

別紙 1 - 1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 NOORROHMAH Siti

論 文 題 目

Study on formation of barriers to radial oxygen loss in lateral and adventitious roots of rice

(イネの側根および不定根における酸素漏出バリア形成に関する研究)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 中園 幹生

名古屋大学教授 芦荻 基行

名古屋大学教授 犬飼 義明

名古屋大学准教授 高橋 宏和

論文審査の結果の要旨

一般的に畑作物は耐湿性が低く、降雨や洪水などにより土壌が湛水・過湿状態になると、しばしば収量の減少や品質低下といった湿害と呼ばれる生育障害が生じる。一方で、イネやヨシなどの湿生植物は湿害を防ぐための様々な耐湿性形質を持ち、湛水・過湿条件下では、根の酸欠を防ぐために酸素供給機構を発達させる。大気中の酸素は、葉などの地上部の器官から植物体内に取り込まれ、通気組織と呼ばれる空隙を通過して根端部まで輸送される。さらに、根の基部において、通気組織から根圏への酸素の漏出を抑制する酸素漏出 (radial oxygen loss (ROL)) バリアが表層組織に形成される。ROL バリアが形成されることにより、輸送途中での酸素の漏出が減少し、根端部へ効率的に酸素が輸送される。半世紀以上前に ROL バリアが発見されて以来、これまでに様々な植物種の不定根 (冠根、節根など) を用いて研究が行われてきたが、側根にて ROL バリアが形成されるかどうかは不明であった。最近、当研究室の研究により、耐湿性の高い *Zea nicaraguensis* (トウモロコシの近縁野生種) では、嫌気還元条件下で、不定根に加えて側根でも ROL バリアを形成することが分かった。また、ROL バリアの構成成分と考えられているスベリンが、*Zea nicaraguensis* の不定根、側根ともに外皮に蓄積していることも明らかになった。しかし、他の ROL バリア形成能がある植物種 (イネなど) において、側根での ROL バリア形成の有無は不明なままであった。

そこで本研究では、イネの側根が ROL バリアを形成する能力があるかどうかを調査した。イネの側根には、L 型側根と S 型側根の 2 種類が存在することが知られている。L 型側根は、根径が大きい上に、根長が長く、高次側根を分枝する能力を有するのに対して、S 型側根は、根径が小さく、根長が短く、高次側根の分枝能力を欠いている。イネ (品種「日本晴」) を嫌気還元条件下で生育させて、メチレンブルー染色によって不定根 (冠根)、L 型側根、S 型側根における酸素漏出パターンを調査した。メチレンブルーは酸素存在下では青色を呈するが、酸素非存在下では無色透明であるという性質をもつ。植物体の根のみメチレンブルー溶液 (脱酸素処理をした無色透明の溶液) 中に入れると、根から酸素が漏出した部位が青色に染色されることから、ROL バリア形成の有無の評価に用いられる。嫌気還元条件下で生育させたイネ植物体を用いて、メチレンブルー染色実験を行ったところ、不定根 (冠根) と L 型側根では根端部が染色されたが、一方で、S 型側根では根の基部が染色された。この結果より、L 型側根は ROL バリア形成能を有するが、S 型側根は ROL バリア形成能がないことが示唆された。さらに、円筒型酸素電極を用いて、L 型側根の根の各部位における酸素漏出量を定量した。その結果、L 型側根の根端部での酸素漏出量が多く、基部に向かうにつれて徐々に酸素漏出量が減少することが分かり、ROL バリアが形成されていることを確認できた。しかし、L 型側根に形成された ROL バリアは、不定根に形成される ROL バリアほど強固 (tight) なバリアではないことが明らかになった。さらに、L 型側根と S 型側根の各部位における横断切片を作製して、Fluorol

論文審査の結果の要旨

Yellow 088 によるスベリン染色を行った結果、L 型側根の外皮と厚壁組織でスベリンの蓄積が観察され、その染色部位と ROL バリアの形成部位がほぼ一致していた。一方で ROL バリアの形成されない S 型側根ではスベリンの蓄積はみられなかった。また、L 型側根と S 型側根における通気組織形成を調査したところ、L 型側根では好気条件下でも通気組織形成が観察され、嫌気還元条件では通気組織がさらに発達していた。一方で、S 型側根では、好気条件、嫌気還元条件ともに通気組織の形成はみられなかった。この結果は、L 型側根では不定根（冠根）と同様に、好気条件下では恒常的通気組織が形成され、嫌気還元条件では恒常的通気組織形成と誘導的通気組織形成の両方によって、通気組織がさらに発達することを示唆している。

上記の研究で、L 型側根に形成される ROL バリアは強固（tight）なものではないことが明らかになった。この理由として、L 型側根の根長は最長でも 60 mm であり、不定根（冠根）と比べて短いことが挙げられた。もし L 型側根がより伸長できれば、強固な ROL バリアが形成される可能性があった。そこで、主根の根端を切断すると補償作用によって L 型側根がより伸長するという現象に着目して、長い L 型側根における ROL バリアの強度を調査することにした。嫌気還元条件で生育させた 28 日齢の植物の 45~65 mm の長さの不定根（冠根）の根端を切除し、さらに 7 日間嫌気還元条件で栽培した結果、約 100 mm の長さの L 型側根を得ることができた。約 100 mm の長さに伸長した L 型側根は根径が大きくなっており、特に皮層細胞数が増え、通気組織の面積も増加していた。この伸長した L 型側根を用いて、円筒型酸素電極による ROL 測定を行ったところ、約 60 mm の L 型側根を用いたときと比べて、より強固な ROL バリアの形成を確認することができた。さらに、Fluorol Yellow 088 によるスベリン染色を行った結果、根端 20 mm の部位から基部に向けて、外皮、厚壁組織でスベリンの蓄積が観察され、ROL バリア形成部位と一致していた。これらの結果より、L 型側根においても、不定根（冠根）と同様に長く伸長すると強固な ROL バリアを形成する能力があることを確認できた。

イネ *dripping wet leaf* (*drp7*) 変異体は、葉のワックス成分が減少することで、葉の表面の撥水性が低下する変異体であり、冠水状態になると葉の表面に形成される leaf gas film が形成されなくなり、冠水耐性が低下することが報告されている。この変異体の原因遺伝子は、ワックス成分の C30 primary alcohol の生合成を触媒する酵素をコードする遺伝子であり、*Leaf Gas Film-1* (*LGF1*) 遺伝子と名付けられている。*LGF1* 遺伝子は、葉だけでなく、根の表層組織でも発現しており、嫌気還元条件下で発現量の増加がおきることから、*LGF1* 遺伝子が ROL バリア形成に関与する可能性が考えられた。その可能性を検証するために、*drp7* 変異体とその野生型である品種「金南風」を嫌気還元条件下で生育させ、メチレンブルー染色ならびに円筒型酸素電極による ROL 測定を行った。その結果、野生型（金南風）では強固な ROL バリアが形成されたのに対して、*drp7* 変異体では

論文審査の結果の要旨

強固な ROL バリアが形成されないことが明らかになった。Fluorol Yellow 088 による根の横断切片の染色を行ったところ、外皮における染色（蛍光）が弱かった。Fluorol Yellow 088 は、根においてスベリンの蓄積を調べるためによく使用される。しかし本来、Fluorol Yellow 088 は脂質成分を染色する染色剤であることから、*drp7* 変異体の根の外皮での染色（蛍光）が弱かったのは、スベリンの蓄積量が減少したためではなく、ワックスの蓄積量が減少したことが理由である可能性も考えられた。これまで、ワックスは主に茎葉部の表面に蓄積することがよく知られていたが、根におけるワックスの生合成、蓄積についてはあまり知られていない。しかし、シロイヌナズナの根では、ワックスの一成분이スベリンと共局在していることが報告されていることから、イネの根においてワックスが生合成され、外皮に蓄積したワックスがスベリンとともに ROL バリアの構成成分として機能する可能性がある。今後、*drp7* 変異体と野生型（金南風）の根の表層組織を単離して、スベリン成分およびワックス成分を分析することによって、*drp7* 変異体の根の表層組織において、スベリンとワックスのどちらの蓄積量が減少しているのかを調査する必要がある。また、ワックスが ROL バリアの構成成分の一つであることが確認できたら、スベリンとワックスがどのように相互作用して ROL バリアの強度を調節しているのかを解明する必要がある。それらの解析によって、不定根（冠根）や L 型側根において根長によって ROL バリアの強度が変わる理由が明らかになり、ROL バリア形成の調節機構の解明につながると期待される。

以上、本研究により、イネの L 型側根は ROL バリアを形成することができるが、S 型側根では ROL バリアを形成できないことを明らかにし、L 型側根と S 型側根が混在することで、より広い範囲の根圏酸化が可能になることが示唆された。また、ワックスが ROL バリアの構成成分の一つとして機能し、ワックスとスベリンの相互作用によって ROL バリアの強度が調節されている可能性を示すことができた。これらの知見は、作物の耐湿性付与に重要な形質である ROL バリア形成の機構解明に寄与すると期待される。そのため、本博士論文は、新規性、独自性等の当該分野における高度の学術的価値を有し、当該分野に関する学術研究に大きく貢献するものであると学位審査委員会により判断された。よって、本審査委員会は本論文の内容が博士（農学）の学位を授与するに十分であると判断した。