

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15120

研究課題名（和文）イネ種子発芽を温度に応じて制御する転写調節モジュールの解析

研究課題名（英文）Analysis of the transcriptional regulatory module responsible for temperature-dependent rice germination

研究代表者

吉田 英樹 (Yoshida, Hideki)

福島大学・食農学類附属発酵醸造研究所・特任講師

研究者番号：10814353

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では最近確立されたGWASシステムを用いて、世界的に栽培されている穀物植物であるイネにおいて温度依存的な発芽調節機構を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、我々は14-3-3ファミリーに属する遺伝子GF14hのORF上に存在する4塩基のInDelが温度依存的に発芽調節に関わっていることを見出した。さらにGF14hの作用機序について解析を行った結果、ABAシグナル伝達を制御することが知られているbZIP型転写因子OREB1、ペプチドホルモンとして機能していることが知られているPEBPファミリーに属するMFT2がGF14hと複合体を形成して発芽の制御に関わ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

発芽は、植物の一生において最も重要なイベントの一つである。様々な環境で初期生育を達成するために、植物は最適なタイミングで発芽する機構を進化させてきた。適切な発芽管理は農業的にも重要であり、特に種子を収穫する穀物植物においては直接収量に関わる。単子葉類のモデル植物としても広く認知されているイネは、穀物植物として世界中で栽培されており、様々な環境に適応した品種が存在する。本研究は日本のイネの発芽形質の多様性を説明する遺伝子を明らかにし、今後のイネ育種における重要な知見を提供することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We find that a 4 bp InDel in one of the 14-3-3 family genes, GF14h, preferentially changes the germination rate of rice under optimum temperature conditions. The GF14h protein constitutes a transcriptional regulatory module with a bZIP-type transcription factor, OREB1, and a florigen-like protein, MOTHER OF FT AND TFL 2, to control the germination rate by regulating abscisic acid (ABA)-responsive genes. The GF14h loss-of-function allele enhances ABA signalling and reduces the germination rate.

研究分野：植物分子生理

キーワード：発芽 イネ GWAS アブシジン酸

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の種子休眠および発芽という現象は植物にとって重要な成長イベントであるとともに、農業にとって極めて重要な現象である。休眠が浅い、つまり発芽しやすい種子は、好適環境に晒されることで収穫前に発芽が起こってしまい、特に種子を収穫する穀物植物においては収穫量が大きく減少してしまう。一方で、休眠が深く、発芽しにくい種子では、種を播いた後の発芽のタイミングを揃えることが難しく、生産コストの上昇に繋がる。したがって、植物の生存だけでなく農業利用の面でもそのタイミングは適切でなければならず、非常に強い選択圧がかかっていると考えられ、厳密な制御機構の存在が予想される。

単子葉類のモデル植物としても広く認知されているイネは、穀物植物として世界中で栽培されており、様々な環境に適応した品種が存在する。特に日本のイネ栽培においては、南北に広い国土であること幅広い温度条件で栽培可能なイネの育種が進められ、その成果によって現在では北海道でも稲作が可能になっている。この稲作の北進に関しては出穂期の調節が主要な育種目標であったが、前述のように、種子の発芽も重要な農業形質であり、また温度に影響を受けるが、温度による発芽制御機構の詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究ではイネ種子発芽を温度に応じて制御する遺伝子の単離および制御機構の解明を目指して研究を行う。特に、予備実験の結果から予想されていた「GF14h」「OREB1」「MFT2」の3種のタンパク質によって構成される温度依存的な種子発芽調節を担う転写調節モジュール（以後 **Temperature-dependent Germination Regulation Module (TdGRM)** と呼称する）による発芽制御機構を明らかにすることを重要な達成目標として研究を行う。

3. 研究の方法

原因遺伝子を単離する手法として、ゲノム上の多型情報と表現型の相関を解析する手法である **Genome-wide association study (GWAS)** に、さらに環境条件を含めて解析を行う **GxE GWAS** という手法を用いる。具体的には日本のイネ 150 品種以上を用い、30°C と 15°C の環境で発芽率を測定し、そのデータを形質値として **GxE GWAS** に供試する。15°C と 37°C における発芽率を測定し、**GxE GWAS** に供した。GWAS とはそれぞれの系統のゲノム情報と形質データを元に、その形質の差異を説明するゲノム領域を解析する手法である。**GxE GWAS** ではゲノム情報だけでなく、環境のデータも解析に含めることで、環境によって働きを変える遺伝子の作用を検出する手法である。その後、得られた候補遺伝子について、実際に温度依存的に発芽調節に関わるどうか形質転換体を作成して検証し、その発芽調節機構についても分子生物学的手法により明らかにする。

