

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17683

研究課題名(和文)野生イネが持つ低栄養耐性分子戦略の解明

研究課題名(英文)Molecular dissection of low-nutrient tolerance in wild rice

研究代表者

大森 良弘 (Ohmori, Yoshihiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号：20398390

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):野生イネ(栽培化されていないイネ)は、肥料などが与えられていない自然環境(低栄養条件)でも大きなバイオマスを形成している。本研究では、野生イネの持つ低栄養耐性の分子戦略を、イオノームとトランスクリプトームの統合解析を行うことで分子ネットワークとして描画することに成功し、これまでに知られていない植物の低栄養応答と環境応答との新たな関係性を明らかにすることができた。さらに、野生イネでは、光合成ができない夜間のエネルギー供給に必要とされる Snf1 関連キナーゼが低カリウム栄養条件で機能することを示唆し、低栄養耐性分子戦略の一端を遺伝子レベルで明らかにすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代農業は多量の化学肥料を投入することで高い生産性を維持している。しかし、過剰な施肥による環境汚染は大きな問題であり、また化学肥料の原材料となる天然資源は有限である。今後、持続可能な農業を続けるためには化学肥料の投入量を低減しつつも高い生産性を維持することができる新技術の開発が必要不可欠である。本研究では、これまでイネの育種に未利用であった野生イネから新たに有用な遺伝子資源を発見し、その働きを遺伝子レベルで明らかにしており、化学肥料を低減した持続可能な農業の実現に向けて、非常に有用な学術的知見および低栄養耐性品種作成の育種ターゲットとなる有用な遺伝子を提供している。

研究成果の概要(英文):Wild rice (non-cultivated rice) forms a large amount of biomass in a natural environment where fertilizers are not applied. In this study, I revealed the molecular strategy of such a low-nutrient tolerance of wild rice as molecular networks (ion-gene co-expression networks) by an integrated analysis of ionome and transcriptome. I could identify a novel relationship between low-nutrient response and environmental responses of plants by ion-gene co-expression networks. Furthermore, in the wild rice, it was suggested that Snf1-related kinase, which is required for energy supply at night (dark condition), also functions in a low potassium condition. Therefore, this study would provide information on a part of the strategy of low-nutrient tolerance at the gene level.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：イオノーム 野生イネ 共発現解析 植物栄養 分子ネットワーク 分子育種 栄養欠乏 トランスオミクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国連の予想では、世界人口は 2030 年までに 86 億人、2100 年には 112 億人に達すると予測されている¹。世界人口の増加に伴い、世界の食料需要は 2050 年までに現在の 1.6 倍に達すると予想されており²、世界的に栄養不足、食料生産や食糧安全保障が大きな関心となっている。これまでに懸念されてきた人口増加に伴う食糧危機は、高収量品種の開発、化学肥料の投入、農薬による病虫害防除、および灌漑施設の整備など、農業技術の発展による穀物収穫量の飛躍的な増加(緑の改革)により回避されてきている。一方で、緑の革命により導入された近代農業モデルにおける過剰な施肥は、水質汚染を引き起こし、地球温暖化の原因となる一酸化二窒素を大量に発生させるなど、環境に大きな悪影響を与えている。そのため、より多くの人口を支え、その発展を持続可能なものとするために、これからの農業には、環境と調和した農業生産を実現する新しい技術や作物品種の開発が必要不可欠となっている。

我々は近代農業における過剰な化学肥料の投入を問題視し、貧栄養でもよく生育し、低化学肥料投入型(低環境負荷型)の農業を実現するイネ品種の開発を進めており、これまでに、野生イネ遺伝子資源に注目した研究を通じて、低栄養(窒素、リン、カリウム)耐性を持つ野生イネ由来の系統(野生イネイントログレッション系統)を複数発見し、またそれら系統から、栽培イネに低カリウム耐性を付与する 1 つの野生イネ遺伝子座の同定、および遺伝子座近傍分子マーカーの作成に成功していた。

