

令和 4 年 9 月 2 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07631

研究課題名（和文）耐倒伏性ローカスprl5の機能解析とその活用

研究課題名（英文）Functional analysis of lodging resistance locus prl5 in rice

研究代表者

石丸 健（ISHIMARU, KEN）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究部門・主席研究員

研究者番号：80370641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物体の支持力を強くして耐倒伏性を高めるprl5の作用機構の解明と有用性評価を行った。糖シグナルであるT6P合成遺伝子がprl5の原因遺伝子であり、発現量の差がアレルを決定する要因であることを明らかにした。更に植物の老化に関わるSnRK1の発現抑制を介して光合成能を維持することで耐倒伏性を高めると考えられた。また、NILの収量、食味はコシヒカリと同等であり有用性は高いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

倒伏はイネ栽培における最も重要な障害であり、コストや確実性から耐性品種の開発が最も有効な対処方法である。本研究において我々の研究チームは、植物体の支持力を強くして耐倒伏性を高めるprl5の原因遺伝子を特定し有用性が高いことを示した。得られた結果は、耐性系統の作出に活用できる。また、イネの植物体下部の枯れ上がりなどの様に制御されているかを分子レベルで明らかにできた。これらの結果は、老化機構の全貌解明に繋がる重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we elucidated the function and evaluated the valuable of prl5 enhanced lodging resistance by pushing resistance in lower parts. We found that the sugar-signaling T6P synthesis gene was the causal gene of prl5, and that differential expression is a factor determining the allele. Furthermore, it was suggested that prl5 enhances the resistance by maintaining photosynthetic ability through suppressing the expression of SnRK1, which is involved in plant senescence. The yield and taste of NIL were comparable to those of Koshihikari, suggesting its high usefulness.

研究分野：作物学

キーワード：倒伏 イネ 植物体支持力 QTL 老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

倒伏は、生産性や品質を低下させ栽培農家の収入を減少させる、イネ栽培における最も深刻な障害である。倒伏軽減剤や倒伏したイネを起こしながら収穫可能なコンバインも開発されているが、耐性系統の作出が最もリスクが低くまたコスト面からも優れている。

「短稈化」に加え「強稈化」と「植物体支持力の強化」が耐倒伏性を高めるための主要な育種ターゲットである。短稈化は重心を下げることで倒れにくくする。「緑の革命」を可能とした半矮性遺伝子*sd-1*は、現在もなお国内外の多くの品種が有している。しかしながら*sd-1*は窒素の吸収を低下させる欠点があり、収量を維持するために窒素肥料の高投入が必要である。肥料の高投入は地力の低下や残留窒素による環境への負荷をもたらす。そのため持続可能な開発目標(SDGs)や「みどりの食料システム戦略」の達成に向けて、*sd-1*に換わる改良技術の開発が求められていた。強稈化に関わる遺伝子(*SCM2*)も特定されている(Ookawa et al.2010)。*SCM2*は稈の物理的強度を増すことで耐倒伏性を向上させる。一方で多義的な作用により茎数を減少させるため、導入できる系統が限定される。

支持力の強化に関しては、古くから重要性が認識されていたが、評価方法が確立しておらず育種ターゲットとして用いられてこなかった。私達の研究チームは、上部を除去した植物体の押し倒し抵抗値による評価方法を確立した。更に量的形質遺伝子座(QTL)解析により、カサラスに由来し支持力を高める*pr15*を特定し、ポジショナルクローニングの手法により候補遺伝子を絞りこんでいた。

2. 研究の目的

倒伏は、イネ栽培の最も重要な障害であり、持続可能な開発目標(SDGs)の達成や「みどりの食料システム戦略」の遵守に向けて、*sd-1*に換わる耐倒伏性改良技術の開発が求められていた。本研究では、耐倒伏性向上に向けた知見を得ることを目的に、多様な形質が関与する支持力が決定される機構を明らかにする。更に準同質遺伝子系統(NIL)を用いて*pr15*の実用性の検証を行う。

