

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03022

研究課題名（和文）酢酸溶液施用によるスギ苗の乾燥耐性機構の解明とコンテナ育苗技術への応用

研究課題名（英文）Elucidation of tolerance mechanism against drought of Japanese cedar by acetic acid application and application to nursing technology of containerized seedling

研究代表者

丹下 健（Tange, Takeshi）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：20179922

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：スギ苗根系への酢酸施用による乾燥耐性誘導を確認する過程で、酢酸が根の吸水機能を阻害する現象を発見した。アクアポリンの通水機能を阻害する水銀と比較し、酢酸も同様にアクアポリンの通水機能を阻害するが、アクアポリンに関わる遺伝子発現や施用解除後の通水機能回復が異なることを明らかにし、水銀と酢酸ではアクアポリンの通水機能阻害機構が異なることを示唆した。放射性炭素で指標した酢酸を施用し、樹体内に取り込まれた酢酸が樹冠上部の成長点に特異的に集積することを明らかにした。スギの成長点での酢酸の測定方法とエピジェネティック情報の取得方法を確立し、酢酸による乾燥耐性誘導機構解明の研究基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酢酸によるアクアポリンの通水機能阻害を発見し、水銀とは異なる機構でアクアポリンの通水機能を阻害することを示唆したことは、植物生理学分野での学術的意義の高い成果である。根系に施用した酢酸が、樹冠上部の成長点に特異的に集積し、集積後も移動せずに成長点に留まることなど、酢酸の樹体内での移動に関する新たな知見を得た。スギの成長点での酢酸の測定方法とエピジェネティック情報の取得方法を確立したことは、酢酸による乾燥耐性誘導機構の解明研究に寄与するものである。主要な造林樹種であるスギ植栽苗の乾燥耐性を高めることは、人工造林の推進に寄与する技術である。本研究成果は、その基礎的知見を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：In the process of confirming drought tolerance induction by acetic acid application to Japanese cedar root system, we discovered that acetic acid inhibits the water-absorbing function of roots. By comparison with mercury application whose inhibition on aquaporin's water-permeating function was known, we found that acetic acid also inhibited the aquaporin's function but that aquaporin-related genes expression and the recovery of water-permeating function after release from the application were different. We suggested that mercury and acetic acid have the different inhibiting mechanisms. We applied acetic acid labeled by radiocarbon and found that the absorbed acetic acid accumulated specifically at growth points in the upper canopy of the seedlings. We established a method for measuring acetic acid at the growing point of cedar seedlings and for obtaining epigenetic information, which were a research base for clarifying the mechanism of induction of drought tolerance by acetic acid.

研究分野：森林科学

キーワード：乾燥耐性発現機構 酢酸施用 スギ

1. 研究開始当初の背景

日本の人工林の過半が伐採・利用可能な林齢に達しており、木材自給率も2002年の18.8%を底に、2020年以降は40%を超えるようになった。しかしながら人工林皆伐後の再造林率が3~4割程度と低いことが、将来の森林資源造成の課題となっている。再造林率が低い原因は、木材価格の低迷と高い再造林コストによる林業の採算性の低さである。人工林造成では、造林コストの削減を目的とした伐採から植栽までの一貫作業の導入が進められており、裸苗の植栽が不適な季節でも比較的活着率が高いコンテナ苗の需要が高まっている。しかしながらコンテナ苗は、育苗容器の有機質培地を詰めた150mlの窪みに播種または苗を植え付けて育成されるために根系発達が制限され、吸水器官である根に対して蒸散器官である葉の比率が大きい傾向になりやすく、特に、苗高が高くなると植栽後に強い乾燥ストレスを受ける危険性が高い。またスギの乾燥耐性は、春~夏にかけての成長期間に低く、特に伸長中の芽が乾燥害を受けやすく、枯死しなくても成長点が損傷を受けるとその後の成長に多大な影響を与える。気候変動に伴う気象の極端化が進んでおり、植栽後にしばらく雨が降らなくても成長点が損傷を受けず、高い活着率を発揮できるような乾燥耐性を高めるコンテナ苗の育苗技術が求められている。

植物の乾燥耐性強化は、乾燥ストレスに応答して溶質濃度を高める浸透調節による機構が明らかになっている。露天での育成では、降雨の影響を受けるため、灌水を調節することによって計画的に乾燥ストレスを与えることは困難である。共同研究者の金は、作物に根から酢酸溶液を吸わせると乾燥耐性が高まることを発見し、酢酸添加によるジャスモン酸の産生とそれに伴う下流乾燥耐性遺伝子群の発現誘導メカニズムを明らかにしている。コンテナ苗は、根系に培地を付けた状態（根鉢）で植栽されることから、培地に酢酸を含ませて植栽することによって乾燥耐性を高められれば、植栽後の降雨条件による枯死苗の大量発生の危険性を低減できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、根系への酢酸溶液施用がスギ苗の乾燥耐性を高める効果があることを実証すること、酢酸溶液施用がスギ苗の乾燥耐性を高める機構を明らかにすること、を当初の研究目的とした。本研究で対象とする酢酸溶液施用による乾燥耐性強化は、共同研究者の金鍾明が発見した現象であり、浸透調節とは全く異なる乾燥耐性強化機構の可能性があることから、学術的独自性・創造性が非常に高い。この新奇乾燥耐性強化機構は、進化系統上、単子葉類、双子葉類を含む全ての植物に高度に保存されていると考えられ、その機構を遺伝子発現から代謝産物までの全体像を明らかにすることを目指した。

本研究を開始後、酢酸が植物体内に取り込まれる前に、根の吸水機能を阻害する可能性を示唆する結果が得られた。根の吸水機能が阻害されることは枯死の原因ともなることから、まず取り組むべき課題として、植物体内に取り込まれる前の段階での根に対する酢酸の作用を解明することを研究目的とし、植物体内に取り込まれた酢酸の作用と並行して研究を進めた。

3. 研究の方法

1) 酢酸溶液施用によるスギ苗の乾燥耐性誘導現象の確認

1年生スギコンテナ苗を供試し、根鉢への20・50mM酢酸溶液（水酸化カリウムを用いてpH6に調整）施用の有無による灌水停止後の可視傷害の発生経過の比較、室内で灌水停止を10日継続した後、再灌水した場合の生存率の比較、灌水停止後の当年シュートの蒸散速度と水ポテンシャルの比較を行い、酢酸溶液施用による乾燥耐性誘導現象を確認した。

2) 酢酸によるスギ苗の根の通水機能阻害機構

培地を洗い落としした1年生スギコンテナ苗の根系を水、10・20・50mM酢酸溶液、20mMクエン酸溶液、20mMギ酸溶液、2mM塩化水銀溶液（いずれも水酸化カリウムを用いてpH6に調整）に浸し、当年シュートの蒸散速度と光合成速度、水ポテンシャルを測定し比較した。根系を切除したスギ苗の茎から酢酸溶液または水を吸わせた時の蒸散速度と光合成速度、水ポテンシャルを測定し比較した。

トマトとトウモロコシについても、酢酸溶液施用による道管流量の変化を調べた。

3) 酢酸がアクアポリン遺伝子の発現に与える影響

培地を洗い落としした1年生スギコンテナ苗根系を水または20・50mM酢酸溶液に浸し、浸す前と浸してから150分後まで経時的に細根採取してRNA抽出し、RNA-seq解析を行い遺伝子の発現量を調べた。

酢酸溶液施用した根で発現量が少なかったアクアポリン遺伝子6個について、水と20・50mM酢酸溶液、1mM塩化水銀溶液に根系を浸し、受光量を増やすことで蒸散速度を高めた時の細根のアクアポリン遺伝子の発現量について、qPCRで検出したCt値から各遺伝子の発現量を比較Ct法で求め、発現量の経時変化を比較した。

4) 植物体内における酢酸吸収動態

放射性同位体¹⁴Cで標識した酢酸（¹⁴C酢酸）を、当年実生または1年生スギ苗の根系に与え、4時間後から6日後までの間に複数回、シュートを採取し、放射線ライブイメージング装置を用いて¹⁴C酢酸の吸収、移動、蓄積を解析した。

5) 遺伝子発現とクロマチン変動

酢酸施用によるスギ苗木の乾燥耐性化過程において、変動遺伝子領域における局所的なエピジェネティックステータスの変化に関する知見を得るため、クロマチン活性化状態の指標となるヒストン修飾（数種のアセチル化およびメチル化）について、クロマチン免疫沈降法（ChIP法）により検出を行うための技術的基盤の確立をまず行う。

その上でスギにおけるエピジェネティック情報の取得を目指す。

6) 酢酸処理および乾燥耐性強化過程における代謝物解析

吸収された酢酸を基質とした代謝物変化を解析するための基盤技術として、固相マイクロ抽出-ガスクロマトグラフィー質量分析計によるスギの植物体内の酢酸の測定方法を確立するため、固相マイクロ抽出法において酢酸の捕集に用いるファイバーの選択とガスクロマトグラフィー質量分析計でのピークのリーディングに適したカラムの選択をまず行った。

その上で樹木の乾燥耐性強化に関わる代謝経路変換および特異的な乾燥耐性強化に寄与する物質の特定を目指す。

4. 研究成果

1) 酢酸溶液施用によるスギ苗の乾燥耐性誘導現象の確認

20mM酢酸溶液を根鉢に施用することによって、灌水停止後の芽の萎れや褐変、先枯れなどの可視傷害の発生が遅れること、50mM酢酸溶液を施用した場合は可視傷害の発生が促進されることを明らかにした。室内で灌水停止して10日間育成し、再灌水した場合、枯死率には差がなかったが、20mM酢酸溶液を施用した方が生存苗のうちで芽の萎れや褐変の可視傷害の見られない供試苗が多いことを明らかにした。

後述するように酢酸は成長点に集積することから、酢酸による芽（成長点）の乾燥耐性が高まった可能性を示す結果が得られた。灌水停止後の供試苗の重量変化を測定し、酢酸溶液施用すると重量減少が小さ

くなることを明らかにし、酢酸によって根鉢内の水の消費が抑制される可能性を示した。

2) 酢酸によるスギ苗の根の通水機能阻害機構

1年生スギ苗の根から20mMまたは50mMの酢酸を吸わせると、酢酸が葉に達しない20分後には蒸散速度と葉の水ポテンシャルが有意に低下し、水ポテンシャルを蒸散速度で割った通水抵抗の指標値が有意に増大することを明らかにした。蒸散速度等の低下は、酢酸濃度が高いほど大きく、10mM酢酸溶液では有意な低下は認められなかった。根から吸収される水分子は、カスパー線が存在によって、アポプラスト経路であっても細胞膜に存在する水チャネル(アクアポリン)を介して細胞内に入り仮道管に達する。根の吸水機能低下はアクアポリンの通水機能低下により生じている可能性を示唆した。

酢酸による根の吸水機能阻害は、酢酸濃度が高いほど大きかったことから、高濃度の酢酸溶液で乾燥耐性誘導が確認されず、かえって乾燥傷害の発生を促進したのは、吸水阻害によって強い乾燥ストレスを受けたために枯死が早まったことによることを示唆した。

根系を切断し茎から20mM酢酸溶液を直接吸わせると蒸散速度と気孔コンダクタンスの有意な低下は見られず、純光合成速度が有意に低下することを明らかにした。気孔から取り込まれたCO₂分子は、アクアポリンを介した膜輸送により炭酸固定の場である葉肉細胞内の葉緑体に取り込まれることから、茎から直接酢酸を吸わせた時の純光合成速度の低下は、アクアポリンの機能低下による可能性が考えられる。この結果も、酢酸がアクアポリンの通水機能を阻害する可能性を支持している。

以上の結果から、スギの根への酢酸溶液の施用による蒸散速度の低下は、酢酸が気孔に直接作用したのではなく、根での吸水機能を担うアクアポリンの通水機能を阻害することで培地から葉への水分供給を減少させる結果、気孔閉鎖により蒸散速度が低下することを示唆した。

アクアポリンの通水機能阻害作用が既知の水銀(塩化水銀溶液)を根に施用することによって、酢酸施用と同様に蒸散速度と水ポテンシャルが有意に低下し、通水抵抗の指標値が有意に増大し、酢酸溶液施用と同じ反応を示すことを明らかにした。この結果も、酢酸がアクアポリンの通水機能を阻害することを支持している。

酢酸施用により通水抵抗が増大した根系を水洗して、水に浸し吸水させると、60分後に通水抵抗が低下し、酢酸による通水機能阻害は短時間で回復可能であった。水銀による通水抵抗の増大は短時間では回復しないことから、酢酸によるアクアポリンの通水機能阻害機構は、物理的にアクアポリンの通水機能を阻害する水銀とは異なることが示唆された。

クエン酸またはギ酸の溶液の施用では酢酸溶液施用ほどの通水抵抗の指標値の増大は認められなかった。アクアポリンの通水機能阻害は酢酸の特異的な作用である可能性を示唆した。

酢酸溶液をトマトとトウモロコシの根に施用することによる道管流量の減少が確認され、草本植物についても、また双子葉植物(トマト)と単子葉植物(トウモロコシ)についても、同様な作用を与えることが明らかになった。

3) 酢酸がアクアポリン遺伝子の発現に与える影響

スギの細根についてRNA-seqを行った結果、約150万個の遺伝子が検出され、約2.2万個の機能グループ(GO)に分類された。Water channel activity(水チャネル活性)のGOに含まれる297個のアクアポリン遺伝子の中で対照区・酢酸施用前の細根で発現量が多い遺伝子は、細胞膜内包型アクアポリン(PIP)遺伝子(PIP)10個と液胞膜内包型アクアポリン(TIP)遺伝子6個の計16個であった。そのうち酢酸施用後の細根で発現量が少ない遺伝子がPIP遺伝子6個とTIP遺伝子2個の計8個あり、発現量が多かった遺伝子はいずれにもなかった。

水に根系を浸して受光量を増やした場合に、2つのPIP遺伝子の発現量が20分後に急増し、その後頭打ちとなって減少する経時変化を示した。当該PIP遺伝子のうちの1つについて、水銀溶液では同様な経時変化傾向を示したが、50mM酢酸溶液では増加傾向を示さなかった。蒸散速度の増加に対応してアクアポリン遺伝子の発現量が増大することが知られており、酢酸はそのアクアポリン遺伝子発現量を抑制する可能性が示唆された。

酢酸施用によるアクアポリンの通水機能阻害は、施用解除によって短時間で回復可能なことや受光量増加に伴う発現量増加が抑制される傾向にあるアクアポリン遺伝子の存在など、水銀による物理的な作用によるアクアポリンの通水機能阻害とは異なる点が明らかになった。酢酸によるアクアポリン遺伝子の発現抑制という通水機能阻害機構の存在を示唆することができた。

4) 植物体内における酢酸吸収動態

放射性同位体¹⁴Cで標識した酢酸(¹⁴C酢酸)を根から吸収させた場合、苗高10cm程度の当年実生では90分後では¹⁴C酢酸が主軸先端付近の葉で検出されないことを確認し、草本植物に比較して移動が遅いことを明らかにした。

苗高40cm程度の1年生苗の根から吸収させた場合、1日後に樹冠上部でわずかに¹⁴C酢酸が検出されたこと、¹⁴C酢酸は樹冠上部の当年シュートの成長点に集積すること、成長点への¹⁴C酢酸の集積の増加が継続すること、成長点に集積した¹⁴C酢酸は移動しないことなどを明らかにした。

5) 遺伝子発現とクロマチン変動

クロマチン免疫沈降解析に用いるスギ苗新芽からのクロマチン分画抽出法を確立した。

精緻なクロマチン情報収集のための測定試料として、発生過程において同調性の高い細胞および組織の取得を目指し、スギ苗の新芽組織を標的とした発生同調化法の確立を進めた。しかし生育環境と個体に依存したブレが大きく、有効な発生同調化法の確立には至らなかった。

6) スギ苗の成長点における酢酸の測定方法の確立

固相マイクロ抽出法に用いるファイバーでは85 μm Carboxen/PDMSファイバーが酢酸の捕集に最も有効であること、ガスクロマトグラフィー質量分析計に用いるカラムでは揮発性脂肪酸等の分析に適しているDB-FFAPが正常なピーク形状を示すことを明らかにした。

選定したファイバーおよびカラムを組み合わせ、スギの成長点に含まれる酢酸の測定に成功した。

放射性同位体炭素で標識した酢酸を用いたスギ苗に取り込まれた酢酸の動態解析の結果から、根で吸収されてから樹冠上部の成長点まで、草本植物に比べて長時間を要するが、酢酸の形態で移動していることが明らかになった。

酢酸溶液施用に供試する発生過程の同調性の高い苗の育成法が確立できず、代謝経路に関する研究を進展させることはできなかった。

7) コンテナ苗造林への応用の方向性

少雨期の植栽時の大量枯死のリスク低減のための技術開発として、コンテナ苗の根鉢に含まれる水分の有効利用と苗木の乾燥耐性の強化が考えられる。コンテナ苗の根鉢への酢酸溶液施用は、植栽当初の蒸散抑制による根鉢の水分消費の抑制効果が、植物体内に取り込まれた酢酸には成長点の乾燥耐性強化の効果が期待できる。酢酸の施用濃度や施用のタイミングなどの検討を通して、実用可能な技術となる可能性がある。

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 小林裕子・黒河内寛之・丹下健
2. 発表標題 酢酸施用がスギコンテナ苗の乾燥耐性を与える影響
3. 学会等名 第133回日本森林学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林裕子・黒河内寛之・浅川修一・吉武和敏・丹下健
2. 発表標題 遺伝子発現から見た酢酸によるスギ苗の細根の吸水抑制機構の検討
3. 学会等名 第135回日本森林学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	草野 都 (Kusano Miyako) (60415148)	筑波大学・生命環境系・教授 (12102)	
研究分担者	田野井 慶太郎 (Tanoi Keitaro) (90361576)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授 (12601)	

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
研究分担者	金 鍾明 (Kim Jong-Myong) (90415141)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任准教授 (12601)	

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