

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14451

研究課題名(和文) イネの水と窒素の需要を反映する根の遺伝子群のフィールドでの発現動態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of Field Expression Dynamics of Root Genes Reflecting Water and Nitrogen Demand in Rice

研究代表者

松波 麻耶 (Matsunami, Maya)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：40740270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：作物が実際に生育するフィールド環境下で、イネの田植えから登熟までの幅広い生育期間において、養水分の吸収に関与する遺伝子がどのような発現動態を示すかについて調査を行った。網羅的な遺伝子発現解析により、根で発現する遺伝子の生育ステージによる発現レベルの変化や温度、蒸散要求量などの気象条件に対する応答性を解析した結果、全体のおよそ30%の遺伝子が栄養生長期と生殖生長期で大きく発現レベルが変化すること、気象条件に対する応答性も生育ステージで転換する遺伝子が多数存在することなどを明らかにした。養水分吸収に関与する遺伝子の発現パターンからフィールドでのイネの生育に重要な遺伝子を抽出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年分子生物学の目覚ましい発展により、我が国の主要作物であるイネにおいても多くの遺伝子が単離され、その機能解析が行われている。一方、これらの研究の多くは、実験室内で幼植物を使用したものであり、作物が実際に生育するフィールド環境下で、幅広い生育ステージの遺伝子の働きを調査した研究は少ない。本研究により、フィールド環境下でのイネの遺伝子が生育ステージや栽培環境に応じてどのように発現制御されているのかを精査し、フィールドでの作物の生長に密接に関与する遺伝子を特定することで、これらの遺伝子をターゲットとしたさらなる養水分吸収効率の向上等を目指した品種育成や栽培技術の開発に資することができる。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the expression dynamics of rice genes involved in the absorption of water and nutrients during the wide growth period from transplanting to ripening under the field environment where crops actually grow. As a result of comprehensive gene expression analysis, it is found that about 30% of the genes in roots showed a large change in expression level during vegetative and reproductive growth stages, and that there were many genes which responsiveness to weather conditions also changed during growth stages. From the expression pattern of genes involved in nutrient water absorption, genes important for rice growth in the field were identified.

研究分野：作物学

キーワード：イネ 根 フィールド アクアポリン 窒素輸送担体

1. 研究開始当初の背景

2000年にイネ全ゲノムの解読が完了すると、イネは主要な農作物としてだけでなく、モデル植物としても重要な研究対象となり、遺伝子の単離やその機能解明に関わる分子生物学的研究が爆発的に進展した。一方で、これらの研究の多くは、人工的に制御された環境で、しかも幼植物を用いたものが主体であり、作物が実際に生育するフィールドで、イネのライフサイクルを通じた遺伝子発現の実態を追究する研究は極めて限られている。ゲノム研究において得られた基礎的な知見を応用し、作物の生産性やストレス耐性の向上に結び付けていくためには、まずフィールド環境下で遺伝子がどのような挙動を示すのかを明らかにした上で、生育や収量形成過程に関与する重要遺伝子を特定し、その栽培学的・育種学的な制御法を明らかにする必要がある。

収量形成過程に関わる多数の生理機能のなかで、研究代表者は養水分吸収の初動となる根の機能に着目し、フィールドにおけるイネの遺伝子発現動態を明らかにするための研究を行ってきた。これまでの成果では、フィールド栽培した幅広い生育ステージの根サンプルからの効果的は RNA 抽方法を確立することに成功した (Matsunami et al., 2018)。その技術を活用し、作物の生育を強く制御する物質である水および窒素に着目し、フィールド環境下でのアクアポリン(水チャネル)および窒素吸収・代謝関連遺伝子の発現動態を調査した。その結果、例えばアクアポリン分子種のひとつであり、ケイ酸の輸送活性も報告されている *OsNIP2;1* の発現が幼穂形成期以降に著しく増加することを確認した (Matsunami et al., 2018)。幼穂形成期以降は地上部でのケイ酸需要が増加する時期と一致することから、根が地上部のケイ酸要求に応答しているものと考えられた。また、*OsPIP2;5* は根の内皮や導管周辺に局在するアクアポリンであるが、野外環境では大気からのポテンシャル蒸発量(葉からの蒸散のし易さに影響)と連動するように発現が制御されることを確認した。つまり、地上部の蒸散要求が何らの信号により根に伝わり、*PIP2;5* が根の水透過性を制御する機構が示唆された。これらの結果から、根の遺伝子発現解析は、複雑な野外環境下でのイネの養水分需要を反映する有効なツールとなる可能性が示された。しかし、外部環境や地上部需要との関係を詳細に明らかにするためには、さらなるフィールドでの遺伝子発現解析や、異なる環境条件に対する遺伝子発現の応答性の実験的証明が必要である。

