

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450031

研究課題名(和文) 湿害によるダイズの吸水機能低下とアクアポリンの関係解明に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Role of soybean aquaporins in inhibition of water uptake under flooding

研究代表者

石川 淳子 (Ishikawa, Junko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター稲研究領域・主任研究員

研究者番号：40343959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では湿害によるダイズの吸水阻害機構に関わる基礎的知見を得るため、吸水に関わる膜タンパク質アクアポリンに着目し、アクアポリンと吸水阻害の関係について検討を行った。ダイズの根では19のアクアポリン遺伝子が発現し、その中でも最も発現量の多い9つの主要アクアポリン遺伝子は湛水処理により半分程度まで発現量が低下したことから、アクアポリン発現量の低下が湛水処理による根の吸水阻害の要因の1つとなっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Soybean is generally susceptible to flooding. In Japan, flooding is a serious problem, because soybeans are often cultivated in the fields converted from paddy fields. Understanding mechanism of the flooding susceptibility is important for developing tolerant genotypes. In the present study, we investigated role of aquaporins in inhibition of water uptake under the flooding. Aquaporins play key roles in regulation of water uptake from the roots. We demonstrated that submerging treatment decreased gene expression of nine major root aquaporins. It suggests that the decrease in the aquaporin expression is a contributing factor in inhibition of water uptake from the roots of submerged plants.

研究分野：農学

キーワード：植物 ダイズ アクアポリン 湿害

1. 研究開始当初の背景

日本におけるダイズ栽培の8割以上は水田転換畑で行われている。転換畑は水がたまりやすく地下水位が高いために湿害が発生しやすく、出芽や初期生育不良により収量が低下するなど、日本におけるダイズ生産の不安定さの要因となっている。そのため、排水設備や地下水位制御システム等による栽培管理技術の確立とともに耐湿性品種の開発が求められている。水分過剰により土壌が嫌気的条件となった場合に根は酸素不足に陥る可能性があるが、湿害に弱いダイズ等の植物でも、胚軸・根等に新たに通気組織を発達させ、地上部から根への酸素供給を可能とするシステムが備わっている (Bacanawo et al. 1999)。しかし、酸素不足により根の機能が阻害される具体的なメカニズムについては十分に分かっていない。湿害を受けた植物で見られる気孔の閉鎖・蒸散量の低下は、土壌の酸素不足により根からの吸水が阻害されることが原因である (Kramer and Boyer 1995)。吸水は栄養素の地上部への移行など根全体の機能の最も良い指標となることから、湿害による吸水阻害の作用機構を明らかにすることが重要である。

植物の根からの吸水は、根系構造・形態だけでなく単位根当たりの水透過性に大きく依存する。根の表皮から中心柱に至る放射方向の水移動経路が根の水透過性の最も大きな抵抗部位であるが、「アクアポリン」と呼ばれる水を通す膜タンパク質が根の各組織の細胞に存在し、放射方向の水移動を促進する (Maurel et al. 2008)。植物には30種類以上のアクアポリン遺伝子が存在し (Chaumont et al. 2001, Johanson et al. 2001, Sakurai et al. 2005)、体内の各部位で発現し機能分担を行っており、特に養水分吸収を担う根では多くの種類のアクアポリンが発現している (Sakurai et al. 2005)。本研究課題の採択直前にダイズの全66種類のアクアポリン遺伝子の同定について報告された (Zhang et al. 2013) が、根で多く発現するアクアポリンの種類等については十分に解析されていなかった。Matsuo ら (2012) は、根の低酸素処理により4種類の細胞膜型アクアポリン遺伝子発現量が低下することを明らかにし、根の吸水阻害にはアクアポリン遺伝子発現量の低下が関与している可能性を示した。しかし、この4種類のアクアポリンがダイズの66種類のアクアポリンのうち根で主要な役割を果たすアクアポリンかどうかは不明である。一方、シロイヌナズナを用いた研究から、嫌気条件下における根の水透過性の低下には、細胞質の酸性化に伴う細胞膜型アクアポリンの活性レベルでの機能阻害 (ゲートの閉鎖) によることが報告されている (Tournaire-Roux et al. 2003) が、ダイズに関しても同様のメカニズムで吸水機能低下が引き起こされているかどうかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本課題では、湿害時におけるダイズの吸水機能低下にアクアポリンがどのように関わっているのか、その基礎的知見を得るために研究を行う。まず水分子の輸送に関わると考えられる細胞膜型及び液胞膜型アクアポリンに着目し、各発育時期の各器官での発現特性を詳細に解析する。その結果を元に、根で主要な役割を果たすアクアポリンの候補を明らかにする。これらの主要アクアポリンに着目し、アクアポリンの量的変動が湿害時の吸水機能低下の要因となっているのかどうかを明らかにするため、湛水処理によって人為的に湿害を誘導したダイズを用いて、根の水透過性の低下とアクアポリン遺伝子発現量の変化の関係について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) ダイズの細胞膜型及び液胞膜型アクアポリンの遺伝子発現量解析方法の確立

Zhang ら (2013) は全66種類のアクアポリン遺伝子のうち細胞膜型として22種類、液胞膜型として23種類の遺伝子を報告した。これらに加えて、偽遺伝子として報告されている細胞膜型アクアポリンの1遺伝子について根での発現量が多いことから解析対象に追加した (*GmPIP1;9* と命名)。一方、液胞膜型アクアポリン1遺伝子 (*GmTIP2;7*) については配列の一部を欠き機能しないと考えられるため解析対象から除外した。最終的に、細胞膜型23種類、液胞膜型22種類の合計45種類のアクアポリン遺伝子をターゲットとしてプライマーを設計した。これらのアクアポリン遺伝子について、配列相同性の高いタンパク質コード領域ではなく、相同性の低い非翻訳領域 (タンパク質をコードしない領域) から遺伝子発現解析用のプライマーを作成した。ダイズは進化上の遺伝子重複により相同性の極めて高い遺伝子がペアで存在するケースが多いため、これらを区別できるようプライマーを設計した。上記プライマーを用いてダイズから抽出した cDNA を用いてリアルタイム PCR を行い、増幅効率や融解曲線の検討を行い最適なプライマーを選定した。

異なるアクアポリンの遺伝子発現量を比較するために、発現コピー数算出用検量線を作成した。増幅効率が $100 \pm 5\%$ 内である遺伝子はほぼ同じ増幅効率であると仮定し (Hachez et al. 2006)、代表となる1遺伝子に対象を絞って検量線を作成し、それを他の遺伝子のコピー数算出にも利用した。具体的には、この代表遺伝子をクローニングしてコピー数既知の標準遺伝子を作成し、その希釈系列を用いて検量線を作成した。増幅効率の異なる2種類の遺伝子については、個別に検量線を作成した。

(2) ダイズ各アクアポリン遺伝子の時期別・器官別発現パターンの解析

ポットと圃場で栽培されたダイズから生

育時期ごとに各部位をサンプリングしてアクアポリン遺伝子発現量を解析した。ポット試験用サンプルは、2011年6~10月に農研機構東北農業研究センター内の温室で栽培した品種エンレイから採取したものをを用いた。施肥条件は1ポット当たり窒素0.3g、リン1g、カリ1g、苦土石灰5gとした。V2期に葉、節、葉柄、子葉、根、R1~R2期に花の各器官、R3、R5~R8期にさやと種子を採取した。圃場試験用サンプルは、2012年5~10月に農研機構東北農業研究センター内の圃場で栽培された品種リュウホウから採取したものをを用いた。施肥条件は10アール当たり窒素3kg、リン12.5kg、カリ9kg、苦土石灰1.5kgであった。V2期に葉、節、葉柄、子葉、根、根粒、V10期に展開中の葉を除く上位3葉、根、根粒、R3、R5~R8期に種子を採取した。サンプルは採取後即座に液体窒素で凍結し、-80℃で保管した。サンプルを凍結状態で粉碎し、RNA抽出及びcDNA合成を行った後、(1)で確立した手法を用いて各アクアポリン遺伝子発現量を解析した。

(3) ダイズの根の水透過性測定手法の確立

2013~2015年に農研機構東北農業研究センター内の人工気象室(明期12時間25/暗期20)にてダイズ(エンレイ)を栽培し、V3期の個体について浸透圧(根圧)を推進力とする水透過性の測定手法について検討を行った。

(4) 湛水処理がダイズの根のアクアポリン遺伝子発現と水透過性に及ぼす影響

2016年1~2月に農研機構作物研究所内の人工気象室(明期14時間28/暗期22)にてダイズ(エンレイ)をポット栽培し、V2期に根域全体を湛水に沈めることにより湿害誘導処理を行った。対照区は土壤が乾燥しない程度に定期的にじょうろで灌水した。(2)の結果から明らかとなった湿害を受けやすい発育初期の根で多く発現するアクアポリンに焦点を絞り、根における遺伝子発現量の変化を経時的に測定した。同時に、(3)で手法を検討した根の水透過性についても測定を行い、アクアポリン発現量と根の水透過性の関係について解析した。

4. 研究成果

(1) ダイズの細胞膜型及び液胞膜型アクアポリンの遺伝子発現量解析方法の確立

全45種類のアクアポリン遺伝子のうち、ダイズのどの器官でも発現量の低い5種類の遺伝子は解析対象から除外した。残り40種類のうち2種類を除き、増幅効率が $100 \pm 5\%$ となるプライマーを作成した。これらの遺伝子の発現コピー数を算出するための検量線を作成した。

(2) ダイズ各アクアポリン遺伝子の時期別・器官別発現パターン解析

アクアポリンの種類により発現する部位が異なった。V2期の根では19のアクアポリン遺伝子が10万コピー以上(根のtotal RNA

1 μg あたり)発現していたが、このうち9遺伝子は100万コピー以上の高いレベルで発現していた(図1)。また、この9遺伝子のうち*GmPIP1;8*はほぼ根特異的に発現する遺伝子であった。ポット(エンレイ)と圃場(リュウホウ)の両サンプルにおける各アクアポリン遺伝子発現の器官特異性はほぼ同様のパターンであり、品種や栽培方法によらず、各アクアポリン遺伝子発現の器官特異性はほぼ同じパターンを示すことが明らかとなった。

なお、配列相同性が極めて高い重複遺伝子のペア(例えば*GmTIP1;7*と*GmTIP1;8*、*GmTIP2;1*と*GmTIP2;2*)については、発現の器官特異性は良く似たパターンを示したが、ペアの発現量が同レベルのタイプ(*GmTIP2;1*と*GmTIP2;2*)と、発現量が大きく異なるタイプ(*GmTIP1;7*と*GmTIP1;8*)に分かれた。この結果は、ダイズの進化上の遺伝子重複と個々の遺伝子機能の関係を考える上で興味深い。

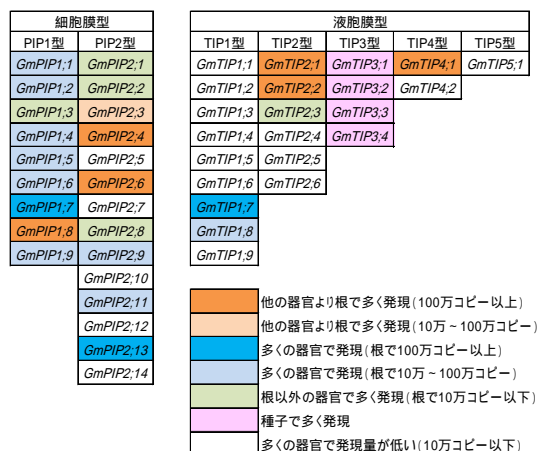


図1. ダイズ細胞膜型及び液胞膜型アクアポリンの器官別発現特性

各アクアポリンの名前はZhang et al. (2013)の命名による。

*GmPIP1;9*のみ本研究により命名した。

(3) ダイズの根の水透過性測定手法の確立

地上部切除後の出液速度や出液の浸透圧は切除5分後までは不安定であったが、その後は比較的安定していた。最初の5分間の出液は廃棄し、実験作業のしやすさを考慮して切除後5~45分までの出液を採取することとした。土壤溶液は、出液測定後の培養土を遠心することにより回収した。根の水透過性 $Lpr_{(os)}$ ($\text{m sec}^{-1} \text{MPa}^{-1}$)は次式により求めることとした。

$$Lpr_{(os)} = J_v / (\Psi_s \cdot A \cdot \Psi_s)$$

ここで、 J_v は切除後5~45分までの出液速度($\text{m}^3 \text{sec}^{-1}$)、 Ψ_s は出液と土壤溶液の浸透ポテンシャル差(MPa)、 A は根の表面積(m^2)、 Ψ_s は反射係数を示す。本実験では Ψ_s を0.4と仮定した。

(4) 湛水処理がダイズの根のアクアポリン遺伝子発現と水透過性に及ぼす影響

(3)で検討した測定手法を用いて、湛水による湿害誘導処理による水透過性の変化を測定したが、本実験では土壤溶液の浸透圧が出液の浸透圧を上回る現象が見られた。この原因は、(3)の測定手法検討の際とは異なる培養土を用いたためと考えられたが、現在検討を行っている。そこで本実験では、水透過性の指標として根表面積当たりの出液速度 J_v / A (m sec^{-1})を求めることとした。湛水処理 26~50 時間後に処理区の出液速度が対照区の半以下に低下したが、処理 98 時間後には湛水処理区で回復が見られた(図2)。根における9つの主要なアクアポリンについて、その全ての遺伝子発現量は処理 50 時間後に湛水処理区が対照区の 50~73%程度まで低下し、処理 98 時間後でも回復しなかった(図3)。このことから、湛水処理に伴う根全体のアクアポリン発現量の低下が吸水機能低下の一因として関わっている可能性が示唆された。Matsuoら(2012)は、水耕栽培したダイズの根に窒素を通気することにより低酸素処理を行い、処理数時間後から4種類のアクアポリン遺伝子発現量が対照区より低く推移することを報告している。ダイズには66種類のアクアポリン遺伝子が存在するが、本研究では細胞膜型及び液胞膜型の全アクアポリン遺伝子を網羅的に解析し、根からの吸水に最も貢献すると考えられるアクアポリンに着目した上で、湛水処理による吸水機能低下と遺伝子発現量の関係を定量的に明らかにした初めての成果である。湛水処理がアクアポリン遺伝子発現量を低下させる具体的な機構については、今後さらに検討を進める必要がある。

湛水処理によるアクアポリンの活性レベルでの機能低下については今回の実験からは明らかにできなかった。シロイヌナズナのアクアポリンでは、タンパク構造内にあるヒスチジン残基が pH センサとして機能し、酸素不足に伴う細胞質酸性化によりアクアポリンの立体構造を変化させる、すなわちゲートを閉鎖させる可能性が報告されている(Tournaire-Roux et al. 2003)。ダイズの細胞膜型アクアポリンの全てにおいてこのヒスチジン残基が保存されていたことから、ダイズにおいてもシロイヌナズナと同様に酸素不足によりアクアポリンのゲートが閉鎖する活性レベルでの機能低下が起こっている可能性が高く、本研究で明らかとなった発現量の低下とともに根の吸水機能低下の要因になっていると考えられる。

98 時間以上の湛水処理による出液速度の回復はアクアポリン発現量とは相関がなかったことから、吸水機能の回復にはアクアポリンの量的回復ではなく、活性レベルでの機能回復が関わっているものと推察された。処理 98 時間後の湛水処理区個体では、対照区個体や処理 50 時間後の個体と比較して、胚軸上の亀裂や不定根の伸長が多数観察されたことから、二次通気組織の形成等の形態的

な変化が地上部からの酸素供給を促し吸水機能の回復をもたらした可能性が考えられる。一方、二次通気組織が十分に発達し地下部に十分な酸素を供給するためには数日~数週間を要するという報告もあることから(Shimamura et al. 2003)、今回観察された98 時間程度の比較的短時間での根の吸水機能の回復についてどのような機構がはたしているのか、耐湿性品種の開発という観点からも興味深い。

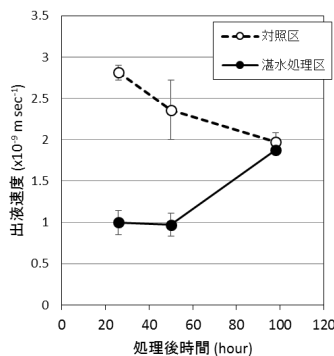


図2. 湛水による湿害誘導処理が出液速度に及ぼす影響

エラーバーは標準誤差 (n=5) を示す。

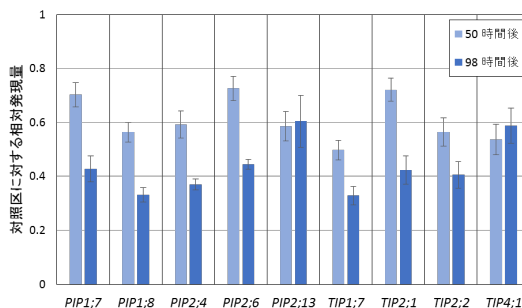


図3. 湛水による湿害誘導処理が根の主要なアクアポリン遺伝子発現量に及ぼす影響

縦軸は対照区を1とした場合の各遺伝子の相対発現量を示す。エラーバーは標準誤差 (n=4) を示す。

< 引用文献 >

- Bacanawmo et al. (1999). Soybean root morphological and anatomical traits associated with acclimation to flooding. *Crop Sci.* 39: 143-149
- Chaumont et al. (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.* 125: 1206-1215
- Hachez et al. (2006) Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Mol Biol.* 62: 305-323
- Johanson et al. (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol.* 126: 1358-1369
- Kramer and Boyer (1995) Water relations of

plants and soils. Academic Press, San Diego, CA

Matsuo et al. (2012) Identification of putative aquaporin genes and their expression analysis under hypoxic conditions in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Prod. Sci.* 15: 278-283

Maurel et al. (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 595-624

Sakurai et al. (2005) Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol.* 46(9): 1568-1577

Shimamura et al. (2003) Formation and function of secondary aerenchyma in hypocotyl, roots and nodules of soybean (*Glycine max*) under flooded conditions. *Plant and Soil* 251: 351-359

Tournaire-Roux et al. (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425: 393-397

Zhang et al. (2012) Genome-wide sequence characterization and expression analysis of major intrinsic proteins in soybean (*Glycine max* L.). *Plos One* 8(2): e56312

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1件)

石川(櫻井)淳子、林秀洋、松尾直樹、実山豊、ダイズの細胞膜型及び液胞膜型アポリン遺伝子の器官別発現特性、日本作物学会第236回講演会(2013年9月10~11日)、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島市)、講演要旨集 p334-335

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 淳子 (ISHIKAWA, Junko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター稲研究領域・主任研究員

研究者番号：40343959

(2)研究分担者

村井 麻理 (MURAI, Mari)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター生産環境研究領域・上級研究員

研究者番号：00343971

(3)連携研究者

松尾 直樹 (MATSUO, Naoki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター水田作研究領域・主任研究員

研究者番号：40579992

実山 豊 (JITSUYAMA, Yutaka)

北海道大学 大学院農学研究院・講師

研究者番号：90322841