

平成 23 年 6 月 18 日現在

研究種目：若手研究(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

研究成果の概要（和文）：三大肥料の一つであるリンの欠乏は世界の農業生産上の重要な問題であるが、問題解決に役立つイネの 2 種の遺伝研究を進めることができた。つまり、リンが欠乏すると根を伸ばす遺伝子については、この性質の有用性を示し遺伝子位置を絞り込むことにより遺伝子の正体解明に向けた成果を挙げることができた。また、古い葉のリンを再利用するのに役立つ酸性ホスファターゼの、機能解析と遺伝要因の解明を進めた。

研究成果の概要（英文）：Deficiency of phosphorus which is one of the three major nutrients, is a limiting factor of agronomical production over the world. I have made progress in genetic analysis of two kinds of agronomical traits in rice, which can be useful for solving the problem. One trait is "Root Elongation under Phosphorus deficiency". Its contribution to P-deficiency tolerance was evaluated and fine-mapping of the gene was conducted. The other trait is "Acid Phosphatase" which can be useful for P recycling from old leaf blade. Its effect on P content in new developing leaf and the genetic factor were studied.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1400,000	0	1400,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
総計	2600,000	360,000	2960,000

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. 研究開始当初の背景

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。植物は不足しがちなリンを吸収するため、進化の過程で獲得した様々な応答機構を持っており、イネでは、リン酸トランスポーターの発現誘導、酸性ホスファターゼの分泌、有機酸の分泌、根の伸長などが報告されている。

これまでにストレス応答機構に関する研究は盛んに行われてきたが、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。また、これら研究された遺伝子の耐性品種育成への応用事例もない。そこで、以下の(1)と(2)に示すイネの 2 つのストレス応答形質に着目した研究計画を立案した。

(1) リン欠乏ストレス誘導性の根の伸長 (Root elongation under Phosphorus deficiency 以下 REP) については、QTL 解析により染色体 6 長腕に有意な染色体領域を見出していた (Shimizu et al., 2004)。この QTL は、染色体 6 長腕が REP を持つ品種に置換した染色体断片置換系統でも有意差が確認でき、その置換領域の精密マッピングを進めているところであった。

(2) リン欠乏ストレス誘導性の酸性ホスファターゼ (Acid Phosphatase 以下 APase) 活性については、下位葉葉身の APase 活性に関する QTL 解析から染色体 8 に有意な染色体領域を検出していた。該当するゲノム領域中に存在する APase 遺伝子は、根のマイクロアレイ解析結果ではリン欠乏ストレスによって発現上昇しており、下位葉葉身の APase 活性誘導を引き起こす原因遺伝子の候補として確認をする必要があった。

2. 研究の目的

世界の作物生産上の主要な制限要因であるリンの欠乏ストレスは、農学上の最重要問題の一つであり、イネ育種学によるこの問題の解決は限りあるリン資源の上に成り立つ世界の食料事情を、持続的で環境保全的に改善する意味を持つ。不可給態リンからのリン獲得能力や植物体内での利用効率を向上させたイネ品種育成に向けて、リン欠乏ストレスに応答する遺伝子を明らかにすることが本研究の目的であり、申請時当初は以下の(1)と(2)を具体的な研究目的とした。

(1) 染色体断片置換系統と反復親品種との交雑後代を利用した精密マッピングによる、リン欠乏ストレス誘導性の根の伸長形質 (REP) の原因遺伝子の単離をすること。更にその機能解析を目的とする。

(2) リン欠乏ストレスによって誘導される酸性ホスファターゼ (APase) 活性上昇の、リン代謝またはリン獲得に対する評価と原因遺伝子の解析を行うことを目的とする。APase 活性はそれぞれ品種間差を見出した①下位葉葉身と②根の 2 部位を研究対象とする。①下位葉葉身の APase 活性上昇はリン利用効率に影響を及ぼすか否かを定量的に評価することを目的とする。この形質は染色体 8 に QTL が検出されているので、染色体断片置換系統群を用いた実験によってもこの QTL の確認を行い、選抜した置換系統を利用した精密マッピングによる遺伝子単離に進み、リン利用効率を向上させた準同質遺伝子系統の作出を目指す。②イネの根の APase 活性もリン欠乏ストレスによって誘導され、その活性には品種間差があった。その品種間差は、根のマイクロアレイ解析により検出されたリン欠乏ストレス誘導性の APase 遺伝子発現強度の品種間差と対応していた。この対応を確認

するために遺伝解析を進めておくことと便利であり、そのために数百個体以上の形質調査を可能とする簡便で精度や再現性の高いスクリーニング法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

イネのリン欠乏ストレス誘導性の応答形質として(1)根の伸長 (REP) と(2)酸性ホスファターゼ (APase) 活性上昇について、それぞれの進捗状況に応じて研究を進める。

(1) REP をポジショナルクローニングするために、精密マッピングによる候補領域の絞り込みを続け候補遺伝子の探索を行う。候補遺伝子は、作出した遺伝子組換えイネによる相補性検定により機能を確認する。

(2) リン欠乏ストレスによって誘導される APase 活性の上昇について、①下位葉葉身の APase 活性上昇がリン利用効率の増加に寄与するか否かを定量的に評価するため、まずストレス処理期間と APase 活性上昇の経時的変化を調査し、活性上昇の誘導時期と個葉別リン濃度との関係から下位葉リンの再利用の可能性を調査する。また検出されている QTL を確認するために、染色体断片置換系統群による形質マッピングを行い、見出した有意な置換系統と背景親との交雑後代を用いた精密マッピングへ進む。②根の APase 活性は、*in vivo* で測定してきた。つまり *p*-ニトロフェニルリン酸の入った反応液にイネを根だけ漬け 30 分培養した際の、APase によって加水分解される *p*-ニトロフェノール生成量で酵素活性を測定していた。この方法は同時に数百以上の個体を処理するのが難しく遺伝解析に向かないため、多検体のスクリーニングが可能な方法に改良する。

4. 研究成果

本課題によって得られた成果を以下の(1)~(4)に分けて説明する。

(1) リン欠乏ストレスによって誘導される根の伸長形質 (REP) の精密マッピング結果を論文発表した (Shimizu et al., 2008)。論文の中で、①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) をスクリーニングしたところ、染色体 6 長腕がインディカ品種 Kasalath に置換した系統 (CSSL29) はリン欠乏下で根が伸長し以前に検出した QTL の効果を別の遺伝解析材料によっても再確認できたこと、②CSSL29 は地上部リン含量や茎数など根の伸長以外の、リン欠乏ストレスにより減少する形質の向上がみられ (図 1)、ストレス適応性が上昇しているといえること、③CSSL29 と反復親である日本晴との交雑自殖

F₂ 集団を利用した精密 QTL マッピングを行ない、*qREP-6* と名付けた遺伝子座を 1, 200kb のゲノム領域に絞り込めたこと (図 2)、などを報告した。

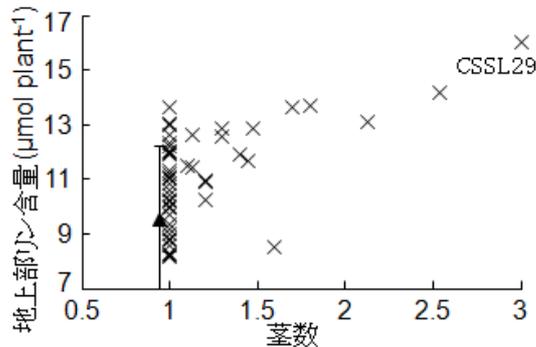


図1. 日本晴天CSSLsの、リン欠乏条件における茎数と地上部リン含量の散布図。CSSLsのプロットを×で、背景親(日本晴天)を▲で示す。

イネ染色体6

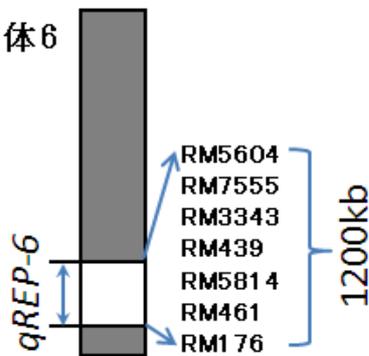


図2 CSSLを利用した精密QTLマッピング

当論文は *Theor. Appl. Genet.* 誌上で 2008 年 10 月に発表され、2010 年 6 月 18 日時点において、データベース Scopus 上で 3 件の被引用が記録されており、更に少なくとも 3 件の被引用 (Springer 社による) がある (Scopus にはタイムラグがあるため未収録)。農業形質のマッピングを報告する論文としては発表後短期間の内によく引用されているといえる。農作物のリン欠乏ストレス耐性を研究する論文からの引用が 6 割以上を占めその全てが農業大国である中国からの引用であることは、本形質の農業上の重要性を反映しているといえる。

(2) ストレス応答形質間の関連を検定する方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)。図 3 の右 (a) は単純相関行列 (COR) により、左 (b) はグラフィカルモデル (GGM) によりそれぞれ REP と他の 6 形質 (TN: 茎数、DW: シュートの乾燥重、P, K, Mg, Ca はそれぞれシュートの P, K, Mg, Ca 含有率) 間の関連を表したもので、

各形質を頂点で表し、頂点間の関連が有意な場合に頂点間を辺で接続している。辺の側の数値は COR では 5%水準以下で有意な単純相関係数を、GGM では最良モデルの偏相関係数を表し、COR でのみ有意な関連を点線で、GGM でのみ有意な関連を破線で示している。

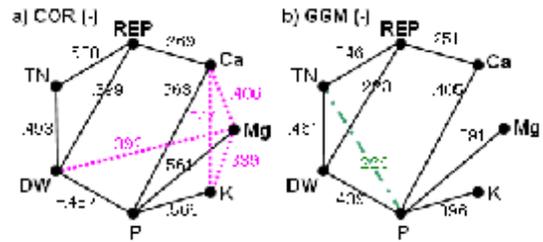


図3 リン欠乏条件下における形質間の関連を表した無向グラフ

COR では有意な関連が 12 対検出され、GGM では 9 対のみ検出された。K と Ca, Mg と K, Ca と Mg の 3 つの正の相関は GGM では偽の関連として排除されているが、解析したデータはリン供給量のみを制限した栽培条件によるため、K, Ca, Mg 間の関連は P を介した間接的なものと考えるのが実情に合う。これらの偽の関連を排除できる GGM は単純相関を用いた方法よりも優れているといえ、論文発表 (Shimizu et al. 2008) においても一部を紹介した。

(3) 多検体の遺伝子型決定を効率的に行うための汎用電気泳動 (HEGS) システムについての論文発表 (Shimizu and Kawasaki 2009) を行った。本研究課題が目的とする精密マッピングによる遺伝子単離の遂行に必要な技術である。

本研究は当初 4 年間の研究計画に基づいていたが、最終年度前年度応募課題 (基盤 C 課題番号 22580010) に採択されたため 3 年目の H21 年度で終了となり、*qREP-6* の単離という目的は継続課題に引き継がれることになった。引き続き候補領域の絞り込みを進めるために必要な、多検体 DNA 抽出と HEGS による効率的なジェノタイピングのシステムが確立できたことによって、Shimizu (2009) で論文発表した鉄過剰害ストレス耐性など、他の様々なストレス関連の複雑な形質の遺伝子単離が実現可能になった。Shimizu (2009) ではまた、栄養ストレスによって誘導される葉身色の変化の画像解析による定量化法を提案したが、これはリン欠乏ストレスの研究にも応用できる成果である。

(4) リン欠乏ストレスで誘導される酸性ホスファターゼ (APase) 活性上昇について。

① 下位葉葉身にみられた品種間差については学会発表した (清水ら 2009、図 4)。

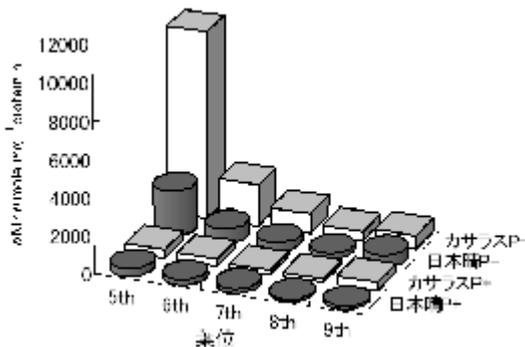


図4 葉位別、処理・品種別のAPase活性

図に示すようにインディカ品種 Kasalath の下位葉の APase 活性はジャポニカ品種の日本晴に比べてリン欠乏下で 4 倍以上高くなり有意な差となった。この品種間差は発芽種子にリン欠乏処理を開始して 4 週間以降に現れたので、4 週間目に品種 Kasalath の下位葉葉身を切除し 1 週間後の完全展開葉のリン含量を調べたところ、切除しないものと比べてリン濃度の減少が確認された。つまり、この形質は地上部のリンの再利用に寄与する可能性が示唆された。

②リン欠乏区および対照区で 4 週間水耕栽培した Kasalath と日本晴のシュートから抽出した RNA を用いて、Agilent 社の 44K マイクロアレイ解析を行ったところ、既に根のマイクロアレイ解析で品種間差を検出していた染色体 8 上にある APase 遺伝子の Kasalath におけるリン欠乏ストレス誘導性を確認できた。今後は CSSL による形質マッピングを行い、日本晴×Kasalath の F₂ 世代の QTL 解析で検出された染色体 8 の領域との対応および、QTL 位置とゲノム領域の位置が対応するマイクロアレイ解析で検出された APase と、品種間差の原因を説明するかどうかを調査する。

③根の APase 測定法が多検体スクリーニング法の確立については、根を反応液に漬ける方法(従来法)は多検体の同時処理が難しく再現性の高い方法は見つかっていないこと、根組織からの酵素抽出する方法は根の部位によって酵素活性の程度に差がみられたため断念した。現在は、分泌性の APase に焦点を絞って多検体用の測定方法を未だに検討中である。

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 顕史 (SHIMIZU AKIFUMI)
滋賀県立大学・環境科学部・助教
研究者番号：40409082