

主論文の要約

論文題目： **Physiological analysis of adaptation mechanism on flood environment in deepwater rice** (浮イネの洪水環境適応に関する生理学的解析)

所属： 名古屋大学大学院生命農学研究科生命技術科学専攻

氏名： 森 欣順

本文：

植物は多種多様な環境に合わせた形態的、生理的な適応を行い、地球各地の様々な地域に生息している。河川や池、湖周辺などの水辺に生育している陸上植物は、生物の生存に不可欠な水分の摂取に関してメリットがある一方、過度の降雨による洪水の影響によって冠水し溺死してしまうリスクを負っている。これは水中における気体の拡散速度は大気中に比べて 10,000 倍小さく、また水中に溶存する酸素、二酸化炭素の量が空気中に比べ少ないため、呼吸や光合成のために必要な酸素や二酸化炭素などの気体の摂取が大きく制限されることに起因している。このように、冠水ストレスは植物の生育に深刻な影響を与える。

植物は様々な形質を備えることにより、洪水に適応してきた。例えば、*SUBMERGENCE1 (SUB1)* 遺伝子を保持しているイネは、洪水時における伸長反応を抑制し、冠水後の再成長時に必要なエネルギーを貯蔵することにより、短期間の洪水に適応していることが報告されている。一方、浮イネは、長期間の洪水に対して積極的な伸長反応によって水中から脱出して洪水ストレスを回避し、洪水環境に適応してきた。

南、東南アジアでは、長期間の雨季において、水深が 1m を超えるような洪水期間が 5 ヶ月以上続き、中には最大で 6 m の水深に達することもある。浮イネは、このように定期的に洪水が発生する地域に適応してきた。具体的には、浮イネは水位の上昇とともに節間(茎)を急速に伸長させ葉先を水面から出すことにより、大気から酸素を摂取し水面下の組織へ送り届けることにより、洪水発生地帯でも生育することができ、その節間長は 7 m に達することもある。一般的なイネは生育の後期である生殖成長期に節間伸長を行い、止め葉の葉鞘から穂を抽出させ出穂に至る。一方、浮イネは、栄養成長期の早期から節間伸長能を有し、雨季の水位の上昇に応答して節間伸長することができる。私の所属する植物遺伝子機能研究室では、これまでに浮イネの洪水に応じた節間伸長応答に着目し、節間伸長を制御する遺伝子の同定や、植物ホルモンと節間伸長との関連などの生理学的な解析が行われてきた(第 1 章)。

先に述べた浮イネの酸素摂取による洪水ストレス回避機構は、冠水時におけるイネの生理状態に関する研究から考察されている。しかしこれまでに、浮イネの節間伸長による酸素摂取と洪水ストレス回避について、総合的な研究を行った例はない。そこで本研究では、冠水状態における浮イネの酸素濃度状態の変動解析や(第 2 章)、水面上

の組織から摂取された気体の水面下の組織への気体移動の可視化を行い、浮イネが節間伸長を行うことの生物学的な意義を検証した(第3章)。また浮イネの節間伸長が洪水応答における重要な要素であるため、浮イネの節間伸長を制御する遺伝子の機能解析(第4章)を行った。

まず第2章では、浮イネ節間内の酸素濃度状態に着目し研究を行った。初めに完全に冠水した状態の浮イネ品種 C9285 と、葉先を水面上に抽出し大気との接触が保たれている部分的に冠水した状態の C9285 において、節間内部の酸素濃度の日周変動の比較検討を行った。夜間において顕著な傾向が見られ、冠水していない C9285 節間内の酸素濃度が 20 kPa であるのに対し、完全冠水状態の C9285 は節間内部の酸素濃度が 3-5 kPa 程度まで低下し、顕著な酸素欠乏状態が観察された。一方、部分冠水状態の C9285 は、夜間においても完全冠水状態の結果よりも高い 10 kPa 程度で推移した。この結果は、浮イネは洪水時に節間伸長し、葉先が水面上に出ることで酸素を取り込み、夜間の体内酸素濃度をある程度維持していることを示唆した。次に、部分冠水状態、完全冠水状態における C9285 の節間伸長を比較した。部分冠水状態における C9285 は、冠水後 3 日後に伸長が減衰した。一方で、完全冠水状態における C9285 は、葉先が水面上に抽出し大気との接触が確保された処理後 2 日目以降でも、6 日間の観察において節間伸長を続けた。このことから浮イネは、完全冠水状態を回避し、必要な酸素を大気から確保するために継続的な節間伸長を行い、節間内部の酸素濃度状態を改善しているという可能性が示唆された。さらに、完全冠水状態での浮イネの節間伸長の維持機構について解析を行った。この機構には、ガスフィルムという水辺環境に生育するイネ科を含む多くの陸上植物が持つ形質が関与していると仮定した。ガスフィルムとは水中の葉表面に形成される空気層であり、葉の表面に存在するワックスなどの疎水性物質や乳頭状突起による撥水性に起因して形成される。このような空気層が、水中に溶存している酸素、二酸化炭素の取り込みを促進し、水面下での呼吸、光合成を維持することが報告されている。そこで初めに、界面活性剤を葉表面に塗布し撥水性を失わせることによってガスフィルムを除去し、完全冠水状態における C9285 節間内部の酸素濃度変動を計測した。ガスフィルムを除去した状態の植物では、夜間において酸素濃度が 0 kPa を示し、無酸素状態に陥っていた。また日中においてもガスフィルムを保持した C9285 に比べ、ガスフィルムを除去した C9285 の節間内部の酸素濃度は大幅に減少していた。よってガスフィルムにより、日中夜間ともに節間内部の酸素濃度が低いながらも維持されていることが明らかとなった。次にガスフィルムによって節間内部の酸素濃度が維持され呼吸を行うことができ、完全冠水状態における浮イネの節間伸長が維持されていると仮定し、ガスフィルムを除いた状態における完全冠水状態での浮イネの節間伸長を評価した。ガスフィルムを保持した状態に比べ、ガスフィルムを除いた状態の C9285 では、節間伸長が有意に減少していた。よって、浮イネはガスフィルムによって無酸素状態にならずある程度酸素濃度が保たれ呼吸を維持し、継続して節間伸長し葉先を水面に抽出させ、大気中の酸素を摂取し体内の酸素濃度状態の維持を行っていることが考えられた。さらに、浮イネは、部分

冠水状態や完全冠水状態、また完全冠水状態でガスフィルムを取り除いた各状態における冠水ストレスを評価するため、C9285において嫌気性代謝に関わる遺伝子群の発現変動を評価を行った。これらの遺伝子群は、低酸素によるエネルギー生産減少を補うため、冠水時や低酸素環境で発現が上昇することが報告されている。大気中におかれたC9285では顕著な発現変動は観察されなかったが、各冠水状態でのC9285では、夜間において嫌気性代謝に関わる遺伝子の発現が誘導された。また部分的冠水状態に比べ、完全冠水状態における浮イネでは、さらにこれらの遺伝子群が高発現していた。さらに完全冠水状態における浮イネでは、ガスフィルムを保持している状態よりも、ガスフィルムを除去した状態において、より嫌気性代謝に関わる遺伝子群の発現が上昇していた。以上のことから、浮イネは節間伸長を行い水中から葉を抽出させることによって水面上の酸素を摂取することで冠水ストレスを回避し、洪水環境における継続した成長を可能にしていることが考えられた。

次に第3章では、イネの通気メカニズムについて解析を行った。水面下から抽出した葉から摂取された気体は、効率的に水面下の組織へ送り届けられている。イネは葉身や葉鞘、また茎や根の植物体全体に通気組織を発達させており、これらの組織による通気によって、呼吸を維持していると考えられている。しかしこれまでにイネ体内の気体の移動を直接観察した例はない。そこで部分冠水状態におけるC9285および一般的なイネ品種T65に、放射性同位体窒素 $^{13}\text{N}_2$ トレーサー($^{13}\text{N}_2$)の投与を行い、positron-emitting tracer imaging system (PETIS)を用いることにより、植物体体内の気体の移動について直接的な観察を行った。両品種において、水面上に抽出している葉より摂取させた $^{13}\text{N}_2$ ガスが、時間経過に従って徐々に水面下の組織へ移動していく様子が観察された。またこの移動は、中空のチューブを用いた対照実験における気体の移動と同様の傾向を示しており、植物体内を移動する気体が拡散によって移動している可能性が考えられた。さらに植物体内を移動する $^{13}\text{N}_2$ ガスは、葉において同化された $^{11}\text{CO}_2$ 転流産物よりも速く、植物体の基部へ到達した。以上の結果よりイネは、通気組織を備え気体の状態で酸素を輸送することにより、冠水した組織へ効率的に酸素輸送を行っていることが考えられた。

第4章では、節間伸長を制御する遺伝子の機能解析を行った。浮イネの節間伸長は、植物ホルモンである、エチレン、アブシシン酸(ABA)、およびジベレリン(GA)によって制御されている。浮イネが冠水すると、気体の拡散が抑制され体内に存在するエチレンが植物体内に蓄積する。また冠水によってエチレン生合成酵素の発現および酵素活性が誘導され、エチレンの生合成が誘導される。このような機構により植物体内に高蓄積したエチレンが、体内のABA含量の減少を引き起こすことによって、植物体におけるGAへの感受性が増加する。そしてGAが節間での細胞分裂および伸長を促進することにより、節間伸長が引き起こされる。しかしこれまでに、浮イネにおいてGAに応じて節間伸長の開始を制御する遺伝子は同定されていない。そこで、GAに応答して節間伸長を誘導する遺伝子の同定および機能解析を行い、浮イネの節間伸長機構のさらなる解明を行った。これまでにT65とC9285の交雑に由来する雑種集団を用いた

QTL 解析により、3 番染色体および 12 番染色体に、GA に応答した節間伸長を制御する QTL が検出されている。本研究では 12 番染色体の QTL に着目し、ポジショナルクローニングを行った。その結果、12 番染色体上の 86kbp の染色体領域を、GA に応じた節間伸長を制御する QTL の候補領域と特定した。C9285 では、候補領域内のうち 23 kbp が欠損していた。候補領域内にはトランスポゾンを除いて 3 つの遺伝子が座乗していた。そのうち翻訳開始因子である eIF2 は、C9285 で欠損している染色体領域に座乗していた。また候補領域を T65 型のホモまたはヘテロで持つ系統は、GA に応じた節間伸長を抑制した。このことから T65 の候補領域において、GA に応答した節間伸長を抑制する因子が存在することが明らかとなった。さらに、候補領域内の 3 つの遺伝子について、GA に応じた遺伝子発現変動を評価したところ、1 つの転写因子が C9285 のみで GA に応じて発現量が減少した。このことから候補領域内の eIF2 または転写因子が、GA に応じて節間伸長を制御する遺伝子の候補として考えられた。そこでこれらの遺伝子を過剰発現または CRISPR-Cas9 による遺伝子編集を行い、表現型を評価した。転写因子を過剰発現した時にのみ形質転換体の顕著な矮化が見られ、また CRISPR-Cas9 によって作成された変異体において、栄養成長期における節間伸長が見られた。このことから候補領域内の転写因子を GA に応じた節間伸長を制御する遺伝子であると結論づけ、*DECELERATOR OF INTERNODE ELONGATION1 (DEC1)*とした。Yeast One Hybrid Assay により、DEC1 タンパク質は転写抑制能を持つことが明らかとなった。さらに *DEC1* は冠水によって発現が低下し、また GA 合成阻害剤と共にエチレンの前駆体である ACC を投与することによっても発現の減少が見られた。過去に浮イネでは、GA の合成酵素である *GA20ox2* が、冠水およびエチレンに応じて特異的に発現が上昇し、冠水時における節間伸長が促進されることが報告されている。これらの結果を統合して浮イネの節間伸長メカニズムを考えると、浮イネはまず冠水特異的に体内にエチレンを蓄積する。蓄積したエチレンが *DEC1* の発現を冠水初期に抑制し、GA への感受性を上昇させると同時に、*GA20ox2* の発現を上昇させ GA 合成を促進する。そして合成された GA が *DEC1* 発現を抑制し続けることにより、GA への感受性を維持し、急激な節間伸長が誘導されているという節間伸長機構が考えられた。

本論文では、浮イネは洪水環境においてどのように生存しているのかということについて、生理学的な観点から生物学的重要性について、また分子生物学的な観点から浮イネの特異的な節間伸長メカニズムと洪水適応について解析を行った。近年、シロイヌナズナやイネに加えて、コムギやトウモロコシ、ジャガイモやトマトなど多くの種における全ゲノム情報が報告されている。将来、これらの遺伝情報を有効に用いることにより、より多くの種における環境適応メカニズムが明らかとなり、生物がどのように地球上に存在してきたのかということについての一層の理解が期待される。