

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380013

研究課題名(和文)水ストレス下のマメ科作物の窒素・糖・水の動態解析による乾燥耐性メカニズム

研究課題名(英文)Mechanism of drought tolerance of regume

研究代表者

井上 眞理 (Iwaya-Inoue, Mari)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60091394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科作物の乾燥ストレス応答について、ササゲおよびダイズを対象に調べた。ササゲの生殖成長期の摘莢処理により、葉の老化が進行しなかったことは、子実肥大期のササゲでは、シンクからの栄養要求が引き金となることを示した。乾燥ストレスを感受すると、気孔閉鎖と光合成の停止、糖の子実への転流と葉の糖含量の低下、葉におけるオートファジーの誘導とタンパク質等の分解、アミノ酸異化酵素による窒素源の子実への転流というスキームで起こることを明らかにした。また、ダイズの葉にROSを処理すると、気孔閉鎖を伴わずに葉の含水率を維持した。このことから、ガラクトキノール系の合成促進により、乾燥ストレスを軽減することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Leaf senescence of legume crops is often accompanied with the grain filling and maturation at the reproductive stage, because efficient nutrient translocation from source organs to the sink organs is essential for high yield. The leaf senescence of cowpea at the reproductive stage was suppressed by depodding treatment. Drought stress on cowpea at the reproductive stage enhanced both leaf senescence and seed maturation. Drought stress also transiently increased sugar contents in leaf and then significantly enhanced sugar translocation from leaves to seeds. These results suggest that the leaf senescence was affected by a status of sugar translocation among organs such as leaves, stems, and pods. It was indicated that autophagy-related genes (ATGs) was involved in leaf senescence of cowpea firstly regulated by sugar nutrient. In addition, ROS treatment to leaves enhanced drought tolerance of soybean.

研究分野：作物生理学

科研費の分科・細目：農学 作物学・雑草学

キーワード：転流 オートファジー 乾燥ストレス ササゲ ダイズ

1. 研究開始当初の背景

ササゲは、半乾燥地帯であるアフリカのサヘル地域で広く栽培され、子実主成分は、タンパク質 25%、炭水化物 67%、脂質 2%であり、栄養飢餓の地域でのタンパク源・カロリー源として貴重な作物である。ササゲは、ほぼ天水に依存した栽培体系であることから、ササゲの特異的な乾燥耐性の解析は乾燥地域の農業体系を構築する上でも重要な情報となる。

ササゲは乾燥下におかれると栄養成長期では、速やかに気孔を閉鎖し、水分損失を防ぐ機構を持つことが知られている (Bates and Hall 1981; Osonubi 1985)。また、生殖成長期においても栄養成長期と同様に、乾燥により気孔を閉鎖し光合成が停止するという特徴をもつ。それに伴い子実の生産が低くなることが想定されるが、品種によっては、収量や品質には影響されないものもある。本研究では、マメ科作物の水ストレス耐性を解明するために、シンクソースバランスに着目し、ササゲおよび乾燥耐性をもたないダイズの窒素・糖代謝と水分動態との関係について着目した。

2. 研究の目的

マメ科作物の乾燥ストレスに伴う葉の光合成速度および子実・葉・葉柄など各器官の窒素・糖および水の動態を比較し、栄養成長期および子実肥大期の乾燥応答メカニズムを解明することを目的とする。さらに、各器官の窒素や糖の転流機構との関係について考察する。さらに、ダイズの水ストレス応答についてもあわせて検討する。

3. 研究の方法

本研究では、マメ科作物のササゲおよびダイズを対象に、子実肥大期における乾燥ストレス下の子実、葉などの器官について、1) 収量、2) 光合成速度、3) 蒸散速度、4) 含水率、5) 窒素の動態、6) 糖の動態、7) 水の動態、8) オートファジー関連遺伝子の発現およびタンパク質の解析、9) 発芽率等を調べることにより、乾燥耐性機構を明らかにする。

一方、ダイズの乾燥耐性付与実験として、乾燥処理開始日に、葉に H_2O_2 、対照区として蒸留水 (DW) をスプレー散布し、その後 8 日間の乾燥処理を行い、土壌含水率、葉の相対含水率、光合成関連パラメーターおよび乾燥ストレス応答遺伝子の発現、ラフィノース、ガラクチノール、*myo*-イノシトール、スクロースを定量した。

