

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292038

研究課題名(和文) 基幹的代謝の最適化に基づくオオムギの鉄欠乏適応機構の解明

研究課題名(英文) Adaptive mechanisms for Fe deficiency based on optimization of primary metabolism in barley

研究代表者

樋口 恭子 (Higuchi, Kyoko)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：60339091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：鉄欠乏になると若い葉で光合成速度が顕著に低下するが、鉄欠乏に強いオオムギ品種では若い葉でSnRK1リン酸化酵素複合体の活性を上昇させ、代謝を同化から異化へ傾けてエネルギーレベルを維持していることが分かった。若い葉の異化の基質となる炭素源は成熟した葉で行われる光合成による一次同化産物ではなく、成熟した葉の多糖やタンパク質の分解産物に依存しており、鉄欠乏に強いオオムギ品種では成熟葉の老化を促進して炭素源を若い葉に転流させていた。

研究成果の概要(英文)：Newly emerged chlorotic leaves are heterotrophic, and older leaves simultaneously conduct photosynthesis, catabolism, and translocation of C and N to chlorotic leaves in Fe-deficient barley. We have focused on SnRK1 which promotes catabolism and suppresses anabolism under stress conditions generally. mRNA accumulation, in vitro activity, and in vivo activity of SnRK1 increased in chlorotic leaves of Ehimehadaka No.1, but not in chlorotic leaves of Shirohadaka, an Fe-deficiency susceptible cultivar. The balance of energy metabolism may contribute to the slow but steady growth of new leaves under the Fe-deficient condition. We have reported that the allocation of assimilates from older leaves to the roots and younger leaves contributes to the adaptation of barley to Fe deficiency that accompanies early senescence in older leaves. Fe-deficient barley may translocate metabolites derived from the catabolism of organic compounds that have been assimilated in older leaves.

研究分野：植物栄養学

キーワード：鉄欠乏 オオムギ 一次代謝 SnRK1 転流

1. 研究開始当初の背景

必須元素の供給量が制限された植物の応答は、(1) 根系とイオン輸送体を強化し低濃度の土壤水からも効率よく吸収する、あるいは根圏に働きかけ吸収しにくい化学形態から吸収しやすい化学形態へと変換して、十分な吸収量を維持する、(2) 植物体内の必須元素の濃度が低下した状態でも同化・成長を継続できるように「基幹的代謝」を最適化する、という2つの戦略に分けて考えることができる。実際の植物はこの2つの機能を同時に働かせていると思われるが、これまで要素欠乏耐性の研究の多くは(1)に関して行われてきた。これに対し研究代表者は、鉄欠乏に強いオオムギの体内鉄含有率は鉄欠乏に弱い植物に比べて決して高くはないことに注目し(Maruyama et al. 2005 Soil Science and Plant Nutrition)、オオムギは鉄欠乏にさらされると、光化学系の機能不全を最小限に抑えること(Saito et al. 2010 Plant and Cell Physiology)、チラコイド膜に優先的に鉄を配分すること(Mikami et al. 2011 Plant Physiology and Biochemistry)、同化能力の低下に適應して下位葉の老化を促進し植物体全体で炭素・窒素の代謝を再調整すること(Higuchi et al. 2011 Soil Science and Plant Nutrition)を明らかにし、オオムギは(2)の機能が優れていることを示してきた。オオムギは(1)の機能、すなわち鉄キレターであるムギネ酸により不溶態の鉄を可溶化して吸収する能力に優れていることが良く知られているが、これは同化産物をムギネ酸として大量に放出し、その分泌と再吸収にも大きなエネルギーを費やすことを意味している。したがって(1)に関しても代謝の最適化は不可欠である。

上述したオオムギの鉄欠乏適應機構の全容を明らかにするためには、個体レベルの代謝の最適化とそれを支える各器官の細胞レベルの代謝調節の両方から研究を進める必要がある。鉄は植物体内で転流しにくく下位葉に蓄積する元素であるため根からの鉄吸収量が低下すると特に若い上位葉の同化能力が低下する。これを補うため、古い下位葉の老化が促進され、同化産物が根や上位葉といったシンク器官に転流すること、鉄欠乏に弱いイネではそのような転流の変化は起こらないことを、研究代表者は明らかにしつつある。さらに、オオムギの、より下位の葉に由来する炭素が優先的に根から根外に分泌されることも分かってきた。従って各個葉の代謝経路の分子レベルの調節が植物個体全体に対してどのような生理的意味をもつのかを念頭に置きながら研究を進める。

