

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221202

研究課題名(和文)植物の無機栄養ホメオスタシスと成長の統合的理解と仮説検証

研究課題名(英文)Homeostasis of Plant Mineral Nutrients and Growth-Modeling of Overall Regulation

研究代表者

藤原 徹 (FUJIWARA, TORU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：80242163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 171,300,000円

研究成果の概要(和文)：無機栄養ホメオスタシスに必須な遺伝子を多くの元素について同定解析し、無機栄養の恒常性維持に細胞壁合成やRNA代謝、翻訳制御等の重要性を示した。リボソームRNA複合体がAUGUAA上で細胞質の栄養濃度を感知し、この感知に伴って栄養輸送体mRNAの分解や転写制御が起こることや翻訳制御のゲノムレベルでの重要性を明らかにした。ホウ素輸送の2次元及び動的モデルを構築し実験的検証を行い、根の成長と地上部への輸送の役割分担や輸送体制御の栄養の流れを高く維持するための重要性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の17種の必須元素は、いずれも輸送や蓄積の制御を通じた恒常性が見られるが、その機構は未知の部分が多く、本研究でその一端を明らかにした。また、栄養のリボソームによる感知を初めて明らかにし、翻訳と転写が協調して起こることを示したこと、AUGUAAという最も短いORFの生物学的機能を明らかにしたこと、栄養輸送の2次元及び動的モデルを構築、一部を実証したことなどが高く評価されていると考えている。また、これらの栄養応答機構の一端は作物の栄養欠乏応答にも関与しており、作物の栄養欠乏症過剰症低減にも寄与する知見を得たと考えている。

研究成果の概要(英文)：Several genes required for mineral nutrient homeostasis have been identified and characterized. Through the analysis, importance of cell wall, RNA metabolism and translational control are demonstrated. Ribosome-RNA complex are shown to recognize cytoplasmic nutrient concentration on the AUGUAA sequence and this recognition leads to mRNA degradation and transcriptional regulation. Genome-wide regulation of translational regulation in response to mineral nutrient conditions have been revealed. Two-dimensional and dynamic models of nutrient transport have been constructed and predicted outcome has in part been experimentally confirmed. These modeling analysis demonstrated the importance of root zones in nutrient transport to shoots and root growth, also importance of swift regulation of transporters in maintaining nutrient flow in roots.

研究分野：植物栄養学

キーワード：無機栄養 翻訳 uORF 栄養感知 数理モデル 実証 低栄養適応 細胞壁

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は土壌から無機元素を吸収して生育する独立栄養生物であり、人類の生存は植物の繁栄に依存している。植物には17種類の必須元素が知られているが、土壌の濃度は最適値から外れていることが多い。植物はどの元素が足りないか(多すぎるか)を感知し、吸収速度や代謝のパターンを変化させたりすることによってある程度生育を維持することができる。このような応答は、移動能力の無い植物が進化の過程で獲得した能力であり生産の基盤である。その理解には多面的解析が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究は植物の不良栄養環境に対する応答を複数の栄養素について分子レベルで解析し、その応答の分子機構を定量的に理解することを目的としている。

これまでのホウ素栄養の研究において成果を挙げた分子遺伝学的な手法を複数の元素に適用すると共に、単に栄養応答現象を支配する遺伝子の同定と機能解析にとどまらず、現象の定量的な理解と予測にまで高めることを目的とする。様々な栄養素についての変異株を検索し、得られた変異株についての分子遺伝学的な解析を行い、輸送体やその制御因子を同定する。これらの研究によって、無機栄養素のホメオスタシス機構を明らかにしていく。またホウ素を中心として、複数の輸送体の制御や発現様式を考慮しつつ、植物全体における輸送の定量的モデルを構築し、栄養環境に応じて植物がどのように無機元素輸送を制御し、植物体全体としての成長に結びつけているのかについての理解を深める。

