

研究報告書

「肥料有効利用型植物の作出基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 三輪 京子

1. 研究のねらい

世界的な人口増加による食糧需要の増加、都市化による優良農地の減少に対して、今後の植物バイオマス生産は、食糧生産と競合しないこと、低エネルギー投入で高生産することが必須である。この実現には、食糧生産には適さない肥沃度の低い不良な土壌環境において、少ない肥料の投入で高い生産性を持つ植物の開発がひとつの有用な方策である。本研究では、このような植物の作出に利用できる遺伝子として「植物の必須ミネラルの体内利用効率を上昇させる遺伝子」を同定・解析することを目標とした。

植物には窒素やリンを含む 17 種類の必須元素がある。これらの必須ミネラルの欠乏は植物生産を制限する主要因であり、現代の作物生産では窒素やリンを含む化学肥料の施用は不可欠である。現代の高い作物生産性は化石燃料や天然ガスに由来するエネルギー消費に依存しており、その必要なエネルギーの 3 分 1 以上は窒素やリンを中心とした化学肥料の生産・輸送・施用にかかるものと計算されている。ゆえに、植物生産にかかる化学肥料の使用量を低下させなければ、植物バイオマスを活用した「真の二酸化炭素資源化・二酸化炭素排出削減」にはならない。

これまでの研究で低ミネラル栄養環境耐性を付与する遺伝子が、窒素・リン・ホウ素などの必須元素に対して報告されている。しかしながら、これらの低栄養環境での生育改善はいずれの場合も環境中からのミネラル栄養の取り込みの増加を伴うものであり、土壌からの栄養の収奪には変わりがない。肥沃度の低い不良な環境で持続的に高い生産を得るためには、ミネラル吸収効率の上昇による低ミネラル栄養耐性の向上だけではなく、植物生産量あたりの必要な栄養量を低下させた「体内ミネラル利用効率の上昇」が重要である。

そこで、本研究では窒素とリン、ホウ素を対象のミネラルとして「必須ミネラルの体内利用効率を向上させる新規遺伝子」の同定を目指した。具体的には、ミネラル濃度が減少し生育が悪い変異株に変異を導入し、「地上部ミネラル濃度は低いままであるが、バイオマス量が回復した」ミネラル利用効率が向上したシロイヌナズナ変異株を単離し、原因遺伝子を同定・解析した。ミネラル利用効率を上昇させる新たな遺伝子資源の発掘を通じ、化学肥料低減・省エネルギーで安定的なバイオマス生産とミネラル資源循環の効率化を推進する技術の基盤の構築を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

これまで、品種間の QTL 解析等が行われてきたが、体内のミネラル利用効率を制御する遺伝子の同定には至っていなかった。本研究では、体内のミネラル利用効率を上昇させる遺伝子を同定するため、全く新規の戦略として、輸送機能欠損株を出発材料とした「体内利用効率が増したシロイヌナズナ変異株」の探索に取り組んだ。その結果、窒素・リン・ホウ素の変異株候補の単離に成功した。さらにホウ素では吸収増加によらない欠乏耐性付与に成功し、世界で初めて必須ミネラル要求量を低下させる遺伝子変異の同定に成功した。

ミネラル輸送機能の欠損変異株は、低ミネラル栄養環境下で地上部のミネラル濃度／含量が減少し、それに伴って生育量が低下する。この株に EMS 処理によって第二の変異を導入し、「地上部の元素濃度は低下したままであるが、地上部生育量が回復した」変異株を単離する。この二重変異株は、親株の輸送機能欠損株や野生型と比較して、成長に必要なミネラル量が低下した「体内ミネラル利用効率が増した株」であると期待される。窒素・リン・ホウ素を対象として、本手法により変異株を探索した。

