

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：23303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14627

研究課題名(和文) 土壌からの窒素獲得能を強化したイネの開発

研究課題名(英文) Development of rice with enhanced nitrogen acquisition ability from soil

研究代表者

濱田 達朗 (Hamada, Tatsuro)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：50310496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：アスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子(OsASP2)を過剰発現させた形質転換イネおよび非形質転換イネをMS培地、または窒素源がタンパク質のみの培地(MS-IN、カゼイン培地)で30日間栽培し、両者の生育を比較した。MS培地においては、両者に有意な成長差は見られなかった。一方、MS-IN、カゼイン培地においては、OsASP2過剰発現体の葉の長さは非形質転換体の約3.7倍で、葉の乾燥重量は非形質転換体の約1.5倍であった。このことから、形質転換イネにおいて、根圏へのアスパラギン酸プロテアーゼの過剰な分泌が、成長のための窒素源としてのタンパク質の利用に寄与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Transgenic rice overexpressing aspartic protease gene (OsASP2) and nontransformed rice were cultivated in MS and MS-IN, casein media for 30 days, and the growth of both were compared. In MS medium, no significant growth difference was found between them. On the other hand, in MS-IN, casein medium, leaf length and dry weight of the OsASP2 transgenic rice were about 3.7 and 1.5 times those of the non-transformant, respectively. This result revealed that the release of aspartic protease from the root to the rhizosphere in the transgenic rice contributed to the use of protein as a nitrogen source for growth.

研究分野：植物生理学

キーワード：イネ アスパラギン酸プロテアーゼ タンパク質 窒素源 形質転換体 根圏

## 1. 研究開始当初の背景

植物は生存、成長のための窒素源として、アンモニウムや硝酸などの無機態窒素を主に利用しており、アミノ酸やタンパク質などの有機態窒素は、食虫植物等の特殊な植物を除くとほとんどの植物は直接、利用できないと考えられてきた。しかしながら、近年、シロイヌナズナやコムギ、ニンジン、ホウレンソウなどの一般的な植物においても、土壤中に存在するタンパク質およびタンパク質分解産物を成長のための窒素源として利用していることが明らかになった(引用文献 - )。また、シロイヌナズナやイネにおいて根圏中のタンパク質がエンドサイトーシスによって根に取り込まれることが報告されている(引用文献、)。シロイヌナズナやコムギなどの植物の根圏においてプロテアーゼ活性があり、このことから、根から分泌されるプロテアーゼにより根圏中のタンパク質が分解され、その分解産物が根に取り込まれやすくなることが示唆された(引用文献、)。しかしながら、どのようなプロテアーゼが根圏中のタンパク質の分解に関わっており、実際にプロテアーゼが植物における根圏中タンパク質の窒素源としての利用にどの程度寄与しているのかは不明のままであった。近年、プロテオーム解析により、シロイヌナズナやイネにおいて、根圏に分泌されるアスパラギン酸プロテアーゼ(ASP)が同定された(引用文献、)。我々の研究グループでは、根圏に分泌されるプロテアーゼと窒素源としての根圏中タンパク質利用との関連性を明らかにするために、根圏に分泌される ASP のタグラインや過剰発現体のシロイヌナズナを用いた解析をおこなった(日本植物生理学会 2014 年大会、北川・濱田)。その結果、低無機態窒素含量かつタンパク質が

根圏中に存在している条件で、過剰発現体が非形質転換体と比較して約 1.7 倍の生長量を示すことを明らかにした。このことから、根圏へのプロテアーゼ分泌量の多い植物のほうが、より土壤中のタンパク質を分解し、その分解タンパク質を窒素源として吸収、利用できることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ASP 高発現シロイヌナズナが土壤中のタンパク質を成長のための窒素源としてより利用できるようになったという結果を重要な作物であるイネに応用することを目的とした。具体的には、様々な植物種由来の組織外分泌型のアスパラギン酸プロテアーゼを過剰発現させた形質転換イネを作製し、低無機態窒素かつ高有機態窒素(タンパク質態窒素)の土壤条件下でも成長可能なイネの開発を目指した。低無機態窒素かつ高有機態窒素の土壤条件は、有機栽培における土壤条件に近いと考えられる。このような作物が育成可能であることが示されれば、栽培において化学肥料の使用を減らし、食物や作物由来の残渣を直接的かつ有効に利用することができ、低コスト、低硝酸態窒素、高収量の作物生産が可能になると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) ASP 遺伝子を過剰発現させた形質転換イネの作製

ASP を根から多く分泌する形質転換イネを作製するために、イネに様々な植物種由来の ASP 遺伝子を導入した。導入には、イネ根圏への分泌が確認された 3 種類の ASP をコードしている *OsASP1a*、*OsASP1b* および *OsASP2* 遺伝子(引用文献)シロイヌナズナのプロテオーム

ム解析により根圏への分泌が確認された ASP をコードしている *AtASP1* 遺伝子 (引用文献)、ウツボカズラの捕虫器溶液に含まれる ASP をコードしている *NaNEP1* 遺伝子 (引用文献) の 4 種類を用いた。これらの ASP 遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター、トウモロコシユビキチン (*Ubi*) プロモーターまたはイネアクチンプロモーター (*Act1*) プロモーターの下流に連結したバイナリーベクターを作製した。*OsASP1a*、*OsASP1b* および *NaNEP1* 遺伝子は CaMV35S プロモーターと、*AtASP1* 遺伝子は *Ubi* プロモーターと、*OsASP2* 遺伝子は CaMV35S プロモーター、*Act1* プロモーターまたは *Ubi* プロモーターと連結し、合計 7 種類のコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトをアグロバクテリウム接種法によりイネ (品種: 日本晴) に導入した。

(2) ASP 遺伝子高発現形質転換イネの選抜 ASP 遺伝子を導入した形質転換イネ (T2 および T3 世代) において、導入した遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR により解析した。また、薬剤耐性 (ハイグロマイシン耐性) 試験や定量的 RT-PCR によって、導入遺伝子のコピー数やホモ、ヘテロ判別をおこなった。

(3) 様々な窒素条件下における ASP 遺伝子高発現形質転換イネの生育検定 導入遺伝子が高発現でホモの系統を用いて、様々な窒素条件下における生育検定をおこなった。コントロールとして、非形質転換体のイネ (日本晴) を使用した。十分な無機態窒素の含まれた培地として MS 培地を、窒素源として有機態窒素のみの培地としてタンパク質 (カゼインまたは BSA) を含んだ培地 MS-IN

(無機窒素成分を取り除いた MS 成分) カゼイン培地および MS-N、BSA 培地を用いた。明期 12 時間、28、暗期 12 時間、26 の条件で、20 - 30 日間栽培し、葉および根の長さや乾燥重量を測定した。

#### 4. 研究成果

研究開始当初、*OsASP1a*、*OsASP1b*、*OsASP2* および *NaNEP1* 遺伝子を CaMV35S プロモーターにより過剰発現させた形質転換イネを作製し、これらの高発現系統において、異なる窒素条件下における生育検定をおこなった。その結果、コントロールの日本晴と比較して、有意な成長差は見られなかった。この結果は、過剰発現体の根から導入遺伝子由来の APS があまり分泌されないため、形質転換作製に用いた CaMV35S プロモーターでは外来遺伝子由来の APS の発現に不十分であったためだと考えられた。

そこで ASP を多く分泌させるために、CaMV35S プロモーターの代わりにイネで外来遺伝子を強く発現させることが知られている *Act1* プロモーターと *Ubi* プロモーターを用い、*OsASP2* または *AtASP1* 遺伝子を発現させた形質転換イネを作製した。形質転換イネの *OsASP2* 遺伝子の発現は、*Ubi* プロモーターを用いたものの方が *Act1* プロモーターのものよりも強かった。そこで、生育比較実験には *Ubi* プロモーター下で *OsASP2* または *AtASP1* 遺伝子を発現させた形質転換イネを用いた。無機窒素が十分に含まれた MS 培地においては、*OsASP2* および *AtASP1* 遺伝子過剰発現イネともに、コントロールの日本晴と同等の成長であった。窒素源としてタンパク質のみを含んだ培地 (MS-IN、カゼイン培地) において、*AtASP1* 遺伝子過剰発現イネは日本晴との生育

に有意差は見られなかった。一方、*OsASP2* 遺伝子過剰発現イネでは、日本晴と比較して葉の長さが約 3.7 倍で、葉の乾燥重量が約 1.5 倍であった。このことから、イネにおける ASP の過剰発現体の育成には *OsASP2* 遺伝子の使用が有効であり、*OsASP2* 遺伝子過剰発現イネでは、根から分泌された *OsASP2* が根圏中のタンパク質（カゼイン）を分解し、その分解産物が根に取り込まれやすくなったために非形質転換体よりも生育したと考えられた。

#### <引用文献>

阿江教治、松本真悟、山縣真人、新しい世紀への植物栄養の展望 4. 土壌に蓄積する有機態窒素の作物による直接吸収、日本土壌肥料科学雑誌、72 巻、2001、115 120

Adamczky, B., Godlewski, M. Zimny, J., Zimny, A. Wheat (*Triticum aestivum*) seedlings secrete proteases from the roots and, after protein addition, grow well on medium without inorganic nitrogen, *Plant Biol.*, 10, 2008, 718 724

Paugfoo-Lohinne, C., Thierry G. A. Lonhienne, T.G.A., Rentsch, D., Robinson, N., Christie, M., Webb, R.I., Gamage H.K., Carroll, B.J., Schenk, P.M., Schmidt, S. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *PNAS.*, 105, 2008, 4524 4529

Nishizawa, N., Mori, S. Electronmicroscope-autoradiographical evidence for the incorporation of exogenous protein into rice root cells.

*Plant Cell Physiol.*, 21, 1980, 493 496  
Adamczky, B., Godlewski, M., Smolander, A., Kitunen, V. Degradation of proteins by enzymes exuded by *Allium porrum* roots - a potentially important strategy for acquiring organic nitrogen by plants. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 2009, 919 925

De-la-Penã, Lei, Z., Watson, B.S., Sumner, L.W., Vivanco, J.M. Root-microbe communication through protein secretion. *J. Biol. Chem.*, 283, 2008, 25247 25255

Shinano, T., S. Komatsu, S., Yoshimura, T., Tokutake, S., Kong, F.-J., Watanabe, T., Wasaki, J., Osaki, M. Proteomic analysis of secreted proteins from aseptically grown rice. *Phytochem.*, 72, 2011, 312 320

Hatano, N., Hamada, T. Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *J. Proteome Res.*, 7, 2008, 809 816

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

濱田達朗、北川優里、花岡茜、根圏に分泌されるアスパラギン酸プロテアーゼによる窒素獲得能の増加、北陸植物学会平成 30 年度第 8 回大会(富山) 2018

〔その他〕

ホームページ等

[http://ribb.ishikawa-pu.ac.jp/pct/hamada\\_research.html](http://ribb.ishikawa-pu.ac.jp/pct/hamada_research.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱田 達朗 (HAMADA, Tatsuro)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：50310496