

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06274

研究課題名(和文) イネ節間伸長を調節するジベレリン合成遺伝子における転写制御機構の解明

研究課題名(英文) Transcriptional regulation of a gibberellin biosynthesis gene that regulates internode elongation in rice

研究代表者

黒羽 剛 (Kuroha, Takeshi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・研究員

研究者番号：50415155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物は、様々な外部環境に対応した多様な環境応答機構を持っている。イネは、日長や温度等に起因する生殖成長の開始や、水没による環境変化に応答して、急激に節間を伸長させる能力を持つ。節間伸長に共通して貢献する因子として、ジベレリン合成酵素遺伝子SD1 (OsGA20ox2) が同定されている。本研究では、SD1遺伝子の発現制御機構を解明するために、多様なSD1遺伝子の多型の組み合わせを持つ系統および、SD1遺伝子の非翻訳領域に様々な欠失を持つゲノム編集システムを作出した。表現型の解析により、SD1遺伝子の発現を通じた節間伸長の制御に関わる候補領域を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、イネの節間伸長の制御において重要なSD1遺伝子の発現制御機構を理解する上で大きな手がかりを得られたと言える。この成果は、植物の多様な成長戦略の解明に結びつくだけでなく、将来的にはイネをはじめとした作物における自在な草丈制御システムの構築に展開できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Plants have diverse environmental response mechanisms in response to various external environments. Rice have the ability to elongate internodes in response to not only the onset of reproductive growth caused by such as day length and temperature, but also environmental changes caused by submergence. The gibberellin synthase gene SD1 (OsGA20ox2) has been identified as a common contributor to internode elongation. In this study, we generated genome-edited lines with various deletions in the untranslated region of the SD1 gene to elucidate the regulatory mechanism of the SD1 gene expression. Through phenotypic analysis of these lines, we succeeded in obtaining the candidate region involved in the regulation of internode elongation through the expression of the SD1 gene.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：イネ ゲノム編集 ジベレリン 節間伸長 洪水応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

固着生活を送る植物は、様々な外部環境に対応して生育するための環境応答機構を持っている。主要作物であるイネは、日長、温度等に起因する生殖成長が開始すると節間を伸長させ開花する。一方、浮きイネと呼ばれる一部のイネは、深水による水没への適応のために急激に節間を伸長させる。先行研究において、通常のイネの生殖成長時や浮きイネの深水応答時の節間伸長には植物ホルモンであるジベレリンの合成酵素遺伝子 *SD1* (*OsGA20ox2*) が関わっていることが初めて明らかになっている。このように、イネにおいて様々な重要な局面において *SD1* 遺伝子の発現誘導を介し節間伸長が行われているが、その発端の一つである *SD1* 遺伝子の発現制御に関わるメカニズムの詳細はほとんど未知のままであった。

2. 研究の目的

植物は、様々な外部環境に適応するために多様な制御機構を持っている。通常の栽培イネは、日長や温度等に応答した生殖成長の開始に伴い、節間を伸長させ開花する。一方で、東南アジアの洪水地帯において栽培される浮きイネは、水没すると急激に節間を伸長させ水面から葉を露出し生き延びることができる。これらの節間伸長に共通して貢献する因子として、先行研究においてジベレリン合成酵素遺伝子 *SD1* (*OsGA20ox2*) が同定されている。先行研究において、浮きイネにおいては水没で生じるエチレン蓄積により、エチレン情報伝達因子 *OsEIL1a* が安定化することで *SD1* 遺伝子のプロモーターに結合し、遺伝子発現が誘導されることが知られている。また、浮きイネ特異的な *SD1* 遺伝子発現の深水誘導性には、*SD1* 遺伝子のプロモーター領域とイントロン領域に存在する、浮きイネ特異的な 17 個の多型が必要であるが、その転写制御の詳細は不明であった。本研究では、交配による組換えおよびゲノム編集技術を用いることにより、*SD1* 遺伝子の転写制御に関わる領域の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 浮きイネ特異的な *SD1* プロモーター領域の変異と、水没に応答した節間伸長との関連を検証するために、交配による大規模な組換え集団から様々な組み合わせの浮きイネ特異的な塩基を持つイネ系統を選抜・純化し、それらの表現型を比較した。

(2) 浮きイネの水没に応答した *SD1* 遺伝子発現の誘導に必要なと考えられる多型をターゲットとしてガイド RNA を設計し、アグロバクテリウムを介した形質転換によりゲノム編集イネを作出した。

(3) 浮きイネ由来の *SD1* 遺伝子を背景を持つイネ系統を用いて、*OsEIL1a* による *SD1* 遺伝子発現の誘導に関わると予想される 20bp の配列を改変したゲノム編集系統を確立するとともに、その周辺の大小様々な欠失が生じたゲノム編集系統を作出した。また、同じ遺伝的背景を持つ系統において、*OsEIL1a* 遺伝子機能の欠損を引き起こすゲノム編集系統を作出した。

4. 研究成果

(1) 交配による大規模な組換え集団からの選抜・純化により、プロモーター側にのみ浮きイネ特異的な多型を持つ系統をはじめとした、様々な組み合わせで浮きイネ特異的な多型を持つ 7 つの系統の作出に成功した。得られた系統を純化させたものについて、深水応答性を

調査したところ、イントロンに浮きイネ特異的多型を持つ系統は、持たない系統よりも深水に応答した節間伸長性が高い傾向があることがわかった。このことは、少なくともイントロンに存在する多型が深水に応答した遺伝子発現の誘導に寄与していることを示唆する。

(2) 17個の多型のうち、ガイド RNA 設計が可能な11の多型部位についてゲノム編集を試みたところ、6つの多型についてゲノム編集による欠失を引き起こすことに成功した。また、残りの多型については1つのガイド RNA による点変異の作成が困難であるため、残りの多型を全て含む領域を欠失させるようなコンストラクトを作成しゲノム編集を試みた。将来的には、これらのゲノム編集を使用し深水に応答した遺伝子発現制御に必須な多型の同定を試みたい。

(3) 浮きイネ由来の *SD1* 遺伝子を背景に持つイネ系統を用いて、*OsEIL1a* による *SD1* 遺伝子発現の誘導に関わると予想される 20bp の配列を改変したゲノム編集系統を確立するとともに、その周辺の大小様々な欠失が生じたゲノム編集系統の作出に成功した。20bp の配列周辺の領域のみを欠失した系統の通常の生育条件での節間伸長は正常であったことから、この配列は生殖成長での節間伸長には必要ではなく、深水に応答した節間伸長に必要なだと推測される。また、*OsEIL1a* 遺伝子機能の欠損を引き起こすゲノム編集系統を作出した。

以上のように、多様な *SD1* 遺伝子の多型の組み合わせを持つ系統および、*SD1* 遺伝子の非翻訳領域に様々な欠失を持つゲノム編集系統を作出し、*SD1* 遺伝子の発現を通じた節間伸長の制御に関わる候補領域を得ることに成功した。今後は作成した様々なゲノム編集系統群の純化を行い、生殖成長期および深水処理での遺伝子発現と節間伸長を比較し、それぞれの条件における *SD1* 遺伝子の発現制御システムの全貌解明につなげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeshi Kuroha and Motoyuki Ashikari	4. 巻 40
2. 論文標題 Molecular mechanisms and future improvement of submergence tolerance in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Breeding	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11032-020-01122-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Fukushima Atsushi, Kuroha Takeshi, Nagai Keisuke, Hattori Yoko, Kobayashi Makoto, Nishizawa Tomoko, Kojima Mikiko, Utsumi Yoshinori, Oikawa Akira, Seki Motoaki, Sakakibara Hitoshi, Saito Kazuki, Ashikari Motoyuki, Kusano Miyako	4. 巻 10
2. 論文標題 Metabolite and Phytohormone Profiling Illustrates Metabolic Reprogramming as an Escape Strategy of Deepwater Rice during Partially Submerged Stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 68～68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo10020068	査読の有無 無
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 T Kuroha, K Nagai, R Gamuyao, D R Wang, T Furuta, M Nakamori, T Kitaoka, K Adachi, A Minami, Y Mori, K Mashiguchi, Y Seto, S Yamaguchi, M Kojima, H Sakakibara, J Wu, K Ebana, N Mitsuda, M Ohme-Takagi, S Yanagisawa, M Yamasaki, R Yokoyama, K Nishitani, T Mochizuki, G Tamiya, S R McCouch, and M Ashikari	4. 巻 361
2. 論文標題 Ethylene-gibberellin signaling underlies adaptation of rice to periodic flooding	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 181～186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aat1577	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 該当する
1. 著者名 Kurokawa Yusuke, Nagai Keisuke, Huan Phung Danh, Shimazaki Kousuke, Qu Huangqi, Mori Yoshinao, Toda Yosuke, Kuroha Takeshi, Hayashi Nagao, Aiga Saori, Itoh Jun-ichi, Yoshimura Atsushi, Sasaki-Sekimoto Yuko, Ohta Hiroyuki, Shimojima Mie, Malik Al Imran, Pedersen Ole, Colmer Timothy David, Ashikari Motoyuki	4. 巻 218
2. 論文標題 Rice leaf hydrophobicity and gas films are conferred by a wax synthesis gene (LGF1) and contribute to flood tolerance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1558～1569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.15070	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 該当する

1. 著者名 A Minami, K Yano, R Gamuyao, K Nagai, T Kuroha, M Ayano, M Nakamori, M Koike, Y Kondo, Y Niimi, K Kuwata, T Suzuki, T Higashiyama, Y Takebayashi, M Kojima, H Sakakibara, A Toyoda, A Fujiyama, N Kurata, M Ashikari, and S Reuscher	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 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 黒羽 剛
2. 発表標題 イネの遺伝子機能の理解とその先に向けて
3. 学会等名 農学中手の会 第5回研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒羽 剛, 草野都, 福島敦史, 永井啓祐, 服部洋子, 小林 誠, 及川彰, 小嶋美紀子, 榊原 均, 内海好規, 関 原明, 芦効基行, 斉藤和季
2. 発表標題 浮きイネにおける深水に応答した代謝物変化の包括的解析
3. 学会等名 第 13 回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Kuroha
2. 発表標題 Molecular mechanism of adaptation to periodic flooding in rice.
3. 学会等名 35th ISPR International Symposium and 5th Symposium on Plant Stress Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Kuroha, Susan R. McCouch, and Motoyuki Ashikari
2. 発表標題 An Ethylene-Gibberellin Relay Co-opts the Green Revolution Gene to Allow Rice Adaptation to Submergence.
3. 学会等名 International Plant & Animal Genome XXVII (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Kuroha and Motoyuki Ashikari
2. 発表標題 Ethylene-Gibberellin Signaling Underlies Adaptation of Rice to Periodic Flooding
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 黒羽 剛, Diane Wang, Susan R. McCouch, 横山隆亮, 西谷和彦, 芦苺基行
2. 発表標題 長期的な洪水に適応した浮きイネの起源とその栽培化
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 黒羽 剛, 増口 潔, 瀬戸義哉, 山口信次郎, 横山隆亮, 西谷和彦, 芦苺基行
2. 発表標題 浮イネにおけるジベレリン合成を介した洪水への適応戦略
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
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
連携研究者	横山 隆亮 (Yokoyama Ryusuke) (90302083)	東北大学・生命科学研究科・講師 (11301)	

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
---------	---------