

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 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：82104
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22780057
 研究課題名（和文） イネ根の破生通気組織の形成が阻害された変異体の単離と機能解析
 研究課題名（英文） Isolation of rice mutant reduced in aerenchyma formation of roots
 研究代表者
 小原 実広（OBARA MITSUHIRO）
 独立行政法人国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・研究員
 研究者番号：10455248

研究成果の概要（和文）：イネの根の破生通気組織の生理機能を解明することを目的とし、根の通気組織の形成が低下した変異体を用いて機能解析を行った。また、根の破生通気組織の形成に関する分子基盤を整備することを目的とし、新規な当該変異体の選抜・単離を行った。野生型に比較して、変異体は好氣的な条件においても、その生育が回復せず、低かった。このことから、イネの根の通気組織は、地上部から根系への酸素の供給に加えて、基本的な成長にも機能していることが新たに示唆された。また、2,000 系統の突然変異集団から、新規な当該突然変異体 2 系統を選抜した。それら 2 系統について、遺伝背景およびインド型品種カサラスとの交配を行い、交配第二世代の種子を得た。今後、それらの遺伝子同定を予定している。

研究成果の概要（英文）：The aim of study was (1) to understand physiological function of aerenchyma cell in root using with spontaneous mutant reduced aerenchyma formation in root and (2) to isolate the corresponding mutants among chemical mutagenesis population. Significant reduction of growth vigors were clearly observed in both root and shoot elongation even when grown in oxygen-rich condition. These data indicate newly function of aerenchyma cell that concerned in basic plant growth. Furthermore, two novel mutant reduced aerenchyma mutant were isolated in 2,000 lines induced mutagenesis by chemical reagent. Toward identifying gene(s) responsible for aerenchyma formation, seeds of F2 generation developed from crosses between mutant and genetic background or indica variety of 'Kasalath' were obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：植物成長・生理・イネ・根・通気組織・遺伝子単離・機能解析

1. 研究開始当初の背景天候や気候の変化により、植物が生育している環境は劇的に変化している。長雨等の冠水によって、土壌は過湿状態となり、土壌の還元が進行する。還元が進行した土壌においては、土壌中の酸素濃度の低下、Mn²⁺や Fe²⁺への還元が進行する。

その可溶化した Mn^{2+} や Fe^{2+} が、植物体内に過剰に吸収されることで、植物の生育に障害が生じる。還元土壌においては、最終的にメタンや硫化水素が発生する。酸素は、地上部から根の通気組織を介して輸送され、根の周りに供給されると考えられている。これにより、根の周りは局所的に酸化状態となり、 Mn^{2+} や Fe^{2+} への還元化が抑制されている。また、土壌で発生したメタン等は、根の通気組織を介して地上部へと輸送され、植物体外へと放出されることが考えられている。コムギやトウモロコシ等の陸上植物は、過湿な土壌に長期間さらされると、生産性の低下あるいは枯死といった甚大な被害が認められる。一方、イネやヨシ等の湿生植物は、過湿な土壌に長期間さらされても、大きな生育阻害は認められない。湿生植物は、陸上植物とは異なり、土壌の過湿程度に関わらず、自発的に根の通気組織を形成させる機構が発達している。このことが、湿生植物が還元が進行した土壌でも生育できる理由の一つであると考えられている。

根の通気組織の多くは、皮層細胞の崩壊によって生じる破生通気組織であることが知られている (Seago et al. 2005)。根の破生通気組織の形成には、エチレンシグナル伝達機構や (He et al. 1996)、根の皮層細胞のプログラム細胞死 (Jackson and Armstrong 1999, Kawai et al. 1998) が関与していることが示唆されている。しかし、根の破生通気組織の形成に関与している変異体や遺伝子群は単離されておらず、分子機構も全く分かっていない。

2. 研究の目的

申請者は、根の破生通気組織が自発的に形成されるイネを用いて、根の破生通気組織の形成程度が低下した突然変異体の単離を行ったところ、破生通気組織の形成が極めて低下した 1 系統が単離された。そこで、その変異体を用いて、根の破生通気組織の生理機能を解明することを目的とした。また、新規なイネ変異体することで、根の破生通気組織の形成に関する分子基盤を整備することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 変異体を用いた、根の破生通気組織の生理機能の解析

還元並びに酸化状態における破生通気組織の生理機能を明らかにする。当該変異体を水耕法で栽培する。窒素ガスを暴露した水耕液、または、水耕液に 0.1% の寒天を加えた stagnant 溶液にて水耕栽培することにより、定常的な還元状態での栽培試験を行う (Wiengweera et al. 1997)。また、水耕液に空気を暴露することで、定常的な酸化状態での

栽培試験を行う。再現性良く、かつ効率的な解析を行うために、イネは人工気象器を用いて栽培する。好気状態において、破生通気組織の形成は、根の伸長の促進することが示唆された。酸化状態で水耕栽培された変異体の根長を測定する。

(2) 部位および時期に依存した遺伝子およびタンパク質の発現・蓄積の解析

原因遺伝子の推測アミノ酸配列を基に、抗原ペプチドを作成し、ポリクローナル抗体を作製する。

(3) 大規模集団からの根の破生通気組織の形成程度が低下した新規な突然変異体の単離

包括的な植物の破生通気組織の形成機構の解明に向けて、根の破生通気組織の形成程度が低下した新規な突然変異体を単離する。単離した系統は、遺伝的固定を行うとともに、遺伝背景およびインド型のカサラスと交配し、雑種集団を作成する。

4. 研究成果

(1) 変異体を用いた、根の破生通気組織の生理機能の解析

根の破生通気組織の生理機能を探る目的で、酸素が十分にある好気的な状態における当該変異体の生育特性を評価した。根の破生通気組織は、酸素の地上部から根への送り出しに機能していることが考えられている。そのため、根の破生通気組織の形成が阻害された変異体は、根へ酸素が供給されている条件においては、その生育が野生型と同程度になることが推察される。あるいは、根の通気組織が酸素の地上部から根への送り出し以外にも機能している場合は、根へ酸素が供給されている条件においては、その生育が野生型程度まで回復しないことが推察される。窒素栄養を与えずに、14 日間水耕法で栽培し、野生型と変異体の根長を比較した。野生型に比較して、変異体の根長は好気条件においては、62% (図 1)、対照区においては 65% (図 2) と、有意に根の伸長は抑制されていた。また、対照区に対する好気条件の根の長さの比は、野生型では 0.95、変異体では 0.99 (図 3) であった。以上の結果から、変異体における根の成長は、酸素の供給によって、野生型のそれまで、回復しないことが明らかになった。

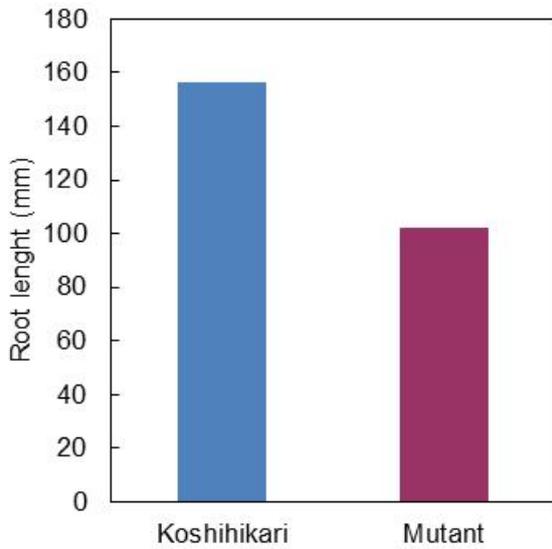


図1. 好気状態における根長の比較

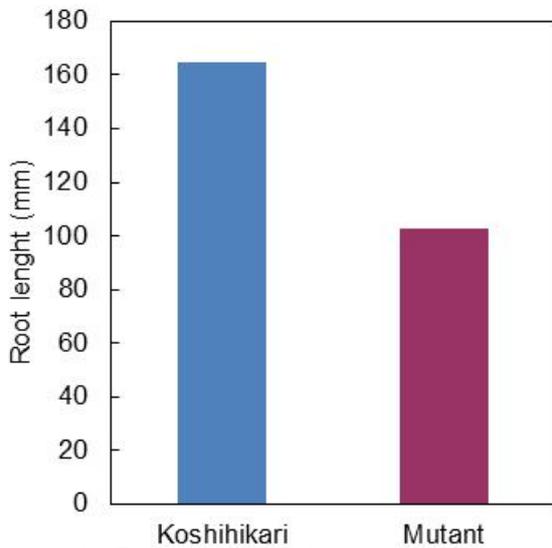


図2 対照区の根長の比較

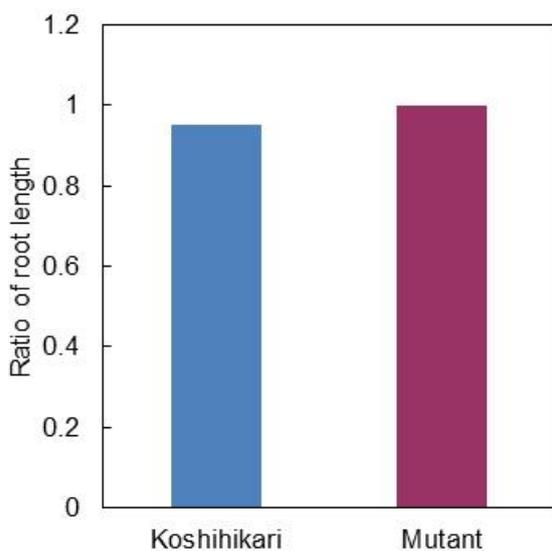


図3 好気条件における根長の比の比較

野生型に比較して、変異体の根長は好気条件においては、73% (図4)、対照区においては69% (図5)と、有意に根の伸長は抑制されていた。また、対照区に対する好気条件の根の長さの比は、野生型では0.70、変異体では0.67 (図6)であった。以上の結果から、変異体における地上部の成長は、酸素の供給によって、野生型のそれまで、回復しないことが明らかになった。

