

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22306

研究課題名(和文) イネの標的形質のみを改変できるシス配列探索法の開発

研究課題名(英文) Development of a cis-sequence search method that can modify only target traits in rice

研究代表者

犬飼 義明 (Inukai, Yoshiaki)

名古屋大学・農学国際教育研究センター・教授

研究者番号：20377790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：日本型とインド型品種の葉と根を対象に網羅的な発現量解析を行ない、葉では発現しないが、根では両品種間で有意に差がある遺伝子群を選抜した。次に、これら遺伝子群の発現量を制御する染色体領域をeQTL解析により検出した結果、第4染色体上に検出されたeQTL(eq.4)は、eq.4隣接遺伝子のプロモーター領域における両品種間の配列の違いによってもたらされることが判明し、日本型品種にのみ存在するシス配列が3種類見出された。このように器官特異的な発現量制御を可能にするシス配列の同定が進めば、これまでに課題とされてきた変異遺伝子の多面発現性を克服することができ、今後の育種利用が大いに期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにイネ根系の発育が優れる系統や品種が、乾燥ストレスなどの不良環境下においても、良好な成長を示すことが報告されている。そのため、根系が発達する突然変異体を対象として、変異遺伝子の同定が進められてきた。しかし、これらの変異遺伝子が実際の育種の現場において実用化された例は決して多くない。この主要な理由として、多くの遺伝子が複数の器官で共通に発現することが挙げられる。本研究にて試みた器官特異的な発現量制御を可能にするシス配列の同定が進めば、一つの変異遺伝子の多面発現性を克服することができ、これら有用遺伝子を実際の育種現場において利用できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive expression level analysis was performed on leaves and roots of Japonica and Indica cultivars, and genes that were not expressed in leaves but showed significant differences in roots between the two cultivars were selected. Next, as a result of detecting the chromosomal regions that control the expression levels of these genes by eQTL analysis, the eQTL (eq.4) detected on chromosome 4 was found to be caused by sequence differences between the two cultivars in the promoter region of the eq.4 flanking gene and three types of cis-sequences that exist only in Japanese cultivars were found. If the identification of cis-sequences that enable organ-specific control of expression level progresses in this way, it will be possible to overcome the pleiotropic expression of mutated genes, which has been a problem so far.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：イネ 標的シス配列 遺伝子発現制御 プロモーター領域

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでにイネ根系の発育が優れる系統や品種が、乾燥ストレスなどの不良環境下においても、良好な成長を示すことが報告されている。そのため、根系が発達する突然変異体を対象として、変異遺伝子の同定が進められてきた。しかし、これらの変異遺伝子が実際の育種の現場において実用化された例は決して多くない。この主要な理由の一つに、多くの遺伝子が複数の器官で共通に発現するため、ある器官、例えば根に対しては品種改良にとって優れた形質を付与できる突然変異遺伝子が見出されても、逆に地上部器官の形質には悪影響を与えてしまうことが挙げられる (Lucob-agustin et al. 2020)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、この変異遺伝子の多面発現性の回避を目指し、目的とする根器官の発現パターンをのみの変更を可能にする新たなシス配列探索法の開発を試みた。遺伝子発現の制御は、遺伝子近傍に位置するプロモーター領域が中心的な役割を果たしている。遺伝子発現パターンの変化は、その後の植物の表現型に影響するため、プロモーター領域の変更は作物の形質を改善できる可能性を大いに秘めている。実際に、プロモーター領域中の様々な箇所的人為的に変異を挿入することにより、トマト果実サイズに連続的な変化が生じることが報告されている (Rodriguez-Leal Det al. 2017)。プロモーター領域内には、遺伝子発現パターンを調節する転写因子が結合する DNA 標的配列 (シス配列) が存在する。その長さは一般に数塩基程度と短いながらも、これらシス配列は下流遺伝子のストレス応答性や発現部位を調節する上で極めて重要な役割を担っている (Tokizawa et al. 2015)。

本研究では、このシス配列に着目し、器官特異的な遺伝子発現制御をもたらす候補となるシス配列の探索を目指した。例えば、1) 根系生育が優れた品種 1 と通常品種 2 において、根における発現量には顕著な差がある一方、両品種の葉ではほぼ発現していない遺伝子 X を見出し、2) この遺伝子 X のプロモーター領域を比較し、品種間で異なるシス配列が存在した場合、このシス配列が根に特異的な発現量の制御に関わっているとみなすことにより、根に特異的な発現制御をもたらすシス配列候補の選抜を試みた。

