

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02959

研究課題名（和文）葉老化抑制による窒素施肥耐性のイネ良食味・酒造好適品種開発のための基礎研究

研究課題名（英文）Basic research for the development of good-tasting and sake-suitable rice varieties with nitrogen fertilization tolerance through leaf senescence suppression

研究代表者

草場 信（Kusaba, Makoto）

広島大学・統合生命科学研究科（理）・教授

研究者番号：20370653

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：イネにおける葉老化抑制は穀粒への窒素転流の抑制に繋がるため、十分な窒素施肥栽培下での食味や酒米の品質向上に貢献すると考えられる。葉老化制御因子とされるNAC転写因子のうち5つ老化誘導性遺伝子をCRISPR-Cas9システムにより多重破壊した系統を作製した。そのうちNBL1の破壊は一種の雄性不稔を生じさせたため、残り4つの多重破壊株を作製したが、顕著な葉老化抑制は見られなかった。また、化学変異剤により作出した葉老化遅延変異体dye3の原因遺伝子をMutMap法によるポジショナルクローニングにより単離した。候補遺伝子は一つに限定されたが、今後、形質転換を用いた相補実験による証明が必要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネ穀粒中のタンパク質の高蓄積は食味や酒米の品質を低下させる。穀粒中の窒素の40～70%は老化葉からの転流によりもたらされるため、葉老化の抑制は十分な窒素施肥栽培下での食味や酒米の品質向上に貢献できると考えられる。本研究では、老化誘導性転写因子のゲノム編集による破壊や葉老化遅延突然変異体の原因遺伝子の単離を行った。これらの研究は基礎研究として高品質・多収イネ品種育成に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In rice, the suppression of leaf senescence can inhibit the translocation of amino acids to the grains, which is thought to contribute to the improvement of taste and the quality of sake rice under sufficient nitrogen fertilization. We created a strain that multiplies the destruction of five senescence-inducing NAC transcription factors, which are believed to play a crucial role in the regulation of senescence, using the CRISPR-Cas9 system. Among them, it was found that disrupting NBL1 causes a kind of male sterility, so we created strains in which the remaining four were disrupted, but no obvious senescence suppression was observed. In addition, we tried isolating the causative gene of the delayed leaf senescence mutant dye3, which was created by a chemical mutagen, by positional cloning using the MutMap method. The candidate for the causative gene has been narrowed down to one, but it will be necessary to prove it by complementation experiments in the future.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：イネ ステイグリーン ゲノム編集 突然変異体

1. 研究開始当初の背景

イネ栽培における窒素施肥は収量の増加をもたらす一方、穀粒中のタンパク質含量の増加により食味や酒米適性を損なう可能性がある。デュラムコムギのステイグリーン系統 *nam-b1* では葉からの窒素分の転流の減少によりタンパク質含量が約 30%減少することが報告されており (Cristobal et al., 2006)、窒素施肥を行っても穀粒タンパク含量増加を抑制できる可能性が考えられた。*NAM-B1* の機能的オースログはイネには複数存在すると考えられたが、そのうちのひとつの遺伝子の RNAi 形質転換体はステイグリーン表現型を示すとともに、収量も増加するという報告がある (Liang et al., 2014)。また、本課題の申請年度に農林水産省等から外来遺伝子を除いた SDN-1 型ゲノム編集体は審査を経れば遺伝子組換え生物として取り扱わないとの方針が示された。したがって、ゲノム編集による *NAM-B1* の機能的オースログの多重変異体を作成すれば、それを社会実装につなげていくことが可能と考えられた。

2. 研究の目的

穀粒中のタンパク質含量は食味の低下や酒米の品質を低下させることが知られている。そのため、イネ栽培では一般に窒素施肥は抑えられる。しかし、窒素分の施肥は分けつ数(穂数)、1穂粒数の増加をもたらすことから、低窒素栽培下では高い収量は望めない。また、高品質の日本酒の醸造のためには、原料である酒米のタンパク質含量が低いことが必要である。それら問題の解決には、窒素施肥を十分に行っても穀粒中のタンパク質含量の増加を抑制できる品種の育成が有効と考えられる。穀粒中の窒素の 40~70%は老化葉からの転流によりもたらされる (Mae et al., 1981) ことから、「葉の老化抑制による窒素転流抑制」によりそのような品種育成が可能と考えた。デュラムコムギには緑色保持(ステイグリーン)系統が知られているが、この系統は普通系統に比べて穀粒中のタンパク質含量が約 30%低い (Cristobal et al., 2006)。そこでイネに存在する複数の *NAM-B1* の機能的オースログをゲノム編集により変異を導入することでステイグリーン系統を育成することを企図した。また、化学変異剤により誘発されたステイグリーン突然変異体を複数得ていたことから、その原因遺伝子の単離を試みた。

