

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06039

研究課題名(和文) オイルボディを介した植物のレジリエンス獲得の分子機構の研究

研究課題名(英文) Molecular mechanism of plant resilience from chilling stress via oil bodies

研究代表者

高橋 秀行 (Takahashi, Hideyuki)

東海大学・農学部・准教授

研究者番号：00455247

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)：多年生植物の休眠と脂質貯蔵器官であるオイルボディとの関与が見出されている。本研究ではリンドウのオイルボディ関連遺伝子GtOBAP1の機能解析からオイルボディを介した休眠調節機構の解明を目指した。GtOBAP1変異体(obap1)の解析から、1) obap1では低温ストレス解除後の成長回復が抑制されること、2) 野生型ではオイルボディに蓄積したトリアシルグリセロール(TAG)は低温ストレス解除で減少したが、obap1では蓄積したままであることが明らかとなった。即ち、GtOBAP1はTAG分解に関与しており、TAG由来のエネルギーが低温ストレスからの成長回復や冬芽の萌芽に用いられることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物におけるオイルボディの機能は大部分が未知であるが、本研究により成長回復や冬芽の萌芽に寄与する可能性が見出された。また、植物のストレス耐性がストレスで誘導される「抵抗力」と被ストレス状態から回復する「レジリエンス」の2段階で構成され、植物が安定したレジリエンスを得るためにオイルボディが中心的な役割を果たす可能性を示した。本成果は、植物のストレス耐性研究に新たな概念をもたらし、耐性強化育種に向けた新たな戦略となることが期待できる。また、TAGは動植物共通の貯蔵脂質であることから、藻類のオイル産生や、動物のストレスレジリエンス等の研究への波及が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Gentian ortholog of OIL BODY-ASSOCIATED PROTEIN1 (GtOBAP1) was found as candidate gene involved in dormancy and budbreak of overwintering buds. The objective of this study is to elucidate the mechanism of dormancy regulation via oil bodies and GtOBAP1. In this study, we generated obap1 mutants by CRISPR/Cas9-mediated genome editing and found that the mutants showed suppression of growth recovery after the release of chilling stress, even though chilling injury was not observed. Furthermore, hydrolysis of triacylglycerols (TAGs) in oil bodies was suppressed in the obap1 mutants. These results indicated that GtOBAP1 may be involved in supply of oil body TAG-derived energy to resume growth after the release of chilling temperature.

研究分野：植物代謝生理学

キーワード：花卉 休眠 オイルボディ リンドウ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多年生植物は、冬芽などの休眠器官を形成し休眠することで耐冷性・耐凍性を獲得し越冬する。これまで申請者は、多年生植物であるリンドウ (*Gentiana triflora*) の冬芽の休眠調節及び耐冷性機構に関するトランスオミクス研究から、冬芽の休眠期及び萌芽期の脂質代謝に顕著な変動を確認した。さらに、冬芽の RNA-seq 解析から、シロイヌナズナでオイルボディ形成との関与が報告されている *OILBODY-ASSOCIATED PROTEIN1* のリンドウホモログ (*GtOBAP1*) が休眠期に増加することが見出された。そこで先行研究として、*GtOBAP1* を機能消失させたゲノム編集体 (*obap1*) を解析したところ、低温ストレスに対する感受性には変化が無いが、低温解除後の生育 (レジリエンス) が著しく抑制されること、野生型では低温処理で蓄積したオイルボディは低温解除で消失したが、*obap1* では蓄積したままであることを見出した。これらの知見は、植物が安定したレジリエンスを得るためにオイルボディ及び OBAP が中心的な役割を果たす可能性を示していた。また圃場栽培されたリンドウ冬芽では多量のオイルボディが観察されると共に、萌芽前に *GtOBAP1* の高い発現が認められることから、圃場レベルにおいても萌芽誘導過程におけるオイルボディを介したレジリエンス機構の重要性が示唆された。

2. 研究の目的

本課題では、多年生植物のモデルとしてリンドウを用い、植物のレジリエンス獲得におけるオイルボディの役割を、*GtOBAP1* の機能同定と、ストレス解除後に作用するトリアシルグリセロール (TAG) を源とするエネルギー代謝調節の観点から解明する。さらに、冬芽の休眠から萌芽に至る過程におけるオイルボディの役割を解明し、レジリエンスを加味した新たな休眠調節モデルを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

1) オイルボディ形成及びレジリエンスを誘導する環境ストレスの探索

温度、光、乾燥などの環境ストレス条件下でリンドウを培養し、オイルボディ形成が誘導されるストレス条件を探索した。また、ストレス解除後の生育回復を調査し、レジリエンスが作用する条件を探索した。

2) *GtOBAP1* の機能解析

GtOBAP1 の機能を消失させるため、CRISPR-Cas9 の系を用いてゲノム編集体 (*obap1*) を作出した。また、CmYLCV プロモーターを用いた高発現体 (*GtOBAP1-OX*) を作成した。野生型と *obap1* 及び *GtOBAP1-OX* を用いて、低温ストレス処理時からストレス解除までの脂質関連代謝物の挙動を解析し、*GtOBAP1* が代謝に及ぼす影響を明らかにした。

3) レジリエンスにおけるエネルギー産生経路の探索

TAG の分解で生じた脂肪酸は β 酸化を経て ATP 合成に用いられる。この過程に関わ

る遺伝子について発現解析を実施した。また、モノアシルグリセロール (MAG), ジアシルグリセロール (DAG), TAG, TAG から遊離した脂肪酸などについて、ストレス処理時及びストレス解除後の挙動を経時的に解析した。

4) 冬芽休眠におけるレジリエンス機構の解明

2) ~ 3) で見出されたレジリエンス調節機構について、圃場栽培されたリンドウ冬芽の自発休眠期~萌芽期における挙動を調査し、実環境下における休眠・萌芽とレジリエンスの関係を調査した。

4. 研究成果

1) オイルボディ形成及びレジリエンスを誘導する環境ストレスの探索

低温, 高温, 強光, 乾燥などのストレス条件下でリンドウを培養し, Nile red による染色の後, オイルボディの形成を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果, 低温ストレスでのみオイルボディの形成が確認された。しかしながら, ストレス条件については, その強度について検討する必要がある。特に温度については, 元来高山植物であるリンドウは高温に対する耐性が低いため, 多くの個体が枯死した。今後さらに詳細な条件を検討する予定である。

低温ストレスによるオイルボディ形成に関して, リンドウ培養個体を用いて観察を実施したところ, 0°C で4日間処理するとオイルボディが安定して形成され, その後 20°C の条件に移動させるとオイルボディが消失することが明らかとなった。

2) *GtOBAP1* の機能解析

GtOBAP1 の機能を明らかにするため, *GtOBAP1*-OX 系統を作成した。7 系統を選抜し, リアルタイム PCR による発現解析から, 最も発現量の高い 2 系統を選抜した。

これまでの報告から *OBAP1* は脂質貯蔵器官であるオイルボディと深く関わっていることがわかっている。そこで, オイルボディに貯蔵される主な脂質である TAG と, TAG 合成の基質である MAG および DAG について, *GtOBAP1* との関与を調査した。低温ストレス処理時からストレス解除までの挙動を経時的に調査したところ, MAG と DAG は低温ストレス処理時に蓄積が見られたが, 野生型と *obap1* で明確な差は見られなかった。一方, オイルボディの主な貯蔵脂質である TAG に関して, 低温ストレス処理時の蓄積には野生型と *obap1* で顕著な差は検出されなかったが, 低温ストレス解除後において, 野生型では TAG が減少したが *obap1* では蓄積したままであった。この結果は *obap1* において低温ストレス解除後にオイルボディが蓄積する結果と一致していた。また, TAG 合成酵素である *DGAT* の発現量は野生型と *obap1* で差がなかったことから, TAG 合成ならびにオイルボディ形成に *GtOBAP1* は直接関与していないことが予想された。

3) レジリエンスにおけるエネルギー産生経路の探索

TAG から遊離した脂肪酸は, ペルオキシソームにおける β 酸化を経て ATP 合成に用いられる。そこで, 野生型と *obap1* を用いて, TAG に由来すると予想される脂肪酸を定量した。低温ストレス処理時には測定した全ての脂肪酸が増加したが, 野生型と

*obap1*で明確な差は見られなかった。一方、低温ストレス解除後では、野生型では脂肪酸の増加が認められたが、*obap1*では脂肪酸が減少していた。これらの結果から、*GtOBAP1*はTAG分解に関与することが推測された。さらに、 β 酸化に関与する酵素遺伝子の発現量を調査したところ、低温ストレス処理時からストレス解除までに明らかな変動は確認されず、野生型と*obap1*で差は確認されなかった。この結果は、 β 酸化の機構は低温ストレスには影響されず、*GtOBAP1*とも関与していないことを示していた。即ち、 β 酸化に供される脂肪酸量の多少がレジリエンスに影響する可能性が示された。

4) 冬芽休眠におけるレジリエンス機構の解明

オイルボディ形成及びTAG合成との関与が予想される遺伝子について、圃場栽培されたリンドウ冬芽における経時的な発現解析を実施した。殆どの遺伝子にはレジリエンスと関連した挙動は観察されず、オイルボディ形成に関わる経路の完全な特定には至らなかった。しかし、DAGからTAGを合成する酵素をコードする*DGAT*において他発休眠期特異的な発現上昇が確認されたことから、本酵素の働きによりTAGが蓄積することが示唆された。

さらに、オイルボディ関連遺伝子の発現挙動解析を行なった。オイルボディに含まれるタンパク質をコードする遺伝子について、冬芽の葉と茎頂における発現を経時的に調査した結果、これら遺伝子の発現は自発休眠期には殆どみられないが、他発休眠期に一時的に増加した後、萌芽期に減少する傾向があることが明らかとなった。この傾向は茎頂で顕著であり、成長点におけるオイルボディの形成および分解とレジリエンスとの関与が推測された。今後、ペルオキシソームにおけるエネルギー産出経路との関与を調査することで、より詳細なレジリエンス機構の解明が進むことが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi Hideyuki、Nishihara Masahiro、Yoshida Chiharu、Itoh Kimiko	4. 巻 188
2. 論文標題 Gentian FLOWERING LOCUS T orthologs regulate phase transitions: floral induction and endodormancy release	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1887 ~ 1899
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiac007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋秀行、吉田千春、西原昌宏、伊藤紀美子
2. 発表標題 リンドウFLOWERING LOCUS Tの機能分化による成長および休眠相転換機構の解明
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会（つくば）大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋秀行
2. 発表標題 Molecular and metabolic regulation of bud dormancy in perennial plant Gentiana
3. 学会等名 XXIII Meeting of the Spanish Society of Plant Physiology/XVI Spanish Portuguese Congress of Plant Physiology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋秀行、西原昌宏、吉田千春、伊藤紀美子
2. 発表標題 リンドウの休眠制御に関連するFRUITFULLホモログの機能解析
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会（堺）大会
4. 発表年 2022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	伊藤 紀美子 (Itoh Kimiko) (10281007)	新潟大学・自然科学系・教授 (13101)	

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
---------	---------