

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05379

研究課題名（和文）乾燥ストレス初期に誘導されるリン酸欠乏応答の生理学的意義の解明

研究課題名（英文）Physiological significance of the phosphate starvation response induced in the early stages of mild drought stress.

研究代表者

永利 友佳理（Nagatoshi, Yukari）

国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・主任研究員

研究者番号：90723859

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：水分欠乏は、植物の生育や生存を脅かす最も深刻な環境ストレスである。本研究では、圃場で生じるマイルドな乾燥ストレス応答の理解を目的として、圃場の乾燥ストレスを受けたダイズにおいて見いだした新規知見について、シロイヌナズナを用いて詳細に解析した。経時的な土壌水分変動に対する、地上部のバイオマス量、リン酸含量や植物ホルモン含量の測定およびトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、マイルドな乾燥ストレスが進行する際に、リン酸欠乏応答がABA応答に先行して生じることを明らかにした。また、変異体を用いた解析により、乾燥ストレスにおけるリン酸欠乏応答遺伝子発現の生理学的意義に関する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の乾燥ストレス応答に関する分子生物学研究は、主に実験室内で、植物に葉の萎れや枯死を誘導するシビアな乾燥条件で行われてきた。一方で、圃場で生じるマイルドな乾燥ストレスの分子機構は不明な点が多い。本研究で提唱した新たな知見は、圃場などの自然環境下における植物の水ストレス応答機構の理解に貢献するだけでなく、植物の栄養応答と乾燥ストレス応答分野を融合した研究の新たな展開が見込まれる。さらに、圃場において有用な乾燥ストレス耐性作物の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Water deficit is the most serious environmental stress affecting plant growth and survival. To understand the mild drought stress response that occurs in the field, we analyzed in detail the novel findings we found in soybean under field drought stress using *Arabidopsis thaliana*. Measurements of above-ground biomass, phosphate and phytohormone content, and transcriptome analysis were conducted in response to soil moisture levels. We demonstrate that the phosphate starvation response precedes ABA response under mild drought stress progression. We also proposed the physiological significance of phosphate starvation response in drought stress by analyzing mutant plants.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：乾燥ストレス リン酸欠乏 ABA 圃場

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

モデル植物を用いた分子生物学的解析により、ABA シグナルを中心とした乾燥ストレス応答機構の詳細が明らかにされてきた。これらの解析は、実験室において、水やりを止めることで急激にポット内の土壌水分が減少し、植物に葉の萎れや枯死を誘導する土壌水分条件で行われてきた。一方、自然環境（圃場）で発生する乾燥ストレスには、少雨や雨無しによる緩やかな土壌水分の減少により一定期間低水分になり、植物に生育抑制や収量低下を誘導する土壌水分条件が多い。圃場の乾燥ストレスに対する植物の応答機構を理解するために、近年、土壌低水分条件下での遺伝子発現や代謝産物の解析が進められている。低水分条件下における植物の応答機構は、従来の乾燥ストレス条件で明らかにされてきた ABA を中心としたそれとは異なることが解ってきたが、中心的な役割を担う因子は未だ不明である (Harb et al, 2010; Skirycz et al, 2011; Dubois et al, 2013; Claeys et al, 2014)。

2. 研究の目的

申請者は圃場で乾燥ストレスを受けたダイズの解析から、乾燥ストレス初期や低水分時特異的にリン酸欠乏応答が誘導されることを見いだした。本研究では、圃場で見いだした新知見の普遍性を含め、乾燥ストレス応答におけるリン酸欠乏応答の位置付けを遺伝子レベルで明らかにし、その生理学的意義に関する知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナを材料として、まずはじめに圃場で得られた解析データをもとに、マイルドな乾燥ストレス試験条件を確立するための条件検討を実施した。確立した条件下において、トランスクリプトーム解析、ABA 含量やリン酸含量の定量および遺伝子欠損変異体を用いた解析を実施した。

具体的には以下の実験を実施した。

- (1) 圃場条件を反映したシロイヌナズナの低水分ストレス誘導系の条件設定
- (2) マイルドな乾燥ストレス条件下における網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq)
- (3) マイルドな乾燥ストレス条件下におけるリン酸含量および ABA 含量の解析
- (4) リン酸欠乏応答シグナル変異体を用いた解析

