

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840103

研究課題名(和文)スベリン合成制御因子を利用したカスパリー線機能強化植物の作出

研究課題名(英文)Improvement of Casparian strip and endodermal functions by regulators for suberin accumulation

研究代表者

大島 良美(Oshima, Yoshimi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号：00722951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：根の内皮に形成される疎水性構造であるスベリン層とカスパリー線は水分や養分、酸素の移動を制限している。本研究ではこれらの疎水性構造の形成制御因子を同定し、それを用いたストレス耐性付与を目指した。転写因子の機能欠損の表現型を誘導し観察した結果、スベリン層またはカスパリー線の形成が異常になる転写因子を複数同定した。そのうちの一つは塩耐性に関与すること、種子の高温多湿環境下での劣化耐性に関与することを明らかにした。これらの成果は疎水性構造を利用した新たな生物または非生物ストレス耐性付与技術の開発につなげていく。

研究成果の概要(英文)：Root endodermis is covered by suberin lamellae and Casparian strip to limit movement of water, nutrients, and oxygen between inside and outside of root. In this study, we attempt to identify novel regulators for suberin accumulation and to produce stress tolerant plant by them. We screened transcription factors responsible for suberin or Casparian strip formation by inducing dominant negative phenotype. One of identified transcription factors was demonstrated to be involved in salinity tolerance and seed viability under high humidity and temperature. These results shed light on the development of novel technology conferring biotic and abiotic stress tolerance.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：根 スベリン カスパリー線 転写因子 塩ストレス 種子

1. 研究開始当初の背景

(1) スベリン層とカスパリー線は根が水分や養分を選択的に取り込む機能と根のストレス耐性に欠かせない構造である。カスパリー線は内皮の細胞間に形成される帯状構造であり、リグニンまたは脂質性のポリエステルモノマーであるスベリンを主成分とする。内皮の細胞壁の内側にはラメラ状にスベリンが蓄積し、スベリン層を形成する。これらの合成酵素に関してはいくつかの知見があるが、転写制御に関しては全く研究が進んでいない。ストレス耐性との因果関係など基本的な生理機能がはっきり証明されていない。

(2) 研究代表者はこれまでにクチクラの形成を制御する転写因子を同定した (Oshima et al. 2013 Plant Cell 25:1609; Oshima et al. 2013 Plant Sig. Behav.)。クチクラとスベリンは類似の脂質性ポリエステルとワックスで構成されていることから、蓄積機構に共通点があると考えられたが、同定した MIXTA 様転写因子はスベリン合成組織では発現していなかった。一方で、MIXTA 様転写因子と近縁に LMI2 が存在し、根で発現していることを示したが、LMI2 は花芽の発生運命決定を制御する因子として報告されており、スベリンやクチクラとの関連は知られていなかった (Pastore et al. 2011 Development 138:3189)。そこで、LMI2 に強力な転写抑制ドメイン (SRDX) を融合したキメラリプレッサーをシロイヌナズナで発現させ、機能欠損の表現型を誘導した (CRES-T 法)。恒常的な発現では全身でクチクラ欠損の表現型を示した。さらに、LMI2 本来のプロモーター下で発現させた根のフルオロルイエロー染色の結果、スベリン蓄積が減少していることが明らかになった。

2. 研究の目的

(1) スベリン層やカスパリー線の形成を制御する転写因子を同定することにより、どのような組織発達過程またはストレス応答下でこれらの形成が誘導されるのかを明らかにし、基本的な生理機能の解明につながる知見を得る。転写因子を利用することにより、複雑な構造をつくるために必要な各種酵素を同時に制御可能であり、機能的なスベリン層およびカスパリー線の全体的な強化方法の開発を目指す。スベリン層及びカスパリー線を厚くすることで、植物に乾燥、塩、重金属の他さまざまなストレス耐性を付与できると期待される。

3. 研究の方法

(1) LMI2 が根のスベリン形成をどのように制御するかを明らかにするため、シロイヌナズナの変異体、キメラリプレッサー発現植物、過剰発現植物を用いてスベリンの分析や遺伝子発現解析、塩などのストレス耐性試験を行う。特に、スベリンの分析は現在国内で行

