

氏 名(本籍)	たか 高	の 野	まもる 守
学位の種類	博	士	(農 学)
学位記番号	農	博	第 570 号
学位授与年月日	平	成	11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科農学専攻 (博士課程)		
学位論文題目	根における水分屈性発現機構の解析		

論文審査委員	(主 査)	教 授	高	橋	秀	幸
		教 授	大	瀧		保
		教 授	西	山	岩	男

論文内容要旨

はじめに

高等植物の根は、物理的に植物体を支えるだけでなく養水分吸収という生存に不可欠な生理的責務を負っている。そのため、根が持つ能力を研究することは植物の生存戦略を知る上で生物学的に興味深いだけでなく、その研究成果をもとに、根がより効率的に養水分を吸収できる環境を整備することは、作物学的に重要である。

根は土中を伸長する際、様々な環境要因に応答して進むべき方向を決定する。植物が受ける刺激と応答の方向が決まっている運動を屈性と呼んでいるが、根は地球上では常に重力屈性の影響を受けながら伸長するために、根における重力屈性以外の屈性運動を単独で証明するのは非常に困難である。ところが、最近、根が重力屈性を欠損したエンドウの突然変異種を用いて、根が水分の多い方向に伸長する水分屈性が科学的に証明された。このエンドウの突然変異種は、根が重力反応を示さないために水分屈性の現象を観察するのに適している。しかし、水分屈性発現機構に関する研究は少なく、水分屈性の仕組みに関する基礎的知見を得ることは、植物の姿勢制御の機構を究明し、またそれを制御する上で重要である。

そこで本研究では、このエンドウの突然変異種(*ageotropum*)を用いて、水分屈性発現機構を解明するための解析を行い、以下の知見を得た。

第1章 根の水分屈性実験系の確立

研究に必要な水分屈性誘導システムの開発を試み、水分勾配感受に必要な水ポテンシャル差を明らかにした。

根の水分屈性が水ポテンシャル勾配によるものか否かを検討するために、ソルビトールを含ませた 1 mm^3 の大きさの寒天片を根冠あるいは伸長帯の片側に付着させ、その反対側にソルビトールを含まない寒天片を付着させることにより、根端の両側に水ポテンシャル差を人為的に設定した。その結果、 $0.5\text{-}1.5\text{ MPamm}^{-1}$ の水ポテンシャル差の存在下で、根はソルビトール寒天片とは反対側に屈曲し、根の水分屈性が、根冠における水勾配の感受を介して発現するものであることが初めて示された(Fig. 1)。この屈曲の経時的変化を観察した結果、ソルビトール寒天片処理による屈曲は、処理後4時間目くらいから認められ、その後2-3時間ごとに屈曲の増減を繰り返す一定のリズムを持った運動であることが明らかになった(Fig. 2)。また、ソルビトールを含んだ寒天片を根の伸長帯に与えた場合、屈曲は認められなかったことから、根冠が水分勾配を感受することが直接的に証明された(Fig. 1)。

重力屈性と水分屈性との関係を検討した。

同じエンドウにおいても、正常な重力感受性のアラスカエンドウの根は、

重力屈性を示し、見かけ上水分屈性を発現しにくい。これは、地上では重力の影響が強く、根の水分屈性が重力屈性によってマスクされていることを示唆している。そこで、重力反応を正常に示す植物の根においても水分屈性を発現することを検証するために、クリノスタット上でアラスカエンドウの根が受ける重力方向を攪乱させ、水分屈性の発現を解析した。

その結果、正常に重力屈性を示すアラスカエンドウの根は、クリノスタットを用いて重力屈性を打ち消すと、ソルビトール寒天片処理によって顕著な水分屈性を示すようになることが明らかになり、地球上では見かけ上水分屈性を示さない植物も、水分屈性能力を持つことが明らかになった(Fig. 3)。これによって、微小重力の宇宙環境下における水分屈性実験系の確立に道を開いた。

