

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02944

研究課題名（和文）イネ葉身の光合成産物転流能力に関する生理・遺伝学的解析

研究課題名（英文）Genotypic variance and its physiological basis in translocation of photoassimilates from rice leaf blades

研究代表者

廣瀬 竜郎（Hirose, Tatsuro）

高崎健康福祉大学・農学部・教授

研究者番号：90355579

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,400,000円

研究成果の概要（和文）：光合成産物の転流は人間社会における物流と同様に植物の生産過程においてきわめて重要である。しかし、作物の品種・系統間での光合成産物転流能力の遺伝的な差異の有無やその生理的な要因はわかっていない。本研究では、転流能力の簡易な評価方法を開発し、世界および日本の様々なイネの光合成産物転流速度を調べ、それら品種の転流能力の高低を評価・整理した。そのうえで、転流能力の差異と、光合成や糖代謝関連の生理形質や生育・収量関連形質などとの関係を考察することを目指した。さらに、次世代シーケンスによる最新の解析技法により、転流能力の差異をもたらす遺伝子座や遺伝子の特定を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作物生産は光合成による物質生産に支えられているが、光合成の場である葉から収穫部位（子実や地下茎など）への光合成産物に輸送（転流）が顧みられることは少ない。本研究では、イネを材料に葉身からの光合成産物の転流速度と植物体の成長パラメーターとの関係を明らかにし、さらに転流速度の制御に関する遺伝子を探索することを試みた。その結果、本研究で開発した転流速度評価法により世界および日本の多くの品種・系統間で転流速度に差異があり、また、その高低が出葉速度や相対成長率と相関することがわかった。また、それらに関する可能性がある遺伝子群を新たなトランスクリプトーム解析法で探索可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Like logistics in human society, translocation of photoassimilate is a crucial step for plant production. Little is known, however, for genotypic variation and its physiological basis in crop plants. In this study we developed a simple method to assess the translocation rate of photoassimilates from leaves and applied to various rice genotypes. We aimed to evaluate the relationships between translocation capacity and physiological traits including sugar metabolism, photosynthesis and some growth and yield parameters. Finally, we tried to get an insight into genetic basis for translocation capacity using a novel methodology of transcriptome analysis.

研究分野：作物生産生理学

キーワード：イネ 転流 糖 遺伝子 トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

生態学と経済学が欧米言語において語源を一にするように、作物の生産過程におけるシンク・ソース関係は経済における需要・供給関係になぞらえることができる。すなわち供給側要因である光合成能力(ソース能力)と、需要側要因である各種のシンク能力(器官形成や貯蔵物質代謝)である。一方、光合成産物の転流は社会経済における物流に相当し、人間社会のそれと同様に作物の生産過程でもきわめて重要である。しかし、ソース能力やシンク能力について膨大な研究成果がある一方、光合成産物転流についての定量的な知見は圧倒的に不足している。歴史的にみると、1960年代から1980年代にかけて行われた各種のトレーサーを使った解析により、転流の定量的な実態がはじめて明らかになった(文献1)。また1990年代以降は分子生物学の発展とあいまって、転流の分子機構(特に篩部ローディング・アンローディング)について多くの知見が得られた(文献2)。しかし、これらはいずれもモデル植物を中心とした生理研究にとどまり、農学的視点から将来の品種改良を視野に入れた研究は皆無である。こうした背景から、本研究では「同種作物のなかで光合成産物転流能力にはどの程度の遺伝的差異があり、それがどのような形質の違いをもたらすのか」について問うた。そして、転流能力の差異を決める要因を明らかにするとともに、転流能力の向上による新たな作物改良の可能性について考察することを目指した。

### (文献)

- 1) 米山忠克(1986)同化産物(炭素・窒素)の転流と植物生産、「植物生産の生理生化学」, pp107-148、博友社。
- 2) Aoki N, Hirose T, Furbank RT (2012) Sucrose transport in higher plants: From source to sink. In Photosynthesis: Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation. Chapter 28, J.J.Eaton-Rye and B.C.Tripathy, T.D. Sharkey eds. pp. 703-729. Springer, Dordrecht.

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、幅広いイネ遺伝資源(品種・系統)のソース葉からの光合成産物転流能力を定量的に評価し、その差異が各種の生理形質、生育・収量関連形質に及ぼす影響を解明し、さらに差異をもたらす遺伝的要因を明らかにすることである。そして、それらを通じて転流能力の向上による新たな作物改良の可能性について考察することを目指した。

## 3. 研究の方法

### 1) 研究材料

幅広いイネ遺伝資源のソース葉からの光合成産物転流能力を定量的に評価してその遺伝的差異を解明するために、農研機構ジーンバンクが配布しているイネコアコレクションを中心に評価を行った。これらコアコレクションはいずれも、農研機構ジーンバンクが所有する、世界および日本に由来する多数のイネ遺伝資源で観察される対立遺伝子の多様性の90%以上をカバーしており、比較的少数の品種セットで多様な遺伝的変異を調べることができるものである。

### 2) 研究方法

本研究では多くの品種・系統を用いて、それらの光合成産物転流能力を評価・解析する必要がある。したがって、多数の品種・系統に対応可能な転流能力の簡便な評価法を確立する必要がある。そこで研究代表者らは転流能力の簡便な評価法として、暗条件下でのソース葉中の糖・デンプン減少速度を用いる方法を開発してこれを用いた。また、転流速度の差異に関与する遺伝子を探査して考察するため、新たなトランスクリプトーム解析法を開発してこれを用いた。そのほか、個体の成長速度などの基礎的な生理形質も定法により測定した。

## 4. 研究成果

### 1) 転流能力の簡便な評価法の開発

従来、光合成産物転流能力の評価には炭素同位体トレーサー法が用いられてきた。本法は正確性に勝るものの、トレーサーの供与や分析に複雑な装置や高度な手技が求められ、多数の品種・系統を迅速に評価するには向いていない。そこで研究代表者らは転流能力の簡便な評価法として、暗条件下でのソース葉中の糖・デンプン減少速度に注目した(図1A)。暗条件化のソース葉では新たな光合成が行われない。一方、葉中の光合成産物量(可溶性糖とデンプンをあわせた含量(非構造的炭水化物含量: NSC含量))は、転流による葉外への搬出、呼吸による損失、および葉内代謝による他の成分への変換によって時間とともに減少する。文献調査から、呼吸損失は多く見積もっても転流による搬出量の10%以下と推測される。代謝変換については情報がないが、イネのソース葉(完全展開葉身)は発育生理的に完成しており、新たな代謝変換は転流量に対して大きくはないと推測できる。したがって、暗条件下の葉中NSCの減少速度は概ね転流による搬出の速度を反映していると考えられた。そこで実際

に、明条件から暗条件に移したときのイネの葉身中 NSC 含量の経時変化を追跡したところ、<sup>14</sup>C でラベルした CO<sub>2</sub> を光合成で取り込ませた後のラベルの残存割合のそれと非常によく似たパターンを示し、この方法で転流速度を簡便に評価できることがわかった(図 1 B)。そこで、その後の本研究では、イネ苗を明条件時と暗条件に移して 2.5 時間後の最上位完全展開葉の NSC 含量の変化から光合成産物の転流速度を求めた。

## 2) 転流速度と成長パラメーターとの関係

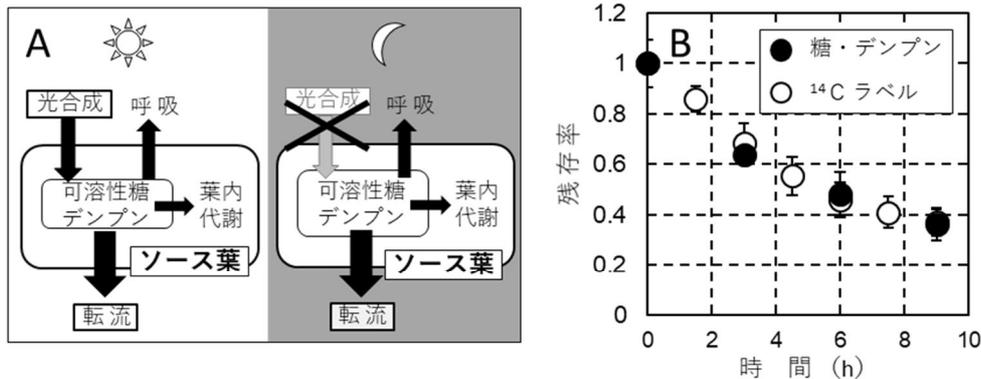


図1: A) 明期および暗期のソース葉における光合成産物(可溶性糖とデンプン)の収支. 明期から暗期になると光合成が行われないために、転流による搬出、呼吸による損失、および葉内での代謝変換のために光合成産物は経時的に減少する. B) 明期から暗期に入った後のイネ葉身中の糖・デンプン含量の経時変化(●), および光合成により<sup>14</sup>C O<sub>2</sub>を取り込ませたイネ葉身中の<sup>14</sup>Cラベル強度の経時変化(○). 両者の減少パターンは非常によく似ており、糖・デンプン含量の経時変化により転流速度を評価が可能であることを示す.

農研機構が配布している世界のイネコアコレクション(WRC)を用いて、第4葉期における各系統の転流速度と出葉速度ならびに成長速度との関係を調べた。その結果、光合成産物の転流速度として、暗所 2.5 時間での光合成産物減少量を用いた場合、および暗所 2.5 時間での減少率を用いた場合のいずれにおいても転流速度と出葉速度や相対成長率との間に有意な正の相関がみられた(表 1、図 2)。

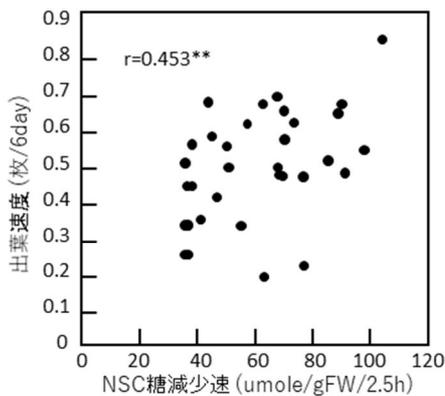


図2: WRC 品種の葉中NSC減少速度と出葉速度との関係

表1: WRC 品種の葉中糖・デンプン減少速度と出葉速度およびRGRとの相関係数

減少速度	出葉速度	RGR
単糖	0.220	0.204
シヨ糖	0.409*	0.393*
可溶性糖 <sup>a</sup>	0.452**	0.433*
デンプン	0.227	0.082
NSC <sup>b</sup>	0.453**	0.377*

第5葉抽出期の第4葉を用い、明期から暗期に入った直後の2.5時間の糖・デンプン減少量と、直前6日間の出葉速度およびRGRとの相関係数を求めた。\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, a: 単糖+シヨ糖, b: 可溶性糖+デンプン

## 3) トランスクリプトーム解析による転流制御因子の探索

上記を受けて、転流速度の差異に関与し、転流を制御する遺伝因子をトランスクリプトーム解析によって明らかにすることを試みた。2)の実験に用いたイネの葉身の一部から RNA を抽出してトランスクリプトーム解析を行った。そのうえで、トランスクリプトームデータと転流速度とを結びつける新たな手法を使って解析した。具体的には、転流速度を遺伝子の発現レベルによって説明する一次の重回帰式を想定した。ただし、イネのトランスクリプトームデータには一般的に説明変数として3万程度もの遺伝子(トランスクリプト)が含まれるため、表面上は高い回帰係数が得られても過学習効果によって真に転流速度と関連するトランスクリプトが選ばれない可能性が高い。そこで、スパース線形回帰の一つである LASSO 法を用い、さらに選ばれた説明変数(遺伝子)の妥当性が評価できるよう、全トランスクリプトの 10%をランダムに選んで LASSO によって 8 遺伝子を選ぶことを 1 万回繰り返し、このとき各遺伝子が選ばれる確率を求めることで、より適切な遺伝子かを評価できるようにした(図 3)。結果の一部を表 2 に示したが、その中にはシヨ糖代謝に関連する遺伝子も含まれており、今後の解析対象として有望であると同時に本解析法の有用性を示唆している。また、そのほ

かにも多くの遺伝子が比較的高頻度で選ばれ、それらの多くが転写因子や機能未知の遺伝子であった。

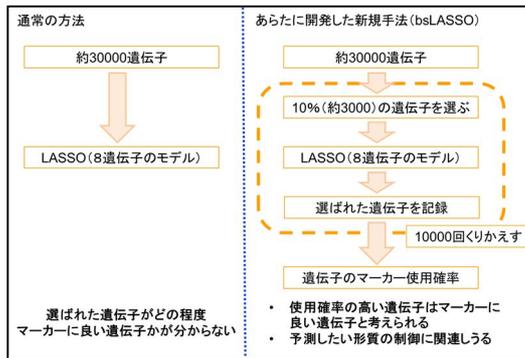


図3: LASSOによる一般的な重回帰 (通常の方法) と本研究が用いた新たな方法 (bsLASSO) とのを比較説明

表2: 転流速度と関連する遺伝子 (トランスクリプト) をbtLASSO によって推定した結果の一例 (カラムAが使用確率)

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	SelectFreq	Query.Seq.id	RAP.DB.description	Subject.Seq.id	gene.alias	Type	Short.description	Curator.summary
2	1	Ost1g0649900	Lipase, GDSL domain AT1G28600.1			protein_coding	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily	
3	1	Ost1g0880300	Similar to Pectin methylase AT5G09760.1			protein_coding	Plant invertase/pectin methyltransferase inter	
4	1	Ost07g0147500	Similar to Photosystem AT4G02400.1			protein_coding	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily	
5	1	Ost08g0457000	Conserved hypothetical AT4G01100.2	ADNT1		protein_coding	adenine nucleotide transporter 1	
6	0.9977776	Ost03g0749900	N-6 adenine-specific AT3G58470.1			protein_coding	nucleic acid binding:methyltransferases	
7	0.9938394	Ost08g0338600	Conserved hypothetical AT2G34300.1			protein_coding	S-adenosyl-L-methionine-dependent met	
8	0.9927312	Ost02g0749300	Conserved hypothetical AT4G21215.2			protein_coding		
9	0.9879879	Ost02g0121100	Zinc finger, CCHC-type AT4G36020.1			protein_coding		
10	0.9872047	Ost03g0392050	Oligosaccharyltransferase AT5G02502.1			protein_coding	Oligosaccharyltransferase	
11	0.9856262	Ost02g0208100	Similar to plastidic A AT1G80300.1			protein_coding	nucleotide transporter 1	
12	0.9808088	Ost01g0823600	Conserved hypothetical AT3G56290.1			protein_coding		
13	0.9783834	Ost08g0385000	Similar to seed matu AT2G21820.1			protein_coding		
14	0.9730849	Ost04g0115400	D111/G-patch domain AT5G26610.1			protein_coding	D111/G-patch domain-containing protein	
15	0.9684106	Ost07g0696100	Conserved hypothetical AT4G17240.1			protein_coding		
16	0.9657198	Ost04g0397800	Conserved hypothetical AT4G31950.1			protein_coding	cytochrome P450, member of CYP82C	
17	0.9616320	Ost07g0298800	Tic22-like family protein AT3G23710.1			protein_coding	Tic22-like family protein	
18	0.9451345	Ost07g0530300	Protein of unknown function AT2G29830.2			protein_coding	transferase:folic acid binding	
19	0.9404878	Ost03g0854400	Ribonuclease III domain AT1G24450.1	NFD2		protein_coding	Ribonuclease III family protein	
20	0.9194954	Ost01g0869900	Similar to Serine/threonine AT1G10940.2	ASK1.SNRK		protein_coding	Protein kinase superfamily Encodes a plant prote	
21	0.9178499	Ost06g0194900	Sucrose synthase 2 (AT3G43190.1)	ATSUS4.SU		protein_coding	sucrose synthase 4 Encodes a protein with	
22	0.9088263	Ost05g0188600	Conserved hypothetical AT4G03090.1			protein_coding	sequence-specific DNA binding:sequence	
180305_LASSO_result_total_ratio								

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Fukuda Akari, Hirose Tatsuro, Hashida Yoichi, Aoki Naohiro, Nagano Atsushi J.	4. 巻 48
2. 論文標題 Selection of transcripts related to low-temperature tolerance using RNA sequencing from F2 plants between japonica and indica rice ( <i>Oryza sativa</i> L.) cultivars	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Functional Plant Biology	6. 最初と最後の頁 984 ~ 984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1071/FP21088	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	福田 あかり  (Fukuda Akari)  (40355235)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター・上級研究員   (82111)	
研究分担者	青木 直大  (Aoki Naohiro)  (70466811)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授   (12601)	

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