

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870780

研究課題名(和文) イネの乾物生産に關与する量的形質遺伝子座の生理学的解析

研究課題名(英文) Physiological characterization of quantitative trait loci involving for biomass production in rice

研究代表者

廣津 直樹 (Hirotzu, Naoki)

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号：40584389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、生育初期の乾物生産速度を増加させる4つの量的遺伝子形質座(qEGR1、qEGR6、qEGR8、qEGR12)を特定した。qEGR1は、純同化率(NAR)を増加させることにより相対成長速度(RGR)を増加させる作用を持つことを明らかにした。qEGR6、qEGR8、qEGR12は根における窒素の吸収速度を増加させていることを明らかにした。さらにこれら4つのQTLは収穫期の乾物重を増加させる作用を持つことが考えられた。これらのことから、初期の乾物生産速度の増加させるこれら4つのQTLは、その後のバイオマス生産性に大きく影響することを確認した。

研究成果の概要(英文)：I investigated the growth mechanism of rice by quantitative trait locus (QTL) analysis. Four QTLs associated with increased in plant growth rate were identified which were derived from 'Kasalath' alleles on chromosomes 1, 6, 8 and 12. This was achieved by evaluating the net dry weight gain between two developmental points. Physiological analysis revealed that the QTL on chromosome 1 (qEGR1) increased the relative growth rate (RGR) by enhancing the net assimilation rate (NAR). High RGR and NAR were facilitated by an increase in gene expression of OsSPS1 that encodes the rate-limiting enzyme in sucrose synthesis. In contrast, QTLs on chromosomes 6, 8 and 12 (qEGR6, qEGR8 and qEGR12) were associated with an increase in uptake of NH₄⁺, the major nitrogen source for rice. These results suggest that growth mechanism is controlled by multiple traits but sucrose biosynthesis and NH₄⁺ uptake play the key role in determining early growth rate of rice plant.

研究分野：作物生理学

キーワード：量的形質遺伝子座 成長解析 窒素吸収 ショ糖リン酸合成酵素 初期生育 乾物生産

1. 研究開始当初の背景

アジアの人口は今後爆発的に増加すると予想され、食糧不足に至ることは確定的事実である。耕作面積の飛躍的な拡大が見込めない現状においては、アジア地域の主食であるコメの増産が求められている。イネの収量は、シンクサイズ(穂数や粒数など)とソース能(光合成速度など)によって決定される。これまでにシンクサイズに関与する複数の遺伝子が特定され、実際にゲノム育種法によるシンクサイズの拡大が実現している(Ashikariら Science 2005 309:741-745)。一方でソース能の拡大に関与する遺伝子はほとんど特定されていない。

20世紀後半のイネ多収性品種の育種において、半矮性品種を多肥栽培することにより見かけ上のソース能を上げてきた。しかしながら、半矮性品種は長稈品種に比べてソース能としてのポテンシャル能力が低いことが作物生理学に明らかとなっている(翁ら 1982 日作紀 51:510-518、武田ら 1983 日作紀 52:299-306)。イネの収量を飛躍的に向上させるためには、これまで半矮性・多肥栽培により行われてきた多収方針を180度転換し、ソース・バイオマス生産向上に主眼を置いた育種を行う必要がある。

ソース・バイオマス生産向上に関与する遺伝子として、唯一、イネの第1番染色体に座乗する草丈を増加させる量的形質遺伝子座(QTL)の原因遺伝子としてSPS遺伝子(*OsSPS1*)が特定された(Ishimaruら 2004 *Planta* 218:388-395)。これ以前からSPS活性とイネの生長速度との間に正の相関関係が見られることが知られており(Seneweeraら 1995 *Plant Physiol* 108:1471-1477)、SPS遺伝子の過剰発現による形質転換イネによりSPS活性の増加が炭水化物代謝を含むソース能に与える影響が調べられてきた(Onoら 2003 *Plant Prod. Sci.* 6:281-286)。イネ以外では、トマト(Laporteら 1997 *Planta* 203:253-259)およびジャガイモ(Ishimaruら 2008 *Plant Prod. Sci.* 11:104-107)でSPS遺伝子の過剰発現植物が圃場栽培され、いずれもコントロールと比べて20%程度の収量(それぞれ果実および塊茎)増加が確認されている。

