

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780019

研究課題名(和文)ダイズ耐湿性の光制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of light-controlled flooding tolerance mechanism in soybean seedling

研究代表者

南條 洋平 (NANJO, Yohei)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所 畑作物研究領域・主任研究員

研究者番号：70457381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：日本におけるダイズは主に水田転換畑で栽培される。播種期が梅雨期と重なる事情から発芽から出芽にかけての幼苗期に湿害の被害を受けやすい。本研究では冠水下のダイズ芽生えへの光照射によって耐湿性が向上する現象に着目し、その機構解明を目指した。解析の結果、冠水下のダイズ芽生え幼根において解糖、発酵の酵素が光により調節を受け、これらが耐湿性の制御に関わることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：In Japan, soybean is cultivated in paddy field. Flooding injury on soybean is often occurred in rainy season. This research aimed to clarify a mechanism of light-induced enhancement of flooding tolerance of soybean seedling. Analysis of light-induced physiological change showed that enzymes in glycolysis and fermentation are regulated by light under flooding, suggesting that the enzymes are involved in regulation of flooding tolerance of soybean seedling.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：作物学・雑草学

キーワード：ダイズ 湿害 耐湿性 光 黄化芽生え 解糖

### 1. 研究開始当初の背景

日本におけるダイズは主に水田転換畑で栽培されることおよび播種期が梅雨期と重なる事情から発芽から出芽にかけての幼苗期に湿害の被害を受けやすい環境に置かれる。この時期の湿害は、致死による欠株を引き起こすばかりでなく、その後の生育にも悪影響を及ぼし、結果として収量の減少を引き起こす。また現状では湿害耐性(耐湿性)を示す有望な栽培品種はなく、耐湿性品種の育成が望まれている。耐湿性品種の育成に資することができる育種素材の開発のために耐湿性を制御しうる鍵遺伝子の導入・欠失のような遺伝子工学的・逆遺伝学的手法を用いることが一つの手段であり、これを遂行するためには、湿害の発生および回避の機構の解明が必要である。しかしながら、このダイズ幼苗期の湿害に関する知見は乏しく、その発生機構も未解明である。この湿害の発生機構を解明するため、申請者は幼苗期のダイズが冠水した時のタンパク質および遺伝子発現の変動を解析してきた(Nanjo et al., 2010, 2011)。これらの解析により明らかとなった冠水により発現変動するタンパク質および遺伝子の関わる代謝と湿害の関連を明確にする必要があったが、生理実験に適した湿害の明確な評価系が確立されていなかった。ダイズの湿害研究では、結果の不安定性から評価系が確立されておらず、このことが研究進展の妨げとなっていた。そこで申請者は幼苗期ダイズにおける湿害の評価系の確立を行った。この評価系確立の過程で、ダイズの生長度、光、冠水の水量などが湿害発生に大きく影響することを突き止め、この中でも、冠水中のダイズへの光照射が耐湿性を向上させることを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究は、冠水下のダイズが光を受けることによって耐湿性が向上する現象に関わる機構および因子を明らかにすることを目的とする。網羅的解析により同定される候補遺伝子・タンパク質群から耐湿性に関わる遺伝子・タンパク質を選抜する。本研究により耐湿性を向上するための新規な機構を明らかにし、遺伝子工学的手法または逆遺伝学的手法による育種素材開発のための基盤情報とする。

### 3. 研究の方法

冠水下のダイズが光を受けた時に発現変動を示すタンパク質および遺伝子をプロテオームおよびトランスクリプトーム解析により網羅的に解析・同定する。発現変動が確認されたタンパク質・遺伝子の調節を受ける代謝系に対する阻害剤や関連代謝物添加による影響を、その関連タンパク質・遺伝子の発現レベルとともに申請者が確立した評価系により調べ、耐湿性向上に関わる代謝系およびその調節に関わるタンパク質・遺伝子の

候補を選抜することを目指す。

(1) トランスクリプトーム解析による変動遺伝子の同定

ダイズ種子を播種して2日間暗所で生育させた幼苗期の黄化芽生えダイズを暗所(24時間暗期)または明所(16時間明期/8時間暗期)で2日間冠水処理を行い、ダイズ芽生えの幼根からそれぞれ全RNAを抽出し、マイクロアレイ技術により冠水下で光により発現変動を示す遺伝子を同定する。マイクロアレイ解析には、ダイズゲノム情報を基にした全遺伝子をカバーするカスタムアレイを作製し、比較解析を行う。

(2) プロテオーム解析による変動タンパク質の同定

ダイズ種子を播種して2日間暗所で生育させた幼苗期の黄化芽生えダイズを暗所(24時間暗期)または明所(16時間明期/8時間暗期)で2日間冠水処理を行い、ダイズ芽生えの幼根からタンパク質を抽出し、比較プロテオーム解析により冠水下で光により発現変動を示すタンパク質を同定する。さらに、通常のプロテオーム解析で見落とされがちな低含量タンパク質をCombinatorial Peptide Ligand Libraries Beadsを用いて濃縮し、比較解析を行う。

(3) バイオインフォマティクス解析

プロテオーム解析およびトランスクリプトーム解析により同定された発現変動するタンパク質・遺伝子群の情報を統合し、バイオインフォマティクスの手法によりそれらの機能に関する情報を併せて解析を行い、冠水下で光により変動の起こるタンパク質・遺伝子またその代謝系を同定する。またそれを制御しうるタンパク質・遺伝子群を推定する。

(4) 湿害評価系を利用した生理実験による評価

申請者の確立した湿害評価系を利用して上述の解析により同定または推定された代謝系および関連するタンパク質・遺伝子の阻害剤またはその代謝物添加等による湿害の程度を調べ、耐湿性との関わりを評価する。

以上の解析結果を総合して冠水下で光制御を受けるタンパク質・遺伝子群また関連する代謝系を明らかにするとともに、耐湿性向上に関わる機構および関連するタンパク質・遺伝子群を同定する。

### 4. 研究成果

(1) 耐湿性向上効果とダイズの酸素消費

湿害評価系を用いてダイズ黄化芽生えを明所および暗所で冠水し耐湿性向上効果の確認を行った。はじめに暗所および明所で5日間冠水した後に3日間栽培した後のダイズを観察したところ、生育がみられない、子葉の緑化はみられるが伸長しない、根の脱落、

子葉の脱落、胚軸・根の褐変の症状がみられた。これらの症状がなく正常な生育を示すダイズの割合を調べたところ、その割合は明所で冠水したダイズで顕著に高いことが確認された(図1)。次に冠水下ダイズの明所・暗所における酸素消費を調べるため、冠水液中の溶存酸素濃度の変化を解析した。黄化ダイズ芽生えおよび脱黄化ダイズ芽生えを用いて調べた結果、脱黄化ダイズを明所で冠水した際には冠水後1日後から大きな溶存酸素消費はみられないのに対し、黄化ダイズでは明所・暗所ともに溶存酸素を消費し続けていた(図2)。また明所・暗所間で顕著な違いはなかった。このことは、脱黄化ダイズは冠水下でも光があれば光合成により酸素を発生してそれを利用しており、一方で黄化ダイズは冠水下では光を受けても光合成が出来ず溶存酸素を吸収・消費を続けていると考えられた。冠水下の黄化ダイズに光を照射しても光合成の必須要素であるクロロフィルの蓄積がみられないことも確認された。

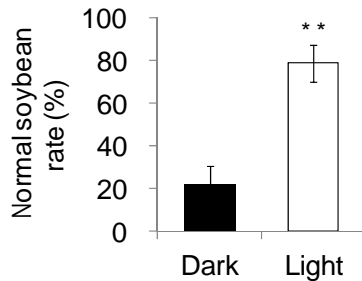


図1 暗所・明所で冠水した後に正常な生育を示すダイズの割合

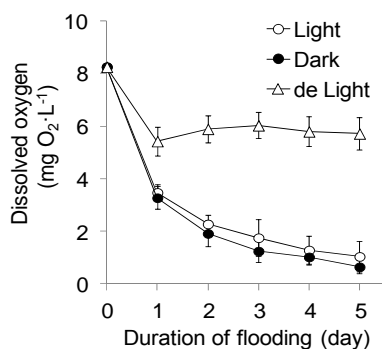


図2 明所・暗所冠水下での黄化ダイズの溶存酸素消費と明所冠水下での脱黄化ダイズ(de)の溶存酸素消費

## (2) 冠水下黄化ダイズ幼根における代謝変動

トランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析により冠水下で光により変動する mRNA およびタンパク質を同定した。冠水のようなストレス条件下では多くの mRNA の蓄積が観察されるが、その全てが翻訳されないことが知られている。このことから mRNA

およびタンパク質、両者で同様の変化が起こっているものを絞り込み、光により変動の起こる代謝に関わる mRNA・タンパク質とした。絞り込まれた mRNA・タンパク質の情報を基にバイオインフォマティクス解析をした結果、冠水下で光により解糖、発酵、アミノ酸、ヌクレオチド代謝や酸化還元システム、糖・硫酸塩輸送などの一部が制御されることが分かった(図3)。

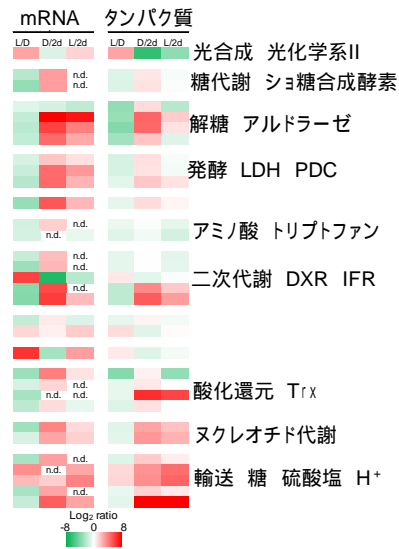


図3 冠水下で光により変動する mRNA とタンパク質：明所と暗所、暗所と冠水前、明所と冠水前の比較結果を示す。

## (3) 冠水下ダイズにおける解糖・発酵の光による変化

解糖・発酵が光により制御を受けることを確認するため、冠水下のダイズ幼根中の糖含量および冠水液中にダイズから放出されるエタノールを測定した。その結果、光により糖、エタノールの分解・生成がそれぞれ光により制御を受け、抑制されることが確認された(図4、5)。

この結果から冠水下のダイズ中で誘導される解糖・発酵の促進が光により mRNA 転写の過程から制御を受けて抑制されていることが明らかになった。

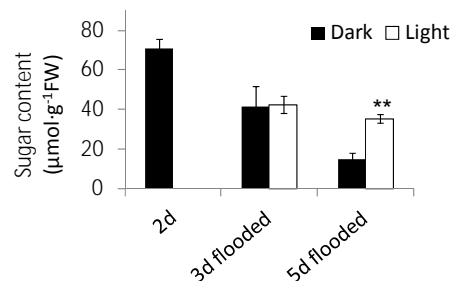


図4 冠水下のダイズ幼根中の糖含量

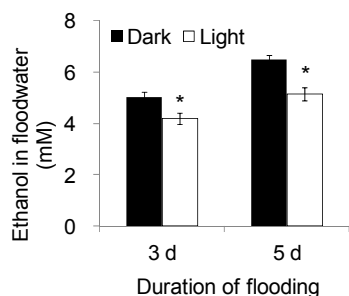


図5 冠水時の冠水液中のエタノール濃度

#### (4) 解糖の抑制と耐湿性向上の関係

観察された解糖の抑制が耐湿性に与える影響を明らかにするため暗所下で解糖系酵素の阻害剤を冠水液中に添加する生理実験を行った。その結果、解糖系酵素の穏やかな阻害により暗所における冠水で発生する障害の軽減が観察された。冠水下で誘導される解糖は、ダイズが冠水下という低酸素の環境下でエネルギーを得るために必須の代謝である。穏やかに抑制をかけることで、幼苗期のエネルギー源である糖の温存を促進すること、解糖によって生じる毒性のある副産物生成を抑制することなどが耐湿性向上に貢献している可能性が考えられる。このことについてはさらなる検証が必要である。

以上本研究から得られた結果は、解糖を調節することが耐湿性を制御する上で重要であることを示唆しており、このことは今後ダイズの耐湿性向上を図っていく上で有用な基盤的情報になると思われる。

#### 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)

[雑誌論文](計 1件)

Yohei Nanjo, Takuji Nakamura, Setsuko Komatsu, Identification of indicator proteins associated with flooding injury in soybean seedlings using label-free quantitative proteomics, Journal of Proteome Research 2013, 12, 4785-4798 DOI: 10.1021/pr4002349 (査読有)

[学会発表](計 5件)

南條洋平、Hee-Young Jang、Hong-Sig Kim、平賀勸、Sun-Hee Woo、小松節子、ダイズ品種の冠水耐性とプロテオームの比較解析、第55回日本植物生理学会年会、2013年3月18-20日、富山大学  
Yohei Nanjo, Kyonoshin Maruyama, Setsuko Komatsu, Analysis of mechanism for light irradiation-mediated enhancement of soybean flooding tolerance by comparative proteomics and transcriptomics, HUP0 12th Annual World Congress, 2013年9

月14-18日、パシフィコ横浜

南條洋平、プロテオーム解析技術の植物研究への利用、第31回日本植物細胞分子生物学会大会、2013年9月10-12日、北海道大学

南條洋平、中村卓司、小松節子、Flooding injury on soybean seedlings is associated with induction of cell wall proteins, 第54回日本植物生理学会年会、2013年3月20-23日、岡山大学

南條洋平、中村卓司、小松節子、ダイズ芽生え中の湿害関連タンパク質の同定、日本プロテオーム学2012年大会、2012年7月26-27日、日本科学未来館 東京

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

南條 洋平 (NANJO, Yohei)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所 畑作物研究領域 主任研究員

研究者番号：70457381