

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660003

研究課題名(和文)植物の環境ストレス応答におけるイノシトールピロリン酸の役割

研究課題名(英文)Role of inositol pyrophosphates in plant environmental stress response

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(農学部)・教授

研究者番号：70183994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、これまで植物の環境応答においてほとんど研究されてこなかったイノシトールピロリン酸(PP-IPs)に着目し、その環境ストレス耐性における役割を明らかにすることを目的とした。主として、PP-IPs合成酵素遺伝子のうち我々が植物で初めて同定したOsKCS1-6の機能解析を中心に研究を行った。その結果、植物の環境応答に重要な役割を果たすアブシジン酸に対する応答にPP-IPsが関与する可能性を初めて明らかにするとともに、これまで1種類しか見つけていなかったPP-IPs合成酵素に、植物でも2種類存在することを初めて指摘することができた。

研究成果の概要(英文)：In plants, inositol pyrophosphates (PP-IPs) have not been studied so far. We aimed to clarify the role of PP-IPs in plant environmental stress responses. We focused on the functional analysis of PP-IPs synthase genes, OsKCS1-6. We identified two kinds of PP-IPs synthase genes, which are homologous to yeast genes, VIP1 and KCS1. We indicated for the first time the possibility that PP-IPs may have a role in abscisic acid response during seed germination.

研究分野：植物環境工学

キーワード：環境ストレス イノシトールピロリン酸 アブシジン酸

1. 研究開始当初の背景

地球の自浄能力を超えた急速な環境劣化が進む中で、厳しいストレス環境に耐性で収量性の高い作物の開発が急務である。これまでもストレス応答因子や適合溶質の利用、活性酸素除去系の活性化、細胞死の制御等による耐性植物の作出が試みられてきたが、未だに十分であるとは言い難い。植物の持つ新たなストレス耐性機構の解明とその利用が望まれている。

イノシトールリン酸化合物の中でもイノシトール六リン酸から合成される高エネルギー型のイノシトールピロリン酸(PP-IPs)は、動物や酵母において塩ストレスや高温ストレス等の環境ストレス応答において重要な役割を果たすことが知られている。酵母では一位のリン酸基にさらにリン酸基を付加するPP-IPs合成酵素(VIP1)に加えて、五位のリン酸基にリン酸基を付加する酵素(KCS1)が存在する(図1)。しかし、申請当時は、植物においてはPP-IPsの生理機能はもちろん、合成酵素すら明らかになっていない状況であった。我々は申請当時、植物でPP-IPs合成酵素候補遺伝子を世界で初めて同定することに成功した。そこで、我々は、植物の環境ストレス応答におけるイノシトールピロリン酸の役割を明らかにし、イノシトールピロリン酸が関与するシステムを利用したストレス耐性作物の作出を目指そうと考えるに至った。

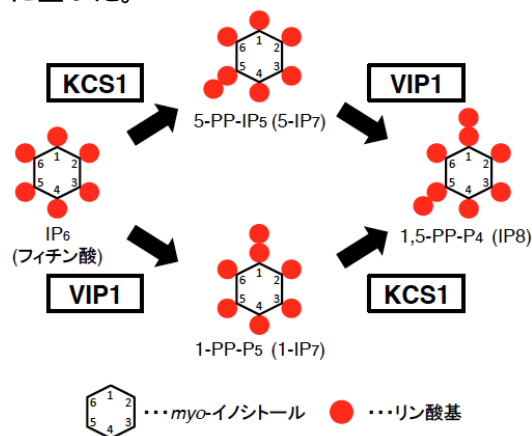


図1. 酵母におけるイノシトールピロリン酸合成経路

2. 研究の目的

本研究は、これまで植物の環境応答においてほとんど解析されてこなかったPP-IPsに着目し、その環境ストレス耐性における役割を明らかにすることを目指した。本研究では特に、植物のPP-IPs合成酵素遺伝子候補である*OsKCS1*, 2, 3, 4, 5, 6の6種類の遺伝子に着目し、研究を進めた。本研究によりストレス耐性植物作出のための新たな基盤が作られることが期待される。

3. 研究の方法

(1) PAGE

0.4M HCl, 10% Na₂SO₄を含む抽出バッファーを用いて破碎種子からイノシトールリン酸類を抽出した。

抽出したサンプルを、35.5%ポリアクリルアミドゲルにロードし、4、450V、40mAで48時間泳動した後、0.05%トルイジンプール染色液で染色してイノシトールリン酸類を検出した。主な方法はLosito et al.(2009)に従った。

(2) 酵母の相補性検定

EUROSCARFより購入した酵母の*KCS1*欠損変異体(BY4741; Mata; his3D1; leu2D0; met16D0; ura3D0; YDR017c::kanMX4)およびO'Shea博士から譲渡された*VIP1*欠損変異体(W303; leu2-3 112try1-1 can1-100; ura3-1 ade2-1 his3-11,15)にイネの候補遺伝子を導入して実験に用いた。イネ候補遺伝子は、pENTR または pYES2 または pYES-DEST52に導入して用いた。

*KCS1*の相補実験では、対数増殖期の酵母を0.8M NaClを加えた培地に移し、37℃で培養して塩・高温ストレス条件を与えた。過酸化水素ストレスは過酸化水素水を最終濃度5mMになるように加えた培地で30、3時間培養することで与えた。

*VIP1*の相補実験では、対数増殖期の酵母をリンが不足した条件(リン濃度10μM)に移し、リン欠乏応答が起こるかを調査した。

(3) イネ組換え体

発現の組織特異性を明らかにする目的で*OsKCS1*~6遺伝子の上流約2kbを*GUS*遺伝子に連結したコンストラクトをイネ品種「日本晴」に導入した。

OsKCS1~6遺伝子または*OsVIP1,2*のcDNA領域をアンチセンス方向にアクチンプロモーターと連結させたコンストラクトをイネ品種「キタアケ」に導入した。

イネ品種「コシヒカリ」の低フィチン酸変異体*osmrp13*種子で*OsMRP13*遺伝子を高発現させるため、種子特異的プロモーターに*OsMRP13*遺伝子を連結したコンストラクトを作成し、*osmrp13*変異体に導入した。種子特異的遺伝子発現調節には18kDaオレオシン遺伝子のプロモーターを用いた。

イネの形質転換にはAgrobacterium法を用いた。組換え体はT₃世代以降まで育成し、ホモ系統を選抜して用いた。

(4) 発芽実験

滅菌した種子を10μMのアブシジン酸(ABA)を含む水溶液を浸したる紙上で28℃の条件で発芽させた。根が1mm以上出現した種子を発芽種子とした。

(5) フィチン酸(イノシトール六リン酸; IP6)の定量

2.4% HClで抽出したIP6をMitsushashi et al.(2005)の方法に従い、イオンクロマトグラフィにより解析した。陰イオン交換カラムDionex IonPac AS20を用いてKOHのグラジ

エント(5mM-80mM)で溶出、分離し、電気伝導度で検出した。

4. 研究成果

(1) PAGE による PP-IPs の検出

イネ種子から抽出したイノシトールリン酸類を PAGE により分離・検出したところ、IP6、イノシトール七リン酸(IP7)、及びイノシトール八リン酸(IP8)のバンドを検出することができた(図2)。

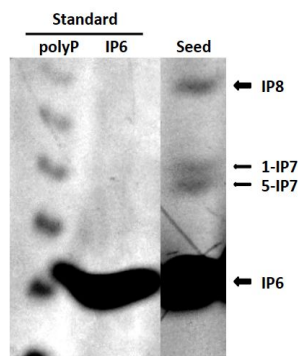


図2. PAGE によるイノシトールリン酸類の検出

IP7 および IP8 は熱処理により分解されることが知られている。抽出液を 100 20 分間加熱処理したところ、IP7 と IP8 のバンドが消失したことから、検出されたバンドが PP-IPs である可能性は高いと判断した。

特筆すべきは、純度の高いポリアクリルアミドを用いて強度を高めたゲルを使用したところ、これまで分離できなかった二種類の IP7、すなわち、一位のリン酸基がリン酸化されたイノシトール七リン酸(1-IP7)と五位のリン酸基がリン酸化されたイノシトール七リン酸(5-IP7)を二本の別々のバンドとして検出できた点である(図2)。

これにより、一位にリン酸基を付加する PP-IPs 合成酵素(VIP1)に加えて、五位にリン酸基を付加する PP-IPs 合成酵素(KCS1)が植物に存在する可能性が初めて示された(図1)。

