

令和元年6月7日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07581

研究課題名(和文) 幼苗期稲の低温耐性遺伝子の解明

研究課題名(英文) Detection of the cold-tolerant genes for the rice seedlings

研究代表者

福田 あかり (FUKUDA, Akari)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・上級研究員

研究者番号：40355235

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、稲苗の低温耐性メカニズムの解明のため、低温耐性に関わる転写産物(RNA)の検出を目指した。低温耐性の弱いインド型稲品種ハバタキと、低温耐性の強い日本型稲品種Arroz da Terraの交配系統の中から、低温下での葉の葉緑素濃度を指標に、低温耐性系統群と、低温感受性系統群を選抜し、苗の転写産物発現量を比較した結果、耐性系統群において、既存のストレス応答遺伝子SPX1、GSTU50が高発現となっていることを明らかにした。また、これらの遺伝子が、多様な遺伝背景を持つ世界稲コアコレクションの系統内においても、その発現量と低温下の葉緑素濃度との間に正の相関を持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インド型稲は、大型の穂を持ち多収であるが、日本型稲に比べ生育初期の低温耐性が低いという欠点がある。稲の低温耐性を高めるため、耐性に関わる遺伝子の同定が求められているが、低温耐性には複数の遺伝子が複雑に関わっており、従来の遺伝子解析法であるQTL解析法では、解明が困難であった。本研究では、稲苗の転写産物に注目し、その網羅解析を行うことで、低温耐性の高い稲系統で高発現となっている転写産物を初めて明らかにした。この知見を用いて、低温耐性の高い稲の育種、低温耐性の生理メカニズムの解明に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：The transcripts affecting the cold tolerance for the rice seedlings were identified using RNA sequencing data of the inbred lines derived from a cross between a cold-sensitive indica cultivar, Habataki, and a cold-tolerant japonica cultivar, Arroz da Terra. The cold-tolerant bulk and the cold-sensitive bulk were selected by the chlorophyll content under low temperatures among the inbred lines. The differential expression analysis between the cold-tolerant bulk and the cold-sensitive bulk revealed that SPX1 gene, controlling cold tolerance, and a glutathios S-transferase gene, GSTU50, known to response to the stress, were highly expressed in the cold-tolerant lines. Furthermore, quantitative real-time PCR showed that SPX1 and GSTU50 expression were positively correlated with chlorophyll content under low temperature even in the world rice core collections that had various genetic background.

研究分野：作物学、植物生理学

キーワード：植物 生理学 ストレス トランスクリプトーム イネ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インド型稲は大型の穂を持ち、多収の稲育種の交配材料として期待されている。しかし、熱帯地方を起源とするインド型稲は、一般に日本型稲に比べ生育初期の低温耐性が低く、低温により葉が黄化する低温クロロシスと呼ばれる傷害や、苗の生育不良などの問題が起こっている。稲の低温耐性を高めるため、耐性に関わる遺伝子の同定が求められているが、低温耐性には弱い作用力を持つ複数の遺伝子座が関わるということが明らかとなってきた (Fukuda et al., 2015)。作用力の小さい多数の遺伝子座を同定することは、従来の QTL 解析法のみでは困難であり、低温耐性メカニズムの全容解明は進めづらなものとなっていた。QTL 解析に代わる方法として、形質に直接作用する転写産物 (RNA) を網羅的に調査する、トランスクリプトーム解析がある (Fukuda et al., 2018)。本研究においては、トランスクリプトーム解析法を用い、低温条件下で、低温耐性の高い稲系統でのみ特徴的に発現する転写産物を検出し、耐性をもたらす転写産物の同定を目指す。