4. 研究成果

マメ科作物の乾燥ストレス応答について、ササゲおよびダイズを対象とし、その耐性機構を調べた。ササゲの生殖成長期において、摘葉区では葉の老化は進行しなかったことは、子実肥大期のササゲでは、シンクからの栄養要求が引き金となることを示した。糖含量の低下に続いて、窒素含量の低下が起こったことから、タンパク質と光合成器官に由来する窒素は糖の後に転流されることが示唆された。また、オートファジー関連遺伝子 (*ATGs*) の発現は乾燥 + 摘葉区と乾燥区において特に顕著な増大が観察されており、その上昇は糖含量の低下と同じ時期に起こった。このことから、オートファジーの誘導は乾燥ストレスによる葉の糖含量の低下によって

引き起こされることが示唆された。また、葉における窒素含量の低下はスクロース含量の低下と *ATGs* の発現の増加に引き続いて起こったことから、デンプン等の不溶性糖の分解と転流の時期と、オートファジーによって分解された葉の栄養源が子実へと転流される時期にはタイムラグがあることが示された。また、アミノ酸を転流形態へと異化するアミノ酸異化酵素関連遺伝子の発現は、オートファジーが促進された区においてオートファジーの発現と同時に促進されることが明らかになった。このことから、葉における栄養状態の低下によってオートファジーが誘導され、それによりタンパク質を中心とした葉の成分の分解が起こり、その分解産物のアミノ酸プールが子実へ転流されるために、転流タイプのアミノ酸に異化するためのアミノ酸異化酵素関連遺伝子の発現が増加することが示唆された。以上のことから、子実肥大期のササゲは乾燥ストレスを感受すると、気孔の閉鎖と光合成の停止、糖の子実への転流と葉の糖含量の低下、葉におけるオートファジーの誘導とタンパク質等の分解、アミノ酸異化酵素による窒素源の子実への転流というスキームで起こることが明らかになった。

一方、乾燥耐性をもたないダイズの乾燥耐性付与を目的とし葉への ROS(H_2O_2) 前処理による効果を調べた。乾燥処理期間中、葉の相対含水率は DW(対照区) に比べ H_2O_2 区において高かったことから、 H_2O_2 散布処理により葉の水分が保持されていることが示唆された。光合成速度は DW 区に比べ H_2O_2 区が高かった。また、 H_2O_2 区では、気孔コンダクタンスは対照区と有意な差が見られなかった

ことから、 H_2O_2 散布による葉の水分保持は気孔の閉鎖によるものではないことが示唆された。

H_2O_2 前処理における効果について、ガラクトキノール合成酵素 (*GolS*) とガラクトキノール合成の上流で働く *myo*-イノシトール合成酵素をコードする遺伝子 (*MIPS1*, *MIPS2*, *MIPS3*, *MIPS4*) 発現解析を行った。その結果、 H_2O_2 前処理は *MIPS2* と *GolS* の誘導が著しく高いことが明らかになった。また、*myo*-イノシトールは H_2O_2 前処理 6 日後に顕著に蓄積し、その後急激に減少したのに対し、ガラクトキノールは乾燥処理 4 日以降から高い値を推移した。これらの結果から、 H_2O_2 前処理は *MIPS2* や *GolS* を誘導し、*myo*-イノシトールやガラクトキノールを合成していることが明らかになった。即ち、これらの適合溶質の合成により、葉内の浸透圧を高め、乾燥ストレス条件でも気孔を閉鎖せずに葉の水分を保持することで、乾燥ストレスを軽減すると考えられる。さらに、ダイズ子実の吸水時における ROS の作用についても明らかにした。

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)

Kaneko, A., E. Noguchi, Y. Ishibashi, T. Yuasa, M. Iwaya-Inoue (2013) Sucrose starvation signal mediates induction of autophagy- and amino acid catabolism-related genes in cowpea seedling, *Amer. J. Plant Sci.*, 4, 647-653

Ishibashi, Y., Y. Koda, S-H Zheng, T. Yuasa, M. Iwaya-Inoue (2013) Regulation of soybean

seed germination through ethylene production in response to reactive oxygen species, *Ann. Bot.*,111,95-102

Sakamoto, T, Y. Hashiguchi, E.Kurauchi, M. Imamura, Y. Ishibashi, S. Muranaka, T. Yuasa M. Iwaya-Inoue (2012) Causative factors of decreasing flower number in cowpea under drought stress during flowering stage, *Cryobiol. Cryotechnol.*,58,1,81-85

Okuda, M. Nang Myint Phyu Sin Htwe, K. Oshima, Y. Ishibashi, S-H Zheng, T. Yuasa, M. Iwaya-Inoue, (2011) Ethylene signal mediates induction of *GmATG8i* in soybean plants under starvation stress, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* ,75,7,1408-1412

Ishibashi, Y., H. Yamaguchi, T. Yuasa, M. Iwaya-Inoue, S. Arima, SH. Zheng (2011) Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants, *J.Plant Physiol.*,168, 1562-1567

〔学会発表〕(計13件)

有吉優里, 石橋勇志, 長内克真, 糸山晴香, 有尾誠介, 湯浅高志, 井上眞理.

ダイズの莢形成とブラシノステロイドの関係 日本作物学会 2013.09.08、鹿児島大学、鹿児島市

金子彩実, 野口英里, 石橋勇志, 湯浅高志, 井上眞理, ササゲの子実肥大期における葉の老化機構の解析, 日本作物学会, 2013.03.29. 明治大学、川崎市

湯浅高志, 山口春香, 中村純也, 石橋勇志, 井上眞理, 高等植物のオリゴ糖合成遺伝子発現による環境ストレス耐性獲得メカニズム, 植物生理学会大会,2013.03.21. 岡山大学、岡

山市

Tajima, D., Y.Ishibashi, T.Yuasa, M. Iwaya-Inoue, Analysis of GmWRI1 regulating fatty acid synthetic genes during soybean development.,International Joint Symposium between Japan and Korea,2012.11.07. Korea

Kaneko, A., Y. Ishibashi, T. Yuasa, M. Iwaya-Inoue,The role of sugar signals in autophagy during reproductive stages of cowpea,International Joint Symposium between Japan and Korea,2012.11.07. Korea

湯浅 高志,金子彩実, Nang Myint Phyu Sin Htwe, , 石橋 勇志, 井上眞理, オートファジーによる老化・栄養転流の調節メカニズム, 園芸学会,2012.09.22. 福井市、福井県立大学

金子彩実, 野口英里, 石橋 勇志, 湯浅 高志, 井上眞理, ササゲの子実肥大期における乾燥ストレスに伴う老化調節メカニズムの解析, トランスポーター研究会九州部会,2012.09.01. 福岡歯科大学、福岡市

今村雅和, 金子彩実, 野口英里, 坂本貴浩, 内八重愛, 橋口祐也, 倉内英梨子, 有村恵, 石橋勇志, 湯浅高志, 井上眞理, マメ科作物ササゲの乾燥に应答した花成調節の分子メカニズムの解析, 日本植物細胞分子生物学会,2012.08.03. 奈良先端大学、奈良県

石橋勇志, 橋口裕也, 今村雅和, 倉内江梨子, 坂本貴浩, 湯浅高志, 井上眞理, ササゲの乾燥ストレス下における糖転流に関する研究, 日本作物学会,2012.03.29. 東京農工大学、府中市

金子彩実, 坂本貴浩, 内八重愛, 石橋勇志,

湯浅高志, 井上眞理, ササゲの子実肥大期における乾燥ストレスに伴う老化調節メカニズムの解析, 日本植物生理学会, 2012.03.17. 京都産業大学、京都市

Kaneko, A., T.Sakamoto, A. Uchibae, Y. Ishibashi, T.Yuasa, M. Iwaya-Inoue, Leaf senescence of legume crops is regulated by sink-source balance and environmental stress, Crop Science Symposium in East Asia 2011, 2011.09.21. Fukuoka, JAPAN

湯浅高志, Nang Myint Phyu Sin Htwe, 石橋勇志, 井上眞理, マメ類の葉の老化・栄養転流におけるオートファジーの役割, 日本植物細胞分子生物学会, 2011.09.08. 九州大学、福岡市

坂本貴浩, 橋口祐也, 倉内英梨子, 今村雅和, 石橋勇志, 村中聡, 湯浅高志, 井上眞理, 開花期の乾燥ストレスによるササゲの花数減少の要因解析, 低温生物工学会, 2011.07.08. いわて県民情報交流センター, 盛岡市

〔図書〕(計1件)

井上眞理, 環境ストレス下の食糧・エネルギー増産を目指した作物, (2012) KITEC INFORMATION No. 264: 5-7

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/sakumotsu/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上眞理 (Mari IWAYA - INOUE)

研究者番号: 60091394

(2)研究分担者

湯浅 高志 (Takashi YUASA)

研究者番号: 40312269

(3)連携研究者 なし

研究者番号: