

令和 2 年 11 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04867

研究課題名（和文）水の流れから捉える作物の一斉登熟性の解明

研究課題名（英文）Analysis of maturing of crops in relation to plant water

研究代表者

井上 眞理（Iwaya-Inoue, Mari）

九州大学・農学研究院・学術特任教員（2016年度 教授）

研究者番号：60091394

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：ダイズは開花時期に拘らず子実は一斉登熟性をもち、同時に葉茎も脱水する特性をもつが、緑葉のまま莢先熟する「青立ち」株の発生は農業上の大きな問題となっている。本研究では、マメ科のうち一斉登熟性をもたないササゲと比較し、転流に着目した。青立ちはシンクソースバランスの変化が要因となることが指摘されている。摘莢による青立ち株では、窒素が葉から根へ転流し、サイトカイニンの関与が示された。乾燥を受けた子実では、タンパク質および脂質含量の低下と糖含量の増大が起こった。一方、ササゲは乾燥により根でABAの合成が促進され耐性を獲得し、葉から花柄へ糖の転流が促進されることで、子実は正常に肥大することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイズは他のマメ科作物と異なり一斉登熟性をもち、「青立ち」株では機械収穫の際に茎葉の水分により汚粒を発生し、古くから農業上の大きな問題となってきた。本研究では、一斉登熟性をもたないササゲと比較し、摘莢や乾燥ストレスを与え、シンクソースバランスを崩すことにより「青立ち」のメカニズムを解明し、栽培技術の向上を目指した。

根や葉の植物ホルモンに着目した結果、ダイズでは、サイトカイニンの制御が青立ち抑制に有効であることを明らかにした。一方、ササゲでは、乾燥ストレスによりABA合成が促進され、葉の脱水に伴い、糖は花柄へ移動し、さらに花柄から子実への転流促進により、登熟が正常に起ることを示した。

研究成果の概要（英文）：Unlike other annual legume crops such as cowpea, soybean leaves drop, and stems lose their green color with seed maturation. A soybean-specific phenomenon called green stem syndrome (GSS) prevents soybean stems and leaves from drying down properly, albeit the mature seeds lose water. GSS lowers both grain yield and grain quality and interferes with machine harvesting. Our results suggested that cytokinin and autophagy were involved in GSS of soybean. In addition, drought stress caused decrease in seed dry weight due to decrease in contents of protein and lipids while increase in soluble sugar content in seeds.

On the other hand, drought stress in cowpea did not affect germination rate, indicating that seed viability and its quality were maintained. Consequently, cowpea yield under drought stress was maintained, despite a decrease in photosynthetic rate, by translocation of photoassimilates from leaves via temporary sink and source organs, especially from flower stalks to the seeds.

研究分野：作物生理学

キーワード：乾燥ストレス ダイズ ササゲ 子実 一斉登熟 貯蔵物質

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

1. 研究開始当初の背景

マメ科の主要作物として世界中で広く栽培されるダイズは、生殖成長期では栄養成長と競合しながら開花を続け、開花時期の早晩に係わらず、同時に種子の成熟を完了する¹⁾。それに伴い茎葉の含水量も低下し枯れ上がる「一斉登熟性」という特徴をもつ。しかし、茎葉が緑色のまま莢と子実だけが成熟脱水し、莢先熟ともいわれる「青立ち」株は、機械収穫を困難にし、また緑葉の水分が子実に染込むことにより品質低下を招き、古くから農業上の深刻な問題となっている。これには生物的ストレス(虫害)や乾燥ストレスがその引き金となることが知られているが、必ずしもその詳細は解明されていない。一方、ササゲは緑葉を保ちながら、開花した順に莢が成熟し、ダイズのような一斉登熟性を示さない。本研究では、摘莢や乾燥ストレス処理による水の流れやシンクソースバランスの崩れに着目し、マメ科作物の栄養成長および生殖成長のステージにおける子実の貯蔵物質の変動を調べた。

