



イネアクアポリン遺伝子の同定と
その発現及び機能解析

岩手大学大学院連合農学研究科

生物資源科学専攻

櫻井 淳子

2008年3月

目次

第1章	緒論	
第1節	植物の水分生理	1
第2節	アクアポリン	2
第3節	植物のアクアポリン	6
第4節	本研究の目的と意義	10
第2章	イネの全アクアポリン遺伝子の同定	
第1節	緒言	12
第2節	材料及び方法	12
第3節	結果	13
第4節	考察	14
第3章	イネアクアポリンの発現及び局在性解析	
第1節	緒言	16
第2節	材料及び方法	16
第3節	結果	21
第4節	考察	24
第4章	イネアクアポリンの水輸送活性	
第1節	緒言	29
第2節	材料及び方法	29
第3節	結果	32
第4節	考察	33
第5章	環境ストレスに対するイネアクアポリンの発現応答	
第1節	緒言	36
第2節	材料及び方法	37
第3節	結果	40
第4節	考察	41
第6章	総合考察	
第1節	イネアクアポリンの発現・局在・水透過性に関する プロファイリング	44

第2節 イネアクアポリンが環境ストレス応答に果たす役割	48
第7章 摘要	51
Summary	54
謝辞	57
引用文献	58
図表	65

第1章 緒論

第1節 植物の水分生理

植物は光合成に必要な CO_2 を吸収するために気孔を開くが、同時に蒸散によって水分を失うというリスクを背負っている。そのために、植物は根から盛んに吸水を行い必要な水分を得ている。しかし、蒸散量の多いヒマワリの場合、わずか20分で自身の葉の含水量と同量の水が失われることが知られている (Boyer 1985)。したがって、根からの吸水がスムーズに行われなければ植物は水ストレスを受け、いわゆる「しおれ」等の症状を呈する。さらに水ストレスが激しくなった場合には、成長停止 (野波 2001)、枯死などの重大な問題を引き起こす。

根の表皮から水が吸収され葉の気孔から蒸散されるまでの植物体内における水の流れは、全く抵抗がなくスムーズなわけではない。維管束組織の道管ではほとんど抵抗無く水が流れる (Steudle and Peterson 1998) が、根の表皮から道管に至るまでの経路、また、葉では道管から気孔までの経路では、水が移動する際に、複数の細胞層を通過する必要があり、これらの部位では水の流れにくさ、すなわち通水抵抗が存在する。したがって、通水抵抗は植物の吸水と蒸散のバランスを司る重要なファクターであると言える。通常の生育条件下では、この通水抵抗の値を低く保つことにより、植物は吸水と蒸散のバランスを保ちながら生育することができる。しかし、環境条件の変化により植物の通水抵抗が増加した場合には、吸水と蒸散のバランスが崩れ、水ストレスを受ける。例えば、本研究で材料として用いたイネの場合、低温により根の通水抵抗が増加し、葉身が巻く (水ストレスを受けている) 現象が圃場においてもしばしば観察される。したがって、湛水条件という恵まれた水環境で育つイネにおいても、植物体内の通水抵抗が植物全体の水分バランスの維持にいかにかに重要かということがわかる。

植物体内の細胞層を通過する水移動経路については、特に根の表皮から道管に至る経路において研究が進んでいる。Steudle (2000) は、根での水移動経路は3つの要素から構成されるというモデルを提唱している (composite transport model, Fig. 1-1)。アポプラスト (細胞外) 経由の水移動経路 (apoplastic pathway)、原形質連絡を通るシンプラスト経由の水移動経路 (symplastic pathway)、細胞の膜を通過する細胞横断型の水移動経路 (transcellular pathway) の3経路である。Symplastic pathway と transcellular pathway については厳密には区別ができないので、通常は両者をまとめて cell-to-cell pathway と呼ばれている。

根の内皮及び外皮細胞の細胞壁には、疎水性の物質が沈着してカスパリー線を形成している (Fig. 1-1)。成熟帯 (根の先端ではなく基部よりの部位) では疎水性物質の沈着がさらに進み、スベリン層を形成しているため、アポプラスト経由の水輸送が大きく阻害される。したがって、根全体の通水抵抗を考えた場合には、cell-to-cell pathway における水輸送、特に細胞の膜を通過する transcellular pathway が重要な役割を果たすと考えられる。この transcellular pathway のキーとなる生体分子が、次節で述べるアクアポリンである。

第2節 アクアポリン

以前は、水は生体膜リン脂質二重層を自由に拡散透過し、生理的にはそれでも十分であると推測されていたが、腎臓や赤血球膜、あるいは植物の液胞膜は水透過率が極めて高いことから、水透過の特別な分子装置の存在が示唆されていた (Verkman 1989)。Preston ら (1992) は、ヒトの赤血球膜に存在するタンパク質 (CHIP28、後に AQP1 と命名) が水透過機能を持つことを証明し、この分子を「アクアポリン」として報告した。その後、植物 (Maurel et al. 1993) や微生物 (Calamita et al. 1995)、昆虫 (Le Caherec et al. 1996) 等でも次々にアクアポリンが存在することが明らかにされ、アクアポリンは生物に必須の重要分子として認識されるようになった。

アクアポリンは生体膜に存在するチャンネルであり、別名「水チャンネル」とも呼ばれる。アクアポリンは自らエネルギーを変換して水を能動輸送するわけではなく、受動的な水輸送を行う。膜内外に十分な浸透圧差がある場合、1つのアクアポリン分子は毎秒20億から30億もの水分子を透過することができる。水透過速度は浸透圧差に依存し、また輸送方向は膜内外の両方向に可能（浸透圧の低い方から高い方向に水が移動）である。輸送基質は水分子が主であり、イオンは全く透過しないが、グリセロール、尿素、アンモニア、二酸化炭素、ケイ素、ホウ素等を輸送するアクアポリンが複数報告されている (Maurel 2007)。

アクアポリンの水透過活性を *in vitro* で測定する場合には、以下のような方法が用いられている。測定に用いる材料（膜小胞、あるいは細胞やプロトプラスト）によって方法が多少異なるが、原理的には、膜内外に浸透圧差を与えて体積を変化させた場合の変化速度から水透過活性を求めるという手法に基づいている。体積変化の測定には大きく2つの方法があり、測定対象のサイズが大きい場合（細胞やプロトプラスト）には、顕微鏡下でその体積変化を直接測定する (Preston et al. 1992, Murai and Kuwagata 2007)。測定対象のサイズが小さい場合（膜小胞）には、光学的手法（ストップフロー光散乱法）で体積変化を測定する (Laizé et al. 1995)。これは、反応系に一定の波長の光を照射した場合の散乱光の変化を測定し、光散乱度と膜小胞のサイズが直線的な相関関係にあること (Laizé et al. 1995) を利用して、膜小胞の体積変化を推定する方法である。膜小胞のサイズが小さいと光散乱度は大きく、膜小胞のサイズが大きいと光散乱度は小さいことになる。

また、次節で詳しく述べるように、ほとんどの生物は複数のアクアポリンを同時に発現しているので、細胞内のアクアポリン全体の活性を測定するのか、あるいは、個々のアクアポリンの水透過活性を評価するのか、その目的によって異なる手法でアクアポリン活性を評価することが必要である。アクアポリン全体の活性は、組織から膜画分（膜小胞）を単離した後、上記のストップフロー光散乱法にて水透過活性を測定することにより評価できる。あるいは、プロトプラストを用いてその体積変化から細胞の水透過活性を求める

こともできる。これらの実験を行う場合は、同時に、アクアポリンの阻害剤である塩化水銀 (HgCl_2) を添加し、その阻害程度から、全水透過性に対するアクアポリンの貢献度を評価する。 HgCl_2 はアクアポリンのみならず多くのタンパク質の活性阻害剤として機能すること、また HgCl_2 による阻害を受けないアクアポリンも報告されている (Ma et al. 1997, Krajinski et al. 2000) ことから、結果の解釈には注意を要するが、おおよそのアクアポリン活性について評価することができる。

個々のアクアポリンの水透過活性を評価する場合には、アフリカツメガエルの卵母細胞発現系、あるいは酵母の異種遺伝子発現系を用いた実験系がよく利用される。アフリカツメガエルの卵母細胞を用いる方法では、あらかじめ目的のアクアポリン遺伝子の cRNA を直接卵母細胞に注入して、アクアポリンを細胞膜に発現させた後、細胞内外に浸透圧差を与えて体積変化速度を直接測定する (Preston et al. 1992)。この方法は簡便であるが、全てのアクアポリンを強制的に細胞膜に発現させること、また用いる卵母細胞によって発現量が異なること等のデメリットがある。酵母の発現系も同様に目的のアクアポリン遺伝子を酵母で発現させるが、酵母から膜画分を単離し、その水透過活性をストップフロー光散乱法で測定する (Suga and Maeshima 2004)。本手法はアフリカツメガエルの卵母細胞を用いる方法より煩雑であるが、ウェスタンブロット法を用いれば単離した膜画分におけるアクアポリン発現量を把握することができるので、アクアポリンの発現比率に応じて正確に水透過活性を評価することが可能である。

アクアポリンは四量体で機能し、それぞれの単量体の中央に水の透過孔が存在する (Murata et al. 2000) (Fig.1-2A)。アクアポリン単量体は、6つの膜貫通ヘリックスと2つのハーフヘリックス(膜貫通ヘリックスの半分程度の長さ)の基本骨格を持つ (Fig. 1-2B)。また2つのハーフヘリックスのN末端側には、Asn-Pro-Ala からなる NPA モチーフが存在する。ヒトのアクアポリン AQP1 の X 線立体構造解析の結果から、アクアポリンが水分子を選択的に高速輸送するメカニズムが明らかになった (Murata et al. 2000)。アクアポリン

の水透過孔は、出口・入口に近い部分は広く開いているが、透過孔の中央付近は細くなっている。2つのNPAモチーフは水透過孔の孔径が最も狭い（約3Å）中心部に対をなして存在し、直径2.8Åの水分子がぎりぎり通過できるサイズになっている。アクアポリンの透過孔では、水素結合によりつながった水分子が数珠つなぎになっているが、NPAモチーフを通る際には水分子同士の水素結合がいったん切れ、水素結合の相手を隣接する水分子からNPAモチーフのアスパラギンのアミド基に置き換える。次に、水分子は少し移動し、水素結合の相手を隣接するもう一つのNPAモチーフのアスパラギンのアミド基に移す。さらに移動すると、孔の向こう側に位置する水分子と水素結合し、チャンネル中心部を通り抜ける。また、水透過孔周辺に存在するアミノ酸残基の組成については、出口・入口に近い部分は親水性のアミノ酸残基が多いのに対し、孔の中心付近は疎水性のアミノ酸残基が多い（Murata et al. 2000）。このような透過孔の構造が水分子の選択的高速輸送を可能にしていると考えられている。

アクアポリン研究が進んでいるヒトでは13種類のアクアポリンが存在し、それぞれのアクアポリンが種々の臓器・細胞に局在して機能していること、またアクアポリン遺伝子変異により様々な疾患が生じること等が明らかになりつつある（King et al. 2004、Verkman 2005）。動物のアクアポリンについては、細胞内での局在性が変化することにより、細胞の水透過性が変化することが報告されている。その一例として、ほ乳類のアクアポリンAQP2が挙げられる（Nejsum 2005）。AQP2は腎臓集合管に多量に存在するアクアポリンであり、集合管細胞の管腔膜及び管腔膜直下の細胞内小胞膜上に局在している。細胞内小胞のAQP2は、抗利尿ホルモン・バソプレッシンの作用でエキソサイトーシスにより小胞膜ごと管腔膜へ融合する。その結果、管腔膜上のAQP2量が増加し、管腔膜の水透過性が増加し、集合管における水の再吸収が促進される。バソプレッシンを除去すると、エンドサイトーシスにより再びアクアポリンは小胞膜上に移行する。このAQP2の局在性の変化は、AQP2のリン酸化・脱リン酸化やcAMPによる制御を介して行われるという報告があり、

その全体像の解明に向けて研究が進められている (Nejsum 2005)。同じような局在性の変化による水透過性の制御は、耳下腺や涙腺に存在する AQP5 でも見られる (Ishikawa et al. 1999, Tsubota et al. 2001)。植物のアクアポリンにおいても、環境ストレスを受けた場合に細胞レベルで局在性が変化する例が報告されている (次節参照) が、その生理的意義についてはまだ明らかにされていない。

第3節 植物のアクアポリン

植物には動物より多くのアクアポリンが存在する。例えば、シロイヌナズナ、トウモロコシではそれぞれ35および33種類のアクアポリン遺伝子が同定されている (Chaumont et al. 2001, Johanson et al. 2001)。これら植物のアクアポリンは、アミノ酸配列上の特徴から4つのサブファミリー、PIP (plasmamembrane intrinsic protein)、TIP (tonoplast intrinsic protein)、NIP (nodulin26-like intrinsic protein)、SIP (small and basic intrinsic protein) に大別される。PIP と TIP は、その名前の通り、それぞれ細胞膜と液胞膜に局在するアクアポリンである (Maeshima et al. 1992, Kaldenhoff et al. 1995)。PIP や TIP の中には、それぞれ二酸化炭素及びアンモニアの輸送を担うアクアポリンが存在することも報告されている (Uehlein et al. 2003, Hanba et al. 2004, Jahn et al. 2004, Loqué et al. 2005)。NIP は、ダイズの根粒細胞に共生する根粒菌を包む包膜に局在する分子として発見された (Fortin et al. 1987) が、根粒のない植物にも NIP が多数存在する。NIP と SIP については植物体内での機能が少しずつ明らかになりつつある。NIP と SIP は、ともに水輸送活性が低く (Ishikawa et al. 2005, Wallace et al. 2006)、いくつかの NIP についてはグリセロール、尿素、ケイ素、ホウ素を輸送することが確認されている (Ma et al. 2006, Takano et al. 2006, Wallace et al. 2006)。NIP と SIP の細胞内での局在については、細胞膜あるいは ER に局在することが報告されている (Ishikawa et al. 2005, Ma et al. 2006, Mizutani et al. 2006)。

植物体でのアクアポリンの生理機能を評価するために、形質転換体を用いた実験が報告されている。シロイヌナズナの AtPIP2;2 は根で多く発現するアクアポリンであるが、この遺伝子を T-DNA により破壊した植物体は、成長そのものに大きな異常は認められないが、根の細胞の水透過率が約 30%低下した (Javot et al. 2003)。また、タバコのアクアポリン NtAQP1 の発現を抑制すると、蒸散量が減少し、茎や葉の水ポテンシャルも低下するとともに、根の通水コンダクタンスが低下した (Siefritz et al. 2002)。シロイヌナズナの AtPIP1;2 をタバコに過剰発現した場合、成長も蒸散も促進され、気孔の数も増え、光合成能も上昇した (Aharon et al. 2003)。オオムギの HvPIP2;1 をイネに過剰発現した場合には、根の通水コンダクタンスが 40%増加し、根に対する地上部の生重量も 50%増加した (Katsuhara et al. 2003)。これらの結果から、アクアポリンは cell-to-cell pathway に重要な役割を果たすとともに、植物の成長と代謝にも影響を与えることがわかる。

環境ストレスとアクアポリンの関係についても様々な研究結果が報告されている。例えば、アクアポリンは植物の乾燥ストレス耐性と密接に関わっていることが明らかになりつつある。Alexandersson ら (2005) は、シロイヌナズナに乾燥ストレスを与えた場合、多くの PIP 及び TIP 遺伝子発現量が根において低下することを明らかにした。また、タバコの細胞膜型アクアポリン NtAQP1 の発現を抑制すると、乾燥ストレスに弱くなったという報告もある (Siefritz et al. 2002)。一方、シロイヌナズナの AtPIP1;2 をタバコに過剰発現した場合も乾燥ストレスに弱くなる (Aharon et al. 2003)。水田イネと陸稲イネにおいて、細胞膜型アクアポリン RWC3 の発現の浸透圧ストレス応答性を比較したところ、水田イネでは発現量が低下し、陸稲イネでは増加したことから、RWC3 は陸稲イネの乾燥ストレス耐性に寄与している可能性が示された (Lian et al. 2004)。また、水田イネにストレス応答性プロモータを用いて RWC3 を発現させると、乾燥ストレス耐性が強化された (Lian et al. 2004)。これらの実験結果をまとめると、アクアポリン発現量の多寡と乾燥ストレス感受性について統一した関係は見られないが、少なくともアクアポリンの量的変動が植物の乾燥ストレス耐性に

影響を与えることがわかる。おそらく、標的アクアポリンが植物の吸水に有利にはたらくのか、それとも脱水を促進するのか、その役割の違いにより乾燥ストレス耐性が変化したものと考えられる。

塩ストレスとアクアポリンの関係についても、乾燥ストレスと同様の報告がある。トウモロコシに 200 mM の塩ストレスを与えた場合には、多くの PIP 及び TIP 遺伝子発現量が低下した (Zhu et al. 2005)。一方、イネに 100 mM の塩ストレスを与えると、莖葉で含水率の低下や成長阻害が見られるが、オオムギのアクアポリン HvPIP2;1 を過剰発現させた場合には、さらに症状が激しくなった (Katsuhara et al. 2003)。この場合、アクアポリン量の増加により、塩ストレス下においてイネの脱水が促進されたのではないかと考えられる。

以上のように、アクアポリンの量的変動が植物の乾燥や塩ストレス耐性を変化させることが明らかになったが、量的変動だけでは説明できない現象も報告されている (下記参照)。これらの現象には、アクアポリンの活性レベルでの調節、すなわちアクアポリンゲートの開閉調節の関与が指摘されている。これまでに報告があったアクアポリン活性の調節機構としては、リン酸化や pH によるゲート開閉メカニズム、 H_2O_2 濃度変化による活性変化、細胞内局在性の変化等があげられる。

リン酸化によるアクアポリン活性制御は、ホウレンソウで初めて報告された (Johansson et al. 1998)。SoPIP2;1 の C 末 274 番目及びハーフヘリックス (HB, Fig. 1-2 参照) 直後の 115 番目のセリン残基のリン酸化がアクアポリン活性の発揮に必須であることが、部位特的アミノ酸置換やリン酸化阻害剤を用いた実験から明らかとなった。SoPIP2;1 の結晶構造解析の結果も、これらのアミノ酸残基のリン酸化がゲートを開くために必要であることを明確に示している (Törnroth-Horsefield et al. 2006)。

pH による活性制御は、シロイヌナズナを材料として報告されている (Tournaire-Roux et al. 2003)。嫌気ストレスによる根の通水コンダクタンス低下は、細胞質の酸性化が原因で生じる。AtPIP2;2 の細胞質側に位置する loop d (Fig. 1-2 参照) のヒスチジン残基は、細胞質の

pH センサーとして機能し、細胞質が酸性化するとこのヒスチジン残基がプロトン化し、アクアポリンゲートが閉じる。このメカニズムは、ホウレンソウの SoPIP2;1 の X 線立体構造解析の結果から、構造的にも証明されている (Törnroth-Horsefield et al. 2006)。また、この loop d のヒスチジン残基は、多くの植物の PIP で保存されたアミノ酸残基であることから、細胞質酸性化によるアクアポリンゲート閉鎖機構は、多くの植物で保存されたメカニズムであると考えられる。

また、 H_2O_2 によるアクアポリン活性制御の可能性も指摘されている。Lee ら (2004) は、低温によるキュウリの根の通水コンダクタンスの低下は、低温により発生した H_2O_2 がアクアポリン活性を阻害するため生じるのではないかと報告している。Aroca ら (2005) は、低温感受性の異なるトウモロコシ品種を材料に用いて実験を行った。低温処理による根の PIP2 型アクアポリン発現量の変動を調べたところ、両品種ともに PIP2 型のタンパク量は減少せず、リン酸化アクアポリン量はむしろ増加していた。一方、両品種の差は H_2O_2 の発生量と相関しており、低温感受性品種では低温により H_2O_2 量が 2 倍に増加していたことから、 H_2O_2 がアクアポリン活性を低下させ根の通水コンダクタンスを低下させるのではないかと考察している。

アクアポリンの細胞内局在性の変化については、動物の AQP2、AQP5 で詳しく研究が進められ、局在性の変化が細胞の水透過性を制御することが明らかになっている (第 2 節参照) が、植物でも同じような現象が観察されている。Vera-Estrella ら (2004) は、塩生植物 *Mesembryanthemum crystallinum* の培養細胞および植物体を用いて、液胞膜型アクアポリン McTIP1;2 の局在を検討した。ストレスを与えない場合には液胞膜に局在していたが、200 mM の浸透圧ストレスを与えると、液胞膜のみならず他のオルガネラにも局在するようになることを見出した。このオルガネラの正体については明らかにされていない。Boursiac ら (2005) は、シロイヌナズナに 100 mM の塩ストレスを与えた場合、根の通水コンダクタンスがわずか 45 分で 1/2 に低下し、4 時間後には元の値の約 30% まで低下するのに対し、ア

クアポリン遺伝子およびタンパクの発現量はそれほど顕著に低下しないことを明らかにした。GFP とアクアポリンの融合タンパク質をシロイヌナズナで発現させ、塩ストレスを与えて根の細胞内での局在を観察したところ、処理 45 分後のサンプルで、AtTIP1;1 が液胞膜及びその内部の小胞様構造に局在していることを確認した。また、処理 120 分後のサンプルでは、同様に AtPIP1;1、AtPIP2;1 が細胞膜及びその内部の小胞様構造に局在していることを確認した。著者らは、これらの結果を基に、アクアポリンの局在性の変化が細胞の水透過性を変化させているのではないかと考察している。

第4節 本研究の目的と意義

以上のように、遺伝子データベースが充実したシロイヌナズナやトウモロコシを中心として植物におけるアクアポリン遺伝子の種類、発現様式、環境ストレス下での機能、そして活性調節機構が明らかになりつつある。しかし、世界で最も多くの人々が主食とする重要穀物イネについては、どのようなアクアポリン遺伝子が存在するのか、また、その機能についての報告が少ない。本研究を開始した時点では、9種のイネアクアポリンについて個別に報告がなされていたにすぎない。それらは PIP が 4 種 (*OsPIP1a*, *RWC1*, *RWC3*, *OsPIP2a*) (Malz and Zauter 1999, Li et al. 2000, Lian et al. 2004)、TIP が 4 種 (*OsTIP1*, *OsTIP1*, *OsTIP2*, *OsTIP3*) (Liu et al. 1994, Takahashi et al. 2004)、NIP が 1 種 (*OsNIP1*) (Liu et al. 1994) であった。しかし、第2節で述べたように、植物には 30 種以上のアクアポリンが存在することが明らかになっている。イネアクアポリンが植物体内でどのような機能を果たすのか、また、環境ストレスに対する反応にアクアポリンがどのように関わっているのか、といったアクアポリンの役割に関する全体像を理解するためには、イネが持つ全アクアポリンを念頭に置いて議論を行わなければならない。また、イネは湛水条件で生育するため、これまで報告されていた畑作物とは異なるアクアポリンの種類や発現様式が明らかになる可能

性がある。

そこで、本研究では、まず第2章において、未だ明らかにされていなかったイネの全アクアポリン遺伝子を同定することから研究を開始した。次に、第3章で、これらのアクアポリンのイネ体内での遺伝子及びタンパクレベルの発現特性について明らかにするとともに、第4章では発現量の多い主要なアクアポリンについて個別にその水透過活性を評価した。第3、4章の結果から、イネのそれぞれの器官・組織で重要な役割を果たすアクアポリンがどのメンバーなのかを特定し、イネアクアポリンの発現・局在・水透過性に関するプロフィールを作成した。第5章では、これらのアクアポリンに焦点を絞り、低温ストレス、高CO₂処理等の環境ストレスによって植物体を受ける変化とアクアポリンにどのような関係があるのか明らかにするため、まずアクアポリンの量的変動に着目して検討を行った。

今後、地球規模で気象変動が激しくなることが予想され、イネの生産性や品質に悪影響を及ぼすおそれがある。例えば、移植直後の春先の低温による苗の活着不良や低温伸長性の阻害（西山 1985）、また穂ばらみ期の冷温による障害型不稔（西山 1985）、登熟期の高温による白穂発生等の様々な障害の頻発が懸念される。また、今後の大気CO₂濃度上昇やそれに伴う温暖化が中長期的にイネの生産性・品質に多大な影響を与えることも考えられる。種々の環境ストレスは水ストレスと密接に関わっていることから、イネアクアポリンの発現や機能変化から環境ストレス発生メカニズムの解明も期待される。本研究で明らかにされたイネアクアポリンの全遺伝子情報やその発現、局在性、そして水透過性などの基礎的知見は、環境ストレス発生メカニズムの解明に向けて、また将来の気象変動に対応したイネ栽培管理技術の開発に向けて、非常に有用な情報を提供するものと考えられる。

第2章 イネの全アクアポリン遺伝子の同定

第1節 緒言

イネにおけるアクアポリンの機能を明らかにするためには、まずイネの全アクアポリン遺伝子を同定する必要がある。モデル植物で全ゲノム配列が最も早く解読されたシロイヌナズナや、EST情報の充実している重要穀物トウモロコシでは、それぞれ35および33種の全アクアポリン遺伝子が同定されている (Chaumont et al. 2001、Johanson et al. 2001)。イネでは、9種 (*OsPIP1a*、*RWC1*、*RWC3*、*OsPIP2a*、*OsγTIP1*、*OsTIP1*、*OsTIP2*、*OsTIP3*、*OsγMIP1*) のアクアポリン遺伝子のクローニングについて報告がある (Liu et al. 1994、Malz and Sauter 1999、Li et al. 2000、Lian et al. 2004、Takahashi et al. 2004) が、まだ全アクアポリン遺伝子が明らかにされていない。本研究を開始する直前にイネの全ゲノム配列が解読されたことから、まず、イネ全アクアポリン遺伝子を同定し、その配列情報を明らかにすることを目的として解析を行った。

第2節 材料及び方法

すでに全アクアポリン遺伝子が同定されているトウモロコシおよびシロイヌナズナの配列をもとに、イネゲノムデータベース (RGP; <http://rgp.dna.affrc.go.jp/>) および NCBI データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) から BLAST 検索を行い、イネアクアポリン遺伝子を探索した。なお、本研究では、品種ニホンバレ由来の遺伝子のみを探索した。候補遺伝子配列の重複するものについて整理を行い、得られたイネアクアポリン遺伝子の推定アミノ酸配列を元に Clustal W プログラム (Thompson et al. 1994) にて系統樹解析を行った。解析結果は TreeView プログラム (Page 1996) にて表示した。また、イネとトウモロコシの

全アクアポリンを構成要素とする系統樹解析も行った。

第3節 結果

データベースから見いだされたイネアクアポリン遺伝子について重複するものについて整理した結果、少なくとも 33 種のアクアポリン遺伝子が見出された (Table 2-1)。なお、各アクアポリン遺伝子の命名は、トウモロコシのアクアポリンの命名法に従った。具体的には、系統樹解析 (Fig. 2-1) の結果を元に、相同性が高いトウモロコシとイネアクアポリンには同様の通し番号 (例 ; ZmPIP1;1 と OsPIP1;1) をつけることをルールとした。すでに 9 種のイネアクアポリン遺伝子 (*OsPIP1a*, *RWC1*, *RWC3*, *OsPIP2a*, *OsTIP1*, *OsTIP1*, *OsTIP2*, *OsTIP3*, *OsMIP1*) がデータベースに登録されていたが、これらは異なる研究者により独自に命名されていた (Table 2-1, Notes) ので、他の植物での命名法と整合性を取るために、本研究では上記の方法により改めて命名を行った。また、見出された 33 種のイネアクアポリン遺伝子以外に、アクアポリン類似配列を持つ遺伝子が十数種存在したが、アクアポリンの基本的構造 (6 つの膜貫通領域と 2 つのハーフヘリックス、NPA モチーフ様配列) を欠失していたり、フレームシフトにより配列途中で停止コドンが入っていたり、あるいは同じく配列途中でフレームシフトにより異様に長いタンパク質をコードしていたこと等から、これらの遺伝子はアクアポリンの機能は持っていないと考え、今回の結果には加えなかった。

イネアクアポリン遺伝子の推定アミノ酸配列から系統樹解析を行ったところ、シロイヌナズナやトウモロコシで報告されている結果と同様に、4 つのサブファミリー (PIP、TIP、NIP、SIP) に大別されることが明らかとなった (Fig. 2-2)。それぞれの内訳を見ると、PIP が 11 種、TIP が 10 種、NIP が 10 種、SIP が 2 種であった。11 種の PIP は、さらに 2 つのグループに分類され、3 種の PIP1 型アクアポリンと、8 種の PIP2 型アクアポリンで構成されて

いた。10種のTIPは、TIP1、2、3型がそれぞれ2種ずつ、TIP4型が3種、TIP5型が1種に分類された。10種のNIPは、NIP1型が4種、NIP2型が6種であった。SIPは、SIP1型とSIP2型がそれぞれ1種ずつであった。系統樹の枝の長さからも判断されるように、PIPはそれぞれのメンバー間で配列の相同性が高かった(58.5~92.7%)が、TIP、NIP及びSIPのそれぞれのメンバー間では、相同性が低かった(例えばOsSIP1;1とOsSIP2;1の相同性は33.0%)。

