

令和元年6月18日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20953

研究課題名(和文) ワイドターゲットメタボロミクスを基盤とした植物のシュウ酸蓄積分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of plant oxalate accumulation on the basis of wide targeted metabolomics

研究代表者

宮城 敦子 (Atsuko, Miyagi)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：00645971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多くの植物に含まれるシュウ酸はヒトや家畜の有害物質である。しかしながら、植物のシュウ酸蓄積機構については不明点が多い。そこで、本研究では植物のシュウ酸蓄積機構を明らかにするため、イネにおけるメタボローム解析と分子遺伝学的手法を用いた解析を行った。その結果、イソクエン酸リアーゼ(ICL)が水没時の葉におけるイネのシュウ酸蓄積に關与する可能性が示唆された。また、イオンビーム照射イネから選抜した低シュウ酸個体では、一部の有機酸含有量の低下により低シュウ酸化したことが示された。さらに、コシヒカリとタカナリとでシュウ酸含有量が著しく異なり、この品種間差が特定の染色体部分領域に基づくことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物のシュウ酸合成に関わる遺伝子の1つであるICLの機能解明が進んだ。また、品種間でシュウ酸含有量が著しく異なる品種が見出され、環境要因に左右されないことも明らかになった。これらの染色体部分置換システムを用いた解析を行えば、シュウ酸蓄積に寄与する、ICL以外の遺伝子についての特定が期待できる。さらに、イオンビーム照射イネ系統から見出された低シュウ酸イネ個体において、その次世代の中からも低シュウ酸形質を示すものが得られたことから、放射線育種による低シュウ酸イネの作出に近づいた。これらの知見は、稲わらのほか、ホウレンソウなどの高シュウ酸作物の品質向上につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Oxalate is accumulated in leaves of various plant species. Excess uptake of oxalate is harmful for human and livestock. However, the mechanism of oxalate accumulation remains unknown. To elucidate the mechanism of oxalate accumulation in rice, metabolome and molecular genetic analysis were performed. The results showed that isocitrate lyase (ICL) might involve in oxalate synthesis in the submerged leaves. Metabolome analysis of low oxalate-plants obtained from ion beam-irradiated rice revealed that the decrease of other organic acids would lead low oxalate content. Moreover, it was found that oxalate content in Takanari leaves is markedly lower than those in Koshihikari ones, suggesting that the difference of oxalate content between two cultivars is caused by particular chromosomal region.

研究分野：農芸化学

キーワード：シュウ酸 イネ メタボローム解析 CE-QQQ-MS ICL 染色体部分置換系統

1. 研究開始当初の背景

植物において、シュウ酸 (Oxalate) は被食防御や酸性土壌中の Al イオンの解毒に役立つだけでなく、過酸化水素に代謝されることでストレス応答や病害抵抗性に寄与するなど、有益な生理活性物質である。しかしながら、ヒトや家畜など哺乳類にとって、シュウ酸は尿路結石やミネラル不足などの重篤な症状を引き起こす毒物である。そのため、シュウ酸は多くの植物に普遍的に存在するため、作物や飼料の低シュウ酸化は農業上の課題となっている。これまでに、植物のシュウ酸合成経路として3つの経路 (イソクエン酸経路、グリコール酸経路、アスコルビン酸経路) が複数の植物において報告されているものの、いずれの経路が可溶性シュウ酸の蓄積に寄与するかは不明であり、分子育種技術を利用した低シュウ酸化作物の作出には至っていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題ではモデル植物として遺伝学的基盤が整備されており、葉にシュウ酸を乾重量の5%程度まで蓄積することのあるイネを材料として、遺伝子 (座) レベルでのシュウ酸蓄積機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

まず、シュウ酸蓄積への関与が示唆されているイソクエン酸経路の主要酵素イソクエン酸リアーゼ (ICL) のシュウ酸蓄積への影響を明らかにするために、ICL の機能解析を行った。次に、イネの重イオンビーム照射イネ系統から得られた低シュウ酸イネやさまざまなイネ品種を用いて、メタボロームおよびゲノム比較解析を行うことにより、ICL 以外のシュウ酸蓄積に関与する新規遺伝子 (座) の特定を目指した。

4. 研究成果

4 - 1. ICL の機能解析

シュウ酸蓄積への関与を明らかにする一環で、ICL の機能解析を行った。まず、ICL の局在を明らかにするため、*ICL promoter-GUS* イネ系統を作成し、GUS 染色を行った。その結果、定常状態の葉では染色が見られなかったものの、暗所や水没時の葉で発現が確認できた (図 1A, B)。このことから、ICL は暗所や水没時の葉におけるシュウ酸蓄積に関与している可能性が示された。今後、シュウ酸含有量を検証し、暗所及び水没時におけるシュウ酸蓄積への ICL の寄与を検証する必要がある。

また、乾燥種子においても発現が確認でき、顕微鏡観察によりアリューロン層 (糊粉層) でのみ発現することが明らかになった (図 1C, D)。種子ではシュウ酸の蓄積は認められないが、アリューロン層に蓄積する脂質からの糖新生過程に ICL が関与しているためと考えられる。さらに、吸水後においては6時間目までの物理的吸水期では吸水前と同様にアリューロン層での ICL の発現が観察されたが、12時間目以降 (発芽準備期以降) では ICL の発現が見られなくなることが明らかとなった。このことは、物理的吸水期まではアリューロン層に蓄積する脂質から糖を得てエネルギー源としているのに対し、発芽準備期にはアミラーゼが活性化しデンプンの利用が可能になり、脂質からの糖新生が不要になるためと考えられる。

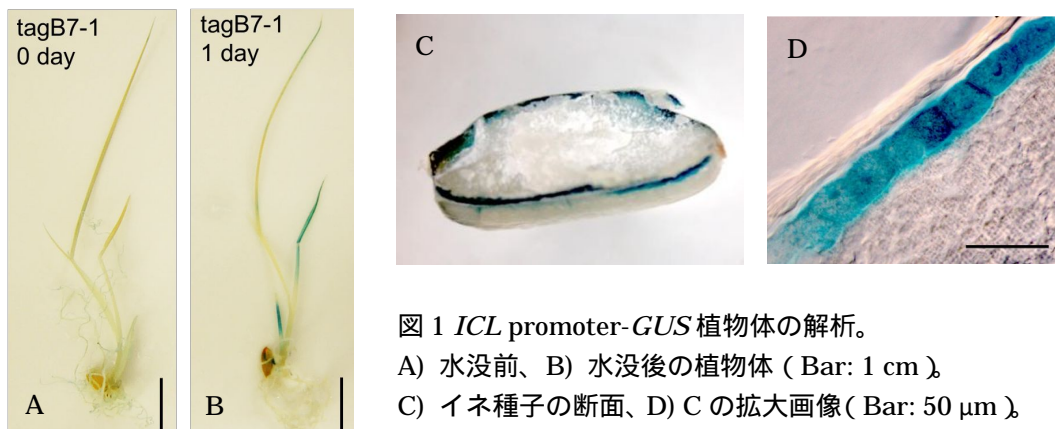


図 1 *ICL promoter-GUS* 植物体の解析。

A) 水没前、B) 水没後の植物体 (Bar: 1 cm)

C) イネ種子の断面、D) C の拡大画像 (Bar: 50 μ m)

4 - 2 . イオンビーム照射イネ系統の解析

シュウ酸蓄積に寄与する代謝経路を特定するため、イオンビーム照射イネ系統（コシヒカリ背景）から得られた低シュウ酸イネ系統（M2 世代）の解析を行った。スクリーニングによって得られた低シュウ酸個体において、キャピラリー電気泳動 - トリプル四重極型質量分析装置（CE-QQQ-MS）を用いたメタボローム解析を行った。その結果、イオンビーム照射個体における葉のシュウ酸含有量の低下が、一部の有機酸含有量の減少によるものと、シュウ酸周辺の有機酸が減少しアミノ酸が増加したことによるものの2パターンに分類されることが明らかになった（図2）。前者（Cluster 1）では全体的に代謝が滞ったためにシュウ酸含有量も低下したのに対し、後者（Cluster 2）では非照射個体ではシュウ酸に使われていた炭素源がアミノ酸など他の代謝物に使用されているものと考えられる。

