

学 位 論 文 題 名

Whole Aspect of Metabolic Responses of Rice Roots to Phosphorus Deficiency and Aluminum Stress Analyzed by Transcriptomic and Proteomic Approaches

（トランスクリプトームおよびプロテオーム解析に基づくイネ根のリン欠乏・アルミニウムストレス条件における代謝応答の網羅的解析）

学位論文内容の要旨

世界中に広範に分布する酸性土壌において作物を生産する場合、最も問題となるのがリン欠乏とアルミニウムストレスである。植物はこれらの条件で生育する場合に、いくつかの適応戦略を発達させ、適応している。イネはこれらの悪条件下で比較的良好に生育できる植物である。また、イネはゲノム解析が進んでいるため、網羅的発現解析に適した植物である。そこで、本研究ではイネを材料として、転写産物ならびに翻訳産物の発現量の変動からこれらのストレスに対する適応戦略を理解することを目的とした。

本研究においては、イネをリン欠乏ならびにアルミニウムストレス条件下で水耕栽培を行い、タンパク質と RNA を抽出してプロテオーム解析ならびにトランスクリプトーム解析に供した。得られた結果の概要は下記の通りである。

1. リン欠乏、アルミニウムストレスに対するイネ根の代謝応答

- 1) リン欠乏ならびにアルミニウムストレス条件下で栽培したイネ根から可溶性タンパク質を抽出し、プロテオーム解析を実施した。イネ根を対象として実施したプロテオーム解析において、464 のタンパク質スポットが検出された。そのうち主要な 94 スポットに対して Peptide Mass Fingerprinting (PMF) 法による同定を試みた結果、56 スポットの同定に成功した。PMF 法により同定されたタンパク質について、一部を Edman 法による N-末端アミノ酸配列の解読を実施し、その同定結果の信頼性が高いことを確認した。
- 2) Lowess Fitting 標準化法を新たに取り入れることにより、プロテオーム解析により得られたタンパク質スポットのシグナル強度を標準化し、複数のゲルの間でのタンパク質発現量の高精度な比較を初めて可能にした。この標準化を行った結果に基づき、発現量比較を実施した。
- 3) イネ EST クローンに由来する cDNA の一部を PCR によって増幅し、これを貼り付けた cDNA マイクロアレイを用いて、リン欠乏イネを対象に経時的にトランスクリプトーム解析を実施した。プロテオーム解析において検出されたタンパク質発現変動が、ある程度転写産物レベルから認められることを示した。また、ホモログ間の発現変動の違いが多く存在することを示した。
- 4) イネ完全長 cDNA クローンの 3' 非翻訳領域配列の一部を化学的に合成し、これを貼り付けたオリゴマイクロアレイを用いて、イネの低リン応答のトランスクリプトーム解析を実施した。その結果をもとに、KaPPa-View を用いてパスウェイ解析を行った結果、パスウェイ解析が代謝変動を理解する

上で非常に有用であることを示した。

- 5) 以上のプロテオーム解析とトランスクリプトーム解析の結果より、リン欠乏とアルミニウムストレスにおいてイネ根が概して似た応答を示すことが示された。

2. リン欠乏、アルミニウムストレス条件下における炭素化合物の流れ

- 1) トランスクリプトーム解析とプロテオーム解析において、低リンおよびアルミニウムストレス条件下で解糖系に関わる代謝経路の誘導が認められた。TCA cycle に関わる代謝経路は変動が認められな
いか、抑制されていた。さらに、窒素同化系の代謝経路は抑制されていた。
- 2) 低リン条件で育ったイネ根からは特異的にシュウ酸が分泌されることが知られる。トランスクリプ
トーム解析より、グリオキシル酸からシュウ酸が生成する経路と、この経路の低リンによる促進が
起きていることが示唆された。シュウ酸合成経路はこれまで未知であった代謝経路であり、本研究
で実施したパスウェイ解析において初めて得られた結果である。
- 3) リン欠乏イネにおいては、光合成産物は地上部においてデンプンとして蓄積し、根部への分配割合
が低く、イネ根からの有機酸分泌量は他の植物と比較して非常に低いレベルであることが知られて
いる。これらのことより、本研究において示されたイネ根における解糖系の促進による炭素骨格の
TCA cycle への流入は、地上部から根部への光合成産物の転流量の低下を補うことが主な目的である
と理解された。また、その一部はシュウ酸の分泌に寄与し、シュウ酸は根圏におけるキレート能に
よりアルミニウム解毒、リン酸の可給化に関わるものと考えられた。

3. リン欠乏、アルミニウムストレス条件下における核酸代謝

- 1) プロテオーム解析において認められた糖関連酵素の発現変動より、低リンおよびアルミニウムスト
レス条件下で核酸モノマーの生合成に関わる ribose-5-phosphate の供給が促進されることが示唆され
た。
- 2) トランスクリプトーム解析に基づくパスウェイ解析の結果、低リン条件では nucleoside
monophosphate から diphosphate へ、また nucleoside diphosphate から triphosphate へのリン酸化に関わ
る遺伝子群の発現の誘導がアデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミンの全てについて確認
された。
- 3) 以上より、低リンおよびアルミニウムストレスにより滞る遺伝子の発現を維持することによってこ
れらのストレス条件に適応するために、核酸モノマーの生合成が誘導されることが示唆された。ま
た、核酸を構成する糖の供給に関わる酵素は翻訳レベルで、核酸モノマーのリン酸化に関わる酵素
は転写レベルで発現が制御されていることが示唆された。

4. リン欠乏、アルミニウムストレス条件下における細胞壁成分への影響

- 1) プロテオーム解析において、アルミニウムストレス条件下で S-adenosyl methionine (SAM) synthase の
発現が強く増加した。この結果から、アルミニウムストレス条件下のイネ根において、ムシラゲや
リグニンの合成が増加することが示唆された。
- 2) トランスクリプトーム解析の結果から、リン欠乏条件下でも SAM synthase の発現が増加することが
示唆された。また、細胞壁構成多糖やリグニン、ウロン酸合成が促進されることが強く示唆された。
- 3) 以上より、リン欠乏およびアルミニウムストレス条件下で生育するイネ根において、光合成産物の分
配が低下する中での細胞壁構成多糖の合成維持が適応戦略の一つであることが示唆された。この結
果は、本研究においてプロテオーム解析とパスウェイ解析を同時に実施したことにより初めて得ら
れた成果である。

これら本研究により得られた知見は、酸性土壌で生育する植物の適応戦略を網羅的な観点から世界で初めて解明されたものであり、植物のリン欠乏とアルミニウムストレスへの適応戦略の理解が深まった。その成果は、植物栄養学分野における耐酸性の基礎研究として重要であるだけでなく、増加し続ける人口に対応した作物の持続的生産のために必要となる酸性土壌における作物生産に貢献する知見をもたらす重要な成果である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 崎 満

副 査 教 授 松 井 博 和

副 査 教 授 小 池 孝 良 (北方生物圏フィールド
科学センター)

副 査 助 教 授 信 濃 卓 郎

学 位 論 文 題 名

Whole Aspect of Metabolic Responses of Rice Roots to Phosphorus Deficiency and Aluminum Stress Analyzed by Transcriptomic and Proteomic Approaches

(トランスクリプトームおよびプロテオーム解析に基づくイネ根のリン欠乏・アルミニウムストレス条件における代謝応答の網羅的解析)

本論文は4章からなり図48、表9、総頁164からなる英語論文で、別に参考論文3編が付されている。

酸性土壌で作物を栽培する場合、最も問題となるのがリン(P)欠乏とアルミニウム(Al)ストレスである。イネはこれらの悪条件下で比較的良好に生育できるとともに、網羅的発現解析に適した植物である。本研究ではイネを材料として、転写産物ならびに翻訳産物の発現量の変動からこれらのストレスに対する適応戦略を理解することを目的とした。得られた結果の概要は下記の通りである。

1.P 欠乏、Al ストレスに対するイネ根の代謝応答

- 1) P 欠乏ならびに Al ストレス条件で栽培したイネ根から可溶性タンパク質を抽出し、プロテオーム解析を実施した。検出された 464 のタンパク質スポットのうち主要な 94 スポットに対して Peptide Mass Fingerprinting 法による同定を試みた結果、56 スポットの同定に成功した。
- 2) Lowess Fitting 標準化法を新たに取り入れることにより、プロテオーム解析により得られたタンパク質スポットのシグナル強度を標準化し、複数のゲルの間でのタンパク質発現量の高精度な比較を初めて可能にした。
- 3) P 欠乏イネを対象にトランスクリプトーム解析を実施した。プロテオーム解析において検出されたタンパク質発現変動が、ある程度転写産物レベルから認められること、ホモログ間の発現変動の違いが多く存在することを示した。発現解析結果をもとに、KaPPa-View を用いてパスウェイ解析を行い、パスウェイ解析が代謝変動を理解する

上で非常に有用であることを示した。

- 4) プロテオーム解析とトランスクリプトーム解析の結果より、P 欠乏と Al ストレスにおいてイネ根が概して似た応答を示すことが示された。

2. P 欠乏、Al ストレス条件下における炭素化合物の流れ

- 1) 低 P および Al ストレス条件下で解糖系に関わる代謝経路の誘導が認められた。TCA cycle に関わる代謝経路は変動が認められないか、抑制されていた。さらに、窒素同化系の代謝経路は抑制されていた。
- 2) 低 P 条件で育ったイネ根からは特異的にシュウ酸が分泌される。グリオキシル酸からシュウ酸が生成する経路と、この経路の低 P による促進が起きていることが示唆された。シュウ酸合成経路はこれまで未知であった代謝経路であり、本研究で実施したパスイ解析において初めて得られた結果である。
- 3) 本研究において示された P 欠乏イネ根における解糖系の促進による炭素骨格の TCA cycle への流入は、地上部から根部への光合成産物の転流量の低下を補うことが主な目的であると理解された。また、その一部はシュウ酸の分泌に寄与し、シュウ酸は根圏におけるキレート能により Al 解毒、リン酸の可給化に関わるものと考えられた。

3. P 欠乏、Al ストレス条件下における核酸代謝

- 1) 糖関連酵素タンパク質の発現変動より、低 P および Al ストレス条件下で核酸モノマーの生合成に関わる ribose-5-phosphate の供給が促進されることが示唆された。
- 2) パスイ解析の結果、低 P 条件では nucleoside monophosphate から diphosphate へ、また nucleoside diphosphate から triphosphate へのリン酸化に関わる遺伝子群の発現の誘導が確認された。
- 3) 以上より、低 P および Al ストレスにより滞る遺伝子の発現を維持することによってこれらのストレス条件に適応するために、核酸モノマーの生合成が誘導されることが示唆された。

4. P 欠乏、Al ストレス条件下における細胞壁成分への影響

- 1) Al ストレス条件下で S-adenosyl methionine (SAM) synthase タンパク質の発現が強く増加した。この結果から、Al ストレス条件下のイネ根において、ムシラゲやリグニンの合成が増加することが示唆された。
- 2) P 欠乏条件下でも SAM synthase 遺伝子の発現が増加することが示唆された。また、細胞壁構成多糖やリグニン、ウロン酸合成が促進されることが強く示唆された。
- 3) 以上より、P 欠乏および Al ストレス条件で生育するイネ根において、光合成産物の分配が低下する中での細胞壁構成多糖の合成維持が適応戦略の一つであることが示唆された。この結果は、本研究においてプロテオーム解析とパスイ解析を同時に実施したことにより初めて得られた成果である。

本研究により得られた知見は、酸性土壌で生育する植物の適応戦略を網羅的な観点から世界で初めて解明されたものであり、植物の P 欠乏と Al ストレスへの適応戦略の理解が深まった。その成果は、植物栄養学分野における耐酸性の基礎研究として重要である

だけでなく、増加し続ける人口に対応した作物の持続的生産のために必要となる酸性土壌における作物生産に貢献する知見をもたらす重要な成果である。

よって審査員一同は、福田琢哉が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。