

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23688017

研究課題名(和文)フェノール性物質を介した樹木根の根圏形成機構の解明

研究課題名(英文) Roles of Phenolic Compounds in Mediating the Rhizosphere Formation in Woody Plant Roots

研究代表者

大澤 裕樹 (Osawa, Hiroki)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：90401182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,700,000円

研究成果の概要(和文)：根冠から脱落する境界細胞の連結様式や細胞数は植物種間で大きく異なる。境界細胞形成過程やその機能のより良い理解は不適環境での根保護に役立つ。本研究では、熱帯造林種アカシアマンガムの根端から新奇の境界様細胞が剥離することを発見するとともに、この細胞に集積するプロアントシアニジンが根伸長跡根圏の死細胞内に3日以上滞留することを初めて明らかにした。さらに微生物忌避や多種根への他感バイオアッセイにより、根から根圏に散布されたプロアントシアニジンを含む境界様細胞が根表層の微生物増殖制御に関与する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Root border-cells play a central role in root growth and development, although their formation patterns are divergent among plant species. We find novel border-like cells (BLCs) that peel from the lateral root cap, developing a sheath structure in a leguminous tree *Acacia mangium*. We also found that proanthocyanidins (PAs) inside the peeled BLCs were conveyed to the rhizosphere of maturing root zone. Despite the loss of membrane integrity, the PAs in the detached cells were hardly eroded for at least three days. Root-inoculation assay revealed that propagation of bacterium pathogen in root surfaces of *A. mangium* was restricted more than that of soybean, which lack both root PA accumulation and BLC formation. Meanwhile, the adhesion of *A. mangium* BLCs onto the root tip in lettuce hardly inhibited its root elongation. These results suggest that BLCs carrying PA from root surface to rhizosphere may play protective roles including a pathogen defense through a repellent dispatcher.

研究分野：造林学・樹木生理学

キーワード：プロアントシアニジン ボーダーライクセル 根 根冠 根圏 アルミニウム 酸性土壌

1. 研究開始当初の背景：根冠は根端を鐘状に包む生細胞の集合体ではほぼ全ての陸生植物に認められ、乾燥や堅密などの種々の土壤制限要因から根を保護する上で重要な役割を果たす(Barlow, 2002; Iijima et al. 2008)。堅密土壤で脱落する根冠細胞数の増大から根伸長時の根冠の潤滑効果が示唆される(Iijima et al. 2000)。根冠周縁から容易に離脱する細胞は、それらの脱落時の結合様式に基づき、単体で分散する境界細胞(border cell)と緩やかな結合の集合体を保つ境界様細胞(border-like cell)に区別される(Hawes, 1990; Hawes et al., 1998; Vicré et al., 2005; Driouich et al., 2007)。境界細胞や境界様細胞の根表面や根圏での動態やそれらの細胞内物質に基づく細胞機能の理解は限定的である。境界細胞や境界様細胞が根から容易に離脱する点や単体や少数の細胞の動態捕捉が困難な点が理解の妨げとなっている。

プロアントシアニジン(PA)はカテキンやエピカテキンといったフラバン-3-オール類の重合体であり、おもに種皮や果皮、樹皮といった地上部表層組織に主に集積する(Xie and Dixon, 2005)。その高い抗酸化能およびタンパク質収斂特性から、PAは細胞内の抗酸化、動物からの摂食抑制、病原菌の侵入防御などの応答に際して重要な役割を果たす(Xie and Dixon, 2005; Barbehenn and Constabel, 2011)。最近、根におけるPAやフラバン-3-オール類の集積が木本性のクスノキ根の解析から報告されている(Osawa et al., 2011)。しかしながら、根におけるPAの集積や放出特性の詳細や、それらを介した他の生物との相互作用について不明である。

アルミニウムイオン(Al)は酸性土壌における主要な有害元素であり、根の伸長を短時間で阻害する。植物のAl耐性は種間で大きく異なる。一年生作物におけるAl耐性の決定要因は、クエン酸やリンゴ酸などの低分子有機酸の根からの放出である。一方、クスノキやマメ科の *Acacia mangium* Willd.、フトモモ科の *Melaleuca cajuputi* などの樹木種は極少量の有機酸放出によらず一年生作物耐性種の10倍以上のAl耐性を示すことを明らかにした(Osawa and Kojima 2006; Osawa et al., 2009)。クスノキ根端の解析から、高濃度Alに関わらず、PAが最内層の根冠側細胞列に集積し、この側細胞が分化脱落する間に内層の表皮細胞が伸長することを明らかにした(Osawa et al., 2011)。

熱帯産マメ科樹木の *A. mangium* は、オーストラリアクイーンズランド州北部に原生分布を有する一方、東南アジアを中心に熱帯地域でパルプ・紙生産や緑化目的に造林される主要樹種の一つである(熱帯植物研究会, 1984; Doran et al., 1997)。この樹種は早生樹としての成長特性を持ち、裸地土壌の高温に対する耐性を有するとともに、貧栄養砂質土壌や強酸性土壌、オイルパーム放棄地でも比較的良好的な成長を示す(Norisada et al., 2005)。

これらの成長特性は *A. mangium* 根端が多重のストレス耐性を保持する可能性を支持するが、それらの耐性機構や原因機能についてはほぼ不明である。

2. 研究の目的：マメ科樹木種のAl耐性比較から、数ミリ程度のサイズを有する鞘状の組織構造が *A. mangium* の根端全体を覆った後に脱落する現象を繰り返すことが見出されている(Osawaら、未発表)。本研究では、不適土壌環境における木本植物根の成長特性や根圏形成機能の解明を目的として、*A. mangium* の根端から離脱する細胞組織の構造特性や様式、細胞内集積する物質の生化学特性に着目した組織化学的・細胞学的解析を行った。さらに、これらの動態が病原微生物侵入や他感作用などの生物間相互作用や、境界様細胞と集積物質にそれぞれ対照を示すマメ科草本との比較解析から評価した。

3. 研究の方法：根端での鞘状組織と境界様細胞の生成を調べるため、主根長が10 cm程度の *A. mangium* 実生苗の根を濾紙で拭き、根端に付着する組織片を除去した。0.5 mM塩化カルシウム水溶液で水耕栽培した根端から組織片をピンセットで採取し、細胞構造を光学顕微鏡下で観察した。濾紙法により栽培した *A. mangium* 根から脱落する細胞を Hawes and Pueppke (1986)の方法を用いて回収した。境界細胞ならびに境界様細胞の時空間的分離を調査し、その数と構造的な接続をダイズ根の境界細胞と比較した。二酢酸フルオロセインを用いた蛍光観察により脱落した境界細胞および境界様細胞の生活性を評価した。レタス根への他感作用を評価するため、鞘状組織あるいはPA構成成分を含む微小アガロースゲルを根に静置した際の根伸長量を測定した。さらに、PA成分の添加がAl応答に与える影響を明らかにするため、Alとの共存添加や前添加条件における根の伸長を計測した。

4. 研究成果：生活性の蛍光試薬と蛍光顕微鏡を用いて、マメ科樹木 *A. mangium* の脱落細胞の時空間的分離を調査し、その数と構造的な接続をダイズと比較した。その結果、*A. mangium* 根の伸長に伴い、側根冠からシート状構造を維持して離脱する新規の境界様細胞が鞘状組織構造の原因であることを明らかにした。シート構造の境界様細胞は、*A. mangium* の側根冠から剥離した。水耕では7日以内に求頂側に剥離した境界様細胞が蓄積し、伸長する根頂端部0-4 mmを鞘状に覆った。摩擦下での根の伸長が求基本的剥離を起こしたが、水耕根に比べて濾紙栽培根の側根冠は最小限の刈込に留まった。一方、*A. mangium* のコルメラ根冠は同時にダイズと同様に単一性の境界細胞を放出した。これらの結果は、細胞型特異的な阻害要因が *A. mangium* の側根冠で単一境界細胞形成を欠損

させる新規表現型を誘導させることを示唆する。

境界細胞と境界様細胞はともに根端防衛上の保護的な役割が予期されるが、剥離後の生存は比較的短命である。これらの細胞由来の植物化学物質の防衛的役割は、ムシゲルを除きほぼ不明である。HPLC 分析により、*A. mangium* の根にプロアントシアニジンが蓄積することを確認した。組織化学染色から、PA が *A. mangium* の側根冠、表皮および外皮の多くの細胞に蓄積するが、コルメラ細胞に蓄積しないことを明らかにした。さらに、*A. mangium* の境界様細胞が主要な輸送胞体として PA を根成熟域の根圏で散布後に滞留することを発見した。発達段階の根横断染色解析から、境界様細胞における PA 蓄積は細胞周辺の小胞で始まり、伸長した境界様細胞の周縁に移行する傾向が見られた。剥離した境界様細胞に含まれる PA は、カテキンおよびエピガロカテキンガレートから構成される一方、それらの重合値は 10 以上でかつ、境界様細胞を失った構造根に比べて約 2 倍大きかった。濾紙栽培における抵抗を受けた伸長中の根では、境界様細胞の求頂剥離が根伸長成熟域根圏に PA を沈着させた。剥離境界様細胞の PA は細胞膜活性が完全に失われた後なお 3 日間あまり流出せずに滞留した。さらに、非 PA 集積性でかつ境界様細胞を生成しないダイズとの比較解析から、PA 集積する側根冠細胞の多層性や境界様細胞としての剥離が、*A. mangium* 根端における病原性微生物の定着増殖を限定させるとともに、根表面に付着した Al を一斉に排除して、根の Al 集積を減少させることを明らかにした。一方、レタス根の伸長は *A. mangium* 境界様細胞の継続した接触で抑制されなかった。これらの結果は、根圏に根表面から PA を運ぶ境界様細胞が根からの剥離を介して病原体防御を含む根端表層の保護に重要な役割を果たす可能性を示唆する。今後、特徴的な境界様細胞の離脱とこれらを介した PA の根圏輸送が、*A. mangium* や他樹木の根での伸長特性や生態的意義、さらに多重性のストレス耐性への潜在機能にどのような影響を及ぼすかについて、さらに総合的に検討する必要があると考えられる。

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 3 件)

1. Osawa H, Ikeda S, Tange T (2013) The rapid accumulation of aluminum is ubiquitous in both the evergreen and deciduous leaves of Theaceae and Ternstroemiaceae plants over a wide pH range in acidic soils. *Plant and Soil* 363: 49-59, DOI:10.1007/s11104-012-1285-5, 査読有

2. Endo I, Tange T, Osawa H (2011) A cell-type-specific defect in border cell formation in the *Acacia mangium* root cap developing an extraordinary sheath of sloughed-off cells. *Annals of Botany* 108: 279-290, DOI:10.1093/aob/mcr139, 査読有

3. Osawa H, Endo I, Hara Y, Matsushima Y, Tange T (2011) Transient proliferation of proanthocyanidin-accumulating cells on the epidermal apex contributes to highly aluminum-resistant root elongation in camphor tree. *Plant Physiology* 155: 433-446, DOI:10.1104/pp.110.166967, 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Zhang M, Osawa H, Tange T (2015) Effect of aluminum on endocytosis and intracellular dynamics of proanthocyanidins in root-tip cells of woody plants. 第 126 回 日本森林学会大会 2015 年 3 月 25-29 日

2. Osawa H, Matsushima Y, Ikeda S, Tange T (2014) Comprehensive analysis of proanthocyanidin accumulation in woody plant roots. 6th International Symposium on Physiological Processes in Roots of Woody Plants, Sep 08-13, Nagoya University, Nagoya, Japan

3. Zhang M, Osawa H, Tange T (2014) Subcellular Localization of Polymeric Flavonoids in Border-like Cells of Al-tolerant Woody Plant *Acacia mangium*. 6th International Symposium on Physiological Processes in Roots of Woody Plants, Sep 08-13, Nagoya University, Nagoya, Japan

4. Zhang M, Osawa H, Tange T (2014) Use of protoplasts to determine the subcellular localization of polymeric flavonoids in roots of *Acacia mangium*. 第 125 回 日本森林学会大会、2014 年 03 月 26-29 日 大宮ソニックシティ(埼玉県大宮市)

5. 張萌・大澤裕樹・丹下健 (2013) アカシアマンギウム境界様細胞の重合性フラボノイドの細胞学的特性および局在性の解析, 2013 年 03 月 25-28 日, 岩手大学(岩手県盛岡市)

6. 大澤裕樹 (2012) Transient proliferation of proanthocyanidin-accumulating cells on the epidermal apex contributes to highly aluminum-resistant root elongation in camphor tree. 第 123 回 日本森林学会大会, 2012 年 3 月 26-28 日, 宇都宮大学(栃木県宇都宮市)〔受賞講演〕

7. 大澤裕樹・遠藤いず貴・丹下健 (2012) 木本性種の根端細胞におけるプロアントシア

ニジン局在の細胞学的解析, 第 123 回 日本
森林学会大会, 2012 年 3 月 26-28 日, 宇都宮大
学 (栃木県宇都宮市)

〔その他〕

ホームページ等

東京大学造林学研究室 HP

<http://www.silva.fr.a.u-tokyo.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大澤裕樹 (OSAWA, Hiroki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号 : 9 0 4 0 1 1 8 2