

本日の最後の演者を迎えたいと思います。名古屋大学大学院生命農学研究科の中園幹生先生です。中園先生は今年の春に名古屋大学の教授になられてますます多忙になりました。専門は植物分子生物学、植物分子遺伝学ということで、このシンポジウムもついに分子の世界の話題に入ります。研究の手法は難しいと感じられるかもしれませんが、先生は一貫して現場に役に立ちたいというお考えで、よく現場を一緒に見に行ったりしますし、使っておられる材料は、実験に使いやすいいわゆる実験植物ではなく、皆さんがつくっておられる同じ作物の稲、トウモロコシということで、ご理解いただければと思います。植物の過湿・冠水ストレスに対する応答と適応の機構解明を目指した最先端の研究についてご紹介いただきます。よろしくお願いいたします。

## 講演6 「植物の耐湿性メカニズム研究の到達点」

### ◇はじめに

今日は、このような発表の機会を与えていただきまして心より感謝申し上げます。題目はこのように非常に大きなタイトルですが、私が実際に行っている、根の酸素の供給機構についての研究に焦点を当ててお話ししたいと思います。最初に研究の背景について説明してから、私たちが研究を行っている通気組織と ROL バリア (Radial Oxygen Loss Barrier) の形成機構についてご紹介し、最後に今後の展望を簡単に述べたいと思っております (図 6-1)。

## 植物の耐湿性メカニズム研究の到達点

- (1) 研究の背景(根への酸素供給機構)
- (2) 通気組織形成機構の解明
- (3) Radial Oxygen Loss (ROL)バリア形成機構の解明
- (4) 今後の展望

(図 6-1)

### ◇耐湿性付与のための重要形質

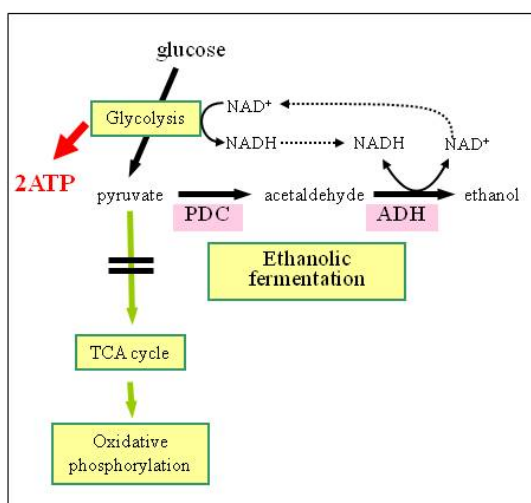
まず研究の背景です。耐湿性付与のための重要形質にはどのようなものがあるかということについては、湿害の原因となるストレスの強さや、そのストレスが継続する期間が短

いか長いかによって違ってくると思います。例えば短期間の嫌気環境下では、解糖系やエタノール発酵系などの嫌気代謝系が重要です。通常は酸素呼吸をすることによりATPという形で大量にエネルギーを作っていますが、酸素が無くなるとその反応が滞ってしまいます。その代わりに解糖系・発酵系を活性化し、少ないながらもATPを作ることによって何とか生き長らえようとします。しかし、長期間の嫌気環境下では、絶対的に酸素の供給が必要になります。そのために、今日のこれまでの講演で何度も話に出ている通気組織の形成が重要です。さらに、ROLバリアも大事です。酸素が通気組織を通して拡散によって根端に供給される過程で、ラジアル方向（編集注：根の伸長軸に対して直角の放射方向）に漏れていく現象があります。その漏れを防ぐバリアが形成されることで、より効率的に酸素が根端に供給されることとなります（図6-2）。今日は、この二つの形質に着目して紹介していきたいと思います。

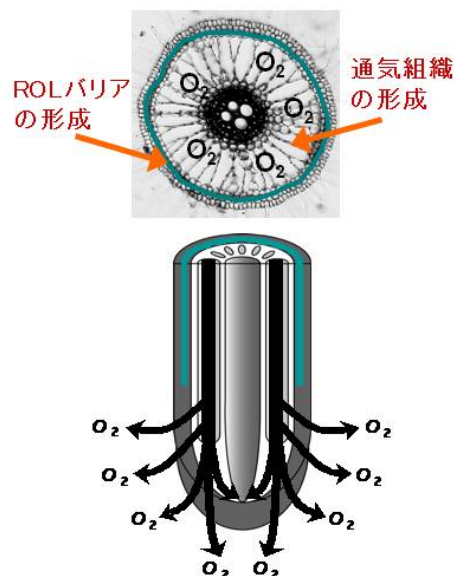
## 耐湿性付与のための重要形質

短期間の嫌気環境では・・・

解糖系・エタノール発酵系などの代謝系の活性化で対応できる。



しかし、長期間の嫌気環境では、根端への酸素の供給が必須である。

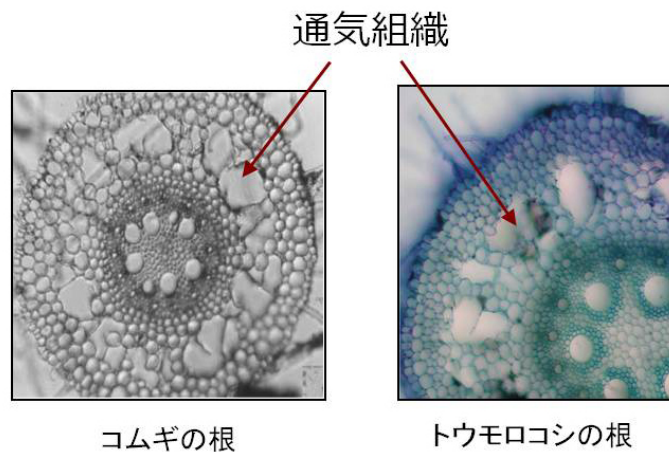


(図6-2)

### ◇通気組織

一つめの重要形質、通気組織について説明します。イネの根には通気組織が非常に発達しています。一方、畑作物の小麦やトウモロコシにも、過湿条件誘導的に通気組織が形成されることが知られています（図6-3）。ここで「イネと耐湿性の低い畑作物、小麦とかトウモロコシの間で一体何が違うのか？」という質問が出てきます。これを説明するため

畑作物のコムギやトウモロコシでも、過湿条件誘導的に通気組織が形成される

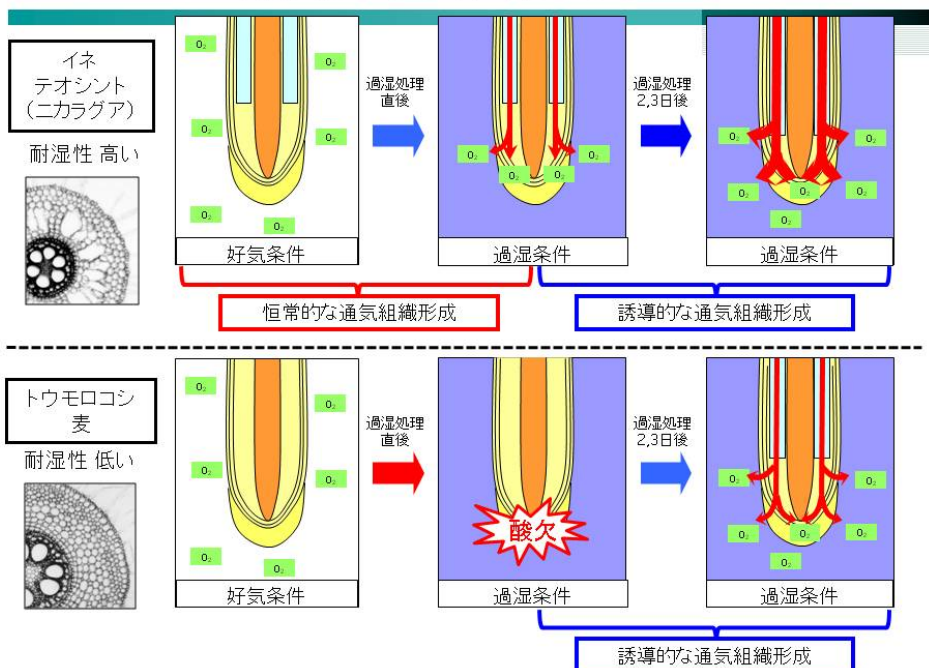


Q: イネと畑作物(コムギ、トウモロコシなど)との間で何が違うのか？

(図6-3)

に、耐湿性の異なるイネ科植物それぞれの、根の通気組織の形成パターンについて紹介したいと思います(図6-4)。イネやニカラグアのテオシントなどの耐湿性の強い植物は恒

### イネ科植物の通気組織の形成パターン

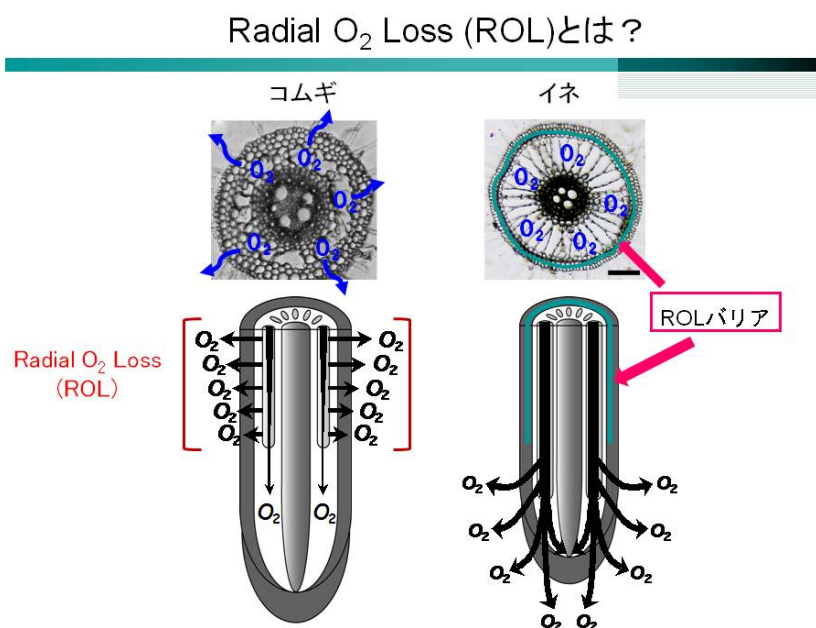


(図6-4)

常に根に通気組織を作る能力があり、酸素が十分あっても通気組織を形成します。しかし、耐湿性の弱いトウモロコシや麦は、酸素が十分ある条件下では根に通気組織を形成しません。ここで、大雨などによって過湿状態になると、イネやニカラグアのテオシントは通気組織がもともと形成されているため、速やかに根端まで酸素が供給されます。ところが麦やトウモロコシでは、通気組織が形成されていないので、根端はしばらく酸欠状態になってしまいます。その後、最終的には何日間かけて、どちらの植物にも誘導的な通気組織が形成されます。その結果、イネなどの耐湿性の強い植物は、通気組織がより肥大化し効率的に酸素が供給されます。麦などの植物もようやく通気組織を形成し、酸素が供給されますが、既に酸欠状態の時期に障害を受けてしまっていますから、その後にくら酸素が供給されたとしても、速やかに回復しにくいと言えます。このような、両者での通気組織形成過程の違いが耐湿性の違いにつながっているのだろうと考えています。

#### ◇ROL バリア

もう一つの重要形質である ROL バリアについて説明します。ROL とは何かというと、根の通気組織を通じて酸素が根端に拡散して行く過程で、ラジアル方向に酸素がどんどん漏出（リーク）していくという現象があり、これをラジアル・オキシゲン・ロス（Radial Oxygen Loss: ROL）と呼んでいます。ある種の植物は、通気組織の外側にあたる根の表層部分に、ある種のバリアを形成する能力を持ちます。このバリアを ROL バリアと言います。バリアがあることで、通気組織からの酸素の漏出が抑えられ、より効率的に酸素が根端に供給されます。イネやニカラグアのテオシントは ROL バリアを形成し、過湿条件下で酸素を効率的に根端に供給することにより、根を伸長させることができます（図 6-5）。ROL

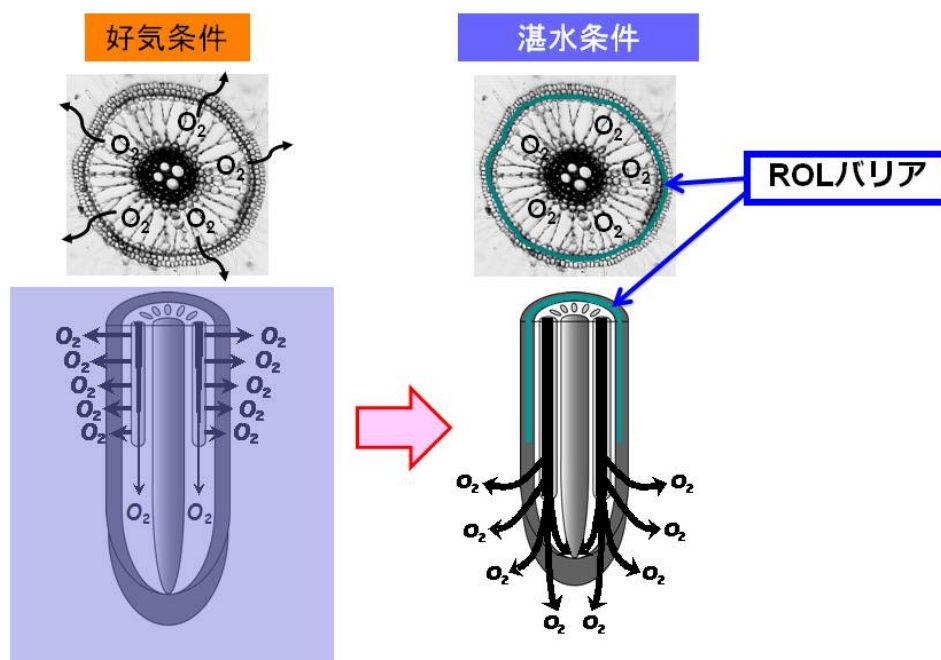


(図 6-5)



バリアを形成する植物は、例えばイネ、ヨシ、ハマムギグサなどが知られており、これらはすべて湿生植物です。また、ニカラグアのテオシントもタイトな (tight: 堅固な) ROLバリアを形成することができます。それに対して小麦、大麦、トウモロコシといった畑作物は、(図6-6) ではウィーク (weak: 脆弱) と示していますが、ほとんどROLバリアを形成することができません。イネのROLバリアを形成する能力について説明を付け加えると、実は好気条件下ではバリアを形成せず、根の基部で酸素がどんどんリークしていきます(図6-6)。好気条件下では根の周囲にある酸素を利用して呼吸ができますので、バ

### 湛水条件によってイネのROLバリアは誘導される



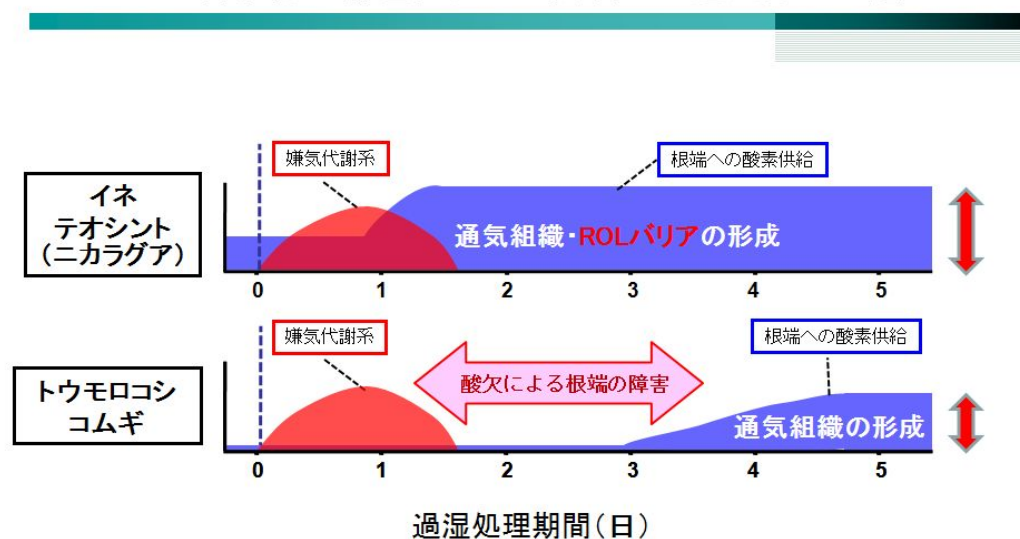
(図6-6)

リアを作る必要がないのです。イネを過湿処理しますと、その刺激が引き金となってROLバリアの形成が誘導されます。先ほど通気組織の形成が非常に重要であるということを申しましたが、それに加えてROLバリアの形成が重要であるということが言えるかと思えます。

通気組織とROLバリアという2つの重要形質についてまとめます。過湿条件になると最初は嫌気代謝系が活性化されます。しかし嫌気代謝系だけでは生育を維持するだけのエネルギーが生産できず、すぐ力尽きます。その後、酸素を根端に供給していくことが大事になります。耐湿性の強い植物(図6-7上)には恒常的に通気組織を形成しているため速やかに酸素が供給されますが、耐湿性の弱い植物(図6-7下)は通気組織ができるまで

に数日を要しますので、酸素供給にギャップが生じてしまいます。このギャップが大きけ

### イネ科植物の耐湿性および根端への通気様式の違い



過湿土壌環境下で、畑作物の根端に効率的に酸素を供給させ、根を伸長させるためには、**通気組織の形成に加え、ROLバリアの形成が必要である**

(図6-7)

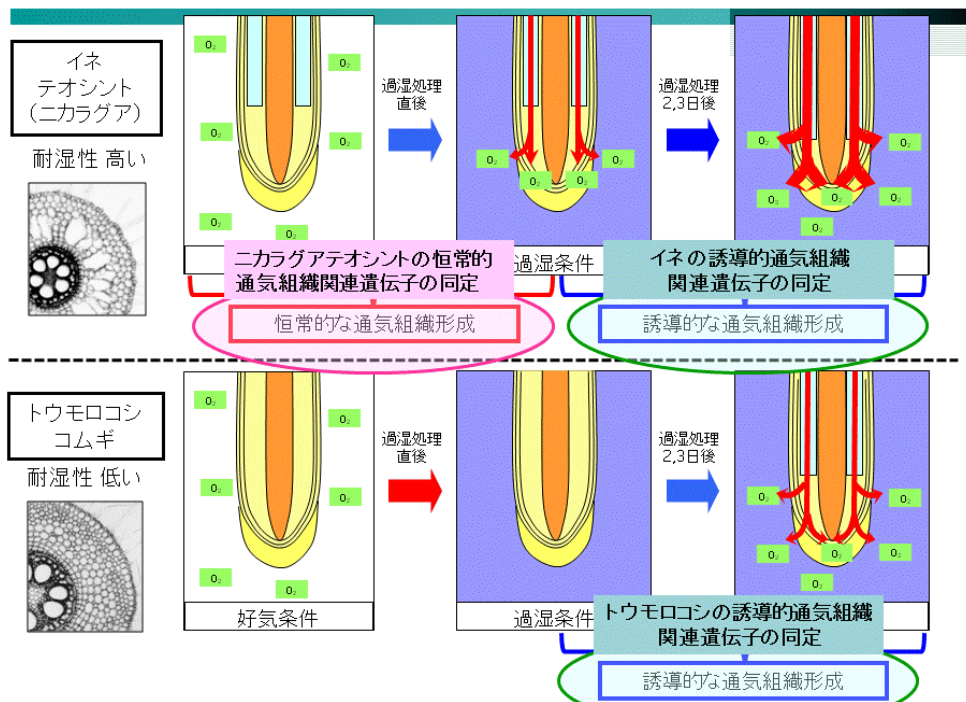
れば大きいほど、酸欠による根端の障害が起こりやすくなります。従って、恒常的な通気組織を形成するという事は、根端の障害を防ぐためにまず第1に重要な形質です。さらに、過湿土壌環境下で畑作物の根端に効率的に酸素を供給させて根を伸長させるためには、通気組織の形成に加えて、このROLバリアを形成する形質が重要であると思います。

#### ◇耐湿性向上のための遺伝子解析

この二つの形質に着目して研究を行うことにより、作物の耐湿性を向上させる何かの糸口をつかむことができるのではないかと考えて研究を進めています。まず通気組織の形成については、恒常的な通気組織の形成と、誘導的な通気組織の形成があると申しました。恒常的な通気組織の形成につきましては、一つ前の講演の間野さんのお話にありましたように、ニカラグアのテオシントの通気組織関連遺伝子の同定を試みております。一方、誘導的な通気組織については、イネやトウモロコシを材料に使う関連遺伝子の同定を進めております(図6-8)。

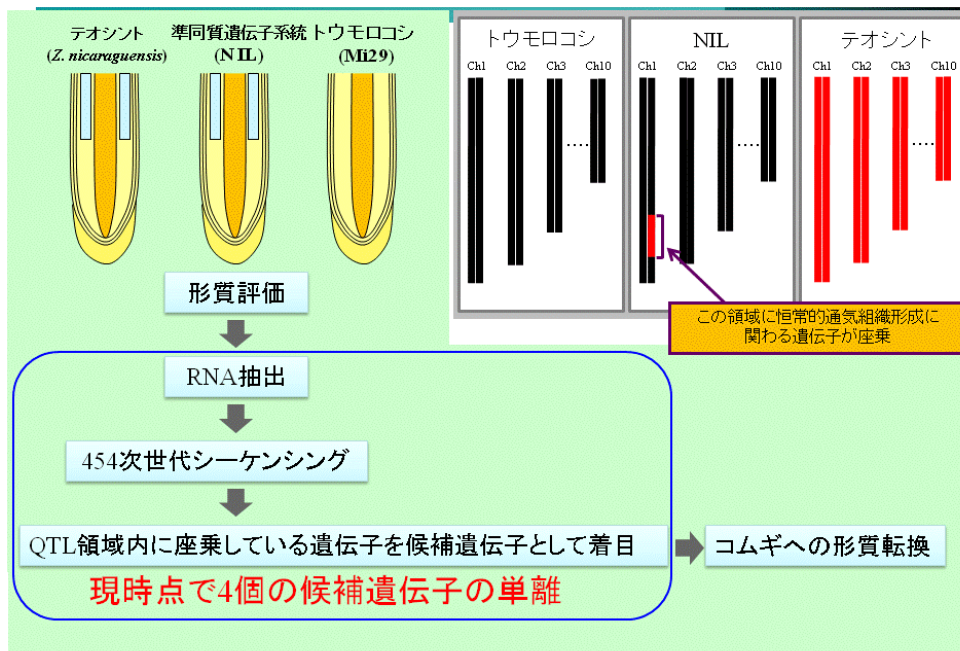
まずニカラグアのテオシントの例ですが、これは間野さんからご紹介がありましたので簡単にお話します。解析材料はトウモロコシの準同質遺伝子系統です。10本の染色体のうち1番染色体の赤い色で示した領域が、テオシント由来の恒常的な通気組織形成に関与する遺伝子を含む染色体断片に組み換わったものです(図6-9)。この準同質遺伝子系統、その親系統であるテオシントおよびトウモロコシの3つを材料に使い、形質評価を行いま

### イネ科植物の通気組織の形成パターン



(図 6 - 8)