窒素では、根への硝酸の取り込みに働く硝酸輸送体 NRT2.1/NRT2.2 の機能欠損株を親株として確立した。M2 種子 1 万 5,000 をロックウール水耕栽培し、葉の展開抑制の緩和が観察された一株の単離に成功した。リンでは、根から地上部へのリン移行を担う PHO1 の機能欠損株を親株として用いた。1 万 6,000 の M2 種子を低リン濃度条件の固形培地で栽培した結果、生育回復が観察された 9 株の単離に成功した。ホウ素では、根から地上部へのホウ素輸送を担うホウ素輸送体 BOR1 の機能欠損株を用い、11 株の変異株の単離に成功した。原因遺伝子変異のひとつはガラクトシロン酸転移酵素遺伝子 (GAUT) のアミノ酸置換を伴う塩基置換であった。さらに、GAUT の点変異および遺伝子破壊のみで低ホウ素条件下での成長および稔実性が改善されることを明らかにした。他の原因遺伝子もホウ素の結合部位であるペクチン多糖 RG-II の合成に関与する遺伝子に集約され、RG-II の変化がホウ素要求量低下の機構であることを見出した。

本研究の結果は、体内のミネラル利用効率の上昇が実現可能であることを示す成果であり、ミネラル利用効率を上昇させる遺伝子資源を同定する新たな方法論を提唱する成果となった。

(2) 詳細

研究テーマ A「窒素・リン・ホウ素の利用効率が増した変異株の探索」

QTL 解析などの先行研究ではミネラル利用効率を制御する遺伝子の同定には至っていない。本研究では、ミネラル体内利用効率を上昇させる遺伝子を同定するため、全く新規の戦略として、輸送機能欠損株を出発材料とした「体内利用効率が増したシロイヌナズナ変異株」の探索に取り組んだ。

ミネラル輸送機能の欠損変異株は、低ミネラル栄養環境下で地上部のミネラル濃度／含量が減少し、それに伴って生育量が低下する。この株に EMS 処理によって第二の変異を導入し、「地上部の元素濃度は低下したままであるが、地上部生育量が回復した」変異株を単離する。この二重変異株は、親株の輸送機能欠損株や野生型と比較して、成長に必要なミネラル

量が低下した「体内ミネラル利用効率」が上昇した株であると期待される(右図)。窒素・リン・ホウ素を対象元素として変異株探索を行った。窒素・リンは多量元素として植物生産の制限の主要因となる元素である。また、ホウ素は微量必須元素のひとつであり、日本を含む世界中で欠乏症が発生している元素である。

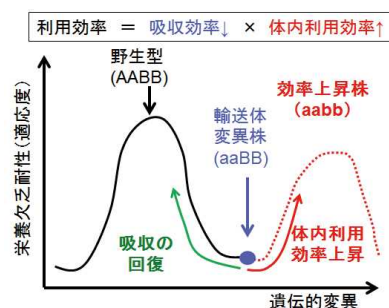
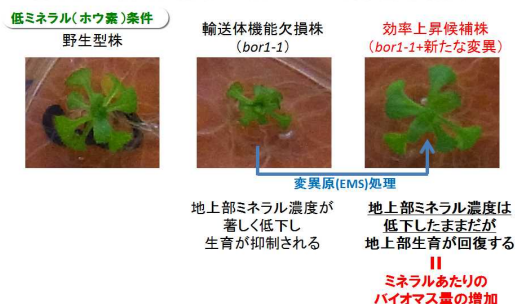
窒素栄養を対象とした変異株探索では、高親和性硝酸輸送体 NRT2.1/NRT2.2 機能欠損株を親株として用い

た。NRT2.1/NRT2.2 は環境から根への硝酸取り込みに関わる輸送体である。窒素栄養依存的な生育パターンは光条件など他環境条件の影響を大きく受けるため、様々な環境条件での栽培試験を実施し、条件設定を行った。最終的に、ロックウール水耕栽培での培地硝酸濃度 2.5 mM および 1 mM において、機能欠損株は地上部全窒素含量の低下および地上部生育量の低下が顕著に認められることを確認し、培地硝酸濃度 2.5 mM のロックウール水耕栽培で変異株探索を行った。EMS 処理をした M2 種子 1 万 5,000 を対象とする一次選抜を行った。選抜された 56 株の M3 種子の栽培試験の結果、親株と比較して葉の展開抑制の緩和傾向が観察された株一株の獲得に成功した。さらに、本二重変異株から NRT2.1/NRT2.2 機能欠損変異を除いた一重変異株候補においても野生型株 Col-0 と比較して地上部生育向上が期待された。