(2) 酵母欠損変異体を用いた遺伝子の同定

イネ KCS1 相同遺伝子の同定

イネ KCS1 候補遺伝子には 6 種の相同遺伝子が存在した。これらはそのアミノ酸配列から、OsKCS1~3, OsKCS4~5, 及び OsKCS6 の 3 つの clade に分類された。塩・高温ストレス、および過酸化水素水ストレスに対する酵母 KCS1 欠損変異体のイネ OsKCS1~6 による相補性検定の結果から、OsKCS1 が最もよく酵母 KCS1 のストレス応答機能を相補すること、OsKCS2 と OsKCS5 もある程度機能を相補することが明らかとなった。

イネ VIP1 相同遺伝子の同定

酵母ではリン欠応答の調節に VIP1 が合成した 1-IP7 が働くことが知られている。この過程をイネ VIP1 候補遺伝子が相補するかを検討したところ、OsVIP1 および OsVIP2 ともに酵母 VIP1 のリン欠応答機能を相補することが明らかとなった。

(3) イネ KCS1 の遺伝子発現

組織特異性

イネ KCS1 候補遺伝子の遺伝子発現を Real time RT-PCR により解析したところ、OsKCS1, 2, 3, 4, 5, 6 の 6 種類の遺伝子全てが、調査した全ての器官(根、葉、花、および種子)で発現していることが明らかとなった。さらに詳しい発現部位を同定するため、各遺伝子のプロモーター領域を GUS 遺伝子に連結したコンストラクトを導入した組換えイネを作成し、遺伝子発現部位を調査した。根や葉では、表皮を除き、維管束を中心とした全ての組織で発現が見られ、根端では特に強く発現した。花では葯や花粉での発現が強く見られた。また、未熟種子では、胚とアリユロン層で強い発現が見られた一方で、胚乳ではほとんど発現が見られなかった。以上の発現パターンに、6 種類のイネ KCS1 候補遺伝子間での違いは見られなかった。

ストレス応答

発芽後 8 日目の実生を用いてイネ KCS1 遺伝子が塩ストレスに応答するかを調査したところ、OsKCS1, OsKCS2, OsKCS4, および OsKCS6 の 4 遺伝子が塩ストレスに応答して発現量を増加させることが明らかとなった。

(4) 発芽における ABA 応答

植物では各種のストレス応答において植物ホルモンの一種であるアブシジン酸(ABA)が重要な役割を持つ。PP-IPs が植物のストレス応答に関与するのであれば、PP-IPs の増減は ABA シグナリングにも影響を与えると考えられる。そこで、OsKCS1~6, OsVIP1~2 の発現量を変化させた組換えイネ、および PP-IPs 合成酵素の基質量が変化した低フィチン酸(IP6)変異体を用いて、発芽時の ABA 応答を調査した。

ABA 処理により、イネの発芽は遅延する。野生型に較べて発芽がさらに遅延すれば ABA 感受性が高まったということであり、野生型よりも発芽が早まれば ABA 感受性が低下したということを示している。

OsKCS1~6 発現抑制体

イネ KCS1 候補遺伝子の 3 つの clade に各々属する OsKCS1, OsKCS4, および OsKCS6 の発現抑制体のホモ系統を用いて、発芽における ABA 感受性を調査したところ、OsKCS4 発現抑制体と OsKCS6 発現抑制体は野生型と変わらなかったが、OsKCS1 発現抑制体は野生型よりも発芽が遅れ、ABA 感受性が高くなっていることがわかった(図3)。酵母の欠損変異体を用いた相補性検定において、酵母の KCS1 の機能を最もよく相補した OsKCS1 のみ ABA 感受性に差が見られたことは、植物での ABA 応答に OsKCS1 の PP-IPs 合成機能が関与することを示唆している。

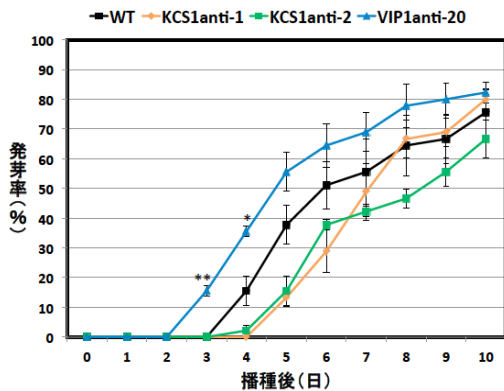


図 3. PP-IPs 合成酵素遺伝子発現抑制体における ABA 応答(10µM ABA, n=15, 3-4 反復)

さらに、PAGE により種子の PP-IPs 量を調べたところ、*OsKCS1* 発現抑制体では 5-IP7 が減少し 1-IP7 が増加していることが明らかとなった(図 4)。これは、*OsKCS1* の発現抑制により 5-IP7 合成が抑制されたことで 1-IP7 がより多く合成されたためと考えられた。

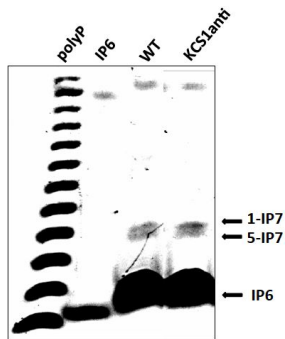


図 4. *OsKCS1* 発現抑制体種子における PP-IPs の検出

OsVIP1, および *OsVIP2* 発現抑制体

OsVIP1 と *OsVIP2* の発現抑制体のホモ系統を用いて、発芽における ABA 感受性を調査した。*OsVIP2* 発現抑制体の ABA 応答には野生型と差は見られなかったが、*OsVIP1* 発現抑制体は野生型よりも発芽が早まり、ABA 感受性が低下することがわかった(図 3)。登熟～発芽の際には *OsVIP1* のみが高い発現を示すため、*OsVIP1* の発現抑制だけが ABA 応答に影響を与えた可能性が考えられた。

また、*OsVIP1* 発現抑制体種子の PP-IPs 量を調べたところ、5-IP7 が増加し 1-IP7 が減少していることが明らかとなった。これは、*OsVIP1* の発現抑制により 1-IP7 合成が抑制されたことで 5-IP7 がより多く合成されたためと考えられた。

低フィチン酸変異体

PP-IPs はフィチン酸(IP6)を基質として合成される(図 1)。従って、IP6 量が変化した種子では、発芽における ABA 応答が影響を受ける可能性がある。そこで、低フィチン酸の形質を示すイネ *osmrp13* 変異体を用いて ABA 応答を調査することにした。*OsMRP13* はフィチン酸を液胞に運ぶトランスポーターであり、*osmrp13* 変異体では、フィチン酸

合成が抑制されて低フィチン酸となることが知られている。

osmrp13 変異体の種子には野生型の 3 割程度のフィチン酸しか蓄積されない(図 5)。変異体の発芽時の ABA 応答を調べたところ、野生型に比べて発芽が早まり、ABA 感受性が低下することがわかった(図 6)。また、変異体の種子では 5-IP7 も 1-IP7 も減少することが明らかとなった(図 7)。

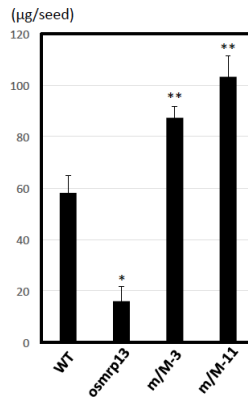


図 5. イネ *osmrp13* 変異体と *osmrp13* 変異体で *OsMRP13* を高発現させた組換え体(m/M)の種子に含まれる IP6 量の比較

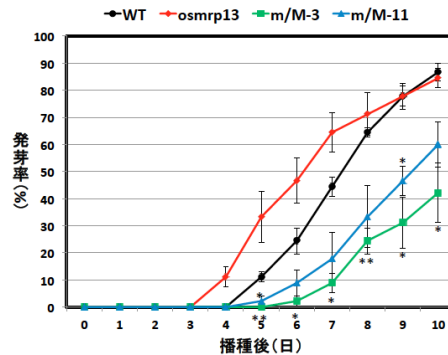


図 6. 低フィチン酸変異体(*osmrp13*)および高フィチン酸組換え体(m/M)における ABA 応答 (10µM ABA, n=15, 3-4 反復)

