

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05980

研究課題名(和文) 野生イネが独自に持つ穂分枝制御機構の研究

研究課題名(英文) Genetic analysis of panicle branching regulators from wild rice species

研究代表者

津田 勝利 (Tsuda, Katsutoshi)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教

研究者番号：30756408

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)：花序の分枝数は種子の終了に直結する重要形質である。栽培イネ *Oryza sativa* は祖先の野生イネ *O. rufipogon* に比べ穂分枝数が多く、栽培化の過程で種子数を増加させた主要因と考えられるが、どのような自然変異に起因して分枝数が増えたのかは不明である。本研究では野生イネが持つ強力な分枝抑制因子 Uniaxial (Ux) に着目し、その分子実体と野生イネ集団内での分布、および野生イネが持つと考えられる Suppressor of Uniaxial (Su) の存在を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

野生植物の繁殖戦略において次世代に残す種子と自身の植物体維持の間で資源分配調節を行うことは重要である。本研究では野生イネが独自に持つ穂分枝抑制因子 Ux を同定した。Ux は特定の野生イネ集団内に分布する傾向があったことから、それらの自生地および生存戦略と Ux を介した資源分配が密接に関連することが考えられた。また、野生イネは Ux の作用を完全に打ち消す因子 Su も持つことが明らかとなり、資源分配を巧妙に調節するための仕組みが備わっている可能性が見えてきた。

研究成果の概要(英文)：Inflorescence branching is an important factor that determines crop yield. Domesticated rice (*Oryza sativa*) has more panicle branches compared to its wild ancestor *O. rufipogon*. However, diversity in the regulation of inflorescence branching among wild species remains elusive. Here we focused on Uniaxial (Ux), a panicle branching repressor found in *O. rufipogon*. We cloned Ux and revealed its distribution among the wild rice population. We also showed that *O. rufipogon* has Suppressor of Uniaxial (Su), which is a dominant factor that completely suppresses the Ux phenotype.

研究分野：植物発生学、育種学

キーワード：野生イネ 穂分枝制御 生存戦略

1. 研究開始当初の背景

花序の分枝数は種子の収量に直結する重要形質である。栽培イネ *Oryza sativa* は祖先の野生イネ *O. rufipogon* に比べ穂分枝数が多く、栽培化の過程で種子数を増大させた主要因と考えられる。一方野生植物の繁殖戦略においては、次世代に残す種子と自身の植物体維持の間で資源分配調節を行うことが重要である。これまでの研究で主に収量コントロールの観点から栽培イネにおける穂分枝制御機構が盛んに研究されてきた。一方、野生イネの穂分枝制御についてはどのようなメカニズムが備わっているか、特に資源分配・生存戦略の観点から研究した例はほとんどない。

代表者は、*O. rufipogon* の第9染色体の一部をもつ染色体断片置換系統 (T65 背景) が極度の穂分枝形成不全を示すことに着目した。遺伝解析の結果、単一の半顕性遺伝子 Uniaxial (U_x) が存在することが明らかとなった (以下、この系統を U_x と呼ぶ)。また、 U_x のような極度の穂分枝抑制は親系統の *O. rufipogon* において見られないため、*O. rufipogon* は U_x の抑制因子 Suppressor of Uniaxial (Su) を持つことが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、次の5つの目的を設定した。

- 1) U_x 責任遺伝子を同定し、その分子実体を解明する。
- 2) U_x ホモ個体における形態観察をおこない、穂分枝形成のどの段階が抑制されるのかを明らかにする。
- 3) U_x ホモ個体におけるトランスクリプトームデータを取得し、 U_x がどのような遺伝子経路に作用するのかを明らかにする。
- 4) 野生イネ集団における U_x 遺伝子座の多型解析をおこない、同遺伝子の集団内における分布を明らかにする。
- 5) U_x と *O. rufipogon* の交雑集団を用いた遺伝解析をおこない、Su の存在を検証する。

3. 研究の方法

1) U_x 責任遺伝子の同定

U_x 表現型を示す染色体断片置換系統と栽培イネ T65 の F2 集団を用いて、ポジショナルクローニングを行うことで、 U_x 候補領域を絞り込む。絞り込んだ領域にある候補遺伝子についてゲノム編集を用いた遺伝子破壊実験をおこなう。 U_x は半顕性の因子であるため、機能破壊により U_x の穂分枝抑制が解除され、正常な穂が形成されると期待される。

2) U_x および T65 の穂分枝形成過程における組織学的・発生学的観察をおこない、 U_x における穂分枝抑制が起こる時期を決定する。

3) U_x ホモ個体の発生異常が起こるステージにおいてレーザーマイクロダイセクションを用いた組織単離をおこない、トランスクリプトーム解析をおこなう。

4) データベースで公開されている野生イネ Whole Genome Sequence (WGS) データを用いて、 U_x 遺伝子座に存在する多型を検出する。

5) U_x と *O. rufipogon* 親系統の F2 集団を用いた遺伝解析により Su が幾つの遺伝子からなるか、顕性が潜性が等の検証をおこなう。

4. 研究成果

1) U_x の分子実体の解明

U_x 表現型を示す染色体断片置換系統と栽培イネ T65 の F2 集団を用いて、ポジショナルクローニングにより U_x 候補領域を約 30kb まで絞り込んだ。日本晴ゲノムの当該領域には2つの ORF が予測されていたためゲノム編集を用いて U_x および T65 背景においてこれら ORF の機能欠損株を作出したが、それぞれの表現型が変化することはなかったため、これら2つの ORF は U_x ではないと結論した。候補領域内の DNA プローブを用いたサザンプロットにより、同領域には T65 と U_x の間で構造多型が存在することがわかった。そこで、先進ゲノム支援のサポートを受け、*O. rufipogon* 親系統のゲノム解読をおこなった。その結果、同領域内には野生イネ特異的な 34 kb の挿入配列が存在することが明らかとなった。野生イネにおけるトランスクリプトームを取得し、遺伝子予測を行ったところ、この挿入配列内には4つの遺伝子が存在することがわかった。そこで、ゲノム編集を用いてそれぞれの機能欠損株を U_x ホモ背景で作出したところ、うち1つの遺伝子の破壊系統で穂分枝が正常に回復したため、この遺伝子が U_x であると考えられた。この遺伝子はトランスポゼース様のタンパク質をコードしていた。GFP との融合タンパク質 U_x -GFP を根端において発現させたところ、核局在を示した。 U_x ホモ個体の DNA より U_x 遺伝子領域をクローニングし、T65 背景に導入したところ、 U_x ホモ個体と同様の穂分枝抑制が起こった。以上の結果を踏まえて、 U_x がトランスポゼース様核タンパク質をコードする遺伝子であると結論した。

2) U_x における発生学的解析

生殖成長への転換期における茎頂分裂組織を固定し、透明化処理を施したのちに顕微鏡下で組織学的観察を行った。U_x では花序分裂組織からの一次枝梗原基形成がほとんど起こらず、稀に形成された一次枝梗原基からの二次枝梗原基の形成もほとんど起きないことがわかった。また micro CT 観察により、通常は枝梗原基形成後に終結する茎頂分裂組織が U_x においては維持され続けることが明らかとなった。一方で、このようなシビアな表現型の現れる頻度は栽培時期によって影響を受けることも明らかとなり、環境要因の関与が示唆された。

3) U_x の表現型に影響を与える環境要因の特定

当初の計画ではトランスクリプトーム解析により U_x ホモ個体で影響を受ける遺伝子経路を同定する予定であった。しかし、上記のように U_x 表現型が環境の影響を受けることが明らかとなったため、その要因を特定する必要が出た。単一圃場内における U_x の表現型の度合いについて調べたところ、給水口付近の水温が低い区域で栽培された個体はよりシビアな表現型を示し、水温が高い区域やバケツで栽培された個体はマイルドな表現型を示すことがわかった。そこで、冬期温室において、低水温 (18-25 度) と高水温 (25-32 度) の栽培区を設け比較したところ、低水温区でシビアな表現型が現れることが明らかとなった。

4) U_x の野生イネ集団内における分布

野生イネ WGS データを本研究で解読した *O.rufipogon* ゲノムにマッピングし、U_x 遺伝子座の Presence/Absence Variation (PAV) 解析を実施したところ、*O.rufipogon* では約 6% の系統でのみ U_x が検出されたのに対し、*O.glumaepatula*・*O. longistaminata* では 4 割を超える系統で検出された。一方、*O.meridionalis* や *O.barthii* では全く検出されなかった。前者の 3 種は多年生の系統を多く含むのに対し、後者 2 種は 1 年生であることから、繁殖戦略と U_x の関連が強く示唆された。

5) Su の検証

U_x ホモ個体と親系統野生イネとの交雑 F₂ 分離集団では、U_x 表現型が 1/4 の割合で出現したことから、Su は単一顕性の因子であることが示唆された。また、同集団を材料とした RADseq 解析により、Su は 10 番染色体に座乗する単一遺伝子座として挙動することが明らかとなった。

以上の解析により、U_x の分子実体解明・発生学的観察・野生イネ集団内における分布・Su の検証などの目的は達成された。一方、トランスクリプトーム解析については、上記環境要因の特定に時間を要したため、予定していた解析を見送らざるをえなかった。しかし、表現型を示す温度条件が絞り込めたため、より詳細な解析を行うことができるようになったことは進展である。

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 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Katsutoshi Tsuda, Toshiya Suzuki, Manaki Mimura and Ken-Ichi Nonomura	4. 巻 39
2. 論文標題 Comparison of constitutive promoter activities and development of maize ubiquitin promoter- and Gateway-based binary vectors for rice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.22.0120a	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 -
1. 著者名 Shimizu-Sato Sae et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Wild Oryza Species Using Immature Embryos	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rice	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） 10.1186/s12284-020-00394-4	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 -
1. 著者名 Kajiya-Kanegae et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 OryzaGenome2.1: Database of Diverse Genotypes in Wild Oryza Species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rice	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） 10.1186/s12284-021-00468-x	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 Sato et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Collection, preservation and distribution of Oryza genetic resources by the National Bioresource Project RICE (NBRP-RICE)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breeding Science	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） なし	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Katsutoshi Tsuda
2. 発表標題 Genetic analysis of panicle branch regulators from a rice ancestor, <i>Oryza rufipogon</i>
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津田勝利
2. 発表標題 ゲノム情報とゲノム編集が可能にする野生イネ遺伝資源の新たな利活用
3. 学会等名 日本植物生理学会
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
研究協 力者	野々村 賢一	国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・准教授	
	(Nonomura Ken-Ichi)		
	(10291890)	(63801)	

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