

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04466

研究課題名(和文) 膜脂質層の分子的改変による、イオンストレスマルチ耐性植物の創生

研究課題名(英文) Making new tolerant plants by molecular modification of the lipid bilayer

研究代表者

我妻 忠雄 (WAGATSUMA, Tadao)

山形大学・農学部・客員教授

研究者番号：70007079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：Indicaは、Alによる膜脂質層内での隙間形成による膜透過性増大を阻止できない stigmasterolが著しく多いことが解った。pah1pah2シロイヌナズナはAl耐性が弱く、膜脂質成分がwild-typeとは異なった。HMGPAAHはCd耐性が向上した。HMGイネはAl耐性が向上する傾向だったが、さらに検討中である。PAHはイネのリンリサイクリングを促進し低リン耐性強化に貢献し、下位葉でのPL分解能の高さが、イネの低リン耐性を向上させることも解った。以上により、膜脂質層のsterolを増やしPLを減らすことが、イオンストレスマルチ耐性に重要であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Stigmasterol, non-effective sterol species for blocking membrane permeabilization, was found to be contained higher in popularly cultivated Al-sensitive Indica than Japonica cultivars. Higher expression of HMG encoding the key sterol biosynthetic HMGR, lower stigmasterol and lower transport of isopentenyl diphosphate, pivotal intermediate for sterol biosynthesis, to plastid are found to be beneficial for higher Al tolerance. PAH encoding phosphatidate phosphohydrolase (PAP) is known as a key gene to decrease phospholipid (PL). Membrane lipid composition of Al-sensitive pah1pah2 Arabidopsis is different from that of wild-type. HMGPAAH Arabidopsis line is more tolerant to Cd toxicity. Al tolerance of HMG rice lines is generally higher than wild-type, and further in detail investigation is continued. PAH is considered to contribute to the greater low-phosphorus (P) tolerance by enhancing the P-recycling. Higher hydrolyzing ability of PL in the lower leaves enhances low P tolerance of rice.

研究分野：農学

キーワード：イオンストレス ステロール 膜脂質再構成 HMG PAH

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界のコメ生産量の8割を占める *Indica* は、酸性土壌の重要な生育制限要因の一つであるアルミニウム (Al) 過剰害への耐性が *Japonica* よりも弱い、その理由は不明である。Al 耐性イネの創生は重要課題であるが成功していない。

(2) 酸性土壌に耐えるためには、Al 耐性にプラスして Ca、P などの養分不足や低 pH への耐性も必須であるが、現在このような視点での研究は皆無であり、養分吸収性の低さ、植物体中の至適養分濃度の低さ、一旦吸収した養分の体内での利用効率性の高さが重要である。我々はこれまでの研究で、膜ステロール (sterol) の増加・リン脂質 (PL) の低下で Al 耐性が向上することを明らかにした。sterol の増加には sterol 生合成経路の上流にある HMG (メバロン酸生成する HMG-CoA 還元酵素コード遺伝子)、PL の低下には PAH (ホスファチジン酸脱リン酸化酵素コード遺伝子) をそれぞれ過剰発現させるのが有効ではないかと予想した。

(3) これまでの研究で低リン耐性の強いイネ品種は、PL からガラクト脂質 (GL) への変換能が高いことが解り、低リン条件に適応するためのリンリサイクリング能には、PL から GL への再編が重要な鍵となっているものと考えられた。

2. 研究の目的

(1) 根細胞膜脂質の sterol を高め、PL 割合を低下させて、イネの Al 耐性を向上させること。

(2) HMG や PAH を過剰発現させた、種々のイオンストレスへのマルチ耐性を強化した植物を創生する。そのために、それら植物の各種表現型 (phenotype) を解析する。さらに、ノックダウンさせた植物との比較も行う。そ

のために、供試植物材料としては、イネのみではなくシロイヌナズナも用い、酸性複合ストレスへのマルチ耐性、各種重金属耐性、高 Na 耐性を解析すること。

(3) *Indica* と *Japonica* イネ品種間での Al 耐性比較、HMG 発現量の違いと Al 耐性との関係、sterol 種の違いと Al 耐性の関係を明らかにすること。