これらの結果から、根の通気組織は、根の酸素の供給以外に、植物の基本的な生長に機能していることが示唆された。

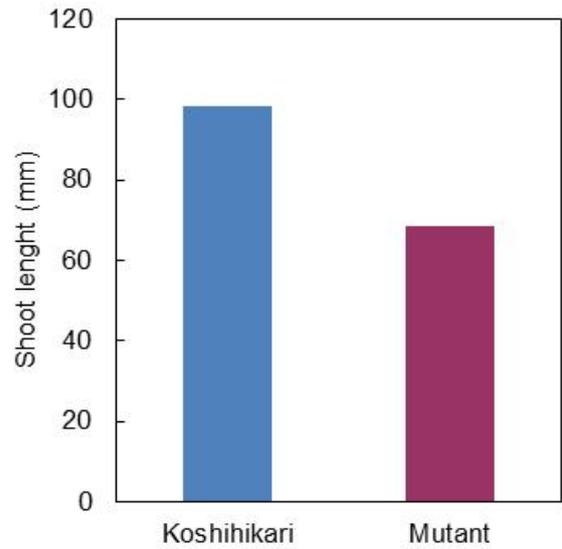


図4. 好気状態における地上部長の比較

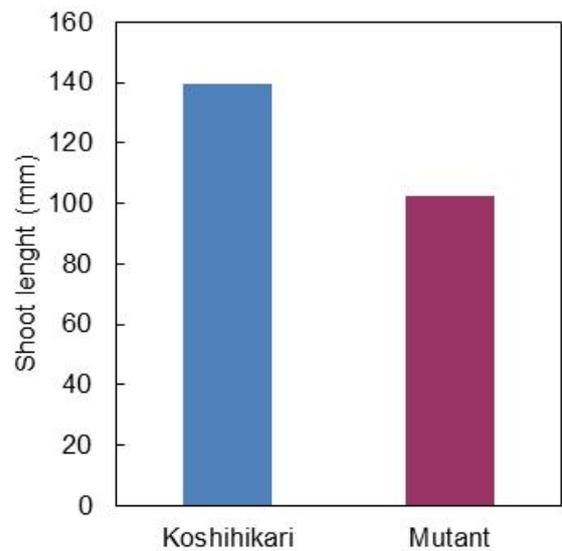


図5 対照区の地上部長の比較

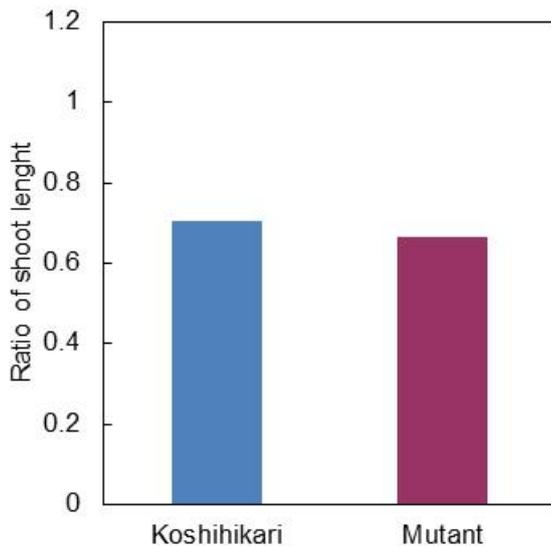


図6 好気条件における地上部長の比の比較

(2) ポリクローナル抗体の作製

根の通気組織に関連している遺伝子のタンパク質レベルでの挙動を調査するために、変異体の原因遺伝子の予想アミノ酸配列を基に、合成ペプチドを免疫し、ウサギ抗体を得た。調製した抗体の力価、特異性を調査するために、合成ペプチドに対する反応性を調査した結果、免疫した抗体が作製されていることが確認された。そこで、イネの地上部および根から調整した粗タンパク質に対する抗体の特性をイムノブロット法で調査した。その結果、明瞭なシグナルは検出されなかった。これらのことから、根の通気組織に関連している遺伝子のタンパク質レベルでの解析には、再度抗体を調整する必要があることが示された。

(3) 大規模集団からの根の破生通気組織の形成程度が低下した新規な突然変異体の単離

2,000 系統の突然変異集団から、新規な当該突然変異体を選抜した。500 系統を 1 集団として系統をバルクに調整した。一次選抜においては、11 系統の変異体候補系統が得られた。それらを自殖し、種子を得て、二次選抜を行った。その結果、2 系統において、明確な通気組織形成能の低下が確認された。

それら 2 系統について、遺伝背景およびインド型品種カサラスとの交配を行い、交配第二世代の種子を得た。その種子を得て、今後の遺伝子同定を予定している。

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 3 件)

- ① 安彦友美、小原実広、窒素欠乏条件におけるイネ根の通気組織の形成、日本育種学会第 121 回講演会、2012 年 3 月 30 日、宇都宮大学、栃木県宇都宮市
- ② 安彦友美、小原実広、バイオマス生産が低下したイネ自然突然変異体の単離と特性、日本植物生理学会 53 回年会、2012 年 3 月 18 日、京都産業大学、京都府京都市
- ③ Obara M, Abiko T. Identification and characterization of reduced biomass production mutant of rice accompanied with reduced root elongation. The JSRR's 20th Anniversary Symposium: The Latest Frontiers of Root Research in Asia, Nov.-5 2012, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 実広 (OBARA MITSUHIRO)

研究者番号 : 10455248

(2) 研究分担者

なし

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし

研究者番号 :