第4節 考察

イネアクアポリン遺伝子の数は、シロイヌナズナで見出された35種類よりは少なかったが、同じ単子葉植物のトウモロコシが持つ33種類と同数であり、植物は種を問わず30種類以上のアクアポリンを持つことが実証された。植物は、動物(ヒトの場合は13種類)に比べ、はるかに多くのアクアポリンを持つが、動物より過酷な環境で限られた期間に効率的に水分を吸収し成長をとげるため、多数のアクアポリンの種類を備えていると考えることができる。

本研究以前に9種のイネアクアポリン遺伝子がデータベースに登録されていた。このうち6種(*OsPIP1a*、*OsyTIP1*、*OsTIP1*、*OsTIP2*、*OsTIP3*、*OsyMIP1*)は今回の解析結果から見出された遺伝子と配列が100%一致していた。残りの3種、*RWC1* (Li et al. 2000)、*RWC3* (Lian et al. 2004)、*OsPIP2a* (Malz and Sauter 1999)については、それぞれ*OsPIP1;1*、*OsPIP1;3*、*OsPIP2;1*と非常に近いが、異なる配列を持っていた。これは、以前に報告されたアクアポリン遺伝子が今回用いた品種(ニホンバレ)とは異なる品種からクローニングされたものであることも原因の一つと考えられる。例えば、*RWC1*はジャポニカ品種の早稲統一からクローニングされた(Li et al. 2000)。したがって、イネ品種によってアクアポリン遺伝子配列に多型が生じる可能性があるのかもしれない。

イネアクアポリンの種類について、他の植物と異なる点は、(1) PIP、特にPIP1型アクア

ポリンの種類が少ない、(2) 他の植物アクアポリンと相同性が低い特徴的な PIP2 型アクアポリン (OsPIP2;7, OsPIP2;8) が存在する、(3) NIP の種類が多い、等があげられる。

まず (1) については、シロイヌナズナでは 5 種、トウモロコシでは 6 種の PIP1 型アクアポリンが報告されているのに対し、イネでは 3 種しか同定されなかった。しかし、シロイヌナズナやトウモロコシでは、体内で多く発現している PIP1 型が主に 2 種のアクアポリンのみであって、残りの PIP1 型の発現量は低いことが報告されている (Alexandersson et al. 2005, Hachez et al. 2006a)。イネで同定された 3 種の PIP1 型アクアポリンについても、OsPIP1;1 と OsPIP1;2 の 2 種の発現が特に多い。さらに、もう 1 種の PIP1 型である OsPIP1;3 も比較的多く発現しており (第 3 章参照)、これらのメンバーのみで十分にイネ体内で必要とされる PIP1 型のアクアポリン量が十分にまかなわれているものと考えられる。

(2) の OsPIP2;7 と OsPIP2;8 については、他の植物アクアポリンと相同性の低い特徴的な配列を持ち、イネ特有の生育条件や機能に関係するアクアポリンとしてはたらいっている可能性も考えられる。しかし、OsPIP2;8 については通常の生育条件下では発現量が低い (第 3 章参照) ことから、イネ体内での機能上の意義はあまりないことも考えられる。両者とも、6 つの膜貫通領域と 2 つの NPA モチーフを持つなどアクアポリンの基本的構造は満たしているが、実際に水透過活性を持つかどうかについては今後の検討が必要である。

(3) の NIP については、シロイヌナズナで 9 種、またトウモロコシで 5 種が報告されているのに対し、イネでは 10 種もの遺伝子が同定され、その機能に興味を持たれる。Ma ら (2006) は、OsNIP2;1 (Lsi1) が水ではなくケイ素 (イネに多量に蓄積され、重要な役割を果たす元素) を輸送することを明らかにした。また、最近、Fujiwara ら (2007) は、OsNIP3;1 がホウ素 (高等植物の微量必須元素) を輸送することを報告した。他の植物では、アクアポリンは水だけでなく様々な低分子化合物 (グリセロール、尿素、アンモニア、二酸化炭素等) を輸送することも明らかにされつつある (Maurel 2007) ことから、イネ NIP の機能を解明するためには、その輸送基質を解明することが重要だと考えられる。

第3章 イネアクアポリンの発現および局在性解析

第1節 緒言

第2章において、イネには33種のアクアポリン遺伝子が存在することを明らかにした。これらのアクアポリンのイネ体内での発現様式を明らかにするために、本章では遺伝子及びタンパクレベルにおける発現解析を行った。まず、葉身や根等の器官レベルでの発現比較を行い、続いてそれぞれの器官の組織内でのアクアポリン局在性を解析した。これらの結果から、それぞれのアクアポリンがどの器官のどの組織に局在しているのかを明らかにした。

第2節 材料及び方法

<用いたイネ品種と栽培方法>

イネ品種はあきたこまちを用いた。種子をスポルタックスターナ SE (日産化学) の200倍希釈液で1日間消毒した後、水に浸漬して2~3日間常温で芽出しを行った。ハトムネ状態になった種子を選び、1/5000アールワグネルポット (直径159 mm × 高さ190 mm) に播種した (Fig. 3-1)。具体的には、ワグネルポットに粗いナイロンメッシュをかぶせたザルをセットし、ザルの深さ約2 cmまでパーミキュライトを敷き詰めたのち、パーミキュライトを十分にしめらせ、種子を表面から深さ約1 cmの位置に播種した。播種後、ワグネルポット上部をアルミ箔で覆い、人工気象室 (明期 25℃/暗期 20℃、12時間明期、相対湿度 75%、光強度 $400 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) に置いた。4日後にアルミ箔をはずし、パーミキュライトの底が水に浸る程度にワグネルポットに水を入れて生育させ、6日後から水耕栽培を開始した。水耕液の組成は窒素 (NH_4NO_3)、リン (NaH_2PO_4)、カリ (K_2SO_4)、カルシウム (CaCl_2)、マグ

ネシウム (MgSO₄) がそれぞれ 10 ppm、鉄 (Fe (III) -EDTA) が 0.4 ppm、マンガン (MnCl₂) が 0.1 ppm であり、pH 5.0 に調整して用いた。水耕液は 2 日でワグネルポット 1 ポット分の水耕液 (約 2.5 L) が交換されるように点滴灌漑を行うか、あるいは 1 日おきに交換した。

<遺伝子およびタンパク発現解析用のサンプリング方法>

分けつ初期 (播種 21 日後) 及び穂ばらみ期 (播種 56 日後) に葉身と根をサンプリングした。葉身は上位 3 葉から、根は根端から 3 分の 1 の部分をサンプリングし、直ちに液体窒素で凍結させ -80℃ で保存した。葯は穂ばらみ期 (播種 56 日後) から出穂期 (播種 67 日後) にかけて、穂上の特定位置にある穎花 (特定穎花、Fig. 3-2 A) からのみサンプリングした。穎花長と葯の発育ステージには相関があるため (Fig. 3-2 B)、穎花長で判断して各発育ステージの葯を採取した。

<RNA 抽出方法>

凍結したサンプルを、液体窒素で冷却した乳鉢・乳棒で粉砕した後、RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社) を用いて total RNA を抽出した。抽出方法はメーカーの推奨プロトコールに従った。

<cDNA の合成>

cDNA の合成は ReverTra Ace (TOYOBO) と Oligo(dT)₂₀ primer (TOYOBO) を用いて行った。逆転写反応は、42℃ で 1 時間行い、その後、99℃ で 5 分間変性して cDNA 原液とした。

<半定量的 RT-PCR 法によるアクアポリン発現量の解析>

PCR 反応は、AmpliTaq GOLD (ABI) と各アクアポリンの 3'-UTR 配列から選定した特異的プライマー (Table 3-1) を用いて行った。反応条件は、94℃・30 秒 (変性)、58℃・30 秒

(アニーリング)、72℃・1分(伸長)を1サイクルとして行い、各アクアポリンメンバーの発現量に応じて、最適なサイクル数 (Fig. 3-3、3-4、括弧内の数字) で各サンプル間の発現量の比較を行った。PCR 反応後のサンプルを 1.5%アガロースゲルにて電気泳動後、CCDカメラで撮影し、NIH Image プログラム (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>) を用いてバンドの濃淡を定量した。内部標準として、18S rRNA あるいは *actin* mRNA 量を用いて各アクアポリン発現量を補正した。なお、抽出した RNA サンプルにゲノム DNA の混入がないことを確認するため、Table 3-1 に示したプライマーペア (PIP1;1-3' と PIP1;1s、両者はイントロンを挟んで設計されている) を用いて PCR を行った。

<粗膜画分抽出法>

乳鉢・乳棒を用い液体窒素下で粉碎した植物組織に、3倍量の抽出液 (50 mM Tris-acetate (pH 7.5)、0.25 M sorbitol、2 mM EGTA、10 μM 4-amidinophenylmethane-sulfonyl fluoride hydrochloride (*p*-APMSF)、1% (w/v) polyvinylpyrrolidone K-30、2 mM DTT) を添加し、氷冷した乳鉢・乳棒でサンプルを磨砕した。以下の操作は全て 4℃で行った。磨砕液を 2,500 g で 5分、さらに 10,000 g で 15分遠心した後、上清を超遠心用チューブに移し、150,000 g で 30分間超遠心を行った。得られた沈殿に懸濁液 (50 mM Tris-acetate (pH 7.5)、2 mM EGTA、10 μM *p*-APMSF、2 mM DTT) を添加しテフロンホモジナイザーで懸濁した後、再度 150,000 g で 30分間超遠心を行った。沈殿に少量の懸濁液を添加し、テフロンホモジナイザーで懸濁して粗膜画分とした。

<タンパク量の定量>

Bio-Rad Protein Assay (BioRad) を用いて行った。検量線は BSA で作成した。

<アクアポリンペプチド抗体の作製>

PIP及びTIPの推定アミノ酸配列を元に各分子種特異的なペプチド配列を選定し(Fig. 3-2)、合成ペプチドを作製した後、KLH (keyhole limpet hemocyanin) と結合させ、ウサギに注射して抗体を作製した。抗体は抗血清として採取した。ペプチド合成と抗体作製は、ともにオペロン社 (<http://www.operon.com>) に委託した。

<抗体の反応特異性の検定>

各アクアポリンを発現させた酵母(第4章参照)から抽出した粗膜画分に対し、作製したアクアポリンペプチド抗体を用いたイムノブロット(次項参照)を行い、反応特異性を検討した。

<イムノブロット解析>

粗膜画分を SDS-PAGE 用サンプルバッファー(10 mM Tris-HCl(pH6.8)、6% (v/v) glycerol、2% (w/v) SDS、0.01% (w/v) BPB) と混合し、60℃で 10 分間処理した後、SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE は 12.5%の e-PAGEL (アトー) を用いて行った。泳動バッファーには、2.5 mM Tris、19.2 mM glycine、0.01% (w/v) SDS (pH8.2) を用い、ゲル 1 枚あたり 20 mA 定電流で 80 分間泳動した。泳動後、PVDF メンブレン (Immobilon-P, Millipore) に転写 (15 V、40 分) した。転写 buffer には 48 mM Tris、39 mM glycine、20% (v/v) methanol、0.02% (w/v) SDS を用いた。

以下に記した抗体反応の操作は全て常温で行った。転写後のメンブレンを 4% (w/v) skim milk を含む TBS buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5)、140 mM NaCl) で数時間ブロッキングを行った。その後、アクアポリンペプチド抗体を、0.05% (v/v) Triton X-100 を含む TBS buffer (TBST) にて 1,000~5,000 倍に希釈して、メンブレンと一晩反応させた。TBST で 4 回洗浄後、HRP-linked anti-rabbit protein A 抗体 (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を TBST にて

2,000 倍に希釈して、メンブレンと 1 時間反応させた。TBST で 3 回、TBS buffer で 2 回の順に洗浄した後、ECL detection reagents (GE ヘルスケアバイオサイエンス) と 1 分間反応させ検出を行った。化学発光の観察はライトキャプチャー (アトー) を用いて行った。

<組織サンプルの固定と切片の作製>

イネ (あきたこまち) を p.16~17 に示す栽培法を用いて生育させ、播種 38 日後に目的とする種々の部位の一次根を切り出した。葉身サンプルには、播種 18 日後の植物体を用い、最上位展開葉の中央部分 1 cm 程度を切り出した。サンプルの固定処理は、パラフィン包埋作業を除いて、全て常温で行った。組織切片は切り出したらすぐ固定液 (3.7% (v/v) formaldehyde, 5.0% (v/v) acetic acid, 50% (v/v) ethanol) に入れ、アスピレーターで脱気を行いつつ固定液を浸潤させた。50% (v/v)、60% (v/v)、70% (v/v)、85% (v/v)、95% (v/v) のエタノール液に順に 30 分ずつ浸して固定液をエタノールに置換した後、0.05% (v/v) エオシンを含む 95% (v/v) エタノールで一晩染色を行った。100% エタノールで 30 分ずつ 3 回処理した後、75% (v/v) エタノール + 25% (v/v) キシレン、50% (v/v) エタノール + 50% (v/v) キシレン、25% (v/v) エタノール + 75% (v/v) キシレン、100% キシレン液に順に 30 分ずつ浸して固定液をキシレンに置換した後、62℃オープンにてパラフィン (Paraplast Plus, SIGMA) 置換を行った。パラフィン液は 4、5 時間おきに数回にわたって交換した。パラフィンプロックとして包埋した後、適当な大きさに切り出して、ミクロトーム RM2125RT (ライカ) にて厚さ 7 μm の連続切片を作製した。

<免疫組織染色>

免疫組織染色の以下の操作は、全て常温で行った。組織切片をのせたスライドガラスを 100%キシレンに 5 分ずつ 2 回浸してパラフィンを溶解させた後、100% エタノール中に 10 分ずつ 2 回浸し、その後、95% (v/v) エタノール、85% (v/v) エタノール、70% (v/v) エ

タノールの順に1分ずつ浸した。さらに、ペルオキシダーゼブロック液(0.3% (v/v) 過酸化水素を含む100%メタノール)に30分間浸して、サンプルに内在するペルオキシダーゼ活性を除去した。その後、水で5分ずつ3回、PBS buffer(10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)、155 mM NaCl)で5分ずつ3回洗浄を行った。洗浄後に、組織切片の周りをパップペン(Liquid Blocker Super Pap Pen、大同産業)で囲んだ後、ブロッキング液(1% (w/v) BSA及び0.2% (v/v) Tween20を含むPBS buffer)を少量(数100 µl)静かに添加して数時間ブロッキングを行った。ブロッキング液を除いた後、各アクアポリンペプチド抗体あるいは免疫前血清をPBSTにて25~300倍に希釈して一晩反応させた。PBS bufferにて3回洗浄後、HRP-linked anti-rabbit protein A抗体をPBSにて200倍に希釈して1時間反応させた。PBS bufferで3回洗浄した後、DAB溶液(0.1% (w/v) 3, 3'-diaminobenzidien tetrahydrochloride、0.2% (v/v) H₂O₂、100 mM Tris-HCl (pH7.2))と10分間反応させた。水で3回洗浄した後、カバーガラスをかけて、光学顕微鏡(BX50F-3、オリンパス)で観察した。

第3節 結果

RT-PCR法により33種のイネアクアポリン遺伝子の葉身、根及び葍における発現を調べたところ、アクアポリンの種類によって異なる器官に局在していることが明らかとなった(Fig. 3-3)。OsPIP1;1、OsPIP1;2、OsPIP2;1、OsPIP2;2、OsPIP2;6、OsTIP1;1、OsTIP2;2、OsNIP3;1、OsSIP1;1、OsSIP2;1は葉身と根の両方で発現しているのに対し、OsPIP1;3、OsPIP2;3、sPIP2;4、OsPIP2;5、OsTIP2;1、OsNIP2;1は主に根で発現していた。一方、OsPIP2;7、OsTIP1;2、OsTIP4;3は主に葉身で発現していた。分けつ初期と穂ばらみ期の2つの生育時期で比較した場合、多くのアクアポリンについて発現の器官特異性に大きな変化は見られなかった。

生殖器官の葍では、特にOsPIP1;1、OsPIP2;6、OsTIP1;1、OsTIP2;2、OsNIP1;1、OsSIP1;1、

*OsSIP2;1*が根と同程度あるいはそれ以上に発現していた (Fig. 3-4)。また *OsPIP1;2*、*OsPIP2;1*、*OsPIP2;2*、*OsPIP2;4* は根よりも発現が低かったが、PCR サイクル数から判断して、葍でも比較的多く発現していると考えられた (Fig. 3-4)。これらのアクアポリンの発現は発育ステージ毎にパターンが異なり、*OsPIP1;1*、*OsTIP1;1* のように発育ステージ全般にわたって発現しているものもあれば、*OsPIP2;4*、*OsPIP2;6* のように小孢子後期までに発現し出穂期には発現しないものもあった。

Fig-3-3 の結果から、イネ体内で遺伝子発現量の多いと考えられるアクアポリン 9 種 (*OsPIP1;1*、*OsPIP1;2*、*OsPIP1;3*、*OsPIP2;1*、*OsPIP2;3*、*OsPIP2;5*、*OsTIP1;1*、*OsTIP2;1*、*OsTIP2;2*) に着目し、これらの分子種を個別に認識することができるペプチド抗体を作製した。酵母で人工的に発現させた組換えアクアポリンに対して、作製した抗体を反応させて検定を行ったところ、それぞれの抗体が目的の分子種のみを特異的に認識することがわかった (Fig. 3-5)。例えば、抗 *OsPIP2;1* 抗体は *OsPIP2;1* のみを認識するが、他の PIP2 型アクアポリンには反応しなかった (Fig. 3-5B)。抗 *OsPIP1s* 抗体は *OsPIP1;1*、*OsPIP1;2*、*OsPIP1;3* の全てを認識し、設計通りの結果となった (Fig. 3-5A)。抗 *RsTIP1;1* 抗体 (Suga and Maeshima 2004) はダイコンの *RsTIP1;1* を認識する抗体であるが、イネの *OsTIP1;1* にも反応した (Fig. 3-5C)。

これら特異性の高い抗体を用いて、葉身や根から抽出した粗膜画分に対しウェスタンブロットリングを行ったところ、それぞれのアクアポリンのアミノ酸配列から推定される分子サイズに近い位置にバンドが見られた (Fig. 3-6)。いくつかの抗体では、単量体 (18~28 kDa) のバンドの他、二量体 (35~55 kDa) のバンドも見られた。あらかじめ抗体と抗原ペプチドを反応させてからウェスタンブロットリングを行った場合 (Fig. 3-6, peptide+) には、これらのバンドは消失したことから、検出されたバンドは抗体の非特異的反応によるものではなく、目的とするアクアポリンのバンドであることが確認できた。葉身と根のアクアポリンのタンパクレベルでの発現量を比較すると、遺伝子発現と同様に器官特異性が見ら

れた。OsPIP1 型、OsPIP2;1、OsTIP1;1、OsTIP2;2 は葉身、根の両方で発現が見られたのに対し、OsPIP2;3、OsPIP2;5、OsTIP2;1 は根で特異的に発現していた。

これらのアクアポリン抗体を用いて、根の組織内でのアクアポリン発現を免疫組織染色法にて検討した。根端から約 4 mm の部位より作製した横断切片では、7 種類の全てのアクアポリン抗体がコントロールの免疫前血清よりも強く反応した (Fig. 3-7A~H)。またアクアポリンの種類によって、異なる組織に局在していた。例えば、OsPIP1 型及び OsTIP2;1 は内皮に特異的に蓄積していた (Fig. 3-7B と G)。OsPIP2;1、OsPIP2;3、OsPIP2;5 は、表皮、外皮、厚膜組織、皮層、内皮、中心柱等、全ての組織に蓄積していたが、内皮で特に強い局在が見られた (Fig. 3-7C~E)。OsTIP1;1 は外皮や厚膜組織特異的に局在していたのに対し (Fig. 3-7F)、OsTIP2;2 は中心柱に多く蓄積していた (Fig. 3-7H)。なお、この根端から 4 mm 付近の内皮細胞には、カスパリー線が原因で生じる band plasmolysis が観察された (Fig. 3-7I)。

根端から約 35 mm 離れた部分 (より成熟が進んだと考えられる部位) から作製した横断切片では、皮層が崩壊し破生通気組織が形成されつつあることが観察された (Fig. 3-7O~V)。この部位で免疫組織染色を行ったところ、アクアポリン抗体の反応性は 4 mm の部分と比べて弱く、また免疫前血清と比較して差が明瞭ではなかった (Fig. 3-7O~V)。またアクアポリンの種類による局在性の違いは見られず、外皮、厚膜組織、破生通気組織、内皮、中心柱等に一様に弱い染色が見られた。

根の縦断切片を用いて免疫組織染色を行ったところ、OsPIP2;1 及び OsTIP1;1 は根端から 1.5~4 mm の部分に最も多く局在しており、そこから基部に向かうにつれて染色が弱くなることが観察された (Fig. 3-7J~N)。また、縦断切片を用いた場合、横断切片で観察されたのと同様に、OsPIP2;1 が内皮、皮層、表皮付近に、OsTIP1;1 が表皮付近に多く局在していることが観察された (Fig. 3-7K, L) が、根冠にも局在性が見られた (Fig. 3-7K, L)。

抗 OsPIP1s 抗体及び抗 OsPIP2;1 抗体を葉身の横断切片に反応させたところ、葉肉細胞に

特異的な局在が観察された (Fig. 3-8)。さらに、篩管や道管にはほとんど局在しなかったが、OsPIP1 型は維管束鞘に、また OsPIP2;1 は表皮に弱い染色が観察された (Fig. 3-8B, C)。

第4節 考察

33 種のイネアクアポリンの発現様式は、アクアポリンの種類によって異なっていた。半定量的リアルタイム PCR 法における PCR サイクル数から、それぞれのアクアポリンの発現量の多寡がおおよそ推定されるので、その結果を考慮して Fig. 3-9 に器官別に多く発現しているアクアポリンの種類をまとめた。葉身、根では、それぞれ 13 種と 16 種のアクアポリンが多く発現していると考えられた。多くのアクアポリンについて、発現の器官特異性は発育ステージに関わらず見られたことから (Fig. 3-3)、個々のアクアポリンが生育期間を通して同じ器官で機能していると考えられる。シロイヌナズナやトウモロコシでも同様にアクアポリン発現の器官特異性が報告されている (Chaumont et al. 2000, Alexandersson et al. 2005)。特に、同じ単子葉植物のトウモロコシでは、イネアクアポリンの器官特異性と共通点が見出された。例えば、OsPIP2;3 と ZmPIP2;5 はアミノ酸コード領域の配列相同性が高い (91.4%の相同性、Fig. 2-1) が、ZmPIP2;5 で報告された (Chaumont et al. 2001) のと同様に、OsPIP2;3 が根特異的に発現しているアクアポリンであることは非常に興味深い。両者のプロモータ領域の解析を行うことにより、根特異的発現を司るプロモータ配列が明らかになるとともに、プロモータ領域も含めたアクアポリンの分子進化を考える上で重要な知見が得られると考えられる。

遺伝子レベルでの解析結果から、特に発現量の多い 9 種のアクアポリン (*OsPIP1;1*, *OsPIP1;2*, *OsPIP1;3*, *OsPIP2;1*, *OsPIP2;3*, *OsPIP2;5*, *OsTIP1;1*, *OsTIP2;1*, *OsTIP2;2*) に着目し、これらのアクアポリンを特異的に認識するペプチド抗体 7 種類を作製した (*OsPIP1;1*, *OsPIP1;2*, *OsPIP1;3* については 3 種を共通で認識する抗体、anti-OsPIP1s 抗体

を作製した) ところ、目的のアクアポリンのみを選択的に認識する非常に特異性の高い抗体の作製に成功した (Fig. 3-5)。この抗体を用いて葉身や根におけるアクアポリン発現を検討したところ、遺伝子レベルでの解析結果と同様の器官特異性が見られたことから (Fig. 3-6)、これらのアクアポリンが、タンパクレベルでも対応する遺伝子の発現が見られた器官で発現していることを確認できた。

根の切片に対してアクアポリン抗体を反応させたところ、特に根の根端から約 4 mm の部位ではアクアポリンの種類による組織局在性の違いが顕著に表れた (Fig. 3-7A~H)。例えば、OsPIP1 型、OsTIP2;1 は内皮特異的に局在していたのに対し、OsTIP1;1 は外皮や厚膜組織特異的に局在しており、それぞれのアクアポリンが特定の組織で機能していることが明らかとなった。アクアポリンの種類による局在性の違いについては、トウモロコシ ZmPIP2;1/2;2 (両者を認識する抗体を使用) と ZmPIP2;5 の局在について報告がある (Hachez et al. 2006a)。根端から 5 mm の部位では、ZmPIP2;1/2;2 及び ZmPIP2;5 がともに中心柱によく局在し、また内皮や皮層でも局在が見られたが、ZmPIP2;5 はさらに表皮にも局在し、興味深いことに表皮細胞の外側 (表面側) のみでカップ状の染色が観察された (Hachez et al. 2006a)。トウモロコシとイネでは、アクアポリンの種類により組織局在性の違いが見られるという共通点はあったが、トウモロコシ PIP2 型と、本研究で明らかとなったイネの PIP2 型 (OsPIP2;1, OsPIP2;3, OsPIP2;5、いずれも根の組織全てに局在するが、内皮により多く局在、Fig. 3-7C, D, E) とでは異なる組織局在性を示したことから、根でのアクアポリンの機能は、それぞれの植物種によって異なった適応をしていることが考えられる。

本研究では、PIP のみならず、TIP についてもアクアポリンの種類により明瞭な局在性の違いがあることを初めて明らかにすることができた (Fig. 3-7F, G, H)。根の表皮から中心柱に至る放射状の水移動経路では、アポプラスト経由の水輸送に加え、複数の細胞層を横断する transcellular pathway が重要な割合を占める。また、水が細胞を通過する場合、細胞膜のみならず細胞体積の大部分を占める液胞膜の水透過性が非常に重要である (Maurel et al.

