっている (Ramankutty et al., 2008). 事実、ISRIC (International Soil Reference and Information Center) の調査報告によれば最近 20 年間に人間活動で 20 億 ha の土壌が劣化したとされており、現在の農業は耕作地の 24%は灌漑を利用して農作物の 34%を生産しているが耕作可能土壌の劣化で作物の収量低下が課題となっている。自然要因が原因として土壌劣化を引き起こす場合もあり、土壌侵食 (風食 4.3 億 ha, 水食 4.7 億 ha), 酸性雨の影響も含めた土壌の酸性化や塩類化, 灌水, 土壌からの溶脱や有機物損失や, 気候および地理的要因による乾燥, 高低温, 毒性金属, 低温, 強光, 栄養欠乏などの非生物学的ストレスにより主要作物の生産や収量, 品質を阻害し, 作物生産の 50%が減少しているとされている (Hammond-Kosack and Jones, 2000; Wang et al., 2003). 加えて, 世界の耕作面積地の 70%は酸性土壌や石灰質土アルカリ土壌といった不良土壌と呼ばれる耕作には不向きな土壌の存在が問題となっている。このような土壌で農業を行うにあたり化学肥料の大量投入による環境高負担の農業が行われているが, 持続可能な環境低負荷型農業への転換が求められており, 農業生産コストの低下ならびに持続的農業のための適切な施肥は資源節約の観点から重要といえる。植物の個々のストレスの応答機構の理解から環境ストレスへの生理機構の全体像の解明は食料問題のみならず, 環境低負荷農業の推進に大きく貢献し, 作物生産量を高める農業において生物多様性の高い地域や地球環境の保全を考慮した持続的農業の方法が必要である。以上の事から今後の農業において土壌中の毒性イオンストレス耐性や栄養欠乏適応能力を備える作物の作出が求められている。

バイオインフォマティクスは分子生物学の発展につながる新しい手法であり, この技術革新に伴って生体の分子全体を網羅的に測定するオーミクス解析技術が目覚ましい発展を

遂げている。近年の急速な分析技術の発展とともに遺伝子の網羅的な mRNA の総体（トランスクリプトーム）や細胞内タンパク質総体（プロテオーム）、生体の代謝物質の総体（メタボローム）など様々な種類の網羅的分子情報の収集・解析が急速に進展してきた。分子生物学実験のハイスループット化によって多くの生物のゲノム解読が完了すると共に、大規模なオーミクス情報の解析環境が整備されつつある。各植物種のオーミクス情報を基にして重要な形質を他植物種へ形質転換で他の植物に組み換えることも可能となった。さらに、これらの大規模オーミクス情報を包括的に活用することで巨大かつ多様な生命現象のデータ解析を可能にする技術の開発およびそれらの情報データベースを統合し、総体的かつ複雑で動的な生命現象を理解、応用し、生命体の全貌を俯瞰することで表現型を決定する分子機構や重要因子の同定が進められている。植物は固着生物で移動できないため自然環境では様々なストレスに晒されており、進化の過程において遺伝子変異が起因となり耐性に関与する機能を有する遺伝子を獲得し適応してきた。モデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) が 2000 年に解読され、イネ、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*)、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) など様々な科の植物ゲノムが解読されている。それに伴いトランスクリプトームやメタボロームをはじめとした様々な環境ストレスや植物ホルモンによって変化するオーミクス情報の集積が始まっている。特にトランスクリプトームは DNA マイクロアレイ法が開発されたことで、遺伝子発現の変化を網羅的にとらえる手段ができ、特定の条件下にある植物の遺伝子の総体的な変動の観察、特定の代謝経路の変化と他の代謝経路の関連性、トランスクリプトームデータの蓄積による大規模かつ網羅的な解析法により発現制御機構の探索や共発現遺伝子ネットワーク解析、プロモーター解析が可能となった。現在、大量のデータの蓄積から情報基盤が整備されており Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) や Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) などのデータベースが構築されている。トランスクリプトームを用いたプロファイリングは植物の様々なストレスに応答する遺伝子を特定することに貢献している。非生物学的ストレスでは乾燥、浸透圧、低温 (Kreps et al., 2002)、高温 (Swindell et al., 2007)、塩 (Chao et al., 2005)、強光 (Rossel et al., 2002)、紫外線

(Brown et al., 2005), 金属 (Herbette et al., 2006; Kumari et al., 2008), 栄養欠乏 (Krapp et al., 2011), 冠水 (Loreti et al., 2005) など多岐に渡って解析されており, それぞれのストレスに応答する遺伝子が特定されている. 生物学的ストレスでは, ウイルス (Postnikova and Nemchinov, 2012), バクテリア (Mark et al., 2005), 糸状菌 (Mathinoni et al., 2011), 昆虫 (Kempema et al., 2007; Misra et al., 2010) など, 多様な病虫害や物理的障害である食害に対する植物の網羅的な遺伝子応答の解析および転写制御機構が報告されている. またストレスを複合処理したトランスクリプトームデータを単一ストレスの処理と比較したところ遺伝子発現パターンが異なる応答を示すことが判明している (Rasmussen et al., 2013). さらに究極的な目的である実際の農場での植物の遺伝子応答を念頭に置いた解析も始められている (Atkinson and Urwin, 2012). このようにトランスクリプトームは多くの研究が進められつつも, いまだ全貌が解明されていない分野である. 近年では RNA-seq による高度かつ正確な遺伝子発現レベルの定量化を行うことが可能になり, その原理から非モデル生物の解析や遺伝子発現の制御に関連する miRNA の特定など, 大量のデータから発現制御機構の理解が進展している. 多様なストレス種が環境中に存在するなか, 土壌中の毒性イオン障害または肥料不足による栄養欠乏といったミネラルストレスは農場で潜在的かつ大きなストレス要因となりうる. ミネラルストレスに対するオーミクス情報の解析から様々なストレス応答性遺伝子の特定およびストレス耐性機構の解明が進められているが全貌は明らかになっていない.

本研究では根圏部のミネラルストレスに対するシロイヌナズナ地上部の分子生物学的変化の動態を DNA マイクロアレイによるゲノムワイドな遺伝的探索および解析を行い, 転写変動の差異を研究から分子生理学的なストレス応答をプロファイリングすることでシロイヌナズナ地上部の根圏ミネラルストレスに対する転写変動の比較解析を行った. また有用微生物による病害抵抗性の誘導機構の解明を目指した. さらに転写反応を基に各ミネラルストレス応答の遺伝子発現バイオマーカーの作成を目的として研究を行った.

第1章

栄養欠乏下のモデル植物の地上部トランスクリプトーム応答の解析

1-1 緒言

前世紀からの化学、工業技術の発展によって農業機械の開発や化学農薬の製造といった農業技術の改革が進み、大規模かつ安定的な農業が可能になるに至った。その一方で大量生産型農業は土壌肥沃度を著しく損耗させる。化学肥料の投入は土壌の栄養分の回復し作物の安定的な収穫をするために不可欠な要素であり、特に窒素 (N), リン (P), カリウム (K) は作物の生長に大きく関わる重要な栄養素である。世界の肥料の使用量は年々増加しており、FAOSTAT (<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>) によると、N 源肥料の消費量は 1961 年では 1160 万トンであったのに対し、2006 年では 1 億 40 万トンへと約 9 倍に増加している。リン酸肥料の消費量は 1961 年では 500 万トンであったのに対し、2006 年では 1800 万トンへと約 3.6 倍に増加している。このような国際的な肥料使用量の増加や肥料価格の高騰は世界人口増加や中国、インドなどの新興国の食生活の変化および資源大量投入型農業への移行に由来するものと考えられる。また近年の石油価格や肥料価格の高騰により、大量のエネルギーや肥料投入を行っている大規模農業で資源面および経済面で農家に大きな負担となっている。

化学肥料は近代農業において作物収量を高める重要な要素であるが、先述のように土壌中の余剰肥料は環境中へ流出し環境汚染の一因となっている (Schachtman et al., 1998; Raun and Johnson, 1999; Strahm and Harrison, 2006)。作物の肥料獲得率は非効率的で、およそ 30~60% と見積もられており、多くの先進国や中国のような農業大国では農耕地への化学肥料や有機質資材の過剰投入により、土壌中の肥料成分の過度な蓄積で環境中の物質循環を大きく攪乱し農耕地の荒廃、ひいては環境汚染が起きている。殊に N 流出は深刻な環境問題の原因となり、土壌や地下水汚染、河川、湖沼の富栄養化による赤潮などの水質汚染を引き起こす。揮散したアンモニアは広域に拡散、流出して自然生態系の物質循環

に悪影響をおよぼし窒素循環過程で発生する亜酸化窒素 (N_2O) は地球温暖化やオゾン層破壊の要因となっている。またリン鉱石は再生不可能な資源であるため、持続可能な農業を推進するにあたり緩効性肥料や被覆肥料の使用、P の回収方法が求められている。これらの環境問題が顕在化したなか、慣行の大量資源投入型の農業方法を見直し循環型農業システムの目指した持続型農業への転換が必要である。近年研究および利用が進んでいる植物工場や精密農業による直接的な植物の栄養状態の情報管理は今後の持続的農業において必須であり、フィールドでの耕作においても環境負担を軽減しつつ植物の栄養状態を健全に保つ効率的な施肥方法が広く求められている (Morimoto et al., 1996)。

土壌中の栄養素の動態は土壌中の化学的性質と栄養元素の形態などの要素が複雑に絡み合っており、作物の栄養状態の管理法は未だ完全ではない。土壌分析は間接的な検査であるため植物の栄養状態そのものを直接検査しているわけではなく、植物の栄養状態を正確に測定できない問題点がある。バイオマーカーは生体指標化合物として病理学および薬理学をはじめとして利用されており、トランスクリプトームやメタボロームなどのオミクス解析の蓄積されたデータ基盤を用い人間の血液や尿などから指標物質の含量変化を測定し癌をはじめとした様々な疾病の早期発見に貢献する技術として確立されている (Pepe et al., 2001)。植物に用いられるバイオマーカーは主に地層の年代測定の判断材料として利用されている放射性炭素や代謝物質、巨大分子などを用いた環境アセスメントに限定されている (Ernst and Peterson, 1994; Hughen et al., 2004)。バイオマーカーを用いた作物の遺伝子変動の利用した栄養欠乏診断のバイオアッセイは積極的に試みられてはならず、研究報告としてイネの生長期間の判断 (Tarpley et al., 2005) やトウモロコシの N 状態 (Yang et al., 2011)、ヒマワリ (*Helianthus annuus L.*) の水状態 (Marchand et al., 2013) を評価する遺伝子発現バイオマーカーが報告されている。

植物の栄養管理の観点から肥料の利用効率をあげるには植物自体の栄養吸収および利用効率を向上させることが挙げられる。これまで様々な研究で多種の植物で形態学、生理学的、生化学的手法による広範な解析が行われ、栄養元素の土壌からの吸収、輸送、代謝機構が明らかにされている (Maathuis 2009)。さらに近年では分子生物学的研究の発展に伴

い、それらのメカニズムに関与する遺伝子の発現変動や転写制御機構に関する研究が行われており、N 欠乏 (Krapp et al., 2011), P 欠乏 (Hammond et al., 2003), 硫黄 (S) 欠乏 (Maruyama-Nakashita et al., 2003) などの様々な元素の栄養欠乏処理によるトランスクリプトーム解析が進められている (Gojon et al., 2009). 本章では網羅的な遺伝子発現解析を行えるマイクロアレイを用い N, P, K 欠乏処理を施したシロイヌナズナおよびイネ地上部のトランスクリプトームの比較解析を行い、N, P, K 特異的応答遺伝子を特定し分子生理学的応答のプロファイリングを目指した。更に栄養管理ツールとして遺伝子発現バイオマーカーの開発を目的とした。

1-2 材料および方法

供試植物

本実験では RIKEN BioResource Center より入手したシロイヌナズナ野生株 Columbia-0 (Col-0; JA58) を用いた。イネ種子は岐阜大学応用生物科学部松井研究室より提供されたイネ品種コシヒカリを用いた。

シロイヌナズナ栄養欠乏処理

水耕栽培は Toda ら (1999) のフロート式水耕栽培法で行った。シロイヌナズナ種子を 4°C で 3 日間吸水処理した。そののちナイロンメッシュ [34 mesh, 30×38 (mm)] を挟んだスライド用マウント [50×50 (mm)] (Fuji Firm, Japan) 上に播種し, 1cm 角の発泡スチロールをつけ, 2%濃度の MGRL 溶液 (Table 1) で明期 12 時間, 光度 (photosynthetic photon flux density) $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25°C で, 7 日間欠乏処理に用いる幼植物体は 14 日間, 2 日間欠乏処理に用いる幼植物体は 19 日間栽培した。溶液の pH 調整には HCl または NaOH を使用し, Horiba pH meter F-52 および低電気伝導率用 pH 電極 (Horiba, Kyoto, Japan) を用い測定, pH 5.6 に調整し 2 日ごとに更新した。その後, 水耕溶液を栄養処理溶液 (Table 2) に替えて幼植物体を栽培した。なお栄養欠乏処理として栄養溶液から各元素を添加しない無添加または 1/4 量栄養を添加した水耕培地を作成し, 植物体を栽培した。N 欠乏では NH_4NO_3 と NaNO_3 を, P 欠乏では NaPO_4 を, K 欠乏処理は KCl をそれぞれ抜き栄養欠乏処理区として使用した。栄養欠乏処理期間はそれぞれ 14 日間育てた幼植物体は 7 日間または 19 日間育てた幼植物体は 2 日間無添加または 1/4 量添加した処理を行った。また 7 日間栄養欠乏処理を施した植物体を完全栄養処理培地に移し 3 日間生育して追肥処理区として扱った。各処理をした植物体の地上部を回収し, -80°C 冷凍庫で保存した。

イネ栄養欠乏処理

イネ種子を 10% 次亜塩素酸で 10 分処理し, イオン交換水で 3 回洗浄したのちシャーレ

に撒きイオン交換水に浸漬処理し 30℃で 3 日間催芽処理を行った。トリカルネット H01 [網目ピッチ 4×4 (mm)] (タキロン) に発泡スチロールをつけてフロート式水耕栽培法で栽培した。栄養処理溶液で 14 日間栽培し、植物体の生育状態が近いサンプルを選抜し、シロイヌナズナの実験と同様に対照区として栄養処理溶液で、さらに N, P, K 完全欠乏培地で 7 日間処理したのち、イネ幼植物体の第 2 葉をサンプリングした。また長期間栄養欠乏状態に晒されたイネ地上部でバイオマーカー遺伝子の発現変動を測定するため、7 日間完全栄養培地で生育したイネ幼植物体を各栄養元素 1/4 量, 1/10 量, 完全欠乏培地で第 5 葉が発生するまで栽培し、第 2 葉をサンプリングした後、使用するまで-80℃で保存した。

RNA 抽出

Total RNA を Suzuki らの方法で抽出した (Suzuki et al., 2003). 回収した植物体サンプルを破砕機 (Shake master Neo, BMS) を用いて凍結させたまま破砕した。抽出 buffer [100 mM Tris-HCl (pH6.8), 25 mM EDTA, 2% (w/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol] 700 µl 加え懸濁した。これをで遠心分離し (13,000 rpm, 室温, 5 min) , 上清を 1.5 ml チューブに移しインキュベーターで 65℃, 5 min 処理した。上清に chloroform/isoamylalcohol (24:1) 700 µl を加え、手で激しく攪拌し、遠心分離 (13,000 rpm, 4 °C, 5 min) した。上清を 1.5 ml チューブに移し、この上清に対して 1 vol のフェノール Mix [3.5% (w/v) GTC, 200 mM NaOAc (pH 4.0) を水飽和フェノールでメスアップ] を加え、vortex し 5 min 室温で静置した後、遠心分離 (14,000 rpm, 4℃, 5 min) した。水層を 1.5 ml チューブに移し、加えたフェノール Mix の 0.5 vol の CHL/isoamylalcohol を加え手で激しく攪拌した後、遠心分離 (14,000 rpm, 4 °C, 5 min) し水層を RNase free のチューブに移した。なおこれ以降の操作は全て RNase free のピペットマンのチップ、チューブ、試薬を用いた。この水層に対して 0.7 vol の isopropanol (SIGMA) を加え室温で 10 min 放置し、遠心分離 (15,000 rpm, 4℃, 15 min) して上清を取り除いた。75% エタノール 200 µl でペレットを洗浄し、遠心分離 (15,000 rpm, 4℃, 5 min) して上清を除去した。この RNA をマイクロアレイまたは定量的 RT-PCR に用いるため、それぞれの用途に

合う適当量の RNase free water (SIGMA) に溶かした.

マイクロアレイに供する RNA 試料は混入している多糖を除去するために塩化リチウム (LiCl) 処理を行った. 30 μ l に調整した RNA 溶液に対し 8 M LiCl を 10 μ l 加え, -80 $^{\circ}$ C で一晩処理した. 遠心分離 (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30 min) し, LiCl 溶液を取り除き, 75 %エタノールを 150 μ l 加え, 遠心分離 (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min) を行った. エタノールを除去したのち, RNase-free water 50 μ l を加えた. また 3 M 酢酸ナトリウム 5 μ l, isopropanol 50 μ l を入れ, 室温で 10 min 静置した. 遠心分離 (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15 min) し, 75 %エタノールを 150 μ l 加え, 遠心分離 (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min) した. エタノールを完全に除去し, 適当量の RNase-free water に溶かした.

定量的 RT-PCR に供する RNA 試料はゲノム DNA を除去するために DNase 処理を行った. 25 μ l に調整した RNA 溶液に対し, 2.5 μ l の 10 \times DNase I バッファー (Takara Bio Inc.), 1 μ l の DNase I (5 U/ μ l, Takara Bio Inc.), 0.5 μ l の RNase inhibitor (40 U/ μ l, TOYOBO), 2 μ l の DEPC 処理水を加え 37 $^{\circ}$ C で 60 min 処理した. この反応溶液に RNase free water を 250 μ l, 水飽和フェノール 150 μ l, chloform/isoamylalcohol 150 μ l を加え転倒混和した. 遠心分離して (室温, 15,000 rpm, 5 min) 上層を新しいチューブに移した. 集めた水層の 1/10 vol の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と水層と等量の isopropanol を加えボルテックスし, 室温で 10 min 静置した. 遠心分離 (4 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm, 15 min) して RNA 沈殿を回収した. 上清を除去し, 75 % エタノール 150 μ l で RNA 沈殿を洗浄し, 遠心分離 (4 $^{\circ}$ C, 16,000 rpm, 3 min) したのち, エタノールを完全に除去し, このペレットを 30 μ l の RNase free water に溶解した. この RNA 溶液を用いて cDNA を作成するため逆転写反応を行った. 1 μ g の RNA を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し, 反応溶液が 11 μ l になるよう RNase free water を加えたのち 70 $^{\circ}$ C, 10 min 処理した後, 氷冷した. 反応溶液に Oligo dT primer [5'-TTTTTTTTTTTTTTTTT(A/C/G)-3'] 4 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, RNase inhibitor 0.5 μ l, RTase を加え, TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (Takara Bio Inc.) で (42 $^{\circ}$ C/60min, 99 $^{\circ}$ C/5 min) で反応させた. この反応溶液に 1/4 TE を 280 μ l 加え定量的 RT-PCR 用 RNA とした. なお RNA 溶液の濃度および質の測定は光度計 NanoVuePlus

(GE Healthcare, Tokyo, Japan) によって計測した。A₂₆₀ の値で RNA 濃度，A₂₆₀/A₂₈₀ でタンパク質，A₂₆₀/A₂₃₀ で多糖の混合度合を判断した。

マイクロアレイおよびデータ解析

マイクロアレイチップは Agilent Arabidopsis 4 Oligo Microarray Chip (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) を使い，Cyanine-3 (Cy3) による 1 色法で行い，Agilent in-situ オリゴ DNA マイクロアレイプロトコール ver 2.3 に従って行った。対照区および各イオンストレス処理区の精製した 1 µg RNA を用いて，Cy3 でラベルした CTP (Perkin Elmer/NEN Life Sciences, Tokyo, Japan) を用いて cRNA を合成した。ハイブリダイゼーションを行った DNA マイクロアレイガラススライドは Agilent Scan Control Software (Version 6.1) を用いてスキャンし，本研究では再現性を高めるため，3 連の独立した反復を用い，得られたイメージのシグナル強度は Agilent Feature Extraction software (Version 9.5.1) で数値化した。さらにこのデータを GeneSpring 7.3.1 によって遺伝子の発現量を観察した。マイクロアレイの画像データのクオリティチェックとして，flags で 3 連の実験系でひとつでも Absent と判断された遺伝子を排除した。各マイクロアレイ実験系で発現誘導遺伝子は，それぞれの栄養欠乏処理を行った各マイクロアレイで発現誘導遺伝子上位 2.5% を採用し，データセットとして解析に用いた。

定量的 RT-PCR 解析

DNase 処理および逆転写反応を行った cDNA を SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc.) を使用し，Thermal Cycle Dice® Real Time System II および Software Version 4.02 (Takara Bio Inc.) を用い，解析手法はマニュアルに従い遺伝子の発現解析を行った。解析には 3 連の独立したサンプルを使い，ハウスキーピング遺伝子として *UBQ1* を用い，転写量を正規化した。なお本解析に使用したシロイヌナズナおよびイネ用のプライマー配列はそれぞれ Table 3, Table 4 に記載した。

土耕試験

土は蔵王より採取した褐色森林土（中性土壌）を用いた．Toda ら（1999）の土耕試験を基に，対照区の土壌として，100g の土壌に対して KCl 0.048 g, MgSO_4 0.036 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.132 g, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.132 g, CaCO_3 0.15 g を乳棒で磨り潰し粉状にしたのち，これらの栄養塩を土へ添加し土に馴染ませるため 1 週間混合した．また各栄養元素欠乏処理区として，N 欠乏処理区は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，P 欠乏処理区は NaH_2PO_4 ，K 欠乏処理区は KCl の添加量を対照区と比較して 1/4 量，1/16 量，無添加の処理区を設置した．4°C で 3 日間吸水処理したシロイヌナズナ種子を土壌にピペットマンで各栄養処理区に 30 粒播種し，土壌表面が乾燥しないようイオン交換水をピペットマンで添加して 28 日間生育した．

イネ地上部の N, P, K 欠乏バイオマーカー遺伝子の探索

ArrayExpress より Takehisa ら（2015）のイネ地上部の栄養欠乏トランスクリプトームデータ（<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-GEOD-66935/>）を入手し解析に用いた．Control 比に対して 1/4, 1/16, 1/64 量の各三連の栄養欠乏データを $p < 0.05$, $\text{Intensity} > 500$, $\text{FC} > 4.0$ (up-regulation) または $\text{FC} < -4.0$ (down-regulation), でフィルタリングを行い，遺伝子を特定した．

Table 1. Concentrations of nutrients in modified MGRL medium

Element	Concentration
NaPO ₄	35 µM
NaNO ₃	80 µM
MgSO ₄	30 µM
CaCl ₂	200 µM
KNO ₃	60 µM
Na ₂ EDTA	1.34 µM
FeSO ₄	172 nM
MnSO ₄	206 nM
H ₃ BO ₃	600 nM
ZnSO ₄	20 nM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.48 nM
CoCl ₂	2.6 nM
CuSO ₄	20 nM

Table 2. The component of nutrient treatment medium

Element	Concentration
NH ₄ NO ₃	0.5 mM
NaNO ₃	1.0 mM
Na-PO ₄	0.8 mM
KCl	0.8 mM
CaCl ₂	0.6 mM
MgSO ₄	0.5 mM
Fe-EDTA	0.05 mM
H ₃ BO ₃	50 µM
MnSO ₄	9.0 µM
CuSO ₄	0.3 µM
ZnSO ₄	0.7 µM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.1 µM

Table 3. Sequences of primers used for quantitative RT-PCR of the nutrient deficiency biomarker in Arabidopsis.

Name		Sequence (5'-)
At5g15500	F	GGAACACGGTCACTTCTGG
	R	AAGAGCGTTTTCTCCGTTC
At1g73040	F	AGATGCAGGACGACTCATGG
	R	CTGACTTTGCGGGTTTACC
At5g16570	F	CTGTGGAGTTGGAGCAGACA
	R	CCAGCCAATTCTGTGATCC
At1g80130	F	GCCGGTCAACATCATTGTC
	R	GAAAGGTGATGACCGATCC
At5g23020	F	AGCACTTACTCCACCGCAG
	R	ATGCCGCATATCACAGGAAC
At4g11910	F	TGTTCCGGGACGAAGTAGTG
	R	GGGCAAAAGCTTCCAGTACC
At1g03545	F	CCAACAATGCATGGATCAG
	R	CCCGTGTCTTGCACTTTTC
At2g14610	F	TTCTTCCCTCGAAAGCTCAA
	R	AGGCCCACCAGAGTGTATGA
At4g23700	F	CCGCTTGACCAGTCTTTAGC
	R	TTTGAACGGTTCGTCTCCTC
At1g14880	F	GATCGAGGATCCAAATCGTG
	R	TTGTTGGGTCAAAGCACAGA
At2g18660	F	TCTCTCTCGTGACGCTTTTC
	R	ACCACGAAATCATCTCTCG
At1g21310	F	ACGGAGAACACGATGTACACAA
	R	ATTGCATGCATGAACCATTG
At1g51800	F	GCGCTACCACGAAAAAGAAG
	R	AGGTTCAAACCGTGGTGAG
At3g38200	F	GCGCTACCACGAAAAAGAAG
	R	AGGTTCAAACCGTGGTGAG
At2g26695	F	CAAATTTGGAGGGGTTGATG
	R	ATCATTCCTCGTAAGCAACC
At2g44370	F	CACGCACATCCACTCACA
	R	TGAGCCCCTTCCTCCTTTA
UBQ1 (internal std.)	F	TCGTAAGTACAATCAGGATAAGATG
	R	CACTGAAACAAGAAAAACAAACCCT

Table 4. Sequences of primers used for quantitative RT-PCR of the nutrient deficiency biomarker in rice.

Name		Sequence (5'-)		Sequence (5'-)
Os01g0136100	F	CGAGGAACACACAACAAACAAG	R	TGGTGTCTCTATCTTTCCG
Os01g0155800	F	CTTTCTGCCCTGCTACACCTAC	R	CTGCCTGCATGCACTTTA
Os02g0276200	F	CTGTTTGGTCAGCCATAGG	R	GATCTTTCCTTGGCAATAGGTG
Os02g0503700	F	GGGCAATGTCTCTGCTACTA	R	ATTGTAGCTTCGGGAGGTCA
Os02g0719600	F	GAGCAGGTGAAGACCAAGTACC	R	CACACACTGGCACGCTACTTA
Os02g0782500	F	TCGCCTGAATCATAGCGTAG	R	GAAACACGAACAGAGCACAAAC
Os12g0231000	F	GGGAACATTTCCACTATGC	R	GTAGAAGCGCTTGATGTAGG
Os03g0764600	F	CTCTGGGCTTCTCAGGAAG	R	CTGTCTAGCAAGATTCCACGA
Os06g0594400	F	CACACCAAGCTCAGACAAGA	R	CTCGTTGTAACCCATGATGC
Os04g0679400	F	GACTCCAATAACACGCTCATC	R	GAATGGAATGGAGGTGAGGA
Os03g0431200	F	CAGAACACGTGCTAAGCAG	R	GCAGTATACCCATCAACGAAG
Os09g0294000	F	CAACCTTGTGCATAAAGCTCAG	R	GAAGCATCGCTCTCAGGTTAC
Os12g0503000	F	GGCGAGATCATGTATCTTGTG	R	GGAGTAGTCCAGGTAGGTGTGC
Os03g0738600	F	CATTGCTGGAGAACATCTACG	R	CCTCGTAGAGCTTGAGGATGTC
Os06g0242000	F	GGTGAAACTATTCCAAGAGC	R	CTCCCAAAAATGTCAGTACC
Os12g0548700	F	CATCATCAGTTTGATCGTGTC	R	TGTCCTTGAGGATCACCTTC
Os11g0655900	F	CGCGCTCTGGCTCTAGTGTA	R	ACTTCACCATTAACCACTCG
Os03g0699700	F	CACACCTGGTGAATTTGACTC	R	GCAGGTCCTTGATAAGTTGGAC
Os08g0150700	F	GAAGAAGGGCGTCTACCTC	R	CCTCCTCAAACCTGGAGAG
Os06g0606700	F	CGCAGCTAAGGTGTAGTCG	R	GAACATACTTGGCTGTGGC
Os03g0806600	F	CCGTTCAGATGTATGCTG	R	CATCGTAGTAGCCACCAAATG
Os10g0550900	F	CATCCCGTACCTCATCAGAC	R	GTCTTCTGCCACCTCACTTTC
Os09g0547500	F	GATCATCAACGAGAGGATGC	R	GCAATAACCAGAGCACGTAC
Os10g0552400	F	GAGGAAAGAACTGGAAAGAAGC	R	GATACTCTTGACGCGGCTTA
Os07g0258400	F	GTAAGGAAACTGGAGGTTGTGG	R	GAATAGATTGTGCGGCATTAC
Os07g0677500	F	GCACGTATAAGACGATGGAGTG	R	GAAACAGAGCAAGGCAAATC
Os03g0725200	F	GCTGCTGGTCTTCTTGAAC	R	GAGCGGCAATATCATAGCAAAC
Os07g0539900	F	GAGTCCCATGATCGACTTC	R	GCCAAATACAGCATAATCACG
Os04g0178300	F	CTCCGACTTTACGATACCAAG	R	AGTGTTGTACATTGGGGTGAC
Os04g0578600	F	AGGGACGAGAAATCGTGATC	R	CTTCAGCAAGTGCAGGTAAATG
Os04t0394100	F	CTCAAGGCATGTTGAGAGC	R	CCTTTCGTGAGGAAGTACAC
Os11g0658900	F	CACACCGAGGTAATAGGGTC	R	GCAACTTTAGACCTTGGATTGG
Os10g0515900	F	GAAGACGACGAACAAAGAGACC	R	GAGCAGAGCTTGATGATCTCG
Os10g0513400	F	GCACGATTTTCTCCTGTACCTC	R	CCGGA CTGTTGAATTTGTTTC
Os01g0525700	F	CGTTTGATACATAGAGGCCAACA	R	CACTTGGTTCATCGTATTTGC
Os05g0505900	F	GTCAAGTGTGTTGTCAATGTGCG	R	CTCAATTCTCTCCTCGATCTC
Os03g0718100 (house-keeping gene)	F	ATCCTTGTATGCTAGCGGTCGA	R	ATCCAACCGAGGATAGCATG

1-3 結果

シロイヌナズナ地上部の N, P, K 欠乏特異的応答遺伝子の特定

シロイヌナズナ植物体を 14 日間水耕栽培系で生育し, 各栄養欠乏処理培地で栽培した後, その生長を観察した (Fig. 1). この地上部を回収し, Total RNA を抽出してマイクロアレイに供した. マイクロアレイデータよりフィルタリングで選抜された 2 日間欠乏処理誘導遺伝子 (N 欠乏 : 55 遺伝子, P 欠乏 : 177 遺伝子, K 欠乏 : 126 遺伝子) および 7 日間欠乏処理誘導遺伝子 (N 欠乏 : 97 遺伝子, P 欠乏 : 119 遺伝子, K 欠乏 : 112 遺伝子) から, 各栄養欠乏に特異的応答を示す遺伝子を特定するために 2 日間または 7 日間処理で発現変動する遺伝子群をベン図で解析した. 2 日間処理では N 欠乏処理区で 51 遺伝子, P 欠乏処理区で 103 遺伝子, K 欠乏処理区では 51 遺伝子が特定され (Fig. 2A), 7 日間処理では N 欠乏処理区で 73 遺伝子, P 欠乏処理区で 89 遺伝子, K 欠乏処理区では 87 遺伝子が特定された (Fig. 2B). 各栄養欠乏特異的応答と判断された遺伝子群を用いベン図によって解析したところ, N 欠乏処理区で 15 遺伝子, P 欠乏処理区で 8 遺伝子, K 欠乏処理区で 5 遺伝子特定した (Fig. 2C). N 欠乏処理で特定された遺伝子は N 代謝として *GLN1;4* (*GLUTAMINE SYNTHETASE 1;4*) が含まれていた. また二次代謝産物に関与する遺伝子 *UF3GT* や *PAP1* (*PURPLE ACID PHOSPHATASE 1*) が含まれていた. P 欠乏処理でストレス期間に共通して誘導される遺伝子として *IPS2* や病害応答性遺伝子 *PR1*, カチオントランスポーター *CHX17* (*CATION/H⁺ EXCHANGER 17*) が含まれていた. K 欠乏処理では *At1g51800* や *At2g44370* といった病害抵抗シグナルに関与する遺伝子が含まれていた.