2. 研究の目的

上記の成果は、栽培イネに導入された、1 つの野生イネ遺伝子座によって、栽培イネが低栄養耐性を示すイネへと変化したことを示唆している。したがって、低栄養耐性系統を持つ 1 つの野生イネ遺伝子座が、どのような栽培イネ遺伝子の使い方を変化させたのかを詳細に解析することで、野生イネの持つ低栄養耐性の分子戦略を解明することができると考えられた。本研究では、野生イネの持つ低栄養耐性の分子戦略を解明することを目的として、ゲノム、トランスクリプトーム、イオノームなどのオミクスデータを統合的に解析(マルチオミクス解析)し、低栄養耐性系統を持つ低栄養応答の分子戦略を、分子ネットワークとして描画・理解すること、ならびに低栄養耐性の原因遺伝子の単離を試みた。

3. 研究の方法

(1) 解析サンプルの調整

植物材料にはカリウム欠乏耐性を示す野生イネイントログレッション系統(GK)、リン欠乏耐性を示す野生イネイントログレッション系統(GP)、およびイントログレッション系統作成時の反復親である台中 65 号(T65)を用いた。

栄養欠乏処理は、木村氏 B 液で発芽後 1 週間水耕栽培した植物体を、木村氏 B 液をベースにカリウムまたはリンを含まないように調整した水耕液でさらに 1 週間水耕栽培することにより行った。時系列オミクスデータを取得するため、カリウム欠乏処理(イオノームとトランスクリプトームにそれぞれ 4 反復)では開始後 0, 3, 6, 12, 24, 48, 96, 168 時間目に、リン欠乏処理(イオノームとトランスクリプトームにそれぞれ 3 反復)では開始後 0, 24, 48, 96, 168 時間目に植物体地上部全体を採取した。

(2) マルチオミクス解析

イオノーム情報の取得

サンプルを乾燥、硝酸分解した後に誘導結合プラズマ質量分析装置(7800 ICP-MS, Agilent Technologies)により Li, Na, Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Cd, Cs の植物体中濃度(ppb)を測定することで取得した。

トランスクリプトーム情報の取得

全 mRNA の配列データを BrAD-seq 法³によるライブラリー作成、および QB3 Genomics の HiSeq4000 Platform (<https://genomics.qb3.berkeley.edu/services/>)による 50bp シングルリードの配列決定により取得した(平均 280 万リード / サンプルを取得)。リン欠乏処理のサンプルについては、2018 年度先進ゲノム支援(<https://www.genome-sci.jp/>)を通じてシングルリードの配列データを取得した(平均 600 万リード / サンプルを取得)。得られた配列情報は FASTX-toolkit によるクオリティーコントロール、TopHat2 による日本晴リファレンス配列へのマッピング、ならびに featureCount による遺伝子毎のリード数カウントを行うことでトランスクリプトーム情報とした。発現変動遺伝子の抽出は、遺伝子アノテーション情報(Oryza_sativa.IRGSP-1.0.23.gtf, <ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/release-23/>)を用いて RUVseq により行った。

イオンと遺伝子の共発現ネットワーク解析

トランスクリプトーム情報については栄養十分条件と栄養欠乏条件の間で発現変動がある遺伝子を、低栄養耐性系統(GK および GP)と T65 のそれぞれについて抽出し、標準化後のカウントデータを統合解析に用いた。イオノームについては各サンプルから得られた上記 18 元素の値をそのまま統合解析に用いた。統合解析の方法には、Weighted Gene Correlation Network

(WGCNA, <https://horvath.genetics.ucla.edu/html/CoexpressionNetwork/Rpackages/WGCNA/>) を利用し、イオンと遺伝子の共発現ネットワークの描画を行った。

(4) 低栄養耐性遺伝子の単離

これまでの研究から、GK に関しては MutMap+ 法⁴により低カリウム関連遺伝子座が検出されていた。本研究では GK にカリウム欠乏耐性を付与する遺伝子を単離するために、上記 MutMap+ 解析により得られていた SNPs 情報を利用したグラフィカルジェノタイピングによる低カリウム関連遺伝子座の絞り込みを行なった。また、GP および低窒素耐性を持つ野生イネイントログレッション系統に関しては、それぞれ戻し交雑 F2 集団を作成し、MutMap+ 法による低栄養耐性関連遺伝子座の同定を行った。