2. 研究の目的

イネ科を含む多くの1年生作物の子実肥大において、登熟初期にはソースからシンクへ水や糖・アミノ酸が運ばれ子実の乾物重の増大が起こり、植物体全体の脱水が終わるとともに子実は成熟する。マメ科のダイズとササゲは、栄養成長と生殖成長が競合して登熟するが、前者は、開花の時期に関らず一斉登熟し同時に植物体が枯れあがるが、後者は緑葉による光合成と子実の登熟脱水が並行して起こる。一斉登熟の阻害の要因として摘莢や乾燥ストレスによりシンクソースバランスの崩れを人為的に誘導し、登熟過程の異なるダイズとササゲを対象とし、ダイズの「青立ち」抑制の栽培技術の確立を目的とする。さらに乾燥ストレス下の両種の登熟過程における子実の水分や貯蔵物質の動態を調べることにより、乾燥耐性をもつササゲの特長を調べることにより、ダイズの乾燥耐性の賦与について検討した。

3. 研究の方法

供試材料として、ダイズ[*Glycine max* (L.) Merr.] では、日本の主要品種であるフクユタカを用い、1/5000a ワグネルポットに水田土壌を充填し、苦土石灰と豆化成を 5g ずつ施肥し、九州大学貝塚圃場(福岡市東区)で栽培した。これまでの知見に基づき、子実肥大始期(R5)に50%摘莢処理を行い、「青立ち」を誘導した²⁾。青立ち個体と無処理の正常個体の子実、葉、根、茎等を対象に、R5から成熟始期(R7)までステージ毎にサンプリングした。一方、乾燥処理についても、R5からR6にかけて緩やかな乾燥ストレスを灌水量により調節し、摘莢処理と同様にサンプリングを行い対照区と比較した。乾燥処理後は再灌水を行い、サイトカニンおよび子実貯蔵物質(タンパク質、脂質、糖)の合成・分解関連遺伝子の発現および収量調査について調べた。

一方、ササゲ[*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] は、乾燥耐性の異なる2系統、‘IT98K-205-8’(乾燥耐性強)、‘IT98K-555-1’(乾燥耐性弱)等を用い、1/5000a ワグネルポットで慣行栽培し、乾燥ストレスを与えた。栄養成長期の葉と根の ABA 関連遺伝子等の発現、生殖成長期においては、子実、葉、花柄の含水量、糖の合成、分解、転流に関する遺伝子発現等を調べた。

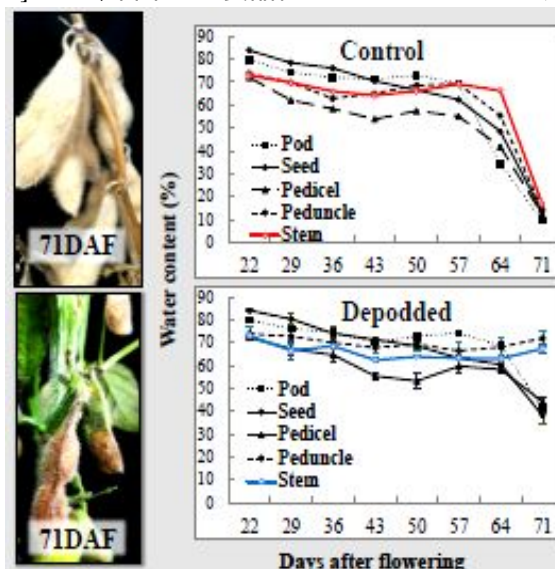


図1 半数莢切除によるダイズの莢・子実・小花柄・花柄・茎の含水率の推移。対照区(上)では、開花後57日以降から各器官で含水率の低下がみられる。一方、摘莢区(下段)では、71日目でも、茎葉が緑色を呈し、水分を維持している。(Tomita et al. 2016)

4. 研究成果

1) ダイズの「青立ち」におけるシンクソースバランスの崩れの要因

ダイズは一斉登熟性をもつことが知られているが¹⁾、莢や子実は脱水・登熟するが茎葉に水分を保つ「青立ち」は、ダイズ栽培において機械収穫を困難にするだけでなく、汚粒の原因となり古くから農業上の問題となっている。これには、虫害や乾燥ストレスにより、落莢による糖シグナルが引き金となり、シンクソースバランスが崩れ³⁾、また葉の老化に伴うオートファジー関連遺伝子の発現が関与することが既に報告されている²⁾。本研究では、人為的に青立ち個体を作成するために、摘莢処理を行い、莢先熟性を確認した(図1)。その結果、莢数減少が引き金となるシンク能の低下により、葉の窒素含量の減少、根の窒素含量の増加から、地上部から地下部へ窒素が輸送されることが示唆された。莢先熟の発生に伴い、根のサイトカニン合成遺伝子の発現上昇、代謝系遺伝子の発現低下の特徴が確認され、さらに道管出液中のサイトカニン含量が増加することが明らかとなった。これらのことから、シンク能の低下は葉から根への窒素の移動を誘導し、根のサイトカニン合成が促進されることで、莢先熟が発生すると考えられた。

