

食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

研究課題	新規乾燥耐性機構の研究
研究種別	<input type="checkbox"/> 共同 <input checked="" type="checkbox"/> 個人
研究組織	農学部 資源生物科学科 助教 玉井鉄宗
研究期間	<input type="checkbox"/> 1年研究 <input checked="" type="checkbox"/> 2年研究
キーワード	(1) 乾燥耐性 (2) オオムギ (3) 根 (4) 中心柱 (5) DNA マイクロアレイ (6) RT-PCR

1. 研究計画(簡潔にまとめて記入してください。)

陸生植物の進化的視点や、乾燥地域における作物増収の観点から、植物の乾燥耐性機構に関する研究は古くから盛んに行われている。そんな中、オオムギ幼植物が急激で極端な乾燥状態となっても、再び水分を与えれば生育が回復することを見出した。このような乾燥耐性の報告は今までになく、新規な乾燥耐性として、その機構を解明することを目的としている。

この機構の解明のために、①新規乾燥耐性現象の形態的・生理的応答を明らかにし、②その現象の遺伝子発現応答を明らかにする実験を行う。

①新規乾燥耐性現象の形態的・生理的応答

- 水耕栽培したオオムギ幼植物を培養液から取り出し、その後の新鮮重の減少過程を観察する。また、それを再び培養液中に入れ、新鮮重の増加過程を観察する。
- 完全に乾燥した根部を、種々のカリウム濃度の培養液に入れ、地上部の回復状態を観察する。
- 根の乾燥部と非乾燥部の横断面切片を作成し、顕微鏡下で観察する。

②乾燥、水の再吸収後の遺伝子発現変化

- 乾燥していない根、乾燥した根、水を再吸収した根から全 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析に供する。
- DNA マイクロアレイ解析の結果、RNA 発現量に著しい変化が見られる遺伝子やハウスキーピング遺伝子に関して、リアルタイム PCR を用いて、その発現解析を行う。

2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

①新規乾燥耐性現象の形態的・生理的応答

水耕栽培したオオムギ幼植物を培養液から出し、根の水分を拭き取った時間を 0 分（乾燥開始）とすると、時間とともに地上部は萎れ始め、30 分後には地上部が約 45 度傾き、60 分後には完全に二つ折れになった。しかし、再び根部を培養液中に浸すと、30 分後、60 分後には、それぞれ約 45 度、約 90 度地上部が持ち上がり、120 分後には完全にもとの状態にまで回復した（図 1）。

乾燥時における根の新鮮重の変化を観察すると、乾燥開始後 5 分で根の新鮮重が約 50%まで急減し、10 分では約 25%まで、30 分では約 10%まで減少し 60 分まではほぼ変化しなかった。乾燥開始後 60 分に再び培養液に根を浸すと、急激に新鮮重が増加し、再吸収後 5 分で、元の新鮮重の約 50%まで回復し、増加速度は緩やかにはなるものの、60 分後には元の約 80%まで回復した。しかし、再吸収時にエタノール水溶液を加えると、全く新鮮重の増加はみられなかった（図 2）。このことは、水の再吸収は細胞膜を介した現象であり、オオムギの根は、完全に乾燥した状態になっても、積極的に水を吸収する能力を有していることが示唆された。

再吸収時の培養液の組成が、乾燥耐性（地上部の萎れた状態からの回復）に影響を与えるのかについても検証した。0mM、1mM、10mM、100mM KCl 水溶液を培養液として用い、2 時間乾燥させたオオムギ幼植物に与えた。その結果、24 時間後、完全に地上部が元の状態まで回復したのは 0mMKCl 水溶液のみで、濃度が濃くなるにつれて回復状態が悪化した。100mM KCl 水溶液では、全く水が地上部に輸送されておらず、その後、栽培を継続すると枯死した（図 3）。これらのことは、再吸収時の根部細胞のカリウム含量が少なく、培養液との間にカリウムイオンの濃度勾配があると水が細胞内に取り込まれない可能性が考えられた。このことは、急激な乾燥によって水輸送担体（アクアポリン）の活性は維持されるが、カリウム輸送担体（カリウムチャンネル）が失活することを示唆している。この点に関しては、現在検証中である。

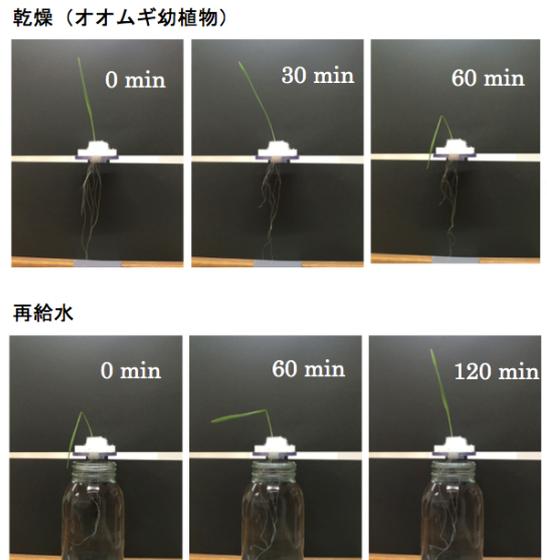


図 1

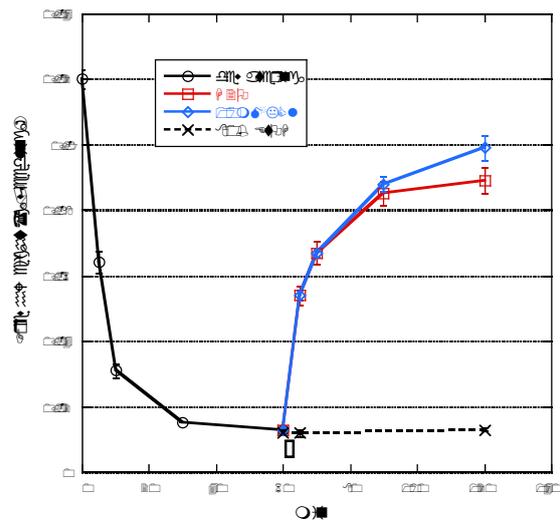


図 2

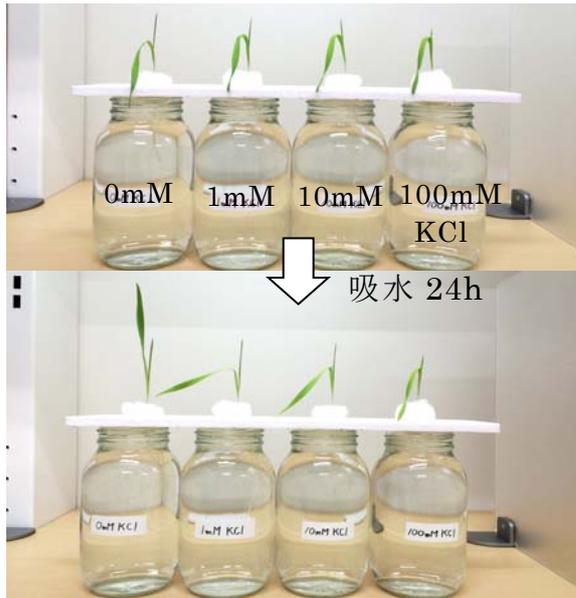


図 3

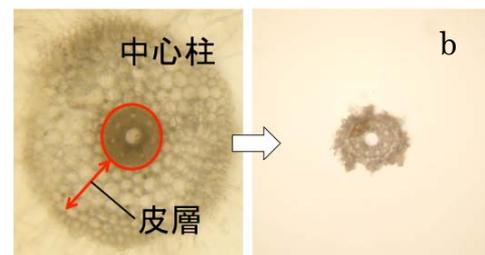
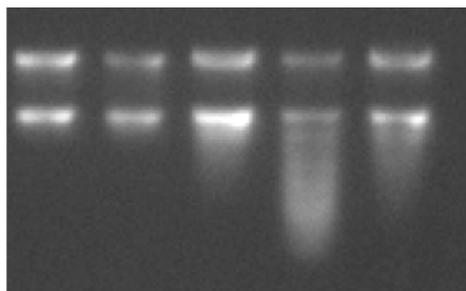


図 4

根の先端部さえ培養液中にあれば、オオムギは根の上部が完全に乾燥しても正常に生育することを見出した（図 4 a）。顕微鏡で乾燥部と非乾燥部の横断面を観察すると、乾燥部では非乾燥部に見られる皮層部が消失し、内皮に囲まれた中心柱のみが存在していた（図 4 b）。正常な養分吸収、光合成産物の転流が行われていることから、乾燥状態でも中心柱は機能を失わないことが示された。これは、乾燥に対する長期的応答であるとも考えられ、乾燥に対しては、上記のように短期的応答と長期的応答があることが考えられた。

②乾燥、水の再吸収後の遺伝子発現変化

乾燥前の根部、乾燥後 60 分の根部（基部は乾燥、先端部は乾燥せず）、再吸水後 60 分の根部（基部、先端部）から全 RNA を抽出し、電気泳動を行った結果、乾燥後 60 分の根部ではリボソーム RNA は分解されていないが、再吸水後 60 分の基部ではリボソーム RNA の一部が分解されていることが判明した。



- a: 乾燥前
- b: 乾燥後（基部）
- c: 乾燥後（先端部）
- d: 再吸水後（基部）
- e: 再吸水後（先端部）

図 5

これらの各部位から抽出した RNA を、DNA マイクロアレイ解析に供した結果、短期的乾燥応答として、多数の遺伝子の発現が促進あるいは抑制されることが明らかとなった。これらの遺伝子をリアルタイム PCR に供して発現解析を行うために、まず、発現の基準となる遺伝子 (reference gene) の検索を行った。

その候補として、一般に多用されるハウスキーピング遺伝子のアクチン (ACT) やグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子に加えて、近年、Ferdous らによって報告されたストレス条件下で有効な reference gene の ADP-Ribosylation factor 1-like protein (ADP) 遺伝子を用いて検証した。これらの遺伝子を特異的に複製できるプライマーの設計を行い、リアルタイム PCR に供した。その結果、ACT と GAPDH 遺伝子は、全処理条件においても発現量は大きく変化せず、相対発現量比 GAPDH/ACT はほぼ 1.0 であった (図 6 a)。一方、ADP は、乾燥後の先端部 (直接は乾燥していない) で発現量が増加し、乾燥後の基部や再吸水後の基部でも増加傾向にあった (図 6 b)。したがって、本実験においては、reference gene として ADP 遺伝子を用いることは適さないと考えられたため、ACT あるいは GAPDH 遺伝子を用いることとした。

