

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660015

研究課題名(和文) 迅速細胞分離法を用いたイネ科植物の葉肉・維管束鞘細胞特異的機能に関わる遺伝子同定

研究課題名(英文) Identification of genes involving in mesophyll and bundle sheath cell-specific functions in gramineous plants by using a rapid cell separation technique

研究代表者

谷口 光隆 (TANIGUCHI, Mitsutaka)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：40231419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：塩ストレスに陥ったC4植物では、葉肉葉緑体の膜構造の崩壊が維管束鞘葉緑体に先んじて起こるといった細胞特異的なストレス応答機構が存在する。しかし、その分子機構の詳細は明らかになっていない。本研究では、ローラー法および機械的破碎法を用いて、塩ストレス暴露したC4植物トウモロコシの葉組織から純度の高い葉肉細胞抽出物と維管束鞘細胞群を単離する系を確立し、遺伝子発現解析を進めた。また、葉緑体膜脂質組成を解析し、グリセロ糖脂質の一種モノガラクトシルジアシルグリセロールのストレスに伴う含量変動が膜構造の安定性と関連深いことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In C4 plants, membrane structure of mesophyll chloroplasts is susceptible to damage by salinity stress compared with that of bundle sheath chloroplasts. This suggests that there are cell-specific mechanisms of stress response and defense. We have succeeded in isolation of pure mesophyll and bundle sheath cells from salinity-stressed maize, a C4 plant, by using roller and mechanical grinding techniques, and undertook gene expression analysis. In addition, we compared the lipid alterations in mesophyll and bundle sheath chloroplasts in response to salinity stress, and found that the changing pattern of monogalactosyldiacylglycerol could be related to the salt sensitivity of membrane structure.

研究分野：作物生理生化学

キーワード：C4植物 葉緑体 環境ストレス 葉肉細胞 維管束鞘細胞 トウモロコシ 遺伝子発現 膜脂質

1. 研究開始当初の背景

イネ科植物の葉組織は、維管束の周りを維管束鞘細胞が取り囲み、さらにその外側を葉肉細胞が取り囲む基本構造が繰り返すことにより構成されている。C₃植物とC₄植物ではその基本構造に差異がみられる。C₃植物では、多数の葉緑体を含む複数層の葉肉細胞が維管束鞘細胞の周りに存在し、光合成を行う主要な場となっている。一方、C₄植物の葉身では、維管束鞘細胞の周りを1層の葉肉細胞が取り囲み、両細胞を一巡するC₄回路がCO₂濃縮ポンプとして働いて効率の良い光合成炭素同化を行っている。

我々は、環境ストレスに対する両光合成細胞の応答性を細胞内構造に着目して解析してきた。塩ストレスに陥ったC₄植物では、葉肉葉緑体の膜構造の崩壊が維管束鞘葉緑体に先んじて起こることを見出した (Hasan *et al.* 2005 *Plant Prod. Sci.*)。さらに、塩ストレスに応答したH₂O₂除去系の酵素活性増大が葉肉葉緑体では起こらず、活性酸素分子種のO₂およびH₂O₂が葉緑体内に蓄積することで膜傷害が引き起こされることを明らかにした (Omoto *et al.* 2013 *Physiol. Plant.*)。さらに、トウモロコシなどのNADP-マリックエンザイム(ME)型C₄植物では、塩ストレスにより維管束鞘葉緑体のグラナ構造が発達することも明らかとなり (Hasan *et al.* 2006 *Plant Prod. Sci.*; Omoto *et al.* 2009 *Plant Prod. Sci.*)、環境ストレスに対する応答性や耐性が葉肉細胞と維管束鞘細胞間で分化していることが判明した。一方、C₃植物イネにおいてはむしろ維管束鞘葉緑体の方がストレス傷害を受けやすいことを見出し (Yamane *et al.* 2003 *J. Plant Physiol.*)、C₃植物とC₄植物の葉緑体の環境適応機構には多様性があり、その分子機構の解明が新たなストレス耐性植物開発に重要であると考えられた。

上記の細胞特異的ストレス応答の分子機構を解明するには、ストレス植物から両光合成細胞を迅速に高純度で分離する方法を確立し、網羅的遺伝子発現解析を行う必要がある。既存の分離法として、細胞壁酵素消化を用いる分離法やレーザーマイクロダイセクション法があるが、安価かつ短時間に行える方法が考案されていなかった。しかし、最近になり、葉身を壁紙圧着ローラーで押し潰して葉肉細胞抽出物を簡便・迅速に採取する手法が報告された (Covshoff *et al.* 2013 *J. Exp. Bot.*)。本研究では、この分離法を用いてストレス植物から細胞抽出液を得ることを試みることとした。

2. 研究の目的

本研究は、今まで困難であったストレス暴露した植物葉から、葉肉細胞と維管束鞘細胞を純度良く迅速に分離する方法を確立することから始める。ローラー法による葉肉細胞

抽出と、ホモジナイザーを用いた機械的破砕法による維管束鞘細胞群単離は、様々なイネ科植物葉に適用可能と考えられ、実験遂行上のアーティファクトを極力排除できるとともに、安価に多種類のサンプルを処理できる利点がある。この手法を用いて、葉肉細胞と維管束鞘細胞の分業・分化に関わる分子機構、特にストレス応答の分子機構解明を目指す。

我々は、細胞特異的な葉緑体のストレス傷害は、活性酸素分子種の一つである過酸化水素の蓄積に起因することを明らかにしている。本研究では、活性酸素消去系酵素のストレスに応答した遺伝子発現変動について細胞間比較を行う。しかし、ストレスに応答して細胞特異的に発現変動する遺伝子は多様なものがあると予想されるので、網羅的遺伝子発現解析を行い、C₄植物の葉肉細胞と維管束鞘細胞のストレス応答の分子機構の全容を明らかにする。

また、膜の安定性には膜を構成する脂質の種類と組成が大きく影響する。ストレス前後での両細胞葉緑体の膜脂質組成を調べ、細胞特異的な葉緑体膜傷害に関わる膜脂質合成・転換・分解系の分子機構解明を目指す。

これらの解析により、ストレスに伴う葉緑体傷害を低減させるために必要な分子ターゲットを見出し、作物のストレス耐性能向上のための方策を打ち出す。

3. 研究の方法

トウモロコシを土耕栽培により2週間人工気象室内で生育させ、3%NaCl溶液を5日間与えることでストレス処理を行った。

トウモロコシ緑葉からの葉肉細胞の抽出には、ローラー法を用いた。氷上に設置したガラス板の上に葉身を置き、壁紙圧着ローラーで葉脈に沿って葉組織を圧着して、葉肉細胞内容物を溶出した。葉身内を密に縦走している葉脈は機械的破砕に強いので、ローラーの圧着により葉肉細胞層だけが壊れ、その内側の維管束鞘細胞層は破壊されない。圧着により溶出されてくる溶液をマイクロピペットを用いて回収し、RNA抽出用溶液と混合した。一方、維管束鞘細胞群の単離は、高速回転ホモジナイザーによる葉身の機械的破砕により行った。維管束の周りを密着して取り囲んでいる維管束鞘細胞層は、外側に位置する葉肉細胞と比べて回転刃による機械的引きちぎりに対して強く、葉肉細胞の混入の少ない維管束鞘細胞群標品を調製することが可能である。これらの分離操作を低温で迅速に行い、分解の少ないRNAの調製を行った。

各標品の純度は、単離維管束鞘細胞群の光学顕微鏡観察、細胞抽出液中のマーカー酵素 (PEPC, NADP-ME) 活性測定、RNA標品中のマーカー遺伝子 (PEPC, NADP-ME, Rubisco) の mRNA 量測定を行うことで行った。

膜脂質組成解析のために両光合成細胞から葉緑体を単離した。葉身をセルラーゼ酵素

処理して得られた葉肉細胞プロトプラストと維管束鞘細胞群を破壊し、パーコール遠心することで高純度の葉緑体標品を得た。さらに、有機溶媒で脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーにより分画した。脂肪酸をメチルエステル化後、ガスクロマトグラフィーによる脂質分析を行った。

4. 研究成果

(1) ローラー法および機械的破碎法を用いて、塩ストレス暴露したトウモロコシ葉組織から純度の高い葉肉細胞抽出物と維管束鞘細胞群を単離する系を確立できた。

塩ストレスに陥った植物の葉は萎縮しており、抽出液の収量低下が起こる。収量と純度の結果に基づいて、供試する植物のストレスの程度や成熟度、ローラーで葉を圧着する際の圧力や反復回数などの最適条件を調べ、維管束鞘細胞の混在が極めて少ない葉肉細胞抽出液を得ることができた。また、機械的摩擦による維管束鞘細胞群単離においても、供試する植物のストレスの程度や成熟度、破碎の強度と時間、破碎・濾過・洗浄操作の反復回数などの最適条件を調べた。

(2) トウモロコシの両光合成細胞において、塩ストレスに伴い発現変動に差異が生じる遺伝子の調査に着手した。上記の細胞分離法確立に時間を要したため、網羅的解析を含む詳細な遺伝子発現解析を現在進めている。特に、活性酸素除去系や膜脂質合成・分解系の酵素遺伝子に注目しつつ解析を進めている。

(3) 両細胞葉緑体の膜脂質組成を解析した。(詳細は発表論文1を参照のこと)

他の植物の葉緑体と同じく、モノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)、スルホキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)といったグリセロ糖脂質が主要な膜脂質であった。SQDG含量は両葉緑体で同程度だったが、MGDGとDGDG含量は葉肉葉緑体の方が多かった。脂質組成を比べると、MGDG相対量は葉肉葉緑体よりも維管束鞘葉緑体で低かった。塩ストレスに伴いMGDG含量は葉肉葉緑体において低下したが、維管束鞘葉緑体では変化が見られなかった(図1)。塩ストレス前後でのDGDG含量は、両葉緑体ともに変動しなかった。一方、SQDG含量は、塩ストレスに伴い両葉緑体で低下した。以上より、維管束鞘葉緑体では、非ストレス下でMGDG含量が相対的に低い(MGDG/DGDG比が低い)ことに加え、ストレスを受けてもMGDG含量が変わらないことが、維管束鞘葉緑体に塩ストレス耐性をもたらす要因になっていることが推察された。一方、両葉緑体膜脂質の脂肪酸組成は塩ストレス前後で変化が見られず、膜脂質の不飽和度は膜傷害と関連しないことが判明した。

MGDG, DGDGは膜の安定化を左右する脂質だと考えられており、両葉緑体間でのグリセロ糖脂質組成の差異が膜傷害誘発の原因であることが推察された。したがって、これらの膜脂質の合成・分解に関する遺伝子の発現が細胞間で異なることが期待され、その遺伝子発現を調べ、ストレス応答、ストレス耐性との関連性を引き続き解析する予定である。

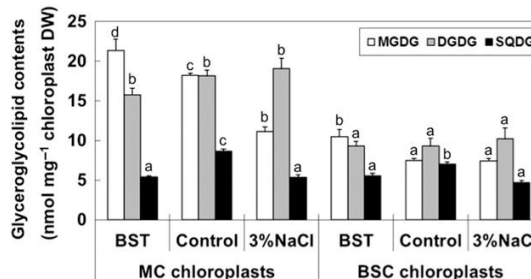


図1 塩ストレスに伴う葉緑体グリセロ糖脂質の含有量変化

BST: 塩ストレス暴露前, control: 非塩ストレス処理, 3%NaCl: 塩ストレス処理, MC: 葉肉細胞, BSC: 維管束鞘細胞. アルファベットは異符号間に危険率5%で有意差があることを示す。

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3件)

Omoto, E., Iwasaki, Y., Miyake, H. and Taniguchi, M. (2016) Salinity induces membrane structure and lipid changes in maize mesophyll and bundle sheath chloroplasts. *Physiologia Plantarum* 157: 13-23 (査読有) DOI: 10.1111/pp1.12404

Weissmann, S., Ma, F., Furuyama, K., Gierse, J., Berg, H., Shao, Y., Taniguchi, M., Allen, D. K. and Brutnell, T. P. (2016) Interactions of C₄ subtype metabolic activities and transport in maize are revealed through the characterization of DCT2 mutants. *Plant Cell* 28: 466-484 (査読有) DOI: 10.1105/tpc.15.00497

谷口光隆, 三宅博 (2016) C₄植物におけるストレス応答の細胞特異性. *植物科学最前線 (BSJ-Review)* 7: 2 (査読無) http://bsj.or.jp/jpn/general/bsj-review/BSJ-Review7A_2-11.pdf

[学会発表](計6件)

塚口駿貴, 加藤優太, 大井崇生, 谷口光隆 長期暗条件により誘導されるC₄植物葉肉葉緑体の凝集配置. 日本作物学会第241回講演会, 2016年3月28~29日(水戸)

加藤優太, 塚口駿貴, 大井崇生, 谷口光隆 C₄ 植物における葉肉葉緑体の細胞内配置: 葉組織成長に伴う凝集配置から光受容に伴う分散配置への変化. 日本作物学会第 241 回講演会, 2016 年 3 月 28~29 日 (水戸)

堤浩一, 宗像里美, 大井崇生, 木羽隆敏, 榊原均, 谷口光隆 C₄ 植物葉肉葉緑体凝集運動の効率的観察法, 日本作物学会第 239 回講演会, 2015 年 3 月 27~28 日 (藤沢)

大元英司, 岩崎雄吾, 三宅博, 谷口光隆 トウモロコシの葉肉葉緑体と維管束鞘葉緑体の塩ストレスに伴う脂質組成変化. 第 27 回植物脂質シンポジウム, 2014 年 11 月 28~29 日 (静岡)

Tsukaguchi T., Maai E., Miyake H. and Taniguchi M.: The aggregative movement of mesophyll chloroplasts is an environmental response common in C₄ plants. 8th Asian Crop Science Association Conference (ACSA8 - 2014), 2014.9.23-25. (Hanoi, Vietnam)

谷口光隆 C₄ 光合成研究の新たな課題: ストレス応答の細胞特異性. 日本植物学会第 78 回大会シンポジウム「C₄ 光合成研究の新展開」, 2014 年 9 月 12~14 日 (川崎)

〔図書〕(計 1 件)

谷口光隆 (分担執筆) (2015) 「ライフサイエンスのための生物学」 pp.64-76 培風館 ISBN: 978-4-563-07815-7

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~shigen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 光隆 (TANIGUCHI, Mitsutaka)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 40231419

(2) 研究協力者

大井 崇生 (OI, Takao)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号: 60752219