

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 8 月 26 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05978

研究課題名(和文) 野生イネを用いた酸素漏出バリアの形成を運命づける分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Understanding of molecular mechanisms to destine to form a constitutive barrier to radial oxygen loss in wild rice species

研究代表者

塩野 克宏 (Shiono, Katsuhiko)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：20610695

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)：酸素漏出バリアは水の多い環境に適応した湿生植物がもつ耐湿性の重要形質である。イネは過湿ストレスを受けてから誘導的にバリアを形成するが、これまでのイネをモデルとした形成機構の研究ではバリア形成を決定づける上流の鍵遺伝子は特定できていない。本研究により、アマゾン川流域に分布するAAゲノム野生イネ*O. glumaepatula*の中に、過湿ストレスを受ける前から恒常的に酸素漏出バリアを形成するエコタイプが特定できた。さらに、この野生イネの染色体断片をイネに導入した染色体部分置換系統の中に、恒常的バリアをもつ系統を発見した。野生イネのもつ、恒常的なバリアを形成させる遺伝子の同定に向け研究が進展した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸素漏出バリアは湿生植物がもつ耐湿性の重要形質である。本研究で、過湿ストレスを受ける前から恒常的に酸素漏出バリアを形成する野生イネのエコタイプを特定できた。さらに、この野生イネの染色体断片を栽培イネに導入すると、野生イネ同様に、恒常的にバリアを形成させることができた。既存のイネをモデルとした形成機構の研究では到達できない、バリア形成を決定づける、上流に位置する鍵遺伝子の特定に向けて、研究が進展した。

研究成果の概要(英文)：A barrier against radial oxygen loss (ROL) is a crucial trait for waterlogging tolerance in wetland plants. Rice inducibly forms the ROL barrier under waterlogged conditions. Therefore, rice has been used as a model to understand the molecular mechanisms of the barrier formation mechanism. But, it has been not identified upstream key genes that determine barrier formation. This study identified an ecotype in the AA-genome wild-rice *O. glumaepatula*, distributed in the Amazon River basin, forming an ROL barrier before suffering waterlogging stress. We found several lines forming a constitutive ROL barrier in the introgression lines of *O. glumaepatula* in the genetic background of *O. sativa* (cv. Taichung 65). Research has progressed toward identifying the gene(s) responsible for forming the constitutive barrier in wild rice.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：湿害 洪水 低酸素 野生イネ 気候変動

1. 研究開始当初の背景

我が国の食糧自給率を増やすために水田転換畑で問題となっている畑作物の耐湿性向上が求められている。しかし、強耐湿性の育種材料がないだけでなく、植物の耐湿性メカニズムに未解明な部分が多く、耐湿性品種の作出は困難である。

土壌から水が適切に排水されない場合、土壌は嫌気状態になる。コムギ・オオムギなどの畑作物の多くは根に通気組織をつくり拡散により酸素通気を行う。しかし、根端へ移動する酸素の30~40%が土壌へ漏出してしまうため、成長点のある根端部へ供給される酸素量が減少し、根の伸長の停止や障害が生じる。一方、耐湿性の高いイネなどの湿生植物は、基部の通気組織の外側(外皮)に、酸素の漏出を抑制するバリア(酸素漏出バリア)を形成する。これにより、根端まで効率よく酸素を供給し、嫌気状態となった過湿土壌で根を伸長させることができる(Armstrong et al., *Ann Bot*, 86:687-703 (2000))。植物の耐湿性には根端への酸素運搬が必要であるが、通気組織の形成だけでは十分でなく、酸素漏出バリアを形成して根端まで効率的に酸素を供給することが重要である。

