

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26712008

研究課題名(和文)カスパリー線形成機構の解明とアポプラスト輸送の理解

研究課題名(英文)Analysis of Casparian strip formation and apoplastic transport pathway

研究代表者

神谷 岳洋(Kamiya, Takehiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：40579439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物は土壌に根を伸ばして生育に必要な栄養や水を吸収する一方で、不必要な物質は取り込まないようにしている。その機能をはたしているのが、根に存在する内皮細胞に存在するカスパリー線とスベリンであるが、その形成や具体的な機能についてはわかっていないことが多かった。本研究では、カスパリー線に異常があるシロイヌナズナ変異株の解析を通して、カスパリー線形成の分子機構の一端を明らかにした。また、その解析の過程で、同じく障壁として機能するスベリンが、カスパリー線が障壁として機能できない部位(側根発生部位)でアポプラスト障壁として機能することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plants take up essential nutrients and water through root in soil. On the other hand, they prevent non-essential substance from entering into plants. This is enabled by endodermis carrying Casparian strip and suberin. However, their mechanisms of formation and physiological function remain unclear. In our work, we have identified novel protein involved in Casparian strip formation. In addition, through the analysis of that mutant, we have discovered novel function of suberin: Suberin functions as an apoplastic barrier at the site of lateral root where Casparian strip is disrupted.

研究分野：植物栄養学

キーワード：カスパリー線 スベリン イオノーム

1. 研究開始当初の背景

植物は土壌から必須元素を選択的に吸収し、二酸化炭素と水のみで生育する。植物が生育する土壌には、非必須元素が含まれていたり、必須元素が欠乏、または、過剰な状態にあることが多い。このような均一でない土壌中から必須元素のみを必要量吸収することによって植物は様々な土壌環境で生育している。

このような植物の生育を可能にしているのが、選択的な物質の移動を行うタンパク質である輸送体と、非選択的な物質の取り込みを防いでいるカスパリー線である。これまでに、必須元素の輸送体タンパク質はすべて同定されており、発現や活性制御機構など多くのことが輸送体についてわかりつつあり、応用研究もされている。一方で、もう一つの役者であるカスパリー線の形成機構や生理的役割に関する理解はほとんど進んでいない。

カスパリー線は内皮細胞（イネの場合は外皮と内皮）の周囲に形成される構造体であり、アポプラスト経路の物質輸送の障壁として機能するといわれている。その存在は、1865年に Robert Caspary によって確認された。長らくカスパリー線形成の分子機構は全くわかっていなかったが、カスパリー線が確認されてから 146 年後の 2011 年になって初めて、シロイヌナズナでカスパリー線の形成に関与する遺伝子 (CASP) がスイスの Niko Geldner 博士らによって同定された。

また、研究代表者は CASP やその他のカスパリー線形成に関与する遺伝子の発現を正に制御する MYB 転写因子を同定した。この遺伝子は、地上部の複数の元素濃度に変化のある変異株の原因遺伝子として同定された。MYB 破壊株のカスパリー線パターンは、これまでの既知の変異株とは全く異なり、カスパリー線様の構造が内皮細胞と皮層細胞の間に異所的に蓄積する。マイクロアレイ解析の結果、MYB は CASP 遺伝子群 (5 遺伝子) と ESB 遺伝子群 (7 遺伝子) すべてと、PER64 の発現を正に制御することを明らかにしている。すなわち、MYB 転写因子はカスパリー線を内皮細胞の正しい位置に形成する遺伝子群の制御に関与していることが示唆された。

しかしながら、CASP のカスパリー線形成部位への局在機構や、なぜカスパリー線は内皮細胞間にしか蓄積しないのか、カスパリー線の栄養輸送における機能はなにか、といった基本的な質問に答えるには至っていない。

また、カスパリー線とともに内皮細胞で障壁とするスベリンの生理的な機能について明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

上述した背景から、本研究では、(1) カスパリー線形成の分子機構の解明、(2) スベリンの栄養吸収における機能を明らかにすること、の 2 点を目的とした。

3. 研究の方法

(1) カスパリー線形成の分子機構の解明

① *myb36* 破壊株で、野生型株と比較して発現量が低下している遺伝子の破壊株を確立し、カスパリー線の観察を行った。

② 新規カスパリー線変異株 *LOTR1* を取得し、原因遺伝子の同定とカスパリー線、元素濃度の測定を行った。

③ シロイヌナズナでカスパリー線形成に関わる遺伝子である、MYB36、CASP、SGN3 の遺伝子破壊株を作成し、表現形の観察を行った。

(2) スベリンの栄養吸収における機能の解明

シロイヌナズナカスパリー線変異株の多くはスベリンを過剰蓄積する。この系統とスベリンを内皮細胞で発現させることにより、スベリンの蓄積が起きない系統を観察することにより、スベリンの機能を解析した。

4. 研究成果

(1) カスパリー線形成の分子機構の解明

① これまでに MYB36 がカスパリー線形成のマスターレギュレーターであることが示唆されていたが、直接的な証明がなされていなかった。そこで、MYB36 の異所的発現と、ChIP-PCR により転写因子が直接カスパリー線形成関与する遺伝子のプロモーターに結合することを調べた。その結果、異所的にカスパリー線が形成されること、直接 CASP1、ESB1、PER64 のプロモーターに結合することを示した。以上の結果とこれまでの結果をまとめて、PNAS に発表した。

MYB36 の下流の遺伝子についても 2 遺伝子については GFP 融合タンパク質を作成し、内皮細胞特異的な発現を確認し、うち 1 遺伝子についてはカスパリー線形成位置への局在を確認した。

また、下流遺伝子について T-DNA 挿入株を取得し、カスパリー線の観察を行ったが、異常を示すものはなかった。T-DNA 挿入株を入手できない 5 遺伝子については、CRISPR 系統を作成した。

② *lotr1* は低カルシウム条件で生育が阻害される変異株として同定された。元素濃度を測定したところ、その変化のパターンが既知のカスパリー線変異株と似ていたことから、カスパリー線を観察したところ、そのパターンに異常があった。CASP1-GFP をこの変異株で発現させたところ、CASP1-GFP の蓄積が異所的に見られたことから、原因遺伝子は CASP1 の局在に必要な遺伝子であることが示唆された。遺伝子マッピングと次世代シーケンスにより原因遺伝子を同定したところ機能

未知の遺伝子をコードしていた。RFP との融合タンパク質を用いて、アポプラスト空間に局在することを明らかにした。

③イネの CASP2 遺伝子に Tos17 が挿入された系統が地上部のイオノームパターンに異常を有することを見出した。アリルがなかったため CRISPR-Cas 系統を作成しイオノームのパターンをみたところ、Tos17 系統と同様のイオノームパターンを示した。以上の結果から、地上部のイオノームの変化が CASP2 の破壊により生じていることを示した。

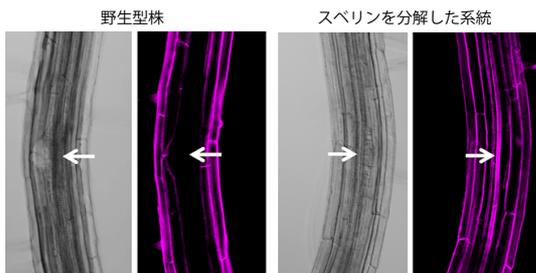
これまでにシロイヌナズナの例とは異なり、明らかなカスパー線異常、アポプラストの透過性の異常、スベリンの過剰蓄積は観察されていない。以上の結果は、イネとシロイヌナズナで CASP の機能が異なることを示唆している。

また、シロイヌナズナでカスパー線の形成に必要な遺伝子である MYB36 や SGN3 のイネのオルソログ遺伝子の破壊株を作成した。MYB36 については表現形が観察できなかったが、SGN3 は通常の土壌で栽培すると枯死することを見出した。

(2) スベリンの栄養吸収における機能の解明

(1) -②で *lotr1* を解析する過程で、*lotr1* では、他のカスパー線変異株同様スベリンが過剰に蓄積することを見出した。上述した *lotr1* で観察されるイオノームのパターンがスベリンの過剰蓄積によるものか、カスパー線の異常によるものか調べるために、*lotr1* でスベリン分解酵素を発現させたところ、カルシウムは野生型と同様の濃度を示した。このことから、地上部のイオノームパターンが野生型株に近づいたことから、スベリンの過剰蓄積がイオノームの変化をもたらしていることを明らかにした。

また、上述したスベリンを分解した系統をアポプラストのトレーサーである PI を用いて観察していたところ、スベリンを分解すると側根発生部位で、PI が侵入することを見出した (下図)。このことは、カスパー線が寸断される側根発生部位においてスベリンがアポプラスト障壁として機能すること示しており、(1) -②とあわせて、論文を投稿した。



*野生型株の根を PI で染色すると中心が染まらない。これは、カスパー線がアポプラスト障壁になるため PI が中心に入っていない

いからである。一方で、スベリンを分解した系統では、矢印で示した側根発生部位で PI が強く染まっている。

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 7 件)

① ¶ Oda, K., ¶ Kamiya, T., Shikanai, Y., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Fujiwara, T. (2016) The Arabidopsis Mg transporter, MRS2-4, is essential for Mg homeostasis under both low and high Mg conditions. *Plant Cell Physiol.* 57:754-763 ¶Equally contributed.

② 神谷岳洋 (2016) 根における栄養吸収と拡散障壁の形成 *植物科学の最前線* 7:210-219

③ 高野順平、Yeh Kuo-Chen、河内美樹、早川俊彦、小山博之、時澤睦朋、小林佑理子、神谷岳洋、三輪 京子 (2015) 2014 年東京大会シンポジウムの概要 *Mineral transport and sensing in plants.* *日本土壤肥料学雑誌* 86:152-158

④ Kamiya, T., Borghi, M., Wang, P., Danku, J. M., Kalmbach, L., Hosmani, P.S., Naseer, S., Fujiwara, T., Geldner, N., *Salt, D.E. The MYB36 transcription factor orchestrates Casparian strip formation. (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112: 10533-10538. 査読あり

⑤ 神谷岳洋 (2014) 植物の無機元素の輸送と耐性の分子機構の解明 *日本土壤肥料学雑誌* 85:412-41113

⑥ Pfister, A., Barberon, M., Alassimone, J., Kalmbach, L., Lee, Y., Vermeer, J., Yamazaki, M., Li, G., Maurel, C., Takano, J., Kamiya, T., Salt, D.E., Roppolo, D., *Geldner, N. A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. (2014) *eLife*, 3:e03115 査読あり

[学会発表] (計 12 件)

① 神谷岳洋 「カスパー線の機能と形成」第 61 回リグニン討論会 2016 年 10 月 28-29 日 京都大学宇治キャンパス (招待講演)

② 神谷岳洋 「カスパー線とスベリン: 内皮細胞における拡散障壁」2016 年 9 月 30 日-10 月 1 日 岡山 倉敷市芸文館 (招待講演)

③ 李保海、神谷岳洋、Lothar Kalmbach、山上睦、山口勝司、重信秀治、澤進一郎、John M.C.Danku、David E. Salt、Niko Geldner、藤原徹 「低カルシウム感受性変異株の解析により明らかになったカスパー線とスベリンによるアポプラスト障壁の協調した形成」第 57 回日本植物生理学会年会 2016 年 3 月 18 日-29 日

④ 神谷岳洋、Danku John M.、Borghi Monica、Naseer Sadaf、Geldner Niko、藤原徹、Salt David E. カスパー線形成を制御する転写因子の同定。日本土壤肥料学会 2015 年度京都大会 2015 年 9 月 9-11 日

⑤ 李保海、神谷岳洋、山上睦、山口勝司、重信

秀治、藤原徹 A novel protein controls localization of Casparian strip protein(CASP) and endodermal barrier formation in Arabidopsis. 日本土壤肥料学会 2015 年度京都大会 2015 年 9 月 9-11 日

⑥ 神谷岳洋、Monica Borghi, John M. Danku, Sadaf Naseer、藤原徹、Niko Geldner、David E. Salt 日本植物学会第 79 回大会シンポジウム「根系の構築 -多様な構造と働き-」2015 年 9 月 6-8 日 新潟 朱鷺メッセ (招待講演)

⑦ Baohai Li, Takehiro Kamiya, Mutsumi Yamagami, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Toru Fujiwara Arabidopsis transcription factor GTE4 prevents the collapse of new leaves caused by calcium deficiency. 第 56 回日本植物生理学会年会 2015 年 3 月 16-18 日

⑧ Kamiya, T. Casparian strip, an apoplastic diffusion barrier of root. International Symposium: Bioremediation and Transporters in Plants. 名古屋大学 2014 年 11 月 20 日

⑨ Kamiya, T., Danku J.M., Borghi, M., Naseer, S., Geldner, N., Salt, D.E. 「Identification of a transcription factor regulating genes required for Casparian strip formation」第 12 回日仏植物科学ワークショップ「植物の環境応答」2014 年 10 月 27-29 日 東京大学弥生講堂(招待講演)

⑩ 神谷岳洋 植物の無機元素の輸送と耐性の分子機構の解明。(日本土壤肥料学会奨励賞受賞講演) 日本土壤肥料学会 2014 年度東京大会 2014 年 9 月 9-11 日

⑪ 神谷岳洋、李保海、John M. Danku、David E. Salt、山上睦、藤原徹 カスパリー線形成に関与する変異株の同定と解析. 第 55 回日本植物生理学会年会 2014 年 3 月 18-20 日

⑫ 平栗章弘、藤原徹、神谷岳洋 (2014) イオノームに変化のあるイネ変異型株の解析. 第 55 回日本植物生理学会年会 2014 年 3 月 18-20 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://plantnutritionkamiya.wixsite.com/mysite-2>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 岳洋 (KAMIYA, Takehiro)

研究者番号：40579439

東京大学・大学院農学生命科学研究科 (農学部)・准教授

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし