

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05612

研究課題名(和文) イネの生育過程を通じた栄養関連代謝の動態モニタリングとその分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on nutrient status dynamics and its underlying molecular mechanism throughout the growth of rice plant

研究代表者

佐藤 豊 (Sato, Yutaka)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター・主任研究員

研究者番号：90510694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネの生育過程を通して窒素とリンの栄養状態をモニタリングするため、指標となる遺伝子群を抽出し発現プロファイリングを行った。その結果、田植え後30日目頃に窒素とリンの栄養状態が同調して変化すること、リン酸吸収係数の高い土壌種の水田では分けつ形成期にイネがリンの要求反応を起こしていること、栄養状態の変動に品種間差が見られることなどを明らかにした。さらに、その栄養状態が変化する時期に表現型が現れる突然変異体の解析を通して、様々な代謝系や転写制御がその変化に関わっている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The expression profiling of nitrogen and phosphorus nutrient indicator genes throughout the growth of rice plant revealed synchronous changes of nitrogen and phosphorus nutrient status observed at about 30 days after transplanting, expression of phosphorus acquisition system under soil conditions with high phosphate retention capacity, and differences in nutrient status dynamics among cultivars. Furthermore, it was suggested that various metabolic pathways and transcriptional factors would be associated with the nutrient status changes through the analysis of mutants, phenotypes of which emerged at the timing of the nutrient status changes.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：イネ トランスクリプトーム 栄養 突然変異体

1. 研究開始当初の背景

これまで植物分子生物学の分野では主に栄養素の欠乏条件下における植物の応答機構や耐性機構等が調べられ、栄養吸収や輸送に関わる多数の因子が明らかにされてきた。一方で、これらの研究の多くは実験室内の環境制御下で幼植物を用いて行われており、野外圃場で育つ作物を対象とした研究はあまり進んでいなかった。我々は、圃場で栽培したイネの大規模な遺伝子発現プロファイリングを実施し、生育過程でダイナミックな遺伝子発現変動が起こる事を明らかにした(Sato et al., 2011)。興味深いことに、発現変動する遺伝子の中にはリン酸代謝に関わるものが多く含まれていた。また、その大きな遺伝子発現変動が起きる時期から表現型が現れる突然変異体が見出され、その多くは「枯れ」という共通の表現型を示すが症状は多様である。これらの突然変異体は、イネの生育にとって必須なシステムに異常が生じたものと思われ、さらに変異体の中には窒素やリン欠乏に対する感受性が変化しているものもあった。これらのことから、生育過程で起こる大きな遺伝子発現変動には栄養状態の変化が深く関係していると考えられた。

2. 研究の目的

大規模な遺伝子発現プロファイリングによって見出された大きな遺伝子発現変動の実体を明らかにするために、窒素やリンの栄養状態の変化をモニタリングする指標遺伝子情報を整備し、様々な条件下で栽培したイネの栄養状態の動態変化をモニタリングする。それによって、イネの生育過程に沿った栄養状態の変化についての知見を得る。さらに、突然変異体の解析を通して、生育段階に依存した窒素やリンの栄養代謝制御に関する分子機構の一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 窒素、リン、カリウムそれぞれの欠乏・過剰条件下で取得したマイクロアレイデータを用いて、各栄養条件で発現変動する遺伝子群を統計解析によって抽出した。さらに、圃場で栽培したイネの生育過程を通して連続的に取得した葉のマイクロアレイデータを利用してそれら遺伝子群の共発現解析を実施した。共発現遺伝子ネットワークからモジュールを抽出し、各モジュールの栄養応答性を基に栄養状態をモニタリングするための指標となる遺伝子候補を選抜した。

(2) 水田は基本的に、10a あたり窒素(N, 5.6kg), リン酸(P_2O_5 , 5.6kg), カリウム(K_2O , 5.6kg)を元肥として施肥した。また、本研究では、性質の異なる2種類の水田(沖積土と火山灰由来の洪積土)を用いた。イネ品種「日本晴」を栽培し、一週間おきにサンプリングした葉を用いてトランスクリプトーム解析を実施した。また、品種による違いを調べる

ために、「コシヒカリ」「タカナリ」「IR64」も栽培し解析に利用した。生育過程を通して生育調査(草丈、葉齢、分けつ数、SPAD値)を測定し、さらに収穫後に収量調査を行った。年次変動を調べるために、上記サンプリングと調査は複数年行った。

