

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657032

研究課題名(和文)シロイヌナズナの根の水輸送調節の分子メカニズムを探る：MRIを用いた挑戦

研究課題名(英文)The study of molecular mechanism of water transport in the roots of Arabidopsis thaliana: the challenge to MRI.

研究代表者

奈良 久美 (Sato-Nara, Kumi)

奈良女子大学・自然科学系・准教授

研究者番号：30322663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物の根の水や無機養分の輸送は光や概日時計をはじめとした様々な外的・内的な因子によって調節されている。本研究では、まず、Magnetic Resonance Imaging (MRI) を用いてシロイヌナズナ実生の水の分布や状態を計測し、胚軸において、光条件による細胞サイズや溶質の種類・濃度に起因すると考えられる水分子の存在状態の違いを検出することに成功した。さらにフィトクロムAや概日時計の変異体を用いた根の形態形成や水透過性、アクアポリン遺伝子の発現解析を行い、環境や内的要因に応じた地上部の成長・形態形成と密接に関連した根の水輸送調節の仕組みの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Various environmental and endogenous factors such as light and circadian clock regulate water and nutrient transport in the roots of the plants. To understand the mechanism of light and clock regulation of water transport of the plants, we were aiming to develop new technics for Magnetic Resonance Imaging (MRI) to intact seedlings of Arabidopsis thaliana, as well as to examine the growth of the roots and shoots, aquaporin expression, and root water permeability. We devised the setting method and succeeded to detect the differences of water status between the light- and dark-grown Arabidopsis seedlings from the MR images of the hypocotyls. Furthermore, new aspects of light regulation of plant growth and aquaporin expression via photoreceptor phytochrome A were found. The comprehensive studies using MRI and the other molecular and physiological techniques may lead us to an understanding of the mechanism for coordinating growth and water transport in response to light and clock.

研究分野：植物科学

キーワード：水輸送 MRI アクアポリン フィトクロムA 概日時計

1. 研究開始当初の背景

(1) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) イメージング、あるいは Magnetic Resonance Imaging (MRI) は生きた試料の水動態の解析に欠かせない技術である。医療分野だけではなく植物においても、MRI を使用した生体組織の可視化や流速の測定が行われているが、モデル植物であるシロイヌナズナは個体が小さく、MRI の解像度では細部を可視化できなかった。一方で、生きたシロイヌナズナの MRI により、根のプロトンシグナル値が日周または概日の変動を示すことが示されていた。また、幾つかの変異体において、概日や光に応答したシグナル変動が異常になることも見出されていた。しかし、この光や時計に応じた根のプロトンシグナル値の変動が根のどのような生理的な変化を反映しているのかについて、決定的な証拠を得ることが出来ていなかった。その理由は、シロイヌナズナを MRI の材料として用いるための基礎的な技術や実験的に得られた情報が不足していたためであった。

(2) 水や無機養分の吸収・輸送を担う根は、植物の健全な成長に欠かせない。この水や無機養分の輸送は光や概日時計をはじめとした様々な外的・内的な因子によって調節されている。上述した MRI による根のプロトンシグナル値の変動は、水・無機養分の輸送あるいは何らかの代謝産物の変化に起因していると予測される。

このプロトンシグナル変動を引き起こす光条件や概日の時間帯において、水や無機養分の輸送を担うアクアポリンの遺伝子のうち、幾つかが発現変動することも見出されていた。しかし、これらの条件で、どの特定のアクアポリン遺伝子の転写産物に変化しているのか、またタンパク質の量的な変化や翻訳後の制御については明らかになっていなかった。さらに同条件でのアクアポリン発現の器官や組織特異性についても、検討されていなかった。さらに、アクアポリン発現と水輸送を、光や時計による植物の成長制御と関連づけて考察するために、MRI に用いた植物の栽培条件や特殊な光条件に合わせて、植物の成長や形態的な特徴を詳細に観察する必要もあった。

モデル植物であるシロイヌナズナの MRI 技術の確立は、水輸送の仕組みを調べるための強力なツールとなるばかりでなく、さまざまな研究に発展する可能性を秘めている。世界的に MRI の植物科学への利用を促進する動きが出ているにも関わらず、国内では利用できる MRI 装置が限定されており、植物科学分野での MRI 利用も進まない中、基礎的な研究の積み重ねが急務であった。

2. 研究の目的

背景で述べたように、生きたシロイヌナズナの根では、プロトンシグナル値が日周または

概日変動する。私達は水の流速あるいは状態の変化がシグナル値の変動に寄与していると予測しているが、この昼夜での根のプロトンシグナル値の変動が、具体的に水のどのような変化を表しているかは明確になっていない。

そこで本研究では、まずシロイヌナズナを用いてさまざまなイメージング手法を試し、昼夜における水の流速または状態の変化、及び野生型と変異体における水動態の違いを計測する技術を確立することを第1の目的とした。それと平行して、MRI 以外の既存の手法を用い、MRI でシグナル変動が見られた条件で、水輸送に関連するアクアポリン遺伝子の発現解析や植物の成長解析を行うことを第2の目的とした。さらに、MRI や遺伝子発現解析で得られた成果と合わせて考察するために、シロイヌナズナの根の水透過性を調べる必要があった。そこで、シロイヌナズナに合わせた測定装置を作製し、根の水透過性を測定することを第3の目的とした。

根の水輸送調節は、環境要因や地上部の成長・形態形成と密接に関連している。作物の品種改良や栽培技術の向上などに応用可能な根の水輸送調節の分子メカニズムに関する新知見を得ること、そのための基礎的な知見を積み重ねることが本研究の最大の目的である。

3. 研究の方法

(1)シロイヌナズナの実生の $^1\text{H-NMR}$ イメージングには、JEOL 製 NMR 装置 (^1H 共鳴周波数 500 MHz、磁場強度 11T、Doty 製イメージングプローブを含むマイクロイメージングアクセサリ付) または、NMR 装置 Bruker Avance 400 (^1H 共鳴周波数 400 MHz、磁場強度 9.4 T ワイドボアタイプ、マイクロイメージングアクセサリ付) を使用した。使用した RF コイル径は 5 mm で、マトリックスサイズ 256 × 256、積算回数 8 回の条件を基本として、2D スピンエコー画像を取得した。

(2) 野生型 (*Ler*) 及びフィトクロム A の変異体 (*phyA*) は、MS 培地で無菌的に栽培 (3 ~ 6 日間) し、成長解析やリアルタイム PCR 解析、MRI に用いた。また野生型 (*Col/g11*) 及び概日時計の変異体 (*elf3*) は、水耕栽培装置で約 2 か月間栽培し、根の水透過性測定や免疫プロット解析に用いた。基本的に 12 時間明期 12 時間暗期 (12L12D) の光周期で栽培し、光条件を変えるときには、通常栽培後に暗処理や連続明条件に移した。また、遠赤色光照射を行うときには暗処理後に行った。

(3)野生型と *phyA* 変異体において、液胞膜アクアポリン TIP2;2 の量的な変動や局在を調べるために、TIP2;2 と GFP の融合タンパク質を発現する形質転換系統を作製した。これらの系統を用いて、光条件を変化させた時のア

クアポリンの量を免疫プロット法、及び蛍光強度の測定により調べた。

(4)野生型と *phyA* 変異体における主要な原形質膜アクアポリンと液胞膜アクアポリンの遺伝子の mRNA 量を、リアルタイム PCR 法を用いて調べた。また、免疫プロット法を用いて、野生型及び概日時計変異体の原形質膜アクアポリンの量、及びリン酸化について検討した。

(5)シロイヌナズナの根の水透過性を測定するために、シロイヌナズナの根の形状に合わせたプレッシャーチャンバー装置を作製した。また野生型及び概日時計変異体において、根の水透過性を測定した。

4. 研究成果

(1) 本研究では、メーカー及び仕様の異なる2台のMRI装置を用い、野生型及び *phyA* 変異体を主な材料として研究を展開した。研究開始からの2年間において、シロイヌナズナの実生のMRIを実施するための一手法、特に栽培条件や系統の異なる2個体を比較するための手法を確立した(図1)。さらに、既成のMRI装置でシロイヌナズナのイメージングを行うために解決すべき問題点を洗い出した。

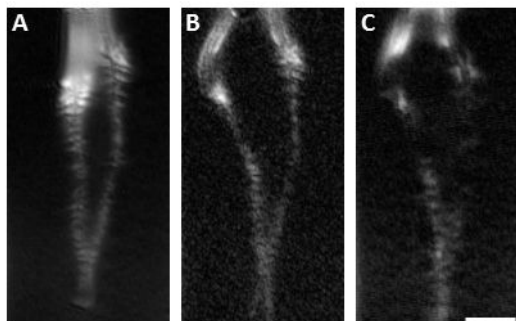


図1 シロイヌナズナ実生のMRイメージ
A~Cは、同一個体(各画像の左:野生型、右:*phyA*変異体)を異なる撮像法で撮った画像である。A、Bでは胚軸と根の境界部で特に強いシグナルが検出され、根毛のような構造もみられる。Bar=1 mm

最終年度においては、MRI装置(Bruker製、400 MHz)を用いて、明所と暗所で栽培したシロイヌナズナ野生型の実生の水の状態や分布を解析した。その結果、明所と暗所で栽培した実生の胚軸において水分子の存在状態(細胞サイズや溶質の種類・濃度を反映したシグナル)に統計的に有意な違いが得られた。胚軸よりも細い根では統計的に有意な差を見出すことはできなかったが、より高解像度の装置を用いれば検出可能であると考えている。本研究において確立された手法は、将来、生きたシロイヌナズナ実生を用いて、光環境を変化させたときの胚軸の細胞の成長や溶質濃度、流速の変化を追跡するために用いることができる。

(2)MRIを用いた実験に加えて、本研究では、以下の(3),(4)で示すように、シロイヌナズナのフィトクロムAや概日時計の変異体を用いた根の形態形成や水透過性、アクアポリン遺伝子の発現解析を行い、環境や内的要因に応じた地上部の成長・形態形成と密接に関連した根の水輸送調節の仕組みの一端を明らかにした。

(3)植物の水輸送は、光環境によって調節される。多くの植物のアクアポリンの遺伝子発現が光条件の影響を受けること、根の水透過性がアクアポリンの発現と相関して日周変動することから、その輸送調節の一端はアクアポリンが担っていると考えられている。シロイヌナズナの根では、暗順応処理によりアクアポリン遺伝子の転写産物量が増加する。中でも、液胞膜アクアポリン *TIP2;2* 遺伝子は、暗処理による誘導性が高く、フィトクロムAによる制御を受けていることが示唆されていた。そこで、*TIP2;2*の暗順応による増加の仕組みの詳細、特に *phyA* の関与を調べるために、*phyA* 変異体と野生型において、*TIP2;2-GFP* 遺伝子を導入し、その量的な変化を調べた。その結果、野生型の植物を暗順応させると、GFPの蛍光が明るくなり、*phyA* 変異体ではその変化が顕著には見られなかった。したがって、*TIP2;2* タンパク質量が暗所で増加することと、明所における *phyA* のはたらきに何らかの関連があると予想された。この暗順応処理による *TIP2;2* の増加は、暗所において液胞膜上のチャンネルを介した水やその他の溶質の輸送の必要性が増すことを示唆しており、未だ解明されていない *TIP2;2* の機能を調べる上でも貴重な知見が得られた。

さらに、シロイヌナズナの主要なアクアポリンの幾つかの転写産物量の変化を調べたところ、幾つかのアクアポリン遺伝子で光条件に応じた発現変化があること、そのうちのひとつがMRIで観察されたプロトンシグナル値の変化とよく似たタイミングで変化することがわかった。また、光と糖による根の成長調節に関する実験から、*phyA* と糖のシグナリングのクロストークを示す興味深い結果が得られた。光による水輸送調節は、光による植物の成長・発達の調節と密接に関連しており、その分子メカニズムの解明に本研究の成果を生かすことができるだろう。

(4)アクアポリンは生体膜に存在し、膜を介した水や低分子の輸送を担うタンパク質であり、アクアポリンの発現量に加えて、局在や孔の開閉を調節することで生体膜の水透過性が調節されると考えられている。一方で、概日時計は、植物の成長や生理機能などを昼夜の周期に合わせるための調節機構である。シロイヌナズナのEARLY FLOWERING 3 (ELF3)は、光や温度という環境シグナルを概日時計

に伝える因子である。ELF3 が欠損した変異体 *elf3* と、野生型を比較した先行研究から、原形質膜アクアポリン PIP2s の遺伝子発現が概日時計によって調節されていることが報告されていたが、概日時計による PIP2s の翻訳後の調節については検討されていなかった。

そこで本研究では、PIP2s の翻訳後調節に概日時計が影響しているかどうかを調べるために、野生型と *elf3* 変異体において、リン酸化された PIP2s の量を調べた。その結果、長日条件の特定の時間帯では、*elf3* のほうが野生型よりも、リン酸化された PIP2s の量が多いことがわかった。また、プレッシャーチャンバーを用いて、時間帯ごとに根の水透過性測定を行った結果、野生型ではある時間帯に根の水透過性が変化する傾向があることがわかった。今後も詳細な解析が必要であるが、本研究により、シロイヌナズナの PIP2s のリン酸化、及び根の水透過性の概日時計による調節機構を解明するための重要な知見が得られた。

(5) 今後は、本研究で確立したシロイヌナズナの MRI 技術を活用するとともに、本研究により明らかになったシロイヌナズナの MRI における様々な問題点を解決していく必要がある。特に、MRI 開発分野の研究者と連携して、植物科学の研究に応用しやすい MRI 装置や測定法を開発していく必要があると考えている。さらに MRI で得られた情報と、分子生物学・植物生理学的研究の成果を総合的に考察するため、分野横断型の共同研究が今後ますます重要となるであろう。

< 引用文献 >

Van As, H. *et al.* MRI of intact plants. *Photosynth Res.* 102(2-3): 213-222, 2009.

