

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380041

研究課題名(和文)膜脂質層の分子的改変による酸性土壌複合ストレスへのマルチ耐性植物の創生

研究課題名(英文) Making of multi-tolerant plants against complexed acid-soil stresses by molecular modifications of membrane lipid layers

研究代表者

我妻 忠雄 (WAGATSUMA, Tadao)

山形大学・農学部・客員教授

研究者番号：70007079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：栽培手法と分子的手法の両面から、根の膜脂質層を低リン脂質・高ステロール化させる目的で、Al耐性の弱いコシヒカリの低リン栽培植物とPAH(リン脂質のガラクト脂質への変換鍵遺伝子)、HMG(ステロール合成の鍵遺伝子)過剰発現組換え体とを作った。栽培イネのAl耐性・低pH下での低Ca耐性や、数種の組換え系統でAl耐性や低P耐性が向上した。低P耐性イネ品種では、低P条件下での含P代謝産物の分解程度に特徴が認められた。シロイヌナズナで、リンリサイクリング能に貢献する数種の遺伝子と、それらの機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to lower the content of phospholipids and to increase that of sterols in roots, we made the new plants by modification using two different techniques, i.e., culturing method and molecular method: Al-sensitive rice cultivar Koshihikari grown previously under P-deficient conditions and transformed by the overexpressions of PAH (key gene to exchange phospholipids into galactolipids) and HMG (key gene to biosynthesize sterols). Al tolerance and low-Ca tolerance under low pH conditions of P-deficient Al-sensitive Koshihikari were significantly enhanced, and Al tolerance and low-P tolerance of the several lines of the transformed Koshihikari were also enhanced. Among several tens of rice cultivars, low-P tolerant rice cultivar was found out to have a specific characteristics on the decomposition of P-containing metabolites. Several genes contributing to P-recycling ability were identified together with each function.

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 ガラクト脂質 ステロール 低リン耐性 メタボローム リン脂質 リンリサイクリング能

1. 研究開始当初の背景

(1) 酸性土壌は複合ストレス条件であり、アルミニウム (Al) 耐性だけでは植物は十分な生育が得られないことが明らかとなり、複合ストレスに多元的に耐えるための分子基盤の解明が重要となった。

(2) 一般作物の中でも特に Al 耐性の強いイネの耐性は、根端からの有機酸放出などの既知の機構では説明できないと指摘されている。一方、根の細胞膜表面電荷の小さな種で耐性が強く、根の主な膜負電荷であるリン脂質のリン酸残基に Al イオンが結合し膜透過性を増大させることが Al 障害の一要因であると示唆された (Wagatsuma et al. 2005)。また、膜脂質中のステロールの割合の大きさは、膜負電荷性や膜透過性を低め、Al 耐性強化に貢献し得る可能性が指摘されていた。

(3) 根の膜脂質層の低リン脂質・高ステロール化が Al 耐性向上に大きく貢献すること、また、これには *CYP51* が鍵となっていることを既に示した。一方、*CYP51* を過剰発現させてもステロールを増大できないことも報告された。そこで、*CYP51* 上流の *HMG* に注目した。

(4) リン (P) 欠乏のシロイヌナズナでは、リン脂質がガラクト脂質や硫黄脂質へ再構成され、P のリサイクリングが図られており、植物の低リン耐性向上へのリンリサイクリング能の向上の重要性が予想されていた。P 含有代謝産物のメタボローム解析はイネでは行われていなかった。

(5) 膜脂質層の低リン脂質・高ステロール化は、前述の Al 耐性のみならず、P の節約、膜構造維持に要するカルシウム (Ca) 必要レベルの低減など酸性複合ストレスへのマルチ耐性にも有利であると予想された。

2. 研究の目的

(1) Al 耐性を向上させるためには細胞膜中のリン脂質割合の低下、ステロール割合の増大が有効であるとの仮説を立て、脂質代謝を分子的に変動させたイネでこれを検証する。

(2) イネを用いて、リンリサイクリング能の品種間差、脂質構成の変化の特徴と低 P 耐性との関連性、低 P 耐性に占めるリンリサイクリング能の貢献度を明らかにする。

(3) リン脂質からガラクト脂質への膜脂質層の変換やステロール生合成の鍵遺伝子と考えられる *PAH* 及び *HMG* に加え、これまでに P 欠乏条件下で生育が低下するシロイヌナズナ変異株の形質から示唆された膜脂質層変換に関与する候補遺伝子について過剰発現株または変異株を育成し、機能評価を行うことにより、これら遺伝子の導入による膜脂質

層の改変がマルチ耐性の付与に資するかどうか検証する。

3. 研究の方法

(1) 植物は P 欠乏時に細胞膜脂質に含まれるリン脂質をガラクト脂質に変換するリンリサイクリング能を持つ。この機構を利用し、P 欠乏処理によって根細胞膜中のリン脂質割合を減らしたイネ (コシヒカリ) の Al 耐性を調査した。

(2) *HMG* はステロール生合成経路における鍵酵素をコードする遺伝子である。そこで、*HMG* 過剰発現イネの根ステロール量の変動と Al 耐性を調査した。

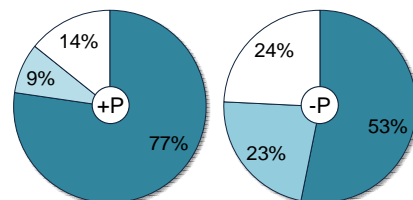
(3) イネ 42 品種をリン酸施肥と無施肥の黒ボク土で生育させ、地上部の生育と P 濃度を測定した。品種赤米、農林 1 号、コシヒカリを 0 (P0) と 8 (P8) mgP/L を含む水耕液で培養し、地上部抽出物、根部抽出物、根浸出物のメタボローム解析を行った。

(4) シロイヌナズナ由来の *AtPAH1* (リン脂質加水分解の鍵遺伝子)、*AtHMG* (ステロール合成における鍵遺伝子)、*AtOCT1* (organic cation transporter のホモログ; At1g73220)、*MtN21* のホモログ (At4g15540)、Glycerol 3-phosphate transporter (At3g47420) 遺伝子を研究対象にした。*AtPAH1*、*AtHMG* については、単独または複数遺伝子をプロモーター制御下でイネに形質転換を行い、過剰発現系統を育成した。At1g73220、At4g15540、At3g47420 については、TAIR から入手した変異株のホモ系統を確立した。いずれとも栽培した後、生育、リン濃度、膜脂質層の解析を実施した。

4. 研究成果

(1) P 欠乏イネ根部では、リン脂質含有率が有意に減少し、ガラクト脂質含有率が有意に増加した。その結果、膜脂質層を構成する全 3 成分中でのリン脂質の割合が低下した。これらのリン脂質割合を変動させたイネを用いて、以下の、の実験を行った。

■ リン脂質 □ ガラクト脂質 □ ステロール



リン脂質の減少したイネは、リン脂質の多いイネに比べ、Al ストレスによる根の伸長阻害程度が少なく、根部 Al 集積量も低下した。根端部の Al 集積程度のヘマトキシリン染色結果でも、これが確認された。

なお、 \pm P 処理間で、根の脂質過酸化レベルや根からの有機酸分泌量に有意な差は認められなかった。結局、P 欠乏処理による AI 耐性の強化は、根部リン脂質割合の低下が要因であると考えられた。

P 欠乏イネは、低 pH 条件下で低 Ca 処理による根の伸長阻害が緩和された。リン脂質の少ない植物根では細胞膜構造維持に必要な Ca レベルが低いと考えられ、低リン脂質植物は、低 pH 条件下での低 Ca 耐性が強く、酸性土壌での複合ストレスへの耐性に有利であると予想された。

PAH は、リン脂質をガラクト脂質へ変換する経路の鍵酵素をコードする遺伝子である。この PAH の過剰発現により根のリン脂質を減少させることを目的として、AI 耐性の最も弱い部類に属するコシヒカリの組換え体の作出に取組んだ。現在、組換えは第二世代まで完了している。その結果、数系統に野生型よりも高い AI 耐性が認められた。今後、PAH 遺伝子の発現量とリン脂質含量、AI 耐性の関連性を解明する。

PAH の二重劣性シロイヌナズナ変異体の根 AI 含有率、AI 耐性に関する成果を述べる。*pah1pah2* シロイヌナズナの低 P 条件下での根部 AI 含有率は、野生株 Col-0 に比べて高く、AI 耐性は逆に弱かった。膜脂質中のリン脂質は、低 P 条件下で Col-0 は著しく減少するのに対し、*pah1pah2* では減少が少ないことは既に分かっている。この結果は、根のリン脂質レベルが根部 AI 濃度を大きく左右し、植物の AI 耐性の重要な決定要因であることを示している。また、我妻、小山、Kinraide が従来から主張してきたイオン吸収や AI 耐性における Gouy-Chapman-Stern モデルの有用性を、実際の植物系での分子的研究によって証明したものといえる。

