

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14871

研究課題名(和文) イネ科植物の土壌pH適応におけるトレードオフ

研究課題名(英文) Soil-pH adaptivity trade-off in gramineous plants

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：土壌pHは植物の栄養素の獲得に大きな影響を及ぼす。酸性土壌では、主に土壌から溶け出すアルミニウムイオンによって植物の生長が阻害される。アルカリ土壌では、主に鉄が不溶化し植物は鉄欠乏となって生育が悪化する。植物種によって土壌pHへの適応性は大きく異なるが、その種間差を規定する分子メカニズムは解明されていない。本研究では土壌pH適応性が大きく異なる3種のイネ科作物イネ(野生型、star1変異体、art1変異体)・オオムギ・ライムギを用い、3つの条件、Alストレス条件(pH 4.5)、通常条件(pH6.0)、鉄欠乏条件(pH7.5)で根の比較トランスクリプトーム解析を実施した。

研究成果の概要(英文)：Soil pH has a large impact on availability of mineral elements. For example, at a low pH, Al is solubilized to inhibit plant growth, while at a high pH, Fe availability becomes very low. However, different plant species show different adaptability to soil pH. Among cereal crops, rice is highly tolerant to Al but relatively sensitive to Fe-deficiency. By contrast, barley is the most sensitive to Al but highly tolerant to Fe-deficiency, while rye is able to adapt to a wide range of soil pHs. However, the molecular mechanisms underlying these differences are poorly understood. In this study, we conducted a comparative transcriptome analysis. Rice (WT, art1, star1), barley and rye were exposed to three different solutions (low pH with Al, moderate pH, or high pH with less Fe) for a short period, the roots were subjected to RNA-seq. The difference in gene expression in response to different pH were compared.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物栄養 土壌適応性 イネ科 アルミニウム 鉄欠乏

1. 研究開始当初の背景

土壌に根を下ろし、独立栄養を営む植物にとって、土壌 pH の変化は無機栄養素の過不足など様々なストレスを引き起こす。酸性土壌では植物にとって最も深刻なストレスは、土壌から溶出するアルミニウムイオン(Al³⁺)毒性である。アルミニウムイオンは根の伸長を素早く阻害し、その結果植物は養水分の吸収が十分にできなくなる。一方アルカリ土壌では、葉緑素の合成などに欠かせない必須元素である鉄が土壌中で不溶化し、植物が吸収できなくなる鉄欠乏ストレスが最も深刻であり、鉄が不足した植物は特徴的な黄化症状(鉄欠乏性クロロシス)を示して光合成活性が低下する。

植物はこれらのストレスを克服するため様々な耐性機構を発達させており、近年イネやシロイヌナズナなどのモデル植物を中心に、いくつかの耐性遺伝子も明らかになってきた。しかし土壌 pH の適応性は植物種毎に異なり、その種間差を決定づける遺伝的要因はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、イネ科作物をモデルケースとして、植物種毎の土壌 pH 適応性を左右する遺伝子ネットワークの種間差の解明を目的とする。

本研究では土壌 pH 適応性の異なる 3 種類のイネ科作物、イネ、オオムギ、ライムギを用いる。イネは酸性土壌が広く分布する東南アジアの熱帯多雨地域に起源し、主要なイネ科作物中で最も酸性土壌耐性が高く、アルカリ土壌への適応性は最も低い。対照的に、オオムギは石灰質アルカリ土壌が分布する中近東の半乾燥地帯に起源し、アルカリ土壌耐性は最も高く、酸性土壌への適応性は最も低い。ライムギはコムギの随伴雑草に由来し、土壌環境への適応範囲が広く、酸性土壌でもアルカリ土壌でも栽培できる。

3. 研究の方法

イネ(野生型日本晴、*star1* 変異体、*art1* 変異体)、オオムギ(品種 はるな二条)、ライムギ(品種 IR5)の合計 5 系統を水耕栽培し、それぞれ、A1 ストレス条件(pH 4.5)、通常条件(pH 6.0)、鉄欠乏条件(pH 7.5)で処理した。(下図参照)

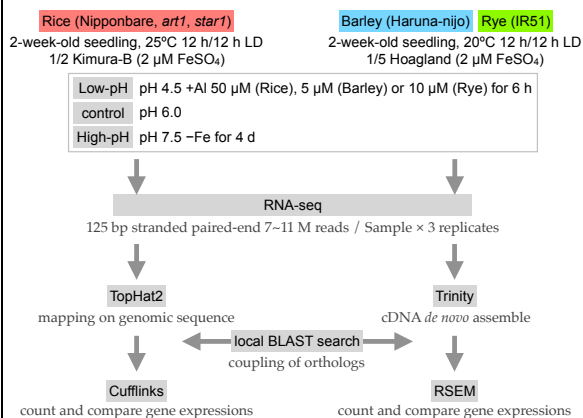
各 3 条件で処理した根から RNA を抽出(各 3 反復)し、次世代シーケンサーを用いた

RNA-seq 解析により、125 bp ペアエンド、約 5 億リードのデータを取得した。

イネに関しては、リードをリファレンスゲノムにマッピングし、標準化したリード数を各処理区間で比較して、A1 ストレスや鉄欠乏ストレスによる遺伝子発現応答を網羅的に明らかにした。

オオムギとライムギについては先ず各処理区のデータをまとめて転写産物の *de novo* アセンブルを実施し、続いて各サンプルの遺伝子発現解析をおこなった。

次に各植物種の応答性が見られた遺伝子について、公開データベース上の配列と 3 植物種の新規 contig 情報とを参照してアノテーションを付与し、3 植物種間で可能な限りオーソログ関係が推定できるようにした。ここでは、植物種間の相同遺伝子が種内のパラログよりも近縁な場合を推定オーソログとする。



A1 ストレスおよび鉄欠乏ストレス下における遺伝子発現応答を植物種間および野生型-変異体間で比較し、その共通点と相違点を見出した。例えば「A1 ストレス下でイネとライムギでともに応答し、オオムギ(とイネ *art1* 変異体)で応答しないもの」あるいは、「鉄欠乏ストレス下でオオムギとライムギに共通し、イネでは応答しないもの」などから、それぞれのストレス下で特徴的に応答する新規遺伝子群を抽出した。また、イネ *star1* 変異体に関しては、主に野生型イネとの比較から、鉄欠乏条件下での新たな役割や関連する遺伝子群を推定した。これらの情報に基づいて、イネにおいて「失われた鉄欠乏耐性遺伝子ネットワーク」、オオムギにおいて「失われた A1 耐性遺伝子ネットワーク」を明らかにし、植物種間の土壌 pH 適応性の違いが生じる要因を浮き彫りにする。

4. 研究成果

低 pH/アルミニウムストレス応答に関しては、イネ、オオムギ、ライムギの3種で共通して応答する遺伝子はわずかしがなく、既知のアルミニウム/低 pH 耐性遺伝子が含まれていなかったことから、主にストレスによって生じた障害に応答した遺伝子と推定された。また、オオムギではアルミニウム応答に関わる主要な転写調節因子 ART1 が欠失していることが今回のトランスクリプトーム解析においても確認された。一方でライムギには ART1 オーソログが保存されており、イネ ART1 と同様にアルミニウムや pH 条件には応答せず、根において恒常的に発現していた。このためオオムギとは異なり、ライムギでは低 pH/アルミニウムストレスに応答して、いくつかの既知の耐性遺伝子や耐性遺伝子オーソログの発現が上昇していたが、意外にもイネ ART1 が制御する約 30 のイネの耐性遺伝子との共通性は低く、STAR1、STAR2、FRDL2、Nrat1 など数遺伝子に限られていた。また、イネの耐性遺伝子の一つで根圏にクエン酸を分泌してアルミニウムをキレートし無毒化する役割を担う OsFRDL4 のオーソログはオオムギ、ライムギともに存在せず、リンゴ酸の分泌を担うライムギ ALMT1 のオーソログはイネとオオムギには存在しなかった。このようにこれら 3 種のイネ科植物の低 pH/アルミニウムストレス耐性は耐性遺伝子とその応答性機構の双方で多様化していることが明らかになった。

高 pH/鉄欠乏ストレスに対しては、イネ科植物は Strategy-I と呼ばれる、鉄キレート物質ムギネ酸類を合成し、根圏に分泌して鉄-ムギネ酸錯体を吸収する戦略が知られている。ムギネ酸類の合成、分泌、鉄錯体の吸収の一連の経路に関わる遺伝子は、イネ、オオムギ、ライムギで共通性が高く、いずれも鉄欠乏条件下で顕著に発現が誘導された。ただし、ムギネ酸合成酵素遺伝子がオオムギ、ライムギでは多コピー存在し、それぞれ発現していたのに対し、イネでは比較的遺伝子コピー数が少なく、またムギネ酸類の修飾に関わる酵素遺伝子の1つが欠失していた。これらの違いが、イネが比較的鉄欠乏に弱く、オオムギ、ライムギが強い理由の一つになっていると推測される。加えて、鉄の獲得に関わる遺伝子群のみならず、他の遷移金属元素(マンガン、銅、亜鉛)の輸送に関わるいくつかの輸送体遺伝子やそのオーソログにも発現応答が見られたが、それらの応答性には3種間で比較的多くの相違が見られた。また、と

くに興味深い相違点として、STAR1・STAR2の応答性がある。STAR1・STAR2はイネにおいて最も重要なアルミニウム耐性遺伝子であり、これらの変異体は著しい酸性土壌/アルミニウムストレス感受性となる。この2つの遺伝子がコードするタンパク質は細菌型ABC輸送体複合体を形成し、UDP-グルコースの輸送活性を持つが、アルミニウム体制への具体的な作用機作は明らかになっていない。STAR1・STAR2遺伝子はイネ科植物だけでなく、シロイヌナズナなどの双子葉植物を含め多くの植物種に保存されており、機能的にも相同性が高いと考えられている。STAR1・STAR2の応答性は、イネでは低 pH/アルミニウムストレスに顕著に発現が増加し、高 pH/鉄欠乏ストレス時の応答性は限定的だった。オオムギでは前述のように低 pH/アルミニウムストレスへの応答性は示さなかったが、高 pH/鉄欠乏ストレスによって顕著に発現が増加した。ライムギでは、pH/アルミニウムストレスと高 pH/鉄欠乏ストレスの双方によって有意に発現の増加が見られた。ただしこのような種間差はイネの他のアルミニウム耐性遺伝子のオーソログには見られなかった。さらに、イネ star1 機能欠損変異体では、高 pH/鉄欠乏ストレス時の鉄欠乏耐性遺伝子の応答性が野生型イネと比べて低下していた。したがって STAR1・STAR2 は pH/アルミニウムストレスのみならず、高 pH/鉄欠乏ストレスに対しても何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。

これらの比較トランスクリプトーム解析は、土壌 pH 適応性の種間差について理解する上で重要な手がかりであり、今後の研究に多くの示唆を与える。

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)

① 横正健剛・山地直樹、生物情報科学・細胞生物学的手法から見えてきた植物栄養応答 5. 作物の金属ストレス耐性機構、日本土壌肥科学雑誌、査読有り、88 巻、2017、139-146

[学会発表] (計 2 件)

① Naoki Yamaji, Miho Kashino-Fujii, Kengo Yokosho, Jian Feng Ma, Comparative analysis of transcriptome in response to rhizosphere pH among rice, barley and rye.,

日本植物生理学会、2017年3月16-18日、鹿
児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

② 山地直樹・柏野美帆・横正健剛・馬建鋒、
イネ科作物の土壌 pH 適応におけるトレード
オフの可能性、日本土壌肥料学会、2016年9
月20-22日、佐賀大学(佐賀県・佐賀市)

[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

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

(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

三谷奈見季 (Mitani, Namiki)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教
研究者番号：40581020

(4) 研究協力者

横正健剛 (Yokosho, Kengo)

岡山大学・資源植物科学研究所