GK ではさらに、グラフィカルジェノタイピングにより絞り込まれたゲノム領域内に存在する遺伝子と統合解析により得られた分子ネットワークとを比較することで、原因遺伝子の候補となる遺伝子を抽出した。候補遺伝子について CRISPR/Cas9 系による遺伝子破壊システムを作成し低カリウム水耕栽培による形質調査を行うことで、候補遺伝子と低カリウム耐性との関連を解析した。

4. 研究成果

(1) イオンと遺伝子の共発現ネットワーク

本研究ではイオノームとトランスクリプトームを利用したマルチオミクス解析を行い、イオンと遺伝子の共発現ネットワークを描画し、低栄養耐性系統 (GK、GP)、T65 のそれぞれにおいて、低栄養に伴う生体内元素と遺伝子の発現変動に関連する複数のモジュールを検出することに成功した (図 1, および 図 2)。共発現ネットワークにおけるモジュールとはお互いに関連する因子 (今回は元素と遺伝子) によるグループであり、同一のモジュールに含まれる因子には機能的に類似した役割や、同一の経路における機能が考えられる。ターゲットとした栄養 (ここではカリウムとリン) が含まれるモジュールを抽出・比較することで、低栄養耐性系統のみが持つ栄養関連モジュール、すなわち低栄養耐性系統のみが持つ遺伝子の働きを以下のように明らかにした。

本成果は、イオノームとトランスクリプトームの統合解析がイネの栄養応答を解析する上で極めて有効であることを示すとともに、野生イネの低栄養耐性の分子戦略を明らかにするための重要なツールになることを示している。

GK 特異的カリウム関連モジュール

カリウム欠乏に応答したイオンと遺伝子の共発現ネットワーク (図 1) のうち、GK と T65 の両方においてカリウムが含まれるモジュールを抽出すると、T65 で 1 つの、GK では 2 つのモジュールが得られた (図 3)。これらモジュールを比較したところ GK が持つ 2 つのモジュールのうち、一方は T65 が持つモジュールと同様の因子から構成されるモジュールであり、残る一方のモジュールでは構成因子のほとんどが GK 特異的であった (図 4)。そこで、この GK 特異的モジュールに注目し、モジュール内で mRNA 蓄積量が多い 100 の遺伝子と mRNA 蓄積量が少ない 100 の遺伝子を、それぞれ遺伝子発現データベース (GENEVESTIGATOR, <https://genevestigator.com>) に照合したところ、熱ストレス、虫害ストレス、冠水ストレス時の遺伝子発現パターンと類似の発現パターンを持つことを明らかにした (図 5)。

PK 特異的リン関連遺伝子群モジュール

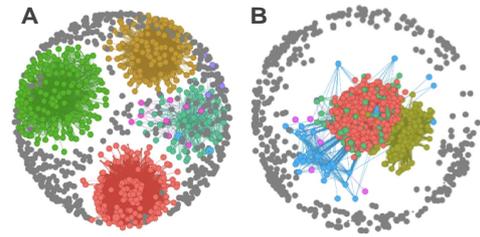


図 1. カリウム欠乏に応答したイオンと遺伝子の共発現ネットワーク T65 におけるネットワーク (A), GK におけるネットワーク (B). T65 では 7 つのモジュールを、GK では 5 つのモジュールを色分けして示している。

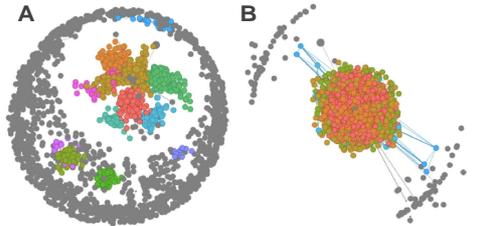


図 2. リン欠乏に応答したイオンと遺伝子の共発現ネットワーク T65 におけるネットワーク (A), GP におけるネットワーク (B). T65 では 13 つのモジュールを、GP では 6 つのモジュールを色分けして示している。

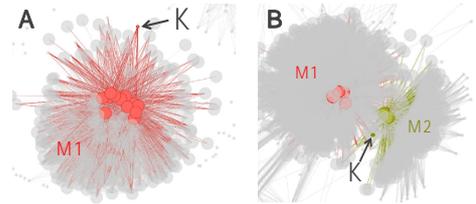


図 3. カリウム関連モジュール カリウムが含まれるモジュールを T65 (A), GK (B) においてそれぞれ示している。T65 ではモジュール 1 (M1) が、GK ではモジュール 1 (M1) とモジュール 2 (M2) にカリウムが含まれていた。図中の K はカリウムを示す。

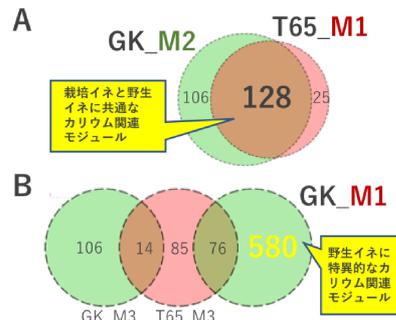


図 4. ベン図によるカリウム関連モジュールの比較 GK のモジュール 2 と T65 のモジュール 1 は共通の因子を含む (A). GK のモジュール 1 は T65 のモジュール 3 と、また T65 のモジュール 3 は GK のモジュール 3 とそれぞれ共通の因子を含む (B). T65_M1, GK_M1, および GK_M2 はカリウム関連モジュール。T65_M3, GK_M3 はカリウムを含んでいないモジュール。図中の数字は因子数を示す。

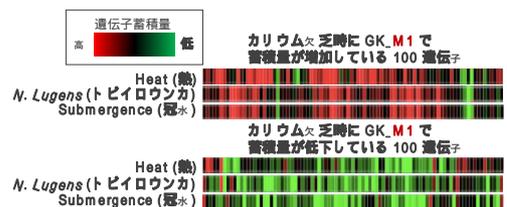


図 5. GK 特異的カリウム関連モジュールの比較トランスクリプトーム解析

リン欠乏にตอบสนองしたイオンと遺伝子の共発現ネットワーク (図 2) のうち、GP と T65 の両方においてリンが含まれるモジュールを抽出すると、T65 で 1 つの、GP では 2 つのモジュールが得られた (図 6)。これらモジュールを比較したところ GP が持つ 2 つのモジュールのうち、一方は T65 が持つモジュールと同様の因子から構成されるモジュールであり、残る一方のモジュールでは構成因子のほとんどが GP 特異的であった (図 7)。そこで、先ほどと同様に、この GP 特異的モジュールに注目し、モジュール内で mRNA 蓄積量が多い 100 の遺伝子と mRNA 蓄積量が少ない 100 の遺伝子を、それぞれ遺伝子発現データベースに照会したところ、GP では、酸欠ストレス、冷害ストレス、種子吸水ストレス時の遺伝子発現パターンと類似の発現パターンを持つことを明らかにした (図 8)。

GK、GP におけるこれらの結果は、野生イネがさまざまな環境ストレスへの応答時と類似した分子戦略を低栄養応答時にも採用・機能させていることを示唆し、これまでの栽培イネを対象とした低栄養応答の研究では見逃されていた低栄養ストレスと環境ストレスの新たな関係性を発見することができた。

(2) 低カリウム耐性遺伝子

カリウム欠乏耐性を持つ GK では、これまでの研究によりカリウム欠乏耐性に関連する 1 遺伝子座が明らかとされており、また、その際に得られた SNPs 情報が利用可能であった。本研究では、SNPs 情報を元に関連遺伝子座内におけるグラフィカルジェノタイプピングを行うことで候補となるゲノム領域を 300 kbp に絞り込んだ。この 300 kbp の領域を栽培イネと野生イネで比較したところ、大きな欠失や挿入などの多型が見られたものの、ゲノムアノテーションプログラムである MEGANTE (<https://megante.dna.affrc.go.jp/help>) による遺伝子予測では、遺伝子構造の大きな変化などは栽培イネと野生イネの間に見られなかった。

次に、トランスクリプトームデータから候補領域内の遺伝子発現に注目し、T65 と GK の間で mRNA 蓄積量に変化がある遺伝子を抽出したところ、9 つの遺伝子がカリウム欠乏時に GK で高い mRNA 蓄積を示すことを明にした。ここで、GK において低カリウム耐性に関与する遺伝子であるのならば、その遺伝子は GK 特異的カリウム関連モジュールに含まれているはずである。これら 9 つの遺伝子が GK 特異的モジュールに含まれるかを調査したところ、1 つの遺伝子 (Gene3 と呼ぶ) が条件を満たしていた。GK 背景で Gene3 の遺伝子破壊系統を作成し、カリウム欠乏時の表現型を観察すると、GK の持つ低カリウム耐性は完全に失われ、Gene3 の遺伝子破壊系統は T65 と同程度であった (図 9)。GK における低カリウム耐性には Gene3 が必要であることが示され、GK が持つ低カリウム耐性遺伝子の正体は Gene3 であると考えられる。

(3) 野性イネが持つ低カリウム耐性の分子戦略

既述のように、Gene3 は GK 特異的カリウム関連モジュールに含まれる遺伝子である。Gene3 の役割を明らかにするために、モジュールのネットワークのうち、Gene3 と直接つながっている遺伝子のみを抽出すると、キナーゼやフォスファターゼの遺伝子が複数見られ、そのうちの 1 つに Snf1 関連キナーゼが見られた。Snf1 関連キナーゼの mRNA 蓄積量をカリウム十分条件と低カリウム条件で比較すると、GK でのみ、低カリウム条件下で mRNA 蓄積量が増加していることを明らかにした (図 10)。Snf1 関連キナーゼは糖などの光合成産物の供給が途絶える夜間のエネルギー供給に必要な遺伝子だと考えられている。野生イネは、Snf1 を通じて、低カリウム条件下でもエネルギー生産のための異化作用を促進し、エネルギー消費を伴う同化作用を抑制することができるため、栽培イネよりも大きなバイオマスを形成することが可能であるとされる。

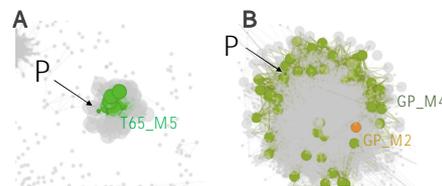


図 6. リン関連モジュール
リンが含まれるモジュールを T65 (A)、GP (B) においてそれぞれ示している。T65 ではモジュール 5 (T65_M5) が、GP ではモジュール 2 (GP_M2) とモジュール 4 (GP_M4) にカリウムが含まれていた。図中の P はリンを示す。

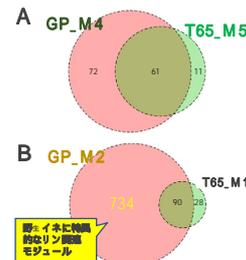


図 7. ベン図によるリン関連モジュールの比較
GP のモジュール 4 と T65 のモジュール 5 は共通の因子を含む (A)。GP のモジュール 2 は T65 のモジュール 1 と共通の因子を含む (B)。T65_M5、GP_M2、および GP_M4 はリン関連モジュール。T65_M1 はリンを含まないモジュール。

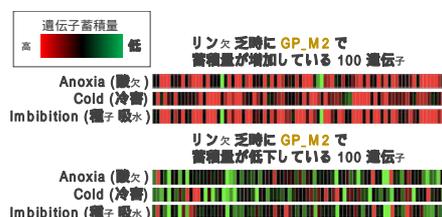


図 8. GP 特異的リン関連モジュールの比較トランスクリプトーム解析

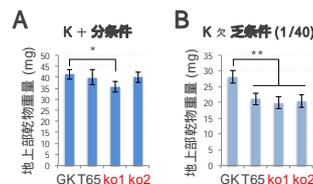


図 9. Gene3 遺伝子破壊系統のカリウム耐性
GK、T65、ko1 (遺伝子破壊系統 1)、ko2 (遺伝子破壊系統 2) における * 栽培後 2 週間後の地上部乾物重量 (mg)、カリウム十分条件 (A)、低カリウム条件 (B)。ko1 と ko2 は異なるアレルの遺伝子破壊系統である。
* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$

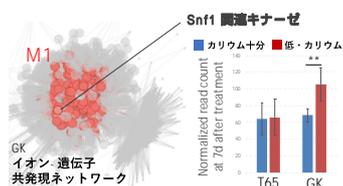


図 10. Snf1 関連キナーゼの mRNA 蓄積量
T65 と GK における Snf1 関連キナーゼの mRNA 蓄積量。カリウム欠乏処理後 7 日目の mRNA 蓄積量を示している。M1 は GK 特異的カリウム関連モジュール Gene3 と直接つながっている因子のみをのせている (左図)。
** = $p < 0.01$

本研究ではこれまでイネの育種に未利用であった野生イネから新たに有用な遺伝子資源を発見し、その働きを遺伝子レベルで明らかにすることに成功した。持続可能な農業の実現に向けて、化学肥料を低減し且つ高い生産性を維持すること望まれる作物栽培において、本研究成果は極めて有用な学術的知見および低栄養耐性品種作成の育種ターゲットとなる有用な遺伝子情報を提供する。

<引用文献>

国際連合経済社会情報・政策分析局人口部編 2017. 世界人口予測 1960 2060 2017 年改訂版, 原書房, 東京.

農林水産省 2012 .2050 年における世界の食料需給見通し .http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/jki/j_rep/annual/2016/attach/pdf/2016_annual_report-38.pdf

Brad T Townsley, Michael F Covington, Yasunori Ichihashi, Kristina Zumstein, and Neelima R Sinha. 2015. BrAD-seq: Breath Adapter Directional Sequencing: A Streamlined, Ultra-Simple and Fast Library Preparation Protocol for Strand Specific mRNA Library Construction. *Frontiers in Plant Science*, (22) 6:366.

Fekih R., Takagi H., Tamiru M., Abe A., Natsume S., Yaegashi H., Sharma S., Sharma S., Kanzaki H., Matsumura H., Saitoh H., Mitsuoka C., Utsushi H., Uemura A., Kanzaki E., Kosugi S., Yoshida K., Cano L., Kamoun S. and Terauchi R. 2013. MutMap+: Genetic Mapping and Mutant Identification without Crossing in Rice. *PLoS ONE*, 8(7), e68529.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshihiro Ohmori, Toru Fujiwara
2. 発表標題 lon-gene co-expression network analysis of a wild rice introgression line in response to potassium deficiency
3. 学会等名 16th International symposium on rice functional genomics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大森 良弘, 藤原 徹
2. 発表標題 野生イネの持つカリウム欠乏耐性遺伝子の同定
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 大森良弘、藤原徹
2. 発表標題 カリウム欠乏耐性をもつ野生イネイントログレッション系統のトランスクリプトーム解析
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 大森良弘、藤原徹
2. 発表標題 貧栄養でもよく生育するイネ系統の同定とその生理遺伝特性の解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度静岡大会、シンポジウムII、理想の農業を追求する-サステイナブルで革新的な食糧生産を支える基礎研究と現場技術（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

2019年度 国立遺伝学研究所 研究集会「Oryza属ゲノム情報を活用した遺伝的多様性研究の推進」において、本研究の成果の一部を「低栄養に応答する野生イネのイオン-遺伝子共発現ネットワーク」という題目で発表した。

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
--	---------------------------	-----------------------	----