

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 23 日現在

機関番号：12102
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22570034
 研究課題名（和文） 落葉性木本植物の根の機能の年間リズムを制御する環境要因と内的要因の解明
 研究課題名（英文） Studies on the environmental and endogenous factors which control the annual rhythm of root functions in deciduous tree
 研究代表者
 佐藤 忍 (SATO Shinobu)
 筑波大学・生命環境系・教授
 研究者番号：70196236

研究成果の概要（和文）：

落葉性木本植物のポプラにおいて、導管液に含まれる K や Ca、グルコースやタンパク質の濃度に年周期性が示されたことから、日本自生のポプラであるドロノキを用い導管液成分に関わる遺伝子の根における発現解析を行った。既知の K 輸送体と相同である *PmGORK-like1* は根において短日処理開始以降恒常的に発現していたが、Ca 輸送体の相同遺伝子である *PmACA-like1* や導管液タンパク質の相同遺伝子 (*PmXSP24*, *PmXSP25*) は短日処理により誘導され、低温によりさらに強く発現した。一方、長日環境にある植物へ ABA 添加や低温処理を行ったところ、*PmGORK-like1* のみが根において顕著に誘導された。

研究成果の概要（英文）：

Since the concentrations of K, Ca, glucose and protein have been shown to annually fluctuate in xylem sap of poplar, a deciduous tree, analysis of the expression of genes related to xylem sap substances was performed in root of *Populus maximowiczii*, a native poplar in Japan. The homologous gene of K transporter, *PmGORK-like1*, was expressed constitutively after short day treatment, but the homologous genes for Ca transporter, *PmACA-like1*, and xylem sap proteins, *PmXSP24* and *PmXSP25* were induced by short day treatment and more strongly induced by following low temperature treatment. On the other hand, when the plant grown in long day condition was treated with ABA or low temperature, only *PmGORK-like1* was strongly induced in root.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子・生理科学

キーワード：ポプラ、根、冬、導管液、カルシウム、カリウム、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

四季の季節変化がある温帯地域に生育す

る多年生植物は、来るべき環境変化に備えて体の形や機能を前もって変化させ、環境に適

応している。中でも落葉性の木本植物は、晩夏～秋において、短日や低温を感知して、茎葉の生長を停止して休眠芽を形成する。また、冬の間、一定期間以上の低温にさらされることで、休眠が解除され、春の気温上昇とともに、芽の生長を開始する。このような木本植物の年間に於ける生育リズムと環境要因との関わりや、植物体内で生じる生理応答を解明することは、陸上植物の生活史を理解する上で欠かすことができない。

しかし、このような研究は、樹木という研究材料の扱いにくさと研究情報の不足から、なかなか進展していなかったが、2006年に木本植物のモデル植物であるポプラ (*Populus trichocarpa*) の全ゲノム塩基配列が明らかにされ (G. A. Tuskan et al. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa*. Science 2006)、木本植物の分子生物学研究に新たな時代が切り開かれた。ポプラはパルプ原料などのバイオマスとしても世界的に重要な植物種であるが、休眠芽の形成が短日条件で誘導され、その休眠が一ヶ月程度の低温で解除されること、その際、アブシジン酸とジベレリンが内的な因子として重要であること、さらに、ポプラの花成誘導因子 FT が休眠芽形成の負の要因として働くことが近年明らかにされるなど、芽の休眠と解除に関して最も情報が蓄積している点で、木本植物の休眠研究の材料として最適である (H. Bohlenius et al. CO/FT Regulatory Module Controls Timing of Flowering and Seasonal Growth Cessation in Trees. Science 2006)。

しかし、これらの研究は、目に触れやすい植物体の地上部に注目したものがほとんどであり、地下に存在する根が、水や栄養塩類の吸収などの重要な働きをしているにもかかわらず、ほとんど注目されてこなかった。落葉樹の根は、春に休眠芽が生長を開始するのに先立って、冬の終わりから早春に活動を開始し、土壌中の栄養塩類を吸収し、樹体内に蓄積していた貯蔵多糖を移動体の単糖や少糖に分解し、導管流に載せて地上部に供給することによって、萌芽の駆動力を与える重要な役割を担っている。また、芽が休眠芽を形成して成長を停止する晩夏を過ぎても秋口まで根が生長を続けることも報告されており、芽と根がそれぞれ異なる生長と機能の年間リズムを有し、それぞれ異なる環境要因からのシグナルを受けていることが考えられる。

申請者らはこれまで、根が産生して地上部に供給する導管液に含まれるタンパク質や糖質に関する研究を、導管液が多量に得られるカボチャやキュウリなどのウリ科植物をはじめ、シロイヌナズナやブロッコリーなどのアブラナ科植物、枝の切り口から早春に多量の導管液が分泌されるブドウ (メルシャン

株式会社との共同研究) を用いて行なってきた (S. Satoh Organic substances in xylem sap delivered to aboveground organs by the roots. J. Plant Research 2006)。その過程で、根で生産される有機物質が根の根毛帯の中心柱の細胞で主に合成されること、それらのうちある種のタンパク質の遺伝子発現が、概日時計によって制御を受けて夕方～夜にかけて発現し、子葉や葉で作られるジベレリンによって正に制御されることを見いだした (A. Oda, C. Sakuta, S. Masuda, T. Mizoguchi, H. Kamada and S. Satoh Possible involvement of leaf gibberellins in the clock-controlled expression of XSP30, a gene encoding a xylem sap lectin, in cucumber roots. Plant Physiol. 2003)。

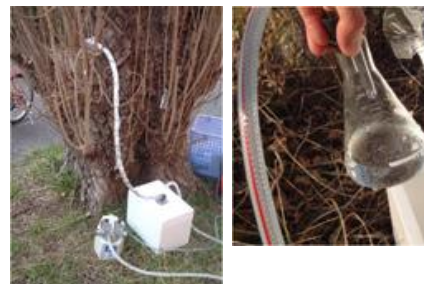
また、早春に得られるブドウの導管液 (ブドウ樹液と呼ばれる) には、アラビノガラクトナンタンパク質が多量に含まれており、その含量が特に出液初期に多いことを見いだした。これらの事実は、根の機能が、光や温度のような環境要因や地上部器官からの因子によって制御されていることを示しており、植物個体全体の生理メカニズムの理解に極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、まず野外環境下で生育しているポプラを用い、導管液成分と根の生長と機能に関わる遺伝子の発現を年間を通して調査する。そのデータを基盤にして、さらに実験室内での環境制御下において、植物ホルモン (特に ABA とジベレリン) やその合成阻害剤を投与することで、ポプラの根の機能の年間リズムを制御する内的/外的要因の解明を目指す。また、冬期の導管液に多く含まれる新規導管液タンパク質 (XSP25: 先行研究で ABA により誘導されることが判明している) の機能解明を目指す。

野外生育植物の解析

①屋外の自然条件下で生育するポプラから導管液を二年間に渡って採取し、無機/有機成分/ホルモンの変動を解析するとともに、年間を通して採取した根から RNA を調製し、生長や導管液成分に関わる各種遺伝子の発現変動を明らかにする。



②ポプラの導管液に最もメジャーに含まれる 25 kDa および 24kDa のタンパク質 (XSP25, XSP24) の遺伝子を質量分析により同定し、その遺伝子発現の年間リズムを明らかにする。

人工環境下における外的／内的要因の解析

①ポプラの水耕栽培系において、人工的に日長や温度などの環境要因を変化させることにより、年間生育リズムのモデル系を確立する。

②根の生長に関わる遺伝子 (サイクリン) と、根の機能に関わる遺伝子 (アクアポリン、アンモニアトランスポーター、導管液タンパク質 XSP25, XSP24) の発現変動を、RT-PCR 法を用いて明らかにする。

③ジベレリン合成阻害剤 (パクロブトラゾール) やアブシジン酸合成阻害剤 (アバミン) を地上部および根に投与し、根の機能に関わる遺伝子の発現とこれらのホルモンの関わりを明らかにするとともに、これらのホルモンの合成酵素遺伝子の発現解析により、根の機能の年間リズム形成におけるこれらホルモンの役割を解明する。

3. 研究の方法

本研究では、まず野外環境下で生育しているポプラを用い、導管液成分と根の生長と機能に関わる遺伝子の年間を通しての発現を調査する。また、冬期の導管液にメジャーに含まれるタンパク質 XSP25, XSP24 の遺伝子を同定し、その発現に対するホルモンの効果を明らかにする。それらのデータを基盤に、さらに実験室内の環境制御下において、植物ホルモン (特に ABA とジベレリン) の合成を薬剤投与によって制御することで、ポプラの根の機能および遺伝子発現を制御する内的／外的要因を解明する。

野外生育植物の解析

①筑波大学内に植栽されているポプラ (*P. nigra* var. *italica*) の枝の切り口に真空ポンプを繋ぎ、 -0.08 MPa で一定時間吸引して導管液を二年間に渡って採取し、根で吸収生産された無機／有機成分の変動を調査する。
(根の生長は地上部の生育が盛んになる6月頃から活発になることが知られているが、先行研究において、導管液にはグルタミンやグルコースおよび K や Ca が、地上部が芽吹く前の早春 (2~3月) に豊富に存在していた。さらに、導管液のホルモノーム解析 (理研 PSC、榊原博士との共同研究) の結果、アブシジン酸 (ABA) やサイトカイニン (tZR) も、早春の導管液に最も多く含まれており、特に ABA は驚くべきことにホルモンの中で最も多く (20 nM) 含まれていた。一方、導管液に含まれるタンパク質は他の成分に先がけて冬期から

(12~3月) 導管液に豊富に存在していた。このように導管液成分のピーク時期は成分により異なっていた。)

	落葉期 12月~	開芽前/後 2月~	成長期 6月~
根の成長	不活性	不活性	細胞の分裂伸長が盛ん
導管液成分	タンパク質に富む	ミネラル、グルコース、グルタミン、ABA、tZR に富む	乏しい
根での遺伝子発現	導管液タンパク質 (XSP25) の発現が高い	細胞膜アクアポリン (PIP)、ABA 合成酵素 (NCED) の発現が高い	cyclin B の発現が高い

②屋外の自然条件下において栽培したポプラ (*P. maximowiczii*: ドロノキ) の根を年間を通して採取し、根における生長 (細胞分裂) および導管液成分やホルモンに関わる各種遺伝子の発現を調べる。(先行研究において、細胞分裂のマーカーであるサイクリン B (CYCB) の発現は、根の生長の盛んな6月にピークを示したが、水輸送に必要な細胞膜アクアポリン (PIP) と、ABA 合成の鍵酵素である 9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase (NCED) は、それに先立つ早春にピークを示した。)

③ポプラの導管液に最も多く含まれる 25 kDa、24 kDa のタンパク質 (XSP25, XSP24) を質量分析計を用いて解析し、遺伝子を同定するとともにその発現の年間変動を調査する (名古屋大学、森博士との共同研究)。(先行研究において、両者はタバコ BY-2 培養細胞やコムギで ABA 誘導性の機能未知タンパク質 (PR protein) として記載されている BSP (basic secretory protein) および Cupin ファミリー遺伝子と高い相同性を有していることが判明した。)

人工環境下における外的／内的要因の解析

①国立科学博物館つくば実験植物園から譲り受けたドロノキ (*Populus maximowiczii*: 登録番号 TBG10713) の枝を挿し木してクローン増殖させた植物材料を用いる。ドロノキは

ゲノム解読のなされた *P. trichocarpa* と同じ節に属して極めて近縁であり、遺伝子の塩基配列も酷似している。また、活発に成長している若い緑枝を水にさすことにより容易に不定根形成を誘導できることから、年間を通して実験室内でクローン増殖することが可能である。

②根の成長や遺伝子発現をモニターするため、水耕栽培系を確立する。通常の水耕栽培は、根のエアレーションのためにバブリングなどを必要とするため、根の連続観察には適さないが、ドロノキは湿地を好むため、深さ 3 cm 程度のプラスチックボックスに紛状ハイポネックスを 1000 倍希釈した水耕液を満たすことで根を広げて栽培することができる。



③長日条件 (16 時間明期/8 時間暗期 : 16hL/8hD、28°C) で栽培している水耕栽培植物を、短日条件 (8hL/16hD、28°C) に 8 週間置くことにより休眠芽形成を誘導する。次に、低温条件 (連続暗、4°C) に 6 週間置くことで休眠解除を行ない、さらに長日条件に移すことで成長を開始させる。

④この間、芽と根の成長を定期的に写真撮影することによりモニターしながら、根と芽を 2 週間に一回サンプリングし、以下の遺伝子の発現を RT-PCR 法で定量する。

