

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2018～2021  
 課題番号：18K05572  
 研究課題名(和文) 高塩環境下の葉へのNaとCl蓄積を支配するイネの遺伝子座の探索と原因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of the responsible genes that govern Na and Cl accumulation in leaves of rice under salinity stress

研究代表者  
 堀江 智明(Horie, Tomoaki)  
 信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：90591181  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：栽培イネと野生イネの戻し交雑自殖系統群(全159系統)を利用して、塩ストレスを被るイネの若い葉身へのNa蓄積を支配する遺伝子座を探索した。その結果、1番および5番染色体に、統計的に有意な量的形質遺伝子座(QTL)が一つ存在することを発見した。責任遺伝子単離には至らず、今後の課題である。一方、Cl蓄積に関しては、栽培イネと耐塩性イネの染色体断片置換系統群(全44系統)を利用して類似の分析を試みるも、諸問題に直面しとん挫した。最終的には、塩ストレス耐性と根のCl蓄積の重要性が示唆され、根に特化した分析により、イネの根のCl蓄積に重要と予想される遺伝子座領域を少なくとも一つ発見した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

NaやClの高蓄積を伴う土壌の塩類集積は、アジアやアフリカでの稲作と米収量に深刻な悪影響を及ぼし始めている。栽培イネは、穀類で最も塩ストレスに脆弱であり、耐塩性に優れた栽培品種を作出することが急務である。本研究では、塩ストレス環境下における主たる毒性要素であるNaやClの、イネ体内での分配や蓄積に大きな影響を及ぼすと予想される遺伝子座領域を発見することができた。今後、それらの責任遺伝子の構造や機能を同定することで有用知見を蓄積させ、耐塩性のイネ栽培品種の育種を加速させることができるかもしれない。本研究の成果は、その礎となり得るものである。

研究成果の概要(英文)：We searched for genetic loci that govern leaf Na accumulation in rice under salt stress using backcross recombinant inbred lines derived from cultivated rice and wild rice (composed of 159 lines). A quantitative trait locus for Na accumulation was deduced to exist in Chromosome 1 and 5, respectively. However, the responsible genes have not yet been isolated. On the other hand, chromosome segment substitution lines (CSSLs) derived from cultivated rice and salt tolerant rice (composed of 44 lines) were used to search for important loci controlling Cl accumulation in rice under salt stress. Several unexpected problems have hindered the progression of research for Cl. Trial and error has, however, led to the assumption that root Cl accumulation could be an important index to consider salt tolerance of rice. Based on the root-based anion analysis using CSSLs, at least one genetic locus that significantly influences on the level of root Cl accumulation was identified.

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

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

塩ストレス下で植物の生長を妨げる主要毒性元素は、Na と Cl である。植物の耐塩性機構に関する研究の歴史は長く、特に Na の毒性に焦点をあてた研究は古くから盛んに行われてきた。近年の分子生物学および分子遺伝学の発展により、耐塩性に資する Na の分配やそれに携わる重要な遺伝子機能が、いくつか解明されている。それにも関わらず、イネを含めた重要な作物の耐塩性機構の詳細は未だ謎が多く、Na 毒性の回避に重要な働きを担う未知の遺伝子の存在も示唆されていた。

一方、Cl の毒性とその回避機構に関しては、Na に比べて遅れており、研究開始当初からより未知の部分が多い事実があった。Na と異なり、微量必須元素としての働きも有する Cl の毒性を評価することは容易ではなく、どのような分配・蓄積特性を示すことが耐塩性にとってより都合がよいかという点も不明であった。また、必須耐塩性因子として、Cl 関連の遺伝子座や責任遺伝子が同定された例も存在しなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、イネの耐塩性に関連する未同定の Na<sup>+</sup>や Cl<sup>-</sup>の輸送・分配制御系の遺伝子の発見を目指し、以下に概述する2つの独立した計画を実施する:(1)高塩環境下の野生イネと栽培イネの交雑系統群(BRILs:全159系統)の全個体を元素分析する事で、両種間の葉のNa蓄積に顕著な違いをもたらす量的形質遺伝子座(QTL)の探索を完遂する。更には、目的とするQTLを保持するBRIL選抜系統の戻し交雑後代集団の連鎖解析やゲノム解析により、それらQTLの責任遺伝子の同定を試みる。(2)申請者らの予備的実験により、塩ストレス下の野生イネや耐塩性イネのCl蓄積様式は、栽培イネとは顕著に異なる事が明らかになった。本研究では、耐塩性イネと栽培イネの交雑系統群(CSSLs:全44系統)の全個体に塩ストレス処理した後、部位別に陰イオン分析してCl蓄積に差をもたらすイネの遺伝子座領域を発掘する。