3. 研究の方法

(1)原因遺伝子の特定

コシヒカリの染色体の一部をインド型稲品種カサラス(Kasalath)に置き換えた染色体断片置換系統群(CSSL)にコシヒカリを交配し、 BC_1F_1 を作成した。原因遺伝子が存在すると考えられる領域の両端にDNAマーカーを設定し、 BC_1F_1 の自殖後代 BC_1F_2 の2,000個体の中から領域内で組換えが生じた個体を選抜した。ポジショナルクローニングの手法を用いて*pr15*の原因遺伝子の存在領域の絞り込みを行った。

(2) *OsTPS6*組換え体による実証実験

原因遺伝子として考えられた*OsTPS6*を35Sプロモーターの制御下で高発現する組換え体を作成した。自殖後代 (T_1) を選抜し、組換え体 (T_3) の各系統10個体についてPCRによる確認を行った。*OsTPS6*遺伝子についてカサラス型と判別できた3系統と導入した遺伝子が確認できない系統 (null ; コントロール) を選抜した。日本晴、null及び組換え体の3系統各6個体を、隔離温室で栽培し解析に用いた。出穂後2週間目のサンプル (-2葉) を緑色計 (SPAD : KONIKA-MINOLTA 501) を用いて測定を行った後、サンプリングし、*OsTPS6*の発現量を測定した。

(3) アリルの決定要因

日本晴とカサラスのアリルを決定する部位を特定するために、*OsTPS6*のプロモータ領域の翻訳開始点より、1.1Kb上流の塩基配列を決定し比較した。

(4) NILによる有用性評価

pr15の特性評価対照のコシヒカリとNILを近隣の農家の方法及びスケジュール下で栽培し耐倒伏性等の評価を行った (畝間30cm、株間18cm、機械植)。また、玄米用の篩を用いて上米比率を求めた。

4. 研究成果

(1) 原因遺伝子の特定

本研究開始時は、原因遺伝子の存在領域は137kbであり、11個の遺伝子がコードされていた (図1の上段)。本研究では前年度までの結果の検証として領域の更なる絞り込みを進め領域を12.1kbに絞り込んだ。その領域には*Os05g0517200* (*OsTPS6*) のみが存在していた (下段)。ORFの塩基配列を比較したところ、コシヒカリとカサラス間でアミノ酸配列に変化を及ぼすSNPsは存在しなかった。一方でNILの発現量はコシヒカリの2倍近く高く発現量の違いがアリルを決定する要因と推測された。

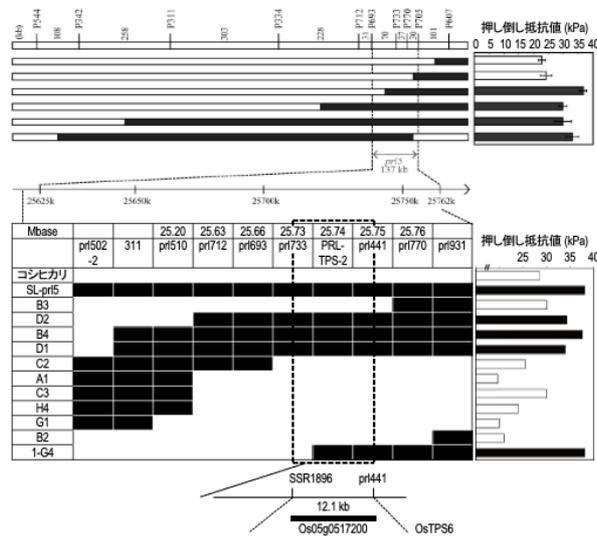


図1 *pr15*のポジショナルクローニング

(2) 組換え体による補完実験

結果を図2に示す。図2のAは各個体における*OsTPS6*発現量を示し、Bは-2葉のSPAD値（下位葉のクロロフィル含量）を示し、Cは押し倒し抵抗値を示す。1は日本晴、2はnull、3~5は組換え体であり、いずれも各系統3個単位の平均である（ $n=3$ ）。*OsTPS6* cDNAを35Sプロモーター下で高発現させた結果、4の押し倒し抵抗値を除き、組換え体は、コシヒカリに対して*OsTPS6*発現量、-2葉のSPAD及び押し倒し抵抗値が有意に高かった（ $p < 0.01$ ）。そのため、*OsTPS6*が原因遺伝子であり、発現量の増加により下位葉の老化が抑制され、植物体の支持力が増大したことが示唆された。

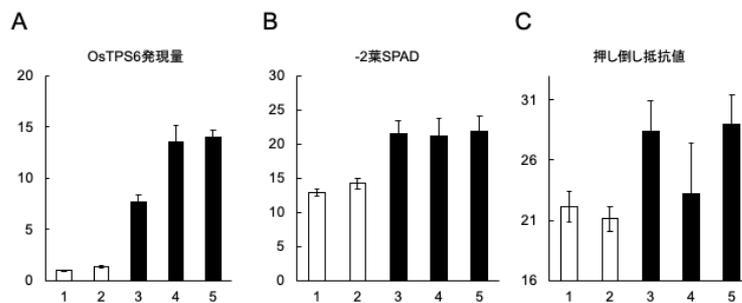


図2 組換え体による補完実験
A: *OsTPS6* 発現量(日本晴に対する相対値), B: 下位葉の SPAD 値, C: 押し倒し抵抗値
1. 日本晴、2. Null、3、4、5. 組換え体

(3) *pr15*のアリルを決定する要因の特定

植物ホルモン的一种であるジベレリンは老化を抑制する作用があり、老化の前後で活性型ジベレリンの量が減少することが報告されている。*OsTPS6*のプロモーター領域の塩基配列を比較したところ、ジベレリンのシグナル伝達に關与するDELLAタンパク質が結合する部位特異的配列(-148bp:GCGGモチーフ)に、カサラス型の*pr15*には一塩基多型(SNP)が存在し結合できないために転写が抑制されない。そのためカサラス型アリルでは相対的に*OsTPS6*の発現が高くなりT6P含量が増加し、下位葉の老化を抑え植物体の支持力を強くすると考えられた。*sd-1*によりジベレリン蓄積量が減少しDELLAタンパク質が蓄積することが知られている。*sd-1*を導入したNILでは*OsTPS6*の発現量が減少するが、*sd-1*と*pr15*を導入したNILでは*sd-1*単独のNILに比べて*TPS6*の発現は高かった。これらの結果から、-148bpに存在するSNPがアリルを決定する要因で有ることが示された。カサラスと同様のSNPを有すインディカイネNona Bokraの染色体断片部分置換系統の中から*pr15*の存在領域が置き換わった系統を選抜し耐倒伏性の評価を行ったところ、支持力はコントロールのコシヒカリの2倍になっていた。これらの結果から、GCGGモチーフに存在するSNPがアリルを決定する要因であること並びにSNPの有無により支持力の強さを予測することが可能であることが示された。

(4) NILによる有用性評価

コシヒカリの遺伝背景にカサラス由来の*pr15*を導入した準同質遺伝子系統(NIL*pr15*)では、下位部の支持力が1.7倍に増加し、耐性はコシヒカリの2.4倍に増加した。この値は、耐倒伏性が

強いとされる日本晴や短稈のキヌヒカリより倒れにくいということを示している。加えて近隣の農家に近似した条件（畝間30cm、株間18cm、機械植）で栽培したところ、コントロールのコシヒカリは、収穫前の長雨により大半が倒伏したが、NILでは倒伏は見られなかった（図3）。

対照のコシヒカリとNILを収穫後、玄米用の篩（1.9mm）を用いて上米比率を求めた。その結果、NILの上米比率は73.0%、コシヒカリでは62.9%となり有意に高い値であった。また、玄米篩目2.0mm 以上における上米比率が、コシヒカリ では25.4%であったが、NILでは43.9%であった。近年の傾向として、粒ぞろいの良い（粒の大きな）コメが選ばれる傾向がある。そのため耐倒伏性向上に加え1.9mm以上の上米比率を高めるpr15の有用性は高いと考えられた。

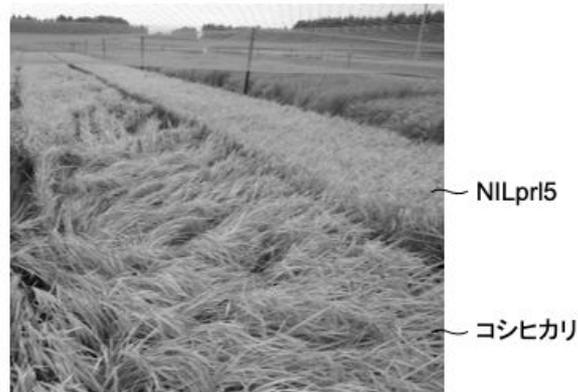


図3 NILpr15とコシヒカリ

研究期間を通じて、支持力がどのように決定されるのか、また本研究で見出した pr15 がそれによりにどのように関与しているのか明らかにできた。加えて pr15 の有用性を実証した。研究は予定通り進捗した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Inagaki Noritoshi, Asami Hidenori, Hirabayashi Hideyuki, Uchino Akira, Imaizumi Toshiyuki, Ishimaru Ken	4. 巻 12
2. 論文標題 A Rice Ancestral Genetic Resource Conferring Ideal Plant Shapes for Vegetative Growth and Weed Suppression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	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) 10.3389/fpls.2021.748531	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 Inagaki Noritoshi, Asami Hidenori, Hirabayashi Hideyuki, Uchino Akira, Imaizumi Toshiyuki, Ishimaru Ken	4. 巻 12
2. 論文標題 A Rice Ancestral Genetic Resource Conferring Ideal Plant Shapes for Vegetative Growth and Weed Suppression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	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) 10.3389/fpls.2021.748531	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 上田忠正、石丸 健、後藤明俊、一家崇志、近藤勝彦、松原一樹、林 武司、山本敏央、 田中淳一	4. 巻 -
2. 論文標題 日本のイネ品種を背景とした準同質遺伝子系統の比較栽培による収量関連 9 対立遺伝子の遺伝的効果	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 育種学研究	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) 10.1270/jsbbr.20J21	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 Ujiiie Kazuhiro, Ishimaru Ken, Hirotsu Naoki, Nagasaka Seiji, Miyakoshi Yuichi, Ota Masako, Tokida Takeshi, Sakai Hidemitsu, Usui Yasuhiro, Ono Keisuke, Kobayashi Kazuhiko, Nakano Hiroshi, Yoshinaga Satoshi, Kashiwagi Takayuki, Magoshi Jun	4. 巻 14
2. 論文標題 How elevated CO2 affects our nutrition in rice, and how we can deal with it	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0212840	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 Hirotsu Naoki, Ujiie Kazuhiro, Perera Ishara, Iri Ayano, Kashiwagi Takayuki, Ishimaru Ken	4. 巻 7
2. 論文標題 Partial loss-of-function of NAL1 alters canopy photosynthesis by changing the contribution of upper and lower canopy leaves in rice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-017-15886-5	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 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石丸健
2. 発表標題 イネの炭水化物蓄積能を決定する遺伝子座RG5の機能解明
3. 学会等名 日本作物学会第250回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石丸健、柏木孝幸、廣津直樹
2. 発表標題 遺伝学的解析手法を取り入れたイネの収量及び関連形質の制御機構の解明
3. 学会等名 日本作物学会第249回講演会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹永和真、氏家和広、森帆菜美、足立文彦、小林和広、石丸健
2. 発表標題 NIL-TGW6を用いた白未熟米発生機構の解析
3. 学会等名 日本作物学会第252回講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 耐倒伏性植物の作出方法	発明者 石丸健	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-203452	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------