われていないため、分析方法を確立する。

(2) 転写因子ライブラリの中からスベリン層またはカスパリー線形成に関与する新規制御因子の同定を目指す。これまでにスベリン欠損植物 (CASP1pro:CDEF1) の側根は給水後 10 日目までは減少すること、側根原基が内皮、皮層、表皮を突き破れず変形することを見出した (未発表データ)。この知見に基づき、CRES-T ライブラリから側根の伸長と形状を指標に転写因子をスクリーニングし、スベリンに関与するかどうか調べる。カスパリー線に関しては、カスパリアンドメインの局在化因子を可視化した植物 (Lee et al. 2013 Cell 153:402) に内皮で発現する転写因子のキメラリプレッサーを導入し、カスパリー線形成に影響を与える転写因子を同定する。

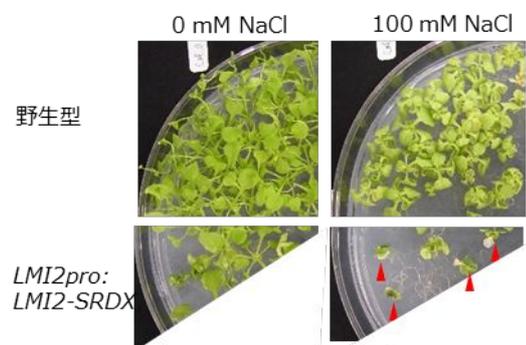
(3) 同定した転写因子について、変異体等を用いてスベリンまたはリグニン分析、遺伝子発現解析などを行い、有望な因子を絞り込む。それについて、実用植物のストレス耐性に関与するか検証する。

4. 研究成果

(1) LMI2 のスベリン形成における機能解析

LMI2pro:LMI2-SRDX 発現シロイヌナズナの根のスベリン蓄積量が減少していたことからスベリンによるストレス耐性に影響があるかどうか解析した。スベリンは塩耐性品種に多く蓄積すること、感受性品種と比較してナトリウムイオン取り込み量が少ないことが報告されている (Krishnamurthy et al. 2009 Planta 230:119)。そこで、NaCl を含む培地上での生育を比較したところ、*LMI2pro:LMI2-SRDX* 植物は野生型よりも生育障害が強く、一部の葉が枯れた (図 1)。従って、LMI2 の機能抑制は根から吸収される NaCl への耐性を低下させることがわかった。今後は根特異的に LMI2 の機能を抑制または強化した植物を作成・解析することにより、スベリン層形成と塩耐性等の関係を明らかにすることができると思われる。

図 1. *LMI2pro:LMI2-SRDX* の塩耐性試験

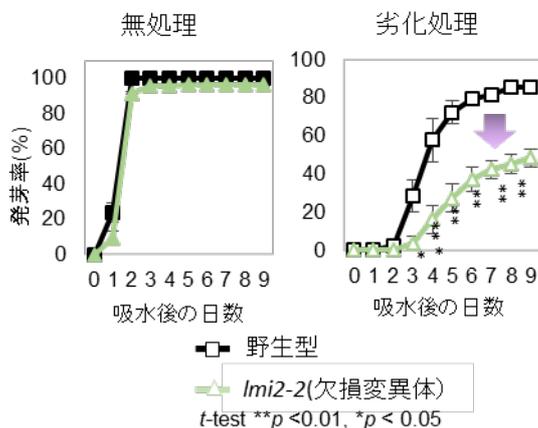


LMI2pro:LMI2-SRDX の根のスベリン含量を分析する場合、地上部のクチクラ欠損が原因

で種子の減少や発芽率の低下が起こるため、容易にサンプル量を確保できない。そこで、スベリン含量測定系を立ち上げるために、表現型が弱い *lmi2-2* 変異体を使用した。*lmi2-2* は側根の伸長抑制は見られるが、根のスベリン染色では *LMI2pro:LMI2-SRDX* ほどはっきりした減少が見られず、根では機能重複した転写因子が存在することが示唆された。一方で、公共のマイクロアレイの結果から、*LMI2* は種皮で発現していることが示唆されていた。種皮はスベリンを蓄積しており、水分透過を制限し胚を守る機能に重要である。そこで、*lmi2-2* 種子から脂質性ポリエステル抽出を試みた。種皮にはスベリン以外にクチンも含まれており、分離できないため総ポリエステルを抽出し、脱ポリエステル化後 GC-MS により単量体の組成と相対量を分析した（埼玉大・石川寿樹助教との共同研究）。その結果、*lmi2-2* では野生型と比較してポリエステルモノマー組成が変化していることが明らかになった。根など他の組織で報告されているスベリンには C20-24 程度のクチンより長鎖長のモノマーが含まれることが報告されており、*lmi2-2* 種子においてこれらが変化していたことから、スベリンの変化が示唆された。

スベリン合成酵素の変異体種子は種皮の水分透過性が向上することが報告されている（Molina et al. 2008 Plant J. 53:437）。保存中の種子の生存において湿度が悪化要因であることが知られている。そこで、*lmi2-2* のスベリンの機能に異常があるかどうかを種子の人工的な劣化試験により調べた。40 相対湿度 100% で 3 日間処理し、発芽率を調べた結果、野生型と比べて発芽率の低下が著しいことがわかった。従って、*LMI2* は種子の発芽能維持に重要であることが明らかになった（図 2、論文投稿中）。

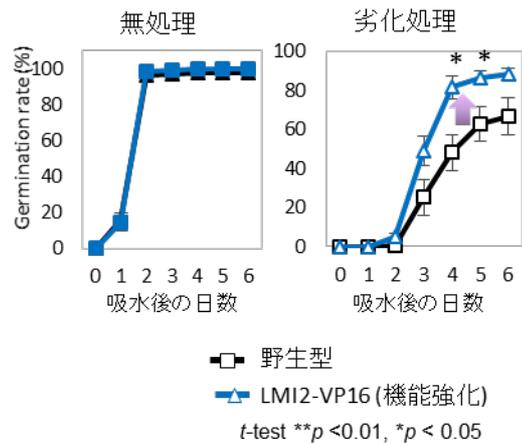
図 2. *lmi2-2* 種子の人工的な劣化（保存性）試験後の発芽率



さらに、種皮で発現する MIXTA 様転写因子も種子の保存性に関与するかどうか調べるため、*lmi2-2* との二重変異体の種子劣化試験を行った。その結果、*LMI2* 単独の変異より発芽

率が低下した（未発表データ）。逆に、*LMI2* に強力な転写活性化ドメイン VP16 を融合して種皮で発現させたところ劣化処理耐性が向上した（図 3、論文投稿中）。よって、*LMI2* は高温多湿におけるストレス耐性を付与できることが明らかになった。

図 3. *LMI2-VP16* 種子の人工的な劣化（保存性）試験後の発芽率



lmi2-2 のポリエステルの異常はスベリンの変化を示唆しているものの、クチンも変化している可能性がある。そこで、種子発芽過程における遺伝子発現解析を行った。その結果、表面クチクラ関連のクチン合成酵素は低下しているものの、種皮内側のクチン及びスベリン層に関する遺伝子発現は低下していなかった。さらに、種皮を電子顕微鏡観察したところ、*lmi2-2* では表面クチクラが薄く、*LMI2pro:LMI2-VP16X* では厚くなっていた。つまり、*LMI2* は主に表面クチクラの形成を制御しており、その他のクチンやスベリンは間接的な影響を受けていることが示唆された（論文投稿中）。予期していなかった結果であるが、本研究により種皮クチクラが種子の発芽能維持に重要であることが明らかになった。このことは、クチクラの新たな生理機能を明らかにし、クチクラが種子品質改善のための新たな分子育種ターゲットとなることが期待される。今後は、根における *LMI2* の機能解析を進めることにより根のストレス耐性を付与できるかを明らかにする。

(2) 新規スベリン層またはカスパー線形成制御因子の探索

エフェクターレポーターアッセイなどにより、*LMI2* は下流遺伝子のプロモーターを制御する際に、パートナーとなる因子が必要であることが示唆された（未発表データ）。そこで、*LMI2* と結合し、根で機能する転写因子を探索するため、酵母 2 ハイブリッドスクリーニングを行った。*LMI2* 全長をベイトに転写因子のみを含むライブラリに対してスクリーニングを行った結果、7 転写因子を同定した（産業技術総合研究所 光田主任研究員と

