

令和元年5月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15239

研究課題名(和文)ソバの酸性土壌耐性機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of acidic soil tolerance in buckwheat

研究代表者

横正 健剛 (Yokosho, Kengo)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：50790622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：酸性土壌の主な生育阻害因子にアルミニウム毒性やマンガンの毒性がある。本研究の生理学的な解析からソバは酸性土壌に強いだけでなく地上部にアルミニウムとマンガンを集積することが分かった。さらにソバのマンガンの吸収、集積の分子機構を明らかにするため、ソバのNrampファミリーに着目し研究を進めた。Nrampファミリーは生物界に広く存在し、金属イオンを輸送することが報告されている。ソバには7つのNramp遺伝子が根または葉で発現していた。酵母やシロイヌナズナを用いた解析からソバのマンガンの吸収はFeNramp5が担うことを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食糧不足問題を解決することは人類の抱える重要な課題の一つである。この問題の解決策のとして、これまでに農耕地として利用されていない、または生産性の低い問題土壌での作物の生産性の向上が期待されている。世界の耕地面積の3-4割は酸性土壌であり、そこでの主な生育阻害因子にアルミニウム毒性やマンガンの毒性がある。ソバは酸性土壌に強い植物であることが知られている。本研究ではソバが地上部にアルミニウムとマンガンを集積することを明らかにした。さらに、ソバのマンガンの吸収に関する輸送体を突き止めた。これはソバの酸性土壌耐性を理解するうえで重要な新しい知見であり、酸性土壌での作物の生産性向上に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Toxicity of both aluminium (Al) and manganese (Mn) has been recognized as limiting factors of crop productivity on acidic soils. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) is a well-known acid soil tolerant species. Physiological study showed that buckwheat is also able to accumulate high Mn in the leaf not only Al. The natural resistance-associated macrophage proteins (Nramps) constitute a large family in bacteria, fungi, plants and mammals. In this study report isolation and characterization of seven Nramp transporter genes in buckwheat. Heterologous experiment showed Mn concentration in yeast expressing FeNramp5 was higher than vector control and other lines. Furthermore expression of FeNramp5 in *atramp1*, a mutant defective in Mn uptake in *arabidopsis*, rescued the phenotype. These results suggest that at least FeNramp5 is involved in the transport of Mn in buckwheat.

研究分野：植物栄養学

キーワード：ソバ 酸性土壌 アルミニウム マンガン 輸送体 Nramp

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食糧不足問題を解決することは人類の抱える重要な課題の一つである。この問題の解決策のとして、これまでに農耕地として利用されていない、または著しく生産性の低い問題土壌での作物の生産性の向上が期待されている。世界の問題土壌の中で最も広い面積を占めるのは酸性土壌である。酸性土壌は世界の農耕地の約 3~4 割を占め、様々な要因によって作物の生育が阻害されている。その中で主要な生育阻害因子にアルミニウム毒性ストレス、次にマンガン毒性ストレスがある。しかし、一部の植物は酸性土壌で生存するためのアルミニウムやマンガン耐性機構を獲得している。植物のアルミニウム耐性は植物種間または品種間によって大きく異なる。イネ、ライムギ、ソバはコムギやオオムギに比べてアルミニウム耐性が高いことが知られている。これまでに我々はイネ科の作物を中心にアルミニウム耐性機構について研究を行っており、オオムギやイネ、ライムギなどから根圏でアルミニウムの無毒化に関与するクエン酸輸送体を単離、同定している。(Furukawa et al., 2007; Yokosho et al., 2010; Yokosho et al., 2011)。

一方、高い酸性土壌耐性を持つソバだがその分子メカニズムは明らかでない。ソバは一年性の草本類でアジアやヨーロッパを中心に世界中で栽培されている。2015 年には全ゲノム情報が解読、公開され、分子レベルでの研究の加速が期待されている (Yasui et al., 2015)。これまでの生理学的な解析からソバにはアルミニウムに対して根からシュウ酸を分泌し無毒化を行う体外無毒化機構、アルミニウムを根から吸収し、地上部に輸送し、最終的に葉の液胞に隔離する体内無毒化機構といった二つのユニークな耐性機構が備わっている。これらの耐性機構には多くの未同定の輸送体の関与が予想されていた。一方で酸性土壌に強いソバにはアルミニウム耐性機構だけでなく、何らかのマンガン耐性機構も持ち合わせていることが予想されるが研究開始当初にはソバのマンガン耐性に関する知見はほとんどなかった。

我々はソバのアルミニウム耐性機構の先行研究として、アルミニウム処理したソバの根と葉から RNA-Seq 解析を行い、根と葉のアルミニウムに対する応答性について遺伝子発現のプロファイリングを行なっている (Yokosho et al., 2014)。さらに、この網羅的な遺伝子発現データを基に FeIREG1 がソバの根においてアルミニウムの体内無毒化機構に関わることを明らかにした (Yokosho et al., 2016)。しかし、FeIREG1 は根の先端の液胞膜に局在することから、アルミニウムの吸収、移行、地上部での無毒化には他の遺伝子が関与していると考えられていた。

### 参考文献

- Furukawa J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y, Sato K, Katsuhara M, Takeda K, Ma JF. (2007) An aluminum-activated citrate transporter in barley, *Plant Cell Physiol.* 48: 1081-1091.
- Yokosho K, Yamaji N, Ma JF. (2010) Isolation and characterization of two MATE genes in rye. *Func. Plant Biol.* 37: 296-303.
- Yokosho K, Yamaji N, Ma JF. (2011) An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J.* 69: 1061-1069.
- Yokosho K, Yamaji N, Ma JF. (2014) Global transcriptome analysis of Al-induced genes in an Al-accumulating species, common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Plant Cell Physiol.* 55: 2077-2091.
- Yokosho K, Yamaji N, Mitani-Ueno N, Shen RF, Ma JF (2016) An aluminum-inducible IREG gene is required for internal detoxification of aluminum in buckwheat. *Plant Cell Physiol* 57:1169-1178.
- Yasui Y, Hirakawa H, Ueno M, Matsui K, Katsube-Tanaka T, Yang SJ, Aii J, Sato S, Mori M. (2016) Assembly of the draft genome of buckwheat and its applications in identifying agronomically useful genes. *DNA Res.* 23:215-224.

### 2. 研究の目的

世界の問題土壌の中で最も広い面積を占めるのは酸性土壌である。酸性土壌は世界の農耕地の約 3~4 割を占め、そこではアルミニウムやマンガンなどの金属過剰ストレスが問題となっている。ソバは酸性土壌に強い作物であり、アルミニウムに対して根からシュウ酸を分泌すること、またアルミニウムを高濃度で地上部に集積することが知られているが、その分子レベルでの研究はほとんどされていない。本研究ではソバの強い酸性土壌耐性の分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、ソバからアルミニウム吸収やシュウ酸分泌の輸送体など、アルミニウム耐性に関わる新規輸送体の単離を目指す。また、酸性土壌ではアルミニウム毒性だけでなくマンガン毒性も問題となる。ソバは酸性土壌に強い作物であるが、ソバのマンガン耐性機構についてはあまり着目されていなかった。そこで本研究ではソバのアルミニウム耐性機構だけでなくマンガンの吸収や耐性機構についても研究を行い、より実際の土壌に近い形でソバの酸性土壌耐性機構を理解することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では効率よくソバから酸性土壌耐性に関わる遺伝子の単離するために、逆遺伝学的な手法を用いて研究を進めた。これまでに我々が作成したソバの根と葉のアノテーション付き RNA-Seq データからアルミニウムやマンガン耐性に関わる遺伝子の単離を試みた。

イネではアルミニウムとマンガンの吸収に関わる遺伝子がすでに単離されており、同じ Nramp ファミリーに属している (Xia et al., 2010; Sasaki et al., 2012)。そこで本研究ではソバの Nramp ファミリーを中心に解析を行なった。まずそれぞれの遺伝子の全長を単離し、酵母に発現させアルミニウムやマンガンなどの輸送基質の特定を試みた。また根や葉における遺伝子の発現量やアルミニウムやマンガンによる応答性についてリアルタイム PCR によって定量し解析を行った。細胞内局在性を調べるために、遺伝子と GFP との融合コンストラクトを作成し、ソバのプロトプラストに一過的に導入して蛍光顕微鏡で観察した。組織内発現パターンの解析にはレーザーマイクロダイセクションを用い、ソバの根全体、表皮を含む外側の層を除いた根、中心柱に切り分け、リアルタイム PCR によって解析した。さらに、植物体における遺伝子の機能を明らかにするためにシロイヌナズナに形質転換を行い生理学的な解析を行った。また、ソバのマンガン吸収、集積や耐性については知見が少ないため輸送体の単離とともに生理学的な解析も行った。異なるマンガン濃度で栽培したときの生育の違いや、酸性土壌で栽培した際の根や各部位でのミネラルの集積を ICP-MS で解析した。

