

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0283

研究課題名（和文）新奇な塩輸送体の機能改変を通じた植物の耐塩性の改善（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Improvement of salinity tolerance in plants through fine-tuning of novel sodium transporters(Fostering Joint International Research)

研究代表者

上田 晃弘 (Ueda, Akihiro)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：10578248

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,900,000円

渡航期間：2.7ヶ月

研究成果の概要（和文）：土壌に過剰量の塩分が蓄積されると塩害が発生する。植物が持つ耐塩性機構のうち、ナトリウムの液胞への隔離や細胞外への排出、葉からのナトリウムの排除については良く研究が進んでいるが、ナトリウムがどのようにして植物体に流入するのかについては良く分かっていない。本研究では、根がどのようにしてナトリウムを取り込むのかについて調べた。塩ストレス下において根のナトリウム濃度が異なるイネ品種の選抜を国際イネ研究所、カセサート大学と実施した。選抜された品種群を用いて、遺伝学的解析のための後代集団の育成を行いつつ、生理学的・分子生物学的解析を行い、これらの品種がなぜ異なるナトリウム蓄積能を示すのかについて考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾燥地や半乾燥地には塩害土壌が広がっているため、塩害に強い耐塩性植物を作出することはこれらの土地での農作物生産性の向上に重要である。本研究では、植物がどのようにして過剰に体内に蓄積されると有害となるナトリウムを土壌から吸収するのかに焦点をあてて研究を行った。様々なイネ品種を用いて根のナトリウム濃度が異なる品種の選抜を行った。根のナトリウム濃度が高い品種や低い品種の特徴を調べるとともに、塩の取り込みに関わる遺伝子群の発現解析を行うことで、イネの根がナトリウムを取り込む仕組みについて考察を行った。根のナトリウム取り込みを抑制した品種を創出することで、より塩害に強いイネを作出するための基盤を築いた。

研究成果の概要（英文）：Accumulation of excess salts causes salinity stress. Mechanisms of salinity tolerance including compartmentalization of sodium into vacuoles, extrusion of sodium to outside of cells, and sodium exclusion from leaves have been well-characterized in recent extensive researches, however, it is still unknown how sodium comes in roots from salinized soils. Therefore, objective of this research is set to study how plants absorb sodium from soils in roots. Through collaborative research with International Rice Research Institute and Kasetsart University, divergent rice varieties were screened based on sodium concentration in roots under salinity stress. Using selected rice varieties, we have developed rice populations for genetic analysis and have characterized these varieties using physiological and molecular biological analyses to discuss why these rice varieties have different ability to absorb sodium in roots.

研究分野：植物栄養学

キーワード：塩ストレス イネ ナトリウム

1. 研究開始当初の背景

土壌に過剰量の塩分（主にナトリウム）が蓄積されると塩害（塩ストレス）が発生し、植物の生産性を低下させる。近年、このような塩害土壌問題が地球規模で広がっており、農作物生産上の問題となっている。塩害土壌問題の解決の一助として、耐塩性を有した植物の作出に期待が寄せられている。塩ストレス下では植物は過剰量のナトリウムを蓄積することでその生育が阻害されるが、特に光合成器官の細胞質へのナトリウム蓄積は光合成活性や様々な代謝活性の阻害とともに活性酸素の生成を引き起こす。よって、植物は塩ストレス下では様々なナトリウム輸送系を活性化させることで、生存を図ろうとする。

植物の耐塩性に寄与すると考えられるナトリウム輸送系には以下の3つの系が関わっている。

細胞質へ流入したナトリウムを液胞内へ隔離する、あるいは細胞外へと排出する（組織耐性機構） 導管内の蒸散流とともに地上部へと輸送されるナトリウムを導管柔細胞でフィルタリングする（葉からの塩排除機構） 土壌から根へのナトリウム取り込みの制限、である。 については、近年研究が盛んに進められた結果、 Na^+/H^+ antiporter (NHX, SOS) や high affinity potassium transporter (HKT) が の分子実体として同定されている。しかしながら、 については、植物が塩ストレス下でどのようにしてナトリウムを取り込んでいるのかについては不明な部分が多い。