### 2. 研究の目的

低温に感受性のインド型稲品種ハバタキと、低温に耐性を持つ日本型稲品種 Arroz da Terra の交配後代の中から、低温耐性の強い系統と弱い系統を選抜し、トランスクリプトーム解析に用いる。それぞれの系統について、低温条件下、および温暖条件下での転写産物の発現量を次世代シーケンサーを用いて網羅的に調査し、低温条件下において、低温耐性の強い系統でのみ特徴的に発現する転写産物を検出する。検出した転写産物について、既存の低温耐性遺伝子との比較を行う。また、トランスクリプトーム解析に用いたハバタキ × Arroz da Terra 系統以外の幅広い稲系統内で、候補転写産物の発現量と低温耐性の強弱との関連について調査し、その生理特性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1)ハバタキ/Arroz 交配 F<sub>5</sub> 系統を用いての RNA 網羅解析

インド型稲品種ハバタキと、日本型稲品種 Arroz da Terra の交配 F<sub>2</sub> 系統 1124 個体について、セルトレイ上に播種し、30 下で出芽させた後、12 時間明暗・18 日の低温条件のグロースチャンパー内で生育させた。第 3 葉期の苗について、第 3 葉葉身の葉緑素濃度 (SPAD 値) を葉緑素計 (コニカミノルタ社) を用い、1 個体の葉身について 3 点を測定し、その平均値として求めた。F<sub>2</sub> 世代の中から、葉緑素濃度の高い低温耐性系統、葉緑素濃度の低い低温感受性系統をそれぞれ 10 系統ずつ選抜した。さらに、自殖後代の F<sub>3</sub>、F<sub>4</sub> 世代について、耐性あるいは感受性個体をそれぞれ系統中から 1 個体ずつ選抜して継代し、F<sub>5</sub> 世代の系統群について、転写産物 (RNA) の採取に用いた。親品種のハバタキ、Arroz da Terra、F<sub>5</sub> 耐性系統群、F<sub>5</sub> 感受性系統群について 18 日の低温条件下で出芽後 3 週間、もしくは 25 日の温暖条件下で出芽後 2 週間、グロースチャンパー内で第 3 葉が展開するまで生育させた。1 系統あたり 3 個体から、第 3 葉を採取して液体窒素中で粉碎し、RNeasy mini Kit (Qiagen 社) を用いて RNA を抽出した。低温耐性系統群・感受性系統群については、それぞれ 10 系統の RNA を等量ずつ混合してバルク RNA とし、RNA 網羅解析に用いた。次世代シーケンサーによる RNA 網羅解析 (RNA-seq 解析) は、クロックミクス社への委託解析にて行った (<https://www.clockmics.com/>)。イネ系統の生育と RNA の採取、RNA-seq 解析は 4 反復で行い、遺伝子発現量 (RPKM 値) を CLC Genomics Workbench (CLC Bio 社) を用いて算出し、低温条件下と温暖条件下、および耐性系統と感受性系統間で発現量の異なる遺伝子の検出を行った (absolute fold-change value > 2、FDR < 0.05)。

#### (2)耐性候補遺伝子のリアルタイム定量 PCR 法による発現量検定

低温耐性系統群において低温条件下で感受性系統群に比べ高発現の遺伝子の内、葉緑素分解に関わる既存遺伝子 *DOS* (RAPDB-ID: Os01g0192000) (Kong et al., 2006)、低温耐性に関わる既存遺伝子 *SPX1* (RAPDB-ID: Os06g0603600) (Wang et al., 2013)、ストレス応答に関わる既存遺伝子 *GSTU50* (RAPDB-ID: Os10g0530900) (Jain et al., 2010) について、リアルタイム定量 PCR 法により、RNA 網羅解析に用いた以外の系統について、その発現量を調査した。ハバタキ/Arroz da Terra F<sub>2</sub> 世代 91 個体、および世界稲コアコレクション (Kojima et al., 2005) 内の稲 50 系統について、18 あるいは 25 条件のグロースチャンパー内で前述と同様の方法で生育させ、第 3 葉葉身から RNA を抽出した。逆転写反応を PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ社) を用いて行い、Thermal Cycler Dice Real Time System III および TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ社) により、リアルタイム定量 PCR 解析を行った。各遺伝子の発現量は、イネデータベース RAP-DB (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html>) に登録された遺伝子配列をもとにリアルタイム定量 PCR 用プライマーを設計し、ユビキチン遺伝子 (RAP-DB ID: Os06g0681400) の発現量を内部指標として、相対定量値として算出した。

### 4. 研究成果

#### (1)低温・高温条件間で発現量差のある遺伝子

18 下での第 3 葉葉緑素濃度 (SPAD 値) の平均は、親品種の Arroz da Terra は 34.4、ハバタキは 13.9、F<sub>5</sub> 耐性系統群は 30.9、F<sub>5</sub> 感受性系統群は 10.5 であり、耐性系統と感受性系統間で大

きな差が見られた(図1)。いっぽう 25 °C の温暖条件下での葉緑素濃度の平均は、Arroz da Terra は 36.6、ハバタキは 39.2、F<sub>5</sub> 耐性系統群は 37.3、F<sub>5</sub> 感受性系統群は 33.9 でありすべての系統で 30 以上の高い値を示した。RNA 網羅解析の結果、Arroz da Terra、ハバタキ、F<sub>5</sub> 耐性系統、F<sub>5</sub> 感受性系統すべての系統で 25 °C 下に比べ、18 °C の低温下で発現量が高い遺伝子が 219 個検出され(表1) それらの中には、葉緑体に移行するタンパク質の遺伝子が 9 個含まれていた(表2)。このことから、低温クロロシスを起こし葉緑素濃度が低下した系統でも、葉緑体内で働くタンパク質をコードする遺伝子の一部は発現していることが明らかになった。すべての系統で共通して、25 °C 下に比べ 18 °C 下で発現量の低い遺伝子は、145 個検出されたが、これらの中に葉緑体タンパク質遺伝子は含まれなかった。また、葉緑素の分解・老化に関わる既存遺伝子 *NYC1*(Non-Yellow coloring 1, RAPDB-ID: Os01g0227100)(<sup>7</sup>Kusaba et al., 2007)、幼苗の葉緑体の発達に関わる遺伝子 *GRY79* (green-revertible yellow 79, RAPDB-ID: Os02g0539600)(<sup>8</sup>Wan et al., 2015)が、すべての系統で 25 °C 下に比べ 18 °C の低温下で発現量が高くなっていることが明らかとなった(図2)。このことから、低温下の葉身では、葉緑体の分解、合成に関わる双方の遺伝子の発現が活発になっている可能性が考えられた。

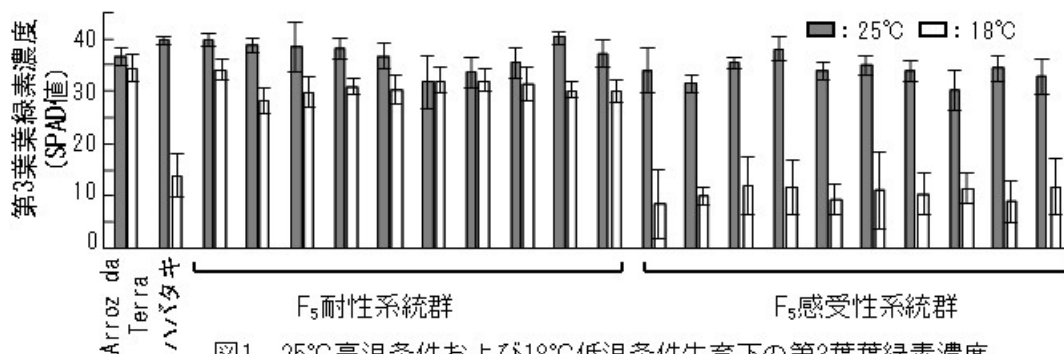


図1. 25°C高温条件および18°C低温条件生育下の第3葉葉緑素濃度 各系統12個体の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

