

イネが水田で育つために最適な根を生み出すしくみを解明 ～イネ科畑作物の耐湿性育種への応用に道筋～

【本研究のポイント】

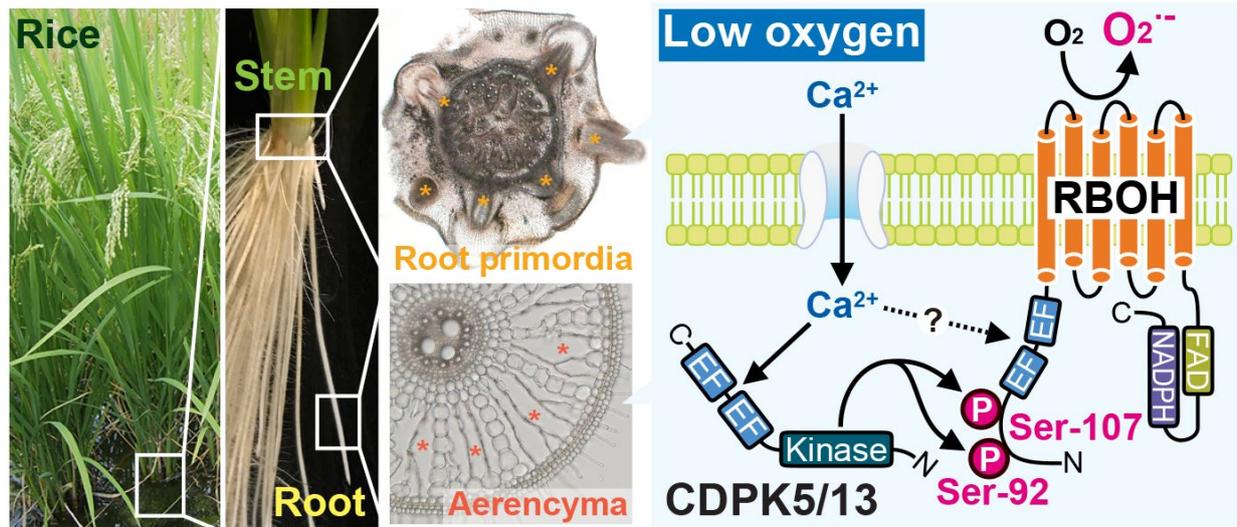
- ・イネのカルシウム依存性プロテインキナーゼ(CDPK)^{注1)}は活性酸素種^{注2)}の生成を担うNADPH オキシダーゼ(RBOH)^{注3)}をリン酸化によって活性化し、不定根^{注4)}における低酸素誘導的な通気組織形成^{注5)}を促進することを解明した。
- ・イネの CDPK と RBOH が誘導的な通気組織形成だけではなく、被子植物に共通の低酸素応答機構の1つである不定根の発生を制御することを明らかにした。
- ・水田のような冠水土壤^{注6)}で育つイネが低酸素に応答して植物体内の酸素の通り道である通気組織を広範囲に形成した不定根を発生させるしくみを解明したことで、耐湿性の強い畑作物品種を作出するための道筋が示された。

【研究概要】

名古屋大学大学院生命農学研究科の李京霞(リ ジンシア) 博士後期課程学生、中園幹生 教授、生物機能開発利用研究センターの山内 卓樹 准教授、大学院生命農学研究科の吉岡 博文 准教授、高橋 宏和 准教授、遺伝子実験施設の多田 安臣 教授、野元 美佳 講師らの共同研究グループは、イネが水田のような酸素の欠乏した冠水土壤に適應するために、カルシウム依存的に生成される活性酸素種をシグナルとして、植物体内の酸素の通り道である通気組織と呼ばれる空隙を形成するとともに、通気組織を広範囲にもつ適應的な根を生み出すしくみを解明しました。