湿生植物の酸素漏出バリアが確認されて70年が経過したが、長い間その構成物質や分子メカニズムは未解明のままである。1998年、イネが酸素漏出バリアを好気的な土壌条件では形成せずに、過湿ストレスに応じて誘導的に形成することが発見され(Colmer et al., *J Exp Bot*, 49:1431-1436 (1998))、誘導メカニズムの研究が進展した。その後、イネを材料とした誘導的なバリア研究により、バリアの主要な構成成分が疎水性ポリマーのスベリンであることが分かってきた(Kulichikhin et al., *Plant Cell Environ*, 37:2406-2420 (2014))。そのような状況の中、我々はイネのバリア誘導のタイミングを特定し(Shiono et al., *Ann Bot*, 107:89-99 (2011))、バリア形成中に外皮で発現する98個の遺伝子を同定した(Shiono et al., *J Exp Bot*, 65:4795-4806 (2014))。さらに、アブシジン酸(ABA)がこの98個の遺伝子の多くを誘導し、バリア形成にABAシグナリングが関与することを明らかにした(当時投稿中、Shiono et al., *New Phytol*, 233: 655-669 (2022))。しかし、過湿ストレス誘導的にバリアを形成する栽培イネを用いた従来のアプローチだけでは候補となる遺伝子が多すぎるため、酸素漏出バリアの形成を決定づける遺伝子の特定が困難な状況にあった。

当時、我々はアマゾン川流域に分布するAAゲノムの野生イネ *Oryza glumaepatula* の中に、過湿ストレスを受ける前から恒常的に酸素漏出バリアを形成する候補となるエコタイプを見いだしていた。その *O. glumaepatula* 系統と栽培イネの交雑系統を用いて、遺伝子発現の比較解析することにより、バリア形成を決定づけている上流の制御遺伝子を特定できる可能性があった。

2. 研究の目的

本研究では、酸素漏出バリア形成を決定づけている上流の制御遺伝子群を特定するために必要な、*O. glumaepatula* 系統を特定し、イネ×野生イネの準同質遺伝子系統群のバリア評価により、野生イネ由来の恒常的バリア誘導遺伝子が優性遺伝子であるかどうかを評価することを目指した。なお、得られるイネ×野生イネの準同質遺伝子系統群は、将来的に恒常的な酸素漏出バリアを運命づけている鍵遺伝子をマッピングするため準同質遺伝子系統群として基盤整備することとした。

3. 研究の方法

最初に幾つかの野生イネ *Oryza glumaepatula* エコタイプの酸素漏出バリア形成能力を評価し、恒常的なバリアについての基礎的情報を得た。続いて、*O. glumaepatula* と栽培イネ (*O. sativa*) の交雑をし、交雑系統のバリア形成能力の評価を目指した。このとき、イネ野生型との交雑系統が恒常的なバリアを形成した場合には野生イネから導入した鍵遺伝子が優性遺伝子であることがわかる。さらに、交雑系統に対して、戻し交配を繰り返し、得られる準同質遺伝子系統群のバリア形成を評価することで、恒常的バリア誘導遺伝子の候補領域の特定を目指した。

4. 研究成果

野生イネ *Oryza glumaepatula* の4つのエコタイプについて酸素漏出バリアを評価した。その結果、不定根に恒常的なバリアを形成する3系統(W2165, W2149, W1183)を特定した(論文発表済: Ejiri et al., *Plants*, 2020)。さらに、不定根のバリアはみられないものの、種子根の基部で酸素漏出を恒常的に抑えるバリアを形成しているエコタイプ(IRGC105668, IRCG105668は栽培イネ(T65)との交配による染色体部分置換系統群が既に作出・配布されている)を見いだした。酸素漏出バリアの構成成分はスベリンであると考えられている。そこでスベリンの染色パターンを評価したところ、バリア形成したIRGC105668系統の種子根において、外皮のスベリン層の発達が確認できた(図1B)。遺伝子のマッピングのためには定量的な評価が不可欠となるが、このスベリン染色パターンの違いを画像解析により定量化することにも成功した(図1C)。