研究代表者はこれまで、コシヒカリのSPS遺伝子(*OsSPS1*)が座乗する染色体部位をインディカ品種のカサラス由来染色体に置き換えた準同質遺伝子系統(NIL)を用いた解析により、カサラス型でSPS活性が増加し、草丈および地上部乾物重が増加することを明らかにした(Hirotsuら 2008 *Plant Physiol. Biochem.* 46:517-523)。また、H22-23年度科学研究費補助金(研究活動スタート支援)の補助を受けてNILを開放系大気CO₂倍加実験(FACE)圃場で栽培し、NIL区およびFACE区で下位節間に糖が蓄積しバイオマスが増加することを見出した(第231回日本作物学会講演会)。これらの結果は、

コシヒカリとカサラス間のSPS遺伝子の塩基配列の差異が、バイオマス生産を増加させることを示唆している。このようにSPSが作物生理学的に利用可能な有用遺伝子であるという証拠は揃いつつあった。

飛躍的にソース・バイオマス生産性を向上させるためには、この上記QTLのみではなく複数QTLをピラミディングして作用を積み重ねることが求められる。しかしながら、前述のとおりSPS遺伝子以外のソース・バイオマス生産向上に関与する遺伝子は特定されていない。作物生理学の立場から、ソース・バイオマス生産向上に主眼を置いたQTLの特定が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、コシヒカリ/カサラス染色体断片置換系統(CSSL)を用いてQTL解析を行い、乾物生産速度および窒素吸収量を増加させるQTLの検出を行うことを目的とする。さらに、特定したQTLの生理機能を明らかにするために、成長解析、ガス交換測定、窒素吸収測定、収量・バイオマス解析および関連する遺伝子発現解析を行い、乾物生産という多くの因子によって制御される複雑な形質を遺伝的に改良するための知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

乾物生産能力は、生育期間の同化能力の積算であり、環境要因の変動などによる影響を受ける。そこで、生育初期の乾物生産速度を評価するために、播種1ヶ月後の全乾物重から種子重を引くことにより実際の乾物の増加速度として求めることとする。また同様に生育初期の窒素吸収能力を評価するために、播種1ヶ月後の個体全窒素含量から種子窒素含量を引いて求めることとする。このような指標を用いてコシヒカリ/カサラスCSSLsを評価し、関連するQTLの特定を行なった。

特定したQTLの乾物生産能力を評価するために成長解析を行い、生育ステージごとの相対成長率(RGR)、純同化率(NAR)、葉面積比(LAI)を求めた。また、初期生育の増加が、生育中期・後期および収量に及ぼす影響を明らかにするために、圃場栽培して各生育時期における草丈、葉位別の葉身および葉鞘の乾物重などのバイオマス生産特性に及ぼす影響を解析した。収量調査は、穂数・1穂粒数・1000粒重・登熟歩合の各収量構成要素に分けて測定した。

次にQTLの生理機能を評価するために、ガス交換法により個葉の光合成速度を、また葉身の窒素含量をCNアナライザーにより測定した。また、水耕栽培法で栽培したSL223を用いて、水耕液中のアンモニア濃度減少速度より根における窒素吸収速度を見積り評価した。

さらに、QTLの分子遺伝的特性を明らかにするために、SPS遺伝子ジーンファミリー

(*OsSPS1*, *OsSPS2*, *OsSPS6*, *OsSPS8*, *OsSPS11*) および *SPP* 遺伝子ファミリー (*OsSPP1*, *OsSPP2* および *OsSPP5*) の遺伝子発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

4. 研究成果

コシヒカリ/カサラス染色体断片置換系統 (CSSL) を用いた解析により、カサラス型で乾物生産速度 (播種 1 ヶ月後の全乾物重から種子重を引いたもの、純乾物増加量) および窒素吸収量 (個体全窒素含量から種子窒素含量を引いたもの) を増加させる QTL が第 1、6、8、12 番染色体 (それぞれ *qEGR1*, *qEGR6*, *qEGR8*, *qEGR12*) に存在することを明らかにした (図 1、第 235 回日本作物学会講演会)。

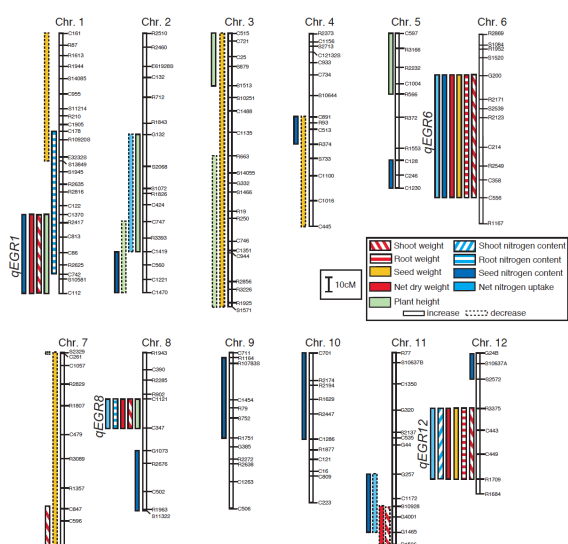


図 1 生育初期の乾物生産に関する QTLs

qEGR1 は、これまでの研究背景からカサラス型 *OsSPS1* 遺伝子発現量の増加による初期生育の向上であることが強く示唆された。しかしながら、ショ糖リン酸合成酵素 (SPS) 遺伝子発現量の増加がどのように生育速度の増加をもたらすのか、その要因は不明である。そこで次に、コシヒカリを遺伝的背景とし、*qEGR1* 近傍がカサラス型に置換された染色体断片置換系統 SL203 を用いて、*OsSPS1* およびその他の *SPS* 遺伝子群や *SPP* 遺伝子群の遺伝子発現を調べ、*OsSPS1* 発現量の増加がイネの乾物生産に与える影響を調査した。SL203 の *OsSPS1* 遺伝子発現量は、コシヒカリよりも有意に増加していた。一方で、その他の *SPS* 遺伝子群の発現は検出されなかった。このとき *SPP* 遺伝子群の発現を調べたところ、*OsSPP1* のみ発現が確認されたものの *OsSPP2* および *OsSPP5* の発現はほとんど確認できなかった。また、系統間で *SPP* 遺伝子の発現量に有意な差は見られなかった。また成長解析の結果、SL203 の RGR はコシヒカリに比べて有意に大きいことが確認された。この RGR の増加は、LAR

の増加によるものではなく、NAR が増加することによることが明らかとなった (図 2)。しかしながら、個葉のガス交換速度を解析したところ、SL203 とコシヒカリで優位な差はみられなかった。

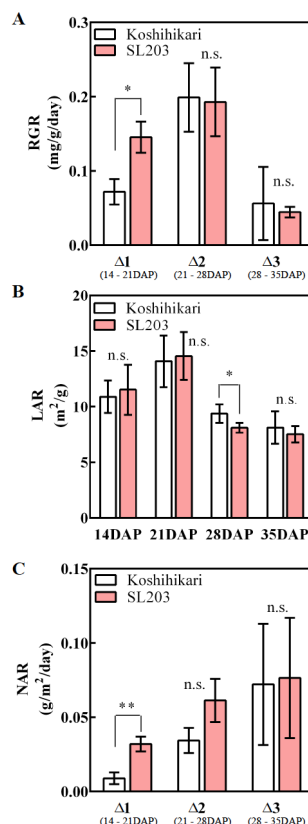


図 2 コシヒカリおよび SL203 の RGR (A)、LAR (B) および NAR (C)

一方で、*qEGR6*, *qEGR8*, *qEGR12* は窒素吸収量を増加させる QTL と領域が重なることから、窒素吸収を増加させることにより乾物生産能力を増加させる新規な QTL である可能性が考えられた。そこでこれらの QTL の近傍をカサラス型に置換した染色体断片置換系統 SL218、SL223、SL238 を用いて、*qEGR6*, *qEGR8*, *qEGR12* がイネの乾物生産を増加させる要因を調査した。SL218、SL223、SL238 の初期生育期間における窒素吸収量を比較した結果、これらの系統はコシヒカリに対してそれぞれ 1.37、1.52、1.41 倍高いアンモニウムイオン吸収速度を示した。実際に、水耕栽培下でのアンモニウムイオンの吸収速度を測定した結果、これら 3 系統すべてでコシヒカリよりも有意に増加していた (図 3)。*qEGR6*, *qEGR8*, *qEGR12* はアンモニウムイオンの吸収速度を増加させることにより初期生育速度を向上させているのではないかと考えられた。

本研究で明らかにした生育初期の乾物生産を増加させる 4 つの QTL がイネの収量およびバイオマス生産に与える影響を明らかにするために、圃場栽培を行った。収穫期における各器官のバイオマスと比較したところ、SL203、SL218、SL223、SL238 はコシ