2. 研究の目的

(1) 栄養成長期のオオムギは約4日に1枚の速度で新しい葉を展開させるため、鉄欠乏時にどこからどこへ同化産物が転流するのかを解明するためには時間分解能と空間分

解能に優れたトレーサー実験を行う必要がある。そこで栄養元素を非破壊で可視化できる PETIS (Positron Emitting Tracer Imaging System)を採用し、短半減期の放射性核種である¹¹Cをトレーサーとして用いて、どこで同化されたものがどのくらいの速度でどこへ転流するのか、その動態が鉄欠乏によりどのように変化するのかを定量的に評価する。

(2) 同化産物の転流元である下位葉では同化を継続しつつ同化産物を分解して篩管へ放出するという、高度に制御された老化が進行する必要がある。真核細胞において栄養・エネルギーの供給に応じて代謝と成長を制御する SnRK1 キナーゼ複合体(酵母では SNF1、動物では AMPK)の調節サブユニットをコードする遺伝子群の発現が鉄欠乏オオムギ葉で誘導されること、老化の開始に必要で SnRK1 の活性を抑制するトレハロース 6-リン酸の含量が鉄欠乏オオムギ下位葉で増加することを、研究代表者は見出した。また、葉齢の進行とともに発現が増加するオオムギ特有の配列を持つ機能未知のレセプター様キナーゼの発現が、鉄欠乏により下位葉で早期に誘導されることも分かってきた。オオムギの栄養器官におけるこれら分子の解析例は極めて少ないため、これら分子の詳細な発現パターンの解析を進めるとともに全長クローニングを行い、シグナル伝達分子としての機能の解析を進める。

以上の解析から適應機構の制御系の中でも鉄欠乏に対する貢献度が高いと思われる段階を絞り込み、関連分子を鉄欠乏に弱い作物に導入し、形質転換体の同化産物転流がどのように変化するかを検証する。鍵となる代謝・成長制御系の分子を用いて、実際に鉄欠乏に適應できる作物の育成を目指す。

3. 研究の方法

(1) トレーサーによる同化産物の分配先の特定

安定同位体¹³C標識の炭酸ガスを投与し、同化された炭素が約2週間に渡ってどの部位に再転流し分配されるかを解析する。

1枚の葉に¹¹C(半減期20分)標識の炭酸ガスを投与し、同化直後の炭素の分配先と転流量を解析する。

安定同位体¹⁵N標識の硝酸イオンを水耕液に投与し、同化された窒素が約2週間に渡ってどの部位に再転流し分配されるかを解析する。

(2) 代謝の制御系

SnRK1複合体遺伝子の全長クローニング
シロイヌナズナは調節サブユニットとして3つの SnRK1₁、SnRK1₂、2つの SnRK1₃を持つ。オオムギが全部で何個の調節サブユニットを持つのかは不明であるため、保存性の高い配列を元に鉄欠乏オオムギの各部位で発現している SnRK1 遺伝子群をクローニングする。

SnRK1 活性の変動

鉄欠乏時の各葉位における SnRK1 複合体のリン酸化活性を経時的に定量し、下位葉における制御された老化との関連、上位葉における同化・成長速度の制御との関連を考察する。

鉄欠乏下位葉誘導性レセプター様キナーゼ遺伝子群の全長クローニング

オオムギ固有の配列を持ち、下位葉で鉄欠乏により発現が誘導されるレセプター様キナーゼ遺伝子が、少なくとも3つあることが分かっている。これら遺伝子の全長をクローニングする。

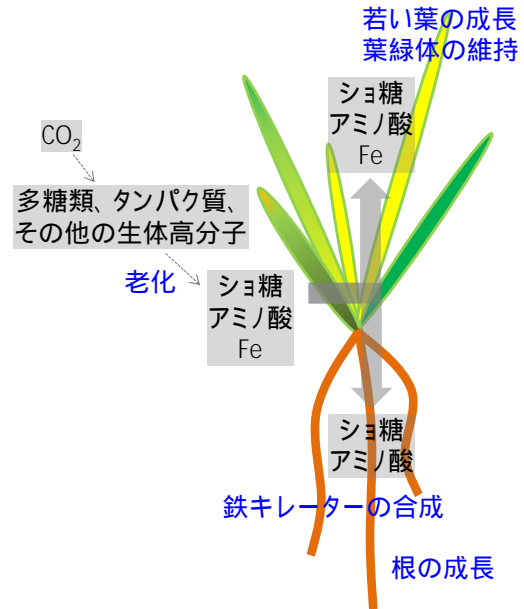
4. 研究成果

(1) 同化産物の分配

まず、下位葉の老化促進が鉄欠乏耐性に寄与する可能性を調べるため、鉄欠乏に強い品種エヒメハダカ No.1、弱い品種シロハダカ No.1 とカイリヨウオオガラの下位葉の C/N 比を調べた。一般に老化が始まるとタンパク質などが分解され窒素が他の部位に転流してセルロースは残るため C/N 比が上昇する。鉄欠乏によりエヒメハダカ No.1 の下位葉では C/N 比が大きく上昇したが、弱い品種では上昇幅は小さかったことから、鉄欠乏耐性と鉄欠乏時の葉の老化促進には関連があることが示唆された。

そこで下位葉から転流した炭素や窒素はどこで使われるのかを推定するため、安定同位体 ^{13}C 標識の炭酸ガスを投与し、経日的に植物の各部位を採取してそこに含まれる ^{13}C の濃度を測定した。その結果、下位葉に同化された炭素は鉄欠乏になると下位葉から転流し、主に根と根から分泌される分泌物に対して1週間から2週間にわたって分配されることが分かった。一方、 ^{11}C (半減期 20 分) 標識の炭酸ガスを投与し、同化直後の炭素の分配先と転流量を解析したところ、対照植物と鉄欠乏植物で転流パターンに違いはなかった。すなわち鉄欠乏時に根に対してエネルギー源と鉄キレーター(ムギネ酸)合成基質となる代謝中間体を供給するために、下位葉の早期老化が引き起こされていることが示唆された。次に、老化によりタンパク質が分解されて生じるアミノ酸の転流先を調べるため、安定同位体 ^{15}N 標識の硝酸イオンを水耕液に投与し、同化された窒素が約2週間に渡ってどの部位に再転流し分配されるかを解析した。その結果、窒素の分配パターンは鉄欠乏の影響をあまり受けておらず、鉄欠乏時に根から分泌されるムギネ酸が含窒素化合物であるにもかかわらず、根分泌物中の ^{15}N 濃度は鉄欠乏によって上昇しなかった。鉄欠乏時にオオムギの根からはムギネ酸だけではなく、大量の有機酸が分泌されることが知られており、鉄欠乏に強いオオムギ品種は下位葉の老化促進により得られた炭素を優先的に根で消費し、窒素は上位葉の葉緑体タンパク質の合成に使用している可能性が考え

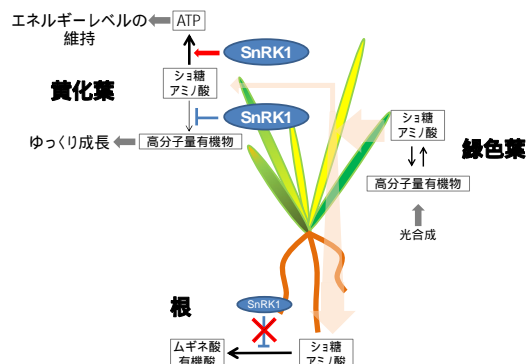
られた。



(2) 代謝の制御系

オオムギゲノムシーケンスを元に SnRK1 複合体遺伝子の全長クローニングを行った。複合体構成分子のうち、(触媒)サブユニットである可能性がある cDNA クローン 3 つ、調節サブユニットの候補として 1 サブユニットの cDNA クローン 1 つ、2 サブユニットの cDNA クローン 1 つ、3 サブユニットの cDNA クローン 1 つ、サブユニットの cDNA クローン 1 つ、サブユニットの cDNA クローン 1 つ、を得た。

クローニングした SnRK1 複合体構成分子の mRNA 蓄積量、*in vitro* 活性(合成基質に対するリン酸化活性)、*in vivo* 活性(植物体内の SnRK1 標的分子の活性化)に対する鉄欠乏の影響を調べた。SnRK1 の発現は様々な段階で調節されるため、三者のパターンは植物の部位によっては必ずしも一致しなかったが、鉄欠乏に強い品種エヒメハダカ No.1 では、鉄欠乏 1 週間で最新クロロシス葉における SnRK1 の活性化と根における抑制が見られた。弱い品種では鉄欠乏による一貫した変動パターンが見られなかった。SnRK1 の活性化は代謝系を異化に傾け、抑制は代謝系を同化に向かわせることが知られている。



これをふまえると、鉄欠乏オオムギの上位黄化葉では自身で十分な光合成ができず下位葉から供給される代謝産物を消費して得たATPを同化に使いすぎないようにしてエネルギーレベルを維持していると思われる。一方根では、大量の有機酸やムギネ酸を合成するためにATPを消費していると思われる。

