

令和元年5月21日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15236

研究課題名(和文)放射性同位体/電気生理/オミクス解析を組合せた根表層でのミネラル獲得機序の解明

研究課題名(英文) A combination of radiotracer/electronode/omics methods for the analysis of mineral uptake

研究代表者

小林 奈通子 (Kobayashi, Natsuko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：60708345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：根でのミネラル吸収活性の調節は、作物栽培に適さない不良環境下での植物の応答の一つである。この応答のメカニズムに関わる分子の同定を目指し、本研究ではミネラル吸収の変化を詳細に解析した。マグネシウム欠乏処理によりマグネシウムの吸収速度が最大になった時点で、既知のマグネシウム輸送体の遺伝子発現に変化はなく、未知の分子の関与が示唆された。30 mMの塩化ナトリウムの添加により、成熟組織でのナトリウム吸収速度が一時的に上昇するものの数分後には速やかに抑制されることが分かった。塩ストレスへの初期応答として、ナトリウム吸収機構が遺伝子発現によらず調節されていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物のイオン吸収速度を精度高く解析するためには、均質な根を持つサンプルを準備することが重要で、側根が発生していない幼植物が使いやすい。本研究ではシロイヌナズナの1週齢個体を実験に供し、安定したデータを取得できる実験系を確立することができた。この系は他の実験にも応用できるものである。また、同一栽培系の中で複数の無機元素吸収を解析したことで、元素ごとの吸収の特徴が示された。

研究成果の概要(英文)：Modulation of mineral uptake manner in root is one of the stress response mechanisms. Aiming to characterize the molecular mechanisms underlying the stress response, alteration in ion flux in root was analyzed. In the magnesium starved root showing the maximum magnesium uptake rate, any changes in the expression of the known magnesium transporter genes were found. This result indicates that some molecules yet to be identified can participate in the magnesium uptake under magnesium deficient condition. Addition of 30 mM NaCl caused a temporal upregulation of sodium influx particularly in the mature root, followed by the immediate reduction within several minutes. Sodium influx is suggested to be controlled independently from gene expression regulation at the early stage of salt stress response.

研究分野：植物生理学

キーワード：マグネシウム欠乏 ナトリウム応答

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

作物栽培に適さない不良環境下での栄養元素の欠乏や過剰というストレスは、各元素に特有の欠乏/過剰障害を引き起こすが、障害発生に先立って、植物体内では適応応答も観察される。地上部での適応応答としては、気孔の開閉の調整、栄養元素の転流活性の調節、あるいは液胞を利用した細胞内イオン恒常性の維持などが挙げられ、地下部では根の形態変化やイオン吸収活性の調節が知られている。これらのうち、経根吸収活性の調節は、根組織の外皮細胞における細胞膜輸送システムの変化によって最終的に実現されると考えられるが、植物による環境ストレスの検知から膜輸送システムの変化までのプロセスは未解明であり、元素ごとに異なる可能性も十分に考えられる。

イオン膜輸送システムの解明にあたっては、輸送体分子の同定は欠かせない。イオン輸送体の探索においては、イオノーム解析による変異体等のスクリーニングによって候補分子が複数見つかってきている。ところが、同定された分子を解析すると、それ自体は液胞や小胞体などに局在していたり、あるいは、根の外皮ではなく、中心柱に局在することが判明する事例が多い。つまり、その分子の変異による体内イオン環境の変化の二次的効果として植物体内のイオン濃度が変化していたことになる。そこで、別の方策として、植物体内の組織別遺伝子発現情報を含むオープンデータベースや、特定の根細胞でプロテオーム解析から、イオン吸収に関与する分子候補を絞ることも試みられている。しかしながら、従来のオミクス解析においては、解析時点での供試植物のイオン吸収活性は調べられていない。そのため、オミクス解析によって示された遺伝子やタンパク質の発現とイオン吸収活性の関連性が曖昧であり、輸送体の同定に至らない一因になっていると思われる。結局、現時点において Mg と Ca の吸収を担う分子は特定されておらず、高塩ストレス下で Na が根に侵入する経路も、いくつかの候補分子が提示されつつも、全体像は不明である。

2. 研究の目的

環境中に多量に存在する陽イオンの代表とも言える、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Ca^{2+} を対象とし、根でのイオン吸収を実際に担う分子を同定することを目標に、各イオンの根における吸収様態の特徴を、考える限りの実験手法を駆使して調査し、吸収輸送体が備える性質を特定することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

実験にはイネとシロイヌナズナの幼植物を用いた。

根全体での吸収速度を調べるため、培地に放射性同位元素を添加し、そこに植物の根を 30 分間晒した。その後、植物体の放射線量を測定し、根長あるいは根重量で割り算した。その値をもとに、培地中のイオン濃度と放射線量の関係から、吸収速度（単位時間、根長あたりの吸収総量）を算出した。また、放射性同位元素を用いた吸収速度算出時に、吸収溶液に様々なイオンや化合物を 1 mM 添加することで、イオン吸収の阻害剤を探索した。

吸収速度に対するストレス処理の影響について調べるため、培地成分を変化させて植物を栽培し、吸収速度を測定した。また、吸収速度の変化に必要な処理時間を決定するとともに、変化が大きい部位を根の縦軸方向について特定した。吸収速度の変化について詳細な解析を行うため、タスマニア大学（オーストラリア）に滞在し、微小電極イオンフラックス計測（MIFE）システムを用いて Flux 解析を行った。

Mg 欠乏処理によって Mg 吸収速度が上昇した根をサンプリングし、BrAD 法にてライブラリを作成し、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析を行った。

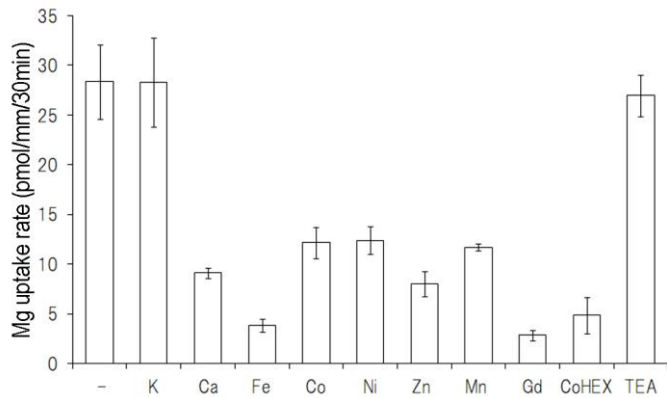
4. 研究成果

Mg 吸収を強く阻害するイオンとして、 Fe^{2+} 、 Gd^{3+} が特定された。また、 Ca^{2+} や Zn^{2+} の共存も Mg 吸収速度を 1/3 に低下させた。K 吸収に対してはこれらのイオンの影響は大きくなかったことから、Mg 吸収に関わる分子が、 Fe^{2+} 、 Gd^{3+} などのイオンに感受性が高いことが示された。

さらに、通常の水耕液の Ca^{2+} 濃度は 2 mM であることを考慮すると、シロイヌナズナにおいては Mg 吸収と Ca 吸収は通常の栽培環境において強い競合関係にあることが考えられた。