リン栄養を対象とした変異株探索では、リンの根から地上部への移行に関わる PHO1 の機能欠損株 *pho1-2* を親株として用いた。1 万 6,000 の M2 種子を用いて低リン濃度条件 (35 μ M) 固形培地での一次選抜を行い、244 株の候補株を得た。四段階の培地リン濃度 (17.5 μ M、35 μ M、87.5 μ M、1.75 mM) で二次選抜を行い、生育回復が観察された株 9 株の単離に成功した。特に 2 株 (No.69, No.91) では親株 *pho1-2* に対して顕著な生育回復が認められ、低リン条件での生育回復が認められた。

ホウ素栄養を対象とした変異株探索では、根から地上部へのホウ素輸送を担うホウ素輸送体 BOR1 の機能欠損株 *bor1-1* を用いた。先行研究で単離された一株に加え、さらに M2 を追加栽培し、計 11 株の変異株の単離に成功した。なお、単離された複数の二重変異株において、親株 *bor1-1* と同様に地上部ホウ素濃度が低下していること、他の元素 (Mg,K,Ca,Mn,Fe,Cu,Zn,Na,Co,P,Mo) の有意な変化がないことを確認した。

ミネラル含量が低下した変異株をもとに体内の利用効率が向上した株を単離する



研究テーマ B「変異株の原因遺伝子の同定」

上記で単離した窒素・リン・ホウ素の変異株の原因遺伝子同定のため、異なるシロイヌナズナのアクセッションとの交配によるラフマッピングと次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を行った。窒素・リンの変異株は解析を進めている段階であり、ホウ素変異株では原因遺伝子変異の同定に成功した。

ホウ素の変異株では、原因遺伝子変異のひとつはガラクトツロン酸転移酵素遺伝子 (*GAUT*) 群に属する一遺伝子内のアミノ酸置換を伴う一塩基置換であることを、相補試験および T-DNA 挿入株の表現型より遺伝学的に明らかにした。さらに、単離された二重変異株より輸送機能欠損変異を戻し交雑によって除いた *GAUT* の点変異のみをもつ株を作出した。*GAUT* の点変異および T-DNA 挿入による遺伝子破壊が起こった一重変異株において、低ホウ素条件下において野生型株 Col-0 と比較して地上部生育および稔実性の改善が認められた。これは、二重変異株の第二の変異のみで、体内ホウ素利用効率の上昇／要求量の低下が起こることを示しており、吸収増加によらないホウ素欠乏耐性植物の作出に世界で初めて成功した。これらの *GAUT* 変異株ではホウ素欠乏耐性獲得のトレードオフとして、通常条件やストレス条件下での生育抑制が懸念されたが、野生型株と比較して生育や形態の明らかな違いは認められず、本遺伝子変異の有用性が示された。

ホウ素の生理機能は一次細胞壁ペクチン質多糖ラムノガラクトツロナン II (RG-II) の架橋である。*GAUT* はペクチン主鎖ホモガラクトツロナンを合成する酵素遺伝子群に属している。*GAUT* 変異株においてホウ素十分・欠乏条件双方での細胞壁ホウ素濃度の低下が認められ、さらに RG-II 抗体での免疫蛍光染色の検出強度の著しい低下が起こっていた。これより、*GAUT* 変異によってペクチン主鎖もしくは RG-II の合成が低下し、細胞壁へのホウ素結合容量の減少が起こった結果、ホウ素要求量の低下が引き起こされたと考察された。さらに、他の独立な変異株の原因遺伝子の候補として、既知の RG-II 合成酵素遺伝子群と共発現している、ガラクトツロン酸転移酵素の他メンバー、複数の独立な糖転移酵素を見出した。ホウ素の体内利用効率が上昇した／要求量が低下した変異株の原因変異は RG-II 合成に関与する酵素群へ集約されたことが考察され、ホウ素の結合部位である RG-II の変化がホウ素要求量の低下の機構であることが見出された。