ヒカリと比べて葉身・葉鞘・穂などの乾物が増加していた。これらのことから、初期の乾物生産速度の増加は、その後のバイオマス生産性に大きく影響することを確認することができた。これらのことから、初期の乾物生産速度の増加は、その後のバイオマス生産性に大きく影響することを確認した。

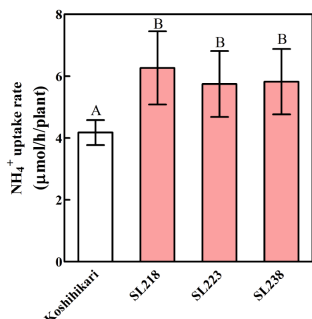


図3 アンモニウムイオン吸収速度

初期生育の増加は、種子の発芽活性にも影響されることが予想される。そこで発芽活性に影響を与える新たな因子として糖鎖構造に着目し、発芽前の種子胚および発芽48時間後の子葉のN-グリカンと比較した。その結果、発芽過程においてN-グリカンの種類が増加してより複雑な構造のN-グリカンが合成されることを明らかにした。今後これらの糖鎖構造の変化と発芽活性の関係や、系統間差について明らかにしていく必要がある。

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)

Risa Horiuchi, Naoki Hirotsu and Nobumitsu Miyanishi. Comparative analysis of N-glycans in the ungerminated and germinated stages of *Oryza sativa*. *Carbohydrate Research* 418, 1-8. (2015) DOI: 10.1016/j.carres.2015.09.008 [査読有り]

Ken Ishimaru*, Naoki Hirotsu*, Yuka Madoka, Naomi Murakami, Nao Hara, Haruko Onodera, Takayuki Kashiwagi, Kazuhiro Ujiie, Bun-ichi Shimizu, Atsuko Onishi, Hisashi Miyagawa and Etsuko Katoh. Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene *TGW6* enhances rice grain weight and increases yield. *Nature Genetics* 45 (6), 707-711. (2013) *equal contribution DOI: 10.1038/ng.2612 [査読有り]

[学会発表](計8件)

竹村ほづみ、清水順平、氏家と広、石丸健、廣津直樹 “機能欠失型 *TGW6* のソース器官における機能と高温登熟障害回避へ果たす役割” (日本作物学会第239回講演会、76、神奈川県藤沢市・日本大学湘南キャンパス、2015年3月27日～28日)

Naoki Hirotsu “The genetic control of rice yield using novel genes.” (2nd Ruhuna International Science & Technology Conference (RISTCON 2015). Plenary session, Faculty of Science, University of Ruhuna, Matara, Sri Lanka, January 22-23, 2015)

堀内里紗、遠坂翼、廣津直樹、宮西伸光 “イネの生長時における糖鎖構造の挙動” (第33回日本糖質学会年会、P-080、愛知県名古屋市・名古屋大学豊田講堂、2014年8月10日～12日)

永井雄基、砂川裕貴、望月麻衣、廣津直樹 “イネの初期生育速度に関する要因の生理学的解析” (第55回日本植物生理学会年会、富山県富山市・富山大学五福キャンパス、2014年3月18日～20日)

永井雄基、廣津直樹 “カサラス型 *OsSPS1* をもつ染色体断片置換系統イネの生育およびガス交換速度の解析” (日本作物学会第236回講演会、P-60、鹿児島県鹿児島市・鹿児島大学都元キャンパス、2013年9月9日～12日)

堀内里紗、廣津直樹、宮西伸光 “イネの生長時における構造別糖鎖含有量の変動” (第32回日本糖質学会年会、大阪府大阪市・大阪国際交流センター、2013年8月5日～7日)

Naoki Hirotsu “The genetic control of rice yield through gleaning superior genes.” (7th International Rice Genetics Symposium. Plenary session PS05-01, Dusit Thani Hotel, Manila, Philippine, November 5-8, 2013)

永井雄基、松本浩一、廣津直樹 “イネの初期生育に関する量的形質遺伝子座の解析” (日本作物学会第235回講演会、P-70、神奈川県川崎市・明治大学生田キャンパス、2013年3月28日～29日)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等
<http://www2.toyo.ac.jp/~hirotsu/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
廣津 直樹 (HIROTSU, Naoki)

東洋大学・生命科学部・准教授
研究者番号：40584389

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし