

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05570

研究課題名(和文) ソルガム新奇優性芒抑制遺伝子DAIによる芒抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of Dominant Awn Inhibitor gene in sorghum

研究代表者

高梨 秀樹 (Takanashi, Hideki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：60707149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまでソルガムにおいては芒研究がほとんど進展しておらず、芒長に関わる遺伝子は一例も報告されていなかった。申請者らはソルガムRIL集団を用いて芒長に関してQTL解析を行い、奇妙なことに優性で芒を抑制するQTLを検出した。この原因遺伝子候補としてSbDAI (Dominant Awn Inhibitor)を見出し、有芒ソルガム系統に対してSbDAIを形質転換することで芒の伸長が抑制されるという原因遺伝子としての証明にも成功した。またSbDAIに関するNILsを用いたRNA-seq解析の結果、DAIの有無により発現が変動する遺伝子群の同定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

芒はイネ科植物小穂の護穎の先端から伸びる針状の突起構造で、イネ科野生種は基本的に有芒(有芒が優性形質)であり、また芒は人類が栽培化の過程で除去を試みてきた「栽培化の歴史」を紐解くうえでも非常に重要な形質でもある。

これまで芒長を優性で伸長させるタイプの遺伝子が多数同定されてきたイネやオオムギと異なり、本研究で同定されたソルガムのSbDAIは優性で芒を消失させるという珍しいタイプの遺伝子であった。興味深い優性芒抑制遺伝子が同定されたことは、今後の応用利用のみならず、遺伝子の進化についても様々な示唆を与える興味深い結果であると言える。

研究成果の概要(英文)：There has been little progress in the study of awn in sorghum, and none of the genes involved in awn length have been reported. I conducted a QTL analysis for awn length in the sorghum RIL population and found a QTL that suppressed awn formation in an oddly dominant manner. I found SbDAI (Dominant Awn Inhibitor) as a candidate causable gene for this QTL, and succeeded in proving that the awn formation was inhibited by introducing SbDAI gene to an awned sorghum line. In addition, RNA-seq analysis using NILs for SbDAI successfully identified a group of genes whose expression varied depending on the presence or absence of DAI.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：ソルガム 芒 器官分化

### 1. 研究開始当初の背景

芒はイネ科植物小穂の護穎(外穎)の先端から伸びる針状の突起構造である。イネ科野生種は基本的に有芒(有芒が優性形質)であり、芒は地面に落ちた種子の地中への潜り込み、食害回避、動物への付着により種子拡散に貢献、など様々な機能が報告されている重要な構造である。一方で、人類が農業を行う上では収穫時の妨げになるとして栽培化の過程で除去された形質としても知られており、栽培化の歴史を紐解くうえでも非常に重要な形質であると言える。

イネやオオムギに関しては芒研究が精力的に行われており、これまで芒長を支配する遺伝子が多数同定・解析されてきた。一方で、五大穀物の一角を占め、芒長に大きな系統間差があるにもかかわらず(図1)ソルガムにおいては芒研究がほとんど進展しておらず、芒長に関わる遺伝子は一例も報告されていなかった。

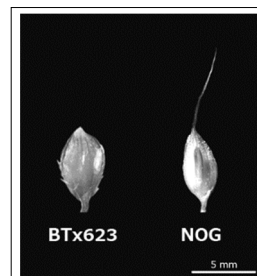


図1 ソルガムにおける芒  
リファレンス系統である BTx623  
には芒が無く、日本在来系統  
NOGは長い芒を持つ。

### 2. 研究の目的

ソルガムは世界的に重要な作物であるものの研究の歴史は浅く、芒を制御する遺伝子はこれまで一報も報告がなかった。そこで、申請者はこれまでに整備してきたソルガムの RIL (recombinant inbred line) 集団および高密度 SNPs マーカーを活用し、ソルガム芒長に関わる遺伝子の同定を目指して研究を開始した。また、得られた芒長関連遺伝子候補について形質転換を用いたその証明と芒長制御メカニズムの一端解明も目的として研究を進めた。