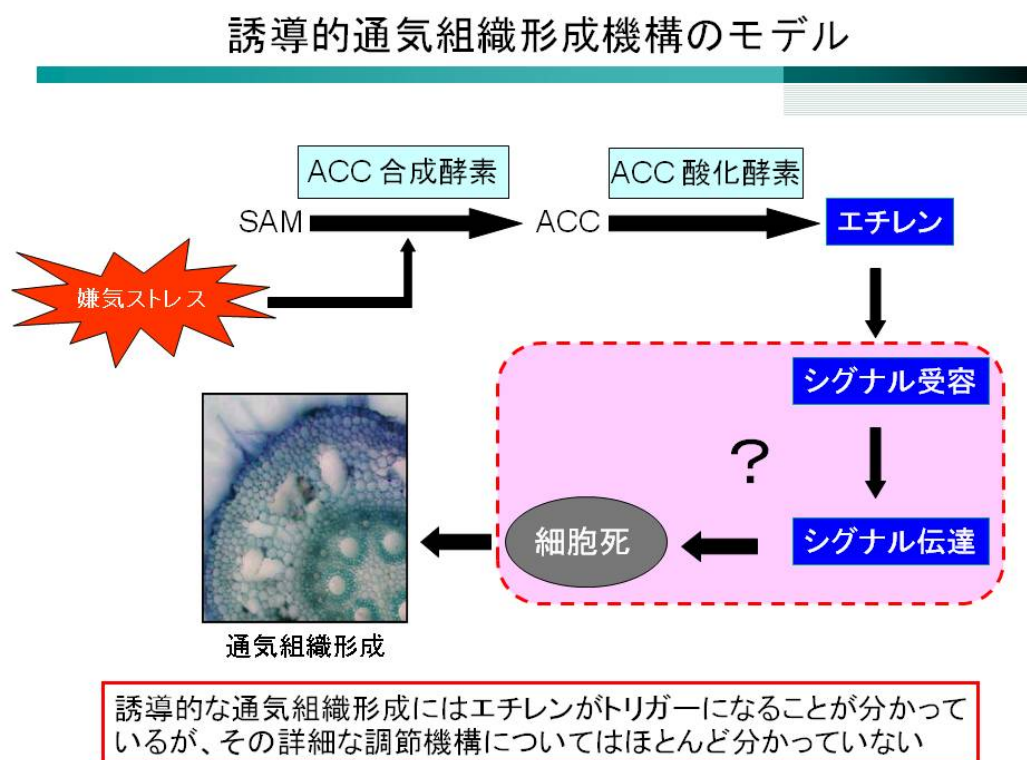
### ニカラグアテオシント由来の通気組織形成遺伝子単離の戦略



(図 6 - 9)

した。その後、それぞれの根からRNAを抽出し、次世代型シーケンサーを使って大量に遺伝子発現解析を行い、テオシントに特有の遺伝子を多数特定しました。さらに、これらの遺伝子のうち、通気組織形成能に関するQTL領域内に座乗しているものを候補遺伝子として選抜していきました。その結果、現時点まで4個の候補遺伝子が単離でき、順次小麦に導入しています。小麦は恒常的な通気組織を形成しませんので、遺伝子導入した小麦において恒常的な通気組織を形成する能力を獲得できるかを指標として、遺伝子の機能を検証して行く考えです。

続いて、誘導的な通気組織形成の研究では、トウモロコシとイネを実験材料として使用しています。まず、この研究を始める前に既にわかっていたことを簡単に紹介します。植物が嫌気ストレスを受けると、植物ホルモンのエチレンが発生します。エチレンはシグナルとして下流へ伝達され、根の皮層細胞で細胞死が起き、その結果、通気組織が形成されることが知られていました（図6-10）。しかしながら、エチレンから細胞死に至る間の

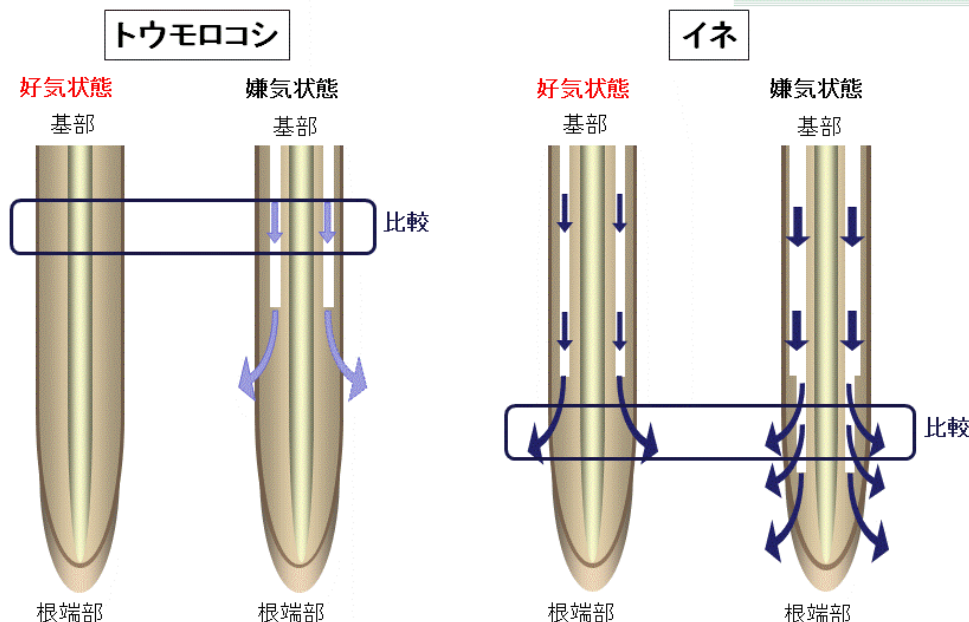


(図6-10)

シグナル伝達に関わる調節機構については全く分かっておりませんでしたので、そのメカニズムを解明したいということで研究を進めています。これらの植物では、通気組織が誘導される根の部位が異なりますが、そのそれぞれの部位の組織からRNAを抽出し、二つの植物で共通の発現制御を受ける遺伝子を探索同定しました（図6-11）。



## トウモロコシ・イネにおける誘導的通気組織形成



トウモロコシ・イネにおいて共通の発現制御を受ける遺伝子を探索・同定する。

(図6-11)

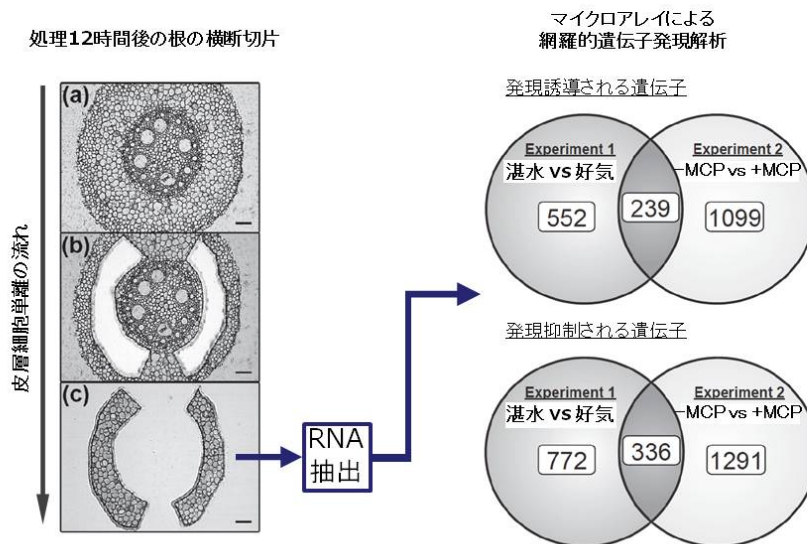
### ◇レーザーマイクロダイセクション法

通気組織形成に関わるシグナル伝達メカニズムを解析するためには、通気組織が形成される部位である皮層細胞だけを材料とし、その他の組織は除いて分析すると有利です。皮層で機能している遺伝子の情報だけを集めることによって解析の精度を高めるということです。そのためにレーザーマイクロダイセクションという手法を使っています。この手法ではレーザービームを使い、光学顕微鏡レベルで目的の細胞や組織を単離します。まずキャプチャーレーザーを発射し、その後、UVレーザーでレーザーナイフのようにして切断します。最終的に切断した組織のみを単離できます。この手法を用い、皮層組織だけを単離してRNAを抽出します。そして、大量に遺伝子発現を解析できるマイクロアレイという手法を使い、通気組織が形成される過程で発現が誘導される遺伝子、また、抑制される遺伝子を同定しています(図6-12)。同様の手法でイネについても解析しています。今日は具体的にはご説明しませんが、さまざまなおもしろそうな遺伝子が同定でき、現在、これらの遺伝子の機能解析を進めています。

### ◇ROLバリア形成に関する遺伝子

ROLバリアに関してもレーザーマイクロダイセクションを使って同様の解析を行いました。

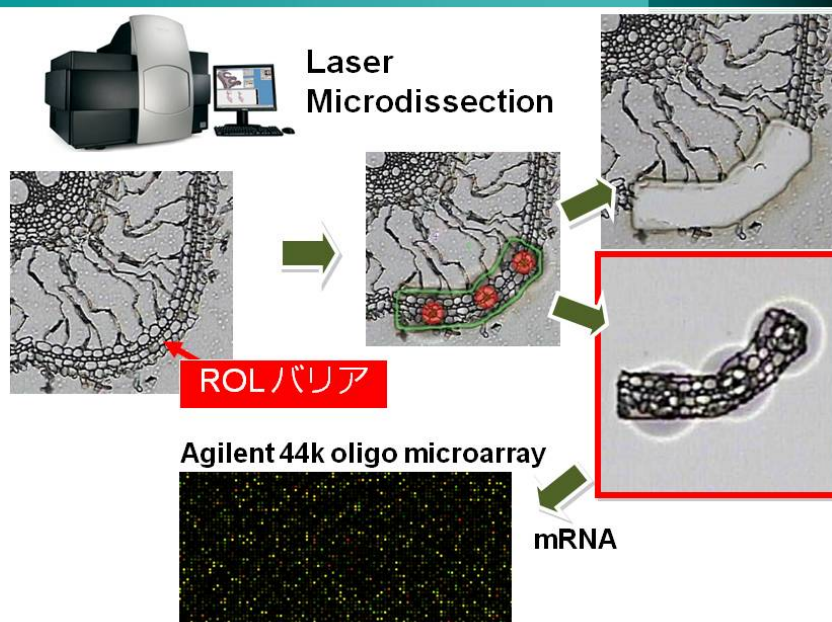
## レーザーマイクロダイセクション(LM)法による皮層細胞の単離 および抽出したRNAを用いたマイクロアレイ解析



(図 6 - 1 2)

た。ROL バリアが形成される場所は必ず通気組織の外側の表層ですので、その表層組織だけを単離し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行いました (図 6 - 1 3)。具体的な

## ROLバリア形成に関わる遺伝子の同定



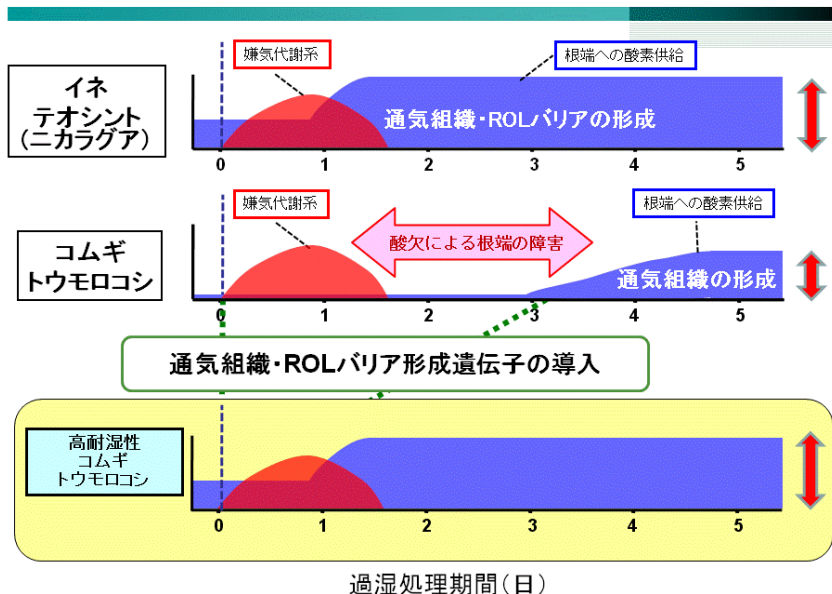
(図 6 - 1 3)

条件は省略しますが、ROL バリアができる条件とできない条件で三つの異なる組み合わせで遺伝子発現解析を行い、共通して遺伝子の発現が誘導される遺伝子、また、抑制される遺伝子を同定しました。その結果、発現が誘導される遺伝子は 95 個、抑制される遺伝子が 35 個ありました。発現が誘導される遺伝子の中でスベリンという物質の代謝、生合成にかかわるような遺伝子が 15% ありました。スベリンの生合成経路は、まず脂肪酸から始まり、細胞内でいろいろな修飾を受け、それが細胞の外に出てポリマーを形成し、沈着するという過程を通りますが、この生合成にかかわる遺伝子が多く誘導されたということです。それではスベリンとは一体どのような物質かということの説明します。スベリンは脂肪酸由来の物質とフェノール性の物質が結合したポリマーです。非常に疎水性が高く、水やガス等を通さない性質があります。スベリンの存在がよく知られているのは根のカスパリー帯のところですが、カスパリー帯というのは根の内皮にあり、イネ科の場合は根の外皮にもありますが、そこの細胞と細胞の間にバンド状に存在しています。その場所だけは物質は細胞外を通ることは出来ず、細胞内輸送、つまりシンプラスティックな養水分の輸送をすることになります。このため、カスパリー帯は根における養水分吸収の調節において重要な役割を担っています。さらに、根の基部ではスベリンラメラという、細胞壁の内側にスベリンが沈着した層状の構造が見られ、それが内皮と外皮に観察されます。ここにたまるスベリンラメラの構造が、酸素が皮層の通気組織を通る過程で外にリークしていくのを防ぐ役割を持つのではないかという可能性が出てきました。今後、この可能性について検証していきたいと考えております。

#### ◇今後の展望

続きまして今後の展望についてお話します。イネの根は恒常的な通気組織を形成し、湛水条件になるとさらにそれが肥大するという性質を持っています。加えて ROL バリアを形成する能力を持っています。その結果、根端に十分に酸素を供給することができ、イネは水田のような湛水環境で根を伸ばして正常に生育することができると言えます。それに対して麦などの畑作物は、根に通気組織を形成しますが、湛水条件になっても形成までに時間がかかりますし、イネほど発達しません。しかも、ROL バリアを形成しないため、大部分の酸素はどんどん漏出することから、根端は意外に酸欠状態であると言えます。その結果、根端が障害を受け、湿害につながると思います。そこで、まず通気組織の形成と ROL バリアの形成にかかわる遺伝子を同定し、最終的に耐湿性獲得のメカニズムを解明したいと考えています。そして、間野さんからもお話がありましたが、耐湿性に関わる形質の鍵遺伝子を小麦に導入することを検討しています。麦、トウモロコシは過湿条件への適応反応にギャップがあり、根端への酸素の供給がどうしても遅れてしまうことが問題になるので、このギャップを少しでも埋めたいということです（図 6-14）。通気組織や ROL バリア形成の鍵遺伝子を導入することができれば、湿生植物と同様に早い段階で酸素を根端に供給できるようになり、耐湿性が向上することを期待しているわけです。トウモロコシ

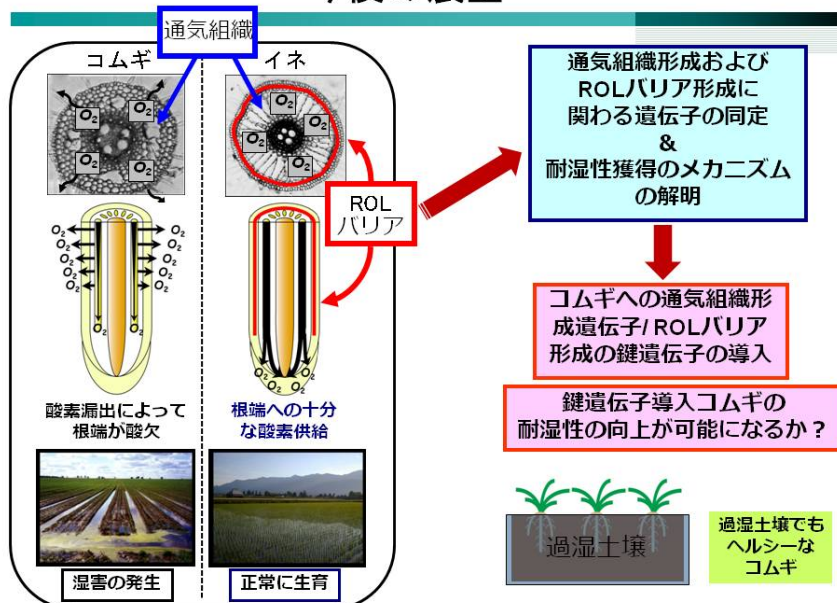
### 耐湿性イネ科作物作出のための研究戦略



(図 6 - 1 4)

は、テオシントが恒常的な通気組織や ROL バリアを形成する能力を両方とも持っているの  
 で、交雑育種によって耐湿性の高いトウモロコシを作出できると期待できますが、小麦は有  
 望な遺伝資源がないので、場合によっては分子育種の手法を使って検証したいと思ってい  
 ます。鍵遺伝子が同定できれば、小麦に導入することによって耐湿性の向上が可能になる  
 のかを検証したいと思って研究を進めています (図 6 - 1 5)。

### 今後の展望



(図 6 - 1 5)



最後にこの研究を行うに当たりましてこのように多くの方々に大変お世話になりました。また、発表した研究は生研センターの助成および農水省の新農業展開ゲノムプロジェクトの助成によって推進されたものです（図6-16）。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。ありがとうございました。

## 謝 辞

### 東京大学大学院農学生命科学研究科 植物分子遺伝学研究室

塩野克宏(ポスドク)  
安彦友美(ポスドク)  
山内卓樹(ポスドク)  
西内俊策(ポスドク)  
Lukasz Kotula (ポスドク)  
高橋宏和(大学院生)  
Imene Rajhi(大学院生)  
安藤美保(大学院生)  
中村元昭(大学院生)  
山崎 聡(大学院生)  
松尾優一(大学院生)  
有村慎一(助教)  
堤 伸浩(教授)

### 新機能植物開発学研究室 西澤 直子(教授)

### 名古屋大学大学院生命農学研究科 植物遺伝育種学研究分野

佐藤 豊(准教授)  
犬飼義明(助教)

### 農研機構・作物研究所

小柳敦史(研究員)  
川口健太郎(研究員)  
安倍史高(研究員)

### 農研機構・畜産草地研究所

間野吉郎(研究員)  
大森史恵(研究支援員)

### 帯広畜産大学

加藤清明(准教授)

### 京都大学生存圏研究所

矢崎一史(教授)  
土反伸和(助教; 現 神戸薬科大学)

### 農業生物資源研究所

長村吉晃(研究員)  
本山立子(研究支援員)

### University of Western Australia, Australia

Prof. Tim Colmer  
Dr. Al Imran Malik

### University of Bonn, Germany

Prof. Lukas Schreiber  
Dr. Kosala Ranathunge

### 農研機構・生物系特定産業技術研究支援センター 四方平和(研究リーダー)

【敬称略】

本研究は 農研機構・生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の助成、および農林水産省 アグリ・ゲノム研究の総合的な推進(新農業展開ゲノムプロジェクト)の助成により推進された。

(図6-16)

### [質疑応答]

川口 どうもありがとうございます。「耐湿性研究・基礎研究ナウ」というすばらしい発表だと思いました。この講演ついてご質問がありましたらお願いいたします。

### ◇ROL バリアとスベリンの関係

Q: いつも非常に興味深い話をお聞かせいただきありがとうございます。ROL バリアとスベリンは密接な関係があると思っておりますが、お話ではスベリンはバリアの一つの要素であるが、その他にも構成要素があるというニュアンスで受け取りました。それでよろしいでしょうか。また、遺伝子解析ではスベリン関係の遺伝子の発現が上昇しているというお話ですが、それ以外では、最新の研究成果を今の段階で公表できないのかもしれませんが、今日のお話の関連でどのような遺伝子の発現があるのか聞かせて下さい。

中園 スベリンはROLバリアの構成成分の一つとして寄与しているのは間違いないと思

います。しかし、スベリンだけではすべて説明できず、他の物質も関わっていると思われるます。では、その物質が具体的に何かということは、ほとんど分かっておらず、遺伝子発現解析でも示唆するような遺伝子は確認できていません。まずはスベリンが **ROL** バリアの構成成分であることから証明していきたいと考えており、今後、さまざまな角度から解析していくことで、どの物質がバリアの形成にどれだけ寄与しているかということについては明らかになると期待しています。

それから、スベリン生合成遺伝子以外で、何か特定の生合成遺伝子が多く発現しているという特徴はありません。例えば、転写因子のような調節因子の遺伝子の発現はありますが、それらの遺伝子が具体的に何に関わっているかというのは機能解析をしないと分かりません。従って、遺伝子の機能からスベリン以外で寄与していると思われる物質の、例えば生合成にかかわるような遺伝子については、今のところ分かりません。

#### ◇スベリンの生合成能と **ROL** バリア形成能

**Q:** 湿生植物に **ROL** バリアが往々にして存在し、栽培型の小麦、大麦には存在しないという紹介がありました。湿生植物の中にホルディウム・マリナム(*Hordeum marinum*)という大麦の近縁の野生種が含まれていましたが、同じようにスベリンの生合成活性が上がっているのでしょうか。大麦、小麦はスベリンの生合成経路自体はあるにもかかわらず、**ROL** バリアを形成しないのだと思います。スベリン合成関連の遺伝子発現、もしくは生合成経路のあるなしと **ROL** バリアができるできないということの関連性について教えてください。

**中園** まずホルディウム・マリナムですが、これは **ROL** バリアを形成する条件でスベリンが蓄積します。その意味で、状況証拠で考えれば、スベリンと **ROL** バリアは関係していると言えます。また、小麦と大麦にもスベリンの生合成経路というのはおそらくあり、根の外皮でスベリンを合成するポテンシャルはあると考えられます。ところが過湿処理してもスベリンが蓄積しない。また、バリア形成されないので、その調節に関わる因子が異なるのだらうと思います。逆に言えば、麦にはもともとスベリン合成のポテンシャルがあるわけですから、その調節に関わる因子が何か分かれば、それを導入することで、根の外皮にスベリンを作らせることができ、さらに **ROL** バリアを形成させることができるのではないかと期待しています。

**川口** 例えば小麦とイネは異なる環境に適応した作物だと思います。イネはバリアと通気組織がある。小麦は、バリアはないようですが通気組織はちょっとできるというところで、小麦にイネやテオシントの形質を入れてやればよいという考え方は非常におもしろいと思います。では、そもそもなぜ小麦はそういった形質を持っていないのかというと、逆にそういう形質が邪魔になるかも知れません。小麦が生きてきた上では必要ないということも考えられるのではないかなと思います。そうすると鍵遺伝子を入れたらどうなるかは非常に興味深いところで、すくすくとイネのように育つのか、あるいは邪魔になってうまくいかないかもしれないということも考えられるということでしょうか。

中園 それはやってみないとわからないですが、特定の形質がある環境下ではアドバンテージになりますが、別の環境下ではそれがディスアドバンテージになるということは結構あります。いずれにしても、最初は **ROL** バリアをつくらせることで耐湿性が上がるかどうかということ調べる必要があると思います。そのあと、もしディスアドバンテージがあるとしたら、それを減らすために、形質発現のファインコントロールをどうしていくかというのが、次の課題として出てくるのだらうと思います。また、スベリンに関しては、外皮のところにできることによって酸素を漏らさないバリアとして働くだけではなく、水の透過のバリアにもなります。ということは例えば乾燥状態になったときに根の中の水分が外に出ていきにくくなるとか、あとは外からのいろいろな毒性物質とか、病原菌などの侵入を防ぐようなバリアとして働くとか、そういった役割があるということはこの **ROL** バリアの解析を私たちがやる前からある程度言われていたことです。それらの能力をうまく使えばいろいろな場面で有用になると期待されますが、それらのことについては実際にやってみて調べてみないとわからないということだと思います。

#### ◇**ROL** バリアと水の吸収

加藤（中央農研） **ROL** バリアが形成された時に、根のその部分からは水を吸収できるのでしょうか。

中園 時間の関係でご紹介しませんでした。スベリンが蓄積する場所は根の基部です。根端部はカスパリー帯しかありません。このため、植物は根端のほうの若い組織で養水分の吸収をします。水はスベリンラメラのできていない根端側の内皮を通して維管束に入って、さらに地上部に向かって導管内を移動して行きます。そこで、内皮のスベリンラメラは、水が地上部に向かって上がっていく過程で、内皮の外側に漏出するのを防ぐためのバリアとして働くことが考えられています。したがって、**ROL** バリアの構成成分がスベリンラメラだとしたら、水の吸収は根の基部では阻害されることになると思います。