

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04465

研究課題名(和文) アルミニウム集積木本植物におけるアルミニウム集積機構および耐性機構の新たな展開

研究課題名(英文) New development of mechanisms of aluminum accumulation and aluminum tolerance in aluminum accumulator woody plants

研究代表者

渡部 敏裕 (Watanabe, Toshihiro)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：60360939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアルミニウム(AI)ストレスに対してAI集積木本植物がどのように適応しているのかをMelastoma malabathricum(メラストーマ)を中心に、遺伝子発現、元素、代謝産物、およびAI形態から総合的に解析した。その結果、メラストーマにおけるAI吸収・輸送・集積に関する遺伝子発現変動の全体像、AI集積におけるAI-クエン酸キレート的重要性、木本植物のAI集積におけるフェノリクスの重要性が明らかとなった。今回得られた成果は今後のAI集積木本植物のAI過剰適応機構/AI集積機構を研究する上で、多くの示唆を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we comprehensively analyzed how Al-accumulator woody plants adapt to aluminum (Al) stress by analyzing gene expression, element, metabolite, and Al-form mainly using Melastoma malabathricum (Melastoma). As a result, the whole aspect of gene expression related to Al absorption, transportation and accumulation in Melastoma, the importance of Al-citrate chelate in Al accumulation in leaves, and the importance of phenolics in Al accumulation of woody plants were clarified. The results obtained in this study will give many suggestions in future research on mechanisms of adaptation to excess Al / mechanisms of Al accumulation, in Al-accumulator woody plants.

研究分野：植物栄養学

キーワード：酸性土壌 アルミニウム アルミニウム集積植物 アルミニウム耐性

1. 研究開始当初の背景

多くの酸性土壌で主要な植物生育制限要因となっているのはアルミニウム (Al) イオンの過剰害である。植物の Al ストレスに対する耐性機構として、Al による最初のかつ主要な障害部位である根細胞を Al から守る Al 排除機構が広く知られる一方で、体内での Al 耐性機構を発達させた植物種も存在する。特に、強酸性土壌に自生する木本植物の中には、体内での Al 耐性機構を極度に発達させ、根部だけではなく地上部にも乾燥重ベースで 1%以上の Al を集積する種がしばしば存在する。これらの植物は「Al 集積植物」と呼ばれており、障害を受けることなく高濃度の Al を集積する機構をもっている。

2. 研究の目的

強酸性土壌に生育する A 集積木本植物は、植物が持つ Al 耐性機構の中でも独特かつ最も強力な機構を持つはずである。しかし、その耐性機構の本質的な部分は未解明であるといっても過言ではない。本研究では申請者らがこれまでに蓄積した Al 集積木本植物に関する多様な研究成果に基づき、Al ストレスが集積植物体内で引き起こす Al 形態、元素、代謝産物、および遺伝子発現の動的変動を統合的に解析し、Al 集積木本植物の真の Al 耐性機構および集積機構の解明を試みる。また、これまで全く研究されてこなかった、地上部への高濃度 Al 輸送の要因が何にあるのか、地上部に到達した後の葉における Al の細胞間・細胞内輸送にどのような物質が関与するかをシンプルで独創的な手法で明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アルミニウム処理がアルミニウム集積木本植物体内の物質動態と遺伝子発現に与える影響

Al 集積植物である *Melastoma malabathricum* (メラストーマ) を 0.5 mM の $AlCl_3$ を含む (+Al) あるいは含まない (-Al) 培養液で 3 日間栽培した後、葉と根を採取した。植物体試料の一部は RNA 抽出に、残りは元素等の分析に用いた。精製した RNA を用いて *de novo* RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。

(2) Al 集積木本植物の Al 吸収・輸送および Al 集積

Al 処理を行ったメラストーマの xylem sap を採取し、それに含まれる主要な陽イオン、陰イオン、有機酸を分析した。+Al 処理時の組成を元に作成した擬似 xylem sap に、Al を xylem sap で通常形成される Al-クエン酸の形態で加えたものと、Al-リンゴ酸の形態で加えたものを作成した。これらの擬似 xylem sap をメラストーマの地下部を切除した個体の切断面から吸収させ、葉における Al の動態を ^{27}Al NMR により調べた。また、メラストーマと Al 非集積植物の *Melaleuca cajuputi*

(メラルーカ) の根の脂質、細胞壁成分、フェノール化合物について調査し、Al 耐性・集積性との関係を調べた。

4. 研究成果

(1) アルミニウム処理がアルミニウム集積木本植物体内の物質動態と遺伝子発現に与える影響

3 日間の +Al 処理でメラストーマの葉の Al 含有率は 260 mg kg^{-1} となり -Al 処理の葉の 56 mg kg^{-1} より有意に高くなったが、メラストーマは本来葉に 10000 mg kg^{-1} を超える Al を集積する能力を有するため、本実験の結果は Al 集積の比較的初期の応答を示すと推察された。

今回の RNA-seq では 39528 個の遺伝子が検出され、そのうち根で特異的に発現したものは 5932 個、葉で特異的に発現したものは 5866 個あった (図 1)。また、Al 添加により発現量が変動した遺伝子 ($\log_2 |FC| \geq 1$, with $q \text{ value} < 0.05$ in edgeR's test and/or $p < 0.05$ in Welch's test) について、up-regulate された遺伝子は 1198 個あり、その約 6 割が根部でのみ、約 4 割が葉でのみ変動が見られ、葉と根で共通して変動した遺伝子はほとんど無かった (図 2)。同様に down-regulate された遺伝子は 1473 個あり、up-regulate された遺伝子の場合とほぼ同じ割合で葉および根に特異的な変動だった。これら Al によって発現が変動する遺伝子の割合は全遺伝子の 7%程度だった (図 2)。

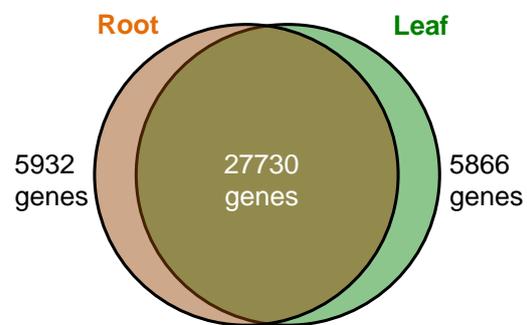


図 1. 根および葉で検出された遺伝子数。CPM>0.4 のものを示した。

次に GOE 解析を行ったところ、根では Al により膜輸送に関連する遺伝子の発現が高まることが示された。また、リグニン合成に関する遺伝子は発現が Al により低下する傾向が認められ、実際にメラストーマのリグニン含有率が Al により低下することを報告した過去の研究結果と一致した (Watanabe et al., 2005)。過酸化脂質含量も Al により低下することから (Watanabe et al., 2006)、この応答は Al が酸化ストレスを軽減することによると考えられる。

膜輸送に関する遺伝子に着目すると、Al イオンあるいは Al イオンの有機酸複合体を輸送することが予想される複数の遺伝子の発

現が Al により上昇することが認められ、今後、メラストーマの Al 超集積性の原因となる遺伝子の特定が期待される。

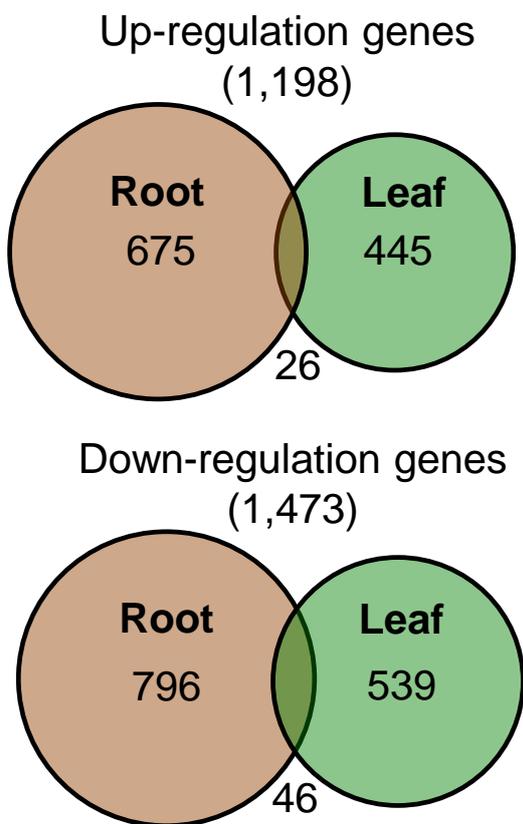


図 2. ±Al 処理間で発現の異なった遺伝子数。差の有無の判定は Up-regulation genes では 2 倍以上、down-regulation genes では 1/2 以下の違いがあり、かつ edgeR' s test で q 値が 0.05 未満か Welch' s test で p 値が 0.05 未満の場合を基準として行った。

(2) Al 集積木本植物の Al 吸収・輸送および Al 集積

Al 処理を行ったメラストーマの xylem sap に含まれる主要な陽イオン、陰イオン、有機酸の濃度と同じ組成の擬似 xylem sap を作成した。pH も xylem sap と同じに調節した。これに、Al を xylem sap で通常形成される Al-クエン酸の形態で加えたものと、Al-リンゴ酸の形態で加えたものを作成した。これらの擬似 xylem sap をメラストーマの地下部を切除した個体の切断面から吸収させたところ、Al-クエン酸の形態で吸収させた場合は速やかに葉で Al-シュウ酸キレート形成が見られたが、Al-リンゴ酸の形態で吸収させた場合は Al-シュウ酸キレートは形成されず、葉の萎れや障害が見られた (図 3)。この症状は擬似 xylem sap にリンゴ酸のみを加えた時には見られなかったことから、解離により生成した無機単量体 Al によると考えられた。以上のことから、メラストーマの葉に Al-シュウ酸キレートとして Al を集積するためには、輸送形態が Al-クエン酸キレートである必要

がある事が明らかとなった。Al-シュウ酸キレートの形成は液胞内で起こる事が予想されることから、液胞膜に Al-クエン酸キレートを輸送する膜輸送体が存在することが予想される。今後、トランスクリプトーム解析の結果も参考にしながら、Al 輸送の全体像解明を目指したい。

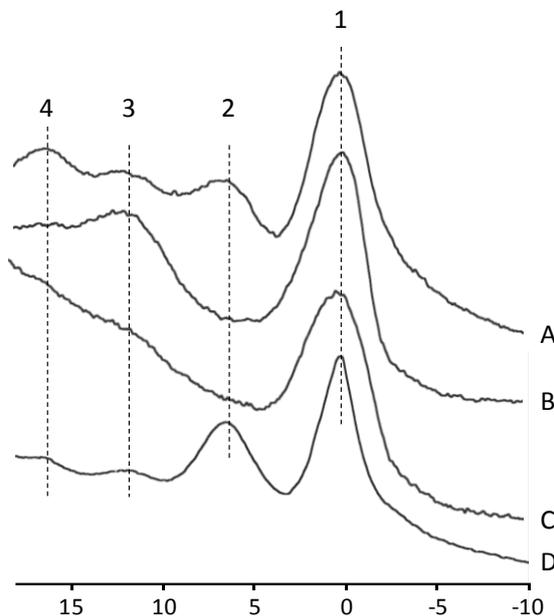


図 3. 葉の ^{27}Al NMR スペクトル。メラストーマの根を切除し切断面から擬似道管液を吸わせた個体の葉 (A、B、C) と 0.5 mM を含む培養液で栽培した植物体の葉 (D) を ^{27}Al NMR にて分析した。A: 3 mM Al+クエン酸混合液を加えた擬似道管液で 6 日間処理、B: 3 mM Al+クエン酸混合液を加えた擬似道管液で 1 日間処理、C: 3 mM Al+リンゴ酸混合液を加えた擬似道管液で 1 日間処理、D: 6 日間 Al 処理したメラストーマ植物体の葉。点線で示したピークはそれぞれ 1: 無機単量体 Al、2: Al-シュウ酸複合体、3: Al-(シュウ酸)₂ 複合体、4: Al-(シュウ酸)₃ 複合体と推定される。リンゴ酸とキレートさせた Al イオンを道管から吸収させた場合は無機単量体のピークしか葉で確認されないが、クエン酸とキレートさせた Al イオンを吸収させた場合はインタクトな植物体で形成されるのと同じように Al-シュウ酸キレートおよび無機単量体 Al イオンが検出された。

木本植物であるメラストーマはタンニンなどのフェノリクスも多く含まれることが過去に報告されている。フェノリクスは Al と結合するためメラストーマ体内での Al 耐性機構と関連していることが予想される。そこでメラストーマ体内での Al 無毒化へのフェノリクスの関与を調べるため、メラストーマと同じフトモモ目の Al 非集積植物であるメラルーカとフェノリクスの特性を比較した。両種ともに根に含まれるフェノリクスの濃度はイネのような草本植物に比べ非常に

高く (図 4)、いずれも Al とキレートを形成する能力が認められたが、集積植物のメラストーマでのみ体内で Al と結合していることが示された。フェノリクスの含有率は Al 処理による影響を受けなかったため、恒常的に高濃度に存在するフェノリクスが集積植物であるメラストーマでは Al を無毒化するリガンドの 1 つとして機能していると予想された。

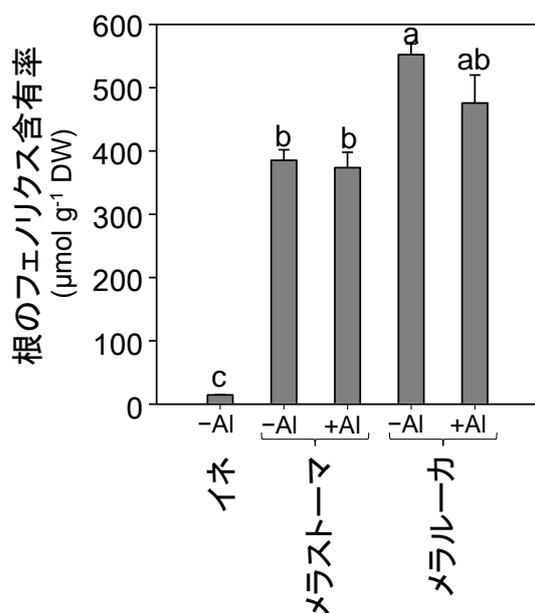


図 4. イネおよび±Al 処理を施したメラストーマとメラルーカの根におけるフェノリクス含有率。

異なるアルファベットは統計的に有意差が認められることを示す ($P < 0.05$, ANOVA および Tukey の多重比較)。メラストーマおよびメラルーカの根ではイネの根と比べて圧倒的に高濃度のフェノリクスが含まれる。

<引用文献>

- ① Watanabe T, Jansen S, and Osaki M: The beneficial effect of Al and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum* L., *New Phytologist*, 165, 773-780 (2005)
- ② Watanabe T, Jansen S, and Osaki M: Aluminium-iron interactions and growth enhancement in *Melastoma malabathricum* and *Miscanthus sinensis* dominating acid sulphate soils. *Plant, Cell & Environment*, 29, 2124-2132 (2006)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Dissanayaka DMSB, Nishida S, Tawarana K, Wasaki J. Organ-specific allocation

pattern of acquired phosphorus and dry matter in two rice genotypes with contrasting tolerance to phosphorus deficiency. *Soil Science and Plant Nutrition*, 印刷中 (2018), 査読有, doi: 10.1080/00380768.2018.1436941

- ② Nishida S, Dissanayaka DMSB, Honda S, Tateishi Y, Chuba M, Maruyama H, Tawarana K, Wasaki J. Identification of genomic regions associated with low phosphorus tolerance in japonica rice (*Oryza sativa* L.) by QTL-Seq. *Soil Science and Plant Nutrition*, 印刷中 (2018), 査読有, doi: 10.1080/00380768.2017.1412238
- ③ Yamamoto A, Wasaki J, Funatsu Y, Nakatsubo T. Distribution and stress tolerance of *Fimbristylis dichotoma* subsp. *podocarpa* (Cyperaceae) growing in highly acidic solfatara fields. *Ecological Research*, 印刷中 (2018), 査読有, doi: 10.1007/s11284-018-1605-1
- ④ Wagatsuma T, Maejima E, Watanabe T, Toyomasu T, Kuroda M, Muranaka T, Ohyama K, Ishikawa A, Usui M, Khan SH, Maruyama K, Tawarayama K, Kobayashi Y, Koyama H. Dark conditions enhance aluminum tolerance in several rice cultivars via multiple modulations of membrane sterols. *Journal of Experimental Botany*, 69, 567-577 (2018), 査読有, doi: 10.1093/jxb/erx414
- ⑤ Rahmawati D, Wijaya CH, Hashidoko Y, Djajakirana G, Haraguchi A, Watanabe T, Kuramochi K, Yanetri A. Concentration of some trace elements in two wild edible ferns, *Diplazium esculentum* and *Stenochlaena palustris*, inhabiting tropical peatlands under different environments in Central Kalimantan. *Eurasian Journal of Forest Research*, 20, 11-20 (2017), 査読有, https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/67941/1/02EJFR20_Della.pdf
- ⑥ Schmitt M, Mehlreter K, Sundue M, Testo W, Watanabe T, Jansen S. The evolution of aluminum accumulation in ferns and lycophytes. *American Journal of Botany*, 104, 573-583 (2017), 査読有, doi: 10.3732/ajb.1600381
- ⑦ Chu Q, Sha Z, Osaki M, Watanabe T. Contrasting effects of cattle manure applications and root-induced changes on heavy metals dynamics in the rhizosphere of soybean in an acidic Haplic Fluvisol: A chronological pot experiment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 3085-3095 (2017), 査読有, doi: 10.1021/acs.jafc.6b05813

- ⑧Dissanayaka DMSB, Wickramasinghe WMKR, Marambe B, Wasaki J. Phosphorus-mobilization strategy based on carboxylate exudation in lupins (*Lupinus*, Fabaceae): a mechanism facilitating the growth and phosphorus acquisition of neighboring plants under phosphorus-limited conditions, *Experimental Agriculture*, 53, 308-319 (2017), 査読有, doi: 10.1017/S0014479716000351
- ⑨Dissanayaka DMSB, Maruyama H, Nishida S, Tawaraya K, Wasaki J. Landrace of Japonica rice, Akamai exhibits enhanced root growth and efficient leaf phosphorus remobilization in response to limited phosphorus availability. *Plant and Soil*, 414, 327-338 (2017), 査読有, doi: 10.1007/s11104-016-3129-1
- ⑩ Maejima E, Osaki M, Wagatsuma T, Watanabe T. Contribution of constitutive characteristics of lipids and phenolics in roots of tree species in Myrtales to aluminum tolerance. *Physiologia Plantarum*, 160, 11-20 (2017), 査読有, doi: 10.1111/ppl.12527
- ⑪Chu Q, Sha Z, Nakamura, T, Oka N, Osaki M, Watanabe T. Differential responses of soybean and sorghum growth, nitrogen uptake and microbial metabolism in the rhizosphere to cattle manure application: A rhizobox study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 8084-8094 (2016), 査読有, doi: 10.1021/acs.jafc.6b03046
- ⑫Schmitt M, Watanabe T., Jansen S. The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. *AoB PLANTS*, plw065 (2016), 査読有, doi: 10.1093/aobpla/plw065
- ⑬Watanabe T., Maejima E, Yoshimura T, Urayama M, Yamauchi A, Owadano M, Okada R, Osaki M, Kanayama Y, and Shinano T. The ionic study of vegetable crops. *PLoS ONE*, 11, e0160273 (2016), 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0160273
- ⑭Chu Q, Watanabe T., Shinano T, Nakamura T, Oka N, Osaki M, Sha Z. The dynamic state of the ionome in roots, nodules, and shoots of soybean under different nitrogen status and at different growth stages. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 179, 488-498 (2016), 査読有, doi: 10.1002/jpln.201600059
- ⑮Sugihara S, Tomita Y, Nishigaki T, Kilasara M, Wasaki J., Sugihara S. Effects of different phosphorus-efficient legumes and soil texture on fractionated rhizosphere soil phosphorus of strongly weathered soils. *Biology and Fertility of Soils*, 52, 367-376 (2016), 査読有, doi: 10.1007/s00374-015-1082-4
- ⑯Schmitt M, Boras S, Watanabe T., Tjoa A, Jansen S. Aluminium accumulation and intra-tree distribution patterns in three arbor aluminosa (*Symplocos*) species from Central Sulawesi. *PLoS ONE*, 11, e0149078 (2016), 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0149078
- ⑰山内大輝, 丸山隼人, 内田慎治, 向井誠二, 坪田博美, 和崎淳. 日本産ヤマモガシ (*Helicia cochinchinensis* Lour., ヤマモガシ科) のクラスター根の発見. *植物研究雑誌*, 90, 103-108 (2015), 査読有
- ⑱Watanabe T., Urayama M, Shinano T, Okada R, Osaki M. Application of ionomics to plant and soil in fields under long-term fertilizer trials. *SpringerPlus*, 4, 781 (2015), 査読有, doi: 10.1186/s40064-015-1562-x
- ⑲Shibuya T, Watanabe T., Ikeda H, Kanayama Y. Ionic analysis of horticultural plants reveals tissue-specific element accumulation. *The Horticulture Journal*, 84, 305-313 (2015), 査読有, doi: 10.2503/hortj.MI-058
- [学会発表] (計 3 1 件)
- ① Watanabe T., Nishida S, Maruyama H, Yoshii K, Wasaki J. Transcriptome analysis of *Melastoma malabathricum* under aluminum stress, 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年 3 月 28 日~30 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- ② Saito T, Watanabe T., Nakatsubo T, Wasaki J. The mechanism of acid tolerance of *Lycopodium cernuum* L. grown in solfatara fields, Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 2017 年 11 月 3 日~6 日, Academia Sinica, 台北 (台湾)
- ③ 渡部敏裕, 前島恵理子. 強酸性土壤に生育する植物とアルミニウムの関係, 日本土壤肥料学会佐賀大会, 2016 年 9 月 20 日~22 日, 佐賀大学 (佐賀県・佐賀市)
- ④ 前島恵理子, 合田健登, 大崎満, 渡部敏裕. 低温条件下で栽培した *Melastoma malabathricum* の生育に対するアルミニウムの効果, 日本土壤肥料学会佐賀大会, 2016 年 9 月 20 日~22 日, 佐賀大学 (佐賀県・佐賀市)
- ⑤ Watanabe T., Maejima E, Osaki M, Azuma T. Ionic variation in leaves of 826 plant species growing in the botanical garden of Hokkaido University, Japan, Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress, 2016 年 6 月 26 日~30 日, Clarion Congress Hotel Prague, プラハ (チェコ)

- ⑥ Maejima E, Hiradate S, Osaki M, Wagatsuma T, Watanabe T. Characteristics of phenolics in root cells of Al-tolerant woody plants, Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress, 2016年6月26日～30日, Clarion Congress Hotel Prague, プラハ (チェコ)
- ⑦ 山本晃弘, 船津勇一, 和崎淳, 中坪孝之. 硫気荒原における植物の分布パターン: 低pH およびアルミニウム耐性で説明できるか?. 第63回日本生態学会大会, 2016年3月20日～24日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
- ⑧ 平舘俊太郎, 森田沙綾香, 小柳知代, 楠本良延. 草原生植物が生育する土壤環境と植物体内における無機栄養元素組成: ツリガネニンジン, ススキ, セイタカアワダチソウの比較, 日本土壤肥料学会京都大会, 2015年9月9日～11日, 京都大学 (京都府・京都市)
- ⑨ 前島恵理子, 渡部敏裕, 我妻忠雄, 大崎満. アルミニウム超耐性をもつ木本植物の根に含まれるフェノリクスの特性, 日本土壤肥料学会京都大会, 2015年9月9日～11日, 京都大学 (京都府・京都市)
- ⑩ Maejima E, Watanabe T, Wagatsuma T, Osaki M. Characteristics of root cell components in aluminum-tolerant woody plants, The 9th International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH, 2015年10月18日～23日, Hotel Ariston, ドゥブロヴニク (クロアチア)
- ⑪ Watanabe T, Maejima E, Hiradate S, Wasaki J, Osaki M, Jansen S. Physiological variations in aluminum accumulation in different aluminum-accumulator plant species, The 9th International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH, 2015年10月18日～23日, Hotel Ariston, ドゥブロヴニク (クロアチア)
- ⑫ Maruyama H, Kohama T, Yamauchi T, Watanabe T, Wasaki J. Effect of phosphorus status on distribution of other elements in *Hakea laurina* (Proteaceae), 13th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, 2015年7月12日～16日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
- ⑬ Wasaki J, Yamauchi T, Takahashi J, Maruyama H, Uchida S, Mukai S, Tsubota H. Growth condition and P mobilizing properties of cluster roots of *Helicia cochinchinensis* (Proteaceae) at Miyajima Island, Japan, Rhizosphere 4 congress, 2015年6月21日～25日, MECC, マーストリヒト (オランダ)
- ⑭ Watanabe T, Kusumoto Y, Morita S, Koyanagi T, Osaki M, Hiradate S. Ionomic

variation in plant species growing in various soil environments, Rhizosphere 4 congress, 2015年6月21日～25日, MECC, マーストリヒト (オランダ)

- ⑮ Maejima E, Watanabe T, Wagatsuma T, Osaki M. The characteristics of root cell components of plants adapted to acidic soil, Rhizosphere 4 congress, 2015年6月21日～25日, MECC, マーストリヒト (オランダ)

[図書] (計1件)

- ① Wagatsuma T, Maejima E, Watanabe T, Khan MSH, Ishikawa S. Aluminum Stress Adaptation in Plants, Springer, 274 (99-124) (2015)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.geocities.jp/watanabel209/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 敏裕 (WATANABE TOSHIHIRO)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 60360939

(2) 研究分担者

和崎 淳 (WASAKI JUN)
広島大学・生物圏科学研究科・教授
研究者番号: 00374728

平舘 俊太郎 (HIRADATE SYUNTARO)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号: 60354099