

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14836

研究課題名（和文）イネ葉鞘における塩排除能の分子機構の解明と耐塩性強化法の提案

研究課題名（英文）Molecular mechanism of salt removal ability in rice leaf sheath and proposal of new method to improve salt tolerance

研究代表者

三屋 史朗（Mitsuya, Shiro）

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：70432250

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：塩害はアジアの沿岸部の稲作に深刻な問題を引き起こしており、さらに近年の気候変動と相まってその被害土壌面積が拡大しているため、イネの耐塩性強化は重要な課題である。イネの耐塩性には、根から取り込まれた塩を根や葉鞘で排除し、光合成を行う葉身への塩の輸送・蓄積を減少させることが重要である。本研究では、イネの葉鞘が塩害の原因となるナトリウムイオンと塩化物イオンを導管流から取り込み、葉鞘内に存在する基本柔細胞という体積の大きい細胞から成る組織に輸送・隔離することが分かった。この機構を葉鞘の塩排除能という。またナトリウムの塩排除能の品種間差を生ずる遺伝子が第5染色体に存在することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

塩害は近年の気候変動に伴ってさらにその被害面積が拡大している。特に稲作の盛んな東南アジア諸国の沿岸部では、塩害による稲作生産の減少が顕著になってきている。そのためイネの耐塩性を改良することは、沿岸部で稲作を営む農家の収入を安定化させ、また稲作可能土地面積の増加にも貢献する。学術的意義としても、本研究からはイネの葉鞘における塩排除能の機構および関連遺伝子座が明らかになった。これは今後の耐塩性イネの分子育種に役立つと共に、他の作物や植物の耐塩性向上にも応用できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Salt intrusion into paddy fields decrease rice growth and yield, thus it is a serious problem to be solved. Rice is a salt-sensitive crop and it is important to improve its salt tolerance. Under saline conditions, salt is absorbed by root, transported to the leaf blades and accumulated salt inhibit photosynthesis and growth in rice. Therefore, removing salt from xylem vessels in root and leaf sheath is a key mechanism to decrease salt accumulation in leaf blade. In this study, we found that leaf sheath has a salt removal ability to decrease salt transportation to leaf blade. We also found that leaf sheaths unload Na and Cl ions from xylem vessels and transport them to the fundamental parenchyma cells. Using around 300 rice varieties, we performed genome wide association analysis regarding salt removal ability in leaf sheath. As a result, we found that the key gene may be localized on chromosome 5 for Na removal. Also, several SNPs were found to be involved in Cl removal ability.

研究分野：作物生理学

キーワード：イネ 耐塩性 塩害 葉鞘 塩排除

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アジアの多くの沿岸部デルタ地域や塩性土壌の内陸部では、海面上昇や塩性地下水位の上昇に伴った土壌中塩濃度の上昇が起こり、イネの生産が不安定となっている。そこで、イネの耐塩性を向上させることによって、上記の地域での稲作の安定化や稲作可能面積の拡大が課題となっている。イネが特に NaCl などの塩が高濃度存在する環境で成育すると、根から吸収されて葉身に蓄積した塩(ここでは特に Na イオンを示す)の増加に伴って、光合成活性が減少し成育が抑制される。したがってイネの耐塩性には、地上部の特に葉身における塩の吸収を抑制することが重要である。

イネにおける葉身への塩の吸収抑制には、根において塩を蒸散流から排除する機構と、葉鞘に塩をトラップする機構がある。蒸散流からの塩の排除は、根の木部柔細胞で発現する Na イオン輸送体タンパク質 (*OsHKT1;5*) が担い (Ren ら, 2005)、耐塩性イネ品種 Pokkali や Nona Bokra の高活性型 *OsHKT1;5* 遺伝子が座乗する *Saltol* 遺伝子座がマーカー育種に利用されている。

一方、地上部に流入した塩は、葉鞘が塩を高濃度でトラップして蓄積することによって、葉身への塩輸送を減少させる塩排除能を持つ (Mitsuya ら 2002)。さらに葉鞘の塩排除能には品種間差があり、葉鞘に塩を高濃度蓄積できる品種は耐塩性が高いことから (Platten ら 2013)、耐塩性イネ品種育成に応用できる可能性が高い。イネの葉鞘はストロー状で、内部をサイズの大きい柔細胞が架橋する。これまで申請者は、葉鞘内中央部柔組織に Na や K、Cl イオンが優先的に蓄積することを示すデータを得てきた。しかし葉鞘内柔細胞への塩の隔離・蓄積などの動態に関わる遺伝子や量的形質遺伝子座は未知であり、耐塩性イネの育種に利用できる段階にない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は次の3つである。はじめに、塩存在下でのイネ葉鞘における塩の動態を明らかにし、塩の隔離・蓄積に重要な組織を同定する。次に、イネ葉鞘の塩の隔離・蓄積に関わる組織における塩輸送に関わる遺伝子群の発現量解析を行う。さらに、ゲノムワイドアソシエーション解析を用いて、葉鞘における塩蓄積量の系統間差をもたらず量的形質遺伝子座を同定し、葉鞘の塩排除に関わる遺伝子の探索を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) イネ葉鞘における塩分布の定性・定量分析