3. 研究の方法

イネ品種日本晴を用いて 5 つの老化誘導性 NAC 転写因子のマルチターゲット CRISPR-Cas9 ベクターによる同時破壊を試みた。突然変異体の次世代シーケンシングによるリシーケンスはイルミナ社 HiSeq により行った。*dye3* 変異体は NMU を用いて日本晴から作成された突然変異集団から単離された。MutMap 解析は *dye3* 変異体と日本晴を交雑した F₂ 集団から 20 個体の変異体バルクと 20 個体の野生型バルクを用い、Sugiura et al. (2022) (<https://github.com/YuSugihara/MutMap>) に従って行った。クロロフィル含量は SPAD メーターを用いて簡易的に測定した。qRT-PCR は KAPA SYBR Fast qPCR kit により QIAGEN Rotor-Gene を用いて行った。

4. 研究成果

1. ゲノム編集による老化誘導性 NAC 転写因子群多重変異体作成

老化誘導性 NAC 転写因子 NBL1~NBL5 (NBL4 は OsNAP) を標的に CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を用い、五重変異体の作製を試みた。このうち、NBL2 と NBL3 は極めて相溶性が高いため、共通の gRNA とし、マルチターゲット CRISPR-Cas9 ベクターに 4 つの gRNA を同時導入した。10 個体の形質転換体を得、NBL1~NBL5 における変異を調査したところ、そのうち 1 系統 (#4) は NBL1 が CDS 上の 1 塩基挿入のホモ接合、NBL2、NBL3、NBL4 が CDS 上の 1 塩基挿入の biallelic になっており、NBL5 はヘテロであった (図 1)。しかしながら、この個体は不稔であり、自殖後代を得ることが出来なかった。10 系統のうち、#4 を含む 9 系統が不稔性を示したが、9 系統全てで NBL1 が変異型ホモあるいは biallelic になっていた。#2 系統は、他の NBL に変異がなく唯一 NBL1 がヘテロであり稔性があったため、後代(M₂)を解析したところ、NBL1 変異型ホモ個体は稔性が無かったが、ヘテロ個体および野生型ホモ個

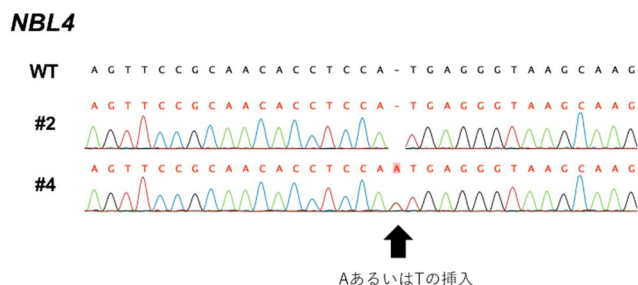


図1. CRISPR-Cas9によるNBL4のゲノム編集の例

体は十分な稔性を示した。さらにこのヘテロ個体から **M₃** 個体を得て、**NBL1** 遺伝子型と稔性の関係を調べたところ、野生型ホモ接合・ヘテロ接合・突然変異型ホモ接合個体は **3** 個体・**5** 個体・**3** 個体であり、その表現型は、それぞれ可稔・可稔・不稔となった。したがって、**NBL1** の機能喪失変異は潜性で不稔性をもたらすと考えられた。

一方、変異体型 **NBL1** をホモに持つ #4 を母親に、野生型を花粉親にした交配では交雑個体が得られたが、逆交配では得られなかったことから、**nbl1** 変異体の不稔性は雄性機能の不全によるものと推測された。また、ヘテロ個体から変異型ホモ個体を得られることから、**NBL1** の機能は配偶体ではなく、孢子体で働いていると考えられた。なお、**NBL1** ノックアウト個体は完全に稔性はないが、高頻度ではないものの胚珠が膨らみ、中は液体が満たされていた。このような現象は受粉時に花粉管と胚嚢との融合はあるが、受精が正常に行われない時に起こるとされる。**NBL1** の機能解析がイネの受精過程の解明に貢献することが期待される。

NBL1 以外の **NBL** 遺伝子が全て機能喪失ホモ接合になっている系統を作成するために、#4 系統に日本晴を交雑した系統の自殖により **F₂** 集団を得た。遺伝子型解析の結果、**NBL2**、**NBL3**、**NBL5** は変異型ホモであり、**NBL4** に関しては **biallelic** である系統を得た。しかしながら、この系統は自然老化の過程では顕著な老化遅延は見られず、後代での詳細な研究が必要と考えられた。

2. スティググリーン変異体 **dye3** の原因遺伝子の単離

既に得られている日本晴由来の化学変異剤誘発スティググリーン変異体について **HiSeq** によるリシーケンスを行った。そのうち、既知のスティググリーン遺伝子の変異体は解析から外し、新奇スティググリーン変異体と考えられた **dye3** の原因遺伝子の探索を行うことにした。**dye3** は暗黒処理による葉老化進行は野生型と差はなかったが、自然老化時には葉の黄変が遅れた (図 2)。

次にポジショナルクローニングによる **DYE3** の単離を目指した。**dye3** と日本晴との **F₂** 集団約 **100** 個体を圃場で展開し、表現型を観察した。そのうち、スティググリーン表現型を示した **20** 個体および野生型表現型個体 **20** 個体をそれぞれバルク化し、**MutMap** 解析を行った (図 3)。その結果、スティググリーン表現型バルクでは **SNP** インデックスが有意に高い領域が検出されたが、野生型バルクではこの領域の **SNP** インデックスは高くなかった。したがって、この領域に **DYE3** が存在すると考えられた。さらにこの領域に焦点を当て **F₂** 分離集団約 **800** 個体を用いて高精度マッピングを行った。リシーケンスデータにより得られた多型情報から、候補領域のすぐ外側に **dcAPS** マーカーを作成し、この領域内で組換えが生じている個体を **12** 個体選抜した。それらの個体において、この領域に設定した **DNA** マーカーの型と表現型を検討し、候補領域を **430kb** に絞り込んだ。さらにこの領域内には **13** の塩基置換が存在していたため、この **430kb** 内で組換えが起きていると考えられる個体について塩基配列決定を行ったところ、原因と考えられる変異を **2** つに絞り込むことができた。そのうちひとつはある酵素遺伝子のアミノ酸置換を起こす塩基置換であり、もう一方はその遺伝子のプロモーター上の変異であった。**2** つの変異のうちどちらが原因であるかを推定するために、**dye3** 変異体におけるこの遺伝子の発現を検討したところ、健全葉、老化葉ともに遺伝子発現に大きな差が見られなかったことから、この酵素タンパク質のアミノ酸置換が遺伝子の機能喪失を引き起こし、スティググリーン表現型を示したと考えられた。今後、形質転換による相補実験を行うことでこの遺伝子が **DYE3** であることを証明する必要がある。

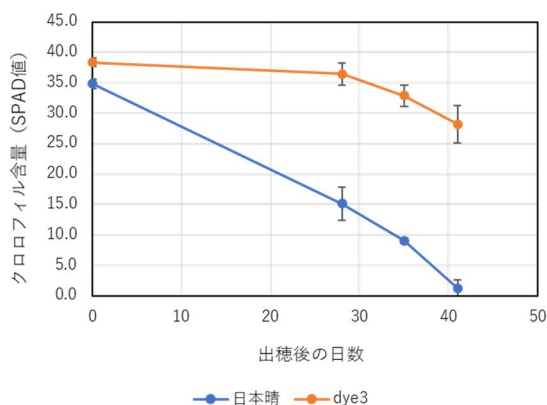


図2. **dye3**における自然老化時の止葉クロロフィル量の変化

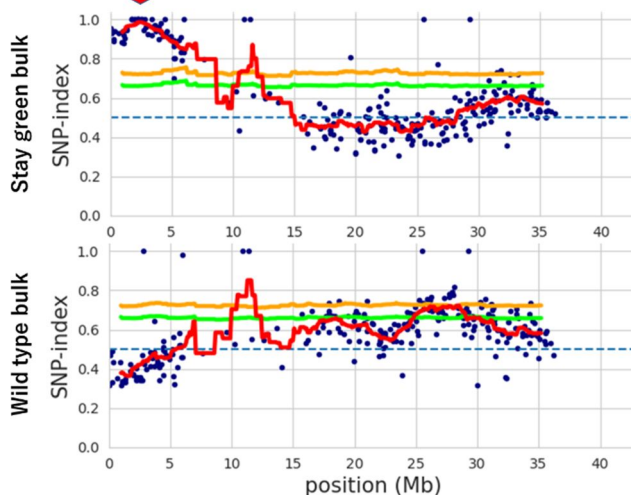


図3. MutMap法による **DYE3** のマッピング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	信澤 岳 (Nobusawa Takashi) (40814463)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・助教 (15401)	
研究分担者	伊藤 岳 (Ito Takeshi) (30636139)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・特任助教 (15401)	削除：2022年3月7日

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