

令和元年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04857

研究課題名(和文) イネの超撥水性を発現する分子遺伝学的基盤の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular and genetic mechanism of super water-repellency in rice

研究代表者

伊藤 純一 (Itoh, Jun-ichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：30345186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：イネの葉はハスと同等の極めて高い撥水性(超撥水性)を示す。この超撥水性の発現メカニズムを様々な観点から明らかにした。まず、イネの葉において葉面向軸側が最も撥水性が高いこと、撥水性は環境条件によって変化することなどを明らかにした。また、撥水性が低下した濡れ葉変異体を用いることによって、複数のワックス合成に関わる遺伝子がイネの撥水性に重要であることを明らかにした。また、様々な種類のイネの撥水性を調査することによって、多くのイネの栽培種は高い撥水性を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超撥水性は植物の耐病性や光合成効率の上昇に寄与すると考えられる。本研究で得られた成果によって植物表面の撥水性を制御する基盤的知識を得ることができた。これを利用して、作物における病原体による初期感染の予防や、汚れの洗浄効果による病原体の感染リスクの低下、光合成効率の上昇が期待できる。また、イネにおけるワックス合成遺伝子の解明により、イネワックスの改変や増産の可能性も期待される。

研究成果の概要(英文)：Rice leaf shows extremely high water-repellency (super water-repellency) as much as that of lotus leaf. In this analysis, expression mechanism for the super water-repellency of rice leaves were elucidated in various points of view. First, it revealed that the adaxial side of leaf blade in rice showed the highest water-repellency and the water-repellency was changed depending on different environmental conditions. In addition, it was shown that several wax biosynthetic genes were important for the water-repellency by using wetting leaf mutants. Furthermore, it was suggested that many rice cultivars show high water-repellency.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：撥水性 イネ 遺伝学 変異体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

イネの葉の表面構造の大きな特徴として、表皮細胞に無数の微細な突起が観察される。この構造は乳頭状突起と呼ばれているが、シロイヌナズナやトウモロコシを始め、その他のモデル植物には存在しないため、その構造的意義や発生・遺伝学的なメカニズムに関する考察はほとんどなされていない。この乳頭状突起はハスの葉表面の微細構造と極めて類似し、イネの高撥水性を発現する上で必要不可欠である構造であることが推察された。イネがどれほどの撥水性を示すかを接触角計を用いて定量的に評価したところ、ハスと同等の高い撥水性を示すことが明らかとなったことから、イネの葉は超撥水性を持ち、水滴が表面を転がることによって表面に付着した汚れを洗い流す「ロータス効果」が備わっていることを示している。しかし、これまでに生物がロータス効果を持つに至った進化的な背景や超撥水性を調節する遺伝学的メカニズムについての報告は無いことから、イネの葉が超撥水性を示す機構を多面的に明らかにすることとした。

### 2. 研究の目的

イネが超撥水性を示す構造的、発生的、遺伝的な基盤を明らかにする。イネの様々なステージ、部位における撥水性と表面構造を調査し、超撥水性がイネの発生過程でどのように確立しているのかを明らかにする。また、撥水性が環境にどのように応答するかを明らかにする。撥水性と葉表面の構造や物質変化、それらに關与する遺伝子を明らかにする為に、イネの撥水性の低下した「濡れ葉」変異体の表現型解析と遺伝学的解析を行う。まず、変異体系統の撥水性を定量的に測定し、表面構造の観察を行う。これらの中には撥水性の発現に関わる様々な形質に関わる変異が含まれており、詳しい表現型解析から、超撥水性の発現に関わる様々な情報が入手する。また変異体からの遺伝子単離によって、超撥水性の発現に必要な遺伝因子を同定する。また、様々なイネ(野生種、栽培種)において撥水性の定量と表面構造の観察を行ない、撥水性の多様性を明らかにすることによって、超撥水性の育種的、進化的な側面も考察する。

### 3. 研究の方法

#### (1) イネ撥水性の発現機構と環境応答機構の解析

イネにおける撥水性の基盤的な情報を得るために、葉の異なる部位(葉身/葉鞘、向軸側/背軸側)における撥水性、また表面構造の変化を様々なステージで観察する。また、撥水性が環境に対して変化するかを明らかにするため、異なる環境条件(高照度/低照度、高湿度/低照度)を設定し、撥水性と表面構造に対する影響を観察する。