N 欠乏処理による特異的発現変動遺伝子

2 日間の N 欠乏処理によってシロイヌナズナ地上部で発現誘導された N トランスポーター遺伝子として, *NRT2;1* (*NITRATE TRANSPORTER 2;1*) や *UPS1* (*UREIDE PERMEASE 1* (*UPS1*), *MtN21* / *EamA-like transporter* family, N 代謝酵素遺伝子として *aspartate-glutamate racemase* や, *GLN1;4* が特定された. また *anthocyanin*

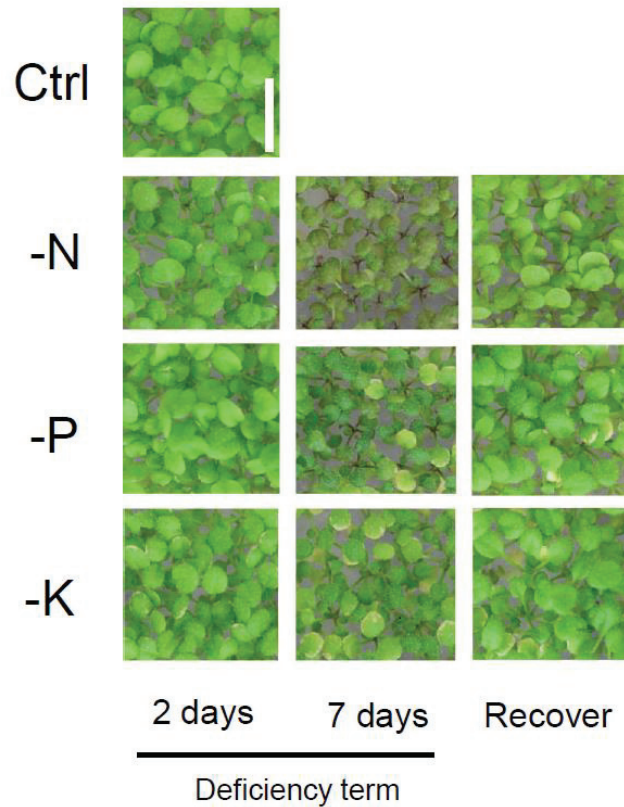


Figure 1. Phenotypes of Arabidopsis seedlings grown in several nutrient content conditions by hydroponics. Seedlings were grown for 14 or 19 days on control condition (2% MGRL, pH5.6) and transferred each nutrient starvation treatment for 7 or 2 days. Recover treatment was performed transferred to control condition for 3 days after nutrient deficiency treatment for 7 days. Left number represents adding each amount of a nutrient content in solution compared with control.

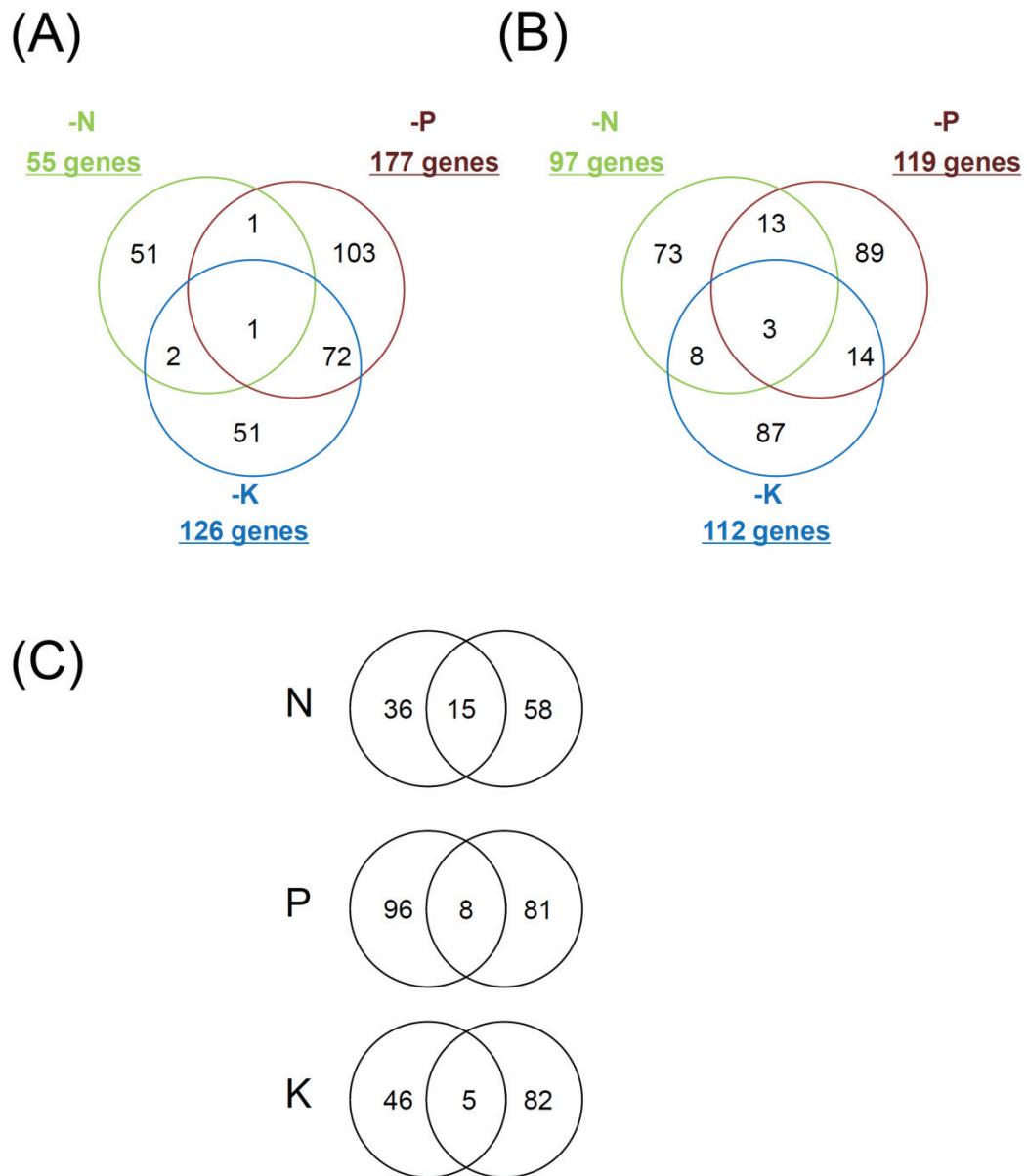


Figure 2. Venn diagram showing the upregulated genes under nutrient deficiency condition in Arabidopsis shoots. The comparison was performed using the expression level of (A) 2 days (B) 7 days. The numbers in the intersections represent the extent overlap among three analyses. Genes were selected if the fold change value was in the upper 2.5% of quality-controlled spots in each microarray experiment after 2 days or 7 days treated with N, P or K free solution. (C) Comparison of the upregulated genes affected by the nutrient deficiency treatment in Arabidopsis shoots. Venn diagram showing overlap between genes upregulated for 2 days and 7 days.

5-O-glucosyltransferase など二次代謝産物に関与する遺伝子群が発現上昇していることが確認された。他に着目する遺伝子として *ALLANTOINASE (ALN)* や *HXXXD-type acyl-transferase-like protein* が複数含まれていた。7 日間の欠乏処理で発現誘導された遺伝子群では、N 輸送および代謝に関わる遺伝子として *NRT2.5* や *GLN1;4* が特定された。また *UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase* などの二次代謝経路関連遺伝子が発現誘導され、二次代謝産物関連遺伝子の発現制御に関わる転写因子 *MYB75* が強誘導されていた。

P 欠乏処理による特異的発現変動遺伝子

2 日間の P 欠乏処理によって特異的発現誘導する遺伝子群に、P 欠乏応答遺伝子として今までに報告されている遺伝子である *PHOSPHATE-RESPONSIVE 1* や *INDUCED BY PI STARVATION 2 (IPS2)* が含まれていた。また P トランスポーター遺伝子として *PHOSPHATE TRANSPORTER 1;1 (PHT1;1)* が同定された。この遺伝子群には病害応答性遺伝子である *PATHOGENESIS-RELATED (PR) gene* や *DEFENSIN-LIKE PROTEIN 208*, *SAR (systemic acquired resistance) regulator protein NIMIN-1-like* が含まれていた。活性酸素除去系遺伝子として *peroxidase* や *GST* が強誘導されていることが確認できた。P 欠乏で発現誘導された転写因子は *WRKY8*, *WRKY18*, *WRKY51*, *WRKY60*, *RAP2-9* が検出された。7 日間の P 欠乏処理発現誘導遺伝子群には P 欠乏応答遺伝子 *PHOSPHATE STARVATION-INDUCED PROTEIN 2 (PS2)* および *PS3* や P トランスポーター遺伝子 *PHT1;4* や *PHO1;H1* が含まれていた。また二次代謝産物生産酵素遺伝子 *PAP14* や病害抵抗性関連遺伝子 *PR1* や *PR5*, カイネース遺伝子 *MAPKKK19* が同定された。

K 欠乏処理による特異的発現変動遺伝子

2 日間の K 欠乏処理では K トランスポーターをコードしている遺伝子は検出されなかった。一方で、細胞壁強化に関与する *AGP2 (ARABINOGLACTAN PROTEIN 2)* が強発現

し、シグナル伝達の役割を果たす Ca^{2+} に関連する遺伝子として calcium-binding protein である *CML38* や *Ca²⁺-transporting ATPase* が同定された。また N 輸送トランスポーター *WR3* (nitrate transmembrane transporter) や N 代謝に関与する Class I glutamine amidotransferase-like superfamily が検出された。7 日間の欠乏処理では、K トランスポーター遺伝子である *HAK5* の発現誘導が確認できた。加えて N 代謝酵素遺伝子である *GLUTAMATE DECARBOXYLASE 1 (GAD1)* や *NITRATE REDUCTASE 1 (NIA1)* が発現誘導していた。

栄養欠乏応答遺伝子の GO 解析

N, P, K 欠乏による発現誘導遺伝子を特定したのち、この遺伝子群を agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) (Du et al., 2010) の “Analysis tool” で “biological process” に着目して解析を行った (Fig. 3)。N 欠乏誘導遺伝子群には 2 日間処理では “secondary metabolic process”, “response to chemical stimulus”, “cellular amino acid and derivative metabolic process”, “response to stress” が、7 日間処理では “carbohydrate biosynthetic process” が同定された。P 欠乏誘導遺伝子群には 2 日間処理では “defense response”, “response to stress”, “response to stimulus”, “response to oxidative stress”, “response to bacterium”, “defense response to fungus”, “response to other organism”, “response to biotic stimulus”, “regulation of defense response”, “regulation of response to stress”, “response to fungus”, “multi-organism process”, “defense response to bacterium”, “response to chemical stimulus”, “regulation of response to stimulus”, “response to salicylic acid stimulus”, “immune response”, “immune system process”, “innate immune response” が、7 日間処理では “cellular response to phosphate starvation”, “response to nutrient levels”, “response to extracellular stimulus”, “cellular response to starvation”, “response to starvation”, “cellular response to nutrient levels”, “cellular response to extracellular stimulus”, “response to external stimulus”, “cellular response to starvation”, “response to starvation”, “cellular

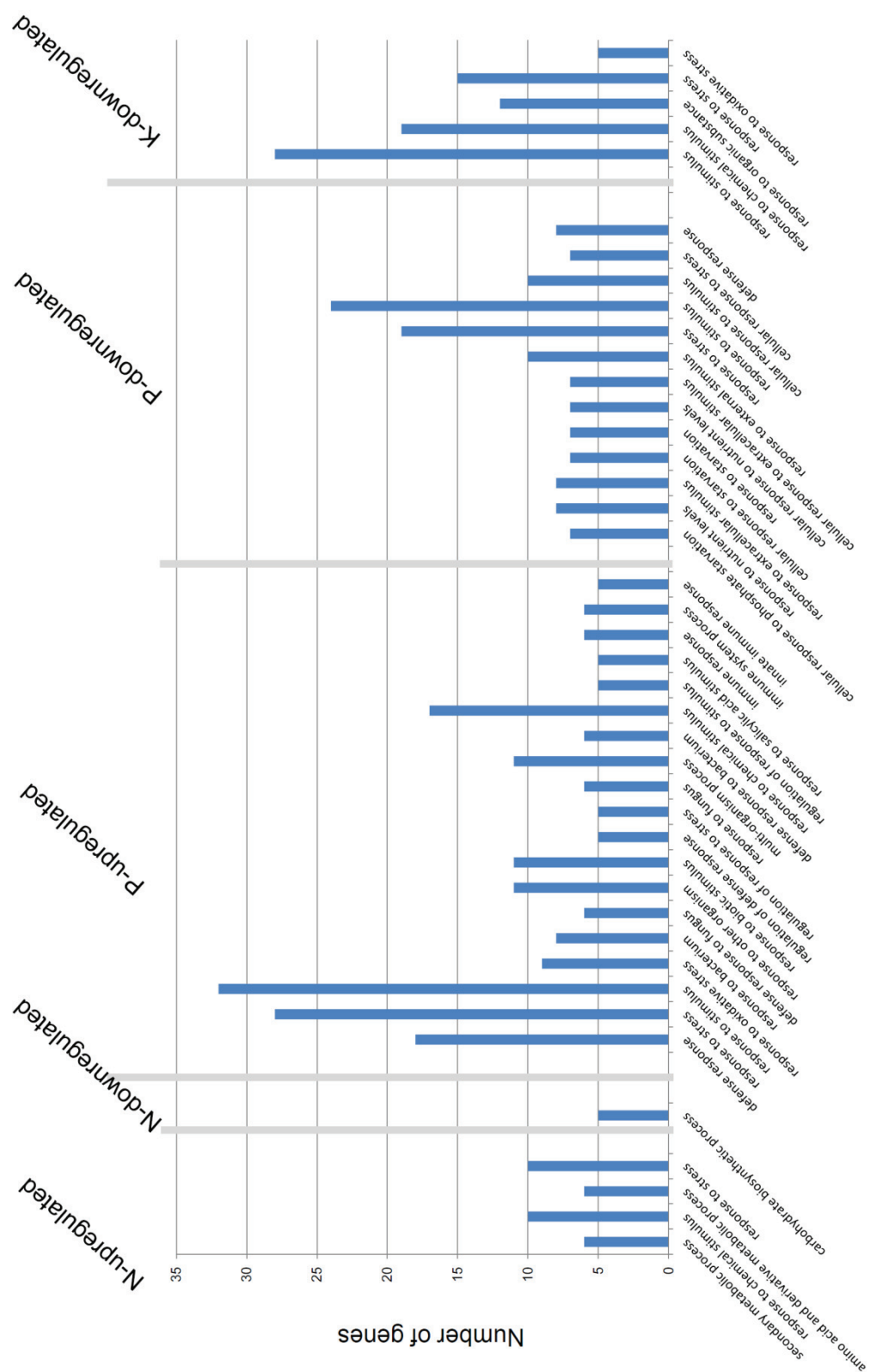


Figure 3. GO term enrichment analysis of nutrient deficient-inducible gene group in Arabidopsis shoot using the agriGO tool.

response to nutrient levels”, “cellular response to extracellular stimulus”, “response to external stimulus”, “response to stress”, “response to stimulus”, “cellular response to stimulus”, “cellular response to stress”, “defense response” が同定された. N 欠乏誘導遺伝子群には 2 日間処理では有意な GO 機能は存在せず, 7 日間処理で, “response to stimulus”, “response to chemical stimulus”, “response to organic substance”, “response to stress”, “response to oxidative stress” が同定された.

シロイヌナズナ栄養欠乏バイオマーカーによるシロイヌナズナの栄養状態の評価

今回の実験では各栄養欠乏処理を 2 日間または 7 日間行った植物体のトランスクリプトームデータを用いたが, 短期および長期処理で共通して誘導される遺伝子はストレス期間に関わらず発現誘導される遺伝子であるといえる. これらの遺伝子を用い, シロイヌナズナで栄養状態を評価する遺伝子発現バイオマーカーとして利用できるか実験を行った. 水耕栽培でシロイヌナズナを 14 日間栽培したのち栄養欠乏処理として対照区と比較して各栄養素を 1/4 量添加した処理区および無添加処理区で 7 日間生育した. このシロイヌナズナ地上部より cDNA を合成し定量的 RT-PCR でバイオマーカー遺伝子の発現量を測定した (Fig. 4). 水耕によるストレス処理では N および P 欠乏処理応答バイオマーカーが高い再現性を示すとともに追肥処理で発現量は対照区と同等に戻っていることが確認できた. 一方で K 欠乏処理応答バイオマーカーは K 追肥による回復性が低いまたは遅いことが判明した.

次に土耕を用いた栄養欠乏処理下におけるシロイヌナズナ地上部のバイオマーカー遺伝子の発現変動を測定した. 土耕で 28 日間生育した N または P 欠乏処理による遺伝子発現は水耕栽培によって生育したシロイヌナズナのデータと相似する結果となった (Fig. 6).

イネ地上部の栄養欠乏遺伝子発現バイオマーカーの検証

シロイヌナズナで特定した転写バイオマーカーでは植物体の栄養状態を評価できることが判明した. 次にシロイヌナズナの方法を基にイネでバイオマーカー遺伝子の特定ができるかを試みた. まず水耕栽培系を用いた栄養欠乏培地で生育したイネ地上部の表現型を観察

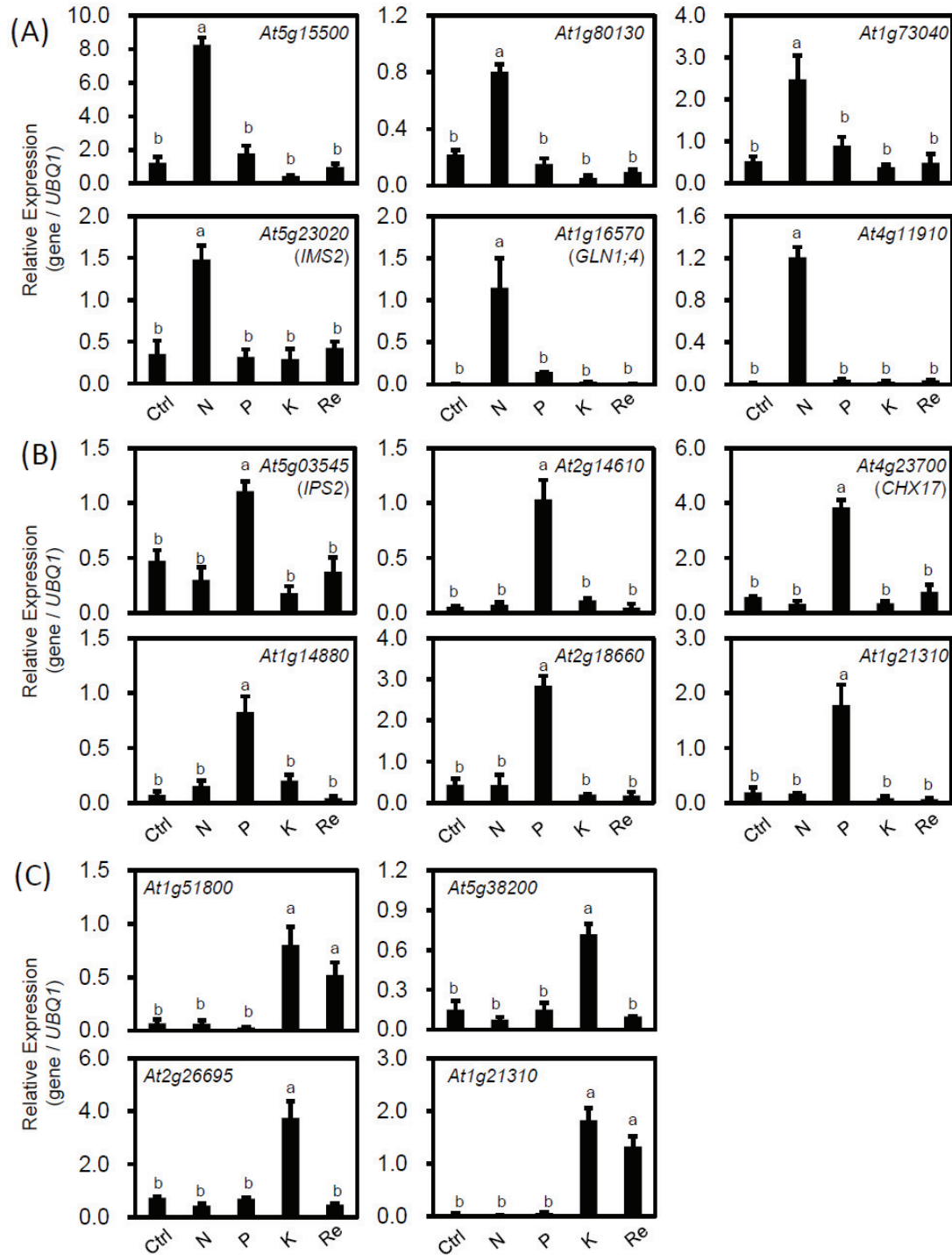


Figure 4. Expression patterns of specific biomarker genes induced by N, P and K deficiency condition using qRT-PCR. Seedlings were grown in control condition for 10 days and transferred control (Ctrl) treatment and each element content of (A), (B), (C) quarter or free (D), (E), (F) in (A), (D) -N, (B), (E) -P and (C), (F) -K for 7 days and “Re” indicates resupply treatment for 2 days after stress treatment for 7 days. Data is derived for three biological replications. Relative expression patterns were calculated using levels of each genes transcripts normalized by housekeeping gene, *UBQ1*. Means \pm SE were calculated from three biological replicates. Different letters indicate significant differences 5% level by Tukey test.

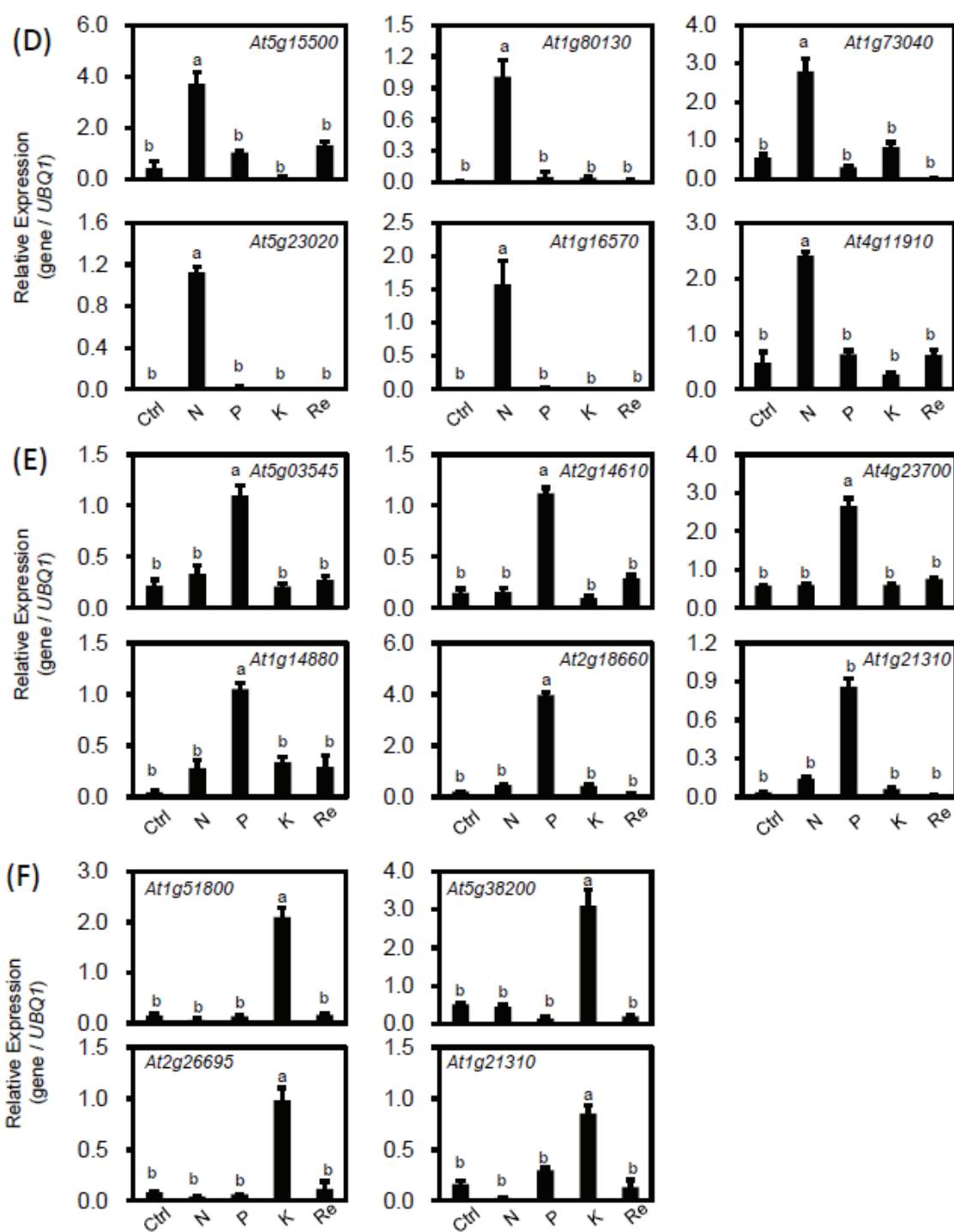


Figure 4. (Continued from previous page.)

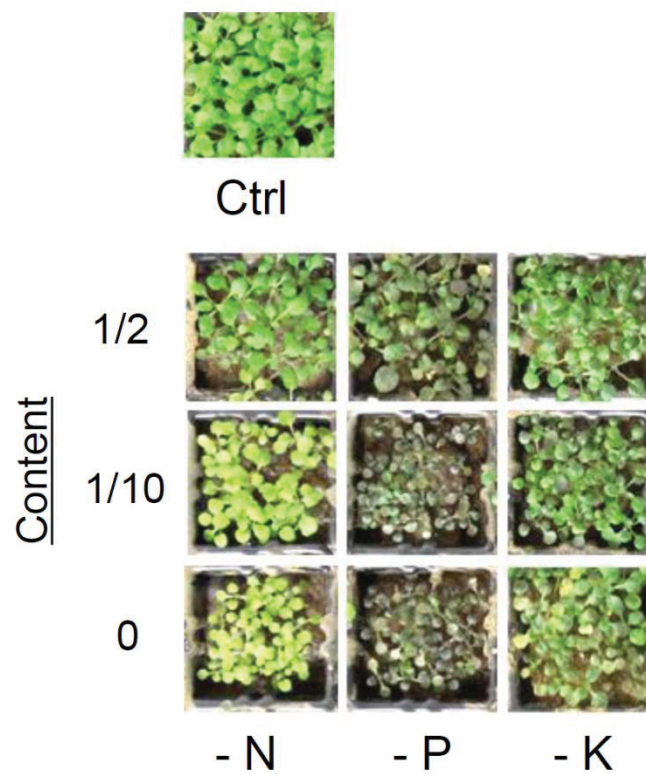


Figure 5. Phenotypes of seedlings grown under nutrient deficiency condition. Seedlings were grown for 28 days under control and each nutrient starvation treatment on neutral forest brown soil. Left number represents adding each amount of bottom nutrient content in soil compared with control soil.

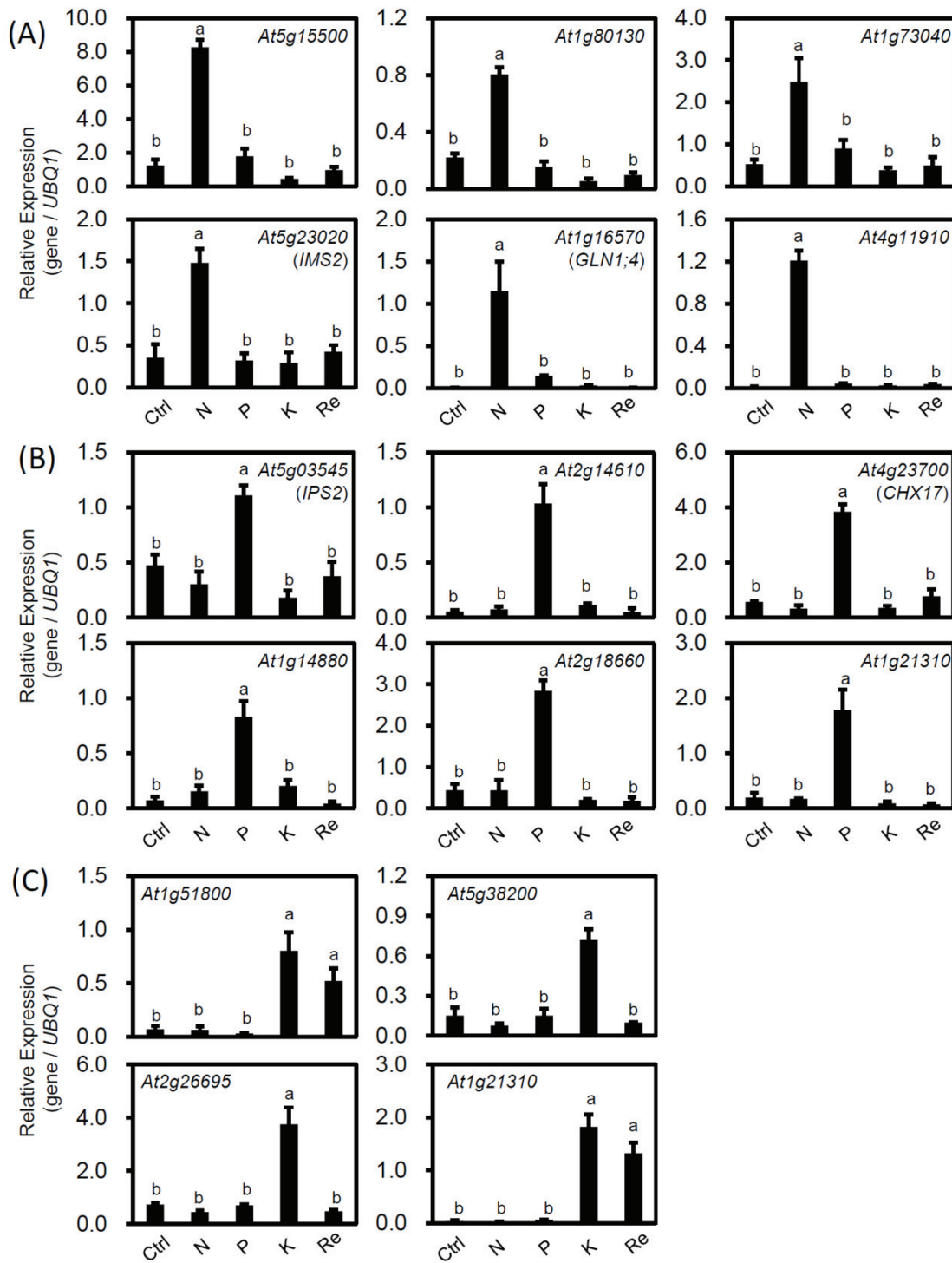


Figure 6. Quantitative RT-PCR analysis of gene expression biomarkers under nutrient deficiency conditions in soil. Plants were grown for 28 days on several nutrition content soil. (A) and (D) N deficiency, (B), (E) P deficiency (C), (F) K deficiency treatment. (A), (B), (C) quarter content and (D), (E) and (F) free soils. Relative expression patterns were calculated using levels of each gene's transcripts normalized by the housekeeping gene, *UBQ1*. Means \pm SE were calculated from three biological replicates. Different letters indicate significant differences at the 5% level by Tukey test. Means \pm SE are shown.

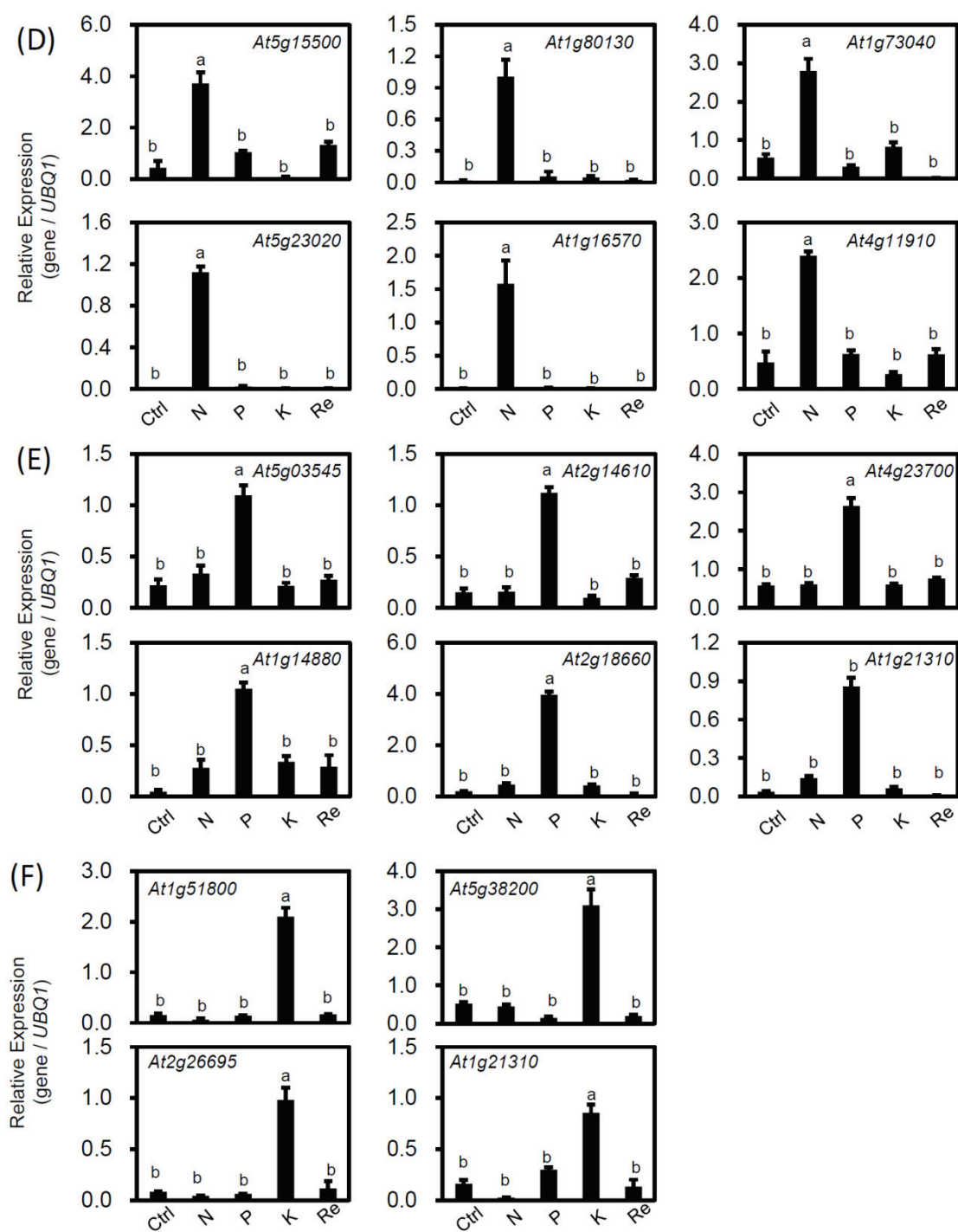


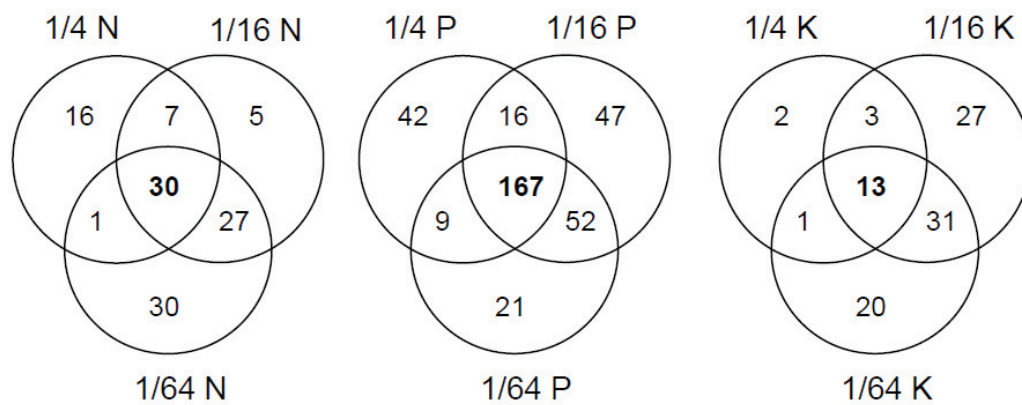
Figure 6. (Continued from previous page.)

した。各栄養欠乏条件で生育したイネ植物体は、N 欠乏処理区で 1/4 培地および 1/10 培地では大きな生育差は見られなかったが、完全培地で栽培した対照区と比較して地上部の生育が阻害されていた (Fig. 7)。また P および K 欠乏処理区でイネ植物体の生長阻害を観察することはできなかった一方で各栄養の添加量を減少させた培地で生育したイネは完全培地で生育したイネと比較して生長の阻害が確認できたが、N, P, K それぞれの元素欠乏処理との見分けがつきにくいことが分かった。

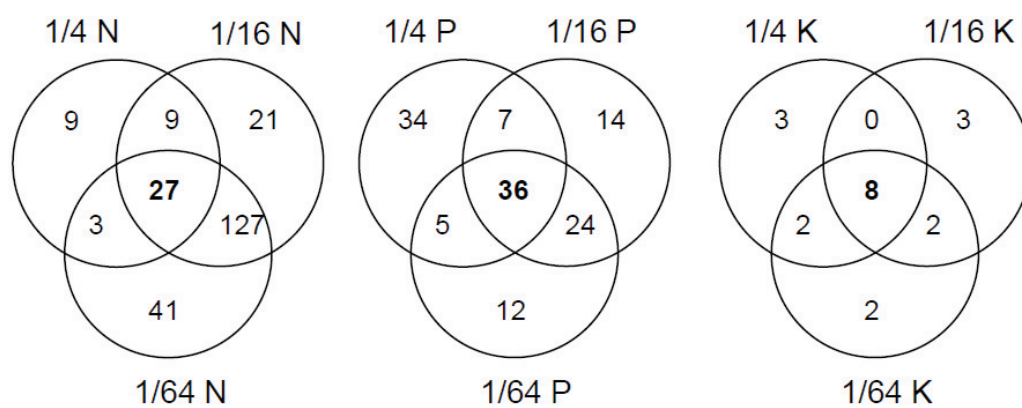
イネ地上部の栄養欠乏のマイクロアレイデータを解析し、発現誘導および抑制遺伝子からバイオマーカー遺伝子を特定した。発現誘導された遺伝子として 1/4 量, 1/16 量, 1/64 量の N 欠乏処理区からそれぞれ 54, 69, 88 遺伝子, P 欠乏処理区からそれぞれ 234, 282, 249 遺伝子, K 欠乏処理区からそれぞれ 22, 74, 65 遺伝子を抽出した。また発現抑制された遺伝子として, 1/4, 1/16, 1/64 量の各 N 欠乏処理区からそれぞれ 48, 184, 198 遺伝子, P 欠乏処理区からそれぞれ 82, 81, 77 遺伝子, K 欠乏処理区からそれぞれ 13, 21, 19 遺伝子が特定された。これらの遺伝子群で各栄養濃度に関わらず共通して発現変動する遺伝子を特定するためベン図による解析を行った。その結果、発現誘導遺伝子では N 欠乏処理で 30 遺伝子, P 欠乏処理で 167 遺伝子, K 欠乏処理で 13 遺伝子が特定された (Fig. 8)。これらの遺伝子群の GO アノテーションの分類を agriGO で行った (Fig. 9)。N 欠乏発現誘導遺伝子群では “response to stress” と “response to stimulus” が、N 欠乏発現抑制遺伝子群には N に関与している “cellular nitrogen compound metabolic process”, “cellular nitrogen compound biosynthetic process”, “nitrogen compound metabolic process”, “cellular biosynthetic process”, “biosynthetic process”, “metabolic process”, “nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process” が含まれていた。P 欠乏発現誘導遺伝子群では N に関与する “cellular nitrogen compound biosynthetic process”, “cellular nitrogen compound metabolic process”, 色素合成に関与する “pigment biosynthetic process” や “pigment metabolic process” 一方で P 欠乏発現抑制遺伝子群にも “cellular nitrogen compound metabolic process” が含まれていた。



Figure 7. Rice shoot (Koshihikari) growth under nutrient starvation treatments. Plants were grown by 2% MGRL medium for 14 days and transplanted from various nutrient concentrations on Nutrient medium for 21 days.



Upregulated genes



Downregulated genes

Figure 8. Venn diagram summarizing the up- or downregulated genes to nutrient deficiency in rice shoots. Genes were filtered by $FC > 4.0$ or $< 1/4$, Intensity > 500 and $p < 0.05$ in Array data from Takehisa et al 2015.

イネ地上部における各栄養元素発現誘導および抑制遺伝子の解析

N 特異的に発現誘導されていると判断された遺伝子群の機能を調査したところ、乾燥耐性に関連する *RESPONSIVE TO ABA GENE 16A (RAB16A)* や *Dehydrin DHN1*, *HSP* が特定できた。また N トランスポーター遺伝子および N 代謝関連酵素はこの遺伝子群には存在しなかった。P 欠乏によって特異的に発現誘導される遺伝子群では、P 欠乏応答遺伝子 *Phosphate starvation response regulator-like protein* や *Similar to Phi-1 protein*, 病害応答性遺伝子 *Thaumatococcus* やジャスモン酸誘導遺伝子 *Os12g0198700*, 傷害応答性遺伝子 *WOUND-INDUCED PROTEASE INHIBITOR 1 (WIP1)*, 重金属輸送に関与する遺伝子 *NAS3 (NICOTIANAMINE SYNTHASE 3)* が同定された。またこの遺伝子群も N 欠乏同様に transporter family や代謝に関わる酵素遺伝子群は確認できなかった。K 欠乏で特異的に発現誘導される遺伝子群は少なく、Mn トランスポーター *OsNRAMP2* や病害応答性遺伝子 *OsPR1b* や *Thaumatococcus-like protein* が含まれていた。

次に遺伝子発現が抑制された遺伝子群の機能を観察した。N 欠乏によって発現抑制されている遺伝子群には N 代謝に関わる *Asparagine synthetase* やアクアポリン *OsTIP2;2* が検出された。P 欠乏抑制遺伝子群では K トランスポーター *OsHAK1* や high-affinity urea transporter である *OsDUR3* が含まれていた。K 欠乏による発現抑制遺伝子群では発現誘導遺伝子と同様に濃度に依存せず共通して発現抑制する遺伝子は少なく、*Ferritin* や CYP450 family, *OsVIT2* で構成されていた。

栄養欠乏下のイネ地上部の遺伝子発現バイオマーカーの評価

トランスクリプトーム解析を基に栄養濃度に関わらず著しく発現誘導または抑制される遺伝子群より発現誘導上位または発現抑制下位 6 遺伝子を選抜し、遺伝子発現バイオマーカーとして以下の解析に用いた。様々な栄養濃度条件下で生育したイネ地上部で各栄養欠乏状態時にバイオマーカー遺伝子がマイクロアレイと同様な転写変化の傾向にあるか、また追肥処理によって発現量が対照区と同程度に回復するかを検証するために定量的 RT-PCR による解析を行った。21 日間栄養培地で生育したのち 7 日間完全欠乏培地で生育

したイネ植物体では、N および P 欠乏による発現誘導または発現抑制遺伝子はそれぞれマイクロアレイデータと同様の転写応答を示し、追肥処理区では発現量が対照区と同等に回復していることが確認できた (Fig. 10). 次に長期間栄養添加量を少なくした培地で生育したイネでも、先の実験と同様な結果を示すことが判明した (Fig. 11). マイクロアレイデータの実験系とは異なる 2 種の実験系で N および P 欠乏処理区のイネでバイオマーカー遺伝子の発現は高い特異性および高い感度を示し、また追肥処理によって発現量は対照区と同等程度に回復していた.

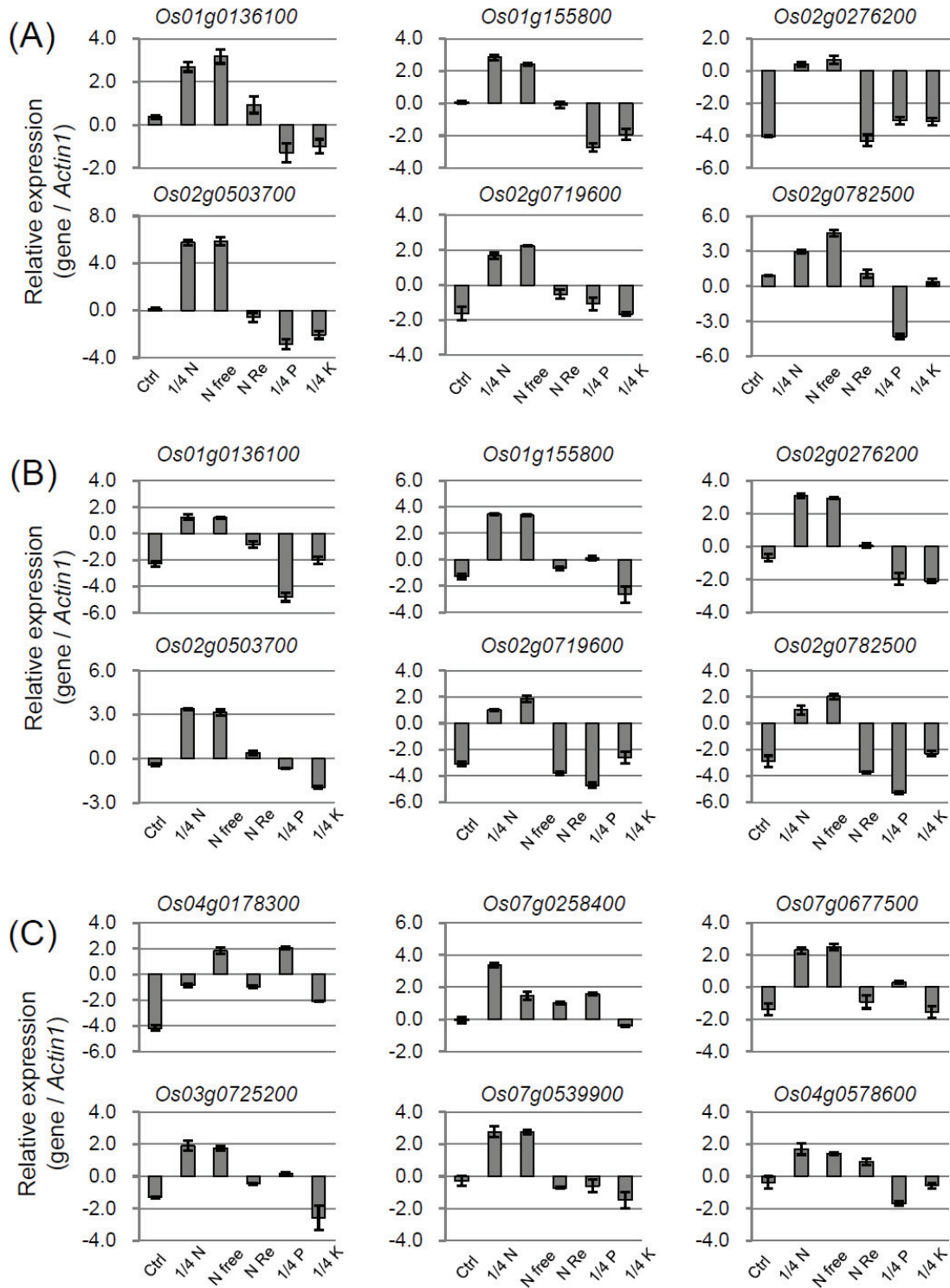


Figure 10. Transcript abundances of gene expression biomarkers in response to macronutrient deficiency in rice. Hydroponic culture-grown seedlings for 21 days were exposed to each nutrition condition for 7 days and then extracted RNA from 2nd leaf. qRT-PCR analysis was carried out in triplicate. Expression levels were normalized to the *Actin1* transcripts. Relative expression values (stress/control) are expressed. Different letters denote significant differences (Tukey test, $P < 0.05$).

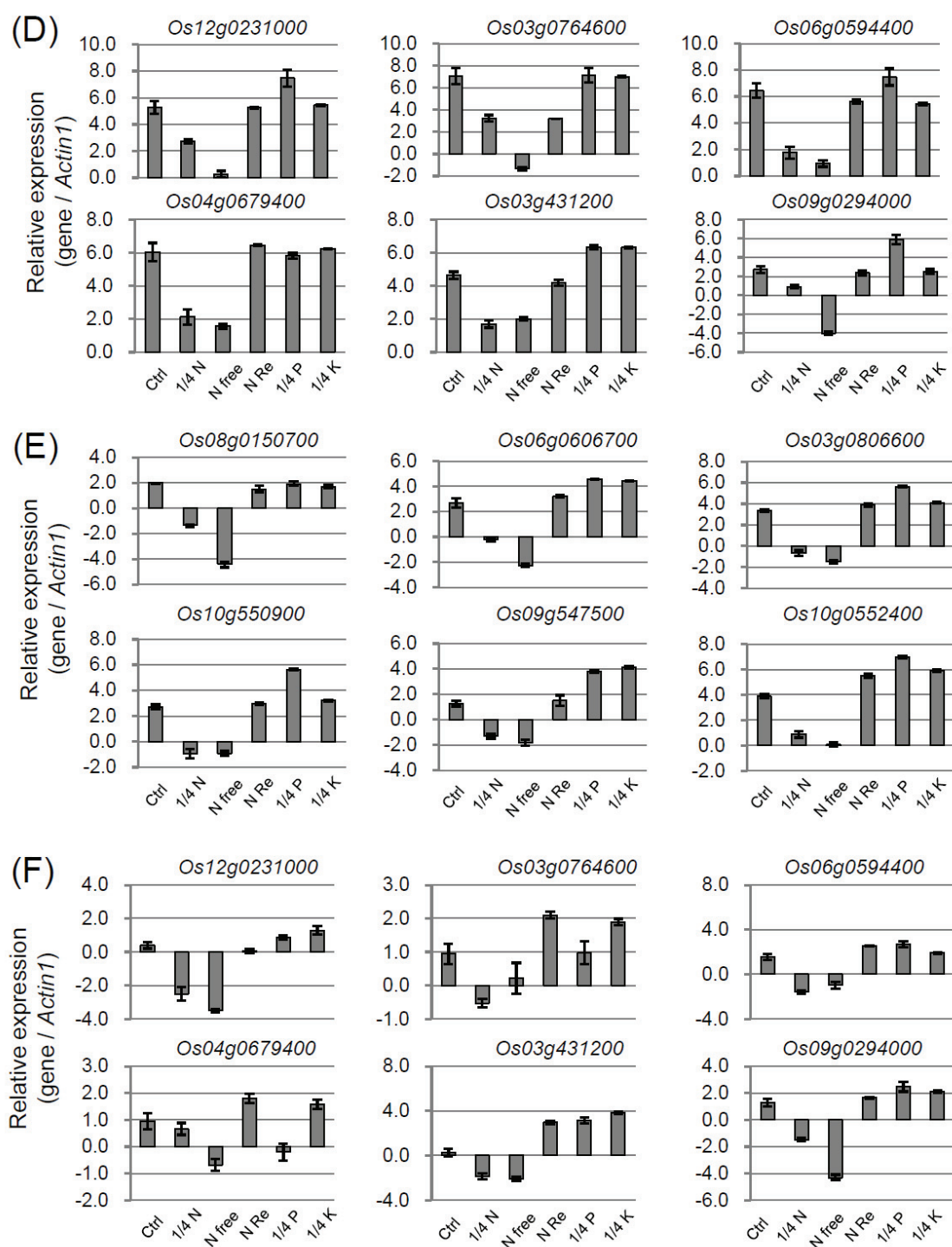


Figure 10. (Continued from previous page.)

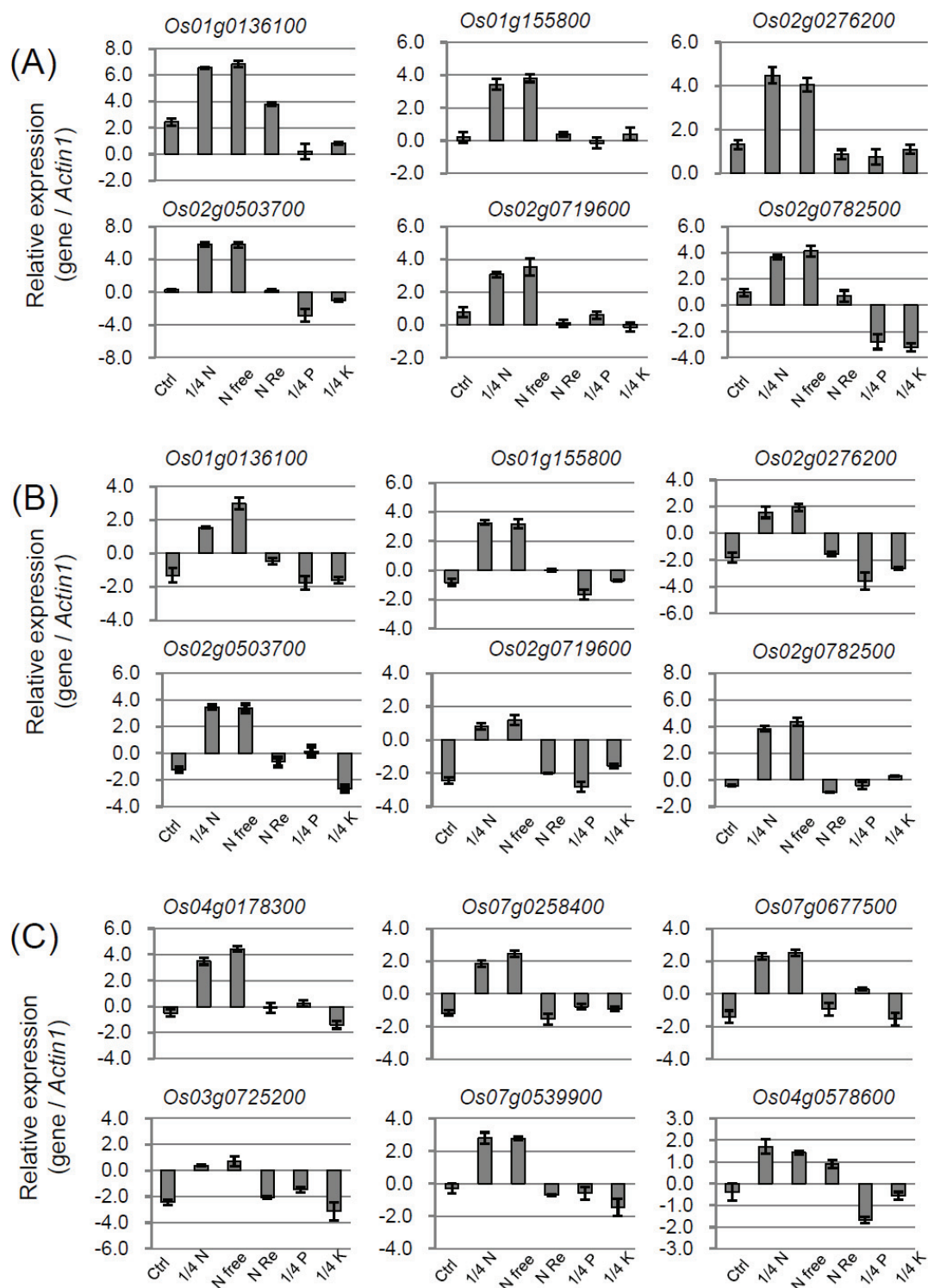


Figure 11. Gene expression of biomarkers are specific for each macronutrient. Biomarker expression values are from qRT-PCR assays of eight biomarker genes. Plants were grown by 1/50 MGRL solution for 1 weeks and were transferred 1/4, 1/10 and free nutrient solution for 7 days. V2 leaf stage then were sampled to extract total RNA. Relative expression patterns were calculated using levels of each genes transcripts normalized by housekeeping gene, Actin1. Means \pm SE were calculated from three biological replicates. Different letters indicate significant differences 5% level by Tukey test.

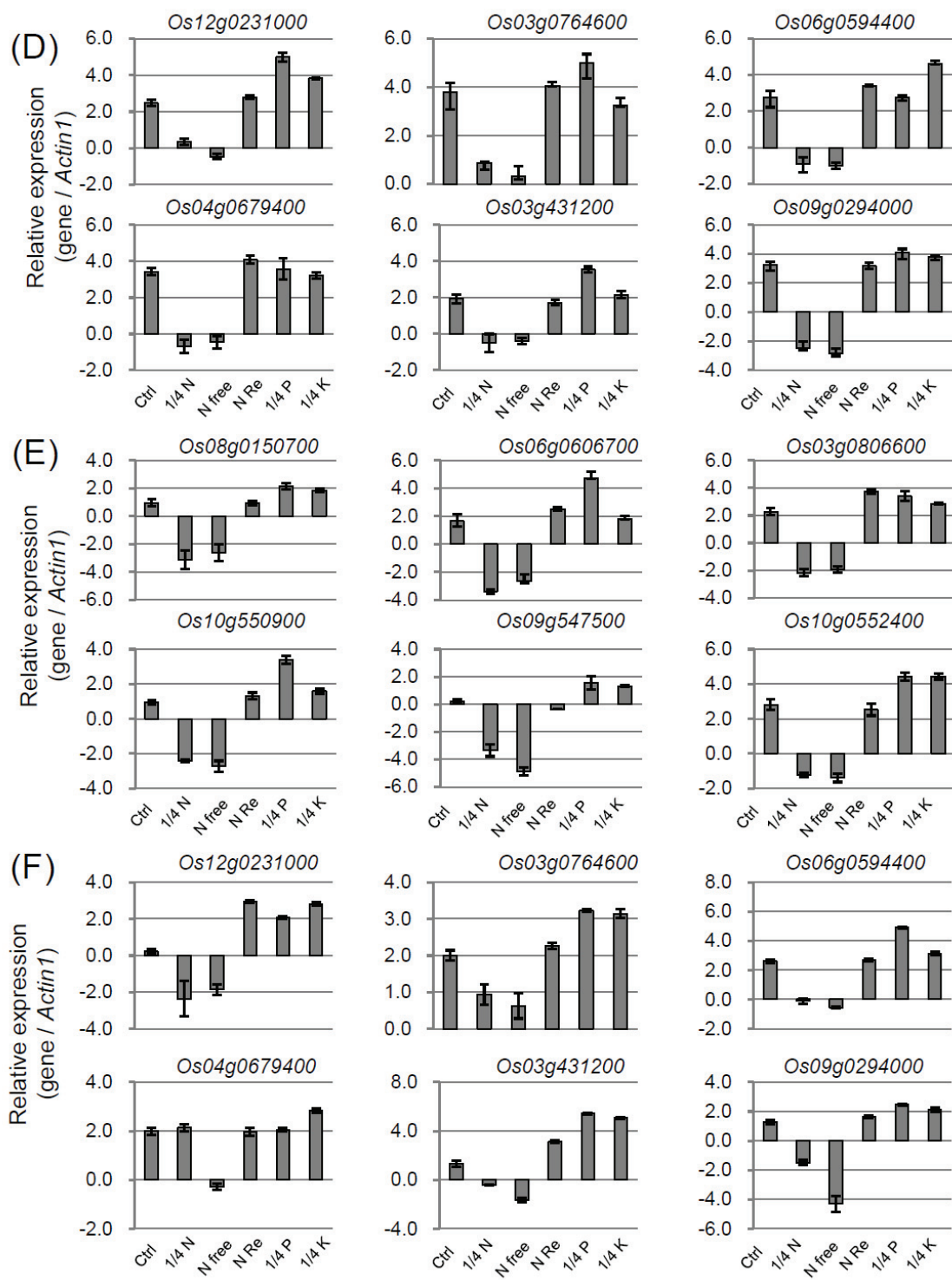


Figure 11. (Continued from previous page.)

