様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：１５３０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2019～2022
課題番号：１９Ｈ０３２５０

研究課題名（和文）イネの環境応答統合メカニズムにおける節の役割

研究課題名（英文）Role of node for integration of environmental responses in rice

研究代表者
山地　直樹（Yamaji, Naoki）

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：００４４４６４６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,300,000円

研究成果の概要（和文）：イネを対象に、環境応答を統合する節の役割を解明するため、種々のストレス条件下における節のトランスクリプトーム解析等を行い、節において特に顕著に発現し、転写調節因子、受容体、ペプチドホルモンなどをコードする機能未知遺伝子を選定した。遺伝子破壊株等を用いた機能解析の結果、カリウム/カルシウムなどの転流に複合的に影響する輸送体、栄養条件によってスプライシングパターンが変化する転写調節因子等を見出した。なかでも節に高発現するSSS(Shoot Silicon Signal)は、ケイ素に対する顕著な発現応答を示し、タンパク質が根に移行して根のケイ酸吸収を調節していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
イネ科植物の節は栄養素分配の集約的な機能を担い、茎、葉、腋芽、根の結節点として成長の可塑性を生み出す要でもある。さらに情報分子の主要な伝達経路として、情報に対する応答や新たな情報の発信、変換、転送などを担う情報処理ネットワークにおけるNodeでもあると予想される。植物の節の情報処理に着目した研究はこれまでに無く、本研究により節の情報処理を担う分子実体のいくつかを見出すことができた。本研究のさらなる発展は、イネ科作物の生産性やストレス耐性の改善にもつながる。

研究成果の概要（英文）：To understand role of node for integration of environmental responses in rice, We conducted transcriptome analyses in nodes under several stress conditions, and selected several candidate genes prominently express in nodes encoding transcription factor, receptor, peptide hormone etc. uncharacterized previously. Through the functional characterization experiments using newly prepared knockout lines, we identified a transporter gene which have multiple effects on K/Ca/P/As translocation, a transcription factor which change the splicing patterns depend on nutrition conditions and so on. Among them, SSS (Shoot Silicon Signal) showed remarkable response to silicon supply level. We demonstrate that SSS protein move to the roots and regulate the root silicon uptake ability.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：節　イネ　環境応答　応答調節

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

「個体」が不可分な行動単位である動物とは異なり、植物の「個体」は緩やかに統合された器官の集合体である。この集合体がもつ頑健性や可塑性の発露として、植物は、一年生–多年生、草本–木本、常緑–落葉、種子繁殖–栄養繁殖、一斉開花、休眠など、多種多様な生態を獲得した。これは大地に根を張り、移動せず、環境の変化に順応して生きる植物の生存戦略の根幹をなすと考えられる。この戦略を成り立たせるためには、１つ１つの植物細胞が備える分化全能性に加えて、器官毎の状態を認識し、個体として一貫性のある環境応答を制御するための自律分散型の情報処理システムが必要であるが、その実体や個体レベルで統合するメカニズムはほとんど解明されていない。その要因の１つは、細胞レベルと個体レベルの環境応答の仲立ちとなる、「情報処理の場」が特定できないことにある。一方で植物の研究で最も多用されるモデル植物シロイヌナズナをはじめとする双子葉植物とは異なり、イネ科植物は「節」を構成単位とするモジュール化された体制をとり、「節」が「情報処理」においても主要な舞台となっていることは想像に難くない。イネ科植物は「節」を構成単位(phytomer)とし、節と、節に付随する一枚の葉、冠根、分げつ(腋芽)、節間が繰り返されるモジュール化された体制をとる(下図参照)。成長した分げつには主茎と同じ節の繰り返し構造が作られ、冠根を伸ばすことで養水分の吸収も独立して行える。この合理的な繰り返し構造は、節と節を連絡する通導組織にも当てはまる。イネ科植物の節は栄養素の分配において集約的な役割を担い、節における維管束間輸送(inter-vascular transfer)によって、上位の節に続く新葉や穂への選択的・優先的な栄養素の分配を実現している(下図参照)。また栄養素に限らず、代謝産物やホルモン、ペプチドシグナル、small RNA などのシグナル物質の長距離輸送においても節の発達した維管束は避けて通れない主要な伝達経路である。さらに節は、茎と葉、腋芽、根の結節点として成長の可塑性を生み出す要でもある。したがって節は、情報分子の主要な伝達経路であり、単に長距離シグナルを通過させるだけでなく、情報に対する応答や新たな情報の発信、変換、転送などを担う情報処理ネットワークにおける“Node”でもあると予想される。