#### (2) 濡れ葉変異体の収集と表現型解析

濡れ葉変異体はイネの葉の撥水性に直接的に關与する変異体であることから、入手可能な濡れ葉の系統をできるだけ多く収集する。収集した濡れ葉変異体は、接触角計による撥水性評価を行った後、形態学的解析により表面の微細構造の観察を行う。また染色による染め分けや自家蛍光の発色による簡易的なクチクラやワックスの化学解析を行なう。

#### (3) 濡れ葉変異体の遺伝子単離と機能解析

上記で得られた濡れ葉変異体は、インド稲カサラスとの交配によってF1種子を作成し、自殖後代の分離集団を用いて、コースマッピングを行なう。その後、大規模集団によるマッピングにより遺伝子単離を行う。濡れ葉変異体からの原因遺伝子が同定された後は、遺伝子の発現解析などによる機能解析を行い、撥水性発現の遺伝学的制御機構を明らかにする。

#### (4) イネ品種、野生種における超撥水性の多様性評価

イネには遺伝的な背景が多様な様々な品種、野生種が存在する。これらの遺伝的多様性は撥水性の多様性も反映している可能性がある。従って、それらのイネ品種、栽培種、野生種において撥水性の調査を行い、イネの育種材料としての潜在性や遺伝子同定への可能性を探る。

### 4. 研究成果

(1) イネ成熟葉における部位ごとの撥水性の評価をおこなったところ、葉身の向軸側において高い撥水性を示す一方、葉鞘の向軸側において撥水性が最も低くなった。また走査型電子顕微鏡を用いてこれらの表面構造を観察したところ、葉身の向軸側では多数の乳頭状突起が配置され、表面はワックスの結晶で覆われていた。一方、葉鞘の向軸側では乳頭状突起やワックスは観察されなかった。このことから、イネ野生型において葉身の向軸側表面には多数の乳頭状突起とワックスが存在し、高い撥水性をもつことが示された(図1)。

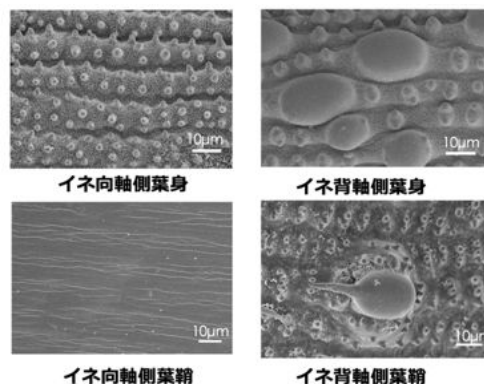


図1 イネの葉における部位ごとの表面構造

乳頭状突起の発生過程を走査型電子顕微鏡で観察したところ、葉原基の特定のステージと場所（P4 中央部）において、細胞の隆起によって乳頭状突起が形成され、その後次第にワックスの結晶で覆われる様子が観察された。その後の発生ステージにおいて、葉の樹脂切片を作成し蛍光顕微鏡で観察したところ、突起形成後の表皮細胞に、他とは異なる自家蛍光が見られたことから、表皮におけるクチクラの発達が生じたことが示唆された。以上よりイネ葉身の向軸側において乳頭状突起は細胞の形態形成によって生じ、その後ワックスやクチクラが蓄積することが示された。環境条件と発生過程で撥水性が変化するか明らかにするために、異なる環境条件で栽培したイネにおける接触角を測定した結果、低照度条件下で栽培した葉はコントロール条件に比べて接触角は低くなった。走査型電子顕微鏡を用いてこれらの表面構造を観察したところ、コントロール条件では、多くの乳頭状突起がワックスの結晶で覆われていたのに対し、低照度条件下では乳頭状突起は少なく、表面のワックス結晶も薄かった。このことから環境の変化に伴い、表面構造や撥水性は変化するものと考えられた。

(2) 濡れ葉性を示す可能性があるイネ変異体 113 系統の第 4 葉の葉身の向軸側について接触角を測定し、野生型と比較して顕著に低い撥水性を示した数十系統に関して、更に詳細な解析をおこなった。電子顕微鏡により表面構造を観察したところ、乳頭状突起の形状や大きさ、密度に異常があるものや、ワックスの形態に異常があるものが確認された。トルイジンブルーやサフランにより細胞壁を染色したところ、野生型では乳頭状突起内部が染まるのに対し、濡れ葉変異体には内部が染まらないものや細胞壁が薄いものが存在した。すなわち濡れ葉性を示す変異体には、乳頭状突起やワックスに異常があるものがあり、これらの構造が撥水性に寄与することが示唆された。

(3) 撥水性を支配する遺伝子を明らかにするために、原因遺伝子のマッピングを行った。特に低い撥水性を示した濡れ葉系統を用いて詳細な遺伝解析を行った結果、8 つの系統において 4 つのワックス合成に関与する遺伝子に変異を発見した（図 2）。

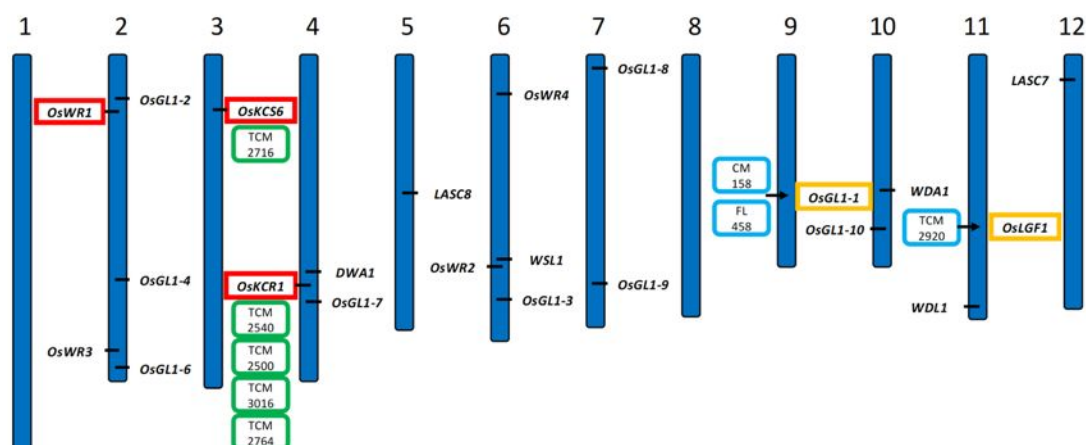


図 2 低撥水性変異体（濡れ葉変異体）の原因遺伝子。緑と水色枠が本研究で解析を行った変異体。

しかし、変異体の葉表面においては、ワックス沈着の減少と共に表面の微細構造も異常になっていたことから、同定された遺伝子はワックスだけでなく、表面の微細構造の形成にも関わっていると考えられた。本研究で同定された遺伝子の発現を、Real-time PCR と *in situ* hybridization によって調査した。Real-time PCR の結果からは、ほとんどの遺伝子が葉原基を含む若い組織で高い発現がみられたが、*in situ* hybridization の結果からは遺伝子間で発現パターンが異なり、機能する場所やタイミングは遺伝子によって異なることが示唆された。

(4) 同定した遺伝子の生育過程における発現解析を行ったところ、いくつかの遺伝子では葉以外の様々な組織での発現が認められた。特に花器官での発現が見られるものが存在したことから、ワックスの生合成は花器官や種子の成長過程に何らかの機能を果たしていると考えられた。そこで、種子に対するワックスの生合成遺伝子の機能を明らかにする為に、変異体の種子表面の物理性を解析した。葉の撥水性が顕著に低下した複数系統の種子を水上に静置させたところ、野生型の種子は顕著に水を弾き、水面に浮かんだのに対して、いくつかの変異体系統では水に浮かぶことなく沈んだ。このことは、これらの系統では葉の撥水性に加えて、種子の撥水性も低下していると考えられた。

(5) 品種間での撥水性の多様性を明らかにするため、接触角計を用いて、世界の栽培イネコアコレクション（WRC）61 系統と野生イネにおいて、撥水性の評価と電子顕微鏡による表皮の微細構造の観察を行った。その結果、WRC 系統間では接触角に大きな違いは見られず、全ての栽培イネ系統において高い撥水性をもつことがわかった。一方、水の散布によって葉の表面に

おける水滴の付着程度が異なる野生イネをスクリーニングし、そのうちの 25 系統における葉の接触角を測定した結果、野生イネには接触角が低い系統が存在することが明らかとなった。さらに、これらの葉の表面構造を観察したところ、乳頭状突起の密度が異なる系統が確認された。このことから、野生イネにおける撥水性の低下には乳頭状突起の密度変化が関与している可能性が示唆された。これらの系統のゲノム構成と生育地との関係について考察した結果、撥水性の低下していた野生イネは栽培イネの祖先種とは遠縁の系統であり、生育地とも相関は認められなかった。このことから、栽培イネの起源種はすでに強い撥水性を保持しており、撥水性形質の変化はイネの栽培化において寄与していないものと推定された。

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] ( 計 7 件 )

Taiyo Toriba, Hiroki Tokunaga, Toshihide Shiga, Fanyu Nie, Satoshi Naramoto, Eriko Honda, Keisuke Tanaka, Teruaki Taji, Jun-Ichi Itoh, Junko Kyozuka. BLADE-ON-PETIOLE genes temporally and developmentally regulate the sheath to blade ratio of rice leaves. Nature communications、査読有、10、2019、619、DOI: 10.1038/s41467-019-08479-5.

Shimano, S., Hibara, K., Furuya, T., Arimura, S., Tsukaya, H. and Itoh, J.I. Conserved functional control, but distinct regulation of cell proliferation in rice and Arabidopsis leaves revealed by comparative analysis of GRF-INTERACTING FACTOR 1 orthologs. Development、査読有、145、2018、dev159624、DOI: 10.1242/dev.159624.

Yusuke Kurokawa, Keisuke Nagai, Phung Danh Huan, Kousuke Shimazaki, Huangqi Qu, Yoshinao Mori, Yosuke Toda, Takeshi Kuroha, Nagao Hayashi, Saori Aiga, Jun-ichi Itoh, Atsushi Yoshimura, Yuko Sasaki-Sekimoto, Hiroyuki Ohta, Mie Shimojima, Al Imran Malik, Ole Pedersen, Timothy David Colmer, Motoyuki Ashikari. Rice leaf hydrophobicity and gas films are conferred by a wax synthesis gene (LGF1) and contribute to flood tolerance. New Phytologist、査読有、218、2018、1558-1569、DOI: 10.1111/nph.15070.

Yuka Kitomi, Jun-Ichi Itoh, Yusaku Uga. Genetic mechanisms involved in the formation of root system architecture. Rice Genomics, Genetics and Breeding、査読有、2018、241-274、DOI: 10.1007/978-981-10-7461-5\_14.

Honda, E., Yew, C.L., Yoshikawa, T., Sato, Y., Hibara, K. and Itoh, J.I. LEAF LATERAL SYMMETRY1, a member of the WUSCHEL-RELATED HOMEBOX3 gene family, regulates lateral organ development differentially from other paralogs, NARROW LEAF2 and NARROW LEAF3 in rice. Plant and Cell Physiology、査読有、59、2017、376-391、DOI: 10.1093/pcp/pcx196.

Hibara, K., Isono, M., Mimura, M., Sentoku, N., Kojima, M., Sakakibara, H., Kitomi, Y., Yoshikawa, T., Itoh, J., and Nagato, Y. Jasmonate regulates juvenile-adult phase transition in rice. Development、査読有、143、2016、3407-3416、DOI: 10.1242/dev.138602.

Yoshikawa, T., Tanaka, S., Masumoto, Y., Nobori, N., Ishii, H., Hibara, K., Itoh, J., Tanisaka, T., and Taketa, S. Barley NARROW LEAFED DWARF1 encoding a WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 3 (WOX3) regulates the marginal development of lateral organs. Breeding Science、査読有、66、2016、416-424、DOI: 10.1270/jsbbs.16019.

### [ 学会発表 ] ( 計 7 件 )

八田大成・水野泉・桧原健一郎・伊藤純一 イネ GE 遺伝子のシュート再生過程における機能解析 日本育種学会講演会 2019 年

八田大成・水野泉・桧原健一郎・伊藤純一 植物の成長制御に関する CYP78 のイネのカルス組織に対する効果 日本育種学会講演会 2018 年

味谷雅之・吉川貴徳・佐藤豊・長村吉晃・伊藤純一 遺伝子発現解析によるイネの葉の形態形成に関わる遺伝子の探索 日本育種学会講演会 2018 年

金川真美・松本和也・石川亮・伊藤純一・桧原健一郎 embryoless 変異体を用いたイネの胚・胚乳サイズ比率制御機構の解析 日本育種学会講演会 2017 年

平岩飛鳥、相賀彩織、佐藤豊、伊藤純一 イネの葉における撥水性の制御機構と多様性の解析 日本育種学会講演会 2017 年

伊久力也、伊藤純一、桧原健一郎 イネの胚性器官に異常を示す変異体の解析 日本育種学会講演会 2016 年

横田 絢、桧原健一郎、伊藤純一 イネにおける LOG 遺伝子ホモログの発現解析 日本育種学会講演会 2016 年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。