4. 研究成果

特定の温度条件下で種子の発芽を制御する遺伝子を同定するために、日本イネ (*O. sativa* subsp. *japonica*) 164 品種の発芽率を、15°C、96 時間および 30°C、24 時間の 2 つの異なる条件下で計測し、計測データを **GxE GWAS** に供試した。その結果、11 番染色体の 23.5Mb にあるピークを検出した (図 1)。ピーク 1 の候補領域には、有意な P 値を持つ 8 つの多型と、アミノ酸交換またはフレームシフト変異が含まれていた。

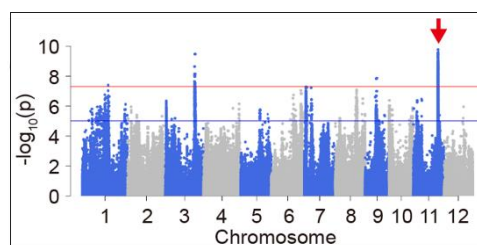


図1:GxE GWASの結果

これらの変異の機能的影響を評価したところ 14-3-3 ファミリータンパク質をコードする GF14h 遺伝子 (LOC_0s11g39540/0s11g0609600) の CDS 領域に 4bp の InDel が原因多型候補として見つかった。4bp 欠損を持つ GF14h の日本晴型ハプロタイプ (Hap. 1) は LOF 対立遺伝子であり、変異型である Hap. 2 および Hap. 3 がオルソログ間で配列が共有されているため機能的であると思われた。実際に Hap. 1 を持つ品種は、30°C では Hap. 2/3 を持つ品種よりもより低い発芽率を示したが、15°C ではほぼ同等であった。日本晴をバックグラウンドとして相補性解析を行ったところ、Hap. 2 のゲノム領域を導入した個体または Hap. 2 を過剰発現した個体で、30°C での発芽率が上昇することが確認され、15°C ではわずかな効

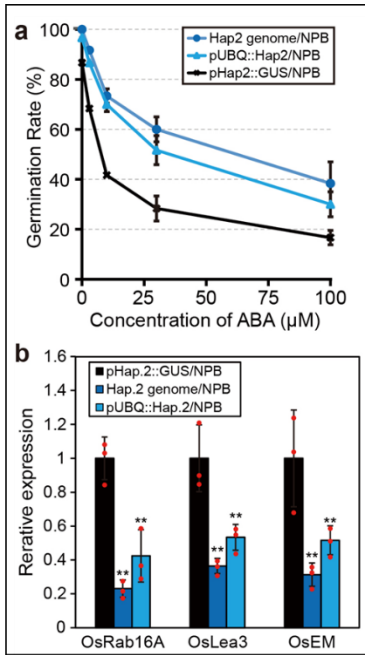


図2:GF14hはABA応答を制御して発芽に関与する

果しか認められなかった。これらの結果から、GF14h が温度に条件によって発芽への影響が変化する遺伝子であることが確認された。

GF14h の機能を解明するため、種子発芽における重要抑制因子である ABA シグナル伝達経路への関与を調べた。機能性 GF14h を持つ種子と持たない種子で発芽率の ABA 応答性を比較したところ、機能性 GF14h は ABA 応答性を劇的に低下させ (図 2a)、3 つの ABA 応答遺伝子 OsRab16A、OsLea3、OsEM の発現を低下させた (図 2b)。さらに、GF14h と bZIP 因子との直接的な相互作用は、開花など様々な生物学的プロセスにおいて報告されていたことから、GF14h と、発芽抑制やストレス応答など ABA 依存的な応答の鍵となる因子として報告されている bZIP タンパク質である OREB1/OsABI5 および TRAB1/OsbZIP66 との相互作用を調べた。酵母ツーハイブリッドシステム (Y2H) を用いると、GF14h は OREB1 と強い相互作用を形成し、TRAB1 との相互作用は低く、Hap. 1 とは両方ともほとんど相互作用しないことが観察された (図 3a)。そこで、GF14h と OREB1 の関係に注目し、研究を進めた。Hap. 2 が植物核内で OREB1 と相互作用していることを、BiFC アッセイを用いて確認した (図 3b)。

