

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310025

研究課題名（和文） 遺伝子発現プロファイルに基づく植物のストレス診断と水稻葉枯症の原因究明

研究課題名（英文） Stress diagnosis of plants based on the gene-expression profile and clarification of causal factors in Suitou-hagare-shou

研究代表者

佐治 光（SAJI HIKARU）

独立行政法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・上級主席研究員

研究者番号：00178683

研究成果の概要（和文）：長崎県高標高地域の水田で発症する水稻葉枯症の原因として酸性霧の関与の可能性を検討するため、環境制御室で育てたイネを酸性霧で処理した後、障害の有無等やマイクロアレイ法による遺伝子発現変化を調べた。その結果、酸性霧によりイネの遺伝子発現が、病原体感染やオゾン処理による場合とよく似た変化をすることがわかった。いっぽう葉枯症を発症する地区の水田から採取したイネではこれらとは大きく異なる遺伝子発現変化が観察されたため、酸性霧等の単因子のみにより葉枯症が誘導されることは説明し難い。

研究成果の概要（英文）：To investigate the possible involvement of acid fog as a causal factor of the rice dieback called “Suitou-Hagare-Shou” that has been observed at the paddy fields with high latitudes in Nagasaki, we exposed rice plants to an acid fog in a growth cabinet and then examined the presence or absence of foliar damage as well as the gene expression profiles using the microarray method. We obtained a result of change in gene expression profile after the acid fog treatment that is similar to those reported in pathogen- or ozone-treated rice plants. By contrast, rice plants suffering from the Suitou-Hagare-Shou at the paddy fields exhibited gene expression profiles that were much different from these ones, suggesting that the rice dieback would not have been caused by a single factor such as acid fog.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、環境影響評価・環境政策

キーワード：遺伝子・イネ・酸性霧・植物・ストレス・マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 環境中には、植物に障害をもたらすストレス因子として、高・低温、強光、乾燥とい

った物理的因子やオゾン、重金属等の化学的因子が存在し、それらが単独または複合的に作用し、種々の影響を及ぼしている。原因が

高い確度で同定できる、昆虫（害虫）や病原体のような生物的因子と比べて、このような非生物的因子によるストレスの診断は容易でなく、障害が生じていてもその原因を明らかにするのは困難な場合が多い。したがって、障害が生じているまたは生じる前の段階の植物で、ストレス状態とその種類を把握できるような手法の開発が望まれていた。

(2) 我々はこれまで、植物の遺伝子発現変化のプロファイルを新たなストレス診断法として利用しようと試みる一方、長崎県高標高地域の水田で発症する水稻葉枯症の原因を究明するための研究を行ってきた。前者については、分子生物学のモデル植物であるシロイヌナズナを用いて、オゾン等のストレス因子により発現が変化する遺伝子群を選抜し、それらの発現パターンに基づいて、7種類のストレス因子（オゾン、乾燥、塩、酸性雨、紫外線、高温、低温）の影響を識別できる可能性があることを明らかにした。また、イネにおいてはゲノムにコードされる全ての遺伝子発現変化をモニターできる 44K マイクロアレイシステムによる遺伝子発現解析を、東アジアで発生する9種のウイルス感染、病原菌感染、乾燥処理等で行うことにより、どのようなストレスでどのような遺伝子発現応答が誘導されるか、ストレスと遺伝子発現の関係を防御系遺伝子の各ファミリーメンバーに遡って解析中であり、そのデータベースの公開に向けた準備も進めつつあった。

(3) 長崎県の北部高標高地帯の水田では、昭和40年代から、梅雨明け前後にイネ葉身の先縁部が白色に枯れる「水稻葉枯症」が発症し、米の収量・品質の低下をきたすことから、現地の水稻生産農家では大きな問題となってきた。これまでの農業関係調査では病原菌が見いだせないことから、何らかの環境要因が原因ではないかと考えられるようになってきた。梅雨期に霧で覆われる地域で発症するという状況証拠や障害葉に高濃度の硫黄成分が検出されたことから、酸性霧が関係しているとの仮説が立てられ、また日射、温度などの急激な変化も発症に関係する可能性も指摘されたが、これまで発症要因の究明には至らなかった。そこで我々は、葉枯症の被害実態と、酸性霧をはじめ気象・大気・水質・土壌などの環境要因との関係を現地調査により調べるとともに、環境制御装置を用いてイネに酸性霧や強光等の処理を行い、葉枯症の発症が再現されるかどうかを調査した。その結果、現地で観察される程度の酸性霧や強光、オゾン等の因子が植物にストレスをもたらすことが明らかとなった。しかし、いまだ葉枯症の原因は解明されておらず、これまで用いたような方法だけでは原因を究明する

のは困難であると考えられ、新たな方法の導入が必要であると考えに至った。

2. 研究の目的

長崎県高標高地域の水田で発症する水稻葉枯症の原因究明のための研究を、可視障害の発現、生理活性の変動及び植物の遺伝子発現プロファイル解析に基づいて実施し、ストレス診断法の開発を目指した。これまでの研究で原因としての可能性が示唆されている酸性霧、強光、オゾン等のストレス因子の単独及び複合処理による環境制御実験を実施し、その影響解析を行ったが、特にイネの遺伝子発現変化をマイクロアレイ法により計測し、得られた結果を我々の有するものを含めた既存データベースと相互比較した。さらに、これらの条件下における遺伝子発現プロファイルを類型化し、特徴的な代謝変化やシグナル応答に関わる反応を抽出した。また現地の発症イネに対しても同様な解析を行って、環境制御実験結果と比較することにより、葉枯症の原因究明を試みた。

3. 研究の方法（図1）

(1) 環境制御装置を用いたストレス処理による葉枯症再現の試み

現地で栽培されている、葉枯症感受性が異なるイネ3品種（イクヒカリ、ヒノヒカリ、あさひの夢）を霧暴露装置を含む環境制御室で育て、種々の条件下で酸性霧等のストレス処理を施し、植物への影響を調べるとともに、葉枯症様の症状が生じるかどうかを実験的に調べた。

(2) 酸性霧等のストレス処理による遺伝子発現変化プロファイルの計測

上記ストレス処理によりイネの遺伝子群の発現がどのように変化するかをマイクロアレイ法により調べ、その特徴を明らかにした。

環境制御室で育てたイネを中性の霧（対照）と酸性霧で処理し、経時的（異なる日数の経過後）にイネの葉を収穫してRNAを抽出し、アジレント社の44K DNAアレイを用いてイネの遺伝子発現変化を解析した。得られた結果をデータベース上の情報と比較し、中性霧及び酸性霧によるストレス反応の特徴を解明した。

(3) 現地イネの葉枯症発症と遺伝子発現変化プロファイルの計測

長崎県高標高地域で葉枯症を頻繁に発症する水田を中心に、発症状況を観察しながら、梅雨期やその後の発症初期、中期、後期において、イネの葉を収穫し、冷凍保存した。その後、保存した試料からRNAを抽出し、マイクロアレイ法により遺伝子発現を解析した。

得られた結果を基に、葉枯症を発症する過程におけるイネの代謝やストレス反応の状況を把握するとともに、環境制御実験で得られた結果やデータベース上の種々のストレス反応に関する情報と比較して、葉枯症発症要因とそのメカニズムについて考察した。

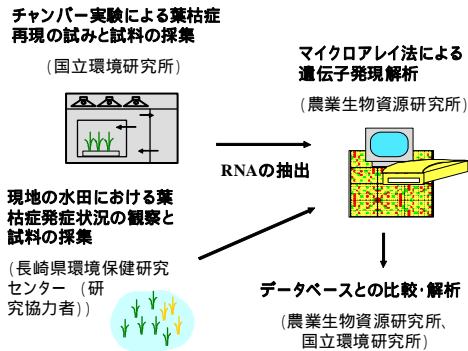


図1 研究の概要

4. 研究成果

(1) 環境制御装置を用いたストレス処理による葉枯症再現の試み

長崎県高標高地域の水田で発症する水稻葉枯症への酸性霧の関与を解明するため、環境制御室で育てたイネをpH 3.3の、3種類の組成の異なる酸性霧 (H_2SO_4 , HNO_3 , $H_2SO_4 + HNO_3$ (2:1)) のいずれかで処理したところ、処理開始後2週間目から葉に小白斑状の可視障害が発現し、処理日数の増加に伴いその程度も増加した。このとき、酸性霧の溶液組成の違いによる有意差は認められなかった(図2)。

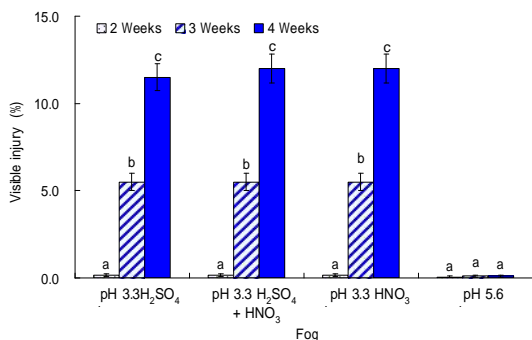


図2 酸性霧がイネの可視障害に及ぼす影響
品種ヒノヒカリを異なる成分の酸性霧に2~4週間曝露した。10個体の平均値±標準誤差を示す。異なる英字はTukey's Multiple Range Testによって有意差 ($P < 0.05$) があることを示す。

可視障害の程度には品種間で差異が認められ、酸性霧に対する感受性は、野外における水稻葉枯症感受性とほぼ一致した。また、どの品種でも処理する霧のpHが低くなるほど可

視障害の程度は顕著となった。

一方、酸性霧のみの処理により葉に生じた可視障害の症状は野外で観察される水稻葉枯症の症状とは若干異なるため、酸性霧のみのみにより水稻葉枯症が引き起こされるとは考えにくい。そこで、酸性霧の2週間処理後に強光処理およびオゾン処理を2週間行ったところ、葉枯症類似の可視障害が発現したことから、酸性霧とその他の要因が組み合わされることにより、水稻葉枯症が発症する可能性が示唆された。

(2) 酸性霧等のストレス処理による遺伝子発現変化プロファイルの計測

環境制御室で育てたイネを、ほぼ中性の霧 (pH5.6) と酸性霧 (pH3.0) で処理し、1日または7日後にイネの葉を収穫してRNAを抽出し、アジレント社の44K DNAアレイを用いてイネの遺伝子発現変化を解析した。その結果、これらの霧処理によりイネの約700~2,000種類の遺伝子の発現が変化することがわかり、変化した遺伝子の数と変化の程度が、中性の霧よりも酸性霧で大きい傾向が見られた(表1)。具体的には、これらの霧処理によりクロロフィル代謝系の遺伝子発現が抑制される一方、病原抵抗性に関わる転写因子やシグナル物質であるジャスモン酸の合成に関わる酵素群の遺伝子発現が誘導された。

表1 中性または酸性の霧で処理したイネ実生で発現が有意に変化した遺伝子の数

発現変化の方向	処理日数	
	1日間	7日間
中性霧 (pH5.6)		
上昇	744	801
低下	975	637
酸性霧 (pH3.0)		
上昇	803	1,857
低下	823	1,697

得られた結果をデータベース上の情報等と比較した結果、霧処理による遺伝子発現変化は、病原体によるものと似ていて、酸化ストレスの特徴を示すことがわかった(図3)。

このように、非生物学的ストレス因子である霧(特に酸性霧)が生物的因子である病原体等と同様に作用するという知見はこれまでに無い新規なものであり、その作用機構も含めたいへん興味深い。

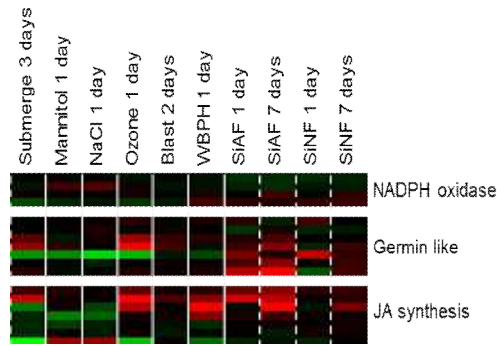


図3 中性霧 (SiNF) 酸性霧 (SiAF) で処理した場合と浸水 (Submerge) マニトール (Mannitol) 食塩 (NaCl) オゾン (Ozone) イモチ病菌 (Blast) セジロウカ (WBPH) によるストレスの場合との遺伝子発現変化の比較の一例
右端の遺伝子族に属する個々の遺伝子の発現変化の方向 (赤: 上昇、緑: 低下) とその程度 (輝度) がバンドの色で表示されている。

(3) 現地イネの葉枯症発症と遺伝子発現プロファイルの計測

長崎県高標高地域で、葉枯症を発症しない心野地区の水田よりイネの健全葉を、また発症する里美地区及び草の尾地区の水田よりイネの健全葉と障害葉を採取し、RNA を抽出して、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果、葉枯症を発症しない地区から採取したイネと比べ、葉枯症を発症する地区から採取したイネでは特徴的な遺伝子発現の違いが観察され、その違いの程度は健全葉よりも障害葉でより大きい傾向があった。たとえば植物ホルモンや活性酸素等のシグナル合成系の遺伝子発現が抑制されており、酸性霧処理による場合と反対方向に制御されており、これまでに報告されているストレス条件下とは異なる生理状態にあることが示唆された (表2)。

以上の結果から、遺伝子発現の観点からは、本研究で解析した酸性霧やオゾン等のストレスの単因子のみによって葉枯症が誘導されることは説明し難い。一方、環境制御室を用いた実験から、酸性霧処理後に強光処理およびオゾン処理を行った水稻葉には、葉枯症類似の可視傷害が発現することが実験的に確かめられており、葉枯症発症の機作は単純ではない。複合的な環境制御実験や葉枯症発症現地における生理生化学的解析や遺伝子発現計測の継時的な比較解析によって、葉枯症発症の原因を明らかにしていく必要があると思われる。

表2 葉枯症を発症する水田から採取した障害葉、健全葉と酸性霧処理した葉との間での遺伝子発現変化の比較

遺伝子族 (総数)	発現の方向	障害葉	非障害葉	酸性霧 7日間
AP2-EREBP (87)	上昇 低下	9 27	8 28	10 6
bHLH (71)	上昇 低下	7 18	5 10	13 6
FAR1 (36)	上昇 低下	5 0	4 3	0 2
G2-like (39)	上昇 低下	3 16	1 12	3 1
MYB (57)	上昇 低下	11 17	4 18	9 3
NAC (63)	上昇 低下	11 17	6 6	11 6
Tify (11)	上昇 低下	0 4	0 6	6 0
WRKY (70)	上昇 低下	15 20	6 25	26 6

左端の各遺伝子族に属する遺伝子のうち、発現が有意に変化 (上昇または低下) したものの数が示されている。

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)

[学会発表] (計5件)

S. Ito, A. Mori, T. Watanabe, H. Saji, H. Shimizu, Impacts of acid fog on the growth of several cultivars of rice plants grown in the paddy fields of Nagasaki Prefecture, Japan, The 6th International Conference on Fog, Fog Collection and Dew, 2013年5月19-24日、横浜

S. Ito, H. Shimizu, A. Mori, T. Watanabe, H. Sasakawa, H. Saji, K. Murano, Effects of acid fog on the growth of rice cultivars grown in Nagasaki Prefecture, Japan, Acid Rain 2011 (The 8th International Conference on Acid Deposition), 2011年6月16日、Beijing, China

森淳子・藤哲士・清水英幸・伊藤祥子・佐治光・渡邊大治・藤山正史・藤原伸介・村野健太郎、長崎県の高標高水田に於ける酸性霧の実態と水稻との関係、大気環境学会、2011年9月14日、長崎

清水英幸・伊藤祥子・佐治光・森淳子・藤哲士・渡邊大治・藤山正史・藤原伸介・村野健太郎、長崎県の水田に及ぼす酸性霧の影響、大気環境学会、2011年9月14日、長崎

佐治光・佐治章子・伊藤祥子・清水英幸、
酸性霧処理したイネの遺伝子発現プロ
ファイル、大気環境学会、2011年9月
14日、長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐治 光 (SAJI HIKARU)

独立行政法人国立環境研究所・生物・生態
系環境研究センター・上級主席研究員

研究者番号：00178683

(2) 研究分担者

清水 英幸 (SHIMIZU HIDEYUKI)

独立行政法人国立環境研究所・地域環境研
究センター・主席研究員

研究者番号：80132851

菊池 尚志 (KIKUCHI SHOSHI)

独立行政法人農業生物資源研究所・植物ゲ
ノムユニット・上級研究員

研究者番号：90370650