

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (A)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18208008
 研究課題名（和文）アルミニウム耐性とリンリサイクル能の分子的改変による酸性土壌耐性植物の創生
 研究課題名（英文）MAKING OF ACID SOIL-TOLERANT PLNTS BY MOLECULAR MODIFICATIONS OF ALUMINUM TOLERANCE AND PHOSPHORUS RECYCLING CAPABILITY
 研究代表者
 我妻 忠雄 (WAGATSUMA TADAO)
 山形大学・農学部・教授
 研究者番号：70007079

研究成果の概要(和文): 酸性土壌の主要な植物生育阻害要因であるアルミニウム(Al)による根細胞伸長阻害機構として、糖の吸収阻害に基づく水吸収阻害、根への光合成産物の転流の促進を明らかにした。次いで、新規な Al 耐性戦略として、根端細胞膜脂質層中のステロールが多いことの重要性を明らかにした。また、酸耐性と Al 耐性が同じ転写制御系で調節され、それぞれに対応した遺伝子で制御されることを明らかにした。さらに、リン(P)欠乏への耐性戦略として、糖代謝や脂質代謝などの変化が P のリサイクル能に貢献し、マメ科植物では特異的にフラボノイド合成系が大きく寄与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文): Aluminum (Al) ion inhibits sugar uptake which leads to the inhibition of water uptake as well as cell elongation. Inhibition of sugar uptake by Al seems to be compensated by the stimulation of translocation of photosynthates. Novel strategy for Al tolerance differing from the known strategy based on the release of organic acid anions was found. Higher sterols in plasma membrane lipid layer of root-tip were demonstrated to be the cause of Al tolerance. Genomic and genetic approaches in *Arabidopsis* revealed that acid and Al tolerances were co-regulated by the same signal transduction pathway, but with the distinct functional genes for tolerance. Comparative microarray analysis showed that common alterations involved in the metabolisms of sugars and lipids contributed to P recycling. It was suggested that responses in flavonoids synthesis were specific in leguminous plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	14,300,000	4,290,000	18,590,000
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
総計	36,600,000	10,980,000	47,580,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：アルミニウム耐性、インペルターゼ、細胞膜ステロール、低 pH 耐性、ヘキソース輸送体、マイクロアレイ、リン酸欠乏応答

1. 研究開始当初の背景

(1) AI イオンは、根の先端にある細胞に吸着し、細胞伸長阻害と細胞死を誘発するが、その機構は不明な部分が多かった。AI による培養細胞の細胞死は、呼吸阻害を伴って誘発される活性酸素が原因の一つであることが見出されていたが、AI 過剰害で起こる細胞伸長阻害機構は不明であった。また、これとの関係で、根における AI ストレスが光合成産物の転流に与える影響は不明であった。また、植物の発芽時の AI 耐性に関する詳細な説明はなされていなかった。

(2) 根端からのリンゴ酸、クエン酸などの放出に基づく AI 耐性機構に関する生理学・遺伝子レベルの解明が、世界的になされた。一方、強力な AI 耐性植物を含めて、この有機酸戦略では説明できない AI 耐性植物が幾つか存在することが知られるようになった。その一つの候補となる戦略として、根端細胞膜脂質層の負電荷性と透過性の小さいことの重要性が、代表者の我妻によって明らかにされていた。

(3) 酸性土壌障害のうち、酸感受性に関する知見は極めて乏しく、酸耐性と AI 耐性との区別に関して、分子生物学・ゲノム遺伝学による解明が期待されていた。ところで、シロイヌナズナやミヤコグサではエコタイプ（作物の品種に相当）が遺伝資源として収集されていた。また、これらを用いて、ある形質に関する遺伝的な機構を理解する集団遺伝学・統計遺伝学が実施できる状況が整備されていた。

(4) P 欠乏を栽培・施肥法で解決するには、石灰と P 肥料を多量に投入する必要があるが、P は、寿命の限られた資源である。これを背景として、酸性土壌地域での持続的な食料・バイオマス資源の生産には、作物が吸収した P の体内での利用効率を向上させ P 欠乏耐性を強化することが期待されていた。

2. 研究の目的

(1) AI による細胞伸長阻害の分子機構について、糖代謝に着目して解析すること。

(2) イネの発芽期の AI 耐性形質を遺伝学的に解析すること。

(3) AI 耐性への根端細胞膜脂質層の役割を明らかにし、それに基づいて AI 耐性・酸性土壌耐性植物を創生すること。

(4) 酸性土壌耐性のうち、理解が遅れている酸感受性を、AI 耐性などと比較して、分子レベルで解明すること。

(5) P の体内リサイクリング能に関する機構を分子レベルで解明して、モデル植物での耐性発現を指標に“強力な酸性土壌耐性を持つ植物”の分子改良に有用な遺伝子群を発見すること。

3. 研究の方法

(1) タバコ培養細胞をカルシウムと放射性同位元素でラベルした糖を含む培地に懸濁し、AI を添加し、糖の取り込みを定量した。細胞壁局在のインベルターゼ活性は、細胞から抽出した粗酵素液を用いて測定した。植物での光合成と転流は、 $^{14}\text{C}-\text{CO}_2$ を取り込ませ Positron-emitting tracer imaging system (PETIS) でモニタリングし解析した。

(2) 日本晴（親系統）の Tos17 トランスポゾン挿入突然変異集団を用い、発芽期に AI 高感受性を示す系統を選抜し、後代を用いて AI 感受性形質と生育について遺伝様式を解析した。

(3) 脂質代謝阻害剤処理によって根端脂質組成や AI 耐性に及ぼす影響を調べた。脂質代謝関連遺伝子のノックダウン系や突然変異体を利用して、AI 耐性・関連生理的变化を比較研究した。

(4) ナショナルバイオリソースプロジェクトで収集されているシロイヌナズナ及びミヤコグサの品種を入手して、酸及び AI 耐性の違いを評価した。さらに、シロイヌナズナでは QTL 解析や表現型クラスター解析を行うとともに、研究途中で単離した酸感受性変異体 *stop1* の形質評価とあわせて、酸及び AI 耐性の分子機構を解析した。

(5) P のリサイクル能に関わる遺伝子を明らかにするため、低 P 耐性の異なるモデル植物(シロイヌナズナ、イネ、ミヤコグサ)を用いて比較マイクロアレイ解析を実施した。植物は人工気象機を用いて水耕栽培し、処理後 10 日目の植物を採取してマイクロアレイ解析の試料とした。地上部と根部で発現量の比較を行い、共通して発現量の変動が認められたもの、それぞれの種において特異的に発現量の変動が認められたものを明らかにした。また、マイクロアレイ解析により示唆された代謝変動について、GC-MS などを用いて物質レベルでの解析を実施した。

4. 研究成果

(1) AI による細胞伸長阻害機構

タバコ培養細胞を用い、以下の内容を明らかにした。タバコ培養細胞の AI に対する応答反応は二相に分かれ、AI 添加直後から 6 時間目くらいまでに細胞伸長阻害が誘発され、6 時間以降 18 時間目までに増殖能の低下が誘発される。コントロール処理の細胞伸長は、培地の糖を取り込むことによる細胞内浸透濃度の上昇(水ポテンシャルの低下)が駆動力となる水吸収による。ここで、AI を添加すると、糖の取り込みが阻害され、その結果、水吸収も阻害され、細胞伸長が抑制される。なお、タバコ細胞は、培地のスクロースを細胞壁インベルターゼでヘキソースに分解したのち取り込むが、AI はインベルターゼを阻害せず、ヘキソースの取り込みを阻害する。なお、培地からスクロースを除去しても AI 処理と同様に細胞伸長が阻害されるが、後期応答反応である活性酸素や呼吸阻害は誘発されない。従って、AI は、糖の吸収阻害から呼吸阻害に至るまでの糖の代謝経路において、特異的な変動を誘発している可能性が高く、これを明らかにすることで、AI 障害経路の全容が解明されると思われる。一方、根の生育に必要な糖は、光合成産物の転流によって供給される。AI は、根においても、添加後 6 時間程度は、糖の取り込みを阻害するが、その後は、糖の転流量がコントロールの根よりも増加することから、個体全体で、根の AI 障害を克服する機構が働いていると思われる。根と地上部の情報伝達機構の解明が今後の課題である。

(2) イネの発芽期に見られる AI 耐性形質

日本晴の Tos17 挿入変異系統から、発芽期に AI 高感受性を示す系統を選抜し、その後代(4~5 世代)を用いて、形質を解析した。そ

の結果、AI 高感受性形質は、優性形質であり、さらに矮性形質と連鎖していることを見出した。従って、イネの発芽期に見られる AI 耐性は、遺伝形質であり、その同定に向けた解析を進める予定である。

(3) AI 耐性への根端細胞膜脂質層の役割

イネ品種間 AI 耐性差への根端細胞膜脂質層の役割

インディカイネ 23 品種や、東北地方で良く栽培されているジャポニカイネ 6 品種とで AI 耐性を比較した結果、耐性に広い違いが認められ、また、ササニシキは最も AI 耐性が強かった。次に、ササニシキの先祖に当たる全系統 20 品種のうちの 18 品種の種子を収集し、それらの AI 耐性を調査し、最強として陸羽 132 号、亀の尾を、最弱として陸羽 20 号、愛国を選別した。耐性品種は根端の AI 集積性、細胞膜透過性が、感受性品種よりも小さかった。また、クエン酸とリンゴ酸の放出量は AI 耐性と無関係であった。細胞膜の主要な脂質であるステロール、の合成経路の下流にある鍵酵素 OBT-14DM の阻害剤ウニコナゾール P 処理によって、AI 耐性品種は根端部のステロール濃度が減少し、リン脂質濃度が増大し、耐性が感受性品種程度にまで低下した。脂質の負電荷性の程度を示す[リン脂質/ステロール]比は、AI 耐性との間に負の相関があり、結局、イネの AI 耐性には根端細胞膜脂質層中のステロールが多いことが重要であると示唆された。

ソルゴー、コムギ、ライコムギ、トウモロコシの AI 耐性差への根端細胞膜脂質層の役割

イネと同様に、AI 耐性品種・系統は、根端の AI 集積性・細胞膜透過性が、より小さかった。有機酸放出に関しては、コムギでは耐性系統でリンゴ酸の多いことが既に解っている。しかしながら、トウモロコシではリンゴ酸に差が認められず、クエン酸ではやや多い程度であったが、ソルゴー、ライコムギには差が認められなかった。一方、全ての AI 耐性品種・系統で根端ステロール濃度に高い傾向が認められ、また、[リン脂質/ステロール]比は小さい傾向があった。さらに、ステロール合成鍵酵素 OBT-14DM の阻害剤処理で、AI 耐性品種・系統の AI 耐性は、感受性のもの程度にまで低下した。その際、根端の AI 集積性・細胞膜透過性は明らかに増大していた。

エンドウの AI 耐性と根端細胞膜脂質との関係

エンドウ *lh* 突然変異体は、著しく AI 感受性であることが解った。この根端は AI 集積性・細胞膜透過性が野生品種よりも大きく、ステロール濃度も、より低かった。さらに OBT-14 DM をコードする *CYP51* mRNA の発現量が低いことが解った。

シロイヌナズナ *CYP51* 形質転換体の AI 耐性と根端細胞膜脂質との関係
CYP51 をアンチセンス形質転換したノックダウン系は、野生型に比較して著しく AI 感受性であり、根端の AI 集積性・細胞膜透過性が著しく高かった。また、リンゴ酸放出量に差は認められず、[リン脂質/ステロール]比は、より大きかった。

イネ *HMG* 遺伝子発現量の調節と AI 耐性との関係
AI 感受性イネ品種コシヒカリは、メバロン酸、グルコース添加条件下の暗所処理で、AI 耐性が耐性品種並みに向上した。AI 耐性品種には、このような変化は認められなかった。この条件で、根端の AI 集積性は低下した。また、ステロール合成経路の上流にあって、動物におけるステロール合成鍵遺伝子である *HMG* の発現量が増大した。*CYP51* を過剰発現させてもステロール濃度を増大させることが出来ないことは、既に報告されている。そこで、コシヒカリに *HMG* 遺伝子を過剰発現させた組換え体を構築し、各種系統の種子を増殖した。現在、AI 耐性等の調査中である。

(4) 分子レベルでの酸耐性と AI 耐性の関連性

シロイヌナズナ及びミヤコグサの AI 及び酸耐性には大きな系統間差があることが明らかとなった。これは、遺伝情報が整備されているシロイヌナズナで、表現型クラスター解析及び QTL ピラミディング解析すると、AI 耐性と低 pH 耐性の主導遺伝子は異なることが示された。ところで、低 pH 耐性として単離したシロイヌナズナ変異体 (*STOP1*) はジンクフィンガー転写因子に感受性原因を持ち、AI にも感受性であることが明らかとなった。この転写因子は、AI 耐性の主導遺伝子 *AtALMT1* の発現を制御するとともに、未知である酸耐性遺伝子を制御していると考えられた。マイクロアレイとトランスクリプトームを統合した解析を行ったところ、イオンホメオスタシス、pH 調節、細胞壁合成等が酸耐性に関わることが明らかとなった。先の遺伝学実験と合わせて考えると、酸及び AI 耐性は同じシグナル伝達経路で *S*

TOP1 を介して制御されるものの、耐性を決定する遺伝子は異なり、そのバリエーションにより系統間差が説明できると考えられる。

(5) 分子レベルでの P リサイクル能

P 有無の培養液で水耕栽培したイネ、シロイヌナズナ、ミヤコグサを地上部と根部に分けて採取し、生育と P 吸収量の変遷を求めた上で、マイクロアレイ解析に供した。P 欠乏の応答機構における植物種間差は二次代謝において最も顕著であった。各種フラボノイド量および生合成関連遺伝子の発現量を測定したところ、P 欠乏条件によるイネ根部でのリグニン合成の促進、シロイヌナズナ地上部でのフラボノールグリコシド生合成の促進、ミヤコグサでのイソフラボノイドからフラボノイド生成へのシフトが、低 P 耐性の植物種間差を生む要因であることが示唆された。また、3 種植物に共通して、P 欠乏によって脂質代謝の変化が引き起こされ、体内の P 利用効率の向上および P のリサイクルに貢献していることが示唆された。イネ、ミヤコグサ、ダイズの P 欠乏への応答機構として、特に根の生理的な応答に着目した。マイクロアレイを利用した遺伝子応答の変動を解析したところ 3 種植物に共通して、P 欠乏によって糖代謝や脂質代謝の変化が引き起こされ、体内の P 利用効率の向上および P のリサイクルに貢献していることが示唆された。さらに、P 利用効率向上に関わる複数の重要な遺伝子を単離し、シロイヌナズナにおけるこれらの遺伝子の変異株の生育が低 P 条件で著しく低下することを見いだした。また、根の応答機構の一つとして根分泌物の P 栄養への応答を解析したところ、多数の糖類の分泌が無菌条件下で見出された。

(6) 根端細胞膜脂質層の分子的改変による、AI 耐性、低 Ca 耐性、低 pH 耐性、P リサイクル能の多元的向上の可能性に関する将来展望

根端細胞膜脂質層中のステロールを増やすことは、上述以外の酸性土壌の種々の不良要因に対しても、以下にのべるように、種々の有利な性質を伴うものと期待される。すなわち、リン脂質を少なく抑えることによって、膜の正常性維持に必要な Ca の量を、より少なくすることが出来ると予想される。これは、低 Ca 培地条件で、より有利な特性であると考えられる。また、低 pH の高 H⁺ 濃度条件では、この結合が妨げられるが、リン脂質濃度を低く抑えることによって、この Ca 結合阻

害のチャンスを少なく出来ると予想される。さらに、細胞膜へのリン脂質の分配を少なくすることによって、他のリン酸化合物への P の分配を増やすことができると予想される。これは、低 P 条件で有利な特性であると考えられる。また、細胞膜脂質層中にあるステロール配糖体は細胞壁セルロース合成の際の糖供与体であることも既に解っていることから、ステロールを増やすことは強固な細胞壁の構築にも有利であると推定される。以上により、根端細胞膜脂質層の分子的改变によって、高 Al・低 Ca・低 pH・低 P ストレスの複合した酸性土壌への耐性を多元的に強化できるという全く新規な将来展望が期待される。

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 33 件)

Abdel-Basset R, Ozuka S, Demiral T, Furuichi T, Sawatani I, Baskin TI, Matsumoto H, Yamamoto Y: Aluminium reduces sugar uptake in tobacco cell cultures: A potential cause of inhibited elongation but not of toxicity. 査読有、Journal of Experimental Botany, Vol. 61, 2010, pp. 1597-1610.

Khan MSH, Tawaraya K, Sekimoto H, Koyama H (他 8 名、12 番目): Relative abundance of δ^5 -sterols in plasma membrane lipids of root-tip cells correlates with aluminum tolerance of rice. 査読有、Physiologia Plantarum, Vol. 135, 2009, pp. 73-83.

Akhter A, Khan MSH, Egashira H, Tawaraya K (他 4 名、8 番目): Greater contribution of low-nutrient tolerance to sorghum and maize growth under combined stress conditions with high aluminum and low nutrients in solution culture simulating the nutrient status of tropical acid soils. 査読有、Soil Science and Plant Nutrition, Vol. 55, 2009, pp. 394-406.

Sawaki S, Iuchi S, Kobayashi Y, Ikka T, Sakurai N, Fujita M, Shinozaki K, Shibata D, Kobayashi M, Koyama H: *STOP1* regulates multiple genes that protect Arabidopsis from proton and

aluminum toxicities. 査読有、Plant Physiology, Vol. 148, 2009, pp. 969-980.

Wasaki J, Maruyama H, Tanaka M, Yamamura T, Dateki H, Shinano T, Ito S, Osaki M: Overexpression of the *LASAP2* gene for secretory acid phosphatase in white lupin improves the phosphorus uptake and growth of tobacco plants. 査読有、Soil Science and Plant Nutrition, Vol. 55, 2009, pp. 107-113.

Chen Z, Watanabe T, Shinano T, Ezawa T, Wasaki J, Kimura K, Osaki M, Zhu Y-G: Element interconnections in *Lotus japonica*: a systematic study of the effects of elements additions on different natural variants. 査読有、Soil Science and Plant Nutrition, Vol. 55, 2009, pp. 91-101.

Ikka T, Kobayashi Y, Tazib T, Koyama H: Aluminum tolerance QTL in Columbia/Kashmir inbred population of Arabidopsis thaliana is not associated with aluminum responsive malate excretion. 査読有、Plant Science, Vol. 175, 2008, pp. 533-538.

Kikui S, Sasaki T, Osawa H, Matsumoto H, Yamamoto Y: Malate enhances recovery from Al-caused inhibition of root elongation in wheat. 査読有、Plant and Soil, Vol. 290, 2007, pp. 1-15.

Ikka T, Kobayashi Y, Iuchi S, Sakurai N, Shibata D, Kobayashi M, Koyama H: Natural variation of Arabidopsis thaliana reveals that aluminum resistance and proton resistance are controlled by different genetic factors. 査読有、Theoretical and Applied Genetics, Vol. 115, 2007, pp. 709-719.

[学会発表](計 111 件)

我妻忠雄、石川明史、植木希、MSH Khan、IM Rao、P Wenzl、石谷学、小山博之 (他 4 名): 根端細胞膜脂質層を改変してアルミニウム耐性植物を創る - アルミニウム過剰条件における抵抗性の比較 (最終・53) 日本土壌肥料学会講演要旨集、55 集、p.91、2009 年 9 月 17 日、京都大学。

Yamamoto Y, Abdel-Basset R, Rikiishi S, Ozuka S, Demiral T, Furuichi T, Sawatani I, Baskin TI, Matsumoto H, Sasaki T: Aluminum reduces sugar uptake

in tobacco: a potential cause of cell elongation inhibition but not of cell death. The 7th International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH, May 17-21, 2009, Guangzhou, China.

Shinano T, Choi SJ, Wasaki J, Osaki M: Comparative study of plant response to P starvation. International Symposium on Plant Science for Biomass and Food Production in Acid Soil Recent advances in physiology, genetics and genomics studies-, September 26, 2007, Creative Research Initiative Sousei (CRIS), Hokkaido University, Sapporo, Japan.

Wasaki J, Maruyama H, Tanaka M, Dateki H, Yamamura T, Shinano T, Ito S, Osaki M: Overexpression of *LASAP2* gene for secretory acid phosphatase of white lupin improves P uptake and growth of tobacco plants. International Symposium on Plant Science for Biomass and Food Production in Acid Soil Recent advances in physiology, genetics and genomics studies-, September 26, 2007, Creative Research Initiative Sousei (CRIS), Hokkaido University, Sapporo, Japan.

Choi S-J, Wasaki J, Shinano T, Ito S, Osaki M: Comparative transcriptomic analysis under phosphorus deficiency among three model plants. Rhizosphere 2, August 26, 2007, Montpellier, France.

Yamamoto Y, Rikiishi S, Demiral T, Sasaki T, Matsumoto H: A role of salicylic acid in aluminum toxicity mechanism in plant cells. In: Book of Abstracts for 18th World Congress of Soil Science, Frontiers of Soil Science, p. 222. July 9-15, 2006, Pennsylvania, USA.

[図書](計16件)

Nakamura T, Okazaki K, Benkeblia N, Wasaki J, Matsuura H, Uchimiya H, Komatsu S, Shinano T: Metabolomics Approach on Soybean. In Bileu K, Ratnaparkhe MB, Kole C (eds.) Genetics, Genomics and Breeding of Soybean. Science Publisher Inc. (印刷中)

佐々木孝行、山本洋子: アルミニウム耐性の分子機構. 有機酸トランスポーターに

よる制御、蛋白質 核酸 酵素、52 巻、共立出版、2007、619-624

信濃卓郎、櫻井道彦、岡崎圭毅、鈴木克昌: 有機農業への新アプローチ、Materials Integration、27 巻、TIC 出版、2007、49-54

6. 研究組織

(1) 研究代表者

我妻 忠雄 (WAGATSUMA TADAO)

山形大学・農学部・教授

研究者番号: 70007079

(2) 研究分担者

山本 洋子 (YAMAMOTO YOUKO)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号: 50166831

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

信濃 卓郎 (SHINANO TAKUROU)

北農研センター・根圏チーム・チーム長

研究者番号: 20235542

和崎 淳 (WASAKI JUN)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号: 00374728