開花調節に関わる複合体と知られている FAC (florigen activation complex) は bZIP と 14-3-3 に加えて、Hd3a/FT からなる。そこで、MOTHER OF FT AND TFL (MFT) の関与についても調べた。MFT はコムギの種子発芽を制御する因子 (TaMFT) として報告されていた。イネには MFT1 と MFT2 の 2 つの MFT があり、MFT2 が TaMFT に相当する。CRISPR-Cas9 を用いて作製した MFT2 欠損植物は、コントロールに比べて ABA 感受性が非常に低かった。Hap. 2-MFT2 の複合体は主に小胞体で観察された。OREB1-MFT2 は核に特異的に局在していた (図 4)。

次に、イネの ABA シグナル伝達のレポーターとしてよく用いられている OsEM プロモーターの制御下にレポーター遺伝子ホタルルシフェラーゼ (fLUC) を配置したプラスミドを用いた一過性レポーターアッセイによって、ABA シグナル伝達における GF14h の役割を調べた。OREB1 によって発現は誘導されたが、Hap. 2 をさらに発現させるとこの発現上昇が部分的に減少した (図 5a)。Hap. 2 による発現量依存的な発現減少も確認できた。さらに MFT2 を共

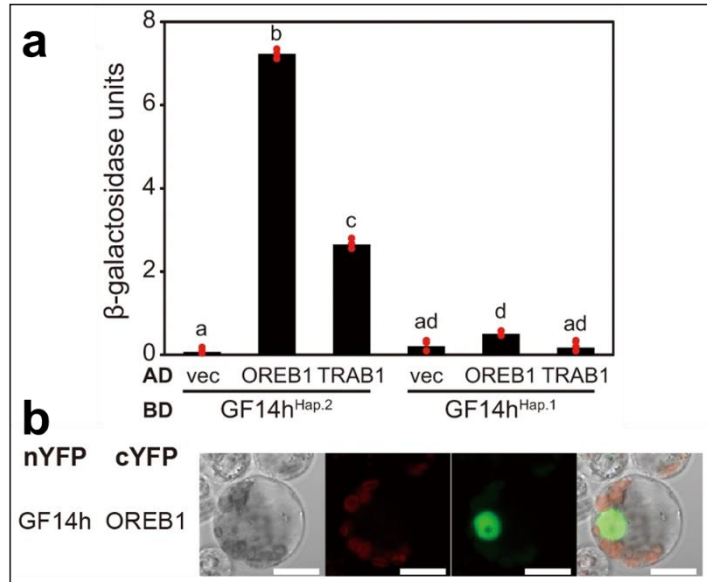


図3:GF14hはOREB1と核内で結合する

果しか認められなかった。これらの結果から、GF14h が温度に条件によって発芽への影響が変化する遺伝子であることが確認された。

GF14h の機能を解明するため、種子発芽における重要抑制因子である ABA シグナル伝達経路への関与を調べた。機能性 GF14h を持つ種子と持たない種子で発芽率の ABA 応答性を比較したところ、機能性 GF14h は ABA 応答性を劇的に低下させ (図 2a)、3 つの ABA 応答遺伝子 OsRab16A、OsLea3、OsEM の発現を低下させた (図 2b)。さらに、GF14h と bZIP 因子との直接的な相互作用は、開花など様々な生物学的プロセスにおいて報告されていたことから、GF14h と、発芽抑制やストレス応答など ABA 依存的な応答の鍵となる因子として報告されている bZIP タンパク質である OREB1/OsABI5 および TRAB1/OsbZIP66 との相互作用を調べた。酵母ツーハイブリッドシステム (Y2H) を用いると、GF14h は OREB1 と強い相互作用を形成し、TRAB1 との相互作用は低く、Hap. 1 とは両方ともほとんど相互作用しないことが観察された (図 3a)。そこで、GF14h と OREB1 の関係に注目し、研究を進めた。Hap. 2 が植物核内で OREB1 と相互作用していることを、BiFC アッセイを用いて確認した (図 3b)。