1-4 考察

N, P, Kは植物に最も要求される元素であり，農業では肥料として作物の品質および収量を左右する重要因子である．分子生物学技術の発展と共に，これら 3 元素に関わる転写機構の解析は進められており様々な植物種でトランスクリプトーム解析が進められている (N: Jeuffroy et al., 2001; Kraiser et al., 2011, Krap et al., 2013, P: Hammond et al., 2003; Calderon-Vazquez et al., 2008; Hammond et al., 2003; Misson et al., 2005; Wu et al., 2003; Secco et al., 2013). しかしながら，N, P, Kに限っても地上部における転写制御に関わる統合的な解析は行われておらず，そのメカニズムの全貌は解明されていない．またストレス独自の転写応答であるかも不明であり，本研究は各栄養元素に対する独自または普遍的な植物の転写応答の理解と解明に貢献する研究として行った．

N 欠乏によるシロイヌナズナ地上部の遺伝子発現の変動の解析

これまでの研究から N 欠乏処理で N トランスポーター遺伝子や N 代謝に関与する酵素遺伝子が発現誘導されることが報告されている (Krapp et al., 2011). 本解析では N 欠乏発現誘導遺伝子群に N トランスポーター *NRT2.5* やグルタミンやアルギニンなどの化合物を輸送するアミノ酸トランスポーター *CAT5*, N 代謝酵素の存在が確認されたが，時間的に共通して発現している遺伝子はなく，ストレス期間が長期化することで発現誘導する遺伝子が変動することが示された．*MYB75* はアントシアニン生合成に関与する転写因子であり (Zhou et al., 2008), *MYB62* はリン酸欠乏に応答する転写因子であることが報告されている (Devaiah et al 2009). 表現型から植物体にはアントシアニンの蓄積がみられ，活性酸素に対する応答だと考えられる．GO 解析から “secondary metabolic process” や “cellular amino acid and derivative metabolic process” などの二次代謝産物に関与する機能の遺伝子が発現誘導していることから N 欠乏ストレスに対して二次代謝産物は重要な役割を果たしていることが推測される．

P 欠乏によるシロイヌナズナ地上部の遺伝子発現の変動の解析

ベン図解析より P 特異的発現誘導遺伝子群を特定したが、その多くが K 欠乏誘導遺伝子と高い親和性を示した (Fig. 2). この遺伝子群には無機リン酸 (Pi) 輸送体遺伝子 *PHT* family が含まれており、根圏部の Pi 欠乏に応答して地上部で転写変動が引き起こされていることが分かった. 2 日間および 7 日間の Pi 欠乏による発現誘導遺伝子群には *PDF1.3* および *PDF2.1*, *WRKY18*, *WRKY60* が確認できたが、これは多くの研究で報告されているように Pi 欠乏で病害応答性遺伝子が発現誘導されていることから、2 日間という短期間欠乏処理でも植物体地上部は迅速に応答することが証明された (Xu et al., 2006). さらに二次代謝産物生産に関与する合成遺伝子や転写因子が含まれていることから、植物は P 飢餓による酸化ストレスに対してアントシアニンを蓄積することで抵抗性を獲得していると考えられる. さらに病害抵抗性遺伝子の誘導が P 欠乏で誘導されており、長期間のストレスでもその応答が継続していることが応答遺伝子および GO 解析から推測できた. P 欠乏強誘導遺伝子が生物的ストレスまたは傷害ストレスで応答することは知られているが、GO 解析においても生物ストレスに関わる機能が検出された. (Uknes et al., 1992; Potter et al., 1993; Chen et al., 2002; Mahalingam et al., 2003).

K 欠乏によるシロイヌナズナ地上部の遺伝子発現の変動の解析

本解析では、K に関与する遺伝子として K 輸送タンパク遺伝子 *HAK5* が含まれていた一方で、他の K 輸送タンパク質をコードしている遺伝子 *HKT* および *AKT* の発現は確認できなかった. K 欠乏によるシロイヌナズナ地上部の転写変動は N 欠乏や P 欠乏と比較して転写が大きく変動する遺伝子が少なく、2 日間および 7 日間で共通して発現誘導または抑制される遺伝子群は少なく、GO 解析からも遺伝子機能の推察は困難であった. これは代替元素が存在しない N や P とは異なり K⁺ には代替元素である Na⁺ があり、ある程度の機能を補完している可能性が考えられる. 特異的応答性遺伝子の解析で細胞壁に関わる遺伝子や *SAUR-like auxin-responsive protein* が検出されたが、発現誘導遺伝子群および抑制遺伝子群とも特定されており、アイソザイムとして K 欠乏への応答に異なる機能をしている可能

性がある．今回検出された遺伝子では K に対するストレスの応答機構を解明することは難しく今後の詳細な解明が期待される．

モデル植物の栄養欠乏応答性バイオマーカーの特定

N および P は植物が最も必要とする栄養素である一方で過剰な投入によって環境汚染の一因となっている．投入量と植物体の栄養状態のギャップは大きく，リアルタイムで植物の栄養診断を評価するバイオマーカー検査は省資源型農業に大きく貢献するものといえる．本研究ではモデル植物であるシロイヌナズナおよびイネを用い各栄養素に特異的応答を示すバイオマーカー遺伝子の特定手法ならびに利用方法の確立を試みた．幼苗期における各栄養元素欠乏状態下のトランスクリプトームデータを基に遺伝子発現バイオマーカーの候補遺伝子を特定し，水耕および土耕栽培で生育した植物体を用いて栄養状態を評価した．定量的 RT-PCR 解析の結果，遺伝子発現バイオマーカーの発現量はマイクロアレイの再現性があることを証明した．また追肥処理によって対照区と同等の発現量まで回復しており，転写バイオマーカーで植物が健常状態へ回復することが確認できることを証明した (Fig. 4)．土耕で生育したシロイヌナズナ植物体では幾つかのバイオマーカー遺伝子が水耕栽培したシロイヌナズナのデータと異なる遺伝子発現量を示したが (Fig. 6)，これは土壌中の無機栄養の濃度は不均一であり，また土壌自体の化学性も種類により大きく異なっていることが考えられる一方で，多くの遺伝子発現バイオマーカーが様々な土壌や地域に適合する汎用性を有することが示唆された．

イネのバイオマーカー遺伝子を特定するために，比較的軽度の栄養欠乏処理である 1/4 量処理かつ重度な欠乏状態である 1/64 量処理で検知できる発現誘導および抑制遺伝子の探索を行った．ベン図解析より特定したバイオマーカー遺伝子を用い，定量的 RT-PCR による転写量の測定したところ短期間処理のイネでは，いずれのバイオマーカー遺伝子でも溶液中の元素濃度に関わらず，特異的な発現誘導を示した (Fig. 10, 11)．またこれらのバイオマーカー遺伝子は異なる生育期間や栽培条件でも高い感度で反応を示し，栽培条件が異なる環境でも一定の精度があることを証明した．しかし今回の実験は栄養成長期の植物体であ

り、生殖成長期の植物体に対応できるかは未知数である。公共データベースから獲得したイネ地上部の栄養欠乏マイクロアレイデータより、シロイヌナズナと同様の方法で特異的かつ著しく発現誘導または発現抑制される遺伝子を同定、活用することで、バイオマーカーで利用できることから、他の植物種においても作物への応用の可能性が高まると考えられる。

遺伝情報が不十分である植物種でバイオマーカー候補遺伝子を特定する指標として遺伝子機能に着目した。NとPでは輸送タンパク質または代謝酵素が有力であると考えられた。トランスポーターは様々な植物でも普遍的に存在するオーソログであり、植物種ごとのcDNAライブラリからも情報が入手できる。Pにおいてもイネ、アルファルファ *MtPT4* (Harrison et al., 2002), ジャガイモ *StPT* family, トマト *LePT* family (Nagy et al., 2005) が単離同定されている。特定の植物種へのオーソログに基づいた応用を考え、トランスポーター遺伝子や元素代謝酵素遺伝子を遺伝子発現バイオマーカーとして最適な候補であると考えられた。今回特定した遺伝子およびGO解析で各栄養元素の輸送タンパク質は存在しなかった。Yangら(2011)の報告からもN欠乏発現抑制バイオマーカーとして同定した遺伝子のGO annotationは”transporter”に属する遺伝子は少なかった。本研究で同定されたトランスポーター遺伝子として、N欠乏では *NRT* family や *URS*, P欠乏では *PHT* family 同定された。水耕栽培で栄養欠乏処理を行ったシロイヌナズナ地上部より特定した遺伝子発現バイオマーカーを土耕で栽培したシロイヌナズナの栄養診断用に多くのバイオマーカーが植物の栄養状態を評価できたことから、環境要因を排除しやすい研究室の実験系で栽培した植物のトランスクリプトームデータは様々な環境因子が存在するフィールド場でも応用できる可能性があることを示唆する結果となった。

栄養欠乏状態下にある植物の転写変動の総合的かつ統合的解析は栄養を効率的に輸送する形質転換植物体の作出に重要である。本実験では2つの植物種を用いて解析を行ったが、N, P, Kに共通して応答する遺伝子はほとんど見られなかったことからシロイヌナズナおよびイネ地上部は欠乏状態下での転写応答は各栄養元素特異的であることが明らかとなった。トランスクリプトームやメタボロームを用いたバイオマーカーを植物への研究として

様々な手法が研究されている (Phelix and Feltus, 2014). 本研究の実験方法でシロイヌナズナの遺伝子発現バイオマーカーは実際の農場を想定した土耕試験においても複数のバイオマーカーで栄養欠乏状態と特定できることが明らかになった. またシロイヌナズナ同様, イネ栄養欠乏ストレス下にある幼植物体の転写応答が, 長期生長植物体にも適用できることが示された. 現在, トランスクリプトームデータが公共データベースに多く集積されており, また次世代シーケンサーを用いた RNA-seq はゲノム解析されていない植物種でも転写解析が可能であり, 今後, 様々な植物種の栄養欠乏応答機構の理解がより進展すると考えられる. 蓄積されたオーミクスデータを活用することで, 栄養利用効率を高めた形質転換体作物の作出や遺伝子発現バイオマーカーを特定し作物の栄養管理を簡便化かつ最適化することができ, 過度な施肥と, それに伴って発生する環境汚染の防止のため省資源型農業の実現において重要な役割を担うと考えられる.

第2章

シロイヌナズナ地上部の根圏毒性イオン応答トランスクリプトーム プロファイリング

2-1 緒言

近年の地球規模の環境変化に伴い激しい気候変動、気温上昇、水資源の枯渇による農業環境の劣化が国際的な問題となっており、実際に世界の主要な作物であるコムギやトウモロコシの生産量は減少していることが報告されている (Godfray et al., 2010; Lobell et al., 2011). 2016 年に世界人口は 73 億人に達し、将来の人口増加に付随して深刻化する食料問題が懸念されている. 序論で述べたが作物の品種改良による単位面積の収量増加は限界にきており、そのため食料増産の方法として栽培面積の拡大が解決手段として挙げられる. しかしながら世界の土壌には農作物を栽培するには不適当な土壌である不良土壌が広く存在しており、これは耕作可能面積の 67%を占めているとされている. 耕作可能土壌の劣化が進んでおり、UNEP (国連環境計画) の調査では自然的または人為的要因によりこれまで 20 億 ha に及ぶ面積の土壌劣化が生じており、今後 20 年間に約 1 億 4 千万 ha もの肥沃な農地が土壌劣化によって失われると予測されている.

不良土壌は土壌中に様々なストレス因子を内包している. 酸性土壌は pH 5.5 以下の土壌と定義されている土壌で熱帯や亜熱帯に広く存在し、耕作可能土壌の 30%を占めるとされ、主に可溶化した Al が植物の生育を阻害する (Foy 1988). 石灰質アルカリ性土壌は pH 7.0 以上の土壌であり不良土壌の 50%を占め、そこでは 3 価の水不溶態鉄 (Fe_2O_3) となり Fe 吸収を阻害し植物の生長が抑制される. また塩類集積土壌の面積は陸地の 6.5%に相当する約 8 億 ha 以上を占めるとされており、さらに過剰な灌漑などによって Na をはじめとした塩類蓄積またはソーダ質化が進み、過剰なナトリウム (Na) や水ストレスにより作物生産性を低めている (FAO, 2005; Frommer et al., 1999; Flowers, 2004). また不良土壌は気候とも密接に関係しており、世界陸地の 1/3 は半乾燥また乾燥気候の地域ではアルカリ土壌ま

たは塩類集積土壌となり、土壌の水分が蒸発することで地表に塩類が集積し土壌中の Na やホウ素 (B) が植物の生育を阻害する。人間活動による環境汚染も不良土壌を作り出す要因であり、不適切な灌漑により土壌劣化が引き起こされ塩類集積土壌になることが問題視されている。他にも工業活動により工場や精錬所からの排煙や廃水がもたらす重金属汚染は植物の生育を著しく阻害し、加えて汚染された土壌で栽培された作物を食物連鎖を介して人間が摂取することで健康問題を引き起こしている。

増加する人口を賄うだけの食料生産を行うために不良土壌の開墾が必須であるが先述のように不良土壌には多種のストレス因子が存在しており現在の農業方法では安定的かつ低コストの作物生産の実現は難しい。そのため分子育種的手法による形質転換を用いたストレス耐性作物の作出が現実的な解決方法だといえる。植物は土壌中に存在するストレス因子に対して多様な耐性機構を備えている。近年、分子生物学的手法によって土壌ストレス耐性機構の解明が進展しており、多くの植物種からストレス耐性に関与しているタンパク質をコードする遺伝子が単離特定されている。土壌中の Al^{3+} に対する有機酸放出機構としてコムギやシロイヌナズナでは Al 応答性リンゴ酸トランスポーター遺伝子 *Al-activated Malate Transporter (ALMT)* family (Sasaki et al., 2004, Jurandir et al., 2007) や、ソルガム、トウモロコシなどでは *MATE (Multidrug and toxic compound extrusion)* family からクエン酸トランスポーターが単離同定されている (Magalhaes et al., 2007)。アルカリ性土壌や塩類集積土壌などでは Na が主要なストレス因子となるが、これは Na が細胞の浸透圧を調整する元素である一方で、過剰に存在すると浸透圧に変調をきたす毒性イオンになることに起因している。植物は高濃度の Na に対して細胞外への排出と液胞への隔離の 2 種類の適応方法を有している。*AtSOS1* は Na を細胞質から細胞外へ排出する Na/H antiporter として機能している (Wu et al., 1996; Shi et al., 2002)。また *AtNHX1* は *AtSOS* family と同様に Na/H antiporter をコードしているが液胞への隔離として機能し細胞質の Na を液胞へ輸送することで細胞毒性を回避している (Yamaguchi et al., 2005)。*Salt Overly Sensitive (SOS)* 経路は塩ストレス下でイオンホメオスタシスの維持に貢献している (Shi et al., 2000; Zhu 2000; Qiu et al., 2003)。土壌中に含まれる重金属元素は Fe

や Mn などの必須微量元素も含まれているが、As や Cd は有害元素であり、また必須元素であっても生体内で過剰に存在すると酸化還元反応により生じる活性酸素種で酸化障害を引き起こす。このため生体内の重金属濃度は厳密に調整される必要があり、この制御機構として重金属の無毒化と液胞への隔離が知られている。重金属と結合する様々なキレート物質が特定されており、ファイトケラチンやリンゴ酸やクエン酸といった有機酸が特定されている (Hall 2002; Nian et al., 2002; Shukla et al. 2012)。以上のように土壌中に存在する毒性イオンに対する植物の適応機構の理解と解明は大きく進展している。

本章ではシロイヌナズナを用い、酸性土壌の主要ストレス因子である Al、重金属汚染土壌のストレス因子である Cd および Cu、塩類集積土壌のストレス因子である NaCl に焦点を当て、これらの根圏毒性イオンによるシロイヌナズナ地上部の転写変動をマイクロアレイによって測定し、比較トランスクリプトーム解析を行うことで各ストレスに対する地上部の分子生理学的反応のプロファイリングを行った。また比較トランスクリプトーム解析を基に各根圏毒性イオンに特異的に応答する遺伝子発現バイオマーカーの候補遺伝子を特定し、不良土壌での農耕地で作物の状態管理技術の知見を深めることおよび技術の手法の開発を目的として研究を行った。

2-2 実験材料および方法

供試植物

本研究では Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) より入手したシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* Col-4 (Col-4) 種子を用いた。また日本たばこ産業 (JT) から入手した *Nicotiana tabacum*. L cv Xanthi と NtSTOP1 を RNA 干渉し発現を抑制した組み換えタバコ植物体 (NtSTOP1-RNAi 株) を用いた。

毒性イオンストレス処理

シロイヌナズナ種子を 4°C で 3 日間吸水処理し、2% 濃度 MGRL 溶液でフロート式水耕法によって 10 日間栽培した。その後、幼植物体の根部をイオン交換水で洗浄したのち対照区 (MGRL 溶液から P を除き、pH 5.0 に調整) および 25 μ M AlCl₃, 15 μ M CdCl₂, 1.6 μ M CuSO₄, 50 mM NaCl 処理区 (MGRL 溶液から P を除き、pH 5.0 に調整、ただし Al は pH 4.95) に移し連続照明状態によって 24 時間処理を行い幼植物体地上部を回収、-80°C 冷凍庫で保存した。なお生育およびストレス処理実験の栽培条件は第 1 章と同様の環境で行われた。

RNA 抽出

RNA 抽出および LiCl 処理、DNase 処理は第 1 章と同様の方法で行った。

マイクロアレイ解析およびデータ整理

マイクロアレイは Agilent Arabidopsis 3 Oligo Microarray Chip (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) を用い、それぞれ Cyanine-5 (Cy5) または Cy3 を用いた 2 色法による解析を行った。実験手順は Agilent プロトコルに従って行った。毒性イオンストレスに対する転写反応を観察するため、対照区と 4 種のストレス処理区で生育したシロイヌナズナ地上部のマイクロアレイを行った。また実験再現性を高めるため、色素を入れ替えたダイスワッ

プを含めた各 3 連で行った。データのクオリティチェックとして、フラグで Absent が立った遺伝子を排除し、各マイクロアレイ実験系で発現誘導遺伝子として対象のストレス処理実験系において $FC > 2.0$, $Intensity > 500$, $p < 0.05$ の遺伝子を、また発現抑制遺伝子として $FC < 0.5$, $Intensity > 500$, $p < 0.05$ の遺伝子を抽出しデータセットとして以後の解析に用いた。

階層的クラスター分析

毒性イオン処理による発現誘導遺伝子をベン図解析によって特定した。解析より根圏毒性イオン特異的と判断された遺伝子群を階層的クラスター分析で分類した。階層的クラスター分析ソフトウェアとして Cluster 3.0 (Eisen et al., 1998 ; <http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm>) を用い作製された .cdt (Clustered data table) ファイルを可視化ソフトウェア JavaTreeView (<http://jtreeview.sourceforge.net/>) を用い、ヒートマップおよび樹形図を作成した。また Pearson の相関係数により遺伝子間の転写量変動の相関性を計算した。いくつかの遺伝子グループに分け、グループ間の Fold change 平均値に対して Scheffe 検定 ($P < 0.05$) を行った。各毒性イオンストレスによって強誘導される遺伝子群からストレス特異的応答をする遺伝子の発現量から RFC (Relative fold change; stress expression level / other stress expression level) で算出し特定した。

共発現遺伝子解析

ストレスに共通して発現誘導する遺伝子の特定および共発現遺伝子ネットワーク解析を行うため、PRIME (Platform for RIKEN Metabolomics; <http://prime.psc.riken.jp/>) の “Correlated Gene” を用いた。設定は “Method” を “interconnection of sets” , “Threshold value” を 0.6 に設定し、データを Pajek software (Batagelj and Mrvar) で視覚化し、Cytoscape 3.1 (<http://www.cytoscape.org/>) でネットワークを描写した (Shannon et al.,

2003). ネットワークを形成した遺伝子を GENEVESTIGATOR で他のストレスで応答するか調査した.

根圏毒性イオン応答性バイオマーカーの探索

植物の根圏毒性イオンのストレス状態を診断するために, 発現誘導された遺伝子から遺伝子発現バイオマーカーの作成を行った. Al, Cd, Cu および NaCl ストレス応答性バイオマーカー遺伝子の特定を行うため, 階層的クラスター分析より, ストレス特異性の高い遺伝子の選抜し, qRT-PCR を用いて解析した. なお本解析で用いたプライマー配列を Table 5 に記載した.

土耕試験を用いた Al ストレス応答性バイオマーカーによる検査

対照区の中性土壌は蔵王より採取した褐色森林土を使用した. 酸性土壌処理区として東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター (川渡センター) で採取された酸性黒ボク土を用いた. なお酸性土壌処理区は CaCO_3 添加量を対照区と比較して 1/10 量, 1/4 量の処理区を設けた. 吸水処理をしたシロイヌナズナ種子 30 粒をピペットマンにより土壌に播種し, 土壌表面が乾燥したらイオン交換水を添加した. 生育が揃った植物体を選抜し 28 日間生育した. 各処理区の土壌に添加した多量元素の構成および栽培環境は第 1 章の土耕試験と同様の条件で行った.

タバコの Al 応答遺伝子バイオマーカーの特定

タバコ種子の発芽勢を揃えるため 5 倍希釈した次亜塩素酸ナトリウムで 7 分振盪処理した後, イオン交換水で 5 回洗浄し, 4°C で 4 日間低温吸水処理を行った. 栽培環境, 水耕栽培方法はシロイヌナズナと同様の環境条件および方法で行った. ただしメッシュは (40 meshes per inch) をプラスチックマウントに挟んだものを使用した. 10 日間栽培したタバコ野生株および NtSTOP1-RNAi 株を Control 溶液, $4\text{ }\mu\text{M}$ および $10\text{ }\mu\text{M}$ Al 処理溶液 (2% MGRL, pH 5.0, P 抜き) で 24 時間処理し, その後地上部をサンプリング, Suzuki らの

方法で RNA を抽出, cDNA を作成し, 定量的 RT-PCR 解析を行った.

活性酸素ストレス応答トランスクリプトーム解析

根圏に存在する毒性イオンは, 各イオン種が引き起こす独自の障害と活性酸素の発生による障害があると考えられている. シロイヌナズナ根部で 4 種の毒性イオンおよび過酸化水素によって発現誘導された遺伝子を特定し, 活性酸素の発生によって誘導される特異的な応答機構の解析を試みた. 全てのマイクロアレイデータでフィルタリングを行い, 発現誘導された遺伝子および抑制された遺伝子群を調べた. 活性酸素誘導遺伝子群の GO 解析を ClueGO で特定した. さらにその遺伝子群の共発現ネットワーク解析を行い, 活性酸素誘導ネットワークを作成した. 共発現ネットワーク解析には CORNET 3.0 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/cor-net/>) を用いた (De Bodt et al., 2010, 2012). マイクロアレイデータは“Abiotic stress TAIR10”, “Leaf TAIR10”, “Root TAIR10”, “Microarray compendium 2 TAIR10”を用いて共発現解析を行った. クオリティコントロールとして Pearson 係数 > 0.8 , $P < 0.05$ で設定し, Pairwise correlations に設定した. また転写因子では AGRIS (arabidopsis.med.ohio-state.edu/) で特定した. Cytoscape 3.0 で可視化し, 解析を行った.

地下部転写の比較トランスクリプトーム解析

先に行ったシロイヌナズナ地下部でイオンストレス処理トランスクリプトームデータを基に, 地上部の応答との比較トランスクリプトーム解析を行った. 地下部のトランスクリプトームデータは Zhao ら (2009) が用いたデータであり Arabidopsis Oligo DNA microarray ver 2.0 のため, 地上部の ver 3.0 と ver 2.0 を同時解析するためにプローブを統一し, 18563 プローブにした. フィルタリングとして各ストレス 3 連の遺伝子発現量が $FC > 2.0$ かつ $p < 0.05$ を条件にした.

Table 5. Primer sequences used for qRT-PCR of rhizotoxic ion biomarker genes.

GeneName		Sequence(5'-)		Sequence(5'-)
At5G38200	F	CTCATGGGGTATGATTACTC	R	CTCTCATCCCAGAGAGAATAGG
At1G09350	F	GTTTCTGCGAGAAGACTTGGAG	R	GGAGGGACAACCTTTGAGTGTC
At2g37330	F	TATCGATCCTTGCCGGGACTTCA	R	GCTTGTCTTGCGTGTGCTCCTA
At5g06860	F	TAAACCAAGCTTATCTCTAGGATTA	R	CCATCAAATAAAACATTTTGAAAATGTGC
At5g17330	F	ACAGGAAGAAGACGAGTGGTAT	R	GAAACTTGGTTCAGTAATAAAGGGA
At5g12940	F	TCGATGGGAACCTTGATCTCC	R	TGAAGACGATTGTTCCGAAG
At5g54060	F	TTGTGATGTATCCGTGGTTAGC	R	GATGGTGTGGAAAGTGATGAG
At2g41510	F	CCAAAGTCCTGGACAGACTACC	R	GTTCAGAATTCCGCTTCTCAG
At5g05270	F	GGGAATGATGCAGAGATGG	R	AGCAGGAACTTGACAAGAGG
At5g17220	F	GGCTGACGTGGAGACCTATTAC	R	CTTTGAGATCCTCGACCAAAAAC
At4g38340	F	AAGTCACCACCTTCGTCATC	R	CTGAGAGCTGGTTTTTGGAAG
At1g61360	F	GGTAGATGTGGACCTTTTGG	R	CCCTGCGTTTCTACAGAAGAG
At4g15100	F	GTGCGAGACAACATCGTAGAAG	R	CTCTTCCGTTGGATTTATCGAC
At5g19110	F	CTCTCTCTGCTTGCCTTC	R	CTTGGAATCGGATTATCGCTAC
At1g73325	F	CAAAGTCAAGCATGTTTCAGCTC	R	CTGACCACCAATGCTTACAAAG
At1g66370	F	GAAAACCTCTGCTCCGATGAAG	R	CATCGTTCATCGTGCTTCTTAC
At1g43160	F	GCAATGGCCAGTATCACTAC	R	GAAATTGCGGTGGTAGACAAG
At2g26370	F	GCAGTCACTCCCTCATAAGG	R	CAGGGTTATCGAACTCAACAC
At5g59310	F	CTGTGCAGGAGTCAAAAAGTTG	R	GCCAGAGGCTAGACTTGGATTA
At3g13784	F	GTCGTCACCGGAGAAAGATAAC	R	CGACCCTCCTTTCAATAGTTTG
At1g52690	F	CTGCACAAACGACTCAAGAGAG	R	GGTCTTCTCCTTACCTGCTTC
At4g33550	F	GGAAGTGGCATGATAAGGAC	R	TAGAGCACAACAAGACCGAG
At5g05410	F	CTTAATTTCCCTCGGTCTGATG	R	GCACCATTCTCCAGACAATAC
At1g13310	F	CTCTTGTTCCTCGGCTTCAG	R	GTAATGCATCATCGTCATCG
UBQ1(internalstd.)	F	TCGTAAGTACAATCAGGATAAGATG	R	CACTGAAACAAGAAAAACAAACCCT
NtALS3	F	TCGCGATGACATCAAGATACAA	R	CAGGAGATAGAGCAATAACCAACGA
NtActin (internalstd.)	F	AACCCCAAGGCCAATAGAGAA	R	GAGACACCATCACCAGAATCCA

2-3 結果

根圏毒性ストレスによるシロイヌナズナ地上部の応答遺伝子の解析

水耕栽培系による高濃度の毒性イオンの根圏部への処理でストレス耐性に関与する遺伝子が強誘導されることが報告されている (Zhao et al., 2009). 本研究も同様の手法により, 根圏毒性イオンによって発現誘導されるシロイヌナズナ地上部のストレス応答遺伝子の探索を行った. その結果, Al 処理で 188 遺伝子, Cd 処理で 361 遺伝子, Cu 処理で 547 遺伝子, NaCl 処理で 255 遺伝子が選抜された. この遺伝子群を用いてベン図で解析した.

全イオンで発現誘導された遺伝子群

4 種の毒性イオンに共通して強誘導された遺伝子は 16 遺伝子であった (Fig. 12A). Fe 欠乏応答転写因子 *BHLH101* や *bHLH* 転写因子 *PYE (POPEYE)*, Fe 欠乏応答遺伝子 *ORG1* や *At5g05250*, *At1g47400* が検出された. 浸透圧ストレス応答遺伝子として, *LEA (late embryogenesis abundant)* やガラクトキノール合成酵素 *GOLS2 (GALACTINOL SYNTHASE 2)*, 乾燥耐性転写因子 *DREB1A (DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING)* が発現上昇していた. 病害応答性またはジャスモン酸応答遺伝子で誘導される遺伝子 *At1g17745*, *At4g23680* が発現誘導していた.

