

令和 2 年 5 月 29 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：2018～2019

課題番号：18H06002・19K21145

研究課題名(和文) イネの体内リンリサイクリングに関連する遺伝子の新規同定

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of transporter genes involved in phosphorus recycling in rice

研究代表者

三谷 奈見季 (MITANI-UENO, 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) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：リンは、体内で移動しやすくリン欠乏時には古い組織から新しい組織への転流が特に活発になる。本研究ではリンの組織間輸送に関わる因子を同定するため、ソース葉とシンク葉からLMD法によって大維管束を分取しトランスクリプトーム解析によってリンの転流に関わる候補遺伝子を選抜した。そのうちOsSultr3;3は細胞質膜局在型輸送体で古葉の大維管束組織で恒常的に高発現していた。この輸送体遺伝子の破壊株は、野生株に比べてソース葉にリンが高蓄積した。以上の結果からこのOsSultr3;3はリンの組織間輸送に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物のリン獲得機構に関しては多くの知見が得られているが、これまでの研究は必要なリンの外からの獲得を増強することを目的とするものであった。シロイヌナズナにおいては唯一ソース組織からシンク組織へのリンの輸送に関わる輸送体AtPht1;5が報告されているものの、研究代表者が着目する体内でのリンの転流に関わる輸送体はイネではまだ見つかっていなかった。本研究結果によって得られた知見は、リンの体内利用効率の向上に貢献し、限りある資源であるリンを有効利用するための手段となりうる。このことは今後さらにその重要性が増すとされる持続可能な農業へとつながる大きな一歩となる。

研究成果の概要(英文)：Phosphorus (P) able to be redistributed from old to young organs for internal recycling of P, especially under P-limited condition. To identify the transporters that are involved in the P recycling in rice, we performed transcriptomic analysis of vascular bundle tissues from old and young leaves of rice grown under nutrient deficiency condition. Among genes highly expressed in the vascular bundles of old leaves, the protein encoded by OsSultr3;3 showed the P transport activity. This genes localized at the plasma membrane of leaf tissues. Knock out of this genes resulted in P accumulation in old leaves. These results indicated that OsSultr3;3 might be involved in the redistribution of P from source to sink organs.

研究分野：植物栄養学

キーワード：リン 体内リサイクル イネ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リンは生命活動に不可欠な元素であり、生体内では核酸や膜、ATP の構成要素として、また種々の酵素反応やシグナル伝達の制御因子として利用されている (Marschner 1995)。植物にとっては多量必須元素であり、農業分野では肥料の 3 大要素の一つとして作物の生産性を大きく左右する。通常リンは無機態リンとしてリン酸イオン ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) の形で植物の根から吸収される。しかしその化学的特性により土壌中のリンの多くは不溶性の形態となったり、土壌微生物の働きにより有機態リンの形となったりしているため、植物による吸収は難しい。したがって肥料として施与することにより作物の生産性を維持しているが、肥料の原料となるリン鉱石は限りある資源であり、将来的な枯渇が懸念されている。また、日本はリン肥料やその原料の大部分を輸入に依存しているが、その半分近くは上述のような化学的特徴により植物が利用できない形態となり土壌中に残存しているとされる。このような背景の中、省エネ、省コストで持続可能な農業の実現のため、リンの利用効率の高い作物の作出が求められる。

植物はその重要性からリン獲得のための様々な戦略を持っている。例えば欠乏時には根からのリン酸イオンの取り込みを担うリン酸輸送体の発現を上昇させたり、根から有機酸を分泌し不溶性のリンを可溶化したり、根の形態を変化させ吸収できる表面積を増大させたりする (Baker et al. 2015)。一方リンは必要量のうちかなりの割合を植物体内での再分配によって賄っているとされ、リン欠乏時には古い組織から新しい組織への転流が特に活発になる (Baker et al. 2015)。この際には古い組織で不要になった有機態リンが分解され、リン源として篩管を介して新しい組織へ再分配される。さらに通常の栽培環境において植物の体内のリンの内 70~95% が液胞に存在しているとの報告がある (Bielecki 1973)。欠乏時にはこの液胞に貯蔵されたリンが再び細胞質へと取り出され、様々な生命活動に利用されることに加え、シンク器官 (新しい組織) への再分配にも利用される。しかしながらこれらリンの再分配/転流の分子メカニズムに関してはこれまでほとんど未解明である。

参考文献: Marschner H. (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. London: Academic.  
Baker et al. (2015) J. Exp. Bot. 66, 3523-3540. Bielecki, R.L. (1973) Annu. Rev. Plant Physiol. 24, 225-252.