#### 参考文献

- Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K, Ma JF (2012). Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *Plant Cell* 24:2155-2167.
- Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma JF (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107:18381-18385.

#### 4. 研究成果

酸性土壌での主な生育阻害因子はアルミニウムとマンガンの過剰毒性である。ソバは酸性土壌に強く地上部に高濃度のアルミニウムを集積する。一方ソバのマンガン毒性に対する研究は少ない。本研究ではまずソバを pH4.5、pH5.0 の土壌で栽培し、地上部の金属含量を比較した。その結果 pH4.5 の酸性土壌で栽培したソバは pH5.0 の土壌に比べ地上部のアルミニウムとマンガンの濃度が約 35 倍に増加した (図 1)。またソバを異なるマンガン濃度 (0.5、50、100、200

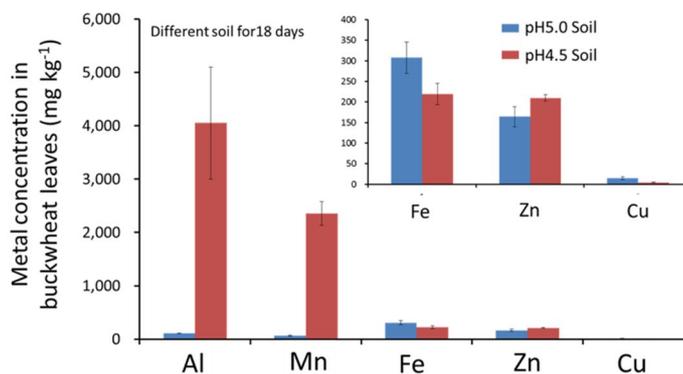


図 1 酸性土壌で栽培したソバの地上部の金属濃度

μM) で水耕栽培した結果、200 μM のマンガンを含む培地では地上部に 5000 mg kg<sup>-1</sup> を超えるマンガンを集積していたが、植物の乾物重にはいずれの濃度で栽培しても大きな違いはみられなかった。これらの結果は、ソバはアルミニウムだけでなくマンガンも地上部に集積するというソバの酸性土壌耐性を理解するうえで重要な新しい知見を提示した。今後この研究を皮切りにソバのマンガン耐性機構に着目した研究も活発になると考えられる。

次にソバのマンガンやアルミニウムの吸収、集積の分子機構を明らかにするために、私たちはソバの Nramp ファミリーに着目し研究を進めた。Nramp (The Natural resistance-associated macrophage proteins) ファミリーは生物界に広く存在し、金属イオン (Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> など) を輸送することが知られている。ソバの RNA-Seq データをもとに Nramp ファミリーを検索したところ、ソバには 7 つの Nramp 遺伝子が根または葉で発現していた (図 2)。それぞれの遺伝子について絶対定量による発現量の比較を行ったところ、FeNramp4, 5, 6 は主に根で発現していたが、FeNramp1, 2, 3, 7 は根と葉の両方で発現していた。根における金属欠乏による発現応答について調べたところ、FeNramp1 の発現量は鉄欠乏に反応し 6 倍に増加し、FeNramp2 と 5 は 2-3 倍程度増加した。FeNramp5 の発現量はマンガン欠乏によって 2.5 倍増加していた。また、アルミニウム処理により FeNramp2 の発現量が 3 倍増加していた。さらにレーザーマイクロダイセクションを用いた根の組織特異的な発現解析から、FeNramp1, 2, 5 は根の全体で発現することが明らかとなった。ソバの Nramp タンパク質の輸送基質を特定するために酵母にそれぞれの遺伝子を発現さ

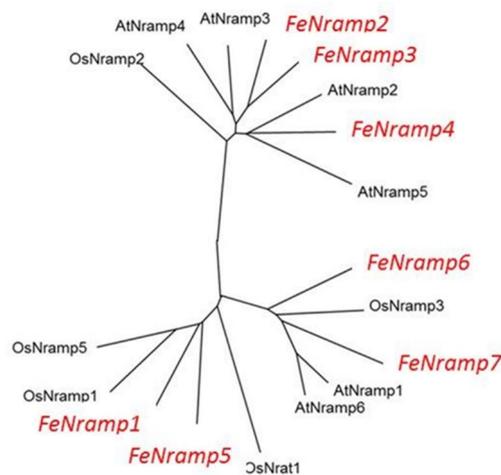


図 2 ソバのNrampファミリーの系統樹

せ、輸送活性測定を行った。その結果、*FeNramp1,2,5* を発現させた酵母にはマンガンの輸送活性があった。特に *FeNramp5* のマンガン輸送活性は *FeNramp1,2* よりも高かった (図 3)。さらに *FeNramp5* にはマンガンだけでなくカドミウムの輸送活性もあり、*FeNramp1* には鉄の輸送活性があることを明らかにした。一方、ソバの *Nramp* ファミリーにはアルミニウムの輸送活性を示すものはなかった。

ソバの *Nramp* 細胞内局在を明らかにするために *FeNramp1,2,5* との GFP との融合タンパク質をソバのプロトプラストまたはタマネギの表皮細胞に発現させたところ *FeNramp1, 5* は細胞膜に *FeNramp2* は液胞膜に局在した。最後に、植物体での *FeNramp5* の機能を明らかにするために、シロイヌナズナのマンガン吸収変異体 *atnramp1* に *FeNramp5* を発現させ相補実験を行った。その結果、*FeNramp5* は *atnramp1* の表現型を相補することができた。これらの結果から *FeNramp5* はソバのマンガン吸収を担う輸送体であることを突き止めた。この成果はソバの酸性土壌耐性を理解するうえで重要であり、ソバに限らず酸性土壌での作物の生産性向上に貢献する可能性がある。さらに、*FeNramp5* はカドミウムの輸送活性もあることから、カドミウム濃度を抑えたソバの作出など、安全な作物生産にもつながる可能性がある。

一方、ソバの *Nramp* ファミリーの中にはアルミニウムを輸送するものはなかった。上記の *Nramp* ファミリー以外にもシロイヌナズナではアルミニウム - リンゴ酸輸送体としていられている *AtNIP1;2* のソバでの相同遺伝子についてアルミニウム輸送活性を行った。*FeNramp* の実験と同様に酵母に *FeNIP1;2* を発現させアルミニウムやアルミニウム有機酸錯体 (Al - クエン酸、Al - リンゴ酸、Al - シュウ酸) の輸送活性を行ったがいずれも有意な輸送活性は認められなかった。この結果は、ソバのアルミニウム吸収には既知の遺伝子とは異なる輸送体が関与している可能性があり、今後は逆遺伝学的な手法だけでなく変異体のスクリーニングなど順遺伝学的な手法も取り入れる必要があると考えている。

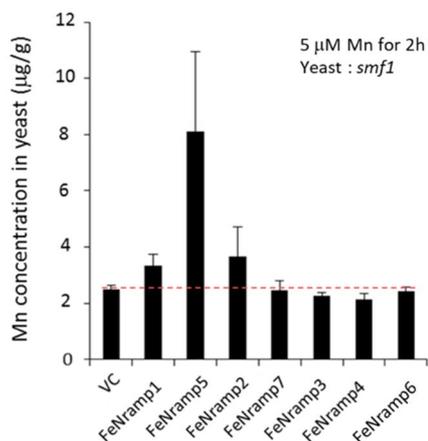


図3 酵母を用いたマンガンの輸送活性測定

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 横正健剛、ソバの *Nramp* ファミリー遺伝子の機能解析、日本土壌肥料学会年会、2017 年
- (2) Yokosho K, Functional characterization of *Nramp* transporter genes in buckwheat, XVIII International Plant Nutrition Colloquium, 2017

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/plant.stress/index-j.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者：横正 健剛

ローマ字氏名：Yokosho Kengo

所属研究機関名：岡山大学

部局名：資源植物科学研究所

職名：助教

研究者番号 (8 桁) : 50790622