

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450017

研究課題名(和文) 水稲直播栽培の高位安定化 - 中茎のアブシジン酸による伸長促進と突然変異系統の探索 -

研究課題名(英文) Stimulating effects of abscisic acid (ABA) on the rice mesocotyl and exploring the mutants with elongating mesocotyl

研究代表者

渡邊 肇 (Watanabe, Hajime)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：10292351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アブシジン酸(ABA)の中茎伸長作用におけるメカニズムやABA処理が直播水稲の生育に及ぼす影響を検討した。ABA処理により、種子中の乾物量の減少が少なく、澱粉分解酵素の活性が低かったことから、ABAによる中茎の伸長の際には、胚乳養分の利用効率が高いことが示唆された。ABA処理により細胞成長に関する遺伝子の発現量の増加がみられた。突然変異処理で得られた後代は、未発芽の種子が多く、発芽しても中茎は伸長しなかった。ABA処理により、催芽や初期生育が不揃いであったが、処理籾の中には中茎の伸長個体があり、現在、より安定的な処理法を検討中である。

研究成果の概要(英文)：We investigated physiological mechanism underlying rice mesocotyl elongation treated by abscisic acid (ABA), and the effects of ABA application on growth of direct-seeded rice. The endosperm nutrient use efficiency was higher by ABA treatment than those of control. The expression levels of genes relating cell elongation were increased by ABA treatment. Mutation treatment with gamma ray resulted in occurrence of un-germinated progeny seeds. The germination and early growth of direct-seeded rice treated with ABA during soaking processes were unstable. Stable and efficient application methods of ABA regarding growth of direct-seeded rice are now in progress.

研究分野：農学・生産環境農学・作物生産科学

キーワード：作物学 直播栽培 イネ アブシジン酸 出芽

1. 研究開始当初の背景

我が国の稲作は、国際化への対応や、国内では、農業従事者の高齢化、後継者不足、米消費量の減少が深刻化している。このような稲作をとりまく状況で、省力・低コストな直播栽培が期待されている。しかし、現在の我が国の稲作では、直播栽培の普及率は低い。直播栽培の普及・拡大には、出芽・苗立ち率の向上が重要である。

我々は、直播栽培の初期生育の促進を目標に、イネ幼植物の生育に関する組織形態と生理的要因を解析してきた。その中で、アブシジン酸 (ABA) が、中茎の伸長を促進することを明らかにした。中茎の伸長は、直播栽培での出芽率向上に重要である。しかし、ABAによる中茎伸長促進のメカニズムの解析や遺伝解析、ABA処理によるイネの生育過程を検討する必要がある。

他方、これまでの水稻品種育成において、突然変異育種の貢献は大きく、ガンマ線等の放射線照射による突然変異の誘発は、実際の品種育成に活用されている。一般に、中茎は日本型品種で伸長量が極めて小さく日本型稲で中茎の伸長がみられる突然変異系統を探索するのは有効である。本研究は、直播水稻の初期生育の高位安定化を通して、我が国における本栽培の普及を目標としたものである。

2. 研究の目的

本研究では、イネの中茎におけるアブシジン酸 (ABA) の伸長促進作用の生理的機構を明らかにすると共に、中茎伸長の遺伝的機構を探索し、直播栽培における初期生育の促進がみられる栽培技術の開発や品種育成に応用することを目的とした。

具体的には、第1に ABA の中茎伸長促進の作用機構を、イネ幼植物の伸長や胚乳養分の分解と糖代謝の点から明らかにしようとした。第2に、ガンマ線等の放射線照射によ

り、突然変異を誘発して、多数の突然変異系統を作出し、中茎の伸長がみられる日本型水稻を選抜して、突然変異体の遺伝的特性を調査すると共に、その作物・栽培学的特性を明らかにしようとした。第3に、ABA処理や中茎の伸長がみられる突然変異系統を直播栽培し、稲体の生育に及ぼす影響を明らかにしようとした。

3. 研究の方法

水稻直播栽培における初期生育の向上に関する以下の課題(1)~(3)に取り組んだ。

(1) アブシジン酸 (ABA) におけるイネ中茎伸長促進作用の機構解明

コシヒカリ、ササニシキ、こしいぶき(良食味品種)を主な材料とした。さらに、稲作の国際競争力の対応強化や米の促進に寄与するため、新規需要米を供試した。消毒した10粒の種子を管瓶内に播種し、30℃、暗条件で8日間、幼植物を育成した。管瓶内に1/100 (v/v) に希釈したMS培地用無機塩類の水溶液を4mL加えた(対照区)。また、この溶液にABAを 5×10^{-6} Mの濃度で加えた(ABA区)。2日間隔でサンプリングし、中茎長を測定した。幼植物を玄米と中茎に分け液体窒素で凍結後、澱粉分解酵素の活性、各種糖類を分析した。タンパク質濃度と澱粉分解酵素の活性は、それぞれProtein Assayキット、澱粉分解酵素測定キットで測定し、糖類はF-kitで分析した。さらに、各サンプルを液体窒素の存在下のもと乳鉢でつぶし、50mM HEPES buffer (pH 7.5) に懸濁させ遠心分離によりタンパク質を抽出した後、澱粉分解酵素のアイソフォーム活性をウエスタンブロッティングで解析した。

また、同様に調整したサンプルを用いて、mRNAを抽出後、RT-PCRを行い、遺伝子の発現量の差異を処理間で比較した。対象とする遺伝子は、幼植物の伸長に関連が強いと考

えられる，細胞成長に関わる遺伝子とした．

(2) イネにおける中茎伸長促進作用の遺伝的機構

ガンマ線等の放射線照射で作出した器官の生育に特異的な突然変異系統リソースを用いた．課題(1)の条件で幼植物を育成し，中茎が伸長した系統を1次選抜した．次に，1次選抜で得た系統を苗立ち期まで育成し，幼植物の地上部(葉齢，葉色，草丈，乾物重等)と地下部(根量等)の生育を突然変異のない野生型稲と比較し，中茎以外には変化がない系統を2次選抜しようとした．

(3) アブシジン酸(ABA)処理と突然変異系統における直播水稻の生育解析

課題(1)と同じ品種を供試した．ABAの処理・濃度は，種子浸漬法で行った．省力・低コストを目標とするため，酸素発生剤や補助剤の使用は当初計画時には予定していなかったが，ABAの作用を導き出すために，適宜，使用については柔軟に対応した．新潟大学農学部圃場のコンクリートポットに，ABAの処理物を湛水直播し，無処理区と出芽・苗立ち性，各器官の伸長量や伸長速度，窒素吸収量の点から比較，検討した．気温，日射量等の気象要因を調べ生育との関連を検討した．突然変異系統に関しては，課題(2)で得た有望系統について，ポットの直播条件で実験した．

4. 研究成果

(1) アブシジン酸(ABA)におけるイネ中茎伸長促進作用の機構解明

対照区，ABA区とも播種4日後から中茎の伸長が開始した．対照区の中茎長は播種8日後では，約0.6cmで推移したが，ABA区では約2.0cmと中茎の伸長がみられた．また，乾燥物重は両処理区ともに，播種後日数の経過に伴い減少したが，ABA区の方が大きかっ

た．澱粉分解酵素の活性は，6日後以降，ABA区では対照区に比べて低く推移した．ABA区では乾燥物重が大きく，この酵素の活性が低く推移したことから，ABAによる中茎の伸長の際には，胚乳養分の利用効率が高いことが示唆された．玄米のグルコース含量は，ABA区は対照区に比べて低く推移した．しかし，中茎のグルコース含量は，ABA区の方が対照区に比べて高く推移した．このことから，ABAによるグルコースの増加は，中茎の伸長を促進する一因と考えられた．

一般に，種子の発芽や胚の成長を促進する際には，澱粉分解酵素の活性化と可溶性糖類の増加がみられるが，中茎の伸長ではむしろ逆の現象がみられるという，作物生理学的に興味深い結果が得られた．この結果から，イネの中茎伸長に関する，澱粉分解酵素の活性について，アイソフォームの発現量の差異の点から詳細に検討した．

ウエスタンブロットングで解析した結果，2種のアイソフォームについて，ABA区ではいずれの播種後日数においても，対照区に比べて発現が弱かった．残り1つのアイソフォームは，対照区とABA区ともに発現が弱かった．しかし，ABA区の方が，相対的に強い発現がみられ，特に，播種2日後と4日後の発現が強かった．3種類の澱粉分解酵素のアイソフォームの発現解析により，ABA処理によって，特定のアイソフォームの発現パターンが変化すると考えられる．以上より，ABAによって特定のアイソフォームの発現が抑制され，澱粉分解酵素活性の総量が低下すると考えられた．また，ABAは特定のアイソフォームの発現パターンを変化させる可能性があり，異なる品種や処理により，他のアイソフォームの発現パターンと比較することで，ABAによる澱粉分解酵素の総量低下の原因が解明されることが考えられる．

本研究では，少量のサンプルにおける効率的なRNA抽出法を確立できたことも1つの

大きな成果である。この方法を用いて、total RNA を抽出後、RT-PCR による発現解析を行った。具体的には、ABA が細胞成長に関する酵素をコードする遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。これらの遺伝子の発現を検討した結果、ABA 処理により対照区に比べて、発現量に差異が見られた。つまり、発現量が増加した遺伝子は 11 種で、その他、発現量が減少あるいは不変の遺伝子があった。ABA によって発現が増加した遺伝子について詳細に検討した結果、播種 6 日後の発現量をピークに 8 日後まで減少し、その後はほぼ一定で推移した。ABA 区における中茎は、播種後 8 日頃まで伸長し、8 日後以降に伸長を停止したことから、当該遺伝子の発現量の増加と中茎の伸長には相関があると考えられた。現在、ABA の中茎伸長促進作用における、本遺伝子の作用については、解析を継続中である。

(2) イネにおける中茎伸長促進作用の遺伝的機構

水稻種子に核種の異なる放射線を照射して突然変異を誘発し、圃場条件下で栽培後、解析可能な後代種子を得ることができた。水稻種子にガンマ線等の放射線を照射し突然変異を誘発し後代を得た。それら後代を、課題(1)の条件で培養したところ、未発芽種子が多数みられた事、また、発芽しても中茎の伸長がみられる個体を見いだすことができなかった。突然変異体の探索では、供試個体数が極めて多かったことから、中茎の伸長性に関する突然変異体を得るには、より効率的なスクリーニング法を用いる必要がある。

現在も、中茎の伸長がみられる突然変異体については、探索中である。

しかしながら、供試品種の中に、日本型品種でありながら、中茎の伸長性が著しいものをみいだした(図1)。通常、日本型品種はインド型品種に比べて、中茎の伸長量が小さいため、本品種は、中茎伸長性の遺伝的特性

を検討する上で有益な材料と考えられる。



図1 通常の日米型品種と中茎伸長性の品種。矢印は中茎の上端(鞘葉節)。左：通常の日米型品種。右：中茎伸長性の品種

(3) アブシジン酸(ABA)処理と中茎伸長突然変異系統における直播水稻の生育解析

ABA を種子の予措の過程(浸種)で行い、通常の催芽条件(30℃, 暗条件)で行ったところ、ABA 処理物の催芽状態や生育が不揃いであった。ABA 処理の濃度を、 10^{-3} ~ 10^{-7} M の5段階、浸種時間を24、48時間を設けて実験を行ったが改善がみられなかった。ABA は、低濃度の外生処理で中茎の伸長を促進するので、処理の濃度、方法、時間等について、更なる検討が必要である。しかし、処理物の中には、僅少なながらも中茎が伸長した個体があり、直播栽培で ABA 処理を行うには、より効率的で安定的な処理法が必要と考えられた。

現在も引き続き、効率的で安定的な ABA の処理法について、酸素発生剤や補助剤の使用も視野に入れながら検討中である。

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2件)

1. Watanabe H., Honma K. and Adachi Y.

2016. Synergistic effect of plant growth regulators on early growth in direct-seeded rice. KAAB International Symposium 2016, Niigata, Japan. Abstract P15 (Poster No.15) . 2016年9月28日 . 新潟大学 , 新潟県新潟市 .

2. 渡邊 肇・本間加絵・安達祐介 2016 .
イネ幼植物の生育における植物成長調整物質の協働作用 .日本作物学会第242回講演会要旨集:107 2016年9月10日~2016年9月11日 . 龍谷大学 , 滋賀県大津市 .

[その他]

ホームページ等

<http://www.akita-pu.ac.jp/stic/souran/scholar/detail.php?id=332>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 肇 (WATANABE HAJIME)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号 : 10292351

(2)研究分担者

西村 実 (NISHIMURA MINORU)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号 : 60391570