

## 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 5 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580002

研究課題名（和文）乾燥に応答した作物の根系発達を制御する遺伝子の解明

研究課題名（英文）Study of genes regulating root development under drought

研究代表者

藤村 達人 (FUJIMURA TATSUHITO)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70292513

研究成果の概要（和文）：

イネが乾燥ストレスに応答して根系を発達させる現象の詳細な調査が可能な栽培方法を開発した。乾燥および水を十分に与えた 3 日目の植物体から mRNA を抽出してマイクロアレイを実施し、発現が増大した 83 個の、低下した 151 個の遺伝子を明らかとした。この中には根の伸長に伴う細胞壁の拡張に関与しているもの、植物ホルモンの代謝に関与する遺伝子などが多数含まれていた。これらの中で特に IAA 代謝に関する遺伝子の変動が大きく、IAA が中心的な働きをしていることが示された。

研究成果の概要（英文）：

The culture method was revised for evaluating the response of rice to drought stress precisely. mRNAs were extracted from plants treated with drought and wet, and subjected to microarray to evaluate the differential expression during drought stress. 83 genes were up-regulated and 151 genes were down regulated with drought. The genes related to phyto-hormones also fluctuated during the stress. Especially, genes related IAA metabolism were clearly fluctuating. IAA might be an important second messenger for root development under drought.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,660,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：抵抗性、耐性

## 1. 研究開始当初の背景

今後地球上の人口および一人当たりの活動量が日々増大しており、それらが必要とする食糧を満たすための食糧増産の対策は急

務である。そのような状況に対処するためには、半乾燥地とよばれる水分の供給が少なくかつ安定しない、これまで農業不適とされていた地域での農業生産が必要とされている。

さらには、地球環境は温暖化・乾燥化の危機に曝されており、現在農業可能な地域の中にも乾燥化し農業不適化することが予測されている場所も多くある。こういった環境での農業生産を可能とするためには、これまでの湿潤な環境に適して利用されてきた作物よりも、より乾燥した環境においても農業生産を可能とするような機能を持った作物の開発が求められている。

乾燥した環境で生育可能な植物は、(1) 気孔を閉じ、浸透圧を上げ、水分のロスを最小限にする(乾燥耐性型)、また(2) 根系を大きく土中深く発達させ、土壌深部の水分を積極的に獲得する(乾燥回避型)というような対応をして、生命を維持し生育している。我々はこれまでのパールミレット(強耐乾燥性イネ科作物、主産地インド)およびテフ(強耐乾燥性イネ科作物、エチオピア原産)を用いた研究から、これらの植物が、強度の乾燥環境下で栽培されると、主として(1)の機能を発揮し、一方で、中程度の乾燥に曝された場合には、主として(2)の機能を発揮していることを明らかにした。即ち前者の環境条件下では生存を優先する体制に代謝を変化させ、後者の条件下では、生存のみならず、作物としての生産性をも維持していることを明らかにした。

このことは、作物生産の限界的な環境である半乾燥地では、少量ながら降雨があり地下深部には水分が存在することから、(2)の機能を発達させた作物を利用することによって農業生産が可能であることを示している。もちろん、地下深部の水分といえども有限であり、このような地域では降水期の高効率のウオーター・ハーベストなど農業土木的な地下水涵養の施策は必須である。

## 2. 研究の目的

植物(作物)が乾燥条件で根系を発達させることは良く知られている事実である。しかし、実際にこれまで、そのような現象を定量的に測定し、制御することは難しかった。それは、根に対して、土壌中の水分が物理的および化学的環境要素として働きかけるだけでなく、土壌中のその他の構成物質(粒子構造などの物理的環境要素や、肥料等の化学的環境要素)も働きかけていることによる。このように複雑に環境要素が働きかけていることから、全体として根系の発達に関する実験の再現性は低く、その制御は難しかった。

我々は、これまでパールミレット、テフ、および、イネを利用して、これらの作物が乾燥条に反応して根を発達させる様相を定量的に測定できる実験方法を開発してきた(文

献 2、3、4)。これは、小型の根箱を利用し、注意深く注水・栽培することで再現性良く根の発達を観察・制御できるシステムである。これを用いることで、多数の植物体を再現性良く栽培することが可能となり、また多数の試験区を設けることも可能となった。全体として乾燥条件を制御でき、乾燥に反応した植物の根系の発達現象を再現性良く定量的にとらえることを可能とした。

本研究計画では、この実験方法を駆使して、乾燥に対応した根系の発達を制御している遺伝子を明らかにしていくことと最終的な目標としている。具体的には、(1) イネおよびテフの RILs 集団を利用して乾燥条件に反応して根系を発達させる現象に関して QTL 解析を行い、この反応を制御している遺伝子の座位を明らかにする、(2) cDNA-AFLP 法およびマイクロアレイ法を用いて、根系の発達時に特異的に発現している遺伝子を明らかにする、(3) 遺伝子破壊システムを利用してこの性質が喪失したものを選抜し対応する遺伝子を同定する。これらの調査を通じて、実際に根系の発達を制御している遺伝子を特定していく計画である。

## 3. 研究の方法

(1) 乾燥に対応して根系の発達を制御する遺伝子の QTL 解析

イネ、テフおよびパールミレットについて多様な品種を収集し、根系の発達を再現性良く評価できるシステムを開発する。既に手法としては開発済みであるが、各々の種に関して実験の最適化を図る。(一部調査済み。前ページ文献 2、3、4)。これらの植物の各々の品種を、湿潤条件および乾燥条件で栽培し根系の発達を調査する。根系の発達が著しいもの、乾燥条件への反応性の大きいものなどを選び出す。また、乾燥条件などを検討して反応がより明瞭となる条件を明らかにする。

(一部研究済み。前ページ文献 2、3、4)

根系の発達の良いもの、およびそれが弱い品種を選抜し、これらを交配し雑種(F1)および後代(F2、F3)を育成する(一部交配済み)。もし、既成の RILs 集団の中に本研究に適した品種の組み合わせがあれば研究の効率が上がるので、そのような集団も積極的に調査し、選抜する。

RILs 集団に対して、SSR マーカーおよび AFLP マーカーを利用して、(a) 湿潤(通常栽培)条件での根の発達、(b) 乾燥条件での根の発達、(c) 前二者の差分から乾燥に対する根の発達の制御、(d) 地上部/地下部のバイオマスの分配の制御、に関する形質を調査する。これらの解析を通じて、乾燥に反応して

根系を発達を制御する遺伝子の QTL 座を明らかにする。

#### (2) 乾燥に対応して根系の発達を制御する遺伝子の発現解析

上記 (1) で試験栽培した結果をもとにイネ、テフないしパールミレットの中から最も反応性の良いものを選抜する。その植物を、乾燥に反応した根系の発達を再現性良く評価できる。改良された実験系を用いて、湿潤条件および乾燥条件で栽培する。各々の根から、mRNA を抽出し、それから cDNA を合成し、マイクロアレイ法および cDNA-RFLP 法を用いて、各々の条件で発現量の変動の大きいクローンを特定する。すなわち乾燥に反応した根の伸長と関連の強い遺伝子を特定する。

cDNA-RFLP 法およびマイクロアレイを用いて乾燥条件下で根の伸長と関連して差次的に発現している遺伝子を網羅的に調査し、クローンを取得する。得られたクローンの配列を調査し、その機能を予測する。

#### (3) 乾燥に対応して根系の発達を制御する遺伝子の破壊系統の選抜

農水省の作出した各種の遺伝子がレトロトランスポゾンの挿入によって破壊されたイネの系統群を取得する (約 10000 系統を取得済み)。それらを、イネの乾燥条件での根系を再現性良く評価できる実験系を用いて栽培し、乾燥に反応した根の発達に変化のみられたものを探し出す。根系の発達に変化がみられた突然変異系統が得られたならば、その再現性を調査し、また遺伝子座を調査する。さらにトランスポゾンの内部配列を利用して TAIL-PCR を行い、変異遺伝子を特定する。

#### (4) 乾燥に対応して根系の発達を制御する遺伝子の同定

上記の解析から得られた遺伝子発現に変動がみられた遺伝子群の中から、遺伝子発現の制御系の遺伝子に特に注目して解析を行う。イネの場合であれば、配列から遺伝子座を特定する。また (3) の研究から変異遺伝子の遺伝子座を特定する。一方で、(1) の QTLs 解析によって根系の発達に関する遺伝子座を特定する。これらの研究を通じて乾燥に対応して根系の発達を制御する遺伝子の候補遺伝子を選定する。これらの各々の研究の結果が一致すれば、乾燥に対応して根系の発達を制御する遺伝子の同定が完了する。

### 4. 研究成果

本プロジェクトの期間中に計画していた試験研究の全てを実施完了するに至らな

ったが、(2)におけるマイクロアレイを利用した試験研究においては実験が進展し有用な情報を得ることが出来た。

(1)、イネを利用して乾燥ストレスによる根系の縦方向の伸長促進を詳細に把握できる「ルートボックス法」を開発した。これまでの土壌を用いた栽培方法は、根を無傷でサンプリングすることや土壌の含水率の不安定さから再現性のある結果が得られず、遺伝子発現解析や生理学的解析には向いていなかった。しかし、ルートボックス法では水分をコントロールしやすく、土壌を用いた栽培でも根の成長に再現性がみられ、また、無傷で迅速なサンプリングが可能となった。

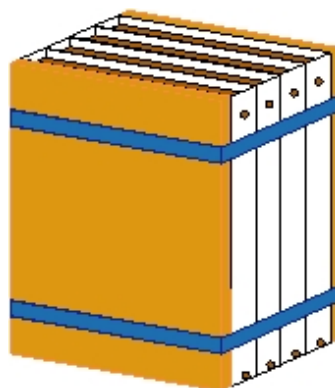


図 1. ルートボックス。

カラーA4 ファイルケース (310×235×22 mm) の上部 10 mm を切断し、扁平形の培養容器とした。培養土を充填し、上部に発芽促進したイネを播種し発芽・発根、生育させた。灌水量を制御することで乾燥ストレス状態を作り出した。培養後、ケースを解体し、根を傷付けること無く採取した。



図 2. 培養 7 日目のサンプル。

左：湛水区、右：乾燥処理区。根・茎葉の長さの違いが顕著になっている。3日目では差はそれほど大きくないが、有意な差異が認められた。

(2) 差別的な遺伝子の発現の調査。

3日目の植物から根を切り取ってサンプルとした。mRNAを抽出し、マイクロアレイを用いて乾燥ストレスによる主根伸長現象に関わる遺伝子の発現解析を行った。根の伸長には細胞伸長や細胞分裂の促進が大きく関与していることから、細胞伸長や細胞分裂に関する遺伝子や乾燥ストレス応答性遺伝子の発現が予測できる。マイクロアレイを行った結果、細胞伸長に関わる xyloglucan endotransglycosylase (XTH) や expansin (EXP)、細胞分裂に関与するポリアミン合成酵素である arginine decarboxylase (ADC) の発現の上昇がみられた。この他にも細胞伸長や細胞分裂の制御に関与するオーキシン、サイトカイニン、エチレンに関する遺伝子に発現変動がみられた。このように、マイクロアレイによるスクリーニングを行った遺伝子が、細胞伸長および細胞分裂を活性化することにより、主根伸長現象がおこる可能性が示唆された。

(3) マイクロアレイの結果を元にオーキシン代謝に関する遺伝子に注目して RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。

その結果、IAA 合成が行われる部位を含む葉茎組織では、乾燥ストレスにより不活性型のアミノ酸結合型 IAA 合成酵素として知られる GH3 遺伝子ファミリーの発現が上昇し、根においてはアミノ酸結合型 IAA を加水分解し活性型の遊離型 IAA を生成する IAA-amino acid hydrolase である ILR1 の発現が上昇した。これらのことから、植物は乾燥ストレスを感知すると、葉茎組織において GH3 による不活性型のアミノ酸結合型 IAA の合成を促進し、根系へと求基本的な輸送を行う。そして、多くのアミノ酸結合型 IAA が蓄積した根系では、ILR1 の働きにより活性型の遊離型 IAA が形成されることによる IAA 量の増加が、乾燥ストレスによる主根伸長現象に大きく関与する可能性が示めされた。

これら以外にも、オーキシンによって発現が抑えられる ARG10 遺伝子、オーキシン応答性転写因子の OsARF16、オーキシンに速い応答を示す SAUR 遺伝子などのオーキシンに関連する多くの遺伝子が発現を変化させていた。オーキシンは細胞分裂や細胞伸長といった植物の成長に関連する植物ホルモンである。この結果から乾燥によって引き起こされた主根の伸長促進は、オーキシンによって制御されている可能性が示された。また、オーキシンの他にも植物ホルモンに関する遺伝子が乾燥ストレスに応答していることが分かってきた。

乾燥応答/耐性遺伝子の RD22 と DERB 1 A が乾

燥ストレス処理区において発現上昇していたことを確認した。サイトカイニン酸化酵素の CKX とエチレン合成酵素の ACO の遺伝子が発現抑制し、ポリアミン合成酵素 ADC については発現上昇していることを確認した。

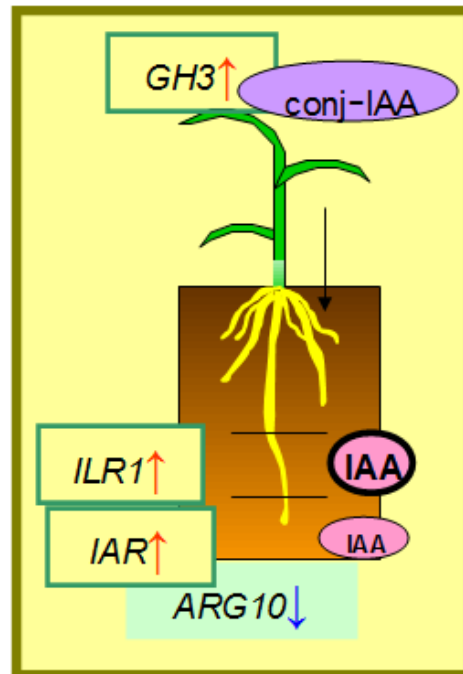


図 3. 今回の研究で得られたオーキシンに関する情報をまとめたもの。

根の伸張部での IAA 含量が高まっており、それに関係する遺伝子群が活性化もしくは抑制されている。

(4) さらに植物ホルモン量を測定し、乾燥ストレス処理区の根端における IAA 量と、根端・根の上部におけるアブシシン酸が増加したことを確認した。一方、乾燥ストレス処理区のサイトカイニン量は減少していることがわかった。また、根端組織を観察したところ、乾燥ストレス区の根では伸長帯が長くなっていた。乾燥ストレス処理区とコントロール処理区の伸長し終えた細胞には大きさに違いがみられないことから、乾燥ストレスによる主根伸長促進現象は、オーキシンによる細胞分裂の促進により引き起こされた可能性が高いことがわかった。

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)

[学会発表] (計 3 件)

(1) Tatsuhito FUJIMURA

Extensive root growth of rice under drought

The 5th AG-BIO/PERDO Graduate Conference  
on Agricultural Biotechnology  
and KU-UT Joint Seminar II (招待講演)  
(Kasetsart University, Thai)  
2012.12.09

(2) Tatsuhito FUJIMURA and Yuka MATSUMA  
Extensive root growth of rice roots under drought  
controlled by drought?  
Tunisian Japanese Symposium on Science,  
Society and Technology  
(Yasmine Hammamet, Tunisia) 2011.11.11-13

(3) Tatsuhito FUJIMURA  
Expression analysis of rice root under drought  
with microarray  
The 1st Algeria-Japan Academic Conference -  
Towards the promotion of mutual academic  
cooperation - (Alger, Algeria) 2010.11.8-9

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 達人 (FUJIMURA TATSUHITO)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70292513