

令和元年6月13日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18565

研究課題名(和文) 浮イネ節間伸長による洪水耐性の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of flood tolerance by internode elongation in deepwater rice

研究代表者

永井 啓祐 (Nagai, Keisuke)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・特任助教

研究者番号：30648473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：洪水時に一般的な水田イネは水没することで酸素不足となり生育することができないのに対して、浮イネと呼ばれるイネは洪水による水位の上昇に伴った急激な節間伸長を誘導することで葉先を水面に出し、酸素欠乏による生育不良を回避している。また、近年の地球環境の変動に伴い世界各地で洪水が発生しており農業的損失が深刻化している。そこで、本課題では浮イネの保持する洪水耐性機構の分子機構の解明を行うことで洪水耐性イネの育種に応用することを目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで洪水に対するイネ育種では、洪水時に生長を抑制することでエネルギー消費を抑える成長抑制戦略と、浮イネのような茎葉伸長による成長促進戦略が採られてきた。前者においては育種的な応用が進められている一方で、後者の戦略においては育種的な応用は進んでいない。この原因として、急激な茎葉伸長には複数の遺伝子による複雑な制御機構の存在や、伸長時のエネルギー消費により収量性が減少するなどの理由が挙げられる。しかし、気候変動による洪水増加に対して、この2つの戦略は洪水耐性イネの作出の両翼を担うものであり、浮イネの急激な伸長の制御メカニズムを解明し育種に利用することは洪水地域でのイネ育種に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Under flooding condition, normal paddy rice cannot grow due to lack of oxygen. On the other hand, deepwater rice put out the tip of the leaves to water surface by inducing rapid internode elongation with the rise of water level under flood condition, and prevents poor growth due to oxygen deficiency. In addition, floods have occurred in various parts of the world due to the global environmental change in recent years, and agricultural losses are becoming serious. Therefore, I aimed to elucidate the molecular mechanism of internode elongation of deepwater rice, and to apply the knowledges to the breeding of flood tolerant rice.

研究分野：イネ環境適応性

キーワード：洪水耐性 節間伸長 低酸素 ジベレリン エチレン 介在分裂組織 浮イネ

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

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、イネの洪水ストレス耐性に関する研究では、イネの幼苗期に発生する Flash flood と呼ばれる 1~2 週間の短期間の洪水耐性に関する研究が盛んに行われてきた。一方、長期間の洪水に対するイネの洪水ストレス耐性に関する分子メカニズムには不明な点が多い。イネが多く栽培されている東南アジア、西アフリカでは雨季に河川が氾濫し毎年定期的な大規模かつ長期間にわたる洪水が発生する。浮イネと呼ばれるイネはこのような過酷な環境においても生存が可能である。浮イネの草丈は一般的な水田環境では通常のイネと変わらず 1m 程度であるが、洪水による水位の上昇に対応して 1 日 20~25cm の急激な節間伸長を行い、葉の先端を水面に出すことで呼吸を確保し 10m 以上の深水環境でも生存できるように環境適応能力を獲得している。これまで洪水ストレスに関するイネの育種的アプローチには、洪水時に生長を抑制することでエネルギー消費を抑える成長抑制戦略と、浮イネのような茎葉伸長を行うことで呼吸を確保する成長促進戦略が採られてきた。前者においては *Sub1* 遺伝子が同定されており、育種的な応用も進められている一方で、後者の戦略においては、我々はこれまでに浮イネの節間伸長を正に制御する遺伝子として *Snorkel* 遺伝子を同定したものの育種的な応用は進んでいない。この原因として、浮イネの急激な伸長には複数の遺伝子による複雑な制御機構の存在が示唆されていることや、伸長時にエネルギーを消費してしまうため収量性が減少するなどの理由が挙げられる。しかし、気候変動による洪水の増加に対して、この 2 つの戦略は洪水耐性イネの作出の両翼を担うものである。今、予想される爆発的な人口増加に伴う食料不足を回避するためには、限られた耕作地における効率的な作物生産が求められたため、浮イネの急激な伸長の制御メカニズムを解明し育種に利用することは洪水地域でのイネ育種に貢献できると考える。

### 2. 研究の目的

浮イネの深水条件下での茎葉伸長の研究は形態学・植物生理学の研究が中心であり (Kende et al. 1998)、浮イネ性の分子遺伝学的な研究はほとんど行われていない。その一因として、浮イネ性が複数の遺伝子座に支配される量的形質であり、これまで量的形質に関する遺伝解析が困難であったことが挙げられる。2004 年にイネゲノム配列が公開され、染色体の任意の領域に分子マーカーが設計できるようになり、量的形質座解析 (QTL 解析) が現実的なものとなった。これまで、申請者は浮イネの節間伸長性を制御する第 1、第 3、第 12 染色体に座乗する 3 つの QTL のうち、最も効果の大きい第 12 染色体に座乗する QTL の原因遺伝子 *Snorkel1/2* を同定し、エチレン情報伝達に関わる転写因子をコードしていることを明らかにした (Hattori et al. 2009)。また、浮イネの節間伸長の開始時期を制御する新たな QTL の存在や、茎葉伸長を制御する植物ホルモンの一つであるジベレリンの感受性を向上させる浮イネ QTL を見いだした (Nagai et al. 2012, Nagai et al. 2014)。しかし、現在までに QTL の原因遺伝子として *Snorkel* 遺伝子以外は同定できておらず、その他の QTL の原因遺伝子は未解明のままである。浮イネの洪水耐性メカニズムを分子レベルで理解するためには、節間伸長に關与する他の QTL の原因遺伝子を同定することが必須であり、これらの原因遺伝子を同定することで浮イネの洪水耐性メカニズムを単一の遺伝子機能によるものではなく、分子ネットワークとして捉えることが可能になると考える。また、イネはコムギ、トウモロコシとともに世界の三大穀物として広く栽培されており、世界の人口の約 40% のカロリー供給をこの 3 種類のイネ科作物が担っている (Doebley, 2006)。このうちイネのみが湛水条件下での栽培が可能であり、コムギ、トウモロコシは湛水条件下では生育が困難である。この一因として、イネは茎葉および根に aerenchyma と呼ばれる通気組織を形成し、さらに根において酸素漏出を抑えるバリアを構築することで酸素を地上部から根まで効率的に運ぶことが可能であると考えられている。さらに、近年バイオエタノールやバイオマスを利用した製造技術 (バイオリファイナリー) の分野において注目されているソルガムもイネ科作物に属しているが湛水での生育が困難である。イネ以外のイネ科作物の耐水性に関する研究は根の形態形成および分子生物学的解析により多くの知見が得られているが、茎葉における知見は乏しい。本申請課題において、浮イネの茎葉伸長の制御機能の解明みならず、浮イネの茎 (節間) における効率的な酸素供給メカニズムを形態学的、分子生物学的に解明し、イネ以外のイネ科畑作物と比較することで、茎の機能に注目したイネ科作物の耐湿性、洪水耐性育種において新たな分野を開拓できる可能性があると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### ・第 1 染色体に座乗する QTL 原因遺伝子のクローニング

これまでの先行研究において、第 1 染色体に座乗する浮イネ性 QTL のマッピングを進め、現在、候補遺伝子を 1 つにまで絞り込むことに成功している。この遺伝子は植物ホルモンの一つであるジベレリンの生合成酵素をコードしており、気体の植物ホルモンであるエチレンのシグナル伝達を介して発現が制御されることを見出している。本課題では酵素活性の測定、またエチレンが候補遺伝子であるジベレリン生合成酵素の発現をどのように制御しているかを、イネプロトプラストを用いたトランジェントアッセイによる転写制御解析、および スクリーンを用いたプロモーター結合実験によって詳細を明らかにする。

#### ・第 3 染色体に座乗する QTL 原因遺伝子のクローニング

申請者はこれまでの先行研究において、第 3 染色体に座乗する浮イネ性 QTL のマッピングを行

い、現在、候補遺伝子を1つ見出している。この候補遺伝子は新規のペプチドをコードしており、この候補遺伝子が発現することでイネが節間伸長を誘導することが可能になることが示唆されている。しかし、その分子メカニズムは未だ明らかにできていない。そこで、本申請課題では抗体染色法を用いたタンパク質の組織学的な局在の解明、TAP-tag および浮イネ RNA を用いた cDNA ライブラリーを作成し酵母 two-hybrid 法という2つの手法を用いて候補遺伝子の相互作用因子の探索を行うことで節間伸長におけるこの遺伝子の機能を明らかにする。

#### ・節間に存在する介在分裂組織における細胞分裂の制御機構の解明

これまで、浮イネに限らずイネの節間伸長において、各節間に存在する介在分裂組織で細胞分裂が起こり、それぞれの細胞が伸長することで節間伸長が誘導されると考えられている。しかし、一般的なイネでは幼穂形成から出穂期にかけて節間伸長を誘導するのに対して、浮イネがどのようにして栄養成長期において介在分裂組織での細胞分裂を可能にしているかについては細胞サイズによる議論に終始している。また、これまでにイネの節間における介在分裂組織を組織化学的に定義した事例はなく、イネの介在分裂組織の分化・発達を解明することは節間伸長を理解する上では非常に有意義であると考えられる。本申請課題では細胞分裂マーカー (EdU を用いた蛍光観察および細胞分裂関連因子の抗体を用いた免疫染色法) を用いて、まずどこが介在分裂組織であり、いつ細胞分裂が起こるのかを組織化学的に明らかにする。その後 (平成 29 年度以降)、介在分裂組織から RNA を抽出し、RNAseq を用いて発現解析を行うことで、介在分裂組織の分裂制御因子を明らかにする。

#### ・冠水時における浮イネ節間の機能の解明

これまで、浮イネの節間は洪水時に水中の組織へ酸素を供給するシュノーケルのような機能を果たしていると考えられてきたが、それを実証した報告はない。また、節間は節によって空間的に隔離されており冠水時に下位組織まで気体を輸送するためには何らかの機能を獲得していると考えられる。そこで本項目において、冠水時の節間内の酸素分圧を酸素電極を用いて real-time で測定することにより節間が実際に空気を通す通気組織として機能しているかについて実証する。また、浮イネ節間の解剖学的解析により節間を隔てている節の構造を明らかにし、レーザーマイクロダイセクション法により節特異的な RNA を抽出することで、浮イネの節における効率的な酸素供給メカニズムを明らかにする。

## 4. 研究成果

#### ・浮イネ第1および第3染色体に座乗する節間伸長を制御する QTL の責任遺伝子の同定

浮イネの洪水時における節間伸長性を制御する因子として、これまでに第1, 3, 12染色体に座乗する QTL が同定されている。これまでに第12染色体 QTL の原因遺伝子として *Snorkel1* および *Snorkel2* を同定しているが、他の2つの QTL 原因遺伝子については同定できていなかった。第1染色体に座乗する QTL 原因遺伝子の同定を目的としたマッピングを行った結果、ジベレリンの生合成遺伝子 *GA20ox2* が浮イネの節間伸長に関わることが示唆された。深水状態になると、浮イネにおいてこの遺伝子の発現が顕著に上昇した。また、深水時にイネ体内ではエチレンが蓄積すること、さらに浮イネにエチレンを処理すると節間伸長が誘導されることがこれまでに明らかとなっている。そのため、エチレンによる *GA20ox2* の発現誘導性を調べた結果、浮イネにエチレンを処理したときに *GA20ox2* の発現上昇が誘導されたが、一般的な栽培イネではこの現象は観察されなかった。さらに、エチレンシグナルにおいて鍵因子と考えられている転写因子 EIN3 が *GA20ox2* の発現上昇に関与するかをトランジェントアッセイによって調べた結果、浮イネの *GA20ox2* プロモーターのみに EIN3 が結合して *GA20ox2* の発現上昇を引き起こすことが示唆された。以上のことから、浮イネは深水時に体内に蓄積したエチレンをシグナル因子としてジベレリンの合成量を上昇させることにより節間伸長を誘導していることが考えられた。また、第3染色体に座乗する節間伸長性に関わる因子の同定を目指したマッピングにおいては、候補遺伝子を1つに絞り込むことに成功している。この遺伝子は機能未知のタンパク質をコードしていると考えられたが、過剰発現体を作出したところ幼苗期での節間伸長が誘導された。このことから、この遺伝子は節間伸長の開始に関わる新規の因子であると考えられた。

#### ・浮イネ節間の Snorkel としての機能および葉の撥水性による洪水耐性

浮イネは洪水時に水位の上昇に応じて節間を伸長させることで葉を水面上に出し、光合成の維持と酸素の獲得をしていると考えられている。しかし、部分冠水下の浮イネの酸素動態は既に報告されているが、大気から酸素などの気体を獲得できない完全冠水下における浮イネの酸素動態と節間伸長性については明らかにされていない。そこで、完全冠水時における浮イネ節間内の酸素動態を、針状光学酸素計を節間内に挿入することで調べた。その結果、通常生育条件下の浮イネ節間内の酸素分圧は常時、大気中の酸素分圧と平衡状態であったのに対して、完全冠水下では日中に高酸素状態、夜間に低酸素状態を示した。しかし、3日間の実験期間を通して無酸素状態になることはなかった。このことは完全冠水下においても酸素を獲得していることを示唆した。そこで、完全冠水下における節間内の酸素動態と葉の撥水性の関係を調べたところ、葉の撥水性を除去すると節間内の酸素量が昼夜を通して顕著に減少し、特に夜間は無酸素状態になった。また、通常の浮イネは完全冠水下で節間伸長するのに対して、葉の撥水性を

除去した浮イネでは節間伸長が有意に抑制された。これらのことから、葉の撥水性と節間内の酸素動態は密接に関連しており、完全冠水下において浮イネは葉を通した節間内の酸素量を維持することで節間伸長を可能にしていると考えられた。

また、イネの葉において撥水性が喪失した変異体の解析を行った結果、wax 合成に関与する新規因子を同定した。冠水した野生型の葉の表面には気体層が形成されるが、変異体では気体層が早期に消失した。さらに葉の撥水性と水中光合成能の関係を調べたところ、野生型では水中における光合成が維持されたのに対して、変異体では有意に低下した。これらのことから、葉の表層 wax による撥水性はイネの水中での気体交換を可能にすることで光合成を維持していることが示唆された。

#### ・節間伸長性に関するトランスクリプトーム解析

節間伸長性を制御する遺伝子群を明らかにするために遺伝子発現量を表現型と捉えて QTL 解析を行う expressionQTL 解析を行った。その結果、深水時に節間伸長を制御する遺伝子発現ネットワークの一部を明らかにした。また、深水時における遺伝子発現の継時的変化を明らかにするために浮イネと一般的なイネの比較トランスクリプトーム解析を行い、植物ホルモン関連遺伝子および細胞壁関連因子などにおける浮イネ特異的な発現変動を明らかにした。また、旺盛な節間伸長性を示すタケの幼若期におけるトランスクリプトーム解析と植物ホルモン定量を行うことで、タケの節間伸長時における植物ホルモンの分布と遺伝子発現の関係を明らかにした。

### 5 . 主な発表論文等

#### 〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Y. Mori, Y. Kurokawa, M. Koike, A. I. Malik, T. D. Colmer, M. Ashikari, O. Pedersen and K. Nagai. (2019) Diel O<sub>2</sub> dynamics in partially and completely submerged deepwater rice: Leaf gas films enhance internodal O<sub>2</sub> status, influence gene expression and accelerate stem elongation for ‘Snorkelling’ during submergence. *Plant and Cell Physiology*, 査読有: 60 p973-985.
2. T. Kuroha\*, K. Nagai\*, et al. (2018) Ethylene-gibberellin signaling underlies adaptation of rice to periodic flooding. *Science*, 査読有: 361 p181-186. \*contributed equally
3. Minami, K. Yano, R. Gamuyao, K. Nagai et al. (2018) Time-course transcriptomics of submerged deepwater rice reveals key responses to flooding. *Plant physiology*, 査読有: 176 p3081-3102.
4. T. Kuroha, K. Nagai et al. (2017) eQTLs Regulating Transcript Variations Associated with Rapid Internode Elongation in Deepwater Rice. *Frontiers in Plant Science*, 査読有: doi: 10.3389/fpls.2017.01753
5. R. Gamuyao, K. Nagai et al. (2017) Hormone distribution and transcriptome profiles in bamboo shoots provide insights on bamboo stem emergence and growth. *Plant cell physiology*, 査読有: 58 p702-716.

#### 〔学会発表〕(計 6 件)

1. 永井啓祐. イネ節の効率的な気体透過性による耐水性機構の解明. 第 34 回資源植物科学シンポジウム、第 10 回植物ストレス科学研究シンポジウム. 2018.
2. 永井啓祐. イネ科植物における節間通気組織の形態学的解析. イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ. 2017.
3. K. Nagai. Oxygen transport through rice node tissue. IGER symposium on Long0distance signaling in plant. 2017.
4. 永井啓祐. 植物が水辺で生きる. 日本育種学会 第 132 回講演会. 2017.
5. 永井啓祐, 黒羽剛, 芦苅基行. イネが水田で生きるためには～コンペイ糖状細胞の発見とガス交換の仕組み～. 2017 年遺伝学研究所研究会「イネ分子遺伝学の方向性」. 2017.
6. K. Nagai, Y. Mori, T. Colmer, O. Pedersen and M. Ashikari. Anatomic analysis of aerenchyma in grasses. 12th international society for plant anaerobiosis. 2016.

〔図書〕(計 1 件)

1. K. Nagai, K. Hirano, R. B. Angeles-Shim, and M. Ashikari. Springer, Singapore. Breeding Applications and Molecular Basis of Semi-dwarfism in Rice. Rice Genomics, Genetics and Breeding. (2018) 155-176.

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。