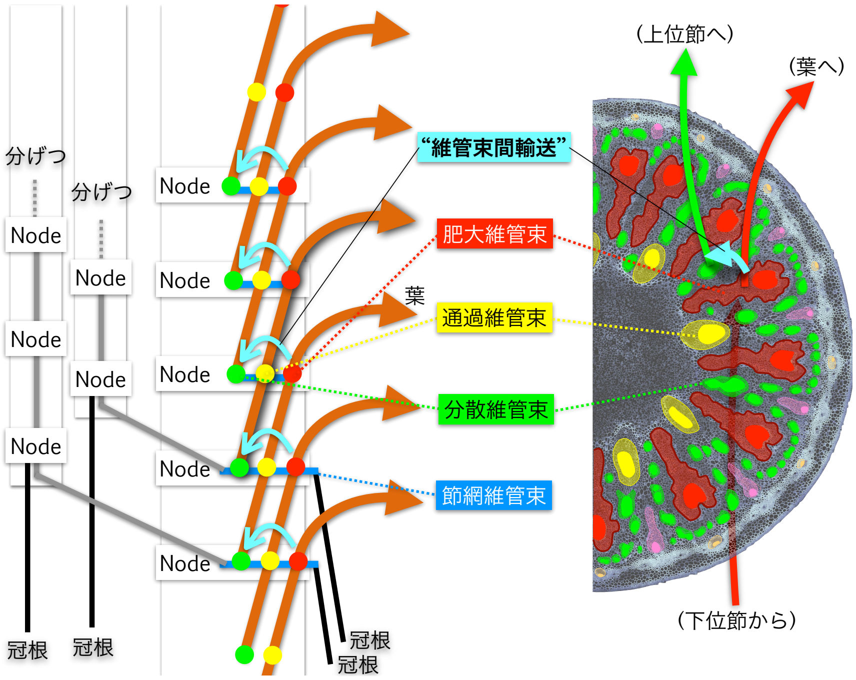

図　イネ節維管束の模式図(左)と組織断面写真(右)

２．研究の目的

本研究では、節をイネ科植物の成長可塑性を支える中心的な器官として、また文字通り、情報伝達や情報処理の node として捉え、その役割とメカニズムを解明する。

３．研究の方法

(1) イネ節において環境変化に応答性を示す遺伝子のスクリーニング

イネ(品種 日本晴)を1/2木村B水耕液を用いて出穂期まで水耕栽培し、穂の切除、葉の切除、多量栄養素の欠乏、微量栄養素の欠乏、*star1*変異体の5通りの短期的なストレス処理を行った。穂と止葉の節点にあたる最上位節（節I）と節間伸長しない下位節（節V~VI）から抽出したRNAサンプル各３反復(合計36サンプル)を、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析に供し、対照区に対して各処理区で発現が有意に変動した遺伝子を抽出した。また節内の発現組織特異性は、節の組織をレーザーマイクロダイセクションによって分画したRNA-seq解析データに基づいて判断し、節以外の他器官での発現に関しては公開データベースを参照した。本研究では節において特に顕著に発現し、転写調節因子、受容体、ペプチドホルモンなどをコードする機能未知遺伝子に注目し、各処理区ごとに２つ程度の候補遺伝子を選定した。

(2) 細菌型 ABC 輸送体遺伝子 STAR1 の節における機能解析

イネの根の主要なアルミニウム耐性因子で､アルミニウム毒性が及ばない節でも高発現する *STAR1* 遺伝子を解析対象とする。*STAR1* promoter-*GFP* 形質転換イネや STAR1 抗体を用いて節における STAR1 の組織･細胞局在性を明らかにした。変異体において、節の維管束間に著しく発達した原形質連絡(柔細胞橋)や維管束篩部におけるカロース蓄積性の違いを抗カロース抗体を用いた免疫組織染色等で調査し、また、節間の切り口から吸収させた Rb、Sr、Al、蛍光色素などの短期間の分配様式などを指標として節の導管や篩管、柔細胞橋の通導性の変化を評価した。

(3) イネ節の環境応答性遺伝子の機能解析

(1)で選定した候補遺伝子について、詳細な遺伝子発現やコードするタンパク質の機能、生理的役割の解析を行った。定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。また CRISPR/Cas9 法による遺伝子破壊株の作成を行った。これらの株を用いて、野生型イネで遺伝子発現応答がみられるストレス条件下および非ストレス条件下において、器官毎の成育や栄養素の分配などを詳細に解析した。遺伝子/タンパク質の組織局在・細胞内局在は promoter-GUS 形質転換イネや免疫組織染色、GFP 融合タンパク質などを用いて解析した。

(4) イネ節の環境応答遺伝子のシグナル経路の解析と相互作用因子の探索

(3)の遺伝子のうち転写調節因子など、二次的な遺伝子発現応答が予想されるものについて、変異体のトランスクリプトーム解析などによって下流のシグナル経路を解析した。またタンパク質相互作用が予想されるものは酵母 two-hybrid 法や免疫沈降などによって相互作用因子の探索を行った。

(5) イネ節で高発現する Lsi6 プロモーターを制御する転写調節因子の単離

以前の研究から、イネ節のケイ酸輸送体 Lsi6 の肥大維管束木部転送細胞における高発現に必要なシス領域が Lsi6 の上流約 250bp の範囲に存在する蓋然性が高いことを明らかにした。この 250bp の配列に結合するトランス因子の単離を酵母 one-hybrid 法によって試みた。

４．研究成果

イネのアルミニウム耐性遺伝子 *STAR1* については節の維管束組織でも高発現していることが確認できた。しかし、節における無機栄養素の分配実験等を行ったが、野生型イネと *star1* 変異体との間に有意な違いは認められず、節における STAR1 の機能解明には至らなかった。トランスクリプトーム解析では *star1* 変異体において節での発現が大きく変動する遺伝子を複数見出した。

イネ節の肥大維管束木部転送細胞に極めて高発現し、ケイ酸の分配を制御する輸送体 Lsi6 の遺伝子発現を制御する転写調節因子の探索については、酵母 one-hybrid システムによるスクリーニングを計画していたが、Lsi6 プロモーターの候補領域が酵母において著しい偽陽性を生じることが判明した。しかしこの目的は 個別の遺伝子の発現制御よりも節に特徴的な組織に特異的な遺伝子発現制御の解明であるため、Lsi6 プロモーター解析に代えて下記のトランスクリプトーム解析で見出した候補遺伝子のうち、節の肥大維管束木部で特異的に発現すると推定される機能未知の転写調節因子の機能解析を行うこととした。

節の環境応答に関与する遺伝子を見出すため、出穂期のイネに対し、短期的なストレス処理を行った最上位節(節 I)と下位節(節 V~VI)の RNA-seq 解析を実施した。各処理区で発現が有意に変動した転写調節因子、受容体、ペプチドホルモン、などをコードする数十の機能未知遺伝子を選抜した。さらに定量的 RT-PCR によるより詳細な遺伝子発現解析を行い、既存の発現データベース等の情報も加味して検討した結果、節において他の器官よりも特に発現レベルが高く、いずれかのストレス処理に顕著に応答する 13 の遺伝子を選抜した。これらの遺伝子について CRISPR/Cas9 法による遺伝子破壊株の作出し、順次生理機能解析を進めた。その中には、カリウム/カルシウム/リン/ヒ素などの転流に複合的に影響する輸送体、栄養条件によってスプライシングパターンが変化する転写調節因子、乾燥応答への関与が報告されている天然変性蛋白質、いくつかのペプチドホルモン様タンパク質などが含まれている。なかでも節に高発現するする遺伝子の一つ SSS(Shoot Silicon Signal)は、ケイ素に対する顕著な発現応答を示し、タンパク質が根に移行して根のケイ酸吸収を調節していることを明らかにした。SSS による個体レベルの生理応答、遺伝子発現調節、長距離シグナル伝達メカニズム、下流の制御因子など統合的な解析にも着手した。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　1件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 山地直樹・三谷奈見季・小西範幸・馬建鋒
２．発表標題 イネのケイ素吸収を制御する長距離シグナルタンパク質の同定
３．学会等名 日本植物生理学会
４．発表年 2023年

１．発表者名 Peitong Wang, Naoki Yamaji, Namiki Mitani-Ueno, Noriyuki Konishi, Jian Feng Ma
２．発表標題 A K+/Ca2+ transporter OsSKOR is involved in Ca accumulation in rice grain.
３．学会等名 19th International Workshop on Plant Membrane Biology 2023（国際学会）
４．発表年 2023年

１．発表者名 Ji Feng Shao, Naoki Yamaji, Sheng Huang and Jian Feng Ma
２．発表標題 OsBOR1 is involved in organ- and tissue-dependent distribution of boron in rice
３．学会等名 日本植物生理学会年会
４．発表年 2021年

１．発表者名 山地直樹　三谷奈見季　馬建鋒
２．発表標題 ケイ素蓄積に伴うイネ葉身のトランスクリプトーム解析
３．学会等名 日本土壌肥料学会年会
４．発表年 2021年

１．発表者名 山地直樹
２．発表標題 イネ科植物の酸性土壌適応メカニズムとその進化的考察
３．学会等名 生化学会シンポジウム（招待講演）
４．発表年 2021年

１．発表者名 山地直樹
２．発表標題 レーザーアブレーション-ICP-MSによる植物組織の元素イメージング
３．学会等名 日本土壌肥料学会
４．発表年 2020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
研究分担者	三谷　奈見季 (Mitani Namiki) (40581020)	岡山大学・資源植物科学研究所・准教授 (15301)	
研究分担者	横正　健剛 (Yokosho Kengo) (50790622)	岡山大学・資源植物科学研究所・准教授 (15301)	削除：2021年8月20日

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