

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：23401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25850006

研究課題名(和文) イネの根の酸素通気はアブシシン酸によってどのように制御されるか？

研究課題名(英文) How abscisic acid regulates a formation of barrier to ROL in rice?

研究代表者

塩野 克宏 (SHIONO, Katsuhiko)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：20610695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：水田転換畑での畑作物の湿害回避が求められている。しかし、耐湿性メカニズムには未解明な部分が多く、耐湿性品種の作出が困難な状況にある。イネなどの湿生植物がもつROLバリアは耐湿性の重要形質であるが、その誘導機構は不明である。本研究ではイネのROLバリアの形成へのABAの関与を検証し、ROLバリアがABAを介したスベリン化により誘導されることが分かった。さらに、畑作物でも同様なメカニズムが保存されているかを調べたところ、外生ABAはオオムギにROLバリアを付与した。このことから、畑作物へのバリア機能の付与にはABAよりも上流にあるシグナル伝達や環境因子のセンシング機構が重要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Breeding of waterlogging tolerant crops is required for improvement of quality and production in the converted field from paddy in Japan. But, it is difficult to breed such a waterlogging tolerant crop because of the knowledges of waterlogging tolerance are limited. Barrier to radial oxygen loss is one of the key strategies for wetland plants to acclimate to waterlogged conditions. But, it is not known how to regulate the barrier formation under waterlogged conditions. Here, we identified abscisic acid (ABA) as inducer of hypodermal suberization and an ROL barrier in rice. Additionally, in barley that does not form barrier in natural, we succeed to make functional barrier to ROL in barley by an application of exogenous ABA. Our results imply the impotence of ABA localization and/or upstream signaling of ABA to give a function of ROL barrier in crops.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：ROLバリア 洪水 耐湿性 育種学 湿害 ストレス スベリン 低酸素

1. 研究開始当初の背景

我が国は食料自給率の向上を目的に水田転換畑での畑作物の栽培を推進しているが、長雨の排水不良による湿害が大きな問題となっている。畑作物の栽培品種の中には耐湿性の高いものがないだけでなく、耐湿性のメカニズムには未解明な部分が多い。そのため、耐湿性品種の作出が困難な状況にある。

土壌から水が適切に排水されない場合に、土壌は嫌気状態になる。オオムギ、コムギなどの畑作物の多くは根に通気組織をつくり拡散を駆動力にした酸素通気をおこなう。しかし、根端へ移動する酸素の30~40%が土壌へ漏出する(この酸素漏出を Radial Oxygen Loss (ROL)と呼ぶ)ため、成長点のある根端部へ供給される酸素量が減少し、根の伸長の停止や障害が生じる。それに対して、耐湿性の高いイネは、基部の通気組織の外側(外皮)に、過湿環境に誘導的な酸素漏出の障壁となるバリア(ROL バリア)を形成する。ROL バリアが形成されることによって、イネは酸素を根端まで届け、嫌気状態となった過湿土壌で根を伸長させることができる(Armstrong et al., Ann Bot, 86: 687-703, 2000)。このように植物の耐湿性には根端への酸素運搬が必須であるが、これには通気組織の形成だけでは十分でなく、ROL バリアを形成して根端まで効率的に酸素を供給することが重要である。湿生植物が ROL バリアを形成する現象が確認されてから 50 年が経過したものの、それに関連する遺伝子や植物ホルモンは未だに特定されていなかった。本研究の開始に先立ち、申請者は ROL バリア形成に植物ホルモンの一つであるアブシシン酸 (ABA) が関与する予見的なデータを得ることに成功していた。

2. 研究の目的

本研究課題ではまず、イネが持つ耐湿性の重要形質である ROL バリア形成を ABA が制御するのかどうかを検証する。さらに耐湿性の低いオオムギで同様な ABA を介したバリア形成機構が維持されているかどうかを調べる。これを通じて、ABA を介した ROL バリア形成の制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) イネにおける ABA を介した ROL バリア形成の証明

申請者の予見的な研究により、イネの ROL バリア形成に ABA が関与することが示唆されていたが、データに厚みがなく、証明に至っていなかった。そこで、イネの ROL バリア形成に ABA が関与することを証明することとした。

イネは好気条件では ROL バリアを形成せず、嫌気還元条件にしてはじめてバリアを誘導的に形成する。イネの野生型を用いて ABA を外生的に与えた場合と、ABA の生合成阻害剤であるフルリドンを追加して栽培した場合の ROL バリア形成をメチレンブルー染色

法で調べた。ABA 生合成に関わる ZEP1 遺伝子が破壊された、イネ変異体 (*oszep1*) を用いて、各種条件で ROL バリア形成能力を調べた。この際、メチレンブルー染色法だけでなく根の酸素漏出量を定量できる円筒型酸素電極法を合わせて評価に用いた。また各種条件で栽培したイネの根を回収し、ROL バリアの構成成分と言われている、スベリンをフロロイエロー 088 法にて染色した。

ABA が正に ROL バリア形成に関与することを確かめるために、バリア形成をしている組織の ABA 量を LC-MS/MS で定量した。また、遺伝子発現レベルで ABA の蓄積を予想した。これには、申請者が以前実施した、レーザーマイクロダイセクションにより ROL バリアを形成している根の表皮側の組織のみを回収し、マイクロアレイにて網羅的な発現解析をしたデータを用いた。

さらに、先述のマイクロアレイデータ解析により同定した ROL バリア形成に関わる 98 個の遺伝子が、外生 ABA により発現上昇するのかについて、遺伝子発現プロファイリングデータベースである RiceXPro を用いて再解析した。

(2) イネにおける ABA 非感受性変異体スクリーニング

ABA が ROL バリアを形成することが分かってきたものの、どのような調節機構が ABA の下流に存在するのかはわからない。申請者らは ABA 非感受性のイネ変異体の中に ROL バリアを形成しないものがいた場合には、ROL バリア形成に関わる ABA シグナリングが明らかになると考えた。その仮定に基づいてイネにおける ABA 非感受性変異体のスクリーニングを実施した (MNU 処理をした M2 世代、約 600 の変異体系統)。

(3) オオムギに欠けているバリア形成機構の特定

オオムギは ROL バリアを形成することができない、耐湿性の低い畑作物の代表である。本研究ではオオムギのような畑作物に ROL バリア機能を付与することを最終目標としてイネの ROL バリア制御機構を調査している。本研究でイネの ROL バリア形成には ABA が関わるということが分かってきた。そこで、オオムギに外生 ABA を投与して栽培した場合に、外皮がスベリン化されるのか? また、ROL バリアを形成するのか? について調べた。これにより、イネにあってオオムギにない、ROL バリアの形成に必要な因子を考察した。

4. 研究成果

まず、ABA がイネの ROL バリア形成にどのように関わるのかについて評価した。イネは嫌気還元条件で ROL バリアを形成する。しかし、ABA の生合成阻害剤であるフルリドンを投与したところ、バリアを形成した根の出

現率が著しく低下した。また、イネは好気的な条件でROLバリアを形成することはない。このような好気条件にあるイネにABAを投与すると、外皮のスベリン化をともなったROLバリアを形成した。続いて、植物ホルモンや阻害剤による二次的な影響を排除するために、ABAの生合成変異体である *oszepl* のROLバリア形成を評価した。先の結果を支持するように、*oszepl* では嫌気還元状態で栽培した場合にもROLバリアを形成できなかった(図1A)。さらに、ROLバリアは外生ABAの投与によって復帰した。この結果とリンクするように、根の外皮のスベリン化も外生ABAの投与により復帰した(図1B)。

ROLバリアを形成している際に根のABA量が増えるのかどうかを、LC-MS/MSによるABAの定量により確認した。その結果、バリア形成中の根におけるABA量の増加は見られなかった。3回にわたって、測定を繰り返したものの、根全体のABA量の変動はない、またはバリア形成中に低下するという結果であった。ABAの存在量が外皮周辺組織特異的に増加している可能性があるため、組織特異的な遺伝子発現解析によりABAの動態を推定することとした。バリアを形成している外皮周辺組織におけるABA生合成、ABA分解系の遺伝子の発現パターンをレーザーマイクロダイセクション・マイクロアレイ分析結果から調べたところ、生合成の遺伝子発現は増加傾向にあるのに対して、分解系の遺伝子発現は低下していた。これらの遺伝子発現の結果は外皮周辺組織でABAが増加することを示唆している。

