

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

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：2018～2022

課題番号：17KK0152

研究課題名（和文）高塩環境下のイネのイオン恒常性を統御する鍵遺伝子の単離を加速する電気生理解析

研究課題名（英文）Electrophysiological analysis that accelerates the isolation of key genes governing ion homeostasis of rice under salinity stress

研究代表者

堀江 智明（Horie, Tomoaki）

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：90591181

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000 円

渡航期間： 4ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究は、MIFE法と呼ばれる非侵襲的な電気生理解析技術を適用し、イネのNa⁺やK⁺の輸送・分配に関する量的形質遺伝子座の責任遺伝子同定の加速を試みる目的で実施された。初年度は、予定通り長期渡航が実現し、日本から持ち込んだ種々のイネ系統を利用しながら、MIFE法の測定技術を取得することができた。しかしながら、次年度以降、新型コロナの影響により渡航や現地での実験が困難となった。主たる研究目標はとん挫したが、初年度の材料をもとに耐塩性に関する共同研究を進めた。当研究室で注目するイネのいくつかの遺伝子が、実際に根の表層のNa⁺輸送に直接関与している新規の証拠を、MIFE法を用いて得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MIFE法は、細胞・組織を介したイオンの流束を、非侵襲的かつ定量的に解析できる電気生理技術である。その汎用性は、植物に限らず微生物から動物細胞まで多岐にわたり、今回共同研究を実施した研究機関が祖となり、その活用が世界に広がりを見せている。残念ながら、感染症の影響で本来の研究目標を達成することはできなかったが、将来の日本への同測定系の導入を目指して、基本技術を自ら習得することができた。また、類似のプロジェクトを急遽実施しながら、本研究期間に重要な成果をあげることができた。更には、共同研究パートナーとは信頼関係を深め、今後も共同研究体制を継続することになった。近い将来日本にMIFEを導入したい。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this project was to attempt accelerating the identification of the genes that function in the transport/distribution of Na⁺ or K⁺ in rice by using non-invasive electrophysiological method called MIFE. Plans for a long-term visit and learning the skill of MIFE at the first project year have been nicely completed. However, the Covid-19 has ruined every plan for the next visit and MIFE experiments since 2020. Although the main purpose of this project was thus interfered unfortunately, some important collaborative experiments using the materials left in the first year were able to be performed by the help of the researchers in the foreign laboratory. MIFE experiments using rice genetic mutants, in which some transporter gene being a research target in my laboratory was disrupted, provided novel evidence that they directly mediate Na⁺ absorption at the root surface of cultivated rice plants.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：イオン輸送 電気生理実験 耐塩性 イネ

1. 研究開始当初の背景

Microelectrode ion flux estimation (MIFE) 法は、微生物から動物、植物細胞にまで広く適用できる、特定のイオン種の流束を非侵襲的かつ定量的に解析するための電気生理技術である。MIFE 法は、本プロジェクトにて国際共同研究のパートナーとなったタスマニア大学の研究室の長、Sergey Shabala 博士（現西オーストラリア大学）が開発者の一員となって世に出した技術である（Shabala et al., 2013）。MIFE は、Shabala 博士の研究グループを中心に、植物生理学、特にストレス生理学の分野で、鍵となるイオン種の解析に大きな効力を発揮していた。植物分子生理学を専門分野とする研究代表者は、イネを中心とした塩ストレス耐性の分子機構の解明に尽力しており、特に植物の細胞や組織を介した毒性イオンである Na^+ や Cl^- 、および善玉イオンである K^+ や Ca^{2+} の流出入や組織・器官内への蓄積に興味を持っていた。また、研究代表者は、ある特定の研究対象の遺伝子に変異が導入されたイネ株を利用した研究を中心に実施していたため、それらの解析に MIFE を適用することに大変な興味と期待を抱いていた。更には、当時研究代表者は、野生イネ、あるいは耐塩性イネと栽培イネとの交雑系統を利用して、耐塩性に関与するイオン種の輸送・分配を支配する量的形質遺伝子座 (QTL) と責任遺伝子の追及といった新たな研究領域への挑戦を開始した。しかし、イネを含む作物 QTL の責任遺伝子の同定が、極めて時間と人力を要する非常にハードルの高い行為であることを認識していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の 2 点である。(1) MIFE の測定技術を自ら習得し、近い将来この解析系を日本に導入し、研究代表者が保有する複数のイオン輸送系の遺伝子変異イネ株の解析を実現するための礎を築く。(2) 幼植物の段階で非侵襲的に特定のイオン種の正味の流出入を定量評価できる MIFE の特質を、 Na^+ などの耐塩性に関与するイオン種の輸送・分配を支配するイネの QTL の責任遺伝子の追及（遺伝子マッピング）に適用する。すなわち、多大な労力と時間を要していた各イオン種の部位特異的蓄積の定量解析に代わり MIFE でのイオン流束解析を実施することで、遺伝子マッピングの過程を省力化し、責任遺伝子同定を加速する系の構築を試みることである。

