

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02937

研究課題名(和文) イネ耐性品種を用いた低リン環境適応型作物モデルの構築

研究課題名(英文) Study on the model of adaptation to low phosphorus conditions with a tolerant rice cultivar

研究代表者

佐藤 豊 (Sato, Yutaka)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究部門・上級研究員

研究者番号：90510694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：低リン耐性品種の耐性に関するQTL領域をコシヒカリとの交配後代集団を使って解析し、後代系統から低リン耐性を示す系統を選抜、さらに固定化を進めた系統を選抜した。これらの低リン耐性品種や系統を使ったトランスクリプトームやマイクロバイオーム解析から根における機能に感受性品種との違いがある可能性が示された。また、リン栄養状態の異なる圃場やポット試験によって、イネが一定の範囲内の低リン環境であれば、生育を害することなく収量を維持できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作物の栄養応答を解明することを目的とした分子生物学的な研究は多くあるが、その多くは実験室内の環境制御下で実施されたものである。本研究では、リン栄養状態の異なる圃場およびポットを使って、低リン耐性品種・系統の評価を行い、低リン環境応答・適応についての知見を分子動態や生育・収量の比較解析によって得た。そのため、本課題はこれまでの分子レベルの研究から得られた知見を圃場レベルでの現象の理解へと結びつける上で有用なものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed QTL for tolerance against low phosphorus conditions using a backcross population between a low phosphorus tolerant cultivar and Koshihikari, and then identified recombinant inbred lines with the tolerance. We performed genome-wide transcriptome and microbiome analyses and indicated the possibility that there are differences in the system associated with phosphorus homeostasis in root between the tolerant cultivar/line and Koshihikari. In addition, we found that rice plants have a potential to maintain growth and yield under moderate phosphorus conditions

研究分野：植物分子生物学

キーワード：リン イネ オミクス QTL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低リン環境に対する応答・適応機構について、これまで数多くの研究成果が報告されており、リン欠乏時の根からのリン酸吸収促進、成熟葉でのリサイクル等に関わる複数の遺伝子やタンパク質が明らかになっていた。一方で、圃場レベルかつ生育過程を通してリン栄養に対する環境応答を調べた分子レベルの研究はほとんどなかった。我々は、イネ体内の栄養状態を調べるために遺伝子発現指標(バイオマーカー)を開発し、複数年のイネの生育過程を通してそのプロファイリングを行った結果、黒ボク土(リン酸吸着能が強く可給態リン酸の量が少ない土壌)で栽培したイネは分けつ形成期にリンの要求反応を起こしていることを明らかにしていた(Takehisa and Sato, 2019)。その反応は沖積土(黒ボク土と比較してリン酸吸着能が弱く可給態リン酸の量が多い土壌)の水田では観察されず、同量の施肥を行った黒ボク土と沖積土の圃場でイネ品種「日本晴」を生育させた場合、両水田の生育にほとんど差が見られなかった。つまり、イネは一定範囲の低リン環境であればその環境に適応し十分に成長する能力を有している可能性が考えられた。これまで報告されていた低リン耐性の研究のうち、作物の改良に有用であることが圃場レベルで実証されていたのは、イネ品種「Kasalath」の QTL から単離された *Pstol1* (Gamuyao et al., 2012)、ムギの *TaPHO2-A1* (Ouyang et al., 2016)、などその数は多くなかった。我々は、長期間リン無施肥の圃場(長期連用圃場)でも十分な耐性を示す品種(以下、低リン耐性品種と称す)を見出ししており、その耐性程度は「コシヒカリ」や「Kasalath」と比較すると強かった。

2. 研究の目的

(1) 低リン耐性品種とコシヒカリとの戻し交雑自殖系統群の中から選抜した耐性系統の遺伝解析を進め、さらに長期連用圃場での試験やオミクス解析等を通じて、その耐性機構の解明を試みる。

(2) 低リン環境の圃場やポットで栽培したイネを対象として、リンの遺伝子発現指標や網羅的なトランスクリプトームのプロファイリングによって体内の栄養状態や生理状態を評価し、収量との関係を照らし合わせることで、低リン環境に対するイネの適応性や頑健性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 低リン耐性形質の遺伝解析