Al ストレス発現誘導遺伝子

Al 特異的誘導遺伝子群は 122 遺伝子であり Al 誘導遺伝子の 64.9%を占めていた (Fig. 12A). この遺伝子群では, *ALS3 (ALUMINUM SENSITIVE 3)*, *PGIP1 (POLYGALACTURONASE INHIBITING PROTEIN 1)*, K 輸送タンパク質 *KUP6 (K⁺ uptake permease 6)* といった Al や低 pH 耐性に関与すると報告されている遺伝子が検出された. N 輸送タンパク質 *NRT family (Nitrate transporter)* や N 代謝に関連する遺伝子 *GAD1 (Glutamate decarboxylase 1)* や *GDH1 (GLUTAMATE DEHYDROGENASE 1)*, C

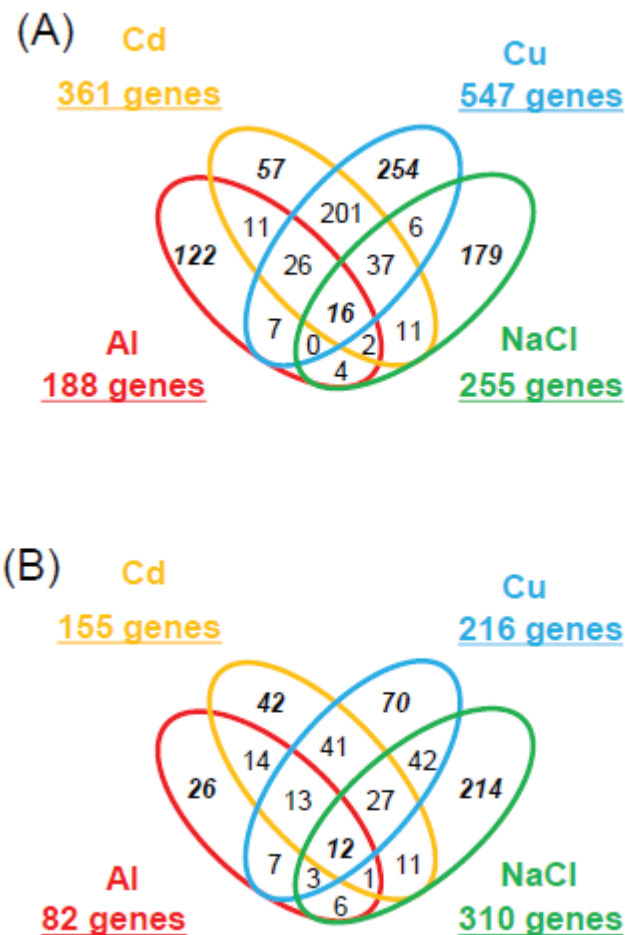


Figure 12. Venn diagram of the most-upregulated genes in the shoots of *Arabidopsis* under rhizotoxic stress conditions. The shoot transcriptome was analyzed 24-h after rhizotoxic treatments to roots. *Arabidopsis* seedlings were precultured hydroponically for 10 days and then roots were exposed to rhizotoxic solutions containing AlCl_3 (25 μM), CdCl_2 (15 μM), CuSO_4 (1.6 μM), or NaCl (50 mM), which induced 90–100% inhibition of root growth. Transcriptomes of the shoots were analyzed for three biologically independent samples and genes with fold change [rhizotoxic treatment/no toxin (control)] >2.0 relative to the mean of three replications, with $P < 0.05$ (t test), were used for Venn diagram analysis.

代謝に関連する遺伝子 *CA1* (*CARBONIC ANHYDRASE 1*) が含まれていた. さらに病害応答性遺伝子 *PR5* (*Pathogen-related gene 5*) や浸透圧ストレス応答性遺伝子 *GOLS3*, 乾燥ストレス応答遺伝子 *ERD3* (*EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 3*) や *DREB1A*, *CBF*, *DR4* (*Drought-repressed 4*), *RD19* (*Responsive to Dehydration 19*) が強誘導されていることが確認された. ベン図によって特異的と判断された遺伝子群の Gene ontology enrichment 解析の結果を Table 2-1 に載せた. Biological process において, “response to abiotic or biotic stimulus”, “response to stress”, “transport”が有意に高く, “cell organization and biogenesis”, “developmental processes”, “protein metabolism”が発現抑制されていた (Table 6).

Cd ストレス特異的誘導遺伝子群

Cd ストレス応答のトランスクリプトームデータより Cd 発現誘導遺伝子のうち 16%が Cd 特異的応答遺伝子と判断された (Fig. 12A). この遺伝子群には Fe 欠乏応答転写因子 *bHLH039*が含まれていた. 二次代謝産物合成系遺伝子 *DFR* (*dihydroflavonol 4-reductase*), *chalcone-flavanone isomerase*, さらにアブラナ科特有の二次代謝産物であるグルコシノレートの合成制御に関与している転写因子 *MYB122*が検出された. またエチレン応答性遺伝子 *ETR2* (*Ethylene Response 2*) や *ERF9* (*ethylene-responsive transcription factor 9*) が特定された. この遺伝子群の GO annotation 解析の結果から Biological process では “response to stress”, “response to abiotic or biotic stimulus”, “other biological processes”に関連する遺伝子が有意に含まれていると判断された (Table 6).

Cu ストレス特異的誘導遺伝子群

Cu による強誘導遺伝子群 547 遺伝子から今回の解析で 254 遺伝子が Cu 特異的と判断され, これは 41%を占める割合であった (Fig. 12A). この遺伝子群は, 先の Cd ストレス同様に二次代謝産物生合成遺伝子によって構成されていた. アントシアニン生合成に関与している転写因子 *MYB90*, *MYB113* が検出された. また *CYP450* (*chytocrome P450*) family

Table 6. GO distribution of the gene groups identified by the comparative microarray approach. Genes highly upregulated by each stressor (A), and those grouped by Venn diagram (B) were classified by GO of biological processes using the TAIR 10 through the bio-analytic resource for plant biology database.

(A) highly upregulated gene by each rhizotoxic stressor					
GO category	Al ion	Cd ion	Cu ion	NaCl	
cell organization and biogenesis	0.5*	0.82*	1.04*	0.73*	
developmental processes	0.76*	1.02	0.99	1.06	
DNA or RNA metabolism	0.16*	0.51*	0.44*	0.12*	
electron transport or energy pathways	1.3	0.22*	0.44*	0.64	
other biological processes	3.41*	2.7*	2.13*	2.58*	
other cellular processes	0.96	1.15*	1.26*	1.16*	
other metabolic processes	0.97	1.27*	1.32*	1.26*	
protein metabolism	0.54*	0.5*	0.67*	0.92	
response to abiotic or biotic stimulus	2.92*	2.64*	2.22*	3.17*	
response to stress	2.86*	2.77	2.37*	3.11*	
signal transduction	1.65*	1.68*	1.65*	3.28*	
transcription,DNA-dependent	0.74	1.07	0.96	1.65*	
transport	2.22*	1.36*	1.56*	1.45*	
unknown biological processes	0.7*	0.48*	0.61*	0.63*	

(B) gene group by specific induced genes by Venn diagram					
GO category	Al ion	Cd ion	Cu ion	NaCl	Cd and Cu
cell organization and biogenesis	0.35*	1.5	1.41*	0.62*	0.63*
developmental processes	0.43*	1.59*	1.19*	1.13	0.75*
DNA or RNA metabolism	NA	2.15	0.84	NA	NA
electron transport or energy pathways	1.67	0.71	0.64	0.91	0.20*
other biological processes	3.19*	2.99*	1.69*	2.4*	2.30*
other cellular processes	0.89*	1.34*	1.42*	1.23*	1.2*
other metabolic processes	0.87*	1.46*	1.39*	1.32*	1.30*
protein metabolism	0.61*	1.03	0.99	1.19*	0.42*
response to abiotic or biotic stimulus	2.75*	2.14*	1.65*	3.49*	2.90*
response to stress	2.43*	2.06*	1.6*	3.51*	3.10
signal transduction	1.51*	0.99	1.39*	4.03*	1.90*
transcription,DNA-dependent	0.61	1.89*	0.93	1.74*	0.85
transport	2.24*	1.55*	1.77*	1.66*	1.3*
unknown biological processes	0.86*	0.47*	0.74*	0.62*	0.45*

(A) Gene groups that were highly induced by each treatment. (B) Gene groups that were uniquely induced by a Venn diagram (see Figure 1). Genes in the whole genome were also categorized (A). Significance difference from the whole genome was shown with asterisks (chi-square test, $P < 0.05$). GO distribution of upregulated gene group within Al (188 genes), Cd (361 genes), Cu (547 genes) and NaCl (255 genes), respectively. NA indicate absence of genes belong to the category.

が多く検出されており、シトクロム P450 は生体内で様々な反応に関与している酸化還元酵素であるが、二次代謝産物合成に関与しているものも多く存在しており、過剰な Cu によって誘導されている CYP 群は酸化ストレスに対する防御応答に役割を果たしていることが推察される。MYB14 は乾燥ストレスだけではなく、虫害においても発現誘導することが分かっている。また植物ホルモン関連遺伝子として *ERF* や *JAZ* family, *LOX3*, *MYC* などが強誘導されていた。Cu 特異的誘導遺伝子群の GO の結果から “response to stress”, “response to abiotic or biotic stimulus, other biological processes” ならびに “signal transduction, transport”, “other metabolic processes” が顕著に発現変動している遺伝子機能であることが示された (Table 6)。

Cd, Cu ストレス共通発現誘導遺伝子群

Cd および Cu に共通して発現誘導される遺伝子として 201 遺伝子が同定された (Fig. 12A)。 *bHLH38* や *bHLH100* といった Fe 欠乏応答転写因子群や、二次代謝産物関連遺伝子 AACT や、病害応答抵抗性遺伝子 *PDF1.2A* や *PDF1.2B*, *PDF1.2C*, エリシターペプチド (At5g09980), さらにその病害応答シグナル伝達に関与しているジャスモン酸の応答性遺伝子である *JAZ1* や *JAZ9*, *LOX1* などの遺伝子が発現上昇していた。また活性酸素除去に関連するペルオキシダーゼが多く検出され、Cd ストレスや Cu ストレスで発現誘導が確認されている *cytochrome P450* family が誘導されていた。GO 解析から “other biological processes”, “other cellular processes”, “other metabolic processes”, “response to abiotic or biotic stimulus”, “response to stress”, “signal transduction”, “transport” が有意に発現誘導されていた。ベン図の遺伝子分類からも Cd, Cu 共通で発現誘導されている遺伝子群は多く、Cd および Cu 特異的誘導遺伝子群の結果と類似していた (Table 6)。

NaCl 特異的誘導遺伝子群

NaCl によって発現誘導された 255 遺伝子のうち 179 遺伝子 (71%) が NaCl 特異的に発現誘導されている遺伝子だと判断された (Fig. 12A)。そのなかで乾燥応答転写因子

DREB2A や浸透圧ストレス応答遺伝子 *LEA* (*LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT protein*) が検出された。また *HSP* や *HSPA2* (*HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A2*) といった高温ストレス誘導性の遺伝子の発現が誘導されていた。脂質転移タンパク質 *LTP* やシグナル伝達に関わる CML family が多く含まれていた。GO annotation の結果から Biological process で “response to stress”, “response to abiotic or biotic stimulus”, “other biological processes”, “signal transduction”, “transport”, “transcription, DNA-dependent”, “other metabolic processes”, “other cellular processes” が有意に強誘導されている機能と判断された (Table 6)。

根圏毒性イオンによって発現抑制された遺伝子群

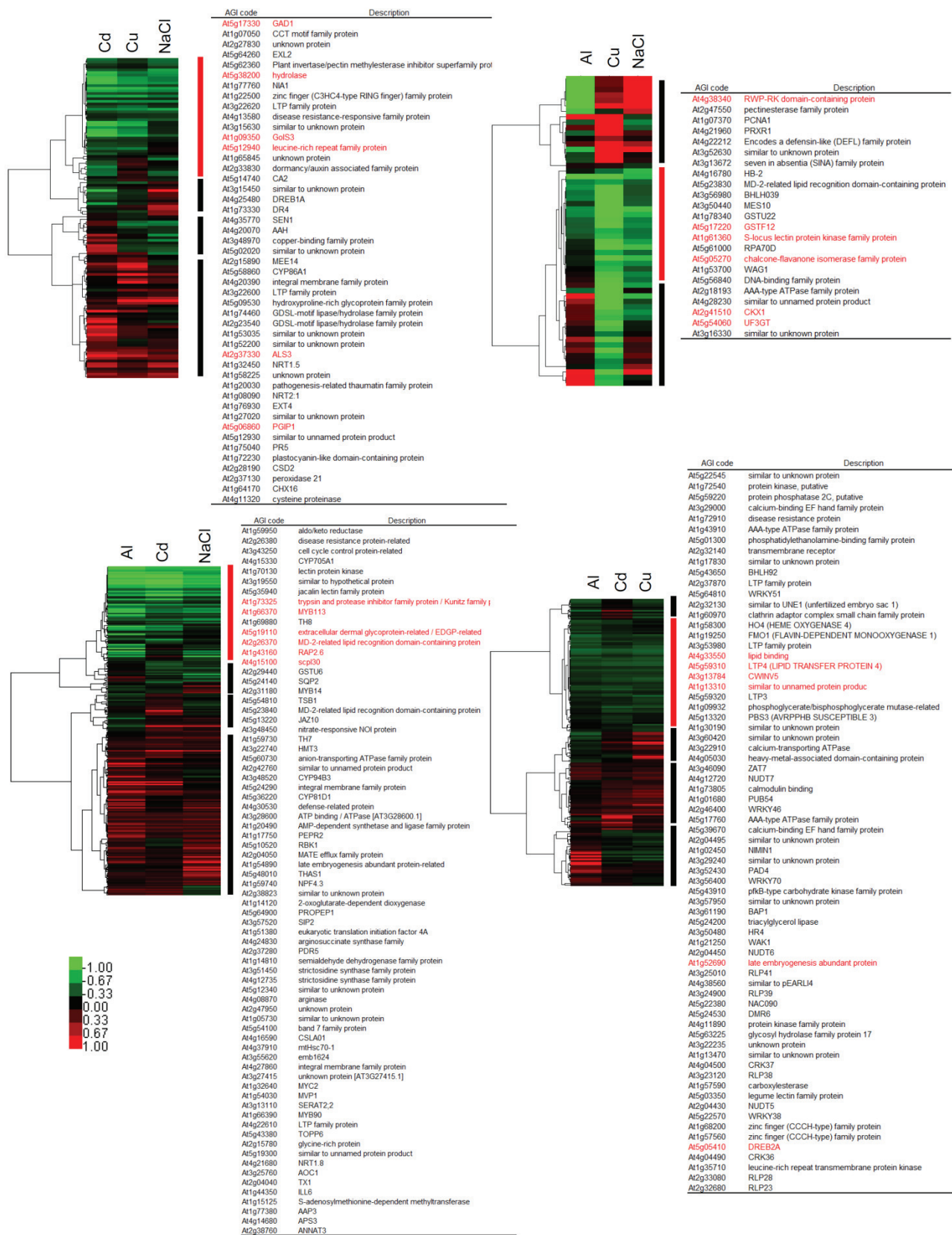
4 種の根圏毒性イオンで発現抑制された遺伝子について、先の発現誘導遺伝子群の解析と同様の方法で抽出した (Fig. 12B)。全ての毒性イオンストレスで発現抑制された遺伝子として鉄貯蔵タンパク質をコードする *FER1* や *FER4* が存在した。各毒性イオンストレスに抑制されている遺伝子としては重金属輸送に関連する遺伝子群が大きく抑制されていた。重金属輸送トランスポーター *ZIP* (*Zinc Transporter precursor*) family や *IRT*, *Yellow Stripe Like* (*YSL*) が発現抑制されていた。Al ストレスによる発現抑制遺伝子群として、ベン図より、Al 特異的に抑制された遺伝子は 82 遺伝子存在した。この遺伝子群には、重金属関連遺伝子が含まれており、*ZIP4* や *ZIP9*, *YSL3* といった重金属トランスポーターやニコチアミン合成酵素遺伝子 *NAS* や *FER* が発現抑制されていた。また二次代謝産物合成に関与する *PAP27* (*purple acid phosphatase 27*) や病害応答性レセプター遺伝子 *FLS1* の発現が抑制されていた。Cd ストレスによる発現抑制遺伝子群として、Cd 特異的に抑制されたと判断された遺伝子は 42 遺伝子存在した。セルロース合成系遺伝子である *CSLG1* やカロース合成系遺伝子 *GSL11* があった。また重金属トランスポーター *YSL1* が含まれていた。リン酸欠乏や酸化ストレスに応答する遺伝子 *PAP9*, *PAP10*, *PAP24* が特定された。Cu ストレスによる発現抑制遺伝子群として、Cu ストレスによって特異的に発現抑制された遺伝子は 70 遺伝子存在した。Cu ストレスによる発現抑制遺伝子として *MTPA1* (*METAL*

TOLERANCE PROTEIN A2), *YSL2*, *FRO2*などの重金属トランスポーター遺伝子が特定された。多くの転写因子や *kinase* 類も発現が抑制されており、このなかに植物ホルモンや病害応答性に関与する遺伝子が含まれていた。またフラボノール合成に関与する転写因子 *MYB111* が検出された。NaCl ストレスによる発現抑制遺伝子群として、NaCl ストレスによって抑制されるシロイヌナズナ地上部の遺伝子は 214 遺伝子検出された。特徴的な遺伝子群として、*SAUR-like auxin-responsive protein* を含めたオーキシン応答遺伝子が 12 遺伝子含まれていた。他の 3 種の毒性イオンとは異なり金属輸送に関連する遺伝子は含まれていなかった。

毒性イオン特異的応答遺伝子を用いた遺伝子発現バイオマーカーの作成

ベン図で特定した発現誘導遺伝子群を階層的クラスター分析を用い各ストレスで、より特異的な発現誘導を示す遺伝子の特定を行った (Fig. 13)。Al ストレスでは 47 遺伝子には STOP1 下流遺伝子である *ALS3* や *PGIP1* が含まれていた。また N 関連遺伝子 *NRT1.5* や *NRT2.1*, *NIA1*, *GAD1*, 浸透圧ストレス応答遺伝子 *GOLS3* や *DREB1A*, *DR4* が特定された。Cd ストレスでは Fe 欠乏応答転写因子 *BHLH039* や二次代謝産物合成遺伝子 *chalcone-flavanone isomerase-like protein* や活性酸素除去系が検出された。Cu 特異的発現誘導遺伝子クラスターでは N トランスポーターや MATE family をはじめとしたトランスポーター類, *JAZ* family などの植物ホルモンおよび病害応答性遺伝子, さらに *CYP P450* family が分類された。NaCl 特異的発現誘導遺伝子クラスターには *DREB2A*, *LEA protein*, などの乾燥応答性遺伝子や *calcium-binding protein CML45* などのシグナルに関わる遺伝子群が特定された。

階層的クラスター分析から発現量の高い遺伝子を同定し遺伝子発現バイオマーカーとして用いた。マイクロアレイと同条件で生育およびストレス処理を施したシロイヌナズナ地上部で 4 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR で測定した。その結果、水耕栽培では各根圏毒性イオンストレスに特異的かつ高い発現量が観察された (Fig. 14)。また、Cd, Cu, NaCl 処理の遺伝子発現バイオマーカーは Al 応答バイオマーカーと同様に、他のストレスによる



発現量の変化と比較して特異的に応答することが判明した。次に酸性土壌を用いた土耕試験で Al 特異的応答バイオマーカー4 遺伝子の発現変動を測定した (Fig. 15)。その結果、水耕よりも高い発現量を示すことが分かった。さらに Ca を添加した処理区ではバイオマーカー1 遺伝子の発現量が抑制されていた。一方で Cd および Cu ストレス発現誘導バイオマーカー1 遺伝子のなかにマイクロアレイの結果と異なり、共通して発現誘導される遺伝子発現バイオマーカーが存在していた。このことから根圏部の毒性イオンに対する植物体地上部の遺伝子発現バイオマーカーは特異性の高い発現性を示し、かつ再現性が高いことが示された。

シロイヌナズナ地上部の STOP1 転写制御機構のトランスクリプトーム解析

酸性土壌耐性必須転写因子 STOP1 は Al および低 pH ストレス耐性遺伝子の発現を制御している (Iuchi et al., 2007; Sawaki et al., 2009)。STOP1 変異体 (*stop1*) は Al および低 pH に対して超感受性を示す。この変異体を用い、根圏 Al ストレスによって地上部で発現誘導する遺伝子 188 遺伝子と Al 処理下の *stop1* 地上部で発現抑制する 233 遺伝子の比較転写解析を行い、地上部で STOP1 制御下にあると示唆される 19 遺伝子を同定した (Fig. 15)。この遺伝子群には Ca トランスポーター *CAX7* や *hydrolase* (*At5g38200*), *GDH2*, *PGIP1*, *DREB1A*, *ALS3* が含まれていた。

タバコ *ALS3* を用いた Al 障害探知バイオマーカーの解析

Ohyama ら (2013) の報告からタバコには STOP1 オーソログによる酸性土壌耐性遺伝子の転写制御機構が存在していることが証明されており、*ALS3* オーソログも保存されていることが判明している。タバコ *ALS3* (*NtALS3*) が Al ストレス応答性バイオマーカーとして利用できるかを定量的 RT-PCR を用いて解析した (Fig. 16)。水耕栽培による Al 処理を根圏に施したタバコ野生株の地上部では *NtALS3* の発現が誘導されており、高 Al 濃度により発現量も上昇することが確認された。一方で *NtSTOP1*-RNAi 株では *NtALS3* の発現が Al ストレス下にも関わらず著しく抑制されていた。このことから *ALS3* オーソログについては

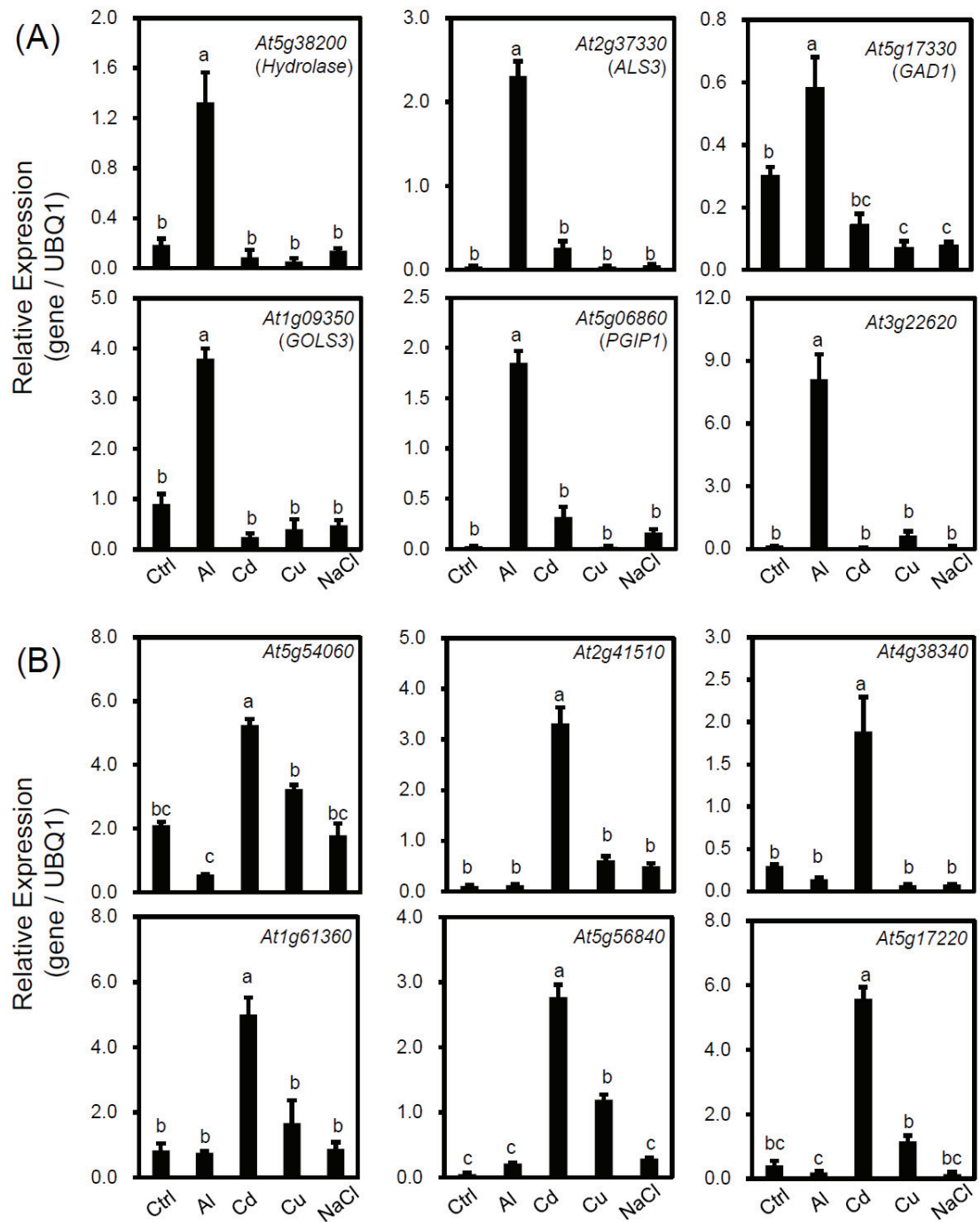


Figure 14. Expression profile of rhizotoxic ion biomarker in hydroponic culture conditions. Ten-day-old seedlings grown under control conditions were transferred to a rhizotoxic solution containing AlCl_3 (25 μM), CdCl_2 (15 μM), CuSO_4 (1.6 μM), or NaCl (50 mM). Then, they were incubated for 24 h under continuous light. Expression of the genes was quantified by real-time polymerase chain reaction in three independent biological samples. Means and SD are shown. Different letters indicate significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).

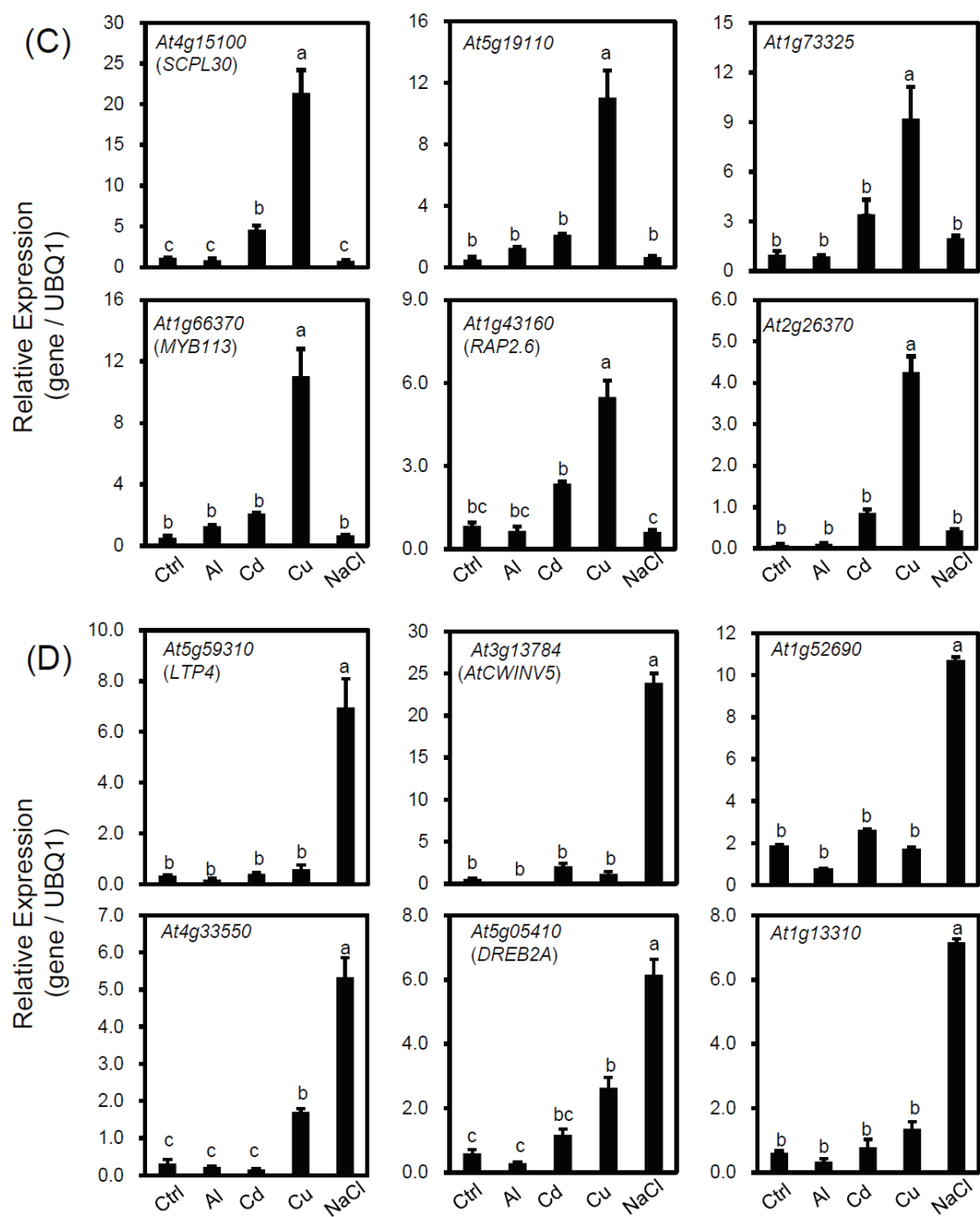


Figure 14. (Continued to previous page.)

(A)



Brown forest soil

Acidic Andosol

CaCO₃ addition (g kg⁻¹ soil)	2.5 Ca	4.0 Ca	0.6 Ca
Soil pH (H₂O)	pH 6.6	pH 5.2	pH 4.8
Exchangeable Al (meq kg⁻¹ soil)	4.4 ± 0.9	20.8 ± 0.9	67.9 ± 0.4

(B)

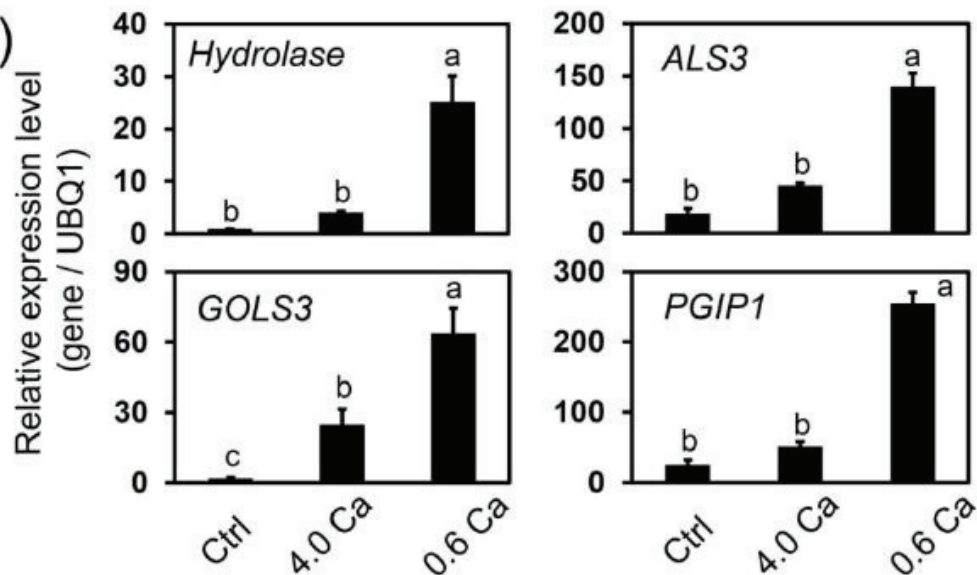


Figure 15. Growth of *Arabidopsis* seedlings in acid soil containing a large amount of exchangeable Al, and expression levels of Al biomarker genes in shoots. Seedlings of *Arabidopsis* were grown on forest brown soil in Zao (2.5 g CaCO₃ kg⁻¹ soil) as control treatment or Kawatabi andosol with different levels of liming (4.0, and 0.6 g CaCO₃ kg⁻¹ soil) as acid soil treatment. Upper panel (A) shows the growth at four weeks and chemical properties of soil. White bar indicates 1 cm. Expression levels of biomarker genes in the shoots were evaluated by quantitative real-time polymerase chain reaction (B; Means and SD, n = 3). Different letters indicate significant difference by Tukey test ($P < 0.05$).