4. 研究成果

- (1) 圃場条件を反映したシロイヌナズナの低水分ストレス誘導系の条件設定

近年、マイルドな乾燥ストレス（土壌低水分条件下）が注目されており、これらの条件下における遺伝子発現や代謝産物の解析も進められている。しかし、リン酸欠乏応答と乾燥ストレス応答の関連についての決定的な報告はない。申請者は、圃場のダイズで得られた結果が再現可能な土壌水分や土壌養分の検討を行った。その結果、バーミキュライトと液肥の組み合わせにより、再現性良く安定してシロイヌナズナに低水分ストレスを誘導し（萎れや枯れではなく、生育の抑制を誘導）かつ、圃場のダイズと同様に、リン酸欠乏応答遺伝子が誘導される条件を確立した（図 1）。通常シロイヌナズナの栽培で使用している培養土など栄養を多く含む土では、圃場で見られた現象は再現できなかったことから、圃場のデータに基づいた土壌養分の制御も重要であることが明らかになった。

- (2) マイルドな乾燥ストレス条件下における網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq)

これまでに、乾燥ストレス条件下で植物体内のリン酸含量が減少すること、リン酸の施肥が乾燥による生育抑制を軽減すること等が、マメ類やイネ科、樹木など複数の植物種で報告されている。乾燥とリン酸欠乏の関係は示唆されてはいたが、遺伝子発現レベル

での報告はなく、詳細やそのメカニズムは不明であった (He & Dijkstra, 2014 New Phytol)。

申請者は、マイルドな乾燥ストレスとリン酸欠乏の関係を明らかにするため、確立した栽培条件において、ストレス処理後（乾燥区は水なし）1日目、3日目、6日目、7日目の地上部のサンプルを用いて、RNA-seq解析を実施した。それぞれのストレスレベル（サンプリング日）において発現が有意に変化した遺伝子群について、クラスタリング解析を実施した結果、ストレス処理開始の初期（1日目）から、遺伝子発現が誘導されるクラスターに、リン酸欠乏応答遺伝子が有意に濃縮されていることを明らかにした。一方、ABA 応答遺伝子が濃縮されているクラスターは、ストレス処理の後期（6日目、7日目）から遺伝子発現

が誘導されていた。この結果は、マイルドな乾燥ストレス初期において、リン酸欠乏応答が ABA 応答より先行して誘導されることを示しており、圃場のダイズで得られた結果とも一致する。さらに、興味深いことに、6日目まで乾燥ストレスを処理したシロイヌナズナに水を与えると（再給水テスト）、6日目の乾燥時に誘導されていた ABA 応答遺伝子群およびリン酸欠乏応答遺伝子群の発現が、7日目には抑制された。このことは、マイルドな乾燥ストレス初期に誘導されるリン酸欠乏応答遺伝子発現は、水分ストレスによる生育差の影響ではなく、土壤水分に応答して変動することを示唆している。

(3) マイルドな乾燥ストレス条件下におけるリン酸含量および ABA 含量の解析

ストレス処理を行ったシロイヌナズナ地上部の ABA およびリン酸含量の定量を行った結果、リン酸含量は乾燥ストレス初期（1日目）から減少傾向を示した。一方で、ABA 含量は、ストレス処理の後期（6日目、7日目）から上昇することを明らかにした。この結果は、上述の遺伝子発現の結果と一致しており、水分ストレスによる生体内のリン酸含量および ABA 含量の変動が、遺伝子発現に影響していることが示された。

(4) リン酸欠乏応答シグナル関連変異体を用いた解析

植物の乾燥ストレス応答におけるリン酸欠乏応答の生理学的役割を明らかにするため、リン酸欠乏応答の主要な制御因子について、変異体を取り寄せ、多重変異体を作成した。これらの変異体を用いて、マイルドな乾燥ストレス応答や ABA に対する応答を解析した結果、培地に添加した ABA に対して、作出した多重変異体は野生株と感受性が異なる結果を示した。また、確立したマイルドな乾燥ストレス条件においても、多重変異体は野生株と異なる応答を示すことを明らかにした。これらの結果から、リン酸欠乏応答は、マイルドな乾燥ストレス応答および ABA 応答において、生物学的に重要な役割を担う可能性が示唆された。