近年の異常気象により、局所的な大量の降雨による農作物の被害が世界的に深刻化しています。国内では、水はけの悪い水田転換畑で多くの畑作物が栽培されている現状から、耐湿性の強い畑作物品種の作出が求められています。本研究の成果によって、コムギやトウモロコシなどの農業上重要なイネ科畑作物に対して、通気組織を広範囲にもつ適應的な根を多く生み出す能力を賦与し、耐湿性の強い畑作物品種を育成するための新たな道筋が示されました。

本研究成果は、2024年6月7日付アメリカ植物生理学会の学会誌「Plant Physiology」電子版に掲載されました。



【研究背景】

植物の根は、土壌中の酸素を好氣的呼吸に利用して生命活動の維持に必要なエネルギーを産み出しています。しかし、大量の降雨によって土壌中の酸素が欠乏すると、植物の根は呼吸によって十分なエネルギーを産生できず、成長は阻害されます。長期的な土壌の冠水は、耐湿性の弱い畑作物の収量を著しく低下させることから、畑作物の耐湿性の強化は農業上重要な課題の 1 つです。そのためにもまず、水田作物であるイネが冠水土壌にどのように適応しているのかを理解することが求められます。

通気組織は、植物体内に形成される空隙であり、地上部から根端部への酸素の拡散を促進します(図1)。農業上重要な作物を多く含むイネ科植物は、土壌の冠水に応答して根の皮層に誘導的な通気組織を形成しますが、水田作物のイネはコムギやトウモロコシなどの畑作物と比べて早く広範囲に通気組織を形成します。これらのことから、誘導的通気組織形成は耐湿性に寄与する重要な形質であり、そのしくみを理解することは低酸素応答に関連する研究分野においても極めて重要な課題です。

これまでに、calcium-dependent protein kinase (CDPK) による respiratory burst oxidase homolog(RBOH)の活性化が、皮層における活性酸素種の蓄積と通気組織形成の誘導に関与することがわかっていましたが、詳細な分子メカニズムは未解明のままです。

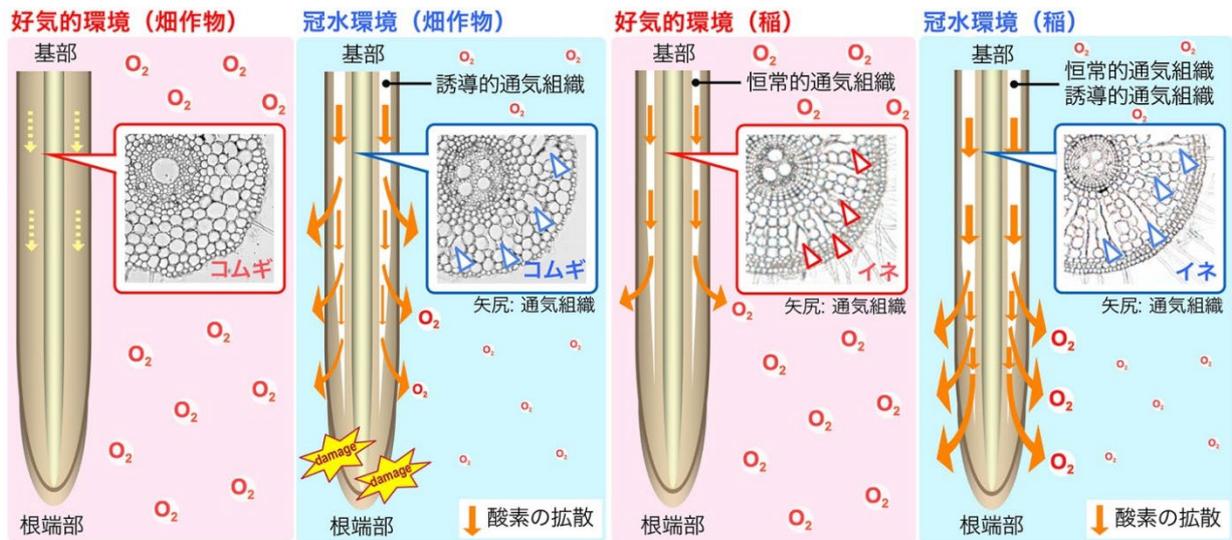


図 1. イネ科畑作物とイネの不定根における通气組織形成とその機能的意義

イネ科畑作物は、土壌の冠水による酸素濃度の低下に応答して誘導的に通气組織を形成する。一方、イネは好気的環境でも恒常的に通气組織を形成するとともに、土壌の冠水に応答して迅速かつ広範囲に誘導的な通气組織を形成することで、根端部に効率よく酸素を供給する。

