

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870319

研究課題名(和文) 突然変異による概日リズムのゆらぎがイネの光合成能力および生産性に及ぼす効果の検証

研究課題名(英文) Investigation of the effects of the circadian rhythms changes on photosynthesis and yield components

研究代表者

齊藤 大樹 (Saito, Hiroki)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10536238

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)：概日リズムは、24時間周期をもつ植物の体内時計であり、生命活動の根幹をなすものである。本研究では、概日リズムのゆらぎがイネの生産性に及ぼす影響を検証した。概日リズム制御に関与すると考えられるOsPRR59のエキソン内にmPingが挿入した突然変異系統GP8を作出した。遅延蛍光の観察による概日リズムの測定では、周期性の有無は検証が必要なものの、イネにおいても蛍光の強弱を観察することができた。すでに概日リズムに変化があることが示されている晩生突然変異系統HS276の収量構成要素の調査を行ったところ、穂長、一次枝梗数ならびに二次枝梗数において、HS276の方が大きくなる傾向にあった。

研究成果の概要(英文)：Circadian rhythms are the subset of biological rhythms with period, defined as the time to complete one cycle of approximately 24 h. In this study, the effect of slight changes of the circadian rhythms on the yield components were investigated. In first, a mutant line (GP8), which harbored a mPing insertion at the exon of OsPRR59 gene, was selected. Next, the measurement of the circadian rhythms based on delayed fluorescence showed some oscillations, however it needs further investigations and improvements to detect distinct rhythmic oscillations. HS276, which harbored a mutant allele at the Ef7 locus and arrhythmic oscillations in the day-time free-running rhythms, showed that the length of panicles, number of primary branches of panicle and secondary branches of panicle were increased compared with the wild type.

研究分野：植物育種学

キーワード：イネ 概日リズム 出穂期 光合成 突然変異

1. 研究開始当初の背景

主要作物のイネにおいて、生産性に関わる様々な形質(穂、籾や茎葉の数・大きさ、光合成能力)に関わる遺伝子が明らかにされてきた(Ashikari et al. 2005, Shoumura et al. 2008, Miura et al. 2010, Li et al. 2011, Takai et al. 2013)。しかし、これらの遺伝子を集積しても現在の高い生産性をもつイネ品種を超える品種は育成されていない。このことは、生産性に関わる直接的な形質に着目した分子遺伝学的改良の限界を示し、イネのもつ真の生産性を引き出すためには、もっと根本的な生理現象に目を向ける必要があると考えられた。

概日リズムは、24時間周期をもつ植物の体内時計であり、生命活動の根幹をなすものである。近年、作物の生産性の原動力となる光合成は概日リズムによって制御され、24時間の明暗周期に合った光合成リズム(糖の生合成とデンプンの蓄積の周期)をもつ個体は、高い適応度(生存・繁殖能力)を示すことが明らかにされている(Graf et al. 2010, Farre 2012, Ruts et al. 2012, Dodd et al. 2013)。

季節的な明暗周期(=日長)の変化が小さい低緯度地域を起源とするイネは、わずか1万年という短い期間で日長の変化が大きい中・高緯度地域に栽培地を拡大してきた。この急速な北進の過程で、イネの光合成は未だ低緯度地域の明暗周期に適応したもので、中・高緯度地域の明暗周期に合う光合成リズムの最適化によって、イネのもつ生産ポテンシャルをさらに引き出すことができるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、新たに確立する概日リズム測定システムを用いて、概日リズム変異系統を作出し、圃場試験における生産性の評価、光合成能力の測定およびトランスクリプトームによる網羅的解析によって、突然変異による概日リズムのゆらぎが光合成能力に及ぼす影響を検証し、生産性の向上に寄与する知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) イネにおける概日リズム観測システムの開発

遺伝子組換え植物を用いず、イネの概日リズムを評価する手法は確立されていない。そこで2つの手法(幼葉鞘の回旋運動の観察と葉における遅延蛍光の観察)によって、概日リズムを迅速かつ簡易に観測するシステムを開発する。なお、概日リズム変異個体のコントロールとして、銀坊主由来の変異系統 HS276 (E17を欠損し、概日リズムがやや長くなる変異系統)および X61 (Se13を欠損し、概日リズム制御遺伝子の発現振幅が小さくなった系統)を用いる。

幼葉鞘の回旋運動の観測

暗黒条件下のイネの芽生え(=幼葉鞘)が約180分の周期で回旋運動をすることが報告されている(Yoshihara and Iino 2005; Biswas et al. 2003)。短い周期であるが、概日リズムによって制御されていると考え、概日リズムを間接的に評価する手法とする。回旋運動の観察には、Tanabata et al. (2008)が開発した回転台上で連続撮影する装置を一部改変し行う。