本研究では、輸送機能欠損株を出発材料として「体内のミネラル利用効率が上昇した変異株」を探索した。窒素・リンにおいて変異株候補の単離に成功し、ホウ素では原因遺伝子変異の同定に成功した。これらの変異株の存在は、現在の野生型植物に対して、体内のミネラル利用効率の上昇／要求量の低下が実現可能であることを示すものである。さらに、ホウ素の変異株で同定された遺伝子変異は単独で体内のミネラル利用効率上昇を引き起こし、世界で初めて必須ミネラル要求量を低下させることに成功した。本結果は、ミネラル利用効率を上昇させる遺伝子資源を同定する新たな方法論を提唱するものであり、肥料投入低減に向けた新たなミネラル栄養欠乏耐性の付与技術の基盤となる成果である。

3. 今後の展開

窒素・リンでは体内の利用効率が上昇した変異株候補を単離した。これらの変異株に対しては、様々な硝酸およびリン濃度条件下での地上部生育量および元素濃度を確定した上で、変異の原因遺伝子の同定を進める。体内のミネラル利用効率が上昇する機構として、A)分配の最適化、B)作用点の構造変化、C)生育抑制応答の解除、を予想している。変異株の生理解析(生育・元素濃度・代謝産物解析など)と原因遺伝子の機能解析を合わせ、表現型を説明する分子機構を明らかにする。さらに、輸送機能欠損変異を戻し交雑によって除いたとき、第二の変異のみでミネラル利用効率の上昇が起こるかを明らかにし、輸送変異と共存したときに起こる野生型株では起こりえない定常状態を持っているのか、単一の変異で利用効率上昇を引き起こせるかを検証する。単一の変異で利用効率上昇を引き起こす場合には、トレードオフとして通常条件やストレス条件下での悪影響の有無を検証し、同定された遺伝子変異の有用性を検討する。

ハウ素の変異株では、ガラクトツロン酸転移酵素を含め、ハウ素の作用点である細胞壁ペクチン質多糖 RG-II の合成遺伝子に変異が集約されていることが考察された。RG-II はガラクトツロン酸が連なったペクチン主鎖に対して4種類の側鎖(A-D)が連結した構造体であり、広く植物一般に存在している。RG-II は12種類の単糖による20種類の連結により構成され、細胞壁多糖の中で最も複雑な構造をもつが、その構造は植物種間で高度に保存されている。これまでRG-II合成酵素として、10程度の単糖合成酵素や糖転移酵素の機能解析の報告がされているが、その複雑な多糖の合成過程の全体像は全く明らかにされていない。これまで、ペクチンやRG-II合成酵素の変異株は多くが致死や矮化を示し、本研究での「ハウ素欠乏条件下で生育抑制が緩和する」という改善が見られる変異株は極めてまれであり、貴重な変異株材料と考えられる。今回単離された変異株を対象として、細胞壁の生化学的な解析(細胞壁ハウ素濃度、細胞壁糖組成分析、糖連結解析、RG-II架橋率測定)を行い、これら酵素遺伝子変異が及ぼす細胞壁への影響を明らかにし、野生型株におけるRG-II合成経路での機能を網羅的に解明する。加えて、遺伝子がコードする酵素活性の検定を行う。これらの結果をもとに、植物におけるハウ素要求量を決定する分子機構を明らかにし、要求量低下に伴うトレードオフを少なくした、より有用な遺伝子変異を提案する。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

① 研究達成状況及び得られた研究成果

本研究課題の目標は植物の体内ミネラル利用効率を上昇させる遺伝子を同定することであった。ハウ素については提案した方法論によって変異株を単離し、体内利用効率を上昇させる／要求量を低下させる原因遺伝子変異の同定に成功した。加えて、この遺伝子変異のみでハウ素欠乏耐性を付与することを示し、不良環境耐性を付与する遺伝子資源の新たな方法論を提唱する成果となった。窒素・リンに対しては、栽培条件検討や親株となる輸送機能欠損株の確立に長時間を要したことが、変異株探索の開始までに長期の時間を必要とする原因となった。そのため、遺伝子変異同定までには至らなかったものの、極めて困難と予想された窒素・リンの変異株候補の単離を達成しており、本手法の汎用性を示す成