複数の元素について分子遺伝学を用いて栄養ホメオスタシスに重要な分子を同定し、その機能解析を通じて機構を明らかにする。RNA とリボソームを介したホウ素応答機構を解明する。栄養と輸送と成長を統合した数理モデルを構築し、実験的な検証を進め、統合的な栄養輸送と利用についてのモデル構築を行う。

3. 研究の方法

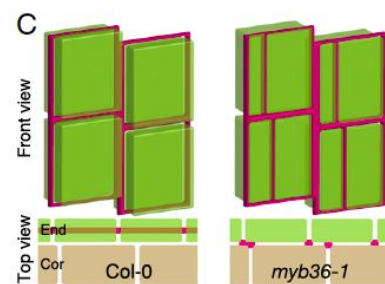
栄養変異株をイネやシロイヌナズナから同定し、その株のゲノム配列を解読するなどして原因遺伝子を同定する。さらに原因遺伝子の機能解析を行う。

RNA とリボソームを介したホウ素応答機構については NIP5;1 mRNA の 5' UTR に変異を導入し、そのホウ素応答を検討した。また、mRNA seq 等を用いた発現や翻訳解析を行った。ホウ素輸送のモデルを様々な数理手法で構築した。

4. 研究成果

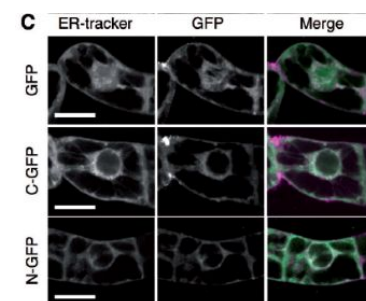
本研究では各種無機栄養のホメオスタシスに関する遺伝子と機能同定を行うこと、輸送と成長の数理モデルの構築と検証を行うことを当初の目的としていた。これまでの成果により当初の目的は達成されたものと考えている。以下に研究成果を列挙する。

1) カスパリー線を介した栄養輸送に関与する転写制御因子を発見し、この転写因子がカスパリー線形成に関わる多くの遺伝子の発現を司っており、異所発現によって本来カスパリー線を合成しない細胞に合成させることに成功した(Kamiya et al PNAS 2015)。右図は転写因子 myb36 に異常のある変異株のカスパリー線の異常を示した模式図である。



2) カスパリー線形成に不可欠な新規遺伝子を同定し、変異株の解析を通じてカスパリー線周辺に蓄積するスペリンが側根発生時の根の中心柱への物質流入を防ぐ役割があることを見いだした。

3) マグネシウムの恒常性維持に関与するマグネシウム輸送体をマグネシウム欠乏感受性の変異株を用いて同定し、その細胞内局在から ER のマグネシウム恒常性についての役割を示唆した。(右図は輸送体の細胞内局在を表している。Oda et al PCP 2016)



4) マグネシウム恒常性維持にスプライシングを司る遺伝子が重要であることを見だし、輸送体遺伝子のスプライシング制御の重要性を示唆した。

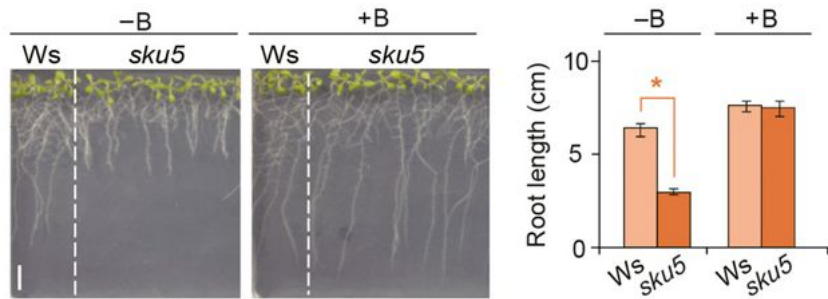
5) 銅の恒常性維持機構に重要な遺伝子として、TPST 遺伝子を見いだした。TPST は植物のペプチドホルモンであるフォスフォスルフォカインの硫黄付加を担い、エチレン合成にも関与していた (Wu et al J Exp Bot 2015)。

6) ホウ素の恒常性維持に関する細胞壁合成関連遺伝子 CTL1 の解析を通じて、ホウ素とセルロー

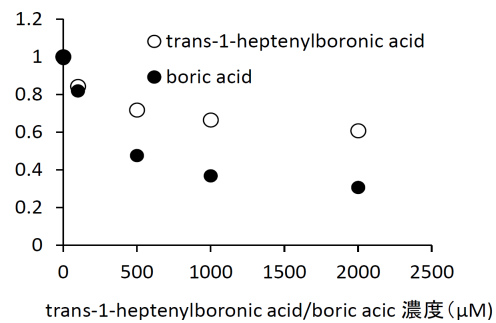
ス合成の関係を検討したところ、ホウ素を与えることで、セルロース合成酵素の微小管上の移動速度が高くなる傾向を見いだした。

7) イネの栄養条件に応じた根の成長変異株の原因遺伝子としてサイトカイニンの代謝に関わる遺伝子を同定し、この変異株でのサイトカイニンの代謝異常を見いだした。

8) ホウ素に応じた *NIP5;1* mRNA の分解機構について反応について詳細な機能解析を行い、ホウ素条件に応じた蓄積制御に *NIP5;1* の 5' UTR に存在する AUGUAA (開始-終止コドン) にリボソームが停

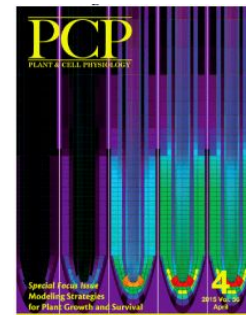


止することを見いだしていた。さらに、AUGUAA 周辺のコザック配列が重要であること、mRNA の切断には AUGUAA 上流側 13nt 程度上流の C/A に富む配列が重要であることを見いだした (Tanaka et al Plant Cell 2016)。また、5' UTR に AUGUAA を持ちホウ素栄養で発現制御を受ける遺伝子、SKU5 を見出し、その破壊株ではホウ素欠乏での生育が抑制されることを明らかにした。(上図)

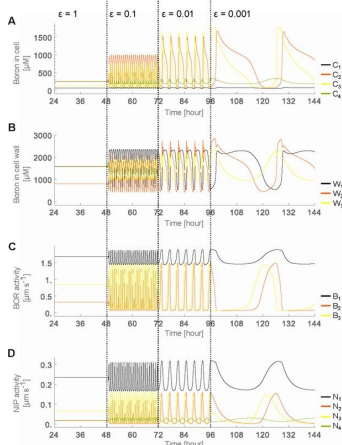


9) *NIP5;1* 遺伝子の mRNA のホウ素による制御機構の解析において、ホウ素以外にこの反応を引き起こす化合物があるかどうかを検討したところ、程度は低いものケイ酸、及び、ホウ酸の関連化合物において、AUGUAA 依存的な反応を引き起こすものがあることが明らかになった(右図)。また、ホウ素は reinitiation やそれに至る過程に影響を及ぼすことが明らかになった。

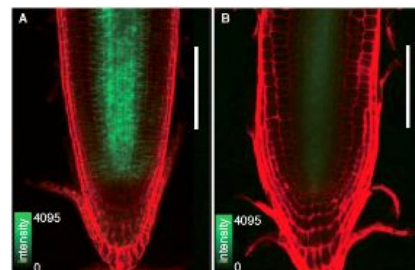
10) Laser Ablation ICP-MS (LA-ICP-MS) を用いてホウ素の濃度分布を測定したところ、モデルの予想(右図、モデルに基づいた計算による培地ホウ素の根への分布の経時変化: PCP の表紙に採用された)とよく一致した。



11) ホウ素輸送体のホウ素による制御を取り入れた数理モデルを構築し、一次元に配置された細胞列でのホウ素の輸送速度と濃度の関係検討したところ、ホウ素輸送体のホウ素により制御を取り入れた数理モデルを構築したところ、輸送体の迅速な制御がオシレーションを起こさずに輸送システムを安定に維持するために重要であることが数値解析から示された (Sotta et al., 2017, eLife) (左図、横軸で示す 4 つの細胞列のホウ素輸送を経時的に示している)。



11) 元々の発現場所とは異なる根の細胞層など特定の細胞に特異的のトランスポーターを発現させると、細胞層によって、生育の改善やホウ素輸送の促進が見られたり、見られなくなることが明らかになった。特に、表皮における発現が吸収に重要であることが示され、また、stem cell niche における発現が、吸収においては重要であることが示された。

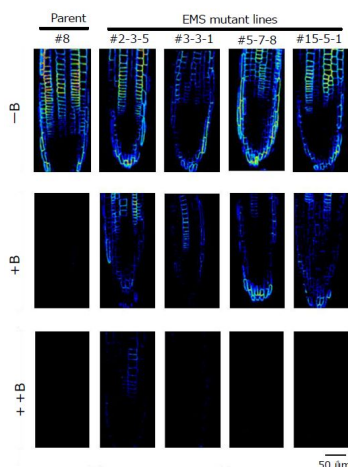


12) BOR1 の極性を変化させる C 末側の配列を同定し、この配列を無極性の輸送体に付与することで極性を制御することができた。

性を制御することができた。

13) ホウ素欠乏によって PIN1 と PIN2 が異なる制御を受けホウ素欠乏での根の生育には PIN3 が重要であることを見いだした (Li et al 2015, PCP)。右図は PIN1 の発現がホウ素欠乏で低下することを示している。

14) レポーター遺伝子 (GFP) を導入し、AUGUAA 配列依存的なホウ素応答を可視化する技術を用い、塩基置換を誘発する変異誘起剤処理を行うことで、ホウ素応答が起らない変異株を同定した。得られた変異株の内在性の *NIP5;1* 遺伝子の mRNA 蓄積を調べたところ、系統によって mRNA 蓄積に影響があるものと影響がないもの両者があることが明らかになった。この 2 系統について

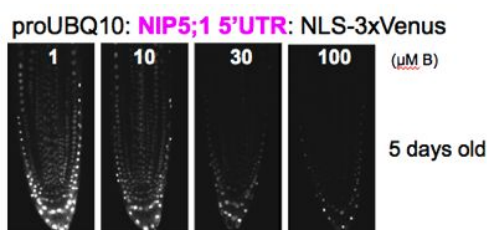


原因遺伝子を同定したところ、内在性の mRNA 蓄積に影響がある変異株では mRNA 分解に関わる遺伝子が、一方、内在性の mRNA 蓄積に影響がない変異株では翻訳に関わる遺伝子に変異があることが明らかとなった。左図は同定された変異株の培地のホウ素濃度に対する応答を示しており、Parent と示された親株とは異なる反応を示す株が得られ、原因遺伝子を同定した。

15) クライオ電子顕微鏡を用い、ホウ素依存的に AUGUAA 配列に停止したリボソームの構造解析を行ったところ、ホウ素条件によって、リボソームに結合している因子が異なっていることが明らかとなった。

16) リボソームプロファイリングより、ホウ素条件による翻訳効率を測定したところ、AUGUAA 配列を介したホウ素依存的

なりボソームの停滞を引き起こしている新規の遺伝子を発見した。また、AUGUAA 以外の 5' UTR 上でホウ素依存的にリボソームが停滞している遺伝子が複数存在することも明らかにした。



17) ホウ素栄養条件に応じた発現を可能にする配列を用いたホウ素の細胞内濃度の検定系を確立した (Fukuda et al., 2018, Plant Journal) 右図は、この検定系を用いてホウ素濃度を可視化した写真を示している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. Local boron concentrations in tuberous roots of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) negatively correlate with distribution of brown heart. Sotta, N., Bian, B., Peng, D., Hongkham, P., Kamiya, T., Niikura, S. and Fujiwara, T. *Plant Physiology and Biochemistry* 136: 58-66 (2019) doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.12.027 査読有
2. Proteasomal degradation of BRAHMA promotes Boron tolerance in Arabidopsis. Sakamoto, T., Tsujimoto-Inui, Y., Sotta, N., Hirakawa, T., M. Matsunaga, T., Fukao, F., Matsunaga, S. and Fujiwara, T. *Nature Communications* 9, Article number: 5285 (2018) doi.org/10.1038/s41467-018-07393-6 査読有
3. A rice PHD-finger protein OsTITANIA, is a growth regulator that functions through elevating expression of transporter genes for multiple metals. Tanaka, N., Uruguchi, S., Kajikawa, M., Saito, A., Ohmori, Y. and Fujiwara, T. *The Plant Journal* (2018) doi.org/10.1111/tj.14085 査読有
4. Exposure to heavy metal stress triggers changes in plasmodesmatal permeability via deposition and breakdown of callose. O'Leary, R., Kasai, K., Clark, N., Fujiwara, T., Sozzani, R. and Gallagher, K. *Journal of Experimental Botany* 69(15)3715-3728 (2018) doi.org/10.1093/jxb/ery171 査読有
5. Establishment of genetically encoded biosensors for cytosolic boric acid in plant cells. Fukuda, M., Wakuta, S., Kamiya, J., Fujiwara, T., & Takano, J. *The Plant Journal*, 95(5), 763-774. (2018) doi.org/10.1111/tj.13985. 査読有
6. Screening Arabidopsis thaliana mutants for low sensitivity to manganese identifies novel alleles of NRAMP1 and PGSIP6. Bian B, Kageshima S, Yano K, Fujiwara, T, Kamiya T. *J Exp Bot.* 69(7), 1795-1803 (2018) doi: 10.1093/jxb/ery018. 査読有
7. Preparing thin cross sections of Arabidopsis roots without embedding, Sotta, N. and Fujiwara, T., *BioTechniques*, Vol. 63, No. 6, December 2017, pp. 281-283 (2017) doi/10.2144/000114621 査読有
8. Rapid transporter regulation prevents substrate flow traffic jams in boron transport. Sotta, N., Duncan, S., Tanaka, M., Sato, T., Marée, A. F., Fujiwara, T., & Grieneisen, V. A. *eLife*, 6:e27038. (2017)doi: 10.7554/eLife.27038. 査読有
9. LjMOT1, a high-affinity molybdate transporter from Lotus japonicus, is essential for molybdate uptake, but not for the delivery to nodules. Duan G, Hakoyama T, Kamiya T, Miwa H, Lombardo F, Sato S, Tabata S, Chen Z, Watanabe T, Shinano T, Fujiwara, T. *Plant J.* 2017 Jun;90(6):1108-1119 (2017) doi: 10.1111/tj.13532. Epub 2017 Apr 12. 査読有
10. Genome-wide analysis of specific alterations in transcript structure and accumulation caused by nutrient deficiencies in *Arabidopsis thaliana* Nishida, S., Kakei, Y., Shimada, Y. and Fujiwara, T. *The Plant Journal* online20170606 (2017) doi:10.1111/tj.13606: 査読有

[学会発表](計40件)