### 2. 研究の目的

イネは日本の主要作物であるのみならず世界の人口の約半分の主食となっている重要な作物である。そのイネは低リン耐性が高く、体内で積極的にリンのリサイクルを行っており、効率的な再分配/転流も低リン耐性の一役を担っていると考えられる。しかしながら、イネにおいてその分子メカニズムは未解明であることから、本研究ではイネにおけるリンの再分配/転流に関わる複数の因子を同定することを研究の目的とする。本研究によりリンの体内リサイクリングに関与する因子が同定されれば、リン利用の効率化からリン肥料の低減につながり、リン肥料を輸入に頼る日本のみならず、省コスト化が重要な発展途上国の農業生産の向上にも貢献できることから、社会的、学術的意義は非常に大きいと考える。また本研究によって得られた結果を他の作物に応用させることができれば、省エネ省コストで持続可能な農業が、不溶性リンの蓄積した施設園芸土壌からリン欠乏が深刻な酸性土壌に至るまで広く可能になる。

### 3. 研究の方法

これまでの研究から、イネにおいてリンの転流がリン欠乏時における効率的な利用に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。また、栄養欠乏条件下で栽培した栄養成長期のソース器官 (古い葉) とシンク器官 (展開前の最新葉) からレーザーマイクロダイセクション法によって大維管束を分取し、マイクロアレイ解析を行っている。加えてこれとは別にリン欠乏条件下の新葉と古葉の葉身のマイクロアレイ解析結果も取得している。これらの知見とデータに基づき、本研究ではこれまでに解明されていないリンの転流に関わる新規輸送体候補遺伝子、特に篩管輸送に直接かかわる候補を選定した。その具体的な手法を以下に述べる。

#### (1) 欠損変異体をもちいた生理機能の逆遺伝学的解析

選定した候補遺伝子 OsSultr3;3 の T-DNA 挿入変異体を取得した。通常の水耕栽培環境下において各器官のミネラル濃度を ICP-MS を使って測定し、野生型と比較した。

#### (2) 定量 PCR による時・空間的発現解析

イネの器官および生育時期別に詳細な発現解析を行い、候補遺伝子がいつどのような環境でどこに発現するかを明らかにした。

#### (3) 組織局在、細胞内局在の解析

免疫組織染色により組織局在を、GFP 融合遺伝子により細胞内局在を明らかにした。

#### (4) 輸送基質の同定

輸送基質の同定及び輸送活性の測定をアフリカツメガエル卵母細胞を用いて行った。またプロテオリボソームの系でも輸送活性のより詳細な解析を行った。

#### 4. 研究成果

LMD を用いた大維管束のトランスクリプトーム解析の結果から、ミネラル欠乏条件下のソース器官の維管束組織で高発現している輸送体遺伝子 *OsSultr3;3* を選定し、その機能解析を試みた。*OsSultr3;3* は硫酸イオントランスポーターファミリーに属する輸送体であるが、これと相同性の高い *OsSultr3;4* (SPDT) はリン酸を輸送することが、代表者の所属研究室の研究によって報告されている。しかし「節」で高発現しリンを穀粒へ選択的に配分するスイッチとしての機能をもつ SPDT とは異なり、*OsSultr3;3* は主に地上部、特に葉身で高く発現していた (図1)。GFP をもちいて、タマネギの表皮細胞やイネのプロトプラストに一過的に発現させ細胞内局在を解析したところ、細胞膜に局在していた。遺伝子の上流プロモーター領域約 2.5kb と GFP をつないだコンストラクトでイネを形質転換し、GFP の発現を抗 GFP 抗体によって免疫組織染色した結果、維管束組織内に発現が確認できた。この結果は、LMD マイクロアレイの結果ともよく一致する。次に輸送基質の同定を試みた。しかし、酵母やアフリカツメガエルを用いた系においてはリン酸の輸送活性を見ることはできなかった。そこで岡山大学の宮地博士らの協力によってプロテオリポソームを用い輸送活性を検討したところ、リン酸の内向き輸送活性を持つことが明らかになった。T-DNA 挿入による変異体を入手し、その表現型を解析したところ、水耕栽培条件下の変異体において野生型と比較し、下位葉にリン酸が蓄積し、上位葉ではわずかに減少していた。以上の結果から *OsSultr3;3* はリンの葉での維管束内輸送 (xylem to-phloem transfer) を介した再分配に関わることが示唆された。さらにこの輸送体の欠損変異体の収量が野生型と比較し大きく減少することから、リンの再分配が栄養成長期のみならず、生殖成長期においても重要であることが強く示された。生殖成長期における *OsSultr3;3* の具体的な役割については、本研究で明らかにすることはできなかったことから今後さらなる実験が必要であると考えられる。

