

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19880038
 研究課題名（和文） 塩害水田において高い収量を維持するイネ突然変異系統の耐性機構と原因遺伝子の解明
 研究課題名（英文） Analysis of tolerance mechanism and gene controlled salt tolerance in rice mutant induced by heavy ion beam.
 研究代表者
 竹久 妃奈子（Takehisa Hinako）
 独立行政法人 理化学研究所 生物照射チーム リサーチアソシエイト
 研究者番号：20455356

研究成果の概要：

申請者は、世界で初めて塩害水田において選抜された耐塩性系統 6-99L の耐性に浸透圧ストレス耐性機構が関与していること、その原因遺伝子が 1 遺伝子であり、第 6 染色体に座上している可能性を示した。さらに申請者は、その遺伝子が、塩害水田におけるイネの草丈や千粒重、整粒歩合を高く維持する能力を有することを示唆した。本研究の結果、この 1 原因遺伝子を調節することによって、野外の塩害水田におけるイネ育種が可能となる可能性を示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,360,000	0	1,360,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,710,000	405,000	3,115,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：塩害・突然変異体・イネ・マッピング・穀粒品質・ストレス耐性

1. 研究開始当初の背景

昨今、乾燥地域での灌漑水の多用や沿岸地域での干拓地の拡張などにより、作物の収量低下を招く過剰なNa⁺で汚染された塩害耕作地が拡大している。将来の人口増加に伴う食糧不足を解消するため、塩害耕作地での作物収量の確保は重要な課題となっている。これまで、塩害耕作地においても収量を高く維持する作物の作出を目指し、過剰なNaClの付与（塩ストレス）に対する植物の応答や耐性機構、それらに関与する遺伝子群の解析が精力的に進められてきた（Bohnert et al. 2001）。これらの研究では、塩ストレスに対し感受性

および耐性を示すシロイヌナズナやイネの変異体と形質転換体を用いた、環境調節室内における発芽期や幼植物時期の生育の耐塩性に関わる遺伝生理機構の解明が中心課題となっている。その結果、植物の塩ストレス応答機構およびそれに関わる遺伝子群が解明され、その耐塩性には植物体内外へのNa⁺とK⁺イオンの吸排出や浸透圧調節機構、活性酸素消去機構に関わる遺伝子群が関与していることが示唆されている。しかし未だ、塩害耕作地において高い収量を維持できる突然変異体または形質転換体が作出されたという報告はない。一方、塩ストレス耐性機

構は植物の生育段階により異なること (Heenan et al. 1988) 塩害耕作地で生育する植物には、塩ストレスによるイオン吸収や浸透圧調節の阻害などの直接的なストレスだけでなく、過剰な塩による土質の変化や栄養障害に起因するストレスも影響を及ぼす (Yamane 1960, Gregorio et al. 2002) ことが示唆されている。以上の知見から申請者は、塩害耕作地においても収量を高く維持する作物の作出およびその生理機構を解明するためには、圃場における作物の栄養成長から種子形成期にかけて有効な、すなわち収量を高く維持する塩害耐性機構を明らかにすることが必須であると考えた。

申請者は上述した視点にたち、穀類の中で最もゲノムサイズが小さく、ゲノムデータベースが充実しているイネを材料とし、塩害水田において収量を高く維持する突然変異体の作出に着手した。日本型イネ品種日本晴 (WT) の種子に、理化学研究所において変異原として炭素イオンを照射し、M₂集団を作成した。その後、M₂集団を東北大学大学院生命科学研究科の湛水生態系野外実験施設内にある、20年間に渡り塩水を付与し続けている塩害水田 (Na⁺濃度 50~100mM) で栽培し、塩害耐性個体の選抜を試みた。その結果、WTに比較して葉身の枯れが少なく、生育阻害の小さい個体を選抜した。その選抜個体の自殖後代M₃系統から、耐性系統 6-99L を作出した。作出した 6-99L の塩害耐性の評価には、収量構成要素として一穂重と千粒重を、穀粒品質として整粒歩合を用いた。その結果、対照水田 (Na⁺濃度 10mM以下) で生育させた場合に比較して、塩害水田で生育させた 6-99L の一穂重の低下の割合は、WTに比較して 19%、千粒重は 12%改善された (表)。

表. 対照水田と塩害水田における日本晴(WT)と6-99Lの一穂重と千粒重

		一穂重	千粒重
日本晴 (WT)	対照水田	2.3 ± 0.1	22.0 ± 0.2
	塩害水田	1.2 ± 0.1 (52%)	16.0 ± 0.5 (73%)
6-99L	対照水田	2.4 ± 0.1	22.0 ± 0.2
	塩害水田	1.7 ± 0.1 (71%)	18.7 ± 0.3 (85%)

括弧内は、対照水田における値に対する塩害水田での相対値

さらに、6-99L の整粒歩合は対照水田と塩害水田においてどちらも 85%と変わらず、日本晴の対照水田 69%および塩害水田 41%に比較して高い値を維持していた (図)。以上の結果から申請者らが作出した 6-99L は「野外の塩害水田において葉身の枯れを抑え、高い収量と穀粒品質を維持できる耐性系統」であることが明らかとなった。

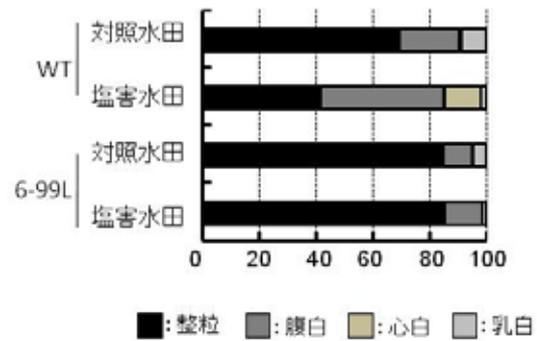


図. 対照水田と塩害水田における WT(日本晴)と耐性系統 6-99L の整粒歩合

2. 研究の目的

そこで申請者は、6-99L が獲得した耐性をイネ育種に用いるだけでなく、他の有用作物にも応用していくことを目指し、6-99L の塩害耐性機構と原因遺伝子を明らかにすることを目的とした。

(1) 6-99L の耐性機構の解明

6-99L の耐性機構が、これまで植物の耐塩性機構として示されてきた「体内外へのイオンの吸収や排出調節機構」、「浸透圧調節機構」、「活性酸素消去機構」に關与しているかを、水耕栽培試験と遺伝子発現解析により推定した。

(2) 6-99L の原因遺伝子の解明

6-99L の原因遺伝子は、マッピングによりそのゲノム候補領域を検出した。

3. 研究の方法

申請者は、6-99L の塩害耐性機構と原因遺伝子を明らかにするため、平成 19 年度は

(1)6-99L の塩害耐性機構の推定、(2)原因遺伝子の優劣性解析とマッピングに用いる解析集団の作出を行った。平成 20 年度は、解析集団を用いた(3)原因遺伝子の優劣性の解明およびマッピング、(4)原因遺伝子を含む関連遺伝子群の網羅的発現解析による原因遺伝子の機能推定を実施した。

(1)6-99L の塩害耐性機構の推定

まず 6-99L が、過剰な NaCl を付与した水耕液 (塩ストレス条件下) において耐性を示すか否かを明らかにした。次に、「Na⁺と K⁺イオン吸収および排出調節機構」に關与しているかを推定するため、塩ストレス条件下で生育させた 6-99L 体内の Na⁺と K⁺濃度を WT と比較した。また、「浸透圧調節機構」に關与しているかを推定するため、高分子ポリエチレングリコール (PEG) を水耕液に付与することによる浸透圧ストレスに対し、6-99L が耐性を示すか否かを明らかにした。また、「活性酸素消化機構」に關与しているか否かは、過酸化水素水を付与した水耕液において 6-99L の耐性を評価し、推定した。以上の栽培実験における耐性評価には、草丈、根長、乾燥重

の増加率を指標として用いた。

(2)原因遺伝子の優劣性解析とマッピング用の解析集団の作出

原因遺伝子の優劣性を解析するため「6-99LとWTの交雑F₂集団」を、公開データベースを利用した迅速な原因遺伝子のマッピングを目指すため、「6-99Lとカサラスの交雑F₂集団」を作出した。

(3)原因遺伝子の優劣性の解明およびマッピング

優劣性の解明

作出した6-99LとWTの33F₂個体を塩害水田に展開し、その集団に認められる耐性の指標形質の分離比により、原因遺伝子の個数と優劣性を推定した。塩害水田における耐性の指標形質としては、「千粒重」および「整粒歩合」を計測した。

原因遺伝子のマッピング

原因遺伝子のマッピングのため、6-99Lとカサラスの交雑F₂集団を塩害水田において生育させ、枯れ程度の顕著な個体のみを選抜し、耐性の評価と遺伝子型の決定を行った。それら両結果を用いて連鎖解析を行い、原因遺伝子の候補領域をマッピングした。

(4)原因遺伝子を含む関連遺伝子の発現解析
過剰なNaClを付与した水耕液(塩ストレス条件下)において6-99Lを12日間育成し、その植物体から抽出したRNAを用いてRT-PCRを用い、WTとは異なる6-99L特異的な発現様式を示す遺伝子を検出する。浸透圧ストレス、Na⁺ストレス、酸化ストレスに応答するP5CS、ProDH、ProDH2、APX、OsDREB2、OsHKT1、OsNHX1、OsSOS1、SKC1の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1)6-99Lの塩害耐性機構の推定

NaClを付与した場合としない場合の水耕液で6-99Lを生育させた結果、NaCl処理による6-99Lの草丈および乾物重の低下率は、いずれもWTに比較して低い値を示した。このことから、6-99LはWTに比較して過剰なNaClに対して耐性を示すことが示唆された。また、各植物体の地上部におけるK⁺およびNa⁺量を計測した結果、6-99LとWTのK⁺およびNa⁺含有量と、K⁺/Na⁺に有意な差は認められなかった。また、過酸化水素水を付与した水耕液における生育にも、違いは認められなかった。次に、Polyethylene glycol (PEG)を水耕液に添加することにより浸透圧ストレスを付与した結果、PEG処理による6-99Lの草丈の低下率はWTに比較して低い値を示した。以上の栽培実験の結果から、塩害水田における6-99Lの耐性は、浸透圧ストレス耐性に関与することが示唆された。

(2)原因遺伝子の優劣性解析とマッピング用解析集団の作出

日本晴(WT)と6-99LのF₂集団33個体と、

カサラスと6-99LのF₂集団約500個体を作成した。

(3)原因遺伝子の優劣性の解明およびマッピング

優劣性の解明

野外の塩害水田において、(2)で作成したWTと6-99Lの33F₂個体を育成させ、優劣性解析を行なった。その結果、感受性個体が25個体、耐性個体が8個体に分離した。さらにF₂集団の草丈、分けつ数、1000粒重、一穂重、整粒歩合を計測した結果、草丈、1000粒重、一穂粒数と整粒歩合の高さには正の相関が確認され、分けつ数には負の相関が確認された。以上の結果から、6-99Lの耐性を担う原因遺伝子は劣性1遺伝子である可能性が示唆された($\chi^2=0.05$, $P=0.94$)。さらに、6-99Lに認められた、WTに比較して「草丈が高い」、「1000粒重が重い」、「一穂重が重い」、「整粒歩合が高い」という形質と、「分けつ数が少ない」という形質が連鎖しており、同一遺伝子によって担われている可能性が示された。

原因遺伝子のマッピング

カサラス(インディカ品種)と6-99Lの交配後代を塩害水田で生育させ、「枯れ程度」を指標にマッピングを行なった。その結果、6-99Lの耐性遺伝子は第6染色体に座することが示唆された。

(4)原因遺伝子を含む関連遺伝子の発現解析
6-99Lの耐性に関わる遺伝子を推定するため、NaClを付与した水耕液で育成したWTと6-99Lの地上部における、P5CS、ProDH、ProDH2、APX、OsDREB2、OsHKT1、OsNHX1、OsSOS1の発現を解析した。その結果、NaCl処理に対してOsDREB2、OsNHX1、OsSOS1、P5CSの発現は上昇し、OsHKT1の発現は減少した。また、ProDHとAPXの発現量には顕著な変化は観察されなかった。しかしながら、6-99LとWTの遺伝子発現量の変動に大きな違いは確認されなかった。

本申請課題では、世界で初めて作出された、塩害水田で高い収量と穀粒品質を維持することができる突然変異系統を用いた。申請者は、本研究課題を遂行することにより、塩害水田におけるイネの耐塩性は、浸透圧ストレス耐性機構に関与し(昨年度の実験結果より)、第6染色体に存在することを初めて示した。また、6-99Lの耐性形質である「塩害水田における高穂重、高千粒重と高い穀粒品質」は1遺伝子を調節することによって付与することが可能であることが示された。本研究期間中に原因遺伝子の単離にまでは至らなかったが、第6染色体上の原因遺伝子と連鎖するDNAマーカーを作成すれば、多様なイネ品種に塩害耐性を付与することが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

- 1) 竹久 妃奈子、林 依子、阿部 知子、佐藤 雅志 重イオンビーム育種技術による耐塩性イネ育成 放射線と産業 121: 22-26 (2009) 査読なし
- 2) H. Takehisa, T. Sato, Genetic diversity of rice leaf bronzing in paddy fields. *Japanese Journal of Plant Sci.* 2, 63-68 (2007) 査読あり
- 3) Y. Hayashi, H. Takehisa, Y. Kazama, C. Kanba, S. Ohbu, H. Ryuto, N. Fukunishi, H. Tokairin, K. Ohkoshi, Y. Yoshini, T. Sato, T. Abe, Characterization of salt-tolerant mutants of rice induced by heavy-ion irradiation. RIKEN Accel. Prog. Rep 41, 234 (2008) 査読あり
- 4) Y. Hayashi, H. Takehisa, Y. Kazama, H. Ichida, H. Ryuto, N. Fukunishi, T. Abe, Effects of ion beam irradiation on mutation induction in rice. *Cyclotrons and their applications 2007*, 237-239, (2008) 査読あり
- 5) Y. Hayashi, H. Takehisa, Y. Kazama, C. Kanba, H. Saito, S. Ohbu, A. Tabayashi¹³, H. Ryuto¹¹, N. Fukunishi⁹, H. Tokairin¹⁴, T. Sato¹⁵ and T. Abe⁹, Isolation of salt-tolerant mutants of rice induced by heavy-ion irradiation. RIKEN Accel. Prog. Rep 40, (2007) 査読あり

〔学会発表〕(計9件)

- 1) 林 依子、竹久 妃奈子、風間 祐介、大部 澄江、東海林 英夫、林 祐子、佐藤 雅志、阿部 知子 炭素イオンビーム照射によるイネの突然変異誘発に対するLETの影響 第114回日本育種学会講演会、滋賀(2008年10月)
- 2) 阿部 知子、風間 裕介、林 依子、市田 裕之、竹久 妃奈子、イオンビーム育種の最近の成果と今後の展開、日本育種学会第112回講演会・49回シンポジウム、鶴岡、(2007年9月)
- 3) 神波 千秋、竹久 妃奈子、林 依子、市田 裕之、小沼 亮子、龍頭 啓充、福西 暢尚、宮沢 豊、東海林 英夫、保倉 明子、福田 直樹、中井 泉、阿部 知子、佐藤 雅志 イネ塩害耐性突然変異体 6-99Lの塩耐性に関わる生理要因の解明 第224回日本作物学会 金沢、(2007年9月)
- 4) 竹久 妃奈子、林 依子、風間 裕介、神波 千秋、市田 裕之、龍頭 啓充、福西 暢尚、宮沢 豊、東海林 英夫、佐藤 雅志、阿部 知子 重イオンビーム照射により誘導されたイネ突然変異体の特性解析 第4回イオンビーム育種研究会大会、水戸、(2007年7月)
- 5) 福田 直樹、阿部 知子、林 依子、竹久 妃

奈子、寺田 靖子、北島 信行、保倉 明子、中井 泉、放射光マイクロビームを用いたイネ突然変異体(6-99L)におけるCdの蛍光X線二次元イメージング 第4回イオンビーム育種研究会大会、水戸(2007年7月)

- 6) 阿部 知子、風間 裕介、林 依子、市田 裕之、竹久 妃奈子イオンビーム育種の最近の成果と今後の展開、日本育種学会第111回講演会・49回シンポジウム、茨城、(2007年3月)
- 7) 竹久 妃奈子、福田 義通、阿部 知子、福田 直樹、小原 実広、山谷 知行、保倉 明子、中井 泉、東谷 篤志、佐藤 雅志 塩害水田におけるイネのLeaf-bronzingの発症を制御する $qLb-3$ と $qLb-11$ のファインマッピング 第111回日本育種学会、茨城、(2007年3月)
- 8) 林 依子、竹久 妃奈子、風間 裕介、神波 千秋、東海林 英夫、斉藤 宏行、龍頭 啓充、福西 暢尚、宮沢 豊、佐藤 雅志、阿部 知子 イネにおける重イオンビーム照射による変異誘発効果 第111回日本育種学会、茨城、(2007年3月)ポスター
- 9) 神波 千秋、竹久 妃奈子、阿部 知子、林 依子、斉藤 宏行、市田 裕之、小沼 亮子、龍頭 啓充、福西 暢尚、宮沢 豊、東海林 英夫、保倉 明子、福田 直樹、中井 泉、佐藤 雅志 重イオンビーム照射により作出されたイネ塩害耐性突然変異系統の特性解析 第111回日本育種学会、茨城、(2007年3月)

〔その他〕

新聞記事

- 1) 2007年8月4日掲載 フジサンケイビジネスアイ(6面)「こちらラボ・重イオンビームで品種創造」
- 2) 2007年12月17日発売 Planted #6 Plants Science 「未来の洋上農業・メガフロートの上で稲作を」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹久 妃奈子 (Takehisa Hinako)
独立行政法人理化学研究所・生物照射チーム・リサーチアソシエイト
研究者番号: 20455356