

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05868

研究課題名（和文）気候変動に適応可能な穀物の品質安定化メカニズムの分子基盤解明

研究課題名（英文）Molecular cloning and characterization of grains quality stabilization for enhancement of environmental adaptability

研究代表者

星野 友紀（Hoshino, Tomoki）

山形大学・農学部・教授

研究者番号：20530174

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではSdr6bの責任遺伝子を解明するために、コシヒカリ（Ksh）突然変異集団から候補遺伝子であるGeneAの突然変異体を単離し逆遺伝学的な証明を試みた。独立した4つの変異系統では、野生型と比べて変異型のGIが有意に低かった。外因性グルコースによる発芽試験の結果、2%グルコース処理ではNILのGI%はKshと比べて有意に低かった。グルコース処理3時間後の胚では、NILにおけるABA8ox1の発現量はKshと比べて有意に減少した。以上の結果より、Sdr6bの責任遺伝子のGeneAであり、GeneAはABA8ox1の発現量を低下させABA含量を高めることにより穂発芽耐性を誘導すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、Sdr6bはABA代謝の上流でこれまでに穂発芽耐性に関してほとんど報告のないグルコース応答に関与し、ABAシグナル伝達を強化させることで穂発芽耐性に導くことが示唆された。今後は、本研究で明らかにされたSdr6bを利用して、昨今の異常気象にも耐え得る、品質安定化品種の育成が期待される。一方、本研究で用いたオウリハタモチは発芽を促進させる遺伝子も含めて候補領域には複数の責任遺伝子が存在すると考えられた。今後は逆遺伝学的手法を用いて責任遺伝子群を包括的に理解することで、穂発芽耐性の分子メカニズムの理解が深めると同時に、これら遺伝子群を用いた育種利用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, to elucidate the gene responsible for Sdr6b, we attempted to isolate mutants of GeneA, a candidate gene of Sdr6b, from the Koshihikari mutant population and prove it by reverse genetics. In four independent mutant lines, the mutant GIs were significantly lower than the wild-type. Results of the exogenous glucose delayed germination test showed that the GI% of NIL was significantly lower than Koshihikari in the 2% glucose treatment. Furthermore, the expression of ABA8ox1 of NIL in embryos was significantly reduced compared to Koshihikari after 3 hours of glucose treatment. These results suggest that GeneA is the responsible gene for Sdr6b and that GeneA induces pre-harvest sprouting resistance by decreasing ABA8ox1 expression and increasing ABA content.

研究分野：作物育種学

キーワード：穂発芽 QTL イネ 責任遺伝子 ファインマッピング

### 1. 研究開始当初の背景

SDGs (持続可能な開発目標) は国際社会共通の目標である。我々は、SDGs の「気候変動に具体的な対策を行い、陸の豊かさを守る」ことによって「飢餓をゼロに」貢献したい。その達成には、「人間活動と自然環境の調和」、すなわち、「自然環境の維持」だけでは困難であると考えている。昨今、世界や日本国内で引き起こされる気候変動は、まさに、「人間活動と自然環境の調和」の限界を超えている証拠であるといえよう。本研究では、SDGs の達成を最終目標に掲げ、一般的な対応策である「環境調和」からさらに一步踏み込み、気候変動に具体的な対策を行うべく、本来、植物自身が気候変動から身を守るために有する機能を強化させる、つまり人為的に「穀物の品質を安定化する」ために、特に穀物の「穂発芽耐性能力」に焦点をあて、「穂発芽耐性」の分子基盤を構築させることによって、人間活動を支えるエネルギー源の確保を試みる。本研究の核心となる学術的「問い」は、「穀物の品質を安定化させるための道具となり得る遺伝子を遺伝資源から見つけ出し、その分子メカニズムを解明する」ことであり、本成果によって気候変動にも動じない穀物を作成することによって「陸の豊かさを守り、飢餓をゼロに」貢献することができると考えている。

昨今、全世界的な問題となっている気候変動は、人間活動のみならず、農作物の栽培環境にも重大な悪影響を及ぼしている。人間活動の貴重なエネルギー源となる米は、本来、稔った種子が誤って冬の間に発芽してしまわないように、発芽を止める(穂発芽耐性の)仕組みを持っている。しかしながら、近年の気候変動による高温多湿条件下では、収穫前に発芽してしまうことで種子の品質が下がってしまう「穂発芽」という現象により、米の品質低下が大きな問題となっている。我々が拠点とする東北地方の良食味栽培品種「ササニシキ」や「あきたこまち」などは、「穂発芽」しやすい品種として知られており、その改良が広く待ち望まれている。一方、日本で広く栽培されている「コシヒカリ」は、比較的「穂発芽」しにくい品種だが、我々は今後予想できない気候変動の影響により、近い将来「コシヒカリ」にも「穂発芽耐性」を付与させることが必要になると考えている。さらに、「穂発芽」が深刻な経済問題となっている穀物に、コムギがある。2016年の北海道では、コムギの穂発芽によって140億円もの被害が生じた報告もある。イネの遺伝子情報は、イネ-コムギ間のゲノムシンテニーを利用したコムギのオーソログ遺伝子の探索に有効であり、コムギへの応用も期待される。以上のように、米やコムギなどの穀物に「穂発芽耐性」を付与させることは、人間活動を支えるエネルギー源の確保につながり、「人間活動の発展」への十分な貢献が期待できる。本研究で得られる遺伝子群を穀物の品質安定化の道具として利用することで、人間活動を支える貴重なエネルギー源を確保し、将来の人間活動の礎を築きたい。

### 2. 研究の目的

我々や他の研究グループらのこれまでの研究より、「穂発芽耐性」は、既知の植物ホルモンのみならず、多くの遺伝子が複雑に関与する分子メカニズムによって制御されていることが明らかになってきているが、その全貌の解明には、さらなる詳細な研究が必要である。そこで、本研究では、劇的な気候変動の中においてもSDGsの達成による人間活動の持続的な発展を最終目標に掲げ、「品質安定化=穂発芽耐性」を実現するための、穂発芽耐性遺伝子群を自然変異から見つけ出し、それら遺伝子の機能解明によって分子メカニズムを考察するとともに、品質安定化が付与された穀物の安定的生産を目指した。

本研究の目的である穂発芽耐性の分子メカニズムの解明には、これに関与する複数の遺伝子群を単離する必要がある。なぜなら、穂発芽耐性は、単一あるいは少数の遺伝子で制御されるものではなく、多くの遺伝子によって複雑に制御されるからだ。しかし、これまでの研究に用いられてきた耐性品種を用いた遺伝学的解析からでは、異なる遺伝資源を用いても既知の共通な遺伝子座が検出されることが多く、分子メカニズムの全貌を理解するためには未知の遺伝子単離が必要であった。この問題を解決するために、我々は新規性を求めて、あえて穂発芽感受性品種を用いることで、親の表現型では穂発芽耐性がマスクされ、着目されることなく隠れて存在する耐性遺伝子に焦点を当てた。その準備段階として我々は、穂発芽感受性品種「オワリハタモチ」から、穂発芽耐性を制御する2つの量的形質遺伝子座「*qSdr9.1*と*qSdr9.2*」を見出すことに成功しており<sup>1)</sup>、未知の耐性遺伝子の存在が示唆されている。本研究では、我々がこれまでに発見した穂発芽耐性遺伝子群(*qSdr6b*、*qSdr9.1*、*qSdr9.2*)の同定とそれらの機能解明によって、既知の遺伝子群と統合させた穀物の品質安定化の分子メカニズムを解明するとともに、新品種開発に利用可能なDNAマーカーの作出を試みた。

### 3. 研究の方法

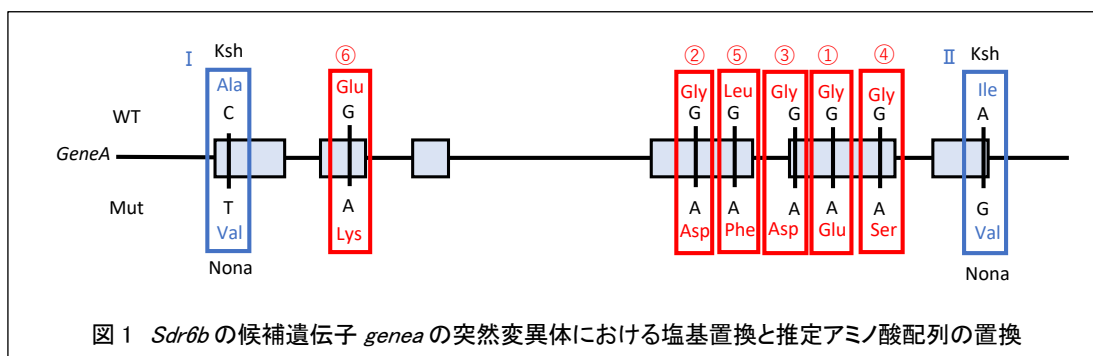
穂発芽耐性が比較的強く日本で幅広く栽培されている japonica 型のコシヒカリ (*Oryza sativa* L. cv. Koshihikari, Ksh) と、種子休眠性が非常に優れた indica 型の Nona Bokra (Nona) あるいは、種子休眠性が極弱な japonica 型のオワリハタモチ (Owa) を用いて、これまでに作出された交雑組換え系統、およびコシヒカリを対象に各種変異原処理を行った突然変異集団を実験材料として用いた。品種や各系統のDNAは、ロングリードシーケンスにも対応可能な高品質な

DNA が得られる改良 Boom 法<sup>2)</sup>によって抽出した。Nona Bokra 由来の *qSdr6b* の候補遺伝子 *GeneA* について、後述するように本研究で得られた *genea* 突然変異系統も、組換え系統と同様に圃場で栽培を行った。発現解析や発芽試験のために Ksh と NIL(*Sdr6b*)、*genea* 突然変異系統は出穂調査として、同一日に出穂した穂の止め葉に印をつけ、サンプリング時期の登熟度合いを揃えた。*genea* 突然変異系統の発芽試験には、出穂 7~9 週後に印のついた穂を各系統 1 個体から 3 穂ずつ、計 5 個体から 15 穂サンプリングしたものをを用いた。*qSdr6b* の候補遺伝子である *GeneA* が、真に *qSdr6b* の責任遺伝子であるか調査するために、TILLING 法を用いて、コシヒカリとつや姫を対象に各種変異原処理を行った突然変異 M<sub>2</sub> 集団<sup>3)</sup>から、我々が開発した TILLING 法<sup>3),4)</sup>を用いて *GeneA* の突然変異体を探索した。M<sub>3</sub> で分離した野生型と変異型を 30 粒ずつ吸水し、30℃の暗所に静置させ一週間毎日発芽率を調査した *GeneA* はグルコースに反応して ABA 同化・異化関連遺伝子の発現を制御すると考えられたため、Ksh と NIL(*Sdr6b*)において、グルコース水溶液を吸水させた種子の胚における ABA 同化および異化酵素をコードする遺伝子の発現量を調査するために、リアルタイム RT-PCR 法を用いて定量した。

