

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：23401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880024

研究課題名（和文）作物の耐湿性強化に寄与する根の酸素通気システム制御機構の解明

研究課題名（英文）Understanding the regulation mechanism of oxygen transportation system for crop waterlogging tolerance.

研究代表者

塩野 克宏（SHIONO KATSUHIRO）

福井県立大学・生物資源学部・助教

研究者番号：20610695

研究成果の概要（和文）：

我が国の食料自給率を増やすためには、水田転換畑で問題となっている畑作物の耐湿性の向上が重要である。しかし、植物の耐湿性のメカニズムには未解明な部分が多く、その方策の立案すら困難である。本研究課題では、植物の耐湿性に深く関与する根の Radial Oxygen Loss (ROL) バリアの形成に関わる遺伝子の単離を目的に研究を推進した。結果、部分的効果ではあるもののイネの ROL バリア形成に関わる遺伝子 (*REDUCED CULM NUMBER1*) を初めて同定できた。

研究成果の概要（英文）：

In Japan, soybean, wheat and barley are grown in the paddy field using for rice cultivation. Thus, waterlogging is one of the biggest problems for the cultivation of these field crops. However, the most part of mechanism of waterlogging tolerance remains unexplained. Formation of barrier to Radial Oxygen Loss (ROL) is one of effective adaptation trait for survival in the waterlogged soil conditions. So far, it was not identified to regulate formation of barrier to ROL. Here, we identified that *REDUCED CULM NUMBER1* gene partly regulates to form barrier to ROL in rice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：湿害、耐湿性、イネ、スベリン、ROL バリア、低酸素、根

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の食料自給率を増やすためには、水田からの転換畑で深刻な問題となっている畑作物の耐湿性を向上させることが重要である。しかし、植物の耐湿性のメカニズムに

は未解明な部分が多く、その方策を立てることすら難しいのが現状である。

土壌から水が適切に排水されない場合には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

り拡散により根の酸素通気をおこなう。しかし、根端へ移動する酸素の30~40%が土壌へ漏洩してしまう（この酸素漏洩は Radial Oxygen Loss (ROL) と呼ばれる）ため、成長点のある根端部へ供給される酸素量が減少し、根の伸長停止や障害が引き起こされる。一方、耐湿性の高いイネは基部の通気組織の外側（外皮）に、過湿環境に誘導的に酸素の漏洩を抑制するバリア（ROL バリア）を形成することによって、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。このように植物の耐湿性には根端への酸素運搬が必須であるが、これには通気組織の形成だけでは十分でなく、ROL 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。

湿生植物が ROL バリアを形成する現象が確認されてから 50 年が経過したが、構成物質や遺伝子は特定されていない。最近の生理・形態学的研究により、構成物質がスベリンという疎水性のバイオポリマーであることが推定されていたが、これまで変異体を用いた直接的な証明がなく、ROL バリアの構成成分は特定されていない。申請者らは ABC トランスポーターをコードする *OsABCG5* 遺伝子に点変異が入っている *reduced culm number1* (*rcn1*) 変異体が、ROL バリアの形成部位である根の外皮のスベリン層を形成できないことを明らかにした。そのため、スベリン変異体 (*rcn1*) における ROL バリア形成機能の評価により、ROL バリアの形成に関わる遺伝子を同定できる可能性があった。

## 2. 研究の目的

ROL バリアは耐湿性と深く結びついた重要形質であるにも関わらず、構成成分や遺伝子が同定されていないため、その形質の農業利用が困難である。そこで、本研究課題ではイネの ROL バリアの構成成分と遺伝子を同定する。そして、湿害が問題となっているイネ科のコムギ、オオムギと比較する。これらを通じ、コムギ・オオムギが湿害に弱い原因を探り、畑作物の耐湿性強化のための有効な方策を提言することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

実験にはイネ (*Oryza sativa*) 赤室、しおかりおよび日本晴品種を用いた。スベリン変異体として赤室、しおかりへの  $\gamma$  線照射によって得られた *reduced culm number1*、またその遺伝子相補系統および vector control を実験に使用した (Takamura & Kinoshita, Jap. J. Breed., 1985; Yasuno et al., J. Hered., 2007; Yasuno et al., New Phytol., 2008)。

