

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05969

研究課題名(和文)ダイズの耐湿性に関する二次通気組織形成機構の解明とその育種利用に関する研究

研究課題名(英文) Study of secondary aerenchyma formation for the waterlogging tolerance in soybean

研究代表者

高橋 宏和 (Takahashi, Hirokazu)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：50755212

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)：日本においてダイズは主に排水性の悪い水田転換畑で栽培されることから、湿害が問題となっており、ダイズの耐湿性向上は重要な育種目標である。ダイズは耐湿性形質に重要な体内酸素循環の役割を果たす二次通気組織を形成するが、十分な二次通気組織の発達には、過湿ストレス発生後1週間以上の期間を要し、その間に湿害が発生する。つまり、ダイズの耐湿性向上には恒常的にあるいは過湿ストレス発生後短期間で通気組織を形成させることが必要であると考えられる。そこで本研究課題では、ダイズの耐湿性向上のために二次通気組織形成に重要な遺伝子を探索、同定することを目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネ科の通気組織は、植物のプログラム細胞死のモデルであり、またトウモロコシやオオムギ、コムギなどの重要な畑作物が形成することから、その分子機構に関する研究や遺伝資源を利用した解析など多数の報告がなされている。その一方で、二次通気組織は一部のマメ科植物が形成するが、作物としてはダイズでのみで報告されており、その具体的な知見は非常に限られている。また、ダイズを主として栽培している海外の国では耐湿性よりも乾燥耐性が着目されており、湿害が問題となっているのは降雨量の多いアジアである。このことからダイズの耐湿性の改良は世界的にみても遅れている状況であり、本研究の社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：In Japan, soybean is mainly grown in the converted field, and waterlogging injury is an important breeding target for soybean. Soybean forms secondary aerenchyma that play an important role in internal aeration, which is an important trait for waterlogging tolerance. However, soybean required at least one week to develop sufficient secondary aerenchyma for internal aeration. Therefore, it is necessary for soybean to form aerenchyma constantly or within a short period of time after the onset of waterlogging stress in order to improve its resistance to waterlogging. In this research project, we aimed to search for and identify genes that are important for the formation of secondary aerenchymas to improve soybeans' waterlogging tolerance.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：耐湿性 ダイズ 通気組織

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、コメの供給過剰から水田の耕地利用が推進されており、水田転換畑として様々な作物が作付けされている。ダイズは、そのような水田転換畑で栽培される主要作物の一つである。しかしながら、排水性の悪い水田転換畑では降雨が続くと、土壌水分が過剰となり、根圏の酸素が不足する過湿ストレスが引き起こされる。ダイズは本来畑作物であることから、このような環境では根系に障害を受け、湿害が生じる。特にダイズは5月中旬から6月上旬にかけて播種されるため、幼苗期が梅雨期と重なり、深刻な障害を受け、収量性が低下することが問題となっている。このことから、ダイズの耐湿性向上は重要な育種目標である。植物の耐湿性には、複数の重要形質の関与が報告されているが、その多くが植物体内の酸素循環機構に関わる形質である (Bailey-Serres and Voisenek 2008. *Annual Review of Plant Biology*)。イネに代表されるような耐湿性の高い湿性植物は、通気組織と呼ばれる細胞間隙を大きく発達させ、植物体内の酸素循環を行なっていることが知られている (Takahashi et al. 2014. *Plant Cell Monographs*)。耐湿性が低いダイズにおいても、過湿ストレスに応答して、胚軸や根、根粒などに二次通気組織と呼ばれる白いスポンジ状の組織が形成される。この二次通気組織は水面より少し上まで形成されることから、酸素の通り道としての役割に加え、取り込み口としても機能していることが明らかとなっている。しかしながら、十分な酸素循環を行うことができるまで二次通気組織を発達させるには、過湿ストレスが発生してから1週間以上の期間を要する。つまり、ダイズは体内酸素循環に関わる二次通気組織を形成する能力を有しているにも関わらず、十分に発達する前に根系が障害を受けてしまうため、湿害が生じると考えられる。

### 2. 研究の目的

作物の耐湿性には植物体内における酸素循環機能が重要であることが知られている。一般的に、植物が過湿ストレスにさらされる前にあらかじめ通気組織を形成している場合、湿害を回避または軽減できると言われている。つまり、ダイズの耐湿性向上には恒常的にあるいは過湿ストレス発生後短期間で通気組織を形成させることが必要である。しかしながら、他の植物を含め二次通気組織の形成に関する知見は非常に少なく、順遺伝学的にも逆遺伝学的にも改良することは不可能であった。そこで本研究課題では、ダイズの耐湿性向上のために二次通気組織形成に重要な遺伝子を探索、同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

