

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07458

研究課題名(和文) 水分蒸散制御に関わる組織間ネットワークの解析

研究課題名(英文) Intertissue networks of water transpiration control in plants

研究代表者

黒森 崇 (Kuromori, Takashi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員

研究者番号：80332295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物の水分蒸散を制御するホルモンであるアブシジン酸が、一般的な動物のホルモンのように遠隔(エンドクライン)で働くのか、あるいは植物ホルモンでこれまで考えられてきたように近傍(オートクライン)で働くのかについて調べました。分子生物学的な研究手法により、気孔閉鎖を促進するアブシジン酸の作用はエンドクラインとオートクラインのどちらの働き方でも作用することが示唆されました。植物特有の生存戦略の一つである可能性があります。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞生物において、ホルモンなどの生理活性物質は、生合成場所から作用場所への機敏で正確な伝播制御が要求されます。植物にとって水分状態を感知・伝播して、気孔を最適な状態に維持していくことは、個体レベルで水分蒸散を調節するための最も重要なネットワーク制御の一つです。水分蒸散を制御する植物ホルモンの生合成と組織間における伝播輸送ネットワーク、そしてそこに関わる制御因子と作用機序の理解を目指しています。

研究成果の概要(英文)：Aba is a key phytohormone that prevents water loss from the plant body. We examined whether Aba has an endocrine-type action or an autocrine-type action, by using molecular biological approaches. Consequently, I found that Aba looked to be able to function by both actions of endocrine and autocrine, which probably would be a unique strategy in plant survival.

研究分野：分子生物学

キーワード：植物ホルモン アブシジン酸 維管束 気孔 孔辺細胞 膜輸送 膜タンパク質 変異体

1. 研究開始当初の背景

動物や植物の環境応答において、組織間や器官間では生体物質の輸送ネットワークが働いており、その結果として生長や反応の器官レベルや個体レベルの方向性が決められています。特に、ホルモンに代表される生理活性物質は、その生合成場所から作用場所への正確な輸送制御が要求されます。例えば、動物ホルモンの多くは特定の場所で分泌され、離れた標的器官に作用すること(エンドクライン)が調べられています。一方で、これまで植物では合成された場所で働くこと(オートクライン)が主であると考えられてきました。

ところが、近年になり植物体においても、ホルモンの生体膜を介した輸送や組織間や器官間の移動の例が次々に報告され、動物ホルモンで調べられているようなエンドクラインを考慮に入れる必要が出てきました。現在、植物ホルモンの作用機序の中で、生合成が生体内のどこで行われるのか、および合成場所から標的場所へのネットワーク制御について改めて注目されています。

研究代表者はこれまでに、植物ホルモンのアブシジン酸(ABA)の膜輸送体(トランスポーター)を同定し、輸送制御メカニズムの一端を報告してきました。また、蛍光イメージングを用いた細胞レベルでの観察により、ABA 生合成を担う酵素遺伝子が維管束組織の特定の細胞で強く発現していることを明らかにしました。これらの結果から、ABA は植物体内部に存在する維管束組織において合成され、植物体表層の標的細胞(孔辺細胞)へエンドクラインで作用する仮説が示唆されています。

2. 研究の目的

植物体にとって水分の状態を感知し、水分蒸散を調節する気孔を最適な状態に維持していくことは、個体レベルの制御の最も重要な項目の一つです。アブシジン酸(ABA)は、表皮組織に存在する孔辺細胞に作用して気孔閉鎖を誘起しますが、研究代表者は ABA 合成酵素や ABA 膜輸送体が維管束組織の特定の細胞(篩管伴細胞)で主に発現していることを示し、ABA はエンドクライン型ホルモンとして働く可能性を報告しました。