また、青立ち発生には乾燥ストレスの関与も知られているが³⁾、根と根粒との関係に着目した研究では、窒素固定が抑制されることが報告されている⁴⁾。本研究では、子実肥大に着目し、乾燥ストレス下の貯蔵物質の変化を調べた。生殖成長期に乾燥ストレスを受けたダイズ子実では、タンパク質合成関連遺伝子の発現低下が見られた。また、脂質合成関連遺伝子の発現抑制と脂質分解関連遺伝子の発現促進により、脂質が減少し、子実サイズと乾物重は低下した(図2)。さらに、子実の脂質分解の促進に伴い、糖やデンプン含量が増えることを明らかにした。これまで、栄養成長期においても、乾燥ストレスにより、ガラクトキノールやミオイノシトールがダイズ葉に蓄積することを報告しているが⁵⁾、登熟種子においてみられた可溶性糖の増大は、子実の乾燥耐性へ賦与している可能性が示唆された。これらのことから、栄養成長期、生殖成長期のいずれのステージにおいても、乾燥ストレスにより誘導された葉や子実の適合溶質の増加が乾燥耐性獲得に寄与していることも考えられる。さらに、葉の老化に伴うオートファジー機能が障害されることも一因となっていることが示唆された。

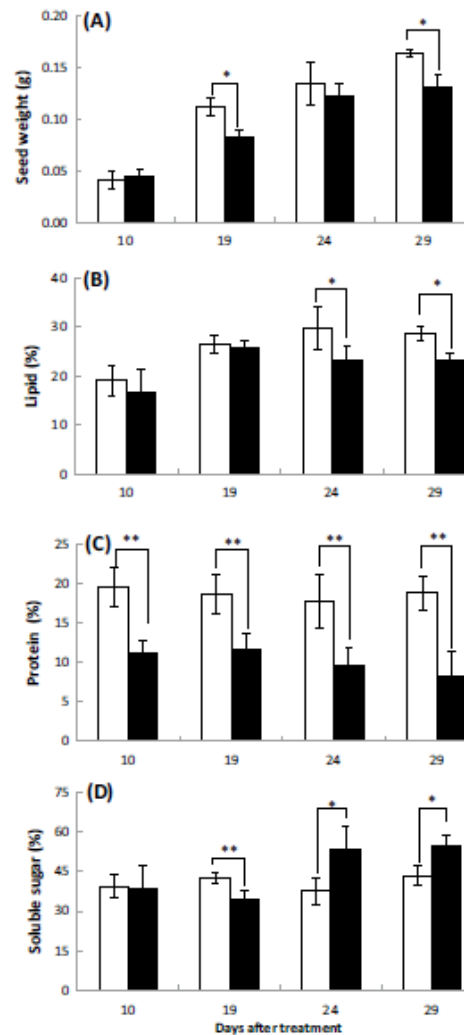


図2 乾燥ストレスによるダイズ子実の乾物重と貯蔵物質含量の推移。(A) 子実乾物重 (B) 脂質含量 (C)タンパク質含量 (D) 可溶性糖含量. 白いバーは対照区, 黒いバーは乾燥処理区を示す. (Nakagawa et al. 2018)

2) ササゲの乾燥適応におけるシンクソース器官の機能特性

乾燥耐性をもつササゲは、アフリカのサヘル地帯で広く栽培され、その子実は貴重なタンパク源となっている。ササゲはダイズと異なり、緑葉を保ちながら、開花した順に莢が成熟し、一斉登熟性を示さない。まず、栄養成長期のササゲの乾燥ストレス適応戦略において、ABAに着目し、合成の律速酵素であるNCEDのプロモーター領域に複数のW-boxが存在し、転写因子であるWRKYが直接結合することを明らかにした。ササゲの根におけるWRKY発現量は、ダイズのそれより有意に高く、乾燥耐性に寄与していることが考えられる。これによりNCEDの発現が促進され、ABAが増加し気孔閉鎖を誘導することで乾燥耐性を獲得していることが示唆された。ブラシノステロイド関連遺伝子の発現と根系との関係についても併せて考察した。さらに、ササゲはダイズを含む他のマメ科植物に比べ、根のプロリン含量も高く、乾燥ストレス時に適合溶質として働くことが考えられた。また、ササゲは初めて乾燥ストレスを受けると速やかに気孔を閉鎖

し、光合成が停止するが、2 回目の乾燥に対しては気孔開度を高く保つことで光合成を維持し、成長を続けた。サイズと異なるこの特異的なストレスメモリー機構には、ABA が深く関与することが示唆された。また、糖飢餓に応答したササゲの芽生えでは、アミノ酸代謝が促進されたことから、乾燥ストレス下でも同様な窒素代謝が起こっていることが示唆された。

生殖成長期においても、ササゲの子実の発達はサイズと著しく異なっている。ササゲは、開花後に花柄（花梗）が急速に伸長を開始し、30 cmほどに発達し、花柄の先端に着く莢は、赤色光条件下で著しく伸長が促進された。乾燥ストレス下のササゲは、生殖成長期において、葉、葉柄、花柄の老化・脱水・脱落が促進されたが、子実は正常に発達するという特徴をもつことを明らかにした。乾燥ストレス下において、ササゲの葉ではスクロース合成に働くSPS 遺伝子の発現抑制および、デンプン分解酵素関連遺伝子（ α -amy, β -amy）の発現増大によりデンプンの分解が進み、可溶性糖はショ糖輸送体（SUT1）遺伝子の発現促進により葉から花柄に運ばれることがわかった。長い花柄では、ショ糖分解とデンプン合成関連遺伝子の発現が高くなり、一時的にデンプンを蓄積するシンク器官として働いていると考えられる。乾燥が引き金となり、葉、葉柄だけでなく花柄から種子への転流が促進されたことから、ササゲの長い花柄は単なる物質の輸送経路としてではなく、糖の一時的な貯蔵器官として、乾燥に適応する代謝機能を構築したと考えることができる。

〔参考文献〕

1. Zheng S.H. et al. (2003) Lag period of pod growth in soybean, *Plant Prod. Sci.*, 6: 243-246.
2. Nang M.P.S.H. et al. (2011) *GmATG8c*, *GmATG8i* and *GmATG4*, *Plant Prod. Sci.*, 14: 141-147.
3. Sato J. et al. (2007) The occurrence of delayed stem senescence in relation to trans-zeatin riboside level in the xylem exudate in soybeans grown under excess-wet and drought soil conditions, *Plant Prod. Sci.*, 10, 460-467.
4. Kunert K.J. et al. (2019) Drought stress responses in soybean roots and nodules, *Front. Plant Sci.*, 7: 1015.
5. Ishibashi Y. et al. (2011) Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants, *J. Plant Physiol.*, 168: 1562-1567.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Tatsumi, Y., S. Murakami, Y. Ishibashi and M. Iwaya-Inoue (2019) Characteristics for deep root system of a drought tolerant cowpea cultivar. *Cryobiol. Cryotechnol.*, 65: 31-36. (査読有)
2. Nakagawa, A. C. S., H. Itoyama, Y. Ariyoshi, N. Ario, Y. Tomita, Y. Kondo, M. Iwaya-Inoue and Y. Ishibashi (2018) Drought stress during soybean seed filling affects storage compounds through regulation of lipid and protein metabolism, *Acta Physiol. Plant.*, 40, 6, 111. (査読有)
3. Taniguchi, T., N. Murayama, M. Hasegawa, A.C.S. Nakagawa, S. Tanaka, S.-H.Zheng, N. Hamaoka, M. Iwaya-Inoue and Y. Ishibashi (2018) Vegetative growth after flowering through gibberellin biosynthesis regulates pod setting rate in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), *Plant Signal. Behav.*, 13, 8, e1473668. (査読有)
4. 井上眞理 (2018) 植物の低温・乾燥耐性における水分生理学的研究, 低温生物工学会誌, 64 : 1-11. (査読有)
5. Md. Matiul Islam, Y. Ishibashi, Andressa C. S. Nakagawa, Y. Tomita, Xin Zhao, M. Iwaya-Inoue, S. Arima and Shao-Hui Zheng (2017) Nitrogen manipulation affects leaf senescence during late seed filling in soybean *Acta Physiol. Plant.*, 39:42. DOI 10.1007/s11738-016-2334-0. (査読有)
6. Tanaka, S., N. Ario, A. C. S. Nakagawa, Y. Tomita, N. Murayama, T. Taniguchi, N. Hamaoka, M. Iwaya-Inoue and Y. Ishibashi (2017) Effects of light quality on pod elongation in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), *Plant Signal. Behav.*, 12, 6, e1327495. (査読有)
7. Islam Md. M., Y. Ishibashi, A. C.S. Nakagawa, Y. Tomita and M. Iwaya-Inoue, S. Arima, S.-H. Zheng (2016) Nitrogen redistribution and its relationship with the expression of *GmATG8c* during seed filling in soybean, *J. Plant Physiol.*. 192: 71-74. (査読有)
8. Ariyoshi, Y., H. Itoyama. A. C. S. Nakagawa, N. Ario, Y. Kondo, Y. Tomita, S. Tanaka, M. Nakashima, K. Tomioka, M. Iwaya-Inoue and Y. Ishibashi (2016) Regulation of

brassinosteroid on pod growth through cell hypertrophy in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) *Plant Growth Regul.*, 80: 391-395. (査読有)

9. Egashira, C., T. Yamauchi, Y. Miyamoto, T. Yuasa, Y. Ishibashi and M. Iwaya-Inoue (2016) Physiological responses of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to drought stress during the pod-filling stage, *Cryobiol. Cryotechnol.*, 62: 69-75. (査読有)

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 田中征矢, A. C.S. Nakagawa, 谷口琢紀, 堀川駿, 小西拓哉, 黒瀬良太, 村山直暉, 長谷川光夫, 濱岡範光, 井上眞理, 石橋勇志 (2019) ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) における莢成長関連遺伝子 *GmPSS9* の多型による転写制御機構の解明, *日本作物学会講演会* 2019.03.
2. 辰己由華, 村上真哉, 石橋勇志, 井上眞理 (2018) ササゲの乾燥耐性品種における深根性形質の検討, *低温生物工学会年会*, 2018.06.
3. 川口颯介, 瀧石英雄, 石橋孝明, 湯淺高志 (2018) ダイズ の老化・栄養飢餓に応答したアミノ酸代謝とオートファジー調節メカニズム, *三学会合同宮崎大会*, 2018.06.
4. 田中征矢, 有吉優里, 中川アンドレッサ, 村山直暉, 谷口琢紀, 長谷川光夫, 濱岡範光, 井上眞理, 石橋勇志 (2018) ダイズ の莢成長を制御する候補遺伝子の推定, *日本作物学会講演会*, 2018.03.
5. 中川アンドレッサ, 田中征矢, 村山直暉, 谷口琢紀, 長谷川光夫, 濱岡範光, 井上眞理, 石橋勇志 (2018) 乾燥および摘莢処理がダイズ の子実成分に及ぼす影響, *日本作物学会講演会*, 2018.03.
6. 三浦寧音, 辰己由華, 濱岡範光, 井上眞理, 石橋勇志 (2018) ササゲのストレスメモリーを介した乾燥地適応戦略, *日本作物学会講演会*, 2018.03.
7. Tanaka, S., Y. Ariyoshi, A. C. S. Nakagawa, Y. Tomita, N. Murayama, T. Taniguchi, M. Hasegawa, N. Hamaoka, M. Iwaya-Inoue and Y. Ishibashi (2017) Identification of candidate gene for pod growth in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), *AFELiSA 2017 (The 14th International Joint Symposium among Japan and Korea)*, 2017.11.
8. Egashira, C., N. Miura, T. Yamauchi, Y. Miyamoto, Y. Hashiguchi, Y. Matsushima, T. Yuasa, Y. Ishibashi and M. Iwaya-Inoue (2017) Effects of drought stress on water-related parameters and photosynthate translocation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) at pod-filling stage, *AFELiSA 2017 (The 14th International Joint Symposium among Japan and Korea)*, 2017.11.
9. 井上眞理 (2017) 植物の低温・乾燥耐性における水分生理学的研究, *低温生物工学会年会*, 2017.05.
10. 柘原美咲, 三浦寧音, 駒井玲花, 辰己由華, 濱岡範光, 石橋勇志, 井上眞理 (2017) ササゲの乾燥適応における *VuWRKY* の役割, *低温生物工学会年会*, 2017.05.
11. 富田雄貴, Andressa C. S. Nakagawa, 田中征矢, 村山直暉, 谷口琢紀, 濱岡範光, 石橋勇志, 井上眞理 (2017) ダイズ の莢先熟発生機構の解析—窒素とサイトカイニンの関係について, *日本作物学会講演会*, 2017.03.
12. 富田雄貴, Andressa C. S. Nakagawa, 田中征矢, 村山直暉, 谷口琢紀, 濱岡範光, 石橋勇志, 井上眞理 (2017) ダイズ の莢先熟発生機構の解析—地下部におけるサイトカイニン合成の影響について, *日本作物学会講演会*, 2017.03.
13. 藤巻航, 松田元太, 谷口智哉, 中島皐耀, 松尾拓海, 緒方華子, 近藤夏帆, 高木啓輔, 中村昂平, 湯淺高志 (2017) 子実肥大期のササゲ葉身における乾燥ストレスに応答した加水分解酵素の活性化 および老化促進メカニズムの解析, *日本作物学会講演会* 2017.03.
14. Tanaka, S., Y. Ariyoshi, Andressa C. S. Nakagawa, Y. Tomita, N. Murayama, T. Taniguchi, N. Hamaoka, M. Iwaya-Inoue, and Y. Ishibashi (2016) Analysis of pod elongation factor in soybean (*Glycine max* L.), *AFELiSA 2016 (The 13th International Joint Symposium among Japan and Korea)*, 2016.11.
15. Tochiara, M., S. Murakami, N. Miura, R. Komai, N. Hamaoka, Y. Ishibashi, and M. Iwaya-Inoue (2016) Effect of *wrky* transcription factor induced by drought stress in cowpea, *AFELiSA 2016 (The 13th International Joint Symposium among Japan and Korea)*, 2016.11.
16. Tomita Y., A. C. S. Nakagawa, S. Tanaka, N. Murayama, T. Taniguchi, N. Hamaoka, Y. Ishibashi, and M. Iwaya-Inoue (2016) Increasing of endogenous cytokinin in reproductive

- stage is involved in green stem syndrome of soybean, *AFELISA 2016 (The 13th International Joint Symposium among Japan and Korea)*, 2016.11.
17. Miura N., S. Murakami, M. Tochiara, R. Komai, N. Hamaoka, Y. Ishibashi and M. Iwaya-Inoue (2016) Mechanism of drought stress memory in cowpea and soybean plants, *AFELISA 2016 (The 13th International Joint Symposium among Japan and Korea)*, 2016.11.
 18. 藤巻航, 松田元太, 石橋孝明, Y.Y.Tun, 谷口智哉, 中島皐耀, 松尾拓海, 緒方華子, 近藤夏帆, 高木啓輔, 中村昂平, 湯淺高志 (2016) ササゲの乾燥ストレスに応答したオートファジー活性化とアミノ酸代謝関連遺伝子の発現誘導, トランスポーター研究会九州支部会, 2016.10.
 19. 柘原美咲, 村上真哉, 三浦寧音, 駒井玲花, 濱岡範光, 井上眞理, 石橋勇志 (2016) 乾燥ストレスによるササゲの早期気孔閉鎖は ABA 合成関連因子 WRKY に制御される, *日本熱帯農業学会講演会*, 2016. 10
 20. 三浦寧音, 村上真哉, 柘原美咲, 駒井玲花, 濱岡範光, 井上眞理, 石橋勇志 (2016) ササゲとダイズにおける ABA を介した乾燥ストレスメモリー機構, *日本熱帯農業学会講演会*, 2016. 10.
 21. Nakagawa, A. C. S., N. Ario, Y. Tomita, S. Tanaka, Y. Ishibashi, M. Iwaya-Inoue (2016) Changes of soybean seed storage compounds related-genes expression under drought stress, *低温生物工学会年会*, 2016.06.

〔図書〕(計 1 件)

1. Ishibashi, Y., T. Yuasa and M. Iwaya-Inoue (2018) Seed dormancy induced by extreme dehydration and its breaking mechanism in relation to water status and reactive oxygen species. *In Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation: Adaptation Mechanisms and their Application. Advances in Experimental Medicine and Biology* 1081. pp. 233-257. Iwaya-Inoue, M., M. Sakurai, M. Uemura (eds), Springer, Singapore p.409 (査読有)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/sakumotsu/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：湯淺 高志

ローマ字氏名：Takashi YUASA

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 40312269

研究分担者氏名：石橋勇志

ローマ字氏名：Yushi ISHIBASHI

所属研究機関名：九州大学大学院

部局名：農学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 50611571

研究分担者氏名：鄭 紹輝

ローマ字氏名：Shao-Hui Zheng

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 90253517

※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。