

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780069

研究課題名（和文） ケイ酸輸送体の発現制御メカニズムの解明

研究課題名（英文） Studies on regulation mechanisms of Si transporters

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：植物の有用元素であるケイ素。そのケイ素の輸送体 *Lsi1* のケイ素に応答した発現量調節メカニズムおよび、発現部位制御メカニズムの解明に向けた基礎的研究を行った。ケイ素集積植物であるイネにおいては、地上部のケイ素集積量に応じて、根でのケイ酸輸送体の発現量を調節していることが分かった。またその発現の調節に関わるシス配列が *Lsi1* の上流-600bp から-400bp の領域に存在することを明らかにした。発現場所制御には-1600bp-1420bp までの領域が関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Silicon transporter *Lsi1* is involved in high accumulation of Si in rice. *Lsi1* is specifically localized at both the exodermis and endodermis in the root and the mRNA expression levels of these transporter genes are down-regulated in response to the accumulation of Si in the shoot. To understand the mechanism regulating the expression and localization of *Lsi1*, I performed promoter deletion assay. As a result, the candidate region of *cis* element for cell-specificity of the *Lsi1* localization was located at -1600bp to -1420bp in the upstream. Furthermore, similar analysis with transgenic plants showed that candidate region for the down-regulation of mRNA was located at -600 to -400bp in the upstream of *Lsi1*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学

キーワード：ケイ酸輸送体、発現制御、イネ

1. 研究開始当初の背景

植物は我々の生活と深く結びついており、

植物が健全にかつ旺盛に生育することは我々にとって非常に重要なことである。多く

の植物は土壤中に根を張り、生育に必要な栄養塩を主にこの土壌から得ている。土壌には様々な成分が含まれているが、最も多く存在するミネラルがケイ素 (Si) である。これまでの研究でケイ素は植物の生育にとって様々な有益効果を与えることが多数報告されている。例えば、地上部にケイ素が集積することにより植物の機械的強度が増し、倒伏の抑制や光合成効率の向上、またケイ素の蓄積が物理的障壁となり病原菌の感染や害虫による食害の防止に役立つとされる。籾殻に蓄積したケイ素は過蒸散の抑制に効果があり、これによって乾燥ストレス耐性に寄与するという報告もある。ケイ素はその化学的性質から土壌中に含まれる元素として唯一過剰障害を出さない元素である。このようにケイ素は普遍的に存在し過剰障害を出さず、様々な種類のストレスを緩和することができる優等生である。

このようなケイ素の恩恵を受けるためには、土壌中のケイ素を根から吸収し、地上部へと集積させることが必須である。私たちはケイ酸の吸収を司る遺伝子の単離を試み、2006年に世界で初めて高等植物であるイネからケイ酸輸送体 *Lsi1* を単離した。その後イネ、オオムギ、トウモロコシからいくつかのケイ酸輸送体を同定している。これら先行研究によってケイ酸輸送体そのものに関しては徐々にその全貌が解明されつつある。そこで、ケイ素非集積性を示すシロイヌナズナにケイ素高集積植物であるイネ由来のケイ酸輸送体遺伝子 *Lsi1* を過剰発現させた形質転換体を作成し、ケイ素集積植物の作出を試みた。しかしながらケイ素含量は高くなるものの植物体サイズおよび種子の収量の減少が観察された。この結果からケイ酸輸送体遺伝子を過剰発現させるだけではケイ素の有益効果を付与したケイ素集積植物を作出す

ることは難しいことが示された。また地上部のケイ素含量がイネに比べて著しく低いにもかかわらず、オオムギやトウモロコシにも非常に相同性の高いケイ酸輸送体が存在することからも、単に輸送体の有無による集積量の違いは説明できない。以上の結果から輸送体を適切な場所で適切に働かせることが、ケイ素の効率的な吸収・集積にとって重要なのではないかと考えた。実際にイネにおいて根からのケイ酸の吸収に関わっている二つのケイ酸輸送体 (*Lsi1*, *Lsi2*) はケイ素十分条件下でその発現が低下し、逆にケイ素欠乏条件下では発現が上昇する。またこれら二つの輸送体は内皮細胞と外皮細胞に対を成して局在し、協調的に働いていることがこれまでに明らかになっている。

2. 研究の目的

上述のような研究結果を受け、ケイ酸輸送体の発現制御機構等詳しい機構の解明が、ケイ素集積性を決めるのにあたり非常に重要になると考えた。つまりケイ酸輸送体を導入し、しかもそれらを適切に制御することによって複合環境ストレス耐性植物の作出が可能になる。本研究ではそのための基礎的研究としてケイ酸輸送体の発現制御機構の解明を行った。具体的には、ケイ素に応答したケイ酸輸送体の発現量調節メカニズムおよびケイ酸輸送体に特徴的な、内皮細胞と外皮細胞特異的発現の制御メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ケイ素に応答した発現量調節メカニズムの解析

①ケイ酸輸送体の発現量を規定するファクターを明らかにすべく低ケイ酸吸収性変異体 *lsi1* を用いた発現解析を行った。野生型

の日本晴と変異体 *Lsi1* を1週間ケイ酸処理し、処理前後の *Lsi1* と *Lsi2* の発現量の変化を定量的 RT-PCR により比較した。

②ケイ素応答性に関わるプロモーター領域を特定するため、*Lsi1* の上流プロモーター領域を5'側より約200bp毎に順に欠損させた各配列にレポーターとして *GFP* 遺伝子を連結させたコンストラクトを作成し、野生型のイネに形質転換した。そして得られた形質転換体のケイ素に対する応答の有無を、導入した *GFP* の発現量を real-time RT-PCR でモニタリングすることにより調べた。さらには、酵母 cDNA ライブラリーを用いたワンハイブリッドスクリーニングにより、そのシス配列を認識し転写活性を調節している転写調節因子の同定を試みた。

(2) 発現場所制御機構の解析

①(1) で作出した形質転換体を用い、ケイ酸輸送体 *Lsi1* の発現場所制御にかかわる上流領域の探索を行った。プロモーター領域の長さの異なるそれぞれの形質転換体での *GFP* の局在を抗 *GFP* 抗体を用いた免疫染色により観察し、イネ由来の *Lsi1*、*Lsi2* に特徴的な内皮細胞外皮細胞での発現が見られなくなっているラインを選抜することによって、水平方向における発現場所の制御に関わる領域を探索した。

②レーザーマイクロダイセクション法とマイクロレイ解析を組み合わせることで、内皮細胞と外皮細胞特異的に発現している輸送体を網羅的に解析し、発現場所を規定する転写調節因子によって *Lsi1* や *Lsi2* と同様の制御を受けている可能性が示唆される輸送体を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

(1) ケイ酸に応答した発現量調節メカニズムの解析

まず、ケイ酸輸送体の発現は何によって規定されているか、言い換えれば何を感知して、ケイ素の吸収を調節しているのか検討した。本実験に用いた低ケイ酸吸収変異体 *Lsi1* は根でのケイ素の集積量は野生型と比較して大きな違いはないものの、地上部の集積量は1/10以下と大きく異なっている。この変異体を用いて、ケイ酸処理未処理間の *Lsi1* の発現量の変化を定量的 RT-PCR により比較した結果、野生型では、ケイ酸処理によって *Lsi1* の発現量が低下したが、変異体 *Lsi1* ではケイ酸処理による *Lsi1* の発現量の低下は見られなかった(図1)。

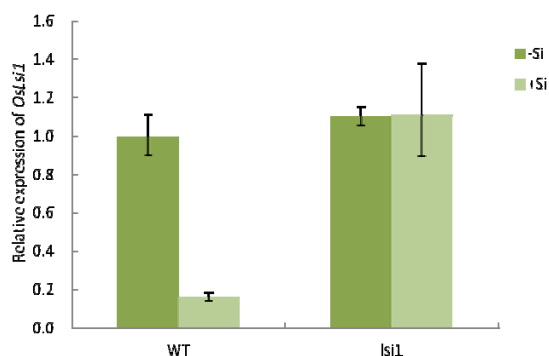


図1 野生型イネと低ケイ酸吸収性変異体におけるケイ素に対する *OsLsi1* 発現応答の違い

さらに野生型においてケイ素集積量とケイ酸輸送体 *Lsi1* の発現量には明確な相関関係が見られた。以上の結果から、イネは何らかの方法で地上部のケイ素量をモニタリングし、その必要量に応じてケイ素を根から吸収する仕組みを持っていることが示唆された。ケイ素集積量のモニタリングおよびシグナル伝達機構も今後解明していきたいと考える。

次にケイ素応答性に関わるプロモーター領域を特定するため、様々な長さの *Lsi1* 上

流配列を *GFP* とつないだ形質転換体のケイ素に対する応答の有無を、導入した *GFP* の発現量を real-time RT-PCR でモニタリングすることにより調べた結果、開始コドン ATG より上流-1600bp から-600bp までを欠損させても *GFP* のケイ素に対する発現応答が保持されていた (図 2)。

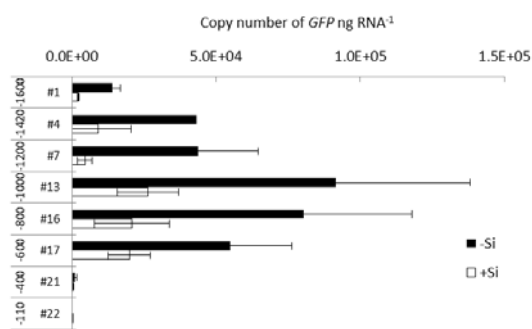


図 2 プロモーター領域の長さの違いによるケイ素応答性の違い

しかし、-600bp よりさらに削ることによって発現自体が著しく低下したことから、今度は-600bp から ATG までの領域を 3' 側から欠損させた形質転換体を新たに作成した。これらの形質転換体を用いて、先述の方法でケイ素に対する応答を調べたところ 3' 側より-400 まで削っても、本来見られるような応答が保持されたことから、ケイ素に対する発現量の応答に関与する領域は、-600bp から-400bp 間に存在することが強く示唆された。この約 200bp の領域をもとに、cDNA ライブラリーを用いた酵母ワンハイブリッドスクリーニングによりトランス因子の探索を行った結果、いくつかのポジティブな結果を示すコロニーが得られた。今後はさらなる解析を進める必要がある。

(2) 発現場所制御機構の解析

前述の形質転換体を持ちいて、*GFP* の局在を抗 *GFP* 抗体を用いた免疫染色により観察した

ところ、プロモーター領域として *Lsi1* の上流-1600bp を導入した場合においてのみ、*Lsi1* の本来の発現パターンである、内皮細胞と外皮細胞への局在を示した。しかし、それ以上削ると内皮細胞外皮細胞に加えて皮層細胞での発現もみられたことから、発現場所の制御に関わる領域は-1600bp から-1420bp の間に存在することが示唆された (図 3)。

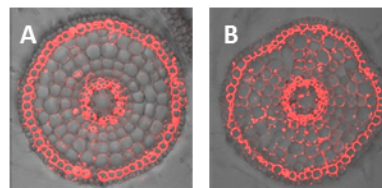


図 3 プロモーター領域の長さの違いによる組織局在の違い (A:プロモーターとして-1600bp, B:-1420bp を含む)

内皮細胞外皮細胞特異的発現の制御に関わる領域のさらなる絞り込みのために、内皮細胞外皮細胞特異的に発現するものをレーザーマイクロダイセクションとマイクロアレイ解析を組み合わせた手法を用いて、網羅的な解析を行った。その結果、ケイ酸輸送体 *Lsi1*, *Lsi2* 以外にミネラルトランスポーターを含む数十のトランスポーターをコードする遺伝子が内皮細胞と外皮細胞で高発現していることが明らかになった。今後はそれらの上流配列を比較することによって、発現場所制御に関わる領域の探索を行う必要がある。

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)

[学会発表] (計 4 件)

(1) 三谷奈見季、ケイ酸輸送体 *Lsi1* の発現制御機構の解析、日本土壤肥料学会、2011 年 8 月 8 日、つくば

(2) 三谷奈見季、ケイ酸輸送体Lsi1のケイ酸応答性および組織局在性を制御するプロモーターの解析、日本土壤肥料学会、2012年9月4日、鳥取

(3) 三谷奈見季、イネ由来ケイ酸輸送体Lsi1の発現応答およびその制御機構の解析、日本植物生理学会、2013年3月23日、岡山

(4) Namiki Mitani - Ueno、Promoter analysis of a rice influx silicon transporter gene Lsi1、IWPMB2013、2013年3月29日、Kurashiki

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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