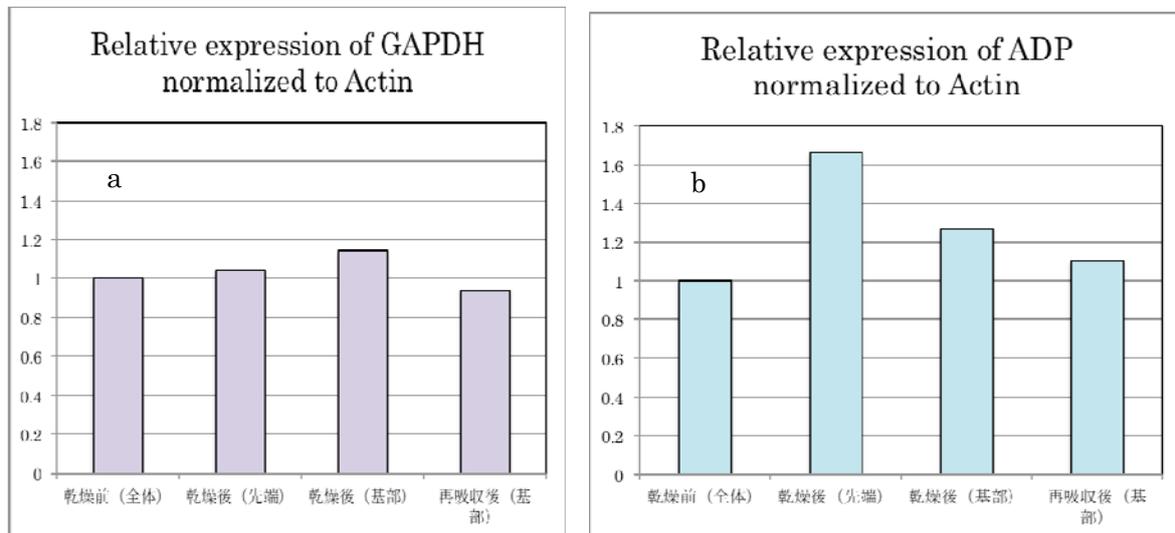


図 6

次に、乾燥時においては遺伝子発現が抑制され、水の再吸収によって発現が促進される遺伝子として、Pirin 遺伝子に注目した。Pirin は、転写制御やアポトーシスなどに関与していると考えられているが、特に植物において、その機能は不明な点が多い。DNA マイクロアレイ解析によると、本乾燥耐性において強く関与すると考えられる遺伝子の一つとして Pirin 遺伝子を見出した。DNA マイクロアレイ解析によって、Pirin 遺伝子の発現量は、乾燥前の根の発現量に比較して、乾燥した根の基部で減少し ($\log_2 \text{ ratio} = -2.5$)、逆に乾燥していない根の先端部では増加する ($\log_2 \text{ ratio} = 1.88$) ことが示唆された。また、乾燥した根の基部を再吸水させると爆発的にその発現量が増加すること ($\log_2 \text{ ratio} = 6.50$) が示唆された。

そこで、Pirin を特異的に検出できるプライマーを設計し、リアルタイム PCR によって、各条件下での発現解析を行った。ACT 遺伝子を reference gene とし

て、Pirin の発現量を比較すると、乾燥直後の先端部では、乾燥前の根よりも相対的発現量が約 1.6 倍に増加していた。また、乾燥後の基部では逆に、Pirin の相対的発現量は、乾燥前の 20%程度にまで減少していた。続いて乾燥した基部に水を再吸収させると、約 2 倍程度発現量が増加した (図 7 a)。これらの結果は、reference gene として GAPDH 遺伝子を用いた場合も同様であった (図 7 b)。以上のことは、Pirin が本乾燥耐性機構に深く関与している可能性を示唆している。

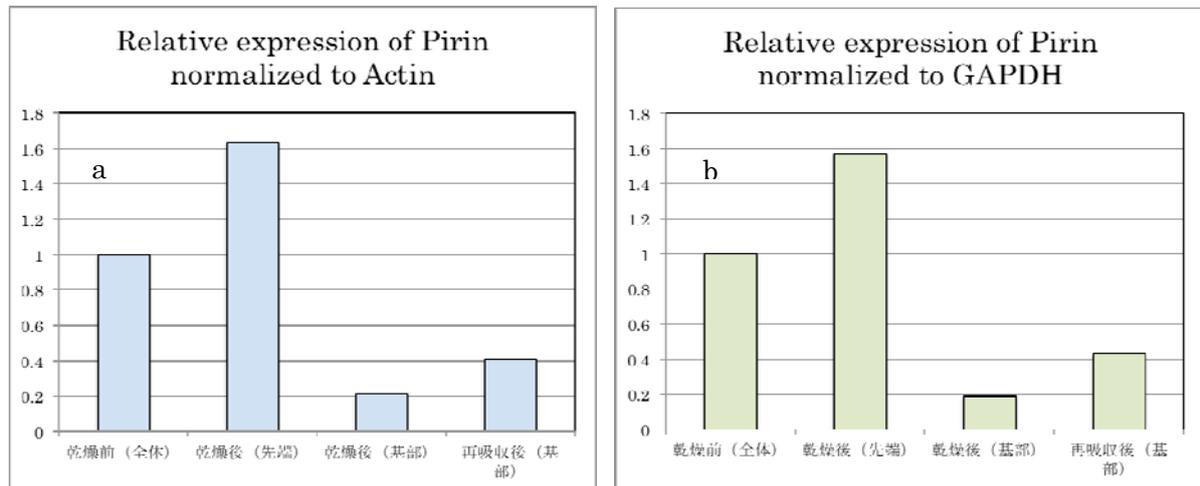


図 7

Pirin は、トマトやオオムギにおいて、プログラムされた細胞死 (アポトーシス) の制御に関係しているという報告がある。本乾燥耐性に関しても、アポトーシスを介した耐性獲得のしくみがあるものと推察される。興味深いのは、直接乾燥していない先端部でも Pirin が乾燥に対して応答している点である。根基部の長期的乾燥において、常に培養液に接している先端部は、著しく側根が発達し、根の表面積を増加させている (図 4 a)。Pirin は、アラビドプシスにおいて、種子の発芽や幼植物の発達にも関与していることが示唆されており、オオムギでも同様に側根分化の過程に関与している可能施が高いと考えられた。

今後、さらなる分子的機構を明らかにしていくとともに、圃場環境でも同様の乾燥耐性機構が機能しているかを検証していく予定である。