表1. 25°C生育下と18°C生育下で 発現量差のある遺伝子数

	18°C下		合計
	高発現	低発現	
Arroz da Terra	1191	1115	2306
ハバタキ	1385	900	2285
F <sub>5</sub> 耐性系統	840	641	1481
F <sub>5</sub> 感受性系統	2241	1549	3790
全系統で共通	219	145	364

表2. 18°C下高発現共通遺伝子中 葉緑体タンパク質遺伝子

遺伝子ID	概要
Os09g0439500	Similar to Type II chlorophyll a/b binding protein
Os02g0192700	Similar to Thioredoxin peroxidase.
Os03g0184000	Similar to Phytoene desaturase
Os06g0196300	Similar to Peroxiredoxin Q
Os10g0533100	Similar to ABC-type Co <sup>2+</sup> transport system, permease component
Os01g0676200	Conserved hypothetical protein.
Os01g0889800	SULFURTRANSFERASE 13, Rhodanese-like domain containing protein
Os06g0699500	Tautomerase domain containing protein.
Os07g0534000	Similar to permeases of the major facilitator superfamily.

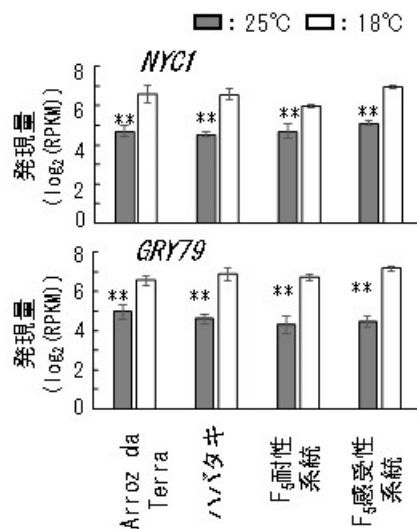


図2. 18°C下高発現共通遺伝子中 葉緑体の分解/合成関連遺伝子発現量 カラムは各系統の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。\*\*は温度条件間で有意差を持つ (FDR<0.01)。

## (2)低温条件下で耐性系統・感受性系統間で発現量差のある遺伝子

親品種の Arroz da Terra とハバタキの間で、発現量差のある遺伝子数は、18 °C 下で 2743 個、25 °C 下で 2673 個であった(表3)。F<sub>5</sub> 耐性系統群・感受性系統群間で発現量に差のある遺伝子は、18 °C 下で 1931 個、25 °C 下で 189 個であり低温下で多く、低温条件下では、耐性・感受性系統間での転写反応が大きく異なっていると考えられた。親品種間、F<sub>5</sub> 耐性・感受性系統間の両方で、低温下で感受性系統に比べ、耐性系統で高発現となった遺伝子が 304 個検出され、それらの中に葉緑体タンパク質の遺伝子が 6 個含まれていた(表4)。これらの葉緑体タンパク質のうち 4 つは、炭素固定やデンプン・糖脂質の合成に関わるものであり、耐性系統でのみ、低温

下でも光合成による炭素固定とそれにつづく糖類の合成がさかんに起こっていることが予想された。また、低温下で感受性系統に比べ耐性系統で高発現となっている遺伝子内には、葉の老化を抑制し葉緑素の分解を防ぐ既存遺伝子 *DOS* (Delay of The Onset of Senescence, RAPDB-ID: Os01g0192000) (<sup>3</sup>Kong et al., 2006)や、植物体内のリン濃度の恒常性調節の他、低温耐性にも関わる既存遺伝子 *SPX1* (RAPDB-ID: Os06g0603600) (<sup>4</sup>Wang et al., 2013)、ストレス反応に関わることが知られる遺伝子 *GST*(Gluthathios S-transferase)の1種 *GSTU50* (RAPDB-ID: Os10g0530900) (<sup>5</sup>Jain et al., 2010)が含まれた(図3)。

表3. 低温耐性・感受性系統間で発現量差のある遺伝子数

	25℃下			18℃下		
	耐性系統 高発現	耐性系統 低発現	合計	耐性系統 高発現	耐性系統 低発現	合計
Arroz da Terra vs ハバタキ (a)	1677	996	2673	1549	1194	2743
F <sub>2</sub> 耐性系統 vs F <sub>2</sub> 感受性系統 (b)	96	93	189	906	1025	1931
ab共通	49	27	76	304	332	636

表4. 18℃下で耐性系統で高発現遺伝子中葉緑体タンパク質遺伝子

遺伝子ID	概要
Os11g0204600	Glucose-1-phosphate adenyltransferase large subunit
Os06g0160700	Soluble starch synthase 1
Os08g0299400	Probable monogalactosyldiacylglycerol synthase 2
Os12g0292400	Ribulose biphosphate carboxylase small chain
Os02g0828200	-
Os01g0128800	-

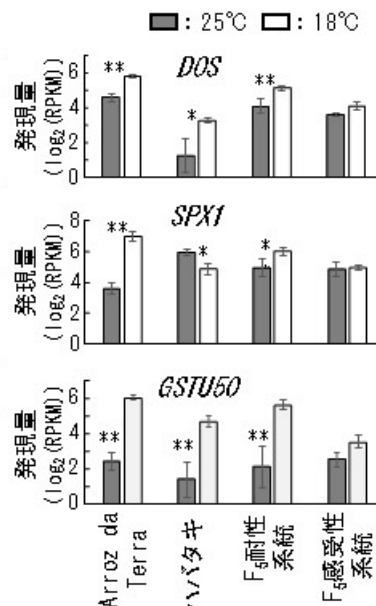


図3. 18℃下耐性系統で高発現遺伝子中葉緑体老化、ストレス耐性関連遺伝子発現量カラムは各系統の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。\*,\*\*は温度条件間で有意差を持つ(FDR<0.05,FDR<0.01)。

### (3)ハバタキ×Arroz da Terra F<sub>2</sub>系統の低温耐性候補遺伝子の発現量と葉緑素濃度

低温耐性系統において高発現であった葉緑素分解抑制遺伝子 *DOS*、低温耐性・ストレス耐性関連遺伝子 *SPX1*、*GSTU50* について、RNA 網羅解析に用いた系統とは別系統について、リアルタイム定量PCR法により、その発現量と低温耐性程度に関連があるか、調査を行った。18℃の低温条件下で栽培したハバタキ×Arroz da Terra F<sub>2</sub>世代91個体について、第3葉葉緑素濃度と葉身中の各遺伝子の発現量について測定を行った。結果、F<sub>2</sub>系統の18℃下第3葉葉緑素濃度(SPAD値)は、0から30まで広く分布した(図4)。各遺伝子の発現量と葉緑素濃度の相関を調査した結果、*DOS* については、低温下葉緑素濃度とその発現量に有意な相関はみられず、*DOS* の発現量が葉緑素濃度に与える影響は小さいものと予想された。一方、*SPX1*、*GSTU50* の第3葉葉身中の発現量と、葉緑素濃度との間には、有意な正の相関があり、これらのストレス耐性に関連する遺伝子が、低温下の葉緑素濃度に影響している可能性が考えられた。

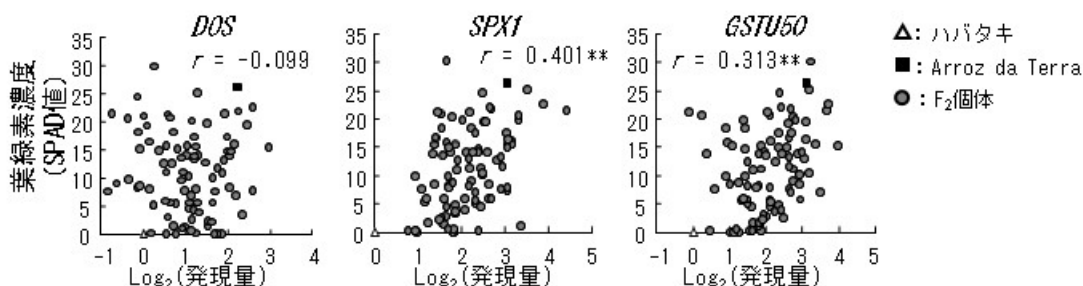


図4. 18℃栽培条件下でのF<sub>2</sub>系統のリアルタイム定量PCRによる遺伝子発現量と第3葉葉緑素濃度の関係 \*\*は1%水準で有意な相関を持つ。

#### (4)世界稲コアコレクション系統の低温耐性候補遺伝子の発現量と葉緑素濃度

低温耐性・ストレス耐性関連遺伝子 *SPX1*、*GSTU50* について、ハバタキ/Arroz da Terra の交配系統以外の系統でも、低温下の葉緑素濃度とその発現量に関連が見られるか、世界稲コアコレクション (Kojima et al., 2005) 内の稲 50 系統を用い (図 5) 調査を行った。25 °C 下で栽培したコアコレクション系統の第 3 葉葉緑素濃度 (SPAD 値) は、21.7 から 34.1 の間に分布した。一方、18 °C 下で栽培したコアコレクション系統の第 3 葉葉緑素濃度は、0.1 から 33.8 の間に分布し、系統により大きな差が生じた。また、稲コアコレクション 50 系統内において、25 °C 下と 18 °C 下の葉緑素濃度に相関は見られなかった。低温耐性・ストレス耐性関連遺伝子 *SPX1*、*GSTU50* の第 3 葉葉身発現量と葉緑素濃度の相関を見ると、25 °C 下では、負の相関が見られたが、18 °C 下では、有意な正の相関が見られた (図 6)。このことから、*SPX1*、*GSTU50* の発現量が、稲コアコレクションのような多様な系統の中でも、低温下での耐性の強さに影響している可能性が考えられた。

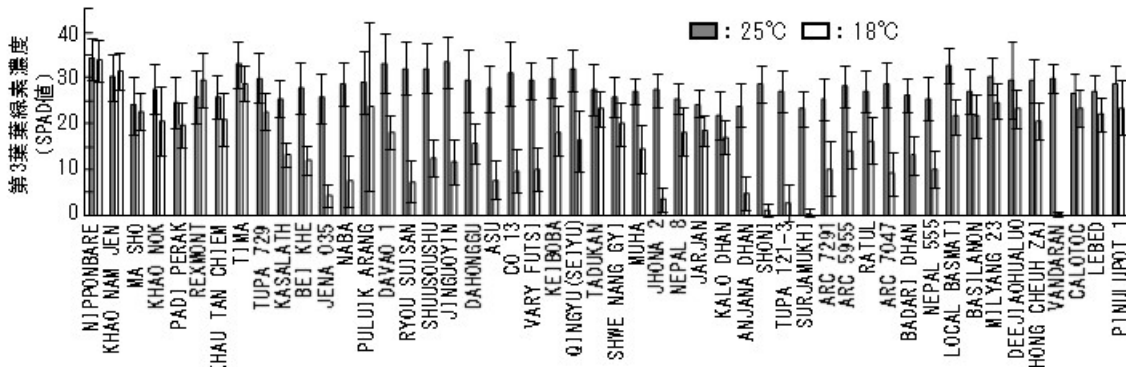


図5. 25°C高温条件および18°C低温条件生育下の世界イネコアコレクション系統の第3葉葉緑素濃度 各系統15個体の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

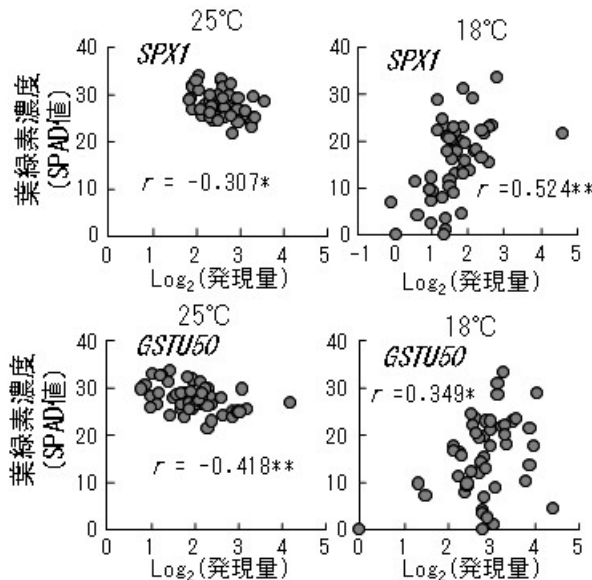


図6. 25°Cおよび18°C栽培条件下での世界稲コアコレクション系統のリアルタイム定量PCRによる遺伝子発現量と第3葉葉緑素濃度の関係 発現量は3反復の平均値を示す。\*、\*\*はそれぞれ5%、1%水準で有意な相関を持つ。

#### (5)総合考察

低温耐性の弱いハバタキと、低温耐性の強い Arroz da Terra の F<sub>5</sub> 系統を用いての RNA 網羅解析の結果から、低温条件下では、耐性系統と感受性系統間での発現遺伝子が大きく異なっていることが予想された (表 3)。さらに、既存の低温耐性遺伝子 *SPX1*、ストレス応答にかかわると考えられている Glutathios S-transferase の 1 種 *GSTU50* が、低温耐性系統において、低温下で高発現となっており、また、これらの遺伝子発現量は、ハバタキ/Arroz da Terra F<sub>2</sub> 系統、さらに、多様な遺伝背景を持つ稲コアコレクション系統内でも、低温下葉緑素濃度と有意な正の相関があることが明らかとなった (図 4、図 6)。*SPX1* および一部の *GST* の発現量は、低温下での稲苗の生育速度に影響することが報告されているが (Wang et al., 2013; Takesawa et al., 2002) 本研究の結果から、低温下での葉緑素濃度についても、これらの遺伝子が関わっている可能性が考えられる。

今回の研究においては、展開した第3葉を用いてRNA網羅解析を行い、低温下葉緑素濃度と発現量に相関を持つ遺伝子を検出することができた。一方で、クロロシスの原因となる既存遺伝子の一部は、未抽出葉において高発現することが知られており（<sup>10</sup>Kusumi and Iba 2014）、今回検出された遺伝子についても、未抽出葉等、生育ステージを変えての詳細な発現量調査が今後必要である。

#### <引用文献>

- <sup>1</sup> Fukuda et al. (2015) Plant Production Science 18: 128-136.
- <sup>2</sup> Fukuda et al. (2018) Frontiers in Plant Science 9: 1880.
- <sup>3</sup> Kong et al. (2006) Plant Physiology 141: 1376-1388.
- <sup>4</sup> Wang et al. (2013) PLOS ONE 8: e81849.
- <sup>5</sup> Jain et al. (2010) BMC Genomics 11: 73.
- <sup>6</sup> Kojima et al. (2005) Breeding Science 55: 431-440.
- <sup>7</sup> Kusaba et al. (2007) Plant Cell 19: 1362-1375.
- <sup>8</sup> Wan et al. (2015) Plant Cell Rep. 34: 1353-1363.
- <sup>9</sup> Takesawa et al. (2002) Molecular Breeding. 9: 93-101.
- <sup>10</sup> Kusumi and Iba (2014) Frontiers in Plant Science 5: 386.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2件)

福田 あかり、インド型稲と日本型稲の交配後代系統苗を用いた低温下葉身転写産物の網羅解析、日本作物学会第247回講演会要旨集、p83、2019

福田 あかり、山川 博幹、幼苗期イネの低温下葉緑素濃度の QTL-seq 解析、育種学研究、第20巻(別冊2号)、p34、2018

#### 6. 研究組織

##### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

##### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。