第2章 根の水分屈性制御要因の解析

屈性に関与すると考えられるカルシウムの水分屈性における作用を検討した。

根冠の片側にカルシウムを濃度別に処理した場合、根はカルシウム寒天片と反対側に屈曲し、その屈曲はカルシウム濃度が高くなるのに伴って増大した。またカルシウムによる屈曲の開始は、ソルビトール処理によって水ポテンシャル差が生じることによっておこる屈曲(水分屈性)より約3時間速いことが明らかになった。また、根におけるカルシウムの屈曲誘導に対する水ストレスの影響を調べた結果、このカルシウムによる根の屈曲は、浸透ポテンシャルに換算して0.05 MPaというごくわずかな水ストレスが加わったとき、最大に促進されることが明らかになった。さらに、カルシウムキレート剤のEGTA、3種類のカルシウムのイオンチャンネルブロッカーおよびイオノフォアの影響を検討した。その結果、水分屈性は、EGTAの前処理によって阻害され、EGTAをカルシウムで置き換えることによって回復した(Fig. 4)。またカルシウムのイオンチャンネルブロッカーの1つである塩化ランタンによって水分屈性は阻害され、イオノフォアの処理によって促進された。

これらの結果から、水分屈性発現にはカルシウムが不可欠であり、カルシウムイオンの細胞膜を介した細胞内流入が重要であることが明らかになった。また、水ストレスがカルシウムによる屈曲を促進するのは、それがカルシウムの細胞内への流入を促進するためであると考えられた。

屈性に関与すると考えられるオーキシンの水分屈性における作用を検討した。

ラジオアイソトープでラベルしたIAAの組織内における追跡調査から、水分屈性を発現している根ではオーキシンが組織内において偏差的に分布していることが明らかになると同時に(Fig. 5A)、オーキシンがその制御に関与していると考えられる細胞壁の表層微小管の配向が変化していることが明らか

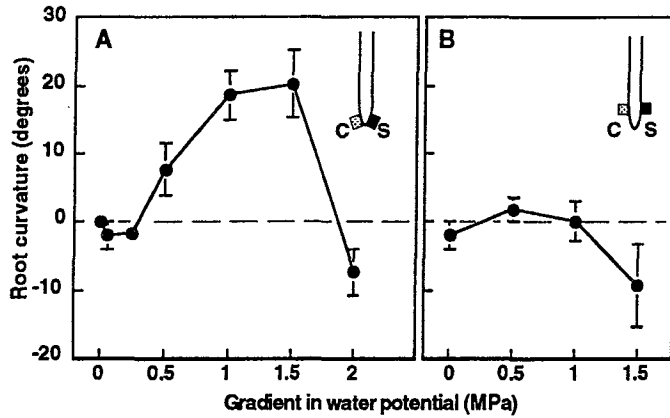


Fig. 1. Root curvature caused by water potential gradients. Gradients in water potential were applied to either the root cap (A) or the elongation region (B) of roots of the *ageotropum* pea mutant. S agar block containing sorbitol; C agar block without sorbitol. Curvature was measured 6 h after initial exposure to the gradient in water potential. The plus sign in degrees curvature indicates curvature away from the sorbitol agar block, and the minus sign indicates curvature toward the sorbitol source. Each datum represents the mean \pm SE.

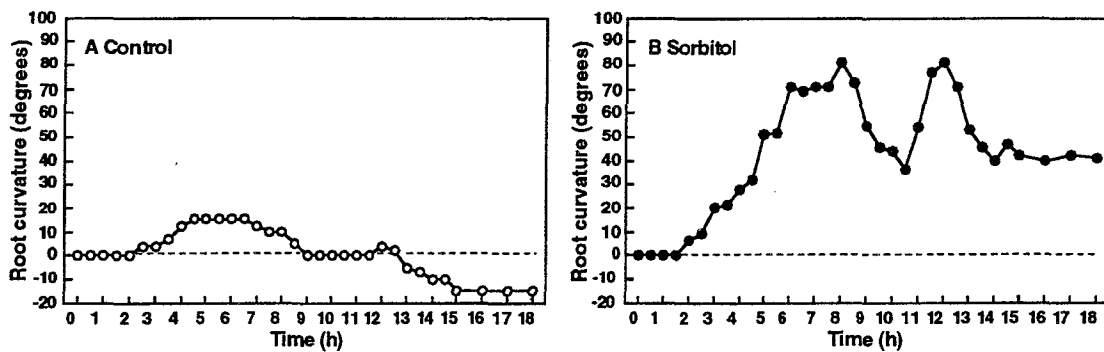


Fig. 2. Kinetics of hydrotropic curvature caused by a water-potential gradient in the root cap. A plain agar blocks were symmetrically applied to both sides of the root cap (control); B an agar block containing sorbitol (-1 MPa) was applied to one side of the root cap and a control plain agar block to the other side (sorbitol). Positive values indicate curvature away from the sorbitol agar block.