(4) リンリサイクリング能の低リン耐性への貢献度、低リン条件での phenotype 解析を行う。

(5) HMG や PAH を過剰発現もしくは遺伝子破壊したイネやシロイヌナズナを用い、低リン耐性が強化されるか否かを検証するとともに、これらの系統で見られる生理学的特性 (ストレス耐性、イオン吸収) や、分子生物学的な影響を調査すること。

(6) 低リン耐性の異なるイネ品種の地上部及び根部における脂質再構成機構の詳細をリピドーム解析により明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) *temperate japonica* と *Indica aus* のイネを Al 処理し、凍結乾燥根端 1 cm で、*OsHMG2*、*OsHMG3* の Real-time qRT-PCR を行った。凍結乾燥根端 1 cm の sterol を GC-MS で測定した。

(2) HMG、PAH 過剰発現体、それらの二重組換え体シロイヌナズナを 20~25 系統作製した。35 プロモーター過剰発現 *AtHMG* 組換えシロイヌナズナ T2、35 Promoter 過剰発現 *AtPAH* 遺伝子組換えシロイヌナズナ T2、*AtALMT1* Promoter : *AtHMG* 組換えシロイヌナズナ T2、CaMV 35S Promoter 及びリンゴ酸トランスporter *AtALMT1* Promoter を使用した。

(3) イネの過剰発現システムを用いた解析では、

野生株(コシヒカリ) vector control (NOS)、*PAH* 過剰発現系統(*PAH*)、*HMG* と *PAH* 両方の過剰発現系統(*HMGPAH*)を異なるリン濃度や AI での処理を行った。シロイヌナズナの過剰発現系統を用いた解析では、野生株(Col-0)、*HMG*、*PAH2*、*HMGPAH2*、*pah1pah2* 系統を無菌的に -P、+P の 1/2MS 培地で処理を行った。

(4) 低リン耐性の異なるイネ品種を低リン処理し、部位・葉位別のリピドーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) *temperate japonica* AI 感受性イネ品種は、暗所で根端での AI 集積が抑えられ、AI 耐性が向上した。根端の PL には差がなかった。AI 処理での膜脂質層内の隙間形成による透過性増大に対して抑止効果を有しない *stigmasterol* の増大は AI 耐性を弱くし、減少は強くすることが本研究で初めて明らかされた。また、従来不明であった *Indica* の著しい AI 感受性の理由は *stigmasterol* が多いためである可能性が初めて示唆された。*sitosterol* から *stigmasterol* への反応に関与する sterol-²²-desaturase をコードする *CYP710A1* への注目が将来期待される。*sterol* 生合成経路の上流にある鍵遺伝子 *HMG2*、*HMG3* の発現増大や、下流での *sterol* 生合成への鍵材料である *isopentenyl diphosphate* (IPP) の plastid への分配状態を知ることは、cytosol/ER-plastid 間での crosstalk を明らかに出来ると考えた。その結果、cytosol-plastid 間での IPP 輸送の制御も下流での *sterol* 生合成原料を増やし AI 耐性強化に貢献しているものと考えられ、今後の課題として指摘される。

(2) シロイヌナズナ *pah1pah2* は、培地-P 条件でのみ野生系統に比べて AI 感受性を示した。一方、AI 耐性は、*AtHMG*、*AtPAH*、*AtALMT1*Promoter:*HMGA**tALMT1*Promoter:*HMA*

G:PAH2 は WT との間に有意な差が認められなかったが、これは AI 応答性リンゴ酸分泌のためと思われた。アノテーションがついている 150 の脂質成分を用いた主成分分析の結果、第一主成分では *pah1pah2* はいずれの条件下でも他と大きく異なっていた。第二主成分では組換え体系間で差異がみられた。また、検出できた 80 の脂質成分で AI 応答性 (AI / コントロールの比) の主成分分析を行ったところ、組換え体系は Col-0 (WT) と *pah1pah2* と異なっていた。組換え系統における AI ストレスによる脂質成分変化の差異が示唆された。それらの脂質成分変化が前述した *AtALMT1* を含めた遺伝子の転写応答へ影響を及ぼすかどうかは今後の課題である。

(3) 過剰 Cd、Ni、Na、Cu、Mn 耐性及び低 Ca、低 pH 耐性についても同様に耐性試験を行った。その結果、*pah1pah2* は著しい Cd 感受性を示し、*HMG* 及び *PAH2* は、WT に比べて Cd 耐性を示した。これらは新規発見であり、脂質成分改変で作物に重要である Cd 耐性を獲得できたことは意義が大きく、イネ組換え体についても調査する必要がある。

(4) 作出を進めた多くのイネ *HMG* 過剰発現系統で AI 耐性の強化が認められたが、この耐性強化は常に見られるわけではなく、不安定な結果であった。遺伝子の過剰発現処理は、イネ自体の *HMG* 遺伝子発現には影響がなかった。*HMGR* の活性は *SnRK1* (sucrose non-fermenting-1-related protein kinase) への翻訳後修飾によって調整されるとの報告もあることから、過剰発現系統における *HMGR* 酵素活性の測定や *sterol* 合成の関連遺伝子群の発現量などの詳細を調査する必要があると考えられた。一方、全根伸長量を基準とした評価では AI 耐性差が認められた。今後は、このスクリーニング法の妥当性をさらに検証し、*sterol* 含量、*HMGR* 酵素等の活

性測定、sterol 合成に関わる他の遺伝子の発現量、根細胞プロトプラストの filipin 染色による sterol のイメージング等に研究を進展させたい。T2、T4 世代の PAH 系統の AI 耐性スクリーニングを行った結果、NOS 系統と比較して AI 耐性が高く、いくつかの系統では統計的に有意だった。また、リン欠乏で前処理することで、高ナトリウムあるいは高ニッケル条件下で栽培したコシヒカリの根ナトリウム、ニッケル含有率はリン十分条件下で前処理したものよりも有意に低下し、耐性も強化される傾向がみられた。AI だけではなく、これらの陽イオン過剰害に対する耐性も PL 割合を低下させることで強化されることが示唆される。これらの陽イオン耐性についても今後 PAH 過剰発現系統により確認したい。

(5) HMGPAH 過剰発現系統イネは、NOS 系統と比べて根の生育が +P、-P 区とも有意に低く、両遺伝子の過剰発現により根の生育が抑制される可能性が考えられた。PAH3、6 系統の 0 ppmP 区では地上部、根部ともリン濃度が有意に低かった。このことから、PAH 過剰発現は、リンのリサイクリングを促進する結果リン濃度を低下させ、低リン耐性の強化に寄与すると考えられた。

(6) シロイヌナズナの各系統は、+P 区では HMGPAH 過剰発現系統で、-P 区では PAH2 および HMGPAH 過剰発現系統で生育が高い傾向が示された。地上部リン濃度は、+P 区では系統間で有意差は見られないが、-P 区では PAH2 過剰発現によるリン濃度の低下が示唆された。培地に添加した sucrose によって激しいリン欠乏症状が生じたものと推察され、PAH 遺伝子が動物と同様に lipin としてシグナル伝達に関与し、PL を減らすだけでなく脂質代謝全体の調節に関わっている可能性が示唆された。

(7) 低リン耐性の異なるイネ品種は、P0 区では PL クラスが減少し、非 PL クラスは増加した。耐性の強い赤米の P0 区/P8 区は非 PL は他品種よりも高く、PL では低かった。+P 区に比較して -P 区での非 PL のグルクロノシルグリセロールの増加割合は、赤米で高かった。赤米は、非 PL のジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG)、モノ GDG、スルフォキノボシル DG、非極性脂質のトリアシルグリセロールが、-P 区でいずれも +P 区よりも増加し、その割合は上位葉で下位葉よりも高かった。一方、各種の PL クラスの傾向は、上記と逆であった。これらの結果から、脂質の再構成を行う割合にイネ品種間差が確認され、赤米の低リン耐性の高さには、脂質の再構成を行う能力の高さが寄与し、赤米は、下位葉ではより多くの PL を分解し、上位葉ではより多くの非 PL を合成して、脂質の再構成を行うことにより体内におけるリンの利用効率を高めていると示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計15件)

Dissanayaka, D.M.S.B., Plaxton, W.C., Lambers, H., Siebers, M., Marambe, B., Wasaki, J. Molecular mechanisms underpinning phosphorus-use efficiency in rice. Plant Cell Environ. 査読有. 2018. (in press). DOI: 10.1111/pce.13191

Tawaraya, K., Honda, S., Cheng, W., Chuba, M., Okazaki, Y. (他5名) Ancient rice cultivar extensively replaces phospholipids with non-phosphorus glycolipid under phosphorus deficiency. Physiol plant. 査読有. 2018. (in press). doi/abs/10.1111/pp1.12699

Nishida, S., Dissanayaka, D.M.S.B., Honda, S., Tateishi, Y., Chuba, M., Maruyama, H., Tawaraya, K., Wasaki, J. Identification of genomic regions associated with low phosphorus tolerance

in Japonica rice (*Oryza sativa* L.) by QTL-Seq. *Soil Sci Plant Nutr.* 査読有.2018. (in press). DOI.10.1080/00380768.2017.1412238

Wagatsuma, T., Maejima, E., Watanabe, T., Toyomasu, T., Kuroda, M. (他9名) Dark conditions enhance aluminum tolerance in several rice cultivars via multiple modulations of membrane sterols. *J Exp Bot.* 査読有. 69. 2018. 567-577. doi:10.1093/jxb/erx414

Wagatsuma, T. The membrane lipid bilayer as a regulated barrier to cope with detrimental ionic conditions: making new tolerant plant lines with altered membrane lipid bilayer. *Soil Sci Plant Nutr.* 査読有.63. 2017. 507-516.

<https://doi.org/10.1080/00380768.2017.1369362>

Maejima, E., Osaki, M., Wagatsuma, T., Watanabe, T. Contribution of constitutive characteristics of lipids and phenolics in roots of tree species in Myrtales to aluminum tolerance. *Physiol Plant.* 査読有.160. 2017. 11-20. doi:10.1111/ppl.12527

[学会発表] (計28件)

Maejima, E., Hiradate, S., Osaki, M., Wagatsuma, T., Watanabe, T., Characteristics of phenolics in root cells of Al-tolerant woody plants. *Plant Biology Europe EPSO/FESP2016 Congress.* June 26-30. 2016. Prague (Czech Republic)

Wagatsuma, T. Significant role of the plasma membrane (PM) lipid bilayers in aluminum (Al) tolerance of plants. IX International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH. Oct, 18-23. 2015. Dubrovnik (Croatia)

[図書] (計2件)

Maruyama, H., Wasaki, J. Academic Press, London, UK. Transgenic approaches for improving phosphorus use efficiency in plants. *In Plant Macro-Nutrient Use Efficiency: Molecular and Genomic Perspectives.* 2017. 323-338. ISBN 978-0-12-811308-0

Wagatsuma, T., Maejima, E., Watanabe, T., Khan, M.S.H., Ishikawa, S. Springer, Cham Heidelberg, Switzerland. Significant role of the plasma membrane lipid bilayers in aluminum tolerance of plants. 2015. 99-124. ISBN 978-3-319-19967-2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

我妻忠雄 (WAGATSUMA, Tadao)

山形大学・農学部・名誉教授

研究者番号：70007079

(2) 研究分担者

俵谷圭太郎 (TAWARAYA, Keitarou)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：70179919

和崎 淳 (WASAKI, Jun)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：00374728

渡部 敏裕 (WATANABE, Toshihiro)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：60360939

小林 佑理子 (KOBAYASHI, Yuriko)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：40610952

丸山 隼人 (MARUYAMA, Hayato)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：10633951

(3) 連携研究者

小山 博之 (KOYAMA, Hiroyuki)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：90234921

黒田 昌治 (KURODA, Masaharu)
国立研究開発法人・中央農業総合研究
センター・主任研究員
研究者番号：30355581

岡咲 洋三 (OKAZAKI, Youzou)
三重大学大学院・生物資源学研究科・
准教授
研究者番号：50469897