遅延蛍光の観察

植物は光合成のため光エネルギーを利用するが、余剰な光エネルギーはクロロフィル蛍光として放出する。その蛍光には瞬時に消失する即時蛍光と数秒から数分後でも検出可能な遅延蛍光がある。Gould et al. (2009)は遅延蛍光を利用して植物の概日リズムを測定できることを報告している。本研究では発芽後から3日間連続で測定する。

(2) 概日リズム制御遺伝子の逆遺伝学的解析と概日リズム変異系統の育成

トランスポゾン *mPing* の自然転移を利用した逆遺伝学的解析によって、概日リズムの制御に関与すると考えられる遺伝子に変異をもつ系統を選抜し、その概日リズムを評価する。得られた突然変異系統を相互に組み合わせ、多様な概日リズム変異系統を作出する。

トランスポゾン *mPing* は銀坊主において活発な転移活性をもつ。そのため、自殖するごとに10~30の新たな挿入箇所を増加させる。また、新たに挿入する位置は遺伝子内あるいは遺伝子近傍に多く、*mPing* 挿入による遺伝子破壊あるいは転写調節領域の改変が生じる(Naito et al. 2009)。すでに、1個体に由来する銀坊主を大規模に栽培し、多様な新規挿入をもつ逆遺伝学解析集団(Spontaneous Transposition of an Active rice transposable element *mPing*: STAmPing line)が育成されている。また、各個体が有する *mPing* の隣接サイトを次世代シーケンサーで解読し、それぞれの個体が有する特異的な *mPing* 挿入位置を特定されている(Yasuda et al. 2012, 2013)。本研究では、これらの情報を基に *mPing* 挿入によってイネの概日リズム制御に関わると考えられる候補遺伝子(シロイヌナズナで報告のあるホモログ遺伝子、および過去のトランスクリプトーム解析から恒常的に日周期変動を示す遺伝子)の機能が破壊された個体を選抜する。

(3) 概日リズム変異系統の光合成能および生産性の検証

得られた変異系統の概日リズム変異系統を圃場で栽培し、光合成能力の測定、

RNA-seq によるトランスクリプトーム解析、収量調査を行い、概日リズムの揺らぎによる光合成能および生産性に及ぼす影響を検証する。

概日リズム変異系統の生産性検定

生産性の指標として収量構成要素の調査を行う。調査項目は地上部乾物重（出穂期および登熟期）、穂数、一穂粒数、千粒重、稔実率とする。また、関連形質である分けつ数、遮光率、SPAD 値について移植後からの経時的な変化を合わせて調査する。遮光率は光量子センサー（Decagon 社 AccuPar LP-80）を用いて、植物体上部および株元の受光量を測定し算出する。SPAD 値は SPAD メーター（コニカミノルタ社 SPAD-502Plus）を用いて、測定日の最上位展開葉の 3 カ所測定し、5 個体平均値を求める。

光合成能力

生育ステージの異なる植物体を調査するため、4 週間おきに 3 回の播種期を設け、個葉 CO₂ 収支および葉面温度を CO₂ 測定装置 (TM systems 社高精度非分散赤外線 CO₂ 分析計) およびサーモセンサー (NEC Avio 社 ThermoGear G100) を用いて、移植後 10、30、50 日目および出穂期、出穂後 10、30 日目の 12:00 に測定を行う。

次世代シーケンサーを用いた RNA-seq による発現解析

と同様に 3 回の播種期で栽培した植物体（原品種および特徴的な変異系統 2 系統）について、移植後 30 日目および出穂後 10 日目において 3 時間おきのサンプリングを行い、遺伝子発現の日周期変動について次世代シーケンサーを用いた RNA-seq によって解析する。得られた結果から、光合成に関連する遺伝子群の発現変動を解析する。

4. 研究成果

(1) イネにおける概日リズム観測システムの開発

幼葉鞘の回旋運動の観測

Tanabata et al. (2008) が開発した回転台上で連続撮影する装置を一部改変し、幼葉鞘の回旋運動を観察する装置を構築し、変異系統を用いた回旋運動の周期を調査した。回旋運動を観察することは可能になったが、撮影された画像から画像解析による回旋周期の抽出には、解像度、ピント調節などに幾らかの改良が必要であると考えられた。

遅延蛍光の観測

24 穴プレートを用いた観測を試み

たところ、発芽後すぐの植物体では遅延蛍光のシグナルが弱く、十分な蛍光を得ることができなかった。そこで、24 穴プレート内で 5~10 日生育させた後、観察を行なったところ、蛍光の強弱を観察することができた（図 1）。

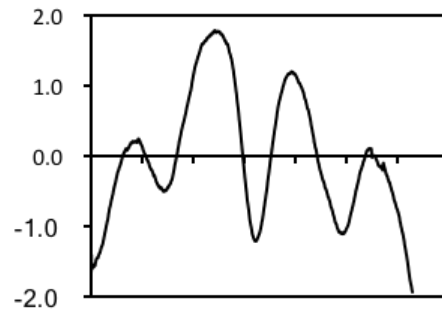


図 1 遅延蛍光の測定結果。X 軸の 1 つのメモリは 12 時間を示す。Y 軸は標準化した蛍光強度を示す。

しかし一定の周期を認めることはできなかった。蛍光の観察には、暗条件に転換後、何秒後からどれくらいの期間露光させ観察するのか、発芽後何日の植物体を用いるのか、といった条件を検討する必要があると考えられた。

以上のことから、概日リズムを観察するには、さらなる条件検討が必要であると考えられた。そのため、遺伝子組換え技術を用い、ルシフェラーゼ生物発光を利用した概日リズムを調査する実験系の確立に取り組み、*OsCab1R* ならびに *OsPRR1* プロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子とを合成したコンストラクトを形質転換し、組換え植物体を得た。

(2) 概日リズム制御遺伝子の逆遺伝学的解析と概日リズム変異系統の育成

銀坊主を遺伝的背景にもつトランスポゾン *mPing* による多様な新規挿入をもつ逆遺伝学解析集団 (Spontaneous Transposition of an Active rice transposable element *mPing*: STAmPing line) を用い、各個体が有する *mPing* の隣接サイトを次世代シーケンサーで解読し、それぞれの個体が有する特異的な *mPing* 挿入位置を特定した結果、イネの概日リズム制御に関わると考えられる *OsPRR59* のエキソン内に *mPing* が挿入した系統 GP8 を作出した。

(3) 概日リズム変異系統の光合成能および生産性の検証

概日リズム変異系統の生産性検定

すでに概日リズムに変化があることが示されている晩生突然変異系統 HS276 を用い、圃場における生産性に

関わる収量構成要素の調査を行ったところ、一穂粒数に關与する穂長、一次枝梗数ならびに二次枝梗数について、HS276の方が大きくなる傾向にあった(図2)。一方、分けつ数は同等かやや少なくなる傾向にあり、最終的な収量は、HS276が低くなった。HS276は原品種より約1週間晩生になることから、生育期間の長短による影響を排除できないことから、概日リズムの変化が光合成、ならびに生産性に及ぼす効果を検証するには、さらなる調査が必要であると考えられた。

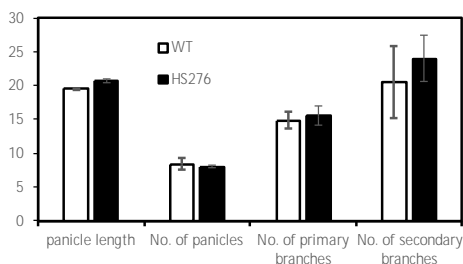


図2 野生型(WT)およびHS276の収量構成要素(抜粋)

光合成能力

概日リズム制御の構成要素の一つであると考えられる *OsPRR59* に変異を持つ新規突然変異系統 GP8 の圃場における到穂日数は原品種とほぼ同等であった。GP8 の光合成能力を CO₂ ガス交換速度によって評価したところ、原品種と GP8 との間に明確な差異は認められなかった。概日リズムは複数の遺伝子によって複雑にかつ冗長的に制御されていることから、*OsPRR59* の変異が、概日リズムの変化に至らなかったため、到穂日数や光合成能力に違いが認められなかったと考えられた。

次世代シーケンサーを用いた RNA-seq による発現解析

概日リズムに何らかの変化があると考えられる突然変異系統をいくつか見出したが、およびの結果から、光合成能力に何らかの変化が生じたとは考えにくいことから、本研究での調査は実施しなかった。

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 1件)

Ogiso-Tanaka Eri, Tsuyoshi Tanaka, Keisuke Tanaka, Yasunori Nonoue, Takuji Sasaki, Eri Fushimi, Yohei Koide, Yutaka Okumoto, Masahiro Yano and Hiroki Saito. Detection of novel QTLs *qDTH4.5* and *qDTH6.3*,

which confer late heading under short-day conditions, by SSR marker-based and QTL-seq analysis. *Breeding Science* (2017) 67: 101-109. (査読あり)

[学会発表](計 1件)

田中剛、小木曾映里、齊藤大樹、田中啓介、佐々木卓治、矢野昌裕 Kasalath の短日出穂遅延因子の検出と QTLseq による検証 日本育種学会第 127 回講演会 平成 27 年 3 月 20 日 ~ 22 日、玉川大学(東京都町田市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 大樹 (SAITO, Hiroki)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：10536238