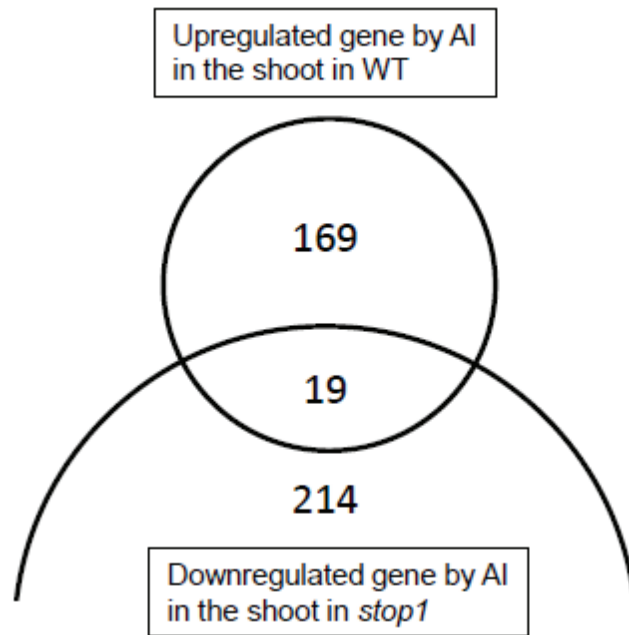


Figure 16. Genes downregulated in the *stop1* mutant compared with the wild type (WT) that were identified by competitive microarray analyses. Greatly downregulated genes in the *stop1* mutant, when they were compared with the wild type, were identified by three biologically independent replications of the comparative microarray of the *stop1* mutant/wild type under Al toxic (10 μ M) conditions. The genes that were in the lowest percentile of the FC values (*stop1* mutant/wild type) in all three replications. Numbers of upregulated genes in the wild type (25 μ M Al/control in the wild type FC > 2.0 with $P < 0.05$) are shown in the lower parts of the Venn diagram.

Table 7. List of genes in the *stop1* mutant among induced genes in the wild type to Al stress in shoots (Fig. 10)

Three biologically independent replications of competitive microarray analyses were performed as follows: *stop1* mutant in Al (10 μ M, 24 h) versus the wild type in Al (10 μ M, 24 h); Al (25 μ M Al, 24h, pH 4.95) in the wild type versus control (no Al, pH 4.95, 24 h) in the wild type. P values from t tests for significant differences from FC = 1.00.

AGI code	DESCRIPTION	FC (<i>stop1</i> mutant / WT) in Al		FC (control / Al) in WT	
		FC	p	FC	p
At5g38200	hydrolase	-3.97	0.000	3.43	0.006
At5g17860	CAX7 (CALCIUM EXCHA	-2.47	0.017	5.43	0.003
At2g26695	binding	-2.12	0.005	1.97	0.011
At5g02480	similar to SLT1	-1.83	0.004	1.34	0.003
At4g20070	ATAAH	-1.52	0.007	1.43	0.007
At5g07440	GDH2	-1.33	0.002	1.76	0.022
At5g06860	PGIP1	-1.05	0.017	1.84	0.002
At2g27830	similar to pentatricopeptide	-0.91	0.043	2.30	0.004
At2g32870	meprin and TRAF homolog	-0.79	0.015	1.01	0.018
At5g12930	similar to unnamed protein	-0.71	0.025	1.71	0.008
At3g15353	MT3 (METALLOTHIONEIN	-0.70	0.025	1.06	0.009
At1g22160	senescence-associated pro	-0.67	0.024	1.02	0.021
At4g25480	DREB1A	-0.67	0.037	2.06	0.005
At2g37330	ALS3	-0.64	0.024	1.43	0.008
At1g73120	similar to hypothetical prot	-0.57	0.036	1.17	0.009
At4g30650	hydrophobic protein	-0.55	0.024	1.34	0.030
At4g01390	meprin and TRAF homolog	-0.53	0.030	1.52	0.002
At5g08000	E13L3	-0.51	0.047	1.08	0.030
At1g53035	similar to unknown protein	-0.51	0.045	1.83	0.043

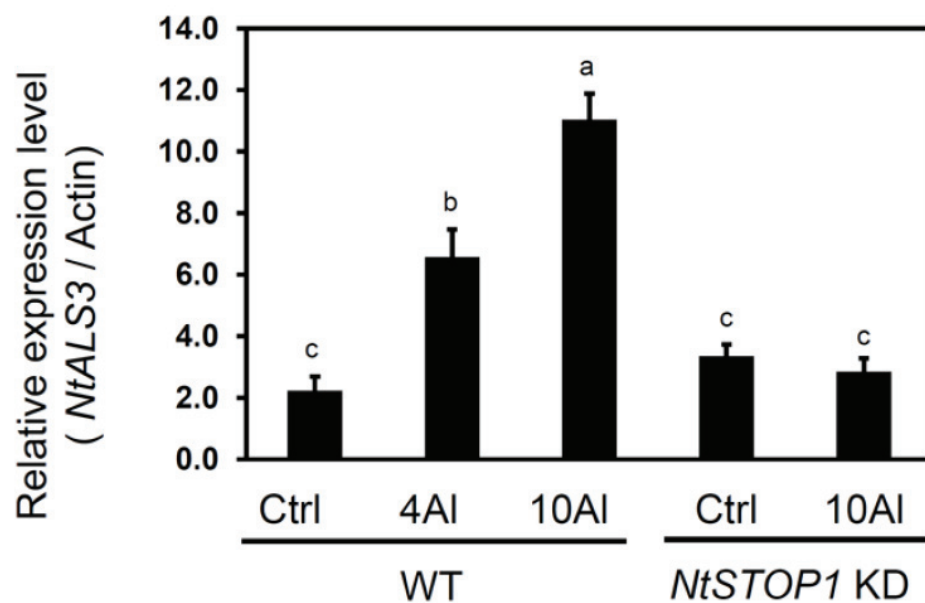


Figure 17. Expression level of *NtALS3* in tobacco shoots after rhizotoxic treatment with Al. Tobacco seedlings were grown for 10 days and then the roots were exposed to in the presence or absence of rhizotoxic Al [0; control, 2 and 4 μ M) for 24 h. The expression level of *NtALS3* in the shoots was quantified in wild-type plants and knockdown transgenic plants suppressing NtSTOP1. Means and SD of three biological replicates are shown. Different letters indicate significant difference of Tukey test ($P < 0.05$).

STOP1 下流遺伝子群が Al 応答性バイオマーカーとして複数の植物種で用いることができることが示唆された。

共発現遺伝子ネットワーク

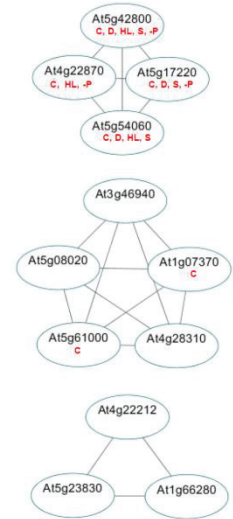
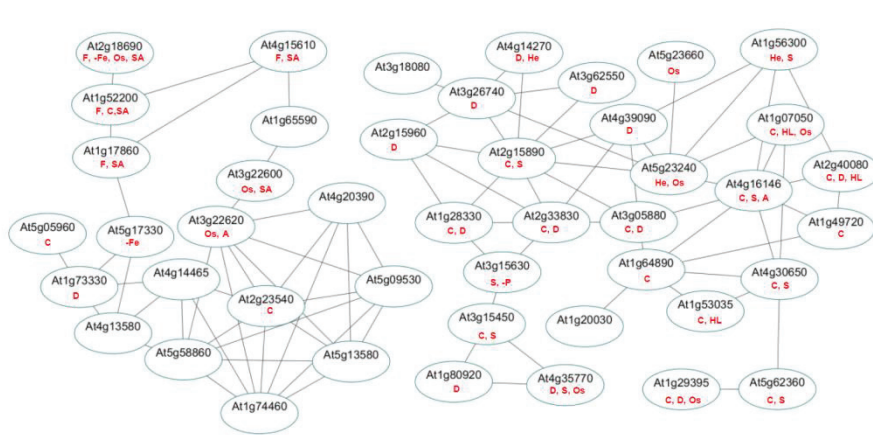
ベン図で特異的と判断された発現誘導遺伝子群を用いて、共発現する遺伝子の解析を行った (Fig. 18). また共発現ネットワークを構成する遺伝子を Genevestigator で他のストレス条件で誘導されているかを確認した. Al 共発現遺伝子は 2 つのクラスターに分かれ、これらの遺伝子は低温や乾燥といった浸透圧に関連するストレスでも発現誘導を示すことが判明した. Cd 特異的誘導遺伝子の共発現遺伝子ネットワークは 3 つのクラスターが形成され、多くの遺伝子は低温や乾燥、塩ストレスで誘導されていることが分かった. Cu ストレスの共発現遺伝子解析は巨大な 1 つのネットワークを形成し、Cd ストレスと同様に低温ストレスに誘導される遺伝子が多く含まれていた. 根圏 NaCl 共誘導遺伝子の共発現ネットワークは 4 つのクラスターを形成し、SA 誘導遺伝子と低温、乾燥、高温、強光といった浸透圧ストレスによって誘導される遺伝子がネットワークを形成することが明らかとなった。

地下部発現誘導遺伝子の比較解析

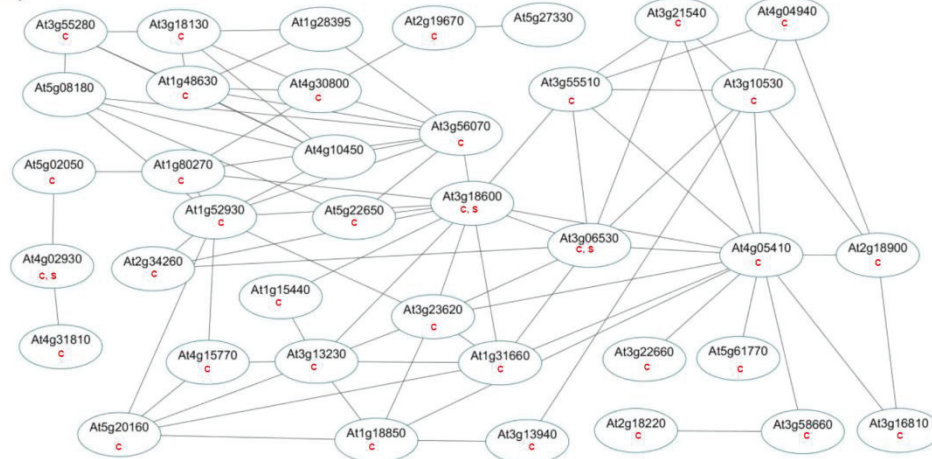
18563 遺伝子よりフィルタリングした地上部および地下部発現誘導遺伝子群を組織に共通して発現誘導されている遺伝子を特定するためベン図解析を行った (Fig. 19). これより Al ストレスで 38 遺伝子、Cd ストレスで 74 遺伝子、Cu ストレスで 122 遺伝子、NaCl ストレスで 35 遺伝子が同定された. Al 処理区では乾燥ストレスに関連する遺伝群が発現誘導されており、*LEA protein* や *GOLS2*, *LTP4*, *ERD14* や転写因子 *CEJ* (*COOPERATIVELY REGULATED BY ETHYLENE AND JASMONATE 1*) が検出された. またショ糖トランスポーター *MSS1* や植物ホルモンに関与する遺伝子としてオーキシン輸送タンパク *MDR4/PGP4* が含まれていた. 細胞壁強化に関与する *PGIP1* や N 代謝関連遺伝子 *GDH* などの先の地上部の Al ストレス強誘導遺伝子として同定された遺伝子が地下部でも特定された. 活性酸素除去系 Cu-Zn SOD や GST family が検出された. Cd では *ERF domain protein*

(A) AI

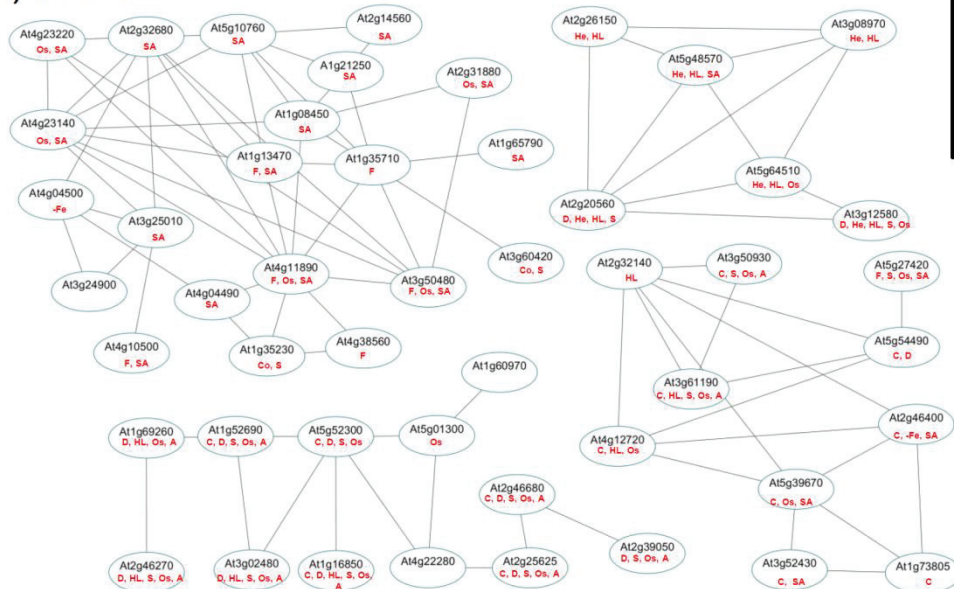
(B) Cd



(C) Cu



(D) NaCl



F : Flagellin
C : Cold
D : Drought
He : Heat
HL : High light
S : Salt
O : Osmotic stress
-Fe : Iron deficiency
-P : Pi deficiency
A : ABA
SA : Salicylic acid

Figure 18. Coexpression gene networks within the rhizotoxic-inducible gene group identified by a comparative microarray approach. Rhizotoxic-inducible genes identified by Venn diagram analysis (Figure 12) were grouped into coexpression networks based on the criterion of Pearson's coefficient > 0.6 . Genes were profiled by the response to other stress and several signal inducers using GENEVESTIGATOR. Conditions of upregulation are indicated by alphabetical letters.

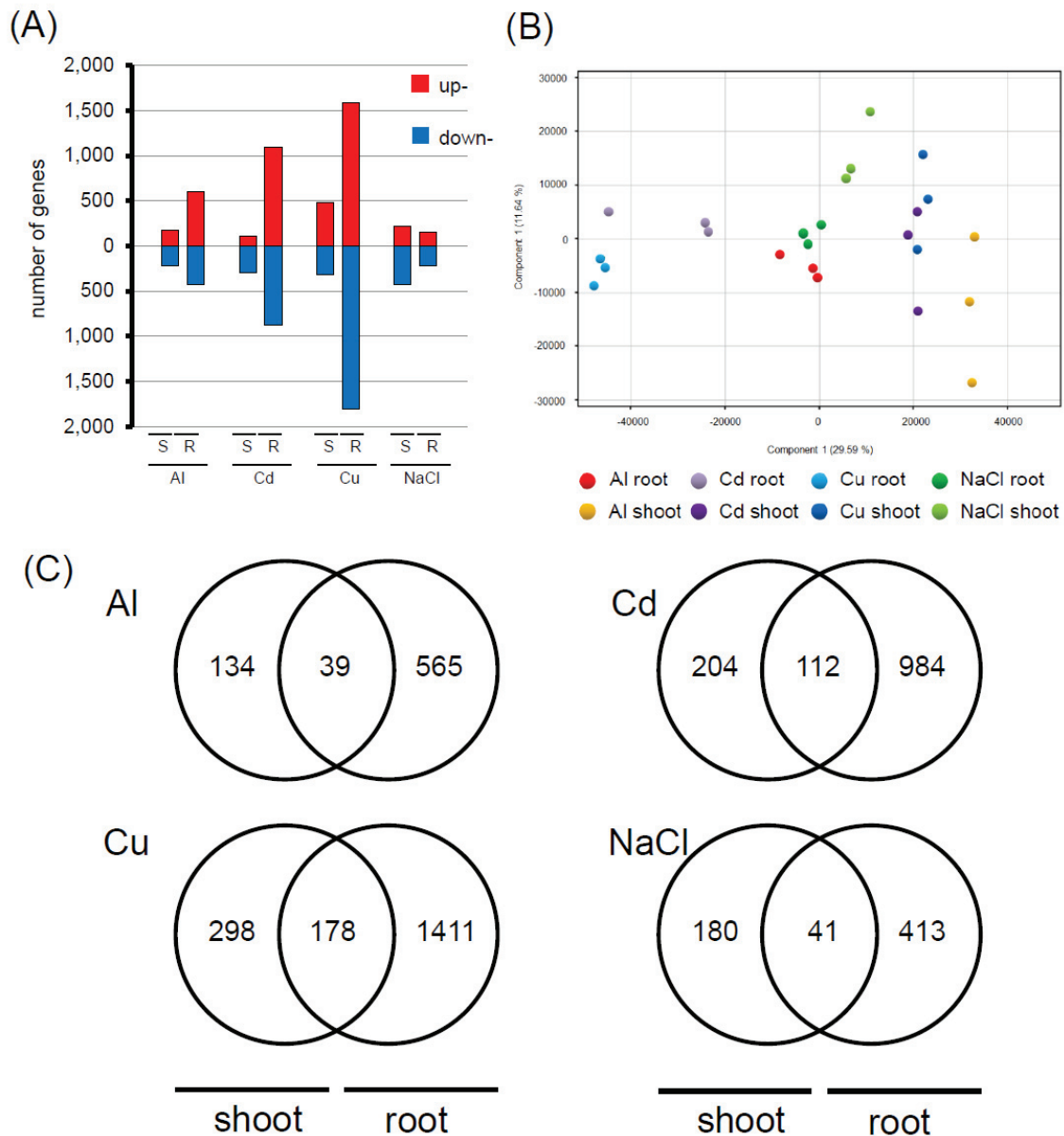


Figure 19. The Transcriptional rhizotoxic ion responses of Arabidopsis shoot and root. Roots of hydroponically grown seedlings were transferred to control (pH 5.0, no toxicant) and rhizotoxic solutions containing AlCl_3 (25 μM), CdCl_2 (15 μM), CuSO_4 (1.6 μM), or NaCl (50 mM) at pH 4.95 (Al) or 5.0 (Others). After 24 h, total RNA was extracted and microarray analyses were performed using the Agilent Arabidopsis 2 Oligo Microarray system. X and Y axes indicate signal intensities in control and rhizotoxic treatments, respectively. (A) Genes responding transcriptionally to rhizotoxic ions according to microarray. Bars represent the number of genes for which transcript levels were changed in response to each stress. (B) Principal component analysis (PCA) of the changes in transcript abundance in root and shoot under different growth regimes. (C) Number of rhizotoxic unique up or downregulated genes found in the Arabidopsis shoots and roots. The microarray data were selected by $\text{FC} > 2.0$ or $< 1/2$, intensity > 500 and $p < 0.05$.

*transcription factor*や活性酸素除去系，硝酸トランスポーター，病害応答性遺伝子が誘導されていた．また二次代謝産物の生産を制御している転写因子 *MYB122* が検出された．Cu 処理ではジャスモン酸に関与する遺伝子 *JAZ1* や *JRG21*，病害応答性遺伝子である *PR4* の発現誘導が確認された．さらに Cd ストレス同様に活性酸素除去系遺伝子であるペルオキシダーゼが検出された．NaCl 誘導遺伝子群では *DREB family* だと類推される *AP2 domain-containing transcription factor* が多く誘導されていた．また生物ストレスに関連する *BGL2* や *CHIB1* が特定された．

活性酸素ストレス応答トランスクリプトームとの比較解析

4 種の毒性イオンと活性酸素で発現誘導する遺伝子のうち，共通して発現誘導する遺伝子群を解析したところ，共発現遺伝子ネットワーク一つに纏まり複数のペルオキシダーゼおよび *GST* 遺伝子，シグナル伝達として機能するカルモジュリンや Ca トランスポーター，またショ糖トランスポーター遺伝子 *MSS1* が含まれていた (Fig. 20)．この遺伝子群には 8 つの転写因子が含まれており，*MYB15* は複数の転写因子と作用してグルコシノレート合成に関与し，*ZAT10* は ROS に応答して発現し，転写因子 *WRKY40* は共同して *WRKY18* および *WRKY60* と塩，低温および高温，浸透圧に対する耐性を誘導する機能を有すると同定されている．また転写因子 *WRKY33* や *WRKY40* は病害抵抗に関与しており，さらに多くのペルオキシダーゼや *GST*，キチナーゼが共通して発現誘導していることが示された．

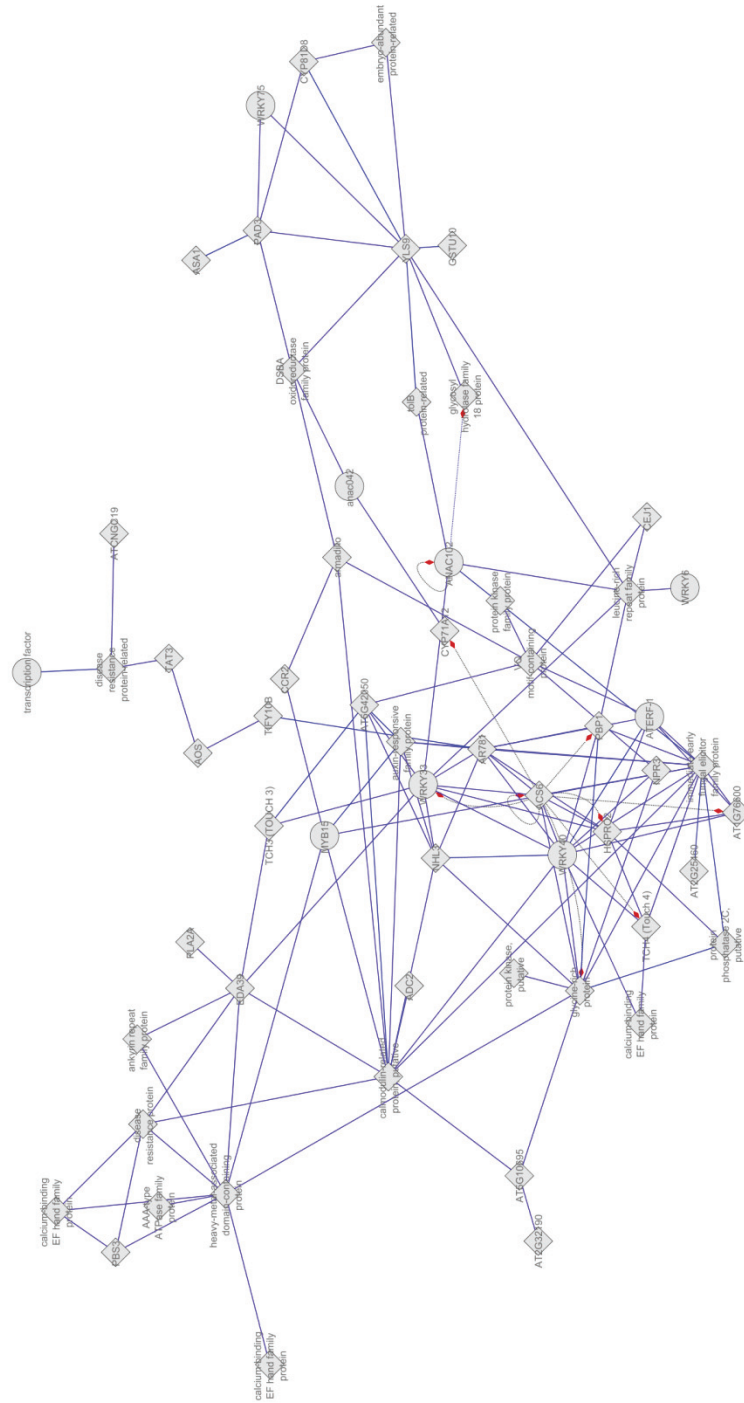


Figure 20. Coexpression network of upregulated genes in Arabidopsis root as affected by oxidative stress. Genes were selected if the $FC > 2.0$, $P < 0.05$ and intensity > 500 in each microarray experiment after 25 μM Al, 15 μM Cd, 1.6 μM Cu, 50 mM NaCl and 500mM H_2O_2 . The network was constructed with the CORNET tool. Circular indicates Transcription factor gene. Edges colored blue connect coexpressed genes, and dashed allow lines indicate direct activation. Visualization is based on the coexpression analysis done in CORNET with a coexpression coefficient of 0.7 and confirmed regulatory interactions from AGRIS.

2-4 考察

これまでに比較トランスクリプトーム解析によるストレス特異的または普遍的に発現変動する遺伝子群の特定が進められ、乾燥、低温といった浸透圧ストレスや生物、非生物ストレス、または植物ホルモン応答性トランスクリプトームの解析が行われており、様々な知見が獲得されてきた (Kreps et al., 2002; Matsui et al., 2008; Lager et al., 2010; Barah et al., 2013; Davila et al., 2016). 毒性イオンに対するトランスクリプトーム解析も研究されているが、根圏毒性イオン処理による植物体地上部の比較トランスクリプトーム解析を行った研究は少なく、本研究はその知見を深めるものである。

根圏毒性イオンは地上部に酸化ストレス、浸透圧ストレスおよび重金属欠乏を引き起こす

Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , NaCl を根圏部に処理したシロイヌナズナ地上部の比較トランスクリプトーム解析で各ストレスの分子生物学的反応をプロファイリングしたが、シロイヌナズナ地上部が根圏に存在する毒性イオンに応答して遺伝子が強濃度かつ短時間で発現変動することが確認された。しかし地下部と比較すると遺伝子数は少ないことから、根圏で直接ストレスに晒される根部と輸送またはシグナル伝達を介した反応のため地上部の遺伝子発現に時間差が生じていることが考えられる。毒性イオンに対する発現湯堂遺伝子の機能として Fe 欠乏応答転写因子が含まれており、根圏毒性イオンによって地上部で Fe 欠乏状態にあることが示唆される。特に Al , Cd , Cu ストレス処理遺伝子群では重金属輸送トランスporterや *NAS* が含まれていた。根部のトランスクリプトーム解析も同様の傾向を示しており、毒性イオンストレスによって植物体全体がトランスクリプトームレベルで重金属輸送関連遺伝子の転写が抑制されることを示し、根圏の強度のイオンストレスは重金属輸送系遺伝子群の発現を抑制するものであることが判明した。しかし、これらの重金属輸送関連遺伝子が発現抑制される転写機構についての詳細は判明していない。また、低温応答性遺伝子や *GOLS2* の発現誘導が確認されたことから、地上部で水分欠乏状態が生じている可能性がある。植物が水ストレスを受けると *GOLS* が発現し、ガラクチノール、ラフィノ

ースの蓄積を促し植物体の乾燥，低温，酸化ストレス耐性獲得に重要な役割を果たすことが知られている (Teruaki Taji et al., 2002; Nishizawa et al., 2008).

次にイオン種独自の転写反応を生理学的な応答として観察した．植物の Al に対する地上部の耐性機構として，チャやアジサイなどの植物種が液胞に隔離，蓄積することで高い Al 耐性能を有していることが知られている．これまでにアジサイで Al 隔離トランスポーターが同定されている (Negishi et al., 2012)．しかしながら，地上部における Al ストレスの詳細な分子生理学的な応答は明らかになっていない．マイクロアレイ解析の結果から，シロイヌナズナ地上部に STOP1 転写制御機構が存在していることが証明された．また地上部でも *AtALMT1* の発現誘導が確認できたが Intensity は約 1000 と地下部の結果と比べて著しく低かった．このことから Al^{3+} によるストレスシグナルが地上部に伝達していると考えられ，さらに GST や SOD といった活性酸素除去系遺伝子が検出されていた．Al は根部の細胞膜に蓄積するため植物体内に吸収されず，地上部へ輸送されにくいされているが，この結果から地上部に Al ストレス障害が起こされていると考えられる．重金属の Cd および Cu によって誘導された遺伝子群として，Cu 処理でチオレドキシン合成に関与する遺伝子が 2 つ誘導されていた．ある種の重金属は生物体内で電子伝達などの重要な機能を果たしているが過剰に存在することで，その酸化力により活性酸素障害を引き起こすとされている．チオレドキシンは原核生物などでは Cu イオン耐性機構に関連することが報告されており，サルモネラ属におけるチオレドキシンのホモログは還元型で Cu イオンに結合し調節することで細胞中の Cu イオン濃度を低下させることが分かっている (Holmgren 1995; Gupta et al., 1997)．この 2 つの重金属に共通して誘導されている遺伝子機能として二次代謝産物生合成に関与する遺伝子が多く含まれていた．二次代謝産物は過剰な酸化反応によって合成する防御物質として機能することが知られている．また Cu は非生物エリシターであることが知られており，ボルドー液や水酸化第二銅は直接的な殺菌作用のほかに植物の防御機構を活性化するエリシター様作用も認められている (Poschenrieder et al., 2006; Maksymiec et al., 2007)．Cu 処理で発現誘導された遺伝子群には植物ホルモン誘導性遺伝子が含まれており，根圏に Cu が過剰に存在することで生物ストレス関連の遺伝子が発現誘

導されており PGPF またはシグナルの相互作用が引き起こされている可能性がある。Cu は必須微量元素であるが、僅かな濃度の違いで根伸長阻害を引き起こす。このような Cu による根部への重篤な障害の詳細なメカニズムは解明されていないが、Cd ストレスと同様に Cu ストレスで発生する過剰な酸化還元反応や活性酸素の発生によりシグナル伝達がインタラクトし生物ストレスに関与するジャスモン酸に関わる遺伝子が多く検出され、ジャスモン酸合成リポキシナーゼ LOX が複数誘導されており、生物ストレスにとってもシグナル伝達に関与しており、このため二次代謝物質を蓄積する病害虫の防御機構が発現誘導している可能性がある。NaCl 過剰処理で強誘導された遺伝子群には、*DREB2A* をはじめとして浸透圧ストレスに関与するとされる遺伝子が多く検出できた。根圏部に処理した塩ストレスにより、植物体内に吸収された Na^+ は地下部から地上部へと輸送されやすく、地上部と地下部で発現する遺伝子群の比較をみたところ、遺伝子は異なる一方、遺伝子機能自体は相同性が高いことから、分子生物学的応答としてはシグナル伝達や転写因子が制御機構の違いということが考えられる。ストレス初期においても地上部で地下部と相同性のある機能の遺伝子が発現していた。

Al では病害応答性遺伝子 PR gene, Cu または Cd, Cu 共通で誘導された遺伝子群の中には *JAZ family* といった病害応答に関連する遺伝子が特定された。特に Cu ストレス処理では *JAZ family* や *VSP1*, *VSP2* といったジャスモン酸応答遺伝子が多く誘導されていることが分かり、ジャスモン酸シグナル伝達経路は他の植物ホルモンとのクロストークによって複雑な調節ネットワークを形成していることが考えられる。最近の研究では非生物、生物ストレスのシグナル伝達は非常に綿密にクロストークしていることが判明しているが、これは過剰な酸化ストレスによるシグナル伝達だと予想される。*MYB20* は塩耐性をネガティブに制御しているセリン・スレオニンプロテインホノターゼを転写制御しており、先の浸透圧ストレスに関連する遺伝子が上昇していることから、毒性イオンストレスにより *MYB20* の発現が抑制されることでシロイヌナズナ地上部の浸透圧ストレス関連遺伝子の強誘導の一因であることが考えられる。また、Fe 貯蔵タンパク質フェリチン遺伝子 *FER1*, *FER4* が発現抑制されており、*FER* は細胞中の Fe ホメオスタシスに深く関わっており反応

性の高い Fe^{2+} を酸化して不活性な Fe^{3+} として無毒化し分子内に取り込むことで Fe 貯蔵の機能を担っている (Jeong and Guerinot 2009). 発現抑制遺伝子群の解析から、乾燥ストレスに対する抵抗性を獲得しており、また植物体内の Fe 濃度の制御が正常に行われていないことが推測される。活性酸素種の発生は根圏の過剰イオンストレスとともに地下部からのストレスシグナルによる誘導、さらに NAS による重金属の無毒化機構が作用していないことから過剰な酸化還元な反応から生じる ROS が原因であることが示唆された。

根圏毒性イオン応答性バイオマーカーの評価

序論で述べたように耕作可能土壌では様々な毒性イオンが植物の生長を阻害するが、毒性イオンストレスを植物の表現型や土壌試験で判断するのは至難である。本研究では毒性イオンストレス処理を根部に施したシロイヌナズナ地上部の遺伝子発現の変動を測定することで植物体が個々の毒性イオンストレスの状態下にあるかを評価できるか遺伝子発現バイオマーカーを用いて試験した。定量的 RT-PCR によってバイオマーカー遺伝子は各毒性イオンに対して高い精度でストレスを特定し、ストレス状態と診断することが可能だと示した。バイオマーカー遺伝子として Al ストレスでは *ALS3* などの STOP1 下流遺伝子が特異的に Al ストレス状態であることを評価していた。Cd および Cu で発現誘導された遺伝子の機能として多くの活性酸素除去系や二次代謝産物、生物ストレス応答性遺伝子が含まれていた。Cd や Cu のみならず As や Pb などの多種の有害な重金属は人間活動により環境中に流出している。このことを加味して各重金属に特異的または共通して発現誘導されるバイオマーカーを作成する必要がある。塩ストレスでは *DREB1A* や *LEA* などの浸透圧ストレス耐性に関与する遺伝子の発現量が増加しており、一方で浸透圧ストレスは乾燥、低温、高温など幅広いストレスで引き起こされる障害であることから塩ストレスと他の浸透圧ストレスによって誘導される遺伝子と区別する必要がある。これらの他のストレスに応答しない遺伝子から選抜する際に留意すべき点である。次に酸性土壌を用いてフィールドを模した試験でバイオマーカーが利用できるかを検証した。酸性土壌の代表的なストレス要因として Al^{3+} と H^{+} 根圏毒があり、これらの障害は植物の生育に大きく関与している (Rao et

al., 1993; Kidd and Proctor, 2001). なかでも Al^{3+} は顕著に植物の根伸長を阻害することが知られているが、 Al^{3+} は植物根端に蓄積し地上部へほとんど輸送されないことから地上部を使った含量検査では植物の状態検査が困難である。植物の状態を直接的に検査できる遺伝子発現バイオマーカーの診断は植物の酸性土壌のストレス診断に有効と考えられるが、 Al ストレスで誘導される遺伝子を用いた解析で植物の状態を精査できるかは報告されていない。遺伝子発現バイオマーカーの試験を行うにあたり、Kobayashi ら (2013) の研究から、 Al ストレスに対して誘導される遺伝子にはストレス耐性遺伝子と傷害応答遺伝子の 2 種類が存在することが分かっており、傷害応答は毒性イオン普遍的に応答する可能性があることから Al 障害による耐性遺伝子に着目した遺伝子でバイオマーカーを作出することが望ましい。今回の遺伝子発現バイオマーカー試験の結果から、黒ボク土を用いた土耕試験でシロイヌナズナの Al 特異的誘導性トランスクリプトーム解析から *STOP1* 下流遺伝子である 4 つの遺伝子を特定し、黒ボク土で生育したシロイヌナズナで遺伝子発現量を測定してみたところ、発現量は普通土壌に比べて著しく高く、また CaCO_3 を多量に投入している黒ボク土では投入量が少ない処理区と比較して低下していることが確認できた (Fig. 15)。しかしながら、*GOLS3* は大量の石灰を添加した処理区と比較しても対照区との有意差があった。また酸性土壌のストレスは先に述べたような様々な要素が存在しているが、気候によりアンティソル、スポドソル、ヒストソルなど多様な土壌を形成することから、遺伝子発現バイオマーカーが本実験で用いたアンドソル以外で生育した植物に応答するかはこれからの解明が待たれる (三枝 1991)。また Al 害は低 pH 条件下だけではなく、高 pH 条件下でも引き起こされることが分かっていることから今後、高 pH 条件下での Al 障害で応答する遺伝子の解明が待たれる (Bartlett et al., 1972)。

Yang ら (2011) の研究から発現抑制遺伝子群も Al ストレス応答発現遺伝子バイオマーカーとしての可能性も示唆されており、作物の多くは Al 感受性であることから Al ストレス発現抑制遺伝子のバイオマーカー作成も有意義であると考えられる。本章は植物ゲノムに普遍的に保存されていると考えられる遺伝子を転写バイオマーカーの候補として用いられるかを検証したが、*AtALS3* ならびに *NtALS3* 発現変動を用いたバイオマーカー解析で

根圏 Al^{3+} に対して地上部で高い発現誘導が観察された。 *ALS3* オーソログは *NtALS3* や *OsSTAR2* をはじめとして多種の植物種に遺伝的に保存されており、さらに Al 応答性遺伝子の発現制御転写因子 *STOP1* とその制御機構が存在することが判明している (Ohyama et al., 2013)。 *STOP1* 制御機構は地上部の Al 応答性遺伝子の発現制御を担い、他の植物種でも *STOP1* 制御機構が地上部に存在していることを示した。これは *STOP1* 制御機構を有する植物体、たとえばポプラやミヤコグサなどでも有用であることを示している。 Al 耐性機構は *STOP1* 転写因子もしくはそのオーソログによる制御機構がシロイヌナズナやイネなど、多くの植物種に保存されている (Iuchi et al., 2007; Ohyama et al., 2013)。マイクロアレイの解析から *STOP1* 下流遺伝子は地上部でも誘導されることが明らかになった。多くの作物種は酸性土壌感受性であり、酸性土壌ストレスを受けている作物を識別する Al ストレス応答性バイオマーカーとして、*STOP1* 制御化にある遺伝子、特に *ALS3* オーソログが有効であると考えられる。 $CaCO_3$ が投入されることでバイオマーカー候補の 3 遺伝子の発現量が対照区と同等にまで抑制されているが、表現型は改善されておらず、地上部に顕著な差が現れていることが分かる。今回シロイヌナズナで、遺伝子発現バイオマーカーによる植物の Al 障害の状態管理が可能であることが判明したのは非常に有意義であり、シロイヌナズナと比較的近縁であるセイヨウアブラナやハクサイでの応用が可能であると考えられる。また次世代シーケンサーではゲノム情報が解読されていない生物でもトランスクリプトーム解析が可能であり、塩基配列の保存性が高いオーソログを特定することで、様々な作物種に対応できる遺伝子発現バイオマーカーの解析も可能になると考えられる。毒性イオン応答遺伝子バイオマーカーの使用用途として、不良土壌における植物の栄養状況の確認およびファイトレメディエーションの検査がある。そのなかで果樹などの多年草植物において、ボルドー液は高い防除効果を示す有用な薬剤である一方で土壌に Cu が蓄積することが問題となっている (Moolenaar et al., 1998)。 Cu は微量元素であるが、過剰に根圏に存在すると根伸長抑制などの障害を引き起こすことから、収穫に数年かかる植物を栽培する農耕地の状態管理技術としての応用が考えられる。今後の課題として、実際の自然環境下で変動する遺伝子を特定し、その遺伝子群からバイオマーカー候補遺伝子の特定を行い、

上記の問題点を改良することで高精度かつ汎用性の高いバイオマーカー遺伝子の特定を行う必要がある。比較トランスクリプトーム解析による複数の毒性イオンに対する植物体の転写応答の解析を行い、地上部および地下部の特異的応答遺伝子の特定、また植物部位による発現遺伝子の差異、また毒性イオンによる転写制御およびシグナル伝達経路の解明に関わる知見を得ることができた。

本研究の解析は 4 種の毒性イオンに対する転写応答の解明に繋がるものである。比較トランスクリプトーム解析の結果、地上部に各イオンに特異的な転写応答を示すことが判明し、また地下部ではそれぞれの毒性イオンに対する解毒機構が観察できた。地上部と地下部で共通する反応として浸透圧ストレスと活性酸素除去系遺伝子の発現誘導および重金属輸送関連遺伝子の発現抑制が確認され、これは根圏毒性ストレス応答機構の解明の一端となるものである。他の植物種、なかでも作物の地上部でそれぞれの毒性イオン応答遺伝子機構を解明することで形質転換作物の作出や植物の栄養状態管理に大きな一歩をもたらすものだといえる。

第3章

Penicillium phinophilum 接種によるイネおよびシロイヌナズナの病害抵抗性の評価

3-1 緒言

20 世紀の農業は科学技術の発展によって生まれた化学製品が様々な変化をもたらした。化学農薬を用いた防除方法は病虫害被害を大きく低下させる高い防除効果を発揮し農家の労働負担を軽減することから広く使用されている。2007 年における日本の化学農薬の出荷量は約 30 万トン、出荷金額は約 3,600 億円とされており、仮に化学農薬を使用しない場合では水稻の収量が 20~50%低下すると推測されている。その反面、化学農薬は環境負担が大きく恒常的な使用によって農地の土壌および水質汚染を引き起こしている。さらに化学農薬に依存した防除は残留農薬問題や薬剤耐性病虫害の発生、微生物層の単純化に伴う多様性の低下、リサージェンスの発生といった問題が報告されている（望月, 1997; 甲斐ら, 1986; 伊藤ら, 1999; 井藤ら, 2000）。

このような状況を背景に化学農薬代替技術に対する社会的ニーズが高まっている。環境低負荷農業として、輪作体系や病害抵抗性品種の使用、熱による消毒や機械などを用いた物理的な防除、天敵やフェロモンの利用なども組み合わせた総合的病害管理（IPM : Integrated Pest Management）が重要な役割を果たすと考えられる。なかでも微生物利用の研究は盛んであり、微生物の様々な有用効果が解明されている。代表的な例として根粒菌による窒素固定やアーバスキュラー菌根菌によるリン酸吸収の補助作用により肥料成分の吸収が効率的になり成長が促進される（Ho and Trappe, 1975; George et al., 1995）。また環境ストレスの抵抗性や緩和効果が判明しており、乾燥や塩、重金属などの非生物ストレスに対する抵抗性が上昇すると報告されている（Dimkpa et al., 2009）。また土壌微生物層が多様化することで連作障害の回避、軽減効果があるとされている。このような微生物が植物にもたらす多様な有用な効果のひとつとして病害防除があり、病害耐性を促進する

微生物を用いる生物的防除は環境負荷が少なく、薬剤耐性病害虫が発生しにくいとされている。微生物の病害防除効果として、植物の病害抵抗性を誘導する全身獲得抵抗性 (Systemic Acquired Resistance: SAR) や誘導全身抵抗性 (Induced Systemic Resistance: ISR) が知られている (Lawton et al., 1996)。また植物の耐病性や生育を促進する植物生育促進根圏細菌 (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: PGPR) や植物生育促進菌類 (Plant Growth-Promoting Fungi: PGPF) が特定され、近年、このような微生物が植物の免疫機構を活性化して病害抵抗性を高める植物プロバイオティクスとして注目されており、様々な微生物が防除資材で商標登録、実用化が進められている。実際に *B. subtilis* や非病原性 *Fusarium* 菌などの微生物が農薬登録され、それぞれボトキラー水和剤、マルカライトとして商業的に利用されている (田口ら: 2003)。病害耐性を誘導する微生物の特定は植物の病害抵抗を促す生物資材の開発につながり、低環境負荷型農業において有意義である。世界の微生物資材市場額は毎年 12% 上昇しており、2004 年に 4 億 6800 ドルの規模であったが、2010 年には 10 億 7500 ドルと 2 倍以上の成長を遂げており、さらに 2018 年までに 2 億 2000 万ドルに達すると予測される有望な市場になると見込まれている (Thakore 2006)。

最近、揖斐川工業株式会社がイネ病害に抵抗性を誘導する有用微生物 *Penicillium pinophilum* YS-31 株 (以下、YS-31 株) を特許に登録した。この菌は水稻培土より単離されたが病害抵抗性の詳細な誘導および耐性機構は解明されていない。本章では YS-31 株のイネ病害に対する発病抑止性の原因であるかを明らかにするため同株のイネ病害に対する防除効果および病害抵抗性誘導能を評価した。

3-2 実験材料および方法

供試植物

供試植物としてイネ品種コシヒカリ，シロイヌナズナ品種 Col-0 を用いた．

培地作成

純化された分離菌株の培養には PDA (potato dextrose agar) 培地に 10 mg/l ナイスタチン，50 mg/l アンピシリン，10 mg/l リファンピシン，100 µg/l ミコナゾールになるよう添加し，寒天が終濃度 0.8% となるように加えた培地（以下，抗生物質入り PDA 培地）を使用した．また抗生物質入り PDB (potato dextrose broth) 培地は上記と同濃度になるよう調整した．

イネ病害発病抑止試験

本実験は揖斐川工業株式会社アグロバイオ課の温室で行った．大麦粒で培養したイネ紋枯病菌 *Rhizoctonia solani* およびイネもみ枯細菌病菌 *Burkholderia glumae* をイネ催芽粒に感染させ，水稻用育苗培養土 400 g に播種した．YS-31 株の菌体懸濁液 (1×10^7 cfu/ml) を噴霧接種した処理区と同株を接種しない対照区を設けた．育苗器で 30°C，100 時間出芽処理を行った後，イネ紋枯病菌処理試験は 20 日間，イネもみ枯細菌病菌試験は 25 日間温室で育苗し，イネ幼苗の発病を評価した．

RNA 抽出，逆転写反応および定量的 RT-PCR 解析

YS-31 株を抗生物質入り PDB 液体培地 500 ml で，約 25°C，暗所で 10 日間静地培養した後，培養液を MILLEX GV 0.22 µm (MILLIPORE) でフィルター濾過滅菌して濾液を回収した．

第 1 章と同様の方法で発芽処理を行ったイネおよびシロイヌナズナを水耕溶液（2% MGRL，pH5.6）で 3 週間水耕栽培し，YS-31 株処理区では植物体の根部を YS-31 株の濾液に 24 時間浸漬後，再び水耕溶液で 24 時間培養したのち地上部を回収した．対照区は

YS-31 株の濾液処理を行わず，48 時間後に地上部を回収した．なお栽培環境は第 1 章と同条件である．

RNA 抽出および逆転写反応，定量的 RT-PCR は第 1 章と同様の方法で行った．イネ病害応答性関連遺伝子は，*PR-1a* (*pathogenesis-related gene 1a* ; *Os07g0129200*)，*PR-1b* (*Os01g0382000*)，*PBZ1* (*probenazole-inducible protein* ; *Os12g0555200*)，*OsGLN1* (*endo-1,3-glucanase* ; *Os07g0539100*)，*PAL* (*Phenylalanine ammonia-lyase* ; *Os02g0626600*)，*Peptidase S8* (*Os01g0653800*)，*GSTU4* (*Os10g0528300*)，*Peroxidase* (*Os07g0638400*) の 8 遺伝子，シロイヌナズナは *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR4*, *PR5*, *PDF1-2*, *Peroxidase* (*At5g64120*)，*WRKY41* の 8 遺伝子の発現量を測定した．イネの内部標準遺伝子として *Rubq1* を，シロイヌナズナの内部標準遺伝子は *UBQ1* を用いた．本実験で用いたプライマー配列を Table 8 に表記した．

Table 8. List of primers used in quantitative RT-PCR experiments.

Name		Sequence (5'-)
Os07g0129200	F	TTATCCTGCTGCTTGCTGG
	R	GGTCGTACCACTGCTTCTCC
Os01g0382000	F	ACGGGCGTACGTA CTGGCTA
	R	CTCGGTATGGACCGTGAAG
Os12g0555200	F	CGTCCTCGAGCTCATACTCC
	R	GAGAGGCTGTGGAAGGTCTG
Os07g0539100	F	GAGCCGAACACCTTAGTTGC
	R	TTCCCCGACACTATCTTTTCG
Os10g0528300	F	TCCCATTGTTTGGGAGAAAA
	R	GAATATTCCTTGCAATTATTCAGACA
Os02g0626600	F	AGTGGCCAGGAAGACTCTGA
	R	GCTTCTTCATCAGCGGGTAG
Os01g0653800	F	TGGAGAGCTTACCAGGCTG
	R	CCATATTCCCCAAAATGTGC
Os07g0677500	F	TCAGGGGCAGGATCTACAAC
	R	AGTTCCTCACCGTGTGTCC
OsRubq1	F	GTGGTGGCCAGTAAGTCCTC
	R	GGACACAATGATTAGGGATCA
PR1	F	TTCTTCCCTCGAAAGCTCAA
	R	CGTTCACATAATTCCCA CGA
PR2	F	GTCTGAATCAAGGAGCTTAGCC
	R	GATGGACTTGGCAAGGTATCG
PR3	F	GACGCCGACCGTGCCGCCGGG
	R	CGGCGACTCTCCCGTCTTGGCC
PR4	F	GGACCAATGCAGCAACGGAGGC
	R	GGCTGCCCAATGAGCTCATTGCC
PR5	F	ATGTGAGCCTCGTAGATGGTTAC
	R	GATCCATGACCTTAAGCATGTTCG
PDF1-2	F	TTTGCTGCTTTCGACGCAC
	R	CGCAAA CCCCTGACCATG
peroxidase	F	TAGGGTCGGGTAAACCTGTG
	R	GTTGCTCTCTCCGGTGGTC
WRKY41	F	CAGCTTCAGGGTTCGTCTTC
	R	GATCAGGCGCAAGCTCTATC
<i>UBQ1</i> (internal std.)	F	TCGTAAGTACAATCAGGATAAGATG
	R	CACTGAAACAAGAAAAACAAACCTT

3-3 結果および考察

YS31 菌株接種による病害抑止性の評価

イネ紋枯病菌およびイネもみ枯細菌病菌に対する YS-31 株の病害抑止効果試験の結果、対照区では病害の発生で生長が抑制または枯死したイネ幼苗が多く存在したが、YS-31 株処理区では発病が抑制されイネ幼苗が健全な生長していることが確認できた (Fig. 21). YS-31 株処理区のイネは健全苗が罹病苗よりも多く存在していることから、イネ紋枯病およびイネもみ枯細菌病に対して発病抑制効果があることが判明しイネの育苗時に防除効果が高い微生物資材になることが示唆された。しかし本試験では育苗土での病害抑止しか検証しておらず、水田に移植した後も防除効果が継続するかの検証が必要である。

YS-31 株はイネおよびシロイヌナズナの病害応答性遺伝子を発現誘導する

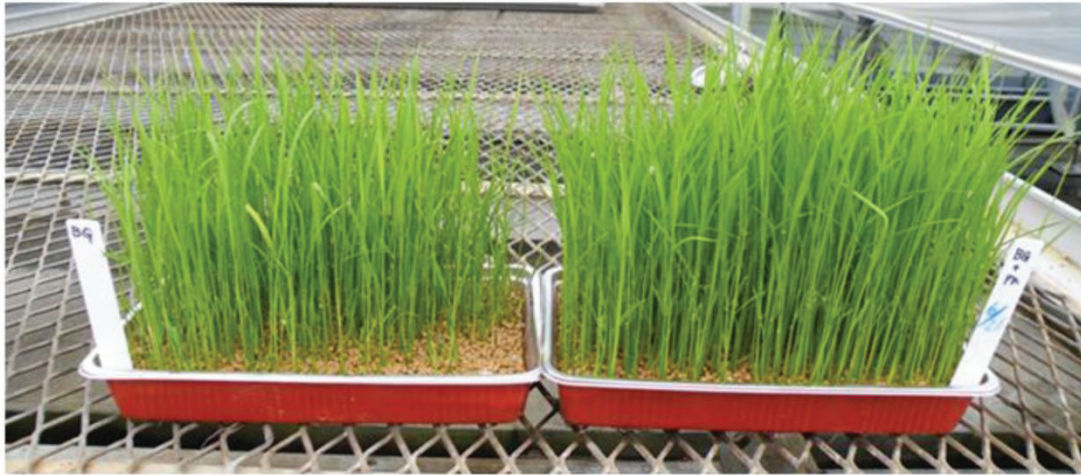
YS-31 株が病害応答性および抵抗性遺伝子を発現誘導するか、YS-31 株を接種したイネおよびシロイヌナズナ地上部で定量的 RT-PCR によって遺伝子発現量を測定した (Fig. 22). YS-31 株の培養濾液処理区のイネでは、感染特異的タンパク質 *PR-1a* や *PR-1b*, ファイトアレキシン合成遺伝子 *bPAL* (*phenylalanine ammonia-lyase*) や *glucan endo-1,3-beta-glucosidase*, 活性酸素除去系遺伝子 *GSTU4* やペルオキシダーゼの発現が対照区と比較して有意に誘導されていた (Fig. 22A). 次に YS-31 株処理区のシロイヌナズナでは、*PR1* や *PR2*, *PR5*, 抗菌活性タンパク質ディフェンシン遺伝子 *PDF1.2* や活性酸素除去系遺伝子の発現が誘導されていた一方で、*PR3* や *PR4* の発現変動は対照区と比較して有意な差はなかった (Fig. 22B). これまでの植物の病害抵抗シグナル伝達機構の研究から病害抵抗性遺伝子はサリチル酸とジャスモン酸/エチレンによるシグナル伝達経路で発現が制御されており、さらにこれらの植物ホルモンによるシグナル伝達は拮抗的に作用することが明らかになっている。植物病害抵抗の研究から、SAR はサリチル酸シグナル伝達経路、ISR はジャスモン酸/エチレンシグナル伝達経路が大きく関与しており、また *PR-1* や *PDF1.2* の発現誘導もそれぞれ異なることが判明している。しかし定量的 RT-PCR の結果から YS-31 株

はシロイヌナズナの病害応答性シグナル伝達に今まで知られていない未知の経路で誘導していることが示唆された。

生物防除資材は広く認知されはじめ、生態学的かつ分子生物学的アプローチにより土壌中や植物の根圏、根面、植物体内に生息する膨大な数の微生物を多角的かつ網羅的に扱う解析が可能になり微生物の有用効果が解明されつつある（百町ら 2014）。これに伴い、病原菌の遺伝的、生化学的特性についての高度な基盤的研究ならびにデータベースの設立が進められている。有用微生物の特定方法や病害防除の特性や防除作用機構の解明など防除剤利用に向けた研究も精力的に行なわれており、微生物防除剤の種類が増し、病害の種類ごとに有効に機能するかの特定制を行い微生物防除剤の使用をする対応が可能になれば、IPMの発展に大きく貢献するといえる。生物資材、特に有用微生物が防除にもたらす有益性は大きく、植物伝染性病害防除能を有する微生物を有効成分として用いる防除剤とそれらの適切な利用方法が求められている。

本章では、YS-31 株はイネ病害の発病抑止とともに植物種を超えた病害抵抗性誘導の機能を有する糸状菌であることを示した。今後、YS-31 株の耐性機構についてさらなる研究するとともに農地での菌の発生率や病害防除効果などの実用性を評価し、フィールドへの応用に向けての調査が必要である。今回の実験で YS-31 株が作物種に病害抵抗性誘導を促進する微生物資材になりうる可能性があることを証明した。その一方で YS-31 株が植物体の生育促進やバイオマス増加などの効果は検証しておらず、YS-31 株の微生物資材としての更なる機能解析が望まれる。

(A)



(B)

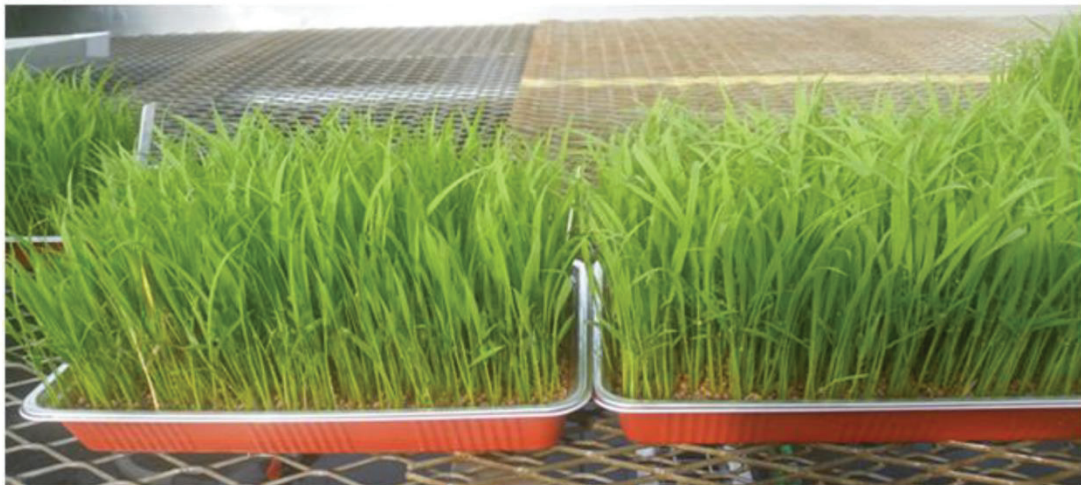


Figure 21. Effects of *P. pinophilum* sp. YS-31 inoculation in rice seedlings. Disease symptoms caused by (A) *Rhizoctonia solani* and (B) *Burkholderia glumae* infection on rice seedlings. Left shows control plants and right shows plants inoculated by *P. pinophilum* sp YS-31.

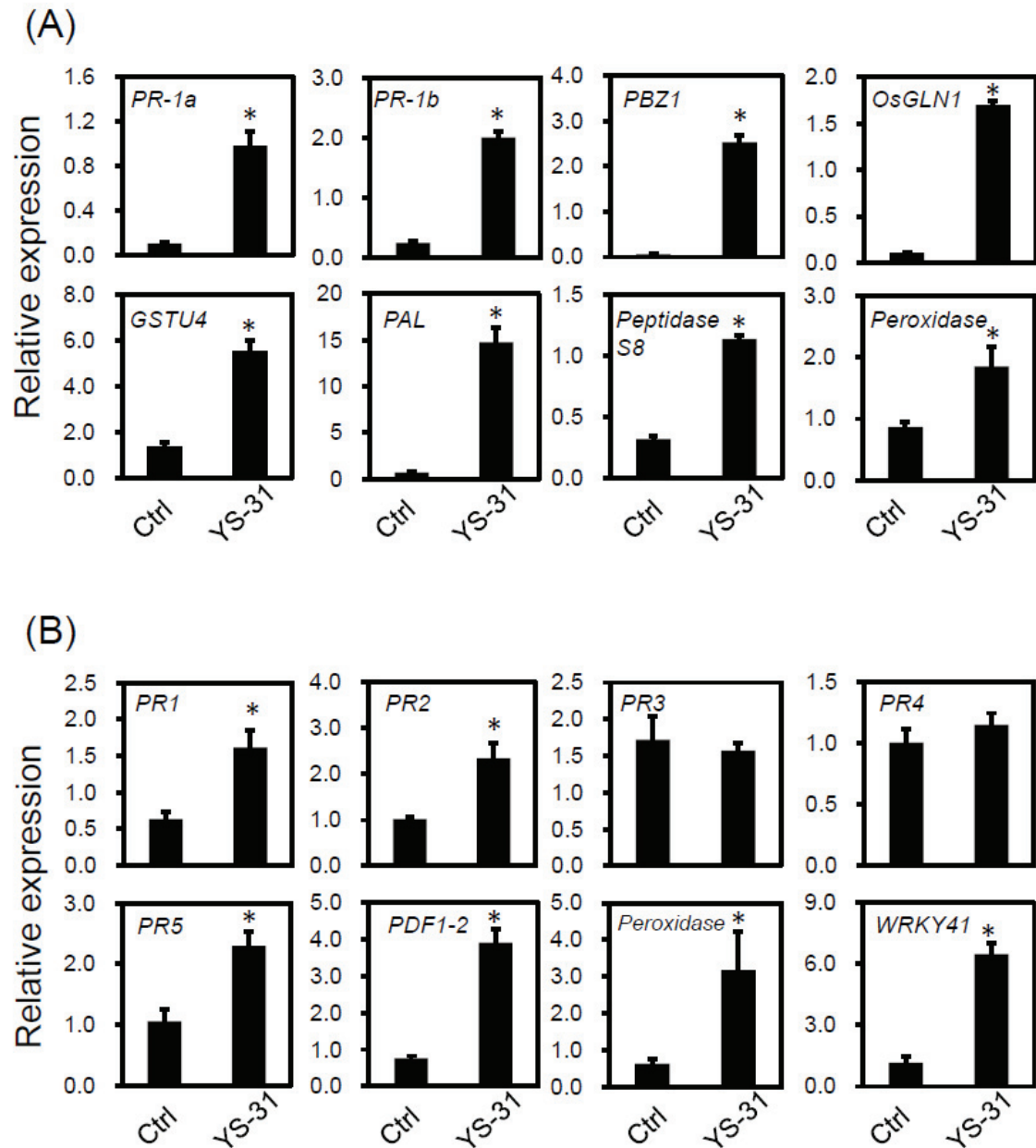


Figure 22. Expression change of pathogen resistance-related genes in rice leaf and Arabidopsis shoots treated with *P.pinophilum*. (A) rice and (B) Arabidopsis treated percolate of *P.pinophilum* transferred seedlings were grown for 3 weeks. Error bars represent SE of the averages of three technical replication. Transcript levels were normalized to the *Rubq1* in rice and *UBQ1* in Arabidopsis as the internal control. Asterisks show a significant difference by Student's *t* test ($P < 0.05$).