さらにABAがROLバリア形成を誘導することを遺伝子発現レベルで考えるために、ROLバリア合成に関わる98個の遺伝子が外生ABAにより誘導されるかどうかをRiceXProで解析した。その結果、スベリン生合成に関わるほとんどの遺伝子が外生ABAによって数時間のうちに発現が高められることがわかった。以上の結果はイネにおいてABAを介したスベリン化、ROLバリア形成がされていることを示している。

このようなABAを介したROLバリア制御に関与するABAシグナル伝達系の遺伝子を単離すべく、ABA非感受性変異体のスクリーニング、既知のABA非感受性変異体でのROLバリアの評価をしたものの、残念ながら期間内にそのような変異体を見出すことはできなかった。

本研究が最終的に目指すものはオオムギのような畑作物にROLバリア機能を付与することで耐湿性を強化することである。そこで、オオムギにABAを介したROLバリア形成能力があるのかを調べた。オオムギは自然状態では、根の外皮をスベリン化することはない、ROLバリアを形成しない。好気条件で栽培するオオムギに外生的にABAを投与したところ、驚くべきことにROLバリアを形成した。それだけでなく、外皮のスベリン化も確認す

ることができた。このことから、オオムギもABA下流の外皮をスベリン化し、ROLバリアを誘導する機能を保持することが分かった。

本研究を通じて、イネのROLバリアがABAを介したスベリン化により誘導されることが明らかになった。それだけでなく、イネとオオムギのROLバリアの形成制御機構の違いはABAの蓄積やそれよりも上流にあるシグナル伝達や環境因子のセンシング機構にあると予想することができた。

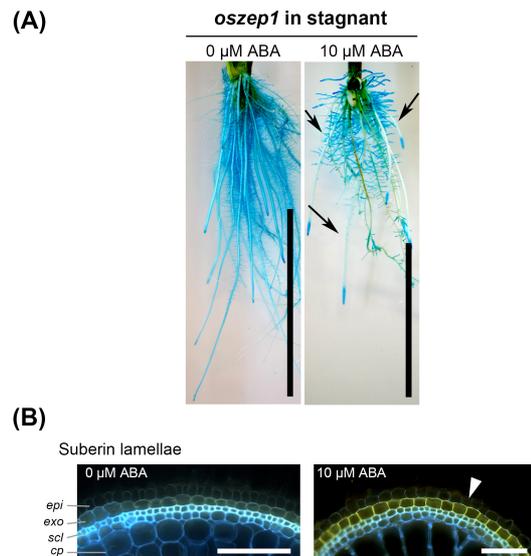


図1. 嫌気還元条件で栽培した *oszepl* のROLバリア形成と外皮のスベリン化。(A)メチレンブルー染色によりROLバリアを可視化した。矢印がROLバリア形成をしている根。メチレンブルーは酸素があると青色を、酸素がないと無色透明(B)スベリン染色。スベリンは黄色の蛍光を呈する(矢頭)。

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4件)

- ① 塩野克宏. ROLバリア: 湿生植物の過湿状態の土壌への適応を支えるしくみ. 根の研究 (査読有) 25(3): 47-62 (2016). DOI: <http://doi.org/10.3117/rootres.25.47>.
- ② Katsuhiko Shiono, Miho Ando, Shunsaku Nishiuchi, Hirokazu Takahashi, Kohtarō Watanabe, Motoaki Nakamura, Yuichi Matsuo, Naoko Yasuno, Utako Yamanouchi, Masaru Fujimoto, Hideki Takanashi, Kosala Ranathunge, Rochus B. Franke, Nobukazu Shitan, Naoko K. Nishizawa, Itsuro Takamura, Masahiro Yano, Nobuhiro Tsutsumi, Lukas Schreiber, Kazufumi Yazaki, Mikio Nakazono, Kiyooki Kato.

RCN1/OsABCG5, an ATP-binding cassette (ABC) transporter, is required for hypodermal suberization of roots in rice (*Oryza sativa*). (査読有) The Plant Journal 80(1): 40-51 (2014). DOI: 10.1111/tpj.12614.

- ③ Katsuhiko Shiono, Takaki Yamauchi, So Yamazaki, Bijayalaxmi Mohanty, Al Imran Malik, Yoshiaki Nagamura, Naoko K. Nishizawa, Nobuhiro Tsutsumi, Timothy D. Colmer, Mikio Nakazono. Microarray analysis of laser-microdissected tissues indicates the biosynthesis of suberin in the outer part of roots during formation of a barrier to radial oxygen loss in rice (*Oryza sativa*). Journal of Experimental Botany (査読有) 65(17): 4795-4806 (2014). DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eru235>.
- ④ Katsuhiko Shiono, Sumiyo Yamada. Waterlogging tolerance and capacity for oxygen transport in *Brachypodium distachyon* (Bd21). Plant Root (査読有) 8: 5-12 (2014). DOI: <http://doi.org/10.3117/plantroot.8.5>.

[学会発表] (計7件)

- ① 塩野克宏, 吉川真理奈, 山田淑葉, 端崎里帆, 緒方是嗣, 山本卓志, 北條優子, 松浦恭和, 森泉, 平修, 吉岡俊人. 耐湿性の重要形質であるイネの酸素漏出バリアは ABA によって制御される. 日本育種学会第 131 回講演会, 名古屋大学 (愛知県・名古屋市), 2017 年 3 月 29 日-30 日.
- ② 塩野克宏, 吉川真理奈, 山田淑葉, 北條優子, 松浦恭和, 森泉, 吉岡俊人. アブシシン酸はイネの ROL バリア形成に必要である. 第 45 回根研究集会, 岡山大学 (岡山県倉敷市), 2016 年 9 月 30 日-10 月 1 日.
- ③ 塩野克宏. 植物はどのような根を形成して過湿状態の土壌に適応するのか? 第 127 回 日本森林学会大会 企画シンポジウム「樹木根の成長と機能」, 日本大学生物資源学部 (神奈川県・藤沢市), 2016 年 3 月 28 日. 招待講演
- ④ 塩野克宏. イネ科植物の根と耐湿性に関する研究. 第三回ブラキポディウムワークショップ, (独)理化学研究所横浜キャンパス (神奈川県・横浜市), 2015 年 3 月 5 日. 招待講演
- ⑤ Katsuhiko Shiono. Identification of a plant hormone involved in the formation of a barrier against radial oxygen loss in rice. 4th International Rice Congress. Bangkok, Thailand, 29-31 October 2014. 招待講演
- ⑥ Katsuhiko Shiono, Marina Yoshikawa, Sumiyo Yamada, Yuko Hojo, Takakazu Matsuura, Toshihito Yoshioka, Izumi C. Mori. Identification of plant hormone to regulate a barrier against radial oxygen loss in rice (*Oryza sativa*). 11th International conference of the International Society for Plant Anaerobiosis, Los Baños, Philippine. 6-11th October 2013.
- ⑦ Katsuhiko Shiono, Marina Yoshikawa, Sumiyo Yamada, Yuko Hojo, Takakazu Matsuura, Toshihito Yoshioka, Izumi C. Mori. Abscisic acid induced a diffusion barrier of oxygen at the outer part of roots in rice (*Oryza sativa*). International Symposium on Plant Apoplastic Diffusion Barriers: Biosynthesis and Functions. Lausanne, Switzerland, 4-6th September 2013.

[その他]
ホームページ等

研究室 HP
<http://www.s.fpu.ac.jp/kankyo/Home/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩野 克宏 (SHIONO, Katsuhiko)
福井県立大学・生物資源学部・准教授
研究者番号：20610695