

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380047

研究課題名（和文）イネホウ素過剰耐性遺伝子の単離と育種への応用

研究課題名（英文）Identification of the gene responsible for the excess boron tolerance in rice and its application to the breeding for excess boron tolerant rice

研究代表者

間藤 徹（MATOH TORU）

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：50157393

研究成果の概要（和文）：ホウ素は高等植物の必須元素である。しかしながら、作物の生育に適した土壌のホウ素濃度の範囲は狭く、ホウ素過剰による作物の生育障害も発生しやすい。本研究では、イネのホウ素過剰耐性を増強することを目的とし、イネ品種間のホウ素過剰耐性の違いの原因となる遺伝子 *BET1* を同定した。さらに、交配によって、ホウ素過剰耐性イネ品種の *BET1* 遺伝子をホウ素感受性品種に導入し、そのホウ素過剰耐性を強化した。

研究成果の概要（英文）：

Boron (B) is an essential micronutrient for higher plants, but excess amounts of B inhibit growth of crops. In this study, excess B tolerance in rice plants was studied, and we identified a gene responsible for tolerance to B toxicity, named *BET1*. We also bred an excess B tolerant near-isogenic line of the popular *indica* cultivar IR64.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壌学

キーワード：植物栄養代謝、ホウ素過剰、イネ、QTL

1. 研究開始当初の背景

(1) ホウ素は高等植物の必須元素である。しかしながら、作物の生育に適した根圏ホウ素濃度の範囲は狭く、ホウ素過剰による作物の生育障害も発生しやすい。土壌中ではホウ素は主に水溶性のホウ酸の形で存在するため、ホウ酸が集積した土壌は乾燥気候下に分布し、そのような地域における穀物生産に害を与えている。我が国にはホウ酸集積土壌は存在しないが、高濃度のホウ酸を含む湧水や工

業排水の灌漑水への流入によるイネのホウ素過剰害発生例がある。

(2) ホウ酸は、シス位のジオール基をもつ化合物とエステル結合する性質があり、このため、RNA, NADH, ATP のようなシスジオール化合物が過剰のホウ素による障害発生部位であると考えられている。しかし、実際の過剰害発生のメカニズムは未だ明らかにされていない。

(3) 多くの作物種でホウ素過剰害耐性に品種

間差が存在することが知られる。オオムギでは根におけるホウ素排除能の違いがホウ素過剰耐性の品種間差に寄与することが示唆されている。

(4)我々が約70品種のイネをホウ素を添加して土耕栽培し、ホウ素過剰耐性を比較したところ、インディカ品種は一般に感受性、ジャポニカ品種は耐性であった。

(5)0-27ppmのホウ素を与えて栽培した場合、ホウ素過剰耐性ジャポニカ品種の熱研1号と感受性インディカ品種のIR36の植物体中のホウ素含有率には差がなかった。イネの場合にはホウ素過剰耐性の品種間差は、ホウ素排除能の違いによるのではなく、体内のホウ素に対する耐性の違いによると考えた。

(6)ホウ素過剰耐性品種の熱研1号と感受性品種のIR36の交配に由来する組換え自殖系統群を用いてQTL (quantitative trait locus) 解析を行い、4番染色体上に寄与率45%の大きな効果を持つQTLを検出した。

(7)4番染色体上のQTLは、コシヒカリ(耐性品種)とカサラス(感受性品種)、日本晴(耐性品種)とカサラス、ササニシキ(耐性品種)とハバタキ(感受性品種)に由来する染色体部分置換系統を用いた検討によっても確認された。

2. 研究の目的

本研究は、イネのホウ素過剰耐性品種間差の原因遺伝子の単離とその機能解明、及び、ホウ素過剰感受性インディカ品種にマーカー育種の手法でホウ素過剰耐性を付与することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)ホウ素過剰耐性品種の熱研1号と感受性品種のIR36(図1)の交雑後代を用い、4番染色体上に検出されたQTL遺伝子(*BET1*)のマップベースドクローニング手法による単離をすすめた。