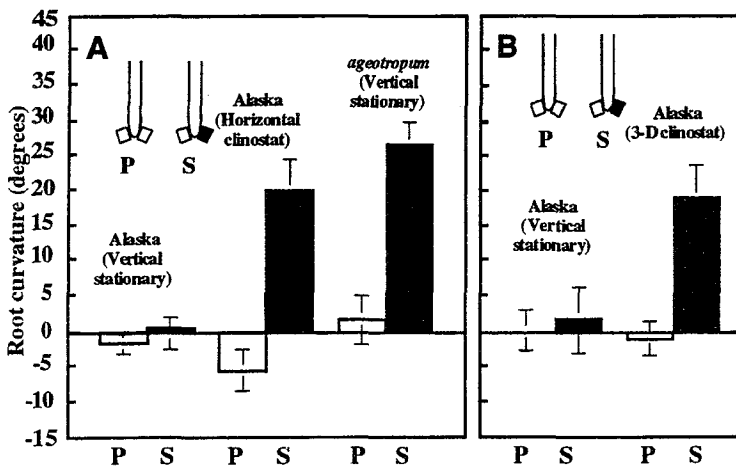


Fig. 3 Induction of hydrotropism in the roots of Alaska and *ageotropum* peas by sorbitol-agar blocks on clinostats. Roots were hydrotropically stimulated by sorbitol-induced gradient of water potential on a horizontal clinostat (A) or a 3-D clinostat (B). Root curvature was measured 6 h after the start of treatment. Positive values indicate root curvature away from the sorbitol agar block. P plain-agar blocks containing no sorbitol were placed on both sides of the root cap; S an agar block containing sorbitol was placed on one side of the root cap and a plain agar block was placed on the opposite side. Vertical bars indicate the mean \pm SE.

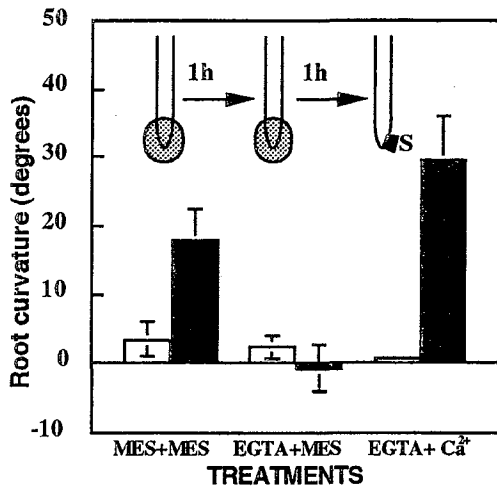


Fig. 4 Inhibition of sorbitol-induced curvature of pea roots by EGTA and its recovery by calcium. Roots were pretreated with a 10 μ l of each solution for 1 h, then hydrotopically stimulated by sorbitol-induced gradient of water potential directly in the root cap zone. Black bars indicate the curvature of the roots treated with sorbitol agar treatment. White bars indicate the control, treated with plain agar block. Root curvature was measured 6 h after finishing drug pretreatment. Positive values indicate root curvature away from the sorbitol agar block. **S** an agar block containing sorbitol (-1MPa) was placed on one side of the root cap and a plain agar block was placed on the opposite side. Vertical bars indicate the mean \pm SE.

