

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15209

研究課題名（和文）イネの高温登熟耐性を制御する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism controlling resistance to high-temperature stress at ripening stage in rice

研究代表者

矢野 憲司 (Yano, Kenji)

国立研究開発法人理化学研究所・革新知能統合研究センター・特別研究員

研究者番号：30791040

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、イネの登熟を制御する遺伝子の単離とその制御システムの解明である。

日本のイネ198品種を用いてイネの登熟に関わる形質を対象にゲノムワイド関連解析（GWAS）を行い、登熟に関わる遺伝子の同定を行った。さらに、その結果を発現プロファイルデータと統合することで、イネの登熟に関わる分子メカニズムの一端を解明した。さらに、従来イネの登熟のような複数の要因によって決められる複雑形質に関わる遺伝子の同定は、従来の手法では困難であった。そこで、複雑な形質に関わる遺伝的要因を同定するため、機械学習とGWASを組み合わせた手法を開発し、その内容の論文を学術誌へ報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、イネの高温登熟においてもGWASの報告がいくつかなされた。しかし、新規の農業的有用形質遺伝子の同定・単離の報告は一つもない。さらに、本来GWASの真骨頂である複雑形質を制御するQTL遺伝子の単離・解析については、これに取り組んだ研究は皆無であった。本研究では、複雑形質に関わる遺伝子の同定手法を開発しただけでなく、高温登熟に関わる有力な遺伝子を同定することができた。この成果によりこの分野に新しい戦略を提供できたと確信している。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to identify genes regulating rice grain ripening and elucidate its molecular mechanisms. For this purpose, I performed the genome-wide association study (GWAS) using 198 Japanese rice varieties and identified a plausible candidate gene. To examine the effects of this gene, I produced the transgenic plants for the candidate gene and confirmed that this gene regulates the rice ripening traits under high temperature stress. In addition, I developed a strategy of using a machine learning method for GWAS because the conventional method makes it difficult to identify genes regulating complex traits that are affected by many factors. This strategy has been published to the scientific journal.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：GWAS イネ 高温登熟

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、イネの登熟期間中の気温が上昇傾向にあり、コメの外観品質の低下が多発している。登熟中の高温は、種子中のデンプン粒蓄積を抑制し、コメの中心が白濁した状態の乳白粒を発生させる。収穫したコメの中に乳白粒が多く含まれると、市場価値が低下するため、深刻な問題となる。これまで、品質低下が起こりにくい品種や栽培方法の開発が求められてきたが、画期的な解決方法は見つかっていない。

最近、次世代シーケンサーにより多数の個体の大規模ゲノムデータを取得する技術や大量ゲノムデータによる形質と遺伝子の相関を計算する技術が開発されたことで、複数の遺伝子により複雑に支配される形質の新しい解析手法が確立されつつある。この手法を適用すると、これまで未解明だったイネの登熟を制御するメカニズムの一端が解明できると確信している。本申請で行う研究は、ゲノムワイド関連解析（以下、GWAS）を用いて行う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、イネの登熟を制御する遺伝子の単離とその制御システムの解明、さらには、それらを利用した分子育種である。日本のイネ 198 品種を用いてイネの登熟に関わる形質を対象にゲノムワイド関連解析（GWAS）を行い、登熟や胚乳発達に関わる遺伝子の単離・同定を目指す。さらに、その結果を発現プロファイルデータと統合することで、イネの登熟や胚乳発達に関わる分子メカニズムを解明する。長期的には登熟や胚乳発達に関わる制御系をモデル化し、効率的分子育種を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、日本のイネ 198 品種を実験材料として用いる。申請者は、これまでの研究から、この 198 品種を用いた次世代シーケンサーによる DNA 多型解析を行っており、約 50 万の多型を検出している。これらの品種からフェノタイプデータとして、心白粒の発生率（心白率）、乳白米の発生率など種子登熟に関連した形質、計 15 項目について計測し、GWAS に使用する。

4. 研究成果

(1) 胚乳形質に関連したゲノム領域を GWAS により調べた。正常な登熟米の割合を例として下に示す（図 1 A）。マンハッタンプロットの図から分かる通り、第 11 番染色体にピークが検出され、この周辺に正常な登熟米の割合に関連した遺伝子が座乗している可能性が考えられた。

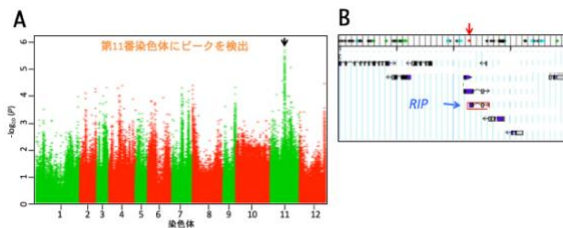


図1. 解析の具体例（正常な登熟米の割合）。(A)正常な登熟米割合のマンハッタンプロット図。(B)候補遺伝子を効率的に選抜するため、第11番染色体ピーク周辺のゲノムブラウザ上に多型をプロットした図。