【研究内容】

本研究では、CDPKによるRBOHの活性化の詳細なメカニズムを理解するために、低酸素誘導的な通气組織形成が起こる不定根で強く発現する4つのCDPKに注目しました。これらのタンパク質の細胞内局在をベンサミアナタバコの葉でGFP融合タンパク質を発現させて評価した結果、RBOHが機能する細胞膜上にCDPK5とCDPK13のみが局在しました。そこで、誘導的な通气組織形成に関与することが知られているRBOHHのアミノ酸配列の中から、CDPKによるリン酸化を受ける可能性が高い92番目と107番目のセリン残基(図4参照)に注目し、CDPK5とCDPK13によるRBOHHの活性化との関連を検討しました。

ベンサミアナタバコの葉でこれらのCDPKとRBOHHを共発現させた結果、RBOHHの92番目と107番目のセリン残基をアラニンに置換することで、RBOHHによる活性酸素種の生成が抑制されました(図2)。つまり、イネのCDPK5とCDPK13はRBOHHのリン酸化を通して活性酸素種の蓄積を促進し、皮層の細胞死と通气組織形成を誘導することが示されました。

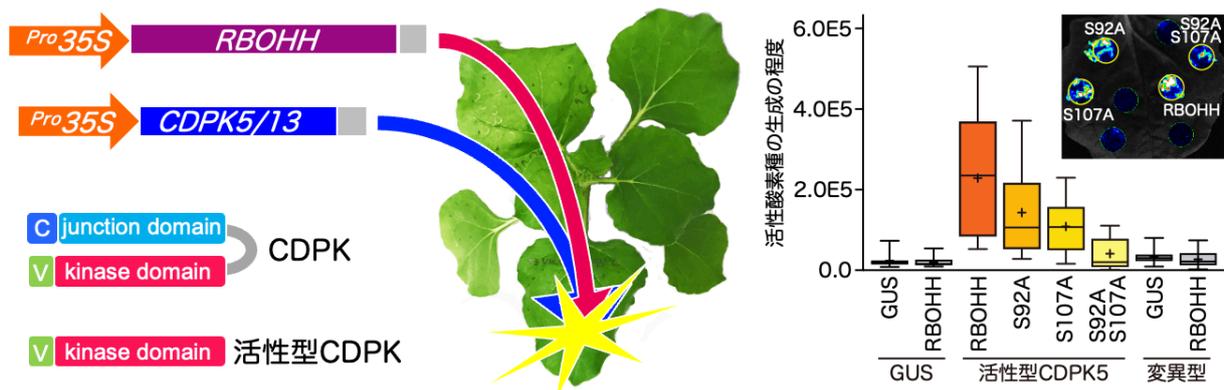


図 2. ベンサミアナタバコでの CDPK5/13 と RBOHH の一過的発現による活性酸素種の定量

ベンサミアナタバコの葉に CDPK と RBOHH を共発現させて活性酸素種を定量した。活性型 CDPK を RBOHH と共発現させた場合に強い活性酸素種の生成がみられた。一方、RBOHH の 92 番目と 107 番目のセリン残基をアラニンに置換すると、活性酸素種の生成が抑制された。