2. 研究の目的

フィールドで生育する作物の養水分吸収において、主要な働きをする遺伝子群を特定し、その遺伝子の挙動をバイオマーカーとして、作物生長解析やストレス感受などの生育診断ツール、さらに植物体需要ベースの土壌肥沃度診断・肥培管理基準として活用することを最終目的とする。その最終目的に向け、本研究ではまず、根における水と窒素の輸送関連遺伝子群について、外部環境やイネのエイジに依存した遺伝子発現動態を明らかにし、根の遺伝子発現が外部環境や地上部の養水分需要によりどのように反映されるかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では水稻の水と窒素の輸送関連遺伝子に着目し、以下に示す通りフィールド環境における幅広いステージでの遺伝子発現動態解析を実施した。

(1) 野外群落環境における水稻根および地上部のトランスクリプトーム解析と環境応答

田植えから成熟期までの幅広い期間において、根および最上位完全展開葉を経時的にサンプリングし、RNAseq 解析を行った。さらに気象条件(ポテンシャル蒸散量 E_p 、気温、地温)と発現遺伝子の相関解析を行った。また、水と窒素の吸収に関連する遺伝子を中心に、それらの発現変動の環境応答および生育ステージによる変動を調査した。

(2) 窒素施肥量の多寡に対する根の遺伝子発現応答

多窒素、標準窒素、無窒素により水田でイネを生育させ、根の遺伝子発現解析、地上部の窒素蓄積量の推移を調査した。また、Split-root 実験により、局所的な土壌窒素濃度の違いに対する根の遺伝子発現応答の調査を行った。

4. 研究成果

野外群落環境におけるイネ遺伝子発現の環境応答

葉における約 14,000 遺伝子、根における約 16,000 遺伝子を対象に移植～幼穂形成期までの栄養生長期と、幼穂形成期～成熟期までの生殖生長期に分け、それぞれの平均遺伝子発現レベルを比較した(栄養生長期の平均 rpm/生殖生長期の平均 rpm)。その結果、葉では比が > 2 (栄養生長期のほうが発現が 2 倍を超えて高い)が 2941 (20.8%)、比が 0.5 (生殖生長期のほうが 2 倍以上発現が高い)の遺伝子は 687 (全体の 4.9%) 存在した。根では、栄養生長期のほうが発現レベルが高いものが 3302 (20.3%)、生殖生長期で高いものが 1681 (10.3%) 存在した。両器官とも、比が 0.5～2 の間、すなわち変動が 2 倍以内の遺伝子数が最も多く、葉では 10529 (74.4%)、根では 11271 (69.3%) であった。この結果は、イネの長いライフサイクルにおいて、栄養生長期と生殖生長期で大きく発現レベルを転換させる遺伝子が葉、根ともに 30% 程度も存在することを示している。次に外部環境条件との関係を調査した結果、葉、根ともに気温または地温との相関関係が、栄養生長期には正の相関を持つ遺伝子が多かったのに対し、生殖生長期には逆に負または無相関になる遺伝子が増加する興味深い傾向が認められた。栄養生長期には強い正の又負の相関係数を示した遺伝子が、生殖生長期には強い負の相関係数を示すような極端な遺伝子もあった。これらの遺伝子群の分類や関連性については、現在詳細に解析を進めているところである。

水および窒素吸収・輸送関連遺伝子のフィールドにおける発現動態

窒素施肥量が単一条件で栽培した場合の、窒素輸送・代謝関連遺伝子(アンモニウムトランスポーター、硝酸トランスポーター、GS/GOGAT 等)およびアクアポリン遺伝子の発現レベルを調査した。

アンモニウムトランスポーター

根においては *AMT1;1*, *AMT1;2*, *AMT1;3*, *AMT2;1*, *AMT3;2*, *AMT3;3* の発現が確認された。こ

のうち、*AMT1s* の発現レベルは他のものよりも高かった。*AMT1s* の3分子種でも明確な発現パターンが認められた。すなわち、*AMT1;1* は分けつ期から幼穂形成期に発現が増加し、幼形期頃をピークに減少に転じたのに対し *AMT1;2* は明確なパターンはないものの、日々の変動が大きかった。*AMT1;3* は栄養生長期の発現レベルは低いものの出穂期にかけて急激に増加した。このように生育ステージによる発現の違いが認められた遺伝子は、他に *AMT3;2*、*AMT3;3* が挙げられる。植物体の窒素吸収量は植物体のバイオマスの増加が著しい幼形期から出穂期にかけて増加するが、このパターンと合致するのは *AMT1;3* と *AMT2;1* であった(図1)。これらが植物体の窒素需要によるものか、土壌窒素の多寡によるものかについてはさらなる検証が必要である。

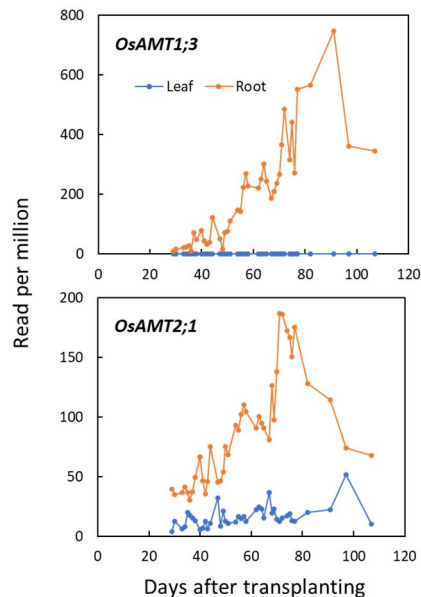


図 1. フィールドにおける *OsAMT1;3* と *OsAMT2;1* の葉および根の発現レベルの推移。

葉におけるアンモニウムトランスポーターの発現レベルは根に比べて少なく、分子種も *AMT1;1*、*AMT2;1*、*AMT3;2*、*AMT3;3* と少なかった。また生育ステージで差異が認められたのは *AMT1;1*、*AMT3;2*、*AMT3;3* であり、いずれも栄養生長期より生殖生長期で発現レベルが上昇していた。

生育ステージの違いによる発現レベルの差が葉よりも根で顕著な理由の一つとして、根は根系全体を採取していたため老化の過程も反映されている可能性があるのに対し、葉は最上位展開葉を採取したため、常に新しい葉を採取していたことも関与しているかもしれない。

硝酸トランスポーター

硝酸輸送に関与する遺伝子として、根では *OsNRT1;1*、*OsNRT1;2*、*OsNRT1;3*、*OsNRT2;1*、*OsNRT2;2*、*OsNRT2;3* の発現が認められた。この中で *OsNRT1;1* と *OsNRT2;3* の発現が多かった。また、アンモニウムトランスポーターに比べると、明確な生育ステージ変動を示す遺伝子は少なく、*NRT1;1* が分けつ期で発現が高く、幼形期以降に急激に低下することを示したのみであった。*NRT2;1* も根で高い発現を示した。これらの硝酸輸送関連の遺伝子は、間断灌漑など好気的な土壌条件で栽培した場合、数倍～数十倍の発現上昇を示した(松波データ未発表)。そのため、土壌中の硝酸態窒素濃度に応答的であると考えられるが、本実験では湛水条件でも検出できたことから、*NRT1;1* や *NRT2;3* のような発現レベルが高い遺伝子は恒常的に発現しているか、もしくは根の近傍での酸素の漏出により硝化された窒素を吸収するために働いていると考えられた。葉では主に *NRT1;3*、*NRT2;4*、*NAR2;2* の発現が確認できた。

アクアポリン

アクアポリンは植物体内の水輸送において重要な役割を果たす膜タンパク質である。アクアポリ

ン全33分子種を対象に発現レベルを調査した結果、それぞれの発現部位で極めて特徴的な発現応答を示すことが明らかになった。大まかに栄養生長期で高い発現を示すタイプ(前半型)、出穂期にかけて徐々に増加していくタイプ(後半型)に区分すると、根では「前半型」:*PIP1;1*, *PIP2;1*, *PIP2;3*, *PIP2;4*, *PIP2;5*, *PIP2;6*, *TIP1;1*, *TIP2;1*, *TIP2;2*, *NIP2;2*, *NIP3;1*, 「後半型」:*TIP4;2*, *NIP1;2*, *NIP1;3*, *NIP2;1*と分類された。葉では*SIP1;1*のみ後半型の傾向を示したが、他の遺伝子は明確な生育ステージでの違いが認められなかった。先述のように、根は全体を採取したのに対し、葉は常に最上位の若い葉身を採取したことがこのような器官の違いによる応答性の違いに關与している可能性もある。いづれにしても根では田植えから登熟までの期間、非常にダイナミックに発現レベルが変動していることが明らかとなった。この変動の生理学的意義については、さらなる実験が必要であるが、後半に発現レベルが増加していくタイプの遺伝子、特に*NIP2;1*はメタロイドポリンとしてホウ素、ケイ素、ゲルマニウム、ヒ素などの輸送活性も報告されている。イネではケイ酸の吸収が出穂期にかけて増加することから、後半型の遺伝子については水の輸送だけではなく、他の元素の吸収に關与している可能性もある。

窒素施肥の多寡に対する遺伝子の発現応答

施肥窒素レベルを3段階(無窒素、標準、多窒素)に設定した圃場から採取した水稻根合計114サンプルについてRNA-seq解析を実施した。その結果、窒素施肥レベルは水や窒素の輸送関連遺伝子の発現に大きな影響を及ぼさない結果が得られた。この要因については、水耕栽培で行われるような窒素飢餓処理とは異なり、圃場では無施肥であっても土壌や灌漑水からの窒素供給があること、また地上部も窒素供給量に応じて個体サイズを変化させることから、長期間の処理で根の供給量と地上部の需要がバランスを取り合うことで遺伝子発現レベルに大きな差が生じないことが考えられた。

Split-root法により、根系全体が多窒素、半分が多窒素で半分が低窒素、全体が低窒素条件の場合のアクアポリンと窒素輸送体の遺伝子発現レベルを比較した。その結果、湛水条件では*AMT1;1*, *AMT1;2*, *NRT1;1*, *NRT1;3*, *NRT1;5*においてスプリットした根の多窒素側が、低窒素側よりも発現レベルが高まっている傾向が確認された。興味深いことに、畑条件での比較ではこの傾向は逆となり、スプリットした根の低窒素側で発現レベルが上昇した。類似した傾向が多くのアクアポリン分子種でも確認できた。これらのことから、ヘテロな土壌環境において、根は局在的に水や窒素の輸送能力を変化させることで効率的な吸収を行っているが、湛水と畑ではその局在性に大きな違いがあることが考えられた。すなわち、湛水条件ではより窒素濃度の高い部分で吸収を促進させ、畑条件では窒素濃度の低い方で吸収を高めようとしていることが示唆された。畑条件でなぜ低窒素側の水や窒素の輸送関連遺伝子を増加させるのかについて、畑条件では無機窒素が主に硝酸態として存在し、湛水条件ではアンモニア態として存在することも關与しているのではないかと考えた。つまり、畑条件では吸水によりマスフローが生じると、根圏に硝酸態窒素が移動することを利用し、低窒素側の水輸送や窒素吸収を高めることで、窒素の獲得を行っているのではないかと考えられた。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maya Matsunami, Hidehiro Hayashi, Yoko Tominaga, Yoshiaki Nagamura, Mari Murai-Hatano, Junko Ishikawa-Sakurai, Tsuneo Kuwagata	4. 巻 433
2. 論文標題 Effective methods for practical application of gene expression analysis in field-grown rice roots	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Soil	6. 最初と最後の頁 173、187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11104-018-3834-z	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 Okamura Shin, Mumtahina Nabila, Shimono Hiroyuki, Matsunami Maya	4. 巻 24
2. 論文標題 Root sampling and RNA extraction methods for field-based gene expression analysis of soybeans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Production Science	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1343943x.2020.1834867	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡村森, 松波麻耶, 狩野真吾, 吉岡望, Mumtahina Nabila
2. 発表標題 圃場およびポット栽培したダイズ根の採取法およびRNA抽出方法の検討
3. 学会等名 第50回根研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松波麻耶・羽田野麻理・冨永陽子・林秀洋・長村吉晃・檜館茉奈・及川聡子・舛谷悠祐
2. 発表標題 遺伝子発現解析に用いるイネ根サンプルの水田での採取法と内部標準遺伝子の探索
3. 学会等名 第49回根研究学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------