

令和 4 年 8 月 26 日現在

機関番号：23401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2021

課題番号：16KK0173

研究課題名（和文）根圏酸化の非破壊イメージング法によるイネの酸素通気制御メカニズムの解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）To understand of a system of root aeration in rice using planar optode(Fostering Joint International Research)

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） 10,800,000円

渡航期間： 7ヶ月

研究成果の概要（和文）：酸素漏出バリアはイネなどの水の多い環境に適応した湿生植物がもつ耐湿性の重要形質である。イネは過湿ストレスを受けてから誘導的にバリアを形成する。しかし、過湿ストレスをどのような環境変動として、どの組織で感知しているかどうか？は未解明であった。本研究課題を通じて、土壌湛水の初期の環境変化である硝酸態窒素量の低下が、イネの酸素漏出バリア誘導のトリガー（きっかけ）であることを明らかにした。また、感知組織の特定のために必要な、2次元酸素オプトード法とスプリットルートシステムを最適化することができた。しかし、研究期間内には目的として掲げていた感知組織の特定を完了することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸素漏出バリアは湿生植物が持つ耐湿性の重要形質である。本研究により、イネが硝酸態窒素量の低下が酸素漏出バリアの誘導のトリガー（きっかけ）となることが明らかになった。これにより、酸素漏出バリア形成の感知に関わる、上流のシグナリング研究が可能となった。この感知機構を含んだ、上流の転写因子の研究は酸素漏出バリアを形成できず、湿害（湛水による生育障害）が問題となっている畑作物の耐性強化に寄与する。

研究成果の概要（英文）：A barrier against radial oxygen loss (ROL) is an essential trait for waterlogging tolerance in wetland plants. Rice inducibly forms the barrier to ROL under waterlogged conditions. However, whether and which tissues sense waterlogging as an environmental trigger? It was not known yet. Through this research project, we found that a reduction of nitrate-nitrogen, an early environmental change during soil waterlogging, triggers the induction of the ROL barrier in rice. We also optimized the two-dimensional oxygen optode and a split-root system to identify sensing tissues. However, we could not identify the sensing tissues within the project period.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：湿害 洪水 二次元酸素オプトード 酸素センサー 耐湿性 気候変動

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

我が国の食糧自給率を増やすために水田転換畑で問題となっている畑作物の耐湿性向上が求められている。しかし、強耐湿性の育種材料がないだけでなく、植物の耐湿性メカニズムに未解明な部分が多く、耐湿性品種の作出は困難である。

土壌から水が適切に排水されない場合、土壌は嫌気状態になる。コムギ・オオムギなどの畑作物の多くは根に通気組織をつくり拡散により酸素通気を行う。しかし、根端へ移動する酸素の30～40%が土壌へ漏出してしまうため、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。一方、耐湿性の高いイネなどの湿生植物は、基部の通気組織の外側(外皮)に、酸素の漏出を抑制するバリア(酸素漏出バリア)を形成する。これにより、根端まで効率よく酸素を供給し、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))。植物の耐湿性には根端への酸素運搬が必要であるが、通気組織の形成だけでは十分でなく、酸素漏出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。

湿生植物の酸素漏出バリアが確認されて70年が経過したが、長い間その構成物質や分子メカニズムは未解明のままである。1998年、イネが酸素漏出バリアを好気的な土壌条件では形成せずに、過湿ストレスに応じて誘導的に形成することが発見され(Colmer et al., J Exp Bot, 49:1431-1436 (1998))、誘導メカニズムの研究が進化した。その後、イネを材料とした誘導的なバリア研究により、バリアの主要な構成成分が疎水性ポリマーのスベリンであることが分かってきた(Kulichikhin et al., Plant Cell Environ, 37:2406-2420 (2014))。そのような状況の中、我々はイネのバリア誘導のタイミングを特定し(Shiono et al., Ann Bot, 107:89-99 (2011))、バリア形成中に外皮で発現する98個の遺伝子を同定した(Shiono et al., J Exp Bot, 65:4795-4806 (2014))。さらに、アブシジン酸(ABA)がこの98個の遺伝子の多くを誘導し、バリア形成にABAシグナリングが関与することを明らかにした(当時投稿中、Shiono et al., New Phytol, 233: 655-669 (2022))。しかし、ABAシグナリングの上流に位置する、環境変動のセンシングメカニズムは未解明であった。