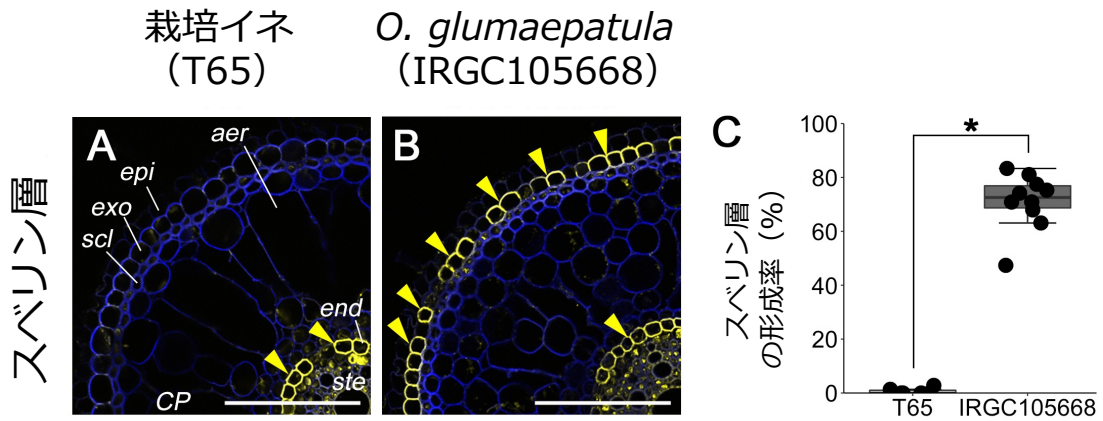


図1. 栽培イネ(T65)と *O. glumaepatula*(IRGC105668) 種子根におけるスベリン層の形成
 (A) T65 のスベリン染色パターン. (B) IRGC105668 系統のスベリン染色パターン. (C) 画像解析により定量化したスベリン層の形成率. スベリン化した根は黄色の蛍光として検出される(黄色矢頭). 青色は自家蛍光. フロロイエロー-088 染色法. aer: 通気組織. CP: 皮層. end: 内皮. epi: 表皮. exo: 外皮. scl: 厚壁組織. ste: 中心柱.

続いて、不定根に恒常的な酸素漏出バリアを形成する3つのエコタイプ(W2165, W2149, W1183)と栽培イネの交配を進めたものの、交配は難航し、失敗に終わった。そこで、既に栽培イネ(T65)との交配による染色体部分置換系統群が既に作出・配布されているIRGC105668系統を、その後の形質評価に用いることにした。

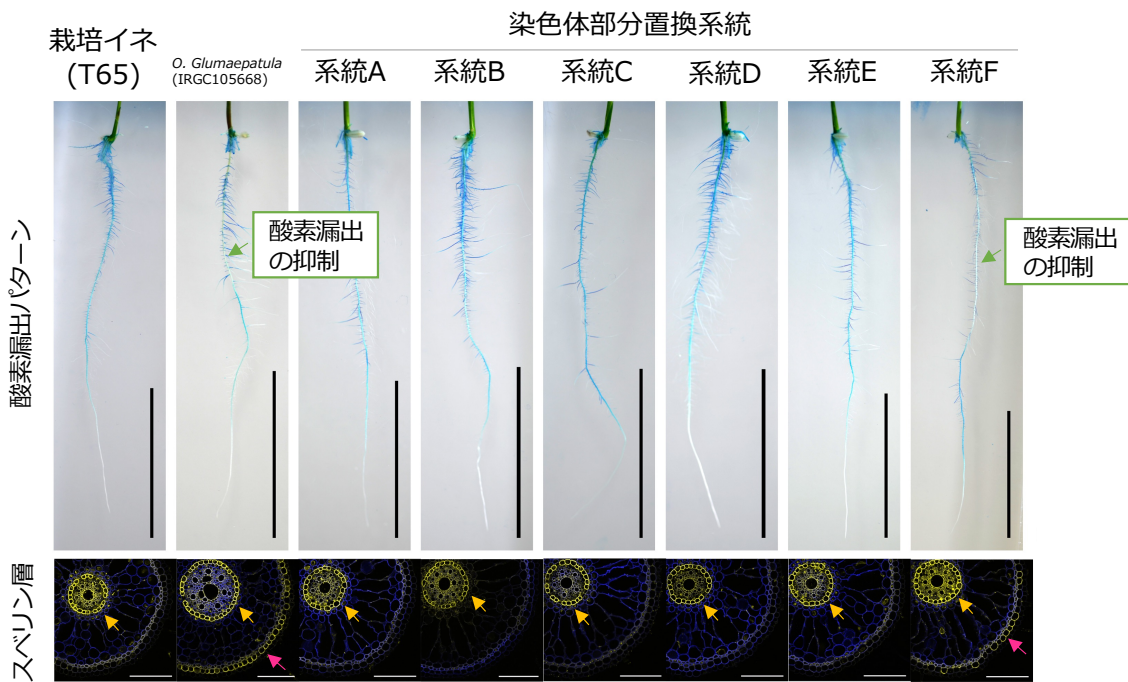


図2. 染色体部分置換系における種子根の酸素漏出パターンと外皮のスベリン化の比較
 (上段)メチレンブルー染色による酸素漏出パターンの評価. 酸素漏出の抑制がみられた箇所を緑色の矢印で示した. Bars = 50 mm. (下段)スベリン染色パターン. スベリン化した根は黄緑色の傾向として検出される(内皮のスベリン化は黄色矢印、外皮のスベリン化はマゼンタの矢印で示した). 青色は自家蛍光. フロロイエロー-088 染色法. Bars = 100 μm.

IRGC105668×T65 の染色体部分置換系統群の種子根における酸素漏出バリア形成能力に加えて、酸素漏出バリアの構成成分と考えられているスベリンの染色を合わせて進めた。T65 を好氣的な条件で栽培したとき、根の基部に酸素漏出バリアを形成することはない(図2の左端)。しかし、*O. glumaepatula* 由来の一部の染色体断片が導入されている染色体部分置換系統群の中に、恒常的にバリアを形成するだけでなく、根のスベリン化までもみられる系統を見いだした(例えば図2の系統F)。このことは、「野生イネ由来の恒常的バリア誘導遺伝子が優性遺伝子である」ことを意味している。これまでのところ、全ての染色体部分置換系統群の評価は完了

していない。しかし、本研究により、酸素漏出バリアの誘導を決定づける、野生イネの優性遺伝子の存在が明らかになった。さらに、この酸素漏出バリア形成を決定づける優性遺伝子の特定やその遺伝子ネットワークの理解に欠かせない、精度の高いバリア評価手法の確立と染色体部分置換系統群を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shiono Katsuhiko, Yoshikawa Marina, Kreszies Tino, Yamada Sumiyo, Hojo Yuko, Matsuura Takakazu, Mori Izumi C., Schreiber Lukas, Yoshioka Toshihito	4. 巻 233
2. 論文標題 Abscisic acid is required for exodermal suberization to form a barrier to radial oxygen loss in the adventitious roots of rice (<i>Oryza sativa</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 655 ~ 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17751	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

1. 著者名 宮下智貴、江尻真斗、島村聡、山内卓樹、塩野克宏	4. 巻 30
2. 論文標題 植物組織の空隙率測定方法 2. アルキメデス法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 根の研究	6. 最初と最後の頁 41 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3117/rootres.30.41	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 塩野克宏、平修	4. 巻 55
2. 論文標題 質量分析イメージングによる複数の植物ホルモンの可視化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 84-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Ejiri Masato, Fukao Takeshi, Miyashita Tomoki, Shiono Katsuhiko	4. 巻 71
2. 論文標題 A barrier to radial oxygen loss helps the root system cope with waterlogging-induced hypoxia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 40 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.20110	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 -

1. 著者名 Ejiri Masato, Sawazaki Yuto, Shiono Katsuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Some Accessions of Amazonian Wild Rice (<i>Oryza glumaepatula</i>) Constitutively Form a Barrier to Radial Oxygen Loss along Adventitious Roots under Aerated Conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 880 ~ 880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants9070880	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 -

1. 著者名 Shiono Katsuhiro, Taira Shu	4. 巻 68
2. 論文標題 Imaging of Multiple Plant Hormones in Roots of Rice (<i>Oryza sativa</i>) Using Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 6770 ~ 6775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.0c00749	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 江尻真斗, 宮下智貴, 塩野克宏	4. 巻 4
2. 論文標題 アマゾン川流域に分布する野生イネ (<i>Oryza glumaepatula</i>) がもっている洪水耐性を利用した育種の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 80-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Ejiri Masato, Shiono Katsuhiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Groups of multi-cellular passage cells in the root exodermis of <i>Echinochloa crus-galli</i> varieties lack not only suberin lamellae but also lignin deposits	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1719749 ~ 1719749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2020.1719749	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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 江尻真斗, 塩野克宏
2. 発表標題 AAゲノムを持つ野生イネ <i>Oryza glumaepatula</i> の種子根における形態と解剖学的特徴
3. 学会等名 第53回根研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮下智貴, 塩野克宏
2. 発表標題 根箱・ピンボード法を用いた野生イネ <i>Oryza glumaepatula</i> の根系評価
3. 学会等名 第53回根研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮下智貴, 塩野克宏
2. 発表標題 非接触スキャナを用いた地表根評価手法の効率化
3. 学会等名 第54回根研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江岸祐夏, 塩野克宏
2. 発表標題 イネの酸素漏出バリア誘導のトリガーを感知する組織の探索
3. 学会等名 第54回根研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮下智貴, 塩野克宏
2. 発表標題 根箱・ピンボード法を用いた湛水処理により誘導される <i>Oryza glumaepatula</i> の地表根の評価
3. 学会等名 第52回根研究集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江尻真斗, 塩野克宏
2. 発表標題 <i>Oryza glumaepatula</i> IRGC105668 系統の恒常的酸素漏出バリア形成能力の評価
3. 学会等名 第139回日本育種学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masato Ejiri, Katsuhiko Shiono
2. 発表標題 Evaluation of barrier to radial oxygen loss in wild rice species, <i>Oryza rufipogon</i> and <i>O. glumaepatula</i> .
3. 学会等名 13th International Society of Plant Anaerobiosis Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kana Shimizu, Katsuhiko Shiono
2. 発表標題 Cytokinin is involved in a formation of barrier to radial oxygen loss along the adventitious roots in rice (<i>Oryza sativa</i>)
3. 学会等名 13th International Society of Plant Anaerobiosis Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuhiko Shiono, Marina Yoshikawa, Tino Kreszies, Sumiyo Yamada, Yuko Hojo, Takakazu Matsuura, Izumi C. Mori, Lukas Schreiber, Toshihito Yoshioka
2. 発表標題 Abscisic acid is required for root suberization at the exodermis to form a barrier to radial oxygen loss in rice (<i>Oryza sativa</i>)
3. 学会等名 13th International Society of Plant Anaerobiosis Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuhiko Shiono, Masato Ejiri
2. 発表標題 Characterization of unsubsized passage-cells at the exodermis in annual wild species of <i>Echinochloa</i>
3. 学会等名 4th Plant Apoplastic Diffusion Barriers 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江尻真斗, 塩野克宏
2. 発表標題 耐湿性の重要形質である酸素漏出バリアを恒常的に形成する野生イネの探索
3. 学会等名 第136回講演会日本育種学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水香那, 塩野克宏
2. 発表標題 サイトカイニンはいネのROLバリア形成に関与する
3. 学会等名 第50回記念根研究集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井県立大学生物資源学部生物資源学科 環境植物学分野HP
<http://www.s.fpu.ac.jp/kankyo/Home/research.html>

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