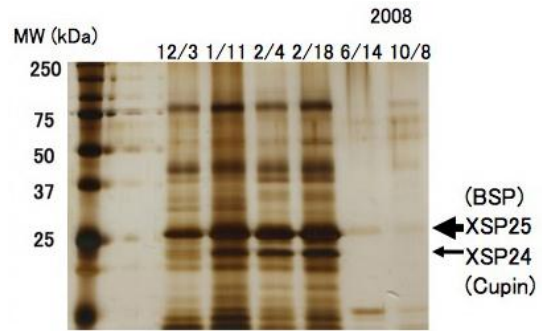
⑤根とシュートを別々に低温処理するとともに、ジベレリン合成阻害剤 (パクロブトラゾール) やアブシジン酸合成阻害剤 (アバミン) を地上部および根に投与し、根と芽の休眠と解除および遺伝子発現を解析する。

4. 研究成果

野外栽培ポプラの根における遺伝子発現

① 導管液に含まれる有機物質の生産に関わる遺伝子の同定と発現解析

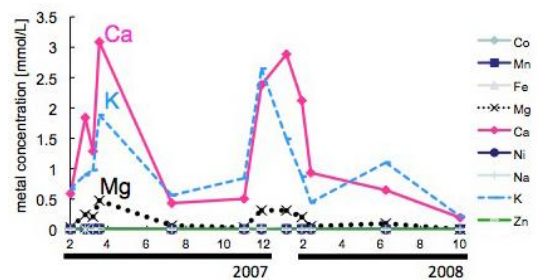
ポプラの導管液に最も多く含まれる 25 kDa および 24 kDa のタンパク質 (XSP25, XSP24) を質量分析計を用いて解析し (名古屋大学、森博士との共同研究)、遺伝子を同定するとともにその発現の年間変動を調査した。



その結果、XSP25 はタバコ BY-2 培養細胞やコムギで ABA 誘導性の機能未知タンパク質 (PR protein) として記載されている BSP (Basic Secretory Protein) と高い相同性を有しており、その根における遺伝子発現は冬期 (12~2 月) に高く、9 月の植物の根に 10^{-5} M ABA を投与すると発現が強く誘導されることが判明した (Plant Root 2011)。また XSP24 は機能未知の Cupin family に属していた。さらにグルコースの産生に関わる細胞壁インベルターゼ (INV-like1) の遺伝子も同定した。ABA 合成の鍵酵素である 9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase (NCED-like1) は、それに先立つ早春にピークを示した。なお細胞分裂のマーカーであるサイクリン B (CYCB) の発現は、根の生長の盛んな 6 月にピークを示した。

② 導管液に含まれる無機成分の輸送に関わる遺伝子の同定と発現解析

休眠時期に導管液中のカルシウムおよびカリウムの濃度が上昇したことから、野外のドロノキの葉に含まれる無機元素を定量したところ、休眠芽形成後にカルシウム濃度の急激な上昇がみられ、導管液カルシウムの低温耐性への関与が注目された (Plant Root 2012)。



そこで導管液中に無機元素をローディングする機構として、細胞外排出型かつ維管束周辺での発現が示唆されている輸送体に着目し、シロイヌナズナのカルシウム輸送体 *ACA8* およびカリウム輸送体 *GORK* のポプラ相同遺伝子を同定し、*ACA-like1* と *GORK-like1* と命名した。野外のドロノキの根を用いて遺伝子発現解析を行ったところ、両遺伝子とも

休眠時期である秋から春の間に発現が誘導され、導管液中のカルシウム、カリウムの濃度上昇と強い相関を示すことが明らかとなった。

また先行研究において一定の吸引力で採取される導管液の量にも年周期性があったことから、根の水コンダクタンスの制御に関与するアクアポリンについても発現解析を行った。細根で強く発現するポプラ *PIP2.2* 遺伝子のドロノキにおける相同遺伝子の発現は、冬季の12~2月では低く、4月以降に上昇することが示された。*PIP* の発現は内生のABAにより誘導されることが知られており、この時期に導管液中のABA濃度の上昇も見られることから、根で生産されたABAによって、地上部への水輸送機構が活性化されていることが示唆された。またこの活性化は *CYCB* に代表される根の成長(6月)よりも先に起こっており、根の機能が適切な時期に活発化することで地上部の成長が支えられていることが示された。

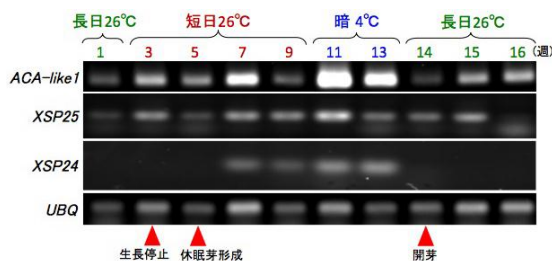
制御環境下における遺伝子発現

①長日条件(16時間明期/8時間暗期: 16hL/8hD、28°C)で栽培している植物を、短日条件(8hL/16hD、28°C)に8週間置くことにより休眠芽形成を誘導した。次に、低温条件(8hL/16hD、4°C)に6週間置くことで休眠解除を行ない、さらに長日条件に移すことで成長を開始させた。

②この間、芽と根の成長を定期的にモニターしながら、根と芽を2週間に一回サンプリングし、以下の遺伝子の発現をRT-PCR法で定量した。

その結果K輸送体の相同遺伝子である *PmGORK-like1* は地上部において短日処理後から低温期まで発現が誘導され、根では短日処理開始以降恒常的に発現していた。一方、Ca輸送体の相同遺伝子である *PmACA-like1* は地上部、根共に短日処理により誘導され、低温によりさらに強く発現した。

またポプラで同定された導管液タンパク質の相同遺伝子(*PmXSP24*, *PmXSP25*)の発現も短日と低温により誘導されていた。



長日環境にある成長中の植物へのABA添加や低温処理によりこれらの遺伝子の発現制御機構の解析を行ったところ、それぞれの処

理により地上部においては *PmACA-like1* が、根においては *PmGORK-like1* が顕著に誘導されており、地上部と根では応答が異なることが示された。

また、ゲノム解読が終わっているトリコルバを寒天培地を用いて透明ポット中で無菌的に栽培し、上記と同様の処理によって休眠芽の形成と休眠解除が起こるかどうかを検証するとともに、その際、根の成長にどのような変化が生じるか、ポットの底面から写真を撮影して調べた。その結果、無菌ポット中でも休眠芽の形成と休眠解除が正常に起こること、根の成長は休眠芽が形成されても継続し、低温に移すと止まることが判明した。

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3件)

- 1) J. Furukawa, M. Kanazawa, S. Satoh Dormancy-induced temporal up-regulation of root activity in calcium translocation to shoot in *Populus maximowiczii*. *Plant Root* 6: 10-18 (2012) 査読有
doi:10.3117/plantroot.6.10
- 2) J. Furukawa, Y. Abe, H. Mizuno, K. Matsuki, K. Sagawa, H. Mori, H. Iwai, S. Satoh Abscisic acid-inducible 25 kDa xylem sap protein abundant in winter poplar. *Plant Root* 5: 63-68 (2011) 査読有
doi:10.3117/plantroot.5.63
- 3) J. Furukawa, Y. Abe, H. Mizuno, K. Matsuki, K. Sagawa, M. Kojima, H. Sakakibara, H. Iwai, S. Satoh Seasonal fluctuation of organic and inorganic components in xylem sap of *Populus nigra*. *Plant Root* 5: 56-62 (2011) 査読有
doi:10.3117/plantroot.5.56

[学会発表] (計3件)

- 1) 古川純他、佐藤忍、落葉性木本植物における導管液物質に関わる遺伝子の環境要因による発現制御、日本植物生理学会2011
東北大学、2011年3月22日
- 2) 水野宏亮他、佐藤忍、ポプラ根の機能の年間リズム形成への環境要因と植物ホルモンの関与、日本植物学会2010
中部大学、2010年9月11日

- 3) 金澤昌史他、佐藤忍、樹木における Ca、K 輸送体の環境による発現誘導、日本植物学会 2010
中部大学、2010 年 9 月 11 日

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 佐藤忍、導管液の採取法 (植物細胞壁、西谷・梅澤編) 講談社サイエンティフィック 292-294 (2013)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~plphys/s hinobuhomepage/SSindex.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 忍 (SATO Shinobu)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：70196236