

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01458

研究課題名(和文) 栽培環境に呼応して変動するQTL遺伝子の単離と同定

研究課題名(英文) Characterization of quantitative trait loci regulated by environmental condition.

研究代表者

松岡 信 (Matsuoka, Makoto)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：00270992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、施肥窒素量に呼応し到穂日数を遅延させる環境応答遺伝子の単離・解析手法の確立及びその分子育種であった。以下に主要成果を記す。窒素応答の責任遺伝子はHD6だった。出穂遺伝子HD1/HD2/HD6のすべてが機能型の場合のみ窒素施肥に呼応し出穂遅延が起こるが、3遺伝子の一つでも欠失すると窒素反応性は消失した。HD6mRNAは窒素量で上昇しないがFLAG-HD6タンパク質は上昇した。HD2タンパク質はHD6活性化に伴い増加した。HD1によるHD3a(フロリジェン)発現誘導をHD2は抑制する。HD6はこの誘導に直接影響を与えず、HD2が濃度依存的にHD1活性を促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、環境に呼応して機能を変化させる農業関連遺伝子の単離・解析手法の確立とそれを利用した分子育種であった。農業に関連する多くの形質は量的形質であり、その研究は従来QTL解析により研究が進められているが、本手法は多大な時間と労力を要するため代替の手法が強く求められている。さらに重要農業形質は気象や土壌などの外的環境によりダイナミックに影響を受け環境条件を加味した遺伝解析が強く望まれている。そこで本研究はQTL解析ではなくゲノムワイド関連(GWA)解析を用いることで、外的環境に呼応してその機能を変化させるQTL遺伝子の単離・解析技術を構築し、分子育種に貢献することを目指した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was isolation and study of gene(s), which prolongs the heading time of rice under high nitrogen (N) content. By a genome wide association study (GWAS), we identified HD6 which delays the heading time through the collaborations of HD1 and HD2. The mRNA of HD6 was not changed by the N level but its protein was increased by its increased stability, and the increased HD6 enhanced the HD2 protein level. HD2 suppresses the induction activity of HD1 to HD3a (florigen) expression, whereas HD6 is involved in this regulation through regulating the HD2 by dose-dependent manner.

研究分野：植物学、遺伝学、育種学

キーワード：作物育種 遺伝子 出穂期 開花制御 窒素施肥

## 1. 研究開始当初の背景

最近の次世代シーケンサー技術の進展により、多数個体の全ゲノム DNA を解析することが可能となり、全ゲノム情報と注目する形質との相関性解析を行うことにより、複数遺伝子により制御される形質 (QTL 形質) の新しい解析手法が確立されつつある (ゲノムワイド関連解析、GWAS)。この手法は、従来の QTL 解析に必須で構築に多大な労力と時間を要する戻し交雑自殖系統 (BIL) や準同質遺伝子系統 (NIL) と言った実験材料を作製することなく、個体間における形質とゲノム構造の相関を統計的に解析し、注目する形質制御に関与する遺伝子座を特定できる点で優れた解析手法と期待されている。しかしその一方で、実際には GWA 解析のインフラが整えられた一部の植物で少数の QTL 遺伝子単離の事例が報告されているだけで、新規遺伝子の単離成功例は極めて少なく GWAS を用いての新規遺伝子の単離には否定的な意見も多く出されている (例えば Lipka et al. Curr. Opin. Plant Biol.2015)。特にイネを用いた GWAS は、これまでのほとんどの取り組みがジャポニカ・インディカというゲノム構造が異なる 2 集団を共存させて行われるため、集団構造に依拠した誤った解析結果が頻出することや、自殖性のため染色体の組み換え頻度が低く広い連鎖不平衡範囲となり、候補領域の絞り込みが困難で候補遺伝子の特定に至らないと言う指摘もあり、実効性については疑問視されてきた。実際、我が国では (我々以前に) GWAS による新規作物 QTL 遺伝子単離・同定の事例はなく、取り組み自体ほとんど行われていないのが実態である。

申請者は、日本イネ品種の集団を用いて GWAS を試行し、いくつかの条件を満たせば GWA 解析により注目する形質を制御する QTL 遺伝子の同定・単離が可能であることを示した (Nature Genetics, 2016)。そこで本研究はこの日本イネ品種集団による GWA 解析を用いて、環境に呼応して機能を変化させる QTL 座の解析を試みた。

## 2. 研究の目的

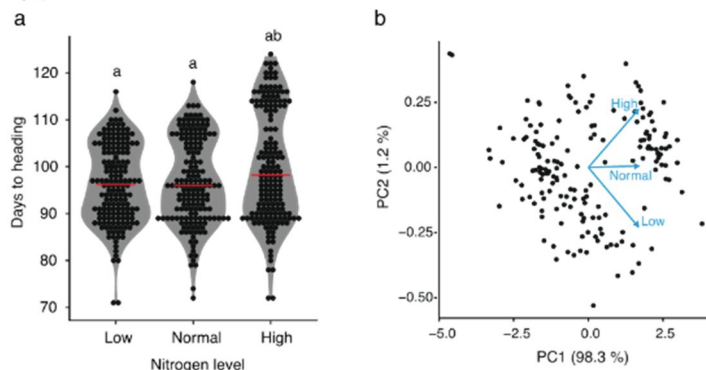
本研究の目的は、環境に呼応して機能を変化させる農業関連遺伝子の単離・解析手法の確立とそれを利用した分子育種だった。農業に関連する多くの形質は量的形質であり、その研究は従来 QTL 解析により遺伝子レベルの研究が進められているが、最近、申請者は QTL 解析を用いることなく、効率的に QTL 遺伝子を単離するゲノムワイド関連 (GWA) 解析技術を構築した (Nature Genetics, 2016)。一方、重要農業形質の多くは、気象や土壌と言った外的環境によりダイナミックに影響を受け、環境条件を加味した遺伝解析が強く望まれている。そこで、本研究は外的環境に呼応してその機能をダイナミックに変化させる QTL 遺伝子の単離・解析技術を構築し、分子育種に貢献することを目指した。

## 3. 研究の方法

GWA 解析は、日本イネ 198 品種を用いて全ゲノム情報に基づく DNA 多型と、環境変動に呼応し変化する形質値との相関を計算することにより行った。本研究に用いた GWA 解析は既に Nature Genetics, (2016) において報告した方法に従い行った。解析に用いる形質は最低 2-3 回の独立した計測が必要であり、平成 27-29 年度に窒素施肥を 3 段階に変えた圃場で複数の農業形質について計測を行った。得られた形質について、随時、GWA 解析を行い有力な候補遺伝子をリストし、候補となった遺伝子に関してしかるべき形質転換実験を行い、得られた形質転換体の形質を評価することで原因となった遺伝子の特定・確認を行った。

## 4. 研究成果

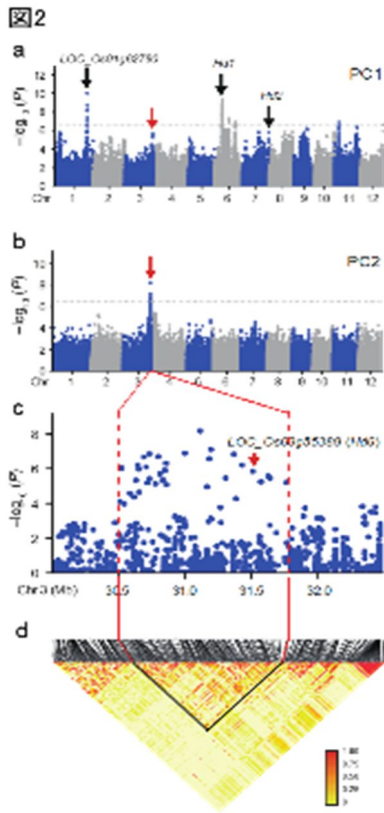
図1



### (1) HD6 は N 施肥に呼応して出穂を遅延させる

本研究の主目的は、窒素施肥が出穂に及ぼす効果に関して、GWAS や G by E を用いて解析することだった。そこで、施肥を 3 段階に変え GWAS パネルを栽培し、各系統の到穂日数を計測した。その結果を図 1 に示す。

ここで、パネル a は N 施肥 3 段階における到穂日数を Beanplot で表しているが、到穂日数 100 日以上の一部の



集団が、施肥量増加に伴い、有意に到穂日数を増加させていることが分かる。そこで、この施肥量に伴う到穂日数の変動を定量化することを目的として、主成分分析 (PCA) を行い (図 1a)、その主成分スコアを用いて GWAS を行った (図 2)。ここで、図 2a は PCA の第 1 主成分スコア (PC1 値) を用いて GWAS した結果であり、出穂遺伝子として知られている *OsHGESO1*, *HD1*, *HD2* 等が座乗するゲノム領域にピークが見つかることから、PC1 はもっぱら出穂関連遺伝子の機能の違いを反映した成分から構成していると考えられた。実際、この PC1 の到穂日数への説明率は 98.3% と非常に高かった。一方、PC2 の説明率は 1.2% と低いが、図 1b の結果から施肥量に伴う到穂日数の変動を表していることが期待され、PC2 値を用いた GWAS により、第 3 染色体長腕末端に有意かつ単一のピークが観察された (図 2b 中赤矢印)。この領域のローカルマンハッタンプロット (図 2c) と連鎖不平衡プロット (図 2d) により候補領域を特定した結果、この領域内に *HD6* 遺伝子が座乗することが確認された (図 2c 中赤矢印)。

そこで、GWAS パネル内の *HD6* 遺伝子のハプロタイプを GWAS パネル内の系統群について調べた所、2 種類のアレルが存在し、レファレンスとして用いた日本晴のアレルはコーディング内に存在する SNP によりストップコドンが発生した完全機能欠失型であることが確認された (図 3, Hap. A)。この *HD6* の Hap. A と機能型と予想された Hap. B を用いて GWAS パネル内系統を分割し、それぞれの集団について低施肥区の集団全体の到穂日数を 1 とし、各条件下での到穂日数を比較した結果、Hap. B (*HD6* 機能型) を持つ系統群は

Hap. A の系統群に比して到穂日数が遅延する傾向が認められた (図 4)。

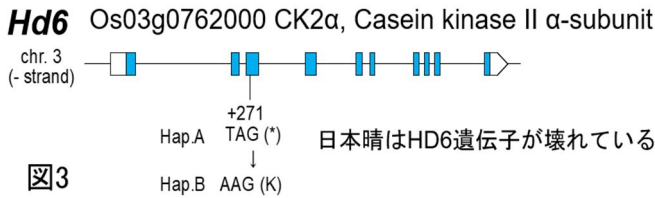


図3

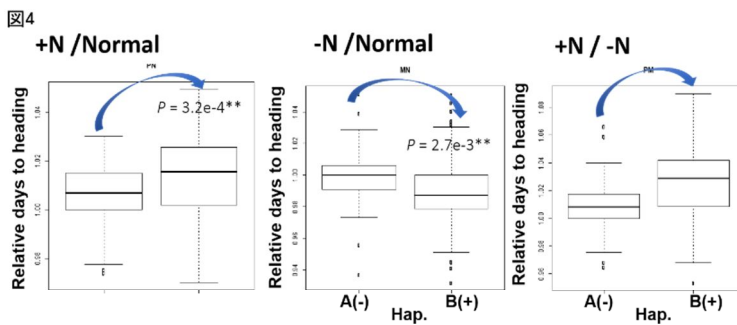


図4

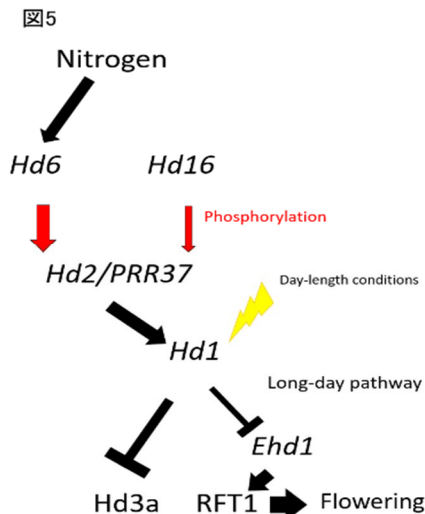
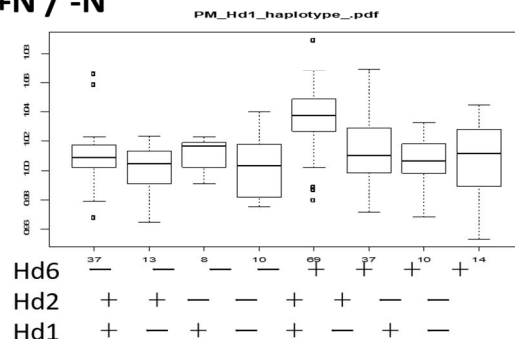


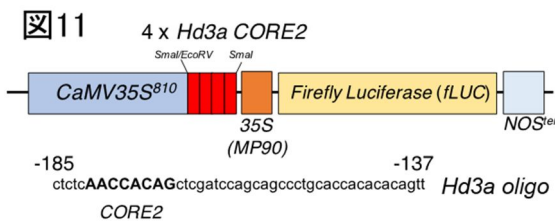
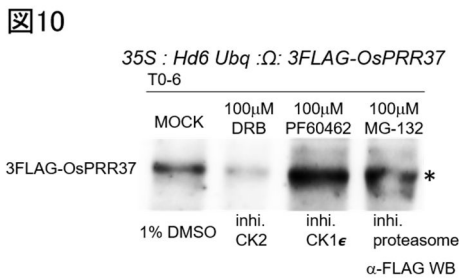
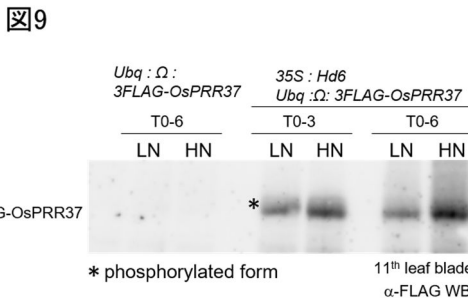
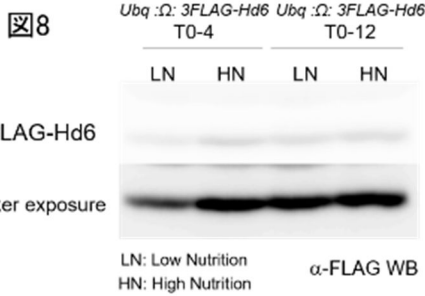
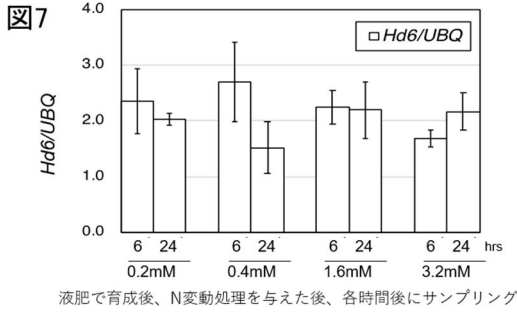
図5

図 5 は、これまでの研究で *HD6* が開花期を制御する機構について纏めた模式図である。以上の結果から、もし窒素が *HD6* を介して開花期を制御するならば、この窒素により誘起される信号伝達は *HD2/PRR37* や *HD1* も関与することが期待できる。そこで、同一系統のバックで *HD6/HD2/HD1* の 3 遺伝子の機能が異なる NIL を用意し、それらの窒素に対する応答を調べた (図 6)。その結果、これらの 3 遺伝子の機能が一つでも欠損すると窒素による出穂遅延は阻害されることが確認された。以上の結果から、窒素による出穂遅延は *HD6* の活性化により *HD2* や *HD1* が関与する開花機構を通して開花ホルモン (フロリジェン) の発現が抑制される結果もたらされると予想された。

図6  
+N / -N



## (2) HD6 を介した開花制御機構の解明

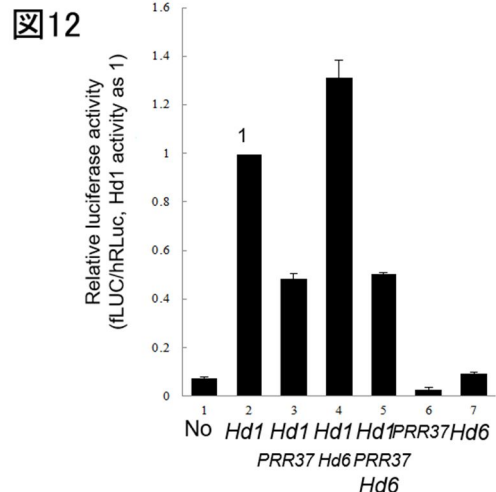


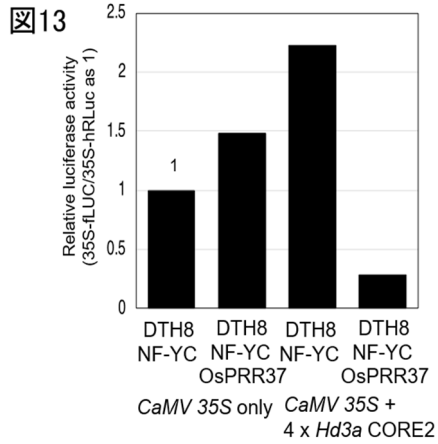
は約半分に抑制された(図12)。一方、HD6の共存はHD1の転写活性を僅かに増加したが、HD6/PRR37の両者の共存ではPRR37単独とほぼ同程度に低下した。上述のように、植物体内ではHD6がPRR37の活性化を介してHD1と拮抗的に作用し、*HD3a*の転写を阻害する結果、出穂が遅延すると想定されるが、プロトプラストを用いた一過的発現制御実験では、HD6タンパク質による発現抑制は観察できなかった。これは、HD6タンパク質がHD2/PRR37タンパク質の安定性を向上させることでその活性を増大させるとする上記の結果と合わせて考えると、本プロトプラストの一過的発現系ではこの抑制が観察できないことも納得出来る。さらにこの

次に、窒素施肥がどのようにHD6活性に影響を及ぼし、ひいては開花期を遅延させるかのメカニズムについて研究を行った。まず、窒素がHD6のmRNAやタンパク量にどのような影響を与えるかを調べた。その結果、N含量を増加させてもHD6mRNA量は増加しない一方(図7)、タンパク量は増加することが確認された(図8)。HD6タンパク質はカゼインキナーゼ活性を有することが報告されている。そこで、Nの多寡がHD6の基質として想定されるHD2/PRR37タンパク質に対してどのような効果を持つかについて生化学実験により検証した。その結果、高N条件でのHD2/PRR37タンパク質は低N条件よりも有意に蓄積し、且つ泳動速度が遅いリン酸化タンパク質が増加することが確認された(図9)。この結果から、窒素によりHD6リン酸化活性が高まり、HD2/PRR37タンパク質のリン酸化レベルが向上すると共に、そのタンパク質量も増加することが確認された。さらにこの際、各種のリン酸化およびタンパク質分解阻害剤で処理すると、カゼインキナーゼの特異的な阻害剤であるDRBのみがHD2/PRR37蓄積を阻害する一方、それ以外の阻害剤の効果は認められなかった(図9)。この結果は、確かにHD6カゼインキナーゼ活性がN量に呼応してHD2/PRR37蓄積を促進することを示している。

## (3) HD2/PRR37の活性化はHD1と拮抗的に作用しHD3aの発現を負に制御する

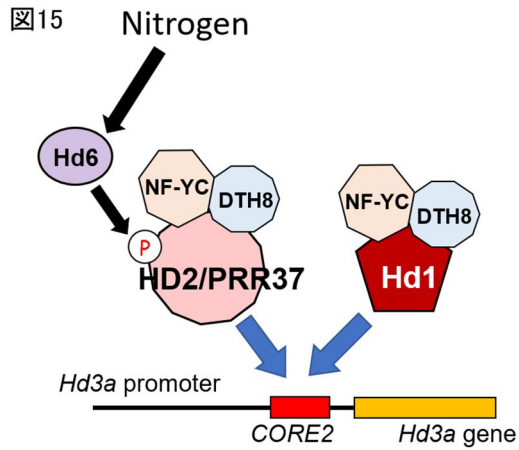
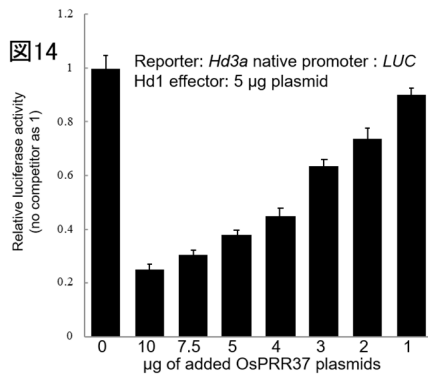
さらに上記のHD6やHD2/PRR37の活性制御が開花ホルモンであるHD3a遺伝子発現にどのように作用するかを生化学実験で解析した。そのためHD3a遺伝子の発現制御に重要な役割をすることが知られるcis因子であるCORE2に着目して、このcis因子をCaMV35Sプロモーター内に挿入したキメラプロモーターを用いて、その下流にfLUCcDNAを結合したレポーター遺伝子を作成した(図11)。イネの葉肉プロトプラストにこのレポーター遺伝子と同時に、強発現プロモーターの支配下で各種の転写制御因子(HD1, HD6, PRR37等)を導入しこれらの遺伝子を一過的に発現させレポーター遺伝子の転写活性化状態を比較した所、期待されたとおりHD1は本レポーターの転写活性を誘導する一方、そこにPRR37を共存させるとHD1による活性化





プロトプラストの一過的発現系を用いて、HD2/PRR37 による転写抑制は HD3a 遺伝子プロモーター内の CORE2 に依存すること (図 13) この阻害活性は濃度依存的であることが確認された (図 14)。この結果は、HD1 と競合的に HD3a 遺伝子の cis 因子である CORE2 を取り合うことで、HD3a 遺伝子の発現をポジティブ (HD1) またはネガティブ (HD2/PRR37) に制御すると言う仮説を強く支持する。

以上の結果を纏めたのが図 15 である。窒素はリン酸化活性を持つ HD6 タンパク質の安定化を促し生体内での活性が上昇し、その結果、HD2/PRR37 のリン酸化状態が促進される。リン酸化 HD2/PRR37 は HD1 とフロリジェンである HD3a の cis 転写制御因子である CORE2 を取り合い、HD3a の転写を抑制する機能を持つ。今回の研究により、この分子機構が作用することにより窒素による出穂遅延が引き起こされることが分かった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Wang Fanmiao, Yano Kenji, Nagamatsu Shiro, Inari Ikeda Mayuko, Koketsu Eriko, Hirano Ko, Aya Koichiro, Matsuoka Makoto	4. 巻 ahead of print
2. 論文標題 Genome wide expression quantitative trait loci studies facilitate isolation of causal genes controlling panicle structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 ahead of print
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/tpj.14726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yano Kenji, Morinaka Yoichi, Wang Fanmiao, Huang Peng, Takehara Sayaka, Hirai Takaaki, Ito Aya, Koketsu Eriko, Kawamura Mayuko, Kotake Kunihiro, Yoshida Shinya, Endo Masaki, Tamiya Gen, Kitano Hidemi, Ueguchi-Tanaka Miyako, Hirano Ko, Matsuoka Makoto	4. 巻 116
2. 論文標題 GWAS with principal component analysis identifies a gene comprehensively controlling rice architecture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 21262 ~ 21267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1073/pnas.1904964116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Hideki, Tanimoto Eiichi, Hirai Takaaki, Miyanoiri Yohei, Mitani Rie, Kawamura Mayuko, Takeda Mitsuhiro, Takehara Sayaka, Hirano Ko, Kainosho Masatsune, Akagi Takashi, Matsuoka Makoto, Ueguchi-Tanaka Miyako	4. 巻 115
2. 論文標題 Evolution and diversification of the plant gibberellin receptor GID1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E7844 ~ E7853
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1073/pnas.1806040115">https://doi.org/10.1073/pnas.1806040115</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Wang Fanmiao, Matsuoka Makoto	4. 巻 560
2. 論文標題 Improved nutrient use gives cereal crops a boost	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 563 ~ 564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1038/d41586-018-05928-x">https://doi.org/10.1038/d41586-018-05928-x</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Huang Peng, Yoshida Hideki, Yano Kenji, Kinoshita Shunsuke, Kawai Kyosuke, Koketsu Eriko, Hattori Masako, Takehara Sayaka, Huang Ji, Hirano Ko, Ordonio Reynante Lacsamana, Matsuoka Makoto, Ueguchi-Tanaka Miyako	4. 巻 60
2. 論文標題 OsIDD2, a zinc finger and INDETERMINATE DOMAIN protein, regulates secondary cell wall formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Integrative Plant Biology	6. 最初と最後の頁 130 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jipb.12557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Matsuoka, M.
2. 発表標題 Genome-wide association study using whole-genome sequencing rapidly identifies new genes regulating agronomic traits in rice.
3. 学会等名 2019全基因组關聯性分析及譜系圖譜分析-以自然種原探勘有用基因應用於作物育種研討會 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuoka, M.
2. 発表標題 GWAS with principal component analysis (PCA) reveals a novel gene comprehensively controlling rice architecture.
3. 学会等名 Workshop of Rice Functional Genome and Breeding by Molecular Design (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuoka, M.
2. 発表標題 GWAS with PCA for isolating novel genes comprehensively controlling rice architecture.
3. 学会等名 Rice Breeding Workshop (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野憲司、平野恒、吉田晋弥、北野英己、田宮元、松岡信
2. 発表標題 主成分分析を用いたイネ草型に関するGWA解析.
3. 学会等名 日本育種学会第135回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森政樹、平野恒、川村真結子、小川ひかり、松岡信
2. 発表標題 米の食味に関するGWA解析.
3. 学会等名 日本育種学会第135回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩田将平、平野恒、矢野憲司、小竹敬久、吉田晋弥、北野英己、松岡信
2. 発表標題 文献情報を用いたGWA解析.
3. 学会等名 日本育種学会第133回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢野憲司、平野恒、北野英己、田宮元、松岡信
2. 発表標題 イネGWASで検出されたシグナルの検証には反復試験が重要.
3. 学会等名 日本育種学会第133回講演会
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
--	---------------------------	-----------------------	----