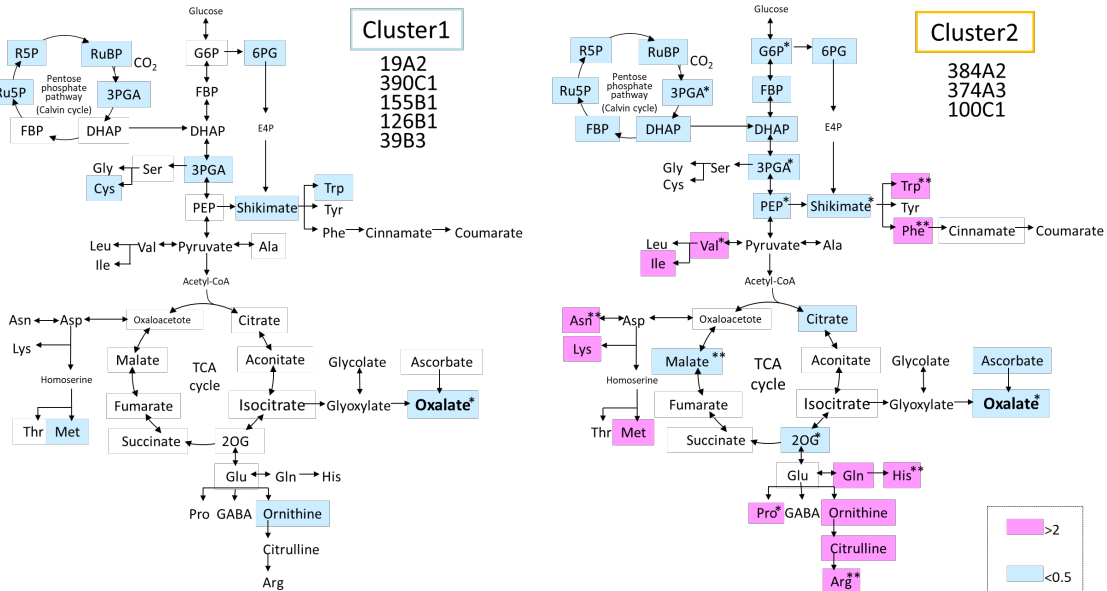


図2 低シュウ酸イネ（M2 世代）の代謝物パターン。
非照射個体と比較して含有量が2倍以上の代謝物をピンク、1/2以下の代謝物をブルーで示す。

これらの低シュウ酸イネの後代でも低シュウ酸形質が維持されているか否かを検証するため、シュウ酸含有量を測定した。その結果、後代においても野生型と同様に成長しシュウ酸含有量が6割まで低下している個体が見出された（図3）。このことから、イオンビームの種子照射系統では成長を損なわず6割程度まで低シュウ酸化系統を得ることが可能なことが示唆された。

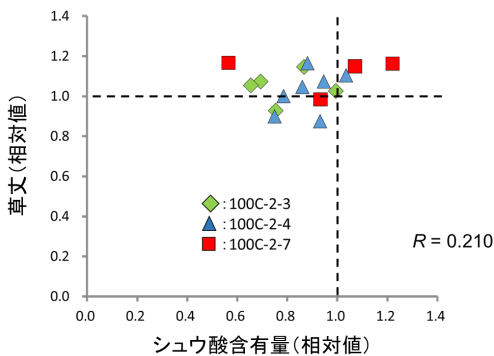


図3 低シュウ酸個体の後代（M3 世代）におけるシュウ酸含有量と草丈。
非照射個体（コシヒカリ）の平均値を1とした時のシュウ酸含有量および草丈を示す。

4 - 3 . イネ品種間比較解析

ICL 以外のシュウ酸蓄積に関与する新規遺伝子（座）を特定するため、シュウ酸含有量の品種間差を利用したゲノム比較解析に着目した。シュウ酸含有量が異なる品種を探索する一環で、コシヒカリとタカナリの葉におけるシュウ酸含有量を CE-QQQ-MS で測定した。この2品種の葉のシュウ酸含有量を比較したところ、タカナリではコシヒカリの1/10から1/4程度までシュウ酸含有量が少ないことが明らかになった。さらに、これらの品種間差がCO₂濃度の上昇や水地温加温などの環境要因によらず、遺伝的背景の違いによることが示された（図4、Miyagi et al., Plant Production Science, 2019）。

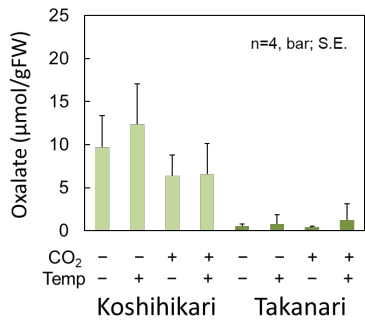


図 4 高 CO₂ 処理や水地温加温処理時のコシヒカリおよびタカナリの葉におけるシュウ酸含有量の比較。2013 年度につくばみらい FACE (開放系大気 CO₂ 増加) 実験施設にて育成した穂ばらみ期 (7 月下旬) の植物体の葉から代謝物抽出を行い、CE-QQQ-MS を用いてシュウ酸含有量を測定した。

この 2 品種の代謝的特徴を明らかにするため、CE-QQQ-MS を用いたメタローム解析を行った。代謝物データを用いた多変量解析の結果、コシヒカリに比べてタカナリではシュウ酸周辺代謝物であるクエン酸やアスコルビン酸などの有機酸含有量が少なく、逆にアミノ酸を高蓄積していることが示された (図 5)。

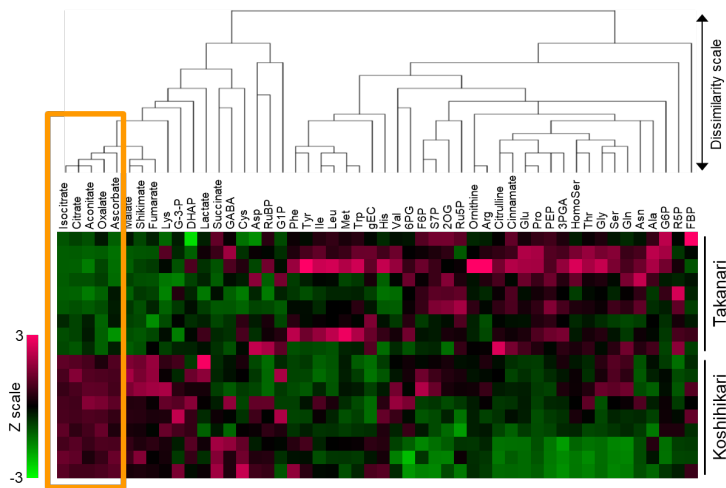


図 5 コシヒカリおよびタカナリの葉における一次代謝物比較。

2016 年度の東京農工大学 FM 本町にて育成した出穂期 (8 月上旬) のイネの葉から代謝物抽出を行い、CE-QQQ-MS を用いてシュウ酸含有量を測定した。得られた代謝物データを Z 値で正規化し SPSS (IBM) を用いて階層的クラスタ解析を行い、ヒートマップを作製した。

さらに、シュウ酸蓄積に寄与する、2 品種の染色体断片置換系統 (80 CSSLs) において、シュウ酸含有量を測定した。その結果、シュウ酸含有量が親品種と異なる複数の正逆染色体置換領域を見出し、シュウ酸に影響を及ぼす 5 か所の染色体領域を特定することが出来た (図 6)。中でも、第 9 番および 11 番染色体の後部の 2 か所がシュウ酸含有量に強く影響を及ぼす染色体領域であることが明らかとなった。今後、これらの領域に含まれる遺伝子の比較解析を行うことにより、シュウ酸蓄積に寄与する遺伝子 (座) の特定が期待できる。

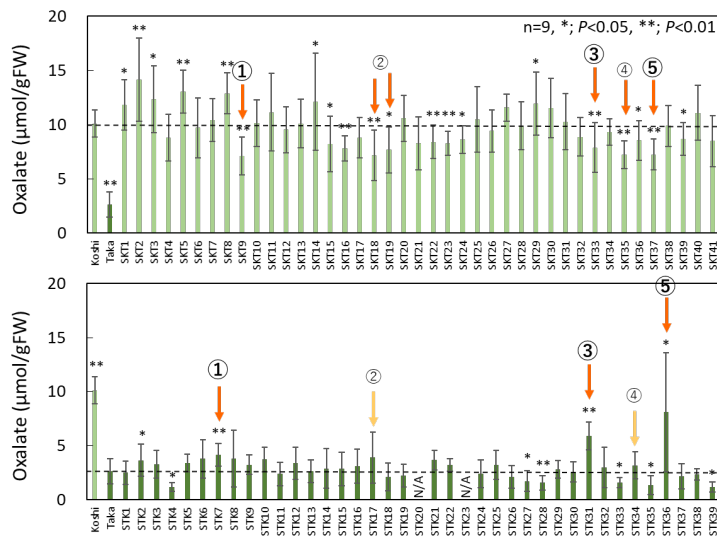


図 6 コシヒカリおよびタカナリの正逆染色体断片置換系統 (80 CSSLs) の葉におけるシュウ酸含有量。

2016 年度の東京農工大学 FM 本町の圃場にて育成した出穂期 (8 月上旬) のイネの止葉におけるシュウ酸含有量を CE-QQQ-MS を用いて測定した。黄緑がコシヒカリ背景、緑がタカナリ背景の染色体部分置換系統を示す。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)(いずれも査読有)

1. **A. Miyagi**, K. Noguchi, T. Tokida, Y. Usui, H. Nakamura, H. Sakai, T. Hasegawa, M. Kawai-Yamada. "Oxalate contents in leaves of two rice cultivars grown at a free-air CO₂ enrichment (FACE) site." *Plant Production Science*, in press. (2019)
<https://doi.org/10.1080/1343943X.2019.1598272>
2. Y. Ishikawa, **A. Miyagi**, T. Ishikawa, M. Nagano, M. Yamaguchi, Y. Hihara, Y. Kaneko, M. Kawai-Yamada. "One of the NAD kinases, sll1415, is required for the glucose metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803." *the Plant Journal*, 98 (4): 654-666. (2019)
<https://doi.org/10.1111/tpj.14262>
3. M. Parveen, **A. Miyagi**, M. Kawai-Yamada, Md H. Rashid, T. Asaeda. "Metabolic and biochemical responses of *Potamogeton anguillanus* Koidz. (Potamogetonaceae) to low oxygen conditions." *Journal of Plant Physiology*, 232: 171-179. (2019)
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.11.023>
4. **A. Miyagi**†, S. Kitano†, Y. Oono, Y. Hase, I. Narumi, H. Uchimiya, M. Kawai-Yamada. "Evaluation of metabolic changes in oxalate-rich plant *Rumex obtusifolius* L. caused by ion beam irradiation." *Plant Physiology and Biochemistry*, 122: 40-45. (2018) †, equally contribution <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.001>
5. Y. Kodama, A. Kawahara, **A. Miyagi**, T. Ishikawa, M. Kawai-Yamada, Y. Kaneko, Y. Takimura, Y. Hihara. "Effects of inactivation of the cyAbrB2 transcription factor together with glycogen synthesis on cellular metabolism and free fatty acid production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Biotechnology and Bioengineering*, 115(12): 2974-2985. (2018) <https://doi.org/10.1002/bit.26842>
6. S.-N. Hashida, **A. Miyagi**, M. Nishiyama, K. Yoshida, T. Hisabori, M. Kawai-Yamada. "Ferredoxin/ thioredoxin system plays an important role in the chloroplastic NADP status of Arabidopsis." *the Plant Journal*, 95(6): 947-960. (2018)
<https://doi.org/10.1111/tpj.14000>
7. K. Noguchi, T. Tsunoda, **A. Miyagi**, M. Kawai-Yamada, D. Sugiura, S.-I. Miyazawa, T. Tokida, Y. Usui, H. Nakamura, H. Sakai, T. Hasegawa. "Effects of elevated atmospheric CO₂ on respiratory rates in mature leaves of two rice cultivars grown at a free-air CO₂ enrichment site and analyses of the underlying mechanisms." *Plant and Cell Physiology*, 59(3): 637-649. (2018) <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy017>
8. **A. Miyagi**, H. Uchimiya, M. Kawai-Yamada. "Synergistic effects of light quality, carbon dioxide and nutrients on metabolite compositions of head lettuce under artificial growth conditions mimicking a plant factory." *Food Chemistry*, 218(1): 561-568. (2017)
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.102>
9. M. Sato, **A. Miyagi**, S. Yoneyama, S. Gisusi, Y. Tokuji, M. Kawai-Yamada. "CE-MS-based metabolomics reveals the metabolic profile of maitake mushroom (*Grifola frondosa*) strains with different cultivation characteristics." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81 (12): 2314-2322. (2017)
<https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1387049>
10. Y. Ishikawa, **A. Miyagi**, Y. Haishima, T. Ishikawa, M. Nagano, M. Yamaguchi, M. Kawai-Yamada. "Metabolomic analysis of NAD kinase-deficient mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Journal of Plant Physiology*, 205: 105-112. (2016) <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.09.002>

〔学会発表〕(計 14 件)

1. **宮城 敦子**, 安達 俊輔, 大川 泰一郎, 川合 真紀. イネ品種間差を利用したメタボローム解析によるシュウ酸蓄積機構の解明. 第 60 回日本植物生理学会年会, 名古屋, 2019 年.
2. 【招待講演】**宮城 敦子**. メタボローム解析から探るイネのシュウ酸代謝機構. 第 12 回メタボロームシンポジウム, 鶴岡, 2018 年.
3. **宮城 敦子**, 西丸 拓也, 尾崎 莉沙子, 石川 寿樹, 山口 雅利, 川合 真紀. イネにおけるイソクエン酸リアーゼ (ICL) における生理機能解析. 日本植物学会第 82 回大会, 広島, 2018 年.
4. 【国際学会】**A. Miyagi**, T. Saimaru, N. Harigai, T. Ishikawa, M. Yamaguchi, M.