Ishida, N. *et al.* The NMR microscope: a unique and promising tool for plant science. *Annals Bot.* 86(2): 259-278, 2000.

Takase, T. *et al.*, The circadian clock modulates water dynamics and aquaporin expression in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Physiol.* 52(2): 373-383, 2011.

Sato-Nara, K. *et al.* Identification of genes regulated by dark adaptation and far-red light illumination in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 27(11): 1387-1394, 2004.

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 1 件)

Yumi Uenishi, Yukari Nakabayashi, Ayako Tsuchihira, Mari Takusagawa, Kayo

Hashimoto, Masayoshi Maeshima, Kumi Sato-Nara, Accumulation of TIP2;2 aquaporin during dark adaptation is partially phyA dependent in roots of *Arabidopsis* seedlings, *Plants*, 3(1), 177-195, 2014, 査読有

DOI: 10.3390/plants3010177

[学会発表](計 6 件)

奥村 綾子、且原 真木、金子 智之、奈良 久美、シロイヌナズナ概日時計変異体を用いた根の水透過性とアクアポリン PIP2s のリン酸化の解析、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 18 日、東京農業大学(東京都世田谷区)

長井 理香、福岡 美香、高瀬 智敬、石田 信昭、奈良 久美、シロイヌナズナの根の細胞サイズと MRI による水の状態の解析、日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 14 日、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

長井 理香、福岡 美香、高瀬 智敬、伊達 康博、菊地 淳、石田 信昭、奈良 久美、シロイヌナズナを用いた根の水の状態の比較の試み、第 18 回 NMR マイクロイメージング研究会、2014 年 8 月 11 日、金沢勤労者プラザ(石川県金沢市)

長井 理香、土平 絢子、前島 正義、奈良 久美、シロイヌナズナ実生のシュートにおけるアクアポリン遺伝子 *PIP2;1* の発現と根の水動態との関連性の検討、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 日、富山大学(富山県富山市)

長井 理香、丹後 真奈実、奈良 久美、シロイヌナズナの根の細胞サイズの光と糖による調節、日本植物学会 第 77 回大会、2013 年 9 月 14 日、北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市)

奈良 久美、長井 理香、丹後 真奈実、伊達 康博、石川 春樹、高瀬 智之、菊地 淳、シロイヌナズナの根の水の状態や輸送に異常のある変異体の探索に向けて、日本植物学会 第 76 回大会、2012 年 9 月 15 日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス(兵庫県姫路市)

[その他]

ホームページ等

<http://koto10.nara-wu.ac.jp/Profiles/4/0000360/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奈良 久美 (SATO-NARA, Kumi)

奈良女子大学・研究院自然科学系・准教授

研究者番号： 30322663

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

石田 信昭 (ISHIDA, Nobuaki)
石川県立大学・生物資源環境学部・教授
研究者番号：20343816

菊地 淳 (KIKUCHI, Jun)
理化学研究所・環境資源科学研究センター
・統合メタボロミクス研究グループ・環境代謝分析研究チーム・チームリーダー
研究者番号：00321753

高瀬 智敬 (TAKASE, Tomoyuki)
学習院大学・理学部・生命科学科・助教
研究者番号：30392012

田草川 真理 (TAKUSAGAWA, Mari)
奈良女子大学大学院・人間文化研究科・博士研究員 (現、山口大学大学院・医学系研究科・学術研究員)
研究者番号：90711599

伊達 康博 (DATE, Yasuhiro)
理化学研究所・環境資源科学研究センター
・統合メタボロミクス研究グループ・環境代謝分析研究チーム・特別研究員
研究者番号：60585785

土平 絢子 (TSUCHIHIRA, Ayako)
名古屋大学大学院・生命農学研究科・博士研究員 (現、民間企業研究員)
研究者番号：70762532

福岡 美香 (FUKUOKA, Mika)
東京海洋大学大学院・海洋科学技術研究科・准教授
研究者番号：10240318

前島 正義 (MAESHIMA, Masayoshi)
名古屋大学大学院・生命農学研究科・教授
研究者番号：80181577

(4)研究協力者

石川 春樹 (ISHIKAWA, Haruki)
長井 理香 (NAGAI, Rika)