

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03948

研究課題名（和文）複雑な自然変動環境下での気温応答性を制御する遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of ambient temperature responsive genes in rice under fluctuating natural conditions

研究代表者

井澤 毅（IZAWA, TAKESHI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：10263443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,400,000 円

研究成果の概要（和文）：野外における気温応答性のイネ光周性花芽形成に異常が起きた変異体Y86系統をマッピングし、染色体7番の約400kbの領域にマッピングした。この変異体は、フロリゲン遺伝子の発現が高い状態でも顕著な開花支援を起こし、これまでに同定できていない新奇な分子機構の鍵となる遺伝子の変異体であると考えられる。

また、イネの気温応答性光周性花芽形成において、PhyBによるGhd7遺伝子の翻訳後制御が大きな作用を持っていることを示唆する結果を得た。これは、PhyBが光受容体として、Ghd7の転写を制御し、その後、気温センサーとして、Ghd7活性を制御していることを示唆する興味深い結果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モデル植物シロイヌナズナにおいて、光受容体フィトクロムが気温センサーとして働くことは報告があるが、今回の発見のように、特定の花芽形成制御遺伝子に関して、光受容体としては、転写制御、気温センサーとしては、活性制御というシステムの報告は新奇な発見となる。また、長日と低温が、フロリゲンの転写を強力に制限している事実は、作物としてのイネの育種において、重要な知見を提供する。

研究成果の概要（英文）：Here, we first examined flowering time under four distinct conditions: short-day or long-day and high or low temperature, using various rice lines. We also examined gene expression patterns of key flowering-time genes using the same lines under various conditions including temporal dynamics after light pulses. In addition to delayed flowering because of low growth rates, we found that photoperiodic flowering is clearly enhanced by both Hd1 and Ghd7 genes under low-temperature conditions in rice. We also revealed that PhyB can post-transcriptionally control Ghd7 repressor activity as a temperature sensor to inhibit Ehd1, Hd3a, and RFT1 at lower temperatures, despite inductive photoperiod conditions. The rising of ambient temperatures in early summer would contribute to inhibition of Ghd7 repressor activity, resulting in the appropriate floral induction of rice in temperate climates.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：イネ 光周性 花芽形成 気温応答性 自然環境 短日植物

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

#### 1. 研究当初の背景

我々の研究成果で、短日植物イネの光周性花芽形成の遺伝子ネットワークに関しては、かなりのことがわかってきたにもかかわらず、気温の影響に関しては、ほとんど明らかとなっていない。日長の長い傾向のある高緯度での作物の栽培は、当然、気温低下も同時に起こるので、さらに品種育成を進めるには、気温変化と光周性の関連性をより詳細に理解する必要がある。

#### 2. 研究の目的

イネの気温応答性に関わる遺伝子を単離することで、自然界の栽培条件におけるイネの花芽形成の遺伝子ネットワークの解明を進める。

#### 3. 研究の方法

MutMap法による遺伝子単離と、既知の光周性花芽形成遺伝子の気温応答性での貢献度をNILや変異体での表現型解析や遺伝子発現解析から進める。

#### 4. 研究成果

##### ○ 遅咲き変異体の選抜と原因遺伝子のMutMapマッピング

北海道のイネ品種が、光周性を失っているのに、本州での栽培と北海道での栽培で、開花時期が大きく変化する現象から、北海道の品種が、光周性を失うことで、気温応答性を亢進しているとの仮定で、北海道品種「ゆめぴりか」にEMS処理により、突然変異を導入し、開花が遅れる個体を西東京市の圃場で選抜した。その結果、約30系統の新規の開花期遅延突然変異体を得た。その中で、表現型が顕著である変異体から、Y86系統を野生型品種と交配し、F2集団を温室で展開した。この変異体の原因遺伝子の同定を行うために、MutMap法を行った。まず、得られたF2世代で、劣性変異により遅咲きになったと考えられる個体を、二つのF2集団で、二十個体からのDNAをバルク化して、Illumina法で解析を行った。その結果を、慣例法でバリエーションコールして、SNP-Indexをもとめ、マッピングを行ったところ、染色体7番の約1.2Mbpの範囲に原因変異をマッピングできた。しかしながら、SNP-Indexの変化を調べると、候補領域の前後に、不自然に、SNP-Indexが下がる領域が存在した。

この結果は、品種「日本晴」のゲノム配列と、「ゆめぴりか」の配列の違いに原因がある可能性があったので、ゆめぴりかのゲノム配列をデノボアセンブリで完全解読を行うために、MinIONを利用した長鎖型次世代ゲノムシーケンサーによるゲノム解読を行った。Illuminaデータで

の補正も行い、現時点で、全ゲノムで58コンティグ、カバー率95%、日本晴との比較で、99.7%の精度で、ゆめぴりかのゲノムをデノボアセンブリで完全解読を行うことができた。

このゆめぴりかのゲノム配列を用いて、MutMap解析を行ったところ、不自然なSNP-Indexの領域はなくなり(図1)、候補領域が、約2.3Mbpに拡大した。

- **BLUE dot** : variant
- **RED line** : mean SNP-index ※**mean**: 200kbの移動平均
- **ORANGE line** : mean p99 **p99**: 99% confidence interval of simulated SNP-index
- **GREEN line** : mean p95 **p95**: 95% confidence interval of simulated SNP-index

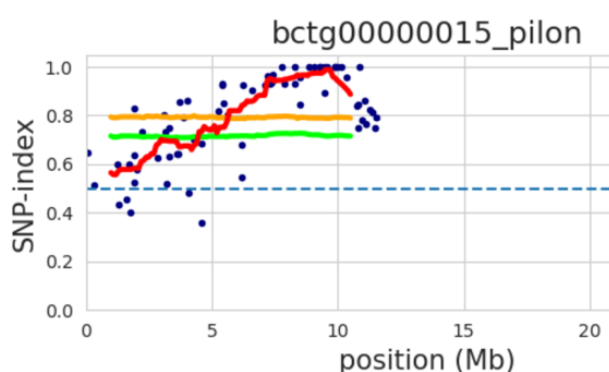


図1 ゆめぴりかのコンティグを用いたMutMapマッピング結果

次に、約150個体のF3分離集団を用いて、候補領域をしぼりこんだ。MutMapの結果から、候補のSNPを絞り込み、9か所のY86変異に関して、DNAマーカー化を行い、マッピングを行ったこと、約400kbの領域に原因遺伝子を絞り込むことができた。しかしながら、DNAマーカー化ができた変異に関して、完全に表現型とのリンクする変異はなく、マーカーにできていない変異が原因と考えられる。現在、ゆめぴりかのデノボアセンブリを行ったコンティグ配列をもちい、k-mer法等を駆使して、候補の変異の絞り込みを行っている。今後、CRISPR/Cas9法によって、候補の領域にある遺伝子の破壊システムを作成し、相補実験を進める計画である。

#### ○ イネの開花期の気温制御に関わる遺伝子の探索研究

この科研費の予算で、約1平米強の栽培スペースを持つメタルハライドランプの人工気象室を4基設置した。動作調整後、試験運転をした上で、4つの人工環境(短日高温区、長日高温区、短日低温区、長日低温区)で、各種系統を栽培し、開花関連遺伝子の発現への影響を調査した。短日区は、10時間日長、長日区は、14.5時間日長であり、高温区は、昼温30℃、夜温26℃、低温区は、昼温21℃、夜温17℃とした。

まず、本州の品種、日本晴と、北海道の品種、ほしのゆめを栽培し、比較したところ、二つのことが明らかとなった。まずは、日長の違いに反応できなくなっている北海道の品種でも、低温栽培では、20日前後の開花遅延が確認できた。葉間期も調べた結果、この開花遅延は、生育遅延によるものであると推定でき、本州の品種でも同様に遅延を示した。一方で、本州の品種は、低温条件で、より、長日条件での開花遅延が顕著になることを見出した。

次に、イネのGhd7, Hd1やPhy遺伝子等の光周性花芽形成ネットワークで働く遺伝子が、気温応答性と関与しているかを解析する実験を、准同質置換系統および突然変異体を用いて解析した。その結果、イネの開花は、長日条件でフロリゲン遺伝子が発現抑制を受けているだけでなく、短日条件であっても、低温区では、発現抑制を受けており、特定の遺伝子の変異によって、その抑制が解除されることがはっきりしてきた。この抑制機構により、本来のイネは、緯度の高い地域では、長日かつ低温条件により、非常に強い開花抑制を受けていたが、育種過程で選抜された変異により、その抑制がなくなり、栽培地域の北進が可能になったことが明らかとなってきた。

より具体的には、准同質置換系統の結果より、光周性の低温増強は、Ghd7遺伝子とHd1の両方が必要であることがわかり、それにより、フロリゲン遺伝子であるHd3aやRFT1の遺伝子が低温区で非常に強く抑制を受けることが明らかとなった。この気温変化を伝える気温センサーとして、数年前に、シロイヌナズナで報告があるフィトクロムB遺伝子の影響を調べたところ、フィトクロムがGhd7のフロリゲン抑制活性を転写後に制御していることが明らかになった。加えて、Ghd7遺伝子が、光パルスで誘導がかかることから、その後のmRNAの経時的変動を解析したところ、Ghd7mRNAは高温で不安定になり、その結果、RFT1の発現が低温で湯徳抑制されることを示す結果を得た。しかしながら、この不安定性は、フィトクロムB遺伝子の変異体でも観察されることから、分子機構が異なる気温応答性がイネには存在し、フロリゲン遺伝子を制御していることが明らかになった。この研究結果は、現在、論文投稿中であり、審査員の指摘に対応して、近く、再投稿を予定している。

また、今回の解析から、遺伝学的にはフロリゲンの上流に位置するEhd1やGhd7の転写も気温応答するが必ずしも開花期への影響と整合性が取れないケースがあり、開花期制御と気温応答性を理解するには慎重な解析が必要であることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Itoh Hironori, Tanaka Yuri, Izawa Takeshi	4. 巻 60
2. 論文標題 Genetic Relationship Between Phytochromes and OsELF3?1 Reveals the Mode of Regulation for the Suppression of Phytochrome Signaling in Rice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 549 ~ 561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy225	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 Itoh Hironori, Wada Kaede C., Sakai Hiroaki, Shibasaki Kyohei, Fukuoka Shuichi, Wu Jianzhong, Yonemaru Jun-ichi, Yano Masahiro, Izawa Takeshi	4. 巻 94
2. 論文標題 Genomic adaptation of flowering-time genes during the expansion of rice cultivation area	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 895 ~ 909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.13906	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 Izawa Takeshi	4. 巻 105
2. 論文標題 What is going on with the hormonal control of flowering in plants?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 431 ~ 445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15036	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1件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takeshi Izawa
2. 発表標題 Field responses and synthetic control of rice flowering
3. 学会等名 PP1530 International PP1530 Symposium: Genetic Variation of Flowering Time Genes and Applications for Crop Improvement (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------