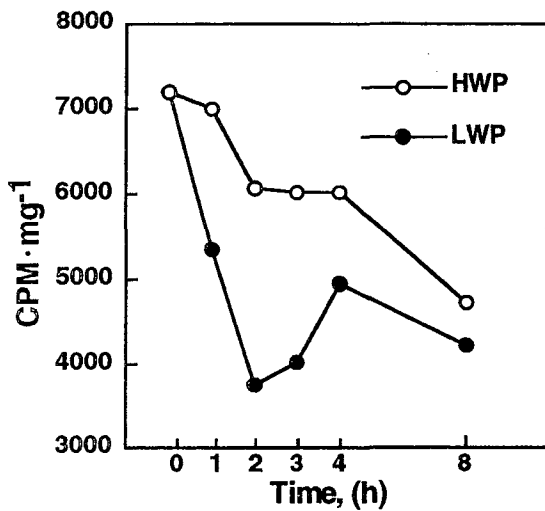


Fig. 5A A time-course study of the movement of [³H] in hydrotopically responding *ageotropum* roots. Roots were hydrotopically stimulated. For counting of the radio activity, 8-mm portions of the apical roots were longitudinally halved for 12 roots. Closed and open circles indicate the sides of the lower (LWP) and higher (HWP) water potentials, respectively.

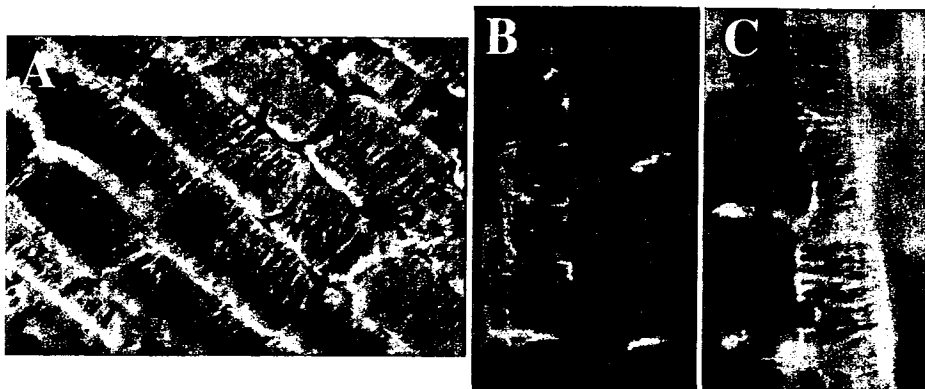


Fig. 5B Cortical microtubules (MTs) in hydrotopically responding *ageotropum* roots stained with anti-tubulin antibody. Roots were hydrotopically stimulated. MTs in Epidermal and cortical cells of elongation zone of the control root have arranged transversely to the cell axis (**A**). MTs in the epidermal cells of the higher water potentials (HWP) have re-arranged (**B**), while those in the side of lower water potential (LWP) arranged transversely to the cell axis as well as in the control (**C**).

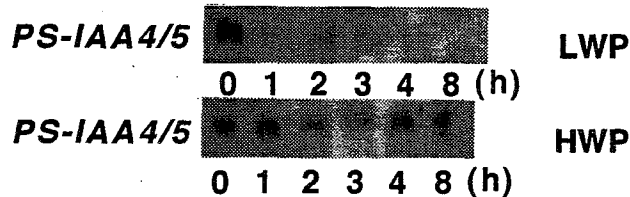


Fig. 5C A time-course study of the differential expression of *PS-IAA4/5* in hydrotropically responding *ageotropum* roots. Roots were hydrotropically stimulated. For RNA extraction, 8-mm portions of the apical roots were longitudinally halved for 40 roots (40 halves weighed more than 400 mg). The upper Northern blotting sheet shows the *PS-IAA4/5* accumulation in the root halves of the LWP side, while the lower shows those of the HWP side.

Ps-EXGT1	MGSSFWTVCL ELASIVSSSF CALPRKVDV PGRNYVPTW AFDHIKYFNG	50
soybean	FSVWT--VGV ELASLASAAL CANPRREVDV QGRNYVPTW AFDHIKYFNG	48
Azuki	MGSSLW-TCL ILLSLASASF AANPRTFIDV PGRNYVPTW AFDHIKYLNG	49
Consensus	MGSS-W-VCL ELASLASASF CANEE-RVDV PGRNYVPTW AFDHIKYFNG	50
Ps-EXGT1	GSEIQLHLDK STGTGFQSKG SYLFGHFMSN IKMVPGDSAG TVTAFYLSSQ	100
soybean	GSDIQLHLDK YTGTFQSKG SYLFGHFMSY IKMVPGDSAG TVTAFYLSSQ	98
Azuki	GSEIQLHLDK YTGTFQSKG SYLFGHFMSY IKLVPGDSAG TVTAFYLSSQ	99
Consensus	GSEIQLHLDK YTGTFQSKG SYLFGHFMSY IKMVPGDSAG TVTAFYLSSQ	100
Ps-EXGT1	NAEHDEIDFE FLGNRTQOPY ILQTNVFTGC QGNKEQRIFE WFDPTKEFHR	150
soybean	NAEHDEIDFE FLGNRTQOPY ILQTNVFTGC KGDREQRIFL WFDPTKEYHR	148
Azuki	NAEHDEIDFE FLGNRTQOPY ILQTNVFTGC KGDREQRIFL WFDPTQYHR	149
Consensus	NAEHDEIDFE FLGNRTQOPY ILQTNVFTGC KGDREQRIFL WFDPTKEYHR	150
Ps-EXGT1	YSILWMMYQI VFYVDDVPIR VFKNSKDLGV KPPFDQPMKI YNSLWNAADDW	200
soybean	YSILWMLYQI VFFVDEVPFR VFKNSKDLGV KPPFDQPMKI YNSLWNAADDW	198
Azuki	YSVLEWMMYQI VFYVDDYPIR VFKNSNDLGV KPPFNQPMKI YNSLWNAADDW	199
Consensus	YSILWMMYQI VFYVDDVPIR VFKNSKDLGV KPPFDQPMKI YNSLWNAADDW	200
Ps-EXGT1	ATRGGLEKTD WSKAPPIAGY KSFHIDGCEA SVNAKFCATQ GKRWWDOVEF	250
soybean	ATRGGLEKTD WSKAPPIAAY KGFHIDGCEA SVNAKFCDTQ GKRWWDOPEF	248
Azuki	ATRGGLEKTD WSKAPPIASY KGFHIDGCEA SVNAKFCDTQ GKRWWDOPEF	249
Consensus	ATRGGLEKTD WSKAPPIA-Y KGFHIDGCEA SVNAKFCDTQ GKRWWDOPEF	250
Ps-EXGT1	RDLDAAQWRR LKVVREKFTI YNYCNDKRL PQIPP-ECKR DRDI	293
soybean	RDLDAAQWRR ERVVRQKYTI YNYCTDTKRY PHISPPECKR DRDI	292
Azuki	RDLDAAQWQK LAWVRNKYTI YNYCTDRKRY SQVPP-ECTR DRDI	292
Consensus	RDLDAAQWRR L-WVR-KYTI YNYCTDRKRY PQIPP-ECKR DRDI	294

Fig. 6A Alignment of the amino acid sequence of *Ps-EXGT1*. *Ps-EXGT1* cDNA and the corresponding genes from other plant species, soybean and Azuki bean.

になった(Fig. 5B). また, オーキシンに応答して発現が上昇する IAA4/5 遺伝子の蓄積が水分屈性による根の屈曲に伴って変動することが明らかになった(Fig. 5C). このことから, 水分屈性の発現時に見られる細胞の偏差生長にオーキシンが関与している可能性が示唆された.

第3章 根の水分屈性における偏差生長機構

水分屈性発現時における偏差生長を解析し, そこに働く細胞壁中の酵素を遺伝子, タンパクレベルで解析した.

水分屈性において, 実際に偏差生長が起こる根の伸長帯を走査型電子顕微鏡で観察し, 同時にパラフィン切片を作成して光学顕微鏡下で観察した. その結果, 根の伸長帯において, 浸透圧が高い寒天片を付けた側で, 皮層細胞の伸長が平均 260% 大きいことが明らかになり, 根の水分屈性における屈曲は細胞の偏差的な伸長生長によって起こることが確認された.

そこで, 細胞の伸長に直接的に関わる細胞壁酵素であると考えられるエンド型キシログルカン転移酵素(EXGT)の遺伝子発現と水分屈性の関係を解析した. まず, エンド型キシログルカン転移酵素遺伝子と相同性が高い部分を *ageotropum* エンドウから RT-PCR 法によって単離し, その全長を決定した. このクローンを *Ps-EXGT1* と命名し, 各組織での発現レベル, また伸長生長との関係をノーザン法で解析したところ, *Ps-EXGT1* は組織の伸長が盛んな部位で多く蓄積していることが明らかとなり, 細胞伸長に働く酵素をコードしている可能性が極めて高いことが示唆された(Fig. 6A). また, 根の水分屈性の発現との関係を検討したところ, 水分屈性による根の屈曲に伴い, 根が受ける水分勾配によって mRNA の蓄積量が根の組織中で偏差的に変動することが明らかになった(Fig. 6B). また, このとき, mRNA 蓄積量に伴って EXGT タンパクが特に表皮細胞で多く発現していることが明らかになり, その結果は *in situ* ハイブリダイゼーション解析によっても確認することができた(Fig. 6C, D).

まとめ

本研究で明らかになった成果をもとに, 水分屈性発現機構のモデルを構築し, それを Fig.7 に示した.

すなわち, 水分勾配(Water gradient)を感受した根は, 乾燥(Dry)を避け, 水分の多い(Wet)方向に屈曲し, 正の水分屈性を示す. この屈曲は水分勾配が与えられてから 3-4 時間が経過してから認められるようになり, 6-8 時間後に屈曲角度の最初のピークを迎える. その後, この屈曲は一定のリズムを持って運動し, 最終的に水分の多い方向に伸長する. 水分勾配が与えられてから, 最初の 6 時間の間に少なくとも以下の A-G のステップが起こるものと考えられる. **A:** 根は先端 1-2 mm の根冠(Root cap)において外界の水分勾配を感受

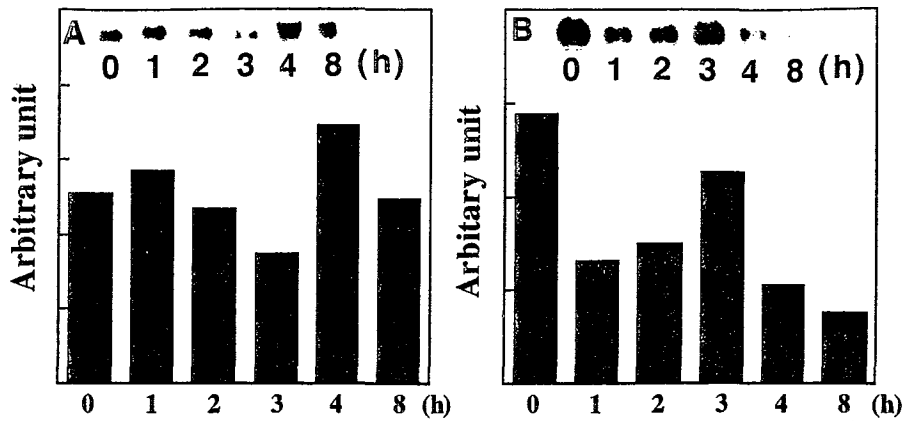


Fig. 6B A time-course study of the differential expression of *Ps-EXGT1* in hydrotropically responding *ageotropum* roots. Roots were hydrotropically stimulated. For RNA extraction, 8-mm portions of the apical roots were longitudinally halved for 40 roots (40 halves weighed more than 400 mg). Changes in *Ps-EXGT1* accumulation on the side of the higher water potential (A) and those on the side of the lower water potential (B). The upper inset of Northern blotting sheet shows the *Ps-EXGT1* accumulation in the root halves of the higher water potential side and those of the lower water potential side.