2. 研究の目的

以上のような背景をふまえ、本研究では塩ストレス下において植物の根のナトリウム流入機構の解明を行う。これまでに遺伝子組換え植物を用いた検証から、組織耐性機構や葉からの塩排除機構は植物の耐塩性向上に大きく寄与することが明らかにされている。根へのナトリウム流入は塩ストレス下で起こるナトリウム輸送に関する最初のイベントであり、ナトリウム流入を抑制することができれば、植物体内のナトリウム蓄積を減じることができ、植物の耐塩性向上に大きく寄与できると期待される。

本研究では、様々なイネ品種群を用いてナトリウム蓄積能が異なる品種群の選抜を行う。これらの品種間に見られる差異について、生理学的、分子生物学的、分子遺伝学的解析を行うことで、塩ストレス下において土壌から根へのナトリウム流入を担う輸送系の同定に迫ることを目的とする。様々なイネ品種群の選抜は、研究代表者が所属する広島大学のほか、国際イネ研究所（フィリピン）とカセサート大学（タイ）にて行う。

3. 研究の方法

（1）イネ品種の選抜

来歴の異なる多様なイネ 100 品種は発芽後、木村氏 B 液を用いた水耕栽培を行った。3~4 葉期のイネに塩ストレス（100 mM NaCl）を 24 時間処理した後、根・葉鞘・葉身部に分けてサンプリングを行った。サンプリングした各器官は 80°C で 72 時間以上乾燥、あるいは液体窒素で凍結後に超低温冷凍庫内で保存した。

（2）イオン分析

各器官の乾物サンプルに 1N HCl を添加して 24 時間振盪することで、ナトリウムの抽出を行った。ナトリウム濃度の測定は蛍光光度計（ANA135、東京光電）を用いて行った。

（3）定量的発現解析

高ナトリウム蓄積品種と低ナトリウム蓄積品種を用いて全 RNA の抽出を行った。その後、Thunderbird SYBR qPCR Mix（東洋紡）と StepOne リアルタイム PCR システム（ThermoFisher Scientific）を用いて塩輸送体をコードする遺伝子の定量的発現解析を行った。発現量は $\text{OseEF1}\alpha$ を内部標準とした $\Delta\Delta\text{CT}$ 法により評価を行った。使用したプライマーの塩基配列は表 1 に示した。

4. 研究成果

塩ストレス下において、イネの根へのナトリウム流入量に品種間差があるのかを調べるために多様なイネ品種群を用いた検証を行った。100 mM NaCl を 24 時間処理した後、根のナトリウム濃度を調べたところ、高ナトリウム蓄積品種では対照区の 4.7 倍、低ナトリウム蓄積品種では対照区の 2.0 倍のナトリウムを蓄積していることが分かった（図 1）。このことから、これらのイネの根では異なるナトリウム流入経路が存在していることが推察された。

高ナトリウム蓄積品種と低ナトリウム蓄積品種を用いて再度水耕栽培を行い、イネ体内のナトリウム濃度の経時的変化を調べた。その結果、高ナトリウム蓄積品種では塩ストレス処理後、すみやかに葉のナトリウム濃度が増加することが分かった（図 2）。一方で、低ナトリウム蓄積品種でも葉のナトリウム濃度の増加はみられたものの、高ナトリウム蓄積品種よりは穏やかな増加であった。このことから、塩処理後の根のナトリウム濃度を低く維持する特性は葉でのナトリウム濃度の低減に寄与していることがうかがわれた。

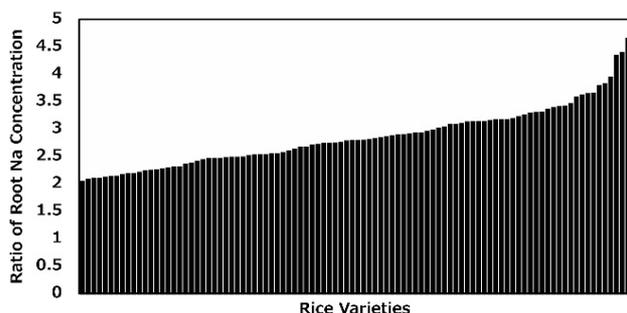


図1．イネ各品種における根のナトリウム濃度比（塩ストレス区／対照区）

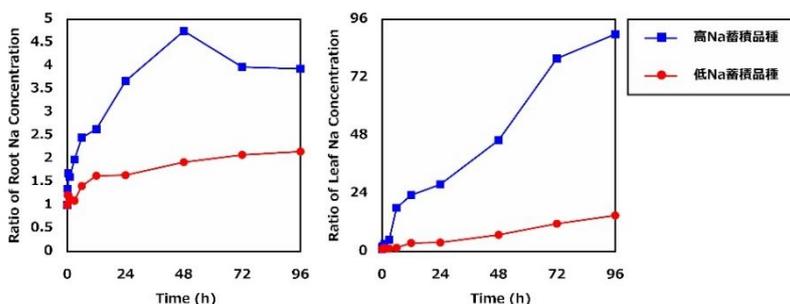


図2．高ナトリウム蓄積品種と低ナトリウム蓄積品種の根（左）と葉（右）におけるナトリウム濃度の経時的変化

高ナトリウム蓄積品種と低ナトリウム蓄積品種の根サンプルを用いて、塩輸送体をコードする遺伝子群の定量的発現解析を行った（図3）。葉からのナトリウム排除に関わる *OsHKT1;5* 遺伝子の発現量は塩ストレス下で高ナトリウム蓄積品種において大きな増加（9.6倍）が見られた。これは高ナトリウム蓄積品種では体内のナトリウム濃度の増加が大きかったために、根における *OsHKT1;5* を介した葉からのナトリウム排除機構が活性化されたためであると考えられる。一方、外部のナトリウムが低濃度の時に根からのナトリウム取り込みに関与している *OsHKT2;1* 遺伝子の発現量は高ナトリウム蓄積品種では大きく減少していた。このことから、*OsHKT2;1* は塩ストレス下における主要なナトリウム流入経路ではないことが考えられた。細胞外へのナトリウム排出に関わっている *OsSOS1* 遺伝子の発現量は高ナトリウム蓄積品種で減少することが分かった。これは高ナトリウム蓄積品種が塩ストレス下で細胞外にナトリウムを排出する能力が低下していることを示している。塩ストレス下では根によるカリウムの吸収が低下することが知られている。カリウムの取り込みに関与している *OsNKCC1* はその遺伝子の発現量が低ナトリウム蓄積品種で大きく増加（9.6倍）していることが分かった。このことは低ナトリウム蓄積品種でナトリウムを低く維持できることにカリウム獲得能が関わっていることを示唆している。

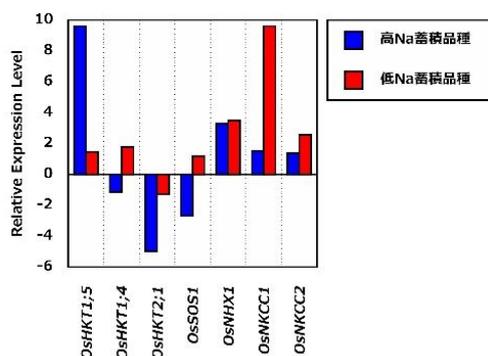


図3．高ナトリウム蓄積品種と低ナトリウム蓄積品種の根における塩輸送体遺伝子群の発現解析

高ナトリウム蓄積品種と低ナトリウム蓄積品種を用いて交雑を行い、後代集団の育成を行った。F2 個体を用いた QTL-seq 解析を行い、根でのナトリウム蓄積量の差に関わる遺伝子座の同定と候補遺伝子の絞り込みを行っている。これによりイネの根におけるナトリウム流入を制御する遺伝子の同定が進むと期待される。

イネ品種選抜の過程で葉身のナトリウムが極めて低い耐塩性品種（奥羽観 383 号）の同定に成功した。耐塩性品種 FL478 は葉からのナトリウム排除能が高い品種として知られているが、奥羽観 383 号は FL478 よりも葉身のナトリウム濃度をさらに低く維持していた（図4）。FL478 の葉からのナトリウム排除には根における *OsHKT1;5* の機能が重要であるが、奥羽観 383 号では葉鞘部でナトリウム輸送体である遺伝子の発現量が極めて高かった（図5）。事実、奥羽観 383 号では葉鞘部におけるナトリウム濃度が高い。このことから、奥羽観 383 号では、葉身部のナト

リウム濃度を低減するために、葉鞘部で塩排除を行っている機構があることが示された (Wangsawang et al., 2018)。

表 1 . プライマーの塩基配列

Name	Sequence (5'-3')	Name	Sequence (5'-3')
OseEF1 α -F	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT	OsSOS1-F	ATACTGAGTGGGGTTGTTATTGC
OseEF1 α -R	GACTTCCTTCACGATTTCATCGTAA	OsSOS1-R	AAAGGTAATTTCAAAAAGGTACATGG
OsHKT1;5-F	CCCATCAACTACAGCGTCCT	OsNHX1-F	AATGATCACCAGCACCATCA
OsHKT1;5-R	AGCTGTACCCCGTGCTGA	OsNHX1-R	AAGGCTCAGAGGTGACAGGA
OsHKT1;4-F	CCGAGAGAAGAAAGCTCAAAGAAGAC	OsNKCC1-F	GGGGGACGGATTTAAGAGTG
OsHKT1;4-R	AGAGATGGTCTGGATTGATCTGTCTACT	OsNKCC1-R	GGCCGACAAAATATGAGAGG
OsHKT2;1-F	TGCATTCATCACTGAGAGGAG	OsNKCC2-F	GCAGCTGTGGTCTCTCGTAA
OsHKT2;1-R	GGTGCAGTTTCTGCAACCTC	OsNKCC1-R	ATGCGTGGGACGTTCTCTAC

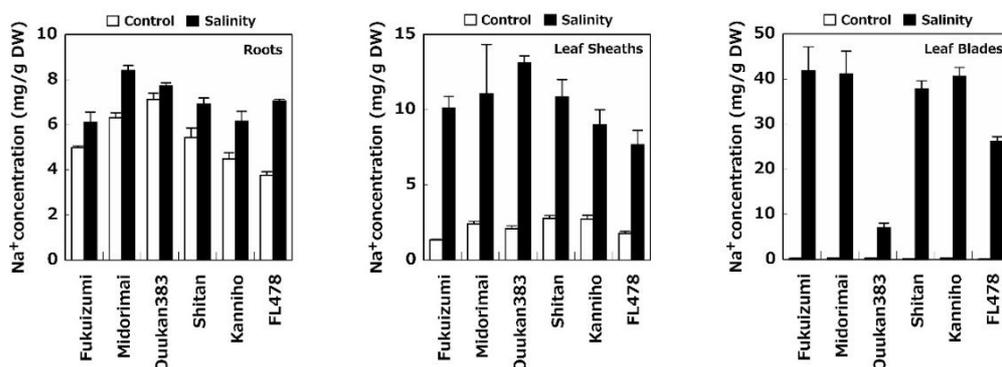


図 4 . イネ 6 品種における器官別ナトリウム濃度

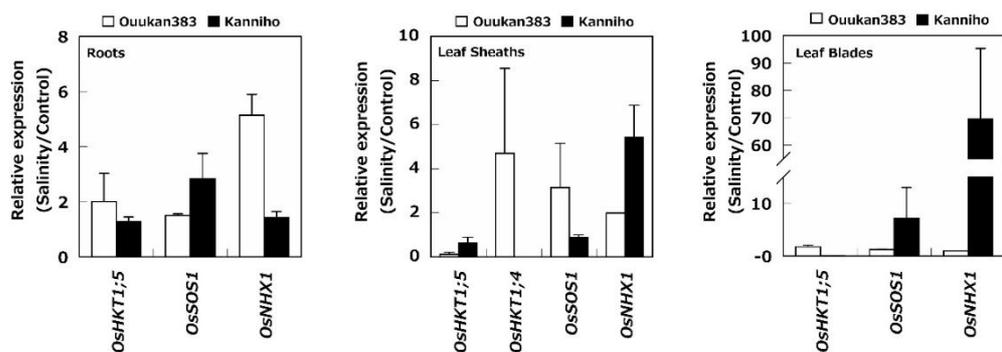


図 5 . 耐塩性品種奥羽観 383 号と塩感受性品種神丹穂における塩輸送体遺伝子群の発現解析

5 . 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

Mekawy AMM, Abdelaziz MN, Ueda A (2018)

Apigenin pretreatment enhances growth and salinity tolerance of rice seedlings.

Plant Physiology and Biochemistry **130**: 94-104.

DOI:10.1016/j.plaphy.2018.06.036 (査読有)

Elsawy HIA, Mekawy AMM, Elhity MA, Abdel-Dayem SM, Abdelaziz MN, Assaha DVM, Ueda A, Saneoka H (2018)

Differential responses of two Egyptian barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars to salt stress.

Plant Physiology and Biochemistry **127**: 425-435.

DOI:10.1016/j.plaphy.2018.04.012 (査読有)

Wangsayang T, Chuamnakhong S, Kohnishi E, Sripichitt P, Sreewongchai T, Ueda A (2018)

A salinity tolerant japonica cultivar has Na⁺ exclusion mechanism at leaf sheaths through the function of a Na⁺ transporter OsHKT1;4 under salinity stress.

Journal of Agronomy and Crop Science **204**: 274-284.

DOI:10.1111/jac.12264 (査読有)

Mekawy AMM, Assaha DVM, Munehiro R, Kohnishi E, Nagaoka T, Ueda A, Saneoka H (2018)

Characterization of type 3 metallothionein-like gene (*OsMT-3a*) from rice, revealed its ability to confer tolerance to salinity and heavy metal stresses.

Environmental and Experimental Botany **147**: 157-166.

DOI:10.1016/j.envexpbot.2017.12.002 (査読有)

Assaha DVM, Ueda A, Saneoka H, Al-Yahyai R, Yaish MW (2017)

The role of Na⁺ and K⁺ transporters in salt stress adaptation in glycophytes. *Front Physiol.***8**:509.

DOI:10.3389/fphys.2017.00509 (査読有)

Assaha DVM, Mekawy AMM, Liu L, Noori MS, Kokulan KS, Ueda A, Nagaoka T, Saneoka H (2017)

Na⁺ retention in the root is a key adaptive mechanism to low and high salinity in the glycophyte, *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. (Portulacaceae).

Journal of Agronomy and Crop Science **203**: 56-67.

DOI:10.1111/jac.12184 (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

南平眞実, 川下真奈, 実岡寛文, 上田晃弘

耐塩性ジャポニカイネ品種の選抜とNa蓄積特性

日本農芸化学会中四国支部第50回記念講演会、2018年

幸西絵梨, Thanakorn Wangsayang, Tanee Sreewongchai, 実岡寛文, 上田晃弘

イネの耐塩性に及ぼす鉄過剰処理の影響

日本農芸化学会中四国支部第50回記念講演会、2018年

幸西絵梨, Thanakorn Wangsayang, Tanee Sreewongchai, 実岡寛文, 上田晃弘

鉄濃度の変化がイネの耐塩性に及ぼす影響

日本土壌肥料学会神奈川大会、2018年

大戸貴裕, 実岡寛文, 上田晃弘

塩ストレスが塩生植物の生育と養分吸収に及ぼす影響

日本土壌肥料学会神奈川大会、2018年

Sumana Chuamnakhong, Hirofumi Saneoka, Akihiro Ueda

Physiological responses to saline-alkaline stress in rice

日本土壌肥料学会関西支部講演会、2018年

Sumana Chuamnakhong, Hirofumi Saneoka, Akihiro Ueda

Amelioration of salinity stress by ascorbic acid pretreatment in rice

日本土壌肥料学会関西支部講演会、2017年

Ahmad Mohammad M. Mekawy, Hirofumi Saneoka, Akihiro Ueda

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：ラケッシュ クマール シン

ローマ字氏名：Rakesh Kumar Singh

所属研究機関名：国際イネ研究所

部局名：植物育種部門

職名：主任研究員

研究協力者氏名：タニー スリーウォンチャイ

ローマ字氏名：Tanee Sreewongchai

所属研究機関名：カセサート大学

部局名：農学部

職名：准教授

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：