

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02929

研究課題名（和文）イネjuvenile-adult相転換期を制御するQTLの同定および育種的活用

研究課題名（英文）Identification and utilization of QTLs for the regulation of rice juvenile-adult phase transition

研究代表者

吉川 貴徳 (Yoshikawa, Takanori)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：00721606

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、イネjaponica品種とindica品種間において栄養成長期間のjuvenile-adult相転換期の分化に關与する遺伝的要因を同定し、生育相転換が農業形質に及ぼす効果の解明を試みた。主たる成果は、1) qJA1、qJA2の原因遺伝子を同定し、トランスクリプトームにおいて關連する経路を見出した。2) qJA1、qJA2のjaponicaアレルが高緯度地域での栽培に適する可能性を見出した。3) 生育環境が相転換に及ぼす影響を明らかにした。4) 生育ステージの進行に伴っていもち病に対する防御応答機構が変化することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまであまり研究対象とならなかったイネの初期生育の違いを「juvenile-adult相転換」という新しい視点から解釈し、その分化に關与した原因遺伝子を同定した。これらの遺伝子はこれまで生育相転換に關与するとは考えられていなかった遺伝子であり、これら遺伝子がトランスクリプトームや農業形質に及ぼす効果について解析を行った。これらの成果はイネの成長について新たな観点を提供し、今後の品種育成において有用な知見となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we identified the genetic factors involved in the differentiation of juvenile-adult phase transition during vegetative growth between rice japonica and indica varieties, and attempted to elucidate the effect of phase transition on agricultural traits. The main results were 1) identification of the causal genes for qJA1 and qJA2, and finding related pathways in the transcriptome. 2) We found that the japonica alleles of qJA1 and qJA2 may be suitable for cultivation in high latitude areas. 3) The effect of the growing environment on the phase transition was clarified. 4) It was found that the defense response mechanism against blast disease changes as the progresses of growing stage.

研究分野：育種学分野

キーワード：イネ japonica indica juvenile-adult相転換 栄養成長 QTL解析 qJA1 qJA2

1. 研究開始当初の背景

我が国の主要作物であるイネは発芽してから生殖成長を行うまでの栄養成長期間に幼若相 (**juvenile phase**) から成熟相 (**adult phase**) へと生育相転換を行い、茎頂分裂組織や葉の大きさ、出葉速度の減少、中肋および葉耳・葉舌の発達、節-節間の分化などの形態的变化とともに光合成活性が上昇し、種子生産の準備を行っていると考えられる。このような生育相転換には主に2つの **micro RNA** (**miR156**, **miR172**) が関与しており、生育相の進行とともに **miR156** および **miR172** の発現量は減少および増大し、下流遺伝子の発現制御を行なっている。このような制御はイネ以外にもシロイヌナズナやダイズ、トウモロコシなど単子葉・双子葉植物において広く認められることから、これらの **micro RNA** は生育相転換におけるキーファクターであると考えられている。また、イネにおいては **juvenile-adult** 相転換が遅延する **peter pan syndrome** (**pps**) 変異体や、逆に早期化する **precocious** (**pre**) 変異体などが得られており、**miR156** および **miR172** の上流においてこれら変異体の原因遺伝子が分子的制御に関与すると考えられているが、詳細な分子機構については未解明である。

申請者らはこれまでにイネ **japonica** 品種と **indica** 品種を用いた **juvenile-adult** 相転換期の比較を行い、**indica** 品種と比較して **japonica** 品種の方が初生葉が短く、未発達であること、出葉速度の転換および **miR156**, **miR172** の発現変化が遅いことなどから、**japonica** 品種の方が相転換期が遅いことを見出している。また、**japonica** 品種の祖先種である野生イネ (**Oryza rufipogon**) の調査を行なった結果、**juvenile-adult** 相転換期は **indica** 品種と同等であると考えられた。このことは、我が国で栽培されている **japonica** 品種は相転換期が遅くなるように進化(または改良)した、世界的にも珍しい品種群であることを示唆すると考えられるが、そのような特性がもたらす適応的意義については不明である。そこで、**japonica-indica** 品種間において相転換期の分化に関与した遺伝的要因を同定するため、**japonica** 品種(日本晴およびコシヒカリ)と **indica** 品種(**Kasalath**)の交配集団を用いて相転換形質に関する **QTL** 解析を行なった結果、両集団に共通する主要な2**QTLs** (**qJuvenile-Adult 1** (**qJA1**), **qJA2**)を検出することができた。**qJA1** および **qJA2** の原因遺伝子を同定するため、ファインマッピングにより候補領域の特定を行なった結果、**qJA1** 候補領域内には1遺伝子 (**Os01g0907900**)、**qJA2** 候補領域内には2遺伝子 (**Os06g0650100**, **Os06g0650300**) が座乗していた。そこで、**japonica** 品種(コシヒカリ)と **indica** 品種(**Kasalath**)の第2葉期および第3葉期シュートを用いてこれら遺伝子の発現量を比較したところ、**Os06g0650100** の発現量は **japonica-indica** 品種間および生育ステージ間において不変であった一方、**Os01g0907900** および **Os06g0650300** は生育ステージの進行とともに発現量が増加し、一貫して **indica** 品種において高い発現量を示した。したがって、これら2遺伝子の発現量は生育ステージと密接に関連しており、候補遺伝子である可能性が高いと考えられる。**Os01g0907900** は **MEI2-like RNA binding protein** をコードしており、出葉速度が極端に早くなる **plastochron 2** (**pla2**) 変異体の原因遺伝子として同定されている。また、**Os06g0650300** は **Histone H4 acetyltransferase** をコードしており、イネの粒重を制御する **QTL** (**GW6a**) の原因遺伝子として同定されている。いずれも農業形質と密接に関連する遺伝子であるが、**juvenile-adult** 相転換との関連については十分な知見が得られていない。

2. 研究の目的

本研究はイネ **japonica-indica** 品種間において **juvenile-adult** 相転換期の分化に関与する遺伝的要因を同定し、その農業形質に及ぼす効果を明らかにすることにより新たなイネ育種に資する知見を得ることを目的としている。これまではあまり着目されてこなかったイネの初期生育の違いを「**juvenile-adult** 相転換」という新しい視点から解釈を行うことにより、イネのライフサイクルにおける栄養成長初期の生物学的意義の解明を試みる。さらに、これまでの取り組みにより同定された **qJA1** および **qJA2** の原因遺伝子の同定を行うとともに、これら遺伝子の下流における生理的・分子的变化の解明に取り組む。生育相の進行に伴い、栄養器官の形態変化や光合成活性の上昇などは単子葉・双子葉植物で広く認められている一方、その他の生理的な変化に関する知見は乏しい。本研究では **qJA1**, **qJA2** 遺伝子型の置換により相転換期を改変したイネを用いて農業形質やストレス耐性を評価し、相転換期改変の育種的有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は **qJA1**, **qJA2** の原因遺伝子を同定し、栄養成長初期における生育相転換が農業形質に及ぼす効果を明らかにすることを目的に以下の6実験を実施した。

3-1. **qJA1**, **qJA2** 置換系統における農業形質の調査

イネ **japonica** 背景(コシヒカリ)において **qJA1**, **qJA2** の遺伝子型が **indica** 型(**Kasalath**)に置換した染色体置換系統(**SL203**, **SL218**, **SL203×218**)を供試し、相転換形質(第2葉葉身長、第2葉葉耳形成頻度、第3葉葉身長)および農業形質(草丈、分蘗数、出穂日、一穂粒数、粒形、一次枝梗数)の調査を行う。さらに、同調査を京都と北海道で実施することにより、相転換期の遅延が地域適応性に及ぼす効果を評価する。

3-2. 相転換に伴う遺伝子発現の網羅的調査

イネ *japonica* 品種 (コシヒカリ) が相転換の進行とともにどのような遺伝子発現の変化を生じるのかトランスクリプトーム解析により網羅的に調査する。さらに、*japonica* 背景 (コシヒカリ) において *qJA1* および *qJA2* の遺伝子型が共に *indica* 型 (*Kasalath*) に置換した染色体置換系統 (*SL203*×*218*) も併せて調査し、*qJA1*, *qJA2* の下流に存在する遺伝子の絞り込みを行う。

3-3. 環境要因が生育相転換に及ぼす影響の解析

幼苗の生育環境 (温度、光、日長) が相転換に与える影響を評価するため、インキュベーター内で様々な環境を再現し、環境間における幼苗の相転換形質 (第 2 葉葉身長および葉耳形成頻度) を評価する。さらに、遺伝的要因との交互作用を評価するため、コシヒカリおよび *SL* 系統間での相転換形質およびトランスクリプトーム変化を比較し、*qJA1*, *qJA2* の環境応答性について知見を得る。

3-4. 生育相転換に伴うストレス耐性変化の解析

相転換の進行に伴いストレス耐性がどのように変化するのか評価するため、*japonica* 品種 (日本晴) を用いてストレス耐性の評価を行う。これまでの取り組みにおいて予備実験として実施したマイクロアレイ解析では、相転換の進行に伴い耐病性や非生物ストレス耐性遺伝子の発現が変動していたため、本研究では耐病性 (いもち病抵抗性) 試験を実施する。