これまでの解析から、湛水処理後から短期間で二次通気組織形成には品種間差があることが明らかになってきたことから、この短期的な二次通気組織形成について、ダイズコアコレクションを用いて評価し、Genome Wide Association (GWA) 解析を行うことで二次通気組織の早期形成に関わる候補責任遺伝子の選抜を行った。

また、二次通気組織は、二次分裂組織 (コルク形成層) から分化することが知られている (Takahashi et al. 2014. *Plant Cell Monographs*)。ダイズは、二次分裂組織と二次通気組織の両方を過湿ストレス後に新たな組織として分化させる。これまでに二次通気組織形成過程を詳細に観察することにより、二次通気組織形成には、以下の4つの大きなステップが存在することを明らかにしている。ダイズは過湿ストレスにさらされると、(1) 内皮細胞の一層外側の皮層細胞の一部が、二次分裂組織の細胞として脱分化する。(2) 脱分化した細胞が分裂を繰り返し、4-5層の細胞層を形成し、成熟した二次分裂組織となる。(3) その後、二次分裂組織の最外層の細胞が、二次通気組織の細胞へと再分化する。(4) 再分化した細胞は、ランダムな方向に細胞伸長することで空気の通り道となる大きな細胞間隙を形成する。つまり二次通気組織形成機構を解明するということは、「①どのように皮層細胞から二次分裂組織を分化させるのか?」、「②二次分裂組織は常に4-5層の分裂細胞層からなるがどのように一定の細胞層を維持しているのか?」、「③どのように二次分裂組織から二次通気組織の細胞を分化させるのか?」の3つの疑問を解明することである。そこで、顕微鏡観察下で組織切片から目的組織のみを回収することができる Laser Microdissection (LM) 法を用いて、二次分裂組織および二次通気組織形成過程の組織を経時的に回収し、RNA-sequencing (RNA-seq) によるトランスクリプトーム解析を行った。

### 4. 研究成果

第8、第10、第19染色体上に候補となるSNPsを検出した (図1a)。このうち第8染色体上のSNPsに着目し、候補責任遺伝子Aを選抜した。そこで、この候補責任遺伝子AのSNPsを用いたハプロタイプ解析を行ったところ、Reference型 (REF型) に比べて、Alternative型 (ALT型) のアレルを持つ系統において二次通気組織が有意に大きくなることが明らかとなった (図1b)。今後は、候補責任遺伝子Aの機能解析を通して、二次通気組織形成への関与を明らかにしていく必要がある。

また、RNA-seq解析で得られたデータを遺伝子発現のパターンをもとに9つのグループにクラスタリングした (図2)。次に、二次通気組織二次通気組織で特異的な発現パターンを示すCluster 1に分離された遺伝子群に着目したところ、メバロン酸経路、ステロール合成経路に加え、トリテルペノイド合成経路の遺伝子が多数含まれていた。そこで、二次通気組織におけるトリ

テルペノイドの定量を行ったところ、ルペオールやベツリン酸といったトリテルペノイドの一種が二次通気組織に高蓄積していることが明らかとなった。トリテルペノイドは植物由来の有用二次代謝産物として、動物における様々な薬理学的研究が多数報告されている。その一方で、植物における生理学的機能についての報告は非常に限られている。二次通気組織に蓄積するルペオールやベツリン酸がどのような機能を有しているかを明らかにするために機能解析を行った。一般的にトリテルペノイドはメバロン酸経路を経て生合成される 2,3-オキドスクアレンを共通基質として生合成される。そこで、2,3-オキドスクアレンからルペオールへの反応を触媒する Lupeol synthase(LUS)をコードするダイズ遺伝子に着目したところ、ダイズゲノム中には GmLUS1 と GmLUS2 の二分子種存在することが明らかとなった。酵母を用いた実験から GmLUS1 と GmLUS2 はともに、2,3-オキドスクアレンからルペオールへと変換する酵素活性があることが明らかとなったものの、二次通気組織で発現するのは *GmLUS1* のみであった。そこで、GmLUS1 の機能欠損変異体(*lus1* 変異体)をゲノム編集により作出したところ、二次通気組織にルペオールやベツリン酸を蓄積しないことが明らかとなった(図 3)。さらに *lus1* 変異体では、二次通気組織表面の細胞外ワックスが完全に消失しており、その結果二次通気組織は撥水性を失い、水面より下の組織への酸素輸送能が低下していることを発見した(図 4)。この酸素輸送能の低下は、過湿ストレス下の根系形成にも影響を及ぼし、土壌と水面の間に発生する地表根は増加させる一方で、土壌中の根の発達は抑制した。これらの結果から、GmLUS1 を介して合成されるトリテルペノイドは、二次通気組織の酸素輸送能の維持に寄与し、さらに結果として過湿ストレス下での根系の発達にも関与していると考えられる。

今後は、今回着目した Cluster1 の遺伝子群以外の Cluster にも着目して解析を行うことで、二次通気組織形成に重要な遺伝子の同定とその機能解析を行っていく必要がある。

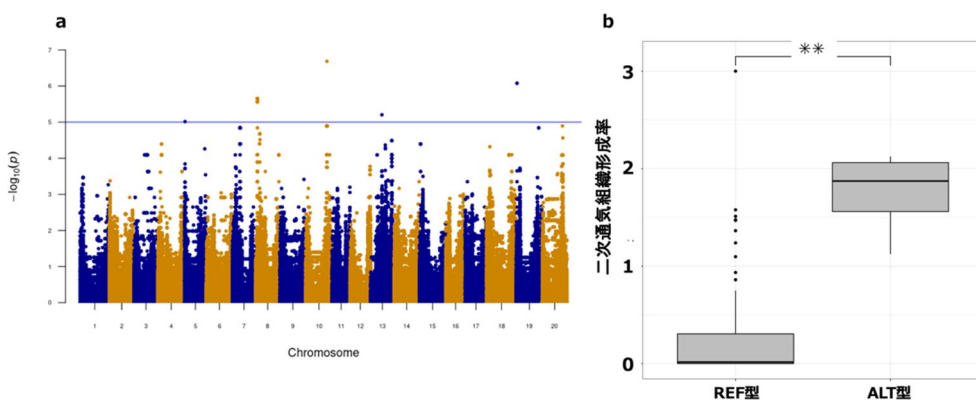


図 1. 二次通気組織に関する GWAS とハプロタイプ解析  
二次通気組織形成に着目した GWAS のマンハッタンプロット (a)。第 8 染色体上の SNPs を用いたハプロタイプ解析 (b)。

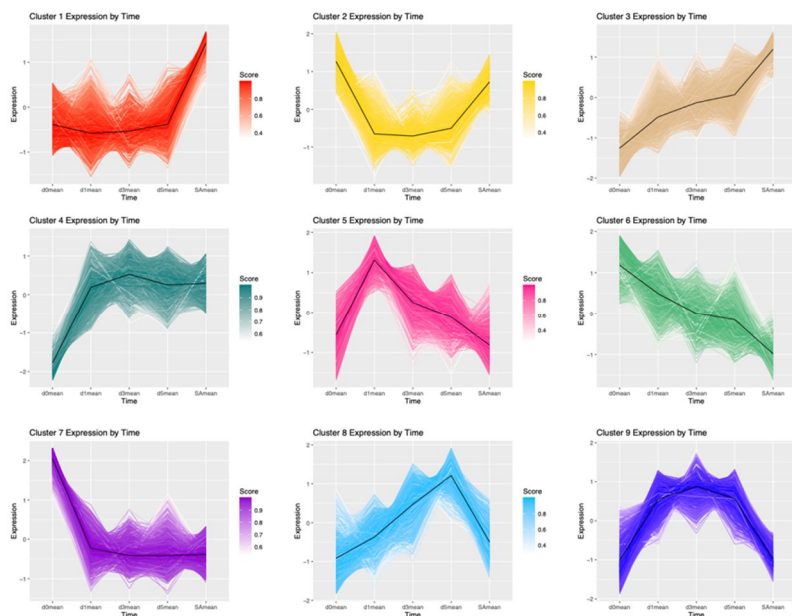


図 2. 二次通気組織形成で発現変動する遺伝子群のクラスタリング解析  
二次通気組織形成過程で、有意に発現が変動する遺伝子を、K-means 法を用いて 9 つの Cluster に分類した。

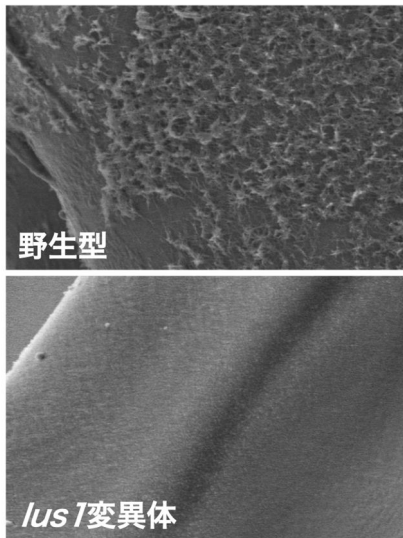


図 3. 二次通気組織の細胞表面の構造  
 クライオ走査型電子顕微鏡を用いて、野生型及び変異体の二次通気組織の細胞表面を観察したところ、野生型では結晶状の構造が観察されたが(上図)、*lus1* 変異体では観察されなかった(下図)。

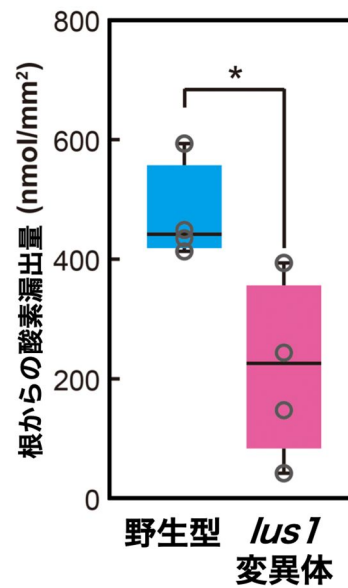


図 4. 根への酸素輸送能の評価  
 根から漏れる酸素量を計測することで、二次通気組織を介した酸素輸送能を評価した。その結果、野生型に比べ、変異体において有意に酸素輸送能が低下していた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 高橋宏和	4. 巻 11月号
2. 論文標題 二次通気組織を利用したダイズの耐湿性育種への試み	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月間アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1064-1068
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 Takahashi, H., Abo, C., Suzuki, H., Romsuk, J., Oi, T., Yanagawa, A., Gorai, T., Tomisaki, Y., Jitsui, M., Shimamura, S., Mori, H., Kaga, A., Ishimoto, M., Seki, H., Muranaka, T. and Nakazono, M	4. 巻 -
2. 論文標題 Triterpenoids in aerenchymatous phellem contribute to internal root aeration and waterlogging adaptability in soybeans.	5. 発行年 2023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.18975	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長谷川史果, 中園幹生, 高橋宏和
2. 発表標題 ダイズの二次通気組織形成におけるペプチドホルモンを介した制御
3. 学会等名 第28回日本育種学会中部地区談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬場唯菜、竹林裕美子、小嶋美紀子、高橋実鈴、Nhung Ta, Kim、佐藤 豊、榊原 均、中園幹生、高橋 宏和
2. 発表標題 ダイズの二次通気組織形成に関する制御因子の探索
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊海斗, 馬場唯菜, 島村聡, 佐藤豊, 中園幹生, 高橋宏和
2. 発表標題 ジャスモン酸処理によるダイズの二次通気組織形成への影響
3. 学会等名 第29回 日本育種学会中部地区談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川 史果, 馬場 唯菜, 高橋 実鈴, 佐藤 豊, 中園 幹生, 高橋 宏和
2. 発表標題 ペプチドホルモンによるダイズの二次通気組織の形成制御機構
3. 学会等名 日本育種学会 第143回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hirokazu Takahashi, Chisato Abo, Hayato Suzuki, Takao Oi, Asako Yanagawa, Tomoka Gorai, Yukari Tomisaki, Mana Jitsui, Satoshi Shimamura, Akito Kaga, Hikaru Seki, Toshiya Muranaka, Mikio Nakazono
2. 発表標題 Triterpenoid accumulation in aerenchymatous phellem contributes to root internal aeration and waterlogging adaptation in soybean
3. 学会等名 International Society for Plant Anaerobiosis (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋宏和
2. 発表標題 畑作物の耐湿性向上を目指して-植物が持つ空気を通すための"穴"の話-
3. 学会等名 日本作物学会東海支部第 152 回講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022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
---------	---------