3. 研究の方法

目的を達成するために、共同研究先へ長期滞在し、ホスト研究室のプロトコルや作業手順に従い MIFE 解析を実施した。各目的別の研究計画は以下である。(1) 日本から持ち込んだ野生イネ (*Oryza rufipogon*) や耐塩性イネ (*O. sativa*)、栽培イネ (*O. sativa*) を材料として、塩ストレス有無の条件下で、根の表層組織をターゲットにして MIFE 解析を実施する。(2) 先行プロジェクトにより研究代表者の研究室で発見していた、塩ストレスを被るイネの若い葉身への Na^+ 蓄積を制御する野生イネ由来の QTL を持つイネ交雑系統（未公表）を MIFE で詳細に解析し、研究代表者の研究室で得た Na^+ 蓄積の表現型との相関性を検証する。栽培イネとの戻し交雑後代系統の準備が間に合えば、これらの結果をもとに、更に MIFE の QTL マッピングへの適用を試みる。

4. 研究成果

2018 年度に国内で元素分析実験や渡航先で使用するイネ種子材料の準備を進め、2019 年度から渡航の計画を立てた。各目的別の研究成果を以下に概術する。

(4-1) MIFE の測定技術を自ら習得し、近い将来この解析系を日本に導入し、研究代表者が保有する複数のイオン輸送系の遺伝子変異イネ株の解析を実現するための礎を築く。

2019 年 4 月下旬にタスマニア大学へ渡航し、同年 9 月中旬に帰国するまで Shabala 研究室にて MIFE 実験の原理を学び技術習得を試みた。まずは、ホスト研究室で保持していたジャポ

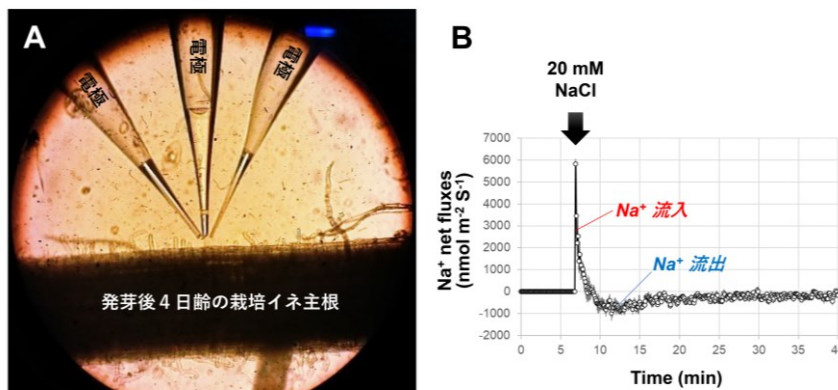


図1. 栽培イネの根の成熟領域表層のMIFE解析とNaCl刺激によるNa⁺流出入の様子の例：A. MIFE測定開始直前の写真. B. 刺激前後のNa⁺の正味の流束

ニカミの栽培種を利用して MIFE 測定を行った。操作に慣れるにつれて、日本からあらかじめ送付した、野生イネ、耐塩性イネなども利用しながら、更なる MIFE の理解と技術の完全な習得を試みた。試行錯誤と反復実験を 1 カ月強繰り返した結果、一連の操作やその原理

を把握し、イネの根の表層組織を介した Na^+ や K^+ 、 H^+ などの正味の流束を、定量的にとらえることができるようになった。非ストレス条件下で準備した栽培イネ（コシヒカリ）の根の表層に、20 mM の NaCl の刺激を突然与えた際の Na^+ の正味の流束の変化の例を図 1 に示す。渡航初年度は、概ね計画通りの実験技術の習得と、日本から送付した遺伝子変異株も含めたいくつかの異なるイネ系統を利用して、順調に MIFE 実験の練習を繰り返すことができ、次年度の本格測定に向けて充実の滞在となった。

(4-2) 幼植物の段階で非浸出的に特定のイオン種の正味の流出入を定量評価できる MIFE の特質を、 Na^+ などの耐塩性に関与するイオン種の輸送・分配を支配するイネの QTL の責任遺伝子の追究（遺伝子マッピング）に適用する。