一方で、別の研究グループから、ABA はオートクライン型ホルモンとして孔辺細胞で合成されて、その場で機能することが提案されました。そこで本研究では、離れた組織である維管束組織と表皮組織(孔辺細胞)の間で、ABA の生合成と組織間伝播輸送システムの統合的な理解を目指して、気孔閉鎖を促進するアブシジン酸はエンドクラインで働くのか、オートクラインで働くのか?について調査します。分子生物学的なアプローチによって、気孔閉鎖を促進するアブシジン酸は、主に維管束細胞で作られているのか、あるいは孔辺細胞で作られているのか、について調べることが目的です。

3. 研究の方法

分子生物学的なアプローチによるネットワーク解析によって、気孔閉鎖を促進するアブシジン酸は主に維管束細胞で作られるのか孔辺細胞で作られるのかについて試験します。

(1) 維管束細胞(篩管伴細胞)で特異的に発現しているスタンダードである SUC2 遺伝子のプロモーター(SUC2pro)および孔辺細胞で特異的に発現しているスタンダードである GC1 遺伝子のプロモーター(GC1pro)をクローニングします。

(2) アブシジン酸合成の最後の3段階を担う酵素(NCED3, ABA2, AAO3)の各々の遺伝子を、1.でクローニングした SUC2pro および GC1pro に融合して合計6種類の形質転換用ベクターを作製し、各々の遺伝子の変異体植物(nced3, aba2, aao3)に導入して形質転換植物を作製します(図1)。

(3) nced3, aba2, aao3の何れの変異体も水分蒸散が亢進する表現型があります。SUC2pro と GC1pro のどちらの細胞特異的な遺伝子発現により、表現型が相補されるかについて、葉からの水分蒸散を簡便に検定できる赤外線カメラ(サーモグラフィー)を用いて観察します。

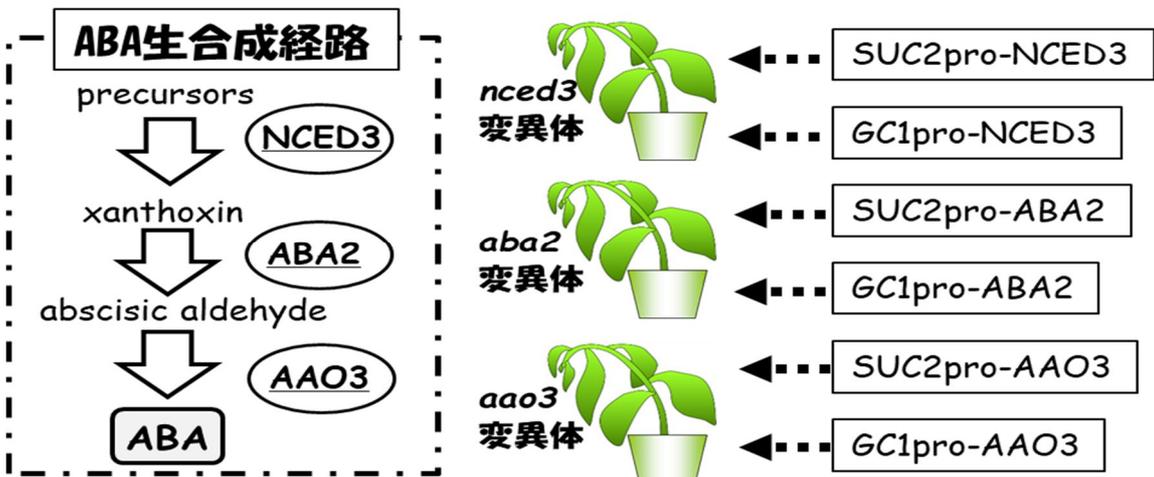


図1 ABA 合成酵素の各変異体において維管束細胞/孔辺細胞のどちらの発現で表現型を戻すか?

4. 研究成果

アブシジン酸がエンドクラインで働くのか、オートクラインで働くのか？について明らかにするため、気孔閉鎖に機能するアブシジン酸が主に維管束細胞で作られるものによるのか孔辺細胞（気孔）で作られるものによるのかに関して、分子生物学的なアプローチによる解析を行いました。

(1) 維管束細胞（師管伴細胞）で特異的に発現する SUC2 遺伝子のプロモーター（SUC2pro）および孔辺細胞で特異的に発現する GC1 遺伝子のプロモーター（GC1pro）をクローニングし、アブシジン酸合成の最後の段階を担う酵素（AAO3）の遺伝子に融合して、2種類の形質転換用ベクターを作製しました。そのベクターを変異体（*aa03*）に導入して形質転換植物を作製しました。

変異体（*aa03*）は、植物ホルモン ABA を合成することができないため、気孔閉鎖を正常に行えず、水分蒸散が亢進する形質があります。作製した形質転換体を複数ラインずつ観察した結果、SUC2pro、GC1pro のどちらの細胞種特異的なプロモーターによって AAO3 遺伝子を発現させた場合でも、その変異体表現型が完全に相補されることが分かりました。

このことから、当初仮説として考えていた ABA のエンドクライン作用による気孔閉鎖はサポートされる一方、オートクライン作用による働きが存在することも示唆されました。

(2) 次に、維管束細胞（師管伴細胞）で特異的に発現する SUC2 遺伝子のプロモーター（SUC2pro）および孔辺細胞で特異的に発現する GC1 遺伝子のプロモーター（GC1pro）を、アブシジン酸合成の最後から2段階目を担う酵素（ABA2）の遺伝子に融合して、2種類の形質転換用ベクターを作製しました。そのベクターを変異体（*aba2*）に導入して形質転換植物を作製しました。

作製した形質転換体を複数ラインずつ観察した結果、変異体（*aba2*）に関しても、SUC2pro、GC1pro のどちらの細胞種特異的なプロモーターによって ABA2 遺伝子を発現させた場合でも、水分蒸散が亢進する変異体表現型が完全に相補されることが分かりました。

この結果は、変異体（*aa03*）に AAO3 遺伝子を導入した場合と同様であり、アブシジン酸がエンドクラインで働く作用とオートクラインで働く作用のどちらも有する可能性があることが示唆されました（図2）。

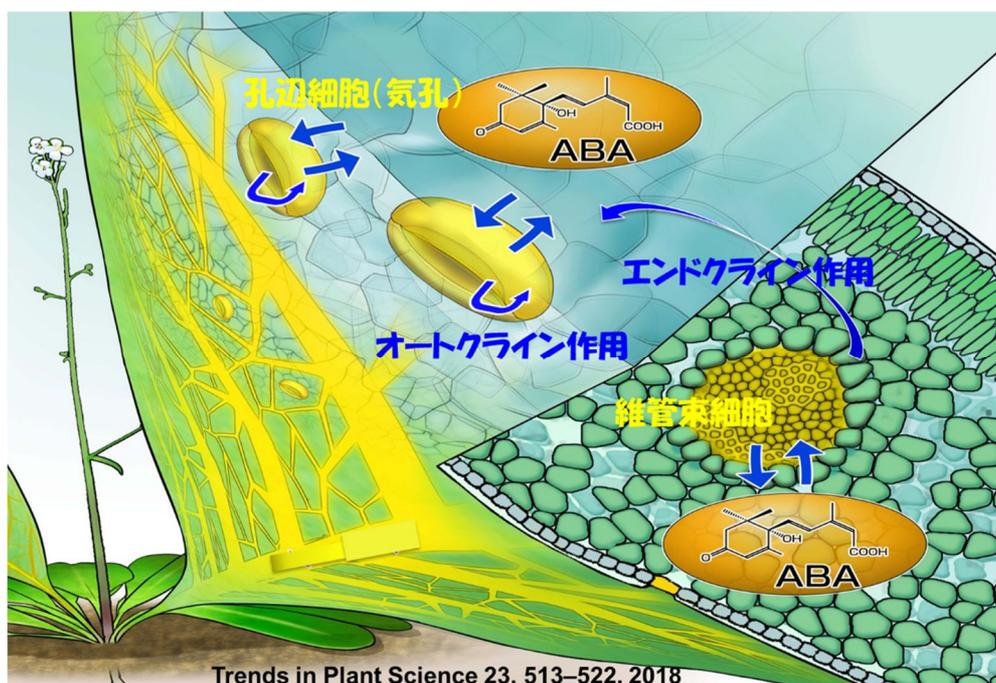


図2 気孔閉鎖を誘導するアブシジン酸の合成場所と作用機序

(3) さらに、維管束細胞（師管伴細胞）で特異的に発現する SUC2 遺伝子のプロモーター（SUC2pro）および孔辺細胞で特異的に発現する GC1 遺伝子のプロモーター（GC1pro）を、アブシジン酸合成の最後から3番目を担う酵素（NCED3）の遺伝子に融合して、2種類の形質転換用ベクターを作製しました。そのベクターを変異体（*nced3*）に導入して形質転換植物を作製しました。

変異体（*nced3*）に関しても、水分蒸散が亢進する形質がありますが、SUC2pro、GC1pro のどちらの細胞種特異的なプロモーターによって NCED3 遺伝子を発現させた場合でも、その変異体表現型に影響を与えることが分かりました。ところが、この場合は上記のアブシジン酸合成酵素遺伝子（AAO3, ABA2）を変異体植物（*aa03*, *aba2*）へ導入した場合は異なる傾向で変化することが分かり、この結果については分析中であり、さらに検討が必要です。

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 4件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Kuromori T, Seo M, Shinozaki K | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 ABA transport and plant water stress responses. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Trends in Plant Science | 6. 最初と最後の頁 513 ~ 522 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tplants.2018.04.001 | 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 Takahashi F, Kuromori T, Sato H, Shinozaki K | 4. 巻 1081 |
| 2. 論文標題 Regulatory Gene Networks in Drought Stress Responses and Resistance in Plants. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology | 6. 最初と最後の頁 189 ~ 214 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-1244-1_11 | 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 Kuromori T, Sugimoto E, Ohiraki H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Functional relationship of AtABCG21 and AtABCG22 in stomatal regulation | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 12501 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-12643-6 | 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11件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 黒森 崇、杉本 絵理子、篠崎 一雄 |
| 2. 発表標題 生理活性物質の膜輸送に関わるトランスポーターの機能解析 |
| 3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kuromori T, Fujita M, Sugimoto E, Kikuchi S, Shinozaki K |
| 2. 発表標題 Functional complementation of guard cell specific or phloem companion cell specific ABA biosynthesis |
| 3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kuromori T, Sugimoto E, Shinozaki K |
| 2. 発表標題 Functional screening of membrane transporters for a specific substance |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 黒森 崇、杉本 絵理子、篠崎 一雄 |
| 2. 発表標題 植物トランスポーターの膜輸送アッセイによる機能解析 |
| 3. 学会等名 第56回アイソトープ・放射線研究発表会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kuromori T, Sugimoto E, Shinozaki K |
| 2. 発表標題 Functional complementation of ABA biosynthesis using cell-type specific promoters |
| 3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 黒森 崇、杉本 絵理子、篠崎 一雄 |
| 2. 発表標題 生理活性物質の膜輸送に関わるトランスポーターの遺伝子機能解析 |
| 3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kuromori T, Sugimoto E, Shinozaki K |
| 2. 発表標題 Is ABA an endocrine-type hormone or an autocrine-type hormone? |
| 3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 黒森 崇、杉本 絵理子、篠崎 一雄 |
| 2. 発表標題 生理活性物質を輸送するトランスポーターの機能的スクリーニング法の開発 |
| 3. 学会等名 第12回トランスポーター研究会年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>研究紹介 http://genediscovery.riken.jp/kuromori.html</p> |
|--|

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 | 杉本 絵理子 (Sugimoto Eriko) | 国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・テクニカルスタッフ (82401) | |