

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04801

研究課題名(和文) 多年生植物の有する維管束を介した新規冬季環境適応機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the novel adaptation mechanism for winter environment via vascular bundle in perennial plants

研究代表者

佐藤 忍 (SATO, Shinobu)

筑波大学・生命環境系(副学長)・副学長

研究者番号：70196236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,530,000円

研究成果の概要(和文)：冬期のポプラの導管液に多く含まれる導管液タンパク質(XSP24)はCupinファミリーに属し、短日および根へのABA投与で発現が誘導され、冬季の低温で活性酸素除去に寄与していると考えられた。また同XSP25はBasic Secretory Proteinファミリーに属し、短日で根の中心柱での発現が誘導される(ABA投与では誘導されない)とともに、芽へのタンパク質の蓄積が見られ、凍結や乾燥から細胞を保護している可能性が示唆された。また、短日の葉で発現し、カボチャ等の既存の篩管液microRNA データベースに含まれるmicroRNA が根への情報伝達因子候補として複数同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

落葉性木本植物において秋の短日は、休眠芽形成と冬季環境への適応を誘導する。冬期導管液中のタンパク質(XSP25、XSP24)は根から地上部に送られて冬期の低温や乾燥に対する耐性をもたらすと考えられた。また無菌ポット栽培では、短日条件下で根の成長が低下し、根でXSP25、XSP24、ショ糖排出輸送体(SWEETs)の発現が誘導された。しかし短日において休眠芽形成を誘導するABAはXSPsとSWEETsの一部しか誘導しなかった。一方、短日の葉で発現し、篩管液に含まれる可能性のあるmicroRNA が複数同定された。この結果は、短日情報を葉から根へ伝達する新たな因子の発見につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：A xylem sap protein (XSP24), which is abundant in the xylem sap of poplar in winter, belongs to the Cupin family, and its expression is induced by short-day (SD) and ABA application to root, and is considered to contribute to the removal of ROS at low temperatures in winter. Also, XSP25 belongs to the Basic Secretory Protein family, expression of which is induced in the central cylinder of the root in SD (not induced by ABA), and XSP25 protein accumulation is observed in buds, and may protect the cells from freeze & dry. In addition, several microRNAs expressed in SD leaves and contained in the known phloem sap microRNA database such as squash were identified as candidates for signaling factors to roots.

研究分野：植物生理学

キーワード：ポプラ 導管液 冬季環境 耐性 根

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

温帯から亜寒帯に生育する多年生植物は、冬期にシュートの細胞や維管束が凍結したり、過度の乾燥に遭遇したり等の強いストレスを受ける。植物はこの様な年周期性の環境変化に対処するため、環境適応・年間成長サイクルの制御機構を発達させてきた。バイオマスとして世界的に重要な植物種であるポプラは、全ゲノム塩基配列が解読されていて、遺伝子組換えも容易な木本植物のモデル植物であり、秋の短日は休眠芽形成を通して冬季環境への適応の初期段階を誘導し、それに続く初冬の4-10の低温は、その後訪れる0以下の凍結温度に対する耐性を誘導する(低温馴化)とともに、芽の自発休眠を打破することが知られている。その際、アブシジン酸(ABA)、ジベレリン、花成誘導因子FTが内的因子として重要であることが明らかになっており、ポプラは植物の環境適応機構を解明するための研究材料として好適である。しかし、導管や篩管を介した環境適応や情報伝達の機構に関する知見は極めて乏しい。

また、落葉性木本植物は、夏から秋にかけて合成した同化産物をデンプンの形で幹や根に蓄積し、翌年の春の芽吹きの際にエネルギー源として使用している。近年、ショ糖が葉の葉肉細胞から篩管に運ばれる過程で、篩部柔組織細胞から細胞外にショ糖を分泌する排出型ショ糖輸送体(SWEET)がシロイヌナズナで発見され(Chen et al. Science 2012)、篩管を介したショ糖輸送のメカニズムの一端が解明された。しかし、春の芽吹きに先立って、幹や根に貯蔵されていた糖がどの様に芽へ供給されるのかは分かっていない。

一方、根は水や栄養塩類の吸収やサイトカイニン等の有機物質の合成など重要な働きをしているにもかかわらず、これまでほとんど注目されてこなかった。申請者らはこれまで、根で産生されて地上部に輸送される導管液に含まれるタンパク質や糖質等に関する研究を、シロイヌナズナやウリ科植物等を用いて行い(Plant Cell Physiol. 2014, Physiologia Plantarum 2009, J. Plant Research 2006, Plant Physiol. 2003)さらに屋外や人工気象室で生育させたポプラを用いて導管液成分の季節変動を調査した。その結果、冬期に導管液中のカルシウムやカリウムに加え、ヘキソースおよび新規導管液タンパク質(XSP25, XSP24)が著しく増加し(右図、Plant Root 2011a, b, 2012)これらの物質が、導管液を介して地上部に送られて冬期の低温や乾燥のストレスに対する耐性をもたらすと同時に、春の萌芽に備えている可能性が考えられた。



2. 研究の目的

温帯から亜寒帯に生育する多年生植物は、冬期における組織の凍結や乾燥等のストレスを乗り越えて春の芽吹きを迎える。我々は、落葉性木本植物ポプラを用いた先行研究で、冬季に導管液中のタンパク質(XSP25, XSP24)やヘキソースが顕著に増加し、それらに関わる遺伝子の根における発現が短日および低温によって誘導されることを見いだした。本研究では、A)導管液有機物質がアポプラストを介して冬季の乾燥や低温に対する耐性を付与する新規のメカニズムと、B)冬季環境耐性獲得のためにシュート等で受容した短日等の情報を器官間で伝達する新規の情報分子(microRNA等)を同定・解析することで、落葉性樹木ポプラをモデルとして、広く多年生植物が有する維管束を介した冬季環境適応・器官間制御メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

A)ポプラで冬季に増加する導管液有機物質の生産と輸送に関わる根で発現する遺伝子を発現抑制した形質転換ポプラ、過剰発現させたシロイヌナズナや組換えタンパク質等を作成し、それらの低温や乾燥に対する耐性および休眠解除後の成長評価を通して、導管液有機物質がアポプラストを介して冬季環境耐性を付与する新規メカニズムを解明する。
B)葉の受けた短日情報を篩管を介して根に伝えると予想されるmicroRNA等を同定し、形質転換ポプラ等を用いてそれらの機能解析を行い、シュート等で受容した短日等の情報を器官間で伝達する新規の情報分子の機能を解明する。

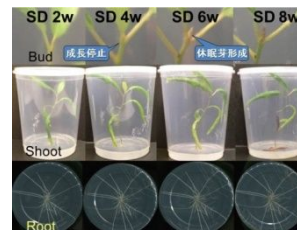
4. 研究成果

多年生植物は年周期性の環境変化に対処するため、環境適応・年間成長サイクルの制御機構を発達させてきた。ポプラは全ゲノム塩基配列が解読されていて、遺伝子組換えも容易な木本植物のモデル植物であり、秋の短日は休眠芽形成を通して冬季環境への適応の初期段階を誘導し、それに続く初冬の4-10の低温は、その後訪れる0以下の凍結温度に対する耐性を誘導する(低温馴化)とともに、芽の自発休眠を打破することが知られている。その際、アブシジ

ン酸 (ABA) とジベレリンが内的因子として重要であることが明らかになっている。また、夏の終わりに短日を受感すると、茎葉の成長を停止して光合成産物をシュートにショ糖やデンプンの形で貯蔵することで、冬季の凍結への耐性や春先の急激な成長のエネルギー源に備えている。

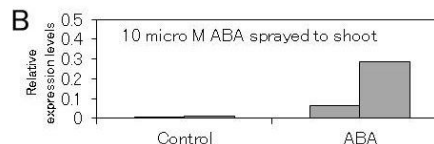
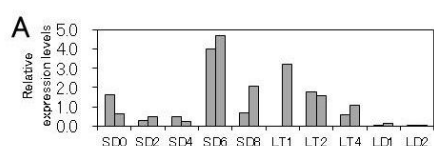
我々は、季節に依存した根の機能を明らかにする目的で屋外のポプラを用いて導管液成分の季節変動を調査した。その結果、冬期に導管液中のカルシウムやカリウムに加え、ショ糖やヘキソース (ブドウ糖、果糖) および新規導管液タンパク質 (XSP25, XSP24) が著しく増加し、これらの物質が、導管液を介して地上部に送られて冬期の低温や乾燥のストレスに対する耐性をもたらすとともに、春の萌芽に備えている可能性が考えられた。

A) そこで、無菌ポット栽培のポプラを用いて環境影響を調べたところ、10 週間にわたる短日条件下 (SD) で根の成長は徐々に低下していき (右図) XSP25 (Basic Secretory Protein: 乾燥耐性と氷結晶の微細化をもたらす) XSP24 (Cupin: 活性酸素を除去) ショ糖排出輸送体 (PtSWEETa と PtSWEETb) が短日の後半の根で特に強く発現していた。また、カルシウム輸送体 (PtACA-like1) やカリウム輸送体 (PtHAK-like1) の発現も短日 6 週目以降に増加し、これらの遺伝子は根の中心柱で強く発現していた。



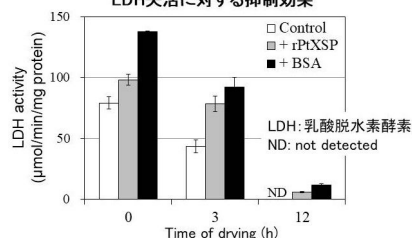
導管液タンパク質の内、短日および根への ABA 投与で発現が誘導される XSP24 は SOD 活性を有する Cupin ファミリーに属し、冬季の低温で生じる活性酸素の除去に寄与していると考えられた (右図)。

ドロノキの根における XSP24 の発現



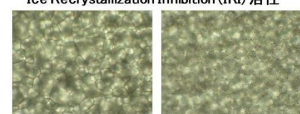
XSP25 は Basic Secretory Protein ファミリーに属し、短日で根の中心柱での発現が誘導される (ABA 投与では誘導されない) とともに、芽へのタンパク質の蓄積が見られた。大腸菌を用いて組換え XSP25 タンパク質を作出し、タンパク質変性の検定によく用いられる乳酸脱水素酵素の活性に対する乾燥と凍結融解からの保護作用と、Ice recrystallization inhibition 活性 (氷結晶のサイズを減少させる活性) を解析したところ、XSP25 が乾燥によるタンパク質の変性を防ぐ作用 (右上図) と、細胞外液が凍結する際、結晶サイズを減少させて細胞膜のダメージを緩和する作用 (右下図) を通して、組織や細胞を冬季の乾燥や凍結から保護している可能性が示唆された。

組換え XSP25 タンパク質の乾燥による LDH 失活に対する抑制効果

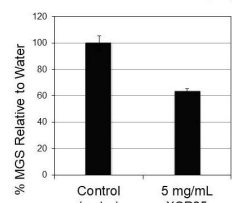


一方、XSP25 を過剰に発現させたシロイヌナズナや RNAi 法で XSP25 の発現を抑制したポプラを作出して凍結に対する耐性を調査したところ、明確な効果が見られなかった。その原因として、シロイヌナズナがもともと凍結耐性を有していること、及びポット内で育てた組み換えポプラを用いて試験を行ったため、水分環境が高すぎたことが考えられた。

組換え XSP25 タンパク質の Ice Recrystallization Inhibition (IRI) 活性



Water control rPtXSP25(5 mg/ml)



B) 秋の短日下においては葉で合成されたアブシジン酸 (ABA) が芽に移動して休眠芽形成の誘導を行うことが知られている。そこで、短日条件下で葉で合成された ABA が根に移動してこれらの遺伝子発現を誘導している可能性を考え、根に ABA を投与したところ XSP24 および PtSWEETa の発現が誘導されたが、XSP25 および PtSWEETb の発現は影響を受けなかった。また、ポプラの頂芽や近くの葉に含まれる ABA は短日に移してから 4 週間目に一過的に高まることが報告されているが (Rohde et al, Plant Cell, 2002) 根の成長抑制や導管液関連遺伝子の発現は 10 週間まで短日が長くなるほど強くなっており、ABA の内生量の変化のパターンと大きく異なっていた。これらの結果は、シュートから根への短日情報の伝達が ABA 以外の因子によってもたらされている可能性を示唆している。近年、篩管中を流れる microRNA が花成やリン酸応答に関わっている事が明らかになってきていることから (Djordjevic et al, J. Exp Bot, 2015, Notaguchi et al, Frontier in Plant Sci, 2015) 我々は、microRNA が葉が受けた短日の情報を篩管を介して根に伝える情報分子として機能しているとの、microRNA の新たな働きに関する仮説を立て、以下の実験を行った。

(1) ポプラ (Populus trichocarpa) の葉において短日で増加する microRNA の同定

長日条件 (16 時間明期 / 8 時間暗期 3 週間) と短日条件 (8 時間明期 / 16 時間暗期 6 週間) の個体より頂芽から展開葉 3 枚目までの葉と茎をサンプリングし、small RNA シークエンス用

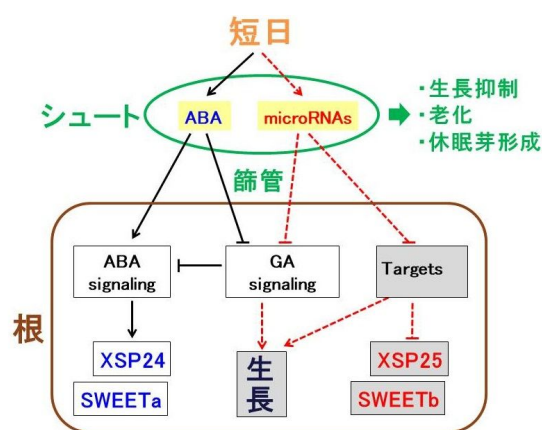
イブラリの調整を行い、次世代シーケンサ HiSeq を使用して Paired End でシーケンス解析を行った。データは microRNA 配列データベース (miRBase) 登録配列を用いて解析した。低出現の配列情報を除外するため、リードカウント数の合計が 5 カウント以上であった配列情報のみを抽出した結果、329,084 の small RNA が同定された。また、各サンプルより得られた 16 塩基以上のリードカウント済み配列データをクエリとして、microRNA データベースの miRBase に対して BLASTN 検索を行った結果、4,343,081 のリードカウント済み配列が miRBase に登録がある *P. trichocarpa* 由来の hairpin miRNA 配列にヒットした。

(2) 篩管中を移動する可能性が高い microRNA の同定と機能解析

ポプラの葉で同定された small RNA (1000 カウント以上) をカボチャ等の篩管液の microRNA データベース (Montes et al, Nature Communications, 2014 等) と照合すると、ポプラの葉において短日で 5 倍以上増加していた miRNA のうち、カボチャ等の篩管液データベース中に存在していたのは 5 種類の microRNA であった。これらの miRNA はシロイヌナズナにおいて標的遺伝子が同定されており、シュートにおいて栄養成長等に関わることが知られている。短日下のポプラでは、これらの microRNA が篩管を通して根へと輸送され、根の生長や導管液有機物質に関わる遺伝子の発現も制御していることが想定された。そこで、これらの microRNA をゲノム編集によりノックアウトしたポプラ (ハイブリッドアスペン) を複数系統ずつ作出し、現在、形質の調査を進めている。

(3) 短日による根の機能制御のモデル

ジベレリン (GA) は休眠において ABA と拮抗することが知られており、GA シグナリングの負の制御因子 GAI (GA-INSENSITIVE) も短日下で根での発現が上昇していたことから、GA シグナリングと ABA シグナリングとのクロストークも組み込んだモデルを作成した (右図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 T. Aohara, H. Mizuno, D. Kiyomichi, Y. Abe, K. Matsuki, K. Sagawa, H. Mori, H. Iwai, J. Furukawa, S. Satoh	4. 巻 33
2. 論文標題 Identification of a xylem sap germin-like protein and its expression under short-day and non-freezing low-temperature conditions in poplar root.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 123-127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.16.0411a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Aohara, J. Furukawa, K. Miura, S. Tsuda, J. S. Poisson, R. N. Ben, P. W. Wilson, S. Satoh	4. 巻 132
2. 論文標題 Presence of a basic secretory protein in xylem sap and shoots of poplar in winter and its physicochemical activities against winter environmental conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Plant Research	6. 最初と最後の頁 655-665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-019-01123-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Y. Noda, J. Furukawa, T. Aohara, N. Nihei, A. Hirose, K. Tanoi, T. Nakanishi, S. Satoh	4. 巻 6
2. 論文標題 Short day length-induced decrease of cesium uptake without altering potassium uptake manner in poplar	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 38360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep38360	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野公代、鈴木陽佳、青原勉、小野道之、岩井宏暁、古川純、佐藤忍
2. 発表標題 ポプラの季節性成長における糖含量の変化とショ糖排出トランスポーターの組織化学的発現解析
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木陽佳、青原勉、古川純、佐藤忍
2. 発表標題 ポプラ根の成長と導管液中の糖に関連する遺伝子の発現に対する日長及び温度の効果
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 青原勉、古川純、三浦謙治、佐藤忍
2. 発表標題 ポプラの根で生産された細胞外導管液タンパク質の耐凍性への関与
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣岡慎也、小野公代、古川純、小野道之、佐藤忍
2. 発表標題 ポプラの短日による休眠移行におけるmicroRNAの根への長距離輸送と機能
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~plphys/shinobuhomepage/SSindex.html>
 ここは 佐藤 忍 研究室です

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
研究協力者	小野 道之 (Ono Michiyuki)		
連携研究者	古川 純 (Furukawa Jun) (40451687)	筑波大学・生命環境系・准教授 (12102)	