

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05854

研究課題名(和文) アポプラストROSモニタリングによる植物状態のプロファイリング解析

研究課題名(英文) Plant monitoring by apoplastic reactive oxygen species

研究代表者

安保 充 (Abo, Mitsuru)

明治大学・農学部・専任准教授

研究者番号：00272443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物根のアポプラストROSの計測デバイスを開発した。PDMSポリマーに作製した流路に、植物根先端を置き、ROSと反応する蛍光プローブを流路に流し、蛍光顕微鏡で定点観測を行った。手法的には経時的な蛍光画像処理、またはマルチチャンネル検出器での信号のモニタリングを行った。通常生育のダイズ幼根と、阻害剤でROS生成阻害時の植物個体との比較計測により、通常生育時の定常的なアポプラストROS放出が観測された。さらに、塩、重金属ストレスを付加し、負荷後30分の経時的変化を観測したところ、強塩ストレス、低塩ストレス、重金属ストレスで放出アポプラスト量の時間軸に対する異なるパターンが観測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物のアポプラストROSを非侵襲的にモニタリングし、ストレスの種類・強度の違いによって、ROS量の経時的変化が異なることを示した。アポプラストROSの非侵襲的モニタリング例はほとんどなく、その応用例も少ない。伸長根端では細胞外の酸化還元酵素が複数発現しているが、その発現量や活性量を総合的に評価するには、アポプラストROSの直接計測が必要不可欠である。ストレス負荷後の短期応答(30-60分程度)・ストレスに対する馴化を、アポプラストROS量を指標にモニタリングできる可能性が示されたことは、学術的にも今後の植物栽培において新たな栽培指標として有意義であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A device for measuring reactive oxygen species (ROS) in the apoplast of plant roots was developed. The root tips were placed in a channel created in a PDMS polymer and a fluorescent probe that reacts with ROS was introduced. Measurements were made with a fluorescence microscope at fixed points. Fluorescence images over time were processed or signals were monitored using a multi-channel detector. By comparing measurements between normally growing soybean roots and those treated with ROS production inhibitor, a steady release of apoplast ROS under normal growth conditions were observed. Furthermore, after application of salt and heavy metal stresses, different patterns in apoplast ROS release in 30 minutes under high salt stress, low salt stress, and heavy metal stress.

研究分野：分析化学

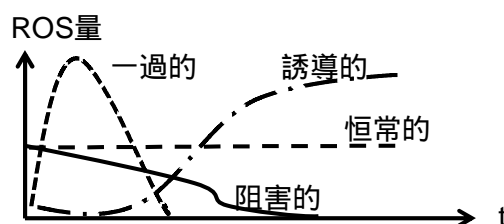
キーワード：apoplast ROS plant chip monitoring

1. 研究開始当初の背景

アポプラストは病原菌の攻撃や植物免疫の発現など外界との境界にあると共に、根端ではアポプラスト経由でミネラルの吸収、およびタンパク質や二次代謝産物、活性酸素種(ROS)などの放出が行われている。アポプラストに放出される ROS は、植物病原菌に感染した場合はオキシバーストと呼ばれる一過的な放出をする。その一方で、根毛伸長や根の伸長時にも放出される。現在まで、アポプラスト ROS を定量的かつ経時的に示した報告は少なく、根毛伸長時に放出されるとの報告 (Monshausen *et al.*, *Plant Physiol.*, 147, 1690-1698, 2008) や、MAMP (microbe-associated molecular pattern) 応答において ROS 放出ピークが刺激後 30 分、2h、7h にあるとの報告 (Shang-Guan *et al.*, *Plant Physiol.*, 176, 2543-2556, 2018) がある程度である。また植物根が、目的に応じて ROS の放出量および放出のタイミングを使い分けしているのか、さらにストレスの発生部位から遠隔位へのシグナル伝達の役割を持つのか? といった学問的問いがあった。そこで、放出されるアポプラスト ROS の放出様式を、時間を軸として類型化できれば新しい知見が得られる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

ROS はストレス応答の防御応答物質、また情報伝達物質としても働くことが知られているが、右図に示したように一過的 (オキシバースト) 恒常的、あるいはストレスにより阻害的/誘導的放出など、時系列でどのようなプロファイルで現れるのか明確ではなかった。今回申請者は高感度にアポプラスト ROS を観察する植物チップと蛍光顕微鏡、切り替え流路を組み込んだシステムを作製し、各種ストレス応答をモニタリングできる系の確立を目指した。また、最終的にはアポプラスト ROS 量を時間軸でプロファイリングし、植物に負荷されているストレスの種類や強さ、植物の状態把握の目的で利用することを考えた。



3. 研究の方法

(1) バッチ型インキュベート実験によるアポプラスト ROS の確認

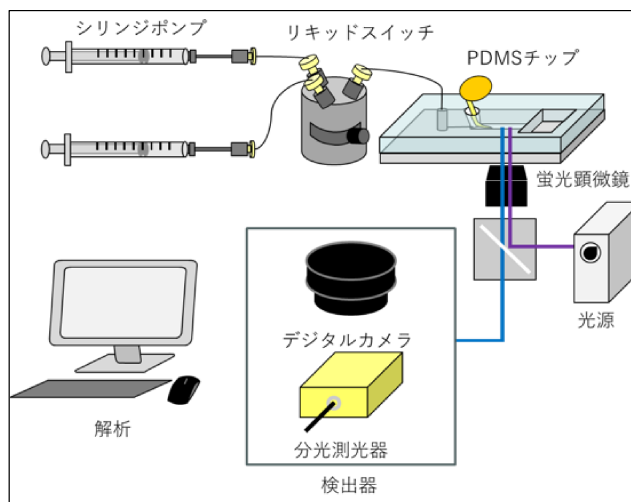
幼植物体を、ROS 検出用のスピントラップ剤または蛍光プローブ液に 30 分間 (あるいは 60 分間) インキュベート後に分析した。ただし、十分な蛍光強度が得られない場合は、インキュベーション時間を 24 時間にした。

(2) フロー型植物チップの作製

植物体をセットするチップはポリジメチルシロキサン (PDMS) ポリマーで作製した。流路は HPLC 用の外径約 1.6 mm の PEEK チューブを鋳型として作製し、スライドガラスに貼り付けて使用した。溶液はシリンジポンプで送液し、4 方スイッチングバルブを用いて 2 液を切り替えることができる系を作り込んだ。

(3) 蛍光顕微鏡 - マルチチャンネル検出器を用いた植物根端の定点モニタリング

右図のように落射型蛍光顕微鏡の C マウントからデジタルカメラに出力する方法 (経時的イメージングから解析) と、マルチチャンネル検出器に出力して信号をモニタリングする方法を行った。ダイズを用いてアポプラスト ROS の放出と、その発生源である NADPH オキシダーゼの阻害剤であるジフェニレイオドニウム (DPI) で 30 分間前処理した植物体を利用することで、アポプラスト ROS の遮断時のバックグラウンド信号を確認した。



(4) ストレス負荷と経時的アポプラスト ROS のプロファイリング

ストレスとして塩ストレス (NaCl 50 -200 mM) と重金属ストレスとして Cd ストレス (5 -20 mM) を負荷し、アポプラスト ROS の放出量を観測した。

(5) 拡散を抑えたアポプラスト ROS のイメージング

ポリビニルアルコール (PVA) と四ホウ酸ナトリウムの架橋反応を用いて植物根表面をゲルで覆うことにより、アポプラスト ROS により蛍光したプローブの拡散を抑制してイメージングした。

4. 研究成果

(1) バッチ型インキュベート実験

ダイズを用いた実験において ESR スピントラップ法によりアポプラスト ROS に由来する炭素中心ラジカルを確認できた。また、蛍光プローブを用いた HPLC 分析により ROS と反応した蛍光プローブピークの検出にも成功した。他の植物種ではチシャ、シロイヌナズナを用いた場合、放出アポプラスト ROS 量が少なく、ピーク検出が困難であったため、インキュベーション時間を 24 時間として測定した。その結果、植物 1 個体あたり、インキュベーション時間 1 時間あたりで比較したところ、チシャはダイズの約 1/100、シロイヌナズナは約 1/30 であった。以上のようにアポプラスト ROS の計測において本手法の汎用性が示された。

(2) フロー型植物チップの設計・作製

本実験系は、流路切替えバルブを使うことでストレス負荷が容易な系であり、申請時に計画していた Y 字型流路ではなく、1 本の流路途中に根をセッティングする設計に変更した。また、マイクロ流路を利用する実験系も検討したが、流路の双方から吸引と吐出の速度を合わせた送液が必要であり、再現性を得ることが困難であったため、内圧が上がらない幅広い流路 (約 1.6 mm) のチップを採用した。

(3) 蛍光顕微鏡-マルチチャンネル検出器を用いた植物根端の定点モニタリング

ダイズ幼植物をチップにセットして計測したところ送液切替え時刻から 5 分ほどで溶液が切り替わり、アポプラスト ROS 放出量は 15 分程で定常的な値を取ることが分かった。アポプラスト ROS の生成酵素である NADPH オキシダーゼを阻害した植物体を用いたところ、シグナルは対照区 (ストレスなし) とは異なり ROS の蛍光信号が増加しなかった。このことから、得られる蛍光信号が NADPH オキシダーゼ由来のアポプラスト ROS を計測していることが確認された。このように、ストレス負荷の初期応答としてアポプラスト ROS を経時的にモニタリングした例は珍しく、植物のストレス応答および馴化を継続的に調べる上で有用な実験系を構築できたと考えている。

(4) ストレス負荷と経時的アポプラスト ROS のプロファイリング

強い塩ストレス (200 mM) 負荷時と中程度の塩ストレス (50 mM, 100 mM) 負荷時では時間軸に対してアポプラスト ROS の放出量の変化が異なった。強い塩ストレス負荷時はアポプラスト ROS が上昇後、下落に転じ、バックグラウンド (植物なし) の信号強度に等しくなるのに対し、中程度の塩ストレス負荷時は上昇後、定常状態になることが分かった。この結果は強いストレスの場合、アポプラスト ROS 生成が完全に阻害されたことから、植物の状態把握の指標として有効であると考えられる。

さらに重金属ストレスとしての Cd ストレスでは、ストレス負荷時にアポプラスト ROS は上昇するが、そのタイミングやプロファイルにはばらつきがあった。

一方、一過的な放出が予想されたキチンやフラジェリタンパク質などの刺激剤に関しては、懸濁試料であって、PDMS を用いたフロー系ではその適用が難しく、データの取得が十分にできなかった。

(5) 拡散を抑えたアポプラスト ROS のイメージング

アポプラスト ROS の蛍光イメージング画像の定点での蛍光強度の時間変化から ROS の放出速度を計算するため、アガロースゲル上での根近傍の定点観測を計画した。しかし、植物栽培用のゲル濃度では拡散速度が速すぎたため、拡散速度を落とすためゲル濃度の検討を行った結果、ゲルが固くなりすぎるといった問題が生じた。そこで、根の表面を PVA-ホウ酸ゲルで被覆したところ、5 分間隔、30 分程度までのアポプラスト ROS の放出の様子をイメージングすることができた。このことは、根の局所的アポプラスト ROS を可視化することができ、ストレスが根のどの部分のアポプラスト ROS 放出に影響を与えているか調べることを可能とした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 稲葉雄哉・神保紀之・牧晋太郎・藤井紳一郎・安保充
2. 発表標題 ダイズ幼根における細胞外活性酸素種のモニタリングデバイスの開発
3. 学会等名 第12回CSJ化学フェスタ2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲葉雄哉、神保紀之、牧晋太郎、藤井紳一郎、安保充
2. 発表標題 有害元素に対する細胞外活性酸素種のモニタリング手法の開発
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 友田裕貴、稲葉雄哉、藤井紳一郎、安保充
2. 発表標題 植物根の細胞外活性酸素種の経時的なイメージング手法の開発
3. 学会等名 本土壌肥料学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔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	藤井 紳一郎 (Fujii Shin-ichiro) (10415739)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター・主任研究員 (82626)	

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