

令和元年6月24日現在

機関番号：23401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15211

研究課題名(和文) 根のアポプラストバリアが湿害の回避に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Study on the role of apoplastic barrier at the root exodermis in waterlogging avoidance

研究代表者

塩野 克宏 (SHIONO, Katsuhiko)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：20610695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：根の表皮側に形成されるアポプラスト(細胞外空間)輸送のバリア機能は耐湿性に深く関与すると考えられている。本研究では、この外側のアポプラストバリア機能を失ったイネ変異体(reduced culm number1, rcn1)を用いてバリアが湿害回避に果たす役割の解明を試みた。イオノーム解析により、過湿ストレスを受けたrcn1変異体では根にNaとKが過剰蓄積し、総量の変化はないもののFeが根の表皮近くに集積することが分かった。Na、KおよびFeの蓄積がrcn1の生育阻害の原因である可能性が高いが、RCN1遺伝子の過剰発現体がアポプラストバリアを形成できなかったため、結論づけるには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根は水や養分(元素)を吸収する重要な器官である。表皮から維管束に至る水と元素が通過する経路では内側(内皮)と外側(外皮)にカスパー線とスベリン層が形成され、細胞外空間(アポプラスト)を通過する物質移動を抑制している。外皮は根の最外層に位置するため、その物質選択機能は養水分吸収や不良環境への適応に重要と考えられている。外皮形成能力を欠いたイネ変異体の解析から、過湿ストレスの回避にNa、K、Feの過剰吸収を防ぐことが重要である可能性が示唆された。本研究では過湿ストレス下での外皮のアポプラストバリアの機能について新しい知見を付加することができた。

研究成果の概要(英文)：In wetland plant including rice, apoplastic barrier at the root exodermis is considered to block an influx of toxic reduced iron for survival under waterlogging. However, it is not known that which reduced irons cause fatal toxicity under waterlogging. Here, we evaluated which reduced irons accumulated in a rice mutant, reduced culm number1 (rcn1), defected exodermal apoplastic barrier under waterlogged conditions. We found hyper accumulation of sodium and iron in rcn1 mutant rather than in wild type. RCN1 over expressed rice (35S::RCN1/OsABCG5) did not introduce strong apoplastic barrier at the exodermis, thus we could not test whether exodermal barrier contribute hyper accumulation of sodium and iron in over expressed lines. Our study suggests that exodermal apoplastic barrier inhibit sodium and iron infiltration under waterlogged conditions.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：アポプラストバリア イオノーム 湿害 カスパー線 スベリン 外皮

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の食糧自給率を増やすには水田転換畑で問題となっている畑作物の湿害回避が求められている。しかし、強耐湿性の育種材料がないだけでなく植物の耐湿性メカニズムは未解明な部分が多く、耐湿性品種の作出は困難である。

湿害の原因は水の排水が適切にされずに土壌が低酸素状態になることに起因する。そのため、根に酸素の通り道となる通气組織を形成し、根の呼吸に必要な酸素を届けることは重要であるが、それだけでは湿害を回避できない。スベリンは細胞外空間(アポプラスト)を經由した酸素、水、無機イオンの移動の障壁として機能する疎水性ポリマーである。イネに代表される湿生植物は根の基部の表皮近くの組織(外皮)にスベリン層のバリアを形成することで根からの酸素漏出を抑制し、呼吸活性の高い根端まで酸素を供給できる。それだけでなく、外皮のスベリン層は過湿状態の土壌で増加する、還元化により有毒になった無機イオン(例えば、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 S^{2-})の根への侵入を防ぐバリアとして機能すると考えられている。外皮にスベリン層を形成できないコムギなどの畑作物は有毒イオンの根への侵入を食い止められず、過湿土壌で根が致命傷を被る。このように、外皮のスベリン層は酸素だけでなく有毒物質のバリアとして機能し、湿害回避に不可欠な役割を担うと考えられてきた。

外皮のスベリン層の強化は作物の耐湿性の向上に寄与すると考えられる。しかし、どの植物種においても外皮のスベリン化に異常のある変異体はなく、その形成に関わる遺伝子は不明であった。そのため、外皮のスベリン層の強化はおろか、変異体を用いたその機能の直接的な証明はできなかった。研究代表者らはこれまでの研究の中で、畑条件では順調に生育できるが、水田条件では生育阻害を受けるイネ変異体(*reduced culm number1*, *rcn1*)を発見した。*rcn1*は根の外側にスベリン層とカスパー線形成できず、アポプラストの物質輸送のバリア機能を失った初めての変異体であった。

