

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04469

研究課題名(和文) 栄養素分配におけるイネ節の機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of function of rice node for nutrients distribution

研究代表者

山地 直樹 (Yamaji, Naoki)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：00444646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネ科植物の節は著しく発達した維管束群が高度に組織化されており、栄養素の“維管束間輸送”によってその分配を制御していることが次第に明らかになってきた。本研究ではイネの節においてリン、ホウ素、鉄の維管束間輸送と器官間の分配に関わる新奇輸送体を同定し、その生理機能解析を行った。このうちリンの新規輸送体SPDTは節の維管束木部などに発現し、リンの維管束間輸送を促進することで新葉や種子へのリンの優先的な分配に寄与する。また節の肥大維管束木部転送細胞で高発現するケイ酸輸送体Lsi6のプロモーター解析を行い、組織特異的な遺伝子発現を制御する領域を推定した。

研究成果の概要(英文)：Nodes of graminaceous plants containing highly developed and fully organized vascular systems, which involved in “inter-vascular transfer” of mineral nutrients. In this study, we identified novel node localized mineral transporters for phosphorus, boron and iron in rice. Each transporter mediate inter-vascular transfer and contribute to preferential distribution control of each elements. In addition, we conducted promoter analysis of rice silicic acid channel Lsi6, which highly express in xylem transfer cells in enlarged vascular bundles in node. We estimate a regulatory promoter region for the tissue specific gene expression.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：イネ 節 無機栄養 ミネラル 輸送体 栄養素分配 プロモーター

1. 研究開始当初の背景

植物は土壌中の無機栄養素(ミネラル元素)の過不足に対処するため、根のミネラル吸収能力を変化させるだけではなく、限られたミネラルを発達中の新しい組織や種子へと優先的に分配し、また過剰なミネラルを古い組織に隔離する能力を備えている。このようなミネラルの選択的分配は、古典的な生理学実験や放射性トレーサを用いた実験、著しく発達した維管束群が集まる組織構造などから、節が主要な舞台であると考えられてきた。しかし、その分子メカニズムについては最近まで未解明であった。研究代表者らは2009年に、イネの節に高発現するケイ酸輸送体 Lsi6 を介した維管束間輸送が、穂への優先的なケイ素分配に不可欠であることを初めて明らかにした。さらに、マンガン、銅、亜鉛、ケイ素、カドミウム、ヒ素の節における分配に関与する輸送体を同定し、世界的にも類例の無い先駆的な研究を行ってきた。

2. 研究の目的

イネの節においてミネラルの分配や貯留に関わる新規遺伝子を同定し、その役割と節の機能を解明する。また節の維管束間輸送において中心的な役割を果たす、肥大維管束の木部転送細胞に特異的な遺伝子発現を制御するシス配列および転写制御因子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 節の各組織に高発現するミネラル分配関連候補遺伝子の選定

イネの栄養生長期の基部節および出穂期の上位節から肥大維管束木部転送細胞および分散維管束節部をレーザーマイクロダイセクション法によって分取し、トランスクリプトーム解析を行った結果に基づき、節の各組織で高発現するリン、ホウ素、鉄の分配への関与が推測される新規輸送体候補遺伝子を

選定した。また節におけるミネラルの貯留に関わる因子として、液胞膜局在が予想される各種ミネラル輸送体、キレート化合物の合成および輸送に関わる遺伝子からも同様に候補遺伝子を選定した。RT-PCRによる発現解析を節および節以外の様々な組織でおこない、節における発現が特に顕著な遺伝子について以下の解析を行った。

(2) 節のミネラル分配関連遺伝子の機能解明

レトロトランスポゾン Tos17 や T-DNA 挿入による遺伝子破壊株を検索、取得し、無い場合にはゲノム編集技術(CRISPR/Cas9法)による変異体を作成した。各器官のミネラル蓄積を ICP-MS によって測定し、また SEM-EDX や各種染色法、アイソトープのパルスラベルを用いた器官/組織毎のミネラル分布の比較などによって節における生理的な役割を解析した。また同時に器官および生育時期別に定量的 RT-PCR によって詳細な発現解析を行い、免疫組織染色とプロモーター GFP 形質転換イネによって組織局在を、GFP 融合遺伝子とウエスタン解析によって細胞内局在を明らかにした。輸送体遺伝子については輸送活性をアフリカツメガエル卵母細胞および酵母発現系を用いてアッセイを行った。

(3) 節の木部転送細胞に高発現する遺伝子のプロモーター解析

節の肥大維管束木部転送細胞に高発現するケイ酸輸送体 Lsi6 についてプロモーター解析を行い、木部転送細胞における遺伝子発現に関わる制御領域の同定を試みた。プロモーターのデリベーションクローンに GFP レポーターを付けたものを多種類用意し、形質転換イネにおいて RT-PCR と GFP 蛍光、GFP に対する抗体染色によって組織特異性を確認した。

4. 研究成果

(1) イネ節のミネラル分配関連候補遺伝

子の機能解析

イネ節で高発現するミネラル輸送体候補のうち、4つの遺伝子について解析を行った。

SPDT/OsSultr3;4については、節の維管束木部および維管束間の柔細胞に発現し、細胞膜に局在するリン酸取り込み輸送体であることを明らかにした。SPDTの変異体では、節、新葉、種子へのリンの分配が減少し、下位葉へのリン蓄積が増加したことから、SPDTが発達中の器官へのリンの優先的分配に寄与していることが明らかになった。(雑誌論文③参照) また、SPDTに加えて、OsPHO1;2も節においてリンの分配に関与していることを見出し、その機能について詳細な解析を行っている。(学会発表⑥)

ハウ酸の輸送体OsNIP3;1については、節の肥大維管束木部柔細胞の細胞膜に局在し、変異体においてはハウ素の分配に影響することを明らかにした。詳細な生理機能解析の結果OsNIP3;1は、新葉へのハウ素の分配に寄与し、破壊株ではハウ素欠乏条件下で著しく生育が悪化した。その発現はハウ素欠乏-ハウ素過剰に応答して、転写レベルおよびタンパク質レベルで制御されることを明らかにした。(雑誌論文①参照)

鉄の輸送体候補については、免疫組織染色の結果、節の肥大維管束木部において細胞膜に局在することを明らかにした。またその変異体では節および新葉の鉄濃度が低下し、新葉は鉄欠乏クロロシスを呈した。引き続きより詳細な生理機能解析や輸送基質の同定などを試みている。

さらに金属結合タンパク質として知られるメタロチオネインのうち、節で著しく高発現する2分子種について、遺伝子破壊株を取得し、生理機能解析を行った。その結果これらの遺伝子は、それぞれ亜鉛及び銅の分配や節への蓄積性に影響を及ぼすことが明らかになった。さらに二重変異体においてはより顕著な表現型を示した。ミネラルの維管束

間輸送を担う節においては他の器官よりも様々な金属元素が高濃度で蓄積することから、これらのメタロチオネインは節における亜鉛や銅の貯留と輸送をサポートする役割があると推測される。

(2) 節の木部転送細胞に高発現する遺伝子のプロモーター解析

節の肥大維管束木部の周縁部に形成される木部転送細胞は導管に面した細胞壁の内殖によって細胞膜の表面積が拡大しており、維管束間輸送の起点として様々なミネラル輸送体を高発現していると考えられる。したがってこの組織特異的な遺伝子発現制御の解明は節の栄養素分配を理解する上で重要であり、また栄養素の分配を改変する応用にもつながる。本研究では肥大維管束木部転送細胞に高発現するケイ酸輸送体Lsi6のプロモーターを対象として、その組織特異的発現を制御するシス配列の同定を試みた。

まず、最長5 kbまでのLsi6プロモーター、ORF(1 kb)またはイントロンを含むゲノム配列(4 kb)、3'UTR配列(0.5 kb)とGFPレポーター遺伝子を組み合わせ、合計14種類のコンストラクトを作成し、組換えイネを作成して、GFPに対する免疫組織染色によって節における発現組織特異性を評価した。ところが、いずれのコンストラクトでも本来Lsi6が高発現する肥大維管束木部には発現が見られず、代わりに分散維管束木部などで発現が見られた。Lsi6は節だけで無く、葉の導管に隣接する細胞などにも発現するが、それらの発現は組換えプロモーターでも再現できた。したがって節におけるLsi6の高発現は、単に維管束が発達することによる見かけ上の高発現では無く、節組織特異的な未知の発現制御機構の存在が示唆された。(学会発表③)

次にLsi6遺伝子上流約2.4 kbにT-DNAが挿入された新規変異株を取得し、この挿入が内在のLsi6の発現様式に影響を及ぼさな

いことを明らかにした。さらに Lsi6 プロモーター上の 2 カ所を同時にターゲットとする CRISPR/Cas9 法による変異導入を試み、プロモーター領域が数百 bp 以上欠失した数種類の新規変異体の作出に成功した。しかし、いずれの欠失系統でも節における Lsi6 の発現様式に大きな変化はみられず、野生型イネと同様に肥大維管束木部転送細胞で高発現していた。

これらの結果から、何らかの未知の理由によって Lsi6 の組換えプロモーターは本来の発現組織特異性を発揮しなかったものの、イネゲノム上の内在の Lsi6 遺伝子について発現制御に関わる蓋然性が高い領域を約 250 bp に絞り込むことができた。

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 3 件)

- ① Ji Feng Shao, Naoki Yamaji, Wei Liu Xin, Kengo Yokosho, Ren Fang Shen, Jian Feng Ma (2018) Preferential distribution of boron to developing tissues is mediated by the intrinsic protein OsNIP3;1. *Plant Physiology*, 176: 1739-1750. DOI: 10.1104/pp.17.01641 査読有り
 - ② Naoki Yamaji, Jian Feng Ma (2017) Node-controlled allocation of mineral elements in Poaceae. *Current Opinion in Plant Biology*, 39:18-24. DOI: 10.1016/j.pbi.2017.05.002 査読有り
 - ③ Naoki Yamaji, Yuma Takemoto, Takaaki Miyaji, Namiki Mitani-Ueno, Kaoru T. Yoshida, Jian Feng Ma (2017) Reducing phosphorus accumulation in rice grains with impaired transporter in node. *Nature* 541: 92-95. DOI: doi:10.1038/nature20610 査読有り
- 〔学会発表〕(計 17 件)
- ① Naoki Yamaji et al., A cooperative transport system for silicon in plants. 7th International Conference on Silicon in Agriculture, 2017 Oct. 24-28, Bengaluru, India
 - ② 山地直樹 イネの“節”の構造と機能 日本育種学会 2017 年 10 月 7-8 日 岩手大学
 - ③ 山地直樹ほか イネのケイ酸輸送体 Lsi6 の節における著しい高発現は組換えプロモーターでは再現できない 日本土壤肥料学会年会 2017 年 9 月 5-7 日 東北大学
 - ④ Naoki Yamaji et al., A novel phosphate transporter controlling grain P accumulation in rice. 18th International Plant Nutrition Colloquium, 2017 Aug. 21-24, Copenhagen, Denmark
 - ⑤ 山地直樹 コメのミネラル蓄積を左右する節の輸送制御 第 12 回トランスポーター研究会年会 2017 年 7 月 8-9 日 東北大学
 - ⑥ Jing Che, Naoki Yamaji, Jian Feng Ma, OsPHO1;2 is also involved in intervascular transfer of phosphorus in rice node. 日本植物生理学会年会 2017 年 3 月 16-18 日 鹿児島大学
 - ⑦ Naoki Yamaji, Novel phosphate transporter in rice node and grain P control. 第 33 回資源植物科学シンポジウム・第 9 回植物ストレス科学研究シンポジウム 2017 年 3 月 6-7 日 倉敷市芸文館
 - ⑧ 山地直樹ほか イネ節の新規リン酸輸送体と少磷米の可能性 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2016 年 7 月 4-5 日 名古屋大学
 - ⑨ Naoki Yamaji et al., OsSultr3;4 localized in rice node is responsible for

preferential distribution of Pi to new leaves and grains. The 17th International Workshop on Plant Membrane Biology, 2016 June 5-10, Annapolis, USA

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

日本農業新聞 2018年2月9日

「稲で世界初 ホウ素輸送体を解明 岡山大
成長促進や収量期待」

朝日新聞 2016年12月23日

「低リン米へ一歩 岡山大など仕組み解明」

ほか新聞報道 計7件

6. 研究組織

(1)研究代表者

山地 直樹 (YAMAJI, Naoki)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：00444646

(2)研究分担者

三谷 奈見季 (MITANI, Namiki)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：40581020

(3)連携研究者

馬 建鋒 (MA, Jian Feng)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：80260389