

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05773

研究課題名(和文) 低投入を目指したイネ体内におけるミネラル再分配機構の分子生物学的解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms in mineral redistribution in rice for improving the nutrient use efficiency

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はイネにおけるミネラルの「再分配」の分子メカニズムを明らかにすることとし、組織別器官別、栄養条件別におこなったトランスクリプトーム解析からいくつかの再分配に関与する候補遺伝子を抽出し、その機能解析を行った。結果として細胞膜に局在しリンの導管から師管への乗せ換えに関わる輸送体、リン欠乏にตอบสนองして液胞に貯蔵されているリンの細胞質への取り込みに関わる輸送体、および維管束鞘細胞の細胞膜に局在し、ケイ酸の維管束組織外への排出に関わる輸送体等を単離同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は必要なミネラルを獲得するために様々な戦略を持っているが、これまでのミネラル欠乏耐性機構に関する研究は、根からのミネラル吸収を担う輸送体の発現を上昇させたり、そのための根の構造を変化させたりと外界からの吸収の増強を目指したものがほとんどであった。しかしある種のミネラルはその必要量の大部分を植物体内でのやりくりによってまかなっており、本研究の遂行によって得られたミネラルの「再分配」とそれに関与する輸送体の知見は、ミネラルの利用効率化から肥料等資材の低減につながることで期待できることから社会的意義が非常に大きい研究成果だといえる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the molecular mechanism of mineral "redistribution" in rice. As a result, at least 3 transporters have been identified related to the individual steps of mineral redistribution. One is a transporter localized to the plasma membrane involved in the xylem-to-phloem transport of phosphorus. The other is a tonoplast localized transporter involved in the release of phosphorus stored in vacuoles to the cytosol in response to phosphorus deficiency. The last is a Si transporter involved in the efflux of Si from vascular bundle sheath cells to the apoplast for Si accumulation at the apoplastic area in rice leaves.

研究分野：植物栄養学

キーワード：輸送体 ミネラル 再分配 イネ

1. 研究開始当初の背景

植物は土壤中から14種類の無機栄養素(ミネラル)を吸収し、それを必要な場所へと輸送し利用することによって生命活動を維持している。しかし土壤中のミネラルは作物の生育にとってかならずしも十分ではなく、多くの場合肥料を投入し不足分を補うことにより生産性を確保している。日本は肥料やその原材料の多くを輸入に依存しており、環境への負荷の低減を考えると肥料成分の「低投入」が今後考慮すべき重要な課題となる。例えば肥料の三大要素の一つリンは、その化学的特性から植物による吸収効率は低い。そこで農業現場ではリン酸質肥料として施与しているが、その原料となるリン鉱石は枯渇が懸念されているし、多量に施与されたリンが流出することにより、水圏の環境悪化を引き起こすことも問題とされている。このような背景の中、持続可能で環境への負荷が少ない農業の実現のため、ミネラルの利用効率を高めることが急務である。ミネラルの利用効率の向上を考えたとき重要なのが、必要な部位へ優先的に分配する能力や

不要になったあるいは十分/過剰な組織から新たに必要となる組織へ再分配する能力である(図1)。ミネラルの優先的分配についてはイネの「節(せつ)」に関する研究によってこれまでに比較的多くの知見が得られている。一方で必須ミネラルの再分配の分子メカニズムに関しての知見は不十分である。再分配とは、ミネラルが不要になった古い組織や十分あるいは過剰に存在する組織から、新たに必要となる組織へと体内移行させることを言う。植物体内でのミネラルの再分配は、篩管がその役割を担っており、液胞に蓄積されたミネラルの有効化や、貯蔵タンパク質や細胞構造(膜構造)の破壊などいくつかの生理学的、生化学的なプロセスを介する(Marschner2012)。過去の研究によると再分配は特に種子発芽期や、栄養成長期や生殖成長期において根圏からのミネラルの供給が不足した場合に特に重要である。例えば、コムギ穀粒中のリンの約90%、窒素の約80%が葉などからの再分配による(Batten et al. 1986)。また微量必須元素である鉄と亜鉛についても穀粒中の50%以上は葉からの再分配によることがムギ類で報告されている(Kutman et al. 2012, Hegelund et al. 2012)。このようなミネラルのリサイクル/リユースのための再分配に加え、葉における xylem-to-phloem transfer を介した再分配も重要である。これは導管を通して葉に運ばれたミネラルを葉の維管束組織内で篩管へと速やかに乗せ換え、新葉などのよりミネラルが必要な組織へと再分配するプロセスである。上述のように、導管から篩管への乗せ換えは節で行われるものもあるが、栄養成長期においては特に葉の役割が大きい。例えばダイズにおけるアミノ酸(窒素)の xylem-to-phloem-transfer の6-7割は葉で行われている(Da Silva and Shelp 1990)。以上のように必須ミネラルの獲得における再分配への依存度は非常に大きい。にもかかわらず、シロイヌナズナの一部の例を除いてその分子メカニズムはほぼ未解明である。

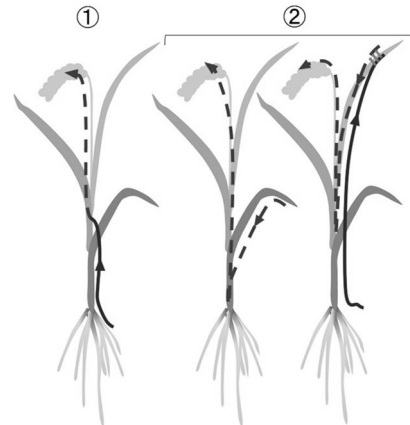


図1 ミネラルの利用効率向上のための戦略①節における優先的分配②備蓄された養分の再分配(中央)と xylem-to-phloem transferによる再分配(右) 点線が篩管輸送、実線が導管輸送を表す

必要となったあるいは十分/過剰な組織から新たに必要となる組織へ再分配する能力である(図1)。ミネラルの優先的分配についてはイネの「節(せつ)」に関する研究によってこれまでに比較的多くの知見が得られている。一方で必須ミネラルの再分配の分子メカニズムに関しての知見は不十分である。再分配とは、ミネラルが不要になった古い組織や十分あるいは過剰に存在する組織から、新たに必要となる組織へと体内移行させることを言う。植物体内でのミネラルの再分配は、篩管がその役割を担っており、液胞に蓄積されたミネラルの有効化や、貯蔵タンパク質や細胞構造(膜構造)の破壊などいくつかの生理学的、生化学的なプロセスを介する(Marschner2012)。過去の研究によると再分配は特に種子発芽期や、栄養成長期や生殖成長期において根圏からのミネラルの供給が不足した場合に特に重要である。例えば、コムギ穀粒中のリンの約90%、窒素の約80%が葉などからの再分配による(Batten et al. 1986)。また微量必須元素である鉄と亜鉛についても穀粒中の50%以上は葉からの再分配によることがムギ類で報告されている(Kutman et al. 2012, Hegelund et al. 2012)。このようなミネラルのリサイクル/リユースのための再分配に加え、葉における xylem-to-phloem transfer を介した再分配も重要である。これは導管を通して葉に運ばれたミネラルを葉の維管束組織内で篩管へと速やかに乗せ換え、新葉などのよりミネラルが必要な組織へと再分配するプロセスである。上述のように、導管から篩管への乗せ換えは節で行われるものもあるが、栄養成長期においては特に葉の役割が大きい。例えばダイズにおけるアミノ酸(窒素)の xylem-to-phloem-transfer の6-7割は葉で行われている(Da Silva and Shelp 1990)。以上のように必須ミネラルの獲得における再分配への依存度は非常に大きい。にもかかわらず、シロイヌナズナの一部の例を除いてその分子メカニズムはほぼ未解明である。

参考文献

Marschner P. (2012) Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic. Press.. Batten et al. (1986) Aust. J. Agric. Res. 37: 459-469. Kutman et al. 2012, Plant Soil. 361: 177-187. Hegelund et al. (2012) Plant Soil. 361: 241-250. Da Silva and Shelp (1990) Plant Physiol. 92: 797-801.

2. 研究の目的

本研究の目的は上述のような重要性から、イネにおけるミネラルの「再分配」の分子メカニズムを明らかにすることとした。具体的には、篩管への再ローディングに関わる輸送体や維管束内輸送に関わる輸送体、液胞に貯蔵されているミネラルの細胞質への取り込みに関わる輸送体等を単離解析し、ミネラルの利用効率の高い作物の作出に貢献する。

3. 研究の方法

これまでに通常栽培条件とミネラル欠乏条件下で栽培したそれぞれのイネの栄養成長期のソース器官(下位葉)とシンク器官(最新未展開葉)からレーザーマイクロダイセクション(LMD)法によって大維管束と葉肉細胞を分取し、トランスクリプトーム解析を行った。加えて、個別のミネラル(リン、鉄、亜鉛、銅、マンガン)の欠乏条件下での下位葉と最新葉の葉全体のトランスクリプトーム解析の結果も取得済みであった。本研究では篩管への再ローディングに関わる輸送体、維管束内輸送に関わる輸送体、さらに液胞に貯蔵されているミネラルの細胞質への取り込みに関わる輸送体、それぞれの候補遺伝子をピックアップし、以下のような機能解析を行った。

(1) 欠損変異体の取得及び作出

上記の条件で選定した候補遺伝子毎に Tos17 や T-DNA 挿入変異株の取得を行う。変異株が入手できなかったものについては CRISPR/Cas9 法により、遺伝子破壊株を作成した。

(2) 定量 PCR による発現解析

イネの器官および生育時期別に詳細な発現解析を行い、候補遺伝子の発現条件を明らかにした。

(3) 細胞内局在の解析

タマネギの表皮細胞やイネのプロトプラストに GFP 融合遺伝子を一過性発現させることにより細胞内局在を明らかにした。

(4) 輸送基質の同定

アフリカツメガエル卵母細胞や酵母、プロテオリポソームを用い輸送活性を測定した。

(5) 組織局在の解析

抗ウサギ抗ペプチド抗体を作製し、免疫組織染色によりイネにおける組織局在を調べた。プロモーター: GFP (GUS) を導入したイネ (日本晴) を作出し、GFP (GUS) 抗体を用いて組織局在の解析を行った。

(6) 生理機能の解析

変異株の各器官のミネラル蓄積や LA-ICP-MS を用いた器官/組織毎の元素の分布比較などを行い、生理的な役割を解析した。

4. 研究成果

篩管への再ローディングに関わる輸送体候補として、Os04g0652400 を抽出した。この遺伝子は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おり、輸送体遺伝子 OsSultr3;3 をコードしていた。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、維管束組織内の発現が確認できた。この遺伝子の T-DNA 挿入による変異体は研究スタート支援によるサポートを受けずに入手しており、表現型も解析済みであった。それによると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。これらの結果から OsSultr3;3 はリンの葉での維管束内輸送を介した再分配に関与することが示唆された。またこの輸送体の欠損変異体の収量が低下することから、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。さらに、変異体においては種子の形状特に胚乳の発達に異常が生じる表現型を呈した。種子の発達における OsSultr3;3 の具体的な役割を調べるため、LA-ICP-MS を用い種子断面におけるリンの分布を野生型と変異体と比較したが変異体の形状の異常が大きすぎて比較することが困難であった。この変異体の種子に関しては、次世代がほぼ発芽しないことから、今後は RNAi 等によって発現を低下させた変異体の作出が求められる。

液胞に貯蔵されているミネラルの細胞質への取り込みに関わる輸送体としては、リン酸欠乏条件下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コードする遺伝子 Os08g0156600 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。平成 30 年からの研究スタート支援によるサポートを受け、変異体の解析はすでに取りかかっていたが、さらに詳細な解析をおこなった結果、リン酸の再転流が変異体において減少していることを見いだした。また、プロテオリポソームを用いた輸送活性の検討により、この輸送体がリン酸の内向き輸送活性を持つことが示された。以上の結果から、この輸送体はリン欠乏時における液胞からのリンの細胞質への取り込みに関与することが推測された。

維管束内輸送に関わる輸送体候補として、LMD トランスクリプトーム解析結果から大維管束で高発現する SIET5 を選抜した。SIET5 はケイ酸排出型輸送体 Lsi2 の相同遺伝子であり、地上部で発現している。さらに発現量を葉身と葉鞘と比較すると、葉鞘の方が高かった。抗 SIET5 抗体を用いた免疫染色により維管束鞘細胞の細胞膜に局在していることが示された。ゲノム編集によって変異体を作成し、表現型を調べたところ変異体の葉鞘へのケイ素の分配が減少し、逆に葉身では増加した。しかし、他の元素の分配には影響が見られなかった。以上の結果から SIET5 は導管を通して葉鞘に到達し Lsi6 によって導管からつま下ろされたケイ酸を維管束鞘細胞の細胞外 (アポプラスト) へ運び出し役割を担っていると考えられた。さらに、この SIET5 と相同性の高い SIET4 の機能解析もおこなった。SIET4 は根と地上部に発現し、ケイ酸の排出輸送活性を持つ。抗 SIET4 抗体を用いた免疫染色の結果から、SIET4 は葉の表皮細胞の外側やケイ化機動細胞に隣接する細胞の細胞膜上に局在していた。ゲノム編集によって作出した変異体では、ケイ素の表面やケイ化機動細胞への沈積が減少し、逆に野生型イネでは沈積が見られない葉肉組織への過剰な沈積が見られた。以上の結果から SIET4 はケイ素を表皮細胞の細胞外やケイ化機動細胞へ沈積するための役割を担うことが示された。本研究によって単離した輸送体は今後さらなる解析が必要ではあるが、養分の利用効率の向上に向け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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Namiki Mitani-Ueno
2. 発表標題 Si in rice: a long journey from uptake to deposition
3. 学会等名 38th IPSR International Symposium and 14th Symposium on Plant Stress Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山地直樹・藤井理樹・三谷奈見季・馬建鋒
2. 発表標題 蛍光染色によるイネ葉のケイ素蓄積過程の解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2022年度東京大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山地直樹・三谷奈見季・小西範幸・馬建鋒
2. 発表標題 イネのケイ素吸収を制御する長距離シグナルタンパク質の同定
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会 (仙台)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Namiki Mitani-Ueno, Naoki Yamaji, Sheng Huang, Yuma Yoshioka, Takaaki Miyaji, Jian Feng Ma
2. 発表標題 A transporter essential for proper deposition of Si in rice
3. 学会等名 19th International workshop on plant membrane biology 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三谷奈見季・山地直樹・馬 建鋒
2. 発表標題 イネのケイ素蓄積に関わる輸送体SIET4の更なる解析
3. 学会等名 日本土壤肥料学会北海道大会
4. 発表年 2021年

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SIET4輸送体は細胞特異的ケイ素蓄積に関与する
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三谷奈見季・山地直樹・馬 建鋒
2. 発表標題 ケイ素輸送体Lsi2の相同遺伝子SIET3,4,5の機能解析
3. 学会等名 日本土壤肥料学会岡山大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------