当時、我々は硝酸態窒素量の低下がイネの酸素漏出バリアの誘導する予備的な結果を得ていた。研究を深めることで、その環境変動のセンシング機構とバリア誘導シグナリングについて、明らかにできる可能性があった。

2. 研究の目的

本研究では、ABAシグナリングの上流に位置する、環境変動を感知する組織とその組織における遺伝子発現変動を解析することで、バリア形成の分子メカニズムの解明を目指した。なお、その環境変動を感知する組織の特定には、時間的、空間的に酸素分布を観測できる非破壊酸素センサである2次元酸素オプトードを利用する必要があった。そのため、2次元酸素オプトードの開発者の一人である、南デンマーク大学(デンマーク)のRonnie N. Glud教授との国際共同研究により、本技術を駆使して感知に関わる組織の特定を進めた。

3. 研究の方法

環境変動を感知する組織の特定を目的に研究を進めた。具体的には(1)硝酸態窒素量の低下による酸素漏出バリア形成誘導の詳細を把握、(2)空間的に根の一部だけ、生育条件を変化させることができる特殊な栽培条件(ここではスプリットルートシステムと呼ぶ)の確立、(3)スプリットルートシステムでの栽培によるバリア誘導の確認を試みた。

4. 研究成果

まず、硝酸態窒素量の低下が酸素漏出バリア形成の誘導に寄与することを確認することにした。当研究室で、従来、用いていた水耕液では、 NO_3NH_4 を硝酸の供給源と利用していたため、硝酸態窒素単独の影響評価ができなかった。そこで、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ を硝酸の供給源に変更し、新たな水耕栽培法を確立させた。組成の変更が酸素漏出バリア形成に影響しないことを確認した。

続いて、硝酸態窒素の低下がバリア形成に与える影響を評価することにした。イネは好気的な水耕液では酸素漏出バリアを形成しない。ところが、他の成分組成はそのままにして、水耕液中の硝酸態窒素量のみを低下させたところ、硝酸イオン濃度が1.1 mMよりも低下すると好気的な条件であるにもかかわらず、酸素漏出バリアが誘導されることが分かった(図1a)。酸素漏出バリアの構成成分はスベリンであると考えられている。そこでスベリンの染色パターンを評価したところ、バリア形成した根で外皮のスベリン層の発達が確認できた(図1b)。

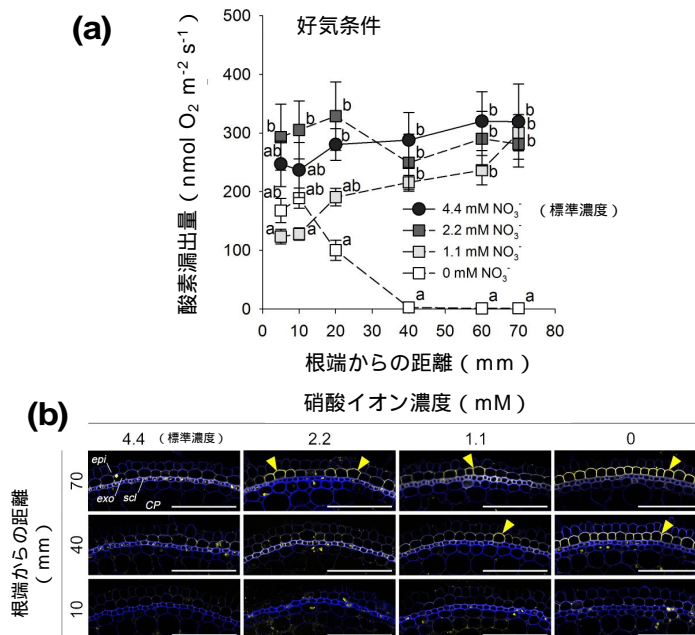


図1. 硝酸態窒素量の低下が好気条件で生育したイネの酸素漏出バリア形成に与える影響

(a)酸素漏出量の定量的によるバリア形成評価. 酸素漏出バリアが形成された根の基部は酸素漏出量がゼロに近づいている. (b)スベリン染色パターン. スベリン化した根は黄色の蛍光として検出される (黄色矢頭). 青色は自家蛍光. フロロイエロー-088 染色法. CP: 皮層. epi. 表皮. exo. 外皮. scl. 厚壁組織.

嫌気還元状態となった水耕液では、0日目に4.4 mMあった硝酸態窒素は7日間で2 mMまで低下し、イネはバリアを誘導的に形成する。そこで、過剰に3倍量のCa(NO₃)₂を水耕液に添加することで、嫌気還元条件にあっても硝酸態窒素量が標準添加量よりも高く維持できる水耕液を用意した。その条件でイネを栽培したところ、嫌気還元条件にあっても酸素漏出バリアの形成が抑制されていた。以上のことから、硝酸態窒素量の低下が酸素漏出バリアを誘導することを確認できた。

続いて、スプリットルートシステムの確立を試みた。様々な条件での検討を進めたが、ワセリンを用いて区画を仕切ること、根の一部のみのトリガー処理が可能となる栽培条件の確立に成功した。その後、スプリットルートシステムを使ってバリアの誘導性試験を進めたものの、植物の生育が安定せず、明瞭な結果を得るに至らなかった (野生型、RCN1^{PRO::GFP-GUS}などを使った実験 (図2))。ノウハウや経験の積み上げはできたものの、研究期間内に環境変動を感知する組織の特定はできなかった。

RCN1^{PRO::GFP-GUS}

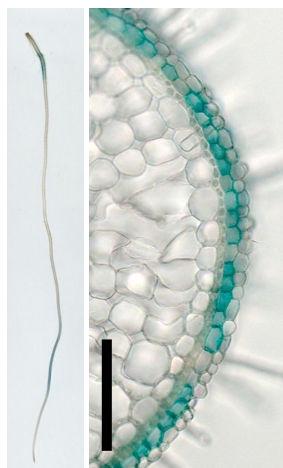


図2. スベリン生合成遺伝子を利用したレポーターアッセイ

スベリンはバリアの構成成分の一つ。スベリン生合成遺伝子 (RCN1) のプロモーター下流に GFP と GUS を連結した RCN1^{PRO::GFP-GUS} を利用して、硝酸態窒素量の低下がバリア形成に関わる遺伝子の発現をコントロールしているかどうか調べた。無肥溶液で栽培すると、スベリン生合成遺伝子 (RCN1) が根の外皮で発現していた。

なお、環境変動の感知組織の特定と形質評価に用いる二次元酸素オプトード装置の制作は順調に進めることができた。2018年、南デンマーク大学 (デンマーク) の Glud 教授の研究室に7ヶ月間滞在し、時空間的な酸素動態が可視化できる二次元酸素オプトード法を習得した。帰国後、我が国の植物科学系研究室としては初めてとなる、二次元酸素オプトード装置を福井県立大学の所属研究室で完成させた。

本研究課題で硝酸態窒素量の低下が酸素漏出バリア形成を誘導することが明らかになった。

また、本研究課題を通じて世界的な人的ネットワークが形成できただけでなく、植物が環境変化を感知するメカニズムを理解する上で欠かせない基盤技術の構築ができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shiono Katsuhiko, Yoshikawa Marina, Kreszies Tino, Yamada Sumiyo, Hojo Yuko, Matsuura Takakazu, Mori Izumi C., Schreiber Lukas, Yoshioka Toshihito	4. 巻 233
2. 論文標題 Abscisic acid is required for exodermal suberization to form a barrier to radial oxygen loss in the adventitious roots of rice (<i>Oryza sativa</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 655 ~ 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 MIYASHITA Tomoki, EJIRI Masato, SHIMAMURA Satoshi, YAMAUCHI Takaki, SHIONO Katsuhiko	4. 巻 30
2. 論文標題 Measurement of plant tissue porosity: II. Archimedes method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Root Research	6. 最初と最後の頁 41 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3117/rootres.30.41	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 塩野克宏、平修	4. 巻 55
2. 論文標題 質量分析イメージングによる複数の植物ホルモンの可視化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 84-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ejiri Masato, Fukao Takeshi, Miyashita Tomoki, Shiono Katsuhiko	4. 巻 71
2. 論文標題 A barrier to radial oxygen loss helps the root system cope with waterlogging-induced hypoxia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 40 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.20110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ejiri Masato, Sawazaki Yuto, Shiono Katsuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Some Accessions of Amazonian Wild Rice (<i>Oryza glumaepatula</i>) Constitutively Form a Barrier to Radial Oxygen Loss along Adventitious Roots under Aerated Conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 880 ~ 880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants9070880	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiono Katsuhiro, Taira Shu	4. 巻 68
2. 論文標題 Imaging of Multiple Plant Hormones in Roots of Rice (<i>Oryza sativa</i>) Using Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 6770 ~ 6775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.0c00749	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ejiri Masato, Shiono Katsuhiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Groups of multi-cellular passage cells in the root exodermis of <i>Echinochloa crus-galli</i> varieties lack not only suberin lamellae but also lignin deposits	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1719749 ~ 1719749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2020.1719749	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiono Katsuhiro, Ejiri Masato, Shimizu Kana, Yamada Sumiyo	4. 巻 22
2. 論文標題 Improved waterlogging tolerance of barley (<i>Hordeum vulgare</i>) by pretreatment with ethephon	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Production Science	6. 最初と最後の頁 285 ~ 295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1343943X.2019.1581579	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ejiri Masato, Shiono Katsuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Prevention of Radial Oxygen Loss Is Associated With Exodermal Suberin Along Adventitious Roots of Annual Wild Species of Echinochloa	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.00254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計23件(うち招待講演 3件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 塩野克宏, 芝日菜子, 越出晃子, 岩崎和也, Ronnie N Glud
2. 発表標題 二次元酸素オプトードによる植物の発芽・発根と酸素動態の研究
3. 学会等名 第17回学際領域における分子イメージングフォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芝日菜子, 塩野克宏
2. 発表標題 二次元酸素オプトード法を用いた根圏酸化モニタリング法の確立
3. 学会等名 第54回根研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江岸祐夏, 塩野克宏
2. 発表標題 イネの酸素漏出バリア誘導のトリガーを感知する組織の探索
3. 学会等名 第54回根研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩野克宏, 越出晃子, 岩崎和也, Morten Larsen, Ronnie N. Glud
2. 発表標題 2次元オプトードが光をあてる: イネが水中で発芽できるしくみ
3. 学会等名 第16回 学際領域における分子イメージングフォーラム(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩野克宏, 越出晃子, 岩崎和也, Morten Larsen, Ronnie N. Glud