の共同研究) 種子形成や側生器官の形成に関与することが知られている転写因子が含まれていた。この中に、根で発現するが根での機能が知られていない転写因子も含まれていた。今後、根のスベリン形成に LMI2 と強調して働いているかを解析する。

これまでに、我々がスベリン減少により側根の伸長が妨げられることを明らかにしたのと反対に、Lucas et al. (2013 PNAS 110:5229)はカスパリー線の異所的形成やスベリンの増加でも同様の表現型を示すことを報告した。つまり、スベリン層とカスパリー線の制御因子のスクリーニングは共に側根の伸長を指標に行うことができる。そこで、スクリーニング方法は側根伸長に絞った。CRES-T ラインの発芽後 10 日目の側根数を数え、0~1 本の個体について顕微鏡観察を行い、側根原基が変形している個体を同定した。その結果、側根伸長の異常を誘導した 15 転写因子を同定した。その中から、カスパリー線に関与する可能性があるリグニン関係の転写因子や、CRES-T ラインのスベリン蓄積が減少する転写因子、スベリン合成酵素遺伝子の発現が低下する MIXTA 様転写因子を同定した。これらの機能強化型を発現する植物を作成した(雑誌論文 1)。今後、転写因子の機能解析やストレス耐性試験等を進めることによりスベリン層やカスパリー線の形成に関与するかどうか、機能増強に応用可能かどうかを明らかにする。研究期間中に MYB36 がカスパリー線形成を、MYB107 と MYB9 が種子のスベリン層形成を制御することが報告された(Kamiya et al. 2015 PNAS 112:10533, Guo et al. 2016 Plant Physiol. 173:1045)。しかし、根のスベリン層形成に関与する転写因子は見つかっていない。本研究で同定した転写因子の内皮での機能が明らかになれば、脂質性バリアの形成機構解明、及び機能の増強による新規ストレス耐性付与技術の開発につながると期待される。

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 1 件)

大島 良美、光田 展隆、Enhanced cuticle accumulation by employing MIXTA-like transcription factors、Plant Biotechnology、査読有、33 巻、2016、161-168 DOI:<http://doi.org/10.5511/plantbiotechology.16.0627a>

[学会発表](計 9 件)

大島 良美 他、Modification of seed coat based on tissue specific cuticle regulation、第 58 回日本植物生理学会、2017 年 3 月 15 日、鹿児島大学、鹿児島県鹿児島市

大島 良美 他、組織特異的なクチクラ形成制御と種子の保存性、第 29 回植物脂質シンポジウム、2016 年 11 月 25 日、大阪大学、大阪府豊中市

大島 良美 他、種子の保存性維持に対するクチクラの役割、題 34 回日本植物細胞分子生物学会、2016 年 9 月 1 日、信州大学、長野県上田市

大島 良美 他、LATE MERISTEM IDENTITY2 は種子表面のクチクラ形成と種子保存性を制御する、題 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日、岩手大学、岩手県盛岡市

大島 良美 他、植物クチクラ形成を制御する転写因子の機能解析とその応用、第 15 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、2016 年 2 月 2 日、産業技術総合研究所、茨城県つくば市

大島 良美 他、種皮のクチクラ形成を制御する転写因子の機能解析、第 28 回植物脂質シンポジウム、2015 年 9 月 10 日、上智大学、東京都千代田区

大島 良美 他、花芽発生を制御する転写因子 LATE MERISTEM IDENTITY 2 のクチクラ形成における機能、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 17 日、東京農業大学、東京都世田谷区

大島 良美 他、種子のクチクラ形成における LATE MERISTEM IDENTITY 2 転写因子の機能、第 27 回植物脂質シンポジウム、2014 年 11 月 29 日、静岡県産学交流センター、静岡県静岡市

大島 良美 他、花芽発生を制御する転写因子 LMI2 は種子のクチクラ形成を制御する、第 32 回日本植物細胞分子生物学会、2014 年 8 月 22 日、アイーナ、岩手県盛岡市

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 種子の劣化を抑制する方法

発明者: 大島良美、光田展隆

権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2016-047311, PCT/JP2017/009516(WIPO)

出願年月日: 平成 28 年 3 月 10 日, 平成 29 年 3 月 9 日

国内外の別: 国内, 外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 良美 (OSHIMA, Yoshimi)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号: 00722951