

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05750

研究課題名(和文) 樹木の節において機能するカリウム回収・分配機構の解明

研究課題名(英文) Identification of potassium recovery and distribution mechanisms in tree nodes

研究代表者

古川 純 (Furukawa, Jun)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40451687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：樹木の冬季環境への適応機構の一つとしてカリウムの回収・分配機構に着目して研究を行った結果、短日を認識したポプラの節では、転写因子MYB59の発現が誘導され、その制御下にあるSKORならびにNRT1.5という細胞外へのカリウム排出を担う輸送体の発現が誘導されるという現象を明らかにした。これらの輸送体は長日条件と短日条件でその局在部位を大きく変化させており、この局在変化が短日条件におけるカリウムの回収・分配制御に関与しているものと考えられる。また短日をトリガーとしたカリウム分配制御には植物ホルモンのオーキシンが直接あるいは間接的に関与している可能性を見出し、樹木の環境適応の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹木のような多年生植物では季節の変化にตอบสนองして樹体内における養分輸送のソース・シンクが大きく変化しており、本成果によりその具体的な分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。特にタンパク質レベルでの局在解析の結果から、成長が活発な春夏と、落葉に備える秋では同一の輸送体であってもその局在部位が異なり、担うべき役割が大きく異なることが示唆されたことは非常に意義深い。ソース・シンクの制御は樹木のみならず多くの作物で課題となっている植物生理学・植物栄養学の重要なトピックであり、本成果はその理解に貢献できるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：Our research focusing on short day length-induced alteration of potassium (K) re-translocation revealed the high MYB59 expression in poplar node and MYB59 dependent induction of SKOR and NRT1.5. SKOR and NRT1.5 are annotated as K efflux transporter and those localization in node drastically changed during the short-day length adaptation. These localization changes will explain a part of mechanisms in K re-translocation and, in the upstream of enhancement of gene expression and change of protein localization, a plant hormone, auxin, might be involved directly or indirectly. These finding will provide a new aspect in the environmental adaptation and the regulation of nutrition distribution in trees.

研究分野：植物栄養学

キーワード：樹木 カリウム 元素動態 節 休眠

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は福島第一原子力発電所事故の後「福島原発事故により放出された放射性核種の環境動態に関する学際的研究」に参画し、栽培作物や野生植物などの放射性セシウム(Cs)吸収や、森林域における放射性Csの循環過程について研究を行ってきた。モデル樹木のポプラを用いたCs動態解析から日照時間の変化がCsの根圏からの吸収や樹体内挙動に大きく関与していることが明らかとなり、特に葉から吸収させたCsの輸送に関して、明期の長い長日条件のポプラではCsが処理葉より下部の器官へと優先的に輸送されるのに対し、逆に明期が短くなる短日移行後の試験では処理葉よりも上部の器官にCsが輸送されることを見出した。植物におけるCs輸送はカリウム(K)の輸送系によって担われていると報告されていることや、以前に自然環境下のポプラの導管液中のK濃度が冬季に上昇することを明らかにしていたことから(Furukawa J. *et al.* 2011)、この輸送方向の変化は篩管によって葉から節へと移動してきたCsが導管へ積み換えられたことによるものではないかと考えた。導管内へのK輸送を担う輸送体の候補としてシロイヌナズナで報告例のあるSKORに着目した解析を行ったところ、短日移行過程においてポプラの持つSKORの一つである*PttSKOR-like2*が節で強く発現誘導されていた。そこで*PttSKOR-like2*のRNAi発現抑制体を作成し、葉から輸送されたCsの挙動を解析したところ、本来の野生型では処理葉よりも上部の器官にCsが輸送される短日条件下においても、RNAi個体では処理葉よりも下部へとCsが輸送されていた。この先行研究で明らかになった短日移行によるCsの動態変化は、越冬あるいは春の開芽に備えたK要求部位の変化に対応するためと考えられ、葉面から篩部転流により節まで輸送されたCsが、本来はKの挙動制御に関わる*PttSKOR-like2*の発現変動を介して導管へと輸送されているという新たなK/Cs輸送制御機構の存在を示唆するものであった。

2. 研究の目的

樹木のような多年生植物は年間を通じた環境の変化に対応するために、休眠という環境適応機構を発達させてきた。秋の短日は休眠芽の形成など冬季環境へ適応するための応答機構を活性化し、それに続く4-10°Cの低温環境は、落葉やその後の0°C以下の凍結温度に対する耐性機構を誘導するとともに、芽の自発休眠を打破することが知られている。休眠誘導時の樹木では落葉前に様々な養分を葉から回収することも知られているが、これまで我々が行ってきた先行研究では、秋を模した短日条件下において、葉から葉柄を介して節まで移動してきたCsが茎頂方向へと優先的に輸送されることを明らかにしている。この輸送方向は春夏期に相当する長日条件下で見られる基部側への輸送とは逆転していた。このような節におけるCs輸送の解析から、*PttSKOR-like2*というK輸送体が短日条件の節で高発現し、樹体内を移動するCsの導管への積み込み過程を制御していることを明らかにしたが、Csは植物にとっての必須元素とはされていないため、この輸送体の本来の機能は必須元素であるKの動態制御であると考えられる。*PttSKOR-like2*の日長依存的な遺伝子発現は短日をトリガーとする樹体内栄養循環制御機構が存在することを示しており、冬季環境への適応応答の一つとしてK動態を積極的に制御しているという可能性を示している。このような多年生植物に特徴的な現象を理解するために、*PttSKOR-like2*の機能および局在の解析、植物ホルモンなど発現誘導に関与する因子の決定を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

実験材料には先行研究と同様にポプラ(Hybrid Aspen T89; *Populus tremula* × *tremuloides*)を用い、栽培は植物培養室あるいは人工気象器内で行った。擬似的に樹木の生育環境を再現した疑似年間環境サイクル栽培(長日3週間→短日10週間→短日低温4週間→長日2週間; Noda Y. *et al.* 2019)により、春夏を模した長日環境(Long Day; LD)での栽培と、秋を模した短日条件(Short Day; SD)での栽培を行い、以下の試験に供した。

(1) LDからSDに移したポプラの地上部では*PttSKOR-like2*の発現誘導に約4週間を要することが先行研究から示されていた。そのため、SD移行後6週間(以降SD6と記す)のポプラの節から抽出したRNAを用いてRNA-Seqによる網羅的な遺伝子発現解析を実施し、その解析結果を得ていた。比較対照としたLD3(LDからSDに移す直前に相当する長日栽培3週間)のポプラに比べ、*PttSKOR-like2*の発現量が約22倍となっており、先行研究で別途実施した定量的RT-PCRの結果とほぼ同等の発現誘導を示している。信頼性の高い遺伝子発現情報が取得できていると考えられたことから、その他の遺伝子の発現誘導についても本RNA-Seq解析の結果から検証を行った。

(2) *PttSKOR-like2*が実際にKの輸送活性を持つかどうか、⁴³Kによるトレーサー実験を実施した。「新学術領域研究リソース支援プログラム・短寿命RI供給プラットフォーム」から、⁴³Kの供給を受けた。LD3、SD6そしてLD3からさらに6週間LD条件での栽培を継続し、SD6と同期間栽培したLD9を用いてKとCsの挙動が同一であるかの検証を行った。また、作出済みで

ある *PttSKOR-like2* の RNAi 発現抑制体を用いて K と Cs の樹体内挙動が一致するかを検証した。

(3) *PttSKOR-like2* が節のどのような部位で発現しているかを明らかにするために抗体染色による局在解析を行った。先行研究で *in situ Hybridization* 法による mRNA レベルでの *PttSKOR-like2* の発現部位解析を行っており、節の篩管と導管の間の細胞で発現が高いことを明らかにしていた。しかしながら導管への K 輸送という想定される SKOR の機能を考慮すると、導管周辺の細胞に局在することが想定されるため、より詳細なタンパク質レベルでの局在解析を実施した。

(4) 休眠誘導時に発現量が増えることから、*PttSKOR-like2* の発現誘導には ABA が関与していることが期待された。そこで、LD 環境下のポプラを用いて葉や節周辺への ABA 塗布試験を行ったところ、*PttSKOR-like2* の発現は誘導傾向にあったものの、有意な増加には至らなかった。そのため、ABA ならびに他の植物ホルモン含量を検証するために LD ならびに SD 環境で栽培したポプラの節に含まれる植物ホルモンの網羅的定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) 植物における導管への K 積み込み輸送体として、シロイヌナズナの根において同定された細胞外排出型の輸送体 SKOR がその主要な役割を担っているとされてきたが、近年、硝酸輸送体である NRT1.5 も同様の K 積み込み活性を有しているとの報告がなされている (Li H. *et al.* 2017)。これらの輸送体は共通した転写因子である MYB59 によって発現が制御されるとの報告もなされたことから (Du X.Q. *et al.* 2019)、ポプラの節における RNA-Seq 解析の結果を再解析したところ、NRT1.5 と MYB59 の相同タンパク質 (それぞれ PttNRT1.5-like, PttMYB59 と称す) をコードする遺伝子の発現が短日条件下で、それぞれ約 17 倍、16 倍と強く誘導されていることが明らかとなった。これらの結果はポプラにおいても SKOR と NRT1.5 は MYB59 によって発現が制御されていることを支持しており、冬季環境への適応においても MYB59 という転写因子が関与していることを示唆する結果となった。また、その他の K 輸送体で発現誘導が認められたものが 3 つ存在していたが、最大でも約 3 倍の誘導にとどまっていた。これらの K 輸送体はすべて K の細胞内への取込みを担う輸送体であったことから、葉から葉柄、節にかけて篩管を移動してきた K の多くが、そのまま細胞質経由で *PttSKOR-like2* と *PttNRT1.5-like* の発現している細胞まで到達し、細胞外へ排出されているものと予測した。しかしながら、(3) で述べるようにこれら輸送体は SD 条件下において導管周囲での発現が少ないことが示されており、これら輸送体の遺伝子レベルでの発現誘導とタンパク質の局在部位、そして K の動態制御について更なる解析が必要である。