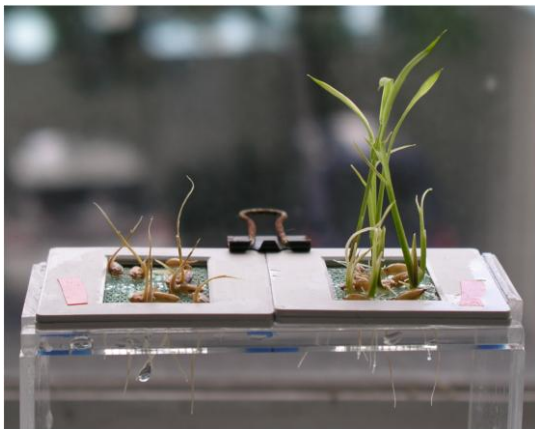


図1 60ppmホウ素を与えて播種後7日間栽培したIR36(左)と熱研1号(右)

(2)ホウ素過剰感受性系統SL18の*BET1*発現

量を抑制したRNAi形質転換体を作成し、そのホウ素過剰耐性を試験した。

(3)ホウ素過剰耐性品種コシヒカリの*BET1*遺伝子をホウ素過剰感受性品種IR64にマーカー育種の手法を用いて導入し、そのホウ素過剰耐性を土耕栽培試験した。

4. 研究成果

(1)熱研1号とIR36の交雑後代用いたマップベースクローニングをすすめた。ホウ素過剰耐性の指標には培養液に60ppmホウ素を与えて栽培した播種後7日齢植物の地上部の長さを対照植物の地上部長で除した値-比地上部長-を用いた。約25,000個体のスクリーニングによって*BET1*座乗候補領域を約49kbに絞り込んだ(図2)。この領域内にはOs04g0476400, Os04g0476500, Os04g0476600, Os04g0476700, Os04g0476800, Os04g0477000, Os04g0477200, Os04g0477300の8つの遺伝子が予測されていた。これらの8遺伝子全てについて、熱研1号とIR36の間では推定アミノ酸配列が異なっていたため、この結果からは*BET1*を同定することはできなかった。

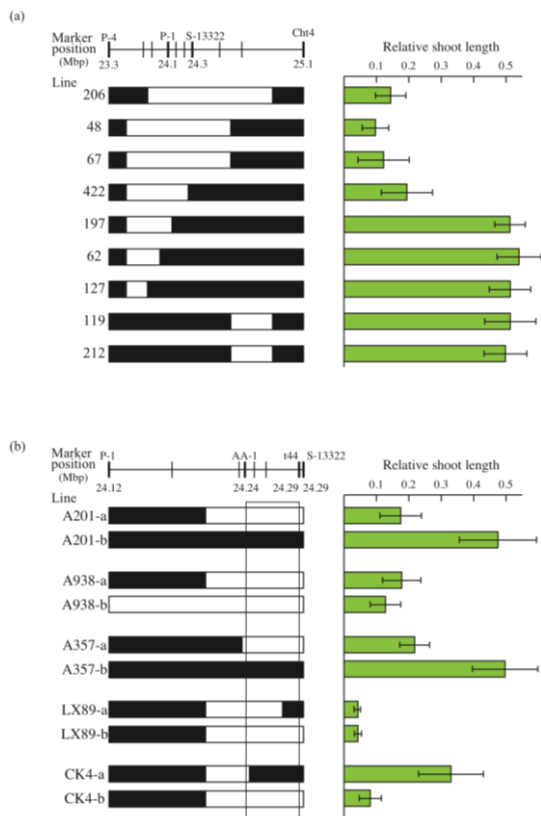


図2 *BET1*遺伝子のファインマッピング ホウ素過剰耐性の指標には播種後7日齢幼苗の60ppmホウ素添加区と対照区の地上部の長さの比を用いた (a)は1段階目の(b)は2段階目の選抜によるマッピング

(2)ジャポニカ品種間では、インディカ-ジャ

ポニカ間に比べて、比較的 DNA 配列の相同性が高い。44 品種のジャポニカ品種のホウ素過剰耐性を比較したところジャポニカ品種にもホウ素過剰に感受性の品種が存在することが明らかになった。そこで、マップベースドクローニングによって同定された 49kb の *BET1* 座乗候補領域について、これら 44 品種の DNA 配列を比較した。配列の比較には eco-Tilling 法を用いた。感受性品種に共通する DNA 多型部位が 4 カ所見つかった(図 3)。DNA シークエンスによって確認した所、これらは、Os04g047600 と Os04g0476800 の間の非コード領域における 4 塩基挿入、Os04g0477000 の 3' -UTR 領域における 1 塩基置換、Os04g0477300 のイントロン領域における 1 塩基置換、及び、Os04g0477300 の ORF 領域における 1 塩基挿入変異であった。コード領域内での 1 塩基挿入は以後のアミノ酸配列に大きな変異をもたらすことから、Os04g0477300 が *BET1* である可能性が示唆された。

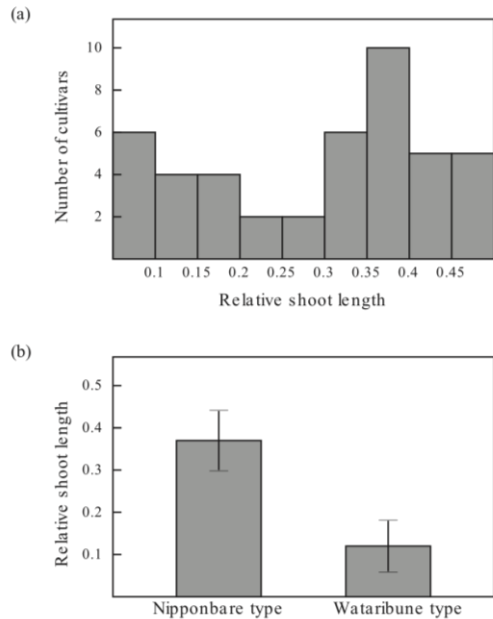


図 3 ジャポニカ品種 44 品種のホウ素過剰耐性 (a)ホウ素過剰耐性の指標に用いた比地上部長の度数分布 (b)Os04g0477300 内の DNA 多型部位における遺伝子型とホウ素過剰耐性

(3) Os04g0477300 遺伝子の機能について検討した。DNA 配列から、Os04g0477300 は 362 アミノ酸残基からなる NAC 様転写因子をコードすると予測された。また、ホウ素過剰感受性品種の配列が機能型であり、耐性品種では未成熟終止コドンの出現によって機能欠損していると推定された(図 4)。

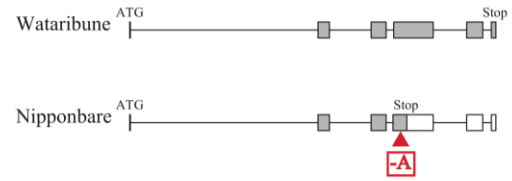


図 4 ホウ素過剰感受性品種渡船と耐性品種コシヒカリの *BET1* 候補遺伝子の模式図 四角はエクソンを直線はイントロン領域を示す 日本晴配列では△で示した部位でアデニンの 1 塩基欠損が生じていた

そこで、次に酵母を用い、転写活性化能を試験した。試験に用いた酵母 MaV203 株はレポーター遺伝子として *His3*, *Ura2* をもち、GAL4 DNA バインディングドメインと転写活性化因子の融合たんぱくを発現させることによって、ヒスチジンまたはウラシルを含まない選抜培地上での生育が可能になる。GAL4 DNA バインディングドメインと感受性品種渡船由来の ORF の融合たんぱく発現コンストラクトを導入した酵母は選抜培地上での生育が可能になった一方、耐性品種コシヒカリ由来遺伝子を導入した場合には、酵母は選抜培地上で生育することができなかった(図 5)。この結果から、渡船由来の遺伝子翻訳産物が転写活性化能を持つこと、日本晴の遺伝子は機能欠損していることが確かめられた。