イネは水耕法で栽培した。イネの栽培は、9 日間好気条件で栽培し、14 日間嫌気還元処

理または好気条件で栽培をつづけたもの（長期処理）。または 16 日間好気栽培し、5 日間嫌気還元処理をしたもの（短期処理）の 2 つの栽培期間で実施した。なお、好気条件とは水耕液にエアポンプで空気を送り続けたものを示す。また、嫌気還元条件とは 0.1% の agar を添加し溶解させた粘性の高い水耕液に窒素ガスを通気することで液中の酸素を追い出したものとする。この水耕液は低酸素かつ酸化還元電位が低下するため、過湿状況となった土壌の状況を模擬することができる (Wiengweera et al., Ann Bot., 1997)。

イネの ROL バリア形成評価はメチレンブルー染色法を用いた。根の切片のスベリンラメラ染色は Fluorol Yellow 088 法により染色し、蛍光顕微鏡で観察した。また、スベリンの定量にはセルラーゼとペクチナーゼを含む酵素液で処理した後、根の表皮側のみをピンセットで集めたサンプルを使用した。これにより、GC/GC-MS により根の外皮のみのスベリン量を定量した。

## 4. 研究成果

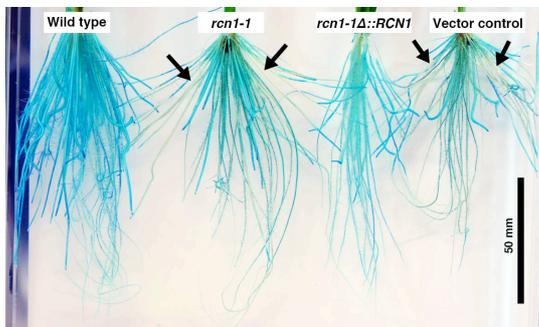
根の外皮のスベリン層が ROL バリアとして機能していると考えられていた (Kotula et al. JXB, 2009)。*rcn1* 変異体は根の外皮のスベリン層を形成することができない変異体である。そのため、ROL バリアを形成できないことを予想し、*rcn1* の ROL バリア形成能力を評価した。

まず、慣行法である 14 日間の嫌気還元処理（長期処理）によって *rcn1* で ROL バリアが形成されるかどうかを調べた。この条件では野生型において ROL バリアが形成される。同様に *rcn1* 変異体においても ROL バリアが形成された。この時の根の外皮のスベリン層を蛍光染色したところ、外皮のスベリンラメラは野生型で確認できるものの *rcn1* 変異体では検出されなかった。また、GC/GC-MS によって、 $C_{16}$  から  $C_{30}$  までの脂肪酸から構成されているスベリンの各成分を定量したところ、*rcn1* 変異体では野生型にみられる  $C_{28}$ 、 $C_{30}$  の極長鎖脂肪酸が低下していた。長期の過湿ストレス条件下では、*rcn1* 変異体はスベリン層が形成できないにも関わらず、ROL バリアを形成していた。

以上の結果は 14 日間という長期のストレス処理によって得られる結果であるため、代謝変化に伴う 2 次的な影響が *rcn1* 変異体に ROL バリアさせたという可能性が考えられた。そこで、5 日間という短期処理による *rcn1* 変異体の ROL バリア形成を評価した (図 1)。この条件では、野生型において 10 cm 以上の長い根で ROL バリア形成がみられるものの、5 cm 程度の短い根ではまったく ROL バリアが形成されないという処理条件である。図 1 で示したように、野生型および *rcn1* 変異体に

正常型の *RCN1* 遺伝子形質転換し、*RCN1* の機能を復帰させた *rcn1-1Δ::RCN1* では、5 cm 程度の短い根で ROL バリアは形成されなかった。この結果はこれまでの知見通りであった。しかし、*rcn1* 変異体と empty vector を形質転換した vector control において、通常形成されることのない、5 cm 程度の短い根で ROL バリアが形成された。しかし、この ROL バリアを形成した *rcn1* の根のスベリン量を GC/GC-MS で定量したところ、スベリンの極長鎖脂肪酸量が低下しており、スベリン量が増加しなかった。スベリンが ROL バリアの構成物質であるといわれていることから予想していた、スベリン量が低下することで、ROL バリアが形成されない。というような相関はみられなかった。

(a)



(b)



図 1. 短期の嫌気還元処理による *rcn1* 変異体の ROL バリア形成力の評価。メチレンブルーは酸素の非存在下では無色透明、酸素存在下では青く呈色する。根からの酸素漏出が抑えられ、ROL バリアを形成した場合は根の基部では染色がなく、根端のみが青く染まる。これによりメチレンブルー染色法により ROL バリアが可視化できる。(a) 5 cm 程度の短い根に形成された ROL バリア (黒矢印)。(b) *rcn1* 変異体の 10 cm 程度

の長い根でしかみられない、根の基部から酸素漏出が見られるものの、根端から 2 cm 程度の部分で酸素漏出がみられる特殊な漏出パターン (ピンク矢印)。

先に示したように、*rcn1* 変異体では短い根で特徴的なバリア形成パターンを示した。一方で、野生型が短期処理でも ROL バリアを形成できる長い根に着目すると、*rcn1* 変異体

の短い根とは異なる特徴が分かった。*rcn1* 変異体の長い 10 cm 程度の根では、根の基部部分では ROL バリアを形成せず、根端から 20-40 mm 程度の部位で酸素漏出が抑制されていた。ROL バリアは、本来、根の基部で形成される。しかし、*rcn1* 変異体の長い根では ROL バリアが形成されなかったということになる。

では、長い根と短い根の ROL バリア形成応答の違いをどのように考えたら良いのだろうか? 長い根の ROL バリアを形成した部位は嫌気還元処理をはじめた時点では根端、もしくはまだ形成されていない部位であった。すなわち、長い根で ROL バリア形成がみられた根端近くの部位は、処理開始後に伸びた新しい組織であると言える。同様に長さや伸長速度から鑑みて、短い根の ROL バリアを形成していた部位も処理開始後に発根した根である。一方、*rcn1* 変異体が ROL バリアを形成できない長い根の基部は、嫌気還元処理開始時には既に根の基部にあたる部位であった。すなわち処理前には既に成熟した細胞として分化していたということになる。このことから、*rcn1* における根の長さによる ROL バリア形成パターンの差は、根の age と反応性の違いが影響していると考えられる。

しかしながら、GC/GC-MS によってスベリンの分析を行った結果、ROL バリア形成とスベリンの相関がみられていない。これら *rcn1* 変異体を用いた一連の研究によって明らかになったことは、スベリンだけではなく、スベリン以外の物質が ROL バリアとして機能することを示唆している。

以上の結果をふまえて、湿害が問題となっている畑作物への耐湿性強化について考える。湿害が問題となっているオオムギやコムギは根に ROL バリアを形成しない (McDonald et al., *New Phytol*, 2001; Garthwaite et al. *Funct. Plant Biol.* 2003)。オオムギでも根の下皮のスベリン化は報告されている。このことから、単純なスベリン量の増加だけではオオムギに ROL バリア形成能力を付与することは難しいと考える。ただし、*rcn1* の長い根の基部でスベリン量と ROL バリアの形成能に相関がみられたように、ある一定の成果が予想される。これまでに報告のあるように、通気組織の形成と耐湿性との間に単純な相関がみられていない (Haque et al., *Plant Prod. Sci.*, 2012)。そのため、耐湿性の付与のためには ROL バリアの機能を生かしたアプローチに期待が持たれる。これまで ROL バリア形成に関わる遺伝子は 1 つも同定されていなかった。本研究課題を通じて部分的ではあるものの ROL バリア形成に関わる遺伝子 (*RCN1*) を初めて同定することができた。しかし、スベ

リンと ROL バリアの関係性は必ずしも一致しなかった。ROL バリアの構成物質を完全に特定し、鍵となる遺伝子を単離することは今後の課題である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① T. Abiko, L. Kotula, K. Shiono, A. I. Malik, T. D. Colmer, M. Nakazono. Enhanced formation of aerenchyma and induction of a barrier to radial oxygen loss in adventitious roots of *Zea nicaraguensis* contribute to its waterlogging tolerance as compared with maize (*Zea mays* ssp. *mays*). *Plant, Cell and Environment* 35(9): 1618-1630 (2012)  
DOI: 10.1111/j.1365-3040.2012.02513.x.  
(査読有り)

[学会発表] (計 14 件)

- ① 塩野克宏, 吉川真理奈, 山下優子, 松浦恭和, 平山隆志, 吉岡俊人, 森泉. イネの耐湿性獲得に重要な Radial Oxygen Loss バリア形成を制御する植物ホルモンの同定. 日本育種学会第 123 回講演会, 東京, 2013 年 3 月 27 日-28 日.
- ② 吉川真理奈, 山下優子, 松浦恭和, 平山隆志, 吉岡俊人, 森泉, 塩野克宏. イネの Radial Oxygen Loss バリアに関わる植物ホルモンの探索. 第 37 回根研究集会, 京都, 2012 年 12 月 1 日-2 日.
- ③ 塩野克宏, 山田淑葉. 次世代イネ科モデル植物ミナトカモジグサ(*Brachypodium distachyon*)の根系と湿害抵抗性の評価. 第 37 回根研究集会, 京都, 2012 年 12 月 1 日-2 日.
- ④ 塩野克宏. 植物の湿地環境への適応には効率的な酸素通気が重要: 二次代謝産物の果たす役割. 2012 年北陸合同バイオシンポジウム, あわら, 2012 年 11 月 2 日-3 日.
- ⑤ 西内俊策, 渡邊宏太郎, 塩野克宏, 槌田(間山)智子, 光田展隆, 高木優, 市川裕章, 中園幹生. NAM 型転写因子 *OsNAC34* のイネのスベリン生合成への関与. P050. 日本育種学会第 122 回講演会, 京都, 2012 年 9 月 14 日-15 日. 優秀発表賞受賞
- ⑥ K. Shiono, M. Ando, M. Nakamura, Y. Matsuo, N. Yasuno, H. Takahashi, S. Nishiuchi, M. Fujimoto, H. Takanashi, K. Ranathunge, R. Franke, N. Shitan, N. K. Nishizawa, I. Takamura, N. Tsutsumi, L. Schreiber, K. Yazaki, M. Nakazono, K. Kato. An ATP-binding cassette (ABC) transporter is required for formation of suberin lamellae

at the hypodermis in rice (*Oryza sativa* L.). International Society of Root Research 2012, Dundee, UK. 25-29th June 2012.

- ⑦ 山内卓樹, 塩野克宏, 高牟禮逸朗, 森仁志, 堤伸浩, 加藤清明, 中園幹生. 根の通気組織形成能が低下したイネ *rcn1* 変異体におけるエチレン生合成. 416. 日本育種学会第 121 回講演会, 宇都宮, 2012 年 3 月 29 日-30 日.
- ⑧ 渡邊宏太郎, 西内俊策, 塩野克宏, 中園幹生. イネの根におけるスベリン生合成遺伝子群の嫌気応答. 第 19 回育種学会中部地区談話会, 津, 2011 年 12 月 10 日.
- ⑨ K. Shiono. Transcriptional profiling during formation of a barrier to radial oxygen loss in rice (*Oryza sativa* L.). International Symposium "Strategies of Plants against Global Environmental Change", Kurashiki, Japan. 8-10<sup>th</sup> December 2011.
- ⑩ K. Shiono, M. Ando, M. Nakamura, Y. Matsuo, N. Yasuno, H. Takahashi, S. Nishiuchi, M. Fujimoto, H. Takanashi, K. Ranathunge, R. Franke, N. Shitan, N. K. Nishizawa, I. Takamura, N. Tsutsumi, L. Schreiber, K. Yazaki, M. Nakazono, K. Kato. Identification of an ATP-binding cassette (ABC) transporter that is required for formation of suberin lamellae and the apoplastic barrier at the hypodermis in rice (*Oryza sativa*). The JSRR's 20th Anniversary Symposium, Tokyo, Japan, 5-6th November 2011.
- ⑪ T. Abiko, L. Kotula, K. Shiono, A. I. Malik, M. Obara, T. D. Colmer, M. Nakazono. Waterlogging tolerant teosinte (*Zea nicaraguensis*) has a large volume of aerenchyma and a barrier to radial oxygen loss in root. The JSRR's 20th Anniversary Symposium, Tokyo, Japan, 5-6th November 2011.
- ⑫ T. Abiko, L. Kotula, K. Shiono, A. I. Malik, M. Obara, T. D. Colmer, M. Nakazono. Comparison of adaptation to waterlogged condition between teosinte (*Zea nicaraguensis*) and maize. 7th Asian Crop Science Conference, Bogor, Indonesia, 27-30th September 2011.
- ⑬ 山内卓樹, 塩野克宏, 高牟禮逸朗, 長村吉晃, 堤伸浩, 西澤直子, 加藤清明, 中園幹生. *rcn1* 変異体を用いたイネの根の通気組織形成遺伝子の発現解析. 育種学研究 13(別 2).199(P035). 日本育種学会第 120 回講演会, 福井, 2011 年 9 月 23 日-24 日.
- ⑭ 西内俊策, 渡邊宏太郎, 山内卓樹, 高橋宏和, 塩野克宏, 槌田(間山)智子, 光田展隆, 高木優, 市川裕章, 中園幹生. イネ

のスペリン生合成経路に關与する NAM  
型転写因子の機能解析. 育種学研究  
13(別 2).109. 日本育種学会第 120 回講演  
会, 福井, 2011 年 9 月 23 日-24 日.

[その他]

ホームページ等

<http://www.s.fpu.ac.jp/kankyo/JP/Home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塩野 克宏 (SHIONO KATSUHIRO)

福井県立大学・生物資源学部・助教

研究者番号：20610695

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：