

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22438

研究課題名（和文）高温・乾燥地域での生育を可能にする植物の新規な蒸散制御システムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of a novel transpiration control system in plants that enables growth in hot and arid areas

研究代表者

金井 雅武（Kanai, Masatake）

基礎生物学研究所・オルガネラ制御研究室・特任助教

研究者番号：30611488

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：東アフリカを原産とするヒマ（*Ricinus communis*）はC3型植物であり、高温・乾燥地域に適したC4型植物でないにも関わらず、優れた高温・乾燥耐性を持つ。ヒマ葉では気孔を形成する孔辺細胞直下にある葉内の間隙において他の植物では見られない細胞が見られた。この特殊な細胞がサイズを変化させることで気孔に繋がる間隙の開閉を担うバルブとして機能することで、気孔の開閉と併せて2つの弁による厳密な制御を行っていることが予測された。バルブ細胞の発現プロファイルから液胞膜のトランスポーターの発現を増加しており、液胞サイズを精密にコントロールすることで葉内のバルブとして機能していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的な気温上昇と水不足の懸念から、高温・乾燥環境下においても健全に生育する作物の作出に向けた基礎研究が盛んに行われている。本研究はヒマの持つ、C3型植物でありながら、極めて強い高温・乾燥耐性を持つという特殊な現象に注目し、既存のモデルにない全く新しい蒸散制御システムの一端を明らかにした。将来的には、イネ、コムギといった食料として極めて重要なC3型植物に新規な蒸散制御システムを導入することで、食料問題の解決に資する新規戦略の提供となる。本研究の進展は、基礎研究の発展のみならず、将来的な食糧問題の解決に貢献するものになると考える。

研究成果の概要（英文）：*Ricinus communis*, which is native to East Africa, is a C3-type plant and has high temperature and drought tolerance, even though it is not a C4-type plant suited to hot and arid regions. In castor leaves, unique cells were found in the intra-leaf spaces below the stomatal cells. It was predicted that these specialized cells function as valves that open and close the pore space leading to the stomatal opening by changing their size, thereby providing a tight control by two valves in conjunction with the opening and closing of the stomatal opening. The expression profiles of the valve cells showed increased expression of transporters in the vacuole membrane, suggesting that they function as valves in the leaf by precisely controlling the vacuole size.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ヒマ 耐暑性 耐乾性 蒸散

1. 研究開始当初の背景

近年の食料やバイオ燃料、バイオプラスチック等の需要増大により作物の生産性向上が喫緊の課題となっている。しかし、世界的な気温上昇や水資源の枯渇が進行しており、作物生産に適した耕地の拡大は困難である。そのため、今後も拡大することが予測される高温・乾燥地域においても健全に生育する作物の作出が不可欠である。

東アフリカを原産とするヒマ (*Ricinus communis*) は種子にバイオプラスチックの原料となるヒドロキシ脂肪酸を高濃度に蓄積する油糧作物である。ヒマは C3 型植物であり、高温・乾燥地域に適した C4 型植物でないにも関わらず、優れた高温・乾燥耐性を持つ。そのため、他の作物には不適な中国やインド内陸の半乾燥地帯において重要な作物となっている。現在、ヒマのストレス耐性に関する研究は数多く行われており、モデル植物と同様に様々な機構を有することが報告されている。一方、ヒマの特徴である、C3 型植物でありながら高温耐性と乾燥耐性を両立させる機構はいまだ明らかでない。

研究代表者の所属機関内にある圃場において C3 型植物の葉面温度を測定したところ、ヒマの葉面温度は、アサガオやダイズと比較して低く保たれていることを見出した。これは、積極的な蒸散により葉を冷却する能力が高いことを示している。さらに、一時的に日光を遮った後に温度を測定したところ、アサガオやダイズ葉では温度が一層低下したものの、ヒマ葉では温度の低下が見られなかった。この結果は、アサガオやダイズでは一時的な遮光により冷却が不必要になったものの、直ちに蒸散を抑制できずに過度な冷却が起こる一方で、ヒマは遮光後すぐに蒸散を抑制し、無駄な水分の損失を防いでいると考えた。これらの結果から、ヒマが C3 型植物でありながら高温耐性と乾燥耐性を両立させることのできる理由は、蒸散量をより厳密に制御する仕組みを持つためであると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒマの高温耐性と乾燥耐性を両立させる仕組みの解明であり、これまでの研究より示唆された葉の蒸散量をより厳密に制御する仕組みを分子レベルに明らかにすることを目指す。

これまでの研究から、ヒマ葉では気孔を形成する孔辺細胞直下にある葉内の間隙において他の植物では見られない細胞が見られた。通常の C3 型植物の葉では、気孔直下に間隙が配置されており、気孔の開閉により葉内のガス交換と蒸散が制御されている。一方、ヒマ葉では気孔直下に葉緑体を持たない特殊な細胞が分化しており、この特殊な細胞は気孔直下でのみ観察された。ヒマ葉では、この特殊な細胞がサイズを変化させることで気孔に繋がる間隙の開閉を担うバルブとして機能することで、気孔の開閉と併せて 2 つの弁による厳密な制御を行っているかと予測した。本研究は、C3 型植物でありながら、優れた高温・乾燥耐性を持つヒマから見出された新規な蒸散制御システムの解明を目指し、その中心となる“バルブ細胞”の機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

バルブ細胞の機能解明のためには、バルブ細胞を単離し、その細胞の遺伝子発現プロファイルを取得することを計画した。動物細胞と比較して植物細胞の単離は困難である場合が多く、効率

的なプロトプラスト化条件を詳細に検討した。加えて、取得したプロトプラストからバルブ細胞を濃縮する方法として、セルソーティングおよび遠心分離を検討した。濃縮したバルブ細胞から mRNA を抽出し、遺伝子発現プロファイルの取得を検討した。

4 . 研究成果

バルブ細胞の機能に向け、ヒマ葉の細胞分画法を検討した。ヒマ葉から細胞の種類に偏りなくプロトプラストを調整するため、既報の Tape-Arabidopsis Sandwich 法を改変した。使用する葉の部位、表皮の前処理、表皮剥離に使用するテープの種類、細胞壁分解酵素の濃度および処理時間、回収した細胞の洗浄方法を検討し、ヒマ葉に最適化した。これより、従来法と比較して、損傷の少ないプロトプラストを大量に調製することができた。次に、ヒマ葉の細胞集団であるプロトプラストからバルブ細胞の分離を検討した。バルブ細胞は顕微鏡観察により見いだされ、他の細胞よりもサイズが大きいことを確認している。サイズの違いを利用し、25 μ m、50 μ m、100 μ m のナイロンメッシュを用いて細胞分画を行った。サイズの小さい細胞は 25 μ m 以下の画分に濃縮され、大きな細胞は 25-50 μ m の画分に濃縮された。25-50 μ m 画分の細胞は、50%程度がクロロフィル自家蛍光を持たない細胞であった。細胞サイズおよびクロロフィル自家蛍光を持たないことから、25-50 μ m の画分にはバルブ細胞と考えられる大きなサイズの細胞が濃縮されていた。バルブ細胞の機能解析のための遺伝子発現プロファイル取得に向けた前段階として、各画分から RNA を抽出して定量 PCR 解析を行った。表皮細胞、柵状組織細胞、柔組織細胞それぞれに特異的に発現している mRNA を定量したところ、バルブ細胞が濃縮されている 25-50 μ m 画分では、他の画分と比較して柔組織細胞特異的な mRNA の発現量が高く、表皮細胞、柵状組織細胞特異的な mRNA の発現量は低かった。さらに、タンパク質発現プロファイルの前段階として、各画分から総タンパク質を抽出して SDS-PAGE 解析、銀染色を行い、そのバンドパターンを比較した。25-50 μ m 画分では、他の画分と比較して Rubisco タンパク質のバンド強度が低下しており、特徴的なバンドパターンであった。これより、取得した 25-50 μ m 画分は表皮細胞、柵状組織細胞の混入は少なく、サイズの大きい柔組織細胞が濃縮されていることを遺伝子発現およびタンパク質レベルで明らかにした。

次に、これまでに確立したヒマ葉の細胞分画法を用いてバルブ細胞濃縮画分の大量調整を検討した。基礎生物学研究所内の人工気象器で 4 週間栽培したヒマの新葉から調整したところ、高い純度でバルブ細胞と考えられるサイズの大きい柔組織細胞が調整できた。この画分から全 RNA および総タンパク質を抽出し、濃度を測定したところ今後の解析に必要な量に達しなかった。サンプル量を増やすために、新葉以外の葉からの分画を検討したところ、純度が低かった。これより、高い純度のサイズの大きい柔組織細胞画分を調整するためには 4 週間栽培したヒマの新葉が適していることが明らかとなった。十分量のヒマ新葉を用意する目的で、所内の複数の人工気象器、ガラス温室、圃場を利用して栽培し、それぞれから収穫した新葉を用いて画分を調整した。精製したバルブ細胞画分を顕微鏡観察により純度を比較したところいずれも高い純度であったものの、屋外で生育させたヒマから精製された細胞は人工気象器由来と比較して 4 倍ほど高い濃度のバルブ細胞が見られた。この結果は屋外圃場で生育させたヒマは人工気象器で栽培されたヒマよりもバルブ細胞を発達させていることを示唆している。屋外圃場の環境は人工気象器と比較して過酷であり、より厳密な蒸散制御が要求されると考えられる。これよりヒマは環境に応じてバルブ細胞の数をコントロールしていると考えられ、バルブ細胞の大量調整には気温の時期に屋外圃場で栽培した植物体が適していることが明らかとなった。一方、屋外圃場、人工気象器由来のバルブ細胞の形態を比較したところ、形やサイズの違いは見られなかったため、ヒマ

は環境に応答してバルブ細胞の数をコントロールしているものと考えられた。

屋外圃場から得られたバルブ細胞画分を用いて RNA-Seq 解析を行った。予備実験の結果と同様に、バルブ細胞画分の発現プロファイルは、柔組織細胞画分のものに近かった。さらにバルブ細胞画分と柔組織細胞画分の比較解析を行ったところ、バルブ細胞では液胞膜局在の各種トランスポーターをコードする遺伝子の発現が高い傾向があることを明らかにした。今後は、再現性を確認し、バルブ細胞の液胞の機能についての研究を進める。

2019 年度以降の COVID-19 の影響と天候不順の影響を受け、当初計画していた研究計画の一部は期間延長により遂行することになったものの、上記のように、ヒマにおける厳密な蒸散を制御していることが示唆されるバルブ細胞の発現プロファイルを得ることができた。このデータを基盤として、バルブ細胞の機能に迫る研究を展開したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Kanai Masatake, Hikino Kazumi, Mano Shoji	4. 巻 14
2. 論文標題 Cloning and Functional Verification of Endogenous U6 Promoters for the Establishment of Efficient CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in Castor (<i>Ricinus communis</i>)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1327 ~ 1327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes14071327	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金井雅武 星理絵 真野昌二
2. 発表標題 孔辺細胞特異的なクチクラ層欠損はCO2吸収促進と乾燥耐性を両立させるか？
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金井雅武 真野昌二
2. 発表標題 低CO2耐性を示すシロイヌナズナ変異体のスクリーニング
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金井雅武 杉浦（中井）篤 山口勝司 重信秀治 真野昌二
2. 発表標題 チャ (<i>Camellia sinensis</i>) 種子における脂質合成の特徴
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masatake Kanai , Kentaro Tamura , Katarzyna Tarnawska-Glatt , Shino Goto-Yamada , Kenji Yamada , Shoji Mano	4. 発行年 2022年
2. 出版社 CABI	5. 総ページ数 270
3. 書名 Plant Omics	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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0件

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
---------	---------