総合考察

本研究ではシロイヌナズナおよびイネにおける複数種のミネラルストレスおよび有用微生物処理によって発現変動する遺伝子をマイクロアレイ解析を主軸にして特定し、遺伝子機能から分子生理学的反応の包括的プロファイリングを行った。さらに根圏ミネラルストレス因子に特異的に応答する遺伝子発現バイオマーカーを同定する簡易的方法の構築を試みた。

比較トランスクリプトーム解析によって N, P, K の栄養欠乏や Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , NaCl の毒性イオンストレスを根圏に処理したモデル植物地上部のストレス特異的反応または普遍的応答遺伝子の同定を行ったところ根圏部の栄養欠乏または毒性イオンストレスによる地上部の転写変動はストレス因子ごとに特異性が高いことが示された。地上部および地下部で共通して強誘導する遺伝子は少なかったが、類似した機能の遺伝子が発現誘導していることから根圏部のストレス障害は地上部にも同様の障害をもたらしており、植物は地上部と地下部それぞれ組織特異的な遺伝子が発現誘導して耐性を獲得している可能性が考えられる。Al ストレスでは STOP1 下流遺伝子が発現誘導されており、さらにマイクロアレイ解析の結果、フィルタリングにより除外されているガリンド酸放出トランスポーター遺伝子 *AtALMT1* が地上部でも発現誘導していることが確認できた。Al は根部に蓄積し、植物体内に移行しにくいことから Al ストレスシグナル伝達による誘導だと推測される。根圏ミネラルストレスに対する地上部へのシグナル伝達機構の解明は進められておらず、今後の解析が望まれる。

根圏部のストレスに対する植物体地下部の転写解析より分子生理学的応答を推測し耐性に関与する遺伝子の同定を行うにあたり有意義な手法である。これは根部が直接的に根圏ミネラルストレスに晒されているためである。その一方で地上部の転写応答は根圏部のストレス因子による直接的な影響またはシグナル伝達を介した間接的な影響があるため耐性遺伝子の特定および解析が困難である。なかでも過剰に存在する毒性イオン種により生じる活性酸素はシグナル伝達物質であると同時に酸化ストレスの原因物質でもあり、従来、

生物的ストレスと非生物的ストレスは異なる独立したシグナル伝達機構であると考えられてきたが、近年では活性酸素ならびに植物ホルモンを介したシグナル経路が相互に緊密かつ重複していることが報告されている。Zhao ら (2008) を含めた多くの研究でシロイヌナズナの根部におけるミネラルストレス誘導遺伝子の共通項として活性酸素ストレスに関与する遺伝子セットとして誘導されており、これらの遺伝子機能が根部の発現遺伝子に高い類似性を示している。

本研究では、根圏ミネラルストレスとして N, P, K の栄養欠乏および Al, Cd, Cu, NaCl の毒性イオンストレス処理で発現誘導される遺伝子群に着目し比較トランスクリプトーム解析より得られたストレス特異的応答遺伝子を用い植物の栄養状態を検査する遺伝子発現バイオマーカーの開発を試みた。その結果、幼植物体のストレス初期応答のトランスクリプトームが長期間生育および土耕栽培した植物に応用できることが明らかになった。また有用微生物を接種した植物体を転写応答で評価し、病害抵抗誘導性の分子生理学的評価が可能であることを示した。遺伝子のなかには複数のストレスによって誘導されるものが多く存在しており、Kobayashi ら (2013) は *AtALMT1* が Al^{3+} や低 pH ストレスのみならず生物ストレスであるフラジェリンやオーキシンの植物ホルモンといった様々な刺激で誘導されることを明らかにしている。このような偽陽性のストレス誘導遺伝子を除くために比較トランスクリプトーム解析で遺伝子数を絞ったのち複数の遺伝子発現量を測定することで転写バイオマーカーの精確性および効率性が向上すると考えられる。環境低負荷型農業を実践するにあたり、世界の多様な土壌で栽培される作物を精密農業 (Precision agriculture) でバイオマーカーを含めた複合的な栄養状態管理によって植物の栄養状態を把握することが期待される。また地上部の発現遺伝子を検査することで不良土壌の農業では区画ごとの細やかな栄養管理が可能となり、例えば酸性土壌では極端に低 pH の区画に対して石灰を追肥すること生産性を向上することが可能となる。様々な物質がバイオマーカーとなっているが、miRNA の発現量もストレス状態を示す有用な遺伝子発現バイオマーカーになりうることを報告されている。遺伝子発現バイオマーカーは土壌検査では精密な評価が困難であるストレス障害を検査することが可能であるため、農地での作物栄養管理に

貢献すると考えられる。また酸性土壌をモデルとして黒ボク土を用い、STOP1 下流遺伝子を Al 応答性バイオマーカー遺伝子の発現量を観察したところ、著しく発現誘導されていることが判明した。またタバコでも *NtALS3* が Al に応答する転写バイオマーカーであることを証明した。植物に普遍的に存在するストレス応答機構の遺伝子を特定することが、バイオマーカーの特定に有用な遺伝子であるといえる。Yang ら (2011) が示したように、温室で栽培した植物のトランスクリプトームデータより得られたバイオマーカー遺伝子がフィールド栽培した植物にも適応できることが示されている。本実験でも水耕栽培系より特定したバイオマーカー遺伝子が土耕条件による長期ストレス処理に対しても十分な互換性があることを示した。遺伝的背景が異なる品種ではバイオマーカー遺伝子の発現量に大きな差が出ることも予測される。例えば、窒素利用効率 (NUE; nitrogen use efficiency) や Al に対する有機酸放出が品種ごとに異なっていることが判明している (Gallais and Hirel, 2004; Ikka et al., 2008)。本研究ではバイオマーカー遺伝子の品種間での普遍的応用性は実験していないが、Yang らはフィールドで育てた複数のトウモロコシ交雑品種で N 欠乏バイオマーカーが N 欠乏に応答するかを試験したところ多くの品種で栄養状態の評価が可能であることを示した。トランスクリプトームを用いた解析では複合ストレスを用いた解析や土壌で生育させた植物の転写解析も行われており、フィールド環境下およびそれを模したストレス応答機構の解明が精力的に進められ、さらにオーミクス解析を統合した技術でフィールドにおける栽培管理を行う方法が検討されている (Jensen et al., 2010; Sato et al., 2011; Nagano et al., 2012; Alexandersson et al., 2014)。

モデル植物であるシロイヌナズナは様々なストレス処理でのトランスクリプトームデータが充実しており分子生物学的解析の基盤として大きく貢献している。その一方で植物種ごとに大量の転写データを蓄積することは困難であり、また品種、植物の生育ステージごとの細かな転写情報を集積することも至難である。従ってシロイヌナズナやイネなどのモデル植物より得られた転写情報からオーソログを特定し、複数の遺伝子発現バイオマーカーで植物の健康状態を評価することが現実的であると考えられる。一般的に作物はストレス感受性であるため、ストレスに対して発現抑制される遺伝子群がバイオマーカーに適して

いると考えられるが、AI ストレス特異的に発現誘導する遺伝子として *ALS3* が植物種普遍的に存在する転写バイオマーカーであると証明した。実際の農地でストレス耐性の付与や遺伝子発現バイオマーカーの開発のためにトランスクリプトームデータの蓄積がより重要になる。本研究も、そのモデルとなる研究であり地上部の転写応答の解明が大きく前進すると考えられる。

以上のことを踏まえ、本研究の成果としてミネラルストレスに対するモデル植物の幼植物体の各ストレス特異的遺伝子の特定および、それを用いて簡便な方法で遺伝子発現バイオマーカーを探索、同定が可能であることを示した。水耕と土耕の根圏環境の差異はありながらも、地上部では同一の遺伝子の発現変化であることが推測される。本研究でも水耕栽培植物体の転写変動がストレス初期の発現誘導遺伝子であっても生育中期の植物体または土耕栽培の植物体にも応用できることを発見した。オーミクス研究によるバイオマーカーによる植物の栄養管理は現実味を帯びてきている。蓄積された膨大なオーミクスデータから分子生理的反応を反映した、遺伝子発現制御機構を解明しモデルを構築し、植物の環境ストレス応答機構の理解に貢献すると考えられる。

結論

ミネラルストレスの比較トランスクリプトーム解析は特異的な応答を示す遺伝子を特定でき、様々な状態下の分子生理学的応答の解明することができる。N, Pi, K 欠乏処理において各ストレスで共通して誘導される遺伝子は少なく、特異的な応答をする遺伝子が多いことから根圏のストレスに対して地上部は特異的な転写反応を示すことが判明した。毒性イオンとして Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , NaCl を根圏に処理した解析で, Al では STOP1 制御遺伝子群, Cd および Cu では JA 関連遺伝子や *PR gene* および *PDF family* といった病害応答性に関与する遺伝子群, NaCl では *DREB2A* や *LEA protein*, *HSP* などの浸透圧ストレス応答遺伝子が誘導されており, さらに総合的な根圏毒性イオン応答の転写解析から浸透圧ストレスおよび酸化ストレスが全ストレスに共通して引き起こされるストレスだと示唆する結果が出た。また Fe 欠乏転写因 *bHLH101* や *PYE* が発現誘導されていたが, IRT family や *YSL family* といった重金属トランスポーター遺伝子や 金属の体内移行に関与する *NAS* の発現量は変動していなかった, または抑制されていた。一方地下部では各根圏毒性イオンストレスで重金属輸送系が大きく抑制されていることから, 根圏毒性イオンによるストレスは植物体内の重金属輸送を攪乱することが示唆された。

比較トランスクリプトーム解析より特定された遺伝子発現バイオマーカーは正確に植物の栄養状態ならびに毒性イオンの障害を評価することができた。このことから水耕栽培系で育てた植物体より得られたトランスクリプトームデータで作成した遺伝子発現バイオマーカーが土耕で栽培した植物にも適応できることが示された。また植物の生育状態および栽培期間やストレス状態が異なる状況でも正確に評価できることが判明した。

有用微生物 *Penicillium pinophilum* YS-31 株を根圏処理することでイネやシロイヌナズナ地上部で病害応答性遺伝子を誘導することが判明した。イネとシロイヌナズナ間で YS-31 株によって誘導される病害応答性遺伝子が異なることから, 病害抵抗性機構の差異を示唆する結果となった。このことより植物種によって植物プロバイオティクスの効果が作用するか検証する必要がある。

謝辞

本研究の遂行ならびに論文作成にあたり御指導と御助言を賜りました岐阜大学応用生物科学部教授 小山博之博士に謹んで御礼申し上げます。また本研究の遂行にあたり御懇篤な御指導と御助言を賜りました岐阜大学応用生物科学部助教 小林佑理子博士に厚く御礼申し上げます。

インターンシップならびに論文執筆においてご助力賜りました揖斐川工業株式会社アグリバイオ課 佐伯裕作様に深く御礼申し上げます。

また、植物細胞学研究室の諸氏に、ここに深く感謝いたします。

最後に長きにわたり研究生活において、つねに暖かく見守り支えてくださった両親ならびに姉と兄に深い感謝の念を表します。

引用文献

- Alexandratos N** (1999) World food and agriculture: Outlook for the medium and longer term. **96**: 5908-5914
- Atkinson NJ, Urwin PE** (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stress: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* **63**: 3523-3544
- Barah P, Winge P, Kusnierczyk A, Tran DH, Bones AM** (2013) Molecular signatures in *Arabidopsis thaliana* in response to insect attack and bacterial infection. *PLoS ONE* **8**: e58987
- Bartlett RJ and Riego DC** (1972) Toxicity of hydroxy aluminum in relation to pH and phosphorus. *Soil Sci* **114**: 194-200
- Brown BA, Cloix C, Jiang GH, Kaiserli E, Herzyk P, Kliebenstein DJ, Jenkins GI** (2005) A UV-B-specific signalling component orchestrates plant UV protection. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 18225-18230
- Bülowa L, Holmberg N, Liliusa G, Bailey JE** (1999) The metabolic effects of native and transgenic hemoglobins on plants. *Trends in Biotech* **17**: 21-24.
- Calderon-Vazquez C, Ibarra-Laclette E, Caballero-Perez J, Herrera-Estrella L** (2008) Transcript profiling of *Zea mays* roots reveals gene responses to phosphate deficiency at the plant- and species-specific levels. *J Exp Bot* **59**: 2479-2497
- Chao DY, Luo YH, Shi M, Luo D, Lin HX.** (2005) Salt-responsive genes in rice revealed by cDNA microarray analysis. *Cell Research* **15**: 796-810
- Davila Olivas NH, Coolen S, Huang P, Severing E, van Verk MC, Hickman R, Wittenberg AHJ, de Vos M, Prins M, van Loon JJA, Aarts MGM, van Wees SCM, Pieterse CMJ, Dicke M** (2016) Effect of prior drought and pathogen stress on *Arabidopsis* transcriptome changes to caterpillar herbivory. *New Phytol* **210**: 1344-1356

- Devaiah BN, Madhuvantihi R, Karthikeyan AS, and Raghothama KG** (2009) Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 transcription factor in Arabidopsis. *Mol Plant* **2**: 43-58
- Dimkpa C, Weinand T, Asch F** (2009) Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ* **32**: 1682-1694
- Ding ZJ, Yan JY, Xu XY, Yu DQ, Li GX, Zhang SQ, Zheng SJ** (2014) Transcription factor WRKY46 regulates osmotic stress responses and stomatal movement independently in Arabidopsis. *Plant Journal* **79**: 13-27
- Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z** (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res* **38**: 64-70
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D** (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14863-14868
- Ernst WHO, Peterson PJ** (1994) The role of biomarkers in environmental assessment. *Terrestrial plants Ecotoxicology* **3**: 180-192
- Fedoroff NV, Cohen JE** (1999) Plants and population: Is there time? *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5903–5907
- Flowers T, Yeo A** (1995) Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Functional Plant Biology* **22**: 875-884
- Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, Cassidy ES, Gerber JS, Johnston M, Mueller ND, O’Connell C, Ray DK, West PC, Balzer C, Bannett EM, Carpenter SR, Monfreda C, Polasky J, Sheehan J, Siebert S, Tilman D, Zaks DPM** (2011) Solutions for a cultivated planet. *Nature* **478**: 337-342
- Foy CD** (1988) Plant adaptation to acid, aluminum - toxic soils. *Commun soil sci plant anal* **19**: 959-987
- Frommer WB, Ludewig U, Rentsch D** (1999) Taking transgenic plants with a pinch of salt. *Science* **285**: 1222-1223

- Gallais A, Hirel B** (2004) An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *J Exp Bot* **55**: 295-306
- Cassman KG** (1999) Ecological intensification of cereal production systems: yield potential, soil quality, and precision agriculture. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5952-5959
- George E, Marschner H, Jakobsen I** (1995) Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorous and nitrogen from soil. *Crit. Rev. Biotechnol* **15**: 257-270
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute JL, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas S, Toulmin C** (2010) Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* **327**: 812-818
- Gojon A, Nacry P, Davidian JC** (2009) Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 328-338
- Gupta SD, Wu HC, Rick PD** (1997) A salmonella typhimurium genetic locus which confers copper tolerance on copper-sensitive mutants of escherichia coli. *J Bacteriol* **179**: 4977-4984
- Hall JL** (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* **53**: 1-11
- Hammond-Kosack KE and Jones JDG** (1997) Plant disease resistance genes. *Plant Mol Biol* **48**: 575-607
- Hammond JP, Bennett MJ, Bowen HC, Broadley MR, Eastwood DC, May ST, Rahn C, Swarup R, Woolaway KE, and White PJ** (2003). Changes in gene expression in Arabidopsis shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiol* **132**: 578-596.
- Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V** (2006) Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots. *Biochimie* **88**: 1751-1765

- Ho I, Trappe JM** (1975). Nitrate reducing capacity of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* **67**: 886-888.
- Hoekenga OA, Maron LG, Pineros MA, Cancado GM, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, et al** (2006) *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 9738–9743
- Holmgren A** (1995). Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* **3**: 239-243
- Holmberg N, B** (1998) Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends in Plant Science* **3**: 61-66
- Hughen KA, Eglinton TI, Xu L, Makou M.** (2004) Abrupt Tropical Vegetation Response to Rapid Climate Changes. *Science* **304**: 1955-1959
- Ikka T, Kobayashi Y, Iuchi S, Sakurai N, Shibata D, Kobayashi M, 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
- Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, Kobayashi Y, Ikka T, Hirayama T, Shinozaki K, and Kobayashi M** (2007). Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 9900-9905
- Jackson MB, Colmer TD** (2005) Response and adaptation by plants to flooding stress. *Annals of Botany* **96**: 501-505
- Jeong J, Guerinot ML** (2009) Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends in plant science* **14**: 280-285
- Jeuffroy MH, Ney B, Ourry A.** (2001) Integrated physiological and agronomic modelling of N capture and use within the plant. *J Exp Bot* **53**: 809-823

- Magalhaes JV, Liu J, Guimaraes CT, Lana UGP, Alves VM, Wang YH, Schaffert RE, Hoekenga OA, Pineros MA, Shaff JE, Patricia EK, Carnerio NP, Coelho CM, Trick HN, Kochian LV** (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature genetics* 39 : 1156-1161
- Maruyama-Nakashita A, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Yamaya T, Takahashi, H.** (2003) Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur on nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiol.* 132: 597-605
- Kato H** (2001) Rice blast disease. *Pestic. Outlook* 12, 23–25
- Kempema LA, Cui X, Holzer FM, Walling LL** (2007) *Arabidopsis* transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiol* 143: 849-865
- Kidd PS, Proctor J** (2001) Why plants grow poorly on very acid soils: are ecologists missing the obvious. *J Exp Bot* 52: 791-799
- Kobayashi Y, Hoekenga OA, Itoh H, Nakashima M, Saito S, Shaff JE, Maron LG, Pineros MA, Kochian LV, Koyama H** (2007) Characterization of AtALMT1 expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 145: 843-852
- Kraiser T, Gras DE, Gutiérrez AG, González B, Gutiérrez RA** (2011) A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *J Exp Bot* 62: 1455-1466
- Krapp A, Berthome R, Orsel M, Mercey-Boutet S, Yu A, Castaings L, Elftieh S, Major H, Renou JP, Daniel-Vedele F** (2011) *Arabidopsis* roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant Physiol* 157: 1255-1282
- Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF** (2002) Transcriptome changes

- for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* **130**: 2129-2141
- Kumari M, Taylor GJ, Deyholos MK** (2008) Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* **279**: 339-357
- Lager I, Andréasson O, Dunbar TL, Andreasson E, Escobar MA, Rasmusson AG** (2010) Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. *Plant Cell Environment* **33**: 1513-1528
- Larsen PB, Geisler MJ, Jones CA, Williams KM, Cancel JD** (2005) *ALS3* encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Plant J* **41**: 353-363
- Lawton K, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Staub T, Kessmann H, and Ryals J** (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J* **10**: 71-82.
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, and Jones JDG** (2004) The Transcriptional Innate Immune Response to flg22. Interplay and Overlap with Avr Gene-Dependent Defense Responses and Bacterial Pathogenesis. *Plant Physiol* **135**: 1113-1128
- Liu W, Liu J, Ning Y, Ding B, Wang X, Wang Z, Wang GL** (2013) Recent progress in understanding PAMP- and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant* **6**: 605–620
- Lobell DB, Schlenker W, Costa-Roberts J** (2011) Climate trends and global crop production since 1980. *Science* **333**: 616-620
- Loreti E, Poggi A, Novi G, Alpi A, Perata P** (2005) A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in Arabidopsis under anoxia. *Plant Physiol* **137**: 1130-1138

- Lutz W, Samir KC** (2001) Dimensions of global population projections: What do we know about future population trends and structures? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**: 2779-2791
- Maathuis F JM** (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 250-258
- Maksymiec W** (2007) Signaling responses in plant to heavy metal stress. *Acta Physiol Plant* **29**: 177-187
- Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki Y, Kaminuma E, Endo TA, Okamoto M, Nambara E, Nakajima M, Kawashima M, Satou M, Kim JM, Kobayashi N, Toyoda T, Shinozaki K, Seki M** (2008) Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant Cell Physiol* **49**: 1135-1149
- Marchand G, Mayjonade B, Vares D, Blanchet N, Boiface M-C, Maury P, Andrianasolo FN, Burger P, Debaeke P, Casadebaig P, Vincourt P, Langlade NB** (2013) A biomarker based on gene expression indicates plant water status in controlled and natural environments. *Plant Cell Environ* **36**: 2175-2189
- Mark GL, Dow JM, Kiely PD, Higgins H, Haynes J, Baysse C, Abbas A, Foley T, Franks A, Morrissey J, O'Gara F** (2005) Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe–plant interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 17454-17459
- Maruyama-Nakashita A, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Yamaya T and Takahashi H** (2003) Transcriptome Profiling of Sulfur-Responsive Genes in Arabidopsis Reveals Global Effects of Sulfur Nutrition on Multiple Metabolic Pathways. *Plant Physiol* **132**: 597-605
- Mathioni SM, Belo A, Rizzo CJ, Dean RA, Donofrio NM** (2011) Transcriptome profiling of the rice blast fungus during invasive plant infection and in vitro stresses. *BMC*

- Misra P, Pandey A, Tiwari M, Chandrashekar K, Sidhu OP, Asif MH, Chakrabarty D, Singh PK, Trivedi PK, Nath P, Tuli R** (2010) Modulation of transcriptome and metabolome of tobacco by Arabidopsis transcription factor, AtMYB12, leads to insect resistance. *Plant Physiol* **152**: 2258-2268
- Misson J, Raghothama KG, Jain A, Jouhet J, Block MA, Bligny R, Ortet P, Creff A, Somerville S, Rolland N, Doumas P, Nacry P, Herrerra-Estrella L, Nussaume L, Thibaud MC** (2005) A genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 11934-11939
- Morimoto T, Hatou K, Hashimoto Y** (1996) Intelligent control for a plant production system. *Control Engineering Practice* **4**: 773-784
- Nable RO, Bañuelos GS, Paull JG** (1997) Boron toxicity. *Plant Soil* **193**: 181-198
- Nathalie V and Christian H** (2013) Physiological and molecular responses to magnesium nutritional imbalance in plants. *Plant Soil* **368**: 87-99
- Nian H, Yang Z M, Ahn S J, Cheng Z J and Matsumoto H** (2002) A comparative study on the aluminium- and copperinduced organic acid exudation from wheat roots. *Physiol Plant* **116**: 328-335
- Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R** (2003) Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J* **33**: 633-650
- Nishizawa A, Yabuta Y, and Shigeoka S** (2008) Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. *Plant Physiol* **147**: 1251-1263
- Ohyama Y, Ito H, Kobayashi Y, Ikka T, Morita A, Kobayashi M., Imaizumi R, Aoki T, Komatsu K, Sakata Y, Iuchi S. Koyama H** (2013) Characterization of AtSTOP1

- orthologous genes in tobacco and other plant species. *Plant Physiol* **162**: 1937-1946
- Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, Winget M, Yasui Y** (2001) The first paper to provide a systematic approach to biomarker development for the early detection of cancer *J Natl Cancer Inst* **93**: 1054–1061
- Phelix CF, Feltus FA** (2014) Plant stress biomarkers from biosimulations: the Transcriptome-To-Metabolome™ (TTM™) technology - effects of drought stress on rice. *Plant Biol*, doi:10.1111/plb.12221
- Poschenrieder C, Tolra R, Barcelo J** (2006) Can metals defend plants against biotic stress? *Trends Plant Sci* **11**: 288–295
- Postnikova OA, Nemchinov LG** (2012) Comparative analysis of microarray data in *Arabidopsis* transcriptome during compatible interactions with plant viruses. *Virology* **9**: 101
- Raghothama KG** (1999) Phosphate Acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**:665–693
- Ramankutty N, Evan AT, Monfreda C, Foley JA** (2008) Farming the planet: 1. Geographic distribution of global agricultural lands in the year 2000. *Global Biogeochem Cycles* **22**: 1003
- Rao IM, Zeigler RS, Vera R and Sarkurung S** (1993) Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. *BioScience* **43**: 454-465
- Rasmussen S, Barah P, Suarez-Rodriguez MC, Bressendorff S, Friis P, CostantinoP, Bones AM, Nielsen HB, Mundy J** (2013) Transcriptome responses to combinations of stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **161**: 1783-1794
- Raun WR, Johnson GV** (1999). Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agronomy Journal* **91**: 357-363
- Rossel, J.B, Wilson IW, Pogson BJ** (2002) Global changes in gene expression in response to high light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **130**: 1109-1120

- Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn SJ, Ryan, PR, Delhaize E, Matsumoto H** (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J* **37**: 645-653
- Sawaki Y, Iuchi S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Ikka T, Sakurai N, Fujita M, Shinozaki K, Shibata D, Kobayashi M, Koyama H** (2009) STOP1 regulates multiple genes that protect Arabidopsis from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol* **150**: 281-294
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling S** (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol* **116**: 447-453
- Secco D, Jabnourne M, Walker H, Shou H, Wu P, Poirier Y, Whelan J** (2013) Spatio-temporal transcript profiling of rice roots and shoots in response to phosphate starvation and recovery. *Plant Cell* **25**: 4285-4304.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, and Ideker T** (2003) Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res* **13**: 2498–2504
- Shukla D, Kesari R, Mishra S, Dwivedi S, Tripathi RD, Nath P, Trivedi PK** (2012) Expression of phytochelatin synthase from aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. enhances cadmium and arsenic accumulation in tobacco. *Plant Cell Rep* **31**: 1687–1699
- Strahm BD, Harrison RB.** (2006). Nitrate sorption in a variable-charge forest soil of the Pacific Northwest. *Soil Science* **171**: 313-321.
- Suzuki Y, Hibino T, Kawazu T, Wada T, Kihara T, Koyama H** (2003) Extraction of total RNA from leaves of Eucalyptus and other woody and herbaceous plants using sodium isoascorbate. *BioTechniques* **34**: 988-90, 992-3
- Swindell W.R, Huebner M, Weber AP** (2007) Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* **8**: 125

- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2002) Important roles of drought and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **29**: 417-426
- Takehisa H, Sato Y, Antonio B, Nagamura Y** (2015). Coexpression network analysis of macronutrient deficiency response genes in rice. *Rice* **8**: 59
- Tarpley L, Duran AL, Kebrom TH, Sumner LW** (2005) Biomarker metabolites capturing the metabolite variance present in a rice plant developmental period. *BMC Plant Biol* **5**: 8
- Thakore Y** (2006) The biopesticide market for global agricultural use. *Ind Biotechnol* **2**: 194-208
- Wang W, Vinocur B, Altman A** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1-14
- Wu P, Ma L, Hou X, Wang M, Wu Y, Liu F, and Deng XW** (2003). Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiol* **132**: 1260-1271
- Xu X, Chen C, Fan B, Chen Z** (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell* **18**: 1310-1326
- Yaji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **29**: 417-426
- Yang XS, Wu J, Ziegler TE, Yang X, Zayed A, Rajani MS, Zhou D, Basra AS, Schachtman DP, Peng M, Armstrong CL, Caldo RA, Morrell JA, Lacy M, Staub JM** (2011) Gene expression biomarkers provide sensitive indicators of in planta nitrogen status in maize. *Plant Physiol* **157**: 1841-1852

- Zhao CR, Ikka T, Sawaki Y, Kobayashi Y, Suzuki Y, Hibino T, Sato S, Sakurai N, Shibata D, Koyama H (2009) Comparative transcriptomic characterization of aluminum, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* **9**:32
- Zhou LL, Zeng HN, Shi MZ, Xie DY (2008) Development of tobacco callus cultures over expressing *Arabidopsis* PAP1/MYB75 transcription factor and characterization of anthocyanin biosynthesis. *Planta* **229**: 37-51
- Zhu JK (2000) Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**: 941-948
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, and Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136**: 2621-2632
- 井藤和人, 高橋満, 田中廉, 巢山弘介, 山本広基 (2000) 土壌微生物相に及ぼす土壌くん蒸剤の影響およびくん蒸後の土壌に接種された *Fusarium oxysporum* の増殖. *Journal of Pesticide Science* **25**: 147-149
- 伊藤清光, 中田唯文 (1999) 殺虫剤の連続散布によるジャガイモのアブラムシのリサーチエンス. *北日本病虫研報* **50**: 208-211
- 三枝正彦 (1991) 低 pH 土壌における作物の生育 植物有害 Al と下層土のエダフォロジー. *日本土壌肥科学雑誌* 第 62 巻 第 4 号 p451~459
- 甲斐秀昭, 蒲田昌治, 河口定生, 金山弘 (1986) 除草剤施用による水田土壌の微生物相の変動. *日本土壌肥科学雑誌* 第 57 巻 第 6 号
- 田口義広, 百町満朗, 堀之内勇人, 川根太 (2003) *Bacillus subtilis*IK-1080 によるイネいもち病の生物防除. *日本植物病理学会報* Vol. 69, No. 2 P 107-116
- 百町満朗, 高橋英樹, 松原陽一, 染谷信孝, 清水将文, 小林括平, 西口正通 (2014) 最近のわが国における植物病害の生物防除研究. *日植病報* 80 特集号 : 179-187

藤原俊六郎, 折原紀子 (1992) 数種の微生物資材の特性とトマト根腐萎ちょう病抑止効果の検討. 神奈川県園芸試験場研究報告 42 号 p. 41-50

望月雅俊 (1997) ケナガカブリダニの合成ピレスロイド剤 permethrin に対する抵抗性発達とその安定性. 日本応用動物昆虫学会誌 第 41 巻 第 1 号: 1-5