

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07810

研究課題名(和文) 野生種を利用したイネ耐塩性関連遺伝子座の同定と耐性品種育種に向けた基盤確立

研究課題名(英文) Identification of genetic loci in relation to salt tolerance of rice using wild rice and development of breeding basis toward the production of resistant cultivars

研究代表者

堀江 智明(Horie, Tomoaki)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：90591181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：栽培イネの祖先野生イネである*Oryza rufipogon*に着目し、塩ストレスに対する表現型を調べると、野生イネは、栽培イネよりも塩に高い感受性を示し、かつ顕著により高濃度のNaを葉に蓄積していた。栽培イネ日本晴と野生イネの戻し交雑自殖系統群(BRILs)の各個体を塩ストレス処理し、元素一斉分析を行う事で葉のNa蓄積を支配するイネの遺伝子座の同定を試みた。152系統の葉身のNa蓄積の解析結果から、3つの主要な候補遺伝子座領域(QTL)を検出した。毒性のNa以外に、耐性に正の効果을及ぼすCa, Mg, Kに関する解析を進め、各元素の葉への蓄積を支配する遺伝子座のおよその候補領域を絞り込んだ。

研究成果の概要(英文)：Phenotypic evaluation for the sensitivity to salt stress has led to the findings that *Oryza rufipogon*, which is an ancestral wild rice to the cultivated rice (*Oryza sativa*), showed higher salt sensitivity with significantly higher Na accumulation in leaves compared with a japonica rice cultivar Nipponbare under salt stress. We have analyzed concentrations of key elements, Na, K, Ca and Mg, in leaves under salt stress using backcross recombinant inbred lines (BRILs), produced by crossing Nipponbare (recurrent) with wild rice (donor). Based on the data of leaf Na accumulation from 152 lines, three important candidates regions for QTL were identified. In addition, genetic regions, which could include QTL for the control of the accumulation of K, Ca, or Mg, were also narrowed down.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：耐塩性 イネ 遺伝資源

### 1. 研究開始当初の背景

植物の根圏に Na を中心とする塩類が過剰に集積する塩ストレス環境下では、一般に大多数の農作物を含む非塩性植物の成長や生産性は著しく妨げられる。植物の耐塩性機構は、毒性イオンである  $\text{Na}^+$  の排除機構を中心に長く解明が試みられてきた。これまでに、塩ストレス下で植物体内に侵入した  $\text{Na}^+$  を排除する三大必須  $\text{Na}^+$  輸送系が発見されている：(1) 多量に侵入した  $\text{Na}^+$  を根の表層組織から外へ排出する、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  対向輸送体である SOS1 系；(2) 細胞内に侵入した  $\text{Na}^+$  を液胞に隔離するための  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  対向輸送体である NHX 系；および(3) 導管への  $\text{Na}^+$  の積み込みと地上部への輸送を、隣接する柔細胞の細胞膜上で吸収除去して妨げる HKT1 系である。しかしながら、塩ストレスにさらされた植物の根から多量の  $\text{Na}^+$  流入を媒介するイオンチャネルを含め、耐塩性に重大な影響を与える未知の  $\text{Na}^+$  輸送系が他にも存在する事が強く示唆されていた。また、その蓄積が植物の塩抵抗性に正に寄与する、いわゆる善玉イオンである  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  の塩ストレス下における吸収・分配に参与する輸送系に関する情報は、 $\text{Na}^+$  輸送系の情報集積に比べて遅れていた。

### 2. 研究の目的

昨今の地球温暖化に伴う気候変動により、アジア太平洋地域の農地を中心に、塩類集積土壌が増加し続けている。 $\text{Na}^+$  を中心とする耐塩性に大きな影響を及ぼす重要なイオン種の恒常性を適切に統御する事は、植物の塩抵抗性の優劣を左右する鍵因子の一つである。

栽培イネ (*Oryza sativa*) は、穀類で最も塩ストレスに対して脆弱である。一般に、作物の野生種は、栽培種にくらべて様々な生物的・非生物的ストレスに対し優れた耐性を示す事が知られている。そこで本研究においては、祖先野生イネ (*Oryza rufipogon*) の遺伝資源に着目し、毒性イオンである  $\text{Na}^+$  や、善玉イオンである  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  を、塩ストレス下においてより抵抗性に資する吸収や分配を司る未知のイネの遺伝子座を発掘する事を目的として研究を実施した。

### 3. 研究の方法

(1) ジャポニカ米の栽培種日本晴、および野生イネ *O. rufipogon* W630 を生物材料とし、それらを水耕栽培にて生育させ、3-4 週齢の個体に塩ストレス ( $\text{NaCl}$  の添加) を 2-3 週間処理することで、地上部や地下部におけるダメージを比較する。また、上記同様に準備した植物に 1 週間ほどの塩ストレスを処理した後、若い葉の葉身、葉鞘、および根の部位別に試料を採取して、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法 (Inductivity coupled plasma optical emission spectrometry, ICP) によって Na, K, Ca, Mg の 4 元素の部位別の濃度を測定し、両種間で比較する。

(2) 当研究グループ (信州大+神戸大) では、日本晴を反復親、野生イネの W630 を供与親として交雑した、戻し交雑自殖系統群 (Backcross Recombinant Inbred Lines, BRILs) が利用可能である。全 159 系統から構成される BRILs の各個体を、前述の親系統と同様に、水耕栽培によって生育させ、塩処理を施した後に、元素分析のための部位別の試料を採取する。各試料中の Na, K, Ca, Mg の濃度を、ICP 解析により網羅的に測定する。得られた濃度データをもとに、量的形質遺伝子座 (Quantitative trait locus, QTL) 解析を行い、各元素の塩ストレス下での蓄積に大きな影響を及ぼす遺伝子座領域を特定する。

### 4. 研究成果

(1) BRILs の親系統である野生イネ *O. rufipogon* W630 と栽培イネ日本晴を、1 X 木村氏 B 液を使用して水耕栽培を行った。約 3 週齢の栄養成長期のイネに塩処理を施した：最初の 3 日間は 25 mM  $\text{NaCl}$  を水耕液に含め、以降は 50 mM  $\text{NaCl}$ 、75 mM  $\text{NaCl}$  と段階的に水耕液中の塩濃度を上昇させた。3 日おきに溶液交換をしながら、約 2-3 週間生育させた。その結果、一般的な傾向から期待される当初の予想とは異なり、野生イネ W630 は、塩ストレスによって日本晴よりも大きなダメージを地上部に被る事が観察され、より早く枯死した。この結果から、祖先野生イネは、栽培イネよりも塩に高い感受性を示す事が判明した。

(2) 上記成果の (1) で述べた手順で、BRILs の親系統 2 種を水耕栽培により準備した。約 3 週齢の栄養成長期のイネに、最初の 3 日間は 25 mM  $\text{NaCl}$ 、後の 4 日間は 50 mM  $\text{NaCl}$  を含んだ水耕液を処理した。塩処理後、最新展開葉である第 6、7 葉の葉身と葉鞘、および根を試料として採取して、ICP 解析によって、各試料中の Na, K, Ca, Mg の濃度を測定した。その結果、Na に関しては、すべての採取した部位で、野生イネ W630 は、日本晴よりも有意に高蓄積していた。光合成場であり、塩ストレスに最も敏感な葉身においては、日本晴の約 1.8 倍と、部位間で最大の差が認められた。この結果は、成果 (1) で述べた、野生イネの方が栽培イネよりも塩感受性が高いという結論とよく一致していた。

一方善玉である K の濃度を見ると、葉身では、若干であるが有意に野生イネの方が増加しているのに対し、葉鞘や根では有意に減少していた。Ca に関しては、葉身で野生イネの方が、有意に濃度が減少するのに対して、葉鞘では若干ながら有意に野生イネの方が上昇していた。根での差は認められなかった。Mg に関しては、葉鞘で野生イネの方が若干濃度が上昇していたが、葉身や根では野生イネの方で濃度が有意に減少していた。

以上の結果から、野生イネ W630 と栽培イネ日本晴の間には、各元素の濃度、すなわち

それらイオンの吸収や分配に、大きな差が存在する事が強く示唆された。

(3) 上述の通り、当初の期待とは異なり、野生イネの方が塩ストレスに高い感受性を示し、かつ葉身を含む地上部で、有意に栽培イネ日本晴より Na を高蓄積する事が判明した。しかしながら、日本晴との間に顕著な主要4元素の蓄積の差が認められたため、BRILsを利用した遺伝子座の探索が有効であると考へ、計画を実行した。

BRILsを構成する各個体を、成果(2)で述べた手順で水耕栽培により系統ごとに6植物ずつ準備し、塩処理を施した。栽培は人工気象器を使用した。一度にできる量に限りがあるため、季節を通して、順次栽培と試料採取、ICP解析を進めた。BRILsを構成する全159系統由来の試料からICP解析による部位別の元素の濃度データを取得した。乾燥と低温に苛まれる冬場の水耕栽培に関しても、極力対策を講じて対処したものの、一部の系統に関しては、明らかに季節的な不具合を生じていると判断されるものが散見された。従って、本研究機関で得られたデータの報告としては、再解析が必須であると判断された7系統を除いた、合計152系統に由来するものである。また、栽培機会ごとに、標準として日本晴も同時に栽培しデータ解析まで行った。しかしながら、季節を通して行う栽培によって、実験間で日本晴にも無視できないほどの濃度の変化が認められたため、すべてのデータは、並行して生育させた日本晴のデータで標準化して比較することとした。

Naに関しては、152系統のうち、第6,7葉身で日本晴比0.17~3.19と大きく分離した。葉鞘部および根では、それぞれ日本晴比0.15~2.27、0.11~1.54と分離した。得られた蓄積量データをもとに、頻度分布図を作成してみると、葉鞘部と根においては正規分布に近い形となったのに対して、葉身部においてはやや歪な分布となった。葉身部の分布の歪さが何に起因するものかは現時点では不明であるものの、いずれの部位においても、Na蓄積に関して複数の遺伝子の影響を受けていることが強く示唆された。また特筆すべきは、元素分析の結果、BRILs系統の中には、親系統である野生イネよりも高濃度のNaを蓄積するものや、日本晴よりも濃度が顕著に低い系統のものが含まれている事が判明した。興味深い事に、それら親系統よりも葉身のNa濃度が顕著に高い、あるいは低い系統の塩ストレス耐性を調査したところ、予想に反して、野生イネよりもNaを葉に多く蓄積するAsn13番の系統が、日本晴にくらべて若干耐塩性が向上している事が視覚的ダメージにより示された。生重量、および乾重量の解析からもその結論がサポートされた。この系統を中心に戻し交雑系統の準備が進んでおり、今後詳細な解析が実施される予定である。

葉身部に関しては、152系統分の濃度デー

タをもとに専用の解析ソフトウェアを駆使してQTL解析を行った。その結果、1, 3, 8番染色体上に、計3つのQTL候補領域を検出した。1, 8番染色体のQTLは野生イネ由来の断片、3番染色体は日本晴由来の断片と予想された。今後、残りの7系統のデータを含めた完璧なデータセットを早急に準備し、再度QTL解析を実施する傍ら、原因遺伝子の究明に向けた準備を進める予定である。

Kに関しては、152系統のうち、第6,7葉身で日本晴比0.24~2.05、葉鞘部で0.41~2.01、および根では0.28~2.02にそれぞれ分離した。得られた蓄積量データをもとに、頻度分布図を作成してみると、葉身部と葉鞘部は正規分布に近い形であったが、根は若干歪な分布であった。QTL解析までは到達できなかったものの、全BRILs系統のマーカーおよび遺伝子型と親系統から突出する系統の濃度データを照らし合わせてみると、QTL候補となり得る、選抜系統間で頻発して観察されるマーカー領域が検出された。

CaやMgに関しては、多くの根の試料で、本元素分析で用いた希釈度では測定限界以下の値となってしまったため、葉身、葉鞘部のみを評価した。Caの場合、葉身で日本晴比0.05~2.63、葉鞘部で0.06~1.97に分離した。一方Mgの場合、葉身で日本晴比0.07~2.11、葉鞘部で0.19~2.20に分離した。頻度分布図を作成してみると、CaとMgも共通した傾向であり、両部位ともやや歪ではあるが、正規分布に近い形となった。Kの場合と同様、全BRILs系統のマーカーおよび遺伝子型と親系統から突出する系統の濃度データを照らし合わせてみると、やはりQTL候補となり得るマーカー領域が検出された。

今後は、不足の7系統のデータも合わせて、部位別、元素別のQTL解析を完結させる必要がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Oda Y, Kobayashi NI, Tanoi K, Ma JF, Itou Y, Katsuhara M, Itou T, Horie T. T-DNA Tagging-Based Gain-of-Function of OsHKT1;4 Reinforces Na Exclusion from Leaves and Stems but Triggers Na Toxicity in Roots of Rice Under Salt Stress. *International Journal of Molecular Science*. 19:235. 2018 (DOI: 10.3390/ijms19010235). 査読あり
- ② Ismail AM and Horie T. Genomics, Physiology, and Molecular Breeding Approaches for Improving Salt Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 68:405-434. 2017 (DOI: 10.1146/annurev-arplant-042916-040936). 査読あり

〔学会発表〕（計 1 件）

① 堀内智貴、石川亮、田野井慶太郎、小林奈通子、石井尊生、堀江智明. 「野生イネ *Oryza rufipogon* と栽培イネ *Oryza sativa* の交雑系統群を利用した新規 Na<sup>+</sup> 輸送系遺伝子・変異の探索」（口頭発表）. 日本育種学会 第 132 回講演会(秋季 岩手大学) 2017 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀江 智明 (HORIE, Tomoaki)  
信州大学・学術研究院繊維学系・准教授  
研究者番号：90591181

### (2) 研究分担者

石川 亮 (ISHIKAWA, Ryo)  
神戸大学・農学研究科・助教  
研究者番号：70467687