

氏名	ハシ ヒデヒロ 林 秀洋
本籍（国籍）	岩手県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 649 号
学位授与年月日	平成 27 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	寒冷圏生命システム学 熱・生命システム学
学位論文題目	高気温下におけるイネ種子アクアポリンの動態 (Dynamics of aquaporins in developing rice grains under high temperature conditions)
学位審査委員	主査 教授 上村 松生 副査 准教授 河村 幸男 副査 教授 葛西 身延 副査 教授 加藤 清明 副査 准教授 岩崎 郁子

## 論文の内容の要旨

イネ種子は登熟中に水分含有量や形態が大きく変化する。同化産物は水と同時に篩管流により種子へと運ばれるが、圧流説に従うと篩管流の流れを促進させるためには種子背部維管束における膨圧を低く保つ必要がある。この条件を維持するため、種子背部維管束へ篩管流により運ばれてきた水の大部分は導管に吸収され排出されることにより、膨圧を低く保っていると考えられている。しかし、種子背部維管束において、効率的に水を篩管から導管へ排出する仕組みについてはよく分かっていなかった。

また、近年、登熟期間中の高温がイネの玄米品質や収量を低下させる高温登熟障害が頻発している。その高温登熟障害発生には同化産物の蓄積や水分生理が深く関わると考えられる。植物体内の水分輸送には、水やその他の電荷を持たない小分子のチャネルとして知られているアクアポリンが強く関わっている。イネにおいては 33 種類のアクアポリンが同定されており、細胞膜型の PIP、液胞膜型の TIP、NIP、SIP の 4 種類に大別される。細菌や動物と比較すると植物では多数の分子種が存在するが、植物は自力で移動することができないため、外界の不良環境に対応して鋭敏に応答するためではないかと考えられている。これまでの研究から、アクアポリンの遺伝子発現や環境要因に対する応答、局在性、水透過活性が報告されており、それぞれの分子種が個性を持っていることが明らかとなっている。しかし、根や葉と比較すると花器官や登熟中の種子における役割についてはこれまで情報が限られていた。そこで本研究では、全イネアクアポリン分子種を対象に花器官および登熟中の種子において重要であると考えられる分子種の特定を試みた。次に、特定した分子種について、水透過活性および局在性を測定し、特徴を明らかにした。さらに、登熟中期に高気温処理を行い、アクアポリンの発現および種子の登熟におよぼす影響を検討した。

花器官を出穂日の葯、雌蕊、花糸、鱗被に分けて全アクアポリン分子種の発現を real-time

PCR 法により明らかにした。葯においては 9 種類、雌蕊においては 11 種類のアクアポリンが多量に発現していた。花糸と鱗被ではそれぞれ 6 種類が多量に発現していた。その中でも *OsTIP4;2* は鱗被と花糸において最も多く発現していた分子種であり、鱗被においては全アクアポリン発現量の 73.8% を占めていた。このことから *OsTIP4;2* は、開花の際の花糸の伸長や、鱗被の膨潤において水輸送の役割を担っていることが考えられた。

登熟中期の種子においては *OsPIP2;1* と *OsTIP3;1* が全アクアポリン発現量の大部分を占めていることが明らかとなった。イムノブロット法による解析においても *OsPIP2;1* と *OsTIP3;1* は遺伝子発現と同じような量的変化が確認された。このうち、*OsTIP3;1* を酵母膜へ発現させ、ストップフロー法によって水透過活性を測定した。ポジティブコントロールとして水透過活性が高いことが明らかとなっている *OsPIP2;5* を、ネガティブコントロールとしてベクターコントロールを用いた。*OsTIP3;1* の水透過活性は *OsPIP2;5* の 6 分の 1 程度で、ベクターコントロールとほぼ同等であった。ついで、免疫組織染色法により出穂後 12 日目 (12 DAH) の種子切片における *OsPIP2;1* の局在性を調査したところ、胚乳、珠心突起、珠心表皮および背部維管束に局在が確認されたが、糊粉層には局在していなかった。一方、*OsTIP3;1* は胚乳および糊粉層に局在していた。さらに、細胞内における局在をイムノブロット法により検討したところ、*OsTIP3;1* のみがオイルボディ膜に局在している可能性が示唆された。次に、*OsTIP3;1* のプロモーター部位を GUS と連結したコンストラクトをイネに導入し、登熟種子における GUS の発現を時期別に調べたところ、7 DAH 以降に胚乳と糊粉層において発現が確認された。このことは、*OsTIP3;1* の遺伝子発現時期と一致し、免疫組織染色における局在性とも一致していた。以上のことから、*OsPIP2;1* と *OsTIP3;1* は発現時期が似ているものの、それぞれ異なる特徴を持っていることが明らかとなり、登熟種子中において異なる役割を担っていることが示唆された。*OsPIP2;1* については水透過活性が高いことが明らかにされていること (Sakurai et al. 2008) から、様々な組織において細胞間の水の拡散に関与することが示唆された。一方で、*OsTIP3;1* は登熟種子における水透過にはほとんど関与しないことが示唆された。

さらに、登熟期間中に高気温処理を行い、種子の重量、水分含有量およびアクアポリンの発現におよぼす影響について調査した。高気温処理は人工気象室内と野外圃場において 7 DAH から 21 DAH まで 2 週間行った。高気温処理は、種子における *OsPIP2;1* 発現の 10~20 DAH の期間における増加を抑制したが、*OsTIP3;1* の発現量にはほとんど影響をおよぼさなかった。同時に、高気温処理によって種子乾重の増加が抑制された。効率的な同化産物の輸送には篩管流の流れを滞らせることなく水が導管へ吸収され、篩管の膨圧を低く保つことが必要である。12 DAH の種子は背部維管束周辺に *OsPIP2;1* を局在させ水透過性を上昇させるとともに、糊粉層には *OsTIP3;1* のみを局在させて水を通しにくくすることによって篩管から導管への水の流れの方向性をコントロールしていることが考えられた。また、種子の水分含有率の減少にはアクアポリンの寄与は大きくなく、夜間における飽差の影響が大きいことが示唆された。本研究は登熟種子における *OsPIP2;1* の重要性を初めて位置付けたものである。*OsPIP2;1* は種子における水の拡散に寄与するだけでなく、篩管流を促進することにより同化産物の蓄積にも寄与していることが考えられた。しかし、本研究においては、*OsTIP3;1* の水透過活性におよぼすリン酸化の影響等の活性調節機構については調査していないため、*OsTIP3;1* が水透過活性を持つことについて完全に否定はできない。*OsTIP3;1* の生理的役割を明らかとするにはさらに調査が必要である。

## 論文審査の結果の要旨

イネ種子は登熟中に水分含有量や形態が大きく変化する。同化産物は水と同時に篩管流により種子へと運ばれるが、圧流説に従うと篩管流の流れを促進させるためには種子背部維管束における膨圧を低く保つ必要があるため、篩管流により運ばれてきた水の大部分は導管に吸収され排出されると考えられている。しかし、効率的に水を篩管から導管へ排出する仕組みについてはほとんど解明されていなかった。近年、イネの高温登熟障害が頻発している。高温登熟障害発生には同化産物の蓄積や水分生理が深く関わりと考えられる。一方、水やその他の小分子のチャネルとして知られているアクアポリンは、イネにおいて 33 種類同定されているが、根や葉と比較すると、花器官や登熟中の種子における役割についてはこれまで情報が限られていた。そこで本研究では、全イネアクアポリンを対象として、花器官および登熟中の種子において重要であると考えられる分子種を特定し、水透過活性および局在性を明らかにした。さらに、登熟中期に高気温処理を行い、アクアポリンの発現および種子の登熟におよぼす影響を検討した。

花器官は出穂日の葯、雌蕊、花糸、鱗被を対象として全アクアポリンの発現を **real-time PCR** 法により明らかにした。*OsTIP4;2* は鱗被においては全アクアポリン発現量の 73.8% を占めていた。このことから *OsTIP4;2* は、開花の際の花糸の伸長や、鱗被の膨潤において水輸送の役割を担っていることが示唆された。

登熟中期の種子においては *OsPIP2;1* と *OsTIP3;1* が全アクアポリン発現量の大部分を占めていることが明らかとなった。このうち、*OsTIP3;1* の水透過活性を測定したところ、ほとんど認められなかった。免疫組織染色法により、登熟中の種子における *OsPIP2;1* の局在性を調査したところ、胚乳および背部維管束等に局在が確認されたが、糊粉層には確認されなかった。一方、*OsTIP3;1* は胚乳および糊粉層に局在していた。さらに、細胞内における局在を調査したところ、*OsTIP3;1* のみがオイルボディ膜に局在している可能性が示唆された。*OsTIP3;1* のプロモーター部位を **GUS** と連結したコンストラクトをイネに導入し、登熟種子における **GUS** の発現を時期別に調べたところ、*OsTIP3;1* の遺伝子発現時期と一致し、免疫組織染色における局在性とも一致していた。以上のことから、*OsPIP2;1* は Sakurai et al. (2008) により水透過活性が高いことが報告されており、種子の様々な組織において細胞間の水の拡散に関与することが示唆された。一方で、*OsTIP3;1* は登熟種子における水透過にはほとんど関与しないことが示唆された。

さらに、登熟期間中に高気温処理を行い、種子の重量、水分含有量およびアクアポリンの発現におよぼす影響について調査した。高気温処理により、*OsPIP2;1* の等熟中期における発現量の増加が抑制されたが、*OsTIP3;1* の発現量にはほとんど影響をおよぼさなかった。同時に、高気温処理により種子乾重の増加が抑制された。以上のことから、登熟中の種子は背部維管束周辺に *OsPIP2;1* を局在させ水透過性を上昇させるとともに、糊粉層には *OsTIP3;1* のみを局在させ水を通しにくくすることによって、篩管から導管への水の流れの方向性をコントロールしていることが考えられた。また、種子の水分含有率の減少にはアクアポリンの寄与は大きくなく、夜間の **VPD** の影響が大きいことが示唆された。

本研究は登熟種子における *OsPIP2;1* の重要性を初めて位置付けた。*OsPIP2;1* は種子における水の拡散に寄与するだけでなく、篩管流を促進することにより同化産物の蓄積にも寄与していることが考えられた。以上の貢献から、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農

学研究科博士学位論文審査基準」に則り、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Hidehiro Hayashi, Junko Ishikawa-Sakurai, Mari Murai-Hatano, Arifa Ahamed & Matsuo Uemura  
(2015)

Aquaporins in developing rice grains.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 79: 1422-1429

(DOI:10.1080/09168451.2015.1032882)