当初の計画では、2020 年度 4 月から 9 月の下旬にかけて、再渡航と Shabala 研究室への長期滞在を予定していた。しかしながら、2019 年 12 月頃から突如中国武漢から巻き起こった新型コロナウイルス感染症に、その後のプロジェクトの進行が大きく阻まれてしまった。その間、オーストラリアへ新たにイネ種子を送付することも段々と難しくなり、その後は感染症の収束と再渡航実現の可能性に期待しつつ、数年プロジェクトの延長を行いながら機会を待った。残念ながら、感染症の動向は落ち着かず、自身の長期渡航も不可能な状況となり、実質本目的 (2) は、今回は断念せざるを得ない状況に追い込まれた。

再渡航と自身による MIFE 実験の再開は諦めねばならなかったものの、MIFE の元祖である研究室との国際共同研究の機会を無駄にしないために、当初の計画にはなかった類似の研究計画の実施を先方に共同で進める提案をした。研究代表者の研究室では、イネの耐塩性、および Na^+ や K^+ 輸送に重要な役割を担うと予想されるいくつかの遺伝子に着目し研究を続けている。幸い、日本から送付できた種子の中に、各遺伝子が破壊されたイネ株が含まれていた。そこで、

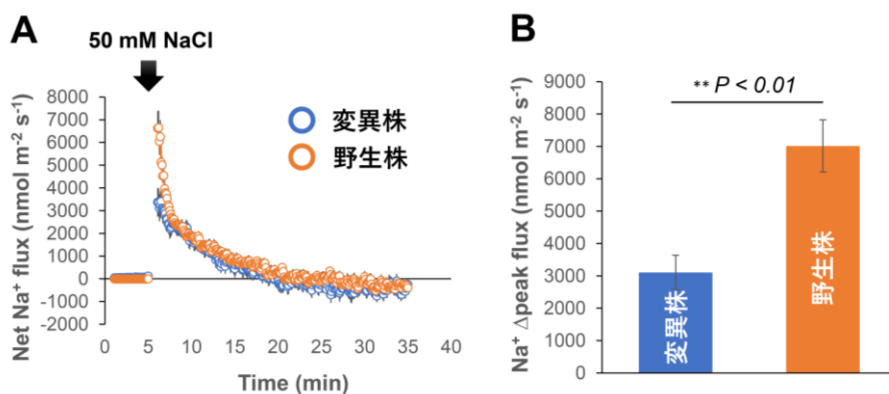


図2. ある遺伝子が破壊されたイネ株の根の伸長領域表層のMIFE解析：

A. 塩ストレス刺激前後の Na^+ の正味の流束. B. 刺激後のイオン流入ピーク時の Na^+ 流束量の定量比較（変異株 vs. 野生株）.

して、明らかに塩ストレス刺激後の Na^+ 流入が顕著に減少していることが証明された（図 2：未公表のため遺伝子名は未記載）。別の遺伝子の変異株に関しても同様の MIFE 解析を進めた結果、類似のポジティブデータが得られた（データ未提示）。これらの成果は、本助成期間終了後になるが、論文として公表する予定である。また、Shabala 研究室との共同研究体制を今後も可能な限り維持し、日本への MIFE 導入と今回断念せざるを得なかった MIFE の遺伝子マッピングへの応用へのチャレンジを、将来実現したい。

参考文献

Sergey Shabala, Lana Shabala, Jayakumar Bose, Tracey Cuin, Ian Newman. (2013) Ion flux measurements using the MIFE technique. *Methods Mol Biol.* 953:171-183. doi: 10.1007/978-1-62703-152-3_11.

先方の博士課程学生の助力も得て、それらの遺伝子破壊株の MIFE 解析を実施することができた。興味深いことに、栽培イネの根の表層から Na^+ 流入を媒介する可能性が考えられたある遺伝子の破壊株を解析した所、野生型と比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ichirou Karahara, Tomoaki Horie	4. 巻 71
2. 論文標題 Functions and structure of roots and their contributions to salinity tolerance in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 89-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.20123	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 Mohammad Al Nayef, Celymar Solis, Lana Shabala, Takaaki Ogura, Zhonghua Chen, Jayakumar Bose, Frans J.M. Maathuis, Gayatri Venkataraman, Keitaro Tanoi, Min Yu, Meixue Zhou, Tomoaki Horie and Sergey Shabala	4. 巻 21
2. 論文標題 Changes in Expression Level of OSHKT1;5 Alters Activity of Membrane Transporters Involved in K ⁺ and Ca ²⁺ Acquisition and Homeostasis in Salinized Rice Roots	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4882
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21144882	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

信州大学学術情報オンラインシステムSOAR http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.OFTmWUDU.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	シャバラ セルゲイ (Shabala Sergey)	タスマニア大学・農学研究科・教授	Shabala研究室は、2023年6月より西オーストラリア大学へ移転。

	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
その他の研究協力者	石川 亮 (Ishikawa Ryo) (70467687)	神戸大学・農学研究科・准教授 (14501)	

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			
オーストラリア	タスマニア大学			