

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570034

研究課題名(和文) 大気からの蒸散要求に対するアクアポリンの応答機構とそれが通水性に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Influence of evaporative demand on aquaporin expression levels and hydraulic conductivity in the roots under natural weather condition

研究代表者

村井 麻理 (MURAI, Mari)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター生産環境研究領域・上級研究員

研究者番号：00343971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：蒸散は、根が土壌水分を吸収する際の主要な駆動力である。アクアポリン(水チャネル)は根の細胞間での水移動において重要な役割を担う膜タンパク質である。本研究では、日々の天気によって変動する蒸散要求量が根のアクアポリン発現量に及ぼす影響を調査した。イネの根においてOsPIP2;4、OsPIP2;5、OsTIP2;1等の根局在型のアクアポリン遺伝子の発現量は、晴天日に多く雨天日に少ない傾向を示し、直前の蒸散要求量(ポテンシャル蒸発量)と有意な正の相関を示すことが分かった。これらのアクアポリンは、高蒸散時において根での水吸収を促進する役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transpiration is major driving force for roots to uptake water from the soil. Aquaporins, the water channel proteins, are thought to play crucial roles in regulation of root hydraulic conductivity. In the present study, we showed that the evaporative demand plays a dominant role in the induction of specific aquaporins in rice roots in seedlings grown hydroponically and then transferred to an open field. We found that the abundance of the root-specific aquaporin transcripts, OsPIP2;4, OsPIP2;5 and OsTIP2;1 in the morning is highly correlated with the evaporative demand (potential evaporation). Aquaporin isoforms with higher correlation to potential evaporation showed higher diurnal amplitude of their expression. Based on these results, it is suggested that rice plants sense daily weather and respond to it by adjusting the expression of specific root aquaporin genes.

研究分野：農業気象

キーワード：アクアポリン イネ 水分生理 蒸散要求 天気

### 1. 研究開始当初の背景

大気からの蒸散要求が大きい気象条件、すなわち植物から多量の水が蒸散によって失われる気象条件において、根がより多くの水を地上部に輸送する能力は、日中の気孔コンダクタンスと光合成速度を高レベルに維持することによって、個体の成長促進と子実生産量(収量)の増加に寄与する重要な形質である。

根の表面から葉の気孔までの植物体内の水経路は、根茎葉の維管束系とその両端に位置する細胞間水輸送系に大別できる。維管束系については、仮導管と導管の構造的な発達、これらの内部で発生するキャピテーションの抑制機構、葉脈密度の増加など、高蒸散時の通水性の改善に寄与する様々なしくみがあることが知られている。一方、根での細胞間水輸送系とは、土壤中の水分が根の表皮から皮層、内皮を通過して導管に入るまでの放射方向の水経路のことを指す。この放射方向の水経路は、導管の中を流れる軸方向の水経路に比べて抵抗が著しく大きいため、根全体の水移動の律速ステップと考えられている。1990年代のアクアポリン(細胞の膜に存在する水透過孔:別名水チャネル)の発見以降は、この経路の通水性がアクアポリンの発現量と活性に依存して柔軟に変化し得ることが変異体や阻害剤を用いた実験によって示されている。

人工気象室を用いたこれまでの研究によって、蒸散要求が根のアクアポリン遺伝子の発現を誘導する強い促進因子であることが明らかにされた(Sakurai-Ishikawa et al. 2011. PCE 34: 1150-1163)。イネに複数あるアクアポリンの中でも根での水吸収の調節に重要な役割を果たすと推測される *OsPIP2;5* 等の発現量は暗期に少なく明期に増加する明瞭な日周変動を示すが、地上部の湿度を高めて蒸散を抑制すると明期に見られた発現量の増加が著しく抑制された(Sakurai-Ishikawa et al. 2011. PCE 34: 1150-1163)。これらの結果から、根で当日発現するアクアポリンの量は蒸散要求の強さによって調節されている可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、自然気象条件下において大気からの蒸散要求に対する根のアクアポリンの応答性を調べる。この研究を通じて、刻々と変動する気象条件を植物がどのような量的情報として認識し、地下部(根)の遺伝子発現を介して通水性に反映させるのかを探索する。

植物の水ストレス耐性に着目した研究は多いが、その大部分は土壤水分欠乏や塩類ストレス等によって植物がすでに脱水した状態を対象としている。これに対して本研究は、地上部の気象条件を植物が察知して根の水透過性を高めることにより、植物が脱水する

ことを未然に防止するメカニズムを明らかにしようとする点に特色がある。植物が脱水を防ぐ手段として気孔を閉じることはよく知られているが、上記のメカニズムの意義は気孔閉鎖による光合成の低下を招かない点にある。本研究によって、植物が激しい脱水ストレスに陥る前の比較的マイルドな水ストレスに対する環境応答機構について新たな知見が得られる。

### 3. 研究の方法

実験材料としてイネ(あきたこまち)を用いた。根でのアクアポリン遺伝子の発現量をさまざまな気象条件の下で時別、日別に測定し、気象条件との関係を調べた。得られた結果に基づき、アクアポリン発現量を決定する前歴気象条件の特徴を考察した。また、人工気象室を用いた実験によって、蒸散要求の多寡が根の水透過性に及ぼす影響を調べた。

(1) 野外実験 1: 播種日をずらしてイネを水耕栽培した。種子を浸種後(浸種日を 0-d-old とする)2 週間、人工気象室(明期 5:00 AM-17:00 PM、PPFD 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、気温明期 25  $^{\circ}\text{C}$ 、暗期 20  $^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 75%)の中で生育させた。14-d-old に達したイネ幼苗を夕方 5 時に東北農業研究センター(岩手県盛岡市)の屋外に移動し、翌朝 8 時に根を採取し直ちに液体窒素で凍結した。凍結保存した根から Total RNA を抽出し、各アクアポリンの発現量(mRNA 量)をリアルタイム PCR 法で定量した。

イネゲノムには 33 種類のアクアポリン遺伝子がコードされており、これらは *PIP* (細胞膜型アクアポリン)、*TIP* (液胞膜型アクアポリン)、*NIP* (nodulin26-like intrinsic protein)、*SIP* (small basic intrinsic protein) の 4 つのサブファミリーに分類される(Sakurai et al. 2005, PCP 46, 1568-1577)。この内、本研究では、細胞間水移動に重要と考えられる *PIP* と *TIP* に着目し、根での発現が比較的多い 9 種の *PIP* (*OsPIP1;1*, *OsPIP1;2*, *OsPIP1;3*, *OsPIP2;1*, *OsPIP2;2*, *OsPIP2;3*, *OsPIP2;4*, *OsPIP2;5* and *OsPIP2;6*) と 4 種の *TIP* (*OsTIP1;1*, *OsTIP1;2*, *OsTIP2;1* and *OsTIP2;2*) の合計 13 種のアクアポリン遺伝子を解析対象とした。

(2) 野外実験 2: 浸種後 8-d-old まで暗所(25/20  $^{\circ}\text{C}$ )で出芽させたイネを野外に移動し、その後 7~8 日間野外環境条件で水耕にて生育させた。このイネ幼苗の根のアクアポリン発現量の時刻変化を天候の異なる連続した 3 日間(7月 2, 3, 4 日)について調査した。

(3) 気象データ及びポテンシャル蒸発量の計算: 気象データは、東北農業研究センター気象観測露場における観測値を用いた。蒸散要求量を表す最適な指標として、ポテンシャル蒸発量 ( $E_p$ ) を使用した。 $E_p$  は、「湿った標準面からの蒸発量」に相当する。特別気象

データ(下向き短波・長波放射量、飽差、気温、風速)から、Kondo & Xu (1997 J. Appl. Meteor 36: 1676-1695) の方法に基づき  $E_p$  を計算した。

(4) 根の水透過性測定: 実験には、人工気象室(明期 25 /暗期 20, Rh75%, PPFD=400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )で水耕栽培したイネ(あきたこまち)幼苗を用いた。明期開始と同時に低蒸散要求( $R_h > 95\%$ , 風速  $0.01 \text{ m s}^{-1}$ )または高蒸散要求( $R_h 40-50\%$ , 風速  $1.5-2.5 \text{ m s}^{-1}$ )の環境にイネ地上部を曝し、4 時間後に浸透圧(根圧)を推進力とする根の水透過性  $L_{pr(0s)}$  を測定した。イネの地上部を根の基部から 2cm 付近で切除し、基部からの出液速度  $J_v$  ( $\text{m}^3 \text{ sec}^{-1}$ )、出液と水耕液の浸透ポテンシャル差  $s$  (MPa) 及び根表面積  $A$  ( $\text{m}^2$ ) の関係から、 $L_{pr(0s)}$  ( $\text{m sec}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ ) を次式により求めた。

$$L_{pr(0s)} = J_v / (s \cdot A \cdot \Delta \Psi_s)$$

ここで  $\rho$  は反射係数を示し 0.4 を仮定した。

#### 4. 研究成果

(1) イネ根のアクアポリン発現量の日々変動と気象条件との関係(野外実験 1)

6 月から 8 月までの期間中にサンプリングを実施した 23 日間において、早朝(午前 4~8 時)の蒸散要求量( $E_p$ )が最も高い 3 日間( $E_p$  平均値=114.4  $\text{W m}^{-2}$ )と最も低い 3 日間( $E_p$  平均値=13.0  $\text{W m}^{-2}$ )を選び、午前 8 時における根のアクアポリン発現量(mRNA 量)を比較した(図 1)。

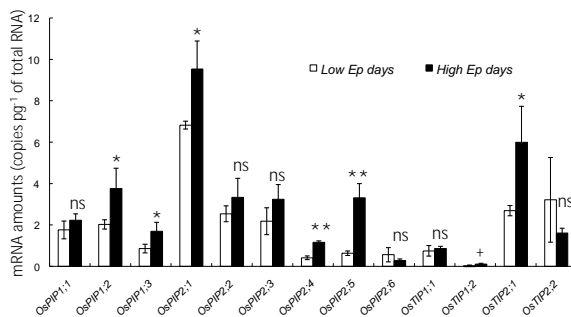


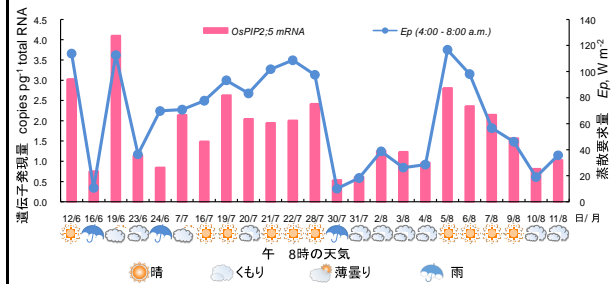
図 1 蒸散要求量の高い日と低い日におけるイネ根のアクアポリン発現量の比較

白い棒グラフと黒い棒グラフはそれぞれ蒸散要求量の低い日と高い日にサンプリングした根のアクアポリン遺伝子の発現量を示す。エラーバーは標準偏差を示す。\*\*, \* 1, 5%水準で有意差あり。ns 5%水準で有意差なし。(Murai-Hatano et. al. 2015)

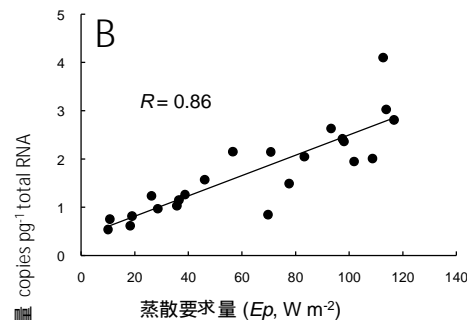
調査した 13 種類のアクアポリンの内、6 種( $OsPIP1;2$ ,  $OsPIP1;3$ ,  $OsPIP2;1$ ,  $OsPIP2;4$ ,  $OsPIP2;5$ ,  $OsTIP2;1$ )において、高蒸散要求日の発現量が低蒸散要求日より有意に高いことが分かった。中でも  $OsPIP2;5$  は高/低蒸散要求日の発現比が 5.21 と最も大きかった(図 1)。

午前 8 時における  $OsPIP2;5$  の発現量と同時刻の天気並びに直前のポテンシャル蒸発量の日々変動を図 2A に示す。

#### A



#### B



#### C

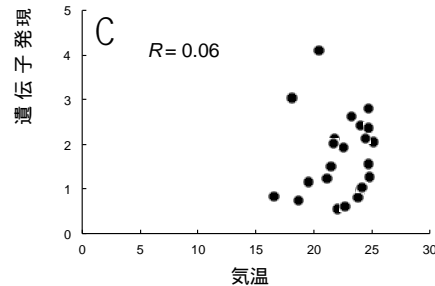


図 2 イネ根のアクアポリン  $OsPIP2;5$  の午前 8 時の発現量と直前 4 時間の気象との関係

A, 午前 8 時の  $OsPIP2;5$  の発現量と直前 4 時間(朝 4~8 時)の平均  $E_p$  の日々の変動 B, 午前 8 時の  $OsPIP2;5$  の発現量と直前 4 時間の蒸散要求量( $E_p$ )との相関。C, 午前 8 時の  $OsPIP2;5$  の発現量と直前 4 時間の気温との相関。(Murai-Hatano et. al. 2015)

$OsPIP2;5$  発現量は雨天日に少なく、晴天日には多い傾向があり(図 2A)、 $OsPIP2;5$  発現量と  $E_p$  の間には高い正の相関が認められた(図 2B)。一方気温との相関は低いことから(図 2C)、 $OsPIP2;5$  発現量の増減において温度依存性は低いと考えられた。調査した 13 種類のアクアポリンの内、6 種のアクアポリンは  $E_p$  と有意な正の相関を示すことが分かった(表 1)。その中でも相関係数の比較的高い  $OsPIP1;3$ ,  $OsPIP2;4$ ,  $OsPIP2;5$ ,  $OsTIP2;1$  は、いずれも根局在型のアクアポリン(Sakurai et al. 2008, PCP 49, 30-39)であった。

表 1 イネ根におけるアクアポリンの午前 8 時の遺伝子発現量と直前の蒸散要求量 (4:00~8:00 の平均ポテンシャル蒸発量  $E_p$ ) の相関 (Murai-Hatano et. al. 2015)

サブファミリー名	遺伝子名	相関係数 R	特徴
細胞膜型 アクアポリン PIP	<i>OsPIP1;1</i>	0.12 ns	
	<i>OsPIP1;2</i>	0.59 **	
	<i>OsPIP1;3</i>	0.75 **	根に多く局在する
	<i>OsPIP2;1</i>	0.46 *	
	<i>OsPIP2;2</i>	0.17 ns	
	<i>OsPIP2;3</i>	0.39 ns	根に多く局在する
	<i>OsPIP2;4</i>	0.65 **	根に多く局在する
	<i>OsPIP2;5</i>	0.86 **	根に多く局在する
液胞膜型 アクアポリン TIP	<i>OsTIP1;1</i>	-0.07 ns	
	<i>OsTIP1;2</i>	0.28 ns	
	<i>OsTIP2;1</i>	0.66 **	根に多く局在する
	<i>OsTIP2;2</i>	-0.55 **	

\*\* , \* , 1% , 5%水準で有意. ns, 5%水準で有意性なし.

(2) 日々の天気の違いがアクアポリン発現量の日周変化に及ぼす影響 (野外実験 1)

天気の異なる連続した3日間(7月2日(晴天), 3日(曇天), 4日(雨天))に、アクアポリン発現量を時刻別に追跡した。晴天日と曇天日において *OsPIP2;4* と *OsPIP2;5* の発現量は、午前 10 時にピークを持つ日周変動を示したが、雨天日には日中の発現量が低く抑えられた (図 3)。同様の傾向は *OsPIP1;2*, *OsPIP1;3*, *OsTIP1;2*, *OsTIP2;1* にも見られた (データ省略)。

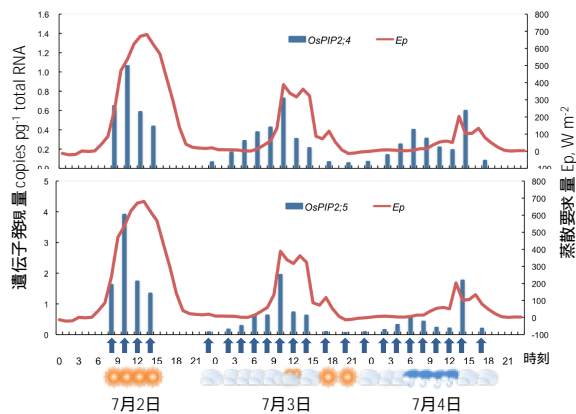


図 3 日々の天気がアクアポリン発現量の時刻変化に及ぼす影響

野外にて水耕ポット栽培した水稲 (本葉第 4 葉展開期) を用いた。7月2日~7月4日の3日間で、図中に青矢印で示した時刻に根をサンプリングし、アクアポリンの遺伝子発現量を定量した。上図, *OsPIP2;4*; 下図, *OsPIP2;5*. (Murai-Hatano et. al. 2015)

これに対して *OsPIP1;1*, *OsPIP2;2*, *OsPIP2;6*, *OsTIP1;1*, *OsTIP2;2* では蒸散要求量との明確

な関係は認められず、発現量が他の気象要因に依存している可能性が示唆された (データ省略)。

(3) 蒸散要求が根の水透過性に及ぼす影響:

人工気象室において、明期開始直後から 4 時間高い蒸散要求 (低湿度) にさらしたイネ (高蒸散要求区) では、対照区 (高湿度) に比べて根からの出液速度  $J_v$  が 30% 多かった (図 4A)。 $s$  (出液の浸透ポテンシャルと水耕液の浸透ポテンシャルの差) は、高蒸散要求区が低蒸散要求区の 1/3 と少なかった (図 4B)。これらの値から計算される根の水透過性  $L_{pr(0s)}$  は、高蒸散要求区で低蒸散要求区の 4.2 倍の高い値を示した (図 4C)。

これらの結果から、イネ地上部の蒸散要求量が増加すると、根で特定のアクアポリンの発現が誘導され、根からの水分供給量が増加する可能性が示された。

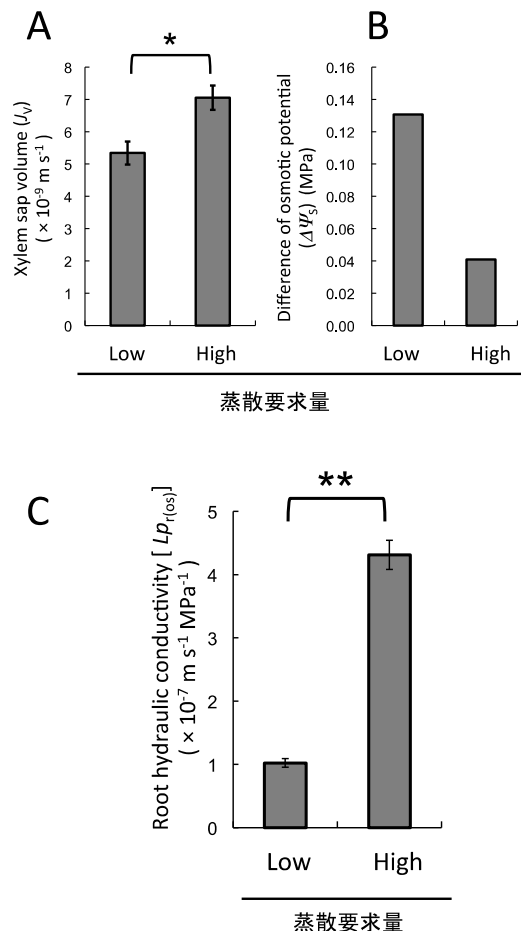


図 4 蒸散要求の違いがイネ根の水透過性 ( $L_{pr(0s)}$ ) に及ぼす影響。

A, 出液速度 ( $J_v$ ); B, 出液の浸透ポテンシャルと水耕液の浸透ポテンシャルの差 ( $s$ ); C, 根の水透過率 ( $L_{pr(0s)}$ )。Low は低蒸散要求区、High は高蒸散要求区を示す。(Murai-Hatano et. al. 2015)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mari Murai-Hatano, Tsuneo Kuwagata, Hidehiro Hayashi, Junko Ishikawa-Sakurai, Masahisa Moriyama, Masumi Okada (2015) Rice plants sense daily weather and regulate aquaporin gene expressions in the roots -Close correlation with potential evaporation-, Journal of Agricultural Meteorology(査読あり), 71, 124-135 (DOI 10.2480/agrmet.D-14-00052)

〔学会発表〕(計 5 件)

林秀洋、村井麻理、石川淳子、富永陽子、松波麻耶、Rice aquaporin localizations in root, and the relationship between morphological changes and aquaporin gene expressions、2016年3月18日-3月20日、第57回日本植物生理学会年会講演要旨282、岩手大学(岩手県・盛岡市)

村井麻理、桑形恒男、石川淳子、林秀洋、天候による蒸散要求の変動がイネのアクアポリン発現の日周変化に及ぼす影響、第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18日-20日、富山大学五福キャンパス(富山県・富山市)

村井麻理、桑形恒男、石川淳子、林秀洋 イネはその日の気象条件を感知して根のアクアポリン発現量を調節している、第58回低温生物工学会年会、2013年6月22日-6月23日、関西大学100年記念会館(大阪府・吹田市)

Mari Murai-Hatano, Tsuneo Kuwagata, Junko Ishikawa-Sakurai, Hidehido Hayashi Rice plants observe today's weather and regulate aquaporin expressions in the roots, International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB2013)、2013年3月26日-3月31日、倉敷市芸文館、(岡山県・倉敷市)

Tsuneo Kuwagata, Junko Ishikawa-Sakurai, Hidehiro Hayashi, Kiyoshi Nagasuga, Keiko Fukushi, Arifa Ahamed, Katsuko Takasugi, Maki Katsuhara Mari Murai-Hatano, Effect of low root-temperature on water use, growth and aquaporin expression in rice plants under various air-humidity conditions, International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB2013)、2013年3月26日-3月31日、倉敷市芸文館、(岡山県・倉敷市)

〔その他〕(計 1 件)

平成27年度ひらめき ときめきサイエンス(研究成果の社会還元・普及事業) プログラム名「アクアポリン」って何?~植物が体をみずみずしく保つしくみについて調べてみよう~、実施日平成27年9月19日 <http://www.jsps.go.jp/hirameki/ht27000/ht27136gaiyou.pdf>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

村井 麻理 (MURAI, Mari)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター生産環境研究領域・上級研究員

研究者番号: 00343971

(2)研究分担者

石川 淳子 (ISHIKAWA, Junko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター稲研究領域・主任研究員

研究者番号: 40343959

(3)連携研究者

桑形 恒男 (KUWAGATA, Tsuneo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター気候変動対応研究領域・作物温暖化応答・ユニット長

研究者番号: 90195602