CDPK5 と CDPK13 がイネの不定根における低酸素誘導的な通気組織形成を制御する可能性を検討するために、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集^{注 7)}によって *CDPK5* と *CDPK13* の二重変異体(以下、*cdpk5 cdpk13*)を作出し、低酸素条件における通気組織形成の程度を評価しました。その結果、*cdpk5 cdpk13* では誘導的通気組織形成がほぼ完全に阻害されることがわかりました(図 3)。

一方、*cdpk5* または *cdpk13* の単独の変異体は、野生型と二重変異体の中間の値を示しました。これらの結果は、ベンサミアナタバコの葉で CDPK5 と CDPK13 の両方が RBOHH を活性化したことと合致したことから、CDPK5 と CDPK13 は重複して RBOHH をリン酸化して不定根における誘導的通気組織形成を制御することがわかりました。

CDPK5 と CDPK13 が属する Group I の CDPK はシロイヌナズナでは 10 個、イネでは 11 個が存在します。シロイヌナズナの病害応答における細胞死の際には、少なくとも 4 つの遺伝子が重複して機能することが知られており、イネがたった 2 つの CDPK で通気組織形成を制御することは驚くべき結果であり、植物の CDPK の理解を飛躍的に進展させることが期待されます。

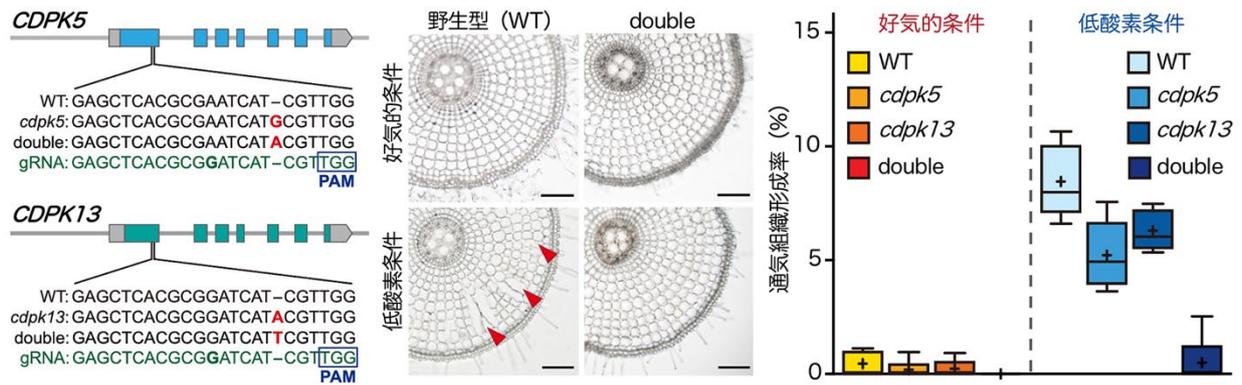


図 3. *CDPK5/13* を標的とした CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊と通气組織形成率の評価

CRISPR/Cas9 によって *CDPK5* または *CDPK13* (*cdpk5*, *cdpk13*) と両方 (double) の機能を破壊した系統を作出した。好气的条件と低酸素条件で栽培して通气組織形成の程度を野生型 (WT) と比較し、double では低酸素誘導的な通气組織がほとんど形成されず、*cdpk5* と *cdpk13* では、通气組織形成が低下することを示した。スケールバーは 100 μ m。赤い矢尻は、通气組織を示す。

CDPK と RBOH が通气組織形成に関与することはわかりましたが、そこで 1 つ疑問が生じました。イネをはじめとするイネ科植物の RBOHH は、双子葉植物の RBOHB と同じクレード^{注 8)} に属しており、CDPK によるリン酸化を受けるセリン残基がそれらの RBOH では保存されていました (図 4)。

一方、シロイヌナズナを含む多くのアブラナ科植物では根の皮層に細胞死を伴う通气組織が形成されないことから、B/H クレードの RBOH は、通气組織形成とは異なる共通の現象に関与することが想定されました。そこで、全ての被子植物に共通する低酸素応答である不定根の発生に注目しました。

好气的条件と低酸素条件で WT と *cdpk5 cdpk13* を栽培して、節の内部に生じた不定根原基の数を調べた結果、好气的条件では不定根原基^{注 4)} の数に差はみられませんでした。低酸素条件に応答した不定根原基の数の増加が *cdpk5 cdpk13* ではほとんどみられませんでした (図 5)。この結果から、Group I の CDPK と B/H クレードの RBOH は、不定根の発生の促進という被子植物に共通の役割を果たすことが示唆されました。

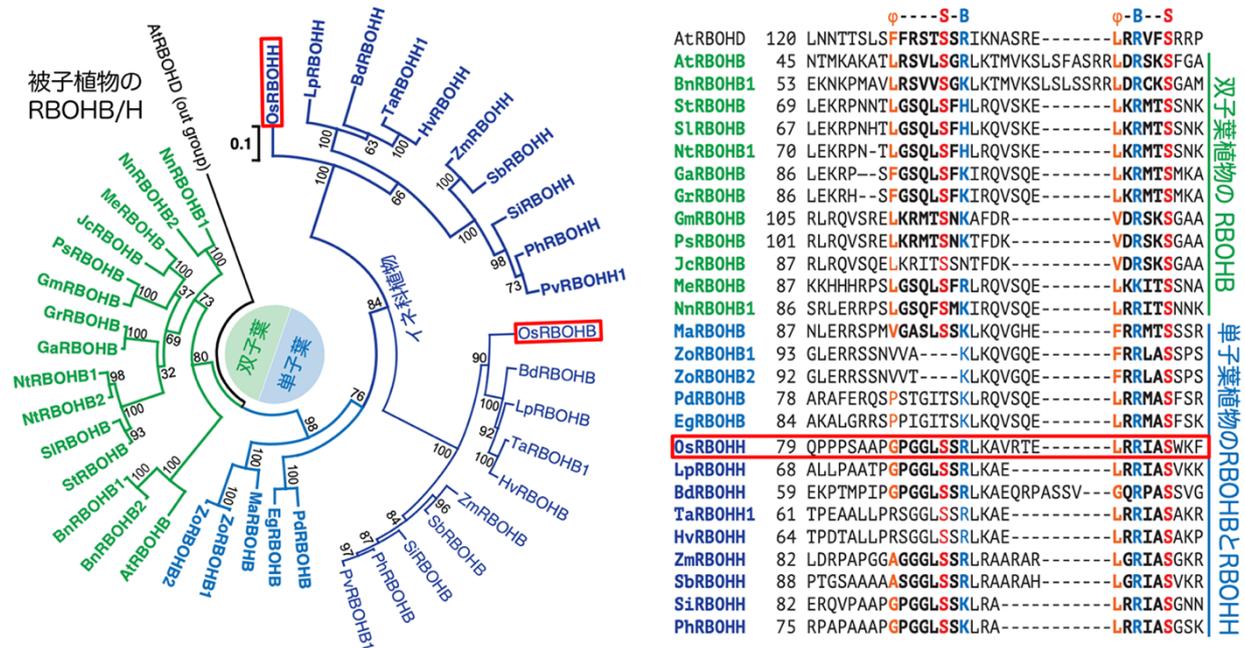


図 4. 被子植物の RBOHB/H の系統樹と CDPK のリン酸化サイトのアミノ酸配列の比較

双子葉植物とイネ科以外の単子葉植物の RBOHB およびイネ科植物の RBOHB と RBOHH のアミノ酸配列を用いて最尤法系統樹を作成した。RBOHH において CDPK によるリン酸化を受ける 92 番目と 107 番目のセリン残基(赤色の S)を他の植物種と比較した。その結果、イネ科植物の RBOHB 以外の全ての RBOHB/H で少なくとも 107 番目のセリン残基が保存されていた。φ は疎水性のアミノ酸、B は塩基性のアミノ酸を示す。双子葉植物は緑色、単子葉植物は青系統の色で示した。イネ(*Oryza sativa*)の RBOH は赤線で囲んで示した。

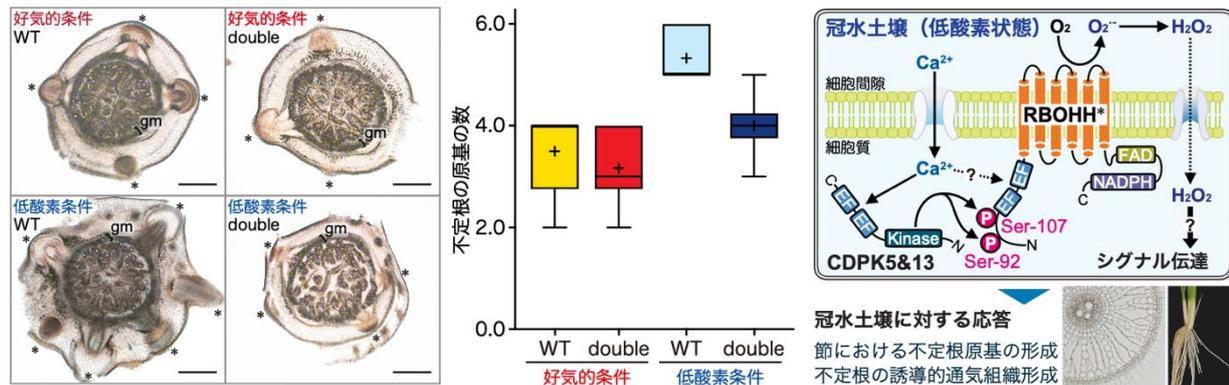


図 5. CDPK5/13 二重変異体における不定根原基の形成と CDPK を介した冠水応答のモデル

CDPK5/13 の二重変異体(double)を好气的条件と低酸素条件で栽培し、不定根原基数を野生型(WT)と比較した。WT では低酸素条件で原基数が増加したが、double では変化しなかった。スケールバーは 500 μm。アスタリスクは不定根原基の位置を示す。右側のモデルは、イネの低酸素応答時の不定根原基と誘導的通气組織の形成に CDPK5/13 と RBOHH(*その他の RBOH ホモログも関与する可能性は残っている)が重要な役割を果たすことを示した。

【成果の意義】

近年の異常気象により、局所的な大量の降雨による農作物の被害が深刻化していることから、耐湿性の強い畑作物品種の作出が求められています。今回の研究では、低酸素に応答したイネの不定根の発生と誘導的な通気組織形成の過程において、CDPK5 と CDPK13 による RBOH のリン酸化を介した活性酸素種の生成の促進が重要であることを解明しました。

不定根の発生や誘導的通気組織の形成は、その程度や速度に違いはありますが、水田作物のイネだけではなくコムギやトウモロコシなどのイネ科畑作物にも共通してみられます。そのため、畑作物の遺伝資源の中からこれらの形質が優れた品種を選抜することや、ゲノム編集を駆使して CDPK や RBOH の発現を調節することで、耐湿性の強い畑作物品種を作出できる可能性があると考えています。今後は、畑作物の耐湿性育種への応用に向けてより詳細なメカニズムの解明に取り組む必要があると考えています。

本研究は、文部科学省科学研究費助成事業学術変革領域(A)「不均一環境と植物」および日本学術振興会科学研究費助成事業の支援のもとで行われました。

【用語説明】

注 1)CDPK:

カルシウム依存性プロテインキナーゼ(calcium-dependent protein kinase; CDPK)は、細胞内に存在する Ca^{2+} に依存して活性化されることで、標的とするタンパク質をリン酸化する酵素である。特に Group I に属する一連の CDPK は、病害応答時に RBOH をリン酸化することで活性化し、シグナル分子である活性酸素種の生成を促進する。

注 2)活性酸素種:

活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)は、酸素(O_2)が還元されて生じる反応性(酸化力)の高い分子および関連する分子群の総称である。ROS には、スーパーオキシドアニオンラジカル($\text{O}_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)、過酸化水素(H_2O_2)などがある。ROS は生体内でシグナル分子として機能して様々な生命現象を制御する。

注 3) RBOH:

NADPH オキシダーゼの植物ホモログ(respiratory burst oxidase homolog; RBOH)は、細胞膜に局在して細胞膜外(apoplast)において酸素からスーパーオキシドアニオンラジカル($\text{O}_2^{\cdot-}$)を生成する。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ は、自発的または酵素反応を介して過酸化水素(H_2O_2)に変換されたのち、細胞質内(cytoplasm)に拡散してシグナル分子として機能すると考えられている。

注 4)不定根(原基):

不定根(adventitious roots)は、イネでは冠根(crown roots)とも呼ばれ、幼

根(種子胚の発生過程で形成され、双子葉植物では後に主根となる)以外の根である。イネの幼根は生育の過程で機能を失うが、複数の不定根から構成される“ひげ根状の根系”を形成する。不定根の発生の初期を不定根原基とよぶ(図 5 参照)。

注 5)通気組織:

破生通気組織(lysigenous aerenchyma)は、葉や茎、根において細胞死をともなって形成される空隙である。イネ科植物の根の皮層に形成される(破生)通気組織は2つに大別される。恒常的通気組織は、イネなどの冠水に適応した植物種のみを観察され、環境に依存せず根の成長にともない形成される。一方、低酸素に反応して形成される誘導的通気組織は形成速度や形成範囲に違いがあるが、イネ以外のイネ科畑作物の根にも観察される。

注 6)冠水土壤:

冠水土壤(waterlogged soils/flooded soils)は、長期的な降雨や水田転換畑のように水はけの悪い性質と関連して、土壤中に存在する気相が水に置き換わった土壤の状態を示す。冠水土壤では、土壤中の酸素が欠乏することで植物の根が呼吸するために必要な酸素が失われるため、湿害が発生して畑作物の収量が低下する。

注 7)CRISPR/Cas9 によるゲノム編集:

clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins 9(CRISPR/Cas9)は、標的とする遺伝子の塩基配列に相補的な短い RNA と細菌由来の DNA 切断酵素を用いてゲノム上の狙った遺伝子の機能を簡易的に高効率に改変するゲノム編集技術である。

注 8)クレード:

クレード(clade)は、分子系統学において共通の祖先(のタンパク質)から派生した子孫(のタンパク質)で構成される集団のことを指す。被子植物の多くは約 10 個の RBOH を持つが、シロイヌナズナを含む双子葉植物の RBOHB とイネ科植物の RBOHB と RBOHH は全て同一起源のタンパク質の集団として分類される。

【論文情報】

雑誌名:Plant Physiology

論文タイトル:CDPK5 and CDPK13 play key roles in acclimation to low oxygen through the control of RBOH-mediated ROS production in rice (CDPK5 と CDPK13 は RBOH を介した活性酸素種の生成を制御することでイネの低酸素への応答に重要な役割を果たす)

著者:Jingxia Li, Takahiro Ishii, Miki Yoshioka, Yuta Hino, Mika Nomoto, Yasuomi Tada, Hirofumi Yoshioka, Hirokazu Takahashi, Takaki Yamauchi, Mikio Nakazono

(李京霞、石井陽大、吉岡美樹、日野雄太、野元美佳、多田安臣、吉岡博文、高橋宏和、山内卓樹、中園 幹生)下線は本学教員

DOI: 10.1093/plphys/kiae293

Press Release

URL: <https://academic.oup.com/plphys/advance-article/doi/10.1093/plphys/kiae293/7689788?login=true>



東海国立大学機構は、岐阜大学と名古屋大学を運営する国立大学法人です。
国際的な競争力向上と地域創生への貢献を両輪とした発展を目指します。

東海国立大学機構 HP <https://www.thers.ac.jp/>

