

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：82104

研究種目：基盤研究(B)（海外学術調査）

研究期間：2015～2019

課題番号：15H05257

研究課題名（和文）ガーナ国ボルタ川流域におけるイネのモレキュラーモニタリング

研究課題名（英文）Transcriptome analysis using rice genetic resources in sulfur-deficient soil conditions of Ghana

研究代表者

圓山 恭之進（Maruyama, Kyonoshin）

国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・主任研究員

研究者番号：10425530

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、作物学的生産評価とゲノム解析の統合研究を行い、ガーナ北部ボルタ川流域の硫黄欠乏環境下における米の増産に向けたアフリカ稲作の改良点を検討した。具体的にはガーナ北部ボルタ川流域の土壌を用いて、栽培試験を行い、硫黄欠乏耐性品種（DJ123）を選抜した。さらに、比較トランスクリプトーム解析を行い、硫黄欠乏土壌環境下においてDJ123で特異的に発現する遺伝子を選抜して、過剰発現型形質転換イネを作出した結果、選抜された遺伝子は、根のバイオマス量に関連していることが示唆された。この遺伝子を発現遺伝子マーカーとして、分子育種をすることで、ガーナの稲作に貢献できる可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はフィールドの研究者と植物分子生理の研究者の異分野連携研究で、ガーナの硫黄欠乏圃場における主要な生産性関連要因を分子レベルで解析したものである。これまで硫黄欠乏応答性遺伝子の研究は、主にシロイヌナズナを用いて実験室で行われてきた。本研究では硫黄欠乏が問題になっているガーナ北部ボルタ川流域の土壌を用いて、イネから網羅的に硫黄欠乏応答性遺伝子を選抜できたことは、この研究分野の発展に貢献できたと思われる。さらに、本研究で硫黄欠乏耐性品種を選抜し、分子育種に活用できる候補遺伝子を選抜できたため、ガーナ等の硫黄欠乏土壌が問題になっているサブサハラアフリカの稲作に貢献できる可能性があると思われる。

研究成果の概要（英文）：Sulfur is an essential macronutrient for plants, and its deficiency significantly affects the growth. Soil sulfur deficiency has been found to be an important factor that constrains the development of appropriate rice cultivation practices in the floodplain of northern Ghana. Such sulfur deficient soils are also reported to be widespread in West Africa. In this study, several rice cultivars were grown in sulfur deficient soils. We found that the growth of DJ123 was not retarded compared with other varieties in sulfur deficient soils. To characterize rice cultivars sulfur-responsive genes, a transcriptome analysis of Nipponbare, IR64, and DJ123 was conducted using microarrays. In addition, we used principal component analysis (PCA) to compare the sulfur-responsive genes and selected on representative sulfur-responsive genes with PCA loading. We found that the levels of several gene transcripts were significantly higher in DJ123 than in Nipponbare and IR64 in sulfur deficient soils.

研究分野：植物分子生理

キーワード：硫黄欠乏 トランスクリプトーム イネ遺伝資源 ガーナ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ガーナを含むサブサハラアフリカでは、米の需要が急速に増加している。さらに、気候変動等による農業被害等で食料供給が不安定化しているため、米の安定生産・増産が課題になっている。この課題解決のために、アフリカ稲作振興のための共同体 (Coalition for African Rice Development : CARD) はフェーズ 1 (2008 年~2018 年) で、水稻・陸稲遺伝資源の評価および改良、アジア型水田基盤整備および水稻栽培モデルの開発、河川流域の稲作に効果的な生産技術の開発を行い、米の生産量を 2 倍にする目標をたてた。辻本らは、ガーナ北部ボルタ川流域は、イネの生育に必要な窒素供給力は、土壌有機物の蓄積等で河川や後背湿地に近づくにつれて、対数関数的に増加するが、硫黄欠乏がイネの生育を著しく阻害することを明らかにした (Tsujiimoto et al. 2013)。本研究では、この先行研究を活かして、飛躍的に進歩しているゲノム解析技術で、ガーナの稲作圃場の生産性に関連する主要な要因を分子レベル (遺伝子発現レベル) で明らかにできれば、生産性向上に向けた稲作の改良点を検討できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、アフリカの圃場を対象とした作物学的生産評価と飛躍的に進歩しているゲノム解析を統合して、圃場におけるイネの生育や収量の律速要因を明らかにして、米の増産に向けたアフリカの稲作の改良点を考察することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) バイオマス量の比較解析