葉鞘内での塩の分布を定量的に経時的に解析し、塩の動態を調べた。イネ品種として塩感受性品種である IR29、耐塩性品種である FL478 を用いた。両品種を水耕栽培し、塩化ナトリウム (NaCl) を水耕液に溶かして塩を処理した。その後、地上部を各葉位別に葉身と葉鞘に切り分けて、各部位における Na と Cl の濃度を測定した。さらに処理開始時の最上位完全展開葉を葉鞘 6 箇所、葉身 3 箇所の計 9 箇所に切り分けて収穫し、各部位における Na と Cl の濃度を測定した。次に葉鞘の放射方向での塩蓄積量を調べるために、本研究では、低真空走査型電子顕微鏡が生体の生物試料を生のまま観察することが可能であることを利用し、付属させたエネルギー分散型 X 線分析装置を用いて、葉鞘内の細胞または組織レベルでの元素の定性定量分析を行った。また観察では X 線照射による乾燥および試料構造の変形を防ぐため、-20 度に設定したクールステージを用いて観察した。

#### (2) レーザーマイクロダイゼクション法による葉鞘での塩の動態に関わる遺伝子群のトランスクリプトーム解析

イネの耐塩性品種 FL478 を対照区および塩処理区において水耕栽培し、葉鞘の塩の隔離・蓄積に関わる部位を化学固定した。横断切片からレーザーマイクロダイゼクション法により周縁部柔組織、維管束組織、中央部の摘出した。レーザーマイクロダイゼクション法における実験は、名古屋大学大学院中園幹生教授および高橋和宏助教を研究協力者として行った。それらの組織から全 RNA を抽出し、Na および Cl 輸送に関連した遺伝子群の発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。また、上記 1 よりイネ葉鞘内での塩蓄積量に違いが見られたため、塩蓄積量の異なる部位を切り出して RNA を抽出し、塩輸送関連遺伝子群の発現量の比較を行った。

#### (3) GWAS による葉鞘による塩排除能の品種間差異をもたらず原因遺伝子の同定

イネにおける耐塩性は、葉鞘における塩の蓄積程度と正の相関があることが知られている (Platten ら 2012)。そこで、海外研究協力者である国際イネ研究所の Abdelbagi M. Ismail 博士および Marjorie de Ocampo 氏の協力のもと、国際イネ研究所においてゲノムワイドアソシエーション解析 (GWAS) をイネ系統群約 300 系統を用いて、葉鞘と葉身の Na、Cl 濃度の比を測定し、葉鞘における塩の排除能の GWAS 解析を行った。系統群の生育をそろえるため大きく 3 グループに分けて、播種時期をずらして水耕栽培した。第 6 葉が完全に展開した後で NaCl を水耕液に溶かして塩を処理した。その後、第 3 葉と第 6 葉の葉身と葉鞘を分けて収穫し、各組織における Na と Cl の濃度を測定した。その結果とジェノタイプングのデータを用いて、R ソフトウェアを用いて GWAS 解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) イネ葉鞘における塩分布の定性・定量分析

耐塩性の異なるイネ 2 品種 (IR29 および FL478) を水耕栽培し、塩を処理した。各葉位を葉身と葉鞘に分けて塩濃度を測定したところ、Na も Cl も、下位葉により多く蓄積し、さらに葉身よりも葉鞘での濃度が高かった。この結果は、少なくともこの 2 品種では、葉鞘がより多く塩を蓄積することで、葉身塩濃度を低下させる塩排除機能があることが分かった。次に、塩を処理したイネ 2 品種の葉身と葉鞘における、軸方向での Na と Cl の分布を調べた。Na は葉鞘の基部で最

も濃度が高く、葉身先端に向かって濃度が低かった。Cl は葉鞘の中央部から葉鞘の先端部で最も濃度が高かった。軸方向での塩分布は各部位での導管流から各イオンを木部柔細胞へと輸送させる機能の違いが関与すると考えられるが、Na と Cl では異なる部位、異なる輸送体タンパク質が導管流からの塩排除を行うと考えられた。一方、放射方向での Na と Cl の分布はいずれも、維管束組織や周縁部柔組織に比べて、比較的サイズの大きい基本柔組織において高い蓄積程度が観察された。したがって、葉鞘での塩排除機能には、これまでに知られていた導管流からの塩排除だけでなく、排除した塩を基本柔組織へ輸送し、おそらく液胞に隔離して高濃度蓄積することが重要であることが示唆された。

(2) レーザーマイクロダイセクション法による葉鞘での塩の動態に関わる遺伝子群のトランスクリプトーム解析

FL478 の葉鞘を基部、中央部、先端部に分けて、葉身と葉鞘 4 箇所から RNA を抽出し、塩輸送関連遺伝子群 (*OsHKT1* 遺伝子群、*OsNHX* 遺伝子群、*OsSOS1*、*NPF*、*CLC* 遺伝子群、*CCC*) の発現量を測定した。結果、対照区ではほとんどの遺伝子は葉鞘基部で発現量が低く、葉鞘中央部および先端部、葉身で発現量が高かった。一方、塩処理を行ったところ複数の遺伝子の発現量が、塩処理により葉鞘基部で最も増加した。

レーザーマイクロダイセクション法により、葉鞘の中心部に存在する基本柔組織を切り出し、RNA 抽出後、cDNA を生成した。リアルタイム PCR 法により塩輸送関連遺伝子群の発現を確認したが、現在のところ RNA の品質が低く、精度の高いリアルタイム PCR が行うことができず、発現量のばらつきが大きく、組織間での発現量の違いを正確に測定することができなかった。今後さらにレーザーマイクロダイセクション法により抽出する RNA の質を向上させる必要がある。

(3) GWAS による葉鞘による塩排除能の品種間差異をもたらす原因遺伝子の同定

GWAS の結果、葉鞘における Na 排除能および Cl 排除能について品種間差異を生ずる一塩基多型 (SNP) の検出に成功した。Na 排除能については、インディカ系統群の系統間差異を生ずる SNP が第 5 番染色体に検出された。さらに Cl 排除能については、全系統群の系統間差異の原因 SNP が第 5 番染色体、インディカ系統群の系統間差異の原因 SNP が 3, 4 番を除く染色体、トロピカルジャポニカ系統群の系統間差異の原因 SNP が 3, 8 番を除く染色体に検出された。Na 排除能に関わる SNP の座乗する領域には、Na 輸送体遺伝子は存在せず、複雑な制御機構の存在が示唆された。また本研究から、葉鞘の塩排出能の高い系統群と低い系統群の選抜にも成功した。これらの系統群での排出能の違いの分子メカニズムは、今後解明すべき課題である。

以上のことより、イネの葉鞘には Na と Cl を高濃度蓄積することで、葉身への塩の流入を押さえる機構があることが分かった。またこの機構には葉鞘に存在する基本柔組織が関与することが示唆された。基本柔組織は維管束組織など他の組織と比べてその細胞サイズが大きく、巨大な液胞がその体積のほとんどを占めると考えられているため、この液胞へ塩を隔離して、葉鞘の塩排出能に関与していることが考えられた。これらの結果は既に国際科学雑誌に掲載された (Sarin ら, 2019 Functional Plant Biology)。

葉鞘の塩排出能には系統間差異があることが分かった。このことは、葉鞘の塩排出能を交配により高めることができる可能性を示している。また本研究からは葉鞘の塩排出能に関わる SNP の同定にも成功した。この SNP を利用すれば、今後のイネ耐塩性の分子育種、また葉鞘の塩排出に関与する遺伝子の同定につながると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Sarin Neang, Marjorie de Ocampo, James A. Egdane, John Damien Platten, Abdelbagi M. Ismail, Nicola S. Skoulding, Mana Kano-Nakata, Akira Yamauchi, Shiro Mitsuya Fundamental parenchyma cells are involved in Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> removal ability in rice leaf sheath. Functional Plant Biology 査読有. in press

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Sarin Neang, Marjorie de Ocampo, James A. Egdane, John Damien Platten, Abdelbagi M. Ismail, Nicola S. Skoulding, Mana Kano-Nakata, Akira Yamauchi, Shiro Mitsuya GWAS approach to find SNPs associated with salt exclusion in leaf sheath of rice. 日本作物学会第 247 回講演会 2019 年.

(2) 内田万咲・仲田(狩野)麻奈・三屋史朗・山内章 長期塩害下におけるイネの収量維持に関与する生理機構の解明. 日本作物学会第 247 回講演会 2019 年.

(3) Shiro Mitsuya, Norifumi Murakami, Tadashi Sato, Mana Kano-Nakata, Akira Yamauchi Salt tolerant rice cv Nona Bokra chromosome segments introgressed into cv Koshihikari improved its yield under salinity through retained grain filling. 9th Asian Crop Science Association Conference 2017 年.

(4) 村上准史・佐藤雅志・仲田(狩野)麻奈・山内章・三屋史朗 コシヒカリを遺伝背景としたノナボクラ染色体断片置換系統群を用いた塩害水田におけるイネの収量維持に関わる形質の探索. 日本作物学会第 242 回講演会. 2016 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://cropstress.wp.xdomain.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：中園幹生、高橋宏和、Joyce Cartagena、Abdelbagi M. Ismail、Marjorie de Ocampo

ローマ字氏名：Mikio Nakazono, Hirokazu Takahashi, Joyce cartagena, Abdelbagi M. Ismail, Marjorie de

Ocampo

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。