

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19343

研究課題名(和文) 葉のステイグリーンと植物環境適応のミッシングリンク解明

研究課題名(英文) Studies on the missing link between stay green and adaptation to environment

研究代表者

坂本 亘 (Sakamoto, Wataru)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：20222002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大型の作物ソルガムが持つ、早枯れ性とステイグリーン性を決定する因子を量的形質遺伝子(QTL)として同定し、野外環境における葉のライフスパンと環境応答の新たな相互作用を解明する。日本在来ソルガムである「たかきび」の多くが「早枯れ」の特性を持つことに着目し、従来のステイグリーン型グレインソルガムBTx623との交雑後代である組換え自殖系統を育成し、これらの遺伝解析でQTLを遺伝子レベルで同定することを試みた。2017-2018年に屋外で栽培した目視のステイグリーン計測の結果から1つのQTLが検出され、この領域でBTx623のみに存在する候補遺伝子を特定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

秋になるとポプラの葉は落葉し、水田は一斉に黄金色となり実りの季節を迎える。「葉が枯れる」という現象は我々に最も身近な風景である一方、植物が自然環境に適応するための重要な生存戦略を具現している。植物にとって、葉がシンクとなり光合成を続けて栄養生長を続けるか、ソースとなって養分を提供して枯れていくかは、生存や繁栄を決定するトレードオフであり、この「葉の老化」制御を遺伝素因として明らかにすることは、バイオマスなど植物の利活用、あるいは資源保全などへ貢献する研究基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Stay green is a physiological trait that is associated with nutrient redistribution during plant growth, but its precise role in adaptation to environmental stresses remain unclear. This study aims in genetically dissecting the missing link between stay green and its contribution to environments such as drought, in a large biomass crop sorghum. In this study, we employed Japanese landrace Takakibi, showing non-stay-green phenotype. A recombinant inbred population generated from the cross between Takakibi and stay-green BTx623 was used to characterize QTL associated with leaf greenness under natural growing condition. The linkage analysis allowed us to identify one QTL in chromosome 5. This gene appeared to be deleted in Takakibi, and we further investigated this gene as to whether it is responsible for the stay green trait.

研究分野：植物生理学・遺伝学

キーワード：形質評価 QTL ソルガム 葉の老化 遺伝育種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

秋になるとポプラの葉は落葉し、水田は一斉に黄金色となり実りの季節を迎える。「葉が枯れる」という現象は我々に最も身近な風景である一方、植物が自然環境に適応するための重要な生存戦略を具現している。地中に根を張って生育する植物は移動して養分を摂取できない代わりに、光合成による炭酸固定能と根から吸収した養分により栄養生長する。ところが成長に不適な温度・日照を感知すると、葉に蓄えた養分を生殖生長に回して種子を作り一生を終えたり、幹に養分を貯めて翌年の成長に利用する。我々は、このような葉の養分転流を季節の移ろいと捉え、愛でている。植物にとって、葉がシンクとなり光合成を続けて栄養生長を続けるか、ソースとなって養分を提供して枯れていくかは、生存や繁栄を決定するトレードオフであり、この「葉の老化」制御を理解することは植物の利活用、資源保全などの根本となる生物学的知見を得ることができる。植物の一生を理解する一側面といえる。

本研究では、上に述べた植物環境適応としての葉の老化制御を、枯れない「ステイグリーン」の解析で明らかにする実験系を立ち上げて、これらを司る遺伝素因の解明を目指すこととした。ステイグリーンはシロイヌナズナなど実験植物で解析されているが、クロロフィル分解が欠損する「コスメティックステイグリーン」が殆どで、外的環境により応答するシンク/ソース転換の本質解明には至っていない。そこで本研究では、ステイグリーンの寄与度が大きい大型作物ソルガム (*Sorghum bicolor* L. Moench) を用いた解析システムに挑戦し、量的形質 (Quantitative Trait Locus: QTL) の同定を通して現象解明を目指すことにした。

## 2. 研究の目的

ソルガムは、トウモロコシ、イネ、ムギ類に次ぐ5番目の穀物で、アフリカ中部のサブサハラ地域を起源とする雑穀の1つである(図1)。熱帯乾燥地から温帯の広汎な栽培環境に対応した大型作物ソルガムは好適な条件では4メートル以上の草丈となるだけでなく、乾燥耐性・低肥沃土壌など環境ストレスに対する多様な遺伝特性



図1. 材料に用いるソルガム両親系統(左)と圃場で栽培したRIL集団(上)。

を維持している。本研究では、日本在来種の多くが「早枯れ」の特性を持つことに着目し、従来のステイグリーン型グレインソルガムとの交雑後代を育成し、遺伝解析で QTL を遺伝子レベルで同定することを試みた。

ソルガムのステイグリーンは、作物学的に出穂前後の乾燥耐性を付与すると言われ、QTL の報告もあり、実際に ICRISAT (インド) のグループなどが4つの QTL を15年以上前に報告しているが、未だに遺伝子の詳細は明らかでない。精査すると、この報告には QTL 解析の疑問点もあり、追試も困難である。本研究では、日本在来で早枯れのたかきびを用いることでステイグリーン研究に参入し、研究期間内にまず、QTL 遺伝子単離を実現することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究ではグレインソルガム BTx623 とたかきび NOG を材料とした。BTx623 は全ゲノム配列が決定されたリファレンス系統で栄養成長における葉のステイグリーンが報告されている。一方で、NOG は BTx623 に対して非ステイグリーン性を示す。これらの違いを指標としてステイグリーンを人工気象条件の幼苗、自然環境(温室)あるいは圃場栽培で個葉、を用いて数値化し、QTL 解析することにした。

これまでに、BTx623(♂)とたかきび NOG(♀)の交雑 F1 後代を自殖した純系 250 個体の集団を作製し、F11 世代までの育成を進めている。この組換え自殖系統 (Recombinant Inbred Line: RIL) では上述のようにステイグリーンが分離するので、QTL としての遺伝解析が可能となる。予備的研究として、F6 世代の全個体から抽出した DNA の RAD-seq により約 4,000 のマーカーからなる遺伝地図を作製している(図2)ので、ステイグリーン形質との連鎖分析を R/qtl パッケージにより解析した。さらに、NOG のリシーケンスも同時に進め、QTL 解析で絞り込まれる染色体領域での原因遺伝子同定に用いた。

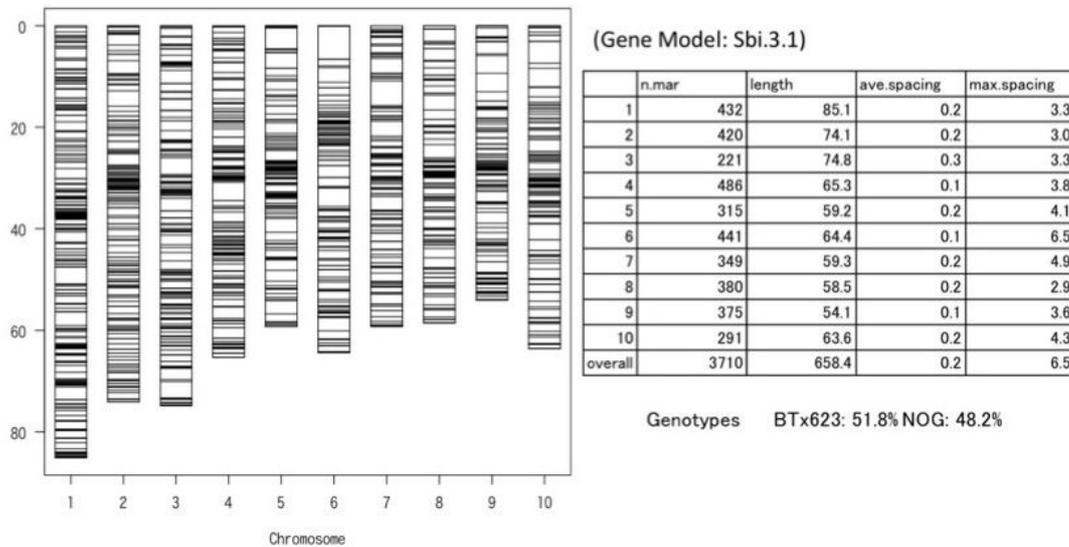


図2. RIL系統のRAD-seqにより作製されたソルガム遺伝地図

#### 4. 研究成果

##### (1) たかきびの葉老化と出穂時期の光合成活性について

本研究で用いた在来種たかきびについては、生理学的な解析例がほとんどないため、まず、BTx623 と対比させた葉の老化の諸性質を測定することにした。BTx623 と NOG をバーミキュライトで発芽させ乾燥条件に晒すと、幼苗では BTx623 が NOG に比べ優位に高い乾燥耐性を示した。葉の老化をクロロフィル含量で見ると、BTx623 がステイグリーンとなり葉の老化が遅れる。また、この老化遅延は、水耕栽培では窒素供給が影響することが明らかとなった。一方で、ポット栽培により出穂期まで生育させて葉の光合成活性を Monitoring-PAM により経時的に観察すると、NOG では出穂後の光合成活性が維持されるが、BTx623 では光合成活性が低下した。以上の結果は、NOG は栄養成長では葉老化が早い、出穂後に葉の光合成活性が継続し乾燥耐性が高くなるソルガム系統であることがわかった。

##### (2) ステイグリーンの QTL 解析

LED 照明下の人工気象条件で栽培した RIL 系統の幼苗（発芽後 2 週間から 3 週間）のクロロフィル含量を SPAD メータで測定し、QTL 解析を行ったところ、LOD 値が 3 以上の QTL が再現性よく検出されることはなく、幼苗でのステイグリーンは様々な遺伝要因に支配される可能性が示唆された。加えて、網室で自然環境で栽培した RIL 個体を用いたステイグリーンの QTL 解析では、いくつかの QTL が検出されたが、栽培年により異なるピークを示すため、環境要因にも影響されると予想された。2017-2018 年に栽培した目視のステイグリーン計測の結果からは、5 番染色体に高いピークを示すことができ、この QTL を本研究では詳しく調べることにした。

上述の自然条件での QTL 解析とは別に、NOG と BTx623 ではアブラムシ防除のために用いた殺虫剤の中で、フェントロチオン系有機リン剤（商品名スミチオン）に著しく異なる耐性を示し、NOG が葉害を示して枯死することが明らかになった（図 3）。このスミチオン感受性について RIL 集団で

QTL 解析を行ったところ、上述のステイグリーン QTL と同じ位置に高いピークを検出することができた（図 3）。このため、両者が同じ原因遺伝子に支配されていると断定し、遺伝子を同定するための解析を行った。

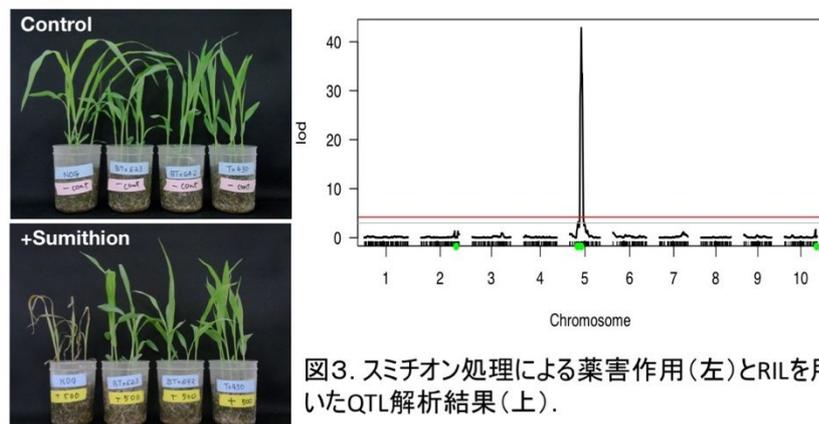


図3. スミチオン処理による葉害作用(左)とRILを用いたQTL解析結果(上)。

### (3) スティググリーン候補遺伝子の絞り込み

得られた QTL の染色体上の領域を、RIL 個体の遺伝子型から絞り込みを行い、5 番染色体上の約 500kb 程度に着目した。この領域には、4 つの遺伝子が存在しており、NOG のリシーケンスとの比較からは、1 つの遺伝子が NOG で欠失していることが予想された。ただし、この領域には、ゲノム上に散在する反復配列が存在して NOG のリシーケンス結果の信頼性が高くなく、欠失した領域を特定することができなかった。加えて、この遺伝子（詳細は省略）はゲノム内に相同性の高い遺伝子が散在しており、欠失遺伝子がスティググリーンとスミチオン耐性の原因遺伝子であることを結論づけることはできなかった。

### (4) スティググリーン遺伝子と有機リン殺虫剤耐性との関連性

止葉の老化を指標としたスティググリーン遺伝子の QTL 解析では 20 年近く前に報告された 4 つの QTL 遺伝子 (*Stg1, 2, 3, 4*) がソルガムではよく知られているが、これらの実態についてはまだ明らかでない。また、有機リン薬剤の感受性もソルガムで報告されており、それぞれを関連づける研究はされていない。本研究で得られた 5 番染色体のスティググリーン遺伝子は、*Stg4* の近傍にマップされており、*Stg4* に相当する可能性も考えられるとともに、ソルガム栽培時にはアブラムシ駆除のために殺虫剤を併用することを考えると、有機リン薬剤耐性がスティググリーンである可能性も否定できない。本研究では、これらの可能性を提示できるとともに、遺伝子の実態解明が今後期待される。今後、様々なソルガム系統で今回同定された候補遺伝子のハプロタイプを解析し、それぞれの遺伝素因解明が可能になると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohnishi Norikazu, Wacera W. Fiona, Sakamoto Wataru	4. 巻 60
2. 論文標題 Photosynthetic Responses to High Temperature and Strong Light Suggest Potential Post-flowering Drought Tolerance of Sorghum Japanese Landrace Takakibi	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2086 ~ 2099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcz107	査読の有無 無
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 Hiromi Kajiya-Kanegae1, Hideki Takanashi, Masaru Fujimoto, Motoyuki Ishimori, Norikazu Ohnishi, Fiona Wacera W., Everlyne A. Omollo, Masaaki Kobayashi, Kentaro Yano, Michiharu Nakano, Toshiaki Kozuka, Makoto Kusaba, Hiroyoshi Iwata, Nobuhiro Tsutsumi, Wataru Sakamoto	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 a 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 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂本 莉沙, 藤本 優, 高梨 秀樹, 鐘ヶ江 弘美, 野下 浩司, 小林 正明, 矢野 健太郎, 小童谷 利恵, 大西 紀和, 堤 伸浩, 坂本 亘, 岩田 洋 佳
2. 発表標題 Phenomics に適した QTL 解析手法の提案: ソルガ ム RIL 集団の葉形態を例に
3. 学会等名 日本育種学会 第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西 紀和, 坂本 亘
2. 発表標題 ソルガムの在来種たかきびが示す高温・強光応答の出穂前後における変化の光合成活性測定による解析
3. 学会等名 第9回 ソルガムワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩屋健一, 大西 紀和, 坂本 亘
2. 発表標題 葉緑体膜機能維持に関わるVIPP1のGTPase活性の解析
3. 学会等名 第60回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Everlyne Omollo, Ivan Galis, 坂本 亘
2. 発表標題 Genetic Dissection of Apid Resistance in a Sorghum Cultivar
3. 学会等名 第10回ソルガムワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荊 子桓、坂本 亘
2. 発表標題 Identification of a stay-green gene in sorghum
3. 学会等名 第10回ソルガムワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荊 子桓、坂本 亘
2. 発表標題 QTL analysis of stay green in sorghum using a RIL population derived from Takakibi NOG
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Everlyne Omollo, Norikazu Ohnishi, Murage Hunja, Hironi Kanegae, Ivan Galis, Wataru Sakamoto
2. 発表標題 Genetic dissection of aphid resistance in a sorghum cultivar
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ワセラ フィオナ , 藤原 徹, 山崎 清志, 高梨 秀樹, 堤 伸浩, 鐘ヶ江 弘美, 坂本 亘
2. 発表標題 たかきびRILのイオノームを用いたソルガム種子の元素含量に関するQTL解析
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020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