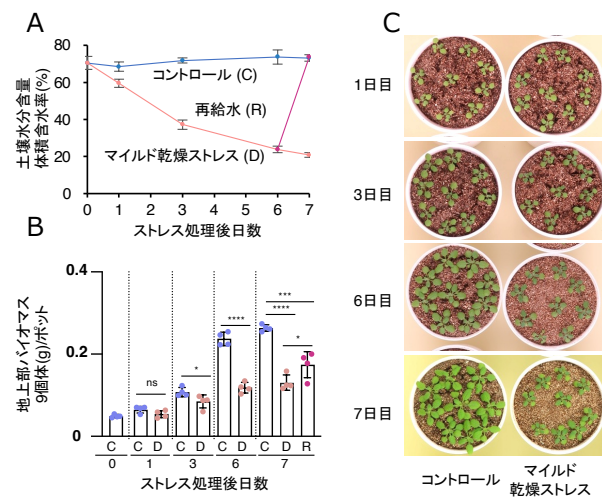


図1:マイルドな乾燥ストレス条件の設定と生育
A: 設定した栽培条件における各サンプリング時の土壤水分変動 ($n = 4$, Bar = SD)
B: 各サンプリング時の地上部のバイオマス (C, コントロール; D, マイルド乾燥ストレス; R, 再給水を示す) ($n = 4$, Bar = SD, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; ns, not significant; two-tailed Student's t -test or one-way ANOVA with Tukey's test (for 7-dat).
C: 各サンプリング時の生育の様子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagatoshi, Y., Fujita, Y.	4. 巻 13 (11)
2. 論文標題 Protein kinase CK2 subunits constitutively activate ABA signaling in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Signal. Behav.	6. 最初と最後の頁 e1525998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2018.1525998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagatoshi, Y., Fujita, M., Fujita, Y.	4. 巻 248 (3)
2. 論文標題 Casein kinase 2 and subunits inversely modulate ABA signal output in Arabidopsis protoplasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 571-578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00425-018-2919-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagatoshi, Y., Fujita, Y.	4. 巻 60 (1)
2. 論文標題 Accelerating Soybean Breeding in a CO ₂ -Supplemented Growth Chamber	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Cell Pysiol.	6. 最初と最後の頁 77-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nagatoshi, Y., Mizuno, N., Ikazaki, K., Oya, T., Yasui, Y., Ogo-Tanaka, E., Ishimoto, M. and Fujita, Y.
2. 発表標題 Transcriptome analysis of soybean responses to water deficit conditions in the field.
3. 学会等名 10th Asian Crop Science Association Conference (ACSAC 10) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永利友佳理 藤田泰成
2. 発表標題 CO2 供給人工気象器を用いた年5回のダイズの交配と世代促進
3. 学会等名 日本作物学会第251回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永利友佳理 藤田泰成
2. 発表標題 ダイズの交配および年5回の世代促進を人工気象器で実現する
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永利友佳理
2. 発表標題 過酷環境に耐える高栄養作物キヌアで気候変動に立ち向かう
3. 学会等名 日本熱帯農業学会第129回講演会 公開シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永利友佳理、藤田泰成
2. 発表標題 CO2 供給人工気象器を用いたダイズの世代促進技術の開発
3. 学会等名 第137回日本育種学会講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永利友佳理、藤田泰成
2. 発表標題 CO2 供給人工気象器を用いたダイズの世代促進技術の開発
3. 学会等名 第249回日本作物学会講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukari Nagatoshi, Miki Fujita, Yasunari Fujita
2. 発表標題 The opposite roles of Protein kinase CK2 and subunits in ABA signaling in Arabidopsis.
3. 学会等名 Plant, Cell & Environment 40th Anniversary Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永利友佳理・藤田美紀・藤田泰成
2. 発表標題 Casein Kinase 2 の2つのサブユニット と は、ABAシグナルを逆に制御する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永利友佳理・藤田美紀・藤田泰成
2. 発表標題 Protein kinase CK2 の2つのサブユニット と はABAシグナルを逆に制御する
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永利友佳理・藤田泰成
2. 発表標題 Accelerating Soybean Breeding in a CO2-Supplemented Growth Chamber
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小林 安文 (Kobayashi Yasufumi)	国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・研究員 (82104)	
研究協力者	藤田 泰成 (Fujita Yasunari)	国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・プロジェクトリーダー (82104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------