

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06421

研究課題名(和文) ケイ酸輸送体の発現制御機構に関する研究

研究課題名(英文) Regulation mechanisms of expression for rice Si transporter Lsi1

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：イネ由来の内向きケイ酸輸送体Lsi1と外向きケイ酸輸送体Lsi2は共に根の外皮細胞と内皮細胞に局在し、このLsi1とLsi2の協調的な働きがイネにおける効率的なケイ酸吸収に重要である。まず、それら輸送体のmRNA発現量は地上部のケイ素集積量に応答してケイ素十分条件下で数分の一程度に低下することを明らかにした。ケイ酸応答性シス配列候補因子を探索するため、Lsi1についてpromoter解析を行った結果、シス配列候補領域は転写開始点より上流-327から-292bpの間に存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rice requires high silicon (Si) for its high and sustainable yield. Two Si transporters Lsi1 and Lsi2 are involved in this high accumulation of Si in rice. Our previous studies showed that the mRNA expression levels of these transporter genes were down-regulated by Si. In this project I investigated the mechanism underlying regulation of Lsi1 and Lsi2 expression. There was a negative correlation between the expression level of Lsi1 and Lsi2 and shoot Si accumulation. Together with the results of split-root experiments, the Si-induced down-regulation of Si transporter genes is controlled by shoot Si accumulation, not root Si. Analysis with transgenic rice carrying different lengths of Lsi1 promoter regions fused with GFP as a reporter gene revealed that the region responsible for Si response of Lsi1 expression is present between -327 to -292 in the promoter.

研究分野：植物栄養学

キーワード：発現制御 輸送体 植物分子生理学

1. 研究開始当初の背景

ケイ素 (Si) は地殻中に最も豊富に存在するミネラルで、植物の複合ストレス (生物ストレスと非生物的ストレス) を軽減する役割があることが示された。特に代表的なケイ素集積植物であるイネにおいてその効果は顕著で、イネの安定多収には必要不可欠であることから日本では「農業上の必須元素」と位置づけられている。

イネにおけるケイ素の高集積性にはイネの根が持つ高いケイ酸吸収能力が大きく起因している。これまでの研究により、イネからケイ酸の吸収を司る二つの輸送体 *Lsi1*、*Lsi2* が同定されている。

イネの *Lsi1* はケイ酸の内向き輸送体で、根の外皮細胞と内皮細胞の遠心側に偏在している。一方、*Lsi2* はケイ酸の外向き輸送体で、同じく根の外皮細胞と内皮細胞に局在しているが、*Lsi1* とは異なり、向心側に偏在している。イネは *Lsi1* と *Lsi2* の協同作業によって、効率よくケイ酸を吸収している。これまでの解析により *Lsi1*、*Lsi2* ともケイ酸添加によって発現が抑制される (逆に言うと、ケイ酸欠乏によって発現が誘導される) ことを明らかにしている。しかし、これらのケイ酸輸送体の発現制御機構については全く分かっていない状況であった。

研究代表者は本研究開始以前に、若手研究 B の支援を受け *Lsi1* のプロモーター解析を行い、*Lsi1* の ATG より上流 -600bp がケイ素に応答した発現量の調節に関与していることが明らかにしている。

2. 研究の目的

イネのケイ酸吸収に必要な輸送体 *Lsi1*、*Lsi2* はケイ素十分条件下で mRNA の発現が数日かけて緩やかに低下することから、これらの根に発現するケイ酸輸送体は地上部の要求量に応じて発現量の調節を受けていると予想される。そこでまず、ケイ酸輸送体の発現調節に根 (根圏) あるいは地上部どちらのケイ素が重要であるかを明らかにする。

次にこれらケイ酸輸送体遺伝子の発現量の調節に関わるシス配列候補領域の絞り込みを行い、その配列に結合し転写量の調節を担っている転写調節因子の探索を目指す。本研究を遂行し得られた知見は、他の植物におけるケイ酸輸送機構の違いの解明にも寄与するとともに、これらの植物のケイ素集積量の向上にも応用することできると考える。

3. 研究の方法

(1) 野生型のイネを異なるケイ酸濃度の水耕液で様々な期間栽培し、地上部のケイ素集積量と、その時の根におけるケイ酸輸送体 *Lsi1*、*Lsi2* の発現量を Real-time PCR により定量した。

(2) ケイ素の集積量が低い *lsi1* 変異体をケイ酸を含む培養液で処理し、根でのケイ酸輸送体の発現量を定量し、野生型のイネと比較

した。

(3) 野生型イネを用いて根分け試験 (図 1) を行い、各処理間でのケイ酸輸送体の発現量を比較定量した。

(4) *Lsi1* プロモーター候補領域を少しづつ欠損させた形質転換植物をさらに作成した。

Lsi1 プロモーター領域を 3' 側から順に削るあるいは、UTR の関与を調べるために 5' -UTR を欠損させた配列にレポーター遺伝子として GFP をつないだコンストラクトを野生型イネに導入した形質転換体を作成。作成した形質転換イネの GFP 遺伝子の発現量の変化をケイ酸処理有無の条件下で調べ、*Lsi1* 発現量制御のシス配列の更なる絞り込みを行った。また、他の遺伝子の発現調節への関与が報告されている 5' -UTR について、*Lsi1* の発現への関与を検討した。

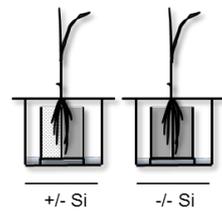


図1 根分け試験

4. 研究成果

(1) 地上部のケイ素集積量と根でのケイ酸輸送体 *Lsi1*、*Lsi2* の発現量との間には高い負の相関関係が見られた (図 2)。

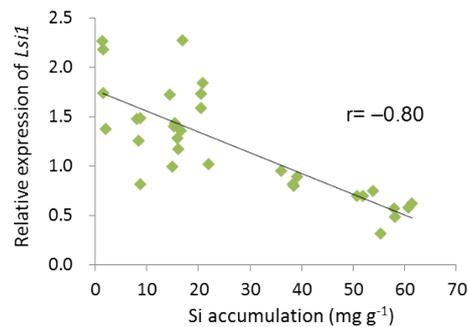


図2 発現と集積量の相関

(2) ケイ素の集積量が低い変異体においてはケイ素処理を施しても *Lsi1* の発現は変化しなかった (図 3)。

(3) 根分けの実験で、片側をケイ酸処理した植物の処理していない方の根でも発現の低下が見られた (図 4)。以上の結果から、地上部を介したシグナルの

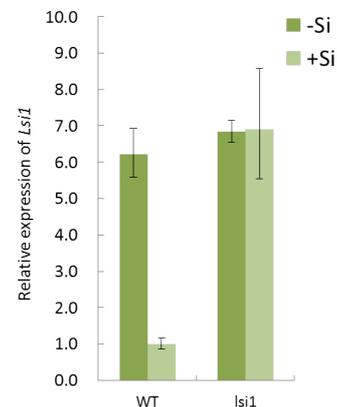


図3 低ケイ酸集積性変異体における *Lsi1* の発現

存在が強く示唆された。

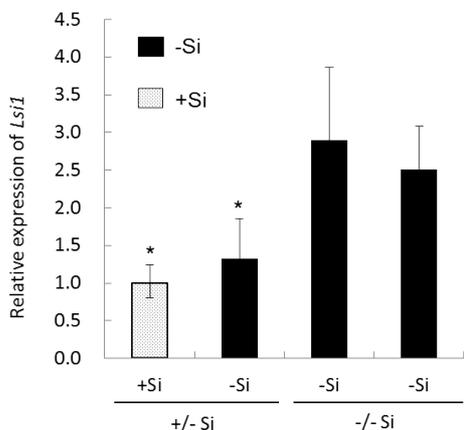


図4 根分け実験における発現量

(4) *Lsi1*の上流プロモーター領域を3'側より順に欠損させた各断片配列に *GFP*を連結させたコンストラクトをイネに導入し、ケイ素に対する *GFP*の発現応答を見た結果、転写開始点より上流 -292 まで削ってもケイ酸処理によるレポーター遺伝子の発現応答は保持されていた(図5)。さらに5' -UTR を削っても応答はみられた(図6)。

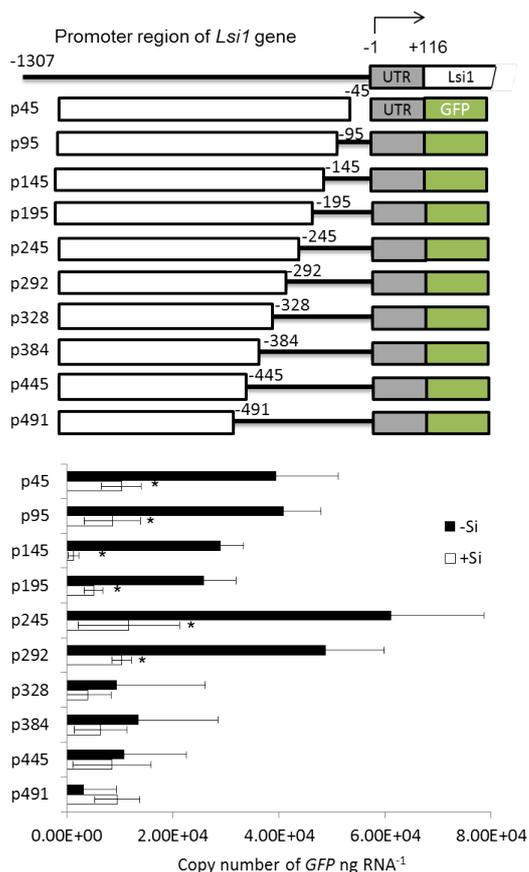


図5 3'側よりシス配列候補領域の絞り込み

以上の結果と、これまでの結果を統合すると、*Lsi1*の転写開始点より上流-327 から-292 までの領域にケイ素応答に関するシス配列が存在することになる。

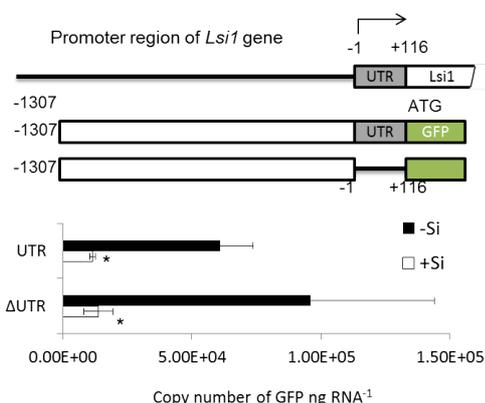


図6 5'-UTRの関与

今後はシス配列を決めるとともに、地上部のケイ素集積を根へと伝えるシグナルの実態の解明を進めていく。

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1件)

Mitani-Ueno, N., Yamaji, N. and Ma, J.F. High silicon accumulation in the shoot is required for down-regulating expression of Si transporter genes in rice. *Plant Cell Physiol.* (2016) 57: 2510-2518、査読有、DOI: 10.1093/pcp/pcw163

[学会発表](計2件)

三谷奈見季、山地直樹、馬建鋒、イネ由来ケイ酸輸送体 *Lsi1* の更なる解析、日本土壤肥料学会佐賀大会、2016年9月21日、佐賀大学(佐賀県佐賀市)

三谷奈見季、山地直樹、馬建鋒、イネのケイ酸吸収に関与する輸送体 *Lsi1* と *Lsi2* の更なる解析、日本土壤肥料学会関西支部会、2015年12月11日、愛媛大学(愛媛県松山市)

[図書](計0件)

該当なし

[産業財産権]

該当なし

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/plant.stress/index-j.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
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