

研究種目：若手（B）
研究期間：2007 ～ 2009
課題番号：19780006
研究課題名（和文）環境保全型農業のための、イネのリン欠乏ストレス応答形質の単離と機能解析
研究課題名（英文）Positional cloning of phosphorus-deficiency-responsive traits in rice and its functional analyses for agriculture of environmental conservation type
研究代表者
清水 顕史（SHIMIZU AKIFUMI）
滋賀県立大・環境科学部・助教
研究者番号：40409082

研究分野：農学
科研費の分科・細目：農学・育種学
キーワード：植物育種・遺伝

1. 研究計画の概要

リンは必須元素の一つであるが、土壌中で植物が利用できない不可給態になり易く農業生産上の限定要因になる。世界中に広がるリン欠乏土壌に対して、低リン環境に適応した作物が育種できれば、リン肥料の過剰投与を抑制でき持続的な環境保全型農業が可能になる。また、リン吸収効率の高い植物を開発することで、リンの富栄養化した湖沼の環境修復にも応用できるだろう。

植物のストレス応答機構に関する研究は現在盛んに行われているが、リン欠乏ストレスに対する遺伝子および発現遺伝子の解析は始まったばかりである。本研究では、リン欠乏条件のイネで誘導される(1)根の伸長と(2)酸性ホスファターゼ活性上昇、の2つのストレス応答形質に着目し、その遺伝子単離と応答機構の解明を目的とする。後者の形質については酵素活性上昇とリン利用率との関連を調査しイネゲノムリソースの提供する染色体断片置換系統群(CSSLs)を利用した形質マッピングを行い遺伝子単離に向けた準備とし、先行している前者の形質については CSSL と背景親との交雑後代を用いたマップベースクローニングによって遺伝子単離を行なう。

2. 研究の進捗状況

リン肥料の投入を減らし環境への負担を抑えた持続的農業を実現するためのイネ育種に向けて、2種類のリン欠乏ストレス(P欠)応答形質の制御に関する有用遺伝子の単離を進めた。

(1)P欠誘導される根の伸長形質(以下REPとする)は、以前にイネ染色体6長腕に座乗

する品種Kasalathの対立遺伝子に由来することを明らかにしていた(Shimizu et al. 2004)。本研究ではKasalath染色体断片を置換する日本晴系統群を用い、染色体6長腕がKasalathに置換した系統は水耕栽培条件においてREPだけでなく茎葉部リン含量の増加などの適応性の向上を示すことを明らかにし、その置換系統と日本晴との交雑F₂集団を用いた精密マッピングによるゲノム領域の絞込みの結果と合わせて、論文発表した(Shimizu et al. 2008)。現在は候補遺伝子の単離に向けて領域の絞込みを進めている。またP欠下におけるREPとその他複数形質間の真の関連性を見出す検定法としてグラフィカルモデルの有効性を示す学会発表を行った(清水 2008)。

(2)P欠応答性の葉身中の酸性ホスファターゼ(APase)活性上昇については、日本晴とKasalathの下位葉ほど品種間差が大きく、Kasalathが4倍以上高いとがわかった(清水ら 2009)。このAPase活性上昇はP欠4~5週目に顕著で、各葉身のリン濃度の測定結果から、下位葉中の有機態リンを無機リンへと再利用するストレス耐性機構の存在が示唆された。今後Kasalathの持つP欠応答性APase活性遺伝子の単離を進める。既に日本晴とKasalathのF₂分離集団を用いたQTL解析の結果から染色体8に候補領域を見出しており、また親品種のマイクロアレイ発現遺伝子解析によっても同領域中に存在するAPase遺伝子のP欠応答性が確認されている。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

当課題は4年計画(平成19~22年)での遂行を予定したので、21年度までの達成度としては順調であるといえる。

P欠で誘導される根の伸長形質(REP)については遺伝子単離とその機能解析を計画していた。最終年度の現在は染色体6長腕のゲノム領域の絞り込みを進めており、候補遺伝子の一つについては形質転換イネを手配して表現型の確認を進めており、おおむね順調といえる。

P欠で誘導される酸性ホスファターゼ(APase)活性上昇という形質については葉身および根で発現する遺伝子のマッピングを計画していた。品種間差が明瞭なP欠で誘導される下位葉葉身のAPase活性を研究対象に絞り、活性上昇時期の特定およびリン含量分布への影響を評価した。CSSLを用いた形質マッピングを22年度に進めており、おおむね順調といえる。

4. 今後の研究の推進方策

本研究課題は最終年度前年度応募課題(基盤C課題番号22580010)に採択されており、継続して推進させることができる。平成22~24年の研究期間中における(1)P欠で誘導される根の伸長形質(REP)と(2)P欠で誘導される酸性ホスファターゼ(APase)活性上昇、それぞれについての推進方策は以下の通りである。

(1)マップベースクローニングによる候補領域の絞り込みと相補性検定による候補遺伝子の確認を進め、遺伝子単離を完遂する。単離できた遺伝子については、リン欠乏ストレス応答性および塩基配列から予想される機能の確認を、分子生物学的手法により行う。本形質のリン欠乏ストレス耐性への寄与については、候補領域の絞りこみ過程で得た準同質遺伝子系統を用いて検定圃場などでの栽培試験により評価する。

(2)染色体断片置換系統群(CSSLs)による形質マッピングの結果が、既に行っているQTL解析およびマイクロアレイ法による発現遺伝子解析結果と対応する場合は、候補遺伝子として考えられる染色体8のAPase遺伝子に着目して相補性検定を行う。対応しない場合は、形質マッピングで有意差の出たCSSLと背景親との交雑後代を利用した精密マッピングを行い、マップベースクローニングによる候補領域の絞り込みを行う。また、本形質のリン利用効率への寄与については、準同質遺伝子系統を用いた栽培試験により評価する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

- ① Shimizu A., Kawasaki S. "Rapid construction of a high-density rice linkage map by High Efficiency Genome Scanning (HEGS) system." *Rice Science* 16:247-251. 2009、査読有り
- ② Shimizu A. "QTL analysis of genetic tolerance to iron-toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) by quantification of bronzing score." *Journal of New Seeds* 10:171-179. 2009、査読有り
- ③ Shimizu A., Kato K., Komatsu A., Motomura K., Ikehashi H. "Genetic analysis of root elongation induced by phosphorus deficiency in rice (*Oryza sativa* L.): fine QTL mapping and multivariate analysis of related traits" *Theoretical and Applied Genetics* 117: 987-996. 2008、査読有り

[学会発表](計5件)

- ① 松本公佑ら「イネ根表面の iron plaque 形成に関する突然変異体スクリーニング」、日本育種学会、2009年9月25日、北海道大学(北海道)
- ② 清水顕史「イネのリン欠乏ストレス耐性・低pH耐性のQTL解析と育種への展望」、日本植物細胞分子生物学会、2009年7月31日、日本大学生物資源科学部(神奈川県)
- ③ 清水顕史ら「リン欠乏ストレス下におけるイネ葉身中のリン再利用」、日本育種学会、2009年3月28日、つくば国際会議場(茨城県)
- ④ 清水顕史「グラフィカルモデルによる低リン・ストレス関連形質の多変量解析」、日本育種学会、2008年10月11日、滋賀県立大学(滋賀県)
- ⑤ 清水顕史ら「イネのリン酸欠乏によって誘導される根伸長3. 精密QTLマッピングと発現遺伝子解析」、日本育種学会、2007年9月22日、山形大学(山形県)

[図書](計1件)

- ① Shimizu A., Kato K., Komatsu A., Ikehashi H. (2008) "Genome and transcriptome analyses for acid tolerance in rice: phosphorous deficiency and low pH stress." *In: Development of New Bioremediation Systems of Acid Sulfate Soil for Agriculture and Forestry.* S. Sasaki (eds), SHOUKADOH Book Sellers, Kyoto, 25-28. ISBN 978-4-87974-608-5