1. Qing Wang, Naoyuki Sotta, Toru Fujiwara, Boron Transporter (BOR1) is Involved in Nitrate-dependent Growth Promotion in Arabidopsis thaliana, 第60回日本植物生理学会年会, 2019"
2. Bian Bian, Kenji Yano, Takehiro Kamiya, Toru Fujiwara, Low Magnesium Tolerance 1 physically associates with ER-localized Mg transporters and plays an important role in extending Mg stress adaptation range in Arabidopsis thaliana, 第60回日本植物生理学会年会, 2019"
3. Naoyuki Sotta, Yukako Chiba, Hirofumi Fukuda, Mayuki Tanaka, Seidai Takamatsu, Yui Yamashita, Kyoko Miwa, Masami Yokota Hirai, Satoshi Naito, Toru Fujiwara, Genome wide analysis of nutrient-dependent translational regulation, 第60回日本植物生理学会年会, 2019
4. 川田ゆかり, シロイヌナズナにおけるホウ酸トランスポーターBOR5の機能の研究, 2018ホウ素研究会, 2018"
5. 山本怜見, 低ホウ素条件下で根が伸長するシロイヌナズナ変異株の解析, 2018ホウ素研究会, 2018
6. Wang Qing, BOR1 is involved in nitrate dependent-growth promotion in Arabidopsis thaliana, 2018ホウ素研究会, 2018
7. 橋本秀一, Searching for possibility that ribosome-protein subunit affects B-dependent response in NIP5;1, 2018ホウ素研究会, 2018
8. 福田寛史, Heterogeneity of plant ribosomes and its implications for nutrient response, 2018ホウ素研究会, 2018
9. 田中真幸, シロイヌナズナのホウ素輸送体、NIP5;1の発現制御機構—転写から翻訳制御まで—, 2018ホウ素研究会, 2018
10. 反田直之, シロイヌナズナのホウ素応答における翻訳制御の網羅解析, 2018ホウ素研究会, 2018
11. Feng Zhihang, 藤原徹, A CRIM domain-containing protein physically associates with ER-localized Mg transporters and plays an essential role in extending Mg stress adaptation range in Arabidopsis thaliana, 植物の栄養研究会第4回研究交流会, 2018
12. 山本怜見, 藤原徹, ホウ素欠乏状態で根が伸長するシロイヌナズナ変異株の解析, 植物の栄養研究会第4回研究交流会, 2018
13. 福田牧葉, 藤原徹, ホウ素輸送体の細胞層特異的発現, 植物の栄養研究会第4回研究交流会, 2018
14. 反田直之, 藤原徹, ホウ素条件に応じた翻訳調節の網羅解析, 植物の栄養研究会第4回研究交流会, 2018"
15. 福田寛史・反田直之・田中真幸・千葉由佳子・三輪京子・内藤哲・藤原徹, リボソームタンパクパラログによる植物のホウ素栄養応答の可能性, 日本土壌肥料学会2018年度神奈川大会, 2018
16. 川田ゆかり 反田直之 三輪京子 Saqib 藤原徹, シロイヌナズナにおけるホウ酸トランスポーターBOR5の機能の研究, 日本土壌肥料学会2018年度神奈川大会, 2018"
17. 反田直之, 高田茂樹, 川田ゆかり, 三輪京子, 高野順平, Verônica A. Grieneisen, Athanasius M. Maree, 藤原徹, シロイヌナズナホウ酸輸送体BOR3の機能解析と、非極性局在トランスポーターによる極性輸送の可能性の検証, 日本土壌肥料学会2018年度神奈川大会, 2018"
18. 田中真幸, Susan Duncan, 反田直之, 千葉由佳子, 尾之内均, 内藤哲, Stan Maree, Veronica Grieneisen, 藤原徹, シロイヌナズナのホウ素輸送体NIP5;1におけるAUGUAA配列を介したホウ素依存的なmRNA分解に伴った転写制御機構の可能性, 第59回日本植物生理学会, 2017
19. 反田直之, 坂本卓也, 松永幸大, 藤原徹, A 26S proteasome subunit RPT5A is essential for normal leaf development under zinc deficiency, 第59回日本植物生理学会, 2017
20. Makiha Fukuda, Shinji Wakuta, Takehiro Kamiya, Jumpei Takano, Toru Fujiwara, Tissue specific expression of boron transporter reveals different roles of cell-types in overall boron transport, 第59回日本植物生理学会, 2017
21. 山口大地, 藤原徹, Function of suberin at lateral root emergence sites, 第3回植物の栄養研究会, 2017
22. 川田ゆかり, 藤原徹, BOR3が植物の生育に及ぼす影響の観察, 第3回植物の栄養研究会, 2017
23. 反田直之, 藤原徹, ホウ素過剰ストレスによる根の生育不良はNADPH oxidase RBOHCを介した成長制御である, 第3回植物の栄養研究会, 2017
24. 福田寛史, 藤原徹, 栄養応答におけるリボソームの動態, 第3回植物の栄養研究会, 2017
25. 福田牧葉, 藤原徹, ホウ素輸送体の組織特異的発現の効果, 第3回植物の栄養研究会, 2017
26. 馮志航, 藤原徹, SMU1 and SMU2 mediate MRS2-7 pre-mRNA splicing and are required for low Mg adaptation in Arabidopsis, 第3回植物の栄養研究会, 2017
27. 李克, 藤原徹, RNA splicing associated protein AQR1 is essential for excess-boron tolerance in Arabidopsis root, 第3回植物の栄養研究会, 2017
28. 馮志航, 藤原徹, SMU1 and SMU2 mediate MRS2-7 pre-mRNA splicing and are

required for low Mg tolerance in Arabidopsis,日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会,2017

29. 藤原 徹,栄養応答と翻訳制御,第 3 回植物の栄養研究会,2017
30. Li Ke、藤原徹,RNA splicing associated protein AQR1 is essential for excess-boron tolerance in Arabidopsis root,日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会,2017
31. 田中 真幸、横山 武司、重松 秀樹、笠井 光治、竹本 千重、内藤 哲、白水 美香子、藤原 徹,高濃度ホウ素存在下によって最小 open reading frame で停止したリボソームの生化学的解析,第 19 回日本 RNA 学会年会,2017"
32. Toru Fujiwara,Regulation of a plant mineral nutrient transporter expression through substrate-dependent mRNA degradation induced by ribosome stall at the AUG-Stop sequence in the 5' UTR of the Arabidopsis thaliana NIP5;1 transcript,EMBO Conference: Eukaryotic RNA turnover,2017
33. 李克、藤原徹,RNA splicing associated protein AQR1 is essential for excess-boron tolerance in Arabidopsis, Identification and Characterization of Arabidopsis low-boron tolerance SLBR mutant,2017 ホウ素栄養研究会,2017
34. Saul Sotomayor Leyton, Toru Fujiwara,A proposal of the analysis of the role of SKU5 in boron nutrition,2017 ホウ素栄養研究会,2017
35. 反田直之、藤原徹,数理モデルによる BOR3 の役割の推定とホウ素過剰ストレスによる根の伸長抑制機構の解明,2017 ホウ素栄養研究会,2017
36. 川田ゆかり、藤原徹,Effect of BOR3 on plant growth and boron distribution,2017 ホウ素栄養研究会,2017
37. 福田牧葉、藤原徹,ホウ素輸送体の細胞層特異的発現の効果,2017 ホウ素栄養研究会,2017
38. 福田寛史、藤原徹,栄養応答におけるリボソームの動態解析,2017 ホウ素栄養研究会,2017
39. 五味寛子、藤原徹,ホウ素依存的な NIP5;1 の発現制御に異常のある変異株の解析,2017 ホウ素栄養研究会,2017
40. 田中真幸、藤原徹,ホウ素依存的なリボソーム停滞を介した NIP5;1 の発現制御機構,2017 ホウ素栄養研究会,2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：内藤 哲

ローマ字氏名： NAITO, Satoshi

所属研究機関名：北海道大学

部局名： 農学研究院

職名：教授

研究者番号(8桁)： 20164105

研究分担者氏名：三輪 京子

ローマ字氏名： MIWA, Kyoko

所属研究機関名：北海道大学

部局名：地球環境科学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁)： 50570587

(2)研究協力者

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、研究者個人に帰属されます。