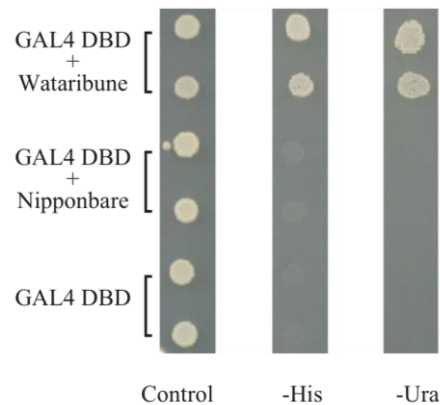


図 5 酵母を用いた転写活性化能の試験 感受性品種渡船由来遺伝子導入株、耐性品種日本晴由来遺伝子導入株、GAL4 DNA 結合ドメインのみを導入したベクターコントロールの、対照培地及び、ヒスチジンまたはウラシル欠損選抜培地上での生育

(4)ホウ素過剰耐性品種は Os04g0477300 の機能欠損によってホウ素過剰耐性を獲得していると推定された。そこで、日本晴とカサラスに由来する染色体部分置換系統で、ホウ素

過剰感受性の系統 SL18 を用いて Os04g0477300 の発現を抑制した RNAi 形質転換株を作成した。T₁ 種子を用い、幼苗期のホウ素過剰耐性を地上部の長さを指標として調べた所、RNAi 発現抑制株は耐性品種の日本晴と同等のホウ素過剰耐性程度を示した(図 6)。

この結果から、Os04g0477300 がコードする NAC 様転写因子遺伝子がホウ素過剰耐性品種間差の原因遺伝子 *BET1* であると結論した。NAC は植物特異的な転写因子である。遺伝子ファミリーを形成し、イネでは 151, シロイヌナズナでは 117 の NAC 遺伝子がゲノム上に存在する。これまでにいくつかの NAC ファミリー遺伝子について、分裂組織の発達、二次壁の合成、葉の老化、ストレス応答への関与が明らかにされてきている。本研究において明らかとなった *BET1* のホウ素過剰耐性への関与は NAC 遺伝子の新規に発見された機能である。

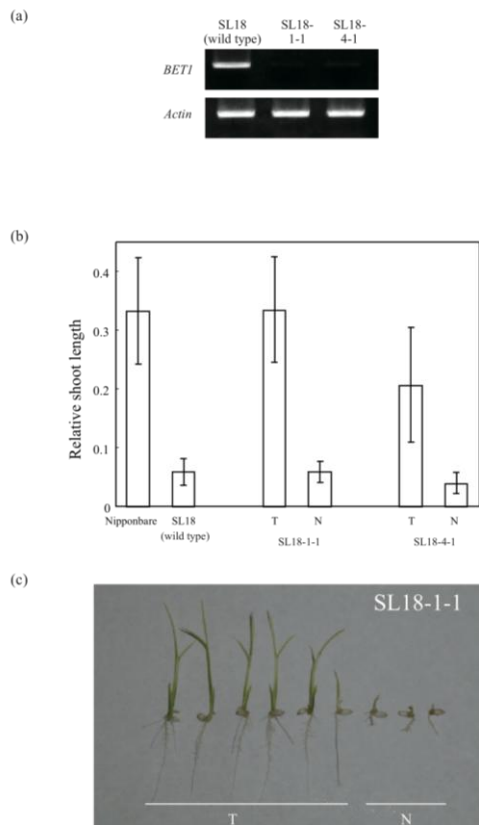


図 6 RNAi 発現抑制株のホウ素過剰耐性 (a) RT-PCR による *BET1* 遺伝子の発現量解析 (b) 日本晴、SL18 (野生株)、SL18-1-1 (RNAi 株)、SL18-4-1 (RNAi 株) の比地上部長 RNAi 形質転換体について T は形質転換個体を N は null-segregant を示す 培養液添加ホウ素濃度 60ppm 栽培期間 7 日間 (c) 60ppm B 添加区での SL18-1-1 の生育の様子 (5) インディカ人気品種でホウ素過剰に感受

性の高い IR64 にホウ素過剰耐性コシヒカリ由来の *BET1* をマーカー育種手法で導入し、IR64 を遺伝的背景として *BET1* 近傍のみがコシヒカリに由来する系統 (IR64-コシヒカリ *BET1*) を得た。幼苗を用いた水耕栽培試験においてこの系統は IR64 に比べて高いホウ素過剰耐性を示した。

またこの系統について土耕栽培試験を行った。栽培には北白川水田土壌 3.5kg を 1/5000 アールポットに充填して用いた。窒素-リン-カリウムは慣行栽培量与えた。ポットには下部に水抜き用の穴を明け、土壌を含むポットごとホウ素溶液 (0, 20ppm) に浸漬した。水は下穴から上昇し土壌を湛水状態とした。乾燥地帯で見られるホウ素過剰水田のホウ素濃度は 1~30ppm と報告されており、現地の状況をよく反映した栽培システムが構成できた。ここに IR64 と IR64-コシヒカリ *BET1* を直接播種し生育を追跡した。0ppm 対照区では全てのイネが順調に生育した。20ppm ホウ素区では IR64-コシヒカリ *BET1* に比べ IR64 の発芽が大幅に遅れた。しかし、栄養成長期にはいと生育の差はなくなった。栽培期間を通しての観察によると、*BET1* 遺伝子によるホウ素過剰耐性は、発芽期、分げつ期に顕著に発揮される。これはホウ素過剰によるイネの生育障害が、発芽の遅れ、分げつ数の低下に起因するとするこれまでの知見とよく一致した。

(6) 本研究により、イネ幼植物でのホウ素過剰耐性を与える遺伝子 (*BET1*) が同定され、この遺伝子が機能することが明らかにできた。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Kumiko Ochiai, Akifumi Shimizu, Yutaka Okumoto, Toru Fujiwara, Toru Matoh (2011) Suppression of a NAC-like transcription factor gene improves boron-toxicity tolerance in rice. *Plant Physiol*, 256, 1457-1463. (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.17147>

② 牧野周・山谷知行・鎌田淳・落合久美子・小山博之・信濃卓郎・馬建鋒・渡部敏裕 (2010) 植物のミネラルストレス応答. *土肥誌*, 81, 181-189. (査読無)

[学会発表] (計 1 件)

① 落合久美子 (2009) イネのホウ素過剰耐性遺伝子の単離とその機能 日本土壌肥料学会 2009 年度京都大会 (発表年月日 2009 年 9 月 16 日 京都大学)

〔図書〕(計1件)

①間藤 徹・馬 建鋒・藤原徹 編 「植物栄養学」第2版, 文永堂出版, 東京, 2010年3月刊行

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jimu.kais.kyoto-u.ac.jp/wiki-gakugai/index.php?plugin=attach&refer=%B9%AD%CA%F3%B0%D1%B0%F7%B2%F1%A1%A6%B8%A6%B5%E6%B0%C6%C6%E2PDF%2F3%B1%FE%CD%D1%0%B8%CC%BF%B2%CA%B3%D8%0%EC%B9%B6&openfile=%BF%A2%CA%AA%B1%C9%CD%DC%B3%D8.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間藤 徹 (MATOH TORU)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 50157393

(2) 研究分担者

落合久美子 (OCHIAI KUMIKO)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 40533302

(3) 連携研究者

()

研究者番号: