

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：81202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20584

研究課題名（和文）OsmADS18の遺伝子重複がイネ育種に与えた生理形態学的意義の解明

研究課題名（英文）Physiological and Morphological Significance of OsmADS18 Gene Duplication in Rice Breeding

研究代表者

野村 ちひろ（NOMURA, Chihiro）

公益財団法人岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・契約研究員

研究者番号：70965384

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では重複配列を標的としたゲノム編集を行うことで、遺伝子のコピー数を改変する技術を確立した。遺伝子重複の有無は通常のPCR法による識別が可能な一方、遺伝子重複の存在がホモかヘテロかの識別はこれまで困難であったが、本研究では定量PCRを応用することにより、上述の識別を可能にする方法を確立した。これらの方法を使用し、OsmADS18遺伝子コピー数の異なるイネを作成し、比較した結果、転写量や植物形態に差異が生じた。これらのことから、OsmADS18の遺伝子コピー数多型はイネ育種において重要なアレルであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作物の育種に利用されてきた遺伝学的変異の多くは一塩基多型やInDelによるものであり、遺伝子コピー数が農業上有用な形質を変化させるという事例は、これまでほとんど報告されてなかった。本研究では、ゲノム編集を用いてイネの転写因子であるOsmADS18の遺伝子コピー数を人為的に改変することに成功し、OsmADS18のコピー数の違いがイネの形態を制御しているということを明らかにした。本研究結果は、従来見落とされていた農業上重要なコピー数変異が、イネ育種において利用可能なアレルであることを示すとともに、遺伝子コピー数を改変することで、人為的にイネの成長を制御できることを実証した。

研究成果の概要（英文）：In this study, a method was established to manipulate gene copy number using genome editing that target duplicated sequences. Although the presence or absence of gene duplication can be detected by the conventional PCR method, it has been difficult to determine whether the gene duplication is homozygous or heterozygous. In this study, a method was established to enable the above discrimination by qPCR. Using these methods, genome-edited rice with different copy numbers of the OsmADS18 gene were generated and compared, resulting in differences in transcript levels and plant morphology. Therefore, it was suggested that the MADS18 gene copy number variation is an important allele in rice breeding.

研究分野：植物育種学

キーワード：コピー数多型 遺伝子重複 ゲノム編集 MADS18 イネ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

所属研究グループでは、独自に確立したイネの Nested Association Mapping (NAM) 集団を利用した量的形質遺伝子座 (QTL) 解析を用いて、第7染色体に植物の形態形成に関する QTL を同定した。さらに、Nanopore sequencing によるロングリードを用いた *de novo* アセンブリを実施した結果、QTL のピークの近傍に *OsMADS18* を含むゲノム領域がタンデムに重複している品種が存在することを明らかにした。先行研究では、*OsMADS18* の過剰発現がイネの分けつ数を減少させることが報告されている (Yin et al., 2019)。これらのことを踏まえ、*OsMADS18* の遺伝子重複はその発現量を変化させ、植物の形態形成に影響を与えていることが予想された。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集を用いることで *OsMADS18* のコピー数を改変したイネを作出する。作出された植物体を用いて、*OsMADS18* のコピー数の違いが遺伝子発現量および形態形成に及ぼす影響について評価する。品種の来歴を辿ることで *OsMADS18* 遺伝子重複の由来について調査する。

3. 研究の方法

(1) ゲノム編集を用いたコピー数多型の操作

CRISPR/Cas9 により、*OsMADS18* のコピー数を標的としたゲノム編集個体を作成した。リアルタイム PCR 法と Nanopore sequencing を用いて、作成した個体の *OsMADS18* のコピー数を解析した。

(2) *OsMADS18* コピー数多型の遺伝子発現解析および形質調査

ゲノム編集によって *OsMADS18* のコピー数を改変した植物の中から、世代促進によってゲノム上の *OsMADS18* コピー数がヘテロで存在するヌル分離個体を選抜した。その個体の後代を用いて、*OsMADS18* の遺伝子発現解析および形態形成に関する形質調査を実施した。

(3) *OsMADS18* 遺伝子重複の祖先の解析

所属機関が保有するイネの全ゲノムシーケンスデータから *k*-mer 解析を用いて、*OsMADS18* の遺伝子重複を有する品種を選抜した。選抜した品種の祖先をジーンバンクから入手し、遺伝子重複の有無を PCR 法によって調査し、*OsMADS18* 遺伝子重複の祖先を探索した。

4. 研究成果

(1) ゲノム編集を用いたコピー数多型の作出

これまで遺伝子重複の有無は通常の PCR 法による識別が可能な一方、遺伝子重複がホモかヘテロかの識別は困難であった。本研究では、遺伝子コピー数を定量して上述の識別を可能にするリアルタイム PCR 法を確立した。この手法を用いて、作出されたゲノム編集個体の *OsMADS18* コピー数を定量した結果、狙い通りにコピー数が改変されていることが推定される個体が得られた。これらの中からコピー数がヘテロのヌル分離個体を選抜し、その後代のコピー数の分離比を上述のリアルタイム PCR 法を用いて調査した結果、メンデルの法則に従って約 1:2:1 に分離していることが明らかになった。これらの個体について、Nanopore sequencing を実施した結果、*OsMADS18* のコピー数が改変された植物が得られたことが確認された。

(2) *OsMADS18* コピー数多型の遺伝子発現量と形質の関連性

上述の *OsMADS18* コピー数がヘテロのヌル分離個体の後代を用いて、遺伝子発現解析と形態形成に関する形質調査を実施した。出穂前の植物体から RNA を採取し、qRT-PCR 法により *OsMADS18* の遺伝子発現量を解析した結果、遺伝子のコピー数と発現量の間には関連があることが観測された。植物形態について形質調査を実施した結果、遺伝子のコピー数と形態との間にも関連があることが観測された。これらのことから、*OsMADS18* のコピー数多型は遺伝子発現量および形態形成に影響を及ぼすことが示唆された。

(3) *OsMADS18* 遺伝子重複の祖先

先行研究の *in silico* 解析では、*OsMADS18* の遺伝子重複は、調査したアクセッションの内、温帯ジャポニカ型のイネにのみ存在していたことが報告されている (Qin et al., 2021)。そこで本研究では、所属機関が保有する日本のイネの全ゲノムシーケンスデータから *k*-mer 解析を用いて、*OsMADS18* の遺伝子重複を有する品種を選抜した。イネ品種・特性データベース検索システム (<https://ineweb.narcc.affrc.go.jp/>) を用いて選抜した品種の来歴を辿ると、多くの品種で育成品種の「農林6号」に辿り着いた。そこで、「農林6号」の祖先品種を更に検索し、それらの品種を農業生物資源ジーンバンク (https://www.gene.affrc.go.jp/index_ja.php) から取得し、重複領域の有無について PCR 法を用いて調査した。その結果、「農林6号」の親にあたる在来品種の「上州」が *OsMADS18* の遺伝子重複を有していることが示唆された。

(4) 研究成果の社会的および学術的意義

これまでゲノム編集は主に遺伝子のノックアウトのために使用されることが多かったが、本研究ではCRISPR/Cas9によって遺伝子のコピー数を改変できることを実証した。また、これまで作物の育種の利用されてきた遺伝学的変異は一塩基多型や InDel が多かったが、本研究ではコピー数多型がイネの表現型を制御していることを実証した。本研究で得られた成果は、コピー数多型を人為的に改変し利用するといった新たな作物育種の選択肢を提供するものである。

<引用文献>

- Yin, X., Liu, X., Xu, B., Lu, P., Dong, T., Yang, D., Ye, T., Feng, Y.-Q., & Wu, Y. (2019). OsMADS18, a membrane-bound MADS-box transcription factor, modulates plant architecture and the abscisic acid response in rice. *Journal of Experimental Botany*, 70(15), 3895-3909.
- Qin, P., Lu, H., Du, H., Wang, H., Chen, W., Chen, Z., He, Q., Ou, S., Zhang, H., Li, X., Li, X., Li, Y., Liao, Y., Gao, Q., Tu, B., Yuan, H., Ma, B., Wang, Y., Qian, Y., ... Li, S. (2021). Pan-genome analysis of 33 genetically diverse rice accessions reveals hidden genomic variations. *Cell*, 184(13), 3542-3558.e16.

<謝辞>

本研究で解析に使用したイネ品種の一部は、農業生物資源ジーンバンクより提供いただいた。

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

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