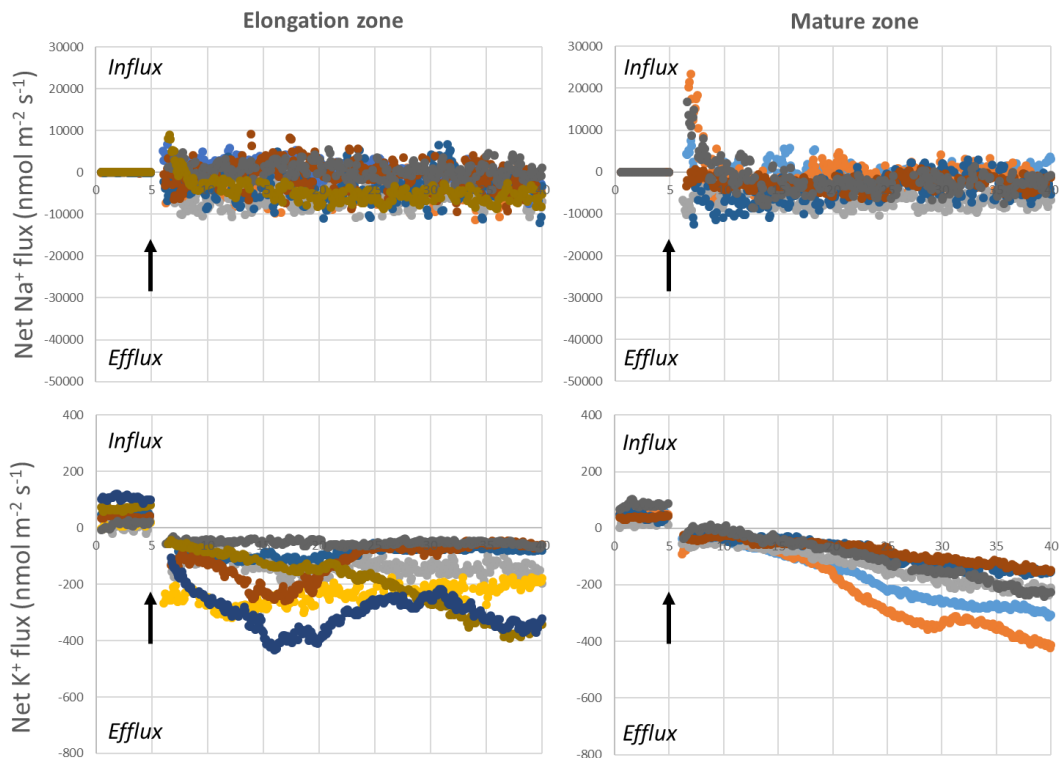
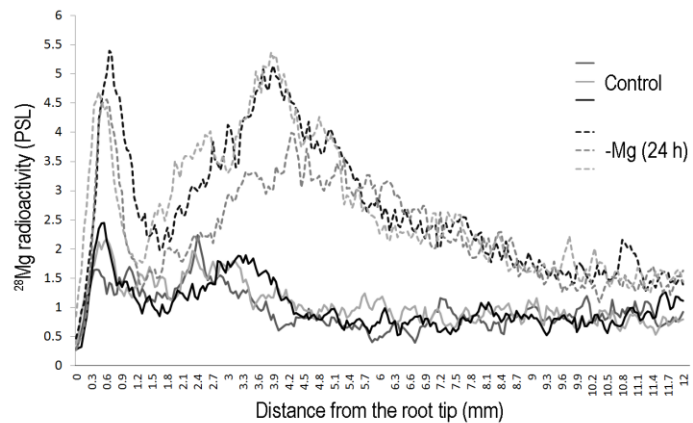
シロイヌナズナのMgの吸収速度は、わずか1時間のMg欠乏処理によって上昇することが分かったが、吸収速度が最大にするには18時間以上の欠乏処理が必要であった。

イネにおいては、24時間のK欠乏処理によってKの吸収速度が約2倍に上昇することが分かったが、欠乏期間が3日以上になると吸収速度の上昇度合いは低下した。K吸収速度はK輸送体OsHAK1の遺伝子発現量と相関が見られ、K欠乏によるK吸収速度の上昇にはOsHAK1が関わるという知見に合致する結果となった。



シロイヌナズナの根において、Mg吸収速度が上昇する部位を探った。その結果、根端から1mm以内の部位と、2mmから6mmにわたる部位が特に活性化している可能性が示された。

根のトランスクリプトーム解析の結果、Mg吸収速度が上昇している時間帯においても、Mg輸送体として知られているMRS2/MGTファミリーの9遺伝子には発現の変化が認められなかった。Mg以外のイオン輸送体としては、カリウム輸送体や鉄/亜鉛輸送体の一部に発現量上昇が見られた。一方、発現量が低下した輸送体は主に、Hexose輸送体、Sucrose輸送体、Glucose輸送体などの糖輸送体であった。Mg欠乏によってMg吸収速度が上昇する仕組みに対する既知のMg輸送体遺伝子の発現制御の寄与は少ない可能性が考えられた。



高塩ストレス下でのイオン吸収について根伸長領域と成熟領域に注目し、MIFE システムを用いて3イオンの同時計測を行った。イネの根を基本培地に浸し、5分後に30 mM NaClを添加したところ(図中の矢印)、その後34分間にわたって、伸長領域においてNa⁺のInfluxとEffluxの両方が連続的に観察された。一方、成熟領域においてはNaCl添加直後に大きなInfluxが観測され、その後は伸長領域と同様のfluxとなった。高濃度の塩に晒された場合、一時的にNa⁺の流入が生じるが、直後にNa⁺の流入経路が閉じるような仕組みがあることが考えられた。Kは塩ストレスを緩和することが知られ、塩ストレスによる植物体内K濃度の低下は塩ストレスの主要因の一つと考えられている。実験の結果、NaClの添加はイネの根からのK⁺のEffluxを誘導することが示された。このEffluxは伸長領域でも成熟領域でも観察されたが、成熟領域では時間とともにEffluxが増大した。K⁺とは対照的に、Ca²⁺についてはNa添加直後に伸長領域で70~200 nmol m⁻² s⁻¹の、成熟領域で50~130 nmol m⁻² s⁻¹のEffluxが検出されたが、Efflux速度は徐々に低下し、添加から10分後にはいずれのfluxも観察されなくなった。Ca²⁺は細胞壁に多く含まれていることが知られている。今回の実験で観測されたCa²⁺は、根圏での急激なNa⁺濃度の上昇によって細胞壁から離脱したCa²⁺であり、細胞内からのCa²⁺の排出ではないと考えている。今後、K⁺のEffluxやNa⁺のInfluxを担う分子の同定を目指すため、様々な阻害剤を添加し、Fluxを解析する実験などが必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Ogura, T.; **Kobayashi, N. I.**; Suzuki, H.; Iwata, R.; Nakanishi, T. M. and Tanoi, K. (2018) Magnesium uptake characteristics in Arabidopsis revealed by ²⁸Mg tracer studies, *Planta* **248**, 745-750.

Kobayashi, N. I.; Ogura, T.; Takagi, K.; Sugita, R.; Suzuki, H.; Iwata, R.; Nakanishi, T. M. and Tanoi, K. (2018) Magnesium deficiency damages the youngest mature leaf in rice through tissue-specific iron toxicity, *Plant and Soil* **428**, 137-152.

[学会発表] (計2件)

小林奈通子、小倉尚晃、小川隆宏、杉田亮平、田野井慶太郎、葉におけるマグネシウム欠乏症発症メカニズムの生理学的考察、日本土壤肥料学会2017年仙台大会、東北大学、2017年9月

Natsuko I. Kobayashi, Ryohei Sugita, Taka-aki Ogura, Hisashi Suzuki, Ren Iwata, Tomoko M. Nakanishi, Keitaro Tanoi. Magnesium Deficiency Damages the Young Mature Leaf Through the Unstabilization of Iron Homeostasis in Rice. 18th International Plant Nutrition Colloquium, コペンハーゲン、2017年7月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/radio-plantphys/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：田野井 慶太郎

ローマ字氏名：Keitaro TANOI

※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。