(2) ステロール変動と AI 耐性に関する成果を述べる。HMG 過剰発現組換えコシヒカリを作出し、AI 耐性評価を行った。第一世代から得られた AI 耐性の向上した 1 系統を継代し第二世代、第三世代を作成した。第二世代からは 3 系統、第三世代からは 4 系統が AI 耐性獲得系統として選抜された。これらの AI 耐性レベルは、我々がこれまでに比較した中で最も AI 耐性の強い品種である陸羽 132 号に匹敵していた。第二世代の選抜系統の根部ステロール含有率は野生型に比べて高い傾向が認められた。今後、ホモ系統を用いて HMG 遺伝子の発現量、根部ステロール含有率、AI 耐性の関連性を解明する。

(3) イネ 42 品種を P 施肥、無施肥の黒ボク土で生育比較を行い、高 P 区の地上部乾物重に対する低 P 区の地上部乾物重の相対値を低 P 耐性とした。低 P 耐性は、あきたこまち

98% から寝太郎 33% と品種間で大きく異なった。低 P 耐性は、あきたこまち、赤米、冷立稲で高く、農林 1 号で中程度、陸羽 132 号、コシヒカリ、寝太郎で低かった。次に、赤米、農林 1 号、コシヒカリを 0 (P0) と 8 (P8) mg PL⁻¹ を含む水耕液で栽培し、地上部抽出物、根部抽出物、根の浸出物のメタボローム解析を行った。地上部の抽出物、根部の抽出物、根の浸出物からそれぞれ 151、155、136 個のイオン性代謝産物が検出された。P0 区地上部で、赤米はコシヒカリに比べ、より多くの種類の代謝産物の濃度が低下した。さらに、検出された合計 134 種類の脂質のうちで、P0 区で赤米は 31-40% が増加し、11-27% が減少した。コシヒカリでは 11-20% が増加し、8-24% が減少した。主なリン脂質は、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルグリセロール(PG)、ホスファチジルイノシトール(PI)であった。主要な非リン脂質は、ジアシルグリセロール(DAG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)、モノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)、スルホキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)、トリアシルグリセロール(TAG)、グルクロン酸脂質(GlcADG)であった。低 P 耐性の異なる品種間で、含 P 代謝産物の分解程度が異なることが示唆された。また、根の浸出物は P8 区と比べて P0 区で、赤米では 18 化合物(13%)が増加し、63 化合物(46%)が減少し、55 化合物(40%)が変化しなかった。コシヒカリでは 27 化合物(22%)が増加し、26 化合物(21%)が減少し、70 化合物(57%)が変化しなかった。現在、これらの結果を詳細に解析中である。

(4) PAH および HMG の過剰発現系組換えイネ系統を、標準 P 培養液(+P 区)および P 欠除培養液(-P 区)で水耕栽培し、低 P 耐性を調査した。その結果、PAH または HMG 単独遺伝子の過剰発現株の生育は、コントロールの NOS 系統と同程度であった。これに対し、PAH・HMG 双方を過剰発現させた株では -P 条件下での生育が NOS 系統と比較して改善傾向が認められた。以上のことは、PAH・HMG の過剰発現による脂質層改変が低 P 耐性の向上に寄与する可能性を示唆する。しかしながら、本研究期間においては双方の遺伝子導入系統においてはホモ系統の確立まで到達しなかったため、遺伝子組換えの選択マーカーとして用いたハイグロマイシン耐性を持った系統で比較を行った。今後、ホモ系統の確立後再検証実験が必要であると考えている。次に、P 欠乏のシロイヌナズナ根において発現量が多い脂質代謝関連のいくつかの候補遺伝子に関して、遺伝子変異株を P 欠乏条件下で栽培した結果、*AtOCT1* (organic cation transporter のホモログ; At1g73220)、*MtN21* のホモログ (At4g15540)、Glycerol 3-phosphate transporter (At3g47420) の変異

株において、根の伸長および地上部の新鮮重の減少が認められた。そこで、+P 区および -P 区で育てたこれらの変異株における P の分配と膜脂質構成の解析を行った。その結果、At1g73220 遺伝子の変異株の P 濃度は -P 区において古い葉で高く、若い葉で低かった。膜脂質は、-P 区において糖脂質（特に DGDG）の割合が減少し、リン脂質の割合が増加していた。これらのことから、At1g73220 は、DGDG の合成に関連し、再転流を促す機能を持つと考えられた。At3g47420 の変異株では、P の再転流は抑制されていた一方で、膜脂質組成は野生株と同等であった。At3g47420 は、膜脂質再編に伴って生じた Glycerol 3-phosphate の輸送を通して P の再転流に関わっていると考えられた。At4g15540 の変異株では、-P 区で糖脂質の占める割合が野生株よりも減少し、At4g15540 が膜脂質の再編に関与することが示唆された。一方、葉位ごとの P 濃度の分配は野生株と変異株と同様であったが、老化葉のみをみると、野生株では -P 区で大幅に減ったが、変異株ではあまり変わらなかった。以上のことより、At4g15540 は、膜脂質再編の面から部分的に P 再転流に関与していると推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Maejima, E., Watanabe, T., Osaki, M. and Wagatsuma, T. Phosphorus deficiency enhances aluminum tolerance of rice (*Oryza sativa*) by changing the physicochemical characteristics of root plasma membranes and cell walls. *J Plant Physiol.* 査読有. 171. 2014. 9-15. DOI:10.1016/j.jplph.2013.09.012

Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Watanabe, T., Shaf J. E., Ohta, H., Kochian, L. V., Wagatsuma, T., Kinraide, T. B., Koyama, H. Molecular and physiological analysis of Al³⁺ and H⁺ rhizotoxicities at moderately acidic conditions. *Plant Physiol.* 査読有. 163. 2013. 180-192. DOI: 10.1104/pp.113.222893

Tawaraya, K., Horie, R., Saito, A., Shinano, T., Wagatsuma, T., Saito, K., Oikawa, A. Metabolite profiling of shoot extracts, root extracts, and root exudates of rice plant under phosphorus deficiency. *J Plant Nutr.* 査読有. 36. 2013. 1138-1159. DOI: 10.1080/01904167.2013.780613

俵谷 圭太郎, 和崎 淳. リン酸資源の枯渇に対応したリン栄養研究. 1. 講座のねらい. *日本土壤肥料学雑誌.* 査読有. 83. 2012. 173-176.

Shinano, T., Komatsu, S., Yoshimura,

T., Tokutake, S., Kong, F.J., Watanabe, T., Wasaki, J., Osaki, M. Proteomic analysis of secreted proteins from aseptically grown rice. *Phytochem.* 査読有. 72. 2011. 302-311. DOI: 10.1016/j.phytochem.2010.12.006

〔学会発表〕(計27件)

Maejima, E. Phosphorus deficiency enhances the tolerance of rice to the acidic soil stress. XVII International Plant Nutrition Colloquium 2013. Aug, 19-22. 2013. Istanbul (Turkey)

Wagatsuma, T. HMG is a promising key gene for the enhancement of aluminum tolerance of rice via modulating membrane sterols in root-tip portion. XVII International Plant Nutrition Colloquium 2013. Aug, 19-22. 2013. Istanbul (Turkey)

Wasaki, J. Comparative transcriptomic analysis of P deficient plant roots. Japan-Australia Symposium on Plant Sciences for Agriculture IV. Dec, 11-12. 2012. Perth (Australia)

前島恵理子. イネの根脂質改変とアルミニウム耐性. 日本土壤肥料学会本大会 2012年度鳥取大会, 2012年9月4-6日, 鳥取大学(鳥取市)

Tawaraya, K. Metabolite profiling of shoot extracts, root extracts, and root exudates of rice under phosphorus deficiency. 8th Symposium of the International Society of Root Research. June, 26-29. Dundee (UK)

〔図書〕(計1件)

Watanabe, T., Khan, M.S.H., Rao, I.M., Wasaki, J., Shinano, T., Ishitani, M., Koyama, K., Ishikawa, S., Tawaraya, K., Nanamori, M., Ueki, N., Wagatsuma, T. Intech, Rijeka, Croatia. Physiological and biochemical mechanisms of plant adaptation to low-fertility acid soils of the tropics: The case of Brachiariagrasses. *In Principles, Application and Assessment in Soil Science.* 2011. 87-116.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

我妻 忠雄 (WAGATSUMA, Tadao)

山形大学・農学部・その他

研究者番号: 70007079

(2) 研究分担者

俵谷 圭太郎 (TAWARAYA, Keitarou)

山形大学・農学部・教授

研究者番号: 70179919

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

渡部 敏裕 (WATANABE, Toshihiro)
北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・
准教授
研究者番号：60360939

(3)連携研究者

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

豊増 知伸 (TOYOMASU, Tomonobu)
山形大学・農学部・教授
研究者番号：60272085

黒田 昌治 (KURODA, Masaharu)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・中央農業総合研究センター稲収量性
研究北陸サブチーム・主任研究員
研究者番号：30355581

及川 彰 (OIKAWA, Akira)
山形大学・農学部・准教授
研究者番号：50442934