1997)。それぞれのイネ TIP は異なる組織で機能することにより、PIP と連携しながら transcellular pathway における効率的な水輸送に貢献しているものと考えられる。

内皮や外皮では、その細胞壁に疎水性の物質が沈着してカスバリー線やスベリン層を形成しており、アポプラスト経由の水輸送が阻害されている。したがって、根の表皮から中心柱に至る放射方向の水の移動経路では、内皮や外皮細胞の内部を通過する水輸送が重要なポイントとなる。本研究で解析を行った根端から約 4 mm の部位では、カスバリー線が原因で生じる band plasmolysis が内皮細胞に観察された (Fig. 3-7I) ことから、アポプラスト経由の水輸送が阻害されている可能性があり、内皮に局在するアクアポリンが内皮細胞内を通る水輸送を促進することでこれを補っているのではないかと考えられる。

根端から 35 mm 離れた部位では、皮層細胞が壊れて破生通気組織が発達していることが確認された (Fig. 3-7O~V)。この部位に対しアクアポリン抗体を反応させた場合には、根端 4 mm の部位ほど明瞭な染色像が得られなかった (Fig. 3-7O~V)。また縦断切片を用いた解析からも、アクアポリンは根端から 1.5~4 mm の位置で最も多く発現しており、それより基部側に向かうにつれて染色像が薄くなることが明らかとなった (Fig. 3-7J~N)。川田と頼 (1968) はマイクロポトメータを用いて、イネの根が最も盛んに吸水している部位がどこにあるかについて検討を行った結果を報告している。彼らは、内皮細胞に band plasmolysis が明瞭に観察される部位で最も水吸収が盛んであり、それより基部に向かうと吸水量が徐々に低下することを明らかにした。本研究で用いた根端から 4 mm の部位でもバンド・プラズモリーシスが観察され (Fig. 3-7I)、アクアポリン抗体による染色が濃かったこと (Fig. 3-7A~H) から判断して、この部位ではアクアポリンのはたらきにより水輸送が促進され吸水が盛んに行われていることが予想される。

根の部位 (発育ステージ) によるアクアポリンの発現量の差異については、トウモロコシを試料とした実験結果として、今回のイネでの結果とは異なる知見が報告されている。Hachez ら (2006a) はトウモロコシの根を根端からの距離によって部位別にサンプリングし

て *PIP* 発現量をリアルタイム PCR 法にて検討した。その結果、根端から 0~10 mm の部位では *PIP* 発現量は低い、そこから成熟帯（根端から 50~60 mm）に向かって徐々に発現量が増加することを明らかにした。成熟帯では内皮・外皮ともに細胞壁でのスベリン沈着が確認されたことから、この部位にアクアポリンが多く発現することにより成熟帯の transcellular pathway における水輸送を促進しているのではないかと考察している (Hachez et al. 2006a)。このイネとトウモロコシでのアクアポリン発現の差異については、様々な要因が考えられる。まず、イネとトウモロコシという植物種の違いに起因する可能性があるが、両者の栽培・実験条件等を詳細に検討し比較する必要がある。また他の要因として、イネとトウモロコシの根の構造の違いが考えられる。イネは湛水で生育するため破生通気組織が発達しているのが大きな特徴である。破生通気組織には気体が存在しているため、これが水移動の大きな障壁となりうる。そのため、破生通気組織の発達していない根端側にアクアポリンが多く局在し、この部位で主に吸水が行われている可能性が考えられる。

葉身では、*PIP1* 型と *PIP2;1* が葉肉細胞に多く蓄積していた (Fig. 3-8)。シロイヌナズナやタバコの葉肉細胞でも、*PIP* の蓄積が報告されている (Robinson et al. 1996, Otto and Kaldenhoff 2000)。一方、葉肉細胞以外の組織では、気孔の孔辺細胞 (Kaldenhoff et al. 1995, Fraysse et al. 2005)、篩管要素 (Fraysse et al. 2005) 及び維管束組織 (Yamada et al. 1995) でのアクアポリン蓄積がシロイヌナズナやハウレンソウ等で報告されている。葉肉細胞に局在するアクアポリンの機能としては、2つの可能性が考えられる。1つ目は、蒸散を行うために葉肉細胞の水ポテンシャルを維持することである。Cochard ら (2007) は、光照射によるクルミの葉の通水コンダクタンス増加と葉の *PIP* 遺伝子発現量増加に相関があることを報告した。彼らは、光照射→光合成→蒸散量増加→葉の水ポテンシャル低下→気孔閉鎖→光合成低下という悪循環に陥らないため、アクアポリンを発現させて葉肉細胞の水ポテンシャルを維持することにより光合成機能の低下を防いでいるのではないかと考察している (Cochard et al. 2007)。2つ目の可能性は、アクアポリンが葉肉細胞での CO_2 拡散に関わっ

ているのではないかということである。いくつかの植物の PIP には、CO₂ 透過性があることが確認されている (Uehlein et al. 2003、Hanba et al. 2004、Flexas et al. 2006)。また、オオムギアクアポリン HvPIP2;1 をイネで過剰発現させた場合に、葉内の CO₂ コンダクタンスが増加したことも報告されている (Hanba et al. 2004)。葉肉細胞特異的に発現する OsPIP1 型や OsPIP2;1 の機能を明らかにするためには、CO₂ 輸送能も含め、さらに検討が必要である。

葯では主に 10 種類のアクアポリンが発現していた (Fig. 3-4)。葯の組織は発育ステージとともに大きく変化する。特に花粉は、花粉母細胞から四分子、小胞子を経て成熟花粉へと劇的に成長を遂げる。四分子期から成熟花粉期までの発育ステージ全般にわたって葯で発現している *OsPIP1;1* 及び *OsTIP1;1* 等のアクアポリンと、小胞子後期までに発現し成熟期には発現しない *OsPIP2;4* 及び *OsPIP2;6* 等のアクアポリンでは、葯内で異なる機能を果たしている可能性が考えられる。Bots ら (2005) は、タバコの PIP2 型アクアポリン (NtPIP2;1) の抗体を用いた免疫組織染色実験を行い、NtPIP2;1 が葯壁、connective tissue、篩管、stomium に局在する一方で、道管、表皮、タペート、小胞子 (花粉) には局在しないことを明らかにした。また、この NtPIP2;1 遺伝子を RNAi 法により発現抑制した形質転換タバコでは、葯の脱水および裂開の進行が遅れることを明らかにし、NtPIP2;1 が葯の正常な脱水および裂開に重要な役割を果たしている可能性を示した。Ishikawa ら (2006) は、プロモータ GUS を用いた方法により、シロイヌナズナのアクアポリン AtSIP1;1 と AtSIP2;1 が花粉に局在することを明らかにした。また、これらの SIP の水輸送活性が低いことや、細胞内では ER に局在することも報告している。イネの葯では、NtPIP2;1 と最も相同性の高い OsPIP2;6、さらに OsSIP1;1、OsSIP2;1 が多く発現していたことから、葯のアクアポリンは、植物を問わず共通した機能を果たしている可能性も考えられる。今後は、遺伝子レベルで発現の見られたアクアポリンに的を絞り、葯の組織内でのアクアポリン局在性や形質転換体の表現型を解析することにより、その機能を解明する必要がある。

第4章 イネアクアポリンの水輸送活性

第1節 緒言

第3章において、33種のイネアクアポリンの中で、葉身と根でそれぞれ13及び16種のアクアポリンが多く発現していることを明らかにした。これらのアクアポリンが実際に水透過性を持つアクアポリン（水チャンネル）として機能しているのかどうかを確かめるため、本章では、この中から特に発現量の多い10種（OsPIP1;1、OsPIP1;2、OsPIP2;1、OsPIP2;2、OsPIP2;3、OsPIP2;4、OsPIP2;5、OsTIP1;1、OsTIP1;2、OsTIP2;2）に的を絞り、これらのアクアポリンの水透過活性を個別に評価した。

第2節 材料及び方法

<イネアクアポリン遺伝子のクローニング>

第3章にてイネ根より抽出したRNAから合成したcDNAに対し、KOD-Plus (TOYOBO)あるいはLa Taq (TaKaRa)と各アクアポリン遺伝子に特異的なプライマー (Table 4-1)を用いたPCRにより遺伝子をクローニングした。PCRの反応条件は、94℃・30秒 (変性)、58℃・30秒 (アニーリング)、72℃・2分 (伸長)を1サイクルとして40サイクル行った後、さらに72℃で5分間伸長反応を行った。なお、クローニングした遺伝子は酵母用遺伝子発現ベクター (次項参照)のマルチクローニングサイトに挿入するため、プライマーの両端に制限酵素配列をあらかじめ付加しておいた。具体的には、ORFの上流側、下流側にそれぞれ*EcoRI*と*SalI* (あるいは*PvuII*)が付加されるようにプライマーを設計した (Table 4-1)。PCR後に、増幅産物を制限酵素処理して、同じく制限酵素処理した酵母用発現ベクターmyc-pKT10 (Fig. 4-1, Tanaka et al. 1990, Suga and Maeshima 2004)とライゲーションを行

った。ライゲーションには、LigaFast™ Rapid DNA Ligation System (PROMEGA) を用いた。その後、BigDye® Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてシーケンスを行い、目的の遺伝子がクローニングされていることを確認した。

<各アクアポリン遺伝子の酵母での発現と粗膜画分の調製>

作製した各アクアポリン遺伝子発現用コンストラクトを酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BJ5458 株に導入し、URA3 を指標として選抜を行った (Nakanishi et al. 2001, Suga and Maeshima 2004)。選抜された酵母から粗膜画分を調製し (Nakanishi et al. 2001)、イムノブロット (第 3 章参照) によりアクアポリン発現を確認した。本発現系では、アクアポリンの N 末端に myc タグがついたタンパクを発現するように設計されているため、イムノブロット用の一次抗体には、anti-myc (9E10) 抗体 (ナカライ) を用いた。また、各アクアポリンペプチド抗体も用いて、目的のアクアポリンの発現を確かめた。得られたバンド濃淡を NIH image あるいは CS analyzer ソフトウェア (アトー) で定量化して、各膜サンプル間のアクアポリン発現量の差異を比較した。

<水透過活性の測定>

Nakanishi ら (2001) の方法に従い、酵母から粗膜画分を抽出した。抽出した粗膜画分をあらかじめ低張液 (50 mM mannitol, 90 mM KCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.2) に 0.4 mg/ml となるよう懸濁しておき、ストップフロー装置 (model SX18MV, Applied Photophysics) の片方の駆動シリンジにセットした (Fig. 4-2)。もう一方の駆動シリンジには高張液 (500 mM mannitol, 90 mM KCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.2) をセットし、両方のシリンジを同時に等量ずつ混合することにより測定を開始した。測定は 10°C で行い、膜小胞内外の浸透圧差 (膜の内側 50 mM に対して外側 275 mM) に応じて膜が収縮する過

程を光散乱度 (466 nm) の変化から測定した。これは、光散乱度と膜小胞のサイズが直線的な相関関係にあること (Laizé et al. 1995) を利用している。膜小胞のサイズが大きいと光散乱度が小さく、膜小胞のサイズが小さいと光散乱度が大きい。各膜サンプルについて測定は 10~14 回行い、その平均値から反応曲線を求めた。この反応曲線をストップフロー装置に付属のソフトウェア (SX.18MV) を用いて exponential にフィッティングさせた後、その速度定数を求めた。

$$P_f = (V_0 * K) / (S * V_w * (Osm_{in} - Osm_{out}))$$

P_f : 膜の水透過活性 ($cm \text{ sec}^{-1}$)

V_0 : 反応前の膜小胞の体積 (cm^3)

K : 速度定数 (sec^{-1})

S : 反応前の膜小胞の表面積 (cm^2)

V_w : 水の部分モル体積 ($18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$)

Osm_{in} : 膜小胞の内側の浸透圧 ($mosM = \text{mol cm}^{-3}$)

Osm_{out} : 膜小胞の外側の浸透圧 ($mosM = \text{mol cm}^{-3}$)

本研究において、各アクアポリンの水透過活性は、アクアポリンを発現していない酵母の膜小胞の水透過活性に対する促進比、すなわち「相対水透過活性」として求めた。したがって、各アクアポリンの相対水透過活性は、ストップフロー実験の反応カーブから求めた速度定数の比 (アクアポリンを発現していない酵母の膜小胞の速度定数に対する比) に一致する。さらに、この相対水透過活性を、前項のイムノプロット解析で求めたアクアポリン発現量の比で補正して、「発現レベルを考慮した個々のアクアポリン分子種の相対水透過活性」とした。なお、OsPIP1;1、OsPIP1;2、OsPIP2;4、OsPIP2;5 については、膜の内側 300 mM に対して外側 450 mM の浸透圧差における収縮過程を測定した。上述の計算式より、水透過活性は、膜内外の浸透圧差及び反応開始前の膜小胞のサイズに依存して変化するが、本研究で用いる「相対水透過活性」は、同じ反応条件で測定したコントロール (アクアポ

リンを発現していない酵母の膜小胞) に対する促進比として求めるので、両実験結果から求められた値は比較することができる。

第3節 結果

各アクアポリンを個別に酵母で発現させた後、粗膜画分を抽出し、anti-myc 抗体を用いてイムノプロット解析を行ったところ、それぞれのアクアポリンの単量体の推定分子サイズ (PIP は 26~29 kDa、TIP は 20~24 kDa) 近くにバンドが確認され、目的のアクアポリンの発現を確認した (Fig. 4-3)。PIP 及び OsTIP2;2 では単量体の他に二量体のバンド (PIP は 52~57 kDa、OsTIP2;2 は 37 kDa) も見られた。なお、それぞれのアクアポリンに特異的なペプチド抗体 (第3章参照) を用いたイムノプロットも行い、目的のアクアポリンが発現していることを確かめている。

得られた膜画分を用いて、膜の内側 50 mM に対して外側 275 mM の浸透圧差における収縮過程をストップフロー光散乱法により水透過活性を測定した。Fig. 4-4 はその典型的な光散乱度の変化パターンを示す。アクアポリンを発現させていない粗膜画分はゆっくりと光散乱度が増加したのに対し、OsPIP2;3 を発現させた粗膜画分では非常に早く光散乱度が増加した。全てのアクアポリンについて、第2節に示した方法により、発現レベルで補正した相対水透過活性を求めたところ、OsPIP2;1、OsPIP2;2、OsPIP2;3、OsPIP2;4、OsPIP2;5、OsTIP2;2 はアクアポリンを発現させていない粗膜画分に比べ高い水透過活性を示したのに対し、OsPIP1;1、OsPIP1;2、OsTIP1;1、OsTIP1;2 は水透過活性が低いことが明らかとなった (Fig. 4-5)。

第4節 考察

イネの主要なアクアポリン10種の水透過活性は、アクアポリンの種類によって異なっていた (Fig. 4-5)。まず、PIP1型は水透過活性が低く、それに対してPIP2型は活性が高かった。この結果は、イネのみならず、トウモロコシやダイコン等、他の植物にも共通する結果である (Chaumont et al. 2000, Fetter et al. 2004, Suga and Maeshima 2004)。また TIP2型の OsTIP2;2 が高い水透過性を示したことは、トウモロコシの TIP2型アクアポリン ZmTIP2;3 (Lopez et al. 2004) と同様の結果であった。しかし、TIP1型の OsTIP1;1 と OsTIP1;2 の活性がともに低かったことは、他の植物で報告されている結果とは異なっている。シロイヌナズナの AtTIP1;1 やダイコンの RsTIP1;1 は、ともに高い水透過活性を示した (Maurel et al. 1993, Suga and Maeshima 2004)。イネと他の植物で違いが見られた原因として、2つの要因が考えられる。まず、今回のイネ実験系ではN末に myc タグをつけた融合タンパク質としてアクアポリンを発現させたという実験系の違いである。Myc タグが TIP1型の立体構造に影響し、アクアポリンゲートが閉じた可能性も考えられるので、myc タグを除いた TIP1型アクアポリンを用いて再検討が必要である。もうひとつの原因として考えられるのは、TIP1型の翻訳後修飾の可能性である。TIPの活性はリン酸化や膜への trafficking により制御されているという報告があることから (Maurel et al. 1995, Vera-Estrella et al. 2004, Boursiac et al. 2005)、今回用いた酵母の発現系においては、これらの活性調節機能が欠失していた可能性も考えられる。イネ TIP1型の水透過活性が本当に低いのか、それとも上記のような理由で、実験上、低い水透過活性が観察されたのかについては、今後の検討が必要である。

今回の実験結果から、少なくともイネの PIP2型及び TIP2;2には高い水透過活性があることが証明された。これらのアクアポリンについては、イネ体内でも高い水透過活性を持ち機能していると考えられる。PIP1型と TIP1型については、水輸送機能が本当にないのか、それとも別の基質を輸送するのか、さらなる検討が必要である。PIP1型の OsPIP1;1, OsPIP1;2

は、イネの中でも最も発現量の多いアクアポリンである（第3章参照）。それにも関わらず水透過活性が低いことは驚きに値する。活性が低い、発現量が多いので細胞の水透過性に一定の貢献をしているのか、あるいは植物細胞内で何らかの活性化メカニズムがあるのか、それとも全く別の物質の輸送体として機能しているのか、今後の解析が必要である。

Suga and Maeshima (2004) は、ダイコンの RsPIP1;3 を用いて PIP1 型の水輸送活性が低いことが、2つのハーフヘリックスのうちC末側の HE に存在する1アミノ酸残基 (Ile) に起因することを突き止めた。ダイコンの場合、全ての PIP1 型でこのアミノ酸残基が Ile であるのに対し、PIP2 型は Val である。RsPIP1;3 の Ile を PIP2 型の Val に置換すると、PIP2 型と同程度の水透過活性を示した。反対に、PIP2 型の RsPIP2;2 の Val を Ile に置換すると、水透過活性が低下したことから、Val が水輸送活性に重要であることを明らかにした (Suga and Maeshima 2004)。イネでも、PIP1 型に Ile が、OsPIP2;8 を除く PIP2 型に Val が保存されていたことから、HE に存在するこのアミノ酸が水透過性の差に影響を与えている可能性が考えられる。

PIP1 型の活性化メカニズムとして、Fetter ら (2004) 及び Zelazny ら (2007) はヘテロ4量体形成説を提示している。アクアポリンはホモ4量体で機能すると考えられているが、彼らは、トウモロコシ葉肉細胞のプロトプラスト発現系を用いて、トウモロコシの PIP1 型と PIP2 型がヘテロ4量体を形成することを明らかにした。さらに、PIP1 型のホモ4量体、あるいは PIP1 型同士のヘテロ4量体では、細胞膜へ局在化されず ER に蓄積しているのに対し、PIP1 型-PIP2 型のヘテロ4量体は細胞膜に局在することを確認した (Zelazny et al. 2007)。またアフリカツメガエルを用いた同様の実験系でも、PIP1 型-PIP2 型のヘテロ4量体化で細胞膜への移行が促進され、細胞の水透過性自体も増加することを報告している (Fetter et al. 2004)。Fetter ら (2004)、及び Zelazny ら (2007) が証明したのは、いずれも強制的にアクアポリンを過剰発現させた場合である。このヘテロ4量体形成説は PIP1 型の機能を考える上で非常に興味深い、実際に、植物体内でアクアポリンのヘテロ4量体が形成されて

いるかについては、さらに検討が必要である。

アクアポリンのヘテロ 4 量体形成説に相反するデータも報告されている。Ohshima ら (2001) は、アクアポリンの単量体同士の相互作用が非常に強いことを明らかにした。植物から抽出した粗膜画分でウェスタンブロットを行う際、SDS-PAGE に供する粗膜画分の濃度を濃くすると dimer や trimer のバンドが観察された (Ohshima et al. 2001)。また本研究においても、アクアポリンを酵母で過剰発現させた場合に dimer のバンドが観察された (Fig. 3-6)。これらの結果から、アクアポリン単量体同士の相互作用は非常に強いことが考えられる。したがって、アクアポリンが新規に合成される過程を考えた場合、粗面小胞体上で mRNA からタンパク質に翻訳された後、直ちに 4 量体を形成して細胞膜や液胞膜へ運ばれるものと予想される。翻訳直後は、異なるアクアポリン分子種の単量体が近くにある確率よりも、同じ分子種の単量体が近くにある確率が高いと考えられるので、ホモ 4 量体を形成しやすいのではないかと考えられる。しかし、実際にトウモロコシの根から抽出した細胞膜画分を PIP2 型抗体で免疫沈降させると、その沈降画分が PIP1 型抗体と反応したという報告もあることから (Zelazney et al. 2007)、植物体内でも PIP1 型と PIP2 型の相互作用する可能性は否定することはできない。植物体内でのホモ 4 量体とヘテロ 4 量体の存在比、また、アクアポリンの生合成経路等、今後の検討が必要である。

第5章 環境ストレスに対するイネアクアポリンの発現応答

第1節 緒言

第3、4章の結果から、イネの33種類のアクアポリンのうち、根で多く発現し、高い水透過活性を持つアクアポリンとして、OsPIP2;1、OsPIP2;2、OsPIP2;3、OsPIP2;4、OsPIP2.5、OsTIP2;2の6種を選定した。さらに活性は低いが発現量の多いOsPIP1;1、OsPIP1;2、OsPIP1;3、OsTIP1;1の4種と、実験は行っていないが活性が高いと考えられ、かつ発現量の比較的多いPIP2型のOsPIP2;6およびTIP2型のOsTIP2;1の2種にも着目し、これら合計12種のアクアポリンについて、本章で環境ストレスとの関係について検討を進めた。葉身についても同様に、第3、4章の結果から、OsPIP1;1、OsPIP1;2、OsPIP2;1、OsPIP2;2、OsPIP2;6、OsTIP1;1、OsTIP1;2、OsTIP2;2の8種に着目して検討を進めた。

第1章でも述べたが、環境ストレス下における植物の応答とアクアポリンの関係については、アクアポリンの量的変動が原因となる場合と、アクアポリンの活性が原因となる場合の二通りがある。本研究では、まず量的変動に着目し、環境ストレスによりアクアポリン発現量が変動するかどうか確認するために実験を行った。具体的には、低温処理と高CO₂処理に着目して実験を進めた。低温は根の吸水量を低下させる(Kramer and Boyer 1995)が、そのメカニズムについては未だ明らかになっていない。そこで低温による吸水量の低下と根のアクアポリン発現量にどのような関係が見られるかどうか検討を行った。また、高CO₂処理については、以前の研究から、大気CO₂濃度より高いCO₂条件下では、イネの成長が促進され、収量が増加することが明らかにされている(Kimball et al. 2002)。一方で、高CO₂条件下では、大気CO₂条件下に比べ気孔開度が低下する(Hunsaker et al. 1994、Kimball et al. 1999)ので、蒸散量が低下する(Kimball and Idso 1983、Hileman et al. 1994)。そこで、根や葉身のアクアポリンの量的変動が、蒸散量の低下に関与している可能性について検討を行

った。

第2節 材料及び方法

<用いたイネ品種と栽培方法>

低温処理実験用イネについては、品種あきたこまちを用い、第3章と全く同じ栽培条件で人工気象室にて水耕栽培を行った。

CO₂処理実験は、2007年の5月25日から6月21日、及び7月20日から8月13日の2作期に分けて行った。イネ品種はあきたこまちを用いた。種子の消毒、芽出しは第3章と同じ方法で行った後、500 mlのプラスチックカップ（デスクアップ、テラオカ、直径100 mm x 高さ120 mm）あるいは1/10,000 アールワグネルポット（直径113 mm x 高さ140 mm）に播種した（Fig. 5-1）。播種後、ポット上部をアルミ箔で覆い、ハウス内に置いた。3、4日後にアルミ箔をはずし、CO₂処理を開始した。CO₂処理は、東北農研センター内にあるTGC（temperature gradient chamber、Fig. 5-2）で行った。TGC2棟を使用し、1棟は、大気CO₂と同じCO₂濃度（以下、大気CO₂区と呼ぶ）、もう1棟は大気CO₂濃度 + 200 ppm（以下、高CO₂区と呼ぶ）に制御した。2棟のTGCそれぞれについて、低温区（TGCの端から2.5 m）及び中温区（同8.5 m）の2カ所にサンプルを置いた。3、4日後から水耕栽培を開始し、1日おきあるいは毎日水耕液を交換して栽培した。

<低温処理>

播種16日後に人工気象室から取り出し、4℃の人工気象室にて低温処理を行った。処理は暗黒下で行い、同時に加湿器で定期的に加湿を行い、イネに光ストレスや乾燥ストレスが生じないようにして低温処理を行った。処理は3あるいは4日間行い、処理後は25℃連続光（相対湿度75%、光強度400 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ）の人工気象室に戻した。

<溢泌液量の測定>

イネの葉鞘の生え際から3~4 cmの部分をハサミでカットし、即座にパラフィルムをまいた綿をかぶせて溢泌液を集めた。溢泌液の回収は25℃明条件下で行い、12時間後に綿の重量変化を測定して溢泌液量 ($\text{mg stem}^{-1} 12 \text{ hr}^{-1}$) とした。

<葉齢の測定>

葉齢は、鞘葉の次に若い葉を第1葉として順次数えた。葉身が展開途中にある場合、展開途中の葉身が1葉前の葉身長の何割まで展開しているかを計測して求めた。例えば、第5葉の葉身が第4葉の葉身長の8割程度まで展開していた場合、葉齢は4.8葉とした。

<蒸散量の測定>

蒸散量 (T_p) は以下の計算式より求めた。

$$T_p = (W_0 - W_1 - W_E) / LA$$

W_0 : 水耕液交換直後のポット重量

W_1 : 翌日水耕液を交換する直前のポット重量

W_E : 植物体のないポットの重量変化 (水耕液の蒸発量)

LA: 葉面積

<葉面積の測定>

葉身のみをサンプリングし、葉面積計 (Automatic area meter AAM-9、林電工) を用いて測定した。

<乾物重の測定>

葉身、葉鞘、根に分けた後、80℃で2日間以上十分に乾燥させた後、重量を測定した。

<RNA 抽出方法>

第3章と同じ方法で行った。抽出の途中で、RNase-Free DNase Set (キアゲン) を用いてサンプル中の DNA を除去した。操作はメーカーの推奨プロトコールに従い行った。

<cDNA の合成>

低温処理サンプルについては第3章と同じ方法で行った。CO₂ 処理サンプルについては、High-Capacity DNA Reverse Transcription Kits (ABI) 及び Random primers (ABI) を用いて行った。逆転写反応は、25℃・10分、37℃・2時間行い、その後、85℃で5秒間変性して cDNA 原液とした。

<アクアポリン発現量の解析>

低温処理サンプルについては第3章と同じく、半定量的 RT-PCR 法で行った。CO₂ 処理サンプルについては、StepOne システム (ABI) と Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI) を用いたリアルタイム PCR 法にて解析を行った。各アクアポリンのプライマーは primer3 ソフトウェア (<http://frodo.wi.mit.edu/>) を用いて設計した (Table 5-1)。反応条件は 95℃・15秒 (変性)、60℃・1分 (アニーリングと伸長) で 40 サイクル行い、反応終了後に融解曲線分析を行い、増幅産物の検定を行った。内部標準としてアクチン遺伝子を用い、アクアポリン発現量を補正した。なお、DNA のコンタミネーションがないことを確認するため、逆転写反応を行う前の RNA サンプルについて、各アクアポリンのプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、増幅産物の有無を確かめた。

第3節 結果

イネに低温処理を行うと、溢泌液量が低下した (Fig. 5-2A)。処理開始1日後には処理前の45%程度まで低下し、その後4日間の処理の間、緩やかに減少し続けた。しかし、25℃明条件下に戻すと処理前と同程度まで回復した。ほとんどのアクアポリンについて、低温処理中に発現量の低下が認められた (Fig. 5-2B, C)。アクアポリンの種類によって発現低下の度合いが異なっていた。*OsPIP1;2*、*OsPIP2;4*、*OsPIP2;5*等は、処理1日後で数分の1に発現量が低下したのに対し、*OsPIP2;3*、*OsTIP2;2*等は3日間の低温処理で緩やかに発現量が低下した。一方、*OsPIP1;3*は、低温処理中に発現量の増加が認められた。低温処理後、25℃、明条件下に戻した場合、全てのアクアポリンで発現量の増加が見られ、3~9時間後から発現量の回復が見られた。

CO₂の処理効果の実験は、2007年の5~6月及び7~8月の2作期に分けて行った。大気CO₂区と高CO₂区の2棟のTGCハウス内のCO₂濃度変化を生育期間全体で比較したところ、平均して約200 ppmの濃度差で制御できていた (Fig. 5-5A)。また、気温及び水耕液の温度変化については、2棟間でほとんど差が無かった (Fig. 5-5B, C)。生育期間中に葉齢の変化を測定したところ、高CO₂区で大気CO₂区より若干葉齢が進んでいる時期もあるが、ほぼ同じ変化を示した (Fig. 5-6)。一方、乾物重については、葉身乾物重は大気CO₂と高CO₂区でほとんど差がなかったが、葉鞘と根の乾物重は高CO₂区が大気CO₂と比べ4~13%高く、低温区で差が大きかった (Fig. 5-7A)。また葉面積については、大気CO₂と高CO₂区で同程度であった (Fig. 5-7B)。蒸散量については、低温・中温区のいずれについても、また2作期のどの日をとっても、高CO₂区で大気CO₂区より約5~23%蒸散量が減少していた (Fig. 5-8)。

次に大気CO₂と高CO₂区でのアクアポリン遺伝子発現量の差異について、根と葉身で比較を行った。まず根については、低温処理の場合と同様に第1節に記した12種類のアクア

ポリンにターゲットを絞り、遺伝子発現量の解析を行った。1作期目については、低・中温区の両方で一致した発現量の変動を示すアクアポリンは見られなかった (Fig. 5-9A)。2作期目の低温区については、*OsPIP1;1*, *OsPIP1;2*, *OsPIP1;3*, *OsPIP2;1*, *OsPIP2;2*, *OsPIP2;6*, *OsTIP1;1*, *OsTIP2;1*, *OsTIP2;2* の発現量が高 CO₂ 区で 16~40%低下し、*OsPIP2;5* の発現量は高 CO₂ 区で 21%増加していた (Fig. 5-9B)。しかし、2作期目の中温区ではどのアクアポリンについても発現量の差は見られなかった (Fig. 5-9B)。

葉身については、第1節に記した 8 種類のアクアポリンについて遺伝子発現量の解析を行った。低・中温区両方で、*OsPIP1;1*, *OsPIP2;2* が高 CO₂ 処理により 11~35%低下していた (Fig. 5-10)。*OsPIP1;2*, *OsPIP2;1*, *OsPIP2;6*, *OsTIP2;2* については、低温区では高 CO₂ 処理により 11~37%低下していたが、中温区では低温区ほど有意な差が見られなかった。

第4節 考察

低温処理はイネの根のアクアポリン遺伝子発現量を低下させた (Fig. 5-4B, C)。低温処理によるアクアポリン mRNA 量の低下は、トウモロコシ (Aroca et al. 2005) や、異なる低温処理を行ったイネ (Li et al. 2000, Yu et al. 2006) でも報告されている。アクアポリンの mRNA のターンオーバー (新規に合成されて分解されるまで) がどのくらいの期間であるのかについてはまだ明らかにされていないが、低温により新規に合成されるアクアポリン mRNA 量が低下するとともに mRNA の分解が促進されたため、全体の mRNA 量が低下したと考えられる。また、発現量の低下の度合はアクアポリンの種類によって異なり、例えば *OsPIP1;2*, *OsPIP2;4* 等は低温処理開始 1 日後で mRNA 量が激減したのに対し、*OsPIP1;1*, *OsPIP2;2* 等は 3 日間の処理中に緩やかに減少した (Fig. 5-4B)。アクアポリンの新規合成量が全体の mRNA 量に大きく寄与していると仮定すると、それぞれのアクアポリンが低温に対して応答性の異なるプロモータを持っていると考えられる。特に *OsPIP1;3* は低温処理中

に唯一発現量が増加するアクアポリンであり、低温誘導性プロモータが上流に存在する可能性がある。今後、プロモータや遺伝子のターンオーバーを詳細に解析することにより、これらの低温応答性の違いが明らかになると考えられる。

低温処理により多くのアクアポリンの遺伝子発現量が低下し、その後、常温に戻すと回復するパターン (Fig. 5-4B, C) は、根の吸水量 (溢泌液量) の変動パターン (Fig. 5-4A) と一致していた。Yu ら (2006) も、7℃の低温処理により、イネの PIP 遺伝子発現量が低下し、その後、常温に戻すと回復するパターンを報告している。この変動パターンは根の通水コンダクタンスの変化とも一致した。これらの結果から、アクアポリンの量的変動が、吸水量の低下に関与している可能性が考えられる。しかし、Murai ら (投稿中) は、イネの根のみを 10℃の低温にさらした場合、根の通水コンダクタンスが徐々に低下し、2 時間で 10 分の 1 程度まで減少するが、この間のアクアポリンのタンパクレベルでの発現量はほとんど変動しないことを明らかにした。したがって、低温による根の通水コンダクタンスの低下は、アクアポリンの量的な変動からは説明することができず、アクアポリンの活性 (ゲートの開閉) が低温で何らかの影響を受けたのではないかと考察している (Murai et al. submitted)。本研究で用いた低温処理方法 (植物体全体を冷却、処理時間が長い) と村井らの行った低温処理方法 (根のみを冷却する、処理時間が短い) は手法が異なり一概に比較することはできないが、本研究と同じ実験系でタンパクレベルでのアクアポリン発現変化を追跡する必要がある。また、特定のアクアポリンの形質転換イネを用いて通水コンダクタンスの温度応答性を解析することにより、アクアポリンの量的変動と低温との関係を明らかにすることができると考えられる。低温がアクアポリン活性 (ゲートの開閉) に影響を与える可能性については、アクアポリンのリン酸化レベルの変化、あるいは細胞質の酸性化、活性酸素種、膜の流動性等の変化を介した制御など、様々な角度から検討を進める必要がある。

+ 200 ppm の高 CO₂ 区でイネを生育させた場合、最大で約 23% もの蒸散量低下が認められ

た (Fig. 5-8) ことから、1つの仮説として、高 CO₂ 区で根や葉身のアクアポリン量が減少し、吸水量や蒸散量が低下しているのではないかと考えられた。しかし、根のアクアポリン遺伝子発現量は高 CO₂ 区と大気 CO₂ 区で明瞭な差は見られなかった (Fig. 5-9)。さらに、高 CO₂ 区で根の乾物重が約 10% 増加していた (Fig. 5-7) ことを考慮すると、根全体のアクアポリン量は高 CO₂ 区の方が若干多いと予想されることから、蒸散量の低下と根のアクアポリン発現量には相関がなく、当初の仮説は成り立たないと考えられた。今後は、大気 CO₂ 区と高 CO₂ 区で溢泌液量あるいは根の通水コンダクタンスを比較するとともに、タンパクレベルでのアクアポリン発現量も解析し、結果を検証する必要がある。また、アクアポリンのリン酸化程度等、活性レベルでの調節機構についても解析する必要がある。

葉のアクアポリン発現量については、高 CO₂ 区の低温・中温両方の温度域で *OsPIP1;1*、*OsPIP2;2* 発現量が 11~35% 低下していた (Fig. 5-10)。葉身乾物重は大気 CO₂ 区と高 CO₂ 区で変わらなかった (Fig. 5-7) ことから、葉身全体としての *OsPIP1;1*、*OsPIP2;2* 遺伝子発現量も高 CO₂ 区で低下したと考えられる。したがって、これらアクアポリンの発現量の低下が、葉の水ポテンシャル低下を介して、蒸散量の低下に寄与している可能性がある。*OsPIP2;2* は、水透過活性が高い (第 4 章参照) ことから、このメカニズムに関与している可能性が高いが、*OsPIP1;1* は水透過活性が低い (第 4 章参照) ので、蒸散量との関係については検討が必要である。なお、葉身の遺伝子発現解析は 1 作期のみの解析データであり、さらに作期を繰り返して実験を行い、結果を検証する必要がある。また、今回の実験系では、生育初期からずっと CO₂ 処理を行っているため、イネが環境に適応して、大気 CO₂ 区と高 CO₂ 区で差が出にくかったことも考えられる。葉身は直接大気と触れているため、大気 CO₂ 区で栽培したイネを高 CO₂ 区に移す、あるいはその逆の処理を行った場合のアクアポリン発現の変化を調べることにより、CO₂ に対するアクアポリンの反応をさらに明確にすることができるものと考えられる。

第6章 総合考察

第1節 イネアクアポリンの発現・局在・水透過性に関するプロファイリング

アクアポリンの発見により、植物水分生理における分子生物学的側面からの研究が進展しつつある。第1章の第3節に詳しく記載したように、シロイヌナズナやトウモロコシ等の遺伝子データベースが充実した植物を中心として研究が進められ、個々のアクアポリンが植物の水分生理、生長、環境ストレス応答性に果たす役割が少しずつ明らかになってきた (Hachez et al. 2006b, Maurel 2007)。また、アクアポリンの活性制御メカニズムや水以外の輸送基質を透過する可能性等についても研究が進められている (Hachez et al. 2006b, Maurel 2007)。しかし、本研究を開始した時点では、世界で最も多くの人々が主食とする重要穀物イネについて、どのようなアクアポリン遺伝子が存在するのか、またその機能についても報告が少なく、9種のイネアクアポリン遺伝子が報告されているに過ぎなかった。一方で、シロイヌナズナやトウモロコシを用いた研究結果 (Chaumont et al. 2001, Johanson et al. 2001) から、植物には30種以上のアクアポリンが存在することが予想されていた。イネアクアポリンが植物体内でどのような機能を果たすのか、また環境ストレスに対する反応にアクアポリンがどのように関わっているのか、その全体像を理解するためには、イネが持つ全アクアポリンを念頭に置いて研究を進めなければならないことは明白であった。また、イネは湛水条件で生育するため、これまで報告されていた畑作物とは異なるアクアポリンの種類や発現様式が明らかになる可能性もあった。そこで本研究では、まずイネの全アクアポリン遺伝子を同定することから研究を開始し (第2章)、これらのアクアポリン遺伝子のイネ体内での発現様式について、遺伝子及びタンパクレベルから詳細に解析を行うとともに (第3章)、特に発現量の多いアクアポリンについては、その水透過活性を個別に評価した (第4章)。これらの結果から、イネアクアポリンの発現・局在・水透過性に関するプ

ロファイルを作成することを第一の目的として研究を行った。

まず第2章において、未だ明らかにされていなかったイネの全アクアポリン遺伝子を同定した。既知のシロイヌナズナやトウモロコシのアクアポリン配列を元にして、イネゲノムデータベースより33種のアクアポリン遺伝子を同定した。その数は、シロイヌナズナの35種 (Johanson et al. 2001) やトウモロコシの33種 (Chaumont et al. 2001) と近いことがわかった。しかし、その内訳を見ると、他の植物との違いも見られた。他の植物にはない特徴的な配列を持つアクアポリン OsPIP2;7、OsPIP2;8 が存在することや、NIP の種類の多さ等が明らかとなった。イネ特有のアクアポリンメンバーについては、輸送基質の同定がその機能解析のカギになると考えられる。

第3章では、第2章で同定した33種のイネアクアポリン遺伝子が、イネのどの器官のどの組織で機能するのかを明らかにするため、遺伝子及びタンパクレベルでの発現及び局在性解析を行った。まず、RT-PCR法により、33種の全アクアポリン遺伝子の発現を葉身と根で比較し、アクアポリンの種類によって異なる器官局在性を持つことを明らかにした。葉身と根では、それぞれ13及び16種のアクアポリン遺伝子が多く発現していた。

葉身と根で特に遺伝子発現量の多い9種 (OsPIP1;1、OsPIP1;2、OsPIP1;3、OsPIP2;1、OsPIP2;3、OsPIP2;5、OsTIP1;1、OsTIP2;1、OsTIP2;2) のアクアポリンに着目し、これらを個別に認識することができるペプチド抗体を作製した。アクアポリンは非常に配列の相同性が高く、PIP1型については個別に認識できる抗体は作製できず、3つのPIP1型全てを認識する抗体を用いた。PIP2型についても、OsPIP2;4とOsPIP2;5のように91%もの配列相同性が見られるものもあるが、比較的、配列の多様性に富むN末端あるいはC末端側の配列をペプチド抗原として、目的のアクアポリンのみを特異的に認識する抗体の作製に成功した。TIPについても、配列の多様性が見られるC末側からペプチド配列を選定し、特異的抗体を作製した。これほど多くの種類の特異的抗体を用いてアクアポリン局在性を解析した研究は、今までに報告はない。この特異的抗体を用いて、それぞれのアクアポリンが根や葉身のどの

組織・細胞に局在するかを免疫組織染色法にて明らかにした。その結果、根では、特に根端に近い部位（根端から約 4 mm の部位）で、アクアポリンの種類により異なる組織に局在していることを明らかにした。例えば、OsPIP1 型、OsTIP2;1 は内皮特異的に局在していたのに対し、OsTIP1;1 は外皮や厚膜組織特異的に局在していた。したがって、イネは種々のアクアポリンメンバーを適材適所に配置し、効率的な水輸送を行っていると考えられる。

根の横断及び縦断切片を用いたアクアポリン局在性解析の結果から、イネアクアポリンは主に根端から 1.5~4 mm の部位に多く局在し、それより基部側ではあまり発現していないことが明らかとなった。一方、トウモロコシでは、根端から数 mm の部位ではアクアポリン遺伝子発現量が低く、基部に向かうにつれて発現量が増加することが明らかにされている (Hachez et al. 2006a)。このアクアポリン局在性の違いは、イネとトウモロコシの根の構造の違いに起因する可能性がある。イネは、通常、湛水条件で生育するため、水生植物に特徴的に見られる破生通気組織が発達している。破生通気組織には気体が存在するため、これが水移動の障壁となりうる。したがって、破生通気組織が発達していない根端側にアクアポリンが多く局在し、この部位で主に吸水が行われている可能性がある。

葉身では、2つの PIP 抗体を用いて局在を調べたところ、葉肉細胞特異的な局在が見られた。シロイヌナズナやタバコでも葉肉細胞にアクアポリンが局在することが明らかにされている (Robinson et al. 1996, Otto and Kaldenhoff 2000) が、本研究では非常に強い葉肉細胞への局在が観察された。これらの葉肉細胞特異的なアクアポリンの機能としては、蒸散を行うために必要とされる葉肉細胞の水ポテンシャルを維持する役割が考えられる。また、他の植物の PIP の中には CO₂ 輸送能が確認されていること (Uehlin et al. 2003, Hanba et al. 2004, Flexas et al. 2006) から、光合成を盛んに行う葉肉細胞において、CO₂ 輸送体として機能している可能性も考えられる。イネの PIP の CO₂ 輸送能については、今後、検討が必要である。

第 4 章では、今回の研究で同定したイネアクアポリンが実際に「水チャンネル」として

機能しているのかどうかを明らかにした。特にイネ体内で発現量の多い10種のアクアポリン (OsPIP1;1、OsPIP1;2、OsPIP2;1、OsPIP2;2、OsPIP2;3、OsPIP2;4、OsPIP2;5、OsTIP1;1、OsTIP1;2、OsTIP2;2) に着目してこれらの水透過活性を個別に評価した。その結果、PIP2型アクアポリンの5種類、及びOsTIP2;2が明瞭な水透過活性を持つことを明らかにした。一方、PIP1型とTIP1型の水透過活性は低かった。PIP1型の活性が低く、PIP2型及びTIP2型が高いという結果は他の植物で報告されている結果 (Chaumont et al. 2000, Fetter et al. 2004, Lopez et al. 2004, Suga and Maeshima 2004) と一致した。しかし、TIP1型については他の植物で高い水透過活性が報告されている (Maurel et al. 1993, Suga and Maeshima 2004) のに対し、イネでは低かった。TIP1型の低い輸送活性はイネのみで見られる現象なのか、それとも何らかの活性制御メカニズムがあるのか、今後の検討が必要である。

以上の結果を総括し、イネアクアポリンの発現・局在・水透過性に関するプロフィールを Fig. 6-1 にまとめた。根では、少なくとも OsPIP2;1、OsPIP2;2、OsPIP2;3、OsPIP2;4、OsPIP2;5、OsTIP2;2 の6種類が活性型のアクアポリンとして機能していると考えられる。さらに組織局在性の実験結果から考察すると、OsPIP2;1、OsPIP2;3、OsPIP2;5 については、内皮を始めとして根の多くの組織に局在しているので、transcellular pathway に中心的な役割を果たすと考えられる。一方、OsTIP2;2 は中心柱に局在するので、中心柱での水透過を促進していると考えられる。葉身では、OsPIP2;1、OsPIP2;2、OsTIP2;2 の3種類が活性型のアクアポリンとして機能していると考えられ、このうち、OsPIP2;1 については、葉肉細胞に局在していることから、葉肉細胞の水ポテンシャルの維持に貢献している可能性が考えられる。葍では、OsPIP2;1、OsPIP2;2、OsPIP2;4、OsTIP2;2 が活性型のアクアポリンとして機能していると考えられる。なお、OsPIP1;1、OsPIP1;2、OsTIP1;1 については、第4章の水透過活性測定実験では水透過活性が低かったが、第3章の RT-PCR の結果からはイネ体内での発現量が最も多いこと、また根では transcellular pathway のカギとなる内皮や外皮での局在が観察されたこと、さらに OsPIP1 のメンバーは葉肉細胞に多く局在していたこと等から、これらの組

織での水透過性に何らかの貢献している可能性があるものと考えられる。今後は、これらのアクアポリンの活性制御メカニズム等について解析を進める必要がある。

第2節 イネアクアポリンが環境ストレス応答に果たす役割

第2～4章の結果から、イネの33種類のアクアポリンのうち、根や葉身でそれぞれ多く発現し、水透過活性の高いアクアポリンが特定されたので、第5章では、これらのアクアポリンを主なターゲットとして、環境ストレスとの関係について検討を進めた。第1章の第3節に詳しく記載したように、環境ストレス下における植物の応答とアクアポリンの関係については、アクアポリンの量的変動が原因となる場合と、アクアポリンの活性が原因となる場合の2通りあることが、他の植物を用いた結果から明らかになりつつある。本研究では、まず量的変動に着目し、環境ストレスにより、上記のターゲットとなるイネアクアポリンの遺伝子発現量が変動するかどうか確認するために実験を行った。

本研究では、低温処理と高CO₂処理に着目して実験を進めた。まず、低温による吸水量の低下と根のアクアポリン遺伝子発現量にどのような関係が見られるかどうか検討を行った。4℃の低温処理を1～3日間行くと、多くのアクアポリン遺伝子発現量が低下し、その後、常温に戻すと回復した。このパターンは、根の吸水量（溢泌液量）の変動パターンと一致したことから、アクアポリン遺伝子の量的変動が、吸水量の低下に関与している可能性が示された。しかし、Muraiら（投稿中）は、イネの根のみを10℃の低温にさらした場合、根の通水コンダクタンスが徐々に低下し、2時間で10分の1程度まで減少するが、この間のアクアポリンのタンパクレベルでの発現量はほとんど変動しないことを明らかにした。したがって、低温による根の通水コンダクタンスの低下は、アクアポリンの量的変動からは説明することができず、アクアポリンの活性（ゲートの開閉）が低温で何らかの影響を受けたのではないかと考察している（Murai et al. submitted）。本研究では、アクアポリン遺

伝子発現量と根の吸水量の変動に相関が見られたが、この結果は見かけ上の相関にすぎない可能性があるため、今後は活性レベルでの調節機構も含めて研究を進める必要がある。

以前の研究から、大気 CO₂ 濃度より高い CO₂ 条件下では、イネの成長が促進され、収量が増加することが明らかにされている (Kimball et al. 2002)。一方で、高 CO₂ 条件下では、大気 CO₂ 条件下に比べ気孔開度が低下する (Hunsaker et al. 1994, Kimball et al. 1999) ので、蒸散量が低下する (Kimball and Idso, 1983, Hileman et al. 1994)。そこで、根や葉身のアクアポリンの量的変動が、高 CO₂ 条件下での蒸散量の低下に関与している可能性について検討を行った。+200 ppm の高 CO₂ 区でイネを生育させた場合、最大で約 23% の蒸散量低下が認められた。一方、根のアクアポリン遺伝子発現量には高 CO₂ 区と大気 CO₂ 区で明瞭な差は見られなかったことから、蒸散量の低下と根のアクアポリン遺伝子発現量には相関がないと考えられる。葉身のアクアポリンについては、*OsPIP1;1*、*OsPIP2;2* 発現量が高 CO₂ 区で 11~35% 低下した。これらアクアポリン遺伝子発現量の低下が、葉身の水ポテンシャル低下を介して蒸散量の低下に寄与している可能性がある。今後は、遺伝子のみならずタンパクレベルでの変動も調査し、アクアポリンの量的変動が蒸散量低下に寄与しているのかどうか、明らかにする必要がある。

以上の結果から、特に低温処理については、アクアポリンの量的変動からはストレス応答性を説明できない可能性が示された。今後は、リン酸化レベルの変化、あるいは細胞質の酸性化、活性酸素種、膜の流動性等の変化を介した制御など、アクアポリンの活性レベルでの調節機構について、様々な角度から検討を進める必要がある。

また、イネアクアポリンの量的変動と環境ストレス応答性に相関があるという可能性については、全く否定することはできない。現在、水透過活性が高く、発現量の多い *OsPIP2;1*、*OsPIP2;4* の遺伝子過剰発現および発現抑制イネを作製しており、これらを用いて、通水コンダクタンスの環境ストレス応答性を解析することにより、イネアクアポリンの量的変動と環境ストレスとの関係を明らかにすることができると考えられる。アクアポリンの量的

変動及び活性制御の双方からの解析を進めることにより、アクアポリンが植物の環境ストレス応答に果たす役割の全容が解明されるものと期待される。

第7章 摘要

アクアポリンは、生体膜に存在し、主に水を選択的に輸送するチャンネルである。植物のアクアポリンは、細胞や組織さらに植物体全体における水透過性に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。すでに、シロイヌナズナやトウモロコシ等では、30種類を超える全アクアポリン遺伝子が同定され、植物体内での発現様式や機能の解析等が進捗しているが、世界で最も多くの人々が主食とする重要穀物イネについては、アクアポリン遺伝子の種類、発現様式等についての報告は少ない。そこで本研究では、イネの全アクアポリン遺伝子を同定し、これらのアクアポリン遺伝子の発現、局在、及び水透過性に関するプロファイルを作成することを目的として研究を行った。これらの解析によって、各器官や組織で重要な役割を果たすイネアクアポリンが選定されたので、それらに着目して、環境ストレスに対するイネの応答とアクアポリンの関係についても検討を行った。

既知のシロイヌナズナやトウモロコシのアクアポリン遺伝子配列を元にして、イネゲノムデータベースより33種のアクアポリン遺伝子を同定した。その数は、シロイヌナズナの35種やトウモロコシの33種と近いが、その内訳を見ると、他の植物にはない特徴的な配列を持つアクアポリン OsPIP2;7、OsPIP2;8 の存在や、4つのサブファミリーのひとつ NIP に属するアクアポリンの種類の多さ等の特徴が明らかとなった。

これら33種の全アクアポリン遺伝子の発現を葉身と根で比較したところ、アクアポリンの種類によって異なる器官局在性を持つことが明らかとなった。葉身と根では、それぞれ13及び16種のアクアポリン遺伝子が多く発現していた。この中から特に発現量の多い9種のアクアポリンに着目し、これらを個別に認識することができるペプチド抗体を作製した。この特異的抗体を用いて、根や葉身におけるアクアポリン局在を免疫組織染色法にて明らかにした。その結果、根では、特に根端に近い部位（根端から約4mmの部位）で、アクアポリンの種類により異なる組織に局在していることを明らかにした。例えば、OsPIP1型や

OsTIP2;1 は内皮特異的に局在していたのに対し、OsTIP1;1 は外皮や厚膜組織特異的に局在していた。したがって、イネは種々のアクアポリンメンバーを適材適所に配置し、根の表皮から道管に至る放射方向の水輸送を促進していると考えられる。また、イネアクアポリンは、主に根端から 1.5~4 mm の部位に多く局在し、それより基部側ではあまり発現していなかった。葉身では、2つのアクアポリン抗体が葉肉細胞と反応したことから、これらのアクアポリンが蒸散を行うために必要とされる葉肉細胞の水ポテンシャルを維持するため機能していると考えられる。また、他の植物で CO₂ 輸送能が確認されているアクアポリンもあることから、アクアポリンが葉肉細胞の CO₂ 透過性に関与している可能性も考えられる。

特にイネ体内で発現量の多い 10 種のアクアポリンに着目して、これらの水透過活性を、酵母の異種遺伝子発現系、及びストップフロー光散乱法を用いて個別に評価した。その結果、細胞膜型アクアポリン(PIP)のうち 5 種類の PIP2 型、及び液胞膜型アクアポリン(TIP)の OsTIP2;2 が明瞭な水透過活性を持つことを明らかにした。一方、PIP1 型と TIP1 型の水透過活性は低かった。以上の結果を総括すると、根では、少なくとも OsPIP2;1、OsPIP2;2、OsPIP2;3、OsPIP2;4、OsPIP2;5、OsTIP2;2 の 6 種類が活性型のアクアポリンとして機能していると考えられた。葉身では、OsPIP2;1、OsPIP2;2、OsTIP2;2 の 3 種類が活性型のアクアポリンとして機能していると考えられた。

これらのアクアポリンを主なターゲットとして、環境ストレスとの関係について検討した。まず、低温による吸水量の低下と根のアクアポリン発現量にどのような関係が見られるかどうか検討を行った。4℃の低温処理を 1~3 日間行くと、アクアポリン遺伝子発現量が低下し、その後、常温に戻すと回復した。このパターンは、根の吸水量（溢泌液量）の変動パターンと一致した。次に、高 CO₂ 条件による蒸散量低下と、根や葉身のアクアポリンの量的変動の関係について検討を行った。+ 200 ppm の高 CO₂ 区でイネを生育させた場合、最大で約 23%もの蒸散量低下が認められた。一方、根のアクアポリン遺伝子発現量に

は高 CO₂ 区と大気 CO₂ 区で明瞭な差は見られなかったことから、蒸散量の低下と根のアクアポリン遺伝子発現量には相関がないものと考えられる。葉身のアクアポリンについては、*OsPIP1;1*、*OsPIP2;2* 発現量が高 CO₂ 区で 11~35%低下した。これらのアクアポリン遺伝子発現量の低下が、葉身の水ポテンシャル低下を介して蒸散量の低下に寄与している可能性がある。今後はタンパクレベルでの発現解析を行い、アクアポリンの量的変動とストレス応答性の関係についてさらに検討を進める必要がある。また、環境ストレスがアクアポリンの活性（ゲートの開閉）調節に及ぼす影響についても検討する必要がある。アクアポリンの量的変動、及び活性制御の双方からの解析を進めることにより、アクアポリンが植物の環境ストレス応答に果たす役割の全容が解明されるものと期待される。

Summary

Aquaporins are membrane-bound channel proteins and transport water molecules efficiently in a wide variety of organisms. Recent studies on plant aquaporins have revealed that they play an important function in water transport in cells, tissues and whole plants. In *Arabidopsis* and maize, more than 30 members of aquaporin genes have been identified. Many studies are in progress to clarify their expression patterns and function *in vivo*. On the other hand, little is known about what members of aquaporins exist and what their function are in rice, one of the most important staple food on which the most of the world's population relies as a main cereal. I set two important objects of this study using rice plants: to identify whole aquaporin members and to determine a total profile of their expression, localization and water transport activities. Furthermore, after I selected several aquaporins that are likely major molecules functioning in each organ and tissue, the relationship between mRNA amounts of these important aquaporins and response to environmental effects on rice plants was analyzed.

Rice aquaporin genes were identified by homology search with those of *Arabidopsis* and maize. Rice had 33 aquaporins, which is almost the same number as *Arabidopsis* (35) and maize (33). Some rice aquaporins have unique sequences compared to other plants, such as OsPIP2;7 and OsPIP2;8. In addition, the number of NIPs was greater in rice than in other plants.

RT-PCR analysis revealed that 33 rice aquaporins had different organ specific expression patterns. In leaf blades and roots, 13 and 16 aquaporin genes were expressed well, respectively. Among them, I focused on nine aquaporins which were expressed really well in these organs. After isoform-specific antibodies of these aquaporins were raised, localization in sections of roots and leaf blades was analyzed by immunocytochemistry. Using samples prepared from root at around 4 mm from root tip, tissue-specific localization was observed with various aquaporins. OsPIP1 members

and OsTIP2;1 accumulated predominantly in endodermis. On the other hand, OsTIP1;1 showed specific localization in rhizodermis and exodermis. Analyses using longitudinal sections of the root revealed that aquaporins accumulated highly in the region adjacent to the root tip (around 1.5 to 4 mm from the root tip) and not so much in the region at around 30 to 40 mm. These results suggest that rice aquaporins may play distinct roles in different tissues and cells, especially in regions just above the root tip, to facilitate radial water movement from root surface to the central cylinder. In leaf blades, OsPIP1 members and OsPIP2;1 were localized mainly in mesophyll cells. These aquaporins may play crucial roles in the maintenance of water potential in mesophyll cells. Otherwise, they may be related to CO₂ uptake since some plant aquaporins have been proved to transport CO₂.

Water transport activity of each aquaporin member was analyzed using a yeast heterologous expression system in combination with a stopped-flow spectrophotometry. In this analysis, ten aquaporins which were expressed well in rice plants were selected. Five OsPIP2 members and OsTIP2;2 showed high water transport activities, while two OsPIP1 and two OsTIP1 members had low activities. From these results, at least 6 aquaporins, OsPIP2;1, OsPIP2;2, OsPIP2;3, OsPIP2;4, OsPIP2;5 and OsTIP2;2, were considered to function as active water channels in roots. In leaf blades, OsPIP2;1, OsPIP2;3 and OsTIP2;2 may play as functional water channels.

Next, the relationship between mRNA amounts of these aquaporins and environmental stresses were analyzed. At first, the effect of low temperature on aquaporin gene expression in roots was analyzed, since low temperature reduces considerably root water uptake. Low temperature treatment at 4°C for 1 to 3 days decreased aquaporin gene expression. After moving the plants back to the room temperature, the gene expression recovered. These expression patterns were similar to the patterns in bleeding sap volume, which is closely related to an ability of water uptake from roots. Secondly, an effect of elevated CO₂ treatment (+ 200 ppm compared to the normal atmosphere) on

aquaporin gene expression was analyzed in leaf blades and roots. Elevated CO₂ treatment decreased the transpiration by 23%. On the other hand, no significant changes in aquaporin gene expression in roots were detected when exposed to elevated CO₂ atmosphere. Therefore, there may be no apparent relationship between aquaporin gene expression in roots and the decrease in transpiration under elevated CO₂ conditions. On the other hand, the elevated CO₂ treatment decreased *OsPIP1;1* and *OsPIP2;2* in leaf blades by 11 to 35%. Decrease in *OsPIP1;1* and *OsPIP2;2* may lower the water potential in leaf blades and, as a result, transpiration may decrease in the elevated CO₂ treatment.

From the results in the present study, I found that rice aquaporins had various water transport activities and showed organ- and tissue-specific accumulation, suggesting that they may play distinct roles in facilitating water movement in different tissues and cells. Furthermore, I demonstrated that aquaporin mRNA amounts were not necessarily correlated with plant responses to under environmental stresses. Future analysis is clearly needed to determine aquaporin amounts at protein level under stress conditions. Furthermore, the effects of the environmental stresses on aquaporin activities (i.e., gating of aquaporins) should be investigated. Both analyses on aquaporin amounts and activities will uncover comprehensive functional profiles of aquaporins on the stress responses of rice plants.

謝辞

本論文を取りまとめるにあたり、ご指導を賜った岩手大学大学院 連合農学研究科 上村松生教授、同 杉山修一教授、同 寺内良平教授に深甚な謝意を表します。また、本論文に対して貴重なコメントをいただいた同 山本紳朗教授、名古屋大学大学院 生命農学研究科 前島正義教授に厚く御礼申し上げます。

研究遂行にあたり有益なご指導とご意見を賜った東北農業研究センター 寒冷地温暖化研究チーム 岡田益己チーム長、鈴木健策博士、村井麻理博士、並びに研究室の皆様方に深く感謝致します。特に、村井氏には研究全般にわたって終始適切なご助言を頂き、心より御礼申し上げます。同研究チームの非常勤職員として分析補助を賜ったアハメード アリファ博士、福士敬子氏、並びにイネの栽培管理等の実験補助を賜った高杉カツ子氏に厚く感謝の意を表します。イムノプロット法やアクアポリン分子種の水透過活性測定実験等についてご指導頂いた名古屋大学大学院 生命農学研究科 前島正義教授、同 石川文義氏、同 水谷政博氏、同 渡部哲史氏に厚く感謝の意を表します。イネの葉苗期低温障害、障害型不稔発生機構や葯サンプリング法をご教授いただいた東北農業研究センター やませ気象変動研究チーム 小池説夫博士に厚く感謝の意を表します。分子生物学関連の技術に関して丁寧なご指導を賜った同 山口知哉博士、岩手大学 COE 研究員 中山克大氏に深く感謝致します。組織切片の作製や免疫組織染色法についてご指導頂いた岩手大学 及川愛氏、東北農業研究センター 吉田信代博士、同 林高見氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を行うにあたり、常に暖かく見守り、精神的な支えとなってくれた家族に心より感謝致します。

引用文献

- Aharon, R., Shahak, Y., Winer, S., Bendov, R., Kapulnik, Y. and Galilia, G. (2003) Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* 15: 439-447.
- Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjövall-Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., Johanson, U. and Kjellbom, P. (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol. Biol.* 59: 469-484.
- Aroca, R., Amodeo, G., Fernández-Illescas, S., Herman, E.M., Chaumont, F. and Chrispeels, M.J. (2005) The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. *Plant Physiol.* 137: 341-353.
- Bots, M., Vergeldt, F., Wolters-Arts, M., Waterings, K., van As, H. and Mariani, C. (2005) Aquaporins of the PIP2 class are required for efficient anther dehiscence in tobacco. *Plant Physiol.* 137: 1049-1056.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D.-T., Sorieul, M., van den Dries, N. and Maurel, C. (2005) Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol.* 139: 790-805.
- Boyer, J. (1985) Water transport. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 473-516.
- Cochard, H., Venisse, J.-S., Barigah, T.S., Brunel, N., Herbette, S., Guilliot, A., Tyree, M.T. and Sakr, S. (2007) Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant Physiol.* 143: 122-133.
- Calamita, G., Bishai, W.R., Preston, G.M., Guggino, W.B. and Agre, P. (1995) Molecular cloning and characterization of *AqpZ*, a water channel from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270: 29063-29066.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R. and Chrispeels, M.J. (2000) Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol.* 122: 1025-1034.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M.J. and Jung, R. (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.* 125: 1206-1215.
- Fetter, K., Wider, V.V., Moshelion, M. and Chaumont, F. (2004) Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell* 16: 215-228.
- Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Hanson, D.T., Bota, J., Otto, B., Cifre, J., McDowell, N., Medrano, H. and Kaldenhoff, R. (2006) Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo. *Plant J.* 48: 427-439.
- Fortin, M.G., Morrison, N.A. and Verma, D.P. (1987) Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin

- is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Res.* 15: 813-824.
- Fraysse, L.C., Wells, B., McCann, M.C. and Kjellbom, P. (2005) Specific plasma membrane aquaporins of the PIP1 subfamily are expressed in sieve elements and guard cells. *Biol. Cell* 97: 519-534.
- Fujiwara, T., Takano, J., Tanaka, M., Hanaoka, H., Wada, M., Kato, Y., von Wiren, N., Ludewig, U., Wallace, I.S., Roberts, R.M. and Miwa, K. (2007) Roles of NIPs in boron uptake and translocation in Arabidopsis and Rice. The 5th International Conference of Aquaporin (Program and abstract) pp 46.
- Hachez, C., Moshelion, M., Zelazny, E., Cavez, D. and Chaumont, F. (2006a) Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Mol. Biol.* 62: 305-323.
- Hachez, C., Zelazny, E. and Chaumont, F. (2006b) Modulating the expression of aquaporin genes in planta: a key to understand their physiological functions? *Biochim. Biophys. Acta* 1758: 1142-1156.
- Hanba, Y.T., Shibasaka, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Kasamo, K., Terashima, I. and Katsuhara, M. (2004) Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol.* 45: 521-529.
- Hileman, D.R., Huluka, G., Kenjige, P.K., Sinha, N., Bhattacharya, N.C., Biswas, P.K., Lewin, K.F., Nagy, J. and Hendrey, G.R. (1994) Canopy photosynthesis and transpiration of field-grown cotton exposed to free-air CO₂ enrichment (FACE) and differential irrigation. *Agric. Forest Meteorol.* 70, 189-207.
- Hunsaker, D.J., Hendrey, G.R., Kimball, B.A., Lewin, K.F., Mauney, J.R. and Nagy, J. (1994) Cotton evapotranspiration under field conditions with CO₂ enrichment and variable soil moisture regimes. *Agric. Forest Meteorol.* 70: 247-258.
- Ishikawa, F., Suga, S., Uemura, T., Sato, M.H. and Maeshima, M. (2005) Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 579: 5814-5820.
- Ishikawa, Y., Skowronski, M.T., Inoue, N. and Ishida, H. (1999) α_1 -Adrenoceptor-induced trafficking of aquaporin-5 to the apical plasma membrane of rat parotid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265: 94-100.
- Jahn, T.P., Møllera, A.L.B., Zeuthen, T., Holmb, L.M., Klærkeb, D.A., Møhsinc, B., Kühlbrandt, W. and Schjoerringa, J.K. (2004) Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett.* 574: 31-36.
- Javot, H., Lauvergeat, V., Santoni, V., Martin-Laurent, F., Güçlü, J., Vinh, J., Heyes, J., Franck, K.I., Schäffner, A.R., Bouchez, D. and Maurel, C. (2003) Role of single aquaporin isoform in root

- water uptake. *Plant Cell* 15: 509-522.
- Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V.K., Chrispeels, M.J., Larsson, C. and Kjellbom, P. (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 10: 451-459.
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S. Fraysse, L., Weig, A.R. and Kjellbom, P. (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol.* 126: 1358-1369.
- Kaldenhoff, R., Kölling, A., Meyers, J., Karmann, U., Ruppel, G. and Richter, G. (1995) The blue light-responsive *AthH2* gene of *Arabidopsis thaliana* is primarily expressed in expanding as well as in differentiating cells and encodes a putative channel protein of the plasmalemma. *Plant J.* 7: 87-95.
- Katsuhara, M., Koshio, K., Shibasaka, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T. and Kasamo, K. (2003) Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol.* 44: 1378-1383.
- 川田信一郎、頼光隆。(1968) 水稻冠根における内皮細胞の分化過程と吸水の関係。日本作物学会記事. 37: 631-639.
- Kimball, B.A. and Idso, S.B. (1983) Increasing atmospheric CO₂: effects on crop yield, water use, and climate. *Agric. Water Manag.* 7: 55-72.
- Kimball, B.A., LaMorte, R.L., Pinter, P.J., Wall, G.W., Hunsaker, D.J., Adamsen, F.J., Leavitt, S.W., Thompson, T.L., Matthias, A.D. and Brooks, T.J. (1999) Free-air CO₂ enrichment and soil nitrogen effects on energy balance and evapotranspiration of wheat. *Water Resour. Res.* 35: 1179-1190.
- Kimball, B.A., Kobayashi, K. and Bindi, M. (2002) Responses of agricultural crops to free-air CO₂ enrichment. *Adv. Agron.* 77: 293-368.
- King, L.S., Kozono, D. and Agre, P. (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature Cell Biol.* 5: 687-698.
- Kramer, P.J. and Boyer, J.S. (1995) Water relations of plant and soils. Academic Press, San Diego, CA.
- Kranjinski, F., Biela, A., Schubert, D., Gianinazzi-Pearson, V., Kaldenhoff, R. and Franken, P. (2000) Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of *Mtaqpl* encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta* 211: 85-90.
- Laizé, V., Rousselet, G., Verbavatz, J.-M., Berthonaud, V., Gobin, R., Roudier, N., Abrami, L., Ripoché, P. and Tacnet, F. (1995) Functional expression of the human CHIP28 water channel in a yeast secretory mutant. *FEBS Lett.* 373: 269-274.
- Le Caherec, F., Deschamps, S., Delamarche, C., Pellerin, I., Bonnet, G., Guillam, M.-T., Thomas, D.,

- Gouranton, J. and Hubert, J.-F. (1996) Molecular cloning and characterization of an insect aquaporin. Functional comparison with aquaporin 1. *Eur. J. Biochem.* 241: 707-715.
- Lee, S.H., Singh, A.P. and Chung, G.C. (2004) Rapid accumulation of hydrogen peroxide in cucumber roots due to exposure to low temperature appears to mediate decreases in water transport. *J. Exp. Bot.* 55: 1733-1741.
- Li, L.-G., Li, S.-F., Tao, Y. and Kitagawa, Y. (2000) Molecular cloning of a novel water channel from rice: its products expression in *Xenopus* oocytes and involvement in chilling tolerance. *Plant Sci.* 154: 43-51.
- Lian, H.-L., Yu, X., Ye, Q., Ding, X.-S., Kitagawa, Y., Kwak, S.-S., Su, W.-A. and Tang, Z.-C. (2004) The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant Cell Physiol.* 45: 481-489.
- Liu, Q., Umeda, M. and Uchiyama, H. (1994) Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein. *Plant Mol. Biol.* 26: 2003-2007.
- Lopez, F., Bousser, A., Sissoëff, I., Hoarau, J. and Mahé, A. (2004) Characterization in maize of ZmTIP2-3, a root-specific tonoplast intrinsic protein exhibiting aquaporin activity. *J. Exp. Bot.* 55: 539-541.
- Loque, D., Ludewig, U., Yuan, L. and von Wirén, N. (2005) Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiol.* 137: 671-680.
- Ma, J.F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., Yano, M. (2006) A silicon transporter in rice. *Nature.* 440: 688-691.
- Ma, T., Yang, B., Gillespie, A., Carlson, E.J., Epstein, C.J. and Verlman, A.S. (1997) Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4. *J. Clin. Invest.* 100: 957-962.
- Maeshima, M. (1992) Characterization of the major integral protein of vacuolar membrane. *Plant Physiol.* 98: 1248-1254.
- Malz, S. and Sauter, M. (1999) Expression of two PIP genes in rapidly growing internodes of rice is not primarily controlled by meristem activity or cell expansion. *Plant Mol. Biol.* 40: 985-995.
- Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J.I. and Chrispeels, M.J. (1993) The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 12: 2241-2247.
- Maurel, C., Kado, R.T., Guern, J. and Chrispeels, M.J. (1995) Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin α -TIP. *EMBO J.* 14: 3028-3035.
- Maurel, C., Tancet, F., Güclü, J., Guren, J. and Ripoche, P. (1997) Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7103-7108.
- Maurel, C. (2007) Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Lett.* 581: 2227-2236.

- Mizutani, M., Watanabe, S., Nakagawa, T. and Maeshima, M. (2006) Aquaporin NIP2;1 is mainly localized to the ER membrane and shows root-specific accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 1420-1426.
- Murai-Hatano, M. and Kuwagata, T. (2007) Osmotic water permeability of plasma and vacuolar membranes in protoplasts I. High osmotic water permeability in radish (*Raphanus sativus*) root cells as measured by a new method. *J. Plant Res.* 120: 175-189.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A. and Fujiyoshi, Y. (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407: 599-605.
- Nakanishi, Y., Saijo, T., Wada, Y. and Maeshima, M. (2001) Mutagenic analysis of functional residues in putative substrate-binding site and acidic domains of vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* 276: 7654-7660.
- Nejsum, L.N. (2005) The renal plumbing system: aquaporin water channels. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 1692-1706.
- 西山岩男 (1985) 第 1 章 イネの冷害. イネの冷害生理学 (北海道大学図書刊行会). pp 1-15.
- 野波浩 (2001) 第 4 章 ホストレスと細胞伸長阻害. 植物水分生理学 (養賢堂). pp 126-178.
- Ohshima, Y., Iwasaki, I., Suga, S., Murakami, M., Inoue, K. and Maeshima, M. (2001) Low aquaporin content and low osmotic water permeability of the plasma and vacuolar membranes of a CAM plant *Graptopetalum paraguayense*: comparison with radish. *Plant Cell Physiol.* 42: 1119-1129.
- Otto, B. and Kaldenhoff, R. (2000) Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta* 211: 167-172.
- Page, R.D.M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358.
- Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B. and Agre, P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256: 385-387.
- Robinson, D.G., Sieber, H., Kammerloher, W. and Schäffner, A.R. (1996) PIP1 aquaporins are concentrated in plasmalemmasomes of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *Plant Physiol.* 111: 645-649.
- Siefritz, F., Tyree, M.T., Lovisolo, C., Schubert, A. and Kaldenhoff, R. (2002) PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* 14: 869-876.
- Steudle, E. and Peterson, C.A. (1998) How does water get through roots? *J. Exp. Bot.* 49: 775-788.
- Steudle, E. (2000) Water uptake by roots: an integration of views. *Plant Soil* 226: 45-56.
- Suga, S. and Maeshima, M. (2004) Water channel activity of radish plasma membrane aquaporins heterologously expressed in yeast and their modification by site-directed mutagenesis. *Plant Cell Physiol.* 45: 823-830.

- Takahashi, H., Rai, M., Kitagawa, T., Morita, S., Masumura, T. and Tanaka, K. (2004) Differential localization of tonoplast intrinsic proteins on the membrane of protein body type II and aleurone grain in rice seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 1728-1736.
- Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., von Wirén, N. and Fujiwara, T. (2006) The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18:1498-1509.
- Tanaka, K., Nakafuku, M., Tamanoi, F., Kaziro, Y., Matsumoto, K. and Toh-e, A. (1990) IRA2, a second gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein with a domain homologous to mammalian ras GTPase-activating protein. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4303-4313.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Törnroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfalk, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., Neutze, R. and Kjellbom, P. (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439: 688-694.
- Tournaire-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D.T., Bligny, R. and Maurel, C. (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425: 393-397.
- Tsubota, K., Hirai, S., King, L.S., Agre, P. and Ishida, N. (2001) Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjögren's syndrome. *Lancet* 357: 688-689.
- Uehlein, N., Lovisolo, G., Siefritz, F. and Kaldenhoff, R. (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* 425: 734-737.
- Verkman, A.S. (1989) Mechanisms and regulation of water permeability in renal epithelia. *Am J Physiol.* 257: C837-C850.
- Verkman, A.S. (2005) More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.* 118: 3225-3232.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J. and Pantoja, O. (2004) Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol.* 135: 2318-2329.
- Wallace, I.S., Choi, W.-U. and Roberts, D.M. (2006) The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochim. Biophys. Acta* 1758: 1165-1175.
- Yamada, S., Katsuhara, M., Kelly, W.B., Michalowski, C.B. and Bohnert, H.J. (1995) A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 7: 1129-1142.
- Yu, X., Peng, Y.H., Zhang, M.H., Shao, Y.J., Su, W.A. and Tang, Z.C. (2006) Water relations and an expression analysis of plasma membrane intrinsic proteins in sensitive and tolerant rice during

chilling and recovery. *Cell Res.* 16: 599-608.

Zelazny, E., Borst, J.W., Muylaert, M., Batoko, H., Hemminga, M.A. and Chaumont, F. (2007)

FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 12359-12364.

Zhu, C., Schraut, D., Hartung, W. and Schäffner, A.R. (2005) Differential responses of maize *MIP* genes to salt stress and ABA. *J. Exp. Bot.* 56: 2971-2981.

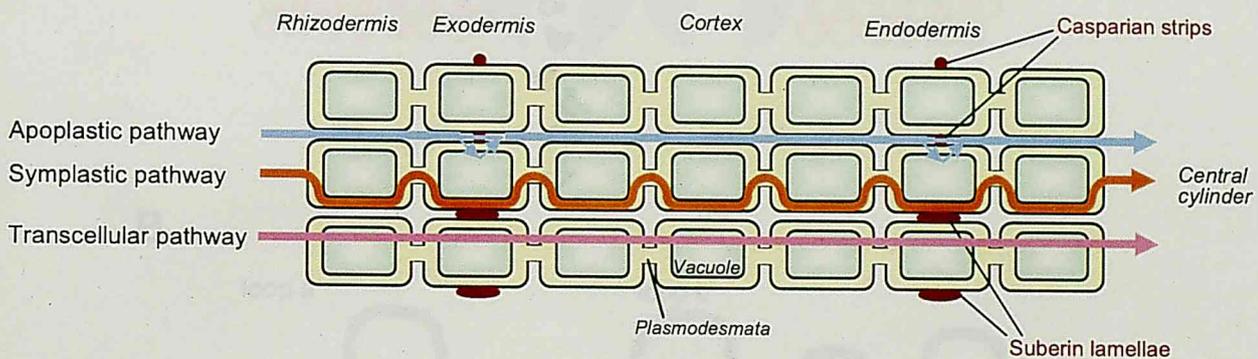


Fig. 1-1 Pathways for the movement of water in roots. Steudle (2000) has established a composite transport model that explains the water movement through non-vascular tissues in roots. In his model, three parallel pathways are considered. The first is an apoplastic pathway, which means a flow through cell walls. The second is a symplastic pathway from cell to cell through plasmodesmata. The third is called a transcellular pathway, where water and solutes have to cross cell membranes, including plasma membrane and tonoplast. The second and the third pathways cannot be usually distinguished and called as a cell-to-cell pathway. Casparian strips and suberin lamellae in the exo- and endodermis interrupt the apoplastic water transport. As a result, water must flow in the cell-to-cell pathway in these cells.

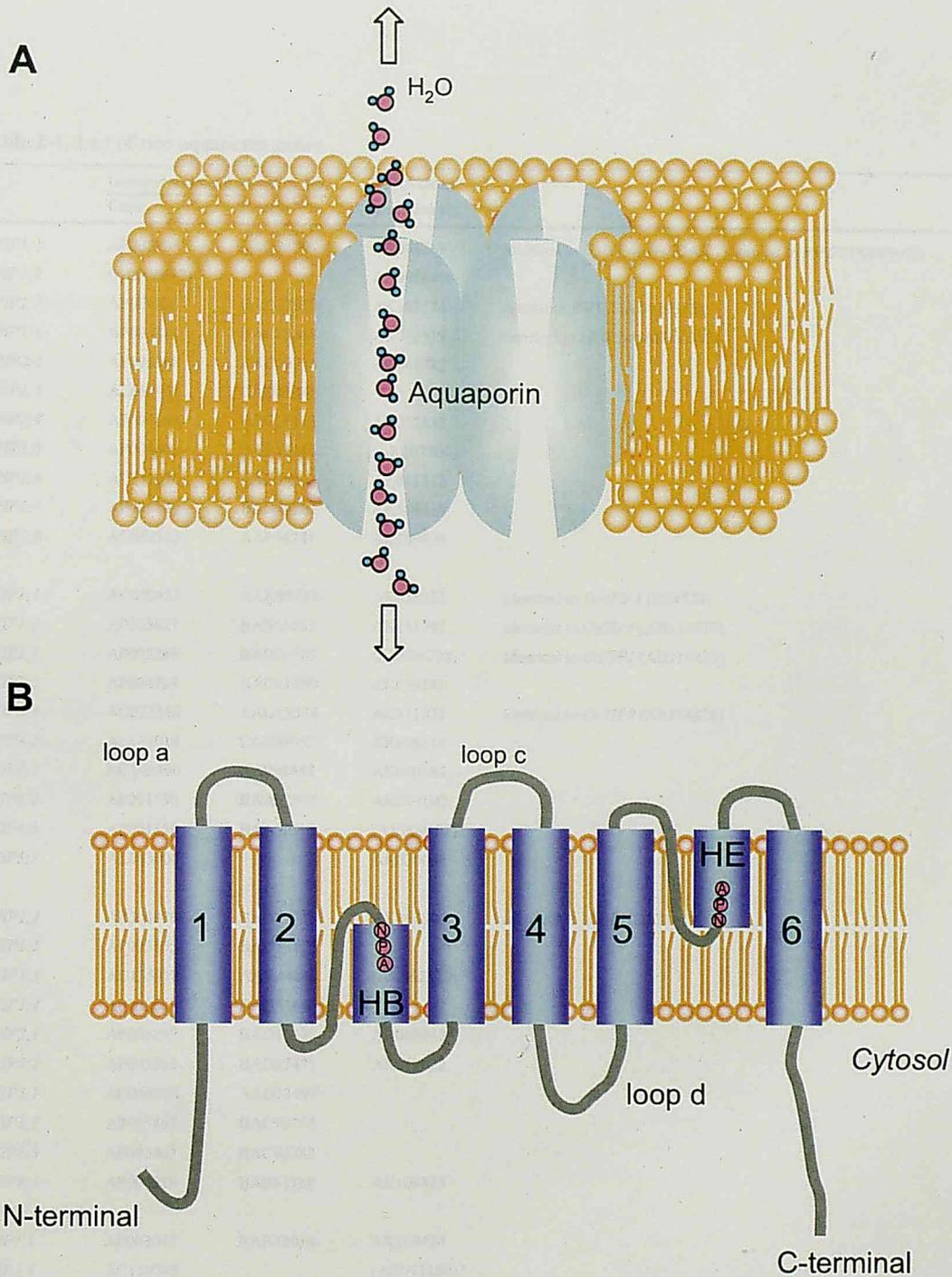


Fig. 1-2 Aquaporin structures. (A) An aquaporin tetramer in a membrane. Water molecules pass a narrow pore in each aquaporin monomer. (B) Structure of aquaporin monomer. Aquaporins have six transmembrane domains (1 to 6) and two half helices (HB and HE). A N- and C-terminal ends face to cytoplasm. The two half helices contain NPA motif which plays key roles for water transport.

Table 2-1 List of rice aquaporin genes

	Genome sequence accession No.		cDNA clone accession no.	
	Gene	Protein ^a		
<i>OsPIP1;1</i>	AP005108	BAD28398	AK061769	identical to <i>OsPIP1a</i> (AJ224327), similar to <i>RWC1</i> (AB09665)
<i>OsPIP1;2</i>	(AL606687) ^b		AK098849	
<i>OsPIP1;3</i>	AP004026	BAD22920	AK102174	similar to <i>RWC3</i> (AB029325)
<i>OsPIP2;1</i>	AP003802	BAC15868	AK072519	similar to <i>OsPIP2a</i> (AF062393)
<i>OsPIP2;2</i>	AP006168	BAD23735	AK061782	
<i>OsPIP2;3</i>	AL662958	CAD41442		
<i>OsPIP2;4</i>	AP004668	BAC16113	AK072632	
<i>OsPIP2;5</i>	AP004668	BAC16116	(AK107700) ^c	
<i>OsPIP2;6</i>	AL731636	CAE05002	AK061312	
<i>OsPIP2;7</i>	AP006149	BAD46581	AK109439	
<i>OsPIP2;8</i>	AC092263	AAP44741	AK109024	
<i>OsTIP1;1</i>	AC090485	AAK98737	AK058322	identical to <i>OsγTIP1</i> (D22534)
<i>OsTIP1;2</i>	AP003627	BAB63833	AK111747	identical to <i>OsTIP1</i> (AB114829)
<i>OsTIP2;1</i>	AP005289	BAD25765	(AK064728) ^c	identical to <i>OsTIP2</i> (AB114830)
<i>OsTIP2;2</i>	AP004784	BAD61899	AK099141	
<i>OsTIP3;1</i>	AC023240	AAG13544	AK111931	identical to <i>OsTIP3</i> (AB114828)
<i>OsTIP3;2</i>	AL663019	CAE05657	AK108116	
<i>OsTIP4;1</i>	AC145396	AAS98488	AK060193	
<i>OsTIP4;2</i>	AP001550	BAA92993	AK099190	
<i>OsTIP4;3</i>	AP001550	BAA92991	(AK069192) ^c	
<i>OsTIP5;1</i>	AL663000		AK070602	
<i>OsNIP1;1</i>	AP004070	BAD27715	AK068806	identical to <i>γMIP1</i> (D17443)
<i>OsNIP1;2</i>	AP003105	BAD73177		
<i>OsNIP1;3</i>	AC135918	AAV44140	(AK062320) ^c	
<i>OsNIP1;4</i>	AP003682	BAD53665		
<i>OsNIP2;1</i>	AP005297	BAD16128	AK069842	
<i>OsNIP2;2</i>	AP003569	BAD37471	AK112022	
<i>OsNIP3;1</i>	AC068924	AAG13499		
<i>OsNIP3;2</i>	AP005467	BAC99758		
<i>OsNIP3;3</i>	AP005467	BAC65382		
<i>OsNIP4;1</i>	AP003219	BAB61180	AK106825	
<i>OsSIP1;1</i>	AP003047	BAB32914	AK109424	
<i>OsSIP2;1</i>	AC119748		(AK071190) ^c	

^a Protein accession numbers were obtained from the result of annotation analysis in the rice genome database.

^b AL606687 encoded a gene which had a high homology to *OsPIP1;2* (see Results).

^c cDNA clones in parentheses did not contain full-length sequences.

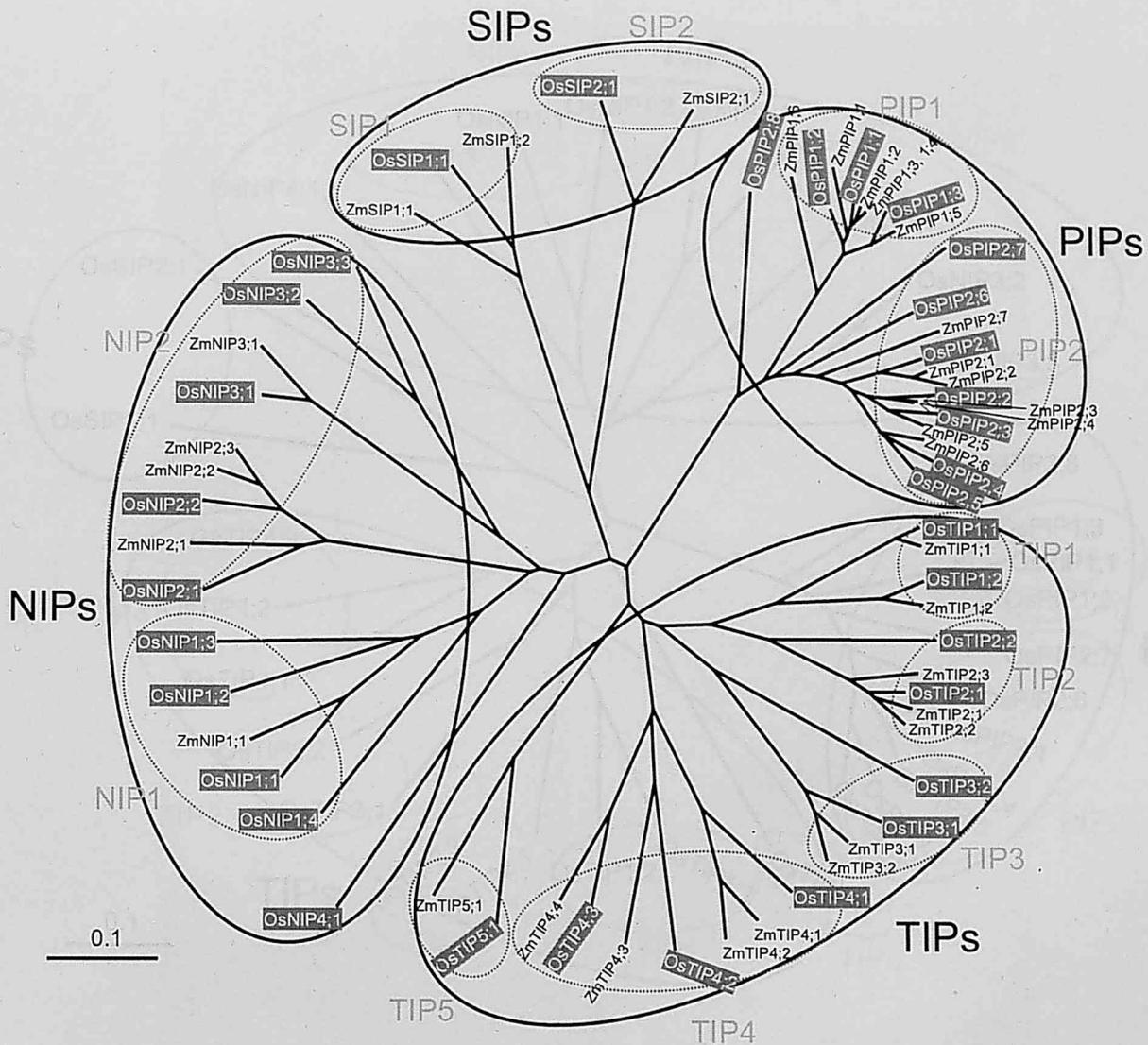


Fig. 2-1 Phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequences of rice aquaporins with those of maize aquaporins. The scale bar of 0.1 is equal to 10% sequence divergence.

Fig. 2-1 Phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequences of rice aquaporins with those of maize aquaporins. The scale bar of 0.1 is equal to 10% sequence divergence.

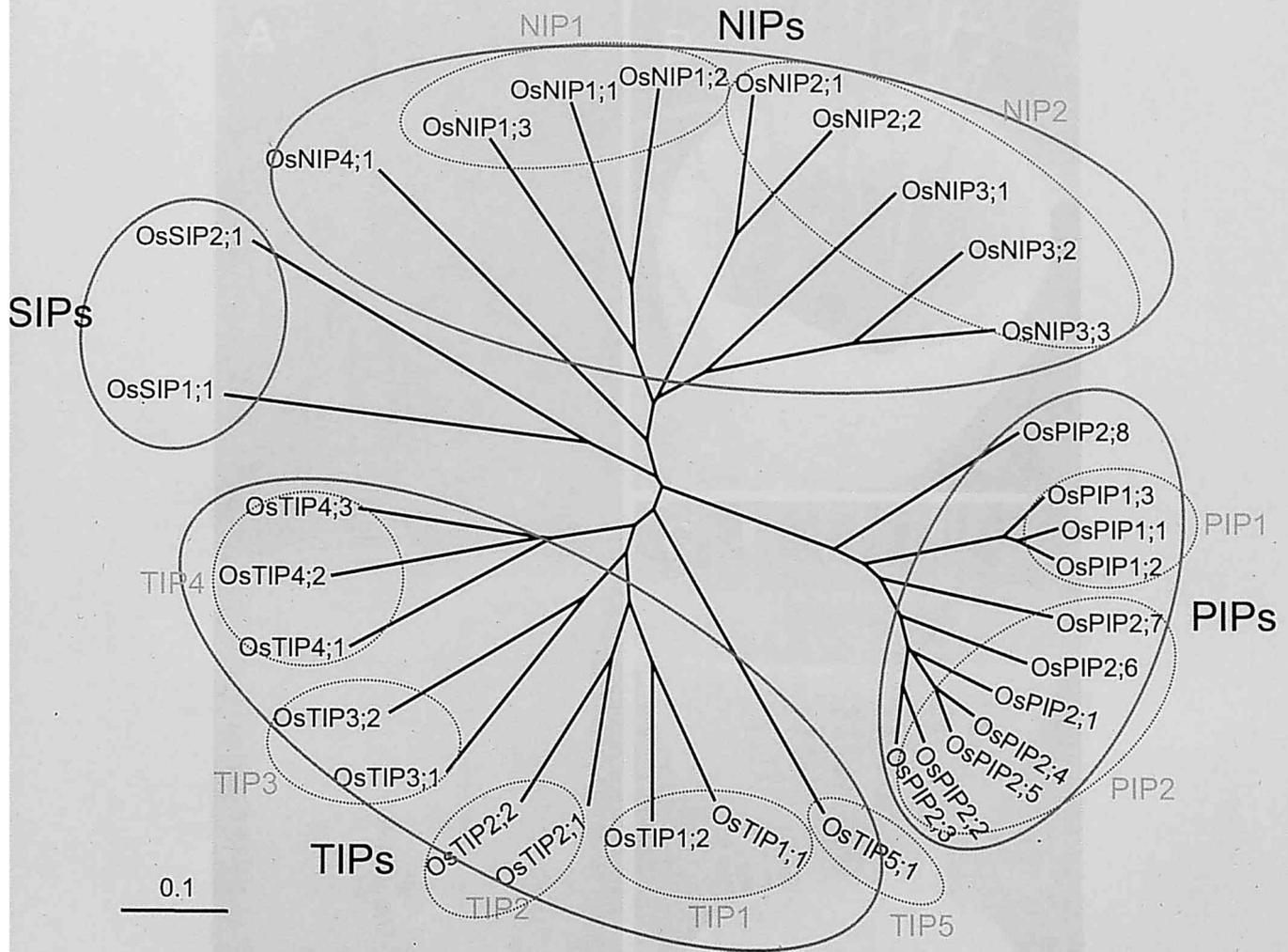


Fig. 2-2 Phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequences of rice aquaporins. The scale bar of 0.1 is equal to 10% sequence divergence.

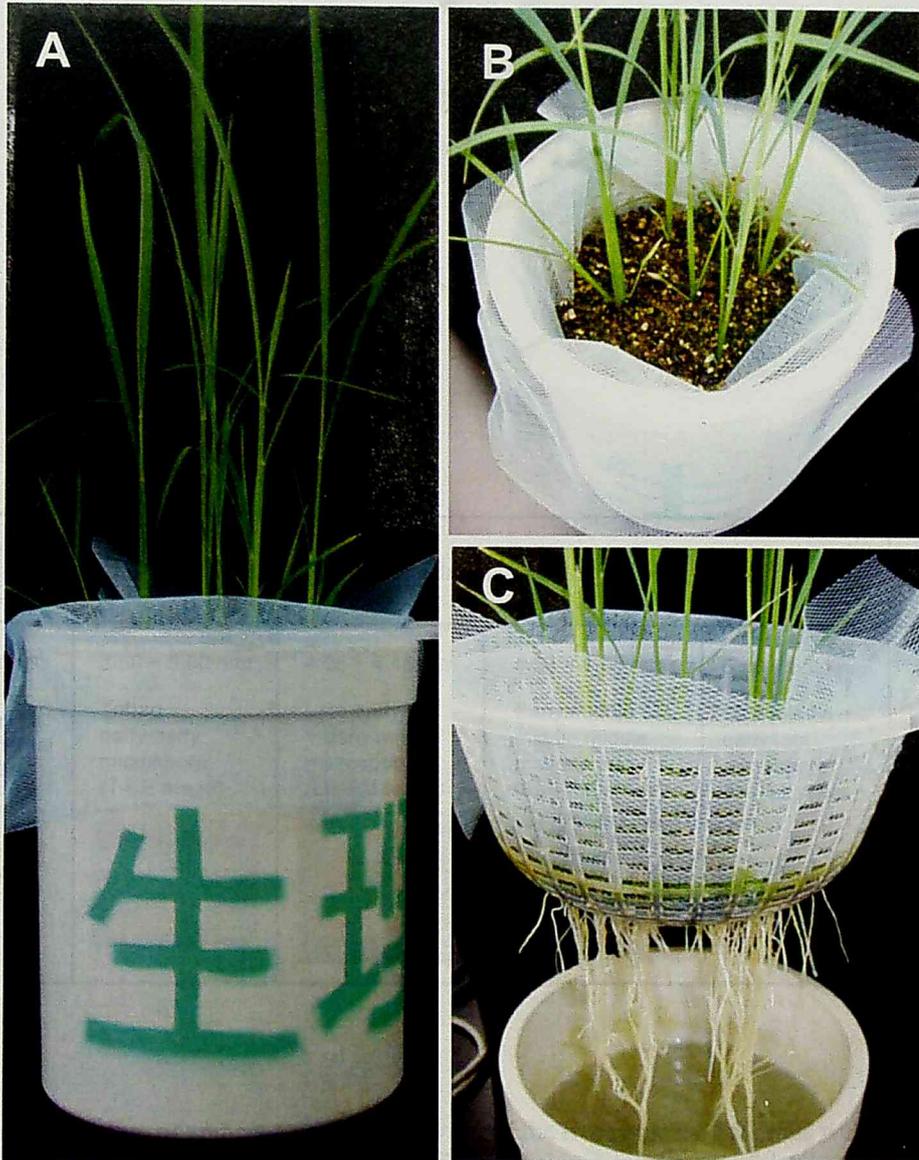


Fig. 3-1 Hydroponic culture of rice plants. Rice seeds were grown in Wagner pot (1/5000 a) with hydroponic solution (A). Seeds were sown in vermiculite at 1 cm depth from the surface (B). Whole plants and vermiculite were hold by plastic colander (C).

A



B

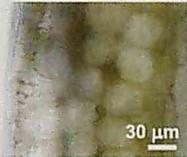
Rice Developmental stage	Booting stage				Heading stage
Spikelet length	3.50 ~ 3.90 mm	4.05 ~ 4.45 mm	4.50 ~ 4.90 mm	5.50 ~ 6.00 mm	> 6.00 mm
Pollen Developmental stage	Tetrad ~ early early microspore (T-EE stage)	Late early ~ early middle microspore (LE-EM stage)	Early middle ~ middle middle microspore (EM-MM stage)	Late middle ~ early late microspore (LM-EL stage)	Mature pollen (MP stage)
Photograph of anthers					

Fig. 3-2 Sampling of anthers. A. Schematic view of the rice panicles. Spikelets were taken from the specific locations on the panicle: the third to fifth spikelets from the top of the three upper primary branches (stars). B. Relationship between spikelet length and pollen developmental stage. Anthers which contain pollens at objective developmental stage were selected based on this relationship between spikelet length and pollen developmental stages. After removing palea and lemma, anthers were picked up by a tweezer and then immediately frozen in liquid nitrogen.

Table 3-1 Primers used for semi-quantitative RT-PCR of rice aquaporin genes.

Name	Primer Sequence	Name	Primer Sequence
PIP1;1-5'	tgcgcagccgacgacatg	TIP4;1-5'	ggccaagaggacccatgag
PIP1;1-3'	catacagtgactgagtactggattac	TIP4;1-3'	cagcccttacaggcctac
PIP1;2-5'	ctgtcaagatgccaatccagag	TIP4;2-5'	tgaggccacgtggcttc
PIP1;2-3'	gaaccgaactccaataggagga	TIP4;2-3'	ctcacttgtagccggcacatac
PIP1;3-5'	ccgtctggatgatgatgaagc	TIP4;3-5'	cctaggaatgacggcgactt
PIP1;3-3'	cataagaggggatgagagggta	TIP4;3-3'	cattcttagcccaaccaatggaag
PIP2;1-5'	tggctggaaggcgttgatgaag	TIP5;1-5'	caaacgggtgctgtgatg
PIP2;1-3'	ccatataggagagcgggca	TIP5;1-3'	gtactacccaaccatccattagtc
PIP2;2-5'	gcgaggtggcgtgaag	NIP1;1-5'	gagcatgaaccggatgaactc
PIP2;2-3'	cttggaaagcaccagcggg	NIP1;1-3'	gaggcagagaagttccacac
PIP2;3-5'	cgctggatgcatgaccgg	NIP1;2-5'	gctcgcgtaggagttagtg
PIP2;3-3'	accatatgcacacagctcgc	NIP1;2-3'	cggtgaaccgacgtacgtg
PIP2;4-5'	gagctcgtctggtgatatcc	NIP1;4-5'	cagtcgctgatatgtgggtac
PIP2;4-3'	catgaagacaacagagggacag	NIP1;4-3'	gtaacacatattctcgcctatcacc
PIP2;5-5'	gcttaagccgcaatcaaatgtgc	NIP2;1-5'	cgagatgctgctgatcgtg
PIP2;5-3'	cgatcgaacaatgtcacacttgc	NIP2;1-3'	ggaacaagcaactgctggag
PIP2;6-5'	gatggccatggctgctctg	NIP2;2-5'	gtactgcacgcgtacgtac
PIP2;6-3'	gcagatggcaattggtggtg	NIP2;2-3'	caacgaaagctcagctccttc
PIP2;7-5'	gtgaggaagacgacgatgttc	NIP3;1-5'	gtgtacacggcgggtaag
PIP2;7-3'	cagatacatacaggcactccac	NIP3;1-3'	cacgcggatttctcttgggtg
PIP2;8-5'	cacccatttttaatccccatgcac	NIP3;2-5'	ccctcaggcaagaacaatattcaatcg
PIP2;8-3'	gctagattacgtacagacagtacag	NIP3;2-3'	gcagtcctaactatgctgcttg
TIP1;1-5'	gcttgtccatgatgcctcg	NIP3;3-5'	ggtaacttgtgactctttgagcatg
TIP1;1-3'	ctggttgcgaatagcgtcg	NIP3;3-3'	ggctctggagctagtaaaaacagc
TIP1;2-5'	cgaattcgtccccctctc	NIP4;1-5'	catcgtcgccttctctctg
TIP1;2-3'	ggtcctcatttggaggaagc	NIP4;-1-3'	ggatggaaaatctctattggttggtc
TIP2;1-5'	ccgtgtcagtttgatgcatc	SIP1;1-5'	cctaaggccaagaaagcatgag
TIP2;1-3'	cagaaaaggacatggcttcc	SIP1;1-3'	catccaccagttcaagagcaaac
TIP2;2-5'	cgccatcggcaacacgc	SIP2;1-5'	ctaggagtatgggtcgtgac
TIP2;2-3'	tgcgaggagaagacacaagc	SIP2;1-3'	ggcttacagcataaaaaatgatcctgtc
TIP3;1-5'	octccagctacaatatctattagctatg	PIP1;1s	caaggaccatgcctggaatg
TIP3;1-3'	cactggtagctcactgttccatac	18S rRNA-5'	caactttcgatggtaggataggg
TIP3;2-5'	gagctgaatcatagcacctgc	18S rRNA-3'	ccaattaccagacactaaagcgc
TIP3;2-3'	ctcgaaagtatgcagccttcag		

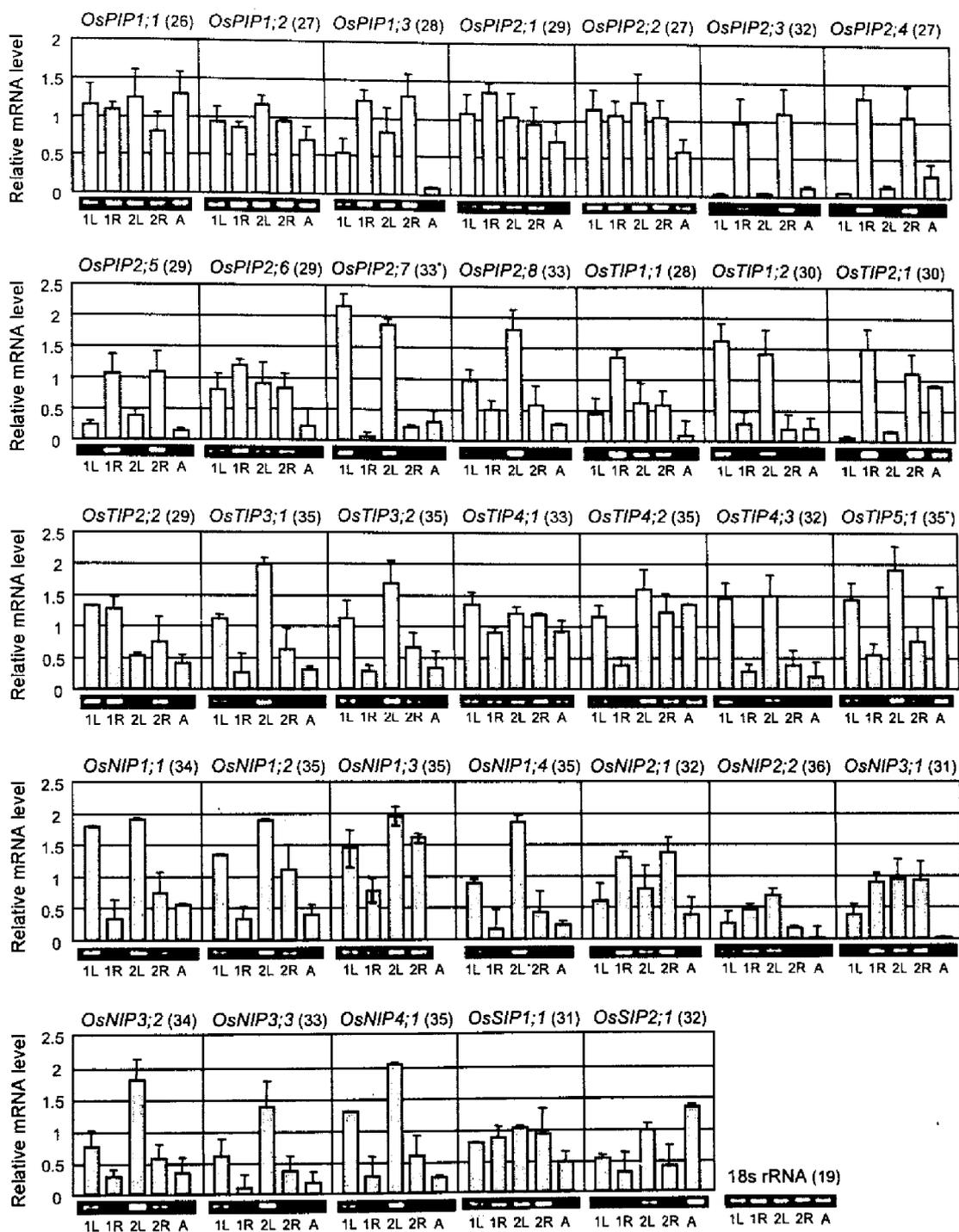


Fig. 3-3 Comparison of the expression of rice aquaporin genes in various organs. Total RNA fractions were prepared from leaf blades (L) and roots (R) of 21-d-old plants (1), 56-day-old plants (2) and anthers (A) of 67-day-old plants. The levels of mRNAs were normalized to that of 18S rRNA. Photographic images of gel electrophoresis are shown at the bottom of each graph. Data represent the means \pm SE for three independent samples. Numbers in parentheses indicate the number of cycles needed to detect the PCR products. In the case of *OsPIP2;7* and *OsTIP5;1*, where marked by an asterisk, the annealing was conducted at 61°C instead of 58°C (see Materials and Methods). *NIP1;3* expression in anthers was not analyzed.

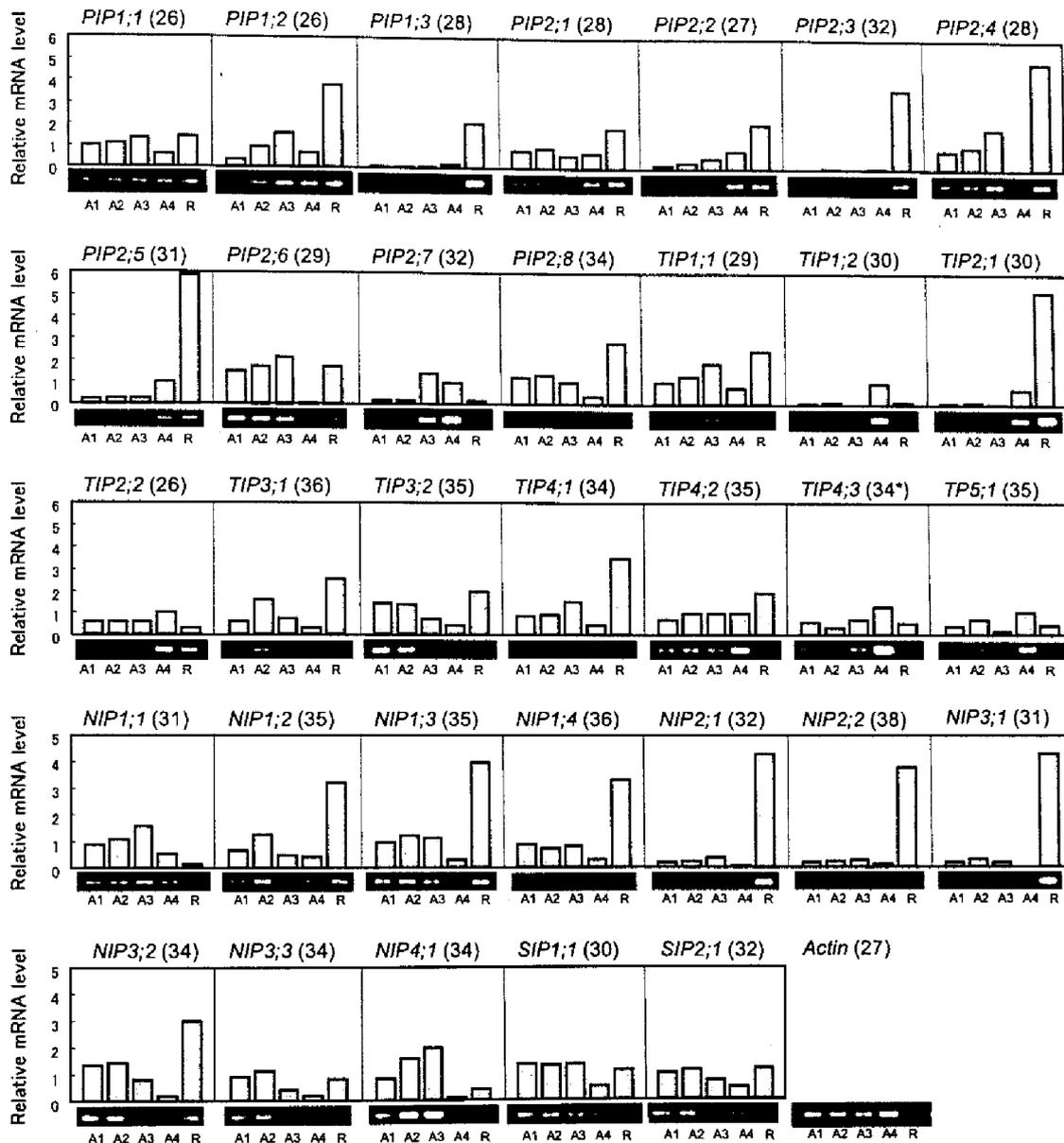


Fig. 3-4 Comparison of the expression of rice aquaporin genes in anthers at several different developmental stages. Root sample was used as a reference. The levels of mRNAs were normalized to that of actin. Photographic images of gel electrophoresis are shown at the bottom of each graph. Numbers in parentheses indicate the numbers of cycles needed to detect the PCR products. In the case of *OsTIP4;3*, where marked by asterisk, the annealing was conducted at 61°C instead of 58°C (see Materials and Method). A1, T/EE stage (see Fig. 3-2B); A2, LE-EM stage; A3, LM-ML stage; A4, MP stage; R, roots.

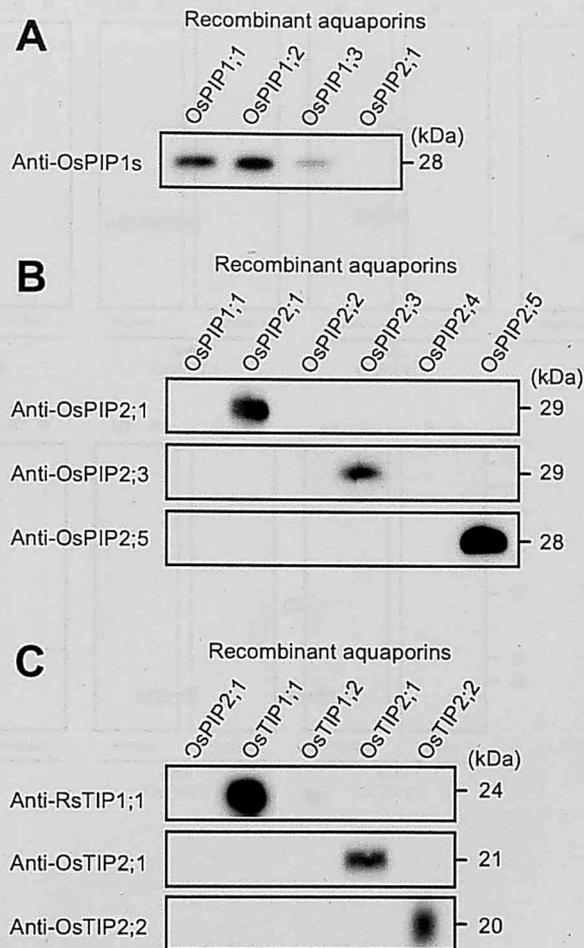


Fig. 3-5 Binding specificities of rice aquaporin antibodies. Crude membrane fractions were prepared from yeast cells which expressed each rice aquaporin gene indicated and then subjected to immunoblotting with the aquaporin antibodies for OsPIP1 members (A), OsPIP2 members (B) and OsTIP members (C). 0.2 μ g protein was applied for each lane.

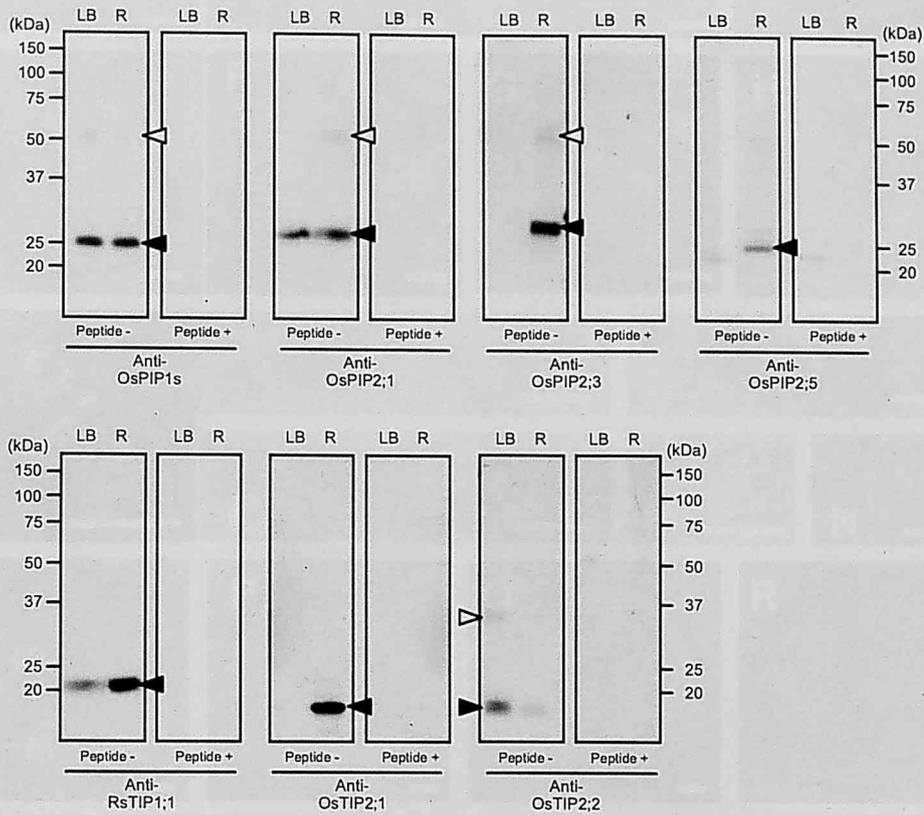


Fig. 3-6 Comparison of aquaporin protein amounts in leaf blades and roots. Crude membrane fractions were prepared from leaf blades (LB) and roots (R) and then subjected to immunoblotting. Each aquaporin antibody was reacted with a membrane after preincubation with (peptide +) or without a peptide antigen (peptide -). Protein amounts applied for one lane are 0.5 μg (for anti-OsPIP2;1 and anti-RsTIP1;1 antibody), 1.5 μg (for anti-OsPIP1s, anti-OsTIP2;1 and anti-OsTIP2;2 antibody) and 5.0 μg (for anti-OsPIP2;3 and anti-OsPIP2;5 antibody). Black and white arrow heads represent monomeric and dimeric form of each aquaporin, respectively.

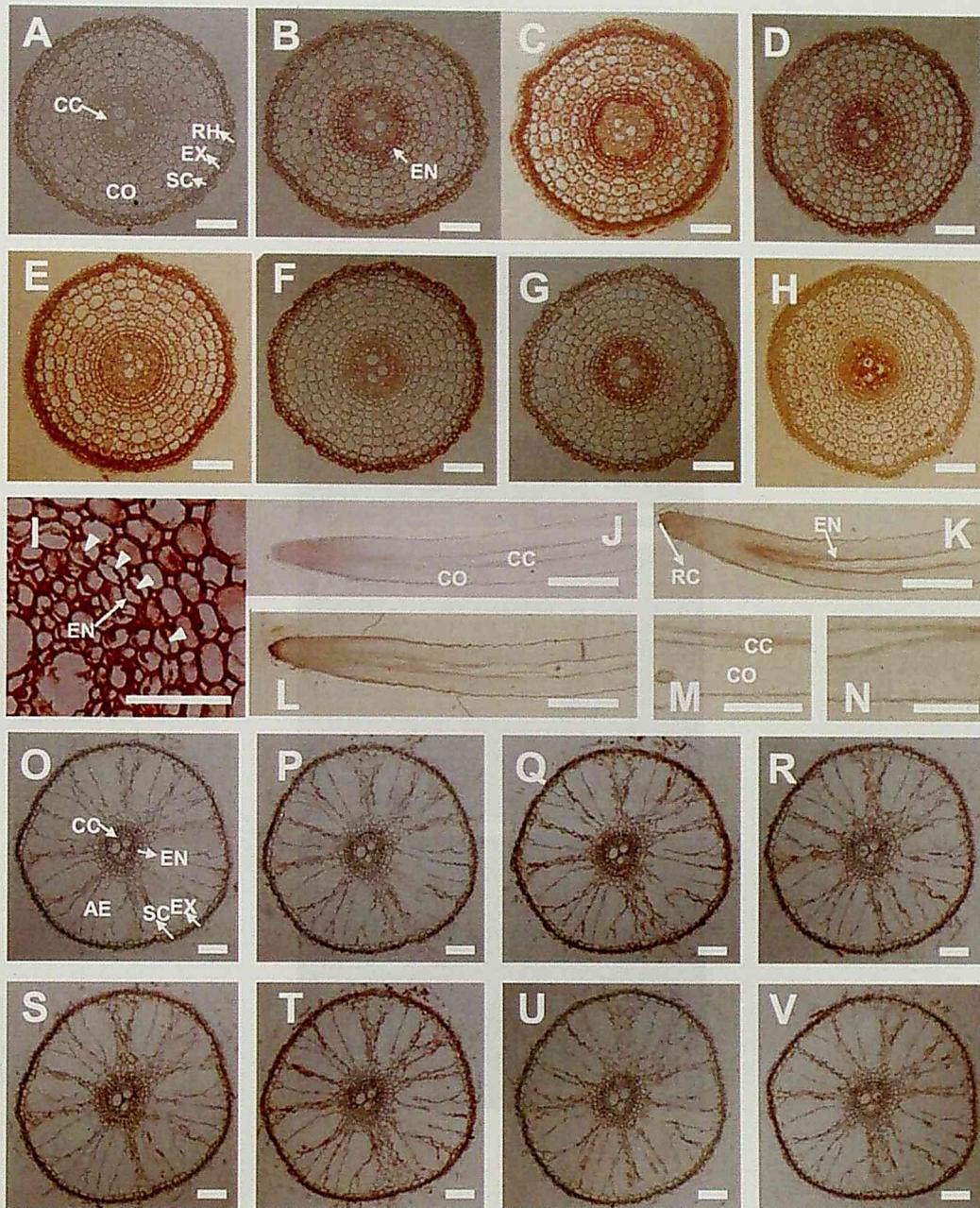


Fig. 3-7 Localization of aquaporins in the primary roots. Cross sections (7 μm) were prepared at the position of approximately 4 mm (A to I) and 35 mm (O to V) from the root tip of 38d-old rice plants. Longitudinal sections (7 μm) were prepared from 0 to 5 mm (J to L) and 30 to 40 mm (M, N) from the root tip. The sections were hybridized with each aquaporin antibody and then visualized with a HRP-linked second antibody and DAB. A, J, M, O, preimmune (100-fold dilution); B, P, anti-OsPIP1s (50-fold); C, K, N, Q, anti-OsPIP2;1 (C, K, N, 300-fold; Q, 100-fold); D, R, anti-OsPIP2;3 (50-fold); E, S, anti-OsPIP2;5 (100-fold); F, L, T, anti-RsTIP1;1 (F, L, 300-fold; T, 100-fold); G, U, anti-OsTIP2;1 (G, 50-fold; U, 25-fold); H, V, anti-OsTIP2;2 (100-fold); I, a close up view of D around endodermis. AE, aerenchyma; CC, central cylinder; CO, cortex; EN, endodermis; EX, exodermis; RH, rhizodermis; SC, sclerenchyma. Arrow heads in I indicate band plasmolysis. Bars represent 100 μm (A to H, O to V), 50 μm (I), 1 mm (J, K, L) and 500 μm (M, N).

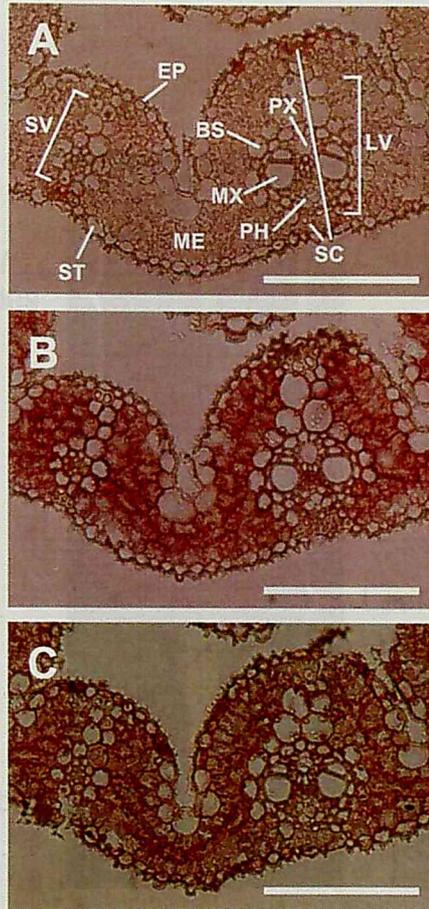


Fig. 3-8 Localization of aquaporins in leaf blades. Cross sections (7 μm) were prepared from the middle part of the uppermost leaves of 18d-old rice plants. The sections were treated in the same method as indicated in Fig. 3-7. A, preimmune (100-fold dilution); B, anti-OsPIP1s (200-fold); C, anti-OsPIP2;1 (300-fold). BS, bundle sheath; EP, epidermis; LV, large vascular bundle; ME, mesophyll; MX, metaxylem; PH, phloem; PX, protoxylem; SC, sclerenchymatous cell; ST, stomata; SV, small vascular bundle. Bars represent 100 μm .

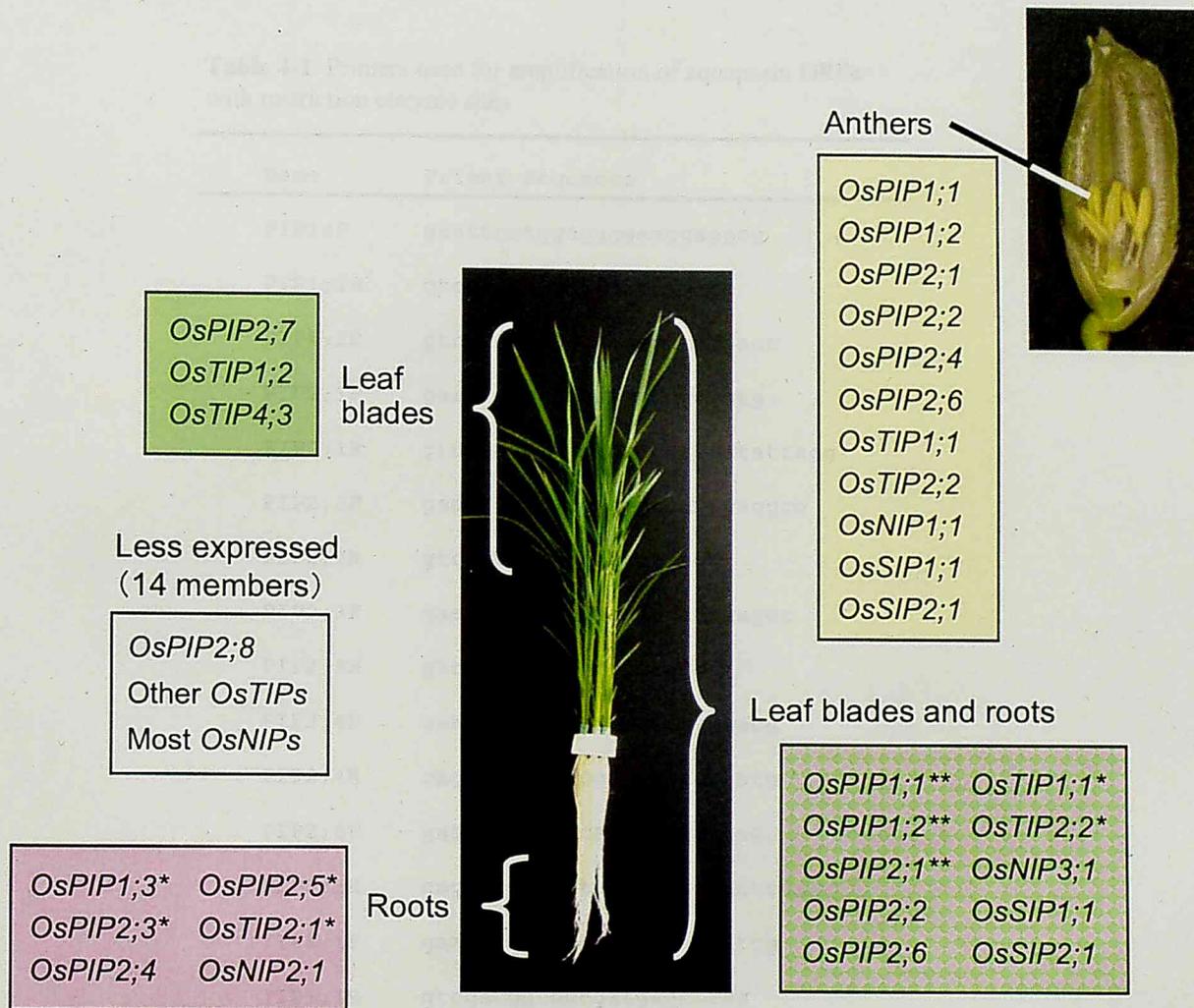
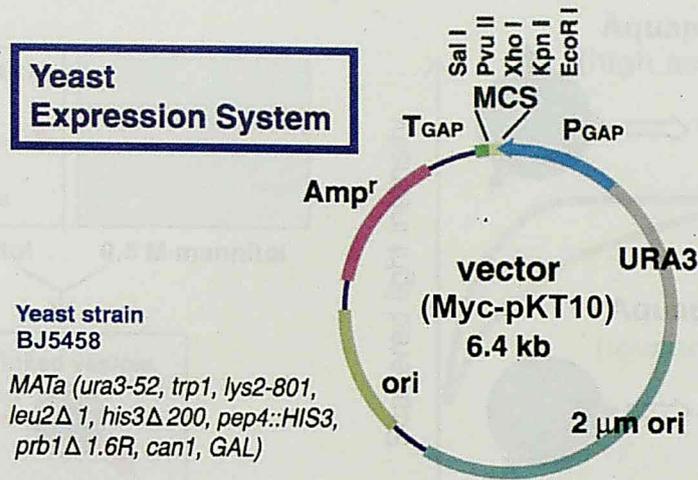


Fig. 3-9 Organ specific expression patterns of rice aquaporins. According to the results of RT-PCR (Fig. 3-3) and immunoblotting (Fig. 3-6), three (in a green box) and six aquaporin members (in a pink box) showed organ specific expression patterns either in leaf blades or in roots, respectively. Ten aquaporin members (in a box mixed with green and pink color) were expressed both in leaf blades and roots. Eleven members (in a yellow box) were expressed in anthers according to the result of RT-PCR (Fig. 3-4). Asterisks and double asterisks mean that these aquaporin members were examined about their tissue-localization only in roots, or both in leaf blades and roots, respectively, by immunocytochemistry (Fig. 3-7 and 3-8).

Table 4-1 Primers used for amplification of aquaporin ORFs with restriction enzyme sites

Name	Primer Sequence
PIP1sF	gaattcatggaggggaaggaggag
PIP1;1R	gtcgaccgcggggcttaagacc
PIP1;2R	gtcgacgctgatgcaggttacgacc
PIP2;1F	gaattcatggggaaggacgaggtg
PIP2;1R	gtcgacgctcgaactcctttgatatcacg
PIP2;2F	gaattcatggcgaaagacattgaggcg
PIP2;2R	gtcgacgcccgcgatctcagg
PIP2;3F	gaattcatggcgaaaggacattgaggc
PIP2;3R	gtcgaccggcggcgtctagc
PIP2;4F	gaattcatgggcaaagaggtggacg
PIP2;4R	cagctgccagacgagctcaactacg
PIP2;5F	gaattcatgggcaaagaggccgac
PIP2;5R	cagctggcacatttgattgcggcttaagc
TIP1;1F	gaattcatgccgatccgcaacatcg
TIP1;1R	gtcgacggcggcgatgagcttag
TIP1;2F	cggaattcatgccggtgagccgga
TIP1;2R	acgcgtcgacgatatgatcagtagtcggcgg
TIP2;2F	cggaattcatgtcgggcaacatcgcc
TIP2;2R	acgcgtcgacggtaattagaactcgtgctgg

A



B

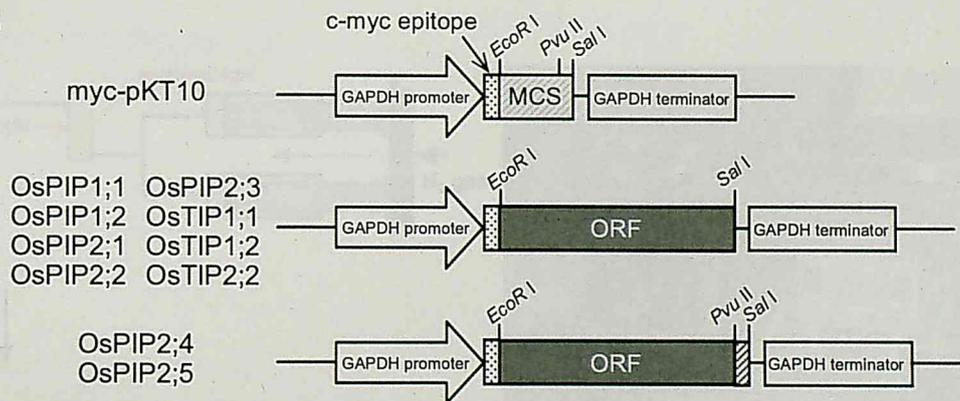


Fig. 4-1 Yeast expression system used in Chapter 4 and constructs for expression of rice aquaporins in yeasts. A. The system was developed in Prof. Maeshima's lab (Tanaka et al. 1990, Nakanishi et al. 2001). The yeast strain BJ5459 lacks functional aquaporins (Suga and Maeshima 2004). B. cDNA of each aquaporin was inserted into the multi-cloning site (MCS) in the interface region between the GAPDH promoter and the terminator of the myc-pKT10 vector.

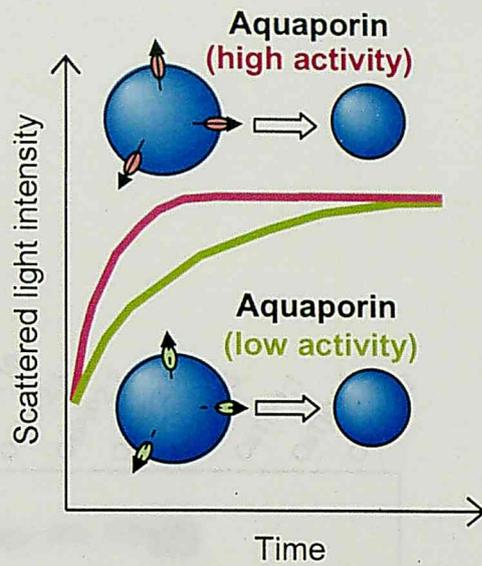
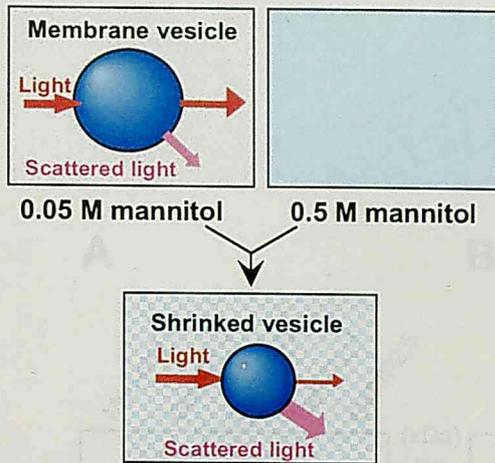
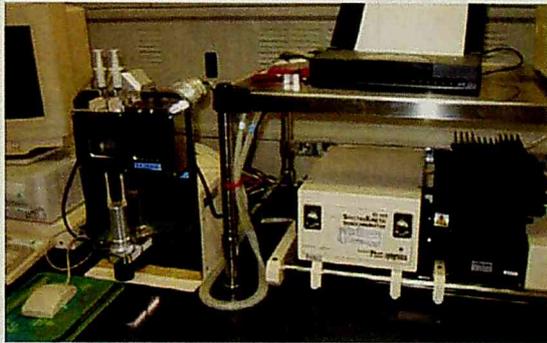
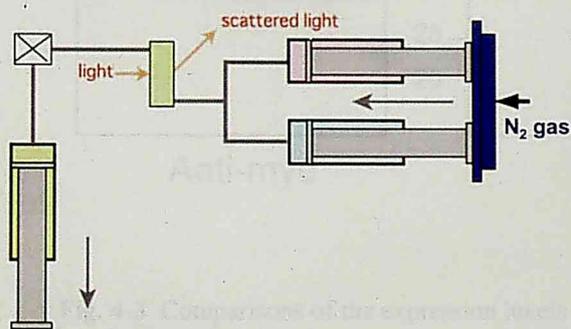
A**B**

Fig. 4-2 Principles and apparatus of stopped-flow spectrophotometry. A. Principles of stopped-flow assay during the shrinkage of vesicles. Osmotic water permeabilities are calculated from the rate constants of exponential fittings of the reaction curves. B. Schematic diagram and the whole system of stopped-flow spectrophotometer.

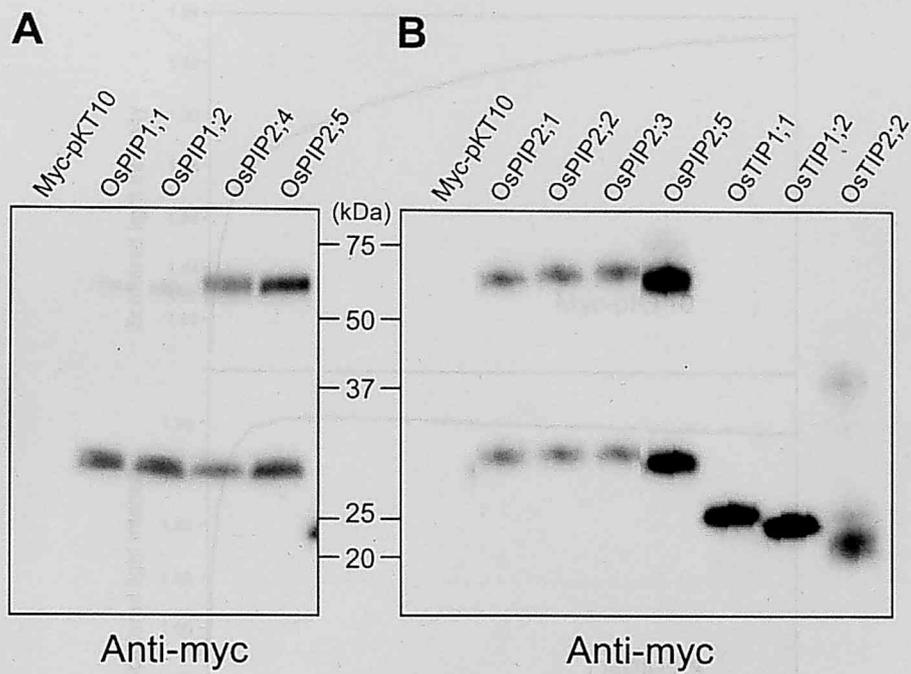


Fig. 4-3 Comparisons of the expression levels of each aquaporin in membrane fractions. Crude membrane fractions were prepared from yeasts and then subjected to immunoblotting with anti-myc antibody. 0.3 (A) and 0.35 μ g (B) proteins were applied for each lane.

Fig. 4-4 Typical changes in acquired high resolution during the cleavage assay were shown for vector control, myc-pKT10 and OsPIP2;3. Each column curve shows the average trace of 14 independent determinations.

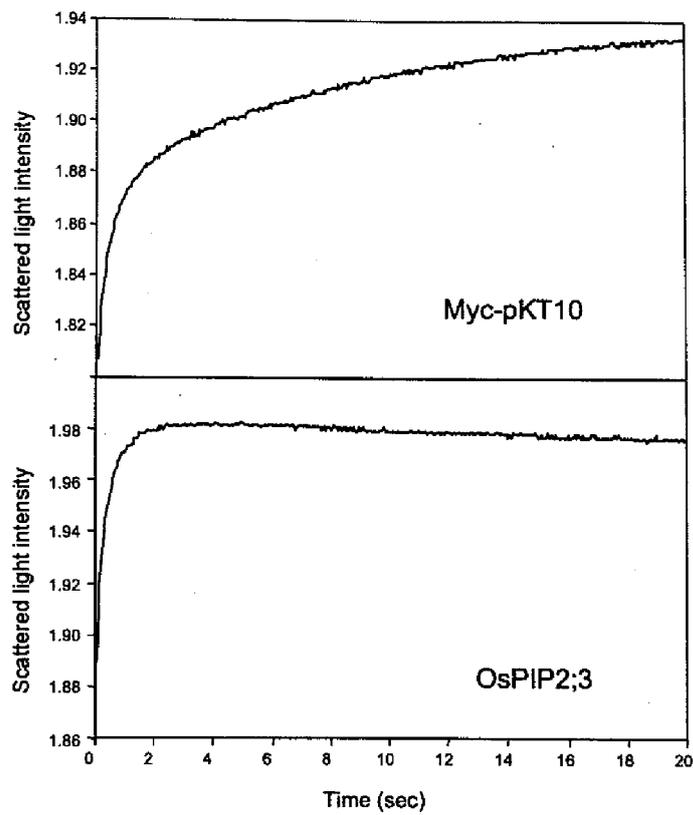


Fig. 4-4 Typical changes in scattered light intensities during the shrinkage assay were shown for vector control myc-pKT10 and OsPIP2;3. Each reaction curve shows the average trace of 14 independent determinations.

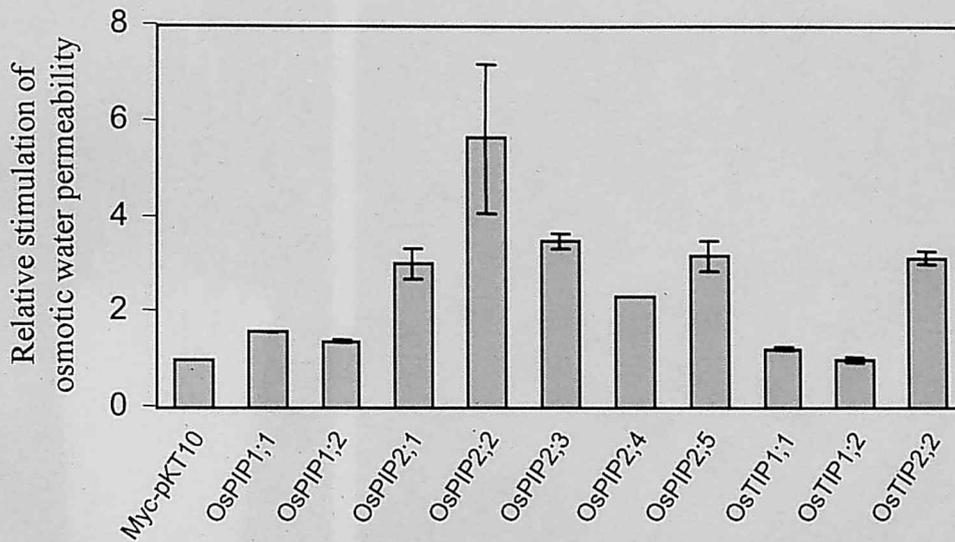


Fig. 4-5 Comparison of water transport activities of rice aquaporins. The relative stimulation fold of osmotic water permeability was calculated as the ratio of the rate constant of each aquaporin to that of the vector control on the basis of the expressed amount of protein. Except for OsPIP2;4, values are expressed as means \pm SE calculated for three independent experiments. The result of OsPIP2;4 is a mean of two experiments.

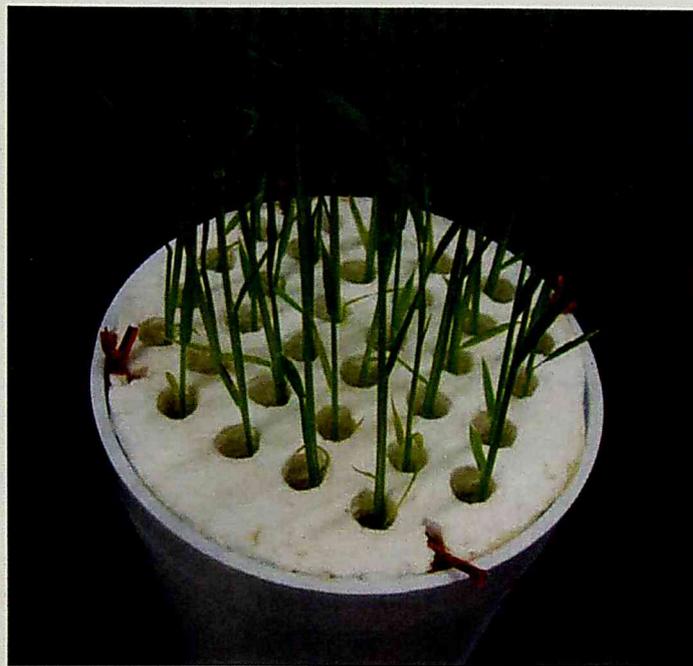


Fig. 5-1 Rice plants used in experiments in Chapter 5. Rice plants were grown with hydroponic culture in a growth chamber as described in Materials and Methods.

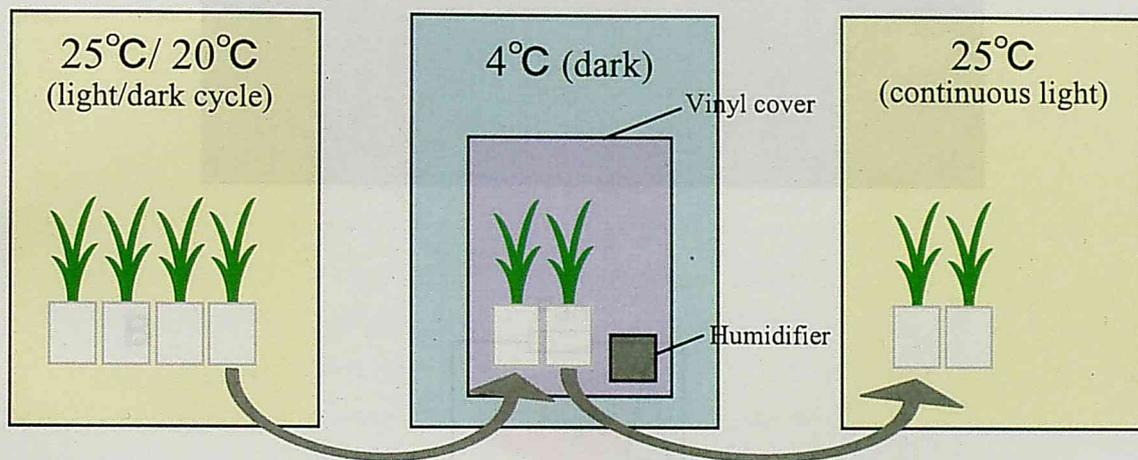


Fig. 5-2 Methods in chilling treatment of rice plants. 16-d-old rice plants were transferred to a 4°C dark chamber. In the 4°C chamber, samples were put into a small cage with vinyl cover where the relative humidity were maintained at almost 100% by humidifier. After 3- or 4-day-treatment, the rice plants were transferred to a 25°C chamber with continuous light.

Fig. 5-3 Temperature gradient chamber (1°C) for growing rice plants. A. Picture of the TGC. B. Air circulation system of the TGC. In the front of TGC, air is cooled by air conditioner. Due to the fan at the back of TGC, the cooled air flows from the front side to back. The air is gradually warmed by warm temperature, as a result, the temperature gradient is formed in the chamber. In this experiment, the plants were put at two different temperature zones. The distance between the Zone I and II was 2.5 and 1.5 m from the lower edge, respectively.

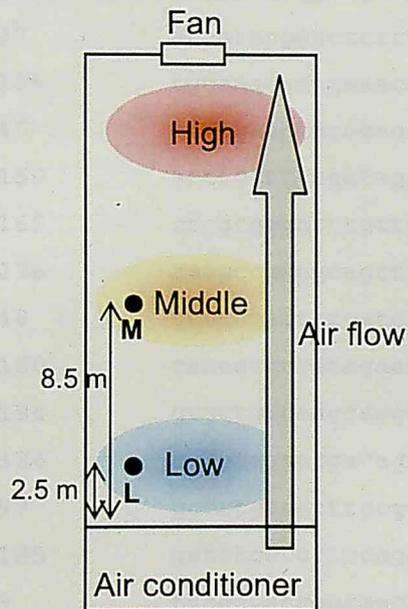
A**B**

Fig. 5-3 Temperature gradient chamber (TGC) for growing rice plants. (A) Picture of the TGC. (B) Schematic view of the TGC. In the front of TGC, air is cooled by air conditioner. Due to the fan at the back of TGC, the cooled air flows from the front to the back. The air is gradually warmed by outside temperature, as a result, the temperature gradient is formed in the chamber. In this experiments, rice plants were put at two different temperature zone, low (L) and middle (M). Zone L and M were 2.5 and 8.5 m from the house edge, respectively.

Table 5-1 Primers used for real-time RT-PCR

Name	Primer sequence
OsPIP1;1FW37	cgcaatcgtgatgtcctggt
OsPIP1;1RV147	acgattgagttgttcagggttc
OsPIP1;2FW2	ctgcatcagctattatcactgtcaa
OsPIP1;2RV84	aagcaggcagcgggaaa
OsPIP1;3FW103	acgtgtgttattaccgtctggtg
OsPIP1;3RV242	cgcacacacaagtaccattttctc
OsPIP2;1FW125	ccgctggctggttttggttc
OsPIP2;1RV244	tacaggctaaacacatgagacatcc
OsPIP2;2FW106	gcatttcgcctcgtggatag
OsPIP2;2RV191	cggacatagttcaaaggaatgga
OsPIP2;3FW122	agtttatcctcggtttctggcttt
OsPIP2;3RV236	gcacacctggaagaaacattgag
OsPIP2;4FW37	attgtttgggctctttctccttc
OsPIP2;4RV166	tgcaaacactgaaacatacaccac
OsPIP2;5FW45	atgggaagaacagagcacagg
OsPIP2;5RV150	acttgcttttgatagcgcacac
OsPIP2;6FW169	ccggtgggattttgtgtatg
OsPIP2;6RV276	aaagccgaagcagtttgtatctc
OsTIP1;1FW40	tctccgactccgatccaac
OsTIP1;1RV180	cacagttttacagaagcaaagcaac
OsTIP1;2FW194	gtgctgtcaaccaagccaac
OsTIP1;2RV324	cgtgaagaacgacagtgaagaga
OsTIP2;1FW97	gctttgtattttccggtttaccttc
OsTIP2;1RV185	gatttccccttccagacaacaa
OsTIP2;2FW9	ttcgccatcggcaacac
OsTIP2;2RV91	ccaaatcagtccttcacaacaca
OsActinFW213	ggactatgaccaggaaatggaga
OsActinRV350	atgaaggaaggctggaagagg

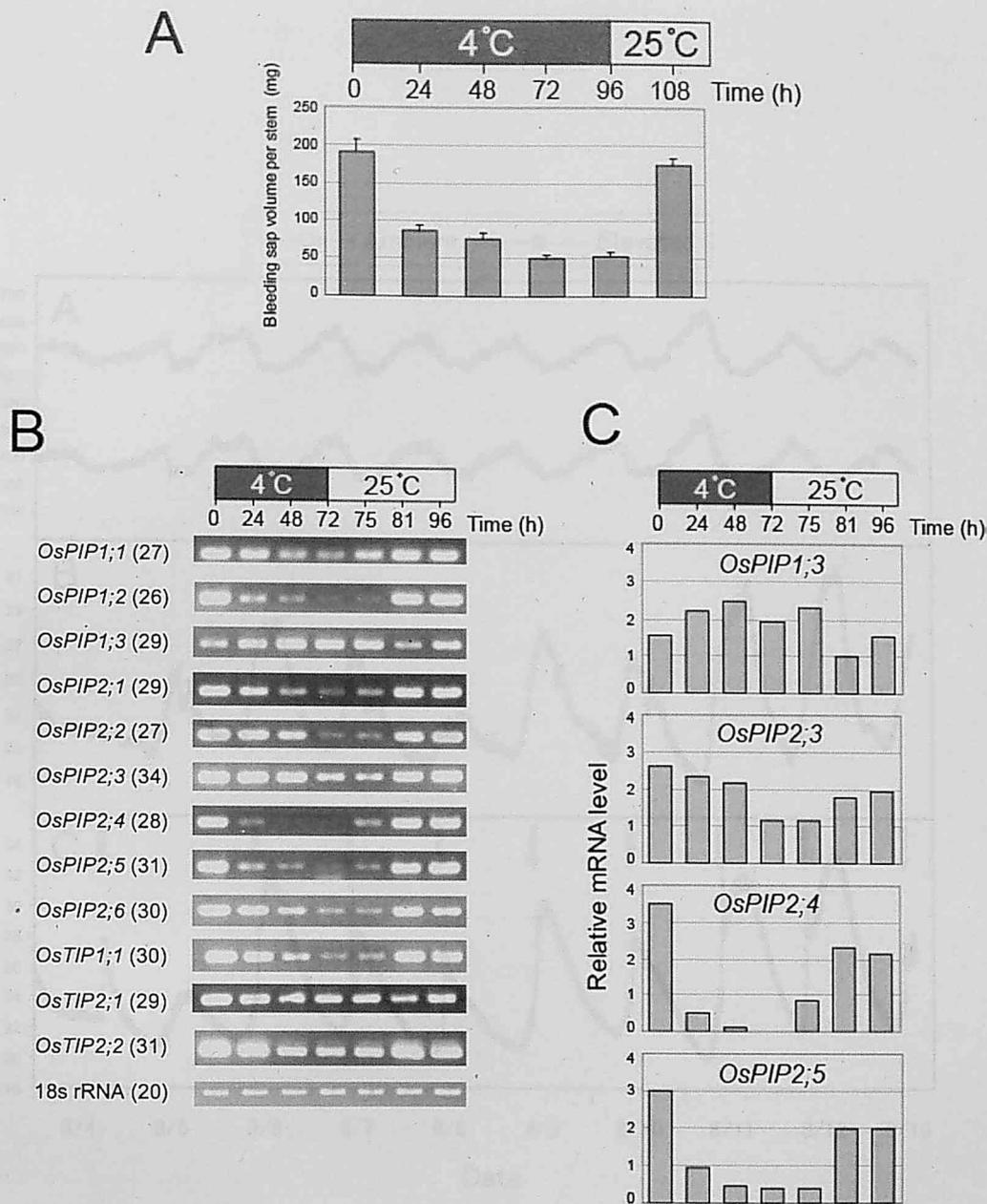


Fig. 5-4 Chilling treatment on mRNA levels of aquaporins in roots. (A) Sixteen-day old rice plants were placed in a chamber at 4°C (gray column) without light under 100% humidity for 96 h and then moved to a chamber at 25°C with continuous light (white column). The bleeding sap was collected into the cotton at 25°C in continuous light for 12h. The data represents the means \pm SE for 19 to 27 independent samples. (B) The mRNA levels were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. Numbers in parentheses indicate the number of PCR cycles. (C) The relative mRNA levels of *OsPIP1;3*, *OsPIP2;3*, *OsPIP2;4* and *OsPIP2;5* were quantified from the images of RNA gel electrophoresis and normalized to that of 18S rRNA.

Fig. 5-4 Effect of chilling treatment on mRNA levels of aquaporins in roots. (A) Sixteen-day old rice plants were placed in a chamber at 4°C (gray column) without light under 100% humidity for 96 h and then moved to a chamber at 25°C with continuous light (white column). The bleeding sap was collected into the cotton at 25°C in continuous light for 12h. The data represents the means \pm SE for 19 to 27 independent samples. (B) The mRNA levels were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. Numbers in parentheses indicate the number of PCR cycles. (C) The relative mRNA levels of *OsPIP1;3*, *OsPIP2;3*, *OsPIP2;4* and *OsPIP2;5* were quantified from the images of RNA gel electrophoresis and normalized to that of 18S rRNA.

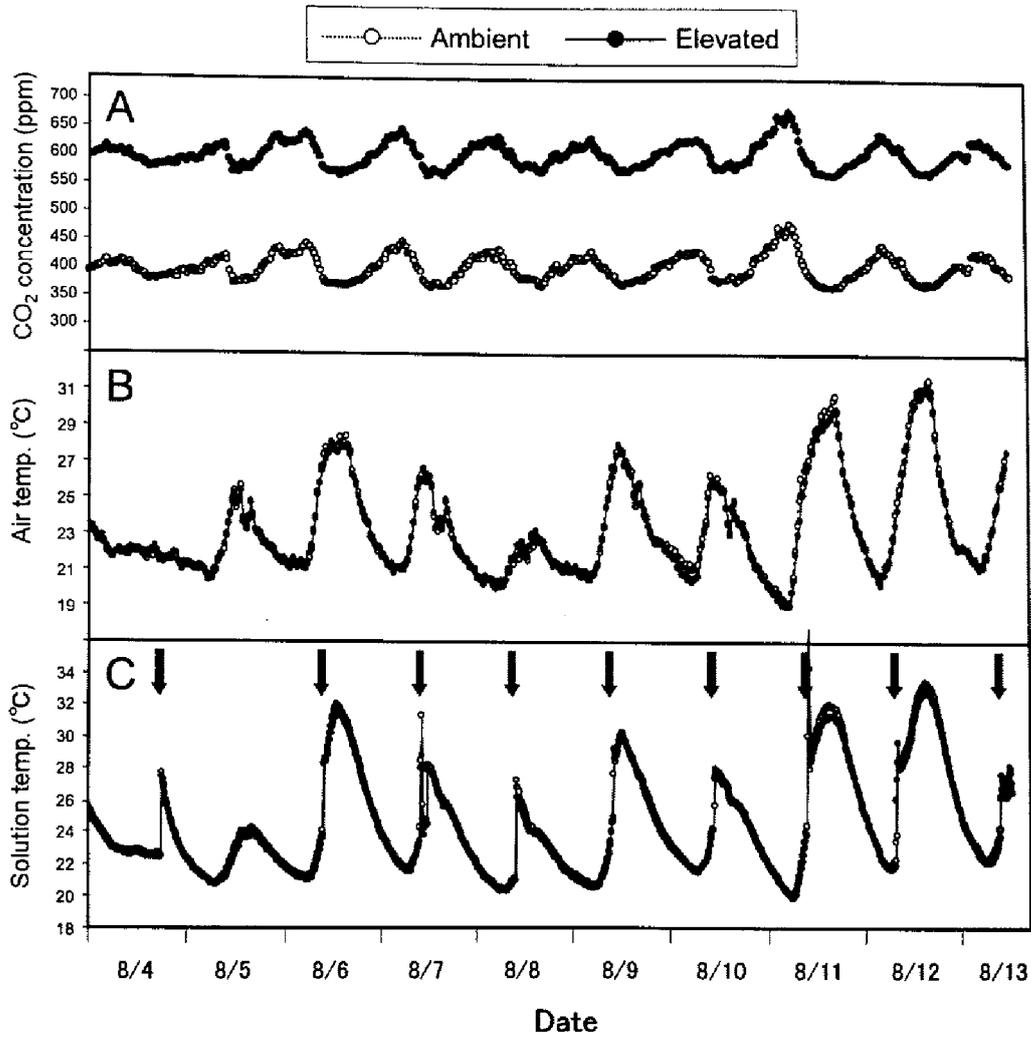


Fig. 5-5 Changes in CO₂ concentration (A) and temperatures of air (B) and hydroponic solution (C) during the experiments. These data are for the samples located at a low temperature zone in the second experiments conducted in August. Hydroponic solution was exchanged at times indicated by arrows in C.

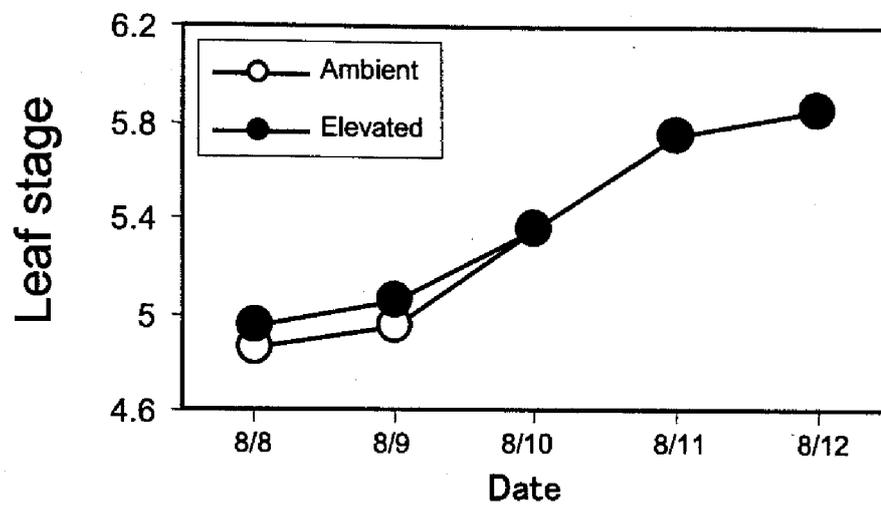


Fig. 5-6 Changes in leaf stage during the experiments. These data are for the samples located at a low temperature zone in the second experiments conducted in August. Leaf stage was measured as described in Materials and Methods.

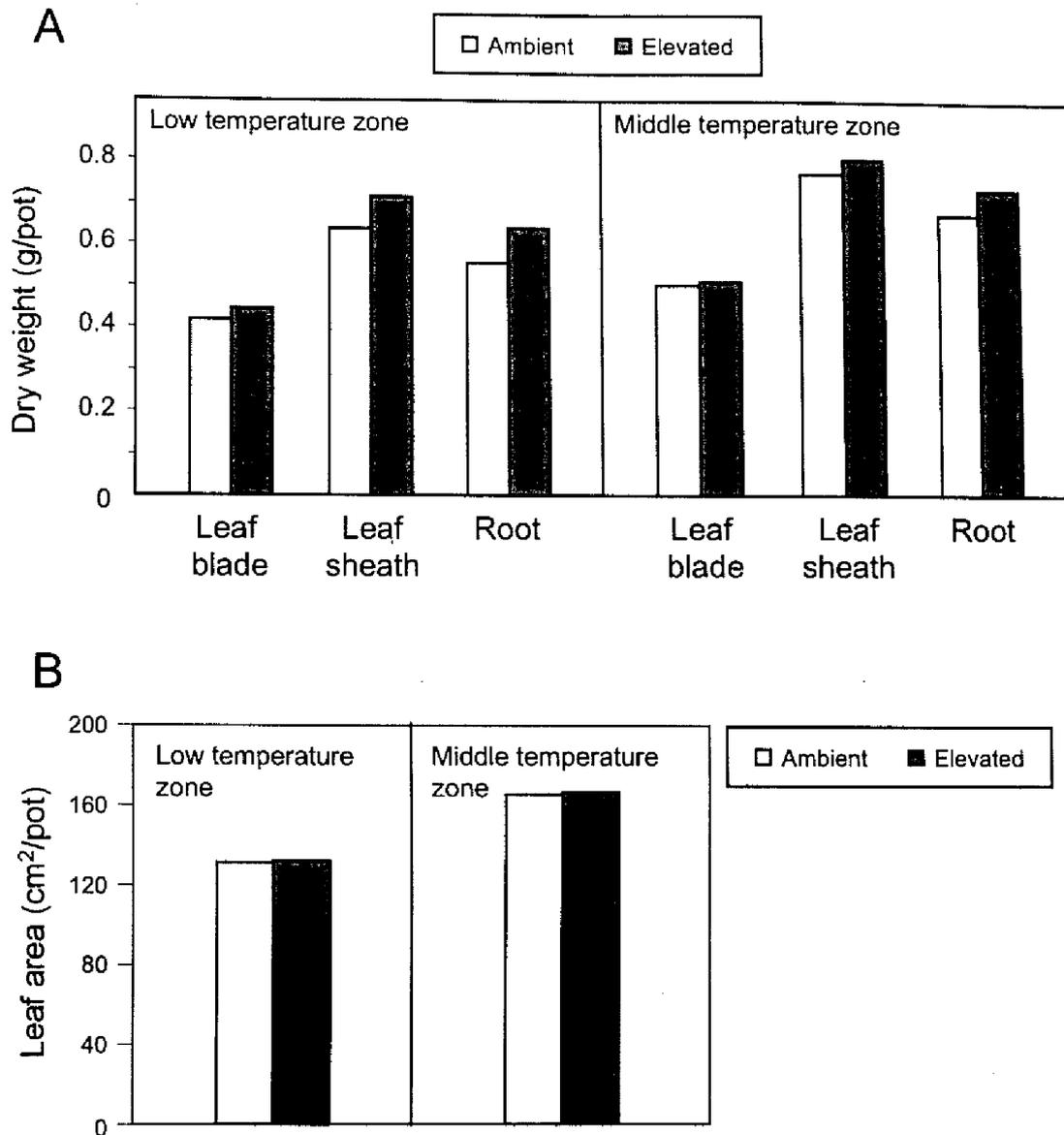


Fig. 5-7 Comparison of dry weights between different organs (A) and leaf area (B). Samples were dried at 80°C for more than 2 days before measuring dry weight. Leaf area was measured before drying leaf blades. These data are for the samples in the first experiments conducted in June. Values are expressed as an average from two or three different pots.

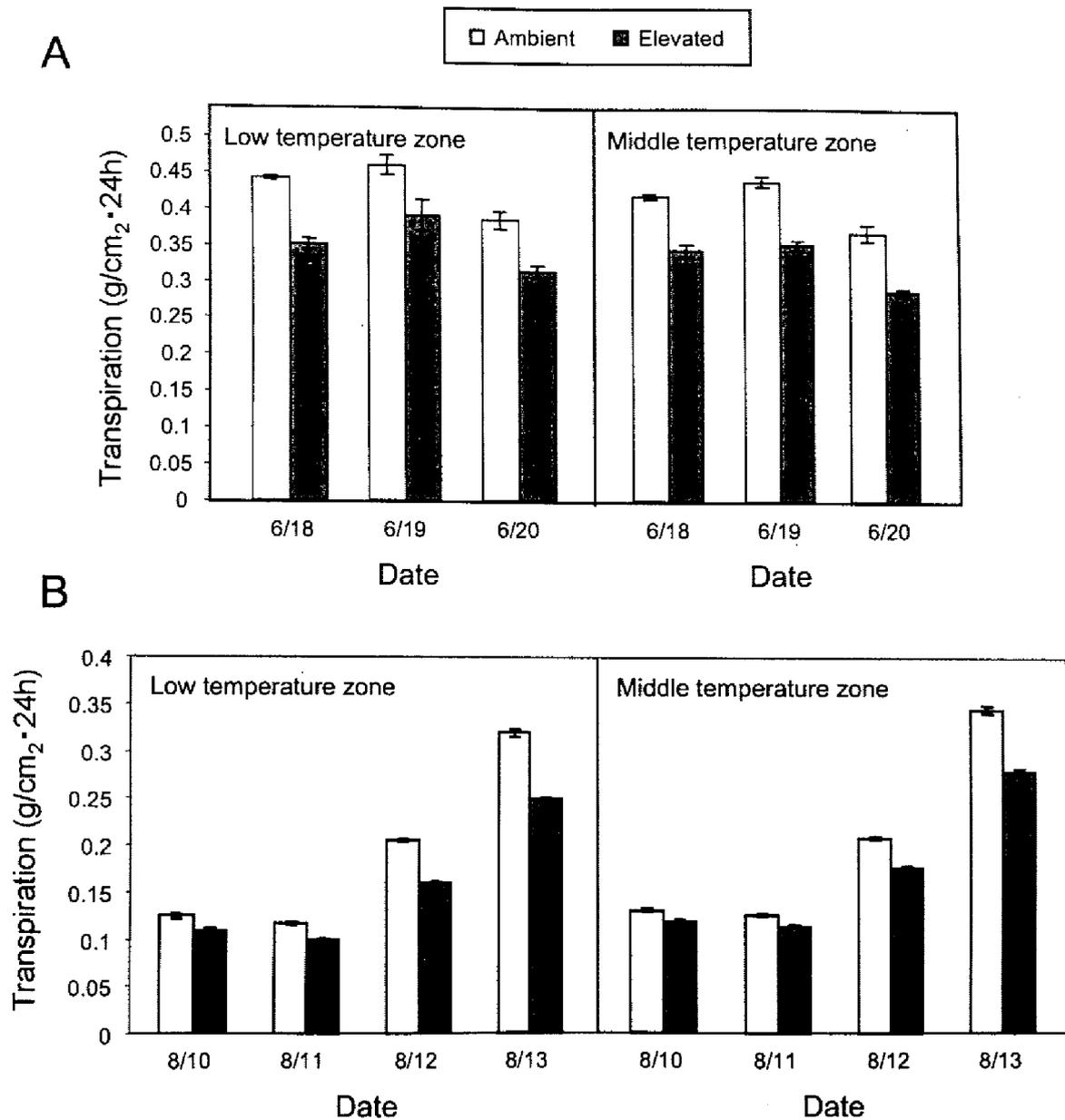


Fig. 5-8 Comparison of transpiration. Transpiration is calculated from the changes of the pot weight during 24 hours on the basis of the leaf area. (A) and (B) represent the results in June and August, respectively. The values are expressed as average \pm SE from 3 to 5 different pots.

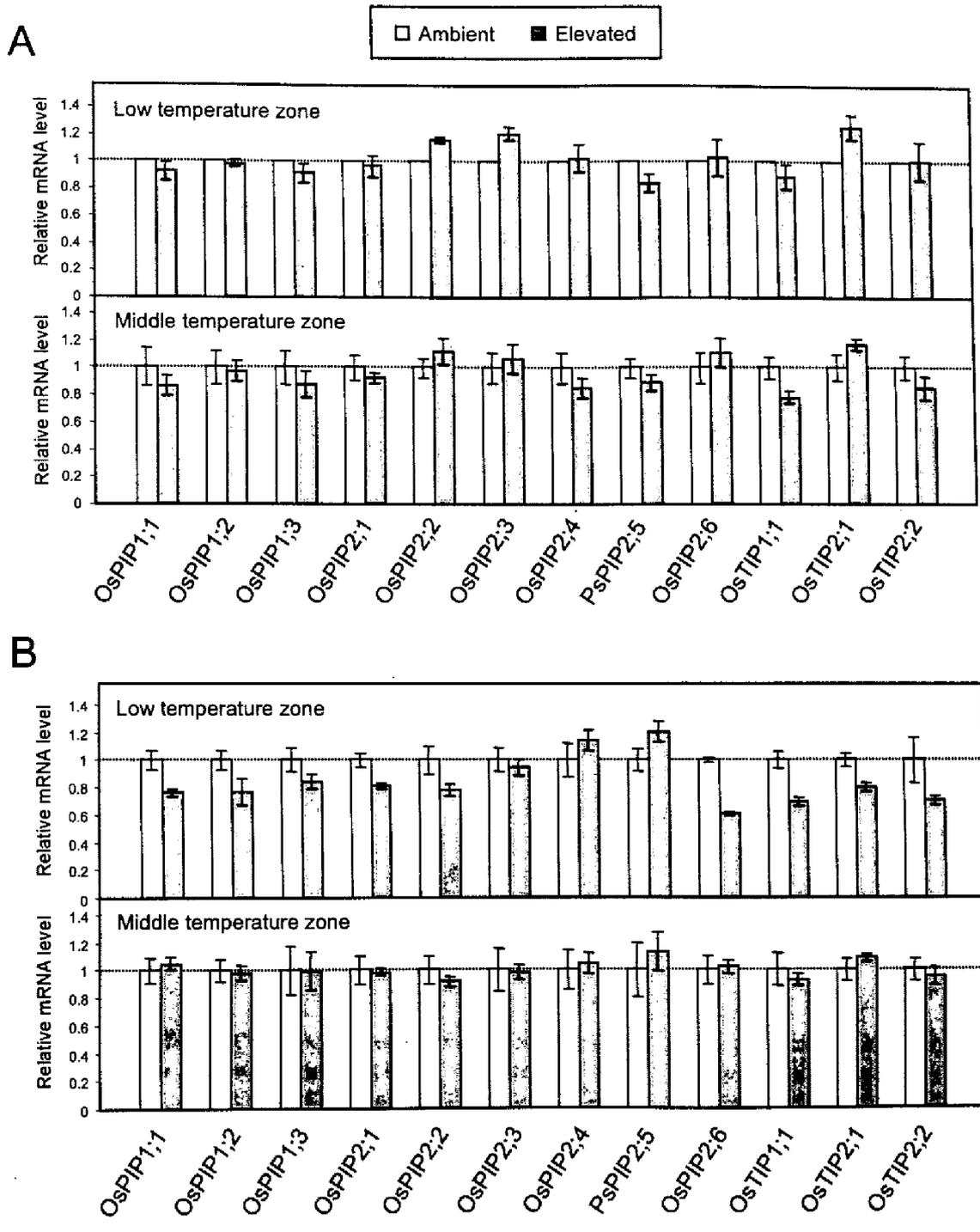


Fig. 5-9 Effect of CO₂ treatment on mRNA levels of aquaporins in roots. Data are expressed as ratio to the aquaporin expression level under the ambient CO₂. Aquaporin expression levels were normalized to that of *actin*. Data represent the means \pm SE for three or four independent samples. A, the results in June 2007; B, the results in August 2007.

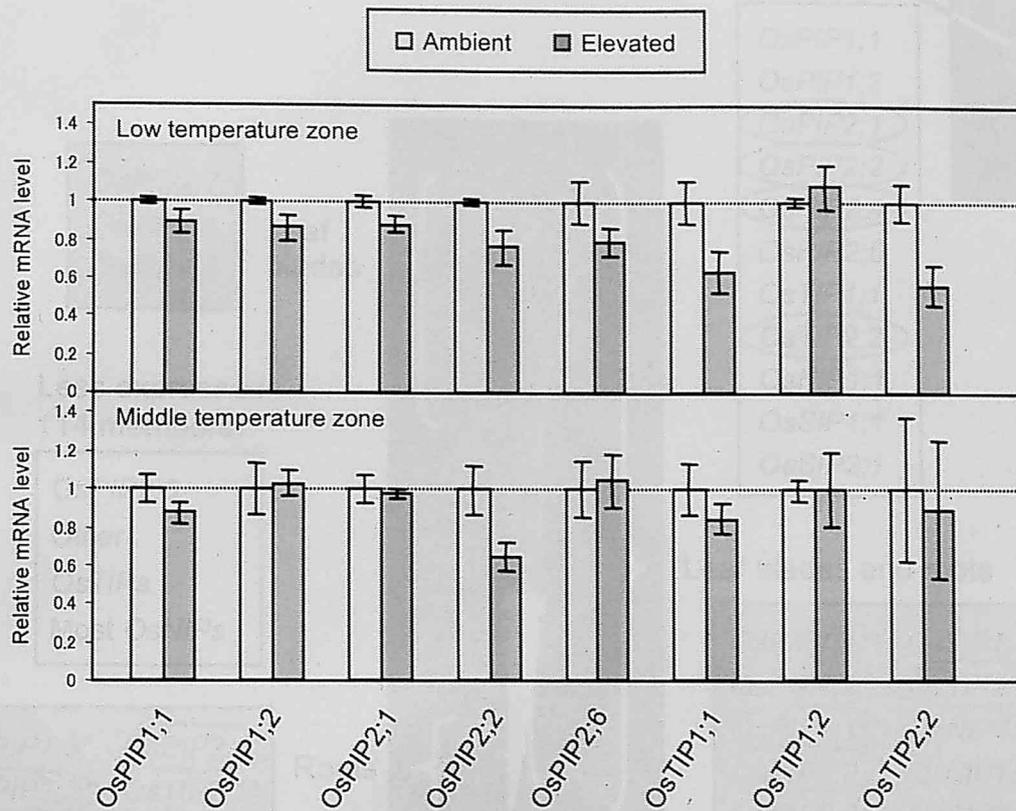


Fig. 5-10 Effect of CO₂ treatment on mRNA levels of aquaporins in the leaf blades. Data are expressed as ratio to the aquaporin expression levels under the ambient CO₂. Aquaporin expression levels were normalized to that of *actin*. Data represent the means \pm SE for three independent samples conducted in June 2007.

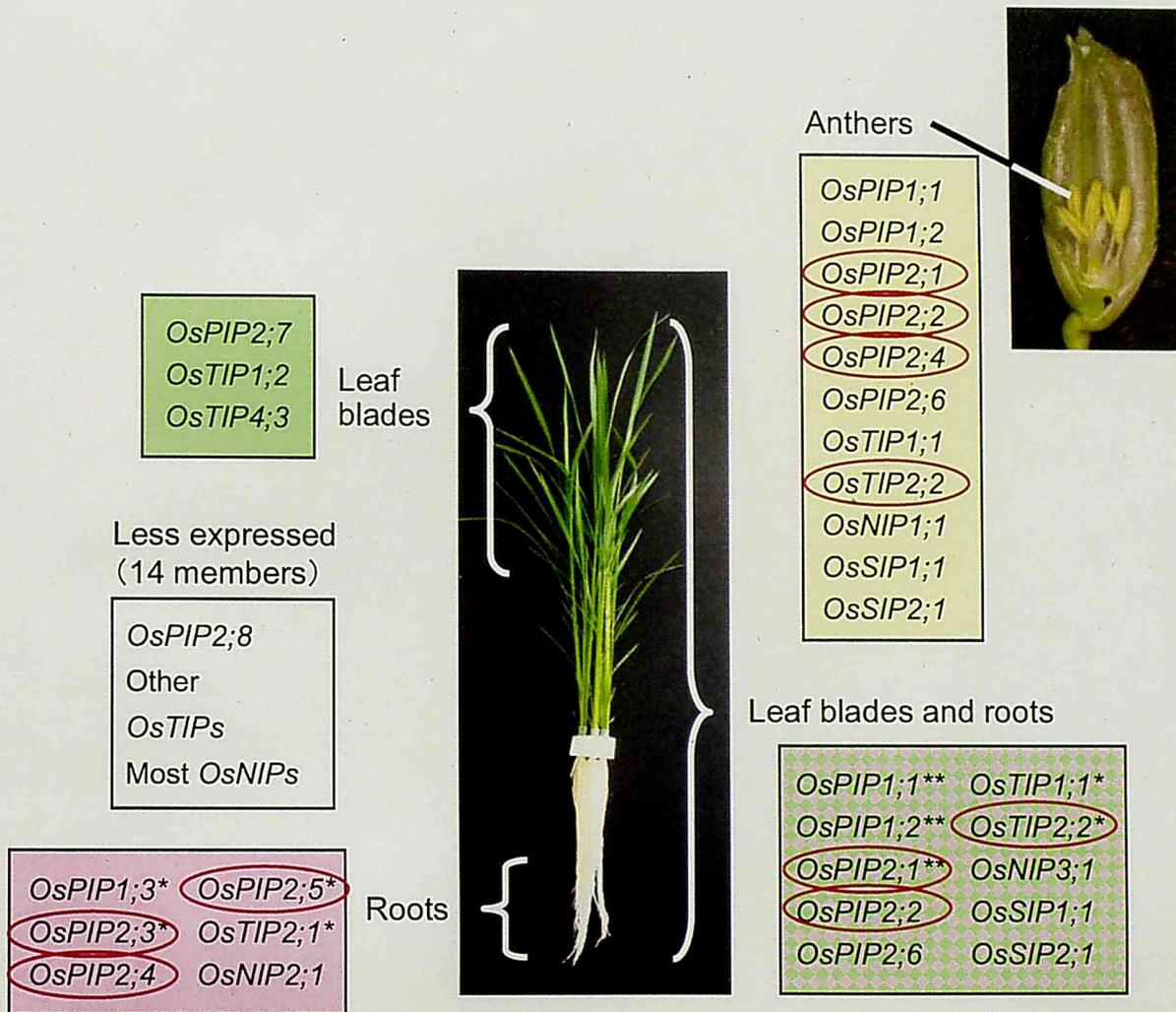


Fig. 6-1 Profile of genes, expression patterns and water transport activities of rice aquaporins. 33 rice aquaporin genes were identified from the rice genome database (Chapter 2). Organ specific expression patterns of them were analyzed (Chapter 3). Red circles mean that these aquaporin members have high water transport activities (Chapter 4). Asterisks and double asterisks mean that these aquaporin members were examined about their tissue-localization only in roots, or both in leaf blades and roots, respectively, by immunocytochemistry (Chapter 3).