(2) LD3、LD9 あるいは SD6 条件下で栽培されたポプラを対象とした ^{43}K の葉面塗布によるトレーサー実験を実施したところ、Cs 同様に LD 条件下では投与葉から基部側へ、SD 条件下では投与葉から茎頂側へと輸送されることが示された (図 1)。そこで、すでに作出されていた *PttSKOR-like2* の発現抑制個体を用いて SD6 条件下で同様の試験を行ったところ、 ^{43}K は ^{137}Cs とは異なり、SKOR の発現抑制の影響を受けないことを示す結果が得られた。これは SD 条件の節では同様の機能を持つ SKOR と NRT1.5 の双方が発現誘導されているため、SKOR のみが抑制されてももう一方の NRT1.5 により輸送方向の制御が補われたためではないかと考えている。また、*PttSKOR-like2* の発現抑制によって ^{43}K と ^{137}Cs の挙動に違いが生じたことから、NRT1.5-like よりも *PttSKOR-like2* の方が Cs に対しての輸送活性が高いのではないかと仮説を立てている。今後これら K 輸送体の Cs 輸送活性についてより詳細な検証を行う必要があると考えている。

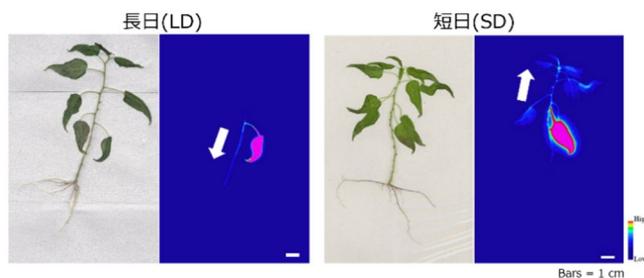


図 1 野生型ポプラにおける LD3 (左) ならびに SD6 (左) 条件下での ^{43}K 局在

(3) *PttSKOR-like2* と *PttNRT1.5-like* に特異的な抗体を作成し、LD3、LD9 あるいは SD6 条件下で栽培されたポプラの節を対象とした両輸送体タンパク質の局在解析を実施した。共通の転写因子によって発現が制御されるという前提に合致するような、両輸送体が共通して発現する部位について検証を行ったところ、LD 条件下の節においては茎から葉柄へと繋がっている維管束で両輸送体が強く発現していることが明らかとなった (図 2)。ポプラの茎には葉柄と接続する維管束が円周状に 5 か所存在しており、節ごとにそのうちの 3 本が葉柄へ、残りの 2 本が上部

の茎へと繋がるような構造をとっている。その葉柄につながる3本の維管束をより詳細に検証すると、両輸送体の抗体が蓄積しているのは維管束の中でも導管に隣接する細胞であることが明らかとなった(図2拡大図)。これらの発現部位はLD条件下での節における両輸送体の役割として、根から吸収・輸送されたKを積極的に葉へと輸送する機能を担っていることを示唆する結果ではないかと考えている。LD3条件下で実施したレーザーアブレーション-ICP-MSを用いた元素局在分析から、両輸送体が高蓄積している葉柄へつながる維管束周辺にKも多く蓄積していることが示されており、LD環境下においては輸送体の局在部位と元素局在の結果が共通して展開葉への活発なK輸送を示唆している。またSD条件下では両輸送体の局在部位が変化し、LD条件下で特徴的に誘導されていた葉柄と繋がる導管周辺での局在は強く抑制され、同じ維管束の外周部となる導管と篩管の境界部に局在部位が変化していることが示された。SD条件下ではこれらK輸送体タンパク質の発現部位が変化することで、落葉目の葉に過剰なK輸送を行わないようにしているものと考えられる。

本研究により、ポプラの節におけるPttSKOR-like2ならびにPttNRT1.5-likeの局在は明らかになったが、葉からのK回収機構への関与については更なる検証が必要である。また、mRNAレベルでの発現解析ではSD6の方が高発現しているにもかかわらず、抗体染色によるタンパク質レベルでの発現解析では維管束組織周辺においてLD条件よりも強く抗体のシグナルが得られるような部位が認められなかった。一方で節全体を見ると、SD条件の方が維管束以外の組織でも抗体のシグナルが認められることから、維管束以外での発現誘導がmRNAレベルでの高い発現量の原因となっている可能性も否定できない。今後、維管束とそれ以外に分けた部位特異的なRNA抽出などを行うことで、より詳細な発現部位の特定と機能の理解が可能であると考えている。

(4) PttSKOR-like2ならびにPttNRT1.5-like、そしてそれらの発現制御に関与すると考えられるPttMYB59の発現に対する植物ホルモンの影響を検討するため、LD3、LD9あるいはSD6のポプラの節に含まれる植物ホルモンの網羅的定量解析を行った。検出できた植物ホルモンの中で、LD3とLD9の間では変化がなく、SD環境において影響を受けるものはオーキシンであった。SD6の節においてオーキシン含量は有意に減少していたことから、休眠誘導過程におけるPttMYB59の発現や、導管周囲におけるPttSKOR-like2ならびにPttNRT1.5-likeの局在変化が起こる過程の一部にオーキシンが関与する可能性が示された。

<引用文献>

- J. Furukawa, Y. Abe, H. Mizuno, K. Matsuki, K. Sagawa, M. Kojima, H. Sakakibara, H. Iwai and S. Satoh: Seasonal fluctuation of organic and inorganic components in xylem sap of *Populus nigra*. Plant Root, Vol. 5, 56 - 62, 2011
- Y. Noda, T. Aohara, S. Satoh and J. Furukawa: Chapter 10. Application of the artificial annual environmental cycle and dormancy-induced suppression of cesium uptake in poplar, Agricultural Implication of the Fukushima Nuclear Accident (III) (T.M. Nakanishi, M. O'Brien and K. Tanoi Eds, Springer), 2019
- H. Li, M. Yu, XQ. Du, ZF. Wang, WH. Wu, F.J. Quintero, XH. Jin, HD. Li, and Y. Wang: NRT1.5/NPF7.3 functions as a proton-coupled H⁺/K⁺ antiporter for K⁺ loading into the xylem in Arabidopsis. Plant Cell, Vol. 29, 2016 - 2026, 2017
- XQ. Du, FL. Wang, H. Li, S. Jing, M. Yu, J. Li, WH. Wu, J. Kudla, and Y. Wang: The transcription factor MYB59 regulates K⁺/NO₃⁻ translocation in the Arabidopsis response to low K⁺ stress. Plant Cell, Vol.31, 699 - 714, 2019

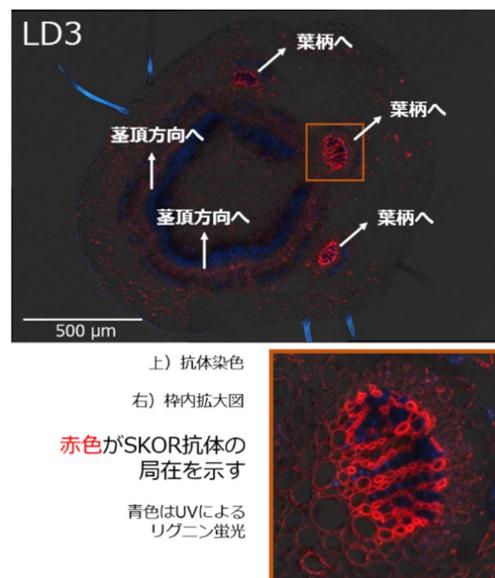


図2 野生型ポプラの節切断面におけるLD3条件下でのSKOR局在

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野田 祐作、佐藤 忍、古川 純
2. 発表標題 樹木内セシウム輸送の日長による制御とセシウム輸送体PttSKOR-like2との相関解析
3. 学会等名 第18回放射線プロセスシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野田 祐作、佐藤 忍、古川 純、河地 有木
2. 発表標題 夏および秋の樹木内セシウム動態とセシウム輸送体PttSKOR-like2との相関解析
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Jun Furukawa	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 7
3. 書名 Radiocesium Dynamics in a Japanese Forest Ecosystem -Initial stage of contamination after the incident at Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant- Ch.7 Movement of cesium in model plants	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田野井 慶太郎 (Tanoi Keitaro)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山地 直樹 (Yamaji Naoki)		
研究協力者	朝比奈 雅志 (Asahina Masashi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
フランス	原子力・代替エネルギー庁 (CEA)		