3-5. *qJA1*, *qJA2* 原因遺伝子の同定

これまでの取り組みにより、*Os01g0907900* (*qJA1*) および *Os06g0650300* (*qJA2*) が *QTLs* の原因遺伝子である可能性が高いと考えられる。これを証明するため、それぞれの *japonica* 型/*indica* 型アレルに加え、プロモーターを入れ替えたコンストラクトを作成し、それぞれの形質転換体の表現型調査よりアレルの差異がプロモーターとアミノ酸配列のいずれに起因するかを明らかにする。

3-6. *qJA1* が幼苗のトランスクリプトーム変動に及ぼす影響の解析

qJA1 が制御する分子的制御経路を明らかにするため、野生型 (*T65*) および候補遺伝子の変異体 (*pla2*) 過剰発現体を用いて各生育ステージにおける葉身の *RNAseq* を行い、ネットワーク解析により *PLA2* 遺伝子の機能有無によって共変動する経路の絞り込みを行う。

4. 研究成果

4-1. *qJA1*, *qJA2* 置換系統における農業形質の調査

京都での栽培において、コシヒカリと比較して *indica* 型の *qJA1* (*qJA1^{ind}*) を有する *SL203* および *qJA2^{ind}* を有する *SL218* は相転換形質が有意に増大した。また、*SL203* と *SL218* の交配により得られた *SL203*×*218* においては相加的効果が認められた。これらの *SL* 系統では成熟個体の草丈がコシヒカリより明確に増大した一方、分蘖数は減少する傾向を示した。出穂日に関しては、いずれの栽培期 (早植え、普通植え、遅植え) においても *SL218* および *SL203*×*218* がコシヒカリより早く、*SL203* はコシヒカリとほぼ同等であり、相転換の早期化は出穂日に明確な影響を与えないと考えられた。コシヒカリと比較して *SL* 系統では一穂粒数や一次枝梗数に明確な変化を示さなかったが、穂長や種子の長さが有意に増大した。以上の結果から、*qJA1* および *qJA2* の *indica* 型アレルの導入により、栄養成長初期の相転換が早期化すると共に、器官の縦方向のサイズが増大する傾向が認められた。

同一材料を北海道で栽培したところ、幼苗の相転換形質は京都と比較して減少する傾向が認められ、特に *SL203* は他の系統と比較してより顕著に減少した。このことから、生育相転換は環境要因の影響を受け、さらに遺伝的要因との交互作用を示す可能性があると考えられた。さらに、成熟個体の草丈および分蘖数は京都よりも北海道の方が減少する傾向を示し、*SL203*×*218* は最も顕著な減少を示した。以上の結果から、*qJA1* および *qJA2* の *japonica* 型アレルは高緯度地域における分蘖数の確保に貢献する可能性があるかと推察された。

4-2. 相転換に伴う遺伝子発現の網羅的調査

コシヒカリおよび *SL203*×*218* の第 2 葉、第 4 葉、第 6 葉より *total RNA* を抽出し、*RNAseq* を行った。それぞれの遺伝子発現 (リードカウント) 分散平均比が大きい上位 3000 遺伝子を用いて主成分分析を行った結果、全体の変動の 67.8% を説明する *PC1* は葉の生育ステージを、15.4% を説明する *PC2* は遺伝的背景の影響を反映していた。さらに、*PC1* 上において *SL203*×*218* のプロットはコシヒカリより全てのサンプルが *adult* 側にシフトしていたことから、*SL203*×*218* は相転換形質のみならず、遺伝子発現変動の観点からも成熟が早期化していることが示唆された。

コシヒカリおよび *SL203*×*218* それぞれのバックグラウンドにおいて各葉位で特異的に高発現する遺伝子を抽出し、両系統に共通する *DEG* を葉位特異的高発現遺伝子とみなした。その結果、第 2 葉、第 4 葉、第 6 葉特異的な高発現遺伝子が 2072 個、190 個、1790 個得られた。*KEGG* パスウェイにおけるエンリッチメント解析の結果、第 2 葉で高発現する遺伝子はリボソームや *DNA* 複製などの細胞の基礎機能を司る遺伝子群への濃縮が認められた。また、第 4 葉で高発現する遺伝子は糖代謝やアミノ酸合成への濃縮が認められたのに対し、第 6 葉特異的な遺伝子はフェノール性二次代謝産物生合成モジュールとエチレン生合成モジュールへの濃縮が確認された。葉位特異的な高発現遺伝子のうち、各葉位ごとにコシヒカリと

SL203×218の比較を実施した結果、第2葉、第4葉、第6葉それぞれにおいて249個、64個、238個の遺伝子発現変動が確認され、これら遺伝子が *qJA1*, *qJA2* の下流で制御される可能性があると考えられた。

4.3. 環境要因が生育相転換に及ぼす影響の解析

コシヒカリおよび SL 系統を生育温度（高温: 35°C-25°C、低温: 25°C-15°C）、光強度（高照度: 1368 μmol m⁻²s⁻¹、低照度: 364.8 μmol m⁻²s⁻¹）、日長（長日: 14 時間明期、短日: 10 時間明期）を改変した環境下で栽培し、相転換形質の比較を行った。その結果、第2葉葉身長に対しては生育温度が、第2葉葉耳形成頻度に対しては生育温度および光強度が強い影響を与えることが明らかになった。これらの環境要因がトランスクリプトームに与える影響および遺伝的背景との交互作用を調査するため、生育温度および光強度を改変した環境下でコシヒカリ、SL203、SL218を栽培し、第2葉、第4葉、第6葉より total RNA を抽出して RNAseq 解析を行った。発現変動遺伝子を用いて主成分分析を行った結果、PC1 (16.2%) は葉の生育ステージを反映し、PC2 (4.7%) は transition phase に特徴的な遺伝子発現変動を反映していた。低温条件下で特徴的な DEG を抽出し、エンリッチメント解析を行った結果、コシヒカリでは光合成経路が強く濃縮された一方、SL203 ではペプチド代謝やジャスモン酸シグナルが、SL218 では温度反応経路が強く濃縮された。同様に、低照度条件下で特徴的な DEG のエンリッチメント解析を行った結果、コシヒカリでは光合成経路が強く濃縮されたのに対し、SL203 では水ストレスやジャスモン酸シグナルが濃縮され、SL218 では濃縮経路は得られなかった。以上の結果から、生育温度および光強度はイネの相転換に関連する表現型および遺伝子発現を変動させる環境要因であり、これにより発現変動が認められる経路は *qJA1* および *qJA2* の遺伝的背景により異なることが明らかになった。

4.4. 生育相転換に伴うストレス耐性変化の解析

生育相の進行に伴う耐病性の変化を調査するため、日本晴の幼苗（第2葉期～第5葉期）を用いていもち病の接種試験を行った。細胞壁強度の変化による影響を排除するため、本実験では全てパンチ接種によりいもち病菌（5×10⁵ 孢子/ml）の接種を行った。第2葉から第5葉までの病斑面積を比較した結果、上位葉ほど病斑が有意に減少した。次に、いもち病菌の菌体量を評価するため、感染葉より DNA を抽出し、リアルタイム PCR によりいもち病菌の遺伝子（*MHP1*）を定量した。その結果、菌体量は上位葉ほど有意に増加し、病斑面積と矛盾する結果となった。そこで、トリパンブルー染色により菌糸を染色して顕微鏡観察を行った結果、第2葉では接種部位を起点として葉の広い面積に菌糸が広がっていたのに対し、第4葉では接種部位の周辺で多数の孢子形成が確認され、いもち病菌の状態が明確に異なっていた。これらの結果から、イネは葉位によっていもち病感染に対する応答が異なると推察された。

葉位によるいもち病感染応答の変化を調査するため、第2葉および第4葉を用いていもち病感染 48 時間後の接種部位より total RNA を抽出し、RNAseq 解析を行った。各葉位、対照区と比較して接種区において発現が変動した DEG は 111 個（第2葉）および 405 個（第4葉）であった。第2葉で特異的に発現が上昇した 55 遺伝子はストレス応答や防御応答経路が濃縮され、発現が減少した 56 遺伝子には明確な経路への濃縮が認められなかった。一方、第4葉で特異的に発現が上昇した 217 遺伝子は二次代謝産物経路への濃縮が認められ、発現が減少した 188 遺伝子は光合成関連経路への濃縮が認められた。以上の結果から、生育ステージの進行に伴っていもち病に対する防御応答機構は変化することが明らかになった。

4.5. *qJA1*, *qJA2* 原因遺伝子の同定

qJA2 の原因候補遺伝子である *Os06g0650300* の *japonica* アリル、*indica* アリルおよび *indica* 型プロモーターに *japonica* 型 ORF を結合した promoter swap アリルを作成し、アグロバクテリウムを用いて T65 へ導入した。得られた形質転換体の *Os06g0650300* 発現量を定量した結果、empty vector を導入した negative control が最も低く、次いで *japonica* アリルの順となり、*indica* アリルおよび swap アリルはほぼ同等であった。これら形質転換体の第2葉葉身長を比較した結果、各形質転換体の *Os06g0650300* 発現量と高い相関を示した ($R^2 = 0.857$)。したがって、*Os06g0650300* は第2葉葉身長の制御に関与していることが示唆され、*japonica* アリルと *indica* アリル間ではプロモーター配列の違いに由来する発現量の差異がアリル間の効果の主たる原因であると考えられた。

qJA1 の原因候補遺伝子である *Os01g0907900* に関しても同様に *japonica* アリル、*indica* アリルのクローニングを行い、T65 への導入を試みたが、*Os06g0650300* とは異なり native promoter を用いても発現量が著しく向上した（約 482 倍）。そこで、*japonica* アリル形質転換体、野生型および *pla2* 変異体を用いて第2葉の表現型を比較した結果、*pla2* 変異体では葉身長が著しく減少しているのに対し、マルチコピー体では顕著に増大していた。興味深いことに、マルチコピー体では第1葉においても葉身形成が確認された。相転換のキーファクターである *miR156* の発現量を比較したところ、野生型では第2葉から第3葉にかけて発現量が減少したのに対し、マルチコピー体では第2葉において既に野生型第3葉と同等レベルまで発現量が減少しており、相転換の早期化が示唆された。したがって、*Os01g0907900*

発現量の上昇は形態的および分子的に相転換の早期化を引き起こし、**qJA1** 原因遺伝子であることを支持する結果となった。

4-6. **qJA1** が幼苗のトランスクリプトーム変動に及ぼす影響の解析

Os06g0650300 は **histone H4 acetyltransferase** をコードしており、葉の発生過程において **P3** 葉原基の葉鞘において強い発現が認められた。一方、**Os01g0907900** は **MEI2-like RNA binding protein** をコードしており、何らかの **RNA** に結合することで葉原基の成熟を阻害すると推察されるが、そのターゲット **RNA** や下流経路については不明である。そこで、**Os01g0907900** マルチコピー体、野生型および **pla2** 変異体を用いて第 **2** 葉～第 **6** 葉における葉のトランスクリプトーム解析を実施した。

各葉位を通じてマルチコピー群 vs その他サンプル群においてアップレギュレートされ、**pla2** 群 vs その他サンプル群においてダウンレギュレートされた **590** 遺伝子のうち、階層的クラスタリングによりマルチコピーで特異的に発現が上昇する **15** 遺伝子を抽出することができた。この **15** 遺伝子の中には **Os01g0907900** 自身も含まれていた。これらの遺伝子は、**Os01g0907900** の過剰発現により発現が促進される遺伝子群であると解釈された。同様に、**pla2** バックグラウンドで特異的にアップレギュレートされている **17** 遺伝子を抽出し、これらの遺伝子は **Os01g0907900** 下流で発現が抑制される遺伝子群であると解釈された。次に、**Os01g0907900** とこれらの遺伝子が関わる遺伝子発現ネットワークを特定するために、重み付き遺伝子共発現ネットワーク解析 (**WGCNA**)を行った。共発現モジュールの同定の結果、**14** の共発現モジュールが同定され、その中から **Os01g0907900** 存在下で促進的および抑制的な機能を有するモジュールを同定することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤本 源, 渡部 太緒, 荒川 恵理, 小出 陽平, 門田 有希, 寺石 政義, 伊藤 純一, 松原 健一郎, 長戸 康郎, 奥本 裕, 吉川 貴徳
2. 発表標題 イネの生育相転換に関与するqJA1, qJA2 が地域適応性に及ぼす効果
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部 太緒, 登 直也, 石井 洋人, 仁科 友希, 吉川 貴徳
2. 発表標題 イネ juvenile-adult 生育相転換を制御するQTLが幼苗のトランスクリプトーム変動に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 植物インフォマティクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takanori Yoshikawa
2. 発表標題 Transcriptome Analysis Through the Juvenile-adult Phase Transition of Rice
3. 学会等名 Online International Conference on Agricultural Sciences (招待講演)
4. 発表年 2022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
研究分担者	門田 有希 (Monden Yuki) (30646089)	岡山大学・環境生命科学学域・准教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	小出 陽平 (Koide Yohei) (70712008)	北海道大学・農学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	寺石 政義 (Teraishi Masayoshi) (80378819)	京都大学・農学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	奥本 裕 (Okumoto Yutaka) (90152438)	京都大学・農学研究科・教授 (14301)	

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