

低カリウムで誘導されるイネのナトリウム吸収促進
の原因遺伝子の同定

2015

宮本 託志

目次

序章	1
第 1 章 イネのナトリウム吸収能力と低カリウム耐性に関する検討	6
第 2 章 ナトリウム吸収促進遺伝子のマップベースクローニング	18
第 3 章 ナトリウム吸収促進に寄与する候補遺伝子の発現量解析	26
第 4 章 <i>OsHKT2;1</i> 高発現による地上部ナトリウム蓄積促進の検討	36
第 5 章 <i>OsHKT2;1</i> 発現を制御するプロモーター領域の同定	45
第 6 章 ナトリウム吸収促進に関わる新たな QTL の探索	53
第 7 章 カリウム不足に発現応答する遺伝子の解析	69
総括	86
発表論文	92
謝辞	93
引用文献	94

序章

カリウムは植物の多量必須元素であり、窒素、リンと並ぶ作物肥料の三要素の一つである。カリウムは土壌溶液中及び植物体内で一価カチオンとして存在し、①酵素タンパクの活性化、②膜電位の形成、③浸透圧の維持といった役割を担っている(Wakeel *et al.* 2011)。しかしカリウムは塩化カリウムや硫酸カリウムといったカリウム質肥料として投入される他、有機質肥料や資材、土壌鉱物、灌漑水から耕地へ供給され、窒素やリンと比べて作物収量の律速因子となることは少ない。例えば Dorbermann ら(1996)はアジアの11ヶ所の圃場でのカリウム施肥に対するイネ(*Oryza sativa* L.)の収量応答性を検討し、多くの圃場で収量増加の程度が小さかったと報告している。また土壌中のカリウムは一般的に水によって抽出される水溶性カリウム画分、酢酸アンモニウムによって抽出される交換態カリウム画分、水や酢酸アンモニウムで抽出されない非交換態カリウム画分に分類され(Eagle 1963)、アジアの沖積土壌の多くは作物に利用され易い交換態カリウムを多量に含むためカリウムが水稻の収量を律速することはまれである(Dorbermann *et al.* 1996)。しかも Wihardjaka ら(1999)がインドネシアの圃場で行ったイネ栽培試験では栽培期間を通して土壌の交換態カリウムが一定に保たれており、作物が利用し難いとされる非交換態カリウム画分からもカリウムが供給されることが示唆された。このような理由から、しばしば収量律速因子となる窒素肥料と比べてカリウム質肥料の意義は軽視されがちである。しかし窒素施肥に偏った集約的な栽培システムと養分要求量の大きい高収量品種の導入により、一部の圃場で土壌からのカリウム収奪が進行している(Dorbermann *et al.* 1996, Wihardjaka *et al.* 1999)。例えば Dai ら(2013)は1990年から2006年まで行ったコムギ(*Triticum aestivum* L.)とトウモロコシ(*Zea mays* L.)の中国の試験圃場における連作試験で、窒素・リン・カリウムを施肥した処理区と比べて窒素・リンを施肥した処理区で収量が低下傾向にあったと報告している。同様に、靱井と井澤(2007)は77年間の圃場試験でカリウム無施肥区のイネの平均収量が対照区と比べて減少したと報告している。また作物のカリウム要求量は生育段階や環境条件によって変化するとされる。イネのカリウム要求量は幼穂形成期に最も高まることが報告されており(長谷川ら 1990)、この時期のカリウム吸収速度が土壌からのカリウム供給速度を上回ることによって生育が制限されるかもしれない。また畑作物においては土壌の水分条件が作物のカリウム吸収に影響することが報告されている(Kuchenbuch *et al.* 1986)。した

がって今後も高収量作物を用いた集約的農業が継続し耕地からのカリウム収奪が進行すれば、生育段階や環境条件特異的なカリウム不足による収量低下が顕在化すると考える。

耕地のカリウム不足はカリウム施肥により改善されるが、肥料価格の高騰と過剰施肥による環境負荷が問題視されている。近年世界的な肥料需要が増大しており、カリウム質肥料の需要増加は 2007 年から 2011 年で 3.0% (FAO 2008)、2011 年から 2014 年で 3.8% (Heffer and Prud'homme 2010)と推定される。その上カリウム質肥料の主要な原料であるカリウム含有鉱物の産地が少数の国に集中しているため、カリウム質肥料の価格は増加傾向にある (USDA 2011, USGS, 2012)。一方で赤井ら(2012)は水田へのカリウム過剰施肥が交換態カルシウムの溶脱を引き起こし、土壌 pH の低下をもたらすと指摘している。肥料コスト削減と環境負荷低減の観点から、農地へのカリウム施肥量を低減しつつカリウム不足による作物収量の低下が起こらないような方策が必要である。方策の一つに、カリウム体内利用効率の高い作物品種の作出がある。

ナトリウムはカリウムと同様にアルカリ金属元素に分類されるが、植物の必須元素ではない。しかしカリウムの供給が制限された環境では、ナトリウム塩の施用により一部の植物種の生育が改善されることが知られている(Lehr 1953; Flowers and Läuchli 1983; Wakeel *et al.* 2011)。植物体内におけるカリウムの役割のうち①酵素タンパクの活性化はカリウム特異的な機能であるが、②膜電位の形成と③浸透圧の維持は部分的にナトリウムにより代替されと考えられている(高橋・前嶋 1998; Wakeel *et al.* 2011)。例えば高橋と前嶋(1998)は低カリウム条件で栽培した複数の植物種に対するナトリウム塩の施用効果を検討し、トウモロコシやインゲンマメ(*Phaseolus vulgaris* L.)に対する生育改善効果はなく、一方でオオムギ(*Hordeum vulgare* L.)の生育はカリウム十分条件の 78%にまで改善されたと報告している。またトマト(*Solanum lycopersicum* L.)においては、低カリウム条件でのナトリウム塩施用効果に品種間差が見出だされている(Figdore *et al.* 1987)。また作物に対するナトリウム塩施用効果の種間差及び品種間差は、地上部のナトリウム含有率と正の相関があると報告されている(Figdore *et al.*, 1987; 高橋・前嶋 1998)。これらの先行研究は土壌からより多くのナトリウムを吸収し地上部に蓄積する作物種及び品種がカリウム不足によるストレスに耐性を持つことを示唆している。またナトリウムは土壌中に普遍的に存在し、土壌溶液中のナトリウム濃度は一般的にカリウム濃度よりも高い(Flowers and Läuchli 1983)。したがって土壌からナトリウムを取り込

み地上部に蓄積する能力を高めることができれば、作物のカリウム体内利用効率は向上し、カリウム施肥量の低減につながると考えた。

イネは湿潤アジアの主要作物の一つであり、稲作におけるカリウム施肥量は世界のカリウム質肥料使用量の 13%を占める(Heffer 2009)。イネはカリウム十分条件と比べ、カリウム不足時にナトリウムを多く吸収する(長谷川ら 1987;長谷川ら 1990; 高橋・前嶋 1998; 赤井ら 2012)。また低カリウム条件で栽培したイネは下位葉から黄化し、褐色斑が生じ萎れるが、ナトリウム塩を施用することで葉が直立し乾物重量が改善する(Yoshida and Castaneda 1969)。同様に、高橋と前嶋(1998)が行った試験ではカリウム無施肥によるイネの生育低下が塩化ナトリウムの添加で 52%軽減された。さらに清野ら(1992)は寒冷地水田においてササニシキやトヨニシキのナトリウム吸収濃度(ある期間におけるナトリウム吸収量/ 乾物重の増加量)としいな重の間に有意な負の相関を見出した。宮本(2009)が行った登熟まで行った水耕栽培試験においても、低カリウム条件でのイネのワラ乾物重量と籾乾物重量はナトリウム塩添加により改善されることが確認された(図 0 - 1)。これらの結果から、ナトリウムの吸収及び地上部への蓄積能力が高いイネ品種の作出はカリウム減肥栽培に有用であると考えた。

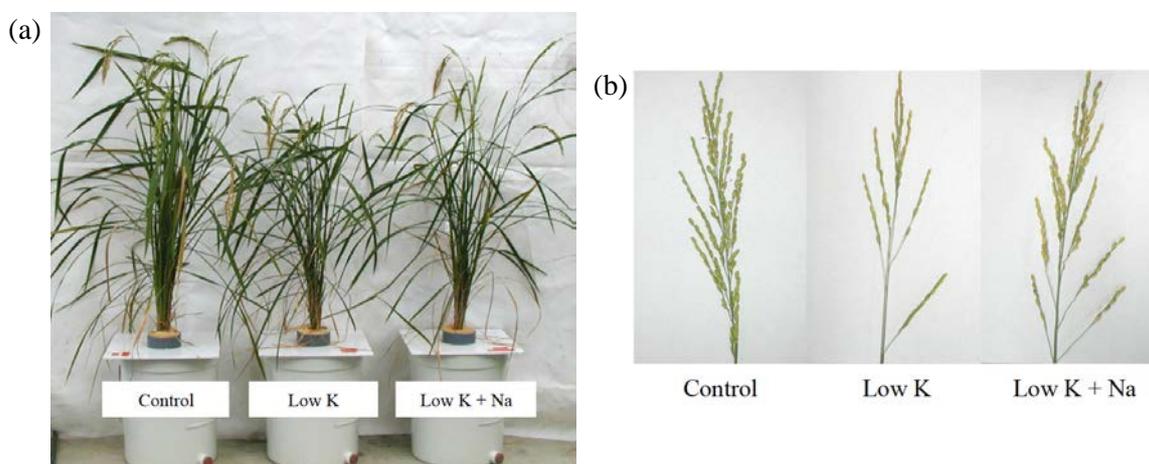


図 0 - 1 登熟まで水耕栽培したイネの草姿(a)と主稈の穂の様子(b)

0.75 (Control), 0.08 (Low K) mol m⁻³ KCl または 0.08 mol m⁻³ KCl + 0.68 mol m⁻³ NaCl (Low K + Na)を含む培養液で登熟まで栽培した。

ナトリウムの根における取り込みや体内での輸送機構を明らかにすることは、ナトリウム高吸収イネ品種の作出に有用な知見となる。植物のナトリウム輸送機構の一つとして、ナトリウム膜輸送タンパク High-affinity K⁺ Transport (HKT)がこれまでに様々な植物

種から単離されている。Schachtman と Schroeder (1994)はカリウム欠除条件で栽培したコムギから cDNA ライブラリーを作成し、高親和性カリウム吸収欠損酵母の生育を相補する遺伝子として *TaHKT1* を単離した。その後 Rubio ら(1995)はアフリカツメガエル卵母細胞(*Xenopus oocyte*)を用いたパッチクランプ実験により、HKT1 がカリウムとナトリウムを共輸送することを明らかにした。さらに Horie ら(2001)はイネ(品種:日本晴)から *TaHKT1* のホモログ *OsHKT1*(後の *OsHKT2;1*)を単離し、それがナトリウム膜輸送体タンパクをコードすることを明らかにした。また Horie ら(2007)は *OsHKT2;1* を欠損したイネ変異株では低カリウム条件でのナトリウム吸収量が著しく減少することを示した。この *OsHKT2;1* を含め、イネは 8 つの *HKT* 様遺伝子(*OsHKT2;1-4*, *OsHKT1;1*, *OsHKT1;3-5*; Horie *et al.* 2001; Garcíadeblás *et al.* 2003)を有している。また HKTs の他にも、細胞膜局在型 Na^+/H^+ アンチポーター SOS (Martínez-Atienza *et al.* 2007)や液胞膜局在型 Na^+/H^+ アンチポーター NHX (Fukuda *et al.* 2004; Fukuda *et al.* 2011)などのナトリウム輸送体タンパクがイネに存在することがこれまでに報告されている。しかし *OsHKT2;1* 以外のナトリウム膜輸送体タンパクのカリウム不足時の機能は不明である。

本研究ではカリウム不足時に多くのナトリウムを吸収し地上部に蓄積するイネ品種の作出を目的とし、ナトリウム吸収を促進する原因遺伝子の同定を試みた。第 1 章の検討では低カリウム条件でのナトリウム吸収量に品種間差を見出し、ナトリウム吸収能力の高い品種はナトリウム塩添加による生育改善効果が大きいことを示した。第 2 章の検討ではナトリウム吸収能力の高い品種と低い品種の交配系統を用いて、ナトリウム吸収促進に関わる量的形質遺伝子座(quantitative trait locus, QTL)の解析と QTL 遺伝子のマップベースクローニングを行った。第 3 章の検討では候補領域に座乗していた遺伝子の機能とカリウム不足に対する発現応答から、ナトリウム吸収促進の原因候補遺伝子を推定した。ここでナトリウム吸収促進の原因と推定された遺伝子は *OsHKT2;1* であり、複数のイネ品種で *OsHKT2;1* 発現レベルとナトリウム吸収量の間に関連のある正の相関が見出された。第 4 章では *OsHKT2;1* 過剰発現株を用いた実験から *OsHKT2;1* の高発現がナトリウムの根での取り込みと地上部への蓄積に及ぼす影響を考察し、第 5 章ではナトリウム高吸収品種において *OsHKT2;1* が高発現する機構について検討を行った。また第 6 章では世界イネコアコレクションのイネを用いてナトリウム高吸収品種のスクリーニングを行い、これまで検討してきたイネ品種よりも優れたナトリウム吸収能力を示すベトナム在来品種 Khau Tan Chiem (KTC)を見出した。そこで

KTC とコシヒカリの交配系統を用いて QTL 解析を行ったところ、ナトリウム吸収促進に関わる複数の新規 QTL を見出だした。第 7 章ではカリウム欠除処理後のイネの根から抽出した mRNA をマイクロアレイ解析に供し、カリウム不足時にナトリウム吸収に関与する候補遺伝子を推定した。最後の第 8 章では本研究の結果を総括し、また今後の展望を考察した。

第1章 イネのナトリウム吸収能力と低カリウム耐性に関する検討

本章では先ずカリウムの供給量に応じたイネのナトリウム吸収量、また複数のイネ品種のナトリウム吸収量の違いを検討した。その結果、カリウムの供給が制限されるとナトリウムの根での取り込みと地上部への蓄積が促進されること、また地上部のナトリウム蓄積量には品種間差があることが明らかとなった。そこでナトリウム吸収能力の高い品種と低い品種で、低カリウム条件でのナトリウム塩の施用効果を比較した。

【植物材料】

- ・ジャポニカ品種: コシヒカリ、ササニシキ、日本晴
- ・インディカ品種: IR36、IR64、カサラス

【方法】

イネ種子の催芽処理

種子を試験管に入れ、蒸留水を注ぎ、3%(w/v)の殺菌剤(トリフミン: 日本曹達株式会社, 東京)を加えて 30 °Cで 3 日間インキュベートした。

培養液組成

培養液の組成を表 1 - 1 に示した。30 日間のポット栽培試験では脱イオン水で、播種後 10 日間のコンテナ栽培試験では蒸留水で培養液を作成した。微量要素の組成は Hewitt ら(1966)に倣った。

表 1 - 1 水耕栽培試験に用いた培養液の組成

培養液組成			
多量栄養素	mol m ⁻³	微量栄養素	mg L ⁻¹
(NH ₄)SO ₄	0.75	H ₃ BO ₃	2.8
(NH ₄)HPO ₄	0.25	MnCl ₂ 4H ₂ O	1.8
KCl	*	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.080
NaCl	*	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.22
CaCl ₂	0.50	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0.10
MgCl ₂	0.50	FeC ₆ H ₅ O ₇ nH ₂ O	29

* 栽培試験ごとに施用量が異なる。

人工気象機内の環境条件

イネの短期水耕栽培試験は人工気象機(NS-280 FHW:高山製作所, 京都)内で行った。環境条件は以下の通りである:温度 30 °C;相対湿度 80%;明期 12 時間;光強度 $350 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

異なる培養液カリウム濃度で栽培したイネのカリウム吸収量とナトリウム吸収量の検討

1 L 容プラスチックコンテナに 0.75 mol m^{-3} KCl を含む培養液を入れた。培養液にメッシュを貼ったプラスチックフレーム(フロート)を 4 枚浮かべ、コシヒカリの種子を 1 フロートあたり 10 粒播いた。播種後 10 日齢幼苗から生育の揃った個体を選抜し、ガラス室内の 4 L 容プラスチックポットに 1 ポットあたり 4 個体移植した。培養液 KCl 濃度は 0.08, 0.15, 0.38 または 0.75 mol m^{-3} の 4 処理区を設け、すべての培養液に 0.38 mmol L^{-1} NaCl を等しく添加した(各処理区 2 ポット、計 8 ポット)。適宜脱イオン水を補充し、液量を一定に保った。1 週間に 2 度(3 日または 4 日に 1 度)培養液を新しいものに交換した。栽培は 2010 年 5 月 20 日から 6 月 19 日の 30 日間行った。すべての個体を収穫し、各処理区 4 群(2 個体ずつ)に分けた。根を脱イオン水で軽く洗い、地上部と根に分けて乾燥させ、カリウム含有率とナトリウム含有率の分析に用いた。

カリウム吸収量及びナトリウム吸収量のイネ品種間差の検討

2 L 容プラスチックコンテナに 0.75 または 0.08 mol m^{-3} KCl を含む培養液を入れた。どちらの処理区にも 0.38 mmol L^{-1} NaCl を等しく添加した。コシヒカリ、ササニシキ、日本晴、IR36、IR64、カサラスの種子をそれぞれ 10 粒播いた(各コンテナ 6 フロート)。播種後 10 日目にすべての個体を収穫し、各品種 3 群(3 個体、3 個体、4 個体)に分けた。根を蒸留水で軽く洗い、地上部と根に分けて乾燥させ、カリウム含有率とナトリウム含有率の分析に用いた。

低カリウム条件でのナトリウム塩施用による生育改善効果の検討

上記の播種後 10 日間の試験と同様の栽培方法で、コシヒカリ、ササニシキ、日本晴、IR36、IR64、カサラスの地上部乾物重量を比較した。 0.75 mol m^{-3} KCl 処理区と 0.08 mol m^{-3} KCl かつ 0.08 mmol L^{-1} NaCl を添加した処理区または添加しなかった処理区を設けた。

またコシヒカリと IR64 を用いて、新鮮重量の推移を比較した。上記と同様にコシヒカリと IR64 を 0.75 mol m^{-3} KCl を含む培養液で栽培した。播種後 7 日目に 40 mL 容のガラスバイアルに入れた 0.08 mol m^{-3} KCl + 0.38 mol m^{-3} NaCl 処理区または 0.08 mol m^{-3} KCl かつ NaCl 無添加処理区に 2 個体ずつ移植した。各処理区 2 反復で栽培した。移植後 3, 7, 10, 14 日目に新鮮重量を測定し、培養液を新しいものに交換した。

試料の乾燥

地上部と根に分けた植物体を封筒に入れ、乾熱器の中に入れた。70 °C で 48 時間乾燥させた。

試料の分解

乾燥させた植物体を秤量し、試験管に入れた。4 L 容プラスチックポットで 30 日間栽培した試料は乾燥後、遊星型ボールミル (P-6, FRITTSCH 社) で粉碎し、一部を試験管に量り採った。濃硝酸を 2 mL 加え、メタルバスを用いて 100 °C で熱した。分解液の色が薄くなった後に温度を 120 °C に上げた。分解液の色の変化がなくなった後、温度を 150 °C に上げて硝酸を完全に蒸発させた。0.1 N 塩酸で 20 mL に調整した。

カリウム含有率とナトリウム含有率の分析

試料溶液を 0.1 N 塩酸で適当な濃度に希釈し、炎光分析機 (AA-6200, 島津製作所) でカリウム含有率とナトリウム含有率を分析した。

【結果】

異なる培養液カリウム濃度で栽培したイネのカリウム吸収量とナトリウム吸収量の検討

4 L 容プラスチックポットで 30 日間水耕栽培したコシヒカリの植物体あたりの乾物重量、カリウム含有量、ナトリウム含有量、地上部と根におけるカリウムとナトリウムの割合を図 1 - 1 に示した。0.38, 0.75 mol m^{-3} KCl 処理区では地上部と根の乾物重量がほとんど変わらなかったが、 0.15 mol m^{-3} KCl 処理区では地上部の乾物重量が減少し、 0.08 mol m^{-3} KCl 処理区では地上部と根の乾物重量がともに有意に減少した (図 1 - 1 a)。地上部と根のカリウム含有量は培養液カリウム濃度の低下に伴って有意に減少した (図 1 - 1 b)。一方で地上部ナトリウム含有量は $0.38, 0.75 \text{ mol m}^{-3}$ KCl 処理区で低く、

0.08, 0.15 mol m⁻³ KCl 処理区で有意に増加した(図 1 - 1 c)。根のナトリウム含有量も同様に 0.08, 0.15 mol m⁻³ KCl 処理区で有意に高い値を示した(図 1 - 1 c)。カリウム含有量とナトリウム含有量の和を 100%とした時、0.38, 0.75 mol m⁻³ KCl 処理区で地上部ナトリウム含有量は 1.06%, 3.10%と極めて低かったが、0.08, 0.15 mol m⁻³ KCl 処理区では 32.6%, 9.29%に増加した(図 1 - 1 d)。根のナトリウム含有量は 0.38, 0.75 mol m⁻³ KCl 処理区で 18.4%, 11.2%、培養液カリウム濃度 0.08, 0.15 mol m⁻³ KCl 処理区では 66.0%, 50.6%に増加した(図 1 - 1 e)。

カリウム吸収量及びナトリウム吸収量のイネ品種間差の検討

対照区(Control, 0.75 mol m⁻³ KCl + 0.38 mol m⁻³ NaCl)または低カリウム処理区(Low K, 0.08 mol m⁻³ KCl + 0.38 mol m⁻³ NaCl)で播種後 10 日間栽培したコシヒカリ、ササニシキ、日本晴、IR36、IR64、カサラスの地上部カリウム含有率と地上部ナトリウム含有率を図 1 - 2 に示した。地上部カリウム含有率、地上部ナトリウム含有率ともに処理区間、品種間で有意に変動した。地上部カリウム含有率は、対照区と比べて低カリウム処理区においてすべての品種で減少した(図 1 - 2 a)。一方でナトリウム含有率は低カリウム処理区においてすべての品種で増加し、低カリウム処理区の地上部ナトリウム含有率はジャポニカ品種のコシヒカリ、ササニシキ、日本晴で顕著に高い値を示した(図 1 - 2 b)。

低カリウム条件でのナトリウム塩施用による生育改善効果の検討

対照区(CT, 0.75 mol m⁻³ KCl)、低カリウム処理区(LK, 0.08 mol m⁻³ KCl)、または低カリウムかつナトリウム添加処理区(LKNa, 0.08 mol m⁻³ KCl + 0.38 mol m⁻³ NaCl)で播種後 10 日間栽培したコシヒカリ、ササニシキ、日本晴、IR36、IR64、カサラスの地上部乾物重量と地上部カリウム・ナトリウム含有量を図 1 - 3 に示した。地上部乾物重量は、対照区と比べて低カリウム処理区においてすべての品種で有意に減少し、低カリウム処理区と比べて低カリウムかつナトリウム添加処理区においてコシヒカリとササニシキで有意に増加した(図 1 - 3 a)。日本晴の地上部乾物重量は、有意差はないものの、低カリウム処理区と比べて低カリウムかつナトリウム添加処理区で増加した(図 1 - 3 a)。IR36、IR64、カサラスの地上部乾物重量は低カリウムかつナトリウム添加処理区で増加しなかった(図 1 - 3 a)。地上部カリウム含有量は、対照区と比べて低カリウム処理区

においてすべての品種で減少し、低カリウムかつナトリウム添加処理区では低カリウム処理区と比べて僅かに減少した(図 1 - 3 b)。一方で地上部ナトリウム含有量は対照区、低カリウム処理区と比べて低カリウムかつナトリウム添加処理区においてすべての品種で増加し、コシヒカリ、ササニシキ、日本晴で高い値を示した(図 1 - 3 b)。地上部カリウム含有量と地上部ナトリウム含有量の和は、低カリウム処理区と比べて低カリウムかつナトリウム添加処理区においてコシヒカリ、ササニシキ、日本晴で有意に増加したが、IR36、IR64、カサラスでは増加しなかった(図 1 - 3 b)。

低カリウム条件でのコシヒカリと IR64 の新鮮重量の推移を図 1 - 4 に示した。コシヒカリの新鮮重量はナトリウム無添加処理区 (without NaCl) と比べてナトリウム添加処理区 (with NaCl) で有意に増加した(図 1 - 4 a)。一方で IR64 の新鮮重量はナトリウム無添加処理区とナトリウム添加処理区の間で有意差がなかった(図 1 - 4 b)。

【考察】

カリウム不足時に誘導されるナトリウム吸収

培養液カリウム濃度が低い条件ではイネのナトリウム吸収量が増加した(図 1 - 1 c; 図 1 - 2 b)。この結果はこれまでの報告と一致している(長谷川ら 1987; 長谷川ら 1990; 高橋・前嶋 1998; 赤井ら 2012)。また宮本(2009)が行った 2 カ月間の水耕栽培試験では、対照区と比べて低カリウムかつナトリウム添加処理区でカルシウム含有率はほとんど変化せず、マグネシウム含有率が僅かに増加したがナトリウム含有率の増加がより顕著であった。この結果はイネがカリウムの代替栄養素としてナトリウムを選択的に外部環境から取り込み、地上部に蓄積することを支持している。

カリウム含有量とナトリウム含有量の和に対するナトリウム含有量の割合は、地上部と比べて根で高かった(図 1 - 1 d, e)。この結果は根におけるナトリウムの取り込みと比べ、根から地上部へのナトリウムの移行が制限されていることを示唆している。イネの地上部にナトリウムをより多く蓄積させるためには、根におけるナトリウムの吸収を高めることに加え、地上部へのナトリウム輸送能力を向上させることも必要であると考えた。

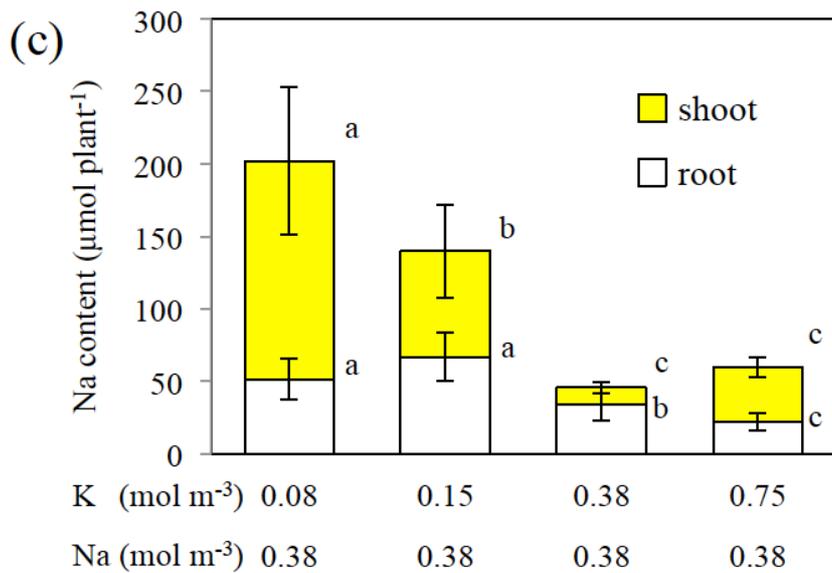
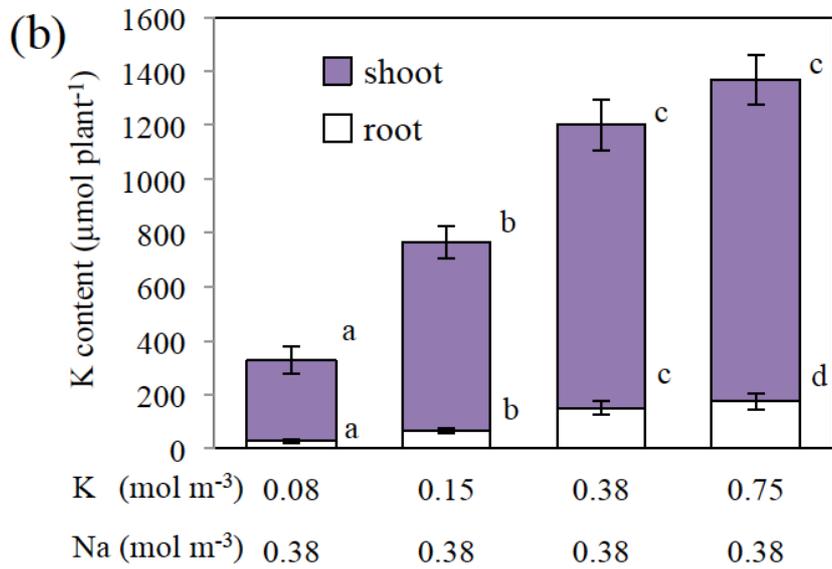
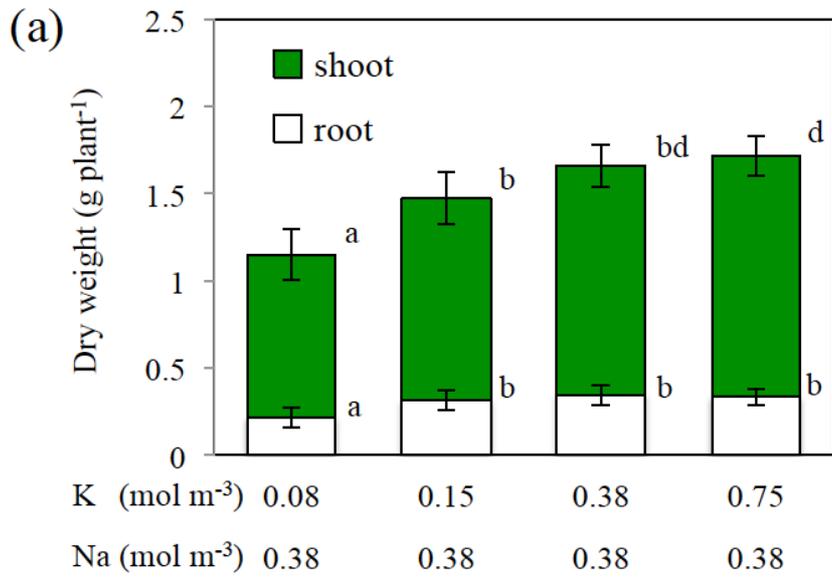
低カリウム条件でのナトリウム吸収能力品種間差

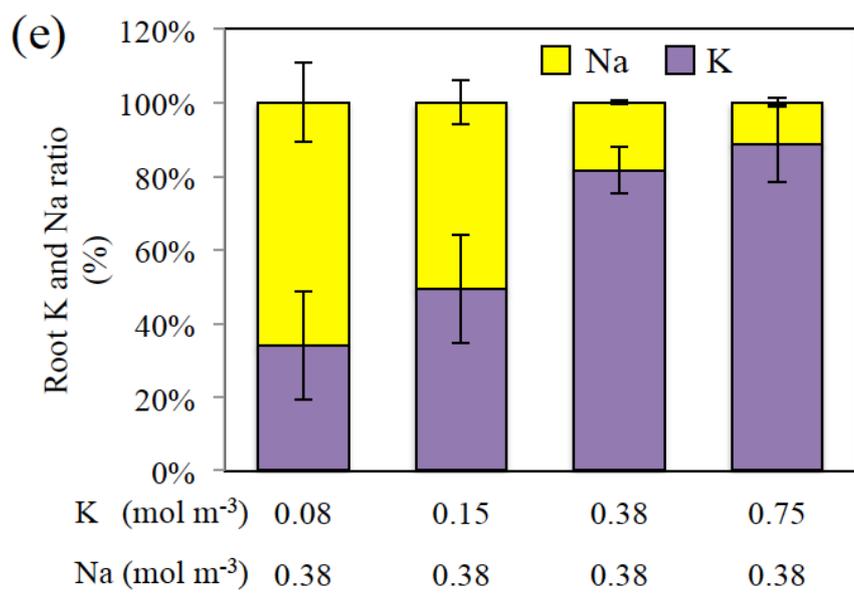
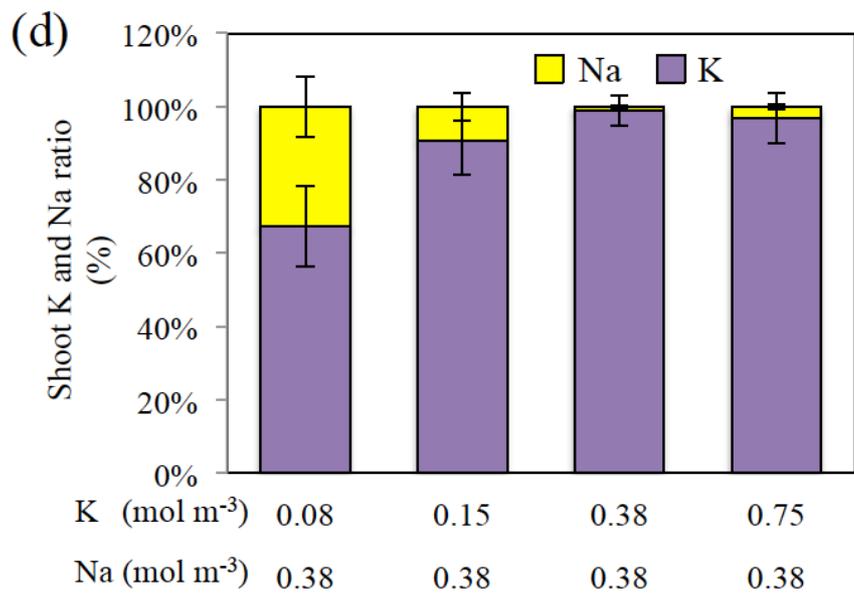
低カリウム条件でジャポニカ品種のコシヒカリ、ササニシキ、日本晴はインディカ品種の IR36、IR64、カサラスと比べて高いナトリウム吸収能力を示した(図 1 - 2 b, 図 1 - 3

b)。同様に武下(2008)の報告では、 $0.08 \text{ mol m}^{-3} \text{ KCl} + 0.68 \text{ mol m}^{-3} \text{ NaCl}$ を含む培養液で播種後 11 日間栽培した場合、ジャポニカ品種のコシヒカリ、ササニシキ、熱研 1 号はインディカ品種の IR36、カサラス、ハバタキと比べて地上部ナトリウム含有率が高かった。これらの結果はジャポニカ品種がインディカ品種と比べて高いナトリウム吸収能力を有することを示唆している。しかし武下(2008)は日本在来イネ・コアコレクションを用いた検討から、インディカ品種は総じてコシヒカリよりも地上部ナトリウム含有率が低いものの、ジャポニカ品種の中でも温帯ジャポニカ品種の入間錦や熱帯ジャポニカ品種の多くはインディカ品種よりも地上部ナトリウム含有率が低いことを示した。これらの結果から、ナトリウム高吸収能力はジャポニカ品種に特有の形質ではなく、一部の温帯ジャポニカ品種が育種の過程で獲得してきた形質であると推定した。

カリウム不足時のナトリウム吸収量と生育の関係

低カリウム条件においてコシヒカリ、ササニシキ、日本晴はナトリウム吸収量が大きく(図 1 - 2 b; 図 1 - 3 b)、ナトリウム塩の添加により地上部乾物重量が有意に増加した(図 1 - 3 a)。またナトリウム吸収能力の高いコシヒカリの新鮮重量は、低カリウム条件でナトリウム塩添加により有意に改善されたのに対し(図 1 - 4 a)、ナトリウム吸収能力の低い IR64 の生育は改善されなかった(図 1 - 4 b)。Figdore ら(1987)はトマト (*Solanum lycopersicum* L.) 5 品種の低カリウム条件でのナトリウム吸収量と生育量を比較し、ナトリウム塩の添加により地上部ナトリウム含有率が大きく増加する系統は植物体あたりの乾物重量及びカリウム利用効率(カリウム含有率の逆数)増加の程度が大きいことを示した。これらの結果は低カリウム条件でナトリウムをより多く吸収することで、カリウム不足による生育低下が軽減されることを示唆している。また Figdore ら(1987)は、ナトリウムによる生育改善効果の程度の大きい系統では、植物体あたりのナトリウム総吸収量に占める地上部ナトリウム含有量の割合が大きいと報告している。高橋と前嶋(1998)はナトリウムのカリウム代替効果の作物種間差は地上部のナトリウム蓄積量の違いを反映すると述べている。これらのことから、低カリウム条件での地上部ナトリウム蓄積量を高めることが、カリウム不足によるストレスに耐性を持つイネ品種の作出につながると考えた。





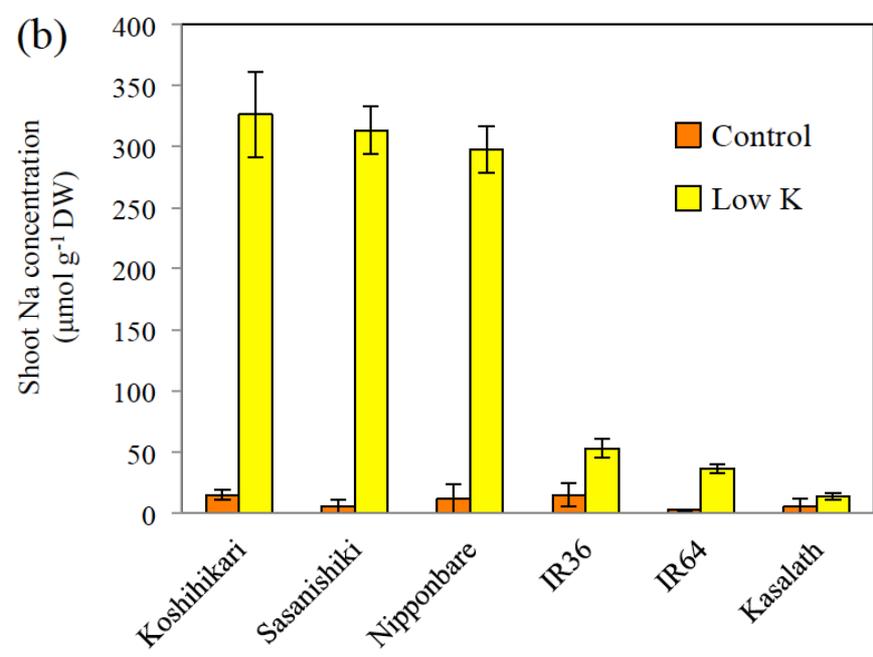
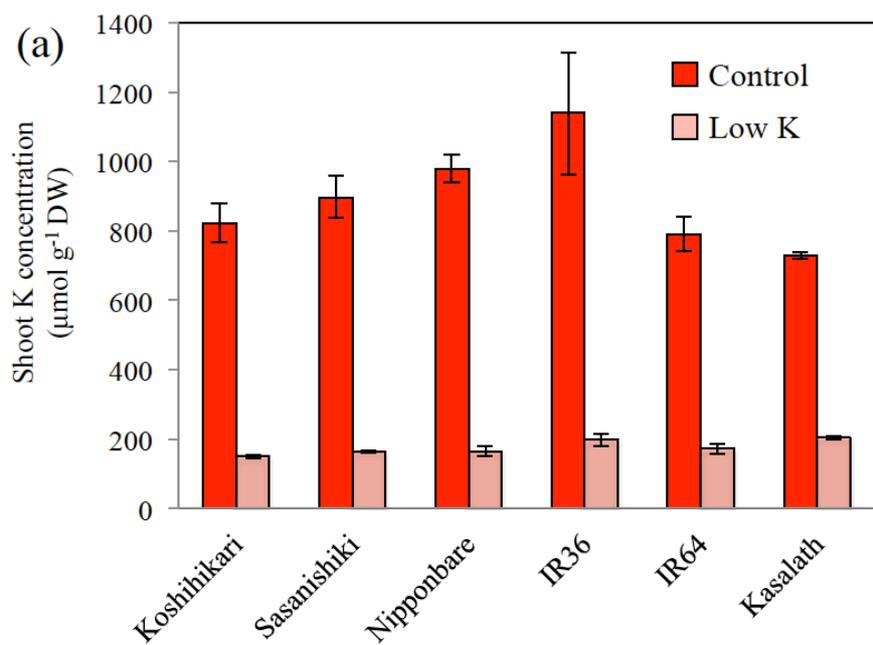


図 1 - 1 異なる培養液カリウム濃度条件で栽培した稲の地上部乾物重量(a)、カリウムとナトリウムの含有量(b, c)とナトリウムとカリウムの割合(d, e)

播種後 10 日齢幼苗を 4 個体ずつ 4 L プラスチック容器に 0.15 または 0.08 mol m⁻³ KCl を含む培養液で 30 日間栽培し、処理区に 0.38 mmol L⁻¹ NaCl を等しく添加した。各値は地上部または根の乾物重量(a)、カリウム含有量(b)、ナトリウム含有量(c)とカリウムとナトリウムの割合(d, e)を示す。異なる値同士では有意差があった (F-test, p < 0.05)。

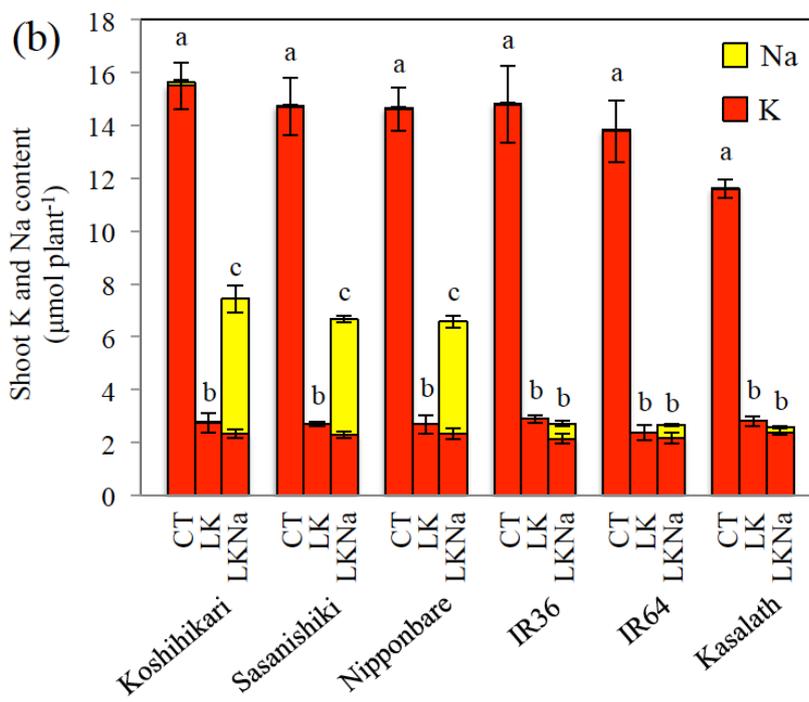
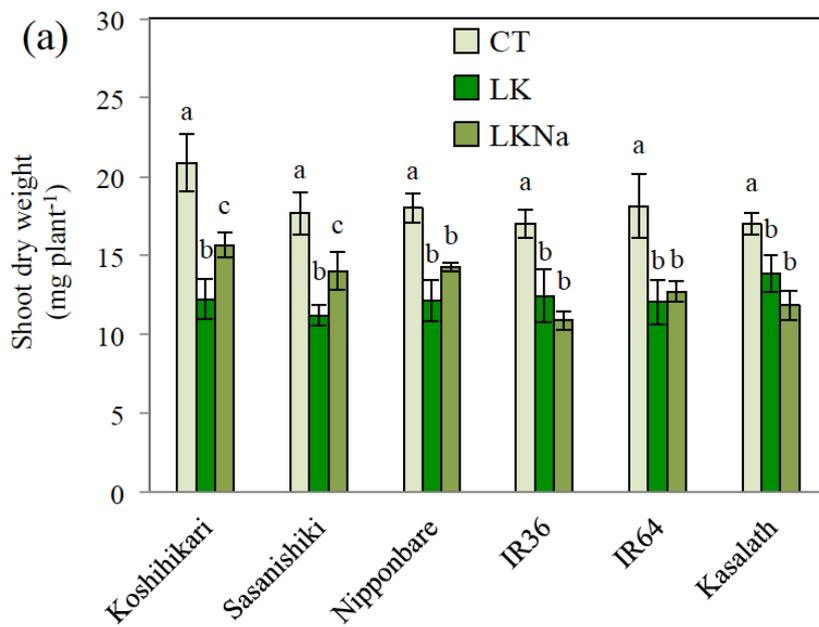
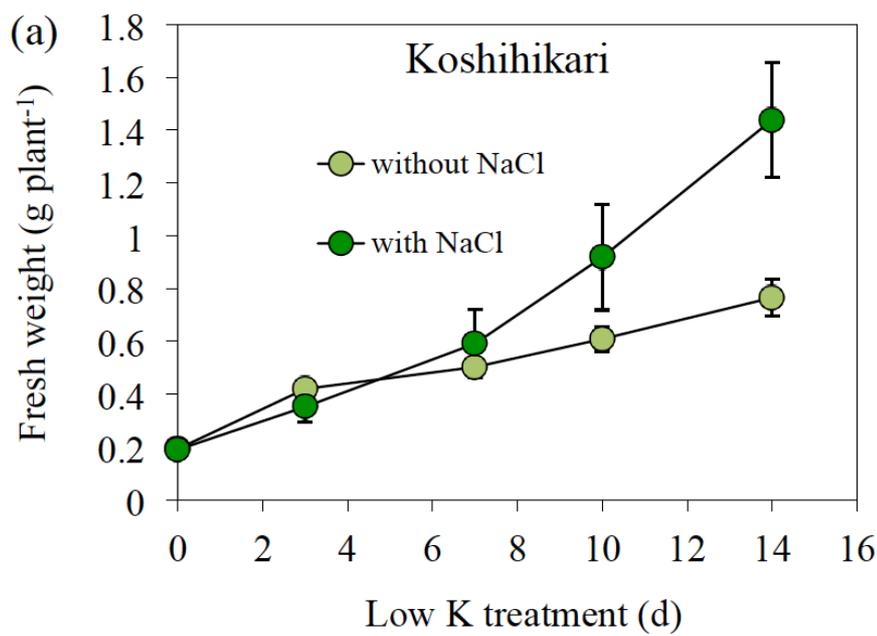


図 3
コシヒカリ、ササニシキ、
またらら、ニッポンbare、
IR36、IR64、カサラサの
処理配量

△含有率(b)
m⁻³ (Control)
栽培した。ど
± SD で示
に品種間、処
< 0.01, 二元

図 10
おむむ



リウム含有
m⁻³ (CT),
LKNa)を含
。各品種に
(*P* < 0.05,
とナトリウ

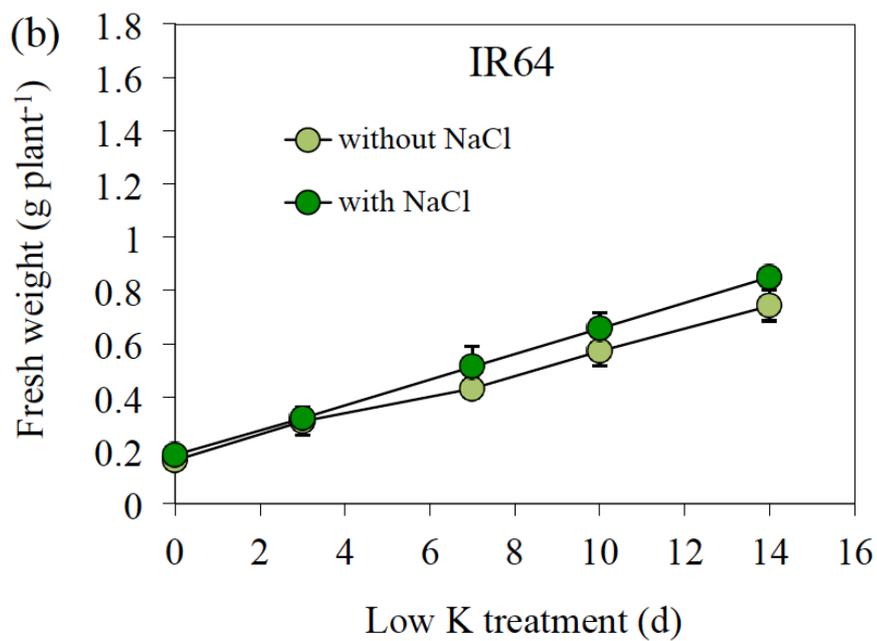


図 1 - 4 低カリウム条件でのコシヒカリ(a)と IR64(b)の新鮮重量の推移

コシヒカリと IR64 を 0.75 mol m^{-3} KCl を含む培養液で播種後 7 日間栽培し、その後 0.08 mol m^{-3} KCl (without NaCl) または 0.08 mol m^{-3} KCl + 0.38 mol m^{-3} KCl (with NaCl) を含む培養液に移植した。移植直前、移植後 3, 7, 10, 14 日で新鮮重量を測定した。各値は平均値 \pm SD で示した。各要因による変動の有意性を以下に示す: Koshihikari: NaCl*, treatment period**, NaCl \times treatment period**; IR64: NaCl^{ns}, treatment period**, NaCl \times treatment period^{ns} [ns, not significant; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$, 反復測定二元配置分散分析 (ANOVA)]。

第 2 章 ナトリウム吸収促進遺伝子のマップベースドクローニング

第 1 章の検討では、ナトリウムを多く吸収し地上部に蓄積するイネ品種はカリウム不足による生育低下が軽減された(図 1 - 3; 図 1 - 4)。この結果から、地上部ナトリウム蓄積を促進する原因遺伝子を明らかにできれば、カリウム不足によるストレスに耐性を持つ新品種の作出に有用な知見となると考えた。

本章では先ず、ナトリウム吸収能力の高いコシヒカリと吸収能力の低いカサラスの交配に由来する戻し交配自殖系統群(backcross inbred lines, BILs; Ma *et al.* 2002)及び染色体部分置換系統群(chromosome segment substitution lines, CSSLs; Ebitani *et al.* 2005)を用いて、地上部ナトリウム含有率を指標とした QTL 解析を行った。その結果、6 番染色体末端にコシヒカリ型で地上部ナトリウム含有率を有意に増加させる QTL が検出された。そこでナトリウム吸収能力の低い IR64 を遺伝的背景とし、6 番染色体末端の一部がコシヒカリ型に置換した系統を用いて、ナトリウム吸収を促進する原因遺伝子のファインマッピングを行った。

【植物材料】

コシヒカリとカサラスの交配に由来する BILs 182 系統、CSSLs 39 系統の種子はイネゲノムリソースセンター(RGRC)(つくば)より分譲を受けた。BILs 182 系統のうち 132 系統を無作為に選抜し、本章の実験に用いた。CSSLs はコシヒカリを遺伝的背景とし、染色体の一部がカサラス型に置換している。置換領域は、39 系統で全 12 染色体のほとんどを網羅する。BILs と CSSLs の遺伝子型は RGRC のウェブサイト(RGRC 2003 a,b)からダウンロードした。

コシヒカリと IR64 の交配に由来する CSSL 2031-15 の種子は、農業生物資源研究所(NIAS)(つくば)の矢野博士から供与を受けた。全 12 染色体を網羅する 148 個のマーカー座をジェノタイピングしたところ、系統 2031-15 は染色体の大部分が IR64 型であり、1 番染色体の SSR マーカー(McCouch *et al.* 2002)RM8111, RM6466, RM10787、6 番染色体のマーカーRM1340, RM5509, RM3307, RM5463、11 番染色体の RM7203, RM1812 の位置がヘテロ型であった。系統 2031-15 の後代個体の地上部ナトリウム含有量は 6 番染色体の遺伝子型によって分離した。そこで系統 2031-15 を自殖し、マーカー RM1340 と RM5463 の間で組換えの起こった 74 系統を選抜してファインマッピングに用いた。

【方法】

イネ種子の催芽処理、栽培に用いた培養液の組成、栽培方法、収穫した植物体の乾燥、ナトリウム含有率の分析については第1章に記した。栽培は人工気象機内で行った。

コシヒカリとカサラスに由来する BILs と CSSLs のナトリウム吸収能力の検討

10 L 容プラスチックコンテナに $0.08 \text{ mol m}^{-3} \text{ KCl} + 0.38 \text{ mol m}^{-3} \text{ NaCl}$ を含む培養液を入れ、コシヒカリ、カサラスと BILs 33 系統の種子をそれぞれ 10 粒播いた。播種後 9 日目に各品種・系統のすべての個体をバルクで収穫し、地上部をカリウム含有率とナトリウム含有率の分析に用いた。

2 L 容プラスチックコンテナに $0.38 \text{ mol m}^{-3} \text{ KCl} + 0.38 \text{ mol m}^{-3} \text{ NaCl}$ を含む培養液を入れ、コシヒカリ、カサラスと CSSLs 6 系統の種子を 10 粒播いた。播種後 10 日目にすべての個体を収穫し、各品種・系統を 3 群に分け、地上部をナトリウム含有率の分析に用いた。

コシヒカリと IR64 の交配に由来する CSSLs の後代個体のナトリウム吸収能力の検討

1 L 容プラスチックコンテナに $0.08 \text{ mol m}^{-3} \text{ KCl} + 0.38 \text{ mol m}^{-3} \text{ NaCl}$ を含む培養液を入れ、コシヒカリ、IR64 と CSSLs 4 系統の種子を 10 粒播いた。1 度の試験で 2 つのコンテナを用いた(2 反復)。播種後 10 日目に 1 個体ずつ収穫し、地上部はナトリウム含有率の分析に、根は DNA 抽出に用いた。異なるコンテナで栽培した個体の数値をコシヒカリと IR64 の値で標準化した。

コシヒカリとカサラスの交配に由来する BILs を用いた QTL 解析

QTL 解析には Qgene software (Nelson 1997) を用いた。Log likelihood (LOD) スコアを指標とし、区間マッピング法により解析した。並べ替え検定 (1000 permutations) に基づいて LOD スコア 2.9 ($P < 0.05$) を QTL の閾値とした。

コシヒカリと IR64 に由来する CSSLs の後代個体のジェノタイピング

根を 1.5 mL 容チューブの中で潰し、cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 緩衝液で DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型とし、各 DNA マーカーの領域を増幅させるプライマーで polymerase chain reaction (PCR) を行った。PCR には Blend Taq

(TOYOBO)を用いた。PCR 増幅産物をアクリルアミドゲルで電気泳動し、バンドサイズの違いで遺伝子型を判別した。DNA マーカーは SSR マーカー (McCouch *et al.* 2002) と 1700-1900 (F-CCTTCCTAGGGCTAGGGGTC, R-TGGACCTAGATAGGCCACAAA) を用いた。

【結果】

コシヒカリとカサラスの交配に由来する BILs を用いた地上部のナトリウム蓄積に影響する QTL の解析

161 個の DNA マーカーを用いて地上部カリウム含有率または地上部ナトリウム含有率に影響する QTL の解析を行った(図 2 - 1; 表 2 - 1)。コシヒカリ型で地上部カリウム含有率、地上部ナトリウム含有率を増加させる QTL がそれぞれ 3 番染色体 (LOD スコア 4.0)、6 番染色体 (LOD スコア 17.1) で検出された(図 2 - 1; 表 2 - 1)。またカサラス型で地上部ナトリウム含有率を増加させる QTL が 3 番染色体 (LOD スコア 3.0) で検出された(図 2 - 1)。解析集団の地上部ナトリウム含有率の分散に対する C721 と R1167 の寄与率はそれぞれ 8%、74%だった(表 2 - 1)。

コシヒカリとカサラスに由来する CSSLs を用いたナトリウム吸収促進に寄与する遺伝子の座乗領域の検討

コシヒカリ、カサラスと CSSLs 39 系統の地上部ナトリウム含有率を図 2 - 2 に示した。ほとんどの系統は遺伝的背景であるコシヒカリと同等の地上部ナトリウム含有率を示した(図 2 - 2 a)。しかし矢印で示した 2 系統 215 と 218 は遺伝子供与親であるカサラスと同程度の低い地上部ナトリウム含有率を示した(図 2 - 2 a)。系統 215 から 218 は 6 番染色体にカサラス型の置換領域を有しており、系統 215 と 218 のみに共通した置換領域はマーカー R2549 より末端側の領域であった(図 2 - 2 b)。

コシヒカリと IR64 に由来する CSSLs を用いたナトリウム吸収を促進する遺伝子のファインマッピング

コシヒカリと IR64 の交配に由来する系統 2031-15 と、その自殖系統 74 系統のうち 8 系統の遺伝子型及び後代個体の地上部ナトリウム含有量を図 2 - 3 に示した。系統

2031-15(図 2 - 3 a)の後代では、コシヒカリ型の個体が IR64 型の個体と比べて有意に高い地上部ナトリウム含有量を示した(図 2 - 3 b)。系統 2031-15-123-3-32(123-3-32)、2031-15-35-9-368(35-9-368)、2031-15-123-3-63(123-3-63)、2031-15-123-3-22(123-3-22)、2031-15-35-9-135(35-9-135)、2031-15-87-81-2(87-81-2)、2031-15-123-3-56(123-3-56)、2031-15-35-9-374(35-9-374)は系統 2031-15 を自殖して作成した CSSLs である(図 2 - 3 a)。系統 123-3-32、35-9-368、123-3-63 の後代では、すべての個体の地上部ナトリウム含有量が遺伝的背景である IR64 よりも高かった(図 2 - 3 b)。系統 123-3-22、35-9-135、87-81-2 の後代では、コシヒカリ型の個体が IR64 型の個体と比べて有意に高い地上部ナトリウム含有量を示した(図 2 - 3 b)。系統 123-3-56、35-9-374 の後代では、すべての個体の地上部ナトリウム含有量が IR64 と同程度に低かった(図 2 - 3 b)。

【考察】

ナトリウム吸収を促進する QTL 遺伝子

コシヒカリとカサラスの交配に由来する BILs を用いた QTL 解析から、地上部ナトリウム蓄積に関わる主働 QTL が 6 番染色体末端に座乗していた(図 2 - 1; 表 2 - 1)。同様にコシヒカリを遺伝的背景とする CSSLs を用いた検討では、6 番染色体末端がカサラス型に置換した系統がカサラスと同程度の低い地上部ナトリウム含有率を示した(図 2 - 2 a)。これらの結果は、6 番染色体末端に座乗する QTL 遺伝子がコシヒカリとカサラスの地上部ナトリウム含有率の差に大きく影響することを示している。またコシヒカリと IR64 の交配に由来する CSSLs を用いた検討では、6 番染色体末端のマーカー RM20657 と 1700-1900 の間がコシヒカリ型の個体は、IR64 型の個体と比べて地上部ナトリウム含有量が高かった(図 2 - 3 b)。この RM20657 と 1700-1900 の間の領域は、コシヒカリとカサラスの地上部ナトリウム含有率の差をもたらす QTL 遺伝子の座乗領域と一致した(図 2 - 1; 図 2 - 2 a)。これらの結果から、マーカー RM20657 と 1700-1900 の間の約 150 kbp の領域にナトリウム吸収を促進する原因遺伝子が座乗することが示された。

またコシヒカリとカサラスの BILs を用いた QTL 解析では、寄与率は小さいながらもカサラス型で地上部ナトリウム含有率を増加させる QTL が 3 番染色体に検出され、この QTL はコシヒカリ型で地上部カリウム含有率を増加させる QTL と重なっていた(図 2 -

1)。3 番染色体のカサラス型 QTL は地上部のカリウム蓄積量を減少させ、結果として地上部ナトリウム含有率を増加させたのかもしれない。

複数の遺伝子の地上部ナトリウム蓄積への寄与

コシヒカリと IR64 の CSSL 系統 123-3-32、35-9-368、123-3-63 の後代個体、及び系統 2031-15、123-3-22、35-9-22、87-81-2 のコシヒカリ型後代個体は、遺伝子供与親であるコシヒカリと比べて地上部ナトリウム含有量が低かった(図 2 - 3 b)。この結果は、マーカー RM20657 と 1700-1900 の間に座乗する遺伝子とは異なる遺伝子もまた、地上部ナトリウム蓄積に影響することを示唆している。IR64 を遺伝的背景とする系統ではコシヒカリ型遺伝子座による地上部ナトリウム含有量の増加が部分的であったが(図 2 - 3 b)、一方でコシヒカリを遺伝的背景とする系統ではカサラス型遺伝子座により地上部ナトリウム含有率がカサラスと同程度にまで減少した(図 2 - 2 a)。この結果から、イネがナトリウムを地上部に蓄積する機構は複数の段階に分かれており、各段階を律速する遺伝子が存在すると考えた。例えば 6 番染色体末端の原因遺伝子が根でのナトリウムの取り込みを促進し、根から地上部へのナトリウムの移行には他の遺伝子が影響するのかもしれない。そこで第 3, 4 章では 6 番染色体末端の原因遺伝子の同定を試み、その機能について考察を行った。

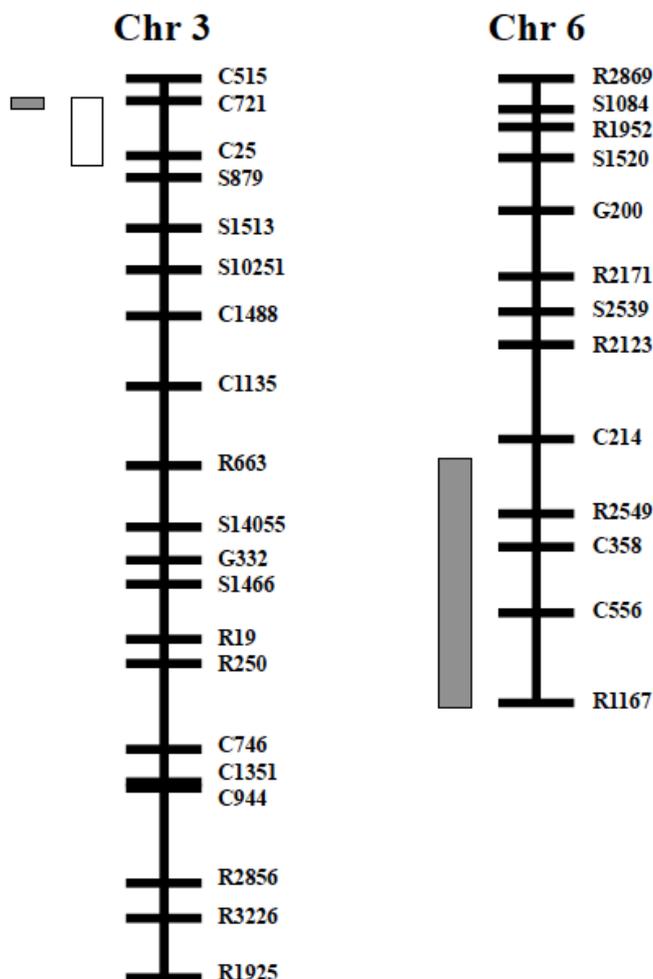


図 2 - 2 コシヒカリとカサラスの交配に由来する CSSLs の地上部ナトリウム含有率 (a)と遺伝子型(b)

コシヒカリ、カサラスと CSSLs を $0.38 \text{ mol m}^{-3} \text{ KCl} + 0.38 \text{ mol m}^{-3} \text{ NaCl}$ を含む培養液で播種後 10 日間栽培した。地上部ナトリウム含有率はコシヒカリの値を 100%とした時の相対値で示した(a)。CSSLs の遺伝子型は RGRC (RGRC 2003b)より取得した(b)。遺伝子型の表は行が染色体上の位置を、列が系統を示す(b)。

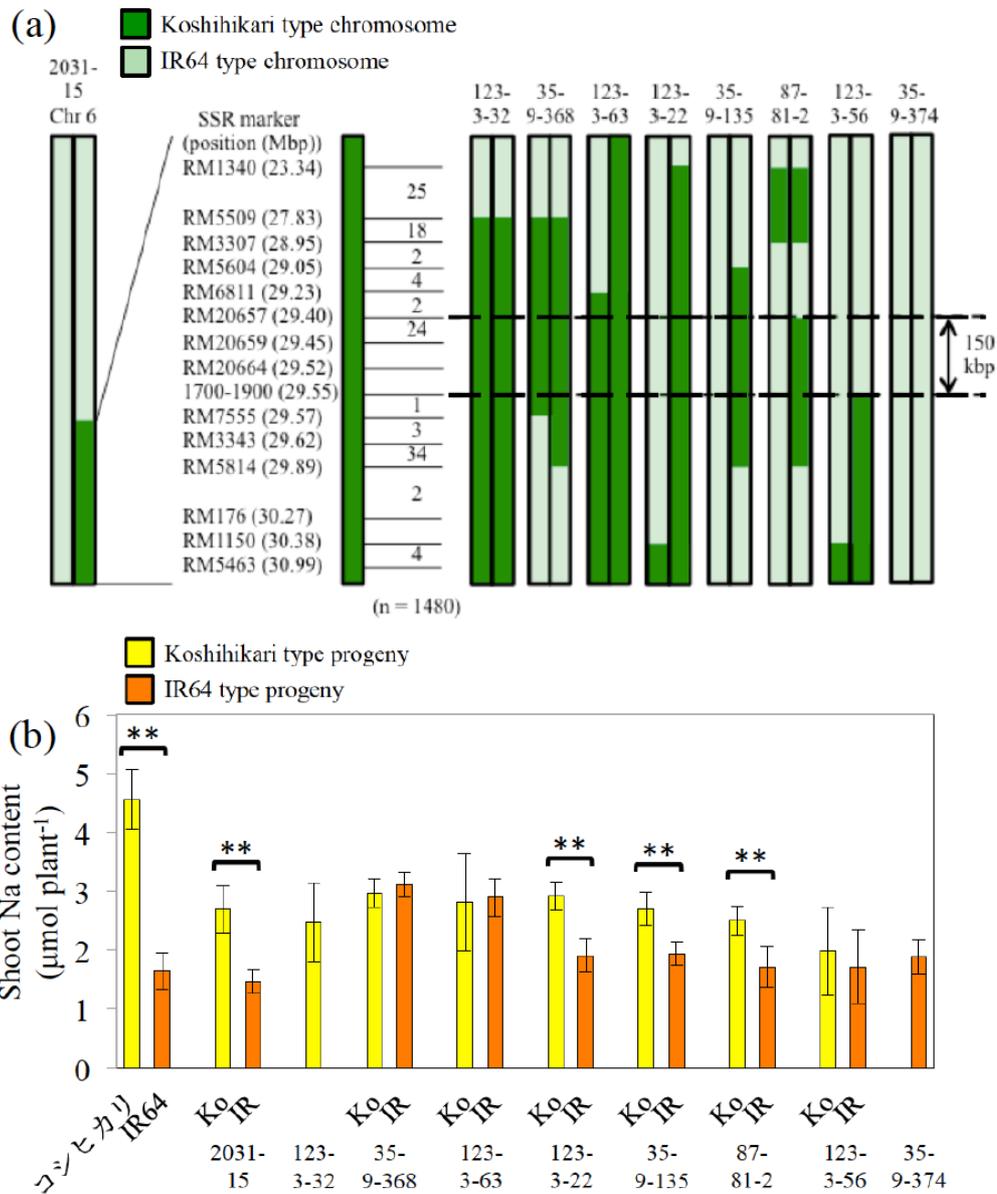


図 2 - 3 コシヒカリと IR64 の交配に由来する CSSLs の遺伝子型(a)と後代個体の地上部ナトリウム含有量(b)

コシヒカリ、IR64 と CSSLs を $0.08 \text{ mol m}^{-3} \text{ KCl} + 0.38 \text{ mol m}^{-3} \text{ NaCl}$ を含む培養液で播種後 10 日間栽培した。各値は平均値 \pm SD で示した。各値の反復数を以下に示す: コシヒカリ (n = 20), IR64 (n = 19), 2031-15 (Ko, n = 16; IR, n = 4), 2031-15-123-3-32 (n = 16), 2031-15-35-9-368 (Ko, n = 6; IR, n = 5), 2031-15-123-3-63 (Ko, n = 3; IR, n = 7), 2031-15-123-3-22 (Ko, n = 6; IR, n = 4), 2031-15-35-9-135 (Ko, n = 4; IR, n = 7), 2031-15-87-81-2 (Ko, n = 4; IR, n = 6), 2031-15-123-3-56 (Ko, n = 7; IR, n = 4), 2031-15-35-9-374 (n = 19)。アスタリスクはコシヒカリと IR64、またはコシヒカリ型個体と IR64 型個体の値間での有意差を示す(b)(** P < 0.01, Student's t 検定)。

第3章 ナトリウム吸収促進に寄与する候補遺伝子の発現量解析

第2章の検討から、6番染色体末端のマーカーRM20657と1700-1900の間の約150 kbpの領域にナトリウム吸収を促進する原因遺伝子が座乗することが示された(図2-3)。Rice Annotation Project Database (RAP-DB; Rice Annotation Project 2008)で候補領域に座乗する遺伝子を検索したところ、21個の遺伝子が予測されていた(図3-1)。これら21個の遺伝子にはカチオン輸送体遺伝子として知られる *OsHKT2;1* (High-affinity K⁺ Transport; Garciadeblás *et al.* 2003; Horie *et al.* 2001) と *OsHKT2;4* (Horie *et al.* 2011 a; Lan *et al.* 2010; Sassi *et al.* 2012) が含まれていた。特に *OsHKT2;1* は低カリウム条件でのナトリウム吸収に関わることが報告されており (Horie *et al.* 2007)、コシヒカリでナトリウム吸収を促進する原因遺伝子の有力な候補と考えた。

イネのナトリウム吸収が低カリウム条件に誘導されることから、ナトリウム吸収を促進する遺伝子はカリウム不足に応答して発現レベルが変化すると推定した。そこで本章では候補領域に座乗する21個の遺伝子の発現レベルをカリウム施用区または無施用区で栽培したイネ幼苗で解析した。その結果、ナトリウム吸収促進遺伝子の有力候補である *OsHKT2;1* の発現レベルはコシヒカリとIR64の両品種でカリウム無施用区において増加し、コシヒカリでその発現レベルが高かった。そこで *OsHKT2;1* 発現レベルをコシヒカリ型の候補領域を持つ CSSL やナトリウム吸収能力の異なる複数の品種で解析した。

【植物材料】

- ・温帯ジャポニカ品種: コシヒカリ、ササニシキ
- ・インディカ品種: IR64、カサラス
- ・コシヒカリとIR64の交配に由来するCSSL: 系統2031-15-87-71

この系統はIR64を遺伝的背景とし、6番染色体末端のマーカーRM20657とRM5814の間がコシヒカリ型に固定されていた。

- ・熱帯ジャポニカ品種: 日本在来イネコアコレクション (JRC; Ebana *et al.* 2008) のイネ品種である日の出 (JRC 3)、山田化 (JRC 5)、オッカモドシ (JRC 8)、嘉平 (JRC 11)、おいらん (JRC 12)、目黒糯 (JRC 14)、世界イネコアコレクション (WRC; Kojima *et al.* 2005) の品種である Khau Tan Chiem (WRC 52)

JRC 及び WRC のイネ種子は NIAS より分譲を受けた。

【方法】

イネ種子の催芽処理、栽培に用いた培養液の組成、収穫した植物体の乾燥、ナトリウム含有率の分析については第1章に記した。栽培は第1章の 1 L 容プラスチックコンテナを用いた試験と同様に人工気象機内で行った。

候補領域に座乗する遺伝子の発現量解析

候補領域の 21 遺伝子の発現レベルをコシヒカリと IR64 で解析した。2 つの 2 L 容プラスチックコンテナに 0.75 mol m^{-3} KCl を含む培養液を入れ、コシヒカリと IR64 の種子をそれぞれ 48 粒播いた。播種後 7 日目に各品種 24 個体(3 フロート)を 0.75 mol m^{-3} KCl を施用した培養液または施用しなかった培養液に移植した。どちらの処理区にも 0.38 mol m^{-3} NaCl を添加した。移植後 4 日目に各品種 8 個体ずつ収穫し、地上部と根に分けて RNA 抽出に用いた。

また *OsHKT2;1* の発現レベルをコシヒカリ、IR64 及び系統 2031-15-87-71 で解析した。1 L 容プラスチックコンテナに 0.38 mM KCl + 0.38 mM NaCl を含む培養液を入れ、それぞれの種子を 10 粒播いた。播種後 7 日目で収穫し、各品種・系統を 3 群に分け、根を切り取って RNA 抽出に用いた。

根における *OsHKT2;1* 発現レベルとナトリウム吸収量の関係の検討

2 品種の温帯ジャポニカ品種、7 品種の熱帯ジャポニカ品種、2 品種のインディカ品種を試験に用いた。1 L 容プラスチックコンテナに 0.38 mol m^{-3} KCl + 0.38 mol m^{-3} NaCl を含む培養液を入れ、コシヒカリと他 5 品種の種子をそれぞれ 10 粒種いた。異なるコンテナで栽培した個体の数値をコシヒカリの値で標準化した。ナトリウム吸収量を検討する試験では播種後 10 日目で植物体を収穫し、各品種 3 群に分け、地上部と根を分析に用いた。根における *OsHKT2;1* 発現レベルを解析する試験では播種後 7 日目で植物体を収穫し、各品種 3 群に分け、根を RNA 抽出に用いた。

遺伝子発現量解析

地上部または根を乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で磨碎し、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) で RNA を抽出した。RNA 溶液中に含まれる DNA を Recombinant DNase I(タ

カラバイオ)で分解した。溶液中の RNA 濃度を分光機 (Bio Spec-mini, 島津製作所, 京都)で測定した。RNA 2 μ g から ReverTra Ace[®] (東洋紡)とオリゴ(dT)₂₀ プライマーを用いて一本鎖 cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型とし、THUNDERBIRD[™] SYBR[®] qPCR Mix(東洋紡)を用いて thermal cycler dice real-time system(タカラバイオ)で定量リアルタイム PCR を行った。*Ubiquitin* と *Actin1* の発現レベルを内部標準とした。解析に用いたプライマーを表 3 - 1 に示した。

【結果】

候補領域に座乗する遺伝子の発現量解析

候補領域に座乗する 21 遺伝子の発現レベルを図 3 - 2 に示した。コシヒカリでは、地上部の Os06g0699850 発現レベルがカリウム施用区 (K applied) と比べてカリウム無施用区 (K not applied) で有意に増加し、地上部と根の Os06g0701700 発現レベルがカリウム無施用区で有意に増加した (図 3 - 2 a)。一方で Os06g0699600, Os06g0700100, Os06g0700500, Os06g0700700 の根における発現レベルはカリウム無施用区で有意に減少した (図 3 - 2 a)。IR64 では、根の Os06g0700601、地上部の Os06g0701100 の発現レベルがカリウム無施用区で有意に増加し、Os06g0701700 発現レベルは地上部と根のどちらにおいてもカリウム無施用区で有意に増加した (図 3 - 2 b)。Os06g0701700 の発現レベルは地上部と比べて根で高く、コシヒカリと IR64 の両品種でカリウム無施用区において有意に増加した (図 3 - 2 a, b)。また *OsHKT2;1* 発現レベルは IR64 と比べてコシヒカリで高かった (図 3 - 2 a, b)。一方で *OsHKT2;1* の推定アミノ酸配列にはコシヒカリと IR64 の間で違いがなかった (data not shown)。

候補領域がコシヒカリ型に固定された CSSL の *OsHKT2;1* 発現レベルの解析

コシヒカリ、IR64 と候補領域がコシヒカリ型に固定された系統 2031-15-87-71 (87-71) の根における *OsHKT2;1* 発現レベルを図 3 - 3 に示した。コシヒカリの *OsHKT2;1* 発現レベルは IR64 のそれと比べて約 5 倍高かった (図 3 - 3)。また 87-71 の *OsHKT2;1* 発現レベルはコシヒカリの発現レベルと比べて低い値を示したものの、IR64 の発現レベルよりも約 2 倍高い値を示した (図 3 - 3)。

根における *OsHKT2;1* 発現レベルとナトリウム吸収量の関係の検討

温帯ジャポニカ品種、熱帯ジャポニカ品種、インディカ品種を含む 11 品種の根における *OsHKT2;1* 発現レベルと植物体あたりのナトリウム含有量の関係を図 3 - 4 に示した。ピアソンの相関係数は 0.697 であり、根の *OsHKT2;1* 発現レベルとナトリウム吸収量の間には有意な正の相関($P < 0.05$)があることが示された(図 3 - 4)。コシヒカリ、ササニシキ、目黒糯は根の *OsHKT2;1* 発現レベルと植物体あたりのナトリウム含有量がともに高く、一方で日の出、山田化、オッカモドシ、嘉平、おいらん、IR64、カサラスは *OsHKT2;1* 発現レベルとナトリウム吸収量が低かった(図 3 - 4)。しかし Khau Tan Chiem は、根における *OsHKT2;1* 発現レベルが IR64 と同程度の低い値を示すものの、植物体あたりのナトリウム含有量は高かった(図 3 - 4)。

【考察】

候補領域に座乗する遺伝子の機能とカリウム欠除処理に対する発現応答

コシヒカリと IR64 は両品種とも低カリウム条件でナトリウム吸収量が増加することから(第 1 章図 2 b)、ナトリウム吸収を促進する遺伝子はコシヒカリと IR64 のどちらにおいてもカリウム不足で発現誘導されると推定した。候補領域に座乗する遺伝子のうち、Os06g0699600, Os06g0699850, Os06g0700100, Os06g0700500, Os06g0700601, Os06g0700700, Os06g0701100, Os06g0701700 の発現レベルがカリウム施用区に対してカリウム無施用区で有意に変化し、コシヒカリと IR64 のどちらにおいても発現レベルが変化したのは Os06g0701700 のみであった(図 3 - 2)。本実験の発現量解析の結果は、Os06g0701700 がコシヒカリと IR64 の両品種においてカリウム不足時に機能することを示唆している。

コシヒカリは IR64 と比べてナトリウム吸収量が有意に高かったが、カリウム吸収量は同程度であった(図 1 - 2 b; 図 1 - 3 b)。この結果から、根の発達や蒸散速度など養分吸収全般に影響する遺伝子ではなく、ナトリウム輸送特異的に機能する遺伝子がコシヒカリと IR64 のナトリウム吸収量の差をもたらすと考えた。候補領域に座乗する遺伝子のうち Os06g0699600 は核局在ドメインを含む CCT (CONSTANS, CONSTANC-LIKE and TOC1) domain containing protein (Strayer *et al.* 2000)、Os06g0700100 はスプライシング、修飾、翻訳といった転写後のプロセスに関わるとされる PPR (pentatricopeptide

repeat) domain containing protein (Delannoy *et al.* 2007)をコードすることが予測されている。これらの遺伝子はナトリウム吸収に関わる遺伝子の発現制御に関わるかもしれないが、それらに関する知見はこれまで報告されていない。またゴルジ体や細胞膜局在型グリコシルトランスフェラーゼの Protein of unknown function (DUF) 266 ドメイン (Hansen *et al.* 2012)を持つタンパクをコードする Os06g0700500、真核生物において mRNA のキャップ構造と相互作用し、翻訳開始に関わる Eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) (Kato *et al.* 2001)をコードする Os06g0701100、亜鉛輸送体タンパク OsHMA2 (Yamaji *et al.* 2013)をコードする Os06g0700700 はナトリウム吸収に直接影響を与えないと推定した。また Os06g0699850, Os06g0700601 の機能は不明であった (RAP-DB; Rice Annotation Project 2008)。したがって、本研究では以上の遺伝子をナトリウム吸収促進遺伝子の候補から除外した。

候補領域にはナトリウム吸収に影響すると推定されるカチオン輸送体遺伝子 *OsHKT2;4*(Os06g0701600)と *OsHKT2;1*(Os06g0701700)が含まれていた(図 3 - 1)。Horie ら(2011 a)と Lan ら(2010)は *OsHKT2;4* がカルシウムやマグネシウムなど幅広いカチオン透過性を示すものの、カリウムの輸送活性が最も高いことを報告した。また Sassi ら(2012)は *OsHKT2;4* がカリウム選択的な輸送体タンパクであり、外部カリウム濃度がナトリウム濃度の 100 分の 1 あるいは 1000 分の 1 程度に低い条件に限りてカリウムとナトリウムを共輸送することを報告した。また Shankar ら(2013)が IR64 を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、*OsHKT2;4* 発現レベルはカリウム欠除処理後 5 日で減少した。しかし本実験ではコシヒカリと IR64 の *OsHKT2;4* 発現レベルはカリウム施用区と無施用区で有意差がなかった(図 3 - 2)。これまでの先行研究と本実験の結果から、*OsHKT2;4* は低カリウム条件でのナトリウム吸収に影響を及ぼさないと考えた。一方で *OsHKT2;1* はカリウム吸収欠損酵母の生育を相補することが報告されているが (Gollmack *et al.* 2002)、異種発現系を用いた検討からナトリウム選択的な輸送体タンパクであることが明らかとなった (Garcia de blás *et al.* 2003; Horie *et al.* 2001)。また Ma ら(2012)が行ったマイクロアレイ解析では、*OsHKT2;1* はカリウム欠除処理後 6 時間の日本晴の根で 2 倍以上の発現上昇を示した。同様に Horie ら(2001)はノザンブロットニングにより、日本晴の根の *OsHKT2;1* 転写産物が培養液カリウム濃度の低下により増加し、また培養液カリウム濃度またはナトリウム濃度の上昇により減少することを示した。

これらの先行研究と本実験の発現量解析(図 3 - 2)は *OsHKT2;1* が低カリウム条件でのナトリウム吸収促進原因遺伝子であることを支持する。

***OsHKT2;1* 発現レベルとナトリウム吸収能力の関係**

ナトリウム吸収能力の高いコシヒカリと吸収能力の低い IR64 では *OsHKT2;1* の推定アミノ酸配列に違いがなかったが、*OsHKT2;1* 発現レベルはカリウム施用区の地上部を除いて IR64 よりもコシヒカリで高かった(図 3 - 2)。またイネ 11 品種の根における *OsHKT2;1* 発現レベルとナトリウム吸収能力を検討した実験では、*OsHKT2;1* 発現レベルとナトリウム吸収量の間に関連のある正の相関があった(図 3 - 4)。これらの結果から、*OsHKT2;1* の高発現が低カリウム条件でのナトリウム吸収能力を向上させると考えた。*OsHKT2;1* の高発現とカリウム不足時のナトリウム吸収との関係については、第 4 章で検討する。また Oomen ら(2012)は *OsHKT2;1* のナトリウム輸送活性がイネ 49 品種で高度に保存されていることを報告した。この結果からナトリウム吸収能力のイネ品種間における多様性は *OsHKT2;1* タンパクのナトリウム輸送活性の違いではなく、主に *OsHKT2;1* 発現レベルの高低によりもたらされると推定した。

一方で Khau Tan Chiem は高いナトリウム吸収能力を示したものの、根における *OsHKT2;1* 発現レベルが低かった(図 3 - 4)。この結果は第 2 章で考察したように、複数の遺伝子が低カリウム条件でのナトリウム吸収促進に関与することを示唆している。Khau Tan Chiem のナトリウム高吸収機構に関しては、第 6 章で検討する。

***OsHKT2;1* 発現レベルの高低が生じる機構**

候補領域がコシヒカリ型に固定された系統 87-71 は、遺伝的背景である IR64 と比べて高い *OsHKT2;1* 発現レベルを示した(図 3 - 3)。この結果から、コシヒカリと IR64 では *OsHKT2;1* プロモーター活性に品種間差があり、結果として *OsHKT2;1* 発現レベルの高低が生じると考えた。この仮説については第 5 章で検討する。しかしながら系統 87-71 の *OsHKT2;1* 発現レベルはコシヒカリのそれと比べて低かった(図 3 - 3)。このことは *OsHKT2;1* を含む約 150 kbp の候補領域とは異なる領域に、*OsHKT2;1* 発現レベルに影響を与える遺伝子が座乗していることを示唆している。*OsHKT2;1* プロモーター活性に加え、*OsHKT2;1* 発現レベルを制御する他の因子、例えば転写因子タンパクの構造や発現量がコシヒカリにおける *OsHKT2;1* 高発現に寄与していると推定した。

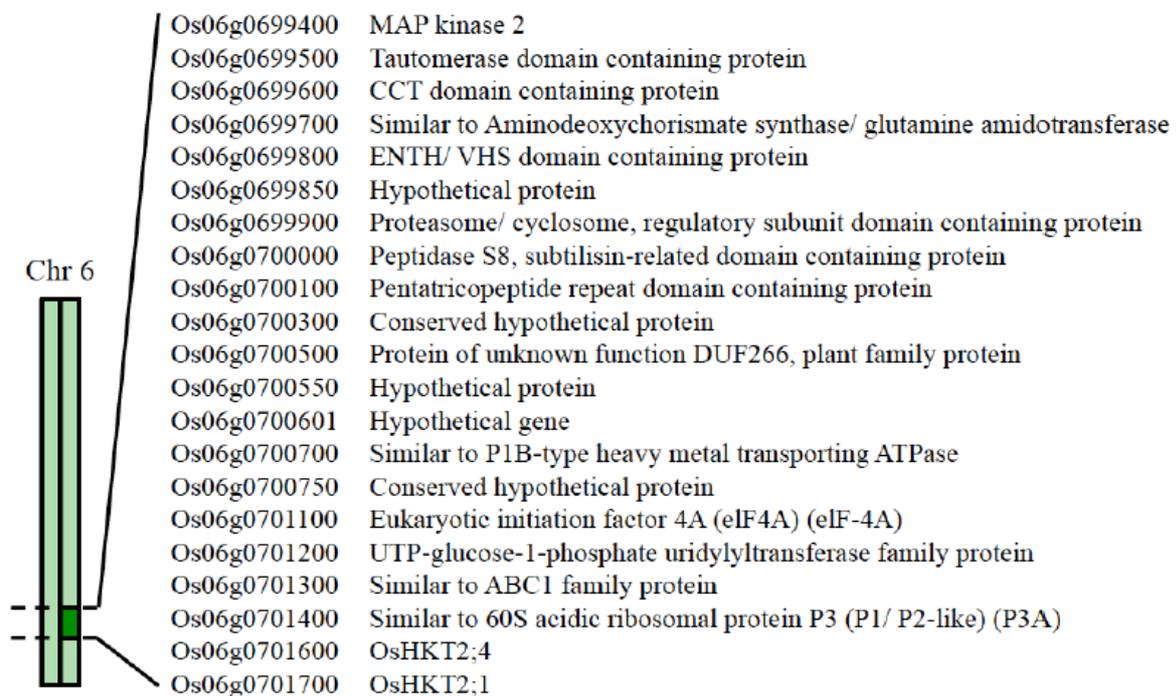


図 3 - 1 6 番染色体末端の候補領域に座乗する遺伝子

遺伝子の ID とアノテーションは Rice Annotation Project Database (RAP-DB; Rice Annotation Project 2008) より取得した。

表 3 - 1 6 番染色体末端の候補領域に座乗する 21 遺伝子の発現量解析に用いたプライマー

Rice Annotation Project Database (RAP-DB; Rice Annotation Project 2008)より遺伝子の配列を取得し、プライマーを設計した。

	Primer sequences	
	forward	reverse
Os06g0699400	TCATCTCAACCTCTTTCTAATGACC	CAGATCGCAGTTTGCATTAACC
Os06g0699500	ACATCATCAAGGACTGCTCCAA	GCCGCCAATGGACATGA
Os06g0699600	GGCTGCGATGCACTTGA	GCTTCCTTCCCGGATAACAC
Os06g0699700	CTGGAAGCAAAGCCAATCAAA	GGAGGTCAACAATCATCAAGTTCTC
Os06g0699800	TCCCAAATCCATGCATAATCAC	CCTTGCTGCCTCCTTGATG
Os06g0699850	GCGACGGCAATCGAGTTA	TTCTCCTCCTTCTTCTCCTCCTC
Os06g0699900	GCAGGTAGACCCAAGACAATCAC	CTTAGGATCACAAAACCCTCAAGAA
Os06g0700000	AGCTACAGAGGTGGAGTTGAAGGA	CCTTCGTAGGTGGAGTGAGTATGAA
Os06g0700100	GAATGGAAAAGCCAGCAGAGG	CACGCTGAGATGACTGCAAGA
Os06g0700300	AGGTACGTGCTGTGCTCGTC	GGACTCGGACTGGAAGATGG
Os06g0700500	CATGTTCTTGACACCCAGTTCATT	CCATTAATATCGGACTAGCGTGAA
Os06g0700550	GCTTCTTGGTGTGTCGTGCAG	GCAAAGAGCCAAGCAACCA
Os06g0700601	CCTTTTGTGGTGCCATGCT	CTGGGTTTCATCGTCTTCTCCTT
Os06g0700700	GTGATCGTTCCCTCCAGGAC	TTCCCATAAGCCCGAACC
Os06g0700750	CTCGAGCGTGAGAGGAGAGATA	CTCCACCTTTTCCGCTCTCT
Os06g0701100	AGTCCCTCCGTCCTGATTACA	GCATTGTAGCAGAGAACACACCA
Os06g0701200	TTGTAGCTGGTGGGCTTGGT	AATTTGCAGCTCGCCTCCT
Os06g0701300	TTAGCAAGGAACCTCCACACAA	CATCTCCGCAAAGGCTGAC
Os06g0701400	AGTCCTCCTTCTCCATGGTCTC	AGCAGCACCTCCACCAATC
Os06g0701600	TCGATCTCCACTGACCCTCTC	GGCAAGCAATCCCATCCT
Os06g0701700	ATGGCAGTGAACGCAAGG	GTGCAAATGTTGTGCGATGGTG
Ubiquitin	AGAAGGAGTCCACCCTCCACC	GCATCCAGCACAGTAAAACACG
Actin 1	ATCCTTGTATGCTAGCGGTCTGA	ATCCAACCGGAGGATAGCATG

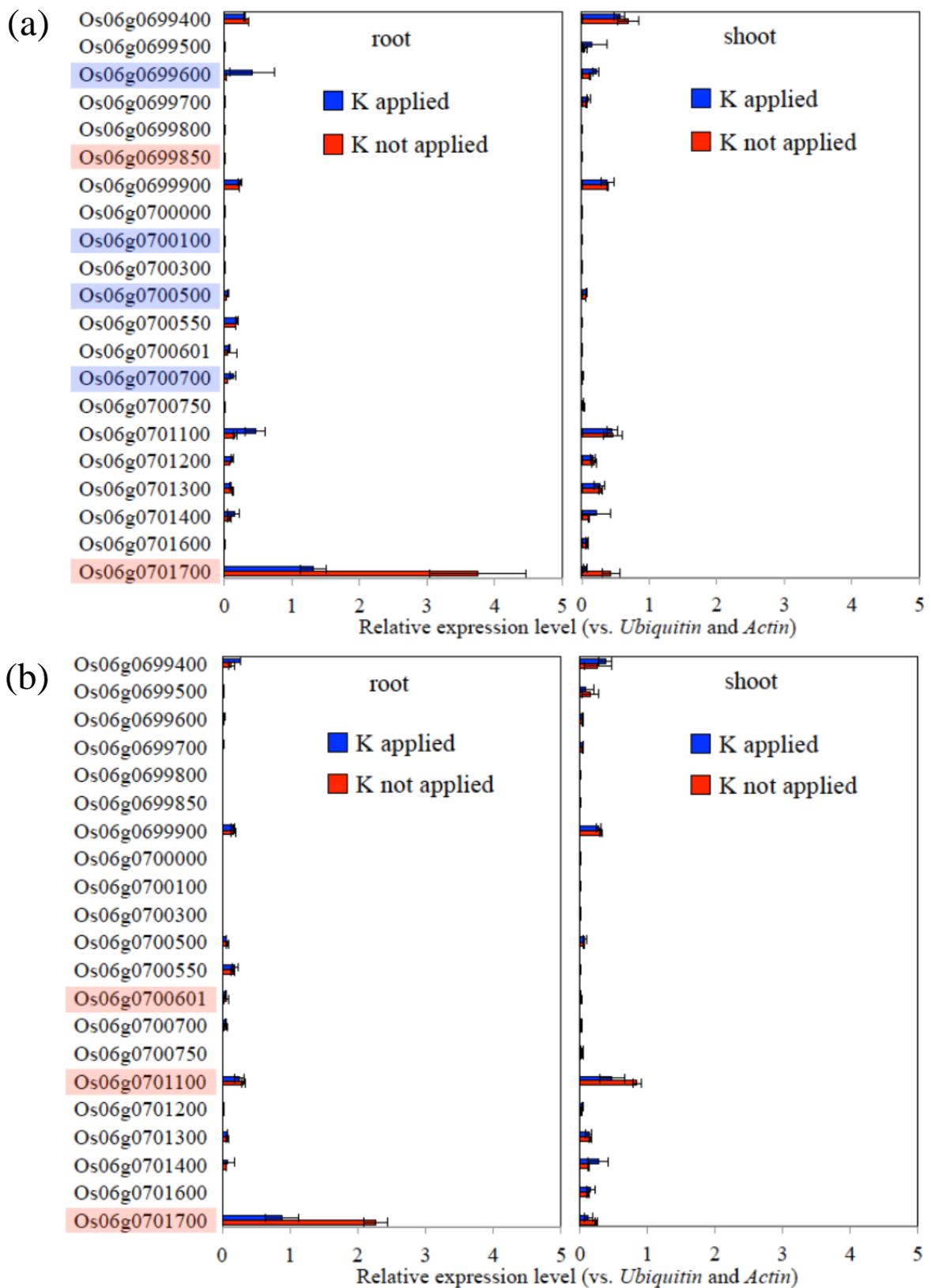


図 3-2 6 番染色体末端の候補領域に座乗する遺伝子の発現レベル

0.75 mol m⁻³ KCl を施用した培養液(K applied)または施用しなかった培養液(K not applied)に移植後 4 日目のコシヒカリと IR64 を解析に用いた。各遺伝子の発現レベルは *Ubiquitin* と *Actin1* の発現レベルに対する相対値で示した。各値は平均値 ± SD (n = 3)で示した。地上部または根における発現レベルがカリウム施用区と比べてカリウム無施用区で有意に増加した遺伝子は赤の背景で、有意に減少した遺伝子は青の背景で示した($P < 0.05$, Tukey 検定)。

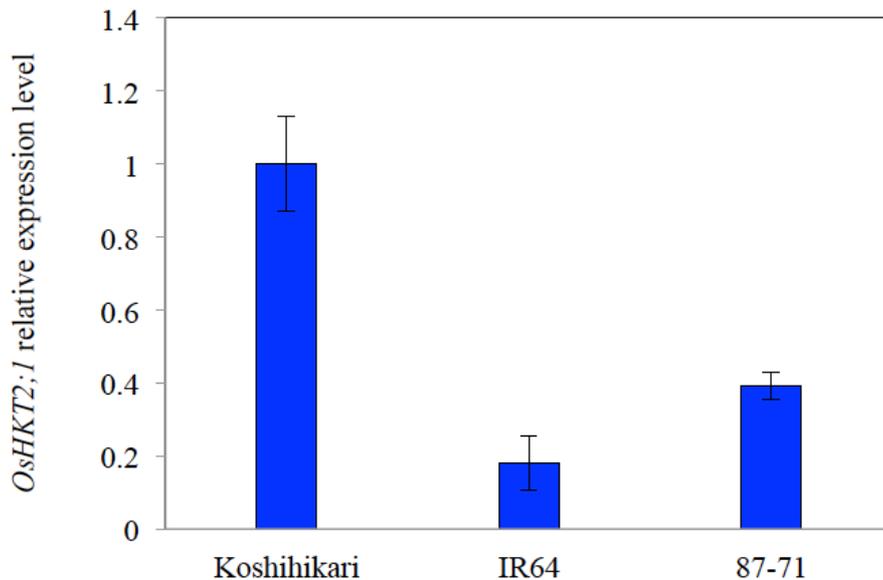


図 3 - 3 コシヒカリ、IR64 と CSSL 2031-15-87-71 の根における *OsHKT2;1* 発現レベル

0.38 mol m⁻³ KCl + 0.38 mol m⁻³ NaCl を含む培養液で播種後 7 日間栽培したコシヒカリ、IR64 と候補領域がコシヒカリ型に固定された CSSL 2031-15-87-71 (87-71) を解析に用いた。系統 87-71 は IR64 を遺伝的背景とし、6 番染色体のマーカー RM20657 と RM5814 の間がコシヒカリ型に固定されている。*Ubiquitin* と *Actin1* の発現レベルを内部標準とし、各値は平均値 ± SD (n = 3) で示した。各品種・系統間で発現レベルは有意に変動した ($P < 0.01$, ANOVA)。

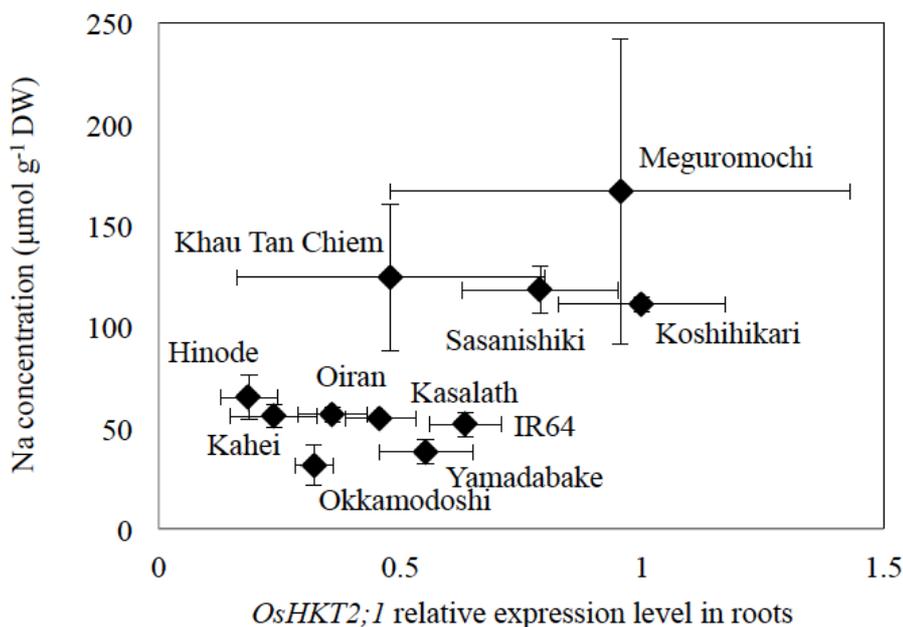


図 3 - 4 根における *OsHKT2;1* 発現レベルとナトリウム吸収量の相関

0.38 mol m⁻³ KCl + 0.38 mol m⁻³ NaCl を含む培養液で栽培したコシヒカリ、ササニシキ、日の出、山田化、オッカモドシ、嘉平、おいらん、目黒糯、Khau Tan Chiem、IR64、カサラスを供試した。播種後 7 日間栽培した植物体の根を *OsHKT2;1* 発現量解析に、播種後 10 日間栽培した植物体をナトリウム含有率の分析に用いた。発現量解析では *Ubiquitin* と *Actin1* の発現レベルを内部標準とした。各値は平均値 ± SD (n = 3) で示した。ピアソンの相関係数(0.697)は *OsHKT2;1* 発現レベルとナトリウム含有率に有意な相関があることを示した ($P < 0.05$)。

第4章 *OsHKT2;1* 高発現による地上部ナトリウム蓄積促進の検討

第3章の検討から、*OsHKT2;1* 発現レベルとナトリウム吸収量には正の相関があることが示された(図3-2; 図3-4)。この結果から *OsHKT2;1* の高発現がカリウム不足時に地上部のナトリウム蓄積を促進すると考えた。本章では *OsHKT2;1* 欠損変異株及び *OsHKT2;1* 過剰発現株を用いて、*OsHKT2;1* が低カリウム条件での根におけるナトリウムの取り込み、または地上部へのナトリウムの蓄積に及ぼす影響を検討した。

【植物材料】

・ *OsHKT2;1* 欠損変異株 (*Tos17* 挿入変異株): NC3381, ND7477

種子は RGRC より分譲を受けた。

・ *OsHKT2;1* 過剰発現株: 2-9, 4-2

両系統はアグロバクテリウム法により作成した(Toki *et al.* 2006)。*OsHKT2;1* のオープンリーディングフレーム(ORF)を PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (タカラバイオ)と *OsHKT2;1* ORF プライマー (F-CACCATGACGAGCATTACCATGATT, R-TTACCATAGCCTCCAATATTAC)を用いた PCR で増幅した。増幅産物を a Gateway pENTR/D-TOPO クローニングベクター (Invitrogen) にクローニングした。得られたプラスミドは LR クロナーゼ (Invitrogen) を用いて pGWB502Ω (Nakagawa *et al.* 2007 a) にサブクローニングした。完成したプラスミドベクターを *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株 (Hood *et al.* 1993) に導入し、イネ (品種: 日本晴) 種子を形質転換した。

【方法】

イネ種子の催芽処理、栽培に用いた培養液の組成、収穫した植物体の乾燥、ナトリウム含有率の分析については第1章に記した。栽培は第1章の 1 L 容プラスチックコンテナを用いた試験と同様に人工気象機内で行った。

OsHKT2;1 欠損変異株のカリウム吸収とナトリウム吸収に関する検討

1 L 容プラスチックコンテナに 0.04 mol m^{-3} KCl + 0.38 mol m^{-3} NaCl を含む培養液を入れ、日本晴野生株、*Tos17* 挿入変異株 NC3381, ND7477 の種子をそれぞれ 10 粒播い

た。播種後 10 日目ですべての植物体を収穫し、各株 3 群に分けた。地上部と根を分け、カリウム含有率とナトリウム含有率の分析に用いた。

OsHKT2;1 過剰発現株のカリウム吸収とナトリウム吸収に関する検討

1 L 容プラスチックコンテナに 0.75 または 0.08 mol m⁻³ KCl を含む培養液を入れ、日本晴野生株、*OsHKT2;1* 過剰発現株 2-9, 4-2 の種子をそれぞれ 10 粒播いた。どちらの処理区にも 0.38 mol m⁻³ NaCl を添加した。カリウム吸収量とナトリウム吸収量を検討する試験では、播種後 10 日目で植物体を収穫し、各品種 3 群に分け、地上部と根を分析に用いた。*OsHKT2;1* 発現レベルを解析する試験では、播種後 7 日目で植物体を収穫し、各品種 3 群に分け、植物体全体(種子を除く)を RNA 抽出に用いた。

半定量 PCR による *OsHKT2;1* 転写産物量の検討

OsHKT2;1 ORF プライマーを用いて *OsHKT2;1* の転写産物量を検討した。*Actin1* の転写産物量を内部標準とした。PCR 反応は以下の条件で行った: 95 °C で 3 分間鋳型 DNA を変性、その後 95 °C 30 秒、55 °C 30 秒、72 °C 1 分 30 秒を 30 サイクル。

【結果】

OsHKT2;1 欠損変異株のカリウム吸収とナトリウム吸収に関する検討

NC3381, ND7477 における *Tos17* 挿入部位、日本晴野生株(wild type)と NC3381, ND7477 の *OsHKT2;1* 転写産物、低カリウム条件での乾物重量、カリウム含有量及びナトリウム含有量を図 4 - 1 に示した。NC3381, ND7477 とともに *OsHKT2;1* の第 1 エキソンに *Tos17* が挿入されていた(図 4 - 1 a)。NC3381 では野生型 *OsHKT2;1* 転写産物全長よりも約 500 bp 長い異常な転写産物が検出され、ND7477 では *OsHKT2;1* 転写産物が検出されなかった(図 4 - 1 b)。半定量 PCR に供試した野生株, NC3381, ND7477 の鋳型 cDNA 中の *Actin1* 転写産物量に大きな違いはなかった(図 4 - 1 b)。地上部の乾物重量は、野生株と比べて NC3381, ND7477 で有意に低い値を示し、また根の乾物重量も野生株と比べて NC3381 で有意に低くなった(図 4 - 1 c)。地上部と根のカリウム含有量は、野生株と比べて NC3381 で有意に低くなったが、ND7477 と野生株の間で有意差はなかった(図 4 - 1 d)。野生株, NC3381, ND7477 の間で地上部及び根のカリウム含有率に有意差はなかった(data not shown)。それに対し、地上部と根のナトリウム

含有量は NC3381 と ND7477 において顕著に低い値を示し、これら 2 系統の植物体あたりのナトリウム含有量はそれぞれ野生株の 4.0%, 6.7%であった(図 4 - 1 d)。

***OsHKT2;1* 過剰発現株のカリウム吸収とナトリウム吸収に関する検討**

日本晴野生株(wild type)、*OsHKT2;1* 過剰発現株 2-9, 4-2 の *OsHKT2;1* 発現レベルを図 4 - 2 に、地上部と根の乾物重量、カリウム含有率、ナトリウム含有率を図 4 - 3 に示した。対照区と低カリウム処理区のどちらにおいても、系統 2-9, 4-2 では野生株と比べて *OsHKT2;1* 発現レベルがそれぞれ約 200 倍、18 倍に上昇していた(図 4 - 2)。また系統 2-9 の地上部と根の *OsHKT2;1* 発現レベルを解析したところ、どちらにおいても野生株と比べて顕著に高い値を示した(data not shown)。野生株、系統 2-9, 4-2 の地上部乾物重は処理区間で有意差がなく、野生株と比べて系統 2-9, 4-2 で低かった(図 4 - 3 a)。対照区の根乾物重量は野生株と比べて系統 2-9, 4-2 で低かった(図 4 - 3 b)。野生株の根乾物重量は対照区と比べて低カリウム処理区で減少したが、系統 2-9, 4-2 の根乾物重量は低カリウム処理区で減少しなかった(図 4 - 3 b)。対照区での地上部カリウム含有率は野生株と比べて系統 2-9, 4-2 で僅かに高く、低カリウム処理区の地上部カリウム含有率は野生株、系統 2-9, 4-2 で同程度であった(図 4 - 3 c)。対照区の根のカリウム含有率は系統 2-9 で低い値を示したが、野生株と系統 4-2 は同程度であった(図 4 - 3 d)。低カリウム処理区の根のカリウム含有率は野生株、系統 2-9, 4-2 で同程度であった(図 4 - 3 d)。対照区の地上部ナトリウム含有率は野生株、系統 2-9, 4-2 で同程度に低い値を示した(図 4 - 3 e)。一方で低カリウム処理区では野生株と系統 2-9, 4-2 の地上部ナトリウム含有率が増加し、野生株と比べて系統 2-9, 4-2 で有意に高かった(図 4 - 3 e)。対照区の根ナトリウム含有率は野生株と比べて系統 2-9, 4-2 で有意に高かった(図 4 - 3 f)。低カリウム処理区の根ナトリウム含有率は系統 2-9 で高い値を示したが、野生株と系統 4-2 は同程度であった(図 4 - 3 f)。

【考察】

***OsHKT2;1* が低カリウム条件でのカリウム及びナトリウム吸収に及ぼす影響**

本実験では *OsHKT2;1* を欠損した *Tos17* 挿入変異株 NC3381, ND7477 のナトリウム吸収量は野生株のそれと比べて著しく減少した(図 4 - 1 e)。この結果は Horie ら(2007)の報告と一致しており、*OsHKT2;1* が低カリウム条件でのナトリウム吸収に関わることが

確認された。また Horie ら(2007)は、*OsHKT2;1* 欠損変異はカリウムと吸収動態が類似するルビジウムの吸収速度には影響しないことを報告している。しかし本実験で *Tos17* 挿入変異株 NC3381 のカリウム吸収量が野生株と比べて減少した(図 4 - 1 d)。また NC3381, ND7477 は野生株と比べて植物体あたりの乾物重量が低く、特に NC3381 は野生株と比べて生育が顕著に減少した(図 1 c)。*Tos17* ミュータントパネルデータベース (National Institute of Agrobiological sciences 2013)によると NC3381 では *OsHKT2;1* の他、Os12g0634900 に *Tos17* が挿入されていた。Os12g0634900 はタンパク結合ドメインを持つ Ankyrin-repeat-containing protein をコードすることが RAP-DB(Rice Annotation Project 2008)で予測されている。このことから NC3381 では Os12g0634900 への *Tos17* 挿入が生育を阻害し、その結果カリウム吸収量が減少したと推定した。先行研究と本実験の結果から、*OsHKT2;1* はカリウム吸収に大きな影響を及ぼさず、主にナトリウムの吸収に関与すると考えた。

***OsHKT2;1* の高発現がナトリウムの根における取り込みと地上部への蓄積に及ぼす影響**

OsHKT2;1 過剰発現株 2-9, 4-2 の対照区での地上部カリウム含有率は野生株のそれと比べて僅かに高かった(図 4 - 3 c)。しかし系統 2-9, 4-2 は野生株と比べて地上部乾物重量が低く(図 4 - 3 a)、地上部カリウム含有量は系統 2-9, 4-2 で低かった(data not shown)。根の乾物重量、カリウム含有率はともに系統 2-9, 4-2 で低かった(図 4 - 3 b, d)。この結果はカリウム吸収が *OsHKT2;1* の高発現により促進されないことを示している。

系統 2-9, 4-2 は対照区と低カリウム処理区のどちらにおいても *OsHKT2;1* 発現レベルが高かったが(図 4 - 2)、対照区の地上部ナトリウム含有率は野生株と同程度の低い値を示した(図 4 - 3 e)。しかし対照区における根のナトリウム含有率は野生株と比べて系統 2-9, 4-2 で高かった(図 4 - 3 f)。この結果は *OsHKT2;1* が主に根でのナトリウムの取り込みを担っており、根から地上部へのナトリウムの移行には他の遺伝子が関与することを示唆している。Jabnourne ら(2009)は RNA *In situ* ハイブリダイゼーションにより、低カリウム条件で栽培した日本晴では根の表皮、外皮、皮層細胞で *OsHKT2;1* が高発現していることを明らかにした。この報告は *OsHKT2;1* が外部環境から根細胞内へのナトリウムの取り込みを担うことを支持する。また Horie ら(2007)は *OsHKT2;1* プロ

モーターと β -グルクロニダーゼ遺伝子(*GUS*)結合コンストラクトを用いたレポーターアッセイにより、カリウム欠除処理した日本晴の根では皮層の他、内皮においても強い*GUS* シグナルが検出されると報告している。*OsHKT2;1* は外部環境からのナトリウムの取り込みに加え、木部へのナトリウムの分配にも関わるかもしれない。

一方で低カリウム処理区では、地上部ナトリウム含有率が野生株と比べて系統 2-9, 4-2 で高かった(図 4 - 3 e)。系統 2-9, 4-2 では低カリウム処理区での地上部乾物重量が野生株のそれと比べて低かったが(図 4 - 3 a)、地上部ナトリウム含有量は系統 2-9, 4-2 で高かった(data not shown)。この結果から、低カリウム条件では根から地上部へのナトリウムの移行が促進されるため、*OsHKT2;1* の高発現により地上部のナトリウム蓄積量が増加すると考えた。また低カリウム処理区において系統 2-9 の根のナトリウム含有率は野生株のそれと比べて高い値を示したが、系統 4-2 は野生株と同程度の値を示した(図 4 - 3 f)。これは根に取り込んだナトリウムが低カリウム条件で地上部へ移行したためであると考えた。

以上の結果から *OsHKT2;1* がナトリウム吸収を促進する原因遺伝子であり、*OsHKT2;1* の高発現によりカリウム不足時の地上部ナトリウム蓄積量が高まると結論した。

***OsHKT2;1* の機能が生育に及ぼす影響**

OsHKT2;1 欠損変異株 NC3381, ND7477 は野生株と比べて乾物重あたりのカリウム含有率が増加したが(data not shown)、乾物重量は減少した(図 4 - 1 c)。この結果は *OsHKT2;1* 機能欠損によりナトリウム吸収量が減少し(図 4 - 1 e)、その結果低カリウム条件での生育が低下したことを示している。

NaCl を添加せずに対照区と低カリウム処理区で日本晴野生株を栽培すると、対照区と比べて低カリウム処理区で地上部乾物重量が 40%以下に減少した(data not shown)。本実験では野生株、系統 2-9, 4-2 の地上部乾物重が処理区間で有意に変わらなかったが(図 3 a)、これは NaCl の添加により低カリウム処理区での生育が改善されたためであると考えた。野生株と *OsHKT2;1* 過剰発現株で低カリウム処理区による地上部の生育低下の程度を比較するためには、より KCl 施用量の少ない条件で栽培試験をする必要があるかもしれない。一方で野生株の根の乾物重量は対照区と比べて低カリウム処理区で減少したが、系統 2-9, 4-2 の根の乾物重量は減少しなかった(図 3 b)。これ

は低カリウム処理区で系統 2-9, 4-2 の生育低下が軽減されたことを反映しているかもしれない。系統 2-9, 4-2 は地上部に多くのナトリウムを蓄積し(図 3 e)、地上部のカリウム不足による様々な代謝反応の低下が軽減され、結果として根の乾物生産が対照区と同程度に維持されたと考えた。

また *OsHKT2;1* 過剰発現株 2-9, 4-2 は野生株と比べて対照区における地上部と根の乾物重量が低かった(図 3 a, b)。しかし系統 2-9, 4-2 の地上部ナトリウム含有率は野生株と同程度に低く(図 3 e)、このことがナトリウムの過剰蓄積によるものではないと考えた。また系統 2-9, 4-2 は野生株と比べて根のナトリウム含有率が高く、それぞれ 279, 115 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW であった(図 3 f)。Wu ら(2009 a)の報告によると 1 mM KCl かつ 25 mM NaCl 処理区で移植後 9 日間栽培した日本晴の根のナトリウム含有率は約 15 mg g^{-1} DW (652 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)であったが、根の新鮮重量は 1 mM KCl かつ NaCl 無添加処理区と比べて減少しなかった。この結果から系統 2-9, 4-2 の地上部及び根の生育低下はナトリウムの蓄積によるものではなく、35S プロモーターコンストラクト挿入による他遺伝子への影響、あるいは *OsHKT2;1* 転写産物の過剰生産による何らかのストレスによると推定した。

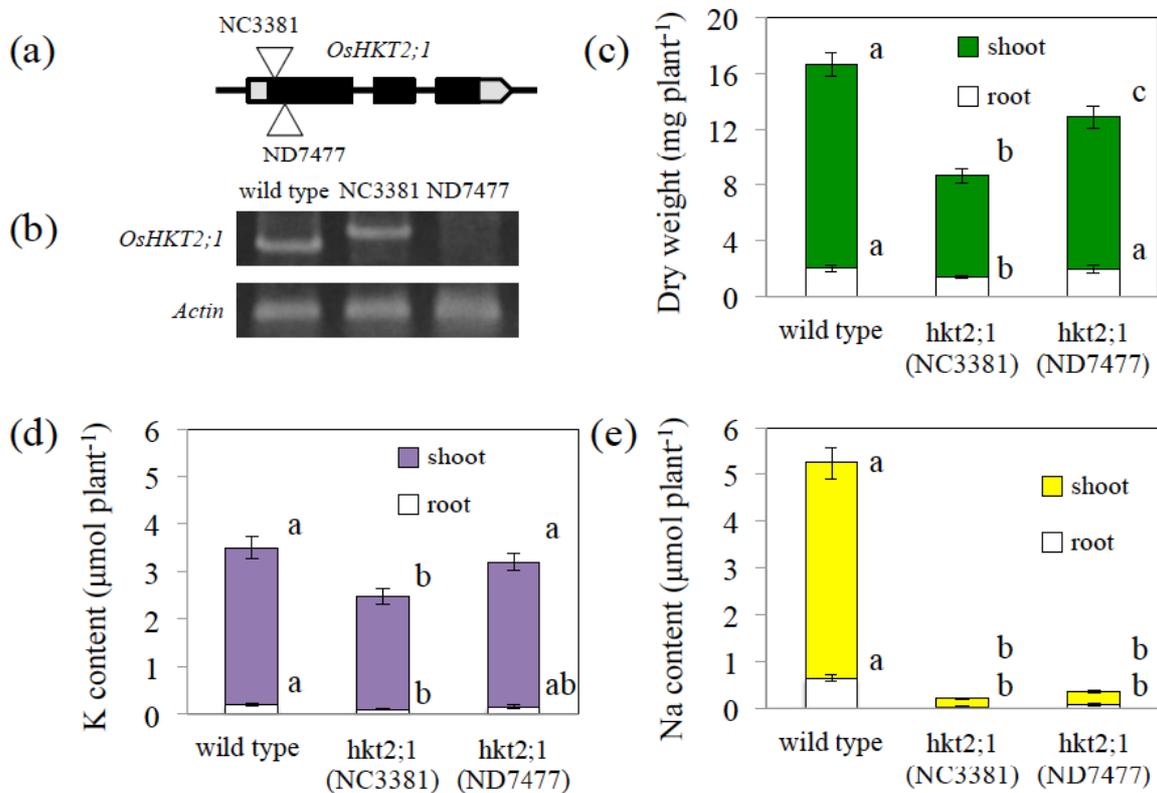


図 4 - 1 *OsHKT2;1* にイネ内在性レトロトランスポゾン *Tos17* が挿入された *OsHKT2;1* 欠損変異株における *Tos17* 挿入位置(a)、*OsHKT2;1* 転写産物(b)、植物体あたりの乾物重量(c)、カリウム含有量(d)とナトリウム含有量(e)

変異株の *Tos17* 挿入位置データは *Tos17* ミュータントパネルデータベース (National Institute of Agrobiological sciences 2013)より取得した(a)。*OsHKT2;1* 転写産物量の解析では *Actin1* 転写産物量を内部標準とした(b)。0.04 mol m⁻³ KCl + 0.38 mol m⁻³ NaCl を含む培養液で野生株 (品種: 日本晴) と *OsHKT2;1* 欠損変異株 NC3381, ND7477 を播種後 10 日間栽培し、解析に用いた。各値は平均値 ± SD (n = 3)で示した (c, d, e)。地上部または根の乾物重量、カリウム含有量、ナトリウム含有量のうち、異なるアルファベットの付いた値同士には有意差があった(c, d, e) (*P* < 0.05, Tukey 検定)。

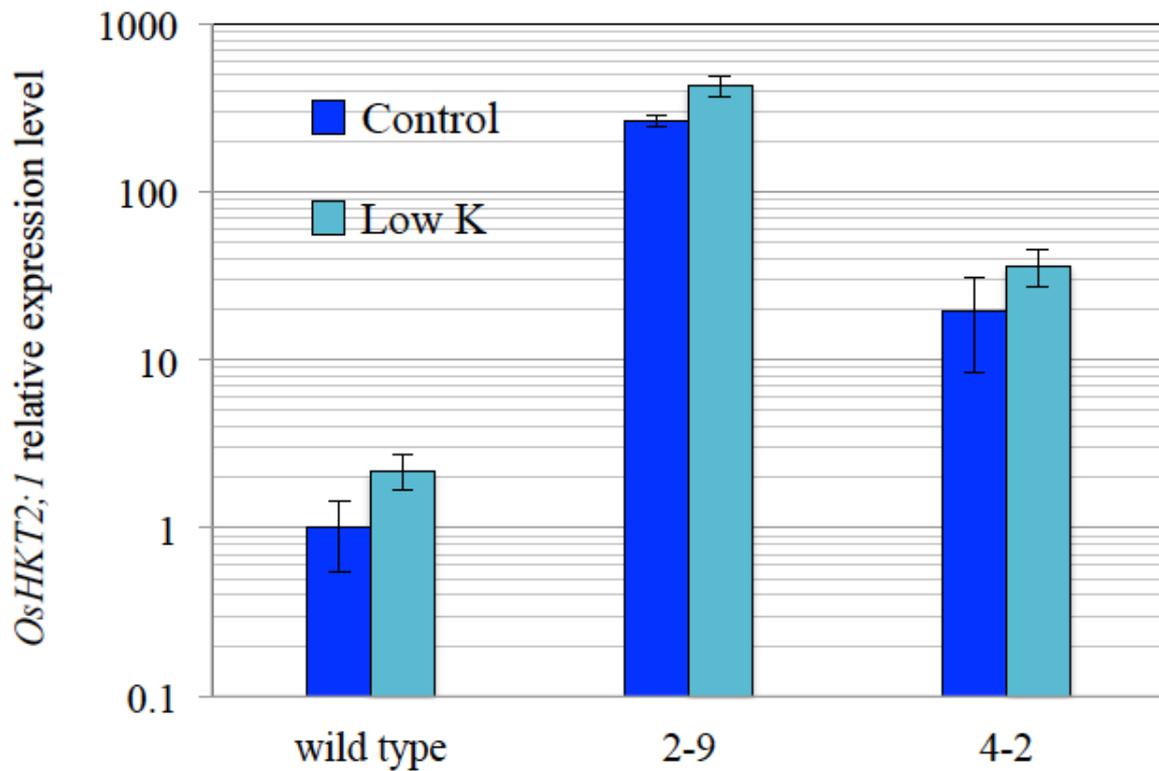


図 4-2 日本晴野生株と *OsHKT2;1* 過剰発現株の植物体あたりの *OsHKT2;1* 発現レベル

0.75 (Control)または 0.08 (Low K) mol m⁻³ KCl を含む培養液で野生株及び各過剰発現株を播種後 7 日間栽培し、解析に用いた。どちらの処理区にも 0.38 mmol L⁻¹ NaCl を添加した。*Ubiquitin* と *Actin1* の発現レベルを内部標準とした。各値は平均値 ± SD (n = 3)で示した。

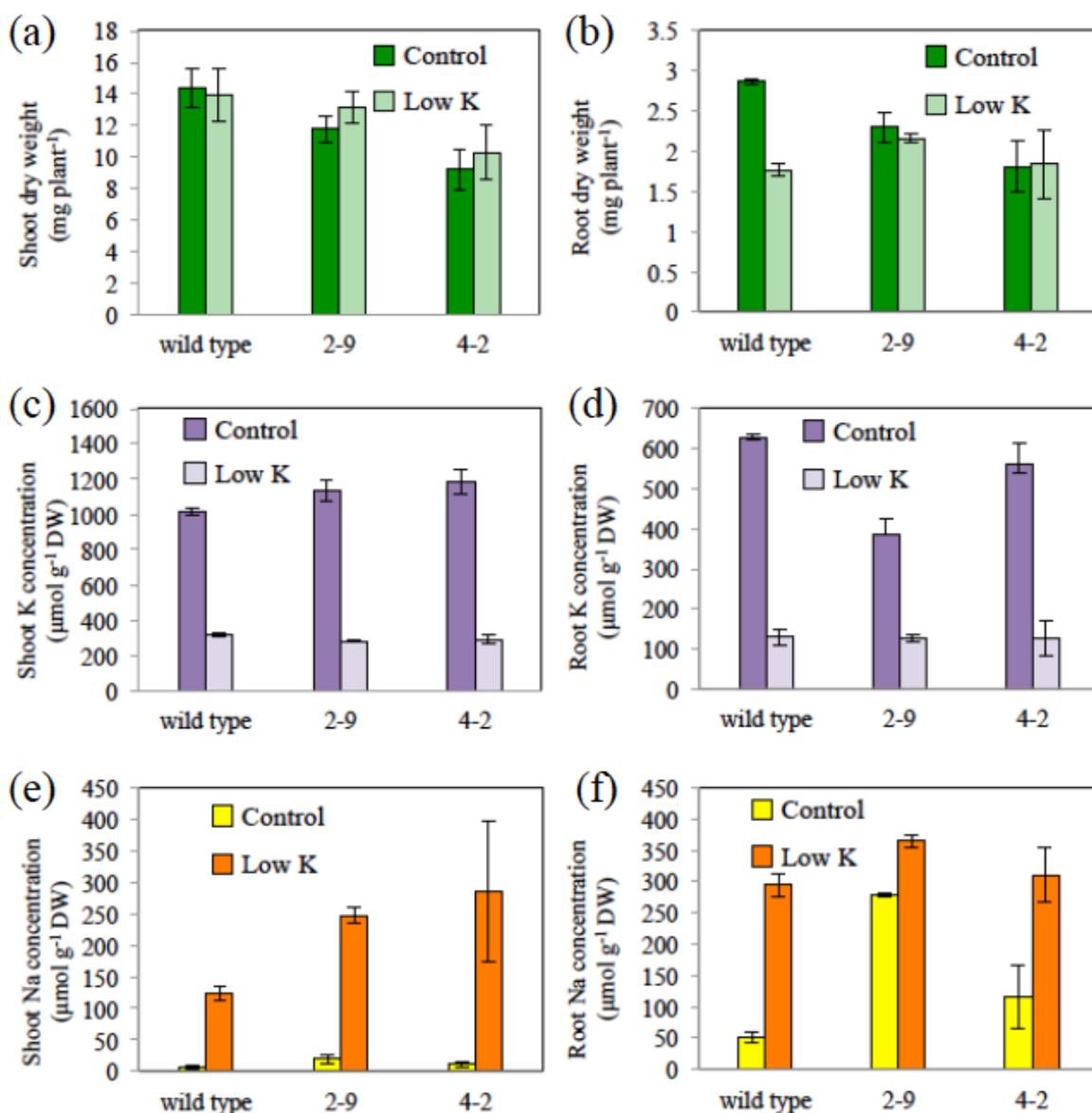


図 4 - 3 日本晴野生株と *OsHKT2;1* 過剰発現株 2-9, 4-2 の地上部と根の乾物重量(a, b)、カリウム含有率(c, d)、ナトリウム含有率(e, f)

0.75 (Control)または 0.08 (Low K) mol m⁻³ KCl を含む培養液で野生株及び各過剰発現株を播種後 10 日間栽培し、分析に用いた。どちらの処理区にも 0.38 mol m⁻³ NaCl を添加した。各値は平均値 ± SD (n = 3)で示した。各要因による変動の有意性を以下に示す：地上部乾物重量：処理区^{ns}，系統**，処理区 × 系統^{ns}；根乾物重量：処理区**，系統**，処理区 × 系統**；地上部カリウム含有率：処理区**，系統*，処理区 × 系統**；根カリウム含有率：処理区**，系統**，処理区 × 系統**；地上部ナトリウム含有率：処理区**，系統*，処理区 × 系統*；根ナトリウム含有率：処理区**，系統**，処理区 × 系統** (ns, not significant; **, P < 0.01; *, P < 0.05, 二元配置分散分析 (ANOVA)).

第 5 章 *OsHKT2;1* 発現を制御するプロモーター領域の同定

第 3 章の検討から、*OsHKT2;1* を含む染色体領域がコシヒカリ型に固定されることで *OsHKT2;1* 発現レベルが向上することが示された(図 3 - 3)。この結果はコシヒカリ型の *OsHKT2;1* プロモーターは IR64 型 *OsHKT2;1* プロモーターと比べて活性が高いことを示唆している。本章では先ず、*OsHKT2;1* 高発現品種コシヒカリ、ササニシキ、目黒糯(図 3 - 4)と *OsHKT2;1* 低発現品種 IR64、カサラス、おいらん、嘉平、オッカモドシ、日の出(図 3 - 4)で *OsHKT2;1* の上流配列を比較した。その結果、高発現品種と低発現品種の間で共通した DNA 多型が見出され、そのうちいくつかの多型は推定シスエレメントの位置に生じていた。これらのうち何れかのシスエレメントが *OsHKT2;1* 発現制御に関わっており、そこに DNA 多型が生じることで発現レベル品種間差がもたらされると推定した。そこで *OsHKT2;1* 上流領域の部分配列(縮退プロモーター)を β -グルクロニダーゼ遺伝子(*GUS*)と結合したコンストラクトを用いて、*OsHKT2;1* 発現制御に関わるシスエレメントの同定を試みた。

【植物材料】

- ・ *OsHKT2;1* 高発現品種: コシヒカリ、ササニシキ、目黒糯
- ・ *OsHKT2;1* 低発現品種: IR64、カサラス、おいらん、嘉平、オッカモドシ、日の出
- ・ *OsHKT2;1* 縮退プロモーター-*GUS* 結合コンストラクト導入カルス

OsHKT2;1 の約 2.1, 1.7, 1.3, 0.6 または 0.5 kbp 上流配列(プロモーター A, B, C, D, E; 表 4 - 1, 図 4 - 2 a)をそれぞれ *GUS* を含む pGWB533 (Nakagawa *et al.* 2007 a)に組み込み、日本晴に導入した。プロモーター A のコンストラクトは、コシヒカリ型(Ko)または IR64 型(IR)を準備した。日本晴の形質転換は第 4 章の方法(Toki *et al.*, 2006)を一部改変した。カルス誘導の期間を 3 日(Toki *et al.* 2006)から 7 日間に変更し、アグロバクテリウムとの共存培養に用いた。また Ozawa (2009)は共存培養時のアグロバクテリウムの増殖を適切に制御することが、その後のカルスの生育を良好にすると報告している。Ozawa (2009)は菌体溶液の濃度を OD600 に調整することと、培地上に 5.5 mL の培養液で湿らせた 3 層のろ紙を敷くことで、共存培養時のアグロバクテリウム増殖を適切に制御できることを示した。しかし本実験において 3 層のろ紙を用いた共存培養を試したところ、薬剤(ハイグロマイシン B)耐性株の頻度は増加しなかった(data not shown)。

表 4 - 1 縮退プロモーターの準備と GUS 発現レベルの解析に用いたプライマー配列

Primer sequences		
	forward	reverse
For HKT2;1 promoter fragments		
Promoter A	CACCAGTCTCGAGAACTCTTATTTA	TTGATGCAAAGGAGCAACGAG
Promoter B	CACCAGGGCCTAAATATTTACT	
Promoter C	CACCCCAAGCTATCCTGGAGTA	
Promoter D	CACCGTACATAAACTTTATTTCTT	
Promoter E	CACCAAACAACAAGAAGCAAGT	
For <i>GUS</i> expression analysis		
GUS qRT	ACAGCCAAAAGCCAGACAGAG	ATGACGACCAAAGCCAGTAAAGTAG

【方法】

OsHKT2;1 上流配列の品種間比較とシスエレメントの推定

OsHKT2;1 高発現品種であるコシヒカリ、ササニシキ、目黒糯、低発現品種である IR64、カサラス、おいらん、嘉平、オッカモドシ、日の出から、第 2 章の方法を用いて DNA を抽出した。各品種のゲノム DNA を鋳型とし、*OsHKT2;1* の約 2 kbp 上流領域を PCR 増幅した。増幅産物の配列を解析し、PLACE (Higo *et al.* 1999) で推定シスエレメントを検索した。

OsHKT2;1 縮退プロモーター—*GUS* 結合コンストラクト導入カルスを用いたプロモーターアッセイ

Toki ら(2006)の方法で選抜したハイグロマイシン B 耐性株を新しい培地に移植し、さらに 1~2 週間培養した。カリウム施用区または無施用区(表 4 - 2)に移植し、12 日間栽培した。カルスの培養は第 1 章で記した人工気象機内で行った。各株すべてのカルスを 3 群に分けて 1.5 mL 容エッペンチューブに収穫し、RNA 抽出に用いた。第 3 章と同様の方法で RNA の抽出と cDNA の作成を行い、*OsHKT2;1* と *GUS* の発現レベルを解析した。解析に用いたプライマーは表 4 - 1 に示した。

表 4 - 2 カリウム施用(N6D + K)または無施用(N6D - K)栽培に用いた培地組成

Composition	N6D + K	N6D - K
Macronutrients	g L ⁻¹	g L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	2.24	2.24
MgSO ₄	0.185	0.185
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.166	0.166
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.970	0.970
KCl	5.26	not applied

微量元素、有機化合物、植物ホルモン、糖の組成は Toki ら(2006)の N6D 培地と同様にした。pH は 0.1 N HCl で 5.8 に調整した。

【結果】

OsHKT2;1 上流配列の品種間比較とシスエレメントの推定

OsHKT2;1 高発現品種群(コシヒカリ、ササニシキ、目黒糯)と低発現品種群(IR64、カサラス、おいらん、嘉平、オッカモドシ、日の出)の *OsHKT2;1* 上流配列における共通した DNA 多型を図 5 - 1 に示した。高発現品種群と低発現品種群の間で共通した 10 個の DNA 多型が見出された(図 5 - 1 a)。次に PLACE (Higo *et al.* 1999)を用いて推定シスエレメントを検索したところ、5 ヶ所の推定シスエレメントが DNA 多型の位置と重なっていた(図 5 - 1 b)。

OsHKT2;1 縮退プロモーター-コンストラクト導入カルスを用いた検討

OsHKT2;1 上流配列のうち発現制御に関わる領域を同定するために、*OsHKT2;1* 縮退プロモーター-*GUS* 結合コンストラクトを用いて、プロモーター活性を比較した(図 5 - 2)。A から E の縮退プロモーターコンストラクト(図 5 - 2 a)をイネカルスに導入し、5.26 g L⁻¹ KCl 施用区(+ K)または無施用区(- K)に移植した(図 5 - 2 b)。移植後 12 日目のカルス(図 5 - 2 c)は KCl 施用区と比べて無施用区で僅かに生育が悪かった。この移植後 12 日目のカルスの内在性 *OsHKT2;1* 及び *GUS* 発現レベルを解析した(図 5 - 2 d, e)。*OsHKT2;1* 発現レベルはほとんどの系統で KCl 施用区と比べて無施用区で高かった(図 5 - 2 d)。しかしコンストラクト C 導入系統のみ処理区間で *OsHKT2;1* 発現レベルの差がなかった(図 5 - 2 d)。*GUS* 発現レベルはほとんど全ての系統において処理区間で差

がなかった(図 5 - 2 e)。コンストラクト A (Ko)導入系統の *GUS* 発現レベルは他の系統のそれと比べて両処理区で高かった(図 5 - 2 e)。

【考察】

DNA 多型がプロモーター活性に及ぼす影響

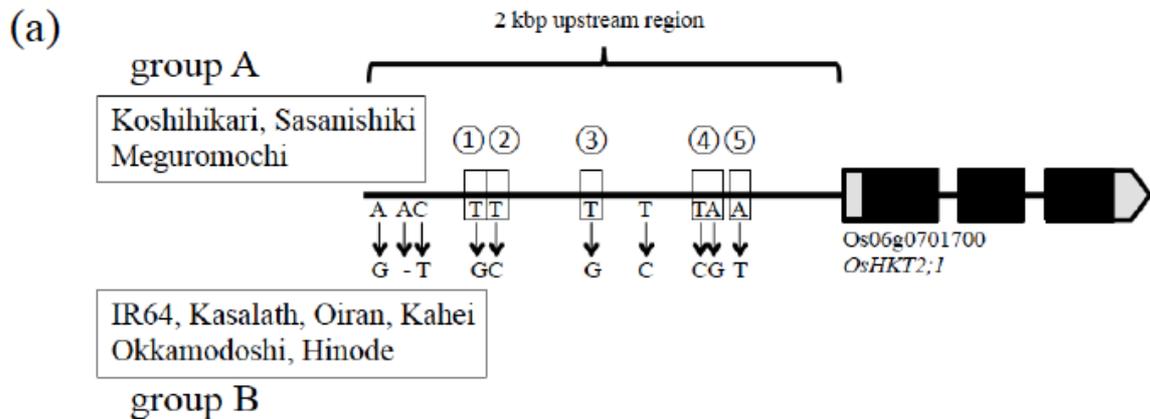
Nakamura ら(2011)はコムギの発芽に関わる遺伝子 *MFT* (Mother of FT and TFL1)のプロモーター領域の bZIP 転写因子結合部位に生じた 1 塩基の多型が発現レベル品種間差をもたらすと報告している。また Jiang ら(2013)はダイズ(*Glycine max* L. Merr.)のフロリゲン(花成ホルモン)遺伝子 *GmFT2a* のプロモーター領域における DNA 多型が花芽形成の日長感受性に影響すると推定した。また Li ら(2011)はイネの細胞周期に関わる遺伝子 *GS5* (Grain Size)の上流配列に生じた DNA 多型が *GS5* 発現レベルに影響し、穀実サイズの品種間差をもたらすことを報告した。これらの先行研究と同様に本実験では *OsHKT2;1* 高発現品種群と低発現品種群の間で共通した 10 個の DNA 多型が見出され(図 5 - 1 a)、高発現品種であるコシヒカリ型 *OsHKT2;1* プロモーター A (Ko)は低発現品種である IR64 型 *OsHKT2;1* プロモーター A (IR)と比べて高い活性を示した(図 5 - 2 e)。これらの結果から *OsHKT2;1* プロモーターに生じた DNA 多型が発現レベルに影響し、ナトリウム吸収能力品種間差がもたらされると考えた。また *OsHKT2;1* 上流領域の DNA 多型は 5 ヶ所の推定シスエレメントの位置と一致したことから(図 5 - 1 b)、これらのうち何れかのシスエレメントが *OsHKT2;1* 発現制御に関わると推定した。

OsHKT2;1 発現制御に関わるプロモーター領域

コンストラクト A (Ko)導入系統の *GUS* 発現レベルは他の系統のそれと比べて両処理区で高かった(図 5 - 2 e)。この結果はコンストラクト A (Ko)に固有の領域(図 5 - 2 a)に下流の遺伝子発現促進を担うモチーフが存在することを示唆している。またコンストラクト A (Ko)導入系統と比べてコンストラクト A (IR)導入系統で *GUS* 発現レベルが低かったことから(図 5 - 2 e)、コンストラクト A に固有の領域に存在し、かつ DNA 多型の位置と一致するシスエレメント CCA1ATLHCB1 または SEF4MOTIFGM7S が *OsHKT2;1* 発現促進を担うと推定した。CCA1ATLHCB1 または SEF4MOTIFGM7S に生じた DNA 多型が CCA1 あるいは SEF4 の結合頻度に影響を与え、結果として *OsHKT2;1* 発現レベル品種間差がもたらされるのかもしれない。

本実験で各縮退プロモーターコンストラクト導入系統の内在性 *OsHKT2;1* 発現レベルは、特に KCl 無施用区において系統間差があった(図 5 - 2 d)。またコンストラクト C 導入系統のみ KCl 施用区においても無施用区と同程度に高い *OsHKT2;1* 発現レベルを示した(図 5 - 2 d)。本実験の手順では、処理区に移植する前にカルスを増殖させる前培養期間が 1~3 週間程度あり、この日数が系統ごとに異なっていた。各系統の増殖の様子に大きな違いはなかったが(data not shown)、この前培養期間の日数の違いが内在性遺伝子の発現レベルに影響したのかもしれない。またイネカルスの *OsHKT2;1* 発現レベルはイネ植物体の地上部や根の約 10 分の 1 から 100 分の 1 程度であり、前培養期間や処理時間の僅かな違いで大きく変動する可能性がある。供試するカルスの培養期間を可能な限り揃え、また処理期間や KCl 施用量を再度検討する必要があると考えた。

Horie ら(2007)は *GFP* (green fluorescence protein)結合コンストラクトを導入した日本晴植物体の根で、*OsHKT2;1* の 1.6 kbp 上流領域が低カリウム条件下で下流遺伝子の発現を促進することを示した。この結果は本実験で用いたプロモーターA(約 2.1 kbp)やプロモーターB(約 1.7 kbp)が KCl 無施用区で *GUS* 発現レベルを促進できることを示唆している。しかし本実験ではほとんどの系統の *GUS* 発現レベルに処理区間で明確な差がなかった(図 5 - 2 e)。これはイネカルスの *OsHKT2;1* 発現レベルがイネ植物体の地上部や根の約 10 分の 1 から 100 分の 1 程度であることと、縮退プロモーター-*GUS* コンストラクトが挿入されたゲノム上の位置により内在性 *OsHKT2;1* よりも発現が制御されにくいためであると推定した。カリウム供給量依存的に *OsHKT2;1* 発現レベルを制御するプロモーター領域を検討するためにはコンストラクト A, B 導入系統の *GUS* 発現レベルがカリウム供給量依存的に変化する実験系を構築しなければならない。先述したように、今後はカルスの前培養期間や処理期間、KCl 施用量を再検討し、*GUS* 発現レベルがカリウム供給量に応じて変化するよう条件を最適化する。また必要であれば再分化個体を供試すること、またはゲノム上の挿入位置の影響を無視できるプロトプラストを用いた一過的発現系を用いる。

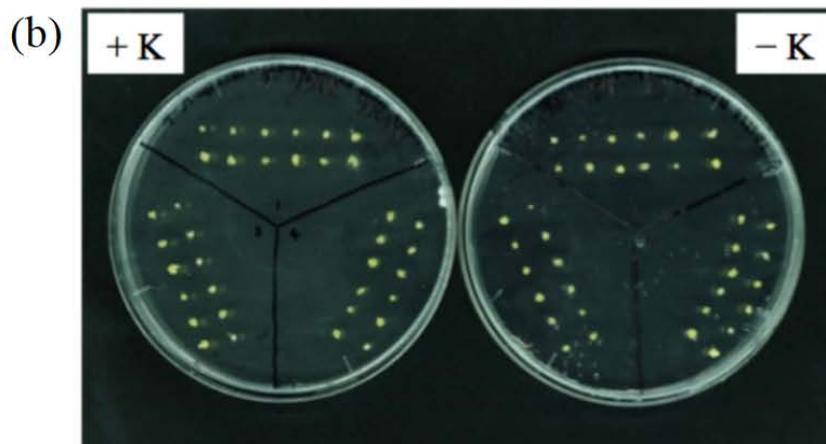
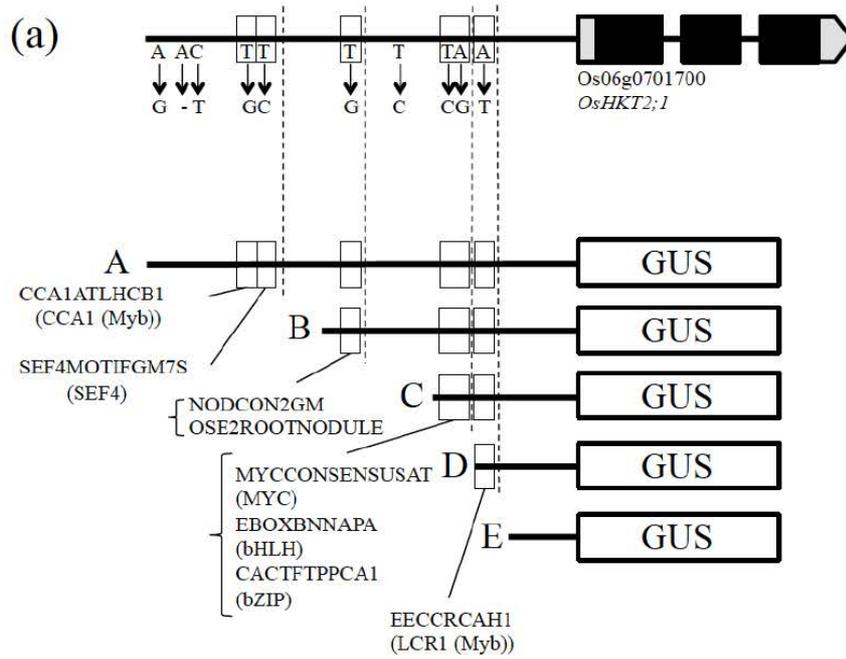


(b)

	Cis-element	Position	Putative binding protein
①	CCA1ATLHCB1	-1793	CCA1
②	SEF4MOTIFGM7S	-1774	SEF4
③	NODCON2GM	-1297	NAT2
	OSE2ROOTNODULE	-1297	OSE
④	CACTFTPPCA1	-563	a basic leucine zipper transcription factor
	EBOXBNNAPA	-563	BHLH, BZIP, R2R3-MYB
	MYCCONSENSUSAT	-563	MYC
⑤	EECCRCAH1	-513	EE1, EE2

図 5-1 *OsHKT2;1* 上流配列の DNA 多型(a)と推定シスエレメント(b)

OsHKT2;1 高発現品種コシヒカリ、ササニシキ、目黒糯 (group A)、*OsHKT2;1* 低発現品種 IR64、カサラス、おいらん、嘉平、オッカモドシ、日の出 (group B) の *OsHKT2;1* の 2 kbp 上流配列を解析し、group A と group B の間で共通した 10 個の DNA 多型を見出した(a)。PLACE (Higa *et al.* 1999)を用いて推定シスエレメントを検索し、DNA 多型の位置と一致したものを示した(b)。



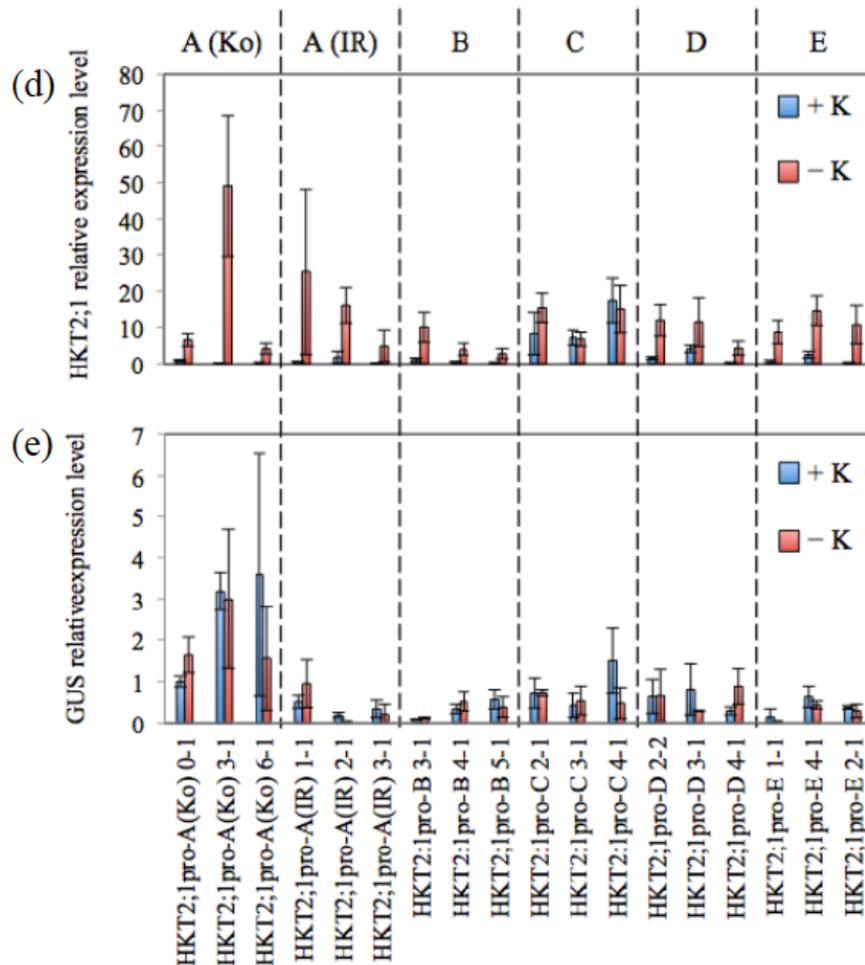


図 5 - 2 *OsHKT2;1* の縮退プロモーター—*GUS* コンストラクト(a)、KCl 施用区または無施用区に移植直後(b)と移植後 12 日目(c)のイネカルス、移植後 12 日目の各縮退プロモーター導入カルスの *OsHKT2;1* 発現レベル(d)と *GUS* 発現レベル(e)

推定シスエレメントの位置に基づいて A から E の縮退プロモーターと *GUS* 結合コンストラクトを設計した(a)。各縮退プロモーター—*GUS* コンストラクト導入イネカルス(品種:日本晴)を KCl 5.26 g L⁻¹を含む培地(+ K)または含まない培地(- K)に移植し、12 日間栽培した(b, c)。写真はプロモーター A (Ko)コンストラクト導入系統の生育を示す(b, c)。各系統の生育に大きな違いはなかった。移植後 12 日目にカルスを収穫し、*OsHKT2;1* と *GUS* の発現レベルを解析した(d, e)。*Ubiquitin* と *Actin1* の発現レベルを内部標準とした。各値は平均値 ± SD (n = 3)で示した。

第 6 章 ナトリウム吸収促進に関わる新たな QTL の探索

武下(2008)や宮本(2009)の検討では、コシヒカリよりも顕著に高いナトリウム吸収能力を示す品種は見出だされなかった。コシヒカリよりもナトリウム吸収能力の優れた新品種を作出するためには、新たな遺伝子源が必要である。本章では世界イネコアコレクション(WRC; Kojima *et al.* 2005)のイネ 28 品種を用いて、ナトリウム高吸収品種のスクリーニングを行った。その結果、ベトナム在来品種 Khau Tan Chiem (KTC)は低カリウム条件でコシヒカリよりも有意に高い地上部ナトリウム含有率を示すことが明らかとなった。そこでコシヒカリと KTC を交配して作成した F₂ 集団を用いて、ナトリウム吸収促進に関わる QTL を解析した。

【植物材料】

- ・温帯ジャポニカ品種:コシヒカリ
- ・熱帯ジャポニカ品種:Ma sho (WRC45, ミャンマー), Khau Nok (WRC46, ラオス), Rexamont (WRC50, アメリカ), Urasan 1 (WRC51, 日本), Khau Tan Chiem (KTC; WRC52, ベトナム)
- ・インディカ品種:Jinguoyin (WRC 11, 中華人民共和国), Asu (WRC 13, ブータン), IR58 (WRC14, フィリピン), Co 13 (WRC15, インド), Keiboba (WRC17, 中華人民共和国), Qingyu (WRC18, 台湾), Tadukan (WRC20, フィリピン), Muha (WRC25, インド), Jhona 2 (WRC26, インド), Jarjan (WRC28, ブータン), Anjana Dhan (WRC30, ネパール), Tupa 121-3 (WRC32, バングラデシュ), ARC7291 (WRC34, インド), Ratul (WRC36, インド), ARC11094 (WRC38, インド), Badari Dhan (WRC39, ネパール), Nepal 555 (WRC40, インド), Local Basmati (WRC42, インド), Bingala (WRC66, ミャンマー), Vandaran (WRC, スリランカ)
- ・ジャポニカ品種/インディカ品種の分類不明:Calotoc (WRC22, フィリピン), Pinulupot 1 (WRC24, フィリピン)
- ・コシヒカリと KTC を交配して作成した F₂ 集団 222 系統

2010 年にコシヒカリと KTC をガラス室で交配し、F₁ 種子を採取した。2011 年に F₁ 世代をガラス室で栽培し、F₂ 種子を採取した。2013 年に兵庫県神崎郡神河町の圃場で F₂ 世代を栽培し、1 株ずつ種子を採取した。各株 1 系統とし、種子を QTL 解析に用いた。

【方法】

イネ種子の催芽処理、栽培に用いた培養液の組成、収穫した植物体の乾燥、ナトリウム含有率の分析については第1章に記した。栽培は第1章の 1 L 容プラスチックコンテナを用いた試験と同様に人工気象機内で行った。

ナトリウム高吸収品種のスクリーニング

2 L 容プラスチックコンテナに $\text{KCl } 0.08 \text{ mol m}^{-3} + \text{NaCl } 0.38 \text{ mol m}^{-3}$ を含む培養液を入れ、コシヒカリと WRC のイネ 7 品種の種子をそれぞれ 10 粒播いた。播種後 10 日目にすべての個体を収穫し、各品種 3 群に分け、ナトリウム含有率の分析に用いた。異なるコンテナで栽培した品種の数値をコシヒカリの値で標準化した。

異なる培養液カリウム濃度で栽培したコシヒカリと KTC のカリウム吸収量及びナトリウム吸収量の検討

1 L 容プラスチックコンテナに入れた培養液にコシヒカリと KTC の種子をそれぞれ 10 粒播いた。 0.04 , 0.15 , 0.23 または 0.38 mol m^{-3} KCl かつ 0.15 mol m^{-3} NaCl 処理区及び、 0.04 mol m^{-3} KCl かつ NaCl 無添加処理区の計 5 処理区を設けた。播種後 10 日目にすべての個体を収穫し、各品種 3 群に分け、カリウム含有率とナトリウム含有率の分析に用いた。

コシヒカリと KTC の F_2 系統のナトリウム吸収能力の検討

10 L 容プラスチックコンテナに 0.08 mol m^{-3} KCl + 0.15 mol m^{-3} NaCl を含む培養液を入れ、コシヒカリ、KTC と F_2 世代 28 系統の種子をそれぞれ 10 粒播いた。播種後 10 日目にすべての個体を収穫し、各品種・系統を 2 群(5 個体ずつ)に分け、地上部をナトリウム含有率の分析に、根を DNA 抽出に用いた。異なるコンテナで栽培した系統の数値をコシヒカリの値で標準化した。

コシヒカリと KTC の F_2 系統を用いた QTL 解析

F_2 系統のジェノタイピングは第 2 章の方法と同様に行った。各マーカー一座の遺伝子型で F_2 系統を 3 群(コシヒカリ型、ヘテロ型、KTC 型)に分けた。各群の形質値について

Tukey 検定を行い、遺伝子型により形質値が有意に変動するマーカー座を QTL とした ($P < 0.05$)。

コシヒカリと KTC のカチオン輸送体遺伝子の解析

1 L 容プラスチックコンテナに 0.75 または 0.04 mol m⁻³ KCl を含む培養液を入れ、コシヒカリと KTC の種子をそれぞれ 10 粒播いた。どちらの培養液にも 0.19 mol m⁻³ NaCl を添加した。播種後 7 日目にすべての個体を収穫し、各品種 3 群に分け、地上部と根を RNA 抽出に用いた。第 2 章と同様の方法で cDNA を作成し、QTL 領域に座乗するカチオン輸送体遺伝子の発現レベルを解析した。発現量解析に用いたプライマーを表 6 - 1 に示した。

またコシヒカリと KTC の各カチオン輸送体タンパクの推定アミノ酸配列を解析した。イネの遺伝子の機能は一般的に日本晴を用いて解析されているため、日本晴のタンパクの推定アミノ酸配列を RAP-DB (Rice Annotation Project 2008) から入手し、日本晴、コシヒカリ、KTC でタンパクの推定アミノ酸配列を比較した。タンパクの膜貫通領域の推定には TMHMM (Krogh *et al.* 2001; Sonnhammer *et al.* 1998.) を利用した。

表 6 - 1 QTL 領域のカチオン輸送体遺伝子発現量解析に用いたプライマー配列

	Primer sequences	
	forward	Reverse
For analysis of cation transporter genes		
OsHAK5	AAACTACAGACAAGATCGGCAATG	GGAAAGAGTGCAATCCACAAAAG
OsHAK6	CCGACAAGTACGAGGGACAG	GTCAGCAGCATCACCCAGA
OsHAK2	TGCCGACCTTGGTCACTTC	CTGTGGGCATGTCAAGGATATTT
OsKCO1	CACGGAAAATGACAAAAGATGGA	ATGGGGAGAGAGTGCCAGAG
OsCNGC7	CTCTACCCTATATTTTGGGGACTCA	GCAATGTGAAGAGCATCAACC
OsHAK10	CATTGGTTTCAGAGACACAAAACAC	AACTATCACCAGGGACATCAGACA
OsHAK13	ATACCTGTCCAAACATAGGGAGGA	TCGCGGGAAACAACCAA
OsNHX5	AAAACCTTGGAGTGCTGCCTTTT	AGTATGGAAACAATTCCTGACAACC
OsTPK1	ACCGTGTCAGAGTTTCTTGCTG	GCCCATCTCCTTGAGCTTGT
OsHAK23	GCTTACATGGGCCAAGCTG	GCAGCAAGTGTAGCAATCACAAA

【結果】

ナトリウム高吸収品種のスクリーニング

低カリウム条件で栽培したコシヒカリと WRC のイネ 28 品種の地上部ナトリウム含有率を図 6 - 1 に示した。ほとんどの品種はコシヒカリと比べて低い地上部ナトリウム含有率を示した(図 6 - 1)。特に ARC7291 と Ma sho の地上部ナトリウム含有率は、炎光分析の検出限界を下回った(図 6 - 1)。一方でベトナム在来品種 Khau Tan Chiem (KTC) はコシヒカリと比べて地上部ナトリウム含有率が顕著に高かった(図 6 - 1)。

異なる培養液カリウム濃度で栽培したコシヒカリと KTC のカリウム吸収量及びナトリウム吸収量の検討

異なる培養液カリウム濃度で栽培したコシヒカリと KTC の植物体あたりの新鮮重量、カリウム含有量、ナトリウム含有量を図 6 - 2 に示した。0.15, 0.23, 0.38 mol m⁻³ KCl 処理区ではコシヒカリと KTC の新鮮重量に有意差がなかった(図 6 - 2 a)。培養液カリウム濃度が最も低い 0.04 mol m⁻³ KCl + 0.15 mol m⁻³ NaCl 処理区ではコシヒカリと比べて KTC で新鮮重量が有意に高かった(図 6 - 2 a)。しかし 0.04 mol m⁻³ KCl かつ NaCl 無添加処理区ではコシヒカリと KTC の新鮮重量に有意差がなかった(図 6 - 2 a)。カリウム吸収量は 0.38 mol m⁻³ KCl + 0.15 mol m⁻³ NaCl 処理区では両品種間で有意差がなく、0.04, 0.15 または 0.23 mol m⁻³ KCl + 0.15 mol m⁻³ NaCl 処理区ではコシヒカリと比べて KTC で有意に高かった(図 6 - 2 b)。しかし 0.04 mol m⁻³ KCl かつ NaCl 無添加処理区ではコシヒカリと KTC のカリウム吸収量に有意差がなかった(図 6 - 2 b)。ナトリウム吸収量は 0.38 mol m⁻³ KCl + 0.15 mol m⁻³ NaCl 処理区では両品種とも同程度の低い値を示し、0.04, 0.15 または 0.23 mol m⁻³ KCl + 0.15 mol m⁻³ NaCl 処理区ではコシヒカリと比べて KTC で有意に高かった(図 6 - 2 c)。

コシヒカリと KTC の F₂ 集団を用いた QTL 解析

コシヒカリと KTC の F₂ 集団における地上部カリウム含有率と地上部ナトリウム含有率の頻度分布を図 6 - 3 に示した。コシヒカリの値を 1 とした時のカリウム相対含有率の分布は 0.85~1.48 であり、解析集団の 91.6%がカリウム相対含有率 0.91~1.30 に分布した(図 6 - 3 a)。一方でナトリウム相対含有率は 0.84~1.90 という広い分布を示した(図 6 - 3 b)。

地上部乾物重量、地上部カリウム含有率、地上部ナトリウム含有率に影響する QTL を図 6 - 4 に示した。1 番染色体のマーカーRM11874, RM8236、3 番染色体のマーカーRM5924、6 番染色体のマーカーRM19894, RM1340, RM20487、9 番染色体のマーカーRM1328 の位置に KTC 型で地上部ナトリウム含有率を有意に増加させる QTL が検出された(図 6 - 4)。形質値分散に対する各マーカー座の遺伝子型の寄与率は約 5~14%と低かった(図 6 - 4)。一方で 10 番染色体のマーカーRM7492, RM4455 の位置にコシヒカリ型で地上部カリウム含有率を有意に増加させる QTL が検出された(図 6 - 4)。またマーカーRM1340, RM7492 の位置に KTC 型で地上部乾物重量を有意に増加させる QTL が検出された(図 6 - 4)。

コシヒカリと KTC のカチオン輸送体遺伝子の解析

地上部ナトリウム含有率に影響する QTL 領域のカチオン輸送体遺伝子を Rice Annotation Project Database (RAP-DB; Rice Annotation Project 2008)で検索した(表 6 - 2)。1 番染色体のマーカーRM8236 付近にはカリウム輸送体遺伝子 *OsHAK5*, *OsHAK6*, *OsHAK2*、3 番染色体のマーカーRM5924 付近にはカリウムチャネル遺伝子 *OsKCO1* と非選択的カチオンチャネル遺伝子 *OsCNGC7*、6 番染色体のマーカーRM20487 には *OsHAK10*, *OsHAK13*、9 番染色体のマーカーRM1328 付近には Na^+/H^+ アンチポーター遺伝子 *OsNHX5*、カリウムチャネル遺伝子 *OsTPK1* と *OsHAK23* が座乗していた(表 6 - 2)。そこでこれらカチオン輸送体遺伝子の発現レベルをコシヒカリと KTC で解析した(図 6 - 5)。*OsHAK5*, *OsCNGC7*, *OsHAK13* の発現レベルは対照区(Control)と比べて低カリウム処理区(Low K)で有意に変化した(図 6 - 5)。*OsHAK5* 発現レベルは両品種の地上部と根において低カリウム処理区で増加し、コシヒカリにおいて高い値を示した(図 6 - 5)。一方で *OsCNGC7* 発現レベルが両品種の地上部と根において低カリウム処理区で減少し、*OsHAK13* 発現レベルがコシヒカリの根において低カリウム処理区で減少した(図 6 - 5)。また地上部と根における *OsHAK6*, *OsHAK10* 発現レベル、根における *OsHAK2*, *OsNHX5* 発現レベルは KTC と比べてコシヒカリで有意に高かった(図 6 - 5)。

日本晴、コシヒカリ、KTC の間の *OsHAK5*, *OsHAK2*, *OsHAK10*, *OsNHX5* 推定アミノ酸配列の違いを図 6 - 6 に示した。コシヒカリと KTC の *OsHAK5* は日本晴のそれと比べて膜貫通領域に 11 アミノ酸の挿入が見出された(図 6 - 6 a)。またコシヒカリと KTC

の OsHAK2, OsNHX5 は日本晴のそれと比べてそれぞれ細胞内領域、細胞外領域に 1 アミノ酸の置換が見出だされた(図 6 - 6 b, d)。しかしそれらのタンパクにコシヒカリと KTC の間で違いはなかった(図 6 - 6 a, b, d)。一方で KTC の OsHAK10 はコシヒカリや日本晴のそれと比べて細胞外領域に 4 アミノ酸の欠失が見出だされた(図 6 - 6 c)。また OsKCO1 の推定アミノ酸配列は日本晴、コシヒカリ、KTC で違いがなかった(data not shown)。

【考察】

KTC の優れたカリウム吸収能力とナトリウム吸収能力

KTC はコシヒカリと比べて植物体あたりのカリウム吸収量及びナトリウム吸収量が有意に高かった(図 6 - 1; 図 6 - 2)。第 3 章の検討では KTC の植物体あたりのナトリウム含有量がコシヒカリと同程度であったが(図 3 - 4)、このときの培養液カリウム濃度は 0.38 mol m^{-3} であり、植物体あたりのナトリウム含有率は $150 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ DW}$ 以下だった(図 3 - 4)。またこのとき KTC はコシヒカリと比べて低い *OsHKT2;1* 発現レベルを示した(図 3 - 4)。したがって第 3 章の実験条件では KTC はあまりカリウム不足を感じておらず、ナトリウム吸収が促進されなかったと考えた。

コシヒカリと KTC の F₂ 集団を用いて地上部カリウム含有率及び地上部ナトリウム含有率に影響する QTL の解析を行ったところ、KTC 型で地上部ナトリウム含有率を有意に増加させる QTL は地上部カリウム含有率に影響を与えなかった(図 6 - 4)。また F₂ 集団の地上部カリウム含有率と地上部ナトリウム含有率には相関がなかった($R^2 = 0.01$, data not shown)。これらの結果から、KTC のナトリウム高吸収能力はカリウム高吸収能力とは独立したナトリウム選択的な輸送機構によるものであると考えた。

KTC はコシヒカリと比べて地上部ナトリウム含有量が高かったが、根のナトリウム含有量は両品種間で同程度であった(図 6 - 2 c)。この結果は、KTC がナトリウムの根における取り込みに加え、根から地上部への輸送に関しても優れていることを示している。カリウム含有量も同様に、地上部においては KTC で高く、根においては両品種間で同程度であった(図 6 - 2 b)。根から地上部への栄養元素全般の輸送能力が KTC で優れている、または根から地上部への優れたカリウム輸送機構とナトリウム輸送機構がそれぞれ KTC に存在するのかもしれない。

低カリウム条件での KTC の生育

0.04 mol m⁻³ KCl + 0.15 mol m⁻³ NaCl 処理区で播種後 10 日間栽培した KTC はコシヒカリと比べて有意に高い新鮮重量を示したが、0.04 mol m⁻³ KCl かつ NaCl 無添加処理区ではコシヒカリと KTC の新鮮重量に有意差がなかった(図 6 - 2 a)。この結果は、KTC はコシヒカリと比べてナトリウムを多く吸収することで、カリウム不足による生育低下が軽減されることを示している。またカリウム吸収量も同様に、0.04 mol m⁻³ KCl + 0.15 mol m⁻³ NaCl 処理区では KTC で有意に高かったが、0.04 mol m⁻³ KCl かつ NaCl 無添加処理区ではコシヒカリと KTC で有意差がなかった(図 6 - 2 b)。KTC は 0.04 mol m⁻³ KCl + 0.15 mol m⁻³ NaCl 処理区でナトリウムを多く吸収することで生育低下が軽減され、その結果カリウム吸収量が増加したと考えた。

KTC のナトリウム吸収促進に寄与する QTL

本実験から地上部ナトリウム蓄積に影響する新規の QTL が 1, 3, 6, 9 番染色体に見出だされた(図 6 - 4)。第 3 章の検討で KTC は比較的高いナトリウム吸収量を示したが、コシヒカリと比べて *OsHKT2;1* 発現レベルが低く(図 3 - 4)、また *OsHKT2;1* の推定アミノ酸配列はコシヒカリと KTC で違いがなかった(data not shown)。これらの結果は *OsHKT2;1* とは異なる遺伝子が KTC の地上部ナトリウム蓄積促進に寄与することを示唆しており、本実験で新しく見出だされた QTL はイネのナトリウム吸収促進に関する新たな知見となると考えた。

6 番染色体のマーカーRM1340 の位置に検出された QTL は KTC 型で地上部ナトリウム含有率と地上部乾物重量を増加させた(図 6 - 4)。この結果からマーカーRM1340 の KTC 型 QTL は地上部のナトリウム蓄積促進を介して生育を改善したと考えた。また 10 番染色体のマーカーRM7492 の QTL は KTC 型で地上部乾物重量を増加させ、コシヒカリ型で地上部カリウム含有率を増加させた(図 6 - 4)。この結果からマーカーRM7492 の KTC 型 QTL はカリウムやナトリウムの吸収とは無関係に地上部乾物重量増加に寄与し、結果として地上部カリウム含有率を減少させたと考えた。

地上部ナトリウム蓄積に影響する各 QTL の寄与率は 5~14%と低かった(図 6 - 4)。この結果については次のような 2 つの仮説を立てた。1 つは染色体上の未解析の領域に地上部ナトリウム蓄積に影響する主働 QTL、もしくは寄与率の低い複数の QTL が座乗するという仮説である。本実験では 233 個の SSR プライマーを供試し、PCR 産物のバ

ンドサイズで遺伝子型を判別できる 61 個のマーカーを採用した。本実験のようなジャポニカ品種同士の交配系統を用いて QTL 解析を行った先行研究では、全 12 染色体を網羅する 120 以上のマーカーが使用されている(Mori *et al.* 2011; Sharma *et al.* 2009; Suh *et al.* 2010; Yamaguchi *et al.* 2004)。このことから本実験においてもコシヒカリと KTC の DNA 多型を検出できるより多くのマーカーを準備することが必要だと考えた。2 つ目は本実験で見出された個々の QTL の寄与率は低い、それらが協調的に機能することで地上部のナトリウム蓄積促進に寄与するという仮説である。複数の輸送体遺伝子が協調的に機能することで栄養元素獲得に寄与することがこれまでに報告されている。例えばシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* L.)のホウ酸輸送体 AtNIP5:1 と AtBOR1 (Takano *et al.* 2008)、イネのホウ酸輸送体 OsNIP3;1 と OsBOR1 (Hanaoka *et al.* 2014; Nakagawa *et al.* 2007 b)、またはイネのケイ酸輸送体 Lsi1 と Lsi2 (Ma *et al.* 2006; Ma *et al.* 2007)は協調的に機能することでそれぞれホウ酸やケイ酸の獲得に寄与する。このように複数のナトリウム輸送体遺伝子の協調的機能によって地上部ナトリウム蓄積が促進されるのかもしれない。

QTL 領域に座乗するカチオン輸送体遺伝子

各 QTL 領域にはカリウム輸送体またはナトリウム輸送体をコードすると推定される遺伝子が複数座乗していた(表 6 - 2)。これらのカリウム輸送体遺伝子がコードするタンパクの多くはそのカチオン選択性が検討されておらず、またタンパクの構造がコシヒカリと KTC で異なれば KTC でナトリウム輸送活性を示すかもしれない。実際に、カリウム輸送体遺伝子として知られる *HAK* の *physcomitrella patens* ホモログである *PpHAK13* がナトリウム輸送活性を持つことが報告されている(Benito *et al.* 2012)。したがって各 QTL 領域に座乗する *HAKs* はナトリウム吸収促進に関わる可能性があると考えた。1 番染色体の QTL 領域に座乗する *OsHAK5* は両品種の地上部と根で低カリウム処理により有意な発現増加を示し、KTC と比べてコシヒカリで発現レベルが高かった(図 6 - 5)。*OsHAK5* はカリウム選択性の高い輸送体タンパクをコードすることが報告されている(Horie *et al.* 2011 b)。*OsHAK5* はカリウムの根における取り込みと根から地上への輸送を促進するとされており、*OsHAK5* 過剰発現株では地上部カリウム含有率が増加する(Yang *et al.* 2014)。しかし、本実験からコシヒカリと KTC の *OsHAK5* 推定アミノ酸配列は Horie ら(2011 b)や Yang ら(2014)が解析した日本晴の *OsHAK5* と異なることが明らか

かとなった(図 6 - 6 a)。この結果からコシヒカリや KTC の *OsHAK5* は日本晴の *OsHAK5* とカチオン選択性が異なるかもしれないと考えた。また *OsHAK5* 欠損変異株は高い地上部ナトリウム含有率を示すことが報告されている(Yang *et al.* 2014)。この結果は、*OsHAK5* 発現レベルが低いことで KTC の地上部ナトリウム蓄積が促進されることを示唆している。

6 番染色体の QTL 領域に座乗する *OsHAK10* は液胞膜局在型の輸送体タンパクであり(Bañuelos *et al.* 2002)、塩ストレス条件で成熟葉において発現レベルが増加することが報告されている(Wang *et al.* 2012 a; Wang *et al.* 2012 b)。*OsHAK10* のカチオン選択性は不明であるが、先の報告は *OsHAK10* が成熟葉の液胞にナトリウムを隔離し、若い組織へのナトリウム移行抑制に機能することを示唆している。また 9 番染色体の QTL 領域に座乗する *OsNHX5* は、液胞膜局在型の Na^+/H^+ アンチポーターをコードする遺伝子 *OsNHX1* (Fukuda *et al.* 2004) のホモログである。*OsNHX5* のエキソンとイントロンの構造は *OsNHX1* と大きく異なるが(Fukuda *et al.* 2011)、その発現レベルは塩ストレス条件下で増加し、*nhx1* 欠損酵母株の NaCl 過剰耐性を改善した(Fukuda *et al.* 2011)。これらの報告は *OsNHX5* が *OsNHX1* と同様にナトリウムの液胞への隔離を介して植物体内のナトリウム移行を抑制することを示唆している。したがって *OsHAK10*, *OsNHX5* がナトリウムの液胞への隔離を介して地上部への移行抑制に機能するのであれば、その発現レベルが低いことで KTC の地上部ナトリウム蓄積が促進されるかもしれない。また KTC の *OsHAK10* はコシヒカリや日本晴のそれと比べて 4 アミノ酸の欠失が生じていた(図 6 - 6)。しかし第 3 章で用いた熱帯ジャポニカ品種目黒糯、日の出、おいらん、オッカモシの *OsHAK10* の推定アミノ酸配列を解析したところ、4 品種とも KTC と同じ部位に 4 アミノ酸の欠失が生じていた(data not shown)。この結果は *OsHAK10* のアミノ酸欠失が熱帯ジャポニカ品種に共通した特徴であり、ナトリウム吸収能力の品種間差に影響しないことを示唆している。またコシヒカリと KTC の *OsNHX5* は Fukuda ら(2011)が解析した日本晴の *OsNHX5* と比べて 1 アミノ酸の置換が生じていたが、*OsNHX5* の機能への影響は不明である。

以上の結果から、*OsHAK5*, *OsHAK10*, *OsNHX5* の発現レベルが低いことで KTC のナトリウム吸収量が高まると推定した。今後はこれらの輸送体タンパクのカチオン選択性と機能について検討する必要があると考える。

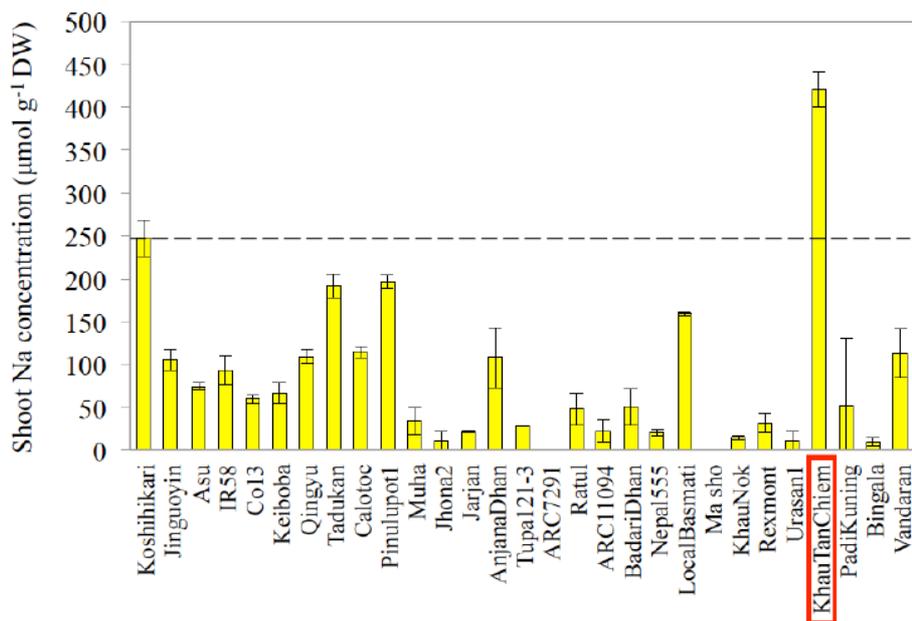


図 6 - 1 世界イネコアコレクションのイネ 28 品種の地上部ナトリウム含有率

0.08 mol m⁻³ KCl + 0.38 mol m⁻³ NaCl を含む培養液で播種後 10 日間栽培した。各値は平均値 ± SD (n = 3) で示した。点線はコシヒカリの値を示す。

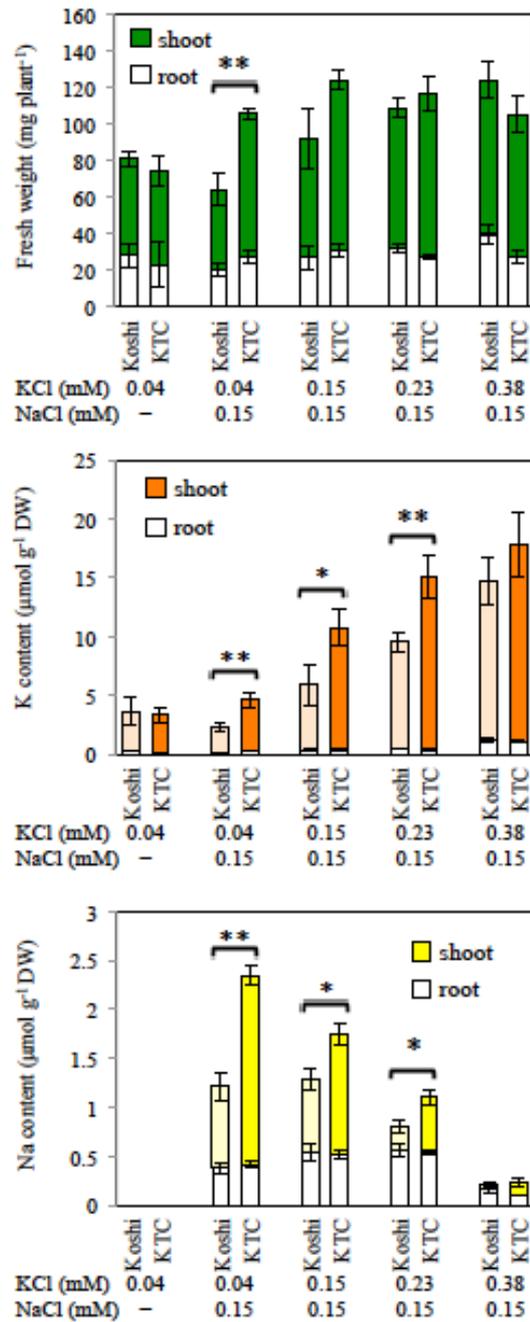


図 6 - 2 異なる培養液カリウム濃度で栽培したコシヒカリ(Koshi)と KTC の植物あたり乾物重量(a)、カリウム含有量(b)、ナトリウム含有量(c)

0.04, 0.15, 0.23 または 0.38 mol m⁻³ KCl かつ 0.15 mol m⁻³ NaCl 処理区及び、0.04 mol m⁻³ KCl かつ NaCl 無添加処理区の 5 処理区で播種後 10 日間栽培した。各値は平均値 ± SD (n = 3) で示した。アスタリスクは各処理区において品種間で値に有意差があったことを示す (* P < 0.05; ** P < 0.01, Student's t 検定)。

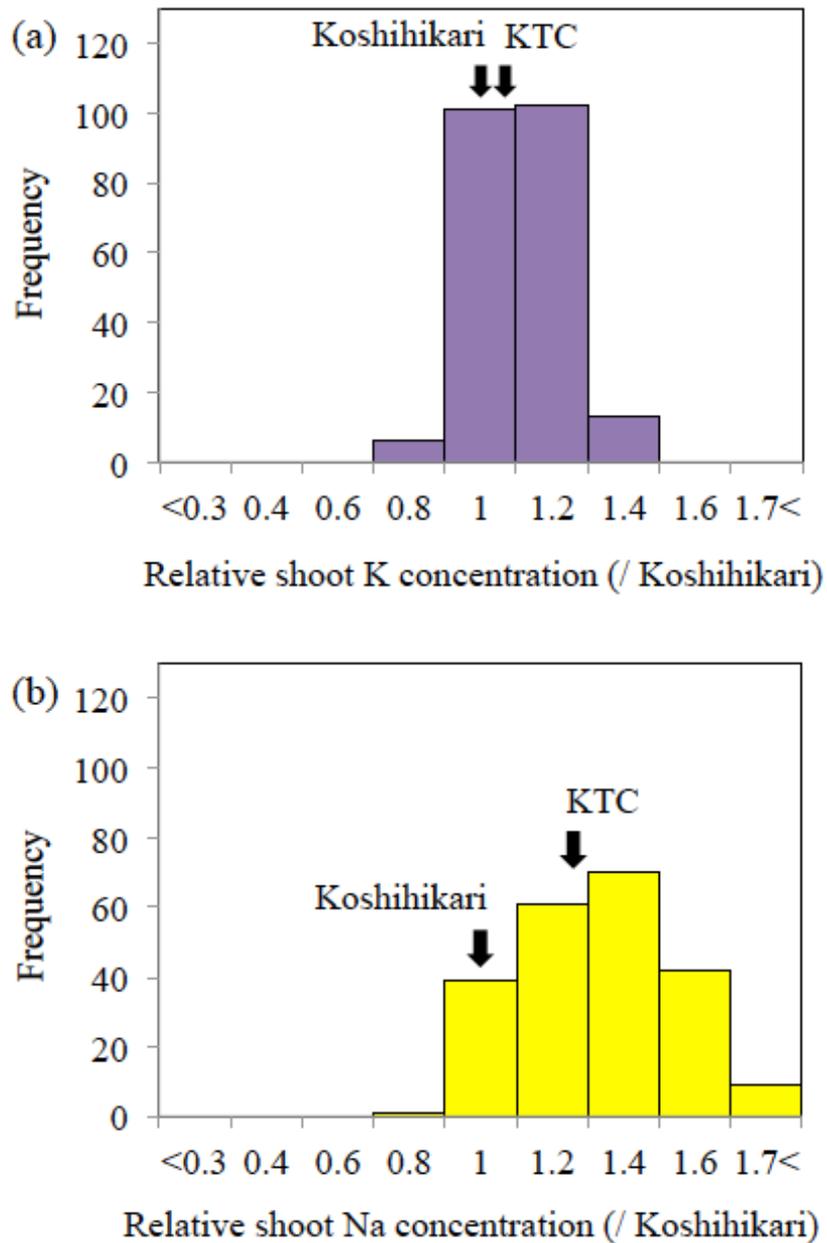


図 6 - 3 コシヒカリと KTC の交配に由来する F₂ 集団 222 系統における地上部カリウム含有率(a)とナトリウム含有率(b)の頻度分布

0.08 mol m⁻³ KCl + 0.15 mol m⁻³ NaCl を含む培養液で播種後 10 日間栽培した。各グラフの横軸はコシヒカリの値を 1 とした時の相対値で表した。グラフ中に矢印でコシヒカリと KTC の値を示した。

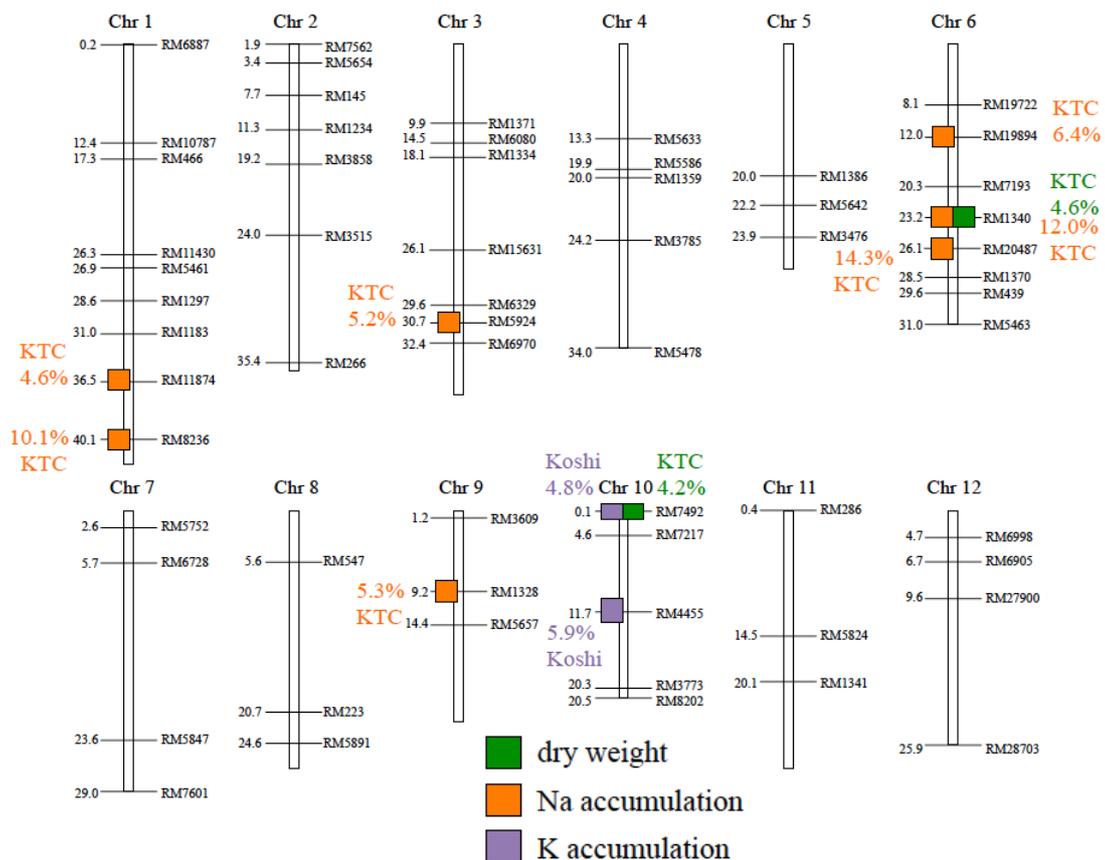


図 6 - 4 コシヒカリと KTC の交配に由来する F₂ 集団の地上部乾物重量、地上部カリウム含有率、地上部ナトリウム含有率に影響する QTL

61 個の SSR マーカー座についてジェノタイピングを行った。各染色体の右側にマーカー名を、左側に位置(Mbp)を記した。F₂ 集団におけるコシヒカリ型個体と KTC 型個体の値に有意差があったマーカー座を四角で示し ($P < 0.05$, Tukey 検定)、その横に寄与率を示した (Koshi: コシヒカリ型で形質値が増加; KTC: KTC 型で形質値が増加)。

表 6 - 2 地上部ナトリウム含有率に影響する QTL 領域のカチオン輸送体遺伝子

Rice Annotation Project Database (PAR-DB; Rice Annotation Project 2008)を用いて検索した。

Chr	Position (Mbp)	Locus ID	Gene name
1	40.8	Os01g0930400	OsHAK5 (K ⁺ transporter)
	40.9	Os01g0932500	OsHAK6 (K ⁺ transporter)
	41.1	Os01g0935500	OsHAK2 (K ⁺ transporter)
3	31.0	Os03g0752300	OsKCO1 (K ⁺ channel)
	31.3	Os03g0758300	OsCNGC7 (cation channel)
6	25.2	Os06g0626050	OsHAK10 (K ⁺ transporter)
	27.8	Os06g0671000	OsHAK13 (K ⁺ transporter)
9	6.4	Os09g0286400	OsNHX5 (Na ⁺ /H ⁺ exchanger)
	7.3	Os09g0299400	OsTPK1 (K ⁺ channel)
	12.7	Os09g0376900	OsHAK23 (K ⁺ transporter)

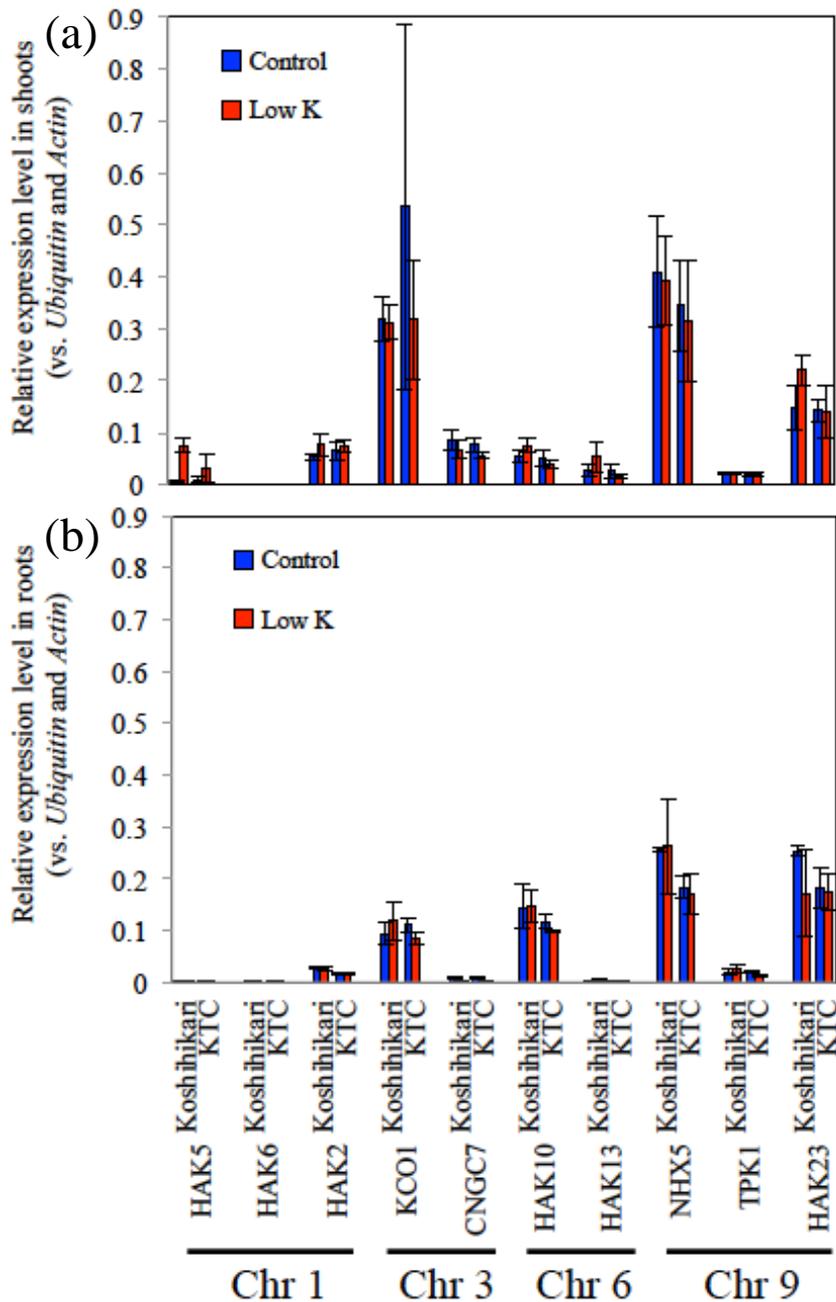


図 6 - 5 コシヒカリと KTC の地上部(a)と根(b)におけるカチオン輸送体遺伝子発現レベル

0.75 (Control)または 0.04 (Low K) mol m⁻³ KCl を含む培養液でコシヒカリと KTC を播種後 7 日間栽培した。どちらの培養液にも 0.19 mol m⁻³ NaCl を添加した。各遺伝子の発現レベルは *Ubiquitin* と *Actin1* の発現レベルに対する相対値で示した。有意差検定の結果を以下に示す: HAK5 地上部:処理区間**, 品種間*, 処理×品種*; HAK5 根:処理区間**, 品種間**, 処理×品種**: HAK6 地上部:品種間*; HAK6 根:品種間*; HAK2 根:品種間**: CNGC7 地上部:処理区間*; CNGC7 根:処理区間**: HAK10 地上部:品種間*; HAK10 根:品種間*; HAK13 根:処理区間*, 品種間*; NHX5 根:品種間*; TPK1 根:処理×品種* (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, 二元配置分散分析(ANOVA))。

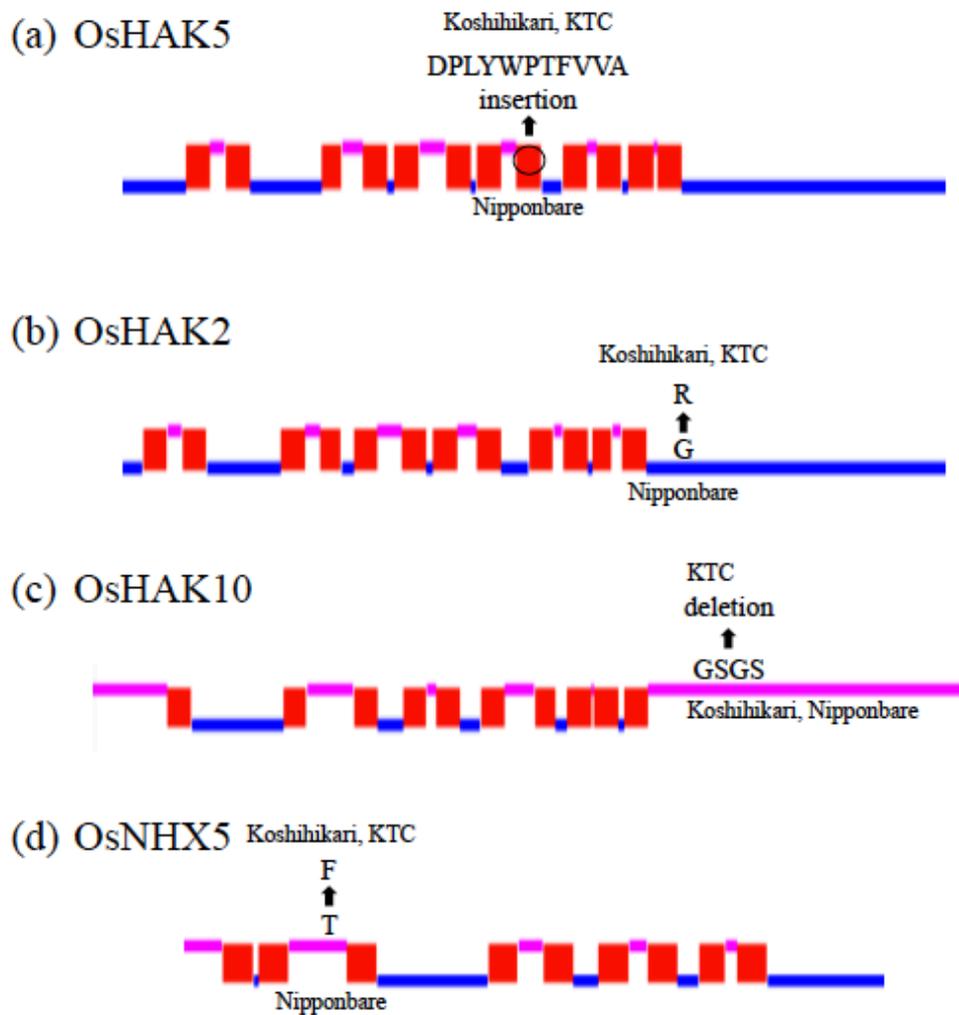


図 6 - 6 日本晴、コシヒカリ、KTC の OsHAK5 (a), OsHAK2 (b), OsHAK10 (c), OsNHX5 (d)の推定アミノ酸配列の比較

コシヒカリと KTC の各遺伝子のコード領域の配列を解析し、また日本晴の遺伝子配列を RAP-DB (Rice Annotation Project 2008)から入手した。タンパクの膜貫通領域の推定には TMHMM (Moller *et al.* 2001)を利用した。図の上側(ピンク)が細胞外または液胞内、下側(青)が細胞内領域を示す。

第 7 章 カリウム不足に発現応答する遺伝子の解析

第 5 章の検討から、*OsHKT2;1* 発現レベル品種間差はプロモーター活性の違いにより生じることが示唆された(図 5 - 2)。*OsHKT2;1* 上流領域では CCA, SEF, NAT, OSE, bZIP, bHLH, MYB, MYC, EE といった転写因子の推定結合モチーフに DNA 多型があり(図 5 - 1)、これらの転写因子の結合頻度の違いが *OsHKT2;1* 発現レベル品種間差をもたらすと考えた。上記の転写因子が *OsHKT2;1* 発現を制御するのであれば、カリウム供給量依存的に発現レベルが変化すると推定した。また第 6 章の検討からベトナム在来品種 Khau Tan Chiem (KTC) のナトリウム高吸収に寄与する新規 QTL が 1, 3, 6, 9 番染色体に見出だされた(図 6 - 4)。KTC のナトリウム高吸収はカリウム不足時に誘導されることから(図 6 - 2)、QTL 遺伝子はカリウム不足に発現応答を示すと推定した。

本章ではカリウム欠除処理後 1, 3 時間のイネの根から抽出した mRNA をマイクロアレイ解析に供し、カリウム不足時に発現応答を示す遺伝子を解析した。

【植物材料】

・日本晴

【方法】

イネ種子の催芽処理、栽培に用いた培養液の組成、栽培方法については第 1 章に記した。栽培は人工気象機内で行った。

RNA サンプルの準備

1 L 容プラスチックコンテナに 0.75 mol m^{-3} KCl を含む培養液を入れ、日本晴の種子を 40 粒播いた。播種後 7 日目に 0.75 mol m^{-3} KCl を含む培養液または含まない培養液にそれぞれ 20 個体移植した。移植後 1, 3 時間で 10 個体ずつ収穫し、2 群に分けた。根を切り分け、第 3 章と同様の方法で RNA を抽出した。KCl 施用区に移植後 1, 3 時間または KCl 無施用区に移植後 1, 3 時間の各 1 サンプル(計 4 サンプル)を解析に供した。サンプルの RNA 濃度と純度を表 7 - 1 に示した。

表 7-1 RNA サンプルの濃度及び純度

KCl 施用区に移植後 1, 3 時間(+ K 1, 3 h)または KCl 無施用区に移植後 1, 3 時間(- K 1, 3 h)の各 1 サンプルを解析に供した。

Sample	RNA conc. (ng μL^{-1})	A260/A280†	A260/A230‡
+ K 1 h	307	1.87	2.05
+ K 3 h	341	1.88	2.01
- K 1 h	298	1.89	1.96
- K 3 h	260	1.89	1.95

†純度の高い RNA 溶液は 1.8-2.0 程度であり、タンパクの夾雑やフェノール試薬の残存が多いと数値が低い。

‡純度の高い RNA 溶液は 2.0-2.2 程度であり、糖の夾雑やフェノール試薬、グアニジンの残存が多いと数値が低い。

マイクロアレイ解析

農業生物資源研究所(つくば)のオープンラボ「マイクロアレイ解析室」で解析を行った。解析には 4 × 44 K RAP-DB(アジレント・テクノロジー株式会社; Sato *et al.* 2010; Sato *et al.* 2013)を用い、2 色法(カラスワップ有り)で行った。4 × 44 K RAP-DB は 27800 遺伝子座をターゲットとした 40121 個の 60 mer プローブから成るマイクロアレイが 1 スライドあたり 4 枚搭載されている。

カリウム不足応答性遺伝子の選抜

データ解析に関しては「マイクロアレイ実験&解析テキスト」(農業生物資源研究所)を参考にした。シグナル強度 300 未満をノイズシグナルとし、KCl 施用区 1, 3 時間と KCl 無施用区 1, 3 時間のすべてにおいてシグナル強度が 300 未満の遺伝子を解析対象から除外した。さらに KCl 施用区と比べて KCl 無施用区で発現レベルが 1.5 倍以上変化した遺伝子を選抜した。また移植後 1, 3 時間のどちらにおいても KCl 施用区と比べて KCl 無施用区で発現レベルが 1.5 倍以上変化した遺伝子のうち、一貫して発現レベルが増加または減少したものについて考察を行った。

遺伝子の分類

カリウム不足応答性遺伝子を以下のように分類した;1. 無機イオン膜輸送体遺伝子;2. 転写因子遺伝子と microRNA 転写産物;3. ストレス応答やシグナル伝達に関わる遺伝子、リン酸化や結合を介した相互作用タンパク遺伝子;4. その他(代謝、光合成、有機化合物の膜輸送に関わる遺伝子など);5. 機能未知遺伝子。遺伝子機能の予測は RAP-DB (Rice Annotation Project 2008)のアノテーションデータに基づいて行った。ここでは conserved hypothetical protein, hypothetical protein, protein of unknown function DUF family, no hitなどを機能未知遺伝子とした。

【結果】

カリウム欠除処理後 1, 3 時間の根で発現応答する遺伝子の解析

カリウム欠除処理後 1, 3 時間で発現レベルが 1.5 倍以上変化した遺伝子数を図 7 - 1 に示した。解析対象である 27800 遺伝子のうち、カリウム欠除処理に発現応答した遺伝子は 1048 個だった(図 7 - 1)。そのうち処理後 1 時間で発現レベルが 1.5 倍以上変化した遺伝子は 1026 個、処理後 3 時間では 500 個であった(図 7 - 1)。また処理後 1, 3 時間のどちらにおいても発現レベルが 1.5 倍以上変化した遺伝子は 478 個であり、無機イオン膜輸送体遺伝子が 14 個、転写制御(転写因子, microRNA)遺伝子が 47 個、ストレス応答、シグナル伝達、タンパク間相互作用関連遺伝子が 75 個、その他の代謝、光合成、有機化合物膜輸送などに関わる遺伝子が 163 個、機能未知遺伝子が 179 個含まれていた(図 7 - 1)。

カリウム欠除処理後 1, 3 時間で発現レベルが 1.5 倍以上変化した 478 遺伝子から、一貫して発現レベルが増加または減少した 301 遺伝子を選抜し、表 7 - 2 にまとめた。無機イオン膜輸送体遺伝子は 7 個が発現上昇、2 個が発現低下を示した(表 7 - 2 a, b)。ナトリウム吸収を促進する QTL 遺伝子 Os06g0701700 (*OsHKT2;1*)、ナトリウムとジカルボン酸の共輸送体遺伝子と推定される Os09g0484900 の発現レベルが増加し、一方で地上部ナトリウム蓄積を抑制する輸送体遺伝子 Os01g0307500 (*OsHKT1;5*)の発現レベルは減少した(表 7 - 2 a, b)。この結果からナトリウム吸収関連遺伝子がカリウム欠除処理後短時間で誘導されることが示された。またカリウム吸収を担う輸送体遺伝子 Os04g0401700 (*OsHAK1*)の発現レベルも増加した(表 7 - 2 a)。

転写因子遺伝子または microRNA 転写産物は 21 個が発現上昇、7 個が発現低下を示した(表 7 - 2 c, d)。 *OsHKT2;1* 上流配列における bHLH, bZIP の推定結合モチーフ

には DNA 多型が生じていたが(図 5 - 1)、本実験ではカリウム欠除処理により Os01g0286100 (bHLH), Os01g0707500 (bHLH), Os07g0182000 (bZIP)の発現レベルが増加し、Os02g0191600 (bZIP), Os05g0103000 (bHLH)の発現レベルが減少した(表 7 - 2 c, d)。

ストレス応答やシグナル伝達に関わる遺伝子、リン酸化や結合を介してタンパクの活性調節を担う遺伝子は 31 個が発現上昇、5 個が発現低下を示した(表 7 - 2 e, f)。この中にはカリウム不足応答に関わるとされるカルシウムシグナリング関連遺伝子が 9 個、シグナル伝達やタンパクの活性調節を担うとされるキナーゼ遺伝子が 5 個含まれていた(表 7 - 2 e, f)。また病原菌感染応答に関わるとされる遺伝子が 7 個、オーキシジンとジベレリン応答性遺伝子がそれぞれ 1 個ずつ含まれていた(表 7 - 2 e, f)。代謝、光合成、有機化合物の膜輸送などに関わる遺伝子は 75 個が発現上昇、33 個が発現低下を示した(表 7 - 2 g, h)。このうち糖代謝及び糖の膜輸送に関わる遺伝子が 17 個、アミノ酸、ポリアミン、ペプチドの代謝及び膜輸送に関わる遺伝子が 9 個、光合成関連遺伝子が 5 個、活性酸素発生を担うペルオキシダーゼ遺伝子が 3 個含まれていた(表 7 - 2 g, h)。

【考察】

ナトリウムの膜輸送体遺伝子

カリウム欠除処理後 1, 3 時間でナトリウム吸収促進に関わる QTL 遺伝子 *OsHKT2;1*、ナトリウム-ジカルボン酸共輸送体遺伝子 Os09g0484900 の発現レベルが増加し、一方で地上部ナトリウム蓄積を抑制する *OsHKT1;5* の発現レベルが減少した(表 7 - 2 a, b)。この結果はカリウム不足の初期においてナトリウム輸送に関わる遺伝子が機能し始めることを示している。*OsHKT1;5* は塩害環境で根の木部柔細胞にナトリウムを再回収し、地上部への移行を抑制することがこれまでに報告されている(Ren *et al.* 2005)。織田(2013)はリアルタイム PCR 法により *OsHKT1;5* の根における発現レベルがカリウム供給量の減少に伴って低下することを明らかにした。これらの結果は *OsHKT1;5* がカリウム供給量依存的にナトリウムの根から地上部への移行を制御することを示唆している。またナトリウム-ジカルボン酸共輸送体様タンパクをコードする Os09g0484900 は Rice Expression Profile Database (RiceXPro; Sato *et al.* 2010; Sato *et al.* 2013)によると葍で高く発現しており、葉身や根においても低い発現が検出される。Os09g0484900 のコード

するタンパクの機能が明らかとなれば、カリウム不足時のナトリウム吸収促進に関する新たな知見となるだろう。

カリウム不足に発現応答する転写因子及びタンパクキナーゼ遺伝子

bHLH や bZIP の推定結合モチーフに生じた DNA 多型(図 5 - 1)は *OsHKT2;1* 発現レベル品種間差の原因であるかもしれない。本実験で Os01g0286100 (bHLH), Os01g0707500 (bHLH), Os07g0182000 (bZIP)はカリウム欠除処理により発現レベルが増加した(表 7 - 2 c)。しかし Os01g0286100 (*OsPIL15*)はオーキシシンシグナル伝達経路や細胞壁合成を介した植物体生育の制御(Zhou *et al.* 2014)、Os07g0182000 (*OsZIP58*)は種子の胚乳におけるデンプン合成に関わっており(Wang *et al.* 2013 a)、カリウム不足時のナトリウム吸収に関与する可能性は低いと考えた。また Os01g0707500 (*OsHLH118*)の機能は不明であるが、RiceXPro (Sato *et al.* 2010; Sato *et al.* 2013)によると根における発現レベルが低かった。*OsHKT2;1* は根において高い発現レベルを示すことから、Os01g0707500 が制御する遺伝子は *OsHKT2;1* ではないと推定した。

一方で Os02g0191600 (bZIP), Os05g0103000 (bHLH)はカリウム欠除処理により発現レベルが減少した(表 7 - 2 c, d)。しかし Os02g0191600 (*OsZIP16*)は乾燥ストレス耐性向上に寄与する転写因子であり(Chen *et al.* 2012)、その発現低下により *OsHKT2;1* 発現レベルが増加するとは考え難い。また Os05g0103000 (*OsHLH083*)の機能未知であり、RiceXPro(Sato *et al.* 2010; Sato *et al.* 2013)によるとその発現パターンは *OsHKT2;1* と異なっていた。以上のことから、本実験でカリウム欠除処理に発現応答を示した Os01g0286100, Os01g0707500, Os02g0191600, Os05g0103000, Os07g0182000 は *OsHKT2;1* 発現制御に関わらないと考えた。*OsHKT2;1* 発現レベル品種間差をもたらす転写因子の発現レベルはカリウム供給量依存的に変化せず、*OsHKT2;1* 上流領域への結合がその他の因子によって制御されているのかもしれない。

また Horie ら(2007)はナトリウム高濃度条件(30 mM NaCl)でセリン/スレオニンキナーゼ阻害剤を添加すると *OsHKT2;1* を介したナトリウム流入がより迅速に抑制されることを明らかにし、*OsHKT2;1* がリン酸化によりタンパクレベルで活性調節されると考察している。このことから *OsHKT2;1* はカリウム不足時にもタンパクレベルで活性調節を受けると推定した。本実験ではタンパクキナーゼ遺伝子 Os02g0135200, Os07g0534300, Os07g0550400, Os07g0584100, Os09g0471600 がカリウム欠除処理により発現増加を

示した(表 7 - 2 e)。これらタンパクキナーゼが OsHKT2;1 タンパクの活性調節を担うかもしれない。

KTC のナトリウム高吸収に関与する QTL 領域の遺伝子

1, 3, 6, 9 番染色体には地上部ナトリウム蓄積に関わる新規の QTL が見出だされた(図 6 - 4)。1, 9 番染色体の QTL 領域にはそれぞれ重金属輸送体(HMA)をコードする Os01g0933200、ABC 輸送体をコードする Os09g0333600 が座乗しており、カリウム欠除処理区でそれぞれ 3, 5 倍以上の発現増加を示した(表 7 - 2 a, h)。しかし HMA, ABC 輸送体とナトリウム吸収の関連は報告されておらず、タンパクの構造が KTC で大きく異なる限りは QTL 遺伝子である可能性は低いと考えた。

3 番染色体の QTL 領域にはジベレリン誘導性タンパクの前駆体をコードする Os03g0760800 が座乗しており、カリウム欠除処理区で 3 倍以上の発現増加を示した(表 7 - 2 e)。ジベレリン代謝はカリウム不足応答シグナル伝達に関わるとされるジャスモン酸の影響を受けることが報告されており(Saito *et al.* 2015)、カリウム不足時にナトリウム吸収を促進するシグナル伝達に関与するかもしれない。また 6 番染色体の QTL 領域にはタンパクのフォールディングなどに関わる分子シャペロン遺伝子 Os06g0650900 (*OsDjC56*)が座乗しており、カリウム欠除処理区で 3 倍以上の発現増加を示した(表 7 - 2 g)。*OsDjC56* 発現レベルはアブシジン酸処理、低温ストレス、塩ストレスにより上昇することが報告されていることから(Sarkar *et al.* 2013 a)、様々なストレス条件でタンパクのコンフォメーションを維持する機能を担うと推定した。低カリウム条件でナトリウム吸収に関わるタンパクの活性に影響を与えるのかもしれない。以上のことから、3, 6 番染色体の QTL 領域に座乗する Os03g0760800, Os06g0650900 はそれぞれカリウム不足応答シグナル伝達、カリウム不足時のタンパク活性維持を介してナトリウム吸収に影響する可能性があると考えた。それらの発現レベルまたはコードするタンパクがコシヒカリと KTC で異なれば、ナトリウム吸収量に差をもたらすかもしれない。

カリウム不足応答シグナル伝達関連遺伝子

カリウム不足は先ず根の細胞膜で感知され、 H^+ -ATPase の活性化により膜電位の過分極が引き起こされると考えられている(Maathuis and Sanders 1993; Schroeder and Fang 1991; Wang and Wu 2010; Wang and Wu 2013)。膜電位の過分極によってカリウムイオンチャネル(Hirsch *et al.* 1998)を介したカリウム吸収が促進され、またカルシウムイオンチャネルが活性化されて細胞内にカルシウムイオンが流入する(Wang and Wu 2010; Wang and Wu 2013)。細胞内のカルシウム濃度が高まると、カルシニューリン B 様タンパク(calcineurin B-like, CBL)がカルシウムイオンと結合し、CBL 相互作用タンパクキナーゼ(CBL-interacting protein kinase, CIPK)が活性化される(Lan *et al.* 2011; Liu *et al.* 2013)。CIPK はカリウムイオンチャネルをリン酸化し、活性化する(Lan *et al.* 2011)。またカリウムが不足した植物には活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)が蓄積し(Shin *et al.* 2005; Wang and Wu 2010; Wang and Wu 2013)、ペルオキシダーゼ遺伝子 *RCI3* による ROS 発生がカリウム輸送体遺伝子 *AtHAK5* の発現誘導に必要であることが報告されている(Kim *et al.* 2010; Kim *et al.* 2012)。これらの報告から、ナトリウム吸収に関わる輸送体タンパクはカルシウムシグナリングを介して活性化され、ナトリウム吸収関連遺伝子の発現は ROS 蓄積により誘導されると推定した。本実験では 7 個のカルシウムシグナリング関連遺伝子がカリウム欠除処理後 1, 3 時間で発現増加を示し、2 個のカルシウムシグナリング関連遺伝子と 3 個のペルオキシダーゼ遺伝子が発現低下を示した(表 7 - 2 e, f)。カリウム不足時に発現上昇を示すペルオキシダーゼ遺伝子はなかったが、発現増加を示した 7 個のカルシウムシグナリング関連遺伝子は *OsHKT2;1* を含むナトリウム輸送体タンパクの活性調節に関わるかもしれない。

カリウムの不足した植物ではエチレンまたはジャスモン酸といった植物ホルモンが蓄積し、これらがカリウム不足応答シグナル伝達に関わるということが報告されている(Armengaud *et al.* 2004; Jung *et al.* 2009)。またジャスモン酸とジベレリン(Saito *et al.* 2015)、ジベレリンとオーキシン(Frigerio *et al.* 2006)はそのシグナル伝達経路が重複することが報告されている。本実験では *S*-アデノシル-L-メチオニンからエチレン前駆体である 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)を合成する酵素遺伝子 *Os04g0578000* (*ACS2*)、オーキシンシグナリング関連遺伝子 *Os09g0554300*, *Os10g0510500*、ジベレリンシグナリング関連遺伝子 *Os03g0760800* がカリウム欠除処理に発現応答を示した(表 7 - 2 e, g)。これらの遺伝子がカリウム不足時のナトリウム吸収促進にも関与するかもしれない。

水ストレス及び塩ストレス応答性遺伝子

植物体内におけるカリウムイオンの機能の一つは細胞の浸透圧形成であり、イネはカリウムが不足すると乾燥あるいは吸水阻害によるストレスを受け易くなる(Song *et al.* 2014; Zain *et al.* 2014)。イネの乾燥ストレス応答としては、浸透圧形成物質であるポリアミン類や糖の蓄積が誘導されることが知られている(Valliyodan *et al.* 2006; Yang *et al.* 2007)。本実験でカリウム欠除処理に発現応答を示した遺伝子の中に複数の乾燥ストレス応答性遺伝子が含まれていた(表 7 - 2 c, d, e)。Os11g0184900 (*OsNAC5*; Khattab *et al.* 2014), Os07g0673200 (*OsRFPHC-13*; Lim *et al.* 2013), Os05g0215000 (*BURP*; Ding *et al.* 2009) Os05g0217800 (*BURP*; Ding *et al.* 2009) は乾燥ストレスにより発現上昇することが報告されている。また Os09g0522200 (*OsDREB1A*; Dubouzet *et al.* 2003), Os01g0626400 (*OsWRKY11*; Wu *et al.* 2009 b), Os11g0127600 (*ONAC045*; Zheng *et al.* 2009)の過剰発現株は野生株と比べて高い乾燥耐性を示す。また浸透圧維持に関わると推定されるアミノ酸代謝や糖代謝に関連する遺伝子がそれぞれ 9, 17 個発現応答を示した(表 7 - 2 g, h)。これらの結果はカリウム欠除処理後のイネが乾燥または吸水阻害によるストレスを受けていたことを示唆している。カリウム不足時のナトリウムの機能の一つが浸透圧の維持であることから(高橋・前嶋 1998; Wakeel *et al.* 2011)、ナトリウム吸収促進の引き金はカリウム不足による乾燥または吸水阻害であるかもしれない。

また塩ストレス応答性遺伝子として報告されている Os03g0820300 (*ZFP182*; Huang *et al.* 2007), Os05g0194500 (*ONAC085*; Fang *et al.* 2008), Os01g0165000 (*OsDREB2A*; Mallilarjuna *et al.* 2011)もまたカリウム欠除処理に発現応答を示した(表 7 - 2 c, d)。植物の塩ストレスはナトリウムイオンの過剰蓄積による代謝阻害に加え、根圏での高浸透圧による吸水阻害を含むと考えられている。これらの結果もまた、カリウム不足時のイネが吸水阻害によるストレスを受けていることを示唆している。

病原菌感染応答性遺伝子

本実験では 10 個の推定病原菌感染応答性遺伝子がカリウム欠除処理に発現応答を示した(表 7 - 2 e, f)。カリウム不足による茎や稈の弱まり、糖や窒素化合物の蓄積が病原菌の感染を助長することが知られている。例えば Maschmann ら(2010)はカリウム質肥料を十分施肥することが *Sclerotium oryzae* によって引き起こされるイネ褐色菌

核病(stem rot)の害兆軽減に有用であることを報告した。また Prabhu ら(1999)は陸稲の窒素無施肥栽培においてカリウムの施用量増加が *Pyricularia grisea* によって引き起こされるいもち病を軽減したと報告している。これらの先行研究はカリウム不足時にイネが病原菌感染によるストレスを受け易いことを示しており、このことから本実験の結果は病原菌感染に対するイネの防御応答であると考えた。

まとめ

本実験からカリウム欠除処理後短時間で複数のナトリウム輸送体遺伝子が発現応答することが明らかとなった(表 7 - 2 a, b)。特に *OsHKT1;5* のカリウム不足時の機能については報告されておらず、Os09g0484900 の機能解析はこれまでに行われていない。これらの遺伝子がカリウム不足に発現応答したことは、ナトリウム吸収促進機構に関する新しい知見であると考えた。また複数のタンパクキナーゼ遺伝子、カルシウムシグナリング関連遺伝子、エチレン、オーキシン、ジベレリンシグナリング関連遺伝子がカリウム欠除処理後短時間で発現増加を示した(表 7 - 2 e, g)。イネのカリウム不足応答シグナル伝達に関する知見は乏しく、これらの遺伝子の機能が明らかになればナトリウム吸収促進機構についても理解が深まるだろう。

Os03g0760800, Os06g0650900 は KTC のナトリウム高吸収に寄与する QTL 領域に座乗しており、カリウム欠除処理によりそれぞれ 3 倍以上の発現増加を示した(表 7 - 2 e, g)。これらの遺伝子の発現レベルまたはコードするタンパクがコシヒカリと KTC で異なれば、それぞれカリウム不足応答シグナル伝達、カリウム不足時のタンパク活性維持を介してナトリウム吸収能力品種間差をもたらすかもしれない。

本実験ではカリウム欠除処理により多くの乾燥ストレス応答遺伝子の発現が誘導された(表 7 - 2 c, d, e, g, h)。この結果はカリウム欠除処理後のイネが乾燥または吸水阻害によるストレスを受けていたことを示唆している。カリウム不足時のナトリウムの機能の一つは浸透圧維持であり(高橋・前嶋 1998; Wakeel *et al.* 2011)、イネはカリウム不足による吸水阻害のストレスを感知してナトリウム吸収を促進すると推定した。

27800 genes

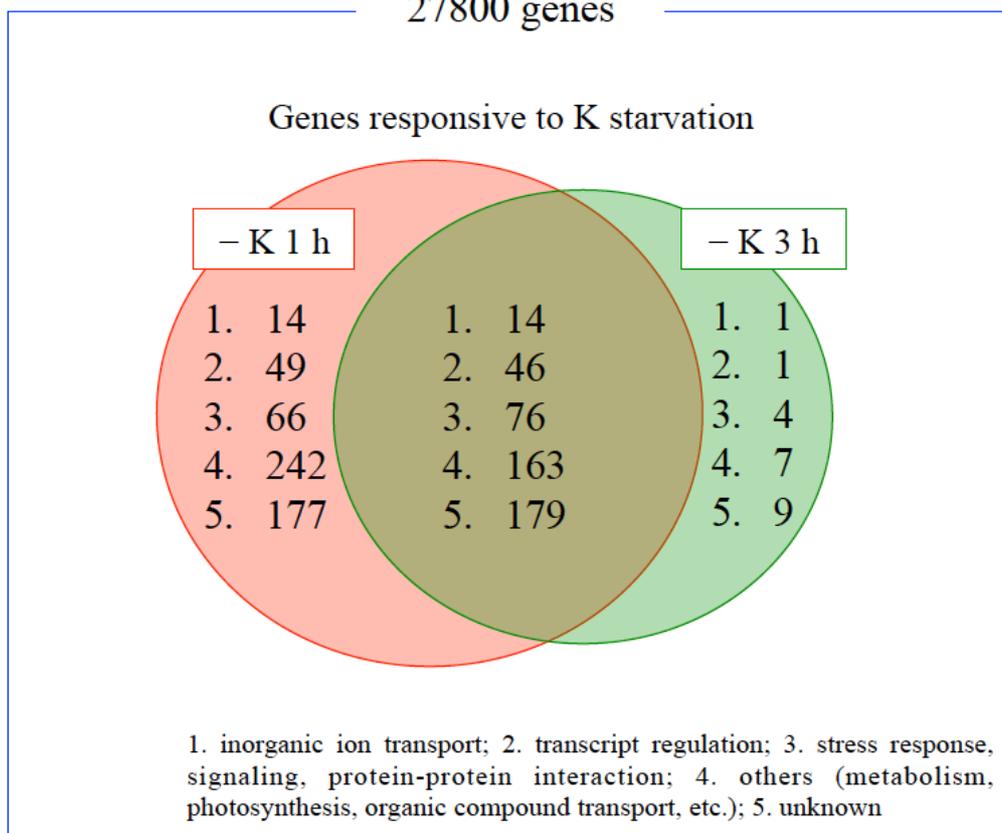


図 7-1 カリウム不足応答性遺伝子の数

0.75 mol m⁻³ KCl を含む培養液で播種後 7 日間栽培した日本晴を、0.75 mol m⁻³ KCl 施用区または無施用区に移植した。1, 3 時間後に収穫した個体の根から mRNA を抽出し、解析に用いた(4 サンプル, 各サンプル 1 連)。マイクロアレイ解析には 4 × 44 K RAP-DB(アジレント・テクノロジー株式会社)を用いた。解析は 2 色法(カラスワップ有り)で行った。KCl 施用区と比べて無施用区において、移植後 1(赤), 3(緑)時間で 1.5 倍以上の発現変化を示した遺伝子数を示した。遺伝子の機能を以下のように分類した; 1. 無機イオン膜輸送; 2. 転写制御(転写因子, microRNA); 3. ストレス応答, シグナス伝達, タンパクキナーゼ, タンパク結合; 4. その他(代謝、光合成、有機化合物輸送など); 5. 不明 (conserved hypothetical protein, protein of unknown function DUF family, no hit など)。

表 7-2 カリウム欠除処理に応答して発現レベルの変化した遺伝子

移植後 1, 3 時間のどちらにおいても KCl 施肥区と比べて無施肥区で発現レベルが 1.5 倍以上上昇または低下した遺伝子をまとめた。遺伝子を 1. 無機イオン膜輸送を担う 9 遺伝子(a, b)、2. 転写制御を担う 28 遺伝子(転写因子, microRNA)(c, d)、3. ストレス応答, シグナス伝達, タンパク間相互作用に関わる 36 遺伝子(e, f)、4. その他、代謝、光合成、有機化合物輸送などに関わる 108 遺伝子(g, h)に分類した。移植後 1, 3 時間で発現レベルが上昇した遺伝子を a, c, e, g に、低下した遺伝子を b, d, f, h に示した。

(a) Up-regulated genes in group 1

Fold-change ≥ 1.5

Os04g0401700 Potassium transporter 5 (OsHAK1).

Os10g0444700 Phosphate transporter 6.

Os03g0147400 Divalent ion symporter.

Fold-change ≥ 2.0

Os01g0831300 Ammonium transporter.

Os01g0933200 Heavy metal transport/detoxification protein domain containing protein.

Os06g0701700 OsHKT2;1.

Os09g0484900 Sodium-dicarboxylate cotransporter-like.

(b) Down-regulated genes in group 1

Fold-change ≥ 1.5

Os01g0307500 Cation transporter family protein (OsHKT1;5).

Os02g0550800 Ammonium transporter.

(c) Up-regulated genes in group 2

Fold-change ≥ 1.5

- Os01g0779400 SNF2-related domain containing protein.
Os01g0908200 BTB/POZ domain containing protein.
Os06g0271600 Zn-finger, RING domain containing protein.
Os09g0385700 Zn-finger, AN1-like domain containing protein (OsSAP17).
Os09g0486500 Multiple stress-responsive zinc-finger protein (OsSAP1).
Os09g0522200 DRE-binding protein 1A (OsDREB1A).
Os11g0303800 Homeodomain-like containing protein.

Fold-change ≥ 2.0

- Os01g0286100 bHLH domain containing protein (OsPIL15).
Os01g0626400 OsWRKY11.
Os01g0707500 Transcription factor (OsHLH118).
Os02g0565600 Homeodomain leucine zipper protein (OsHOX7).
Os02g0682300 Zn-finger, RING domain containing protein.
Os03g0324200 OsEIL1.
Os03g0820300 ZFP182.
Os05g0194500 No apical meristem (NAM) protein domain containing protein (ONAC085).
Os07g0182000 Transcriptional activator protein (OsZIP58).
Os07g0673200 Zn-finger, RING domain containing protein (OsRFPHC-13).
Os10g0562900 Pathogenesis-related transcriptional factor (OsERF96).
Os11g0184900 OsNAC5 protein.

Fold-change ≥ 3.0

- Os02g0559800 Zn-finger, RING domain containing protein.
Os11g0127600 No apical meristem (NAM) protein domain containing protein.
-

(d) Down-regulated genes in group 2

Fold-change ≥ 1.5

- Os01g0165000 DRE binding protein 2 (OsDREB2A).
Os09g0507100 SBP domain containing protein.

Fold-change ≥ 2.0

- Os02g0828900 Transcription factor jumonji, jmjC domain containing protein.
osa-miR414 miRNA

Fold-change ≥ 3.0

- Os02g0191600 Basic-leucine zipper transcription factor (OsZIP16).
Os05g0103000 Basic helix-loop-helix dimerization region (OsHLH083).
osa-miR416 miRNA
-

(e) Up-regulated genes in group 3

Fold-change \geq 1.5

- Os05g0215000 BURP domain containing protein.
Os05g0217800 BURP domain containing protein.
Os07g0584100 MAP kinase-like protein.
Os10g0510500 Auxin responsive SAUR protein family protein.

Fold-change \geq 2.0

- Os01g0135700 Flagellar calcium-binding protein (calflagin) family protein.
Os01g0837000 Ankyrin repeat containing protein (OsNPR4).
Os04g0620800 NB-ARC domain containing protein (pathogen).
Os06g0219900 Phosphate-induced protein 1 conserved region family protein.
Os06g0279900 Disease resistance protein family protein.
Os07g0550400 Receptor-like protein kinase 5.
Os08g0494300 Copine domain containing protein (Ca²⁺ signaling).
Os08g0558100 Calcium-binding EF-hand domain containing protein.
Os08g0562600 C2 domain containing protein (Ca²⁺ binding).
Os09g0361200 Hypersensitive-induced reaction protein 2 (Fragment).
Os09g0471600 Protein kinase domain containing protein (OsWAK84).
Os09g0571200 C2 domain containing protein (Ca²⁺ binding).
Os10g0130200 Cyclin-like F-box domain containing protein.
Os11g0213800 NBS-LRR disease resistance protein homologue (Fragment).
Os12g0108500 Cyclin-like F-box domain containing protein.

Fold-change \geq 3.0

- Os01g0955100 Regulator of gene silencing (OsMSR2, Ca²⁺ signaling).
Os02g0135200 Blast and wounding induced mitogen-activated protein kinase (OsMAPK2).
Os02g0707900 Universal stress protein (Usp) family protein.
Os02g0756600 Phosphate-induced protein 1 conserved region family protein.
Os02g0756800 Phosphate-induced protein 1 conserved region family protein.
Os03g0190300 Leucine-rich repeat, typical subtype containing protein.
Os03g0760800 Gibberellin regulated protein family protein.
Os05g0367900 Harpin-induced 1 domain containing protein (pathogen).
Os06g0128800 C2 calcium/lipid-binding region, CaLB domain containing protein.
Os07g0534300 Protein kinase family protein.
Os09g0517200 Disease resistance protein family protein.
Os11g0687100 von Willebrand factor, type A domain containing protein.
-

(f) Down-regulated genes in group 3

Fold-change \geq 1.5
Os01g0743100 IQ calmodulin-binding region domain containing protein (Ca²⁺ signaling).
Fold-change \geq 2.0
Os02g0689900 TGF-beta receptor, type I/II extracellular region family protein.
Os08g0517800 Thaumatin, pathogenesis-related family protein.
Fold-change \geq 3.0
Os03g0652000 C2 domain containing protein (Ca²⁺ binding).
Os10g0576600 TPR-like domain containing protein.

(g) Up-regulated genes in group 4

Fold-change \geq 1.5
Os01g0160800 Protein synthesis inhibitor II, (Ribosome-inactivating protein II).
Os01g0705200 Late embryogenesis abundant protein repeat containing protein.
Os01g0868900 Proteinase inhibitor I9, subtilisin propeptide domain containing protein.
Os02g0215200 Histone deacetylase (Fragment).
Os02g0299300 Esterase/lipase/thioesterase domain containing protein.
Os02g0572400 Riboflavin biosynthesis protein ribA, chloroplast precursor.
Os02g0802500 H(+)-translocating (Pyrophosphate-ENERGIZED).
Os04g0403600 Protein phosphatase 2C-like domain containing protein.
Os04g0578000 ACC synthase (ACS2).
Os04g0600200 Alternative oxidase 1c, mitochondrial precursor.
Os04g0656100 H(+)-transporting ATPase (EC 3.6.1.35).
Os04g0683700 4-coumarate-CoA ligase-like protein.
Os05g0186300 NADP-malic enzyme.
Os05g0457800 Phospholipid/glycerol acyltransferase family protein.
Os05g0554000 Multi antimicrobial extrusion protein MatE family protein.
Os08g0468100 Nitrate reductase [NADH] 1 (EC 1.7.1.1) (NR1).
Os09g0570300 Short-chain dehydrogenase Tic32.

(Continued)

(Continued)

(g) Up-regulated genes in group 4

Fold-change ≥ 1.5

Os10g0206800 Multi antimicrobial extrusion protein MatE family protein (OsFRDL2).
Os10g0345100 Multi antimicrobial extrusion protein MatE family protein.
Os10g0450900 Glycine-rich cell wall structural protein 2 precursor.
Os11g0134900 Major facilitator superfamily antiporter (OsTOM1).
Os11g0138900 Esterase/lipase/thioesterase domain containing protein.
Os12g0227400 Allyl alcohol dehydrogenase.

Fold-change ≥ 2.0

Os01g0314800 Late embryogenesis abundant protein 3 family protein.
Os01g0681900 Glutamate synthase [NADH], chloroplast precursor.
Os01g0693300 Lipid phosphate phosphatase 2 (EC 3.1.3.-).
Os01g0858900 Glycosyl transferase, family 29 protein.
Os01g0860500 Chitinase (EC 3.2.1.14).
Os01g0905200 Exo70 exocyst complex subunit family protein.
Os02g0159700 Electron transport protein SCO1/SenC family protein.
Os02g0176900 Aldose 1-epimerase family protein.
Os02g0191300 Amino acid/polyamine transporter II family protein.
Os02g0226300 Mitochondrial substrate carrier family protein.
Os02g0473200 Peptidase A1, pepsin family protein.
Os02g0532500 RmlC-like cupin family protein.
Os03g0236200 Glutamate decarboxylase isozyme 3 (EC 4.1.1.15).
Os03g0288000 Metallothionein-like protein 1 (MT-1).
Os03g0571900 Multi antimicrobial extrusion protein MatE family protein.
Os03g0776900 DNAJ protein-like.
Os04g0184100 Amidase family protein.
Os04g0447700 NAD(P)H dependent 6'-deoxychalcone synthase.
Os04g0565200 Cis-zeatin O-glucosyltransferase.
Os04g0650700 L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase).
Os04g0667400 2OG-Fe(II) oxygenase domain containing protein.

(Continued)

(Continued)

(g) Up-regulated genes in group 4

Fold-change ≥ 2.0

- Os05g0373900 Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 (eRF1).
Os05g0405000 Orthophosphate dikinase precursor (EC 2.7.9.1).
Os05g0462400 Lipin, N-terminal conserved region domain containing protein.
Os05g0526900 UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family protein.
Os06g0199000 Glycine-rich cell wall structural protein 2 precursor.
Os07g0552800 Cellulose synthase family protein.
Os09g0554300 Auxin Efflux Carrier family protein.
Os10g0521000 Glycoside hydrolase, family 37 protein.
Os10g0553300 Trehalose-6-phosphate phosphatase.
Os11g0138300 E-class P450, group I family protein.
Os12g0134900 Cytochrome P450 family protein.
Os12g0181600 Amino acid/polyamine transporter II family protein.
Os12g0478200 GRAM domain containing protein.
Os12g0512100 General substrate transporter family protein.

Fold-change ≥ 3.0

- Os01g0191200 Acid phosphatase (Class B) family protein.
Os01g0760000 Dynein 8 kDa light chain, flagellar outer arm.
Os01g0892500 Pectinacetyltransferase family protein.
Os02g0770800 Nitrate reductase [NAD(P)H] (EC 1.7.1.2).
Os03g0183600 Alanine aminotransferase.
Os03g0255500 Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP].
Os03g0267000 Low molecular mass heat shock protein Oshsp18.0.
Os04g0369000 Major sperm protein domain containing protein.
Os04g0518400 Phenylalanine ammonia-lyase 2 (EC 4.3.1.5).
Os04g0600300 Alternative oxidase (OSJNBa0083N12.12 protein).
Os05g0194900 Pyrophosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase-like protein.
Os06g0650900 Heat shock protein DnaJ family protein (OsDjC56).
Os08g0112200 Transferase family protein.
Os08g0112300 Transferase family protein.
Os08g0120600 Aldolase C-1.
Os11g0525900 Exonuclease domain containing protein.
Os12g0641000 Actin 66 (Fragment).
-

(h) Down-regulated genes in group 4

Fold-change \geq 1.5

- Os01g0686300 UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family protein.
Os01g0966900 Sorbitol transporter.
Os04g0208200 Cysteine proteinase.
Os04g0452600 Sugar transporter family protein.
Os04g0513400 Beta-glucosidase.
Os04g0517500 Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase.
Os04g0552200 Beta-expansin 5.
Os04g0631100 General substrate transporter family protein.
Os06g0697000 Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein A precursor.
Os08g0237800 Xyloglucan endotransglycosylase (Fragment).
Os08g0564300 P-glycoprotein 1.
Os11g0149400 Phytosulfokines 2 precursor; Phytosulfokine-beta.

Fold-change \geq 2.0

- Os01g0580000 Esterase/lipase/thioesterase domain containing protein.
Os01g0878900 4,5-DOPA dioxygenase extradiol.
Os02g0529800 Cytochrome P450 family protein.
Os03g0336400 Expansin S1.
Os03g0347500 MtN3-like protein.
Os04g0611200 Transferase family protein.
Os04g0678700 Protochlorophyllide reductase A, chloroplast precursor.
Os04g0689000 Anionic peroxidase precursor.
Os06g0568600 Ent-kaurene oxidase (EC 1.14.13.78) (AtKO1) (Cytochrome P450 701A3).
Os06g0725200 Lipolytic enzyme, G-D-S-L family protein.
Os07g0531400 Peroxidase 27 precursor (EC 1.11.1.7) (Atperox P27) (PRXR7) (ATP12a).
Os08g0302000 Peroxidase 40 precursor (EC 1.11.1.7) (Atperox P40).
Os10g0530600 Glutathione S-transferase GST 20 (EC 2.5.1.18).
Os12g0637200 Purple acid phosphatase (EC 3.1.3.2).

Fold-change \geq 3.0

- Os02g0102000 Glutaredoxin domain containing protein.
Os02g0650300 Oligopeptide transporter OPT superfamily protein.
Os04g0526600 Alpha-amylase/subtilisin inhibitor (RASt).
Os06g0262800 Senescence-associated protein 15.
Os07g0561500 Brn1-like protein.
Os09g0333600 ABC1 protein.
Os12g0189300 Isocitrate lyase and phosphorylmutase family protein.
-

総括

ナトリウム高吸収によりカリウム不足時のイネの生育低下が軽減される

本研究からナトリウムを多く吸収し地上部に蓄積するイネ品種はカリウム不足による生育低下が軽減されることが示された(図 1 - 3, 4; 図 6 - 2)。この結果から、地上部ナトリウム蓄積能力の高いイネ品種を選抜し栽培に用いる、または現在栽培されている優良品種の地上部ナトリウム蓄積能力を高めることで、結果としてイネのカリウム利用効率を高めることができると考えた。イネのカリウム体内利用効率向上に関する研究の例としては、Jia ら(2008)は低カリウム条件での葉緑体の構造異常と光合成速度に着目し、Yang ら(2003)は吸収したカリウムあたりの乾物生産量または穀実生産量について検討している。これらの先行研究で報告されている有用形質に加え、本研究ではナトリウム吸収能力がカリウム不足によるストレスに耐性を持つイネ品種選抜のための新たな指標として利用されることが示された。

カリウムの代替栄養素としてナトリウムを利用する作物種は多く報告されているが(Figdore *et al.* 1987; 高橋・前嶋 1998)、ナトリウムの利用に着目した作物のカリウム体内利用効率向上に関する研究は少ない。Pettersson と Jensen (1983)はオオムギのカリウム体内利用効率(カリウム含有率の逆数)に品種間差を見出だした。また Woodend と Glass (1993)はコムギの栄養成長期におけるカリウム体内利用効率品種間差を検討し、それが環境要因によって大きく影響されたと報告している。また White ら(2010)は *Brassica oleracea* L.の温室内での栽培試験と圃場試験により地上部カリウム含有量に影響する QTL の解析を行っている。本研究はナトリウムの高吸収がカリウム不足によるイネの生育低下を軽減することを示したが、イネ以外の作物種においてもナトリウム吸収に関する研究が進むことでカリウム体内利用効率の高い品種の作出に役立つと考えた。

OsHKT2;1 はナトリウム吸収促進に寄与する QTL 遺伝子である

マップベースクローニングとイネ変異体を用いた解析によりジャポニカ品種コシヒカリでナトリウム吸収促進に寄与する QTL 遺伝子 *OsHKT2;1* を同定し、その高発現がナトリウム高吸収能力をもたらすことを明らかにした(図 3 - 4; 図 4 - 3)。この結果から *OsHKT2;1* 発現レベルが低く、したがってナトリウム吸収能力の低いインディカ品種や熱

帯ジャポニカ品種(図 3 - 4)にコシヒカリ型 *OsHKT2;1* 遺伝子座を導入することでナトリウム吸収能力を高めることができると考えた。今後はコシヒカリ型 *OsHKT2;1* 遺伝子座を持つ IR64 が低カリウム条件で高い籾収量を示すことを確かめること、さらにはコシヒカリ型 *OsHKT2;1* 遺伝子座近傍の DNA マーカーを作成することが必要であると考えた。

第 2, 3 章の検討では、コシヒカリ型 *OsHKT2;1* 遺伝子座を持つ IR64 の *OsHKT2;1* 発現レベル及びナトリウム吸収能力は遺伝子供与親であるコシヒカリのそれと比べて低かった(図 2 - 3; 図 3 - 3)。これは *OsHKT2;1* 発現レベルに影響する他の遺伝子、例えば転写因子の発現レベルや構造がコシヒカリと IR64 で異なるためであると考えた。転写因子の影響により遺伝子発現品種間差が生じる例として、細胞分裂を制御する転写因子 *OsGS5* がその発現レベルの違いにより穀実サイズを変化させることが報告されている(Li *et al.* 2011)。また *OsSPL14* (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE) はその配列の違いから転写産物の分解され易さが異なり、穂の形態に品種間差をもたらす(Jiao *et al.* 2010)。これらの先行研究から *OsHKT2;1* 発現レベル品種間差にはプロモーター活性に加え、転写因子の発現量や構造もまた影響すると推定した。また Jabnourne ら(2009)が行った RNA *In situ* ハイブリダイゼーションは低カリウム条件で栽培した日本晴の根の表皮、外皮、皮層細胞で *OsHKT2;1* が高発現することを示したが、Gollmack ら(2002)はカリウム欠除処理をした IR29 の根の維管束組織で最も高い *OsHKT2;1* 発現が検出されたと報告している。これらの報告から *OsHKT2;1* 発現レベルだけでなく、発現局在の違いもまたナトリウム吸収に影響を与えると考えた。今後は *OsHKT2;1* 発現の組織局在や *OsHKT2;1* 発現をカリウム供給量依存的に制御する転写因子について検討する必要があるだろう。

OsHKT2;1 発現制御機構に加え、*OsHKT2;1* タンパクの活性調節機構もまたナトリウム吸収能力に影響する。第 7 章の検討からカリウム欠除処理後短時間で発現増加する複数のタンパクキナーゼ遺伝子、カルシウムシグナリング関連遺伝子が明らかとなった(表 7 - 2 e)。Horie ら(2007)は *OsHKT2;1* がリン酸化によりタンパクレベルで活性調節されると考察しており、本研究でカリウム不足応答を示したタンパクキナーゼ遺伝子やカルシウムシグナリング関連遺伝子はリン酸化により *OsHKT2;1* タンパクの活性調節を担う候補遺伝子であると考えた。実際にこれまで多くの膜輸送タンパクがリン酸化により活性調節をうけることが明らかとなっている。例えばシロイヌナズナの細胞膜局在型 Na^+/H^+ アンチポーター SOS1(Shi *et al.* 2000; Shi *et al.* 2002)はカルシウム結合タンパ

クである SOS3 (Liu and Zhu 1998)とセリン/スレオニンキナーゼである SOS2 (Liu *et al.* 2000)の複合体によりリン酸化され、活性化されることが報告されている(Qiu *et al.* 2002)。またシロイヌナズナの液胞膜局在型 Na^+/H^+ アンチポーターNHX1 もまた SOS2 によって活性化されることが示唆された(Qiu *et al.* 2004)。またシロイヌナズナのカリウムチャネル AKT1 (Hirsch *et al.* 1998)はカルシウム結合タンパクである CBL10 (calcineurin B-like)やセリン/スレオニンキナーゼ CIPK23 (CBL interacted protein kinase)によって活性調節されることが報告されている (Ren *et al.* 2013; Xu *et al.* 2006)。今後、OsHKT2;1 の活性調節機構を解明していくことがナトリウム高吸収品種作出のために有用な知見となると考えた。

ベトナム在来品種 Khau Tan Chiem のナトリウム高吸収に寄与する QTL が 1, 3, 6, 9 番染色体に検出された

これまでの検討ではコシヒカリよりもナトリウム吸収能力の高い品種は見つかっていなかった。本研究ではコシヒカリよりも高いナトリウム吸収能力を有するベトナム在来品種 Khau Tan Chiem (KTC)を見出した(図 6 - 1; 図 6 - 2)。さらにナトリウム高吸収品種 KTC とコシヒカリの F_2 集団を用いた解析から、地上部ナトリウム蓄積に関わる新規の QTL が 1, 3, 6, 9 番染色体に検出された(図 6 - 4)。それぞれの QTL の寄与率は 5~14%と低かったが、それらが協調的に機能することで地上部のナトリウム蓄積を促すと推定した。各 QTL 領域には複数のカチオン輸送体遺伝子が座乗しており、*OsHAK2*, *OsHAK5*, *OsHAK6*, *OsHAK10*, *OsNHX5* の発現レベルが KTC と比べてコシヒカリで有意に高かった。特にカリウム輸送体遺伝子 *OsHAK5* はその欠損変異により地上部ナトリウム含有率が増加することが報告されている(Horie *et al.* 2011 b; Yang *et al.* 2014)。*OsHAK5* がどのような機構で地上部ナトリウム蓄積に寄与するのかは不明であるが、KTC ではその発現レベルが低いことにより地上部ナトリウム蓄積が促進されると推定した。また *OsHAK10*, *OsNHX5* は液胞膜に局在し、植物体内のナトリウム移行抑制に機能することが示唆されている(Fukuda *et al.* 2011; Wang *et al.* 2012 a; Wang *et al.* 2012 b)。これらカチオン輸送体の機能は不明であるが、それらの発現レベルが KTC で低いこともまた地上部ナトリウム高蓄積に寄与するかもしれない。

マイクロアレイ解析の結果、3, 6 番染色体の QTL 領域に座乗する Os03g0760800, Os06g0650900 (*OsDjC56*)はカリウム欠除処理によりそれぞれ 3 倍以上発現増加するこ

とが明らかとなった(表 7 - 2 e, g)。Os03g0760800 はジベレリン誘導性タンパクの前駆体をコードしており、カリウム不足応答シグナル伝達に関与するかもしれない。OsDjC56 はストレス応答性の分子シャペロンをコードしており(Sarkar *et al.* 2013 a)、カリウム不足時にタンパクのコンホメーション維持に機能していると推定した。これらの遺伝子の発現レベルまたはコードするタンパクがコシヒカリと KTC で異なれば、ナトリウム吸収能力の差に影響するかもしれない。今後 KTC のナトリウム高吸収に寄与する QTL 遺伝子を同定できれば、イネのナトリウム吸収機構に関する新しい知見を得ることができるだろう。

今後の課題と展望

本研究で同定した QTL 遺伝子 *OsHKT2;1* はイネのカリウム栄養状態を診断する指標としても有用である。土壌のカリウム供給能力や作物のカリウム栄養状態を正確に評価し、作物品種及び圃場ごとにカリウム施肥量を適正化することも施肥量低減策の一つである。一般的に、土壌から酢酸アンモニウムで抽出した交換態カリウムの量を指標として作物に利用され得るカリウムの量が評価されるが、実際の作物のカリウム吸収量はしばしば交換態カリウムの量よりも多い(Eagle 1963)。カリウムは酢酸アンモニウムによって抽出されない非交換態画分の一部からも作物に供給されるが、その量は土壌鉱物の種類や有機物含量などにより異なる(Eagle 1963; Moritsuka *et al.* 2004; Sarkar *et al.* 2013 b; Wang *et al.* 2011)。したがって土壌分析のみで土壌のカリウム供給量を評価することは難しい。一方でイネの地上部ナトリウム含有率は土壌からのカリウム供給量依存的に変化するため、茎葉のナトリウム含有率を指標としてイネのカリウム栄養状態あるいは土壌のカリウム供給量を評価する試みが行われている(赤井ら 2012; 長谷川ら 1990)。赤井ら(2012)はイネの茎葉ナトリウム含有率が増加し始める土壌カリウム飽和度 4%を基準としてカリウム施肥をすることを提案している。しかしイネのカリウム要求量は成長段階によって異なり(長谷川ら 1990)、またカリウムの機能が乾燥ストレス耐性(Song *et al.* 2014; Zain *et al.* 2014)や病虫害抵抗性(Maschmann *et al.* 2010; Prabhu *et al.* 1999)と関係していることからカリウム要求量は環境要因によっても変動すると推定した。したがって葉身の *OsHKT2;1* 発現レベルを栽培期間中に解析することで、生育途中で一過的に起こるカリウム不足をリアルタイムで診断できると考えた。カリウム不足時に地上部で *OsHKT2;1* を高発現するイネ品種を用いれば、栽培期間中の作物のカリウム栄養診断や土壌のカリウム供給能力のバイオアッセイに役立つだろう。

本研究の第 1 章の検討から、根におけるナトリウムの取り込みと比べて根から地上部へのナトリウムの移行は制限されていることが示唆された(図 1 - 1 d, e)。また第 4 章の検討から根でのナトリウムの取り込みは主に *OsHKT2;1* を介して行われ、根から地上部へのナトリウム移行促進には他の遺伝子が関わるということが示唆された(図 4 - 3 e, f)。したがって地上部により多くのナトリウムを蓄積するイネ品種を作出するためには、地上部へのナトリウム輸送機構を明らかにすることが必要である。織田(2013)は呼吸阻害剤を用いた検討から、カリウムが十分供給される条件では根から地上部へのナトリウムの移行が ATP 依存的な機構で抑制されていることを明らかにした。根から地上部へのナトリウム移行抑制機構としては、ノナボクラの耐塩性に寄与する QTL 遺伝子 *OsHKT1;5* がこれまでに報告されている(Ren *et al.* 2005)。*OsHKT1;5* は根において木部柔細胞にナトリウムを再回収し地上部への移行を抑制する(Ren *et al.* 2005)。この *OsHKT1;5* と同様の機能を持つシロイヌナズナの *AtHKT1;1* は、根における導管からのナトリウム再回収(Davenport *et al.* 2007)に加え、篩管を介したナトリウムの地上部から根への再転流を担うと報告されている(Berthomieu *et al.* 2003)。本研究のマイクロアレイ解析から *OsHKT1;5* の根における発現レベルはカリウム欠除処理後短時間で減少することが明らかとなり(表 7 - 2)、織田(2013)はリアルタイム PCR 法によりカリウム供給量の減少に伴って *OsHKT1;5* 発現レベルが減少することを明らかにした。これらの結果から *OsHKT1;5* がナトリウムの導管輸送及び篩管輸送の制御を介して、カリウムが十分供給される条件で地上部ナトリウム蓄積を抑制していると考えた。したがってイネの *OsHKT1;5* 発現レベルをカリウム不足時にさらに抑制できれば、地上部ナトリウム蓄積を促進することができるだろう。

イネはシロイヌナズナの細胞膜局在型 Na^+/H^+ アンチポーター-salt overly sensitive 1 (SOS1) のホモログである *OsSOS1* を有している。シロイヌナズナの *AtSOS1* を導入したイネは耐塩性が向上することが報告されている(Martínez-Atienza *et al.* 2007)。またシロイヌナズナ *sos1* 変異株の地上部ナトリウム含有率は弱い塩ストレス条件(25 mM NaCl)では野生株のそれと比べて低く、一方で深刻な塩ストレス条件(100 mM NaCl)では野生株の地上部ナトリウム含有率よりも高かった(Shi *et al.* 2002)。この結果は SOS1 が地上部のナトリウム蓄積を制御することを示唆している。したがって *OsSOS1* のカリウム不足時の機能を明らかにすることで、地上部ナトリウム蓄積促進に有用な知見となるだろう。

ナトリウムを多く蓄積するだけでなく、組織へ分配する機構も重要であると考え。近年、*OsHKT1;4* がイネ地上部において葉鞘から葉身へのナトリウムの移行を制御することが報告された(Costaftis *et al.* 2012)。また *OsHKT1;1* と *OsHKT1;3* はナトリウム選択的な輸送体タンパクをコードしており、前者は主に根の表皮、外皮、皮層で発現し、後者は主に成熟した葉身や根の篩管で発現する(Jabnourne *et al.* 2009)。このことは *OsHKT1;1* が根におけるナトリウムの取り込みに、*OsHKT1;3* が地上部と根の間のナトリウム長距離輸送に関与することを示唆している。また成熟葉の細胞においてナトリウムを液胞内に隔離する Na^+/H^+ アンチポーター 遺伝子 *OsNHX1* は、若い葉へのナトリウム移行を抑制すると報告されている(Fukuda *et al.* 2004)。イネは複数の *OsNHXs* を有しており(Fukuda *et al.* 2011)、それらが植物体内のナトリウムの分配を抑制的に制御しているかもしれない。これらのナトリウム輸送体は主にイネの耐塩性機構として研究されている。今後代替栄養素としてのナトリウムの利用という観点から様々なナトリウム輸送体のカリウム不足時の機能について明らかになれば、カリウム利用効率の高いイネ品種作出に役立つと考えた。

発表論文

1. Miyamoto T, Ochiai K, Takeshita S, Match T 2012: Identification of quantitative trait loci associated with shoot sodium accumulation under low potassium conditions in rice plants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **58**, 728 – 736.
2. Miyamoto T, Ochiai K, Nonoue Y, Matsubara K, Yano M, Match T 2015: Expression level of the sodium transporter gene *OsHKT2;1* determines sodium accumulation of rice cultivars under potassium-deficient conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, in press, DOI.10.1080/00380768.2015.1005539.

投稿準備中

3. Miyamoto T, Ochiai K, Match T: Genetic loci derived from a tropical *japonica* cultivar enhance sodium accumulation of potassium-deficient rice plants. in preparation.
4. Miyamoto T, Ochiai K, Match T: DNA polymorphism in the *cis*-element causes *OsHKT2;1* expression diversity in rice cultivars. in preparation.

謝辞

本研究を行うにあたってお世話になった皆様に心より感謝致します。

間藤徹教授には研究のねらい、意義についてディスカッションしていただき、また実験が行き詰まった際の御助言をいただきました。

落合久美子助教授には直接実験を御指導いただき、実験の進め方や得られた結果の解釈について相談にのっていただきました。

小林優准教授にはセミナーや学会発表の際、自分では考え至らなかった貴重な御意見をいただきました。

農業生物資源研究所の矢野博士からは、染色体部分置換系統の種子の供与を受けました。

植物栄養学研究室の皆様には実験についてディスカッションしていただき、また心の支えになっていただきました。

ありがとうございました。

最後になりましたが、常々私の健康を気遣い、研究生活を支えてくださった両親に感謝します。

引用文献

- Armengaud P., Breitling R., Amtmann A. (2004) The potassium-dependent transcriptome of Arabidopsis reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiol.* **136**, 2556–2576.
- Bañuelos M. A., Garciadeblas B., Cubero B., Rodríguez-Navarro A. (2002) Inventory and Functional Characterization of the HAK Potassium Transporters of Rice. *Plant Physiol.*, **130**, 784–795.
- Benito B., Garciadeblas B., Rodrigues-Navarro A. (2012) HAK transporters from *Physcomitrella patens* and *Yarrow lipolytica* mediate sodium uptake. *Plant Cell Physiol.*, **53**, 1117–1123.
- Berthomieu P. *et al.* (2003) Functional analysis of *AtHKT1* in Arabidopsis shows that Na^+ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.*, **22**, 2004–2014.
- Chen H., Chen W., Zhou J., He H., Chen L., Chen H., Deng X. W. (2012) Basic leucine zipper transcription factor OsbZIP16 positively regulated drought resistance in rice. *Plant Sci.*, **193–194**, 8–17.
- Cotsaftis O., Plett D., Shirley N., Tester M., Hrmova M. (2012) A Two-Stage Model of Na^+ Exclusion in Rice Explained by 3D Modeling of HKT Transporter and Alternative Splicing. *Plos One*, **7**, e39865.
- Dai X., Ouyang Z., Li Y., Wang H. (2013) Variation in yield gap induced by nitrogen, phosphorus and potassium fertilizer in north China plain, *Plos one*, **8**, e82147.
- Davenport R. J., Muñoz-Mayor A., Jha D., Essah P. A., Rus A., Tester M. (2007) The Na^+ transporter *AtHKT1;1* controls retrieval of Na^+ from the xylem in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.*, **30**, 497–507.
- Delannoy E., Stanley W. A., Bond C. S., Small I. D. (2007) Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 1643–1647.

- Ding X., Hou X., Xie K., Xiong L. (2009) Genome-wide identification of BURP domain-containing genes in rice reveals a gene family with diverse structures and responses to abiotic stresses. *Planta*, **230**, 149–163.
- Dorbermann A., Cruz P. C. S., Cassman K. G. (1996) Fertilizer inputs, nutrient balance, and soil nutrient-supplying power in intensive, irrigated rice systems. I . Potassium uptake and K balance. *Nutr. Cycl. Agroecosyst*, **46**, 1–10.
- Dubouzet J. G., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E. G., Miura S., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.*, **33**, 751–763.
- Eagle D. J. (1963) Potassium Availability to Plants. *Nature*, **198**, 558–560.
- Ebitani T., Takeuchi Y., Nonoue Y., Yamamoto T., Takeuchi K., Yano M. (2005) Construction and Evaluation of Chromosome Segment Substitution Lines Carrying Overlapping Chromosome Segments of *indica* Rice Cultivar ‘Kasalath’ in a Genetic Background of *japonica* Elite Cultivar ‘Koshihikari’ . *Breed. Sci.*, **55**, 65–73.
- Fang Y., You J., Xie K., Xie W., Xiong L. (2008) Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Mol. Genet. Genomics*, **280**, 547–563.
- FAO (2008) Current World Fertilizer Trends and Outlook to 2011/12, FAO, Roma, Italy.
- Figdore S. S., Gabelman W. H., Gerloff G. C. (1987) The accumulation and distribution of sodium in tomato strains differing in potassium efficiency when grown under low-K stress. *Plant Soil*, **99**, 85–92.
- Flowers T. J., Lauchli A. (1983) Sodium Versus Potassium: Substitution and Compartmentation. *In* Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Volume 15 B Inorganic Plant Nutrition, Eds. A Lauchli, RL Bielecki, pp. 651–681. Springer-Verlag, Berlin Germany.
- Frigerio M., Alabad D., Pérez-Gómez J., García-Cárcel L., Phillips A. L., Hedden P., Blázquez M. A. (2006) Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **142**, 553–563.

- Fukuda A., Nakamura A., Tagiri A., Tanaka H., Miyao A., Hirochika H., Tanaka Y. (2004) Function, Intracellular Localization and the Importance in Salt Tolerance of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter from Rice. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 146–159.
- Fukuda A., Nakamura A., Hara N., Toki S., Tanaka Y. (2011) Molecular and functional analysis of rice NHX-type Na⁺/H⁺ antiporter genes. *Planta*, **233**, 175–188.
- Garciadeblas B., Senn M. E., Banuelos M. A., Rodrigues-Navarro A. (2003) Sodium Transporter and HKT Transporters: the Rice Model. *Plant J.*, **34**, 788–801.
- Golldack D., Su H., Quigley F., Kamasani U. R., Munoz-Garay C., Balderas E., Popova O. V., Bennett J., Bohnert H. J., Pantoja O. (2002) Characterization of a HKT-type Transporter in Rice as a General Alkali Cation Transporter. *Plant J.*, **31**, 529–542.
- Hanaoka H., Uruguchi S., Takano J., Tanaka M., Fujiwara T. (2014) OsNIP3;1, a rice boric acid channel, regulates boron distribution and is essential for growth under boron-deficient conditions. *Plant J.*, **78**, 890–902.
- Hansen S.F., Harholt J., Oikawa A., Scheller H. V. (2012) Plant glycosyltransferases beyond CAZy: a perspective on DUF families. *Front. Plant Sci.*, **3**, 59, doi:10.3389/fpls.2012.00059.
- Heffer P. (2009) Assessment of fertilizer use by crop at the global level. 2006/07–2007/08. <http://www.fertilizer.org> (March, 2012).
- Heffer P., Prud'homme M. (2010) Fertilizer outlook 2010–2014. <http://www.fertilizer.org> (March, 2012)
- Hewitt E. J. (1966) The Composition of the Nutrient Solution. In Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition, Ed. E Hewitt, pp. 190. Farnham Royal Bucks, Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, UK.
- Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M., Korenaga T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 297–300.
- Hirsch R. E., Lewis B. D., Spalding E. P., Sussman M. R. (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science*, **280**, 918–921.
- Hood E. E., Gelvin S. B., Melchers L. S., Hoekema A. (1993) New Agrobacterium Helper Plasmids for Gene Transfer to Plants. *Transgenic Res.*, **2**, 208–218.

- Horie T., Yoshida K., Nakayama H., Yamada K., Oiki S., Shinmyo A. (2001) Two Types of HKT Transporters with Different Properties of Na⁺ and K⁺ Transport in *Oryza sativa*. *Plant J.*, **27**, 129–138.
- Horie T., Coata A., Kim T. H., Han M. J., Horie R., Leung H. Y., Miyao A., Hirochika H., An G., Schroeder J. I. (2007) Rice OsHKT2;1 Transporter Mediates Large Na⁺ Influx Components into K⁺-starved Roots for Growth. *EMBO J.*, **26**, 3003–3014.
- Horie T., Brodsky D. E., Costa A., Kaneko T., Schiavo F. L., Katsuhara M., Schroeder J. I. (2011 a) K⁺ Transport by the OsHKT2;4 Transporter from Rice with Atypical Na⁺ Transport Properties and Competition in Permeation of K⁺ over Mg²⁺ and Ca²⁺ Ions. *Plant Physiol.* **156**, 1493–1507.
- Horie T., Sugawara M., Okada T., Taira K., Kaohion-Nakayama P., Katsuhara M., Shinmyo A., Nakayama H. (2011 b) Rice sodium-insensitive potassium transporter, OsHAK5, confers increased salt tolerance in tobacco BY2 cells. *J. Biosci., Bioeng.*, **111**, 346–356.
- Huang J., Yang X., Wang M. M., Tang H. J., Ding L. Y., Shen Y., Zhang H. S. (2007) A novel rice C2H2-type zinc finger protein lacking DLN-box/EAR-motif plays a role in salt tolerance. *Biochim. Biophys. Acta*, **1769**, 220–227.
- Jabnourne M., Espeout S., Mieulet D. *et al.* (2009) Diversity in Expression Patterns and Functional Properties in the Rice HKT Transporter Family. *Plant Physiol.*, **150**, 1955–1971.
- Jia Y., Yang X., Islam E., Feng Y. (2008) Effects of potassium deficiency on chloroplast ultrastructure and chlorophyll fluorescence in inefficient and efficient genotypes of rice. *J. Plant Nutr.*, **31**, 2105–2118.
- Jiao Y., Wang Y., Xue D., Wang J. (2010) Regulation of *OsSPL14* by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. *Nature Genet.*, **42**, 541–544.
- Jiang B., Yue Y., Gao Y., Ma L., Sun S., Wu C., Hou W., Lam H. M., Han T. (2013) *GmFT2a* Polymorphism and Maturity Diversity in Soybeans. *Plos One*, **8**, e77474.
- Jung J. Y., Shin R., Schachtman D. P. (2009) Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**, 607–621.

- Kato A., Fujita S., Komeda Y. (2001) Identification and characterization of two genes encoding the eukaryotic initiation factor 4A in rice. *DNA Seq.*, **12**, 295–303.
- Khattab H. I., Emam M. A., Emam M. M., Helal N. M., Mohamed M. R. (2014) Effect of selenium and silicon on transcription factors NAC5 and DREB2A involved in drought-responsive gene expression in rice. *Biol. Plant.*, **58**, 265–273.
- Kim M. J., Ciani S., Schachtmann D. P. (2010) A peroxidase contributes to ROS production during *Arabidopsis* root response to potassium deficiency. *Mol. Plant*, **3**, 420–427.
- Kim M. J., Ruzicka D., Shin R., Schachtmann D. P. (2012) The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor RAP2.11 modulates plant response to low-potassium conditions. *Mol. Plant*, **5**, 1042–1057.
- Kojima Y., Ebana K., Fukuoka S., Nagamine T., Kawase M., (2005) Development of an RFLP-based rice diversity research set of germplasm. *Breed. Sci.*, **55**, 431–440.
- Krogh A., Larsson B., Heijne G. V., Sonnhammer E. L. L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Molecul. Biol.*, **305**, 567–580.
- Kuchenbuch R., Claassen N., Jungk A. (1986) Potassium availability in relation to soil moisture. *Plant soil*, **95**, 221–231.
- Lan W. Z., Wang W., Wang S. M., Li L. G., Buchanan B. B., Lin H. X., Gao J. P., Luan S. (2010) A Rice High-affinity Potassium Transporter (HKT) Conceals a Calcium-permeable Cation Channel. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **107**, 7089–7094.
- Lan W. Z., Lee S. C., Che Y. F., Jiang Y. Q., Luan S. (2011) Mechanistic analysis of AKT1 regulation by the CBL-CIPK-PP2CA interactions. *Mol. Plant*, **4**, 527–536.
- Lehr J. J. (1953) Sodium as a plant nutrient. *J. Sci. Food. Agric.*, **4**, 460–422.
- Li Y., Fan C., Xing Y., Jiang Y., Luo L., Sun L., Shao D., Xu C., Li X., Xiao J., He Y., Zhang Q. (2011) Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nature Genet.*, **43**, 1266–1270.
- Lim S. D., Hwang J. G., Jung C. G., Hwang S. G., Moon J. C., Jang C. S. (2013) Comprehensive analysis of the rice ring E3 ligase family reveals their functional diversity in response to abiotic stress. *DNA Res.*, **20**, 299–314.

- Liu J., Zhu J. K. (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, **280**, 1943–1945.
- Liu J., Ishitani M., Halfter U., Kim C. S., Zhu J. K. (2000) The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **97**, 3730–3734.
- Liu L. L., Ren H. M., Chen L. Q., Wang Y., Wu W. H. (2013) A protein kinase, calcineurin B-like protein-interacting protein kinase9, interacts with calcium sensor calcineurin B-like protein3 and regulates potassium homeostasis under low-potassium stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **161**, 266–277.
- Ma J. F., Shen R. F., Zhao Z. Q., Wissuwa M., Takeuchi Y., Ebitani T., Yano M. (2002) Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 652–659.
- Ma J. F., Tamai K., Yamaji N., Mitani N., Konishi S., Katsuhara M., Ishiguro M., Murata Y., Yano M. (2006) A silicon transporter in rice. *Nature*, **440**, 688–691.
- Ma J. F., Yamaji N., Mitani N., Tamai K., Konishi S., Fujiwara T., Katsuhara M., Yano M. (2007) An efflux transporter of silicon in rice. *Nature*, **448**, 209–213.
- Ma T., Hua W., Wang Y. (2012) Transcriptome Analysis of Rice Root Responses to Potassium Deficiency. *BMC Plant Biol.*, **12**, 161–173.
- Maathuis F. J. M., Sanders D. (1993) Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **191**, 302–307.
- Mallikarjuna G., Mallikarjuna K., Reddy M. K., Kaul T. (2011) Expression of OsDREB2A transcription factor confers enhanced dehydration and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnol. Lett.*, **33**, 1689–1697.
- Martinez-Atienza J., Xingyu J., Garcideblas B., Mendoza I., Zhu J. K., Pardo J. M., Quintero F. J. (2007) Conservation of the Salt Overly Sensitive Pathway in Rice. *Plant Physiol.*, **143**, 1001–1012.
- Maschmann E. T., Slaton N. A., Cartwright R. D., Norman R. J. (2010) Rate and timing of potassium fertilization and fungicide influence rice yield and stem rot. *Agron. J.*, **102**, 163–170.

- Mori M., Onishi K., Tokizono Y., Shinada H., Yoshimura T., Numao Y., Miura H., Sato T. (2011) Detection of a novel quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage derived from a tropical *japonica* rice variety Silewah. *Breed. Sci.*, **61**, 61–68.
- Moritsuka N., Yanai J., Kosaki T. (2004) Possible processes releasing nonexchangeable potassium from the rhizosphere of maize. *Plant Soil*, **258**, 261–268.
- McCouch S. R., Teytelman L., Xu Y. *et al.* (2002) Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.*, **9**, 199–207.
- Nakagawa T., Suzuki T., Murata S. *et al.* (2007 a) Improved Gateway Binary Vectors: High-Performance Vectors for Creation of Fusion Constructs in Transgenic Analysis of Plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2095–2100.
- Nakagawa Y., Hanaoka H., Kobayashi M., Miyoshi K., Miwa K., Fujiwara T. (2007 b) Cell-type specificity of the expression of *OsBOR1*, a rice efflux boron transporter gene, is regulated in response to boron availability for efficient boron uptake and xylem loading. *Plant Cell*, **19**, 2624–2635.
- Nakamura S., Abe F., Kawahigashi H. *et al.* (2011) A Wheat Homolog of MOTHER OF FT AND TFL1 Acts in the Regulation of Germination. *Plant Cell*, **23**, 3215–3229.
- National Institute of Agrobiological sciences (2013) *Tos17* Mutant Panel database. <http://www.tos.nias.affrc.go.jp> (May, 2015).
- Nelson J. C. (1997) QGENE: Software for marker-based genomic analysis and breeding. *Molecul. Breed.*, **3**, 239–245.
- Oomen R. J. F. J., Benito B., Sentenac H., Rodriguez-Navarro A., Talon M., Very A. A., Domingo C. (2012) HKT2;2/1, a K⁺-permeable Transporter Identified in a Salt-tolerance Rice Cultivar through Surveys of Natural Genetic Polymorphism. *Plant J.*, **71**, 750–762.
- Ozawa K. (2009) Establishment of a high efficiency Agrobacterium-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.*, **176**, 522–527.
- Pettersson S., Jensen P. (1983) Variation among species and varieties in uptake and utilization of potassium. *Plant Soil*, **72**, 231–237.

- Prabhu A. S., Barbosa F. M. P., Filippi M. C. Zimmermann F. J. P. (1999) Relationship between potassium fertilization and panicle blast severity in upland rice. *Pesq. Agropec. Bras.*, **34**, 1729–1732.
- Qiu Q. S., Guo Y., Dietrich M. A., Schumaker K. S., Zhu J. K. (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **99**, 8436–8441.
- Qiu Q. S., Guo Y., Quintero F. J., Pardo J. M., Schumaker K. S., Zhu J. K. (2004) Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana* by salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 207–215.
- RGRC (2003a) Genotype data of backcross inbred lines (BILs) from Koshihikari/Kasalath/Koshihikari. <http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/jp/data/KK-BIL182-20030506.pdf> (March, 2012).
- RGRC (2003 b) Genotype data of chromosome segment substitution lines (CSSLs) from Koshihikari/Kasalath. <http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/jp/data/KK-SL39-20030506.pdf> (March, 2012).
- Ren Z. H., Gao J. P., Li L. G., Cai X. L., Huang W., Chao D. Y., Zhu M. Z., Wang Z. Y., Luan S., Lin H. X. (2005) A Rice Quantitative Trait Locus for Salt Tolerance Encodes a Sodium Transporter. *Nature Genet.*, **37**, 1141–1146.
- Ren X. L., Qi G. N., Feng H. Q., Zhao S., Zhao S. S., Wang Y., Wu W. H. (2013) Calcineurin B-like protein CBL10 directly interacts with AKT1 and modulates K⁺ homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **74**, 258–266.
- Rice Annotation Project (2008) The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): 2008 update. *Nucl. Acids Res.*, **36**, 1028–1033.
- Rubio F., Gassmann W., Schroeder J. I. (1995) Sodium-Driven Potassium Uptake by the Plant Potassium Transporter HKT1 and Mutations Conferring Salt Tolerance. *Science*, **270**, 1660–1663.
- Sarkar N. K., Thapar U., Kundnani P., Panwar P., Grover A. (2013 a) Functional relevance of J-protein family of rice (*Oryza sativa*). *Cell Stress Chaperones*, **18**, 321–331.

- Sarkar G. K., Chattopadhyay A. P. Sanyal S. K. (2013 b) Release pattern of non-exchangeable potassium reserves in Alfisols, Inceptisols and Entisols of West Bengal, India. *Geoderma*, **207–208**, 8–14.
- Sassi A., Mieulet D., Khan I., Moreau B., Gaillard I., Sentenac, Very A. A. (2012) The Rice Monovalent Cation Transporter OsHKT2;4: Revisited Ionic Selectivity. *Plant Physiol.*, **160**, 498–510.
- Saito H. *et al.* (2015) The jasmonate-responsive GTR1 transporter is regulated for gibberellin-mediated stamen development in Arabidopsis. *Nature Commun.*, **6**, DOI: 10.1038/ncomms7095.
- Sato Y., Antonio B., Namiki N., Takehisa H., Minami H., Kamatsuki K., Sugimoto K., Shimizu Y., Hirochika H., Nagamura Y. (2010) RiceXPro: a platform for monitoring gene expression in japonica rice grown under natural field conditions. *Nucl. Acids Res.*, **39**, 1141–1148.
- Sato Y., Takehisa H., Kamatsuki K., Minami H., Namiki N., Ikawa H., Ohyanagi H., Sugimoto K., Antonio B., Nagamura Y. (2013) RiceXPro Version 3.0: expanding the informatics resource for rice transcriptome. *Nucl. Acids Res.*, **41**, D1206–D1213.
- Schachtman D. P., Schroeder J. I. (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, **370**, 655–658.
- Schroeder J. I., Fang H. H. (1991) Inward-rectifying K⁺ channels in guard cells provide a mechanism for low-affinity K⁺ uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11583–11587.
- Shankar A., Singh A., Kanwar P., Strivastava A. K., Pandey A., Suprasanna P., Kapoor S., Pandey G. K. (2013) Gene Expression Analysis of Rice Seedling under Potassium Deprivation Reveals Major Changes in Metabolism and Signaling Components. *Plos One*, **8**, e70321.
- Sharma A., McClung A. M., Pinson S. R. M., Kepiro J. L., Shank A. R., Tabien R. E., Fjellstrom R. (2009) Genetic mapping of sheath blight resistance QTLs within tropical japonica rice cultivars. *Crop Sci.*, **49**, 256–264.

- Shi H., Ishitani M., Kim C., Zhu J. K. (2000) The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **97**, 6896–6901.
- Shi H., Quintero F. J., Pardo J. M., Zhu J. K. (2002) The Putative Plasma Membrane Na⁺/ H⁺ Antiporter SOS1 Controls Long-Distance Na⁺ Transport in Plants. *Plant Cell*, **14**, 465–477.
- Shin R., Berg R. H., Schachtman D. P. (2005) Reactive oxygen species and root hairs in Arabidopsis root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant Cell Physiol.*, **46**, 1350–1357.
- Song Z. Z., Yang S. Y., Zuo J., Su Y. H. (2014) Over-expression of *ApKUP3* enhances potassium nutrition and drought tolerance in transgenic rice. *Biol. Plant.*, **58**, 649–658.
- Sonnhammer E. L. L., Heijne G. V., Krogh A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *In* Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, Eds. Glasgow J., Littlejohn T., Major F., Lathrop R., Sankoff D., Sensen C., pp. 175–182, Menlo Park, CA.
- Strayer C. Oyama T., Schultz T. F., Raman R., Somers D. F., Más P., Panda S., Kreps J. A., Kay S. A. (2000) Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, **289**, 768–771.
- Suh J. P., Jeung J. U., Lee J. I., Choi Y. H., Yea J. D., Virk P. S., Mackill D. J., Jena K. K. (2010) Identification and analysis of QTLs controlling cold tolerance at the reproductive stage and validation of effective QTLs in cold-tolerant genotypes of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **120**, 985–995.
- Takano J., Miwa K., Fujiwara T. (2008) Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends Plant Sci.*, **13**, 451–457.
- Toki S., Hara N., Ono K., Onodera H., Tagiri A., Oka S., Tanaka H. (2006) Early Infection of Scutellum Tissue with *Agrobacterium* Allows High-speed Transformation of Rice. *Plant J.*, **47**, 969–976.

- USDA (2011) Fertilizer use and price. <http://www.ers.usda.gov/Data/FertilizerUse/> (March, 2012).
- USGS (2012) Mineral Commodity summaries 2012. <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2012/mcs2012.pdf> (March, 2012).
- Valliyodan B., Nguyen H. T. (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**, 189–195.
- Wakeel A., Farooq M., Qadir M., Schubert S. (2011) Potassium Substitution by Sodium in Plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **30**, 401–413.
- Wang Y., Wu W. H. (2010) Plant sensing and signaling in response to K⁺-deficiency. *Mol. Plant*, **3**, 280–287.
- Wang H. Y., Shen Q. H., Zhou J. M., Wang J., Du C. W., Chen X. Q. (2011) Plants use alternative strategies to utilize nonexchangeable potassium in minerals. *Plant Soil*, **343**, 209–220.
- Wang H., Zhang M., Guo R., Shi D., Liu B., Lin X., Yang C. (2012 a) Effects of salt stress on ion balance and nitrogen metabolism of old and young leaves in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biol.*, **12**, doi:10.1186/1471-2229-12-194.
- Wang H., Wu Z., Han J., Zheng W., Yang C. (2012 b) Comparison of ion balance and nitrogen metabolism in old and young leaves of alkali-stressed rice plants. *Plos One*, **7**, e37817.
- Wang J. C., Xu H., Zhu Y., Liu Q. Q., Cai X. L. (2013) OsbZIP58, a basic leucine zipper transcription factor, regulates starch biosynthesis in rice endosperm. *J. Exp. Bot.*, **64**, 3453–3466.
- Wang Y., Wu W. H. (2013) Potassium transport and signaling in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **64**, 451–476.
- Wihardjaka A., Kirk G. J. D., Abdulrachman S., Mamaril C. P. (1999) Potassium balances in rainfed lowland rice on a light-textured soil. *Field Crops Res.*, **64**, 237–247.
- White P. J., Hammond J. P., King G. J., Bowen H. C., Hayden R. M., Meacham M. C., Sprachlen W. P., Broadley M. R. (2010) Genetic analysis of potassium use efficiency in *Brassica oleracea*. *Ann. Bot.*, **105**, 1199–1210.

- Woodend J. J., Glass A. D. M. (1993) Genotype–environment interaction and correlation between vegetative and grain production measures of potassium use–efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under potassium stress. *Plant Soil*, **151**, 39–44.
- Wu Y., Hu Y., Xu G. (2009 a) Interactive effects of potassium and sodium on root growth and expression of K/Na transporter genes in rice. *Plant Growth Reg.*, **57**, 271–280.
- Wu X., Shiroto Y., Kishitani S., Ito Y., Toriyama K. (2009 b) Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. *Plant Cell Rep.*, **28**, 21–30.
- Xu J., Li H. D., Chen L. Q., Wang Y., Liu L. L., Liu H., Wu W. H. (2006) A protein kinase, interacting with two calcineurin B–like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*, **125**, 1347–1360.
- Yamaguchi J., Miyamoto N., Hirotsu S., Laza R. C., Nemoto K. (2004) QTLs for branching, floret formation, and pre–flowering floret abortion of rice panicle in a temperate *japonica* × tropical *japonica*. *Theor. Appl. Genet.*, **109**, 1555–1561.
- Yamaji N., Xia J., Mitani–Ueno N., Yokosho K., Ma J. F. (2013) Preferential of zinc to developing tissue in rice is mediated by P–type heavy metal ATPase OsHMA2. *Plant Physiol.*, **162**, 927–939.
- Yang X. E., Liu J. X., Wang W. M., Li H., Luo A. C., Ye Z. Q., Yang Y. (2003) Genotypic differences and some associated plant traits in potassium internal use efficiency of lowland rice (*Oryza sativa* L.) *Nutr. Cycl. Agroecosyst.*, **67**, 273–282.
- Yang J., Zhang J., Liu K., Wang Z., Liu L. (2007) Involvement of polyamines in the drought resistance of rice. *J. Exp. Bot.*, **58**, 1545–1555.
- Yang T., Zhang S., Hu Y., Wu F., Hu Q., Chen G., Cai J., Wu T., Moran N., Yu L., Xu G. (2014) The role of a potassium transporter OsHAK5 in potassium acquisition and transporter from roots to shoots in rice at low potassium supply levels. *Plant Physiol.*, **166**, 945–959.

Yoshida S., Castaneda L. (1969) Partial Replace of Potassium by Sodium in the Rice under Weakly Saline Conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **15**, 183–186.

Zain N. A. M., Ismail M. R., Puteh A., Mahmood M., Islam M. R. (2014) Drought tolerance and ion accumulation of rice following application of additional potassium fertilizer. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **45**, 2502–2514.

Zheng X., Chen B., Lu G., Han B. (2009) Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 985–989.

Zhou J., Liu Q., Zhang F., Wang Y., Zhang S., Cheng H., Yan L., Li L., Chen F. Xie X. (2014) Overexpression of OsPIL15, a phytochrome-interacting factor-like protein gene, represses etiolated seedling growth in rice. *J. Integr. Plant Biol.*, **56**, 378–387.

赤井直彦・鷺尾建紀・田淵恵・石橋英二 (2012) 岡山県南部水田土壌の化学性調査および水稻茎葉中のナトリウム含有率に基づくカリウム減肥指針の作成、日本土壌肥料学会誌、**83**, 266–273.

織田有紀子 (2013) イネ地上部からのナトリウム排除の機構に関する研究、京都大学農学部学士論文

清野馨・田村有希博・竹内誠・上沢正志 (1992) 寒冷地水稻のナトリウムの吸収と登熟との関係、日本土壌肥料学会誌、**63**, 25–30.

高橋栄一・前嶋一宏 (1998) ナトリウムの有用性に関する比較植物栄養学的研究、近畿大学農学部紀要、**31**, 57–72.

武下沙矢 (2008) イネのナトリウム吸収の品種間差の研究—染色体部分置換系統を用いた検討—、京都大学農学部学士論文

長谷川栄一・斉藤公夫・安井孝臣 (1987) 水稻のカリウム及びナトリウム吸収、宮城県農業センター研究報告、**55**, 19–36.

長谷川栄一・斉藤公夫・安井孝臣 (1990) 水稻のナトリウム吸収から推定した水稻茎葉の最適カリウム含有率と施肥法についての一考察、日本土壌肥料学雑誌、**61**, 649–652.

宮本託志 (2009) イネにおけるナトリウムのカリウム代替機能の検討、京都大学農学部
学士論文

籾井隆志・井澤敏彦 (2007) 77 年間継続した四要素無施肥区と堆肥施用区にみられる
水稻玄米収量の経年推移と各要素の施用効果、日本作物学会記事、76, 288-
294.

参考文献

「マイクロアレイ実験&解析テキスト」編集・発行 独立行政法人 農業生物資源研究所