Kawai-Yamada. Screening of low oxalate rice plants from ion beam-irradiated seeds. 16th International Symposium on Rice Functional Genomics, Tokyo, Japan, 2018.

- 5 .宮城 敦子、安達 俊輔、野口 航、常田 岳志、臼井 靖浩、中村 浩史、酒井 英光、長谷川 利拓、山本 敏夫、大川 泰一郎、川合 真紀 . イネにおける染色体部分置換がシュウ酸蓄積に及ぼす影響 . 第 36 回日本植物細胞分子生物学会大会、金沢、2018 年 .
- 6 .【国際学会】A. Miyagi, Sayaka Kitano, Yutaka Oono, Yoshihiro Hase, Issay Narumi, Masatoshi Yamaguchi, Maki Kawai-Yamada. Impact of ion beam-irradiation on metabolisms in oxalate rich plant. Plant Biology 2018, Montreal, Canada, 2018.
- 7 .宮城 敦子、安達 俊輔、野口 航、常田 岳志、臼井 靖浩、中村 浩史、酒井 英光、長谷川 利拓、山本 敏夫、大川 泰一郎、川合 真紀 . シュウ酸蓄積機構におけるイネ品種間の代謝比較解析 . 第 59 回日本植物生理学会年会、札幌、2018 年 .
- 8 .宮城 敦子、安達 俊輔、野口 航、常田 岳志、臼井 靖浩、中村 浩史、酒井 英光、長谷川 利拓、山本 敏夫、大川 泰一郎、川合 真紀 . イネ品種間差を利用したシュウ酸蓄積機構の解明 . メタボロームシンポジウム、大阪、2017 年 .
- 9 .宮城 敦子、西丸 拓也、針谷 のぞみ、大野 豊、長谷 純宏、長野 稔、石川 寿樹、山口 雅利、川合 真紀 . イネにおける ICL の機能解析 . 日本植物学会第 81 回大会、野田、2017 年 .
- 10 .宮城 敦子、西丸 拓也、針谷 のぞみ、大野 豊、長谷 純宏、長野 稔、石川 寿樹、山口 雅利、川合 真紀 . イオンビーム育種による低シュウ酸イネの作出 . 第 35 回日本植物細胞分子生物学会大会、さいたま、2017 年 .
- 11 .【国際学会】A. Miyagi, M. Kawai-Yamada. Impacts of high CO₂ and nutrients to the metabolic pathway of oxalate rich plant. Metabolomics 2017, Brisbane, Australia, 2017.
- 12 .宮城 敦子、西丸 拓也、針谷 のぞみ、尾崎 莉沙子、大野 豊、長谷 純宏、長野 稔、石川 寿樹、山口 雅利、川合 真紀 . イネにおけるシュウ酸蓄積機構の解析 . 第 58 回日本植物生理学会年会、鹿児島、2017 年 .
- 13 .宮城 敦子、橋田 慎之介、川合 真紀 . 根圏の Al が高シュウ酸植物に及ぼす影響 . 日本植物学会第 80 回大会、那覇、2016 年 .
- 14 .宮城 敦子、西丸 拓也、大野 豊、長谷 純宏、川合 真紀 . イオンビーム照射イネ系統におけるメタボローム解析 . 第 34 回日本植物細胞分子生物学会大会、上田、2016 年 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 : なし

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 川合 真紀、山口 雅利、石川 寿樹、長野 稔、大野 豊、長谷 純宏、大川 泰一郎、安達 俊輔、野口 航、常田 岳志、臼井 靖浩、中村 浩史、酒井 英光、長谷川 利拓、山本 敏夫

ローマ字氏名 : Maki Kawai-Yamada, Masatoshi Yamaguchi, Toshiki Ishikawa, Minoru Nagano, Yutaka Oono, Yoshihiro Hase, Taiichiro Ookawa, Shunsuke Adachi, Ko Noguchi, Takeshi Tokida, Yasuhiro Usui, Hirofumi Nakamura, Hidemitsu Sakai, Toshihiro Hasegawa, Toshio Yamamoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。