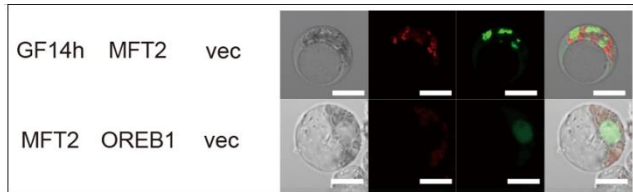


図4:MFT2はGF14h、OREB1と結合する

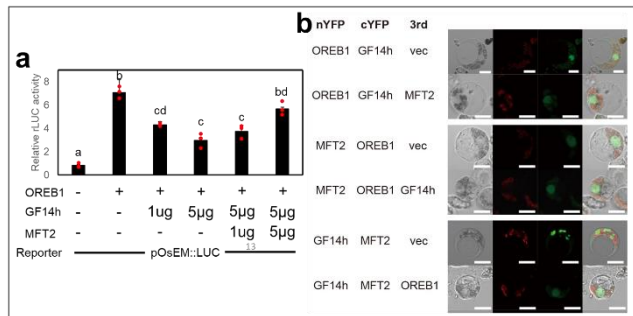


図5:GF14h-OREB1-MFT2モジュールによる転写調節

果しか認められなかった。これらの結果から、GF14h が温度に条件によって発芽への影響が変化する遺伝子であることが確認された。

GF14h の機能を解明するため、種子発芽における重要抑制因子である ABA シグナル伝達経路への関与を調べた。機能性 GF14h を持つ種子と持たない種子で発芽率の ABA 応答性を比較したところ、機能性 GF14h は ABA 応答性を劇的に低下させ (図 2a)、3 つの ABA 応答遺伝子 OsRab16A、OsLea3、OsEM の発現を低下させた (図 2b)。さらに、GF14h と bZIP 因子との直接的な相互作用は、開花など様々な生物学的プロセスにおいて報告されていたことから、GF14h と、発芽抑制やストレス応答など ABA 依存的な応答の鍵となる因子として報告されている bZIP タンパク質である OREB1/OsABI5 および TRAB1/OsbZIP66 との相互作用を調べた。酵母ツーハイブリッドシステム (Y2H) を用いると、GF14h は OREB1 と強い相互作用を形成し、TRAB1 との相互作用は低く、Hap. 1 とは両方ともほとんど相互作用しないことが観察された (図 3a)。そこで、GF14h と OREB1 の関係に注目し、研究を進めた。Hap. 2 が植物核内で OREB1 と相互作用していることを、BiFC アッセイを用いて確認した (図 3b)。

開花調節に関わる複合体と知られている FAC (florigen activation complex) は bZIP と 14-3-3 に加えて、Hd3a/FT からなる。そこで、MOTHER OF FT AND TFL (MFT) の関与についても調べた。MFT はコムギの種子発芽を制御する因子 (TaMFT) として報告されていた。イネには MFT1 と MFT2 の 2 つの MFT があり、MFT2 が TaMFT に相当する。CRISPR-Cas9 を用いて作製した MFT2 欠損植物は、コントロールに比べて ABA 感受性が非常に低かった。Hap. 2-MFT2 の複合体は主に小胞体で観察された。OREB1-MFT2 は核に特異的に局在していた (図 4)。

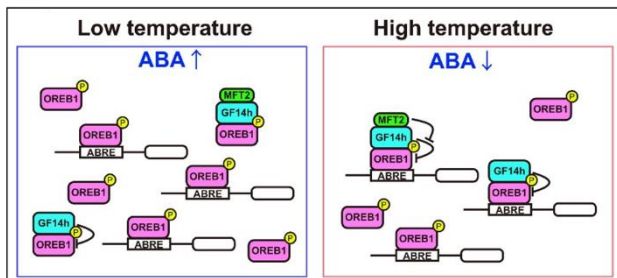


図6:GF14h-OREB1-MFT2モジュールによる温度依存的発芽調節機構

発現させるとは Hap. 2 の抑制効果を発現量依存的に緩和した (図 5a)。タグのない第 3 因子を用いて BiFC 実験を行った。MFT2 または Hap. 2 が存在する場合、Hap. 2-OREB1 または OREB1-MFT2 のシグナルの局在や強度にそれぞれ変化は見られなかった (図 5b)。一方、OREB1 が存在すると、GF14hHap. 2-MFT2 の局在は核へと変化した (図 5b)。これらの結果は、三重複合体形成が OREB1 を介して核内で結合することを示している。以上のことから GF14h タンパク質は、bZIP 型転写因子 OREB1 およびフロリゲン様タンパク質 MFT2 と転写制御モジュールを構成し、ABA 応答遺伝子を制御することで発芽率を制御していることを明らかにした (図 6)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshida Hideki, Hirano Ko, Yano Kenji, Wang Fanmiao, Mori Masaki, Kawamura Mayuko, Koketsu Eriko, Hattori Masako, Ordonio Reynante Lacsamana, Huang Peng, Yamamoto Eiji, Matsuoka Makoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Genome-wide association study identifies a gene responsible for temperature-dependent rice germination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-33318-5	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 Suganami Mao, Kojima Soichi, Wang Fanmiao, Yoshida Hideki, Miura Kotaro, Morinaka Yoichi, Watanabe Masao, Matsuda Tsukasa, Yamamoto Eiji, Matsuoka Makoto	4. 巻 191
2. 論文標題 Effective use of legacy data in a genome-wide association studies improves the credibility of quantitative trait loci detection in rice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1561 ~ 1573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiad018	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 Yoshida Hideki, Matsuoka Makoto	4. 巻 54
2. 論文標題 Two bHLH transcription factors affect sprouting by regulating the level of ABA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 1772 ~ 1773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-022-01238-1	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Wang Fanmiao, Yoshida Hideki, Matsuoka Makoto	4. 巻 62
2. 論文標題 Making the 'Green Revolution' Truly Green: Improving Crop Nitrogen Use Efficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 942 ~ 947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab051	査読の有無 無
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 Suganami Mao, Yoshida Hideki, Yoshida Shinya, Kawamura Mayuko, Koketsu Eriko, Matsuoka Makoto, Kojima Soichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Redefining awn development in rice through the breeding history of Japanese awn reduction	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1370956 ~ 1370956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2024.1370956	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 Suganami Mao, Kojima Soichi, Yoshida Hideki, Mori Masaki, Kawamura Mayuko, Koketsu Eriko, Matsuoka Makoto	4. 巻 15
2. 論文標題 Low mutation rate of spontaneous mutants enables detection of causative genes by comparing whole genome sequences	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1366413 ~ 1366413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2024.1366413	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 Y. Hideki, O. Satoshi, W. Fanmiao, S. Shohei, M. Masaki, K. Mayuko, Z. Xue, W. Yiqiao, N. Naho, K. Asako, M. Kotaro, Y. Shinya, I. Masaru, I. Akitoshi, H. Lin-Tzu, C. Hsing Yue-le, Y. Yoshiyuki, M. Yoichi, Y. Masanori, K. Toshihisa, Y. Eiji, S. Jian, H. Ko, M. Makoto	4. 巻 16
2. 論文標題 Integrated genome-wide differentiation and association analyses identify causal genes underlying breeding-selected grain quality traits in japonica rice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Plant	6. 最初と最後の頁 1460 ~ 1477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molp.2023.09.002	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 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吉田 英樹, 平野 恒, 矢野 憲司, Fanmiao Wang, 森 政樹, 川村 真結子, 嶺巖 永里子, 服部 将子
2. 発表標題 イネ種子発芽を温度に応じて制御する転写調節モジュールの解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 英樹, 平野 恒, 矢野 憲司, Fanniao Wang, 森 政樹, 川村 真結子, 瀧澤 永里子, 服部 将子
2. 発表標題 イネ種子発芽を温度に応じて制御する転写調節モジュールの解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideki Yoshida
2. 発表標題 Genome-wide association study identifies a gene responsible for temperature-dependent rice germination
3. 学会等名 the 15th International Symposium on Pre-Harvest Sprouting in Cereals (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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		
中国	瀋陽農業大学	台湾中央研究院	