

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380003

研究課題名（和文） 湖沼のリン汚染を軽減する植物の育成

研究課題名（英文） Production of plants that reduce phosphate pollution of lakes and marshes.

研究代表者

吉田 薫（YOSHIDA KAORU）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70183994

研究成果の概要（和文）：植物のリン貯蔵物質であるフィチンの生合成を遺伝子組換え技術を用いて制御することにより、フィチン集積イネおよび低フィチン米を作出することを目的とした。フィチン集積イネはリンの超集積植物として富栄養化した湖沼からのリンの回収に役立つ環境浄化植物として、低フィチン米は消化吸収がよく畜舎からのリン排出を軽減できる環境負荷低減飼料として利用価値が高い。本研究により、実用化レベルの低フィチン米の作出が実現し、フィチン集積イネ作出のための戦略が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Phytate is the storage form of phosphorus in plants. Our aim of this study was to create the phytate-accumulator rice and the low-phytate rice grains by controlling biosynthesis of phytate through genetically modified technology. The phytate-accumulator rice plant can be used for the phosphorus collection from the lakes and marshes that was polluted by excessive phosphorus. The low-phytate rice grains can be used as fodder with a high nutritive value with a good digestive absorption, and they reduce the impact of animal manures on the pollution load of water bodies. In this study, the low-phytate rice at the practical use level was achieved, and the strategy for the production of phytate-accumulator rice became clear.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2008 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物分子育種学

1. 研究開始当初の背景

世界の多くの湖沼では流域からのリン、窒素流入による富栄養化が進行しており、上水処理への障害、毒性藻類の発生、魚の大量死などを引き起こしている。全リン濃度 0.035mg/l を越えると富栄養化問題が生ずる

と言われているが、先進国の多くの湖沼がこの値を超えていることが報告されている。人間活動に密着した湖沼では、家庭、工場、農場、畜舎などからリンが大量に湖沼に流れ込んで汚染が進行している。リンの流入をできる限り減少させること、汚染された湖沼から

リンを回収することが望まれている。

穀物の種子は家畜の飼料に使われるが、種子に含まれるリンの 90%前後はフィチン態の形で存在している。フィチンは、消化性が悪くそのままでは大部分は消化されずに排出されてしまい、リンの汚染源となる。通常の飼育農家では、家畜のリン不足を補うため、飼料にサプリメントとして大量の無機リンを添加しており、これがさらにリン汚染を拡大している。

種子中に含まれるフィチン態のリンを減少させて無機リンの形で貯蔵させることができれば、消化性が高くなり、リンの利用効率が高まる。これにより、環境に有害な無機リン添加が不要となり、畜舎から排出されるリンが減少し、環境への負荷を和らげることができる。また、逆に、根や茎、葉に大量にフィチンを蓄積する植物を作出できれば、リンの *Hyperaccumulator* (超集積植物) として湖沼からのリンの回収に利用することができる。すなわち、フィチン合成を自由に制御できれば、環境負荷低減および環境浄化に役立つ植物を作出できる可能性が高い。

フィチンはフィチン酸とカリウムやマグネシウム等の金属イオンが結合した物質であり、イノシトールリン酸合成酵素により、グルコース-6-リン酸からイノシトールリン酸(*Ins(3)P*)を経て合成される。我々は、イネを用いたこれまでの研究で、本酵素(*RINO1*)が種子におけるフィチン酸合成系路の鍵酵素である可能性を世界で初めて指摘した(Yoshida *et al.* 1999)。さらに、*RINO1* 遺伝子の種子での発現を抑制する形質転換イネを作出し、種子中のフィチンを減少させることに成功した(Feng and Yoshida 2004, Kuwano *et al.* 2006)。しかしながら、この場合、登熟胚でのフィチン酸合成も抑制してしまったため、胚形成不全を示し、発芽率が低下した。イネでは、フィチン酸は胚とアリューロン層で合成されるが、胚で合成されたフィチン酸は胚の発育に伴って消費されることが知られている。従って、最終的には、フィチンは主としてアリューロン層に蓄積される。そこで、アリューロン層でのみフィチン酸合成を抑制することができれば、発芽能力の高いフィチン低含有種子を作出できる可能性がきわめて高いと考えるに至った。アリューロン層特異的プロモーターを活用することで、胚形成には全く影響を与えずに種子中の無機リン量を飛躍的に増加させ(目標: 70%以上)、フィチンを減少させることが可能となろう。しかし、これまでにアリューロン層だけで発現する遺伝子の報告はなく、アリューロン層特異的プロモーターの探索が急務である。

一方、栄養器官でフィチン酸合成を行わせ環境浄化植物を作出するためには、フィチン

酸合成経路全体を栄養器官で強化する必要がある。そのためには、合成経路とそれに関わる酵素遺伝子を同定することが最重要課題である。

2. 研究の目的

世界の多くの湖沼では流域からのリン、窒素の流入による富栄養化が進行している。リンの流入をできる限り減少させること、汚染された湖沼からリンを回収することが望まれている。植物種子に大量に蓄積されるリン貯蔵物質フィチン酸を根や葉などの栄養器官に蓄積させることができれば、リンの超集積植物として湖沼からのリン回収に役立つ環境浄化植物が実現する。また、消化吸収の悪いフィチン酸を減少させて無機リンの形で種子に貯蔵させることができれば、畜舎から排出するリンを軽減する環境負荷低減植物が実現する。

本研究では、フィチン酸合成経路を明らかにし、その情報をもとに、遺伝子組換え技術を用いてフィチン酸合成を制御し、高フィチン含有植物(環境浄化植物)および極低フィチン米(環境負荷低減飼料)を作出することを最終目的とする。そのための基盤を整備するため、フィチン酸合成に関与する可能性のある遺伝子を逆遺伝学的手法によりその機能を明らかにし、それらの過剰発現体を用いて高フィチン含有植物作出への道筋を検討すること、極低フィチン米作出に必要な発現調節プロモーター(アリューロン層特異的プロモーター)を開発すること、およびフィチン酸合成に関わる新たな遺伝子を探索するため、低フィチン突然変異体のスクリーニングと原因遺伝子の同定を行うことを計画した。

3. 研究の方法

各種遺伝子を用いた形質転換イネの作出には、栽培期間の短い品種キタアケを使用し、*Agrobacterium* 法により遺伝子を導入した。プロモーターは、登熟中の胚とアリューロン層で特異的に発現を誘導する 18-kDa オレオシンプロモーターまたは、植物体全体で発現を誘導するアクチンプロモーターを使用した。

植物の葉、根、および種子の凍結乾燥サンプルから 2.4% HCl を用いて各種イノシトールリン酸類を抽出した。抽出サンプルは、陰イオンカラム *Dionex IonPac AS20* を用いた 5-80mM KOH/120min のグラジエント溶出条件のイオンクロマトグラフィーにより解析した。

アリューロン層特異的に発現する遺伝子を探索し、そのプロモーターを利用するため、イネ 44K マイクロアレイ解析を行うとともに、候補遺伝子の各組織での発現を RT-PCR により明らかにした。また、胚とアリューロ

ン層で発現を誘導する 18-kDa オレオシンプロモーターのアリューロン層特異的 *cis* 配列を明らかにするため、オレオシンプロモーターを様々なに変化したプロモーターを GUS レポーター遺伝子に連結させ、イネ（日本晴）に導入して発現解析を行った。

Tos17 挿入突然変異体から低フィチン米系統を高無機リンを指標として選抜した。変異体のマッピングにはインド型品種 *Kasalath* との交雑 F₂ 集団を用いた。

4. 研究成果

(1) 環境浄化植物の作出に向けて

① フィチン酸合成経路の解明

種子特異的発現誘導活性を持つオレオシンプロモーターにフィチン酸合成に関与する可能性のある遺伝子をアンチセンスに連結させたコンストラクトを導入した組換えイネを作出し、その遺伝子の発現を種子で抑制した時にフィチン酸合成が抑制されるかを調べたところ、イノシトール五リン酸キナーゼ、および6種類あるイノシトール三リン酸 5/6 キナーゼのうちの2種類でフィチン酸合成が抑制されることがわかった。このことは、これら3酵素がフィチン酸合成に関与する酵素であることを示している。さらに、イオンクロマトグラフィーを用いた生化学的解析から、これら3酵素は、基質と生成物を異にする機能の異なる酵素である可能性を指摘した。

② 高発現形質転換イネの解析

フィチン酸合成に関与することが明らかとなったイノシトール三リン酸合成酵素、2種のイノシトール三リン酸キナーゼ、およびイノシトール五リン酸キナーゼをそれぞれ過剰発現するイネを作出し、そのイノシトール代謝産物を詳細に解析した。その結果、種子におけるフィチン酸合成は促進されるものの、栄養器官におけるフィチン酸合成は促進されないことがわかった。

③ 高発現形質転換イネの交雑系統の解析

フィチン酸合成の最初と最後のステップで働くイノシトール三リン酸合成酵素とイノシトール五リン酸キナーゼを共に過剰発現させた交雑系統を育成し、そのイノシトール代謝産物を分析したところ、栄養器官でのフィチン酸合成は促進されなかった。

以上の結果から、高フィチン植物を作出するためには、フィチン酸合成全体を活性化させる必要がある、合成されたフィチン酸の液胞（蓄積部位）への輸送活性を高める必要がある、根からのリンの吸収・輸送活性を高める必要があるなど、今後検討しなければいけない様々な可能性が指摘された。

(2) 環境負荷低減植物の作出に向けて

① アリューロン層特異的プロモーターの開発

フィチン蓄積部位のうち、胚形成に影響しないアリューロン層でのフィチン酸合成抑制を目指すため、アリューロン層特異的プロモーターを探索した。マイクロアレイ解析および RT-PCR 解析を行い、アリューロン層特異的発現を示す数種類の遺伝子を同定した。GUS レポーター遺伝子を利用したプロモーター解析を行なったが、アリューロン層全体で登熟初期から発現を誘導するプロモーターを発見することはできなかった。

また、オレオシンプロモーターを改変し、アリューロン層特異的発現誘導プロモーターを作出できないかを検討するため、種々の改変プロモーター::GUS コンストラクトを作成し、登熟種子での発現を解析した。しかしながら、アリューロン層特異的発現に必要な *cis* 配列を同定するには至らなかった。

② 低フィチン米の特性分析

種子に含まれる全リンの 60% を無機リンにすることに成功した低フィチン形質転換イネ（野生型株では無機リンは全リンの 3% 程度にすぎない）の種子の特性を明らかにするため、イオンクロマトグラフィー解析を行った。その結果、フィチン酸が 50% 以上削減されていること、その他のイノシトールリン化合物は増加していないことが明らかとなり、作出した系統が実用化レベルに達していることが明らかとなった。

(3) 低フィチン突然変異体の解析

① 原因遺伝子の単離・同定

フィチン酸合成に関与する新たな遺伝子を単離する目的で、*Tos* 挿入突然変異体約 4000 系統の種子無機リン濃度を測定し、高無機リン種子系統 1 系統 (*hip* 変異体) を選抜した。インド型イネ品種 *Kasalath* との F₂ 集団について DNA マーカーを用いた多型解析、シーケンス解析、ジェノタイプ解析を行なった結果、第 3 染色体短腕に座する MRP ABC トランスポーター (*OsLPA1*) が *hip* 変異体の原因遺伝子であることが明らかとなった。*hip* 変異体は、その機能に重要なモチーフ内に一塩基置換（一アミノ酸置換）を起こした変異体であることがわかった。

② 表現型の解析

hip 変異体では、野生型株と比較して無機リンは約 6 倍増加し、フィチン酸は約 31% 減少していることがわかった。幼少期の成育を比較したところ、*hip* 変異体は野生型株よりも生育が遅れることが明らかとなった。また、百粒重も野生型株より約 14% 減少していた。また、*hip* 変異体は野生型株に比べ、塩スト

レスに感受性であることがわかった。

トランスポーターとして働く可能性の高い本遺伝子は、フィチン酸合成そのものに関与するのではなく、フィチン酸の輸送蓄積に何らかの働きを有する可能性が高いと考えられ、そのことが、種子以外の器官での表現型が現れる原因と考えられた。

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4件)

- ① Suzuki, M., Tanaka, K., Kuwano, M., Yoshida, K.T. (2007) Expression pattern of inositol phosphate-related enzymes in rice (*Oryza sativa* L.): implications for the phytic acid biosynthetic pathway. **Gene** 405: 55-64.
- ② Mitsuhashi, N., Kondo, M., Nakaune, S., Ohnishi, M., Hayashi, M., Hara-Nishimura, I., Richardson, A., Fukaki, H., Nishimura, M., Mimura, T. (2008) Localization of myo-inositol 1-phosphate synthase to the endosperm in developing seeds of Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany** 59: 3069-3076.
- ③ Kuwano, M., Takaiwa, F., Yoshida, K.T. (2009) Differential effects of a transgene to confer low phytic acid in caryopses located at different positions in rice panicles. **Plant Cell Physiology** 50: 1387-1392.
- ④ Kuwano, M., Mimura, T., Takaiwa, F., Yoshida, K.T. (2009) Generation of stable transgenic rice through antisense repression of the 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase gene (*RINO1*) using the 13-kDa oleosin promoter. **Plant Biotechnology Journal** 7: 96-105.

[学会発表] (計7件)

- ① 桑野美緒・高岩文雄・吉田薫「18kDa オレオシンプロモーターによるフィチン酸生合成抑制種子系統の作出」第25回日本植物細胞分子生物学会大会、2007年8月、千葉大学
- ② 宮本正薫・桑野美緒・吉田薫「イノシトールリン酸関連酵素の過剰発現によるフィチン酸生合成の活性化」第112回日本育種学会大会、2007年9月、山形大学
- ③ 桑野美緒・高岩文雄・吉田薫「オレオシンプロモーターを利用したフィチン酸生合成制御による低フィチン米の創出」第113回日本育種学会大会、2008年3月、明治大学
- ④ 桑野美緒・高岩文雄・吉田薫「組換え低フィチン米における穂の着生位置による導入遺伝子効果の差異」第114回日本育種学会大会、2008年10月、滋賀県立大学
- ⑤ 古賀亘・宮本正薫・吉田薫「イノシトールリン酸生合成酵素の過剰発現による塩スト

レス耐性およびバイオマスの向上」第116回日本育種学会大会、2009年9月、北海道大学

⑥ 中島優典・作山麻衣子・吉田薫「イネ高無機リン種子変異体 *hip* の原因遺伝子の同定」第116回日本育種学会大会、2009年9月、北海道大学

⑦ 米野浩一・下川哲也・吉田薫「イノシトールリン酸代謝におけるイネイノシトール三リン酸キナーゼの役割」第116回日本育種学会大会、2009年9月、北海道大学

[図書] (計0件)

- ① 生物学辞典, 東京化学同人, 2010 (予定), (分担執筆)

[産業財産権]

○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.es.a.u-tokyo.ac.jp/ce/yoshida/home.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 薫 (YOSHIDA KAORU)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授

研究者番号: 70183994

(2)研究分担者

(3)連携研究者

三村 徹郎 (MIMURA TETSURO)

神戸大学・理学部・教授

研究者番号: 20174120