低リン耐性系統にコシヒカリを交配した分離集団(F2)を可給態リン酸がほとんど存在しない長期連用圃場で栽培し、分けつ数や枯れ程度から各個体の低リン耐性を評価して、「極強」、「強」、「弱」、「極弱」の4グループに分類した。グループ毎にバルク化したDNAを用いて次世代シーケンシングによるQTL-Seq解析を実施した。また、翌年にF2集団から選抜した低リン耐性「強」および「弱」の個体の自殖後代を長期連用圃場で栽培し、耐性が「強」の34個体、「弱」の26個体をバルクにしてQTL-Seq解析を行った。候補領域を絞り込むために、耐性系統とコシヒカリの交配後代(F2)にコシヒカリを戻し交配した集団を作成し、そこから低リンに耐性を示す系統(Line72, 75)と感受性を示す系統(Line104)を選抜し、自殖して固定化を進めた。

(2) トランスクリプトームおよびマイクロバイオーム解析

長期連用圃場で栽培した低リン耐性品種・系統とコシヒカリの葉と根を経時的にサンプリングし、mRNA-Seq解析を実施した。また、コシヒカリおよびLine72,75,104系統をリン無施肥のポットで栽培し、根のmRNA-Seq解析から低リン耐性の有無で発現差が見られる遺伝子を抽出した。また、低リン圃場(黒ボク土)で栽培した耐性品種、コシヒカリ、Line72の根のサンプルを用いて、マイクロバイオーム解析を実施した。

(3) 複数品種を用いたリン栄養環境に対する応答性の比較解析

2種類の土壌種(沖積土と黒ボク土)の水田で栽培した複数品種の葉を分けつ形成期にサンプリングし、遺伝子発現指標のプロファイリングを行うとともに、収量(穂数と穂重)の調査を行った。また、2種類の土壌種で栽培した複数年の経時的な「日本晴」の遺伝子発現データ、2種類の土壌種で栽培したジャポニカ2品種、インディカ2品種の遺伝子発現データを活用して、ゲノムワイドな比較解析を行った。

(4) 低リン耐性品種および系統の特性解析

リンの施肥量を段階的に変えた長期連用圃場の土壌および低リン圃場(黒ボク土)の土壌を使って、低リン耐性品種およびコシヒカリを栽培しリンの遺伝子発現指標の発現プロファイリングを行うとともに、収量(穂数と穂重)を調べた。また、同様にコシヒカリとLine72をリンの施

肥量を段階的に変えたポットで栽培し、生育および収量を調査した。

4. 研究成果

(1) 低リン耐性形質の遺伝解析

2年間実施した QTL-Seq 解析の結果、どちらの年も第3染色体、第7染色体の長腕、第11染色体の短腕、に QTL が検出された。また、選抜した Line72 については、DNA マーカーで解析した結果、耐性品種の約 85% がコシヒカリに置き換わっていると考えられた。一方で、耐性品種とコシヒカリの交配後代から選抜した系統の多くは稔性が低く、分離集団の稔実を調査して遺伝解析を実施したが原因となっている染色体領域を見出すことはできなかった。また、低リン耐性 QTL 領域を絞り込むために、3年目には Line72 とコシヒカリを交配して得られた F2 集団を長期連用圃場の土壌を使用したポット試験で評価することを試みたが、ポット試験では耐性品種の形質を再現することができなかった。長期連用圃場ではコシヒカリは分けつ数が 2-3 本と著しく抑制されるが、耐性系統は耐性品種と同様に移植後 50 日目以降から分けつ数が増加し、最終的には 8 本程度、Line72 は 10 本程度の分けつを形成する。長期連用圃場で栽培したコシヒカリ、耐性品種や系統の地上部の経時的な可溶性リン酸濃度には違いが見られず、現時点ではポット試験で低リン耐性を再現できない原因は明らかになっていない。

(2) トランスクリプトームおよびマイクロバイオーム解析

長期連用圃場で栽培した低リン耐性品種・系統とコシヒカリの葉と根を経時的にサンプリングし、mRNA-Seq 解析を実施した。根のデータを解析した結果、耐性系統ではコシヒカリと比較して、生育の早い段階で酸性フォスファターゼ等の遺伝子の発現が高い傾向が見られた。一方で葉のデータ解析では、耐性品種・系統とコシヒカリの間でリンの遺伝子発現指標等の発現に差は見られなかった。また、コシヒカリおよび Line72, 75, 104 系統をリン無施肥のポットで栽培し、根の mRNA-Seq 解析を実施した。Line72 とコシヒカリの間で発現差が見られる遺伝子を抽出したところ、菌根菌との共生に関わる遺伝子が含まれており、Line75 と 104 の耐性と発現レベルにも相関が見られた。そこで、低リン圃場で栽培した耐性品種・系統とコシヒカリの根をサンプリングし、アンプリコンシーケンスによりマイクロバイオーム解析を実施した。クラスタリング解析の結果、真菌叢に関しては、全栽培環境下において系統・品種間の明確な違いは認められなかったが、細菌叢では、圃場移植後 6 週間目で系統・品種間の違いが見られ、Line72 はコシヒカリよりも耐性品種に類似した群集構造を持つことが示された。植物の根圏微生物は、根からの代謝物分泌に大きく影響を受けることが知られている。耐性系統では酸性フォスファターゼ等の発現が上昇していたことから、根圏微生物に影響を与えていた可能性はあるが、低リン耐性と直接の関係についてはさらなる研究が必要であると考えられる。

(3) 複数品種を用いたリン栄養環境に対する応答性の比較解析

リン無施肥の黒ボク土（1-2 年間）、通常施肥の黒ボク土と沖積土に複数のイネ品種を栽培し、分けつ形成期にリンの遺伝子発現指標のプロファイリングを行った結果、リン無施肥の黒ボク土で最も発現が高く、沖積土で発現が最も低かった。また、最終的な収量（穂数や穂重）を調査したところ、圃場に依存した差異は見られなかった。黒ボク土と沖積土で栽培したときに体内の生理的狀態に違いあるか調べるために、両圃場で栽培したジャポニカ 2 品種、インディカ 2 品種の経時的な葉の遺伝子発現データをゲノムワイドに比較解析した。具体的には、11817 遺伝子を発現パターンの類似性を元に 54 のクラスターに分類し、4 品種についてそれらの発現を比較した。その結果、14 個の遺伝子からなる 1 つのクラスター (Clus10_b) だけ沖積土と黒ボク土で顕著な発現差が見られ、それ以外のクラスターでは大きな差が見られなかった (図 1)。それら 14 個の遺伝子はリンのリサイクル等に関わる遺伝子が含まれていることから、黒ボク土のイネではリンの恒常性維持に関わるシステムが発現しているが、一方でそれ以外の生理状態はほとんど差がない可能性が示唆された。また、黒ボク土で栽培したイネの根の遺伝発現データから、一部の酸性フォスファターゼ遺伝子が分けつ形成期に発現が高いこと、4 品種の葉のデータから microRNA399 の前駆体の発現が黒ボク土で高いことが明らかになり、黒ボク土のようなリンを吸収しづらい環境では、地上部ではリンのリサイクル等の反応、地下部では土壌から積極的にリンを吸収する機構を発現することで生育を維持していると考えられた。

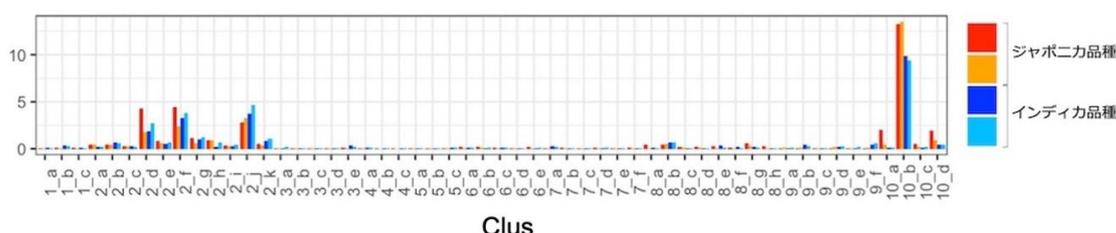


図 1. 各クラスターにおける黒ボク土と沖積土間の相対発現量の残差平方和の平均

(4) 低リン耐性品種および系統の特性

長期連用圃場の土壌および1年間リンを施肥していない黒ボク土圃場の土壌を使って、コシヒカリと耐性品種をリンの施肥量の異なるポットで栽培し(0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 kg/10a)、リンの遺伝子発現指標の発現プロファイリングと収量調査を実施した。その結果、リンの遺伝子発現指標の発現は、リンの施肥量に依存して変化するが、収量については長期連用圃場の土壌において、リンの施肥量が10 kg/10a以下で有意に減少が見られた。これらのことから、圃場試験の結果と同様に、イネは本来持っている機能を発動することで一定の範囲内の低リン環境であれば生育および収量を維持できることが明らかになった。

低リン耐性で選抜・固定したLine72の耐性を評価するため、Line72とコシヒカリをリンの施肥量を振った土耕ポット(0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 10 kg/10a)で栽培した結果、全試験区において両系統の草丈に違いは無かったが、2, 3, 4, 8, 10 kg/10a施肥区においてLine72の分げつ数は、コシヒカリに比較して有意に多かった(図2)。一方で、通常施肥圃場における両系統の草丈、分げつ数、地上部乾燥重、穂数と全穂重には有意な差は認められなかったことから、Line72は低リン環境下で分げつ数を高く維持できる耐性系統であることが確認された。また、本実験で両系統の分げつ数に最も大きな差が認められた3 kg/10aの条件についてコシヒカリとLine72の葉についてmRNA-Seq解析を行なったが、耐性形質と関連のありそうな遺伝子を見出すことができなかった。

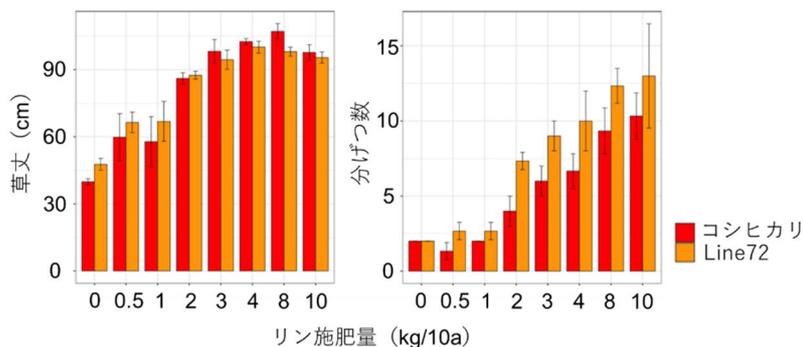


図2. リン施肥量を変えた土耕ポットにおける耐性系統の生育

< 引用文献 >

- Takehisa H, Sato Y (2019) Transcriptome monitoring visualizes growth stage-dependent nutrient status dynamics in rice under field conditions Plant J. 97:1048-1060.
- Gamuyao R, Chin JH, Pariasca-Tanaka J, Pesaresi P, Catausan S, Dalid C, Slamet-Loedin I, Tecson-Mendoza EM, Wissuwa M, Heuer S (2012) The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. Nature 488:535-539.
- Ouyang X, Hong X, Zhao X, Zhang W, He X, Ma W, Teng W, Tong Y (2016) Knock out of the PHOSPHATE 2 gene *TaPHO2-A1* improves phosphorus uptake and grain yield under low phosphorus conditions in common wheat. Sci Rep. 6:29850.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takehisa Hinako, Sato Yutaka	4. 巻 71
2. 論文標題 Transcriptome-based approaches for clarification of nutritional responses and improvement of crop production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 76～88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.20098	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 Takehisa Hinako, Ando Fuminori, Takara Yohei, Ikehata Akifumi, Sato Yutaka	4. 巻 45
2. 論文標題 Transcriptome and hyperspectral profiling allows assessment of phosphorus nutrient status in rice under field conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 1507～1519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pce.14280	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤豊、竹久妃奈子
2. 発表標題 網羅的トランスクリプトームおよびパイオマーカールを利用した低リン圃場環境がイネに及ぼす影響の解析
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021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
研究分担者	竹久 妃奈子 (Takehisa Hinako) (20455356)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究部門・上級研究員 (82111)	

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