

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380004

研究課題名(和文) イネのカスパリー線へのスベリン供給を調節する膜輸送体・転写因子の機能解明

研究課題名(英文) Analysis of transporters and transcription factors controlling suberization in Casparian strip in rice

研究代表者

中園 幹生 (Nakazono, Mikio)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：70282697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イネのABCトランスポーターのRCN1が、カスパリー線やスベリンラメラの形成に関わるかどうかを調査し、さらにスベリン合成・輸送系遺伝子の発現を制御する転写因子を同定することで、カスパリー線やスベリンラメラへのスベリン供給メカニズムを明らかにすることを旨とした。rcn1変異体を用いて根におけるカスパリー線やスベリンラメラの形成を調べたところ、両方とも野生型と比べ形成が阻害されており、RCN1タンパク質はカスパリー線やスベリンラメラの形成を通してアポプラスティックバリアの形成に重要であることを確認した。また、カスパリー線およびスベリンラメラの形成を調節する転写因子の候補を同定した。

研究成果の概要(英文)：In rice, the hypodermis in the outer part of roots forms a suberized cell wall (Casparian strip and/or suberin lamellae), which inhibits the flow of water and ions. We examined if an ABC transporter RCN1 is involved in the Casparian strip and suberin lamellae formations and tried to understand the mechanism of suberization in Casparian strip and suberin lamellae by identifying transcription factors, which control expressions of suberin biosynthetic genes and suberin transporter genes. Under stagnant deoxygenated conditions, well-suberized hypodermis developed in the wild type but not in the rcn1 mutant. An apoplastic tracer, periodic acid, was blocked at the hypodermis in the wild type but not in rcn1, indicating that the apoplastic barrier in the mutant was impaired. Moreover, we identified some transcription factors, which might control the formations of Casparian strip and suberin lamellae.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：イネ カスパリー線 スベリン ABCトランスポーター

1. 研究開始当初の背景

植物の根の内皮および外皮には、アポプラスト輸送を阻害し原形質連絡によるシンプラスト輸送を促すカスパリー線と、水・溶質・ガスなどの移動をほぼ完全に阻害するスベリンラメラが存在する。カスパリー線は養水分吸収の盛んな根端に近い組織で形成され、スベリンラメラは主に根の基部側で形成される。両方とも疎水性の高いスベリンが細胞壁部分に蓄積することによって、吸収した水・溶質を保持し、さらに土壌からの有害物質の侵入を防ぐアポプラスティックバリアとして働く。分げつ数の低下するイネ変異体 *reduced culm number1* (*rcn1*) を湛水条件下で生育させると、根の外皮にカスパリー線およびスベリンラメラが形成されないことが明らかになった。RCN1 遺伝子産物はハーフサイズの ABC トランスポーターであることが明らかになっており、これらの知見から、RCN1 は根においてはスベリン前駆体の膜輸送体であることが示唆された。

2. 研究の目的

どの植物もカスパリー線やスベリンラメラを形成するが、同じ植物種でもその形成速度や形成程度には系統間差があることが知られている。カスパリー線やスベリンラメラは土壌からの有害物質の侵入を防ぐアポプラスティックバリアとして重要な構造体なので、その形成速度・程度の違いが土壌中の有害物質に対する抵抗性の違いにつながると指摘されている。カスパリー線やスベリンラメラへスベリン前駆体を供給する膜輸送体、およびスベリン合成・輸送を調節する因子(転写因子)を同定し、遺伝子組換えの手法で、根の発達過程の早い段階で確実にカスパリー線を形成させることが可能となれば、アポプラスティックバリア強化によるストレス耐性品種の作出を目指した応用研究の基盤を確立できると考えた。

本研究課題では、RCN1 がスベリン前駆体の細胞内極性輸送によってカスパリー線やスベリンラメラの形成に関与するのかどうかを検証し、スベリン合成・輸送系遺伝子の発現を制御する転写因子を同定することで、カスパリー線やスベリンラメラへのスベリン供給機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

RCN1 がカスパリー線やスベリンラメラの形成に関与するのかどうかを検証するために、*rcn1* 変異体の根の横断切片を作製して、Berberine hemisulfate-aniline blue 染色法または Fluorol Yellow 088 染色法によって、根の外皮におけるカスパリー線およびスベリンラメラの形成程度を調査した。さらにアポプラスティックトレーサー-periodic acid を用いて、根の外皮部分の透過性実験を行い、*rcn1* 変異体におけるカスパリー線およびスベリンラメラの形成によるアポプラスティックバリアの有無を調査した。

RCN1 を含む ABC トランスポーター遺伝子、スベリン合成遺伝子と共発現をすることを確認している NAC 系転写因子および WRKY 系転写因子が、実際 RCN1 遺伝子やスベリン合成遺伝子の発現を調節しているのどうかを確かめるために、これらの転写因子遺伝子の過剰発現形質転換イネ系統、機能抑制形質転換イネ系統を作出した。さらにプロモーター:GUS のコンストラクトも作製して、イネに形質転換した。

RCN1 のパートナーになる ABCG タンパク質の候補遺伝子に RFP をつないだ融合遺伝子を作製し、一過的な発現系を用いて、その融合遺伝子と RCN1-GFP の融合遺伝子を共発現させることで、RCN1 のパートナーの ABCG タンパク質遺伝子の探索を行った。

4. 研究成果

嫌気還元条件下で生育させたイネの野生型および *rcn1* 変異体の根の横断切片を作製して、Berberine hemisulfate-aniline blue 染色法(カスパリー線の染色)および Fluorol Yellow 088 染色法(スベリンラメラの染色)によって、根の外皮におけるカスパリー線およびスベリンラメラの形成程度を調査したところ、スベリンラメラ、カスパリー線ともに、*rcn1* 変異体において野生型と比べ形成が阻害されていた(図1)。

さらに、アポプラスティックトレーサー-periodic acid を用いて、根の外皮における透過性実験を行った結果、野生型ではアポプラスティックトレーサーの透過は途中の細胞で止まるのに対して *rcn1* 変異体ではアポプラスティックトレーサーが根の内部まで透過していることが分かった(図2)。

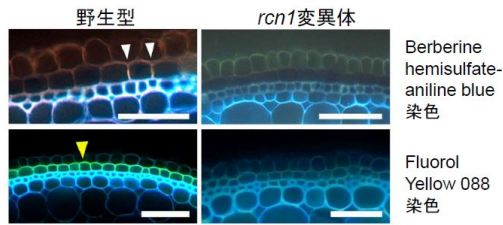


図 1. イネ根の横断切片の Berberine hemisulfate-aniline blue 染色および Fluorol Yellow 088 染色.

Berberine hemisulfate-aniline blue 染色法によりカスパリー線が白い蛍光（白色の矢じり）として、Fluorol Yellow 088 染色法によりスベリンラメラが黄色い蛍光（黄色の矢じり）として観察される。*rcn1* 変異体の外皮では、カスパリー線、スベリンラメラともに形成程度が低いことが分かった。スケールバー：50 μm 。

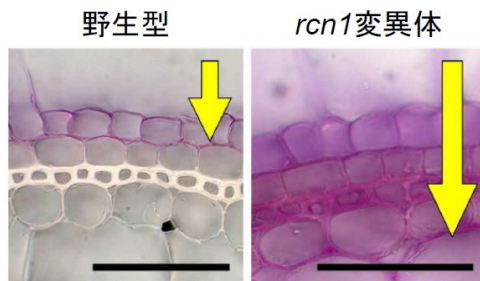


図 2. アポプラスチックトレーサー periodic acid を用いた根の外皮における透過性実験.

嫌気還元条件下で生育させたイネの根にアポプラスチックトレーサー periodic acid を浸透させて、シッフ染色を行った。野生型ではカスパリー線・スベリンラメラが形成されるために periodic acid の透過が外皮の外側でブロックされているが、*rcn1* 変異体では、カスパリー線・スベリンラメラの形成程度が低いために periodic acid が皮層組織まで透過している。スケールバー：50 μm 。

NAC 系転写因子および WRKY 系転写因子をコードする遺伝子の過剰発現形質転換イネ系統、機能抑制形質転換イネ系統を作出した。過剰発現形質転換イネ系統については、本来スベリンラメラが観察されない好気条件下において、蓄積量は少ないながらスベリンラメラが観察された。また、機能抑制形質転換イネ系統については、NAC 系転写因子遺伝子の RNAi 系統の根のスベリンラメラの染色を行ったところ、野生型と比べて RNAi 系統の外皮におけるスベリンラメラの形成程度が低いことがわかった（図 3）。

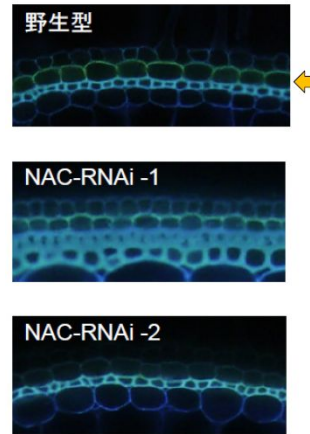


図 3. イネ根の横断切片の Fluorol Yellow 088 染色.

Fluorol Yellow 088 染色法によりスベリンラメラが黄色い蛍光（黄色の矢印）として観察される。野生型と比較して NAC 系転写因子遺伝子の RNAi 系統の外皮では、スベリンラメラの形成程度が低いことが分かった。

さらに、NAC 系転写因子遺伝子プロモーター：GUS のコンストラクトも作製して、イネに形質転換した。嫌気還元条件下でプロモーター：GUS 形質転換イネ系統を生育させ、GUS 染色を行ったところ、根の外皮特異的に GUS が発現することを確認できたことから、この NAC 系転写因子遺伝子はカスパリー線やスベリンラメラの形成される外皮で発現することが明らかになった（図 4）。

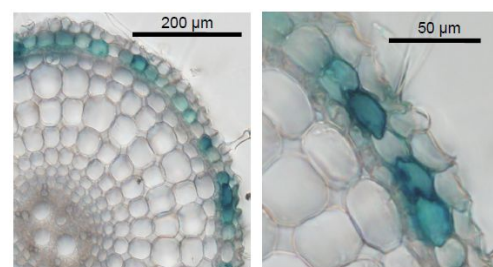


図 4. NAC 系転写因子遺伝子プロモーター：GUS 形質転換イネ系統の GUS 染色.

外皮特異的に GUS の発現（GUS 染色）が観察されたことから、NAC 系転写因子遺伝子の発現部位は外皮であることが分かった。

RCN1 のパートナーになる ABCG タンパク質の候補遺伝子に RFP をつないだ融合遺伝子を構築し、一過的な発現系を用いて、その融合遺伝子と RCN1-GFP の融合遺伝子を共発現させて、2 つの融合遺伝子の細胞

内局在を調査したが、うまく蛍光を観察できなかった。そこで、候補の ABCG トランスポーター遺伝子プロモーター:GUS を導入して作出した形質転換イネ系統を嫌気還元条件下で生育させて、GUS 染色を行った。その結果、一部の ABCG トランスポーター遺伝子については、RCN1 遺伝子と同じ発現部位での GUS の発現が観察された。これらの ABCG トランスポーターについては、RCN1 と二量体を形成するためのパートナーである可能性が考えられた。今後もこれらの ABCG トランスポーターと RCN1 が二量体を形成するかどうかを検証するための実験の条件検討を継続する予定である。

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 15 件)

- (1) Shiono, K., Yamauchi, T., Yamazaki, S., Mohanty, B., Malik, A.I., Nagamura, Y., Nishizawa, N.K., Tsutsumi, N., Colmer, T.D. and Nakazono, M.: Microarray analysis of laser-microdissected tissues indicates the biosynthesis of suberin in the outer part of roots during formation of a barrier to radial oxygen loss in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Experimental Botany*, 査読有, 印刷中.
- (2) Yamauchi, T., Abe, F., Kawaguchi, K., Oyanagi, A. and Nakazono, M.: Adventitious roots of wheat seedlings that emerge in oxygen-deficient conditions have increased root diameters with highly developed lysigenous aerenchyma. *Plant Signaling & Behavior*, 査読有, 印刷中.
- (3) Kulichikhin, K., Yamauchi, T., Watanabe, K. and Nakazono, M.: Biochemical and molecular characterization of rice (*Oryza sativa* L.) roots forming a barrier to radial oxygen loss. *Plant, Cell & Environment*, 査読有, 印刷中.
- (4) Takahashi, H., Greenway, H., Matsumura, H., Tsutsumi N. and Nakazono, M.: Rice alcohol dehydrogenase 1 promotes survival and has a major impact on carbohydrate metabolism in the embryo and endosperm when seeds are germinated in partially oxygenated water. *Annals of Botany*, 査読有, 113: 851-859 (2014)
- (5) Hu, Z., Yamauchi, T., Yang, J., Jikumaru, Y., Tsuchida-Mayama, T., Ichikawa, H., Takamura, I., Nagamura, Y., Tsutsumi, N., Yamaguchi, S., Kyojuka J. and Nakazono, M.: Strigolactone and cytokinin act antagonistically in regulating rice mesocotyl elongation in darkness. *Plant and Cell Physiology*, 査読有, 55: 30-41 (2014)
- (6) Yamauchi, T., Watanabe, K., Fukazawa, A., Mori, H., Abe, F., Kawaguchi, K., Oyanagi, A. and Nakazono, M.: Ethylene and reactive oxygen species are involved in root aerenchyma formation and adaptation of wheat seedlings to oxygen-deficient conditions. *Journal of Experimental Botany*, 査読有, 65: 261-273 (2014)
- (7) Kotula, L., Colmer, T.D. and Nakazono, M.: Effects of organic acids on formation of the barrier to radial oxygen loss in roots of *Hordeum marinum*. *Functional Plant Biology*, 査読有, 41: 187-202 (2014)
- (8) Watanabe, K., Nishiuchi, S., Kulichikhin, K. and Nakazono, M.: Does suberin accumulation in plant roots contribute to waterlogging tolerance? *Frontiers in Plant Science*, 査読有, 4: 178 (2013)
- (9) Yamauchi, T., Shimamura, S., Nakazono, M. and Mochizuki, T.: Aerenchyma formation in crop species: a review. *Field Crops Research*, 査読有, 152: 8-16 (2013).
- (10) Abiko, T., Obara, M., Abe, F., Kawaguchi, K., Oyanagi, A., Yamauchi, T. and Nakazono, M.: Screening of candidate genes associated with constitutive aerenchyma formation in adventitious roots of the teosinte *Zea nicaraguensis*. *Plant Root*, 査読有, 6: 19-27 (2012)
- (11) Abiko, T., Kotula, L., Shiono, K., Malik, A.I., Colmer, T.D. and Nakazono, M.: Enhanced formation of aerenchyma and induction of a barrier to radial oxygen loss in adventitious roots of *Zea nicaraguensis* contribute to its waterlogging tolerance as compared with maize (*Zea mays* ssp. *mays*). *Plant, Cell & Environment*, 査読有, 35: 1618-1630 (2012)
- (12) Nishiuchi, S., Yamauchi, T., Takahashi, H., Kotula, L. and Nakazono, M.: Mechanisms for coping with submergence and waterlogging in rice. *Rice*, 査読有, 5: 2 (2012)
- (13) Takahashi, H., Saika, H., Matsumura, H., Nagamura, Y., Tsutsumi, N., Nishizawa, N.K. and Nakazono, M.: Cell division and cell elongation in the coleoptile of rice alcohol dehydrogenase 1-deficient mutant are reduced under complete submergence. *Annals of Botany*, 査読有, 108: 253-261 (2011)
- (14) Rajhi, I., Yamauchi, T., Takahashi, H., Nishiuchi, S., Shiono, K., Watanabe, R., Mliki, A., Nagamura, Y., Tsutsumi, N., Nishizawa, N.K. and Nakazono, M.: Identification of

genes expressed in maize root cortical cells during lysigenous aerenchyma formation using laser microdissection and microarray analyses. *New Phytologist*, 査読有, 190: 351-368 (2011)

- (15) Shiono, K., Ogawa, S., Yamazaki, S., Isoda, H., Fujimura, T., Nakazono, M. and Colmer, T.D.: Contrasting dynamics of radial O₂-loss barrier induction and aerenchyma formation in rice roots of two lengths. *Annals of Botany*, 査読有, 107: 89-99 (2011)

〔学会発表〕(計6件)

- (1) Shunsaku Nishiuchi, Kohtaro Watanabe, Katsuhiro Shiono, Tomoko Tsuchida-Mayama, Nobutaka Mitsuda, Masaru Ohme-Takagi, Hiroaki Ichikawa, Mikio Nakazono: Role of the NAC transcriptional factor OsNAC34 in formation of a barrier to radial oxygen loss in rice. 11th conference of the International Society for Plant Anaerobiosis. 2013.10.6-11. Los Banos, Philippines.
- (2) 渡邊 宏太郎、西内 俊策、中園 幹生: 嫌気条件下のイネの根におけるスベリン生合成関連遺伝子群の発現変動. 第20回育種学会中部地区談話会. 2012.12.8. 名古屋.
- (3) 西内 俊策、渡邊 宏太郎、塩野 克宏、槌田(間山) 智子、光田 展隆、高木 優、市川 裕章、中園 幹生: NAM型転写因子OsNAC34のイネのスベリン生合成への関与. 第122回 日本育種学会講演会. 2012.9.24-25. 京都.
- (4) 渡邊 宏太郎、西内 俊策、中園 幹生: 嫌気条件下のイネの根におけるスベリン生合成関連遺伝子群の発現解析. 第121回 日本育種学会講演会. 2012.3.29-30. 宇都宮.
- (5) Katsuhiro Shiono, Miho Ando, Motoaki Nakamura, Yuichi Matsuo, Naoko Yasuno, Hirokazu Takahashi, Shunsaku Nishiuchi, Masaru Fujimoto, Hideki Takanashi, Kosala Ranathunge, Rochus Franke, Nobukazu Shitan, Naoko K Nishizawa, Itsuro Takamura, Nobuhiro Tsutsumi, Lukas Schreiber, Kazufumi Yazaki, Mikio Nakazono, Kiyooki Kato: Identification of an ATP-binding cassette (ABC) transporter that is required for formation of suberin lamellae and the apoplastic barrier at the hypodermis in rice (*Oryza sativa*). The JSRR's 20th Anniversary Symposium-The Latest Frontiers of Root Research in Asia. 2011.11.5-6. 東京.
- (6) 西内 俊策、渡邊 宏太郎、山内 卓樹、高橋 宏和、塩野 克宏、槌田(間山) 智子、光田 展隆、高木 優、市川 裕章、中園 幹生: イネのスベリン生合成経路に關与するNAM型転写因子の機能解析. 第120回 日本

育種学会講演会. 2011.9.23-24. 福井.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中園 幹生 (NAKAZONO MIKIO)
名古屋大学大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 70282697

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし