

平成 21 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19880032

研究課題名（和文） イネの根系発達を制御する遺伝子の機能解析と分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular identification and characterization of regulatory gene for root system development in rice.

研究代表者

小原 実広 (OBARA MITSUHIRO)

財団法人 岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・研究員

研究者番号：10455248

研究成果の概要：物質生産向上には、作土からの水分や栄養吸収を促進させることが有効な方法の一つである。すなわち、これらの吸収を担っている根を拡大させることで、作物の生産性の向上が期待される。しかし、作物の根の発達を制御している遺伝子やその機構は、ほとんどわかっていない。そこで、申請者は、物質生産が低下したイネの自然突然変異系統を単離し、根系の形との関連を調査するとともに、原因遺伝子の同定を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,360,000	0	1,360,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,710,000	405,000	3,115,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：イネ、根系発達、遺伝子単離、生産性

1. 研究開始当初の背景

水田や畑で栽培されている作物は、様々な環境において栽培されている。また、生育を通しての個体群落構成の変化によっても、栽培環境は変化していく。地上部においては葉群の発達による光競合が、地下部においては根の発達による作土からの栄養素の吸収競合が生じている。作物はこの様な栽培環境の変化に対応して、その形態や代謝などを変化させて、拡大生産を続けている。作物の物質生産向上を達成するためには、地上部における葉の群落構成や地下部での根系を制御し

ている分子機構を解明し、人為的に育種することが急務である。近年、葉の群落構成による光競合の回避に重要であると考えられている、直立型葉を制御している遺伝子が同定された(Sakamoto et al., 2006)。その遺伝子はブラシノステロイド代謝に関与しており、単位面積あたりの物質生産向上に寄与することが示された。一方、地下部は視覚的かつ継続的な観察が困難であるために、作物の根系を制御している機構の解析は遅れていた。根系の形は遺伝的性質が強いことが知られているために、シロイヌナズナ、イネなどの

モデル植物を用いた、分子遺伝学的解析が行われていた。根の伸長及び冠根の形成に障害が生じたイネの変異体が複数単離され、オーキシンシグナル伝達を介した冠根形成を制御している遺伝子が単子葉植物で初めて同定された(Inukai et al., 2000, 2005)。しかしながら、冠根形成の有無は、物質生産に大きな影響を及ぼさないことが示されている(Inukai et al., 2005)。また、モデル植物である双子葉植物シロイヌナズナにおいては、根の形態に関する複数の変異体が単離、解析がなされている(Casimiro et al., 2003)。さらに、自然変異に由来する QTL 解析から、根の分裂帯の細胞増殖と伸長を制御している遺伝子が同定された(Mouchel et al., 2006)。このように、複数の変異体が単離されていたものの、根系の発達を制御する遺伝子群とその機構の解明は、未だ不明な部分が多かった。

2. 研究の目的

本研究においては、根系の形に関する変異体を利用して、根系発達に関わる遺伝子を同定することを目的とした。さらに、同定した遺伝子の根系の発達、根の細胞の形態、遺伝子発現特性を明らかにすることにより、根系の発達機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *rbm1* 変異体の単離と性状解析

水田で栽培された野生型コシヒカリの集団から、完熟期の地上部乾物重が極めて低かった系統 *rbm1* (*reduced biomass mutant 1*) が単離された。この自然変異体と思われる *rbm1* は、根系の発達も極めて阻害されていた。この地上部乾物重と根系の発達の阻害の連関を詳細に検討するために、戻し交配第 2 世代の個体群を用いて、水田で栽培試験を行った。さらに、水耕法による栽培試験も行い、完熟期の地上部乾物重と根系の発達程度、水耕法栽培における幼植物期の根系との連関も検討した。水耕法で栽培された *rbm1* 幼植物を用いて、この変異体の根の伸長率を見積もった。

(2) ポジショナルクローニング法による、根系発達を制御する遺伝子の同定

rbm1 の原因遺伝子を単離、同定するために、インド型品種カサラスとの F₂ 交雑集団を作製した。*rbm1* や野生型コシヒカリに比較して、水耕法で栽培されたカサラスの根は有意に長いことが確認された。この F₂ 交雑集団を用いて、完熟期の乾物重と幼植物期の根長を調査した。DNA マーカーは、GRAMANE データベースで公開されている SSR マーカー、日本晴と 93-11 の塩基配列間の挿入と欠損を整理したデータベースから DNA マーカーの設定を行った。

(3) 形質転換植物を用いた、遺伝子の相補性試験

RBM1 遺伝子の構造遺伝子領域約 3.0 kb と、プロモーター領域と考えられる遺伝子上流領域約 3.0 kb を、PCR 法により、単離した。この遺伝子断片を、イネ形質転換植物作製に用いられるバイナリーベクターに導入し、アグロバクテリウム法により、形質転換イネの作製を行った。*rbm1* 変異体は、稔実の良い種子の獲得が困難であるために、*rbm1* 原因遺伝子がヘテロ接合体となっている系統の種子より、無作為にカルスを誘導し、感染を行った。複数系統の形質転換植物を作製し、幼植物期の根長にて、相補性試験を行った。独立した 3 系統の T0 個体の自殖種子を獲得し、水耕法にて栽培した。13 日間栽培した後、根長を測定後、葉身の一部を収穫し、DNA 溶液の調製を行った。これらの個体から、*rbm1* 背景に、*RBM1* 遺伝子断片が導入された個体を、PCR 法によって同定した。

(4) *RBM1* 遺伝子転写産物の発現・蓄積

幼植物期、栄養成長期及び完熟期の *RBM1* mRNA の蓄積量を、Real time PCR 法によって比較定量した。比較は、actin あたりの相対量で行った。

(5) *RBM1* 遺伝子の塩基配列比較解析

ラオス人民共和国の焼き畑で栽培されていたイネの根系の発達程度を、達観で評価した。これらの品種の種子は、日本へ持ち込まず、既に日本国内で保存されている系統を選抜した。これらの種子を催芽させ、DNA 溶液の調製を行い、*RBM1* 遺伝子の塩基配列比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) *rbm1* 変異体の単離と性状解析

rbm1 と野生型コシヒカリの戻し交配第 2 世代、110 個体を、水田にて完熟期まで生育させ、地上部乾物重を測定し、度数分布を解析した。その結果、明確に 2 ピークが検出された。一つ目のピークは、*rbm1* と同程度の地上部乾物重を示しており、この集団には、31 個体が含まれていた。これらの個体群の表現型は、*rbm1* 変異体と判断された。もう一方のピークは、*rbm1* の乾物重より高い個体群に由来しており、79 個体が含まれていた。このピークの平均値は、野生型コシヒカリと同程度であった。以上の結果から、*rbm1* は、主働な 1 遺伝子により支配されている、劣性変異体であることが明らかとなった。さらに、根部乾物重に関する度数分布の解析を行った所、明確な 2 ピークは検出されなかった。一般に、水田にて栽培されたイネの根部を、正確に収穫することは困難である。本研究の

収穫方法では、根部乾物重を正確に測定できていないために、*rbm1*の戻し交配第2世代の根部乾物重を正確に評価できていないことが考えられた。そこで、*rbm1*の根部の乾物重の減少が、いずれの根系の形の形質と連鎖しているかを、生育期間を通して調査した。その結果、完熟期の*rbm1*の根部乾物重の減少は、根の長さとは連鎖していることが判明した。このことは、水耕法で栽培された時にも認められた。乾物重を調査した、*rbm1*と野生型コシヒカリの戻し交配第2世代、110個体の自殖種子を採種して、幼植物期の根長の分布を解析した。その結果、異なる分布を示す3グループが存在することが明らかになった。一つ目のグループは、野生型コシヒカリと同様の根長の分布を示し、二つ目のグループは*rbm1*と同様の分布を示した、三つ目のグループは、野生型コシヒカリと同様のピークと*rbm1*と同様のピークが検出された。この結果より、*rbm1*の根部の乾物重の減少は、幼植物期の根長と連鎖していることが明らかとなった。さらには、*rbm1*の表現型を、簡便かつ正確に評価できることが明らかとなった。幼植物期における、根長の推移を経時的に調査した所、*rbm1*においては、播種2日後より、根の伸長阻害が認められ、相対伸長率も有意に低いことが判明した。

(2) ポジショナルクローニング法による、根系発達を制御する遺伝子の同定

*rbm1*とカサラスとのF₂個体群を、水田にて栽培し、完熟期の地上部乾物重を測定し、度数の分布を解析した。その結果、F₂個体群の度数分布は、明確に2つのピークを示さず、緩やかな連続的な分布を示した。この分布から、*rbm1*の表現型を正確に評価することは困難であった。水田で栽培された根長に関しても、同様のことが認められた。そこで、水耕法で栽培された、幼植物の根長を調査して、度数の分布を解析した。その結果、幼植物の根長においては、明確な2つのピークが検出された。根長が短い一つ目のピークは、*rbm1*の根長と同程度であり、根長が長い二つ目のピークは、野生型コシヒカリと同程度、あるいはより長い個体で構成されていた。これらの、*rbm1*の根長と同程度のF₂個体22個体を用いて、根長と連鎖のある染色体領域を、58個のDNAマーカーによって同定した。その結果、第1染色体の140-170 cMの領域と第2染色体の80-110 cMの領域に、連鎖が認められた。この染色体領域に関して、野生型コシヒカリよりも、根長が長かったF₂個体を用いて、連鎖を解析した。その結果、第1染色体の140-170 cMの領域には、*rbm1*の遺伝背景との連鎖が認められたのに対し、第2染色体の80-110 cMの領域には、*rbm1*の遺伝

背景との連鎖が認められなかった。これらの結果から、*rbm1*原因遺伝子は、第2染色体の80-110 cMの領域に存在していることが明らかとなった。そこで、この領域に新たにDNAマーカーを設定するとともに、4,000個体のF₂個体から、*rbm1*変異を示す個体を選抜した。連鎖を解析した所、*rbm1*原因遺伝子を、32 kbの領域に狭めることに成功した。Rice Annotation Data Baseから、この領域には、2遺伝子が存在することが示唆された。その内の一つの遺伝子においては、*rbm1*変異体では、約1.4 kbの欠損が認められ、成熟タンパク質が翻訳されないことが示唆された。この遺伝子を*rbm1*変異の原因遺伝子の候補として、野生型コシヒカリの遺伝子を*RBM1*遺伝子とした。

(3) 形質転換植物を用いた、原因遺伝子の相補性試験

ある系統において、*rbm1*背景に、*RBM1*遺伝子が遺伝子導入された個体は、根長が増加することが期待される。系統1においては、*rbm1*背景に、*RBM1*遺伝子が遺伝子導入された個体は21個体中17個体あり、根長の平均値は167±18 mmであった。一方、*rbm1*背景であり、*RBM1*遺伝子が脱落している個体は、21個体中4個体あり、根長の平均値は69±14 mmであった。これらの個体群の根長の間には、有意な差が認められた(図)。また、系統2においては、*rbm1*背景に、*RBM1*遺伝子が遺伝子導入された個体は21個体中17個体あり、根長の平均値は141±14 mmであった。一方、*rbm1*背景であり、*RBM1*遺伝子が脱落している個体は、21個体中4個体あり、根長の平均値は67±11 mmであった。これらの個体群の根長の間には、有意な差が認められた(図)。これらの結果から、*rbm1*変異は、*RBM1*遺伝子の部分的な欠損により、引き起こされていることが、確認された。

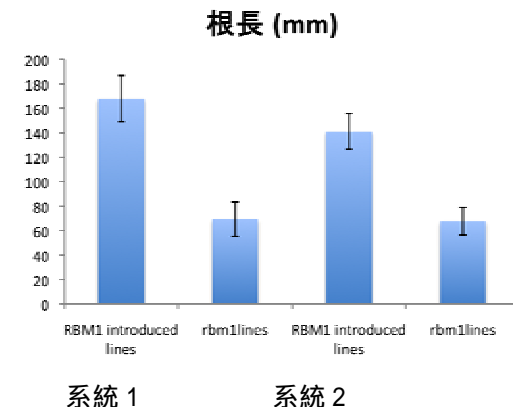


図 RBM1 遺伝子の機能相補性検定

(3)連携研究者
該当なし

(4) *RBM1* 遺伝子転写産物の発現・蓄積

RBM1 遺伝子の転写産物は、幼植物期の根、地上部や生殖成長期の葉身、葉鞘、穎花等、調査した全ての器官で、発現・蓄積が認められた。相対的な比較解析から、*RBM1* 遺伝子は、根で多く発現・蓄積していることが判明し、特に、先端より 10-30 mm 付近の伸長帯で、多く発現・蓄積していた。このことから、*RBM1* 遺伝子は、根の伸長に関与していることが示唆された。*RBM1* 遺伝子は、機能が解明されている遺伝子との相同性は、認められなかった。これより、*RBM1* 遺伝子は、根の伸長に関与している新奇遺伝子であることが判明した。

(5) *RBM1* 遺伝子の塩基配列比較解析

ラオスでの栽培が確認されている 3 品種に関して、*RBM1* 遺伝子を単離し、塩基配列比較解析を行った。その結果、これらの品種においては、数カ所の塩基配列の変異は認められるものの、大きな違いは認められなかった。また、現地での根系の達観調査から、無肥料で栽培されている地域においても、根系の発達程度に遺伝変異があることが判明した。この結果から、根系の発達を制御している遺伝子は、複数存在していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 3 件)

小原 実広、他 2 名、完熟期の乾物生産が低下したイネ変異体の単離と機能解析、日本土壤肥料学会 2008 年度愛知大会、2008 年 9 月 9 日

Obara M and Yamaya T, Genetic and physiological approach of nitrogen utilization toward improving environmental adaptation of rice., Workshop on Development of Environmentally-friendly Water-saving Technologies for rice, JIRCAS, 8 June 2008.

小原 実広、他 6 名、イネの根系発達能の評価とこの QTL の同定、日本育種学会第 113 回講演会、2008 年 3 月 29 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

小原実広 (OBARA MITSUHIRO)

財団法人 岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・研究員

研究者番号: 10455248

(2)研究分担者

該当なし