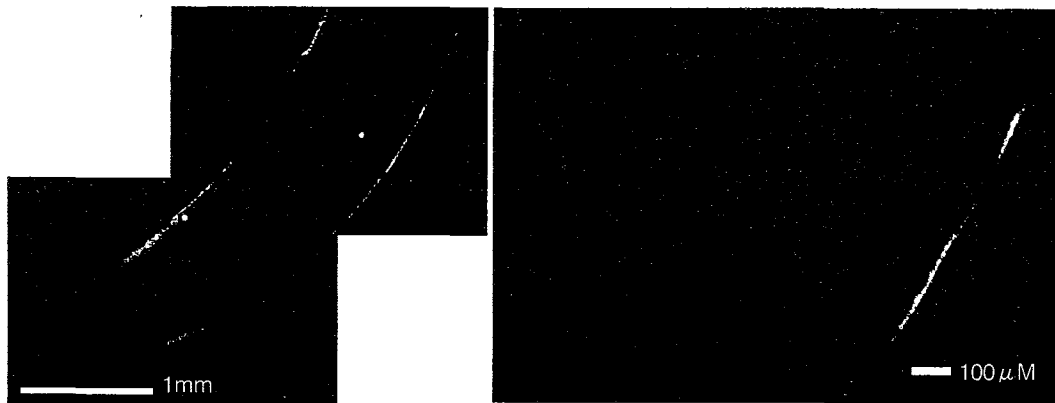


Fig. 6C The expression of the EXGT in hydrotropically responding *ageotropum* roots stained with anti-EXGT antibody. Roots were hydrotropically stimulated for 6 h. Eight-mm portions of the apical roots were longitudinally sectioned.

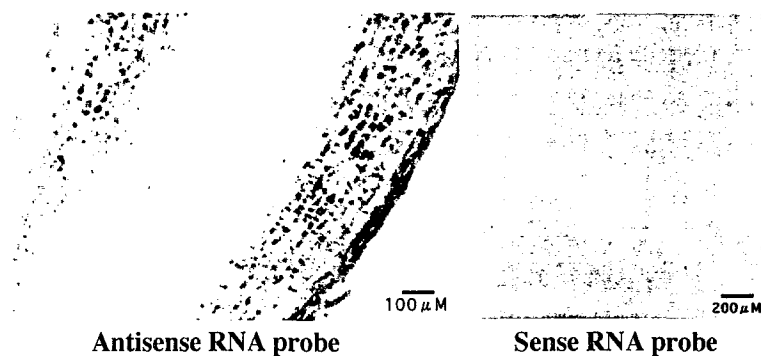


Fig. 6D Detailed *in situ* hybridization pattern of *Ps-EXGT1* in hydrotropically responding *ageotropum* roots. Roots were hydrotropically stimulated and observed 3 h after the application of water potential gradient. The expression was much stronger on the side of the lower water potential than on the higher water potential. Sense probes were hybridized as back-ground control.

する。この場合、 0.5 MPa mm^{-1} 以下の水ポテンシャル差で屈曲を開始する。B: 水分勾配を感受した根冠細胞内に細胞外からのカルシウムイオンが流入する。この流入は電位に非依存的なチャンネルを介する。C: 根冠で水分勾配を感受した後、伸長帯(Elongation zone)を含む領域でオーキシン(Auxin)の不均衡分布が生じる。この場合、オーキシンは水分ポテンシャルが高い側に多く集積する。D: 根の伸長帯において、水ポテンシャルが高い側の細胞の表層微小管(MT)の配向が変化する。E: 屈曲の開始に先立って、水ポテンシャルが低い側の伸長帯において、偏差的に細胞壁の伸展性に関与するエンド型キシログルカン転移酵素(EXGT)遺伝子の転写が一時的に上昇する。F: 根冠が水分勾配を感受して、EXGT 遺伝子は少なくとも 4 時間以内に翻訳され、そのタンパクが機能する。G: EXGT タンパクの偏差的な局在が、細胞の偏差生長を誘導して水分屈性が発現する。

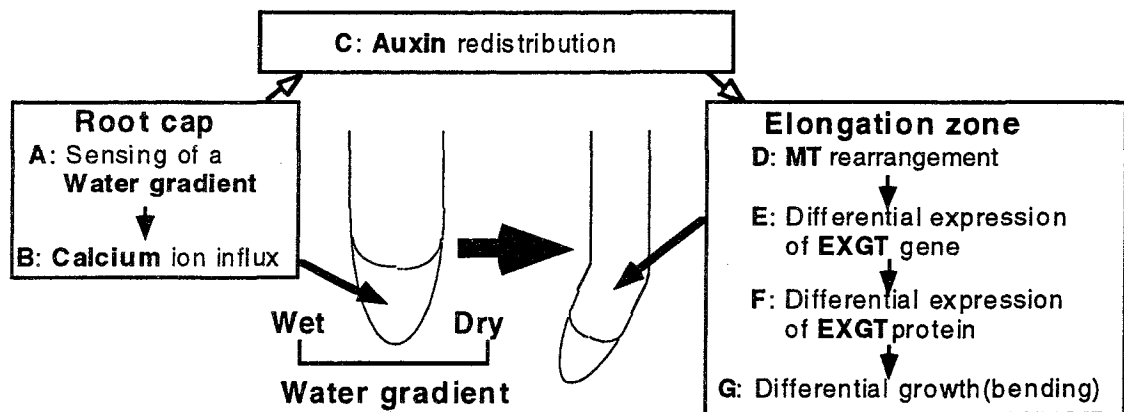


Fig. 7 A hypothesis for the mechanism of hydrotropism in seedling roots.

以上の結果から、水分屈性は根冠による水ポテンシャル勾配の感受によって生じ、それによって生起する生体情報が実際の屈曲部位である伸長帯に伝達されて、EXGT による細胞壁の再構築および細胞壁の表層微小管の配向変化を伴った偏差生長を誘起し、その場合の根冠での刺激感受あるいはシグナル伝達機構にカルシウムおよびオーキシンが重要な役割を演じていることが明らかになった。また、水分屈性の発現に必要な水ポテンシャル勾配は 0.5 MPa mm^{-1} 以下であることが明らかになり、これは地中環境あるいは地表でも十分に存在し得る水ポテンシャル勾配であることから、根の水分屈性は自然界で水ストレス回避のために機能しているものと考えられた。

論文審査結果要旨

根の水分屈性は、植物が乾燥ストレスを回避するために機能すると考えられている。しかし、根の伸長方向は重力屈性によって干渉され、根の水分屈性を研究するための実験系が確立されていなかったこともあり、その発現機構についてはほとんど明らかにされていない。本研究は、エンドウの重力屈性突然変異体を用いて根の水分屈性実験系を確立するとともに、水分屈性発現機構におけるカルシウムイオンとオーキシンの役割を明らかにし、さらに、その偏差成長を制御する細胞壁酵素遺伝子をクローニングして、その遺伝子発現と水分屈性の関係を明らかにしたものである。

まず第一に、根の水分屈性発現のための水ポテンシャル勾配を検討し、根冠における $0.5\text{--}1.5\text{ MPa mm}^{-1}$ の水ポテンシャル勾配が正の水分屈性を誘発すること、また、根冠に水分勾配センサーの存在することを見いだした。さらに、突然変異体、正常種、クリノスタットを用いた解析から、地球上では、根の伸長方向が水分屈性と重力屈性の相互作用の結果として決定されることを示した。

第二に、根の水分屈性における生理的要因について検討した結果、カルシウムイオンとオーキシンの動態が水分屈性の発現に重要な役割を果たしていることが明らかになった。カルシウム、カルシウムキレート剤、カルシウムチャンネル阻害剤、カルシウムイオノファなどを用いた解析から、水分屈性の発現には根冠における細胞外カルシウムが不可欠であり、水分勾配が制御するカルシウムチャンネルの開閉によって生ずる偏差的なカルシウムイオンの細胞内流入が関与することを示した。さらに、トレーサー実験、オーキシン制御遺伝子 (*PS-IAA4/5*) の発現解析、細胞壁の表層微小管の配向の観察から、水分屈性を発現している根ではオーキシンが偏差的に分布し、高水分側に比較して低水分側でオーキシン濃度の減少が生じて、偏差成長が誘導されることを明らかにした。

第三に、水分屈性における偏差成長の仕組みを明らかにするために、細胞壁酵素であるエンド型キシログルカン転移酵素遺伝子を単離し (*PS-EXGT1* と命名した)、その構造解析を行うとともに、*PS-EXGT1* の発現と水分屈性の関係を解析した。その結果、*PS-EXGT1* が根の伸長成長に深く関与し、水分屈性の発現と関連して、その mRNA の蓄積量が偏差的に変動することが明らかになった。

以上のように、本研究は根における水分屈性実験系を確立し、その発現にかかわる要因を解明し、はじめて根の水分屈性の発現機構のモデルを提唱した。また、根の成長を制御する細胞壁酵素遺伝子の単離に成功したことの意義も大きい。これらの成果によって、根の成長制御と環境応答のメカニズムに関する今後の研究の発展が大いに期待できるだけでなく、半乾燥地などの特殊環境下での作物栽培のための根の成長制御に結びつく研究への応用が可能になった。したがって、審査員一同は、本論文の著者に対して、博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。