

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850012

研究課題名(和文) イネの低温順化における分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism underlying cold acclimation of rice

研究代表者

提 箸 祥 幸 (SAGEHASHI, YOSHIYUKI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター作物開発研究領域・主任研究員

研究者番号：20414617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：イネ幼苗が低温順化処理により低温耐性を獲得することを多くの品種を用いて確認した。メタボローム解析により、イネは低温順化処理により糖類およびアミノ酸類を高蓄積することを明らかにした。また、トランスクリプトーム解析では熱ショック関連遺伝子の発現が増加していたことから、熱ショック転写因子HsfA2cを過発現させ下流の熱ショック蛋白質遺伝子を網羅的に発現するイネを作出した。このイネは幼苗期および穂ばらみ期において原品種よりも低温耐性が優れていた。これらのことから、イネの低温順化には、適合溶質や熱ショックなど複数の機構が関与していることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We used a cold acclimation treatment to confirm that many types of rice seedlings are tolerant to cold temperatures. Results of the metabolome analysis showed that the rice seedlings accumulated high amounts of saccharides and amino acids after the cold acclimation treatment. Microarray analysis showed that the expression of many heat-shock protein genes increased after the cold treatment. We identified that a heat-shock transcription factor gene, HsfA2c, was induced after the cold acclimation treatment. We developed transgenic rice plants by using HsfA2c and Hsp90-D80N, which showed extremely high gene expressions of heat-shock proteins under the cold conditions. The rice plants exhibited improved cold tolerance during seedling and booting stages. Our results show that multiple mechanisms, such as compatible solutes and the heat-shock mechanism, are involved in the cold acclimation of rice.

研究分野：農学

キーワード：イネ 低温順化 低温ストレス耐性 熱ショック蛋白質 Sucrose

1. 研究開始当初の背景

(1) 熱帯起源作物であるイネは栽培化とともに高緯度地域へ進出し、北海道が我が国の主産地を占めるまでになった。北海道の稲栽培では低温障害が克服すべき課題であり、不稔を引き起こす障害型例外については、耐性品種の開発により被害が軽減されてきた。しかし、発芽～幼苗期の低温による障害は未だに耐性品種が開発されておらず、低温下での伸長の旺盛な品種の開発が試みられているに過ぎない。

(2) イネのような熱帯、亜寒帯を起源とする1年生植物の多くでは常温で生育させた後に低温環境化に置かれると著しい生育障害が起こり、ときには死に至る。このような低温ストレスに対しては耐性のある遺伝子型が知られ、機構として microRNA から蛋白質、糖質に至るまで様々な分子が耐冷性に貢献するものとして同定されてきており、さらには低温抵抗性に関する数多くの QTL が報告されている。一方、越冬性作物であるムギ類などでは通常の低温応答の他に、一定期間低温に暴露されることで低温耐性を獲得する低温順化が存在する。越冬作物では低温順化に関して多くの研究がなされており、その過程では遺伝子発現や代謝に大きな変化が生じ、それに伴い膜構造の変化や水分含量の低下、プロリン等のアミノ酸や可溶性糖の増加といった数多くの変化が引き起こされる。熱帯・亜熱帯を起源とする低温感受性植物については、一般に低温順化能力を持たないと考えられてきたため、これまで低温順化に関する研究がほとんど行われていなかったが、近年イネにおいても低温順化に相当する応答が存在することが示されている。このような状況で、イネの低温順化に関する分子機構を生理学的な視点から解析しようと試みた研究は少なく、得られている知見も極めて少ない。モデル実験植物であるイネの低温順化の機構を解明することは、熱帯起源植物の寒地への適応戦略を理解する上で重要であり、北海道におけるイネの重要な形質のひとつである耐冷性を評価する上でも必要不可欠と考える。

2. 研究の目的

熱帯起源の植物であるイネは、これまで温帯・亜寒帯を起源とする植物のように低温順化機構を持つと考えられてこなかった。しかし、近年イネにおいても徐々に強い低温に曝されていく過程で低温耐性を獲得する機構があることが明らかになってきた。モデル実験植物であり我が国の最重要作物のひとつであるイネの低温順化機構を解明することは、熱帯起源植物の寒地への適応戦略を理解する上で重要であると同時に、これまで成功

していない幼苗期低温耐性に優れた品種開発の可能性もある。本研究では、低温順化処理による低温耐性の評価方法の確立、低温順化処理時の代謝産物および遺伝子発現の網羅的解析、熱ショック転写因子を高発現する組換えイネを用いた低温耐性の評価、を通じイネの低温順化における分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 低温順化処理による低温耐性の評価

検定はまず低温順化無処理では、27 条件で 10 日間生育させたイネ幼苗について 4 条件で処理し、その後 27 に戻した後に枯死せずに生存した個体の割合で評価した。低温順化処理では、27 条件で 10 日間生育させたイネ幼苗について 12 の弱い低温に曝した後、4 条件で処理し、その後 27 に戻した後に生存した個体の割合で評価した。

(2) 代謝産物、遺伝子産物等の網羅的解析

北海道の食用品種「おぼろづき」を用いて、低温順化応答の誘導時に経時的にイネ植物体地上部のサンプリングを行い、メタボローム解析および DNA マイクロアレイ解析、可溶性糖の定量分析に供した。

(3) 組換えイネの幼苗期の低温枯死耐性試験

原品種の「おぼろづき」と組換えイネについて、播種後 10 日のイネ幼苗を一昼夜 12 処理の後、4 7 日間の低温処理を行い、27 へ戻して 14 日後の個体の生存率で評価した。

(4) 穂ばらみ期の耐冷性試験

原品種の「おぼろづき」と組換えイネについて、穂ばらみ期耐冷性を冷水浸水処理法により評価した。主稈と 1 次分げつのみを残し 18.5 の冷水に植物体が完全に水没しないように浸漬することで穂ばらみ期の低温処理を行った。水深はイネの生育にあわせて増加させ、最終的には地上 20 cm までとした。冷水処理は第 5 葉期から出穂期まで(約 45 日)行った。採種後に総粒数と稔実数を計測し、稔実率を算出した。

4. 研究成果

(1) 低温順化処理による低温耐性の獲得

「日本晴」、「コシヒカリ」、北海道のイネ品種を用いて、12 5 日の低温順化処理をした個体と無処理の個体をそれぞれ 4 10 日間低温処理した後、27 に移して生存する個体の割合を調べた。全ての品種において、無処理のものは全個体が枯死したが、低温順化処理をしたものはほぼ全ての個体が生存してい

た。このことは、低温順化処理により幼苗期のイネが低温耐性を獲得できることを示唆した。

(2) 「おぼろづき」、「きたあおば」の低温順化処理による低温耐性の獲得

一般的な北海道の食用品種として「おぼろづき」を、飼料イネ品種として「きたあおば」を用い、低温順化処理の有無による低温ストレス処理期間と生存率の関係について調べた(図1)。「おぼろづき」、「きたあおば」ともに生存率が0%に至るまでの期間は、無処理(低温順化処理なし)では6日以内であった。一方、低温順化処理を行ったものでは生存率が0%に至るまでの低温処理期間は、「おぼろづき」、「きたあおば」ともに無処理に対して6~8日程度の延長が観察された。このことは、イネ幼苗の低温順化処理がその後の低温ストレス耐性を著しく向上させたことを意味する。

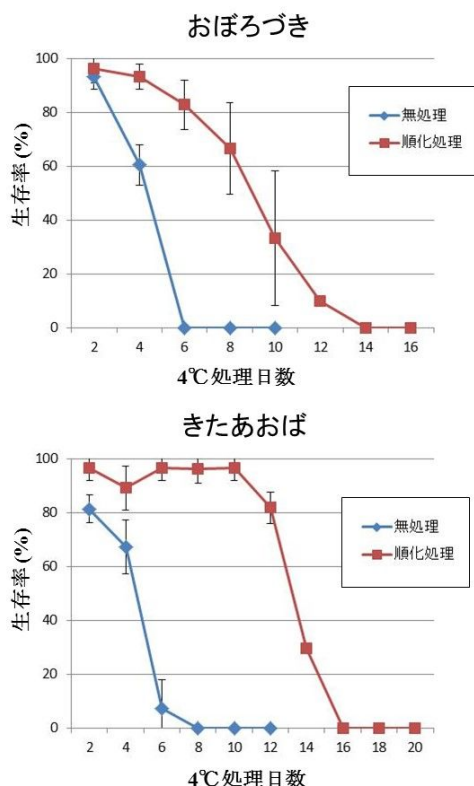


図1 低温順化の有無による低温ストレス処理期間と生存率
上段が「おぼろづき」、下段が「きたあおば」。
低温順化処理は12°C5日間とした。

(3) 低温順化処理により増加する物質

メタボローム解析は、播種後27日10日生育させた「おぼろづき」を用い、無処理、12日1、3、5、10日処理、12日5日処理(低温順化処理)後4日1、3、5、10日処理、4日1、3、5日処理を行った後、イネの地上部を採種し、GC-TOF-MS分析に供した。低温順

化処理により増加する物質を調べたところ、各処理による代謝物の変動についての傾向が見られた。それらの中で、4日5日の低温処理において低温順化処理を行ったものを行わなかったものと比較すると、低温順化処理を行ったもので糖類とアミノ酸類が顕著に増加していた。糖類では、フルクトース、ガラクトースが、アミノ酸類では、アラニン、セリン、グルタミン、アスパラギンが低温順化処理により増加していた。可溶性糖についてHPLCを用いた分析を追加で行ったところ、スクロースが低温順化処理により顕著に増加していることが明らかになった。糖類およびアミノ酸類は適合溶質として知られるものも多く含まれ、これらの蓄積により細胞内浸透圧の上昇をもたらして細胞内からの脱水を抑えて傷害発生を低減させていることが考えられた。

(4) 低温順化処理により変動する遺伝子発現

低温順化処理における遺伝子発現の変動をマイクロアレイ解析により行った。播種後27日10日生育させた「おぼろづき」を用い、無処理、12日5日処理、12日5日処理後4日5日処理、4日5日処理のイネ幼苗からRNAを抽出し、マイクロアレイ解析に供した。糖類やアミノ酸類の合成に関与する遺伝子の他、熱ショック関連の熱ショック転写因子遺伝子および熱ショック蛋白質遺伝子の発現の増加が低温順化処理により増加していた。熱ショック転写因子は熱ショック蛋白質の発現を制御するものであり、熱ショック蛋白質は細胞を様々なストレスのダメージから保護する働きがあり、これらの熱ショック機構が低温順化によりイネ幼苗が獲得する低温耐性に寄与している可能性が考えられた。

(5) 熱ショック機構のイネ低温耐性への効果

マイクロアレイ解析により、イネ幼苗が低温順化処理後の低温耐性を獲得するときに、熱ショック転写因子である *HsfA2c* の発現が増加していた。また、このときにその下流に存在する熱ショック蛋白質(HSPs)遺伝子の発現も増加していた。熱ショック転写因子は熱ストレス時に下流に存在する多くのHSPsの発現を誘導し、細胞をストレスから保護する働きがあるとされる。そこで多くのHSPs遺伝子の発現が郵送される低温順化処理後の状況を再現するために、*HsfA2c* を低温下で過剰発現させることにより低温下で多くのHSPsを発現する組換えイネを作成した。この組換えイネを用いて幼苗期の低温耐性を評価したところ、原品種の「おぼろづき」に対して有意に低温耐性が向上していた(図2)。また、この組換えイネは穂ばらみ期の耐冷性についても原品種の「おぼろづき」よりも優れていた(図3)。これらのことから、熱ショック機構がイネ幼苗の低温順化により

獲得される低温耐性のひとつの要因として関与している可能性が示唆された。

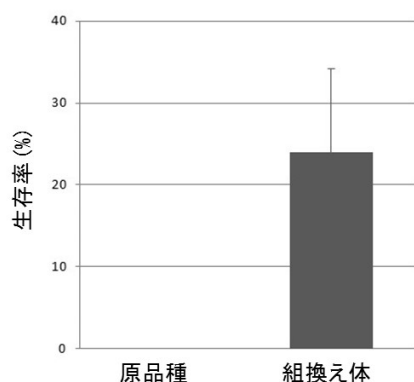


図2 組換えイネと原品種の幼苗期低温耐性

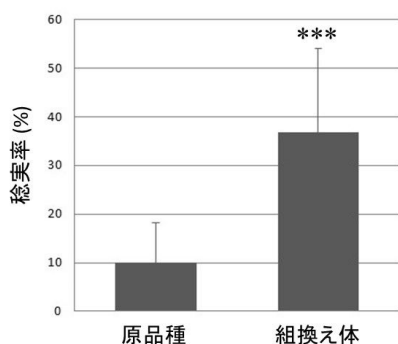


図3 組換えイネと原品種の穂ばらみ期耐冷性

***は0.1%水準で原品種「おぼろづき」と比較して有意差があることを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

提箸祥幸, (2015) 熱帯出身なもので寒さに弱いのです, 日本生物工学会誌 93:35

〔学会発表〕(計 11 件)

提箸祥幸・佐藤裕, 低温順化のバイオマーカーを利用した水稻苗の低温耐性強化方法の開発, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2016 年 3 月 30 日

提箸祥幸・保田浩・佐藤裕, 低温順化処理で発現する熱ショック転写因子遺伝子を利用した低温耐性イネの作出, 日本育種学会第 129 回講演会 横浜市立大学(神奈川県横浜市), 2016 年 3 月 22 日

Yoshiyuki Sagehashi, Hiroshi Yasuda, Yutaka Sato, Improvement of cold tolerance in rice by cold induced expression of heat shock genes, Plant &

Animal Genome XX, San Diego (CA, USA), 2016 年 1 月 11 日

提箸祥幸・佐藤裕, 低温順化処理によるイネ幼苗への低温耐性付与効果, 日本育種学会第 128 回講演会, 新潟大学(新潟県新潟市), 2015 年 9 月 12 日

提箸祥幸・佐藤裕, 低温順化処理によるイネ幼苗の低温耐性強化方法の検討, 日本作物学会第 240 回講演会 信州大学(長野県長野市), 2015 年 9 月 5 日

提箸祥幸・佐藤裕, スクロースを指標したイネ幼苗の低温順化処理方法の検討, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学(岡山県岡山市), 2015 年 3 月 28 日

提箸祥幸・佐藤裕, スクロースをバイオマーカーとしたイネ幼苗の低温順化処理方法の検討, 日本作物学会第 239 回講演会, 日本大学(神奈川県藤沢市), 2015 年 3 月 27 日

提箸祥幸・保田浩・佐藤裕, 低温順化処理により発現する熱ショック転写因子の低温耐性への効果, 日本育種学会第 127 回講演会, 玉川大学(東京都町田市), 2015 年 3 月 21 日

提箸祥幸・佐藤裕, イネの低温順化現象における代謝産物の変動に関する解析, 日本育種学会第 126 回講演会, 南九州大学(宮崎県都城市), 2014 年 9 月 27 日

提箸祥幸・佐藤裕, イネの低温順化現象における代謝産物の解析, 日本作物学会第 238 回講演会, 愛媛大学(愛媛県松山市), 2014 年 9 月 9 日

Yoshiyuki Sagehashi, Hiroshi Yasuda, Yutaka Sato, Cold tolerance in transgenic rice plants using heat shock mechanism, Plant Biology 2014, Portland (OR, USA), 2014 年 7 月 13 日 ~ 7 月 15 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

提箸 祥幸 (SAGEHASHI, Yoshiyuki)
国立研究開発法人・農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・作物開発研究領域・主任研究員
研究者番号: 20414617