ガーナ北部ボルタ川流域の土壌を用いて、硫黄 (硫安) の施肥試験を行い、イネ品種である IR64、日本晴 (NB)、DJ123 の生育初期の地上部及び地下部のバイオマス量の比較解析を行う。

#### (2) イネの硫黄欠乏誘導性硫酸イオントランスポーターの選抜

代表的なイネの硫黄欠乏誘導性遺伝子を選抜するために、既知の硫黄欠乏誘導性遺伝子であるシロイヌナズナの硫酸イオントランスポーター遺伝子と相同性の高い、イネの硫酸イオントランスポーター遺伝子を分子系統解析で選抜する。

#### (3) 硫黄欠乏誘導性硫酸イオントランスポーターの遺伝子発現解析

硫安施肥栽培試験をした IR64、NB、DJ123 の地下部から RNA を調製して、定量 PCR 法でイネの硫酸イオントランスポーターの遺伝子発現解析を行う。

#### (4) 網羅的な硫黄欠乏応答性遺伝子の比較解析

硫安施肥栽培試験をした IR64、NB、DJ123 の地下部から RNA を調製して、マイクロアレイで、網羅的な遺伝子発現解析を行い、主成分分析で硫黄欠乏耐性品種である DJ123 で特異的に発現する遺伝子を選抜する。

#### (5) DJ123 で特異的に発現する遺伝子の過剰発現体の解析

DJ123 で特異的に発現する遺伝子を NB に形質転換した後、表現型を観察して、遺伝子の機能を検討する。さらに、これらの解析結果を踏まえて、米の増産に向けたアフリカの稲作の改良点を考察する。

### 4. 研究成果

#### (1) DJ123 は硫黄欠乏条件で、地下部のバイオマス量が増加する

ガーナ北部ボルタ川流域の土壌を用いて、IR64、NB、DJ123 の硫安施肥栽培試験を行った結果、3 品種ともに施肥に比べて、無施肥の地上部のバイオマス量が減少した。一方、地下部においては、IR64 と NB は大きな変化はなかったが、DJ123 は施肥より無施肥でバイオマス量が増加した (図 1)。DJ123 は硫黄欠乏条件において、耐性であることが示唆された。

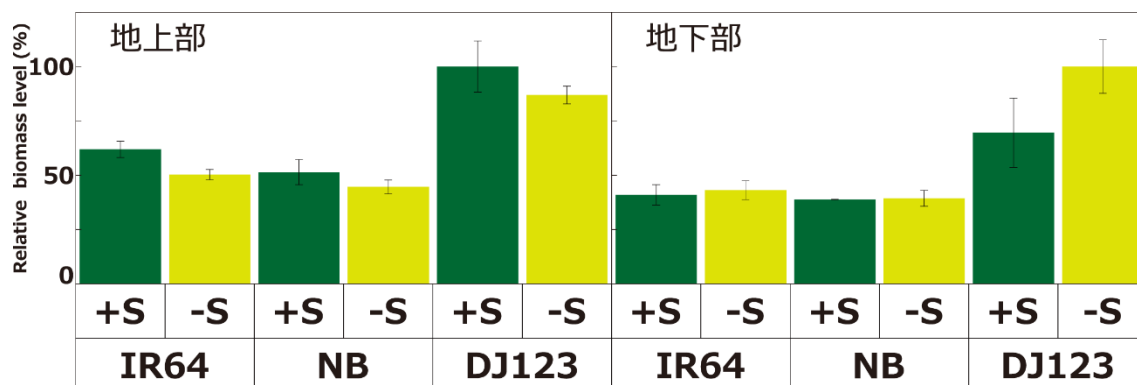


図 1. ガーナ北部のボルタ川流域の土壌を用いた硫黄 (硫安) の施肥試験

(2) 硫酸イオントランスポーターは4グループに分類される

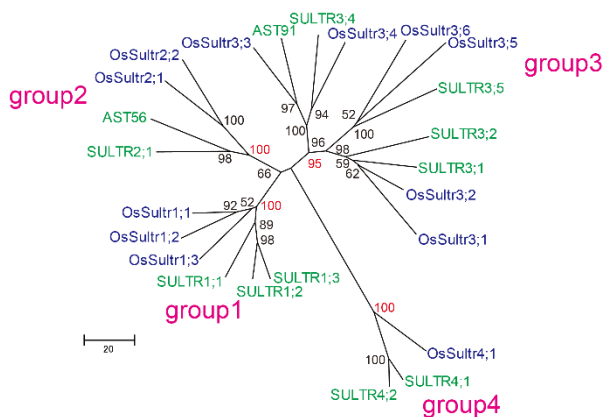
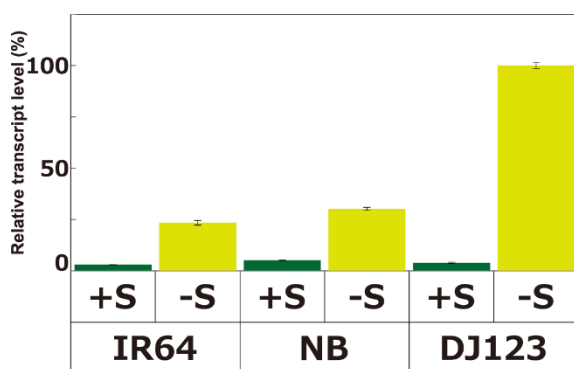


図 2. 硫酸イオントランスポーターの分子系統樹

イネの硫黄欠乏誘導性遺伝子を選抜するために、既知の硫黄欠乏誘導性遺伝子であるシロイヌナズナの硫酸イオントランスポーターと相同性が高い、イネの硫酸イオントランスポーターを分子系統解析で選抜した。イネの硫酸イオントランスポーターはシロイヌナズナの硫酸イオントランスポーターと同様に4グループに分類され、顕著な硫黄欠乏誘導性が報告されているグループ1に分類されるイネの硫酸イオントランスポーターは3遺伝子存在した(図2)。

(3) OsSultr1;1は硫黄欠乏誘導性遺伝子である



硫安施肥栽培試験をした IR64、NB、DJ123 の地下部から RNA を調製して、硫酸イオントランスポーターのグループ1に分類される OsSultr1;1 の mRNA の蓄積量を定量 PCR 法で解析した結果、3品種の OsSultr1;1 は硫安施肥より無施肥の栽培環境下で、mRNA の蓄積量が増加することがわかった。また、無施肥の栽培環境下では IR64 や NB より DJ123 の OsSultr1;1 は約3倍の mRNA が蓄積していることもわかった(図3)。

図 3. 硫安施肥環境下の OsSultr1;1 の遺伝子発現解析

(4) 硫黄欠乏環境下で DJ123 特異的に発現する遺伝子が存在する

硫安施肥栽培試験を行った IR64、NB、DJ123 の地下部から RNA を調製して、マイクロアレイで、網羅的に硫黄欠乏誘導性遺伝子を選抜した。mRNA の蓄積量が増加する遺伝子数は、1,200 (IR64)、21,393 (NB)、10,042 (DJ123) (Benjamini and Hochberg false discovery rate [FDR]:  $p < 0.05$ ; fold change [FC]  $> 2$ )、減少する遺伝子数は、17,662 (IR64)、1,267 (NB)、1,836 (DJ123) (FDR,  $p < 0.05$ ; FC  $< 0.5$ ) であった。比較トランスクリプトーム(主成分分析)を行った結果、DJ123 の無施肥、IR64 と NB の無施肥、IR64、NB、DJ123 の施肥の3つに分類された(図4A)。さらに、主成分負荷量を解析した結果、DJ123 の無施肥で特異的に発現する遺伝子 (MTI3B) が存在することがわかった(図4B)。MTI3B はメタロチオネインをコードしている。メタロチオネインは、動植物に存在しており、重金属イオンと結合できることから、必須微量元素の恒常性維持や重金属元素の解毒等の役割を果たしていると考えられている。また、抗酸化性タンパク質としても注目されている。

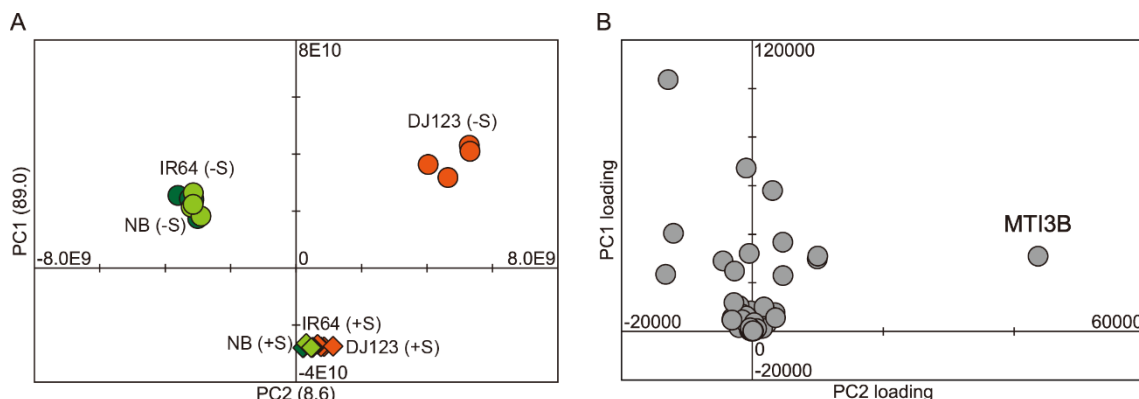
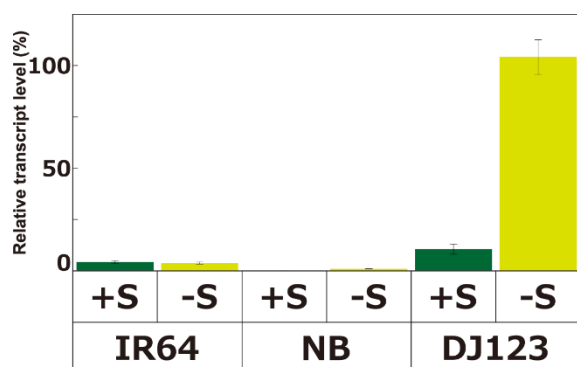


図 4. 硫安の施肥環境下における比較トランスクリプトーム解析 A は主成分分析、B は主成分負荷量を示す。

(5) MIT3B は DJ123 特異的な硫黄欠乏誘導性遺伝子である



硫黄施肥栽培試験をした IR64、NB、DJ123 の地下部から RNA を調製して、主成分分析で選抜された MIT3B の mRNA の蓄積量を定量 PCR 法で解析した結果、MIT3B は DJ123 特異的に硫黄施肥より無施肥の栽培環境下で、mRNA の蓄積量が増加することがわかった (図 5)。また、MIT3B は、DJ123 において、硫黄施肥環境下で IR64 と NB に比べて、mRNA の蓄積量が高いこともわかった。これらの解析によって、MIT3B は DJ123 の硫黄欠乏耐性に関与していることが示唆された。

図 5. 硫黄施肥環境下の MIT3B の遺伝子発現解析

(6) MIT3B 遺伝子の過剰発現型形質転換体の評価

MIT3B 遺伝子とユビキチンプロモーターを結合した後、NB に導入して、MIT3B 遺伝子過剰発現型形質転換イネ (OX a と OX b) を作出した。DJ123、NB、OX a、OX b を MS 培地 (図 6A) とイネ用培養土 (図 6B) で栽培試験を行った結果、OX a 及び OX b は NB より根のバイオマス量が増加することが示唆された。これらの結果から MIT3B は DJ123 の根のバイオマス量に関連していることが示唆された。今後はガーナの硫黄欠乏土壌を用いて、OX a と OX b の栽培試験を行う必要があるが、形質転換イネをガーナの圃場で栽培することができないため、ガーナから硫黄欠乏土壌を大量に輸入して、栽培試験を行う必要がある。また、MIT3B がガーナの硫黄欠乏土壌に対して有効な遺伝子であることが示唆されたため、MIT3B 遺伝子の発現量をマーカーにした分子育種を行うことで、ガーナの稲作に貢献できると考えられる。



図 6. MIT3B 遺伝子過剰発現型形質転換イネを用いた栽培試験 A は MS 培地を用いた栽培試験、B はイネ用培養土を用いた栽培試験を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 圓山恭之進 辻本泰弘 近藤勝彦 櫻井哲也
2. 発表標題 硫黄欠乏土壤条件下におけるイネ遺伝資源を用いた比較トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻本泰弘 圓山恭之進 近藤勝彦
2. 発表標題 在来アウス品種のDJ123が硫黄欠乏下で根系の発達を促進する
3. 学会等名 第246回日本作物学会講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	辻本 泰弘  (Tsujiimoto Yasuhiro)  (20588511)	国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生産環境・畜産領域・主任研究員   (82104)	
研究分担者	櫻井 哲也  (Sakurai Tetsuya)  (90415167)	高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・准教授   (16401)	