果となった。

外部発表では、主にホウ素の変異株の成果について、学会発表を国際学会発表 7 件（うち招待講演3件）、国内学会発表 5 件を行った。また、研究課題に関連した論文を、国際誌に第一著者として2報、Last author として1報、いずれも責任著者として発表した。

② 研究成果の戦略目標、社会・経済・科学技術への貢献

作物生産における化学肥料の低減は、エネルギー・資源消費および環境保全の双方の観点から世界的な課題となっている。低窒素・低リン耐性の植物の開発は世界中での研究課題であるが、これまでの低ミネラル耐性の成功例はいずれも吸収効率を強化したものであり、体内の利用効率を上昇させるという「真のミネラル栄養欠乏耐性」を実現したものはなかった。本研究のホウ素利用効率を上昇させる遺伝子変異の同定は世界初の成功例であり、植物の必須ミネラル要求量を低下させた初めての成果である。

シロイヌナズナと同じアブラナ科のナタネはホウ素要求量が高く、ホウ素欠乏による減収が中国では実際の問題となり、育種課題となっている。本研究で同定された遺伝子変異をナタネへ導入することは、ホウ素要求量の低いホウ素欠乏耐性ナタネ品種の開発に直結すると期待される。なお、今回の利用効率を上昇させる変異は特定の遺伝子の点変異（一塩基置換）のため、実用植物への遺伝子変異の導入株は、EMS による塩基置換誘発株または様々な変異をもつ品種を対象として、TILLING 法での選抜が可能である。そのため、形質転換による遺伝子導入の過程は必要ではなく、実用化が形質転換体と比較すると容易であることが期待される。

また、窒素やリンの変異株より、体内利用効率を上昇させる遺伝子変異を同定することができれば、あらゆる作物への導入により窒素やリンの要求量が低い作物品種の開発に結びつくことが期待される。これが実現されれば、化学肥料の低減による省エネルギー・省資源の持続的な植物生産システムの基盤技術として活用されることが期待される。

③ 成果の展開の方向

本研究課題の基礎研究としての展開は（1）複数の遺伝子変異の組み合わせによる大きな定常状態の変化の理解と（2）植物のミネラル栄養要求量の決定の分子機構の解明である。ミネラル栄養は植物の体をつくる必須な材料であり、その必要量は必然として一定量が決まっていると想定されてきた。本研究ではホウ素でその要求量が遺伝的に制御されていることを明らかにした。この結果は、植物種間や品種間で異なる栄養要求量の多様性を説明する分子機構の解明の第一歩となる。また、今回単離されたホウ素の変異株の原因変異がペクチン質多糖 RG-II の合成遺伝子群の変異に集約されていることが考察され、これまで全く明らかにされていない細胞壁多糖 RG-II の合成経路を明らかにできると期待される。

また、本領域の CREST 課題では、低ミネラル栄養耐性向上を対象とした研究課題はない。CREST 課題で、光合成能力を強化した植物や乾燥ストレス耐性を強化した植物の開発が達成されたとき、体内のミネラル栄養が生育の制限要因となる可能性がある。複数の環境ストレス耐性強化のひとつとして本研究課題で同定された遺伝子変異の導入により、さらなる高い生産性をもつ植物の開発に貢献できると期待される。

④ 研究実施体制

研究補助者の雇用により大規模な変異株スクリーニングの実験(条件の検討、大量の変異原処理をした種子の播種および後代の種子の獲得、数万の変異株探索)の実施が可能となった。また、人工気象器を新規で2台購入し、均一な環境条件でのロックウール水耕栽培による大規模な変異株スクリーニングを行うことができ、機器が有効に活用された。

2012年12月にはミネラル輸送および代謝研究を行う外国人研究者を招待し、国際シンポジウムを北海道大学で主催し、招待講演者とのネットワーク形成をした。また、細胞壁分析を専門とする研究者を訪ね、実験手法への助言を得た。

