

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08164

研究課題名(和文) 穂発芽耐性遺伝子の単離と機能解明によるイネの環境適応力強化

研究課題名(英文) Molecular cloning and characterization of pre-harvest sprouting resistance genes for enhancement of environmental adaptability

研究代表者

星野 友紀 (HOSHINO, TOMOKI)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：20530174

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)：穂発芽耐性は、複雑な分子メカニズムによって制御されると考えられるが、その全体像は不明である。ファインマッピングより、qSdr6a候補領域内に遺伝子は存在しなかったことから、qSdr6aは近傍の遺伝子発現を調節する、という仮説を立てた。遺伝子発現解析より、qSdr6aの候補遺伝子としてGeneXとGeneYが同定された。新規に作出した突然変異集団から単離したgenexと geney突然変異体は、それぞれ強い発芽抑制と発芽促進を示した。以上の結果より、qSdr6aは遺伝子の発現調節領域であり、GeneXとGeneYを、それぞれ負と正に発現制御することによって、穂発芽耐性を誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、「人間活動の発展」を最終目標に掲げ、「環境調和」からさらに一步踏み込み、本来、植物自身が環境変動から身を守るために有する機能を強化させる、つまり人為的に「環境適応力を強化させる」ために、特に穀物の「穂発芽耐性能力」に焦点をあて、「穂発芽耐性」の分子基盤を構築することによって、人間活動を支えるエネルギー源の確保を試みた。さらに、「穂発芽耐性」を付与させることは、穀物の品質劣化を食い止め、穀物の品質向上につながることを期待される。本研究成果は、穀物に「穂発芽耐性=環境適応力」を付与させることが可能となり、環境変動にも動じない、きめ細やかな穀物の品質向上が可能になるであろう。

研究成果の概要(英文)：Pre-harvest sprouting (PHS) is a phenomenon wherein seeds germinate prematurely during the process of ripening due to high temperature and humidity. PHS resistance is believed to be regulated via a complex molecular mechanism; nevertheless, its overall functioning remains unclear. Given that fine mapping could not detect any genes within the qSdr6a region, we hypothesized that qSdr6a regulates the expression of genes in its vicinity. Gene expression analyses of developing embryos identified GeneX and GeneY as candidate genes for qSdr6a. The genex and geney mutants isolated from the newly created mutant populations exhibited strong inhibitory and promotional effects, respectively, on germination. These results suggest that qSdr6a may be a gene expression regulatory domain. It may induce PHS resistance in rice by negatively and positively regulating the expressions of the GeneX and GeneY, respectively.

研究分野：作物育種学

キーワード：穂発芽 イネ QTL ファインマッピング 遺伝子 発現解析 突然変異体 TILLING

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、持続的な「人間活動の発展」は、「人間活動と自然環境の調和」、すなわち、「自然環境の維持」だけでは困難であると考えている。昨今、世界や日本国内で引き起こされる地球温暖化や異常気象は、まさに、「人間活動と自然環境の調和」の限界を超えている証拠であるといえよう。本研究では、「人間活動の発展」を最終目標に掲げ、「環境調和」からさらに一歩踏み込み、本来、植物自身が環境変動から身を守るために有する機能を強化させる、つまり人為的に「環境適応力を強化させる」ために、特に穀物の「穂発芽耐性能力」に焦点をあて、「穂発芽耐性」の分子基盤を構築することによって、人間活動を支えるエネルギー源の確保を試みる。

昨今、全世界的な問題となっている地球温暖化は、人間活動のみならず、農作物の栽培環境にも重大な悪影響を及ぼしている。人間活動の貴重なエネルギー源となる米は、本来、稔った種子が誤って冬の間に発芽してしまわないように、発芽を止める（穂発芽耐性の）仕組みを持っている。しかしながら、近年の地球温暖化による高温多湿条件では、収穫前に発芽してしまうことで種子の品質が下がってしまう「穂発芽」という現象により、米の品質低下が大きな問題となっている。日本で広く栽培されている「コシヒカリ」は、比較的「穂発芽」しにくい品種だが、我々が予想できない地球温暖化の影響により、近い将来「コシヒカリ」にも「穂発芽耐性」を付与させることが必要になると考えている。さらに、「穂発芽」が深刻な経済問題となっている穀物に、コムギがある。平成21年の国内のコムギ生産高は、前年比で23%も減少したが、その要因として長雨による穂発芽の多発があげられている（平成21年度農林水産統計）。以上のように、米やコムギなどの穀物に「穂発芽耐性＝環境適応力」を付与させることは、人間活動を支えるエネルギー源の確保につながり、「人間活動の発展」に、十分な貢献が期待できると考えている。

さらに、「穂発芽耐性」を付与させることは、穀物の品質劣化を食い止め、穀物の品質向上につながることを期待される。環太平洋戦略経済連携協定（TPP）の導入により、日本経済を下支えする国内の穀物生産の維持は、今後、非常に困難が予想される。そのような中、我々は、日本の穀物生産の生き残る策として、海外のような大規模栽培や大量加工による大量流通のモノマネでは通用せず、日本にしかできない、新たな対抗策が必要であると考えている。この解決策の1つとして、我々は、穀物に「穂発芽耐性＝環境適応力」を付与させることにより、環境変動にも動じない、きめ細やかな穀物の品質向上が可能であると考えている。

2. 研究の目的

人為的に、穀物の「穂発芽耐性」を制御するには、イレギュラーな環境下においても発芽を止めるための「穂発芽耐性」メカニズムを分子レベルで解明する必要がある。「穂発芽」を司る遺伝子群を特定することによって、「穂発芽耐性」を強くするための変異アレルを品種改良の道具として用いることが可能となる。これまでに、モデル植物のシロイヌナズナにおいて、穂発芽をネガティブに制御する「*Delay Of Germination 1 (DOG1)*」遺伝子¹⁾の存在が明らかとなっている。我々は、イネを対象に穂発芽耐性が強い品種「ハバタキ」と弱い品種「ササニシキ」を用いた量的遺伝子座（QTL）解析によって、シロイヌナズナの *DOG1* と相同性がある「*OsDOG1-like 1*」遺伝子の単離に成功している。また、我々は、穂発芽耐性が強い品種「カサラス」と弱い品種「日本晴」を用いた QTL 解析から、イネ特異的に穂発芽耐性を制御する「*Seed Dormancy 4*」や「*Seed Dormancy 1*」遺伝子の存在を見出している²⁾。これらの研究より、「穂発芽耐性」は、既知の植物ホルモンのみならず、多くの遺伝子が複雑に関与する分子メカニズムによって制御されていることが明らかになってきており、その全貌の解明には、さらなる詳細な研究が必要であると考えられる。本研究では、劇的な環境変動においても人間活動の持続的な発展を最終目標に掲げ、「穂発芽耐性」付与による穀物の安定的生産と品質向上を実現するための、「穂発芽耐性」メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、穂発芽耐性能力が高い品種「ノナボクラ」が保有する3つの「穂発芽耐性」遺伝子座の中でも、最も効果が大きい「*Seed Dormancy 6 (qSdr6)*」³⁾に注目して研究を展開した。我々のこれまでの解析によって、「*qSdr6*」はイネ第1染色体の短腕に位置し（図1）、比較的近い位置に2つの「穂発芽耐性」遺伝子 *qSdr6* と *qSdr6b* が存在することを見出している。本研究では、*qSdr6a* を標的に、責任遺伝子の同定を試みた。

コシヒカリを遺伝背景とし、第1染色体の短腕のみノナボクラの染色体に置き換わった準同質置換系統群を対象として、予備的に行ったラフマッピングより、*Sdr6a* の候補となる染色体領域を270 kb まで絞り込むことに成功していた。本研究では、この候補領域270 kb の間で組換えを有する26系統群を用いて、系統群の遺伝子型調査を行い、270 kb のどこで組換えが起こっているかを特定した。遺伝子型の解析と同時に、圃場で栽培した26系統と、基準となるコシヒカリの穂発芽調査を行った。具体的には、系統ごとの出穂日を調査し、出穂日から8週後の穂を30℃でインキュベートし、24時間おきの発芽率を調査する。系統ごとの遺伝子型と発芽率の結果をもとに、染色体物理地図を作成し、ノナボクラの「穂発芽耐性」遺伝子座の候補領域を狭め *Sdr6a* を特定し、遺伝子内の多型を用いて DNA マーカーを作成した。

さらに、遺伝子発現解析のために、出穂3から10週後に吸水させた種子の胚から抽出した RNA を用いて、qRT-PCR 法により遺伝子の発現量を定量した。コシヒカリあるいはつや姫を対象に各

種変異原処理を行った突然変異 M₂ 集団約 15,000 系統⁴⁾から、TILLING 法⁴⁾を用いて候補遺伝子の突然変異体を探査し、得られた M₃ 系統を圃場で栽培して、出穂 6~9 週後に発芽試験を行った

4. 研究成果

Sdr6a 組換え系統の表現型と遺伝子型の調査より、*qSdr6a* は最終的に 1,385 bp まで絞り込まれた (図 1)。この候補領域内に予測される遺伝子が確認できなかったことから、候補領域内における多型が近傍の遺伝子発現を制御している可能性が考えられた。そこで、候補領域の近傍に位置する 5 つの遺伝子について発現解析を行った結果、出穂 3 週後における *GeneX* と *GeneY* の発現量が、コシヒカリと比べて NIL (*Sdr6a*) で有意に高かった (図 1)。この事実より、穂発芽耐性遺伝子座 *qSdr6a* の責任遺伝子は *GeneX* か *GeneY* のどちらか、あるいは両者である可能性が高いと考えられた。

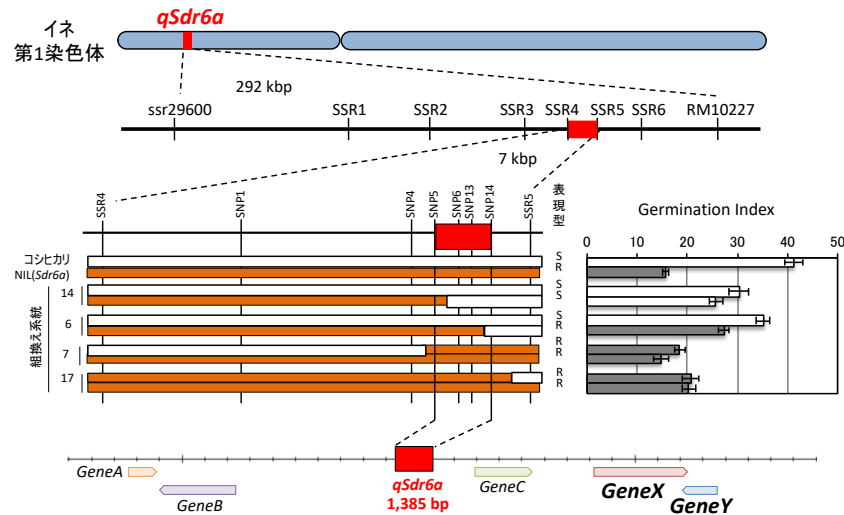


図 1 穂発芽耐性量的形質遺伝子座 *qSdr6a* の候補領域とその近傍の遺伝子
組換え系統を用いたファインマッピングによって *qSdr6a* は、1,385 bp に絞り込まれたが、その領域に遺伝子は存在しなかった。RAP-DB より、*qSdr6a* の近傍には、*GeneA*、*GeneB*、*GeneC*、*GeneX* および *GeneY* の 5 つの遺伝子が存在した。

この仮説を証明するために、TILLING 法⁴⁾を用いてイネ突然変異集団から *GeneX* と *GeneY* の突然変異体を探査した。突然変異集団から *GeneX* の遺伝子領域内に、非同義置換を有する 8 系統とフレームシフト変異 1 系統の合計 9 系統の突然変異体を単離した。一方、*GeneY* については、*GeneY* の遺伝子領域内に、非同義置換を有する 13 系統の突然変異体を単離した。

GeneX のフレームシフト変異体は、遺伝子機能が破壊されていることが予想された。このフレームシフト変異体について、発芽した自殖分離後代 M₃ 100 個体中、変異ホモ型は 2 個体しか存在せず、明らかに分離の歪みが認められた。この結果から、*GeneX* は、発芽に必要な遺伝子であることが推察された。この系統における遺伝子型別の発芽試験を行った結果、野生型の GI は 44.2 ± 2.4 であったのに対して、ヘテロ型は $35.1 \pm 2.8^*$ ($P < 0.05$) であり、野生型と比べてヘテロ型で有意に低かった (図 2)。また、非同義置換変異体 (V186M) の GI は、野生型と比べて変異型で有意に低かった (図 2)。以上の結果より、機能欠損 *genex* は著しく発芽を抑制することから、*GeneX* は発芽促進遺伝子であることが示唆された。

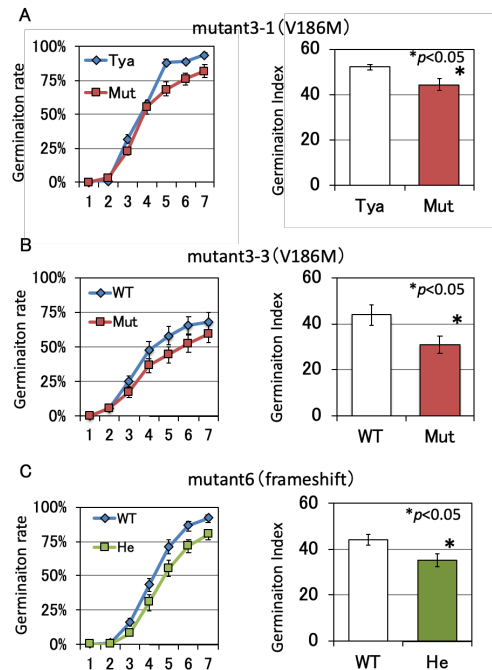


図 2 *genex* 突然変異体の発芽率と発芽指数
A, B: 野生型と非同義置換変異体 mutant3 における発芽率と GI を示す、C: 野生型とフレームシフト変異体 mutant6 のヘテロ型における発芽率と GI を示す。

一方、*GeneY*については、 M_2 ホモ変異体3系統のGIは、Kshと比べて有意に高かった(図3)。また、 M_2 ヘテロ変異体2系統では、自殖分離後代 M_3 のヘテロ型あるいは変異体のGIは、野生型と比べて有意に高かった(図3)。以上の結果より、機能欠損 *geney* は著しく発芽を促進したことから、*GeneY*は発芽抑制遺伝子であることが示唆された。

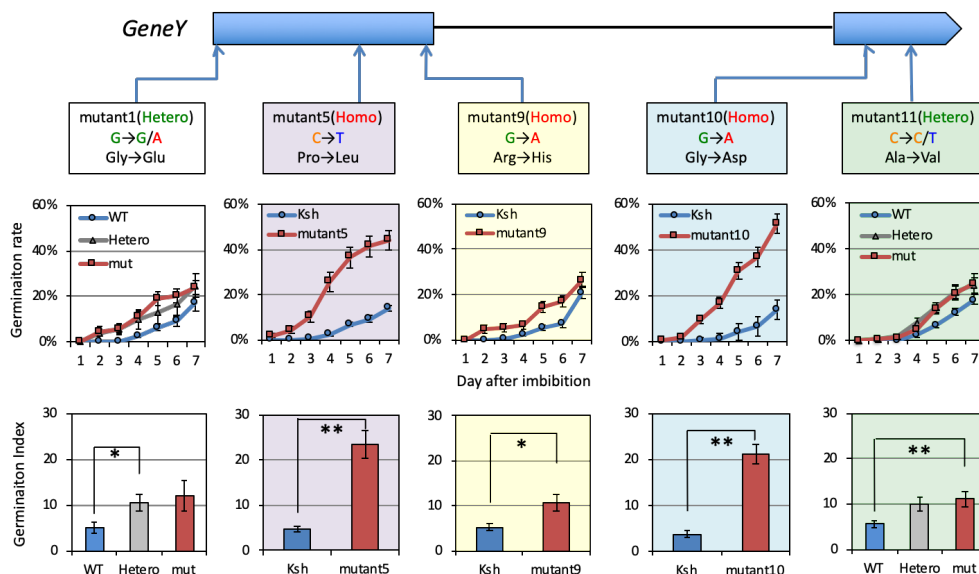


図3 *geney*突然変異体の発芽率と発芽指数 (GI)

野生型と5つの非同義置換系統におけるヘテロ型あるいは変異ホモ型における発芽率とGIを示す。

突然変異体を用いた本研究によって、穂発芽耐性量の形質遺伝子座 *qSdr6a* は遺伝子発現を調節する領域であり、発芽促進遺伝子 *GeneX* と、発芽抑制遺伝子 *GeneY* を、それぞれ負と正に発現制御することによって、穂発芽耐性を示すことが示唆された。これら2つの遺伝子は、*Sdr6a* 領域の下流にお互いが向き合う様に存在し、*GeneX* と *GeneY* のプロモーター領域は、それぞれの遺伝子領域の外側に位置している。通常、遺伝子発現を調節するエンハンサーあるいはサイレンサーは、1つの遺伝子のプロモーターと1つの転写因子を介したDNAループを形成することで転写を制御していることが知られている。しかしながら、最近の転写制御の研究において、遺伝子領域が3次元的な立体構造を形成することによって、1つのエンハンサーが2つの遺伝子のプロモーターを制御すること示された。この報告をもとに、我々は、*qSdr6a* は *GeneX* と *GeneY* の遺伝子発現を正逆両方向に制御する際の新たなDNAループモデル「サイレンサー/エンハンサーデュアルトランスクリプショナルコントロール」を提唱する。*qSdr6a* の発現調節モデルは、*GeneX* と *GeneY* が、向かい合うようにDNAが立体構造をとることで、*Sdr6a* が2つのプロモーターを制御可能なループ構造を形成し、*Sdr6a* は発芽促進遺伝子 *GeneX* に対してはサイレンサー、発芽抑制遺伝子 *GeneY* に対してはエンハンサーとして作用し、それらの発現を負と正に調節して穂発芽耐性を獲得するのではないだろうか。現在、*GeneX* と *GeneY* の遺伝子機能について、詳細な解析を継続している。本研究で明らかになった *qSdr6a* は、イネの穂発芽耐性品種の育成に利用できるだけでなく、*qSdr6a* のオーソログを利用して、コムギやオオムギなどのイネ科穀物における穂発芽耐性品種の育成が期待される。

<引用文献>

- 1) Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ, Koornneef M (2006) Cloning of *DOG1*, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:17042-17047.
- 2) Sugimoto K, Takeuchi Y, Ebana K, Miyao A, Hirochika H, Hara N, Ishiyama K, Kobayashi M, Ban Y, Hattori T, Yano M (2010) Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:5792-5797.
- 3) Marzougui S, Sugimoto K, Yamanouchi U, Shimono M, Hoshino T, Hori K, Kobayashi M, Ishiyama K, Yano M (2012) Mapping and characterization of seed dormancy QTLs using chromosome segment substitution lines in rice. Theor. Appl. Genet. 124: 893-902.
- 4) Kawakami T, Goto H, Abe Y, Chuba M, Watanabe M, Hoshino T (2020) High frequency of transversion mutations in the rice mutant population produced by diepoxybutane mutagenesis. Genet. Resour. Crop Evol. 67:in press

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hoshino Tomoki, Iijima Nobushige, Hata Masakazu, Watanabe Anri, Kawakami Tamae, Anai Toyoaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Molecular characterization of high stearic acid soybean mutants and post-transcriptional control of GmSACPD genes in the mutant with a single nucleotide deletion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Gene	6. 最初と最後の頁 100207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plgene.2019.100207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐野舜一、小鹿なつめ、飯島信繁、石川広朗、杉本和彦、星野友紀
2. 発表標題 突然変異体を利用した穂発芽耐性遺伝子座qSdr6aの責任遺伝子の同定
3. 学会等名 東北植物学会第9回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川広朗、飯島信繁、佐野舜一、杉本和彦、星野友紀
2. 発表標題 第9染色体に座乗する穂発芽耐性遺伝子座qSdr9.1とqSdr9.2のファインマッピング
3. 学会等名 東北植物学会第9回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野舜一、飯島信繁、杉本和彦、星野友紀
2. 発表標題 イネ穂発芽耐性QTL・qSdr6aの候補遺伝子の同定
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯島信繁、杉本和彦、星野友紀
2. 発表標題 イネ第1染色体上に見出された穂発芽耐性遺伝子Sdr6のファインマッピングと候補遺伝子の解析
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯島信繁、阿部光希、四宮未貴、石川広朗、佐野舜一、杉本和彦、星野友紀
2. 発表標題 突然変異体を利用した穂発芽耐性遺伝子座qSdr6aの責任遺伝子の同定
3. 学会等名 第13回東北育種研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯島信繁、杉本和彦、星野友紀
2. 発表標題 イネ第1染色体上に見出された穂発芽耐性遺伝子qSdr6aのファインマッピングと責任遺伝子の同定
3. 学会等名 東北植物学会第8回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯島信繁、杉本和彦、星野友紀
2. 発表標題 インド稲品種Nona Bokraの第1染色体短腕に座乗する穂発芽耐性遺伝子座Sdr6aとSdr6bのファインマッピング
3. 学会等名 日本育種学会第131回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯島信繁, 杉本和彦, 星野友紀
2. 発表標題 イネ穂発芽耐性遺伝子座qSdr6のファインマッピング
3. 学会等名 第7回植物生理化学会シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----