### 3. 研究の方法

使用する交雑系統群の反復親である栽培イネと各系統を水耕栽培により準備して実験を行った。Na蓄積を制御する遺伝子座の探索に関しては、光合成の場となる若い葉身にターゲットを絞り、栽培イネ日本晴(*Oryza sativa*)と野生イネ(*O. rufipogon* W630)由来の戻し交雑組換え自殖系統群(BRILs)を使用した。木村氏B液で水耕栽培した各BRIL系統(全159系統)を、第6葉が完全展開する直前にNaClを加える形で塩ストレス処理を開始した。25 mMで3日間、50 mMで4日間処理した各個体から、完全展開している第6、7葉の葉身を、試料として採取した。その後、硝酸と熱による分解を行い、試料を誘導結合プラズマ(ICP)発光分光分析装置で分析した。この際、毒性元素であるNaに加えて、その蓄積が塩ストレス耐性に一般に正の影響をもたらすと考えられているK、Ca、Mgについても同時に分析した。試料の乾燥重量1gあたりの4元素の蓄積量を解析して、QTL解析を行った。検出されたQTLsの遺伝子マッピングと責任遺伝子同定に向けて、研究分担者である神戸大学農学研究科の石川亮博士により、Na蓄積に関するQTLを保持する系統と反復親である栽培イネとの戻し交雑系統を作製した。

Cl蓄積を制御する遺伝子座の探索に関しては、塩ストレス下のイネの地上部および根の蓄積様式を指標として有用な遺伝子座の探索を実施した。材料として、栽培イネコシヒカリ(*O. sativa*)と耐塩性イネノナボクラ(*O. sativa*)由来の染色体断片置換系統群(CSSLs)を使用した。木村氏B液で水耕栽培した各CSSL系統(全44系統)を、第4葉が完全展開した時点でNaClを加える形で塩ストレス処理を開始した。25 mM、50 mM、75 mM NaClを各3日間処理した個体から、地上部と根を試料として採取した。その後、マルチピースショッカーで各試料を破碎し、超純水で希釈した測定試料を、陰イオンクロマトグラフィーを用いて分析した。試料の湿重量1gあたりのCl含量を算出・グラフ化して、栽培イネと顕著な蓄積量の差を示すCSSL系統が保持する耐塩性イネ由来の遺伝子座の領域を絞り込んだ。

### 4. 研究成果

主として、2つに大別できる成果が得られた。以下にその概要を記す。

#### (1) BRIL系統を用いた塩ストレス下の若い葉身のNa、K、Ca、Mg蓄積に関して

塩ストレスを施したBRILs全159系統の葉身の4元素の蓄積量をグラフ化して比較した。濃度領域別に頻度分布図も作成しデータを精査した所、BRIL系統の各元素の蓄積は、反復親である日本晴と比べて大きく分離していた:Na, 0.24 ~ 3.78; K, 0.68 ~ 2.05; Ca, 0.48 ~ 2.63; Mg, 0.07 ~ 2.17。それらのデータをもとに、Simple Interval Mapping (SIM)法によりQTL解析を実施した。その結果、Na蓄積に関しては、1番および5番染色体に、それぞれ1つずつ統計的に有

意な QTL が存在することが示された。それらを仮に *Na-QTL1*, *Na-QTL5* と名付けた。*Na-QTL1* は、イネの若い葉身の Na 蓄積を有意に低下させ、逆に *Na-QTL5* は有意にその高蓄積を促す効果があるものと予想された。責任遺伝子同定を目指して、まず *Na-QTL1* を保持する BRIL4 独立系統と日本晴の戻し交雑を行い、後代集団を作製した。

また、K と Mg に関してはそれぞれ 2 つ、Ca に関しては 1 つの QTL が存在することが予想された。存在が予想された染色体番号をもとに、各 QTL を *K-QTL3*, *K-QTL7*; *Ca-QTL4*, *Ca-QTL7*; *Mg-QTL7* と名付けた。K に関しては、双方の QTL 共に、塩ストレス時の葉身の蓄積を有意に減少させる働きがあり、Ca と Mg に関しては、葉身での蓄積を有意に増加させる効果があるものと予想された。

全ての QTLs の責任遺伝子の単離に向けて、戻し交雑と各 QTL 保持株の詳細な特性解析が、本研究期間終了後も進行している。

## (2) CSSL 系統を用いた塩ストレス下の根の Cl 蓄積に関して

栽培イネコシヒカリと耐塩性イネノナボクラの CSSLs を利用して、塩ストレス下の Cl の吸収や分配に深く関与する遺伝子座の絞り込みを実施するプロジェクトに関しては、想定外の難問に直面したため、思うような進捗は得られず大幅に遅れを生じた。Cl 蓄積様式と耐塩性との相関に関して、詳細な調査を進めた所、耐塩性イネには、塩ストレス下でより多くの Cl を根に蓄積させ、地上部への移行を妨げる傾向があることが示唆された。そこで、本研究では、根での Cl 蓄積量を、目的とする遺伝子座探索のための指標とすることにした。全 44 系統の CSSL に塩処理を施し、根を試料とした陰イオンクロマトグラフィー解析を完遂した。その結果、反復親であるコシヒカリよりも、有意に根の Cl 含量が上昇する CSSL 系統を 2 系統発見した。その内、少なくとも 2 番染色体の一部が置換された系統では、反復実験において、繰り返し有意な Cl の高蓄積が根で確認された。

責任遺伝子の単離に向けて、この CSSL 系統とコシヒカリの戻し交雑を実施するために、土耕栽培を実施中である。また、当該系統のより詳細な塩ストレス有無の条件下における Cl 蓄積特性や、塩ストレスに対する生理応答を精査している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ichirou Karahara and Tomoaki Horie	4. 巻 71
2. 論文標題 Functions and structure of roots and their contributions to salinity tolerance in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 89, 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.20123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rubio F, Nieves-Cordones M, Horie T, Shabala S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Doing 'business as usual' comes with a cost: evaluating energy cost of maintaining plant intracellular K <sup>+</sup> homeostasis under saline conditions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.15852	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤くるみ、高師知紀、伊藤隆、堀江智明
2. 発表標題 野生イネ (O. rufipogon) -栽培イネ (O. sativa) CSSLsを利用した塩ストレス下のイネのCl <sup>-</sup> -恒常性機構を制御する遺伝子座の探索
3. 学会等名 日本育種学会 第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤くるみ、伊藤隆、石川亮、石井尊生、堀江智明
2. 発表標題 塩ストレス下のイネのCl <sup>-</sup> -輸送・分配システムの解明を目指したCl <sup>-</sup> -蓄積量の評価
3. 学会等名 日本育種学会 第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸田 楓香, 石川 亮, Amarasinghe Yaddhige Priya Jayantha, 石井 尊生, 堀江 智明
2. 発表標題 塩ストレス下のイネの葉身のNa+濃度を制御するQTLの探索
3. 学会等名 日本育種学会 第140回講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>信州大学学術情報オンラインシステムSOAR  <a href="http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.OFTmWUDU.html">http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.OFTmWUDU.html</a>  信州大学学術情報オンラインシステムSOAR  <a href="http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.OFTmWUDU.html">http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.OFTmWUDU.html</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石川 亮  (Ishikawa Ryo)  (70467687)	神戸大学・農学研究科・准教授    (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------