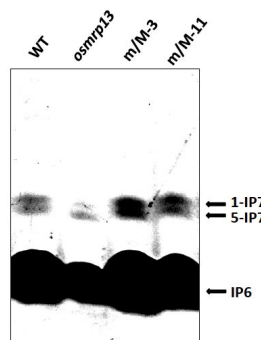


図 7. 低フィチン酸変異体(*osmrp13*)および高フィチン酸組換え体(m/M)種子における PP-IPs の検出

高フィチン酸組換え体

上述の *osmrp13* 変異体で *OsMRP13* 遺伝子を種子特異的に高発現させた組換え体を作出したところ、種子に含まれる IP6 量は 1.5 倍以上に増加した(図 5)。この組換え体を用いて発芽時の ABA 応答を調べたところ、発芽が大きく遅れ、ABA 感受性が高くなったことがわかった(図 6)。さらに、組換え体種子の PP-IPs 量を調べたところ、5-IP7 も 1-IP7 も大きく増加していることが明らかとなった(図 7)。

本実験で用いた *OsMRP13* 高発現体では種子特異的プロモーターを用いている。種子特異的に *OsMRP13* を高発現させても発芽の ABA 応答が大きく変化したことから、種子に蓄積された PP-IPs が発芽時の ABA 応答に重要な役割を担うことが示唆された。

以上のように、PP-IPs の合成・蓄積に関わると考えられる遺伝子の発現を変化させると、発芽の際の ABA 応答が変化することが明らかとなった。ABA 応答に変化の見られた *OsKCS1* 発現抑制体、*OsVIP1* 発現抑制体、および *osmrp13* 変異体の結果をまとめると表 1 のようになった。ABA 感受性と IP6, 5-IP7, および 1-IP7 量との関係を比較すると、1-IP7 量が少ないと ABA 感受性が低くなり、1-IP7 量が多いと ABA 感受性が高くなるという関係が成り立つことがわかる。一方、IP6 や 5-IP7 の量と ABA 感受性との間には、このような明瞭な関係性は見られない。

表1. 高次イノシトールリン酸とABA感受性との関係

	IP6	5-IP7	1-IP7	ABA感受性
WT	中	中	中	中
<i>OsKCS1anti</i>	中	低	高	高
<i>OsVIP1anti</i>	高	高	低	低
<i>osmrp13</i>	低	低	低	低
<i>osmrp13/OsMRP13</i>	高	高	高	高

本研究から、PP-IPs のうち、1-IP7 が ABA シグナリングに参与する可能性が高いことが初めて示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tagashira Y, Shimizu T, Miyamoto M, Nishida S, Yoshida KT, Overexpression of a gene involved in phytic acid biosynthesis substantially increases phytic acid and total phosphorus in rice seeds., *Plants*, 査読有, 4, 2015, 196-208

Kusuda H, Koga W, Kusano M, Oikawa A, Saito K, Hirai MY, Yoshida KT, Ectopic expression of *myo*-inositol-3-phosphate synthase induces a wide range of metabolic changes and confers salt tolerance in rice., *Plant Science*, 査読有, 232, 2015, 49-56, DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.12.009

〔学会発表〕(計 6 件)

海老勇吾、早川郷、高梨秀樹、吉田薫、ABA 応答におけるイノシトールピロリン酸の役割解明、日本育種学会、2016 年 9 月 24 日、鳥取大学(鳥取県鳥取市)

塩崎麻由、栗飯原ひとみ、楠田弘毅、吉田薫、イネにおけるイノシトール合成活性化による種子重増加機構の解明、日本植物細胞分子生物学会、2015 年 8 月 12 日、東京大学

(東京)

齊藤友美、田頭裕介、吉田薫、イネ培養細胞を用いたイノシトール六リン酸合成制御機構の解明、日本植物細胞分子生物学会、2015 年 8 月 11 日、東京大学(東京)

早川郷、森下直紀、北村嘉崇、吉田薫、イネにおけるイノシトールピロリン酸合成酵素遺伝子の機能解析、植物生理学会、2015 年 3 月 17 日、東京農業大学(東京)

臼井祐人、松原千恵、矢頭治、吉田薫、イネにおけるフィチン酸トランスポーター *OsABCC13* を介した新規リンホメオスタシス制御機構の解明、日本育種学会、2014 年 9 月 26 日、南九州大学(宮崎県、都城市)

早川郷、森下直紀、北村嘉崇、吉田薫、イネにおけるイノシトールピロリン酸の役割解明に向けて、イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2014、2014 年 7 月 11 日、東京大学(東京)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

○取得状況(計 件)

〔その他〕

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・教授

研究者番号：70183994

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者