(2) 第 11 番染色体に検出されたピークについて効率的に候補遺伝子を絞り込むため、ゲノムブラウザ上に、今回検出した多型をプロットした（図 1 B）。その結果、非同義置換を伴う遺伝子が 1 つ存在した。さらに、この遺伝子の組織別発現量を調べてみると、胚乳で高発現していることが分かり、有力な候補として考えられた。そこで、この遺伝子を *RIP* と名付け、形質転換法により胚乳形質に対する影響を調べた。正常な *RIP* タンパク質が生成されない CRISPR 系統を作成し、平均温度が 30 °C に設定された高温条件の温室で栽培し、胚乳形質への影響を調べた。その結果、コントロールの日本晴に対し、*RIP* の CRISPR 系統で正常な登熟米の割合が多いことがわかった（図 2）。この結果から、*RIP* タンパク質は、高温条件下での種子登熟に重要な働きをすることが明らかとなった。今後、この遺伝子の機能が弱いと思われるアレルを持つ品種に機能型のアレルを形質転換法により導入する gain-of-function 実験などを行い、*RIP* の機能についてさらなる調査を行う予定である。



図2. ライトテーブルで観察した日本晴（コントロール）と *RIP* の CRISPR 系統 1、2 の高温登熟種子。

(3) 正常な登熟米の割合に加え、心白率や乳白率、腹白率、背白率について、複数年にわたり計測をし、GWASを行った(図3)。RIPとWRC3に関しては、形質転換法により、機能欠失型アリルを持つと思われる品種に機能獲得型アリルを導入することで形質(心白率や正常な登熟米割合)に変化があるか今後検証予定である。

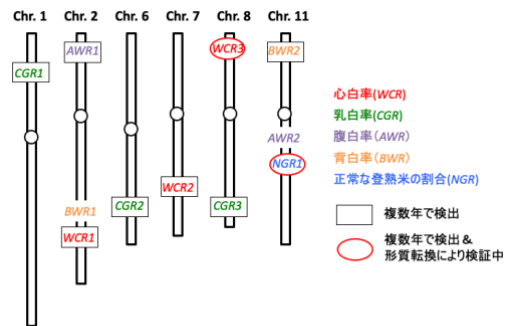


図3. GWASを用いたイネ胚乳形質に関するQTLの染色体上の座標位置。

(4) 次に、イネの品種間で異なる乳白粒の発生率と関連のある遺伝子を見つけ出すため、代表的な96品種から採取した開花10日目の胚乳を用いてRNA-seq解析により網羅的な遺伝子発現情報を取得した。その結果、約6万個(58,517)の遺伝子について発現情報を取得し、この中から、乳白粒の発生率と関連のある遺伝子を調べた所、負の相関を示す遺伝子群にデンプン合成に関わる遺伝子が多く含まれていることがわかった。図4Aは、デンプンの合成経路上にヒートマップとして表した。一例として、胚乳枝作り酵素(BE11b)と乳白米発生率の関係をプロットした(図4B)。胚乳枝作り酵素をコードする遺伝子の発現が上昇すると、乳白粒の発生率が減少する傾向を示している。この結果を先のヒートマップの結果と合わせると、乳白粒の発生率が高い品種は、一連のデンプン合成に関わる遺伝子発現量が低下していることが明らかとなり、一連のデンプン合成関連遺伝子は、乳白米の発生と密接な関係があることが想定される。

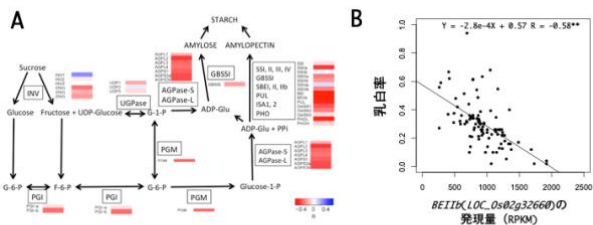


図4. (A) 乳白粒の発生率とデンプン合成関連遺伝子の相関を示したヒートマップ。デンプンの合成に関わる遺伝子が乳白粒の発生率と負の相関があった場合は、赤色、正の相関があった場合は、青色で示す。(B) 胚乳枝作り酵素(BE11b)と乳白米発生率の関係を示した散布図。

以上の結果から、網羅的な遺伝子発現に基づいた解析は、登熟機構の解明に有効であると考えられた。

(5) 上記の結果からデンプン合成に関わる遺伝子の発現量が乳白米の発生と密接な関係があることが想定されたため、デンプン合成に関わる遺伝子の発現量を形質として用いたGWASを行った(図5)。この解析により、デンプン合成に関わる遺伝子の発現制御に関わるゲノム上の領域が検出できると期待される。その結果、第8番染色体に共通してピークが見られた。この結果は、この領域に、デンプン合成に関わる遺伝子の発現量を制御する遺伝子が存在することを示唆している。今後、この領域に座乗する遺伝子を詳細に調べることでデンプン合成関連遺伝子の発現制御とそれに関連した乳白米発生の分子メカニズムが明らかになることが期待される。

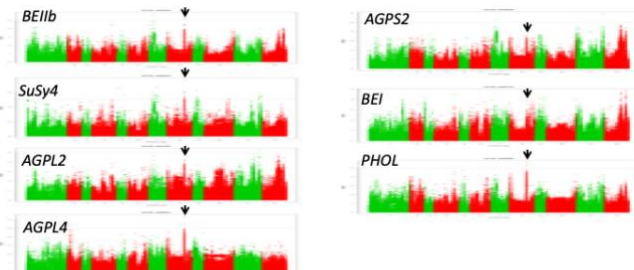


図5. デンプン合成関連遺伝子の発現量を形質としてGWASを行い、その結果をマンハッタンプロットとして示した。左上の記号は遺伝子名を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Minami Anzu, Yano Kenji, Gamuyao Rico, Nagai Keisuke, Kurata Nori, Ashikari Motoyuki, Reuscher Stefan et al.	4. 巻 176
2. 論文標題 Time-Course Transcriptomics Analysis Reveals Key Responses of Submerged Deepwater Rice to Flooding	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 3081 ~ 3102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.17.00858	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 -

1. 著者名 Bian Bian, Kageshima Sae, Yano Kenji, Fujiwara Toru, Kamiya Takehiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Screening Arabidopsis thaliana mutants for low sensitivity to manganese identifies novel alleles of NRAMP1 and PGSIP6	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 1795, 1803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/ery018	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 -

1. 著者名 Kenji Yano, Yoichi Morinaka, Fanmiao Wang, Peng Huang, Sayaka Takehara, Takaaki Hirai, Aya Ito, Eriko Koketsu, Mayuko Kawamura, Kunihiko Kotake, Shinya Yoshida, Masaki Endo, Gen Tamiya, Hidemi Kitano, Miyako Ueguchi-Tanaka, Ko Hirano, Makoto Matsuoka	4. 巻 116
2. 論文標題 GWAS with principal component analysis identifies a gene comprehensively controlling rice architecture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 21262, 21267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1904964116	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 -

1. 著者名 Fanmiao Wang, Kenji Yano, Shiro Nagamatsu, Mayuko Inari-Ikeda, Eriko Koketsu, Ko Hirano, Koichiro Aya, Makoto Matsuoka	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome wide expression quantitative trait locus studies facilitate isolation of causal genes controlling panicle structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	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) 10.1111/tpj.14726	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 2件）

1. 発表者名 Yano Kenji, Yoshida Shinya, Tamiya Gen, Hirano Ko, Kitano Hidemi, Matsuoka Makoto
2. 発表標題 A genome-wide association study identifies novel loci associated with rice panicle structure
3. 学会等名 16th International Symposium on Rice Functional Genomics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Yano, Hirano Ko, Kitano Hidemi, Makoto Matsuoka
2. 発表標題 Genetic Signatures of Cold Adaptation in Rice
3. 学会等名 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢野憲司
2. 発表標題 パブリックデータ利活用による研究の迅速化
3. 学会等名 第4回中手の会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢野 憲司、平野 恒、吉田 晋弥、北野 英己、田宮 元、松岡 信
2. 発表標題 主成分分析を用いたイネ草型に関するGWA解析
3. 学会等名 日本育種学会第135回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野 憲司、平野 恒、北野 英己、田宮 元、松岡 信
2. 発表標題 イネGWASで検出されたシグナルの検証には反復試験が重要
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩田 将平、平野 恒、矢野 憲司、小竹 敬久、吉田 晋弥、北野 英己、松岡 信
2. 発表標題 文献情報を用いたGWA解析
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢野 憲司
2. 発表標題 日本のイネ育種の過程でどのような遺伝子変化が起きたか
3. 学会等名 中手の会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Yano
2. 発表標題 GWAS Identifies a Gene Controlling Rice Architecture
3. 学会等名 Plant and Animal Genome Conference 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----