下位葉の老化・代謝変動が鉄欠乏時に重要であることが分かったため、下位葉で鉄欠乏に応答する分子機構に興味を持たれる。研究代表者は以前に、鉄欠乏のオオムギ品種エヒメハダカ No.1 の下位葉で機能未知のレセプター様キナーゼ遺伝子が誘導されるというデータを得ていた。特に鉄欠乏下位葉で再現性良く発現が誘導される2クローンについて全長 cDNA をクローニングし、*IdiRLK1*、*IdiRLK2* と名付けた。これらの mRNA 蓄積パターンを調べたところ、下位葉の老化を誘導する窒素欠乏や、鉄欠乏に付随する重金属過剰ではこれらの遺伝子は誘導されず、鉄欠乏特異的に誘導されることが分かった。これらが鉄欠乏耐性に寄与する可能性を検討するため、エヒメハダカ No.1 以外の鉄欠乏に強い品種や弱い品種で発現パターンを比較しようとしたところ、これらの遺伝子を増幅するための PCR プライマーが他の品種では機能せず、塩基配列が品種間で異なっていることが示唆された。レセプター様キナーゼファミリーは植物ゲノム上に数百から 1000 を超すホモログが存在していることが知られているが、オオムギと同じイネ科のゲノムには全長に渡って *IdiRLK1*、*IdiRLK2* とともに相同性の高い遺伝子は見いだされないことから、これらはオオムギに特異的な遺伝子であり、しかも品種の特性に関わる遺伝子であると推察される。

(3) 総括

本研究プロジェクトにより、同化能力が低下する鉄欠乏条件下で、オオムギが代謝を調節して同化産物の配分・消費を変化させ、鉄欠乏に適応していることが明らかになった。吸収しにくい鉄を吸収するために大きなエネルギーコストを費やすだけでなく、土壌の可給態鉄の量が絶えず変動する中でしばらくの間、少ない鉄でゆっくりとだが成長を続ける、という適応方法も有効な生存戦略であると考えられる。今後は代謝を制御する分子機構を明らかにし、それをオオムギの他品種、あるいはイネに導入することで、代謝適応の鉄欠乏耐性への寄与を証明することが必要である。

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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

K. Higuchi, J. Iwase, Y. Tsukiori, D. Nakura, N. Kobayashi, H. Ohashi, A. Saito, E. Miwa, Early senescence of the oldest leaves of Fe-deficient barley plants may contribute to phytosiderophore release from the roots. *Physiologia Plantarum*, 査読有、v151, 2014, 313-322
DOI:10.1111/ppl.12175

〔学会発表〕(計 9 件)

K. Higuchi, A. Saito, Comprehensive mechanisms for metabolic adaptation of barley to Fe deficiency. 17th International Plant Nutrition Colloquium 2013 年 8 月 19 日「イスタンブール(トルコ)」

J. Iwase, D. Nagura, Y. Tsukiori, A. Saito, E. Miwa, K. Higuchi, Supply of assimilates by old leaves contributes to barley growth under Fe deficiency. 17th International Plant Nutrition Colloquium 2013 年 8 月 19 日「イスタンブール(トルコ)」

樋口 恭子、岩瀬 潤、月居 佳史、名倉 大樹、大橋 英典、齋藤 彰宏、三輪 睿太郎、イネ科作物の鉄欠乏適応と同化産物分配パターンの関係、日本土壤肥料学会大会、2013 年 9 月、名古屋大学

岩瀬 潤、月居 佳史、名倉 大貴、齋藤 彰宏、三輪 睿太郎、樋口 恭子、鉄欠乏オオムギにおけるソース・シンクの代謝適応、日本植物生理学会年会、2014 年 3 月、富山大学

樋口 恭子、小林 奈保子、内田 裕也、齋藤 彰宏、鉄欠乏オオムギ下位葉の老化に伴って早期に発現が誘導される遺伝子の解析、日本植物生理学会年会、2014 年 3 月、富山大学

K. Higuchi, J. Iwase, T. Tomizawa, N. Kobayashi, T. Fujisaku, C. Kawamura, A. Saito, Regulation of metabolic adaptations to Fe deficiency in barley. 17th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants, 2014 年 7 月「ドイツ(ガテスレーベン)」

樋口 恭子、岩瀬 潤、富澤 隆章、月居 佳史、藤咲 朋恵、川村 知代、鈴井 伸郎、藤 巻 秀、齋藤 彰宏、鉄欠乏に適応したオオムギにおける炭素・窒素の転流と代謝の調節、日本土壤肥料学会大会、2014 年 9 月、東京農工大学

川村 知代、藤咲 朋恵、齋藤 彰宏、樋口 恭子、鉄欠乏オオムギの代謝適応と SnRK1 活性の関係、日本植物生理学会年会、2016 年 3 月、岩手大学

K. Higuchi, T. Ogawa, C. Kawamura, R. Obata, T. Fujisaku, A. Saito, The regulatory mechanism of iron and metabolic adaptation in leaves of iron-deficiency tolerant cultivars of barley. 18th International Symposium on Iron Nutrition and Interaction in Plants, 2016 年 6 月 2 日「マドリッド(スペイン)」

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 恭子 (HIGUCHI, Kyoko)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：60339091

(2) 研究分担者

鈴木 伸郎 (SUZUI, Nobuo)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機

構・原子力科学研究部門・量子ビーム応用

研究センター・研究副主幹

研究者番号：20391287

(3) 連携研究者

齋藤 彰宏 (SAITO, Akihiro)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：10610355