(3) 3種類の突然変異体について「カサラス」と交配した F_2 分離集団を使って、原因遺伝子の座乗する位置を特定した。さらに、原品種「日本晴」と交配した F_2 集団から表現型が現れる系統を選抜し、そのバルクDNAを用いて次世代シーケンス解析を行った。

4. 研究成果

(1) 窒素、リン、カリウムの欠乏・過剰条件下で変動する遺伝子群をそれぞれ抽出した。窒素では欠乏時に発現変動する遺伝子が多く、リンでは欠乏・過剰で同じ程度の数の遺伝子が含まれ、カリウムでは欠乏時に発現が上昇する遺伝子、過剰時に発現が抑制される遺伝子が多いという傾向が見られた。発現変動した計1,452遺伝子について、圃場で生育するイネの葉の連続的なデータを使って総当りでピアソン積率相関係数を算出し、共発現遺伝子ネットワークを構築した。9つのモジュールを抽出し、それぞれのモジュールの栄養欠乏に対する反応性を基に、指標遺伝子の候補となる3つのモジュールを選抜した。2つは窒素欠乏で発現が誘導または抑制され、リンやカリウム欠乏条件では発現が変化しないもの、残りの1つのモジュールはリン欠乏で発現が誘導されるが、窒素やカリウムで発現が変化しないものであった。また、カリウム特異的に発現変動するモジュールは見出せなかった。

(2) 圃場で栽培したイネの生育過程を通して取得した葉のマイクロアレイデータを使って、選抜した3つの指標遺伝子のプロファイリングを行った。その結果、窒素およびリンの指標遺伝子の発現は田植え後30から40日目ぐらいに大きく変化し、さらに窒素とリンの指標遺伝子の変動は連動して起きていると考えられた。生育過程を通して生育調査(草丈、分けつ、葉齢、SPAD)を行い、それら時系列データと指標遺伝子の発現変動を比較したところ、指標遺伝子が発現変動する時期とイネの分けつ形成が止まる時期がおおよそ一致することが分かった。

(3) 生育過程を通して分けつ芽のサンプリングを行い、マイクロアレイ解析を行った。窒素の指標遺伝子が変動する前(田植え後21日目)と後(田植え後48日目)で分けつ芽で発現が変動する遺伝子群を統計学的に抽出した。発現が誘導された249遺伝子および発現が抑制された314遺伝子についてGene ontology (GO) enrichment testを実施したところ、抑制された遺伝子ではDNA複製などに関わるGO

が有意に含まれていた。さらに、1週間おきに取得した分けつ芽のデータにおいて、それらの遺伝子群の発現プロファイリングを行ったところ、窒素指標遺伝子の発現が変化すると似たタイミングで分けつ芽の遺伝子が変化していることが分かった。また、窒素およびリン欠乏処理を施した幼植物の遺伝子発現データにおいて、分けつ芽で発現変動した遺伝子の発現をプロファイリングしたところ、田植え後21日目から48日目の間に分けつ芽で発現が誘導された遺伝子群は窒素欠乏に対して誘導、抑制された遺伝子群は窒素欠乏に対して抑制される傾向があった。リン欠乏に対しては顕著な傾向は見られなかった。

(4) 化学性の異なる2種類の土壌(沖積土、洪積土)の水田でイネを栽培し、生育過程を通して生育調査および栄養指標遺伝子の発現プロファイリングを行った。その結果、リン酸吸収係数が高い洪積土で栽培したイネでのみ分けつ形成期にリンの指標遺伝子の発現が見られた。つまり、可給態リン酸が少ない土壌では、イネが分けつを増やすために積極的にリン酸を吸収、再利用していると考えられる。また、これら2種類の水田において穂重、穂長を調べたところ、水田間でほとんど差が見られなかったことから、極端なリン欠乏条件でない場合、リン酸要求反応を起こすことでイネが支払う対価はそれほど大きいものではないと考えられた。

(5) 4種類の品種(日本晴、コシヒカリ、タカナリ、IR64)において、指標遺伝子の発現プロファイルと比較するため、日本晴と各品種とのComparative genomic hybridization (CGH)解析を行った。すべての品種間でシグナル値の比率が1.5倍以内であったプローブが30591個あり、品種間の発現解析にはこれらのプローブを用いることにした。栄養の指標遺伝子に対するプローブから該当するプローブを選抜し、発現プロファイリングを行った。その結果、窒素指標についてはタカナリが、リン指標についてはIR64が他の品種とは少し異なるプロファイルを示した。コシヒカリとタカナリの戻し交雑自殖系統群を用いて、タカナリで見られた窒素指標の発現プロファイルの違いについて検証した。簡易に解析するために生育過程を通して経時的にSPAD値を測定し主成分値を用いてQTL解析を行った。その結果、3つの染色体でQTLが検出され、そのうち2つについては染色体断片置換システムの解析からその効果が確認された。

(6) 2種類の土壌(沖積土、洪積土)の水田で栽培した4品種の経時的なマイクロアレイデータを使ってゲノムワイドな比較解析を実施した。その結果、沖積土と洪積土の水田間の比較では、沖積土において分けつ形成期に

著しく発現が上昇する遺伝子クラスターが観察されたが、生育過程を通して全体的な遺伝子発現にはほとんど差異が見られなかった。このことは、上述したリン酸要求反応を起こすことでイネが支払う対価はそれほど大きくないという仮説を支持するものであると考えられる。また、品種間の比較では、ジャポニカとインディカ間で発現量が異なる遺伝子が多数存在することが明らかになり、mRNA-Seqのデータからもその傾向が確認できた。これらの違いがどのような形質を支配しているのか興味深く、今後の解析が必要である。

(7) 大きな遺伝子発現変動が起きる時期から表現型が現れる3つの突然変異体について、カサラスとのF₂分離集団を用いてラフマッピングを行ったところ、それぞれ第1染色体、第7染色体、第6染色体の領域に原因遺伝子が座乗していることが分かった。日本晴とのF₂分離集団から形質が現れる個体を選抜しバルクDNAを用いて次世代シーケンス解析を行った。その結果、すべての突然変異体で原因遺伝子候補を絞り込むことができた。ただし、その遺伝子のアノテーションから予想される機能から栄養状態の変化との直接的な関連性は推察できなかった。そこで、3つの突然変異体のうち2つの突然変異体において、表現型が現れる前後でマイクロアレイ解析を実施して、野生型と比較して発現変動する遺伝子群を統計学的に抽出した。表現型が現れる前は発現に差のある遺伝子数どちらの変異体でも20以下だったのに対し、表現型が現れた後は923プローブ(831誘導、92抑制)、2418プローブ(1796誘導、622抑制)において発現に差がみられ、発現が誘導されているものが多く含まれる傾向があった。また、興味深いことに、2つの突然変異体で発現誘導されたプローブのうち635が共通していることが明らかになり、GO enrichment testから様々な代謝系に関わる遺伝子や転写制御に関わる遺伝子等が有意に含まれていることが示された。このことから、栄養状態が大きく変動する田植え後30から40日頃に、植物体内で様々な変化が起きていると考えられ、これら突然変異体の原因遺伝子はその変化を制御している重要な因子である可能性が高く、今後の詳細な解析が必要であると考えられる。

<引用文献>

Sato Y, Antonio BA, Namiki N, Motoyama R, Sugimoto K, Takehisa H, Minami H, Kamatsuki K, Kusaba M, Hirochika H, Nagamura Y, Field transcriptome revealed critical developmental and physiological transitions involved in the expression of growth potential in *japonica* rice. BMC Plant Biology, 2011, 11:10

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

佐藤 豊、フィールドオミクスで解き明かす作物の成長と栄養環境適応、植物科学シンポジウム 2017「植物科学のバイオ農業への展開」、2017

竹久 妃奈子、佐藤 豊、フィールドトランスクリプトミクス情報に基づく選抜によって得られたイネのリン酸過剰蓄積変異体の解析、日本育種学会第 131 回講演会、2017

竹久 妃奈子、佐藤 豊、遺伝子発現指標を用いた圃場におけるイネの栄養生理の解析、日本育種学会第 130 回講演会、2016

佐藤 豊、竹久 妃奈子、圃場におけるイネの栄養生理解明に向けた遺伝子発現指標の開発、日本育種学会第 130 回講演会、2016

佐藤 豊、遺伝子発現から紐解くイネの栄養生理、第 2 回植物の栄養研究会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 豊 (SATO, Yutaka)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター・

主任研究員

研究者番号：90510694

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()