⑤ 特記事項

本研究課題の成果の評価を含め、2013年4月に日本土壌肥料学会奨励賞を受賞した。また、2014年4月に北海道大学創成研究機構特任助教より北海道大学大学院地球環境科学研究院准教授に昇進した。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ホウ素、窒素、リンという肥料の有効利用を図るための新たな方策を確立するため、それらの要素の利用効率を高める変異体を獲得し、その原因遺伝子を特定して、低エネルギー型植物育成技術につなげようと、研究が進められた。ホウ素に関しては、これまでの成果を発展させ、原因遺伝子の機能を特定することに成功し、基礎研究として大きな成果を得た。一方、極めてチャレンジングな課題であり、これが実現すれば将来の植物生産に大きく貢献しうる可能性を秘めた窒素、リンについては、多くの努力にもかかわらず、低窒素、低リン状態で良好に生育する変異株の候補が得られた段階である。今後、その変異株の解析が進めば、本研究で目指したことについて一定の結論が得られるであろう。

今後は、現在得られている、窒素、リンを対象とした変異株の解析を進め、どのような原因遺伝子が関わっているか、またその機能は何かを明らかにしていくことを期待するとともに、本研究課題で採用したスクリーニング法の有効性についても、一定の結論を出して欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Aibara, I., **Miwa, K.*** “Strategies for optimization of mineral nutrient transport in plants: multi-level regulation of nutrient-dependent dynamics of root architecture and transporter activity.” *Plant and Cell Physiology* (2014) 55, 2027–2036.
2. **Miwa, K.***, Aibara, I., Fujiwara T. “*Arabidopsis thaliana* BOR4 is upregulated under high boron conditions and confers tolerance to high boron.” *Soil Science and Plant Nutrition*

(2014) 60, 349–355.

3. **Miwa, K.***, Wakuta, S., Takada, S., Ide, K., Takano, J., Naito, S., Omori, H., Matsunaga, T., Fujiwara, T. “Roles of BOR2, an efflux-type boron transporter, in crosslinking of rhamnogalacturonan II and root elongation under boron limitation in *Arabidopsis thaliana*.” *Plant Physiology* (2013) 163, 4, 1699–1709.
4. Fukuma, K., Fujiwara, T., **Miwa, K.** “A novel strategy for identification of genes to improve boron use efficiency in *Arabidopsis thaliana*.” XVII. International Plant Nutrition Colloquium and Boron Satellite Meeting Proceedings Book, (2013) pp 51–52, Sabanci University, Istanbul. ISBN 978–605–4348–62–6.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会賞受賞】

2013 年 4 月「トランスポーターを用いた栄養欠乏および過剰耐性植物の作出」で日本土壤肥料学会奨励賞を受賞

【国際シンポジウムの開催】

“International Workshop for Plant Response to Mineral”を 2012 年 12 月 7 日に北海道大学で主催した。4 名の外国人研究者を招待し、60 名の参加を得た。

【国際シンポジウムでの招待講演】

Miwa, K. “Generation of nutrient-stress tolerant plants ~through identification of novel genes to improve nutrient efficiency in *Arabidopsis thaliana*~ Joint symposium on Environmental Science 2013 –Bridging Finland and Japan–, Helsinki, Finland, 2013 年 11 月 27 日

Miwa, K. “Formation of pectic networks by borate – identification of novel genes to regulate boron demand and supply for plant cell walls.” International Symposium on Cell Wall Integrity, Tokyo, 2013 年 10 月 30 日

【国際学会での講演】

Fukuma, K., Fujiwara, T., **Miwa, K.** “A novel strategy for identification of genes to improve boron use efficiency in *Arabidopsis thaliana*.” XVII. International Plant Nutrition Colloquium, Istanbul, Turkey, 2013 年 8 月 19–22 日

Fukuma, K., Fujiwara, T., **Miwa, K.** “Identification of a novel gene to reduce boron requirement in *Arabidopsis thaliana*.” BORON2013, Istanbul, Turkey, 2013 年 8 月 17–18 日

【アウトリーチ活動(一般向け講演)】

三輪京子「ミネラルを運ぶ分子を研究して、やせた土地にも農業を興す」日本植物学会第 77 回(札幌)大会 公開シンポジウム「植物科学の最前線—植物がひらく私たちの未来—」2013 年 9 月 15 日