3. 研究の方法

本研究では地上部形質には影響せず、根系のみを改善することを目指すため、まず日本型イネ品種とインド型イネ品種の葉と根を対象に RNA を抽出し、イネが有する 3 万を超える遺伝子に対して RNA-seq 法による網羅的な発現量解析を行った。次に、日本型とインド型品種間で有意に発現量に差が生じた遺伝子に対して発現量に関与する可能性のある染色体領域を統計的に検出する解析手法である expression QTL (eQTL) 解析を行った。

このうち、第 4 染色体上に検出された eQTL (eq.4) は、自身がその発現量を制御する遺伝子の座乗領域に非常に密接して存在するため、本遺伝子のプロモーター領域における両品種間の配列の違いによってもたらされた可能性が示唆された。そこで、日本型およびインド型品種間での根における発現量の差をもたらす要因が、プロモーター領域にあることを検証するため、複数の日本型およびインド型品種における、本遺伝子のプロモーター領域の配列の比較を試みた。

4. 研究成果

(1) 発現量データに基づく理想的な発現パターンを持つ遺伝子の選抜

本研究では地上部形質には影響せず、根系のみを改善することを目指すため、まず日本型イネ品種とインド型イネ品種の葉と根を対象に RNA を抽出し、イネが有する 3 万を超える遺伝子に対して RNA-seq 法による網羅的な発現量解析を行った。その結果、根のみで発現する遺伝子群を 625 個見出した。これらの遺伝子中には、日本型とインド型品種間で有意に発現量に差が生じた遺伝子が 300 個存在した。そこで、これら 300 個の個々の遺伝子に対して eQTL 解析を行った結果、9 つの eQTL を検出することに成功した。このうち、第 4 染色体上に検出された eQTL (eq.4) は、自身がその発現量を制御する遺伝子 (eq.4 隣接遺伝子) の座乗領域に非常に密接して存在するため、本遺伝子のプロモーター領域における両品種間の配列の違いによってもたらされた可能性が示唆された。そこで本 eQTL に注目し、根および葉における eq.4 隣接遺伝子の発現量を RT-qPCR により測定し、両品種間で比較した。その結果、eq.4 隣接遺伝子は葉ではほぼ発現しておらず、根で特異的に発現し、かつ根における発現量はインド型品種において日本型品種よりも有意に高いことが確認された。

(2) eq.4 隣接遺伝子の発現量の違いが根形質へ与える影響

これまでに、プロモーター領域の変異が作物の表現型形質変化に関与することが報告されているため、eq.4 が制御する RCc3-2 遺伝子の発現量の違いが根形質へ与える影響を評価した。日本型品種とインド型品種の交配により作出された染色体断片置換系統群 (CSSL, Chromosome Segment Substitution Line) のうち、eq.4 および eq.4 隣接遺伝子が座乗する第 4 染色体の一部のみ

がインド型由来の染色体に置換された CSSL34 を用い、eq.4 隣接遺伝子の根における発現量と種子根長を、親品種である日本型およびインド型品種と比較した。その結果、CSSL34 は、eq.4 隣接遺伝子の根における発現量と、種子根長のいずれにおいても日本型親品種よりも有意に高い値を示すことが判明した。また、これらの値はいずれもインド型親品種と同程度であった。この結果から、CSSL34 において、eq.4 隣接遺伝子が根において高い発現をすることで、長い種子根をもたらす要因である可能性が示唆された。

(3) eq.4 隣接遺伝子の発現を制御する候補シス配列の選抜

日本型およびインド型品種間での根における発現量の差をもたらす要因が、プロモーター領域にあることを検証するため、複数の日本型およびインド型品種における、eq.4 隣接遺伝子のプロモーター領域の配列の比較を試みた。その結果、供試した日本型 2 品種ではいずれもプロモーター領域を増幅することができたのに対して、供試したインド型 7 品種全てにおいて、同領域を増幅することができなかった。この結果から、eq.4 隣接遺伝子は日本型とインド型品種で配列の異なるプロモーター領域を持ち、この違いが品種間の根における遺伝子発現量差に影響しているのではないかと考えられた。