### 3. 研究の方法

ソルガムの芒長を制御する遺伝子座を同定する際には、ソルガムリファレンス系統である BTx623(無芒)と日本在来品種 NOG(有芒)を用いて作製した RIL 集団 (F<sub>7</sub>, 250 系統) の芒長測定データおよび F<sub>6</sub> 集団において RAD-seq 解析により取得した高密度 SNPs マーカーを用いた QTL 解析を行った。責任遺伝子候補の証明にはイネおよびソルガムの形質転換体を作成しその効果を検証した。並行して作出した NILs (Near Isogenic Lines) を用いて幼穂の RNA-seq 解析を行い、芒長制御メカニズムの解明に向けた解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 第三染色体に検出された極度に効果の大きな QTL とその興味深い特徴

QTL 解析を行った結果、第三染色体長腕 72.6 Mbp 付近に極めて効果の大きな QTL が検出された(図 2A, 以降 *qAwn3* と略記)。RIL 集団において *qAwn3* ピークにおける遺伝子型と芒長との関係を詳細に調べたところ、BTx623 型をホモで持つ系統は無芒、NOG 型をホモで持つものは長芒であるという予想通りの結果を得たが、驚いたことにヘテロ型で持つ系統は無芒になることが明らかになった(図 2B)。イネ等のこれまでの研究からも常識的に考えれば芒を作るタイプ(NOG 型)が優性であると想像されるものの、この結果は *qAwn3* では無芒タイプ(BTx623 型)が優性であるということを示している。

意外性のある結果であったため、確認のために改めて BTx623 と NOG を交配して F<sub>1</sub> および F<sub>2</sub> 集団を作製してみたところ、やはり F<sub>1</sub> は無芒であり(図 2C)、また F<sub>2</sub> の分離比は有芒 : 無芒 = 1 : 3 となったことから、本集団における芒の有無は優性芒抑制効果を持つ一遺伝子座 *qAwn3* によって制御される形質であることが明らかになった。

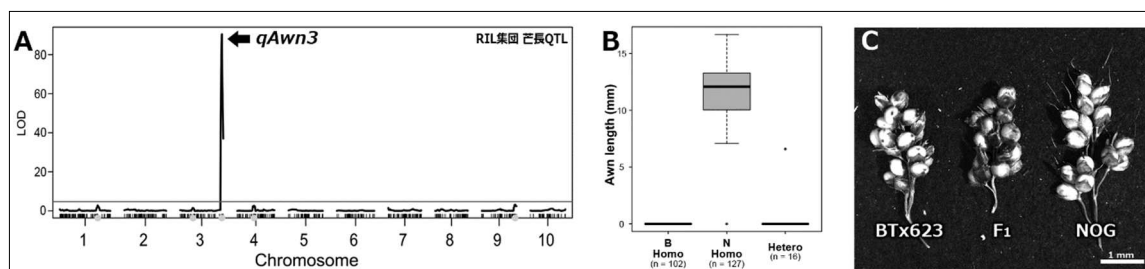


図2 芒長 QTL の結果, *qAwn3* ピークにおけるジェノタイプごとの芒長, および F<sub>1</sub> 種子の様子

A: RIL 集団を用いた芒長 QTL 解析の結果。も第三染色体長腕に極大ピーク (*qAwn3*) が検出された。B: *qAwn3* ピークにおけるジェノタイプごとの芒長 Box plot。B; BTx623 型, N; NOG 型。不思議なことに、ヘテロ型の個体は無芒となる。C: BTx623 と NOG の交配によって作出した F<sub>1</sub> の登熟種子の様子。F<sub>1</sub> は無芒であることがわかる。

## (2) *qAwn3* の原因遺伝子・*SbDAI* (Dominant Awn Inhibitor) の同定

イネやオオムギでこれまでに同定された芒関連遺伝子は全て優性で芒を伸長させるタイプであり、栽培化による無芒化はそれらの優性遺伝子の機能喪失変異体を選抜することで達成されてきた。ソルガムにおいても野生種は有芒であることから、無芒が優性形質である異質な *qAwn3* の実体は、何らかの原因で新しく芒を抑制する機能を得た機能獲得型の変異であることが想像される。この原因遺伝子を同定するため *qAwn3* 周辺領域のゲノム配列を精査したところ、一つの候補として NOG ではある遺伝子 *A* を含む 5.4 Kbp ほどが欠失している (あるいはこの 5.4 Kbp が BTx623 に挿入された) 領域を見出した。この遺伝子 *A* が *qAwn3* の原因遺伝子か否かを検証するためには、有芒の NOG にネイティブプロモーターを含む遺伝子 *A* のゲノム断片 (図 3A) を形質転換して芒が消失するかを検証するのがベストであるものの、ソルガムの形質転換は困難であったため、先行して代替案として有芒イネであるカサラスに形質転換を行った。その結果、遺伝子 *A* を含むゲノム断片を導入した時のみカサラスの芒が完全に消失することが明らかになった (図 3B)。この結果は、遺伝子 *A* が *qAwn3* の原因遺伝子であったことを強く支持しているため、以降この遺伝子を *SbDAI* (Dominant Awn Inhibitor) と呼称することとした。また、困難であるものの有芒ソルガムに対する *DAI* 遺伝子の形質転換にも挑戦し続けたところ、幸い一系統のみではあるが形質転換体が得られ、その形質転換体では芒が消失することが確かめられた。以上のことから、*SbDAI* が *qAwn3* の原因遺伝子であると結論付けた。

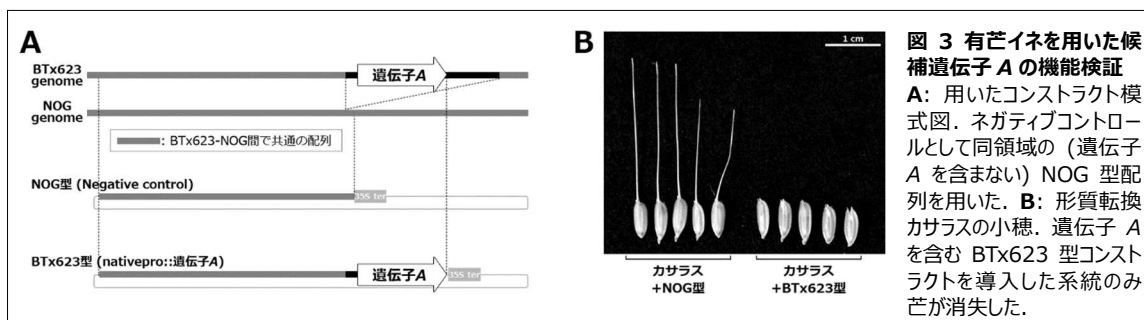


図 3 有芒イネを用いた候補遺伝子 *A* の機能検証  
**A:** 用いたコンストラクト模式図。ネガティブコントロールとして同領域の (遺伝子 *A* を含まない) NOG 型配列を用いた。**B:** 形質転換カサラスの小穂。遺伝子 *A* を含む BTx623 型コンストラクトを導入した系統のみ芒が消失した。

## (3) *SbDAI* の機能解析、芒抑制のメカニズム解明に向けて

本研究で使用している RIL 集団の中には、*qAwn3* のピークにおける遺伝子型がヘテロタイプの系統が存在していたため、その後代を展開し、それぞれ有芒/無芒の兄弟系統を固定した。これは *qAwn3* 周辺のみ (*DAI* 有り/無し) の違いがあり、それ以外の部分についてはほぼ共通のゲノムを持つ NIL (Near Isogenic Line)-like な系統であると言える。このような遺伝的背景を極力揃えた系統同士を比較・解析することで *DAI* の機能およびその効果がより明確に見えてくると考えられた。

そこでまず幼穂形成期の NILs を様々なタイミングで解剖・観察し、芒がどのタイミングで発生するのかを調査した。本研究では小穂のステージングとして小穂メリステムが分化した段階を Stage 1、出穂直前の小穂の構造がほぼ完成した段階を Stage 8 と定義し、計 8 段階で小穂の発達段階を評価した (図 4A)。*DAI* をもつ NIL\_DAI 系統では全ての発達段階において芒は観察されないが、*DAI* をもたない NIL\_dai では Stage 5 と Stage 6 の間で芒が表出してくることが明らかとなった。このことから、芒原基が分化し、伸長を始めるのは Stage 5 あるいはそれ以前であることが想像された。

*SbDAI* はアノテーション上ある種の転写因子であると予想されるため、その下流因子を明らかにすることで芒抑制のメカニズムの一端を説明できる可能性があると考えられ

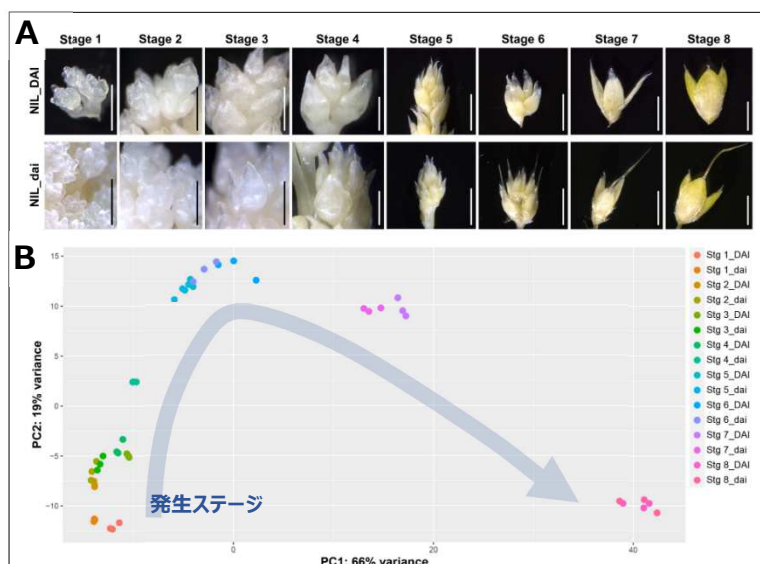


図 4 NILs 小穂を用いた RNA-seq 解析

**A:** RNA-seq 解析に用いた小穂のステージング例。NIL\_DAI および NIL\_dai の小穂について、小穂メリステムが分化した段階 (Stage 1) から小穂の形態がほぼ完成する段階 (Stage 8) まで 8 段階に分けた各発達段階の小穂をサンプリングし、RNA-seq 解析に用いた。Bars = 500  $\mu$ m in Stage 1-4, 2 mm in Stage 5-8. **B:** NIL\_DAI および NIL\_dai の各 8 段階の幼穂 (各 3 反復) から抽出した RNA 用いて RNA-seq 解析を行った。得られた RNA-seq データを用いた PCA 解析結果を示す。

た. 上記実験の結果をもとに, 各ステージにおける NILs 小穂から RNA を抽出し, RNA-seq 解析を行った (各 3 反復, Illumina HiSeq X-ten). 得られた発現データを用いて PCA 解析を行ったところ, NIL\_DAI, NIL\_dai 共に小穂の発生ステージの進行に伴いその発現プロファイルが大きく変化していくという小穂の発生トラジェクトリが明確に描出できていることがわかった (図 4B).

R/DESeq2 パッケージを用いて *SbDAI* を持つ/持たない NILs 間において同一ステージ間で発現変動が見られる遺伝子群 (DEGs) をリストアップしたところ, それぞれ数百遺伝子を DEGs として検出することに成功した. また R/maSigPro パッケージを利用して時系列データから発現変動遺伝子を検出し, 特に特徴的な発現パターンを示す遺伝子群の同定にも成功した (全ての発生ステージにおいて両 NILs 間で有意に発現量が異なる遺伝子群: 図 5. 常に NIL\_DAI で発現量が高いクラスターには 33 遺伝子が, 逆に常に NIL\_dai で発現量が高いクラスターには 45 遺伝子が含まれていた).

今後はこれらの DEGs を精査し, *SbDAI* の存在により下流で生じるイベントの推定や, *SbDAI* が直接転写を制御する下流遺伝子の同定等を通じて DAI による芒長制御メカニズムの解明を目指していく予定である.

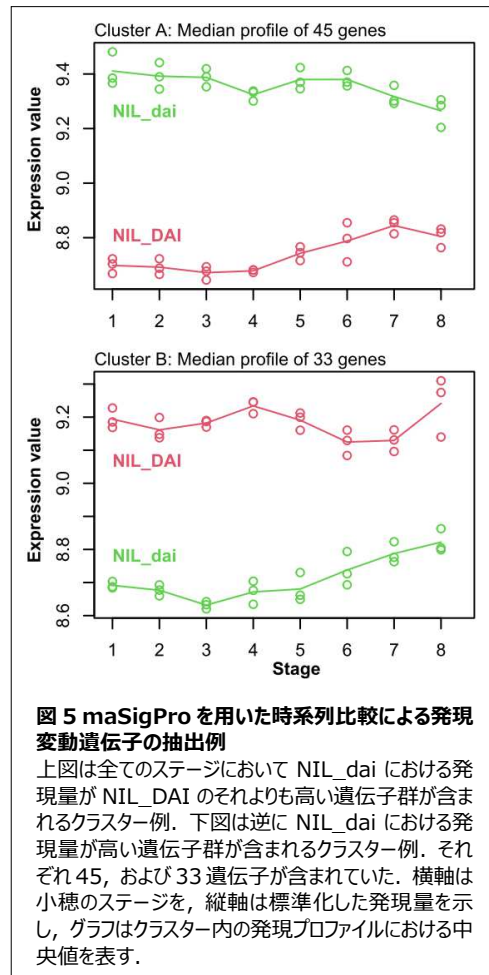


図 5 maSigPro を用いた時系列比較による発現変動遺伝子の抽出例

上図は全てのステージにおいて NIL\_dai における発現量が NIL\_DAI のそれよりも高い遺伝子群が含まれるクラスター例. 下図は逆に NIL\_dai における発現量が高い遺伝子群が含まれるクラスター例. それぞれ 45, および 33 遺伝子が含まれていた. 横軸は小穂のステージを, 縦軸は標準化した発現量を示し, グラフはクラスター内の発現プロファイルにおける中央値を表す.

## 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 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kajiya-Kanegae Hiromi, Takanashi Hideki, Fujimoto Masaru, Ishimori Motoyuki, Ohnishi Norikazu, Wacera W. Fiona, Omollo Everlyne A, Kobayashi Masaaki, Yano Kentaro, Nakano Michiharu, Kozuka Toshiaki, Kusaba Makoto, Iwata Hiroyoshi, Tsutsumi Nobuhiro, Sakamoto Wataru	4. 巻 61
2. 論文標題 RAD-seq-Based High-Density Linkage Map Construction and QTL Mapping of Biomass-Related Traits in Sorghum using the Japanese Landrace Takakibi NOG	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1262 ~ 1272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa056	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 Yamazaki Kiyoshi, Ishimori Motoyuki, Kajiya-Kanegae Hiromi, Takanashi Hideki, Fujimoto Masaru, Yoneda Jun-ichi, Yano Kentaro, Koshiba Taichi, Tanaka Ryokei, Iwata Hiroyoshi, Tokunaga Tsuyoshi, Tsutsumi Nobuhiro, Fujiwara Toru	4. 巻 70
2. 論文標題 Effect of salt tolerance on biomass production in a large population of sorghum accessions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 167 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.19009	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 Ishimori Motoyuki, Takanashi Hideki, Hamazaki Kosuke, Atagi Yamato, Kajiya-Kanegae Hiromi, Fujimoto Masaru, Yoneda Junichi, Tokunaga Tsuyoshi, Tsutsumi Nobuhiro, Iwata Hiroyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Dissecting the Genetic Architecture of Biofuel-Related Traits in a Sorghum Breeding Population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 G3 Genes Genomes Genetics	6. 最初と最後の頁 4565 ~ 4577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1534/g3.120.401582	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 Ishimori Motoyuki, Hattori Tomohiro, Yamazaki Kiyoshi, Takanashi Hideki, Fujimoto Masaru, Kajiya-Kanegae Hiromi, Yoneda Junichi, Tokunaga Tsuyoshi, Fujiwara Toru, Tsutsumi Nobuhiro, Iwata Hiroyoshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Impacts of dominance effects on genomic prediction of sorghum hybrid performance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 605 ~ 616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.20042	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takanashi, H., Kajiya-Kanegae H., Ishimori, M., Yano, K., Ohnishi, N., Fujiwara, T., Iwata, H., Sakamoto, W., Tsutsumi, N.
2. 発表標題 Mapping of QTLs associated with awn length in sorghum.
3. 学会等名 Sorghum in the 21st Century (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物分子遺伝学研究室HP <a href="http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/pmg/">http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/pmg/</a>
---

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------