

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 10 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450015

研究課題名(和文)ダイズの総合的耐湿性と組織細胞水透過性との関係性に関する研究

研究課題名(英文) Study of relationship between soybean comprehensive wet tolerance and water permeability of tissue cells

研究代表者

実山 豊 (JITSUYAMA, Yutaka)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：90322841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ダイズが被る2種類の湿害、植物体根域冠水害と種子冠水害の発生機序に関する基礎的知見を得るため、根や種皮の透水性に着目し、耐湿性との関連性について調査した。根域低酸素負荷水耕装置による簡易サーベイを行なった結果、耐性品種では根域が低酸素環境になると根量が増え、更に特定のアクアポリンが増えることで、根の透水性を保てることがわかった。また、種子冠水耐性に優れる品種に由来する遺伝子座には、耐性を高めるQTLが複数存在し、そのうちの1つは硬実性と共通のQTLであった。このように、異なる2つのダイズ耐湿性には、器官の透水性が密接に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Soybean is easy to suffer flooding injuries at both stages of seeding and vegetative growth. To understand the mechanism of the injury, we investigated the wet tolerance of various soybean cultivars focusing on the water permeability of the root or the seed coat. In case of vegetative injury, the tolerant cultivars had abilities of increasing root mass and specific root aquaporins in hypoxia condition, and kept the high root conductivity even under flooding. In case of seed flooding injury, the QTLs from tolerant wild lines could increase the germination rate after flooding, and one of them is same one for 'seed hardness'. Thus, two different types of soybean flooding injuries might link to the organ water permeability closely.

研究分野：作物学

キーワード：ダイズ ストレス応答 湿害 水チャネル

1. 研究開始当初の背景

ダイズの耐湿性には、「播種時の冠水耐性」と「植物体成長時の根域冠水耐性」があり、播種直後や以降に土壤過湿環境に遭遇すると、品種によっては甚大な収量減を被る。種々の先行研究により、種子冠水耐性には、受動吸水速度を律する種皮の透水コンダクティビティが、根域冠水耐性には、溶存酸素濃度に影響を受ける根の透水コンダクティビティが、その品種間差を左右する決定因子の1つとして考えられた。この器官透水性に着目し、ダイズの湿害発生機序に着目した研究はこれまで非常に限られてきた。植物の器官透水性を司る透水装置として水チャネル(アクアポリン)が想起された。ダイズにおける水チャネルの動向については、Slow-wilting 症状の原因について葉中アクアポリン動態に言及し(Sadok and Siclaur, 2010)、また国内では、ダイズ植物体の湿害とアクアポリンとが関連する可能性について触れられているが(松尾ら, 2010)、具体的な役割やメカニズムについては不明な点が多い。また、RIL 集団を用いた QTL 解析による遺伝子座の同定試験では、種子冠水害については、耐性品種 Peking を片親とした RIL 集団にて耐湿性関連遺伝子の同定がなされているが(Sayama et al., 2009)、種皮透水性の関与の有無と種子冠水耐性関連遺伝子領域の同定には至っていない。そこで本応募では、ダイズの総合的な耐湿性獲得機構の解明の一助としての基礎的知見を得ることを目的として、遺伝背景の異なる様々な供試材料を用いた上で、種子における冠水耐性と、植物体における根域低酸素耐性に対する器官透水性及び水チャネルの関与を調査することを提案した。

2. 研究の目的

その発症メカニズムが大きく異なると考えられる二つのダイズ湿害の本質を解き明かすため、その共通項である根や種皮の「透水性」に主に着目し、湿害発生メカニズムとの因果関係を調査する。まず、特徴的な耐湿性を発現する品種・系統のサーベイ、基本的なフェノタイプ(種子冠水耐性、根域低酸素耐性、各種バイオマス、根形態、根透水コンダクティビティ)の調査、および耐湿性に関与する遺伝子座の同定に要する RIL 集団の選定などを行なった上で、植物体の耐湿性、種子の冠水耐性に影響を及ぼす主たる要因について考察しようとした。さらにこれらの調査により、ダイズ両耐湿性の制御因子を明らかにするとともに、これら湿害回避機構への根及び種皮の通導コンダクティビティや、水チャネルタンパク質の関与の可能性について説明しようとした。

3. 研究の方法

ダイズ植物体の耐湿性の簡易サーベイと特徴的な品種の選抜

播種時に過湿環境に遭わず、無事に発芽して幼植物体に成長した後も、根域が長期間水浸しになると、ダイズ植物体は大きなダメージを被る。過湿土壤は還元状態となるため、根の酸欠が湿害の本質的な要因であると考えられる。そこで本研究では、根の酸欠に強い品種を効率的にサーベイするための装置を考えた。すなわち、ダイズの根域に、低酸素環境を均一に負荷するため、土や根粒の影響をあえて取り除いた水耕栽培システムを設け、10 日間ほどの成育期間における低酸素反応性を観察した。また測定項目は、我々の先行研究結果(実山, 2010; 実山, 2011; Jitsuyama, 2013)を元に、各器官のバイオマスを測定した上で、「冠水下/対照区」の処理間比を、「低酸素による傷害指標」として算出した。

国内外の様々なダイズ品種を、ペーパータオル法を用いて発芽させ、健全個体のみを上述の水耕栽培による根域低酸素負荷試験に供試した。気温 25 (液温 22.5) 照度 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (15.5 時間日長)、気相酸素濃度: 20.9%を基本環境とし、根域の溶存酸素濃度を、対照区では $4.9 (\pm 0.17) \text{ mg l}^{-1}$ 、低酸素区(N_2 ガスローディングによる)では $1.5 (\pm 0.45) \text{ mg l}^{-1}$ として 10 日間栽培したのちに植物体を採取した。葉面積および根の形態的特徴については WinRhizo(2004a, Regent Instruments Inc.) で解析し求めた。乾物重は、組織を 70 で 1 週間通風乾燥後に秤量して得た。

ダイズ植物体の根域低酸素耐性の品種間差異に影響する要因の解析

上述の水耕装置を使ったダイズ耐湿性の簡易サーベイシステムを用いて、様々な国内ダイズ品種について根域低酸素負荷試験を行った。上述のように、各器官のバイオマス量、根系デザインの詳細なデータのほか、根の通導コンダクタンスを調査し、加えて根に局在する水チャネルタンパク質の同定を行った。

根の通導コンダクタンスは、低酸素負荷処理および対照処理後の根をサンプリングし、プレッシャーチャンバーにて 200kPa 以上の圧力負荷の下、茎断面より溢泌液を採取し、その液量から透水コンダクティビティを推定した。

また水チャネルタンパク質については、市販のアクアポリンの抗体を PIP 及び TIP 数種を準備し、根からの粗タンパク質抽出物

を用いて定法によりウェスタンブロッティング法を行った (Katsuhara and Hanba, 2008)。

ダイズ種子の冠水耐性に影響を及ぼす遺伝子座の同定

入手可能な既存の RIL 集団を持つ両親組み合わせの品種・系統のダイズ (もしくはツルマメ) を入手し、定法に従い種子冠水耐性を調査した (実山・紺野, 2012a; 実山ら, 2012b)。用いた RIL 親は以下のとおり。

十系 780 (TK780) × 日高 4 号 (ツルマメ: B01167)、ミスズ大豆 × Moshido Gong 503 (中国飼料ダイズ)、田螺大豆 × T106 (ツルマメ)、タチナガハ × ツルマメ青森、AGS292 (大正白毛) × K3 (タイ地方品種)、ダイズ × ツルマメ (耐塩性解析に利用された JIRCAS 育成 RILs)。

特徴的な種子冠水耐性挙動を示した親品種・系統については、RIL 集団を取り寄せ、種子冠水耐性及び種子吸水速度 (受動吸水及び毛管吸水の各速度) を測定した (Jitsuyama et al., 2014)。

これらフェノタイプリングデータをモチーフとした本 RIL 集団の QTL 解析については、MapQTL5.0 により Interval Mapping を行なった後に、有意な LOD 値の域値を決定し、種子冠水耐性において有意に高い LOD ピークを示す遺伝子座の同定を試みた。また、他のフェノタイプについても同様に解析し、種子冠水耐性と共通の遺伝子座の有無について確認した。

4. 研究成果

ダイズ植物体の耐湿性の簡易サーベイと特徴的な品種の選抜

12 の日本のダイズ品種 (中生光黒・エンレイ・ハヤヒカリ・伊豫ダイズ・コガネジロ・植系 32 号・白鶴の子・トヨハルカ・トヨホマレ・トヨムスメ・タチナガハ・ユウヅル) を用いて圃場耐湿性と水耕栽培システムによる低酸素耐性とを比較したところ、根形態とりわけ太い根の長さの低酸素反応性と圃場耐湿性に極めて密接な関係性を見出し、圃場耐湿性の簡易サーベイ法としての水耕栽培法について公表した (Jitsuyama, 2015)。また以上の方法で、国内外の様々なダイズ品種植物体の根域低酸素耐性をサーベイしていく中で、これまで本研究で用いてきた耐湿性が特徴的な国内ダイズと似た根域低酸素反応を示すいくつかの海外品種も見い出さ

れ、改めて国内ダイズとの低酸素耐性の比較試験を行った (実山ら, 2015)。その結果、中国品種の 'Fen dou 16' は根域低酸素環境に安定的な生育を示し、特に同じく中国品種の '青黄豆' においては耐湿性極強の国内系統の '植系 32 号' に匹敵する根域低酸素耐性を有することが明らかとなった。また韓国品種である 'K099' は、耐湿性極弱の国内系統の 'トヨハルカ' や '白鶴の子' に近似した感受性を示すことが明らかとなった。

ダイズ植物体の根域低酸素耐性の品種間差異に影響する要因の解析

国内ダイズ 9 品種・系統 (エンレイ・コガネジロ・植系 32 号・白鶴の子・トヨハルカ・トヨホマレ・トヨムスメ・丹波黒・スズマル) を用いて、水耕栽培システムで根域低酸素耐性を品種間比較したところ、低酸素耐性と根の通導抵抗の変動に密接な関連性を見い出した。この根通導抵抗が変動した理由として、多くの品種では、根域低酸素下での根形態デザインの変化に言及できたが、もっとも低酸素耐性の高かった '植系 32 号' においては、根形態変化に加え、根の透水抵抗に影響すると思われる水チャネル、膜内在性タンパク質のアクアポリン、32.4kDa の 'PIP1;1' の絶対量が低酸素下での増加が耐湿性の強さに貢献しているものと考えられた。液胞膜に局在するアクアポリン (TIP) についても、根抽出タンパク質の中に、低酸素環境に反応して僅かながら増えるものが検出されたものの、これらは低酸素耐性と無関係である可能性が考えられた。

ダイズ種子の冠水耐性に影響を及ぼす遺伝子座の同定

既存の RIL 集団の親品種を用いて、耐湿性 (根域低酸素耐性および種子冠水耐性) のフェノタイプリングを行い、耐湿性が特徴的なダイズ 12 品種 (エンレイ・タチナガハ、ハヤヒカリ・peking・スズマル、ナカセンナリ・トヨムスメ、植系 32 号・コガネジロ・トヨホマレ、白鶴の子・トヨハルカ) の耐湿性と比較した結果 (データは公表していない)、根域低酸素耐性において 1 組み合わせ (AGS292 × K3)、種子冠水耐性についても 1 組み合わせ (TK780 × B01167) の 2 つの興味深い親品種を見い出した。これらの親品種については、親同士に十分有意差のある耐性が認められた。

これらのうち、種子冠水耐性において大きく異なるフェノタイプを示した 2 系統 'TK780 ×

B01167' について、それらを親とする RILs (85 系統: 親含め 87 系統) の乾燥種子を用いて、発芽試験および吸水速度の測定を行い、種子冠水耐性に対し影響度が高いと思われる複数の遺伝子座について QTL 解析したところ、種子冠水耐性に対し影響度が有意とされた遺伝子座 5 つを同定し (染色体 A2, C, I 及び L 上に 5 つ)、種子の硬実性への影響度の高い遺伝子座との一致性 (I: A/GA/CCC260) について見出した。なお本内容は、以下のように投稿中である。

Jitsuyama, Y., Y. Tokumitsu, and J. Abe (2017) QTL analysis of seed-flooding tolerance irrespective of seed coat permeability of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) dry seed.

また本研究全過程を通し懸案であった、根導管コンダクティビティや種皮透水性に影響すると考えられた水チャネルを構成するタンパク質、アクアポリンの原形質膜上局在を視覚化するべくフリーズフラクチャーレプリカ法の変法、SDS-FRL 法 (Kimura et al., 1999) の本試験への適用については、本法の開発者のお一人である元京都大学の伊東隆夫教授 (現奈良文化財研究所) や、当時本技術を受け継いだ現東京大学の木村聡先生にご助言を仰ぎながら、進めていたが、各種酵素による組織の微繊維除去が困難を極め、研究期間内での TEM 観察での明瞭な可視化には至らなかった。今後は規模縮小の上、本手法について試行予定である。

【引用文献】

実山 豊 (2010) 低酸素水耕栽培におけるダイズ生育の品種間差異-栄養成長初期における地上部及び根部反応性-. 日本作物学会紀事 79(別1): 302-303.

実山 豊 (2011) 低酸素水耕栽培におけるダイズ生育の品種間差異-環境変動下での形態反応変化について-. 日本作物学会紀事 81(別1): 382-383.

Jitsuyama, Y. (2013) Responses of Japanese soybeans to hypoxic condition at rhizosphere were different depending upon cultivars and ambient temperatures. *American Journal of Plant Science*, 4:1297-1308.

実山 豊・紺野裕太郎 (2012a) 北海道産ダイズ 2 品種の種子冠水害発生機序における品種間差異-種子の調湿処理と吸

水動向に着目して-. 日本作物学会紀事 82(別1): 360-361.

実山 豊・紺野裕太郎・萩原雄真 (2012b) 北海道産ダイズ 2 品種の種子冠水害発生機序における品種間差異-種子吸水動向に影響を与える種皮形態因子-. 日本作物学会紀事 82(別2): 262-263.

Jitsuyama, Y., Y. Konno and Y. Hagihara (2014) Two imbibition properties independently influence the cultivar-specific flooding tolerance of dried soybean seeds. *Seed Science Research*, 24 (1): 37-48.

Jitsuyama, Y. (2015) Morphological root responses of soybean to rhizosphere hypoxia reflect waterlogging tolerance. *Canadian Journal of Plant Science*, 95(5): 999-1005.

実山 豊・阿部 純・大内優一郎・吉清 翼・許 東河 (2015) いくつかのダイズ品種・系統は根域低酸素下でもバイオマスを増加させる. 園芸学会平成 27 年度秋季大会研究発表 (2015 年 9 月 26~27 日) 徳島大学常三島キャンパス (徳島市)、園芸学研究 14(別2): 392.

実山 豊 (2015) ダイズ湿害発生メカニズムに関するいくつかの考察 -効率的な耐湿性育種サーベイ法考案に向けての一助として-. *グリーンテクノ情報*, 11 (2): 8-11.

Jitsuyama, Y. (2017) Hypoxia-responsive root hydraulic conductivity influences soybean cultivar-specific waterlogging tolerance. *American Journal of Plant Science*, 8: 770-790.

Katsuhara, M. and Hanba, T. Y., (2008) Barley plasma membrane intrinsic proteins (PIP Aquaporins) as water and CO₂ transporters. *European Journal of Physiology*, 456: 687-691.

Kimura, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, C.R., and Brown, R.M.Jr., (1999) Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *The Plant Cell*, 11: 2075-2085.

Matsuo, N., Y. Nanjo, M. Tougo, T. Nakamura, K. Nishizawa, S. Komatsu and S. Shimamura. (2012) Identification of Putative Aquaporin Genes and Their Expression Analysis under Hypoxic Conditions in Soybean [*Glycine max*

(L.) Merr.]. Plant Production Science, 15(4): 278-283.

Sadok W. and Sinclair T. R. (2010) Transpiration response of 'slow-wilting' and commercial soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotypes to three aquaporin inhibitors. Journal of Experimental Botany, 61 (3): 821-829.

Sayama, T.; Nakazaki, T.; Ishikawa, G.; Yagasaki, K.; Yamada, N.; Hirota, N.; Hirata, K.; Yoshikawa, T.; Saito, H.; Teraishi, M. (2009) QTL analysis of seed-flooding tolerance in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). Plant Science, 176: 514-521.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Jitsuyama, Y. (2015) Morphological root responses of soybean to rhizosphere hypoxia reflect waterlogging tolerance. Canadian Journal of Plant Science, 95(5): 999-1005. DOI : 10.4141/cjps-2014-370
査読あり

実山 豊 (2015) ダイズ湿害発生メカニズムに関するいくつかの考察 -効率的な耐湿性育種サーベイ法考案に向けての一助として-. グリーンテクノ情報, 11 (2): 8-11. URL : <http://hdl.handle.net/2115/64523>
査読なし

Jitsuyama, Y. (2017) Hypoxia-responsive root hydraulic conductivity influences soybean cultivar-specific waterlogging tolerance. American Journal of Plant Science, 8: 770-790. DOI: 10.4236/ajps.2017.84054
査読あり

[学会発表](計1件)

実山 豊・阿部 純・大内優一郎・吉清 翼・許 東河 (2015) いくつかのダイズ品種・系統は根域低酸素下でもバイオマスを増加させる. 園芸学会平成 27 年度秋季大会研究発表 (2015 年 9 月 26~27 日)、徳島大学常三島キャンパス (徳島市)、園芸学研究 14(別 2) : 392.

[その他]

ホームページ等
<http://www.agr.hokudai.ac.jp/botagr/sakumotsu/Jitsuyama/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

実山 豊 (JITSUYAMA Yutaka)
北海道大学 大学院農学研究院・講師