次に、インド型品種におけるプロモーター配列を決定するため、イネゲノム全体の DNA を用いる代わりに、BAC (Bacteria Artificial Chromosome) クローンをテンプレートに PCR 反応を行った。この BAC クローンはイネゲノムの一部配列だけを持つため、より効率的に PCR 反応を行うことができる。本研究でも、eq.4 隣接遺伝子領域を含む BAC クローンの利用により、インド型品種における本遺伝子上流約 3kb のプロモーター配列を決定することが可能となった。そこで、日本型品種とインド型品種間において本プロモーター配列を比較した結果、インド型品種においてのみ DNA トランスポゾンが挿入していることが判明した。そのため、この DNA トランスポゾンの挿入が、両品種間での eq.4 隣接遺伝子の発現量の差をもたらしたのではないかと考えられた。

これを明らかにするために、日本型とインド型の両品種が持つプロモーター配列、それぞれ約 3kb の中で、本遺伝子の発現量に重要な領域を絞り込むことを試みた。まず、両品種由来の異なる長さのプロモーター領域とレポーター遺伝子を連結し、これらを導入した形質転換体を作成した。次に、これら形質転換体のレポーター遺伝子の発現量を比較した結果、日本型品種の eq.4 隣接遺伝子上流 0.5kb から 1kb の領域を含む形質転換体では、インド型品種の同領域を含む形質転換体に比べ、有意にレポーター遺伝子の発現量が低下することが明らかとなった。そのため、この 500b の領域中に遺伝子発現を制御するシス配列が存在すると考えられた。そこで、両品種間の eq.4 隣接遺伝子上流 0.5-1kb の塩基配列に対してどのような既知のシス配列が存在するかを検索し、比較した結果、インド型品種には存在せず、日本型品種にのみ存在するシス配列が 3 種類見出された。これらの選抜されたシス配列は、根において特異的に遺伝子発現量を抑制的に制御する機能を持つ可能性があると考えられる。

(4) 考察と今後の展望

本研究では、地上部形質には影響せず、根系だけを改良する育種技術開発のため、遺伝子の器官特異的な発現制御メカニズムの解明を目指した。この過程で、根特異的な発現をする eq.4 隣接遺伝子を同定し、この遺伝子の発現制御がプロモーター領域中に存在するシス配列の影響を大きく受けている可能性が見出された。日本型品種の上流 0.5-1kb の領域に検出されたシス配列は発現制御に抑制的な働きをしていると推察され、インド型品種ではトランスポゾンの挿入により、この抑制的なシス配列が破壊され、発現抑制が解除されたことで発現量が上昇したものと推察された。今後は、絞り込んだプロモーター領域をさらに狭めていくことと同時に、選抜されたシス配列をゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 などを用いて破壊し、これらの発現制御に関わる機能解析を行うことで、この考えを検証する必要がある。

このように器官特異的な発現量制御を可能にするシス配列の同定が進めば、これまでに見出されてきた根系を拡大する変異遺伝子が課題としてきた多面発現性を克服することができ、これら有用遺伝子を実際の育種現場において利用できるものと期待される。

< 引用文献 >

Lucob-agustin et al. 2020. Enhanced Root System Development Responses of a Newly Identified Mutation Gene Promoting Lateral Root Development to Various Nitrogen Conditions in Rice. *J. Int. Coop. Agric. Dev.*18: 48-55.

Rodríguez-Leal Det al. 2017. Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. *Cell* 171: 470-480.e8.

Tokizawa et al. 2015. Sensitive to proton Rhizotoxicity1, calmodulin binding transcription activator2, and other transcription factors are involved in Aluminum-Activated Malate transporter1 expression. *Plant Physiol.* 167: 991-1003.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神野恭輔、河合翼、土井一行、犬飼義明
2. 発表標題 イネにおける根特異的に発現する遺伝子の発現量制御に關与するシス配列の探索
3. 学会等名 第52回根研究集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神野 恭輔 , 河合 翼, 土井 一行, 犬飼義明
2. 発表標題 イネにおける根特異的発現性を示す遺伝子の発現量を制御するシス 配列の探索
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神野恭輔・河合翼・土井一行・犬飼義明
2. 発表標題 イネ遠縁品種由来の組換え自殖系統群を用いた根における eQTL 解析
3. 学会等名 第27回育種学会中部地区談話会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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