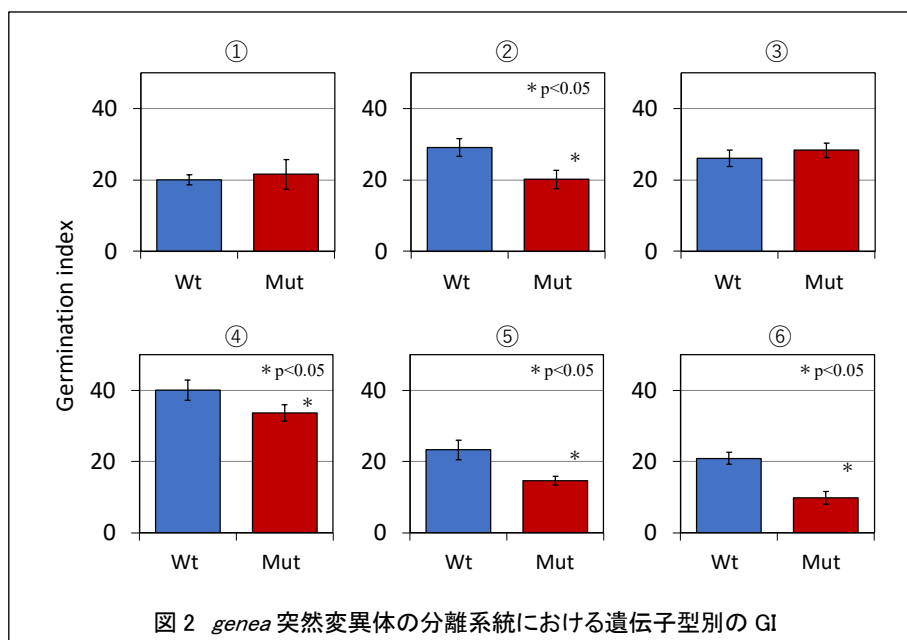
一方、オワリハタモチ由来の *qSdr9.1* と *qSdr9.2* については、新たに作出した大規模な組換え集団を用いてファインピングを行った。それぞれの候補遺伝子の中で、イネゲノムデータベース上においてアノテーションの付いた遺伝子や、種子において発現が確認できた遺伝子を対象に、シーケンスおよび発現解析によって、それぞれの責任遺伝子を探索した。

#### 4. 研究成果

先行研究の QTL 解析によって、第 1 染色体短腕に座乗する穂発芽耐性 QTL・*qSdr6b* を見出した。ファインマッピングにより絞りこまれた 13.7 kbp の *qSdr6b* 候補領域内には、3 つの候補遺伝子が存在した。これら 3 つの遺伝子について、両親品種間の多型調査と、吸水処理を施した胚を対象に行った発現解析の結果、*GeneA* が責任遺伝子であると推定された。本研究では、この *GeneA* が真に *Sdr6b* の責任遺伝子であるかを検証するために、Ksh 突然変異集団から *genea* 突然変異体を単離し、逆遺伝学的な証明を試みた。その結果、Ksh 突然変異集団の中から、*GeneA* 領域に独立した非同義置換を有する 6 系統を選抜することができた (図 1)。



これら 6 系統の分離後代を用いて発芽試験を行ったところ、独立した 4 系統では、野生型と比べて変異型の GI が有意に低かった (図 2)。これらの結果は、*GeneA* が *qSdr6b* の責任遺伝子であるという仮説を裏付けるものであった。



また、シロイヌナズナの *GeneA* 相同遺伝子は、膜貫通タンパク質をコードしており<sup>5)</sup>、GI が有意に低下した変異系統では、その変異は推定される膜構造の中に存在するか、細胞外の表面付近に存在することが示唆された (図 3)。これらの部位に存在するアミノ酸が変異したことによって、膜タンパク質の機能が欠損あるいは消滅したと予想される。シロイヌナズナの *GeneA* はグルコースに反応して発芽を制御することが考えられたため、*Sdr6b* も同様な機能を有するか検証した。Ksh 型の *GeneA* 対立遺伝子はイネ科植物で広く保存されており、Nona 型の対立遺伝子は機能損失あるいは低下によって、グルコースの感受性が高まって ABA が高蓄積し、穂発芽耐性を示すと考えられた。

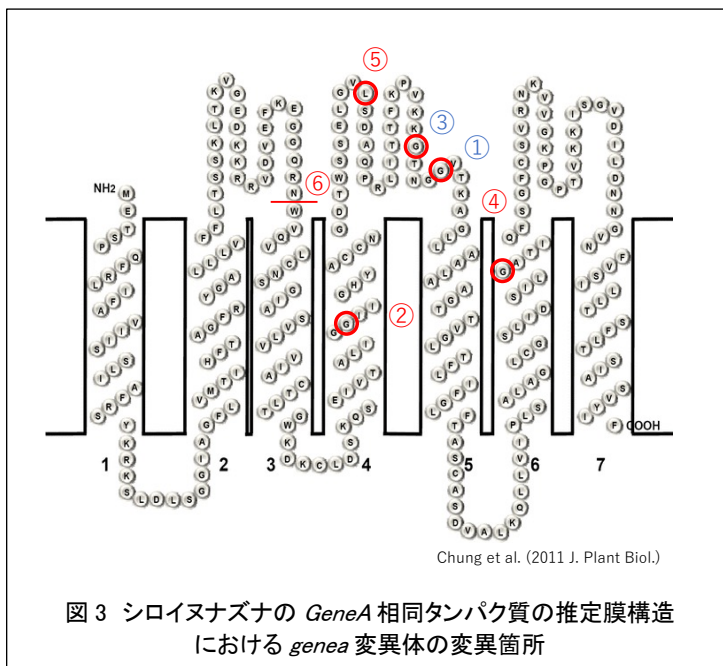


図 3 シロイヌナズナの *GeneA* 相同タンパク質の推定膜構造における *genea* 変異体の変異箇所

そこで、この仮説を検証するために、外因性グルコースによる発芽遅延試験を実施した。その結果、2%グルコース処理では、NIL (*qSdr6b*) の GI% は  $76.6 \pm 2.1\%$  であり、Ksh の  $84.2 \pm 1.6\%$  と比べて有意に低かった (図 4)。また、5%水準で有意な差は認められなかったものの、1、3、4%グルコース処理区においても、NIL の GI% は Ksh と比べて低い傾向が見られた (図 4)。これらの結果は、NIL (*qSdr6b*) は *genea* の機能損失あるいは低下によって、グルコースの感受性が高まり ABA が高蓄積したことによって、穂発芽耐性を示すという仮説を大いに支持するものであった。

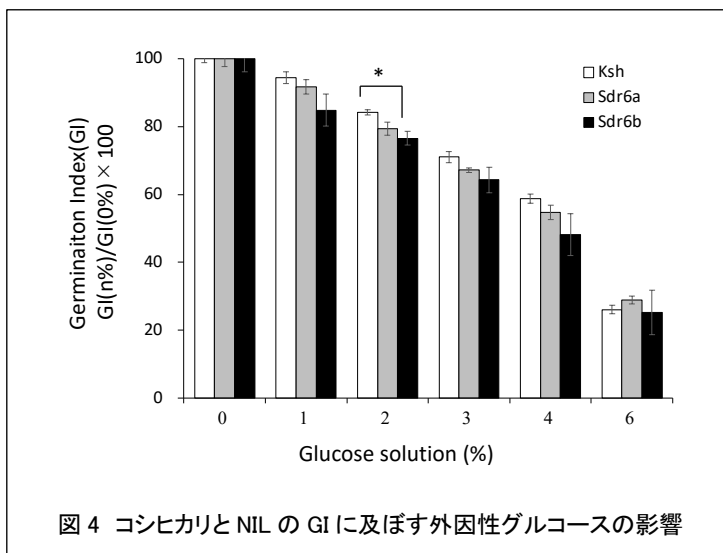


図 4 コシヒカリと NIL の GI に及ぼす外因性グルコースの影響

NIL (*qSdr6b*) で確認されたグルコースによる発芽遅延の原因を探るために ABA 代謝遺伝子の発現解析を行った。その結果、グルコース処理後 3 時間後の胚において、NIL (*qSdr6b*) における *ABA8ox1* の発現量は、Ksh と比較して有意に減少していた。つまり、*GeneA* の Nona アリルである機能欠損型では、*ABA8ox1* の発現量が低下することによって ABA 含量が高まり、穂発芽耐性を獲得すると考えられた。本研究において、*Sdr6b/ GeneA<sup>Nona</sup>* は、ABA 代謝の上流で、これまでに穂発芽耐性に関してほとんど報告のないグルコース応答に関与し、ABA シグナル伝達を強化させることで穂発芽耐性に導くことが示唆された。今後は、本研究で明らかにされた *Sdr6b/ GeneA<sup>Nona</sup>* を利用して、昨今の異常気象にも耐え得る新たな穂発芽耐性品種の育成が期待される。

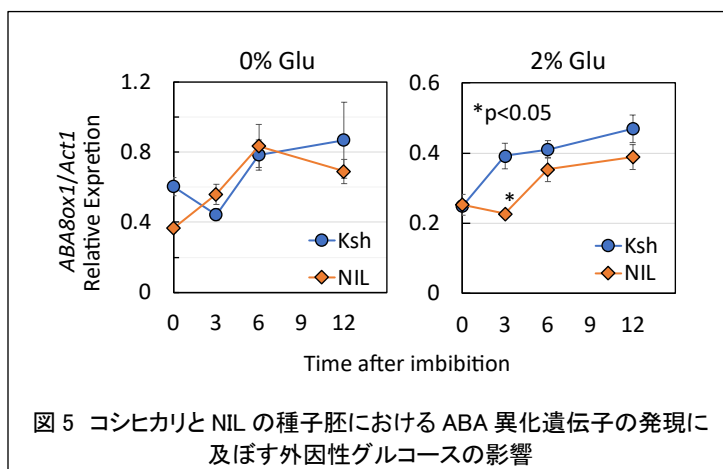


図 5 コシヒカリと NIL の種子胚における ABA 異化遺伝子の発現に及ぼす外因性グルコースの影響

一方、新規な穂発芽耐性 QTL の発見を目指して、これまで報告例の少ない易発芽性品種であるオワリハタモチ (Owa) を用い、コシヒカリ (Ksh) との交雑集団から第 9 染色体に 2 つの QTL、*qSdr9.1* および *qSdr9.2a* を検出した。*qSdr9.1* は約 158 kbp に、*qSdr9.2a* は約 370 kbp に絞り込まれた。*qSdr9.1* の候補遺伝子の中では、*Os09g0375400* に唯一の非同義置換が検出され、*Os09g0375100* と *Os09g0375600* はプロモーター領域に多型が検出された。*Os09g0375400* と *Os09g0375600* は登熟段階におけるイネ種子において、Ksh と NIL 間で発現量に有意な差が見られたことから、これらが *qSdr9.1* の責任遺伝子である可能性が示された。*Os09g0375400* は、カルモジュリンバインディングプロテインをコードしており、種子の発生に必須であることが報告されていることから、この遺伝子が *qSdr9.1* の責任遺伝子として最も可能性が高いと判断された。一方、ファインマッピングの結果、先行研究によって絞り込まれた領域よりも短腕側の約 2 Mbp の領域が、新たな候補領域であると示唆されたことから、新たな組換え系統を作出して継続的な研究が必要であろう。一方 *qSdr9.2a* には、穂発芽耐性遺伝子と発芽促進遺伝子が複数存在することが示唆されたものの、当初の約 370 kbp から少なくとも 1 つ耐性遺伝子が存在すると示唆された約 27 kbp に絞り込まれた。この領域に存在したアミノ酸トランスポーター様遺伝子をコードする *Os09g0427300* は、プロモーター領域に多型が存在したことから、*qSdr9.2a* の責任遺伝子の 1 つであることが示唆された。種子内のアミノ酸含量は発芽に影響することから、*Os09g0427300* は種子内のアミノ酸蓄積に関与し発芽を制御する可能性がある。本研究で用いたオワリハタモチは穂発芽感受性品種であるため、発芽を促進させる遺伝子も含めて、*qSdr9.1* と *qSdr9.2a* には発芽に関与する複数の遺伝子が存在すると考えられた。これらを考慮すると、ファインマッピングによって個別の責任遺伝子を同定することは困難であろう。今後は逆遺伝学的手法を用いて候補遺伝子の機能解析を行い、責任遺伝子群を包括的に理解することで、穂発芽耐性の分子メカニズムの理解が深まると同時に、これら遺伝子群を用いた育種利用が期待される。

#### 引用文献

- 1) Mizuno Y, Yamanouchi U, Hoshino T, Nonoue Y, Nagata K, Fukuoka S, Ando T, Yano M, Sugimoto K. (2018) Genetic dissection of pre-harvest sprouting resistance in an upland rice cultivar. *Breed. Sci.* 68:200-209. doi: 10.1270/jsbbs.17062.
- 2) Shioya N, Ogiso-Tanaka E, Watanabe M, Anai T, Hoshino T. (2023) Development of a high-quality/yield long-read sequencing-adaptable DNA extraction method for crop seeds. *Plants (Basel)* 12:2971. doi: 10.3390/plants12162971.
- 3) Kawakami T, Goto H, Abe Y, Chuba M, Watanabe M, Hoshino T (2020) High frequency of transversion mutations in the rice (*Oryza sativa* L.) mutant population produced by diepoxybutane mutagenesis. *Genet. Resour. Crop Evol.* 67:1355-1365. doi: 10.1007/s10722-020-00950-3.
- 4) Koshika N, Shioya N, Fujimura T, Oguchi R, Ota C, Kato E, Takahashi R, Kimura S, Furuno S, Saito K, Okabe K, Watanabe M, Hoshino T. (2022) Development of ethyl methanesulfonate mutant edamame soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) populations and forward and reverse genetic screening for early-flowering mutants. *Plants (Basel)*. 11:1839. doi: 10.3390/plants11141839.
- 5) Chung M, Huang P, Ha C, Jun J, Ahn S, Zhang F, Bae H, Cho B, Kim C. (2011) Molecular identification and physiological characterization of a putative novel plasma membrane protein from Arabidopsis involved in glucose response. *J. Plant Biology* 54:57-64. doi: 10.1007/s12374-011-9145-z.

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<br>Shioya Naohiro, Ogiso-Tanaka Eri, Watanabe Masanori, Anai Toyooki, Hoshino Tomoki                        | 4. 巻<br>12                |
| 2. 論文標題<br>Development of a High-Quality/Yield Long-Read Sequencing-Adaptable DNA Extraction Method for Crop Seeds | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>Plants   | 6. 最初と最後の頁<br>2971 ~ 2971 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/plants12162971  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>塩谷直弘、小木首映里、渡辺昌規、穴井豊昭、星野友紀              |
| 2. 発表標題<br>作物種子からロングリードシーケンスに適応可能な高品質/収量DNA抽出法の開発 |
| 3. 学会等名<br>日本育種学会第144回講演会                         |
| 4. 発表年<br>2023年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>佐藤紗知、杉本和彦、星野友紀                                     |
| 2. 発表標題<br>オワリハタモチより見出された穂発芽耐性遺伝子座qSdr9.1およびqSdr9.2aの責任遺伝子の探索 |
| 3. 学会等名<br>第18回東北育種研究集会                                       |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>西村麟太郎、佐野舜一、杉本和彦、星野友紀                     |
| 2. 発表標題<br>突然変異体を用いたイネ穂発芽耐性遺伝子座qSdr6bの責任遺伝子の逆遺伝学的証明 |
| 3. 学会等名<br>第18回東北育種研究集会                             |
| 4. 発表年<br>2023年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>佐藤紗知、三浦智美、大泉武士、大花沙衣、杉本和彦、星野友紀                    |
| 2. 発表標題<br>オワリハタモチより見出された穂発芽耐性遺伝子座qSdr9.1とqSdr9.2のファインマッピング |
| 3. 学会等名<br>第17回東北育種研究集会                                     |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>佐野舜一、黄浚彦、飯島信繁、杉本和彦、星野友紀                        |
| 2. 発表標題<br>イネ穂発芽耐性QTL・Sdr6領域に2つ存在したqSdr6aとqSdr6bの候補遺伝子の同定 |
| 3. 学会等名<br>第16回東北育種研究集会                                   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>佐野舜一、黄浚彦、飯島信繁、杉本和彦、星野友紀                        |
| 2. 発表標題<br>イネ穂発芽耐性QTL・Sdr6領域に2つ存在したqSdr6aとqSdr6bの候補遺伝子の同定 |
| 3. 学会等名<br>東北植物学会第11回大会                                   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>佐野舜一、黄浚彦、飯島信繁、杉本和彦、星野友紀                   |
| 2. 発表標題<br>イネ穂発芽耐性QTLsであるqSdr6aとqSdr6bの候補遺伝子の同定と機能解析 |
| 3. 学会等名<br>日本育種学会第141回講演会                            |
| 4. 発表年<br>2022年                                      |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|