

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15815

研究課題名（和文）イネ節間における水ストレス耐性の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism of water stress tolerance in rice internode.

研究代表者

永井 啓祐（Keisuke, Nagai）

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・助教

研究者番号：30648473

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：洪水時に一般的な水田イネは酸素欠乏により溺死するのに対して、浮イネは急激な節間伸長により洪水時にも葉先を水面に出し、水面下の組織に効率的に酸素を供給することで洪水環境下においても生存することが可能である。これまで浮イネの伸長には植物ホルモンの一つであるジベレリンが関与していることは知られていたが、詳細な分子機構については未解明であった。本研究ではジベレリンに応答して節間における細胞分裂を制御する2つの遺伝子を見出し、ジベレリンによるイネの節間伸長制御機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネ科作物の草丈は収量性と密接に関連しているため、重要な農業形質の一つであるが、これまでの草丈関連育種は耐倒伏性の観点から短稈化が主流であった。一方、東南アジアを中心に栽培されている浮イネは、洪水時に水位の上昇に合わせて茎（節間）を伸長させることで洪水による溺死を回避している。これまでに、浮イネの節間伸長には植物ホルモンの一種であるジベレリンが関与することが知られていたが、詳細な分子メカニズムは未解明であった。本研究は、ジベレリンによるイネの節間伸長制御機構を解明するとともに、近年、世界で多発する洪水によるイネ科作物の被害に対して、節間伸長による洪水耐性といった育種的应用を目指すものである。

研究成果の概要（英文）：Normal paddy rice drowns due to oxygen deprivation during flood. On the other hand, deepwater rice can survive in flooding environment because its internodes elongate rapidly, allowing the leaf tips to rise to the water surface and take up oxygen during flooding. Although it has been known that gibberellin, a plant hormone, is involved in elongation of deepwater rice, the detailed molecular mechanism has not yet been elucidated. In this study, I found two genes that regulate cell division in the internodes in response to gibberellin and elucidated the regulatory mechanism of internode elongation in rice by gibberellin.

研究分野：植物遺伝育種

キーワード：洪水耐性 節間伸長 イネ 介在分裂組織 ジベレリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界三大穀物であるイネ、コムギ、トウモロコシの中でイネは唯一、水田環境で栽培が可能であることから、イネは独自の耐水性機構を獲得したことで水田におけるニッチを獲得したと言える。その中でも東南アジアを中心に栽培されている浮イネと呼ばれるイネは、雨季に発生する数メートルにもおよぶ洪水が数ヶ月にわたる環境において、水位に応じた茎(節間)伸長を行い、葉を水面上に出して呼吸や光合成を維持することで洪水という過酷な環境にも適応している。そこで私はこれまでに浮イネの節間伸長を制御する遺伝子領域を同定するために、バングラデシュ由来の浮イネ C9285(Dowai 38/9)と台湾由来の一般的な水田イネ Taichung 65 (T65)の F₂集団を用いて、節間伸長性に関する QTL 解析を行なった。その結果、洪水環境下における伸長節間長の和である総節間長(TIL: Total Internode Length)を制御する *qTIL1* と *qTIL12* をそれぞれ第 1 染色体と第 12 染色体に検出し、早期節間伸長の指標である最低伸長節間(LEI: Lowest Elongated Internode)を制御する *qLEI3* と *qLEI12* をそれぞれ第 3 染色体と第 12 染色体に検出した。その後の解析により *qTIL1* の原因遺伝子としてジベレリン生合成酵素の一つである *GA20ox2* を同定した(Kuroha, Nagai *et al.*, 2018)。一方、*qTIL12* と *pLEI12* はともに第 12 番染色体末端の同様の位置に検出されたが、*qTIL12* の原因遺伝子である *SNORKEL1* および *SNORKEL2* の過剰発現植物では節間長は長くなるものの LEI の低下(早期節間伸長)は見られなかった。このことから、*SNORKEL1* および *SNORKEL2* の機能は伸長を開始した節間の長さを促進することであり、早期節間伸長を制御する *qLEI12* の原因遺伝子は別に存在することが考えられた。また、それぞれの QTL に関して準同質遺伝子系統(NIL: Nearly Isogenic Line)を作出し、ジベレリン処理を行ったところ、*qLEI3* または *qLEI12* を保持する NIL3 と NIL12 は、それぞれジベレリンにตอบสนองした早期節間伸長を誘導した。これらの結果から、浮イネでは洪水環境下において *GA20ox2* によりジベレリンの生合成量が増加し、*qLEI3* および *qLEI12* の原因遺伝子によってジベレリン応答性が促進されることによって節間伸長が開始されるものと推察された。しかし、イネがジベレリンにตอบสนองして節間を伸長させる詳細な分子メカニズムについては未解明な部分が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究は、節間において高ジベレリン感受性を示す浮イネをモデル植物と考え、ジベレリンに応じたイネの節間伸長開始制御機構の解明を試みた。また、本研究で得られた知見を一般的なイネに応用することで、洪水耐性イネを作出することを育種的な目的とした。

3. 研究の方法

(1)浮イネ第 3 および第 12 染色体に座乗する GA 応答性を決定する責任遺伝子の同定と機能解析
私はこれまでに、浮イネ第 3 および第 12 染色体に GA にตอบสนองした節間伸長を制御する QTL を検出した(Nagai *et al.*, 2014)。そこで本研究では、ポジショナルクローニングによって責任遺伝子の同定を行なった。

(2)節間介在分裂組織の発達過程および機能活性化機構の解明

イネ科植物の節間の伸長には節間基部に形成される介在分裂組織の活性が必須であるが、発達過程や分子機構に関しては不明である。そこで、細胞分裂周期における S 期マーカーである EdU を用いた組織化学的な解析によってイネ節間の介在分裂組織の発達過程を明らかにした。

4. 研究成果

(1)浮イネ第 3 および第 12 染色体に座乗する GA 応答性を決定する責任遺伝子の同定と機能解析
qLEI3 と *qLEI12* の責任遺伝子の同定を目指し、ポジショナルクローニングを行なった結果、*qLEI3* の責任遺伝子として機能未知のタンパク質をコードする *ACCELERATOR OF INTERNODE ELONGATION1 (ACE1)* と、*qLEI12* の責任遺伝子として C2H2 型 zinc-finger 転写因子をコードする *DECELERATOR OF INTERNODE ELONGATION1 (DEC1)* を同定した。これらの機能解析を進めたところ、興味深いことに浮イネでは、ジベレリンによって *ACE1* の発現が上昇し、これにより節間の介在分裂組織における細胞分裂が活性化することで節間伸長が促進されたのに対して、*DEC1* はジベレリン存在下で発現が減少し、これにより節間の介在分裂組織における細胞分裂活性が上昇することで節間伸長が促進されることが明らかとなった。これらの結果は、節間介在分裂組織の細胞分裂制御に対して相反する機能を有する因子の初めての報告例である。一方で一般的な水田イネでは、*ACE1* のコード配列に突然変異が存在しており、機能的な *ACE1* タンパク質が作られないことに加え、栄養成長期ではジベレリン存在下でも *DEC1* が高発現しているために節間伸長が起こらないと考えられた。しかし、一般的な水田イネにおいても生殖成長期になると *ACE1* 遺伝子のホモログである *ACE1-LIKE1* の発現量が増加するとともに、*DEC1* の発現量が減少することで節間伸長が開始することが明らかとなった。

私はこれまでに浮イネの節間伸長に関わる遺伝子を 5 つ見出した(*SNORKEL1*, *SNORKEL2*, *GA20ox2*, *ACE1* and *DEC1*)。そこで本研究では洪水耐性作物の育成を目指し、これらの遺伝子を一般的なイ

ネ T65 に集積させた系統を作出し、洪水環境を模した 1.2m の深水条件下において節間伸長性および収量性を評価した。その結果、T65 は 3 ヶ月に及ぶ深水処理では生存することができなかったのに対して、遺伝子集積系統では節間伸長を誘導することで深水環境でも生育を続けた。さらに、通常の水田環境で生育させた T65 の収量と比較して深水条件下で生育させた遺伝子集積系統の収量は約 10%減少するものの、深水環境下においても収穫が可能であることを実証した。このことから、浮イネの節間伸長制御遺伝子群が洪水耐性作物の創出に向けた有用な育種素材になり得ることが示された。

(2) 節間介在分裂組織の発達過程および機能活性化機構の解明

節間形成には intercalary meristem と呼ばれる介在分裂組織、皮層分裂組織、小維管束付属分裂組織が関わりとされている(川原ら, 1968)。介在分裂組織の位置に関しては、浮イネ伸長節間において節隔壁の上部 3-4 mm から始まるとされている(Catling 1992)。節間分裂組織の特定、および形態形成過程についての観察結果について、トリチウム化チミジンを用いた分裂部位の観察が行われている(Mettraux and Kende, 1984)。しかし、節間の伸長過程において、初期節間のどの段階で分裂能力を獲得しているのか、また、節間介在分裂組織における分裂活性の空間的局在および維持期間については明らかにされていなかった。また、節間中央部の髓腔の形成過程と分裂領域の空間的配置に関する詳細についても未解明であった。そこで本研究では、節間分裂組織の特定および節間形成過程と分裂能の活性の関係の解明を目的とし、EdU と蛍光物質の click 反応(EdU 反応)を用いた節間分裂組織の組織化学的な解析を行った。

はじめに、浮イネの伸長節間の発達と髓腔形成過程についてトリパンブルー染色(死細胞染色)による観察を行なった。その結果、伸長節間を以下の 4 つの Stage に分類した。節間発達初期で髓腔が生じていない節間形成初期を Stage1、下位節直上の領域に細胞死が起こり(一次崩壊)、1 つの髓腔が形成される時期を Stage2、1 つ目の髓腔の上でさらに細胞死が起こり(二次崩壊)、節間内に上下 2 つの髓腔が形成される時期を Stage3、上下二つの髓腔がつながり 1 つの巨大な髓腔になる時期を Stage4 とした。

その後、髓腔形成をもとにした節間発達段階を参照して EdU 染色の観察を行った。その結果、浮イネ C9285 では節間形成初期(Stage1)の、節間長が約 0.8mm で節間に髓腔が生じる前段階においては、節間部分において蛍光が一様に観察された。同じ Stage1 の節間長が約 1mm のものでは、同一節間の下部で楕円状に蛍光が検出されない部位が観察され、ここが髓の一次崩壊につながる部位であると考えられた。Stage2 の節間長が約 1.7mm の蛍光観察では、一次崩壊の側面における蛍光頻度は下がっており、一次崩壊上部に蛍光が帯状に観察された。また、上位節のすぐ下に楕円状の蛍光が観察されない部位が存在し、この部分が髓の二次崩壊につながる部位であると考えられた。Stage3 の節間長が約 6mm の蛍光観察では、一次崩壊側面においては節網維管束(nodal vascular anastomosis)部分では蛍光が観察されたが、髓柔細胞の部分ではほとんど蛍光が観察されなかった。Stage3 の節間では、二次崩壊が大きく拡大している様子が観察され、二次崩壊側面から基部の髓にかけて広範囲に蛍光が観察された。また、二次崩壊側面の基部から上部方向に向けて蛍光頻度が低下した。Stage4 の節間が大きく伸長したものは、一次崩壊側面においてはほとんど蛍光が観察されず、二次崩壊側面の基部において蛍光が観察されたが、蛍光頻度は低下している様子が見られた。一般的なイネである T65 の栄養成長期の節間では、Stage1 までの現象が観察され、生殖成長期には浮イネと同様に Stage4 までの現象が観察された。以上のことから、イネの節間伸長には二段階の制御機構が存在すると考えた。すなわち、イネ節間伸長における二段階制御機構のうち、Stage1 までの 1 つの髓腔形成とわずかな伸長を示す現象を一次節間伸長とし、その後、2 つ目の髓腔を生じ、その側面で顕著な細胞分裂を伴う現象を二次節間伸長とした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yin Yong Gen, Mori Yoshinao, Suzui Nobuo, Kurita Keisuke, Yamaguchi Mitsutaka, Miyoshi Yuta, Nagao Yuto, Ashikari Motoyuki, Nagai Keisuke, Kawachi Naoki	4. 巻 232
2. 論文標題 Noninvasive imaging of hollow structures and gas movement revealed the gas partial pressure gradient driven long distance gas movement in the aerenchyma along the leaf blade to submerged organs in rice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1974 ~ 1984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17726	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 Nagai Keisuke, Kurokawa Yusuke, Mori Yoshinao, Minami Anzu, Reuscher Stefan, Wu Jianzhong, Matsumoto Takashi, Ashikari Motoyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 SNORKEL Genes Relating to Flood Tolerance Were Pseudogenized in Normal Cultivated Rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 376 ~ 376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants11030376	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 Fukushima Atsushi, Kuroha Takeshi, Nagai Keisuke, Hattori Yoko, Kobayashi Makoto, Nishizawa Tomoko, Kojima Mikiko, Utsumi Yoshinori, Oikawa Akira, Seki Motoaki, Sakakibara Hitoshi, Saito Kazuki, Ashikari Motoyuki, Kusano Miyako	4. 巻 10
2. 論文標題 Metabolite and Phytohormone Profiling Illustrates Metabolic Reprogramming as an Escape Strategy of Deepwater Rice during Partially Submerged Stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 68 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo10020068	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 Nagai K., Mori Y., Ishikawa S., Furuta T., Gamuyao R., Niimi Y., Hobo T., Fukuda M., Kojima M., Takebayashi Y., Fukushima A.i, Himuro Y., Kobayashi M., Ackley W., Hisano H., Sato K., Yoshida A., Wu J., Sakakibara H., Sato Y., Tsuji H., Akagi T., Ashikari M.	4. 巻 584
2. 論文標題 Antagonistic regulation of the gibberellic acid response during stem growth in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 109 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-2501-8	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 Shuto Yamada, Yusuke Kurokawa, Keisuke Nagai, Rosalyn B Angeles-Shim, Hideshi Yasui, Naruto Furuya, Atsushi Yoshimura, Kazuyuki Doi, Motoyuki Ashikari, and Hidehiko Sunohara	4. 巻 18
2. 論文標題 Evaluation of backcrossed pyramiding lines of the yield-related gene and the bacterial leaf blight resistant genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of international cooperation for agricultural development	6. 最初と最後の頁 18~28
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Y. Mori, Y. Kurokawa, M. Koike, A. I. Malik, T. D. Colmer, M. Ashikari, O. Pedersen and K. Nagai	4. 巻 60
2. 論文標題 Diel O ₂ dynamics in partially and completely submerged deepwater rice: Leaf gas films enhance internodal O ₂ status, influence gene expression and accelerate stem elongation for 'Snorkelling' during submergence.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 973-985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz009	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

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 永井啓祐、森欣順、石川慎、Rico Gamuyao、新美陽子、保浦徳典、福田萌莉、榊原均、古田智敬、久野 裕、佐藤 和 広、赤木剛士、小嶋美紀子、竹林 裕美子、福島敦史、氷室泰代、小林正智、呉健忠、アキリ巨、吉田綾、辻寛之、佐藤豊、芦莉基行
2. 発表標題 ACE1とDEC 1 によるイネ節間伸長のantagonistic制御2
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永井啓祐、森欣順、石川慎、Rico Gamuyao、新美陽子、保浦徳典、福田萌莉、榊原均、古田智敬、久野 裕、佐藤 和 広、赤木剛士、小嶋美紀子、竹林 裕美子、福島敦史、氷室泰代、小林正智、呉健忠、アキリ巨、吉田綾、辻寛之、佐藤豊、芦莉基行
2. 発表標題 イネ節間伸長の開始制御機構の解明
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永井啓祐、森欣順、石川慎、Rico Gamuyao、新美陽子、保浦徳典、福田萌莉、榊原均、古田智敬、久野 裕、佐藤 和 広、赤木剛士、小嶋美紀子、竹林 裕美子、福島敦史、氷室泰代、小林正智、呉健忠、アキリ亘、吉田綾、辻寛之、佐藤豊、芦苺基行
2. 発表標題 The regulation of phase transition in rice internode
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永井啓祐、森欣順、石川慎、Rico Gamuyao、新美陽子、保浦徳典、福田萌莉、榊原均、古田智敬、久野 裕、佐藤 和 広、赤木剛士、小嶋美紀子、竹林 裕美子、福島敦史、氷室泰代、小林正智、呉健忠、アキリ亘、吉田綾、辻寛之、佐藤豊、芦苺基行
2. 発表標題 イネ節間におけるジベレリンに応答した拮抗的伸長制御機構
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keisuke Nagai, Shin Ishikawa, Mori Yoshinao, Yoko Niimi, Tokunori Hobo, Motoyuki Ashikari
2. 発表標題 Antagonistic regulatory mechanism by accelerating and decelerating factors in internode elongation of rice for flooding adaptation.
3. 学会等名 The 13th International Society of Plant Anaerobiosis Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井啓祐, 芦苺基行
2. 発表標題 イネ節間伸長における拮抗的制御機構
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 永井啓祐、芦苅基行
2. 発表標題 節間伸長促進因子SNORKEL-LIKEsの偽遺伝子化による水田イネ短稈化機構の解明
3. 学会等名 日本育種学会 第141回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永井啓祐
2. 発表標題 イネ節間伸長の分子機構の解明
3. 学会等名 日本育種学会 第141回講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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	The University of Western Australia			
デンマーク	University of Copenhagen			