近年、元素の一斉分析手法が普及し、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)だけでなく粒子線励起 X 線分析(PIXE)といったイオノーム解析が可能になってきた。また、*rcn1*の原因遺伝子(*RCN1/OsABCG5*)が同定され、形質転換による外皮のスベリン層の機能強化とその機能評価の可能性が高くなってきた。このように、研究開始当初、実験材料、分析手法、遺伝子情報は準備できていたものの、外皮のアポプラストバリアのイオン選択機能は未解明な状態にあった。

2. 研究の目的

本研究では、耐湿性に深く関与する根の表皮側に形成されるアポプラスト(細胞外空間)輸送のバリア機能を失ったイネ変異体(*rcn1*)をイオノーム解析することで、湿害の主要因となる有毒物質(元素)の特定を目指した。さらに、変異体の原因遺伝子の過剰発現により、有毒物質を透過させないアポプラストバリアの強化の可能性を検証した。これらを通じて、外皮のアポプラストバリアのイオン選択機能を理解し、アポプラストバリア強化による耐湿性品種の作出の基盤構築を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、根の外皮にアポプラストバリアの主成分であるスベリン層を形成できずに、水田に適応できなくなったイネ変異体(*rcn1*)を用いて、外皮のアポプラストバリア機能を実験的に評価することを目指した。まず、過湿ストレスを受けた*rcn1*の根に蓄積した複数の元素をICP-MS法により定量した。さらに、PIXE法により元素の分布を解析した。これにより、*rcn1*に異常蓄積している元素の特定と蓄積パターンを把握した。さらに、*rcn1*の原因遺伝子であるABCトランスポーター、*RCN1/OsABCG5*遺伝子をイネ野生型に過剰発現させることにより、アポプラストバリア機能が強化されるかどうかを検証した。具体的には外皮のスベリン化によるアポプラストバリアを作らない好気的な条件で、*RCN1/OsABCG5*過剰発現体を栽培し、その際にアポプラストバリアの構成成分であるスベリン化が誘導されるかどうかを組織染色によって確認した。同様に過湿ストレス条件下でも*RCN1/OsABCG5*過剰発現体を栽培し、過湿ストレスへの適応性が高まっているかどうかを評価した。

4. 研究成果

*rcn1*変異体は過湿ストレスを受けると根の生育が阻害され、過湿ストレス条件下で本来誘導される外皮のアポプラストバリアを形成できないイネ変異体である(Shiono et al. Plant J, 2014)。過湿ストレス条件下で過剰に吸収している元素を突き止めるため、好気条件(Aerated)と過湿ストレス条件(Stagnant)で栽培した根に含まれる元素をICP-MS法を用いて一斉分析した(図1A,1B)。*rcn1*変異体は好気条件下の生育には異常がみられないことから、過湿ストレスを与えた条件でのみ、*rcn1*変異体で蓄積する元素が*rcn1*の生育阻害に影響を与える元素であると考えられる。ICP-MSで分析したNa、Mg、Ca、Mn、Fe、Ni、Cu、Zn、Mo、Cl、S、Ni、Cu、Zn、Moの内、*rcn1*の過湿ストレス条件下のみ過剰蓄積をみせたのはNa一つであった。*rcn1*変異体は外皮のアポプラストバリアに異常がみられる変異体であるため、元素の局在パターンに変化がある可能性も否定できない。そこで、PIXE法によりICP-MSに用いた植物体と同じ根の基部において切片上の元素マッピングを進めた。PIXEで検出できたK、Fe、Al、P、S、Clの内、過湿ストレス条件下で栽培した*rcn1*変異体で異常な蓄積パターンを見せたものはKとFeの2つであった(図1C)。Kは根の皮層と内皮の外側に部分的に過剰に蓄積するパターンを示していた。一方、Feは外皮近くに過剰に蓄積しており、外皮のアポプラストバリアとの関係性が予見される結果と

なった。しかしながら、ICP-MS で定量した根全体の Fe 蓄積量には野生型との差異はなく、この Fe の蓄積は根の基部の外皮特異的にみられる現象であることが推察された。なお、K は今回使用した ICP-MS 分析法では検出できなかったため、PIXE の結果との関係は考察できなかった。以上の元素分析により、*rcn1* 変異体が過湿ストレスを受ける原因に Na、K、Fe の根への過剰または異常な流入が関わる可能性が示された。

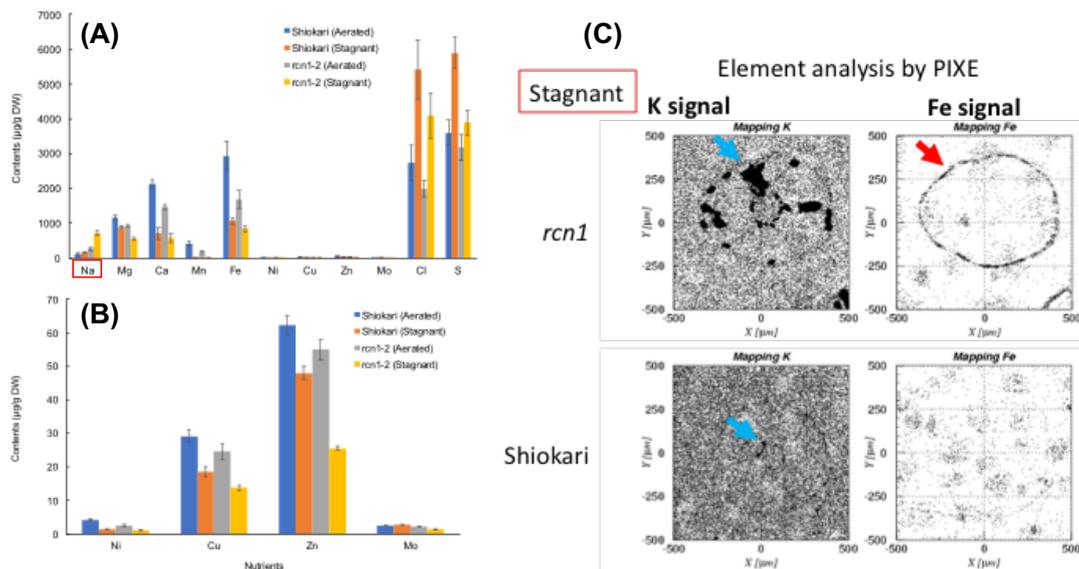


図 1. 根の元素分析 ICP-MM による多量に含まれる元素(A)と微量の元素(B)の定量結果。PIXE による元素マッピングの結果(C)。

続いて、*rcn1* の原因遺伝子である ABC トランスポーター、*RCN1/OsABCG5* 遺伝子をイネ野生型に過剰発現させることにより、外皮のアポプラストバリアの機能評価をするとともに外皮バリア強化により過湿ストレス耐性が強化できる可能性を検証することにした。イネは好気的な条件では外皮に強固なアポプラストバリアをつくることができない(図2左上)。そこで、35S プロモーターで *RCN1/OsABCG5* を過剰発現したイネを好気条件で栽培し、好気条件において外皮のスベリン化が促進されるかどうかを検証した。結果、*RCN1/OsABCG5* 過剰発現体でも、外皮のスベリン化は観察されず、外皮を *RCN1/OsABCG5* の過剰発現により強制的に形成させることはできなかった(図 2 左下)。さらに、*RCN1/OsABCG5* 過剰発現体を過湿ストレス条件で栽培し、過湿ストレス耐性が高まるかどうかを調べた。結果的に過剰発現体が過湿ストレス耐性を高めることはなく、根の乾燥重量は野生型の 15-32% 程度と過湿ストレスに感受性となっていた。*RCN1/OsABCG5* 過剰発現体が過湿ストレス感受性となることが興味深かったため、根のスベリン化を調べてみたところ野生型は外皮に連続したスベリン層を作れる(図 2 右上)のに対して、*RCN1/OsABCG5* 過剰発現体は外皮のスベリン層がパッチ状に点在していた(図 2 右下)。さらに、過湿ストレス耐性に重要な酸素漏出バリアの形成をメチレンブルー染色法により確認したところ、過剰発現体では野生よりもバリアを形成した根の数が減少していた。以上のように、*RCN1/OsABCG5* 過剰発現体における外皮のアポプラストバリアの強化と過湿ストレス耐性の強化は確認できなかった。

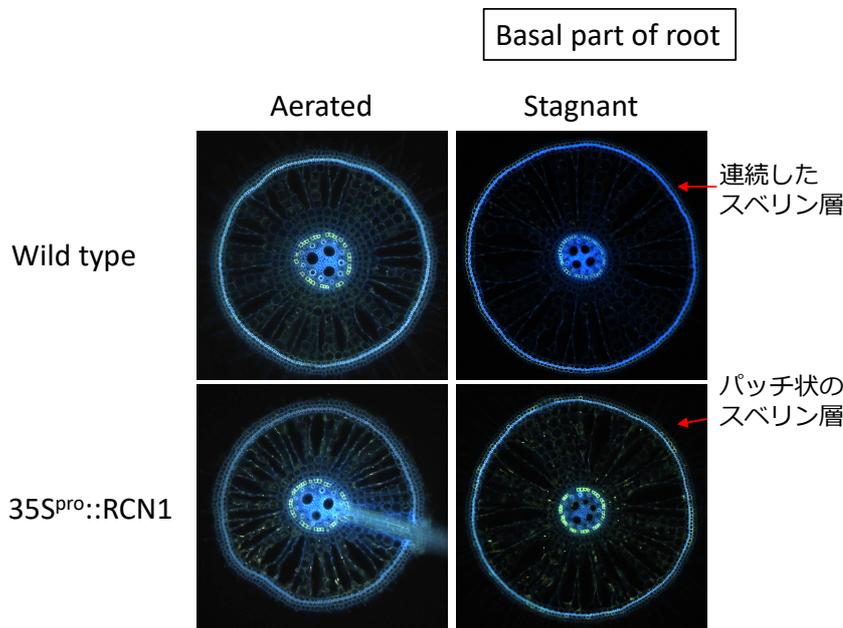


図 2. 根の基部における根のスベリン化 スベリン化した根は黄緑色の蛍光として検出される。青色は自家蛍光。フロロイエロ-088 染色法。

本研究では当初の予定通りに研究計画を進めることができたものの、期待に反して、過剰発現体が十分に外皮を形成することができなかつたため、Na、K、Feの過剰吸収が*rcn1*の生育阻害の直接的な原因であったのかどうかについての回答ができなかつた。しかし、*RCN1/OsABCG5*の過剰発現が外皮のスベリン化に影響を与えたことは興味深く、外皮の形成メカニズムに新しい知見を与えた。*RCN1/OsABCG5*がコードしているABCトランスポーターはハーフサイズのトランスポーターであり、ヘテロダイマーまたはホモダイマーとして機能する。*RCN1/OsABCG5*がスベリン化に関わるパートナーを変更しているまたはスベリン化への負のフィードバックの可能性が考えられる。本研究により、外皮のアポプラストバリアの構築機構について新しい知見を得られただけでなく、今後の外皮のバリア形成メカニズムの解明に利用できる材料を得ることができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Masato Ejiri, Katsuhiro Shiono*. Prevention of radial oxygen loss is associated with exodermal suberin along adventitious roots of annual wild species of *Echinochloa*. *Frontiers in Plant Science*, 10:254 (2019) (査読あり)
2. Katsuhiro Shiono*, Masato Ejiri, Kana Shimizu, Sumiyo Yamada. Improved waterlogging tolerance of barley (*Hordeum vulgare*) by pre-treatment with ethephon. *Plant Production Science*, 22(2): 285-295 (2019) (査読あり)

*: 責任著者

[学会発表] (計 8 件)

1. 江尻真斗, 塩野克宏. ヒエの外皮のスベリンは恒常的な Radial oxygen loss バリアとして機能する. 第 60 回日本植物生理学会年会, 名古屋, 2019 年 3 月 13-15 日.
2. Katsuhiro Shiono. Abscisic acid is required for root suberization at the exodermis to form a barrier to radial oxygen loss in rice (*Oryza sativa*). Biosynthesis and function of suberin, Bunkyo, Tokyo, 2018 年 10 月 24 日. Invited Speaker
3. Masato Ejiri, Katsuhiro Shiono. Suberin at the exodermis is associated with formation of a constitutive tight barrier to radial oxygen loss along adventitious roots of annual wild species of *Echinochloa*. Biosynthesis and function of suberin, Bunkyo, Tokyo, 2018 年 10 月 24 日.
4. 安藤希珠名, 塩野克宏. イネの外皮形成力の有無は塩ストレス耐性に影響するの? 第 48 回根研究集会, 前橋, 2018 年 5 月 25-26 日.
5. 塩野克宏. イネの耐湿性に関与する根の酸素通気システムの研究. 第 47 回根研究集会, 堺, 2017 年 10 月 28 日. 学術奨励賞受賞講演
6. 江尻真斗, 塩野克宏. ヒエ属雑草とイネにおける ROL(酸素放出) バリア形成機能の比較. 日本育種学会第 132 回講演会, 盛岡, 2017 年 10 月 7 日-10 月 8 日.
7. 塩野克宏, 松浦晴香, 山田淑葉, Timothy D. Colmer. 外生 ABA がオオムギの外皮に機能的なアポプラストバリアを形成させる. 第 46 回根研究学会, 富山, 2017 年 6 月 17 日.
8. 江尻真斗, 塩野克宏. 東アジアに分布するヒエ属(2 種 3 変種)における耐湿性の比較. 第 46 回根研究学会, 富山, 2017 年 6 月 17 日.

[その他]

ホームページ等

福井県立大学生物資源学部植物環境学分野 HP
<http://www.s.fpu.ac.jp/kankyo/Home/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 遠藤 伸之

ローマ字氏名: ENDO, Nobuyuki

研究協力者氏名: 鈴木 耕拓

ローマ字氏名: SUZUKI, Kohtaku

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。