2. 発表標題 2次元酸素オプトードによる酸素動態観察からみえてきたイネの発根と酸素の関わり
3. 学会等名 第52回根研究集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江尻真斗, 沢崎雄登, Xoan Nguyen T., Timothy D. Colmer, 塩野克宏
2. 発表標題 硝酸態窒素量の低下がイネの酸素漏出バリア形成のきっかけとなる
3. 学会等名 第52回根研究集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩野克宏, 越出晃子, 岩崎和也, Morten Larsen, Ronnie N. Glud
2. 発表標題 2次元酸素オプトードにより可視化されたイネの湛水発芽過程における酸素動態と苗立ちの関係
3. 学会等名 日本作物学会第251回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masato Ejiri, Katsuhiko Shiono
2. 発表標題 Evaluation of barrier to radial oxygen loss in wild rice species, <i>Oryza rufipogon</i> and <i>O. glumaepatula</i> .
3. 学会等名 13th International Society of Plant Anaerobiosis Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kana Shimizu, Katsuhiko Shiono
2. 発表標題 Cytokinin is involved in a formation of barrier to radial oxygen loss along the adventitious roots in rice (<i>Oryza sativa</i>)
3. 学会等名 13th International Society of Plant Anaerobiosis Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuhiko Shiono, Marina Yoshikawa, Tino Kreszies, Sumiyo Yamada, Yuko Hojo, Takakazu Matsuura, Izumi C. Mori, Lukas Schreiber, Toshihito Yoshioka
2. 発表標題 Abscisic acid is required for root suberization at the exodermis to form a barrier to radial oxygen loss in rice (<i>Oryza sativa</i>)
3. 学会等名 13th International Society of Plant Anaerobiosis Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuhiko Shiono, Masato Ejiri
2. 発表標題 Characterization of un-suberized passage-cells at the exodermis in annual wild species of <i>Echinochloa</i>
3. 学会等名 4th Plant Apoplastic Diffusion Barriers 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuhiko Shiono, Shu Taira
2. 発表標題 Multiple plant-hormone imaging using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) and nano-particle assisted laser desorption/ionization (Nano-PALDI) MSI
3. 学会等名 Imaging mass spectrometry for phytochemical genomics (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江尻真斗, 塩野克宏
2. 発表標題 耐湿性の重要形質である酸素漏出バリアを恒常的に形成する野生イネの探索
3. 学会等名 第136回講演会日本育種学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水香那, 塩野克宏
2. 発表標題 サイトカイニンはいネのROLバリア形成に關与する
3. 学会等名 第50回記念根研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩野克宏, 岩崎和也, Morten Larsen, Ronnie N. Glud
2. 発表標題 非破壊酸素イメージング法によるイネ発根時の酸素動態のモニタリング
3. 学会等名 第50回記念根研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩野克宏, 岩崎和也, Morten Larsen, Ronnie N. Glud
2. 発表標題 冠水状態のイネの発根には一過的な酸素上昇が必要である
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沢崎雄登, Xoan Nguyen T., 塩野克宏
2. 発表標題 イネの耐湿性に重要なROL(Radial Oxygen Loss)バリアを誘導する環境要因の探索
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水香那, 塩野克宏
2. 発表標題 サイトカイニンはイネの根のRadial Oxygen Loss (ROL) バリア形成を誘導する
3. 学会等名 第48回根研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水香那, 塩野克宏
2. 発表標題 湿生植物の耐湿性の獲得に重要な根のRadial oxygen lossバリア形成に関わる植物ホルモンの探索
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江尻真斗, 塩野克宏
2. 発表標題 Radial oxygen lossバリアはヒエ属雑草において恒常的に形成されている
3. 学会等名 第48回根研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江尻真斗, 塩野克宏
2. 発表標題 ヒエの外皮のスベリンは恒常的なRadial oxygen lossバリアとして機能する
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuhiko Shiono
2. 発表標題 Abscisic acid is required for root suberization at the exodermis to form a barrier to radial oxygen loss in rice (<i>Oryza sativa</i>)
3. 学会等名 Biosynthesis and function of suberin (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Ejiri, Katsuhiko Shiono
2. 発表標題 Suberin at the exodermis is associated with formation of a constitutive tight barrier to radial oxygen loss along adventitious roots of annual wild species of <i>Echinochloa</i>
3. 学会等名 Biosynthesis and function of suberin (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井県立大学生物資源学部生物資源学科 環境植物学分野HP
<http://www.s.fpu.ac.jp/kankyo/Home/research.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	グルッド ロニー (Glud Ronnie N)	南デンマーク大学・Department of Biology・Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
デンマーク	南デンマーク大学			