

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580010

研究課題名（和文）環境保全型イネのゲノム育種に役立つ、酸性土壌ストレス耐性の遺伝子単離と機能解析

研究課題名（英文）Isolation and functional analysis of acid soil tolerance genes in rice, which are useful for genome based breeding of environmentally sustainable varieties.

研究代表者

清水 顕史（SHIMIZU AKIFUMI）

滋賀県立大学・環境科学部・准教授

研究者番号：40409082

研究成果の概要（和文）：

酸性土壌は世界の作物生産の限定要因になっており、元素の欠乏や過剰で引き起こされる。ストレス耐性品種の開発は、この問題土壌に対する低投入で環境保全型の解決となる。耐性品種のゲノム育種を目指し、プロトン過剰毒耐性やリン欠乏ストレス耐性など3種類の関連形質について染色体領域の探索および遺伝子単離を進めた。単離できた（候補）遺伝子については、耐性対立遺伝子のコシヒカリへの集積と効果を確かめることができた。

研究成果の概要（英文）：

Acid soils limit crop yields around the world due to nutrients deficiency and mineral toxicity. Improving acid soil tolerant rice is very promising for environmentally sustainable agriculture. Towards genome-based breeding for acid soil, chromosomal region search and/or gene isolation of three kinds of traits, which are related to proton toxicity and phosphorus deficiency, were conducted. Tolerant alleles of isolated genes were introgressed to major variety Koshihikari and their effects were observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：抵抗性・耐性 バイオレメディエーション

1. 研究開始当初の背景

イネはゲノム研究の進んだモデル作物で、様々な農業上の有用形質が既に単離されており、遺伝子研究を進めるための基盤も整っている。一方で、世界のイネ栽培の制限要因

になっている酸性ストレスに対する耐性遺伝子の研究は余り進んでおらず、遺伝子情報を利用した品種開発もされていない。そこで、これら土壌ストレスに対する耐性遺伝子の単離と機能解析を行うことで、低投入持続的

つまり環境保全的な問題解決のための品種開発に役立つ研究を目指した。

2. 研究の目的

世界の耕地面積の5割を占めるといわれる酸性土壌では、元素の欠乏および過剰ストレスが作物生産の制限要因となっている。これら不良土壌でも生育できる作物を育種できれば、低投入で持続的・環境保全的な問題解決に貢献できるだろう。

イネは酸性土壌適応性にすぐれたモデル作物で、ゲノム研究が進み遺伝子を単離するための様々な解析ツールが整備されている。本研究では、酸性土壌で主要なリン欠乏および低 pH ストレスに着目し、その耐性遺伝子の単離と機能解析および育種利用を目的とする。つまり、酸性土壌におけるイネの生育に影響を及ぼす形質としてまず、(1) 低 pH 溶液による根の伸長阻害に対する耐性形質、の関与する遺伝領域を調べた。また、酸性土壌ではリン栄養の欠乏がよくみられるため、

(2) リンの利用効率の向上に寄与する形質として低リン誘導性の下位葉葉身の酸性ホスファターゼ活性および、(3) 低リン条件下で誘導される根の伸長形質、に関与する遺伝子を調べた。また(2)と(3)については、染色体断片置換系統を利用した両遺伝子の集積効果を評価し、機能を推定することにした。

3. 研究の方法

以下の(1)~(3)の酸性土壌耐性関連形質について、単離した遺伝子の効果の確認や、ゲノム領域の検出を行った。

(1) 低 pH による根の伸長阻害耐性に関する遺伝子の解析。

強酸性条件でイネを栽培すると顕著な根の伸長阻害が見られ、pH3.6 水溶液で1週育てたイネの根長には、明瞭な品種間差が見られた。この形質について日本晴(耐性)と Kasalath(感受性)の交雑 F3 を用いた QTL 解析を行ったところ染色体2に寄与率26%の QTL が1つ検出できていた。

そこで、この QTL の効果を確認するため、日本晴/Kasalath//Kasalath の BC1F2 集団を用いて、感受性品種の遺伝的背景における耐性遺伝子の効果を QTL 解析することにした。耐性と感受性の形質を分離する BC1F2 集団について、すでに Kasalath に固定している染色体領域を除き、SSR マーカー遺伝子型を調べ飽和する連鎖地図を作製し、コンボジット・インターバルマッピングによる QTL 解析を行った。

(2) リン欠乏ストレス誘導性のホスファターゼ(APase)遺伝子のマッピング

リン欠乏誘導性の下位葉葉身 APase は植物

体内のリンの利用効率向上に寄与する可能性があり、日本晴(低 APase)と Kasalath(高 APase)の交雑 F2 集団を用いた QTL 解析を行ったところ、染色体8に QTL が検出された。この QTL の遺伝子の単離に向けて、コシヒカリ(低 APase)を遺伝的背景にもち Kasalath 染色体断片を置換した染色体断片置換系統群(CSSLs)をスクリーニングして、染色体8の QTL 領域が Kasalath に置換した系統が高 APase になることを確認する。その置換系統とコシヒカリとの交雑 F2 集団で置換領域をカバーする SSR マーカー遺伝子型を調べ、コンボジット・インターバルマッピングによる QTL マッピングを行った。

また、この形質は低リン誘導性であることから、低リンで誘導される発現遺伝子をマイクロアレイで探索し、候補遺伝子の絞り込みに使用した。絞り込んだ遺伝子について、T-DNA タギング系統を用いた遺伝子機能の解析も行った。

(3) リン欠乏ストレス誘導性の根伸長に関する遺伝子の単離と機能解明

この形質については既に染色体6長腕に遺伝子座のマッピングができており(Shimizu et al. 2008 TheorApplGenet117:987-)、Kasalath 対立遺伝子は(日本晴やコシヒカリ対立遺伝子に比べ)低リンにおける根の伸長形質を示すことが分かった。遺伝子単離に向けて選抜した自殖後代による詳細マッピングを行い、候補遺伝子の絞り込みを行った。絞り込んだ候補遺伝子について、遺伝子組換えイネを用いた相補性検定を行い、発現遺伝子解析によって遺伝子機能の推定を行った。

候補遺伝子の絞り込みができた(2)と(3)の Kasalath 対立遺伝子をそれぞれ染色体断片に含むコシヒカリ置換系統同士の交配 F2 集団を用いて QTL 解析を行い、両遺伝子の Kasalath への集積と相互作用を調査した。

4. 研究成果

(1) 低 pH 耐性の遺伝解析

用いた BC1F2 集団はゲノム領域の33%が Kasalath に固定していた。残りのゲノム領域は、計80座の SSR マーカーを使用すると平均インターバル20cMの13連鎖群でカバーでき、コンボジット・インターバルマッピングによる QTL 解析の結果、染色体11に寄与率38%の LOD ピークが検出できた(図1)。

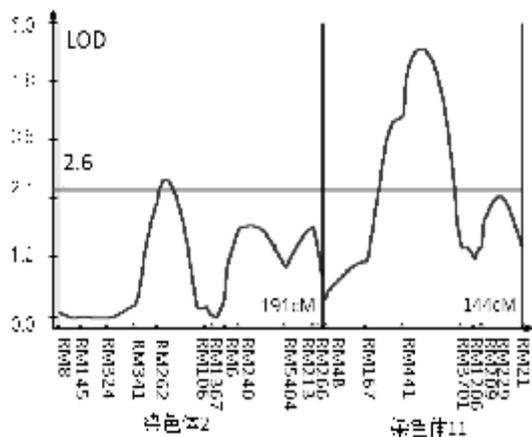


図1 低pH耐性のQTL解析結果(染色体2と11のみ抜粋)。横軸は、ジェノタイピングに用いたSSRマーカー名で、縦軸はLODスコア。

以前の研究でQTLが報告された染色体2の領域は、今回も同様の位置にピークがみられたが、染色体11のQTLの効果が高く上位性を示した。つまり、染色体11のQTL領域が日本晴(耐性)型の場合にのみ染色体2の遺伝子型の差が有意になった。このことから、低pHによる根の伸長阻害耐性は染色体11のQTLによってもたらされたもので、染色体2のQTLは根の伸長に関わる遺伝子であり耐性遺伝子存在下で根の伸長を促すことで耐性に見えてしまったのではないかと考えている。現在、検出された耐性遺伝子の単離に向けて、感受性背景下で耐性遺伝子を分離する交雑後代によるマッピングを進めている。

(2) 低リン誘導性の下位葉葉身ホスファターゼ(APase)遺伝子のマッピング

コシヒカリ(低APase)を遺伝的背景にもちKasalath(高APase)染色体断片を置換した染色体断片置換系統群(CSSLs)をスクリーニングした結果、染色体8がKasalathに置換した系統SL224は低リン条件下で下位葉葉身のAPase活性が高くなることがわかった。そこでSL224×コシヒカリのF2集団によるQTLマッピングを行ったところ、以前の報告と同じ領域にQTLが検出された。またマイクロアレイ解析の結果からこのQTL領域には、低リンで発現誘導される酸性ホスファターゼが存在していることがわかり、その発現量はAPase活性の高いKasalathが、活性の低い日本晴よりも1.84倍高いことが分かった。そこで、この酸性ホスファターゼのT-DNAアクチベーションタギング系統(Jeon et al. 2002 PlantPhysiol1130:1636-)を入手し、下位葉葉身のAPase活性を測定したところ、リン十分区ではタギング系統と野生型に活性の差はないが、リン欠乏区では活性が有意に高くなった(図2)。

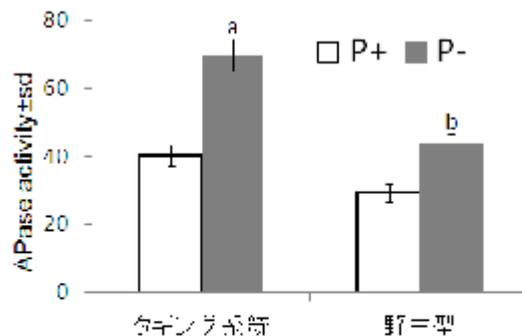


図2 染色体8APase遺伝子上流へのアクチベーションタギング系統と野生型のAPase活性の変化。リン欠乏区のみ系統間の活性に有意差がみられた($p < 0.05$)。

タギング系統は4縦列のエンハンサーが候補遺伝子の5' UTR上端位置に挿入されており、酸性ホスファターゼ活性の低リン誘導性が強化されることが分かった。現在、この結果について投稿論文を準備している。

(3) リン欠乏ストレス誘導性の根伸長に関する遺伝子の単離と機能解明

候補遺伝子は低リンで誘導される転写因子で、この遺伝子を過剰発現させた組換えイネは、リン欠乏およびリン十分のどちらで育成した場合でも、有意に根が長くなり相補性が確かめられた。またこの組換え体を用いてマイクロアレイ解析およびリアルタイムPCRによる発現解析を行うことで、幾つかの酸性ホスファターゼなどリン代謝に関わる遺伝子の発現が上昇することがわかった。この発現情報は特に低リン環境で著しく観察された。

(2)と(3)で単離された遺伝子は、それぞれKasalath対立遺伝子が耐性を示す。コシヒカリを遺伝的背景に持ち、それぞれのKasalath対立遺伝子を含む染色体断片を持つ置換系統を交配したF2集団のQTL解析を行ったところ、酸性ホスファターゼ活性および根の伸長形質ともに対応する領域にQTLが検出された。また低リン条件下で水耕栽培した5週間目の最上位完全展開葉のリン含量についてQTL解析をしたところ、単一の有意なQTLは検出されなかったが、両候補遺伝子座の相互作用は有意に高くなった。つまり、両耐性遺伝子のコシヒカリへの集積系統は、酸性土壌への適応能力を持つと考えられた。現在、このことを明らかにするため、準同質遺伝子系統化を進めている。

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）

- ①Ochiai K, Shimizu A., Okumoto Y, Fujiwara T, Matoh T. Suppression of a NAC-like transcription factor gene improves boron-toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Physiology*, 査読有, Vol.156, 2011, 1457-1463, DOI:10.1104/pp.110.171470
- ②Iehisa J.C.M., Shimizu A., Sato K., Nasuda S., Takumi S. Discovery of high-confidence SNPs from large-scale de novo analysis of leaf transcripts of *Aegilops tauschii*, a wild wheat progenitor, *DNA Research*, 査読有, Vol. 19, 2012, 487-497, DOI:10.1093/dnares/dss028

〔学会発表〕（計 2 件）

- ①片山敬仁、小川恵未、植川英明、清水顕史、長谷川博、落合久美子、間藤徹、リン欠乏ストレス下におけるイネ葉身中のリン再利用 2、日本育種学会、2010 年 9 月 24 日、秋田県立大学
- ②松本公佑、西村悠希、清水顕史、長谷川博、奥本裕、イネ根の Iron-plaque 非形成変異体を用いた、mPing 転移断片の塩基配列、日本育種学会、2010 年 9 月 24 日、秋田県立大学

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 顕史 (SHIMIZU AKIFUMI)
滋賀県立大学環境科学部・准教授
研究者番号：40409082