

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380011

研究課題名(和文)浸透圧ストレス条件下での根系可塑性発現過程についての多面的・網羅的解析

研究課題名(英文)Multifaceted and exhaustive analysis about the root system plasticity expression process under the osmotic stress condition

研究代表者

小川 敦史(Ogawa, Atsushi)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：30315600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、(1)農業生物資源研究所の世界のイネコアコレクションを含む59品種を供試材料に、浸透圧ストレスおよび塩ストレス耐性ならびに感受性品種のスクリーニングと根系形態学的特徴の解析、(2)ストレス耐性品種と感受性品種間の水分生理や植物ホルモンの側面から差異を評価、(3)ストレス耐性と感受性品種間の根系におけるメタボロミクスを用いた代謝変動物質の網羅的解析、(4)ストレス耐性と感受性品種間のマイクロアレイ解析を用いた側根原基における発現変動遺伝子の網羅的解析、(5)ストレス耐性と感受性品種間の塩ストレス条件下での収量性に及ぼす要因の解明を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed (1) the selection of osmotic stress and salt stress tolerance and the sensitivity cultivars and analysis of the root system morphologic traits using 59 rice cultivars including 54 Rice Diversity Research Set cultivars developed by NIAS, (2) the evaluation of the difference by the side of water relations and the plant hormone between tolerance cultivar and the sensitivity cultivar, (3) the exhaustive analysis of the metabolism change material using the metabolomics analysis in the root system between stress tolerance and the sensitivity cultivar, (4) the exhaustive analysis of the change of the expression gene using the microarray analysis in the root system between stress tolerance and the sensitivity cultivar, and (5) the clarification of the factor to cause it to yield characteristics under the salt stress condition between stress tolerance and the sensitivity cultivar.

研究分野：作物生理学

キーワード：浸透圧ストレス イネ 根系 側根 マイクロアレイ メタボローム World Rice Collection

## 1. 研究開始当初の背景

世界のイネの栽培の約 40% が養水分の供給が不安定な天水田で行われており、途上国ではさらに大きな割合を示している。近年気候変動による降水量の劇的な変化によって引き起こされる干ばつや塩害により、養水分供給の不安定になりイネの生育がさらに不安定化すると予想される。したがって、水ストレスや塩ストレスである浸透圧ストレス耐性イネの育成は急務である。

根、特に根系の大部分を形成する側根は、植物の生長を支える上で養水分吸収を一手に担う最も重要な形質の一つである。作物根系は環境変化に対して形態を劇的に変える可塑性に優れているが、可塑性の発現に大きく寄与しているのは側根である。特に養水分吸収が阻害されることにより植物の生育障害が引き起こされる浸透圧ストレス条件下では、根系の可塑性の発現、言い換えるといかに側根の生長を維持し、養水分の吸収を維持することで地上部への養水分の供給を維持できるかが、生育・生存のための重要な鍵となる。したがって、浸透圧ストレス下での可塑性の発現に大きく寄与する側根形成過程について明らかにすることは、耐浸透圧ストレス品種を育種する上で重要である。

申請者は、浸透圧ストレス下での根の生長とそれに関わる要因について研究を行ってきた。作物の浸透圧調節機能の発現過程と根の伸長の関係 (Ogawa et al., 2006, Plant Prod. Sci., 9: 27-38.), 浸透圧調節に関わる溶質蓄積の経時的変化 (Ogawa et al., 2006, Plant Prod. Sci., 9: 39-46), 浸透圧ストレスが根端分裂組織における細胞数の増加速度に与える影響と根の生長との関係 (Ogawa et al., 2006, Plant Prod. Sci., 9: 56-64.), 浸透圧ストレス下で側根の発生が予定されている部位に Sucrose および Glucose の蓄積が起こる (Ogawa et al., 2005, Plant Prod. Sci., 8: 173-180.) ことを、明らかにした。さらに (1) 側根発生における糖ならびに糖代謝関連酵素の働き の 解 明 (Ogawa et al., 2009 Plant Production Science 12: 9-16.), (2) 側根形成時のオーキシン分配の可視化とその役割の解明 (小川 2010 日本作物学会紀事, 79: 373-376.), (3) トウモロコシ側根原基におけるレーザーマイクロダイセクション法と DNA マイクロアレイ法を用いた浸透圧ストレス条件下での発現遺伝子の差異を明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では遺伝的差異のあるイネ品種群を用いて、浸透圧ストレスに対する耐性程度の違いと、ストレス耐性品種とストレス感受性品種の根の形態学的特徴について明らかにし、さらに選抜した耐性品種と感受性品種を比較して作物水分生理学的、代謝生理学的、分子生物学的特性を網羅的に解明し、ストレス耐性機構を明らかにすることを目的とし

た。

具体的に以下のことに取り組んだ。

(1) 農業生物資源研究所 (NIAS) の世界のイネコアコレクションを含む 59 品種を供試材料に、浸透圧ストレス耐性ならびに感受性品種のスクリーニングを行い根系形態学的特徴の解析。

(2) 水分生理や植物ホルモンの側面からストレス耐性品種と感受性品種の差異を評価。

(3) ストレス耐性と感受性品種間の根系におけるメタボロミクスを用いた代謝変動物質の網羅的解析。

(4) ストレス耐性と感受性品種間でのマイクロアレイ解析を用いた側根原基における発現変動遺伝子の網羅的解析。

(5) ストレス耐性と感受性品種間の塩ストレス条件下での収量性に及ぼす要因の解明。

本研究で取り扱う形態形成やストレス抵抗機構などの複雑な生命現象は、複数の遺伝子やそれをもとにした代謝物質が相互的に貢献し合い発現する形質であると考えられる。しかしこれらの機構解明のために、主に突然変異体の解析を用いて一遺伝子あるいは一物質に注目した解析法が現在主流となっている。この手法では一部の現象についての把握は可能になるが、様々な遺伝子や物質が相互的に関与していると考えられる複雑な生命現象の全体像の把握は困難である。これらの現象の解明には、代謝物質や遺伝子の発現変動に関する情報の全体像を網羅的に捉えた後、詳細な研究に至る研究手法が必要である。

本研究の目的は、浸透圧ストレス条件下でのイネ側根形成機構の解明し、根系での可塑性発現の分子生物学的・作物生理学的バックグラウンドを明らかにすることである。そのために上記の考えを念頭に、包括的な材料から可塑性発現の中心を担う側根形成について耐性ならびに感受性を示すもののスクリーニングを行い、それらの作物水分生理学的特徴を把握した上で、発現遺伝子と代謝物質の変化について網羅的比較解析を行う。この結果、根系での可塑性発現過程について、複数の遺伝子が関与した遺伝子発現機構ならびに代謝機構がマクロな視点から推測でき、その結果をミクロな視点に還元し機能的役割を考察することができる。本研究の成果として、養水分吸収を担う側根形成を中心とする可塑性発現過程から見たストレス耐性育種のための新規重要知見を得ることができ

## 3. 研究の方法

(1) イネにおける浸透圧ストレス耐性の遺伝的変異とそのメカニズムの多面的・網羅的解析

浸透圧ストレス耐性・感受性品種の選抜および根系形質の特徴の解明

供試材料として農業生物資源バンク (NIAS) の世界のイネコアコレクション

のうち54品種と耐乾性品種であるAzucena, IRAT109, Dular, 乾燥ストレス感受性品種であるIR64, 塩ストレス感受性品種のIR28(塩感受性)の合計59品種を用いた。イネ幼植物体を、水耕栽培によって、催芽後14日間栽培した(対照区)。浸透圧ストレス処理のために、ポリエチレングリコール6000を移植後7日目に水耕液に溶かし、水耕液の水ポテンシャルを-0.42 MPaに調整した(ストレス区)。サンプリング後、根系の形態学的形質の測定を行った。ストレス耐性程度を評価するためにストレス区と対照区との比(S/C値)を求めた。

浸透圧ストレス条件下における水分生理や植物ホルモンの側面からストレス耐性品種と感受性品種の差異を評価

(1) - 選抜した浸透圧ストレス耐性品種IR58とストレス感受性品種Basilanonを用い、浸透圧ストレス処理による吸水量、浸透ポテンシャル、イオン含有量、オーキシンならびにアブシジン酸含有量の変化について調査した。

ストレス耐性品種と感受性品種間における浸透圧ストレス条件下での代謝物質変動の差異の網羅的解析

(1) - 選抜した浸透圧ストレス耐性品種IR58とストレス感受性品種Basilanonを用い、浸透圧ストレス処理後1, 3, 7日後における根での代謝物質変動をメタボローム解析により網羅的に解析した。

ストレス耐性品種と感受性品種間における浸透圧ストレス条件下での発現遺伝子変動の差異の網羅的解析

(1) - で選抜した浸透圧ストレス耐性品種IR58と浸透圧ストレス感受性品種Basilanonを用い、と同様の栽培条件を用いてマイクロアレイ法により浸透圧ストレス処理による遺伝子発現変動の網羅的解析を行った。

(2) イネにおける塩ストレス耐性の遺伝的変異とそのメカニズムの多面的・網羅的解析

耐塩性・塩感受性品種の選抜および耐塩性に関与する品種特性の解明

農業生物資源研究所が作成したイネWorld Rice Collectionの56品種に他6品種を加えた合計62品種を供試した。人工気象器内で栽培を行い、定植7日後に50 mM NaClになるよう塩処理を行い、定植14日後に地上部および根乾物重を測定し、JaponicaおよびIndicaから耐塩性品種ならびに塩感受性品種2品種ずつ合計8品種選抜した。耐塩性に関与する品種特性を解明するために、選抜した8品種を供試して、イオン含量、蒸散速度、IAA含量、ABA含量および側根数の品種間差異を調査した。

耐塩性を異にするイネ品種の収量形成とイオン含量の関係

(2) - において選抜した耐塩性の異なる4品種を供試し、温室で28日間育苗を行った後、1/2000 aワグネルポットに移植し、50 mM NaClとなるように塩処理した。定植160日後にサンプリングを行い、収量構成要素およびイオン含量を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) イネにおける浸透圧ストレス耐性の遺伝的変異とそのメカニズムの多面的・網羅的解析

浸透圧ストレス耐性・感受性品種の選抜および根系形質の特徴の解明

地上部乾物重のS/C値は0.931から0.342、値では0.874から0.376と有意な品種間差異を示した。また地上部と根のS/C値の間には有意な相関が認められた。浸透ストレス耐性と感受性の品種をそれぞれ5品種ずつ選抜し、それらの根系形態を詳細に調査した。浸透圧ストレス処理によりL型側根(長く太い側根)の数は、ストレス耐性品種において対照区の1.5-3.6倍に増加したがストレス感受性品種では0.8-0.9倍と僅かに減少した。冠根数とS型側根(短く細い側根)の数は、ストレス処理により両方の品種群で減少したが、減少程度はストレス耐性品種で小さかった。これらの結果は、根系発達の維持、特にL型側根の成長の維持が、浸透圧ストレス条件下での乾物生産の品種間差異に影響することを示唆していた。

浸透圧ストレス条件下における水分生理や植物ホルモンの側面からストレス耐性品種と感受性品種の差異を評価

浸透圧ストレス条件下において感受性品種に比べ耐性品種では吸水量の低下が少なく、根の浸透ポテンシャルの低下が大きく、地上部や根でのオーキシンやアブシジン酸含有量の変化が少なかった。

ストレス耐性品種と感受性品種間における浸透圧ストレス条件下での代謝物質変動の差異の網羅的解析

276の物質(カチオン148, アニオン128)のピークを検出できた。主成分分析の結果、浸透圧ストレス処理によりの有無、またストレス耐性品種と感受性品種の差異により代謝物質が異なる傾向を示していた。KEGG Pathway解析から、ストレス条件においてアミノ酸合成代謝系、リグニン合成につながるフェニルプロパノイド生合成系、デンプンや糖代謝系、ポリアミン代謝系、抗酸化ストレスに関与するグルタチオン代謝系などにおいて、感受性品種に比べ耐性品種で代謝物質の増加が認められた。ストレス条件下で耐性品種ではTCA回路のクエン酸合成酵素の活性が対照区より有意に増加しており、感受性品種では変化がなかったことから、耐性品種で

は積極的にエネルギー合成を行いストレス耐性に寄与していることが示唆された。

ストレス耐性品種と感受性品種間における浸透圧ストレス条件下での発現遺伝子変動の差異の網羅的解析

対照区と比較してストレス処理により IR 58 では7倍以上発現を示した遺伝子が 1278, 1/7 以下に減少した遺伝子が 380 検出された。一方 Basilanon では7倍以上発現を示した遺伝子が 1225, 1/7 以下に減少した遺伝子が 645 検出された。耐性品種は、浸透圧ストレス下において、側根形成を誘導するオーキシンの生合成遺伝子 (Flavin-containing monooxygenase) が感受性品種と比較して 26.4 倍に、また、側根形成開始に必要なであると指摘されている Lateral organ boundaries (LBD) 遺伝子の発現が感受性品種に比べて 3.7 倍に増加していた。これらは耐性品種の L 型側根数が著しく増加していた現象を裏付ける結果である。さらに耐性品種の KEGG pathway 解析から、リグニン合成などの二次代謝系、窒素代謝系、そして解糖系等に属する遺伝子の発現が有意に上昇していることが明らかとなった。二次代謝系では特にリグニン合成に必要な peroxidase が、窒素代謝系では硝酸輸送体が、そして解糖系では Pyruvate decarboxylase や Pyruvate dehydrogenase などの発現が増加した。以上の結果から、浸透圧ストレス下で耐性品種は、根系から積極的に窒素を取り込み、エネルギーを産生し、側根とくに L 型側根の形成を盛んにおこなうことで養水分の獲得を維持していることが明らかとなった。

(2) イネにおける塩ストレス耐性の遺伝的変異とそのメカニズムの多面的・網羅的解析

耐塩性・塩感受性品種の選抜および耐塩性に関与する品種特性の解明

ストレス耐性を示す指標として Stress/Ctrl 比を求めた。地上部および根乾物重の Stress/Ctrl 比は品種により大きく異なった。地上部乾物重と根乾物重の Stress/Ctrl 比の間には有意な相関が見られた。これらの結果から耐塩性品種として Japonica の Jaguary と Khao Nok および Indica の Jhona 2 と Vary Futsi, 塩感受性品種として Japonica の Padi Perak と Ma Sho および Indica の Calotoc と Punulupot 1 の 8 品種を選抜した。地上部のナトリウム含量は Padi Perak は Ctrl と比較して Stress で約 200 倍増加したが、Jhona 2 は約 20 倍の増加に抑制された、根のナトリウム含量は Punulupot 1 は約 10 倍増加したが、Khao Nok は約 80 倍増加した。カリウム含量は耐塩性品種では根で、塩感受性品種では地上部で維持される傾向が見られた。蒸散速度は塩処理により Khao Nok を除いて減少し、塩感受性品種で抑制される傾向が見られた。Jaguary, Khao Nok, Jhona 2 および Pinulupot 1 で全側根

数と細く短い S 型側根数は塩処理の影響を受けなかった。一方、太くて長く高次の側根を発生する L 型側根数は Jaguary および Jhona 2 の 2 品種で塩処理により増加した。地上部および根の ABA 含量は塩処理により Japonica 3 品種では変化しなかったが、他品種では増加した。地上部の IAA 含量は塩処理により Ma Sho, Jhona 2 および Calotoc で増加し、他品種は変化が見られなかった。一方、根はどの品種でも変化が見られなかった。

これらの結果より、塩ストレス応答は品種により異なり、塩ストレスに対する生育の遺伝的多様性が存在することが明らかになった。この結果は耐塩性機構が遺伝的に制御されていることを示唆していた。栄養成長期の耐塩性機構として、根にナトリウムを蓄積することによる地上部へのナトリウム移行の抑制、ABA の合成による蒸散速度の制御、L 型側根形成の促進による根圏の拡大を通じた養水分吸収の維持が示された。またこれらは品種により異なり、同時に複数の耐塩性機構が存在することが考えられた。

耐塩性を異にするイネ品種の収量形成と生理的反応の関係

穂数は塩処理により減少したが、品種間差異は見られなかった。1 穂粒数、登熟歩合および 1000 粒重は塩処理による減少と品種間差異が見られた。耐塩性品種は塩感受性品種と比較すると登熟歩合と 1000 粒重の減少度が小さかった。また 1 穂粒数と登熟歩合では品種×処理の交互作用が見られた。収量構成要素とイオン含量について主成分分析を行うと、第 1 主成分が止葉および稈のナトリウム含量、第 2 主成分が 1 穂粒数に関する形質であった。

これらの結果より、収量形成時では、カリウムとカルシウムの積極的な吸収がナトリウムの蓄積抑制に貢献し、登熟歩合および 1000 粒重の形成に必要な穎花分裂期から減数分裂盛期の耐塩性に寄与していることが示唆された。

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 8 件)

・ M. Matsunami, T. Matsunami, K. Kon, A. Ogawa, I. Kodama, and M. Kokubun (2013) Genotypic variation in nitrogen uptake during early growth among rice cultivars under different soil moisture regimes. *Plant Production Science* 16: 238-246

・ S. Takahashi, Rui Sato, M. Takahashi, N. Hashiba, A. Ogawa, K. Toyofuku, T. Sawata, Y. Ohsawa, K. Ueda, H. Wabiko (2013) Ectopic localization of auxin and cytokinin in tobacco seedlings by the plant-oncogenic AK-6b gene of *Agrobacterium tumefaciens* AKE10. *Planta*

238: 753-770.

・ K. Toyofuku, M. Matsunami, and A. Ogawa Genotypic variation in osmotic stress tolerance among rice cultivars and its association with L-type lateral roots development. Plant Production Science. accepted

・ Atsushi Ogawa, Sakiko Shirado and Kyoko Toyofuku (2012) Comparison of effect of salt stress on the cell death in seminal root and lateral root of rice seedlings by the modified TUNEL method. Plant Root 5-9.

・ Maya Matsunami, Toshinori Matsunami, Atsushi Ogawa, Kyoko Toyofuku, Ikuko Kodama and Makie Kokubun (2012) Genotypic Variation in Biomass Production at the Early Vegetative Stage among Rice Cultivars Subjected to Deficient Soil Moisture Regimes and Its Association with Water Uptake Capacity. Plant Production Science 15: 82-91

・ Shelley, I. J., S. Nishiuchi, K. Shibata and Y. Inukai (2013) SLL1, which encodes a member of the stearyl-acyl carrier protein fatty acid desaturase family, is involved in cell elongation in lateral roots via regulation of fatty acid content in rice. Plant Cell 207: 12-17

・ Thiem Thi Tran, Mana Kano-Nakata, Moe Takeda, Daniel Menge, Shiro Mitsuya, Yoshiaki Inukai and Akira Yamauchi. (2014) Nitrogen application enhanced the expression of developmental plasticity of root system triggered by mild drought stress in rice. Plant and Soil 378: 139-152.

・ Jonathan M. Niones, Yoshiaki Inukai, Roel R. Suralta and Akira Yamauchi (2015) QTL associated with lateral root plasticity in response to soil moisture fluctuation stress in rice. Plant and Soil 391: 63-75.

[学会発表](計12件)

・ 豊福 恭子, 野下 浩二, 小川 敦史 浸透圧ストレスと窒素欠乏の複合ストレス下におけるイネ幼植物体根系の生理形態学的研究 第234回日本作物学会講演会 2012年9月10日 東北大学

・ 天野 寿紀, 豊福 恭子, 松波 麻耶, 森田 弘彦, 小川 敦史 浸透ポテンシャルとNa/K比に着目したイネの塩ストレス反応の品種間差異 第234回日本作物学会講演会 2012年9月10日 東北大学

・ 松波 麻耶, 豊福 恭子, 小川 敦史, 石川(桜井)淳子, 国分 牧衛 浸透圧ストレスに対するイネ根系発育の可塑性およびアクアポリン遺伝子発現の品種間差異 第234回日本作物学会講演会 2012年9月10日 東北大学

・ Y. Inukai, Y. Kitomi, H. Inahashi, M. Nakata-Kano, J. Niones, R. Suralta and A.

Yamauchi. Key root traits and useful genes on rainfed lowland rice breeding for water stress avoidance. 8th symposium of the International Society of Root Research 2012年6月 Dundee, Scotland

・ 天野 寿紀, 豊福 恭子, 松波 麻耶, 森田 弘彦, 小川 敦史 塩ストレス条件下におけるイネの水分生理特性の品種間差異 日本作物学会第236回講演会(鹿児島大学) 2013年9月11日

・ 豊福 恭子, 松波 麻耶, 永澤 信洋, 小川 敦史 イネ初期栄養成長における浸透圧ストレス耐性の遺伝的変異と根系形態特徴 第39回根研究会 2013年11月9日-10日

・ 稲橋 宏樹・山内 卓樹・小川 敦史・犬飼 義明 OsPIN2 遺伝子によるイネの側根形成制御機構 日本育種学会 2013年10月13日~2013年10月14日 鹿児島大学

・ 柴田 晃秀, 柴田 恭佑, 西内 俊策, 稲橋 宏樹, 犬飼 義明 イネ QHB タンパク質の相互作用および下流制御因子の探索 第126回日本育種学会講演会 2014年09月26日~2014年09月27日 南九州大学

・ Shelley Israt Jahan, 渡邊 紗哉華, 永澤 信洋, 小川 敦史, 北野 英己, 犬飼 義明 イネの根端分裂組織の維持に関わる rrl3 突然変異体の解析 第126回日本育種学会講演会 2014年09月26日~2014年09月27日 南九州大学

・ 佐藤(永澤) 奈美子, 永澤 信洋, 長戸 康郎 栄養生長を続ける新規イネ突然変異体の解析 第127回日本育種学会 2015年03月22日~2015年03月23日 玉川大学

・ 豊福 恭子, 松波 麻耶, 小川 敦史 イネにおける浸透圧ストレス耐性の遺伝的変異と発現変動遺伝子の網羅的解析 第42回根研究集会 2015年06月06日 秋田県立大学

・ 小川 敦史, 松波 麻耶, 豊福 恭子 イネにおける浸透圧ストレス耐性の遺伝的変異と代謝物質変動の網羅的解析 第42回根研究集会 2015年06月06日 秋田県立大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 敦史 (OGAWA ATSUSHI)  
秋田県立大学 生物資源科学部 准教授  
研究者番号: 30315600

### (2) 研究分担者

犬飼 義明 (INUKAI YOSHIAKI)  
名古屋大学 農学国際教育協力研究センター 准教授  
研究者番号: 20377790

永澤 信洋 (NAGASAWA NOBUHIRO)  
秋田県立大学 生物資源科学部 准教授  
研究者番号: 90599268

野下 浩二 (NOGE KOJI)

秋田県立大学 生物資源科学部 助教  
研究者番号：40423008