

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23658008

研究課題名（和文）トウモロコシの通気組織形成過程で合成される組織特異的タンパク質の網羅的解析

研究課題名（英文）Analysis of proteins specifically produced in the tissues during aerenchyma formation in maize

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

研究成果の概要（和文）：植物が過湿環境で正常に生育するためには、根への酸素供給に寄与する通気組織の形成が重要である。本研究課題では、トウモロコシを材料にして、通気組織が形成される組織である皮層組織を Laser Microdissection 法によって単離して、タンパク質の網羅的解析を行うために条件検討を行った。そのために、まず固定液の検討を行い、最適な固定液を決定することができた。しかし、タンパク質の回収量が少なく、ウェスタンブロッティングによる Alcohol dehydrogenase タンパク質の検出はできたものの、網羅的なタンパク質の解析を行うために必要なタンパク質量を得るには至らなかった。

研究成果の概要（英文）：Aerenchyma enables internal aeration between shoots and roots, and its formation is therefore important for the adaptation of plants to excess water environments. I examined optimal conditions for comprehensive proteome analysis using the cortex isolated by laser microdissection (LM) from maize roots. I determined an optimal fixative for fixation of tissues. Moreover, I detected Alcohol dehydrogenase protein by western blotting using LM-isolated cortex proteins. However, I failed to obtain enough amounts of proteins that are required for comprehensive proteome analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：植物分子遺伝学、植物分子生物学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：レーザーマイクロダイセクション、タンパク質、通気組織

1. 研究開始当初の背景

植物が過湿環境で正常に生育するためには、根端部への効率的な酸素供給が必須である。そのため、根の皮層における通気組織の形成は重要である。研究代表者は通気組織研究のモデル植物であるトウモロコシを材料にして、通気組織形成機構の解明を進めてきた。トウモロコシの通気組織は、嫌気条件下で根の皮層細胞特異的なプログラム細胞死によって形成されるので、Laser Microdissection (LM) 法を用いて皮層細胞を単離し、トランスクリプトーム

解析を行った結果、プログラム細胞死の誘導に関わると考えられる多数の遺伝子が同定された。しかし、嫌気条件下では選択的なタンパク質合成機構が働くことが知られており、通気組織形成過程ではタンパク質の蓄積量が転写産物の蓄積量を反映しない可能性が考えられた。それを検証するためには、通気組織形成過程の皮層細胞に蓄積するタンパク質を分析する必要があった。

2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」のような状況の中、植物の通気組織形成機構の解明には、遺伝子発現制御がどの程度タンパク質合成量を反映しているかを明らかにすることが不可欠であると考えられた。

研究代表者は微小な植物組織を精度良く単離するLM法の技術を開発した一人であり、当研究室ではLM技術がすでに確立されていた。しかし、植物からLM法によって特定の組織、細胞を単離して、タンパク質の網羅的解析を行う技術までは確立されていなかった。そこで、本研究課題では、LMによって単離した微小な植物組織、細胞から安定かつ効率的にタンパク質を回収し、それをを用いた網羅的なタンパク質の解析技術を開発することで、通気組織形成過程で特異的に蓄積が変動するタンパク質の同定に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

トウモロコシの根のパラフィン包埋切片からLM法によって皮層組織を単離して、タンパク質を抽出する際に、効率的にタンパク質を回収できる最適な固定液の検討を行った。エタノール：酢酸 (3:1)、エタノール：酢酸 (3:2)、100%エタノール、アセトンの4種類を用いて固定したトウモロコシの根をパラフィン包埋し、組織切片を作製した。

(1) 形態の確認、(2) LMを利用して抽出したタンパク質の濃度測定による回収効率の算出の結果から、最適な固定液を検討した。

最適な固定液を決定した後、12時間の過湿処理をしたトウモロコシの根および過湿処理をしていないトウモロコシの根を、上記の4つの固定液で固定して、パラフィン包埋切片を作製した。LM法によって、根の横断切片から皮層組織のみを単離して、タンパク質を抽出した。タンパク質の定量は、アジレント2100 バイオアナライザーの Agilent High Sensitivity Protein250 キットを用いて行った。

LM法によって単離・抽出した皮層組織のタンパク質を用いて、SDS-PAGEを行い、PVDF膜に転写後、抗ADH抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い、ADHタンパク質の検出を行った。

4. 研究成果

LM法によって単離した組織からのタンパク質抽出に最適な固定液を検討するために、エタノール：酢酸 (3:1)、エタノール：酢酸 (3:2)、100%エタノール、アセトンの4種類の固定液を用いて、トウモロコシの根を固定して、パラフィン包埋切片を作製した。その後、LM法によって皮層組織を単離して (図1)、タンパク質の抽出を行った。さらにタンパク質の定

量を行った結果、エタノール：酢酸 (3:1) が最適であることが分かったので、以後の実験ではエタノール：酢酸 (3:1) を固定液に用いることにした。

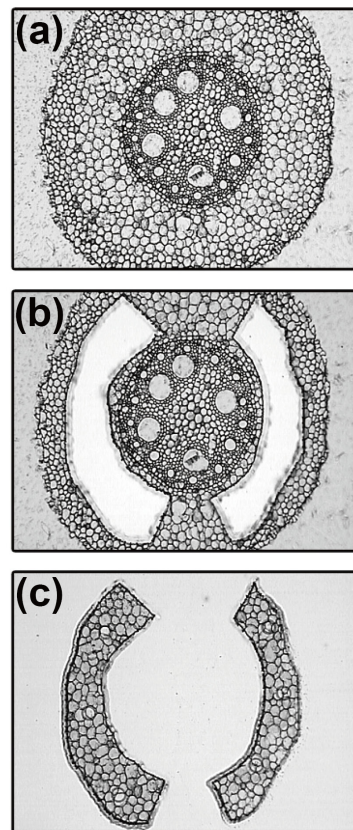


図1. LMによるトウモロコシの根の横断切片からの皮層組織の単離. (a) エタノール：酢酸 (3:1) を用いて固定したトウモロコシの根の横断切片. (b) LMによって皮層組織を単離したあとの切片. (c) LMによって単離した皮層組織.

品質の良いタンパク質を回収できたかどうかを確認するために、過湿条件で発現誘導することが知られており、LM-トランスクリプトーム解析においても過湿条件下の皮層組織で遺伝子発現が誘導されていた Alcohol dehydrogenase (ADH) タンパク質に対する抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行った (図2)。その結果、過湿条件の皮層組織で予想されるサイズのADHタンパク質のシグナルを検出された。それに対して、好気条件ではADHタンパク質のシグナルを検出されなかった。したがって、LM法によってパラフィン包埋切片から比較的品質のよいタンパク質が回収されたことが確認できた。しかし、依然としてタンパク質の回収量は少なく、網羅的なタンパク質の発現解析を行うために必要なタンパク質量を得るには至らなかった。

た。今後、条件検討を継続して、LM 法によって単離した組織からのタンパク質の回収効率の向上を図る必要がある。

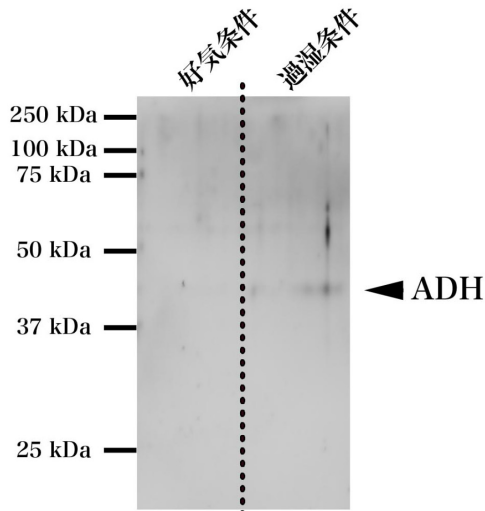


図 2. LM 法によって単離したトウモロコシの根のタンパク質のウェスタンブロットティング解析

好気条件と過湿条件で生育させたトウモロコシの根からパラフィン包埋切片を作製して、LM 法によって皮層組織を単離した。タンパク質を抽出後、抗 ADH 抗体を用いて、ウェスタンブロットティング解析を行い、ADH タンパク質の検出を行った。

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 10 件)

(1) 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)
DOI: 10.1111/j.1365-3040.2012.02513.x

(2) 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)
DOI: 10.3117/plantroot.6.19

(3) Xiong, H., Kobayashi, T., Kakei, Y., Senoura, T., Nakazono, M., Takahashi, H., Nakanishi, H., Shen, H., Duan, P., Guo, X., Nishizawa, N.K. and Zuo, Y.: *AhNRAMP1* iron transporter is involved in iron acquisition in peanut. **Journal of Experimental Botany**, 査読有, 63: 4437-4446 (2012)
DOI: 10.1093/jxb/ers117

(4) Takanashi, K., Takahashi, H., Sakurai, N., Sugiyama, A., Shibata, D., Nakazono, M. and Yazaki, K.: Cell-type specific transcriptome analysis in nodules of *Lotus japonicas*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 査読有, 25: 869-876 (2012)
DOI: 10.1094/MPMI-01-12-0011-R

(5) Fujii, M., Yokosho, K., Yamaji, N., Saisho, D., Yamane, M., Takahashi, H., Sato, K., Nakazono, M. and Ma, J.F.: Acquisition of aluminum tolerance by modification of a single gene in barley. **Nature Communications**, 査読有, 3: 713 (2012)
DOI: 10.1038/ncomms1726

(6) Takehisa, H., Sato, Y., Igarashi, M., Abiko, T., Antonio, B., Kamatsuki, K., Minami, H., Namiki, N., Inukai, Y., Nakazono, M. and Nagamura, Y.: Genome-wide transcriptome dissection of the rice root system: Implications for developmental and physiological functions. **Plant Journal**, 査読有, 69: 126-140 (2012)
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04777.x

(7) 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)
DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03535.x

(8) Aya, K., Suzuki, G., Suwabe, K., Hobo, T., Takahashi, H., Shiono, K., Yano, K., Tsutsumi, N., Nakazono, M., Nagamura, Y., Matsuoka, M. and Watanabe, M.: Comprehensive network analysis of anther-expressed genes in rice by the combination of 33 laser microdissection and 143 spatiotemporal microarrays. **PLOS**

ONE, 査読有, 6: e26162 (2011)
DOI : 10.1371/journal.pone.0026162

(9) 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)
DOI: 10.1093/aob/mcr137

(10) 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)
DOI: 10.1093/aob/mcq221

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 高橋宏和、山内卓樹、Imene. Rajhi、長村吉晃、堤伸浩、西澤直子、中園幹生: トウモロコシの通気組織形成に関与するエチレン応答性遺伝子の探索. 第120回 日本育種学会講演会. 2011.9.23-24. 福井.
- (2) Imene Rajhi, Takaki Yamauchi, Hirokazu Takahashi, Shunsaku Nishiuchi, Katsuhiro Shiono, Ryosuke Watanabe, Ahmed Mliki, Yoshiaki Nagamura, Nobuhiro Tsutsumi, Naoko K. Nishizawa, Mikio

Nakazono: Study of aerenchyma formation in maize roots during waterlogged conditions. Tunisian Japanese Symposium on Science, Society and Technology 11. 2011.11.11-13. Yasmine Hammamet, Tunisia.

- (3) 高橋宏和、山内卓樹、Imene Rajhi、長村吉晃、堤伸浩、西澤直子、中園幹生: トウモロコシにおける通気組織形成時のエチレン応答性遺伝子の発現解析. 第122回 日本育種学会講演会. 2012.9.24-25. 京都.

[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・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