

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32658

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660048

研究課題名(和文)根圏高pHに対する地上部による根伸長促進機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of root elongation under high pH condition

研究代表者

樋口 恭子(higuchi, kyoko)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：60339091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：植物の細胞は一般に細胞壁が微酸性のときに伸長するため、アルカリ性の土壌では多くの植物の根伸長が阻害される。しかしオオムギやその他のいくつかの植物はアルカリ性でもよく根を伸長させることが分かった。根の伸長は根端細胞の分裂とその後の伸長によって達成されるため、根端細胞の観察と細胞周期関連遺伝子の発現を調べたところ、オオムギではアルカリ性で細胞分裂と伸長ための分化が促進されていることが分かった。さらに細胞の伸長に必要な、細胞壁を酸性化する原形質膜H⁺-ATPaseの活性が、アルカリ性水耕液で栽培したオオムギで大きく上昇することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Plant cells elongate well under acidic condition, thus the ability to elongate root against external high pH will be advantageous for survival on alkaline soil. We found that some plant species promote root elongation in alkaline nutrient solution. Barley facilitated cell proliferation and elongation in root apex under pH8 condition based on data from microscopy, the expression of cell cycle-related genes, and plasma membrane H⁺-ATPase activity. Then root growth of barley was maintained in pH8 nutrient solution. In contrast, we could not observed evidence of promotion of cell proliferation and elongation in tomato root apex when root elongation of tomato was reduced in pH8 nutrient solution. Fe and Mn were absorbed well from pH8 nutrient solution by both barley and tomato. We propose adaptation of barley to alkaline stress by root development.

研究分野：植物栄養学

キーワード：根伸長 オオムギ トマト 細胞周期 P-ATPase

1. 研究開始当初の背景

アルカリ土壌では微量元素欠乏やアンモニア害、炭酸害が植物の生育を阻害することがよく知られているが、植物細胞は酸性で伸長するため(酸成長理論)、アルカリ土壌では根の伸長も阻害されるはずである。アルカリ土壌に適応していないイネやトマトでは高 pH 水耕液において要素障害よりも先に根伸長阻害が引き起こされることを、研究代表者は明らかにしている[1]。多くの植物種について水耕液 pH に対する根伸長応答を調べたところ、大部分の植物種は pH 5 ~ 6 で最もよく伸長するのに対し、アルカリ土壌に自生する植物やアルカリ土壌でも生育するオオムギなど一部の植物種は pH 6 ~ 8 で最もよく伸長する、あるいは pH 10 でもある程度伸長する、という高 pH 適応を示すことが明らかになってきた。

根から十分な養水分を獲得するためには根の伸長と分岐により根表面積を拡大する必要があり、特に不良土壌においては必須元素が不溶化して植物は要素欠乏に陥るため、根域拡大の重要性は増す。窒素、リン、鉄などいくつかの必須元素については欠乏した際の根の伸長や分岐の変化が知られており、植物体内の元素濃度により根系の制御を行う分子機構も明らかになりつつある。しかし細胞伸長が阻害される高 pH に応答して根伸長を促進するという報告はこれまでにない。

2. 研究の目的

根伸長は根端細胞の細胞分裂とそれに続く細胞の分化・伸長によって達成される。これらの各段階のどれが、あるいは全てが、高 pH に適応しているオオムギでは強化され高 pH に感受性のトマトでは抑制されるのかを明らかにする。また根で高 pH を感知し、その情報を地上部へ送り、地上部から根へ根伸長に必要なシグナルを送るといった分子機構を解明し、不良土壌での養水分獲得に不可欠な根域拡大能力を作物に付与することを目指す。

3. 研究の方法

全ての実験において水耕液に 5mM MES, 5mM HEPES, 5mM CHES を添加することにより pH を 6 もしくは 8 に固定した。使用後の水耕液 pH の変動はプラスマイナス 0.5 以内にとどまっていた。

(1) 成熟苗におけるオオムギとトマトの根伸長の比較

4 ~ 6 葉期のオオムギとトマトを 1 週間、pH6 もしくは pH8 の水耕液で栽培した。総根長を格子法で測定した。地上部と地下部の Fe と Mn 含有率を測定した。

(2) オオムギとトマトの根先端細胞における細胞分裂と細胞伸長の比較

オオムギとトマトの幼植物を 4 8 時間、pH6

もしくは pH8 の水耕液で栽培した。根端細胞と組織の形状はヨウ化プロピジウム染色により観察した。細胞周期関連遺伝子の発現量は qRT-PCR により評価した。根から原形質膜画分を精製し、原形質膜型 H⁺-ATPase 活性を測定した。

(3) オオムギとトマトの植物ホルモンの高 pH による変動

オオムギとトマトの幼植物を 4 時間および 8 時間、pH6 もしくは pH8 の水耕液で栽培した。理化学研究所・植物科学研究センターにサイトカイニン、オーキシン、ジベレリン、アブシジン酸、サリチル酸、ジャスモン酸の分析を依頼した。

(4) 高 pH で栽培したオオムギで発現が変動する遺伝子の網羅的解析

オオムギの幼植物を 2 4 時間、pH6 もしくは pH8 の水耕液で栽培した。東京農業大学・生物資源ゲノム解析センターに依頼して RNA-Seq を行った。

4. 研究成果

(1) 成熟苗におけるオオムギとトマトの根伸長の比較

成熟苗においてもオオムギの総根長は pH6 に比べ pH8 で増加し、トマトでは減少することが確かめられた。また根乾物重・地上部乾物重も同様であった。この差が養分欠乏によるものではないことを確かめるため Fe と Mn の含有率を測定した。pH6 に比べて pH8 では、Fe はオオムギとトマトで同程度に減少し、Mn はトマトではむしろ増加した。したがって植物の生育は養分欠乏以外に根圏の pH によっても左右されることが明らかになった。1 週間の間に地上部の生育にも差が現れたため、根圏 pH の情報は地上部にも送られていることがさらに裏付けられた。

(2) オオムギとトマトの根先端細胞における細胞分裂と細胞伸長の比較

根端組織を観察して根先端から順に Meristematic zone (MZ)、Transition zone (TZ)、Elongation zone (EZ)、Growth terminating zone (GTZ) を識別し、各領域の長さを計測した。pH6 に比べて pH8 ではオオムギの TZ と EZ が長くなったのに対し、トマトの MZ、TZ、EZ が短くなり GTZ が長くなった。またオオムギでは細胞周期関連遺伝子の発現が pH8 で上昇した。これらの結果はオオムギでは pH8 で細胞分裂と分化(伸長開始)が促進されていることを示唆する。さらに細胞伸長に必要な細胞壁の酸性化に働く原形質膜型 H⁺-ATPase 活性を測定したところ、オオムギ、トマトともに pH8 で活性が上昇したものの、上昇幅はオオムギの方が大きかった。これらのことから、高 pH におけるオオムギの根伸長は細胞分裂と細胞伸長の両面から促進されていると考えられる。

(3) オオムギとトマトの植物ホルモンの高 pH による変動

オオムギでは pH8 に移植して 4 時間後に一過的にサイトカイニン量が根伸長領域で低下したが、全体にあまり明瞭な変化は見られなかった。それに対し、トマトでは pH8 に移植することで地上部でオーキシンとサイトカイニンが減少し、特にサイトカイニンの現象は顕著であった。これは pH8 でトマトの生育が地上部・地下部とも抑制されることと関連していると思われる。今後、再現性を見るときもサイトカイニンの合成・分解・受容系の遺伝子の発現も併せて検討する必要がある。

(4) 高 pH で栽培したオオムギで発現が変動する遺伝子の網羅的解析

根の MZ+TZ、および EZ では pH6 に比べて pH8 で発現上昇した contig も発現減少した contig も 2000 から 4000 個検出された。一方、根の GTZ と葉では発現が変動した contig は 1000 個以下であり、第二葉では発現が上昇したのは 300 個未満であったのに対し、減少したのは 1000 個であった。全般に発現制御やシグナル伝達に関する分子が多く発現変動しており、特に MZ+TZ ではリボソームに関する分子が多数発現上昇していた。今後、RT-PCR で再現性を確認するとともにトマトでも同様の解析を行って比較する必要がある。

(5) 総括

まず、高 pH が根の伸長に及ぼす影響は根端の細胞分裂と細胞伸長の両方に渡っていることが明らかになった。オオムギでは pH8 で細胞分裂が促進され、増殖した細胞が速やかに分化・伸長を開始して最終的に根が伸長していると考えられる。細胞伸長については、オオムギの方がトマトよりも pH8 で酸性化を促進していることが分かったが、トマトはもとも pH6 においてもオオムギよりもタンパク質あたりの原形質膜 H⁺-ATPase 活性が高かった。したがってトマトの根伸長が pH8 で抑制されるのは、アポプラストの pH が外液 pH によって上昇し酸成長ができなくなったからというよりも、細胞の分裂・分化・伸長を制御するシグナル伝達系の支配により抑制されたという可能性が考えられる。

水耕液高 pH の影響は根のみならず地上部の生育にも現われた。オオムギでは 1 週間の pH8 栽培で地上部・根ともに重量が若干増加し、トマトでは減少したが、アルカリ性で不溶態になり欠乏しやすい Fe と Mn の含有率の減少はオオムギとトマトで同等であり、しかも欠乏と言えるレベルではなかったことから、高 pH に起因する要素障害ではなく、根圏が高 pH であることそのものによって植物の大きさが変化したと言える。すなわち、根圏が高 pH であるという情報が地上部に送られ、それ

によって地上部の生育が制御されたと考えられる。

オオムギの根が pH8 でも十分に伸長するという応答も根自律的なものではない。本研究開始前に、無傷オオムギの根は pH6 よりも pH8 でよく伸長するにもかかわらず、切り出した根先端は酸成長理論に従い pH8 よりも pH6 でよく伸長することが明らかになっている。すなわち、pH8 におけるオオムギ根の伸長は地上部の支配によっている。これら全ての結果を考慮すると、植物は養水分条件だけでなく根圏の pH を感知してその情報を地上部に送り、植物体全体を成長させるか否かを決定してその情報を地上部のみならず根にも伝達していると考えられる。今後はこれらの情報伝達がどのようにして行われているのかを解明する必要がある。情報伝達分子の候補として今回明らかになったオーキシンとサイトカイニンが挙げられるが、植物の長距離情報伝達手段としては植物ホルモン以外にもペプチド、RNA の他、一過的な膜電位や活性酸素種の発生も知られている。RNA-Seq の結果を精査することにより、情報伝達機構解明の手掛かりが得られると考えている。

< 引用文献 >

Kobayashi O., Higuchi K., Miwa E., Tadano T. Growth injury induced by high pH itself in rice and tomato. *Soil Sci. Plant Nutr.*, v56, 2010, 407-411

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

研究代表者が第一著者の論文を 1 件投稿中

[学会発表](計 5 件)

荒木怜、須恵雅之、樋口恭子、高 pH 水耕液がオオムギ根の細胞分裂・分化に及ぼす影響、日本植物生理学会、平成 27 年 3 月、東京農業大学

牧島平、樋口恭子、アルカリ条件下で栽培したオオムギの根伸長と原形質膜 H⁺ATPase 活性の関係、日本植物生理学会平成 27 年 3 月、東京農業大学

樋口恭子、上杉哲哉、pH8 の水耕液がオオムギとトマトの根伸長に及ぼす影響の比較、日本土壌肥料学会関東支部会、平成 26 年 12 月、山梨大学

荒木怜、須恵雅之、樋口恭子、高 pH の水耕液がオオムギ根の細胞伸長に及ぼす影響、日本土壌肥料学会、平成 26 年 9 月、東京農工大学

太田紗津記、榊原均、小嶋美紀子、三輪睿太郎、樋口恭子、根圏高 pH 条件におけるオオムギ根伸長とサイトカイニンの関係、日本植物生理学会、平成 26 年 3 月、富山大学

6 . 研究組織

(1)研究代表者

樋口 恭子 (HIGUCHI, Kyoko)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：60339091