

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：82104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04440

研究課題名(和文)低リン条件下におけるリンの吸収と利用効率を高めたイネの創出

研究課題名(英文)Rice improvement for phosphorus (P) acquisition and utilization efficiency under low P condition

研究代表者

Wissuwa Matthias (Wissuwa, Matthias)

国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生産環境・畜産領域・主任研究員

研究者番号：90442722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、「リン欠乏耐性イネが如何にリンを吸収し効率よく利用しているか？」分子生物学・生化学的アプローチと育種利用・イネ創出につなげることを目的として研究を行った。リンの吸収に関しては、リン酸欠乏時イネの根系形成に關与するPstol1(プロテインキナーゼ)の標的タンパク質を検出するためリン酸化プロテオームを行った。リン利用効率に関しては、候補遺伝子をゲノム編集により調査し、メタボローム解析によりリン利用効率の高いイネ系統で高蓄積する代謝物を検出した。育種への応用として、リン利用効率の候補領域を持った準同質遺伝子系統株(BC5F2)を作成し、アフリカでの現地低リン圃場での調査を開始した。

研究成果の概要(英文)：Phosphorus (P) is an essential macronutrient for crop growth and because the phosphate rock used to produce P fertilizers is a nonrenewable resource, it is necessary to improve the P efficiency of crops. This project aimed to identify by which mechanisms and genes low P tolerant rice genotypes manage to acquire more P from a low-P soil.

The gene OsPstol1 is known to enhance root development under P-deficient condition. To identify a target protein for Pstol1 as a kinase, we identified several phosphopeptides. A second is phosphorous utilization efficiency (PUE) and we employed three strategies ; 1) identification of candidate genes and gene effects using a gene editing (CRISPR-Cas) approach, 2) metabolomic analysis to link certain metabolomic adaptation to P efficiency, and 3) the development of near isogenic precursor lines with OsPstol1 and high PUE loci. Lines of this population were sent to Africa as breeding material to be tested in farmer's fields.

研究分野：遺伝学 植物生理学

キーワード：育種学 ストレス 土壌学 リン酸化プロテオーム 国際農業貢献

## 1. 研究開始当初の背景

リン酸は、窒素、カリウムと並ぶ植物の必須三要素の一つで、その機能は他の栄養素では補うことができない。しかしながら、リン酸肥料の原料となるリン鉱石は非常に限られた資源であり、特に精製が容易な高品質のリン鉱石は枯渇しつつあることから、すでに2008年頃から肥料価格の高騰を引き起こしている。先進国における多投入型の農業ではリンがより高価な投入となり、アジア・アフリカにおける低投入型農業では施肥自体がより困難となる状況を招いている。作物生産を安定的に確保していくためには、低リン酸土壌においても高い生産性を確保できるイネ品種の開発が一つの有効なアプローチとなっている。

研究代表者らは、これまで低リン条件下におけるイネのリン吸収や利用効率についての研究に取り組み、根系の生育促進によりリン欠乏耐性を付与する遺伝子 (*Pstol1*) を世界で初めて明らかにした (Gamuyao, Wissuwa et al. Nature 2012)。しかし、育種をより最適化するためには、「プロテインキナーゼである *Pstol1* の下流標的タンパク質が何か？」という点について明らかにする必要がある。

また、申請者らは独自に開発した水耕栽培のスクリーニング方法により、リン利用効率の高いイネ系統を選抜し、ゲノムワイドアソシエーション解析 (GWAS) によりリン利用効率に関連するいくつかの遺伝子座 (第1, 4, 11, 12 染色体) を同定した (Wissuwa et al. Plos One 2016)

### <引用文献>

Gamuyao R, Chin JH, Pariasca-Tanaka J, Pesaresi P, Catausan S, Dalid C, Slamet-Loedin I, Tecson-Mendoza EM, Wissuwa M, Heuer S (2012) The protein kinase *Pstol1* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. Nature 488: 535-539

Wissuwa M, Kondo K, Fukuda T, Mori A, Rose MT, Pariasca-Tanaka J, Kretzschmar T, Haefele S, Rose TJ (2015) Unmasking novel loci for internal phosphorus utilization efficiency in rice germplasm through Genome-Wide Association Analysis. PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0124215

## 2. 研究の目的

申請者らはこれまでに低リン条件下でイネの根のリン吸収向上に関わる遺伝子 *Pstol1* (タンパク質リン酸化酵素) を発見し、その機能解析を行ってきた。本研究は、「リン欠乏耐性イネが如何にリンを吸収し効率

よく利用しているか？」分子生物学・植物生理学的アプローチによりその機能を解明し、それらの機能を低リン圃場において検証し、より効果的な育種利用・イネ創出につなげることを目的とした。

## 3. 研究の方法

上記の背景及びこれまでの成果をもとに、本研究では根からのリン吸収および地上部のリン利用効率に関してまだ解明されていない領域の基礎的研究を行い、リン吸収およびリン利用効率の高い品種を利用した分子育種へ応用可能な研究を行う。材料として、申請者が作製した準同質遺伝子系統や *Pstol1* を過剰発現した形質転換体植物、水耕栽培や低リン圃場で選抜したリン欠乏耐性系統を使用し、研究期間内に以下の内容について研究を行った。

### (1) 根における *Pstol1* のリン酸化シグナル伝達の解析

プロテインキナーゼである *Pstol1* は低リン条件の根の冠根で遺伝子発現量が増加し根を増加させる。*Pstol1* を介した根形成のシグナル制御系 (図1) を明らかにするために、リン酸化プロテオーム解析により *Pstol1* の標的タンパク質のスクリーニングを行う。材料として、低リン条件での *Pstol1* 準同質遺伝子系統株を使用し、冠根からタンパク質を抽出する。抽出したタンパク質を消化酵素 (Trypsin) で断片化したのちリン酸化ペプチドを濃縮し、タンパク質質量分析計 (LC MS/MS) によりリン酸化プロテインの解析を行う。低リン条件でのコントロール株との比較により、*Pstol1* の標的タンパク質の検索を行う。また、標的タンパク質のリン酸化部位の解析も同時に行う。

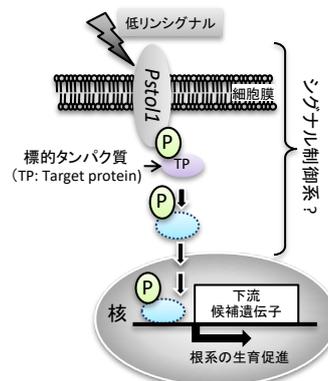


図.1 *Pstol1* のリン酸化を介したシグナル伝達系

### (2) 地上部のリン利用効率に関する新規遺伝子の同定

GWAS により選抜された候補染色体領域から、リン利用効率に関わる新規遺伝子の同定を行う。リン欠乏条件下で遺伝子発現応答する

遺伝子のスクリーニングを定量的PCRにより行う。スクリーニングで得られた候補遺伝子に関して、形質転換体による過剰発現体・RNAi ノックダウン株を作製し、リン利用効率に影響を及ぼすか調査する。

### (3) メタボローム解析による リン利用効率のメカニズムの解析

低リン条件で生育するイネは、様々な代謝変化により体内に取り込んだリンを有効利用することが知られている。また、申請者らは、高リン利用効率系統では低リン利用効率系統と比べて各葉位別のリン濃度が低いことが明らかにした。低リン条件で、高リン利用効率系統が、どのようにしてリンを効率良く利用し適応しているか明らかにするため、メタボローム解析による一次代謝産物やリンが多く含まれている主要構成要素（RNA、リン脂質、リン酸エステル、ribosomal RNA など）の網羅的解析を行う。

### (4) リン欠乏耐性を強化した イネ集積系統の作出

低リン圃場用の水稻の標準品種として IR64 背景の準同質遺伝子系統 (NILs) を作成する。低リン耐性を高めるために、低リン条件でイネの根を増加させリンの吸収を促進する IR64-*Pstol1* NIL と、リン利用効率(PUE)に関与する領域を持った準同質遺伝子系統を作製し、*Pstol1*-NIL との PUE-NIL の集積系統の作製を行う。

DNA マーカー選抜によりリン利用効率の候補領域を持った系統の選抜を行い、SSR マーカーを用いたラフマッピングにより準同質遺伝子系統の選抜を行う。それぞれの PUE-NIL と *Pstol1*-NIL やそれらの集積系統を用いて、低リン条件での水耕栽培試験やアフリカ地域の研究機関と共同して現地低リン圃場でのリン欠乏耐性を評価する。

## 4. 研究成果

### (1) *Pstol1* の標的タンパク質の検索

イネの根の形成に関与する *Pstol1* (プロテインキナーゼ) のシグナル制御系を明らかにするために、リン酸化プロテオーム解析により *Pstol1* の標的タンパク質のスクリーニングを行った。低リン条件下でのイネの冠根からタンパク質を抽出し、リン酸化ペプチドを濃縮しタンパク質量分析計 (LC MS/MS) により網羅的なリン酸化ペプチドの検出に成功した (表. 1)。1回の解析で 1000 個以上のリン酸化ペプチドを検出している事から、イネを用いた解析でも解析手法が先行しているシロイヌナズナと同様のリン酸化プロテオームの解析が可能であることが分かった。今後、これらの解析を繰り返し *Pstol1* のタ

ーゲットとなるリン酸化タンパク質の解析を行う。

	Phospho peptides		Peptides		pS	pT	pY	Phospho %
Rice	R40	1777	2451	1620	156	156	0	72.5%
root	R83	1128	1788	1044	82	82	1	63.1%

表. 1 リン酸化プロテオーム解析結果

### (2) リン利用効率に関わる候補遺伝子の同定

リン利用効率に関わる QTL が第 1 染色体から同定され、候補遺伝子を定量的 PCR 法により絞り込んだ。それぞれの候補遺伝子の遺伝子発現は、低リン条件下で up- または down-regulate されていた (図. 2)。候補遺伝子の機能解析を行うために、ノックダウン形質転換株 ( $T_3$ ) をゲノム編集 (CRISPR-Cas9) により作成し、リン利用効率との関連性を調査した。形質転換体を用いて水耕栽培でのリン利用効率を調査した結果、リン利用効率との関連性は認められなかった。しかしながら、*PUE1-9* 遺伝子の機能欠損株では、高リン条件下においてバイオマスの低下が確認された。*PUE1-9* 遺伝子は、高リン条件下で高い遺伝発現を示す事や、培養液のリン濃度に遺伝子応答している事、形質転換体の遺伝子欠損株で生育阻害を引き起こすことから、リンの細胞質中の恒常性 (homeostasis) に関与する事が示唆された。

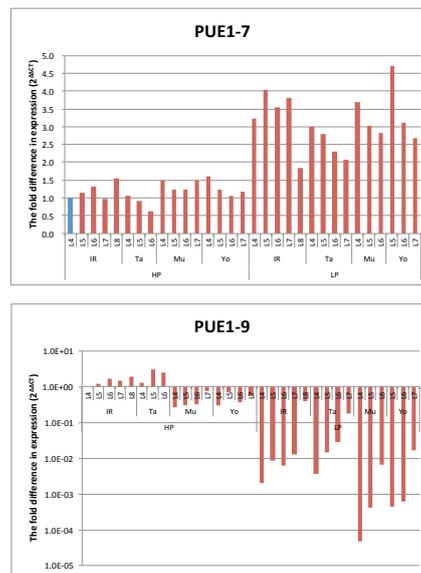


図. 2 高リン (HP) および低リン (LP) 条件下におけるリン利用効率候補遺伝子の遺伝子発現解析

### (3) メタボローム解析によるリンの利用効率 に関連するメカニズムの解析

リン利用効率の高い及び低いイネ系統それぞれ 2 系統の高リン及び低リン生育条件下における葉位別 96 サンプルについてメタボローム解析を行うことにより、イネのリン欠乏時の代謝物変化を明らかにした。葉位によって各代謝物の量及びリン欠乏応答パターンが異なることが示された。また、リン利用効

率と相関の高い代謝物やリン利用効率の高いイネ系統で高蓄積している代謝物を見出すことが出来た(図.3). 結果は審査付学術論文に投稿準備中である.

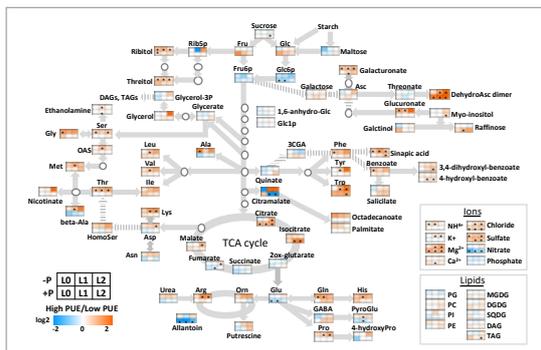


図.3 高リン利用効率および低リン利用効率イネ系統を用いたメタボローム解析

#### (4) リン欠乏耐性を強化したイネ集積システムの作出

##### ① イネの根を増加させリンの吸収を促進する IR64-*Pstol1* NIL の作出

低リン圃場用の水稻の標準品種とし IR64 背景での IR64-*Pstol1* NIL の作成を行った. IR64 と計5回の戻し交配とマーカー選抜による遺伝的背景の確認を行った.

IR64-*Pstol1* NIL を用いて, 低リン圃場や現地アフリカでの圃場試験を開始した. 現在のところ IR64-*Pstol1* NIL は, 低リン圃場での低リン耐性のパフォーマンスを示していない. これらのことから考えられるのは, *Pstol1* は Nipponbare 遺伝子型背景では作用するが, IR64 遺伝子型背景では作用しないことが考えられた. したがって, IR64 では *Pstol1* を介したシグナル伝達系のある部分が欠失している可能性が示唆されると同時に, その欠失している因子を明らかにすることにより *Pstol1* を介した新たな根形成のシグナル制御系の因子の発見が考えられた.

##### ② リン利用効率の候補領域を持った準同質遺伝子系統株の作出

2つの高リン利用効率系統を遺伝子供与体として, IR64 と計5回の戻し交配により, 背景が IR64 に置換したリン利用効率に関する準同質遺伝子系統 (IR64-*PUE1* NIL, IR64-*PUE11* NIL: BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>) をそれぞれ作製した. 現在, 水耕栽培の実験によりリン利用効率の確認を行っている.

今後の展開として, 低リン耐性に関する NIL 作成し, 現地アフリカ低リン圃場での評価による低リン耐性の表現型の確認を行うと同時に, 有望な NIL の系統に関しては, 集積系統を作成しより強固な低リン耐性のイネ育種系統の作出を行う.

#### 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)

① Heuer S, Gaxiola R, Schilling R, Herrera-Estrella L, Lopez-Arredondo D, Wissuwa M, Delhaize E, Rouached H 査読有り

Improving phosphorus use efficiency: a complex trait with emerging opportunities vol.17, 2016, 868-885 doi:10.1111/pbr.12052

[学会発表] (計 5 件)

Wissuwa Matthias, Improving phosphorus efficiency in rice: A breeding strategy targeting complementary efficiency mechanisms, Sustainable Phosphorus Management for Future Food, 2016  
Wissuwa Matthias, *Pup1* and beyond: Developing rice adapted to infertile soils in Africa, 20th EUCARPIA General Congress, 2016

Wissuwa Matthias, Improving phosphorus efficiency in rice: A strategy targeting complementary efficiency mechanisms, Argentine plant physiology meeting, 2016

Wissuwa Matthias, Exploring genetic diversity for nutrient efficiency traits through GWAS and 3K allele mining, The 14th symposium on rice functional genomics, 2016

近藤 勝彦, リン酸欠乏耐性イネ育種への試み (ラボからフィールドまで), 第2回植物の栄養研究会, 2016

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年:  
 国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:

取得年：  
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

Wissuwa Matthias (WISSUWA Matthia)  
国立研究開発法人 国際農林水産業研究センター・生産環境・畜産領域・主任研究員  
研究者番号：90442722

### (2) 研究分担者

近藤 勝彦 (KONDO Katsuhiko)  
国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生産環境・畜産領域・特別研究員  
研究者番号：60532702

石崎 琢磨 (ISHIZAKI Takuma)  
国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・熱帯・島嶼研究拠点・主任研究員  
研究者番号：30442718

梅澤 泰史 (UMEZAWA Taishi)  
東京農工大学・(連合) 農学研究科 (研究院)・准教授  
研究者番号：70342756

### (3) 研究協力者

峠 隆之 (TOHGE Takayuki)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授