

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03782

研究課題名(和文) アポプラスト障壁の形成と機能の理解

研究課題名(英文) Understanding the formation and function of apoplastic barriers

研究代表者

神谷 岳洋 (Kamiya, Takehiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：40579439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：アポプラスト障壁は植物の内と外を分ける構造である。根の内皮細胞や外皮細胞の細胞壁にリグニン(カスパー線)やスベリンが蓄積することにより、障壁としての機能を発揮する。しかし、その形成機構や生理的役割に関しては未解明の点が多い。本研究では、シロイヌナズナを用いて、カスパー線形成の転写因子であるMYB36により直接転写制御される遺伝子の解析を行い、カスパー線形成に重要なタンパク質であるCASP1の細胞内局在に重要な機能を果たす遺伝子を同定した。また、カスパー線の形成が低栄養(カリウム)によって制御されていること、また、その制御はMYB36が介して行われることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アポプラスト障壁は植物の内と外を分ける重要な構造であり、植物がさまざまな物質が含まれる土壌から、植物が必要なもののみを吸収するのに必要である。本研究では、これまでに同定したカスパー線形成に重要な遺伝子(MYB36)を手がかりに、その形成機構の分子メカニズムの詳細を明らかにしたものである。加えて、栄養条件によってカスパー線の形成が柔軟に変化することを示し、植物の環境適応応答について新しい知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The apoplastic barrier is the structure that separates the inside from the outside of the plant. Apoplastic barrier is composed of lignin (Casparian strip) and suberin composed of lipids. These are the cell wall structure of root endodermal and exodermal cells and form the barrier. However, the mechanism of their formation and their physiological roles remain largely unknown. In this study, using *Arabidopsis thaliana*, I analyzed genes directly regulated by MYB36, a master regulator of Casparian strip formation, and identified genes that play important functions in the subcellular localization of CASP1, a protein that serves as an important scaffold for Casparian strip formation. I also found that Casparian strip (apoplastic barrier) formation is regulated by low nutrition (potassium) and that this regulation is mediated by MYB36.

研究分野：植物栄養学

キーワード：アポプラスト カスパー線 スベリン

1. 研究開始当初の背景

植物は土壌から必須元素を選択的に吸収し、二酸化炭素と水のみで生育する。植物が生育する土壌には、非必須元素が含まれていたり、必須元素が欠乏、または、過剰な状態にあることが多い。このような均一でない土壌中から必須元素のみを必要量吸収することによって植物は様々な土壌環境で生育している。このような環境下での植物の生育を可能にしているのが、選択的な物質の移動を行うタンパク質である輸送体と、非選択的な物質の取り込みを防ぐアポプラスト障壁であるカスパー線である。これまでに、必須元素の輸送体タンパク質はすべて同定されており、発現や活性制御機構など多くのことが輸送体についてわかりつつあり、応用研究もされている。一方で、もう一つの役者であるアポプラスト障壁の形成機構や生理的役割に関しては未解明の点が多い状態であった。

2. 研究の目的

本研究は、アポプラスト障壁であるカスパー線とスベリンの形成と機能を理解することを目的とし、輸送体の解析だけでは見えてこなかった栄養吸収の仕組みについて新たな知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

アポプラスト障壁の形成機構と機能について、カスパー線形成のマスターレギュレーターである MYB36 により発現が制御されている遺伝子について変異株を確立し、カスパー線や CASP の局在を観察する。また、アポプラスト障壁に異常を有する変異体や形質転換体を用いることにより、形成の分子機構を解明する。材料はシロイヌナズナとイネを用いた。

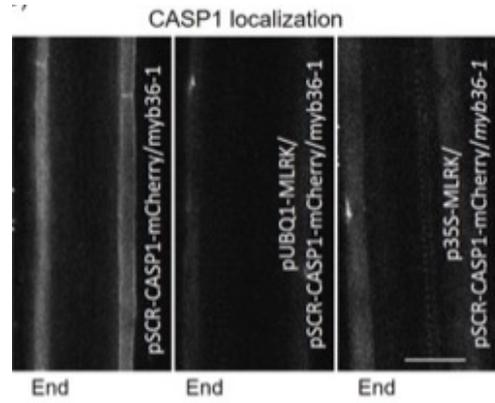
4. 研究成果

(1) MYB36 により発現が制御される遺伝子の解析

MYB36 によって制御されている遺伝子群の T-DNA 破壊株 (10 遺伝子)、CRISPR 破壊株 (2 遺伝子) を作成し、カスパー線に形成がある二つの遺伝子について機能解析を行った。MLRK (MYB36-regulated leucine-rich repeat receptor kinase) と ERK1 (Endodermis receptor kinase 1) と命名し、以下に示す成果を得た。

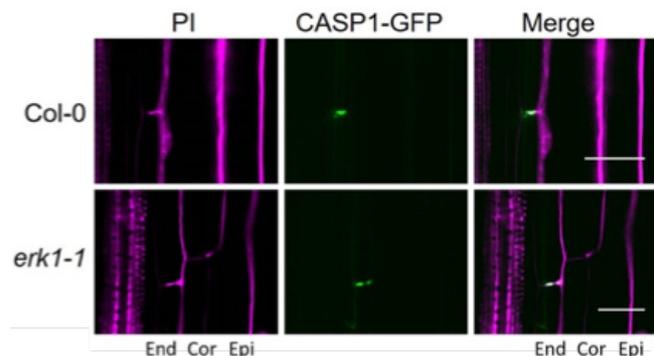
・ MLRK

MLRK が MYB36 により直接転写制御されることを ChIP-qPCR により示した。MLRK はカスパー線が形成される内皮細胞で特異的に発現し、Casparian strip domain (CSD) の両側に局在することを MLRK-genome-GFP を導入した植物を用いて示した。*mr1k* 変異株は、カスパー線の形成やアポプラスト障壁の形成に表現型が見られなかった。また、CAS1 の局在も *mr1k* 変異株では変化しなかった。一方で、pSCR-CASP1-mCherry/*myb36* では細胞膜全体に観察された CASP1 の蛍光が、MLRK を発現させると、内皮細胞の皮層側に CASP1 が局在することが明らかになった(右図)。さらに、MLRK とそのホモログである RDK1 (Receptor Dead Kinase1) の二重変異体では、内皮細胞の皮層側に異所的にリグニンが沈着し、アポプラスト障壁の形成に異常を有していた。これらの結果から、MLRK および RDK1 はカスパー線形成に必要であり、これら遺伝子の機能は冗長であることを示し、カスパー線形成に必要な二つの遺伝子を同定した。



・ ERK1

ERK1 が MYB36 により直接転写制御されることを ChIP-qPCR により示した。ERK1 は、内皮細胞で発現し、細胞質および核に局在していた。ERK1 の破壊株では、カスパー線の形成に異常があった。ただし、二つの T-DNA 破壊株についていずれもホモ系統の 20%のみがカスパー線異常を示した。*erk1* 変異株では、CAS1 の局在が変化していた(右図:*erk1-1*では CASP1-GFP の異所的な局在が観察できる)。また、



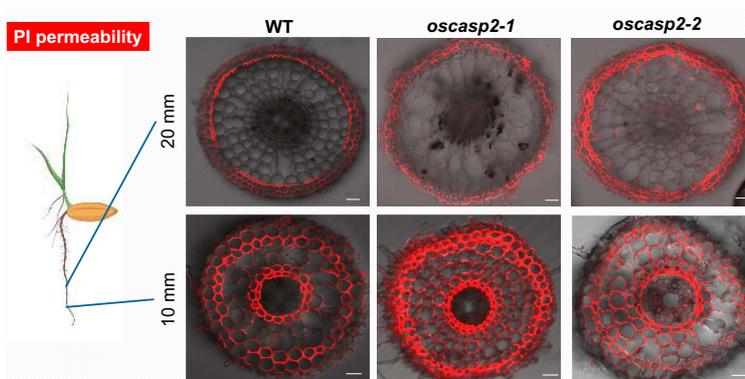
ERK1 と相互作用する単量体 G タンパク質 (ROP2 および ROP6) の破壊株では、*erk1* と同様のカスパーリー線の異常、CASP1 の局在の異常が観察された。以上の結果から、ERK/ROPs 経路はカスパーリー線形成に関与していることを示した

## (2) イネ変異株の解析

以下、OsCASP2 の解析と OsSGN3 の解析について示す。それぞれ、シロイヌナズナの CASP および SGN3 のホモログについて、CRISPR 破壊株を作成し解析した。

### ・ OsCASP2

OsCASP2 の CRISPR 破壊株を独立に複数系統作成し、そのうち、十分な量の種子が得られた 2 系統について解析を行った。ICP-MS による地上部の元素分析および propidium iodide (PI) を用いたアポプラスト障壁の機能を観察したところ、地上部における元素濃度は異常があったが (高 Ca、Sr が顕著であり、他のグループから発表された OsCASP1 と同様の元素変化パターン)、アポプラスト障壁における異常を見出すことはできなかった (右図: PI を用いた)。リグニン (カスパーリー線) の染色、スベリンの染色も行ったが、野生型との差は見出すことができなかった。観察できていない微小なアポプラスト障壁への変化が地上部元素濃度の変化を生じていると考えられる。

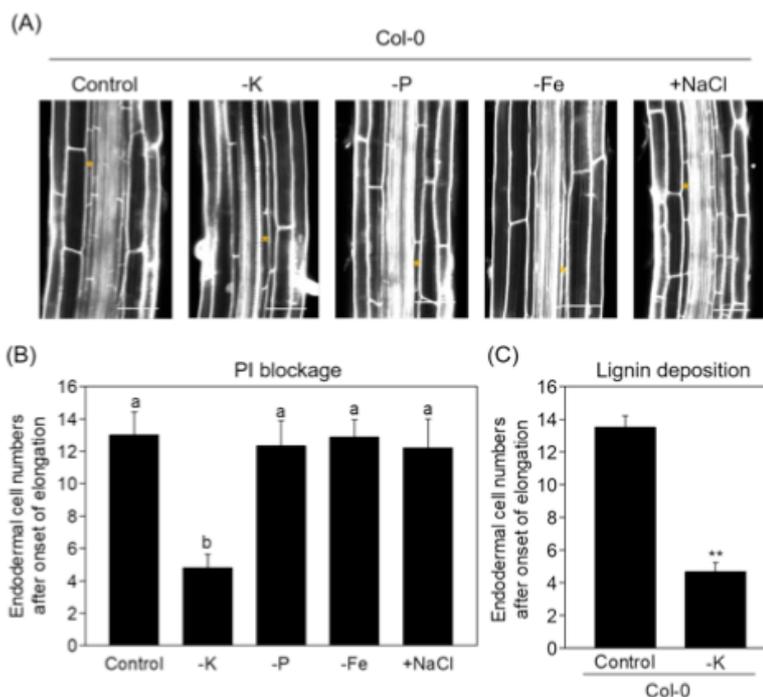


### ・ OsSGN3

OsSGN3 の CRISPR 破壊株を独立に 2 系統作成した。ホモ系統が得られなかったため (花粉が全くないため雄性不稔であると考えられる)、ヘテロ系統を維持している。このことは、OsSGN3 が花粉形成に関与することを示しており、花にもアポプラスト障壁が存在する可能性、または、OsSGN3 がアポプラスト障壁形成とは全く異なる機能を持つ可能性を示唆するものである。

## (3) 低カリウム条件で誘導されるカスパーリー線の機能

アポプラスト障壁であるスベリンの形成が栄養条件によって変化することが既に報告されていた。そこで、本研究では栄養条件がカスパーリー線形成に与える影響を解析した (右図)。シロイヌナズナを低栄養条件と NaCl 条件で栽培し、PI を用いたアポプラスト障壁の機能を検証したところ、低カリウム下にて、アポプラスト障壁の形成が通常条件下よりも根端側で観察された (右図 A, B)。また、カスパーリー線の実態であるリグニンの蓄積も低カリウム条件下で、通常条件と比較して根端側で観察された (右図 C)。また、カスパーリー線形成のマスターレギュレーターである MYB36 の発現も同様に根端側で観察された。すなわち、低カリウム条件では MYB36 の発現が根端側で発現することにより、カスパーリー線の形成、アポプラスト障壁の形成が早まることを明らかにした。



## (4) Mg 変異株の解析

カスパーリー線変異株を単離する過程で得られた低 Mg 感受性シロイヌナズナ変異株について原因遺伝子を同定し、その機能を解析した。1 つはカスパーリー線形成に関与する SGN3 であり、2

つは機能未知の遺伝子、一つはマグネシウム輸送体である MRS2-7 のスプライシングに関与していることを示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 神谷 岳洋	4. 巻 92
2. 論文標題 根におけるカスパリー線およびスベリン層形成の分子機構と養分吸収における機能	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本土壌肥科学雑誌	6. 最初と最後の頁 70～75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20710/dojo.92.2_70	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 Kolbeck Andreas, Marhav? Peter, De Bellis Damien, Li Baohai, Kamiya Takehiro, Fujiwara Toru, Kalmbach Lothar, Geldner Niko	4. 巻 11
2. 論文標題 CASP microdomain formation requires cross cell wall stabilization of domains and non-cell autonomous action of LOST1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e69602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.69602	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 Durr Julius, Reyt Guilhem, Spaepen Stijn, Hilton Sally, Meehan Cathal, Qi Wu, Kamiya Takehiro, Flis Paulina, Dickinson Hugh G, Feher Attila, Shivshankar Umashankar, Pavagadhi Shruti, Swarup Sanjay, Salt David, Bending Gary D, Gutierrez-Marcos Jose	4. 巻 62
2. 論文標題 A Novel Signaling Pathway Required for Arabidopsis Endodermal Root Organization Shapes the Rhizosphere Microbiome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 248～261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcaa170	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 Tanaka-Takada Natsuki, Kobayashi Akie, Takahashi Hideyuki, Kamiya Takehiro, Kinoshita Toshinori, Maeshima Masayoshi	4. 巻 0
2. 論文標題 Plasma Membrane-Associated Ca <sup>2+</sup> -Binding Protein PCaP1 is Involved in Root Hydrotropism of Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcz042	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 Sotta Naoyuki, Bian Bian, Peng Danhan, Hongkham Phattharawan, Kamiya Takehiro, Niikura Satoshi, Fujiwara Toru	4. 巻 136
2. 論文標題 Local boron concentrations in tuberous roots of Japanese radish ( <i>Raphanus sativus</i> L.) negatively correlate with distribution of brown heart	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 58 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plaphy.2018.12.027	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 Feng Zhihang, Nagao Hiroshi, Li Baohai, Sotta Naoyuki, Shikanai Yusuke, Yamaguchi Katsushi, Shigenobu Shuji, Kamiya Takehiro, Fujiwara Toru	4. 巻 184
2. 論文標題 An SMU Splicing Factor Complex Within Nuclear Speckles Contributes to Magnesium Homeostasis in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 428 ~ 442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00109	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Wu Qi, Takehiro Kamiya
2. 発表標題 Two kinase regulated by MYB36 are essential for correct localization of lignin in Casparian strip domain
3. 学会等名 4th Int'l Symposium on Plant Apoplastic Diffusion (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神谷岳洋
2. 発表標題 植物の根における栄養吸収 植物の内と外を分ける内皮の物質輸送障壁の形成と機能
3. 学会等名 第4回トランスポーター研究会関東部会 (JTRAKB2019) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takehiro Kamiya
2. 発表標題 Endodermal cell differentiation and apoplastic barrier formation
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wu Qi, Toru Fujiwara, Takehiro Kamiya
2. 発表標題 Two kinases regulated by MYB36 are essential for correct localization of lignin deposition in the Casparian strip domain
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takehiro Kamiya
2. 発表標題 Coordinated formation of apoplastic barrier: Casparian strips and suberin lamellae
3. 学会等名 Biosynthesis and function of suberin (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鹿内勇佑、山上睦、重信秀治、山口勝司、神谷岳洋、藤原徹
2. 発表標題 シロイヌナズナのカロース合成酵素遺伝子の低Ca耐性における作用部位と作用様式の解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2018年度神奈川大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zhihang Feng, Takehiro Kamiya, Toru Fujiwara
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鹿内勇佑, 浅田真由, 黒木俊作, 山上睦, 重信秀治, 山口勝司, 神谷岳洋, 藤原徹
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける低 Ca 耐性への GSLファミリー遺伝子の寄与の解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takehiro Kamiya
2. 発表標題 Coordinated formation of apoplastic barrier: Casparian strips and suberin lamellae
3. 学会等名 Biosynthesis and function of suberin
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Prashant Kandwal, 田中 伸裕, 藤原 徹, 神谷 岳洋
2. 発表標題 Isolation and characterization of the rice mutant with high molybdenum in grain
3. 学会等名 日本土壤肥料学会 2018年度神奈川大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manman Kan, Toru Fujiwara, Takehiro Kamiya
2. 発表標題 Golgi-localized OsFPN1 is required for cobalt and nickel homeostasis in rice
3. 学会等名 第60回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mohammad Anwar Hossain, Takehiro Kamiya, David Burritt, Lam-Son Phan Tran, Toru Fujiwara	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 324
3. 書名 Plant Micronutrient Use Efficiency	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	山上 睦 (Yamagami Mutsumi)  (60715499)	公益財団法人環境科学技術研究所・環境影響研究部・副主任 研究員  (81103)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計2件

国際研究集会 Biosynthesis and function of suberin	開催年 2018年～2018年
国際研究集会 Biosynthesis and function of suberin	開催年 2018年～2018年

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------