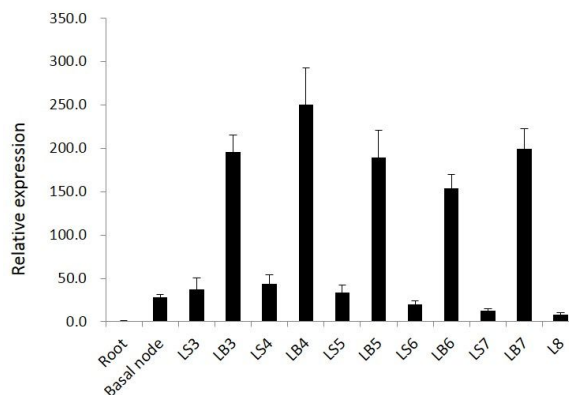


図1. 各器官における*OsSultr3;3*のmRNAの発現量 (根での発現量を1とした場合の相対量を示した)

また、LMD を用いたトランスクリプトーム解析とは別に、リン酸欠乏条件下の葉でその発現が誘導される輸送体として MFS ファミリーに属する輸送体を選抜した。この輸送体は、液胞膜に局在し、根と地上部で発現していた。T-DNA 挿入による変異体を入手し、その表現型を解析したところ、リン酸欠乏条件において下位葉へのリンの分配が増加し逆に上位葉では減少した。さらにリン酸の再転流を測定したところ、変異体において減少していた。以上の結果から、この輸送体はリン酸欠乏時における液胞からのリン酸の細胞質への取り出しに関わることが推測される。しかしリン酸の輸送活性を明らかにするため、酵母発現系とアフリカツメガエル卵母細胞発現系で輸送活性の測定を試みたが、これまでのところ確認できていない。今後、さらに別の系を使った検証が必要である。また、この輸送体の抗体を作製し、免疫組織染色によって組織局在を明らかにしようと試みたが、抗体の特異性が低く詳細な組織局在はわかっていない。現在 promoter-GFP のコンストラクトで形質転換したイネを作出して、抗 GFP 抗体による免疫組織染色を計画中である。以上は栄養成長期における結果であるが、この変異体は生育期間を通して植物体全体で発現が確認されたことから、生殖成長期における役割を検討するため、隔離温室で収穫期まで土耕栽培した。その結果変異体において収量が大きく減少し葉や節やそれより下の器官においてリン酸の濃度が増加していた。

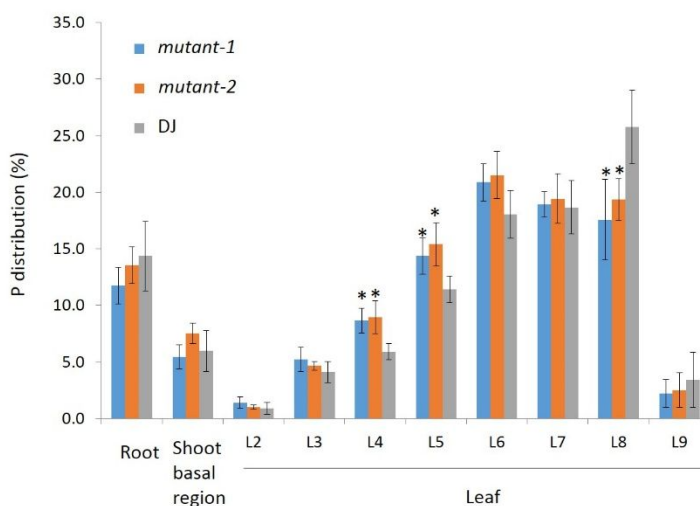


図2. リン酸欠乏処理後一週間での変異体と野生株DJの各器官におけるリン含量の比較 (各器官への分配割合で示した)

本研究によって単離した二つの輸送体は今後さらなる解析が必要ではあるが「備蓄されたリンの再利用を介した利用効率向上」への将来的な貢献が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三谷奈見季、山地直樹、馬建鋒
2. 発表標題 イネのリン再転流関連遺伝子の同定と機能解析
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学資源植物科学研究所植物ストレス学グループ <a href="http://www.rib.okayama-u.ac.jp/plant.stress/index-j.html">http://www.rib.okayama-u.ac.jp/plant.stress/index-j.html</a>
---

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----