

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450008

研究課題名(和文) イネ種子形を制御する遺伝子群の同定

研究課題名(英文) Identification of genes regulating seed size in rice

研究代表者

岩崎 行玄 (IWASAKI, Yukimoto)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：20193732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：イネの種子サイズを制御する遺伝子群の理解を深めるため、新奇短粒変異体srs2とsrs6の短粒の原因となる遺伝子の探索を行った。srs2は、BRASSINOSTEROID- SIGNALING KINASE 2：ブラシノステロイドシグナル伝達キナーゼ2(BSK2)のオーソログ遺伝子(OS10g0571300)内にナンセンス変異を引き起こすSNPを検出した。srs6はF-boxタンパク質をコードするERECT PANICLE 3 (EP3)遺伝子内に終始コドンが生じる一塩基置換を見出した。現在、形質転換による相補性検定とCRISPR-cas9システムを用いて原因遺伝子の特定を試みている。

研究成果の概要(英文)：In order to understand mechanism regulating seed size, the identification and isolation of genes regulating seed size using novel seed size mutants in rice, srs2 and srs6 were carried out. A SNP due to nonsense mutation was detected in an orthologue gene to Arabidopsis BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE 2 (BSK2) in srs2 mutant. A one base substitution due to generate a stop codon was found ERECT PANICLE 3 (EP3) gene, which encodes F-box protein in srs6 mutant. Now we start the complementation test introducing wild type genes and produce the knock out rice using CRISPR-Cas 9 system, in order to proof the function of the candidate genes.

研究分野：植物生化学

キーワード：イネ 種子形 粒形変異体 3量体Gタンパク質 ブラシノステロイド

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 主要穀物の収量を増加させることは、安定な食料供給の重要な課題である。イネの場合、収量は、4つの構成要素(穂数、穂に結実するモミ数、登熟歩合、玄米重量)の積で算出できる。私どもは、この内の玄米重量を規定する種子形に着目し、分子生物学的、遺伝学的な視点に立脚して、種子を形づくる遺伝子機能の理解や情報伝達様式の理解を深めることを目的とした。将来的には、遺伝子に着目して、種子形を自在にデザインすることを期待している。

(2) 種子形を規定する遺伝子は、(ア)粒形が異常な変異体からマップベースクローニング法で単離するか、(イ)多様な品種等から QTL 解析で単離できる。我々は、現在まで、両者の方法を採用し、種子形研究を行っている。

(3) 野生型品種を NMU 等の変異源処理により、変異を誘発した集団からは、粒形が異常な変異体が数多く選抜できるが、その大多数は短粒である。短粒になる遺伝子の同定は、農業上、意味がないであろうという意見が出されるが、それは短見である。例えば、D1 遺伝子(3量体 G タンパク質 サブユニット 遺伝子)は、遺伝子欠失で短粒であるが、恒常的活性型変異では大粒である。GS3 遺伝子(3量体 G タンパク質 3 遺伝子)は、遺伝子欠失で大粒であるが、C 末端のシステイン-リッチドメイン領域の欠失では短粒である。D11 遺伝子(ブラシノステロイド生合成に関与する P450 遺伝子)は、遺伝子欠失で短粒であるが、過剰発現で大粒である。つまり、研究のスタートとなる材料は、短粒でも、大粒でもよく(もちろん大粒ならば直接、育種に使うことができるが)、粒形の形成に関与する遺伝子の同定が優先して行われることが肝要と考えている。マップベースクローニング法で同定できた短粒の原因遺伝子が、多様な品種の QTL 解析の候補領域に見出される可能性は十分に想定され、両研究手法は、相互に確からしさを補うことができるので、両者を併用することは重要であろう。

(4) 本研究に着手する時点で、我々は、種子形に関与する遺伝子群は、大きく、外穎を形成する細胞の数(細胞数)を決定する物(D1, SRS2, SRS4, SRS6)と外穎を形成する細胞の長さ(細胞長)を決定する物(D61, D2, D11, SRS1, SRS3, SRS5)に分類した。

(5) この内、細胞長に関わる遺伝子群の研究が進んでおり、D61 は BR 受容体、D2 と D11 は、それぞれ BR 生合成に関わる P450 遺伝子、SRS1 は機能未知な新規遺伝子、SRS3 はキネシン 13 タンパク質遺伝子、SRS5 は チュープリン遺伝子であることが

明らかにされている。

(6) 加えて、細胞長に関する遺伝子群の相関関係も解析が進んでいる。D61, D2, D11 は、いずれもブラシノステロイド(BR)シグナリングで働く遺伝子群で、種子形の形成において、ブラシノステロイドシグナリングは、細胞長を制御する。興味あることに、SRS1, SRS3, SRS5 の変異体(srs1, srs3, Srs5)をそれぞれ BR 関連変異体(d2 または d61)に交配して得られた 2 重変異体は、加算的に種子が小さくなった。よって、SRS1, SRS3, SRS5 遺伝子は、BR シグナリングと独立していることが明らかになった。さらに、srs1, srs3, Srs5 変異体に着目し、2 重変異体を作出したところ、SRS3 と SRS5 は遺伝学的に同一の経路に含まれることが示された。よって、現在、外穎の細胞長を制御する遺伝子群は、ア)BR シグナリング、イ)SRS3 と SRS5、ウ)SRS1 の 3 つの独立した仕組みがあることが明らかになった。

(7) 細胞数を制御する遺伝子群の研究は未解明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

種子形の形成に関与する遺伝子群は、研究背景にも記したように、細胞長を制御する遺伝子の同定が進んでいるが、細胞数を制御する遺伝子群の同定は未解明な部分が多い。よって、本研究課題では、外穎の細胞数を制御する短粒変異体 srs2, srs4, srs6 について短粒の原因となる遺伝子の探索を行った。

## 3. 研究の方法

(1) QTL 解析(MutMap+法および QTL-sec 法): 野生型と変異体を交配した F2 集団を作製、変異表現型 30 個体と野生型表現型 30 個体を、バルクで DNA を抽出後、次世代シーケンス解析を行った。

(2) 次世代シーケンス: 20x ゲノムのデプスで実施した。

(3) アグロバクテリアを用いた相補検定実験: バイナリーベクターである pYL-TAC7 に、日本晴れゲノム断片導入した。この後、作出したバイナリーベクターをアグロバクテリア EHA105 に導入した。この後、アグロバクテリアをイネカルスと共存させ、遺伝子導入個体を得た。

(4) CRISPR-cas9 を用いた遺伝子編集: ターゲット配列を pU6gRNA にクローニング後、バイナリーベクターである pZH\_gYSA\_MMCas9 に挿入し、アグロバクテリア法でイネに導入した。

#### 4. 研究成果

(1) srs2 は、BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE 2 : BSK2(ブラシノステロイドシグナル伝達キナーゼ 2)のオースログ遺伝子(OS10g0571300)内にナンセンス変異を引き起こす SNP を検出した。これを証明するために、野生型 BSK2 遺伝子を srs2 に形質転換する相補性検定を試みた。しかしながら、srs2 は発芽率の低下、カルス誘導能の低下、再分化能の低下がみられ、形質転換が困難であった。そこで、この遺伝子変異が srs2 変異の原因であると確定するために、野生型系統の BSK2 を CRISPR-Cas9 法を用いて、遺伝子編集で候補遺伝子を破壊することで、検証を試みた。遺伝子編集個体を作成し、その表現型を調査したところ野生型個体よりも種子が有意に短くなっていた。この結果から、SRS2 遺伝子は BSK2 をコードしていると結論した。

次に、細胞数変異体に着目し、srs2 変異体と d1 変異体との二重変異体を作成したところ、種子長、草丈に関して d1 変異体と酷似した表現型であった。このことから、srs2 変異体は D1 遺伝子がコードする 3 量体 G タンパク質 サブユニットのシグナル伝達に関わる事が推測された。srs2 は d1 との二重変異体により d1 が遺伝的上位であることが示されたため、今後、3 量体 G タンパク質シグナル伝達の変異体であるか否かを調査することが重要である。

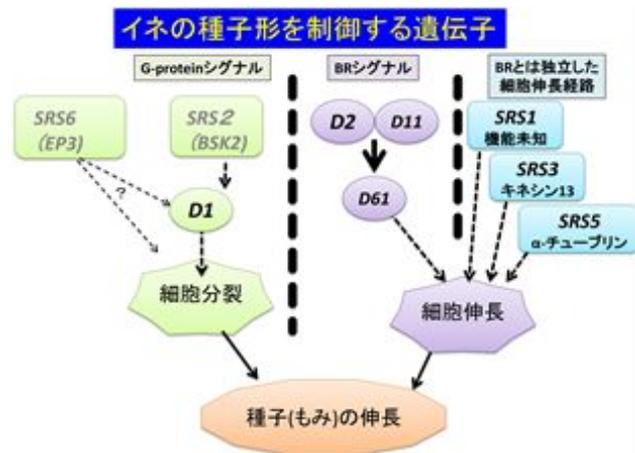
srs2 は細胞数変異体のため、原因遺伝子が細胞長を制御するブラシノステロイドシグナリングに関わる遺伝子であることは、極めて興味深い。申請者らは、細胞数を制御する 3 量体 G タンパク質シグナリングと細胞長を制御するブラシノステロイドシグナリングは、大部分が独立したパスウェイと考えていたが、BSK2 を介して、シグナリングパスウェイが交差している可能性が出てきた。今後、この点に着目した研究が必須と考える。

(2) srs6 は、F-box タンパク質をコードする EP3 遺伝子内に変異を見出した。この遺伝子変異が srs6 の原因であることを証明するために、形質転換による相補性検定を試みている。srs6 は、d1 背景の EP3 遺伝子破壊系統及び BR 関連変異体との二重変異体を解析することで、3 量体 G タンパク質シグナリングおよびブラシノステロイドシグナリングにおける位置づけが解明できると期待している。

(3) srs4 は、マップベースクローニング法が困難であったため、MutMap+ 法および QTL-sec 法による解析を試みたが、遺伝子同定には至っていない。マップベースクローニングの困難さは、日本型-インド型の遺伝背景の違いにより、srs4 表現型の出現頻度を低

下させるような効果が表れていると推測した。この分離の歪みを低減させるために、野生型系統 T65 と、日本晴と交配した雑種集団の再構築を開始した。最終年度である 28 年度は、srs4 変異体と野生型品種 T65、srs4 変異体と日本晴を交配し、F1 種子を得た。

現在までの成果を、下図に示す。中心より右側が、細胞長を制御する遺伝子群をまとめた物である。中心より左側が、細胞数を制御する遺伝子群である。本研究により、新たに 2 個の新規遺伝子 (SRS2, SRS6) を加えることができた。



#### 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) Shuhei Segami, Kana Takehara, Tatsuya Yamamoto, Shintaro Kido, Saki Kondo, Kotaro Miura, and Yukimoto Iwasaki. Molecular breeding using grain size related genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science* 査読有、in press

2) Urano, D., Miura, K., Wu, Q., Iwasaki, Y., Jackson, D. and Jones, A. M. Plant Morphology of Heterotrimeric G Protein Mutants. *Plant Cell Physiol.* 査読有、57, 437-445 (2016)

[学会発表](計2件)

1) 瀬上修平、北野英巳、三浦孝太郎、岩崎行玄: BR シグナル伝達とは独立にイネの種子形を制御する SRS5 遺伝子の利用。日本育種学会 第 129 回講演会 2016 (横浜市立大学 2016 年 3 月 22 日)

2) 瀬上修平、三浦孝太郎、岩崎行玄：イネの短粒変異体は、外穎の細胞数の減少か細胞長の減少で区別できる。日本育種学会 第128回講演会 2015 (新潟大学 2015年9月11-12日)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩崎 行玄 (IWASAKI Yukimoto)  
福井県立大学・生物資源学部・教授  
研究者番号：20193732

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

三浦 孝太郎 (MIURA Kotaro)  
福井県立大学・生物資源学部・准教授  
研究者番号：70571561