

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580033

研究課題名(和文) イネの炭水化物蓄積能を決定する遺伝子座RG5の機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of RG5, a locus determining carbohydrate accumulation capacity in rice

研究代表者

石丸 健 (Ishimaru, Ken)

独立行政法人農業生物資源研究所・植物生産生理機能研究ユニット・上席研究員

研究者番号：80370641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：イネは栄養生長期に体内に光合成産物である炭水化物を蓄積する。この炭水化物は米の形成に利用されるため、蓄積能を向上させることは収量増に向けた主要なターゲットである。本研究では、蓄積能を高める染色体領域RG5の機能解析を通じて、最上位に位置する止葉から下二葉の葉面積拡大がRG5の蓄積能を決定する要因であり、遺伝学的な手法により葉面積の拡大ひいては蓄積能を改良することが可能であることを実証した。発現調節に関わる遺伝子の塩基の違いがRG5のアリルを決定する要因であると考えられた。また、RG5が近年の大気二酸化炭素濃度の上昇による必須元素の減少を抑える作用があることを明らかにした。v

研究成果の概要(英文)：In rice, the source capacity is estimated as the total quantity of carbohydrate available. Greater capacity to accumulate carbohydrate is the main target for increasing rice yield potential. RG5 is a locus responsible for increased yield potential across the genetic background by improvement in carbohydrate storage capacity. In this study, our results showed that expansion of leaf area of two leaves below a flag leaf improved storage capacity of RG5. Additionally, it is suggested that a transcriptional control gene might be the main candidate gene for RG5. Under the FACE condition, the content of protein and S significantly decreased in grains from "Koshihikari"; by contrast, a chromosomal segment substitution of RG5 was found to maintain protein and S content. Thus, our results proved that the improvement in retranslocation by higher carbohydrate storage capacity might be the main target to diminish the elemental decline in grains grown under elevated CO2 condition.

研究分野：作物整理学

キーワード：イネ 収量特性 登熟 QTL

### 1. 研究開始当初の背景

アジア地域における爆発的な人口増が予測され、主食である米の飛躍的な収量増が求められている。イネの収量は主にシンクサイズとソース能により決定される。既に粒数や粒形等のシンクサイズに関与する複数の遺伝子が特定されており(例：石丸ら、特許 2008;2009)、シンクサイズの拡大は現実のものとなってきている。一方で多くの近代品種では、シンクサイズに比べソース能が同等かむしろ低く(Mann CC, Science 1999)、シンクサイズの一方的な拡大は必ずしも収量性向上に繋がらない。そのためソース能を向上させていくことが収量性を飛躍的に高めるための鍵となる。

イネは、止葉による合成に加え出穂前の植物体蓄積に由来する2つのソースを有している。止葉の合成能は面積当たりの光合成能により決定されるが、光合成能の改良は不可能とされていた。植物体に蓄積した炭水化物量は収量の3割を決定し、長期間にわたり蓄積するため環境要因の影響を受けにくく、冷夏等の悪環境条件下では重要性が増す。日印間の超多収F<sub>1</sub>ハイブリットライスの解析により、高い蓄積能が多収の要因であることが報告されており(Song et al., Jpn J Crop Sci 1990)、蓄積能の向上がソース能改良に向けた主要なターゲットと考えられてきた。私達の研究グループは、主に蓄積を担う葉鞘一枚の中に機能分化が存在し、上部は炭水化物の転流、下部が蓄積を担っていること(Ishimaru et al., PPB 2004)、出穂前後で関与する遺伝子群が大きく異なること(Takahashi et al., Breed Sci 2005)を明らかにしてきた。これらの研究に見られるように、炭水化物の蓄積は複雑な機構により制御されているため、重要性が古くから認識されているにも関わらず蓄積能を決定する遺伝生理学的な要因並びに改良に向けた具体的な方策は明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

蓄積能の制御要因解明に向けて、私達は第一段階として出穂前の炭水化物蓄積量に関わる遺伝子座(QTL)解析を進め、蓄積能を1.5倍に増加させ、その結果として登熟歩合を高めるQTL(RG5)を特定した。これらの結果は、蓄積能が遺伝学的に決定され人為的に改変可能であることを示している。

本研究では、RG5の作物生理学的な機能解明:「RG5はどのように炭水化物の蓄積量を増加させるのか」と並行してRG5の候補遺伝子の絞り込みを行い、蓄積能を決定する

要因の理解ひいては改良に向けた知見を得る。

### 3. 研究の方法

#### 1) RG5の機能解析

予備的解析により、カサラスのRG5を有すコシヒカリ染色体断片置換系統(SLRG5)において、主に蓄積を担う葉鞘では物理的な変化無しに蓄積能(デンプン含量)が2倍に増加することを明らかにしている。一枚の葉鞘内に機能分化が存在し、関与する酵素の遺伝子発現量や活性も大きく異なることから、蓄積量の増加の要因として2つの仮説(蓄積部位の増加、蓄積量の増加(図1.参照))が考えられる。先ず仮説の

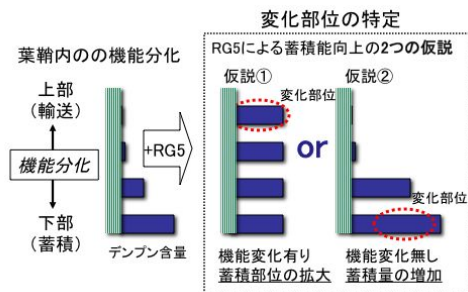


図1.RG5の作用特性に関する作業仮説

検証に向けて、葉鞘を分割し各部位の蓄積量の測定から、蓄積の増加をもたらした変化部位の特定を試みた。次に特定部位を用いて、炭水化物の転流とデンプン合成の観点から蓄積能の向上を引き起こす要因を解析した。

#### 2) RG5の原因遺伝子の特定に向けて

RG5の候補領域の両端にDNAマーカーを作出し、4,000個体の中から領域内で組換えが生じた系統を選抜した。これら系統の自殖交配後代の中からホモ系統を選抜し、田圃で栽培し、表現型と遺伝子型からRG5の存在領域の矮小化を行った。

#### 3) RG5が高二酸化炭素条件下における玄米のミネラル含量低下へ影響の解析

他の環境要因はそのまま、二酸化炭素濃度のみ上昇させることができるつくばみらい市の開放系高二酸化炭素濃度増加施設でコシヒカリとSLRG5の栽培を行い、玄米に含まれる元素量を測定した。

#### 4. 研究成果

##### 1) RG5 の作用特性

コシヒカリと SLRG5 の葉鞘を 5 分割し各部位の蓄積量の測定を行った。その結果、デンプン含量は各部位において増加していた。上部から基部にかけて下にいくほど蓄積量が増える傾向は変わらなかった。このことから、RG5 による葉鞘全体で蓄積量が増加したのは、仮説 の機能分化に変化が生じ蓄積部位が増加したのではなく、仮説 の部位当たりの蓄積量の増加に起因することが明らかになった。

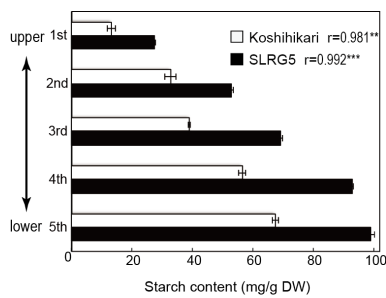


図 2. RG5 による炭水化物増加

出穂前の植物体における主要な蓄積器官である葉鞘において、顆粒性デンプン合成酵素  $\beta$  (GBSSII) とブランチンゲンザイム (BEIIa) がデンプン合成の鍵酵素であり、転写レベルで活性が制御されている。分割した葉鞘を用いて、この 2 つの鍵酵素の発現量を比較した。(図 3)。他の部位においても同様の結果であった。これらの結果は、RG5 による蓄積能の向上は、蓄積器官のデンプン合成能に因るのではなく、炭水化物供給能によることを示している。

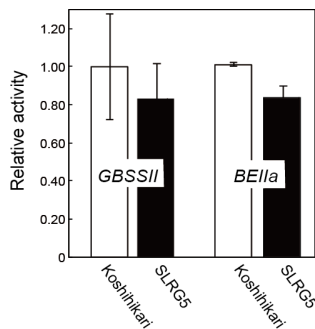


図 3. 葉鞘下部におけるデンプン合成関連遺伝子発現量の比較

コシヒカリに比べ SLRG5 の葉鞘に接続する葉身の面積は 1 割以上大きくなっていった (図 4)。一方で光合成特性に違いは見られ

なかった。これらの結果から、RG5 による蓄積能の向上は蓄積能ではなく、供給能の向上により、もたらされると考えられた。

最も炭水化物を多く蓄積する止葉下の 2 葉の葉面積拡大に加え受光態勢の向上を含め光合成能を維持することが蓄積能ひいてはソース能向上に向けたターゲットと考えられた。実際、Nona Bokra から見出した下位部の葉面積を拡大する QTL を有すコシヒカリ CSSL でも RG5 と同様に炭水化物蓄積が有意に増加していた。研究を通して、蓄積能の制御要因ならびに改変に向けた具体的なターゲットを示し、人為的に改変可能であることを実証することができた。

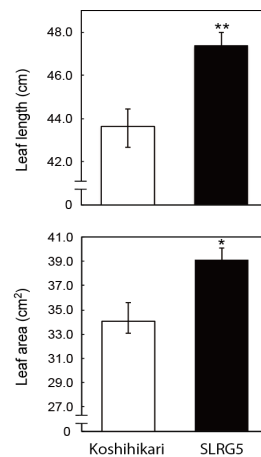


図 4. 下位部葉身の長さ及び面積 2) RG5 の原因遺伝子の特定に向けて

##### 2) RG5 の原因遺伝子の特定に向けて

RG5 の候補領域の両端に DNA マーカーを作出し、4,000 個体の中から領域内で組換えが生じた 5 系統を選抜した。この 5 系統の自殖交配後代の中からホモ系統を選抜し、田圃で栽培した。これら系統の表現型と遺伝子型から RG5 の存在領域を 2M から 750kb に狭めた (図 5)。

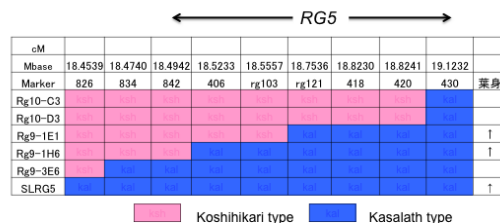


図 5. RG5 の領域の矮小化

27年度も同様な方法を用いて、RG5の存在領域を前年度の750kbから約250kbに絞り込んだ。ゲノムシーケンスによるアノテーションの結果から、この領域には15個の遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子に関して文献情報により機能を調べた結果、発現制御に関わるある遺伝子は機能を失うことで登熟障害が生じることが分かった。この遺伝子のORF領域をシーケンスし、コシヒカリとカサラス間で配列を比較したところ、コシヒカリのORFには一塩基の欠損があり、その結果ストップコドンが生じ完全タンパク質が作られないことが明らかになった。更にこの遺伝子は3個の遺伝子がタンデムに並んでいたが、遺伝子が壊れているのは一個だけだった。これらの結果から、この遺伝子がRG5の原因遺伝子であり、コシヒカリで完全タンパク質が減少することがアレルを決定する要因で有ると推測している。今後組換え体を作成し証明する。

3) RG5の転流特性の向上が高二酸化炭素下での玄米に含まれるミネラル量低下に及ぼす影響

近年の温暖化に伴う大気二酸化炭素濃度の上昇は穀類並びに豆類の可食部に含まれる必須元素の量の減少を引き起こす。2014年に米国のMyersらにより、50年後には数十億人がこの被害により健康を害す可能性が有ることが発表され、早急に具体的な対策方法を確立することが求められていた。

研究開始時の計画にはなかったが、玄米における蓄積量低下の要因を明らかにし、対応に向けた知見を得るために、移植から田植えまでの期間を通じて、これらの元素がどのように転流し蓄積するのか解析した。その結果、高二酸化炭素条件下では他の器官からの再転流量が減少することが、玄米における蓄積量を低下させる要因で有ることが明らかになった。植物では蓄積した元素は、炭水化物と共に別な器官に運ばれる。これらの結果から、炭水化物転流を増加させることで、高二酸化炭素条件下における元素の再転流については蓄積量を増加させることができるのではないかと推測された。炭水化物の蓄積、転流量を増加させるRG5を導入したコシヒカリ準同質遺伝子系統を用いて、この仮説の実証を試みた。

準同質遺伝子系統を高二酸化炭素濃度下で栽培し、玄米に含まれる窒素と硫黄含量を測定したところ、両元素とも有意な減少が見られなかった(図6)。これはRG5によ

る炭水化物の転流量の増加に伴い、他の器官から硫黄、タンパク質の再転流量が増加したためと推測された。加えて、有用なアレルの導入による転流特性の改変が、大気二酸化炭素濃度上昇に伴う必須元素の減少を回復させるための解決策として有望であることが明らかになった。

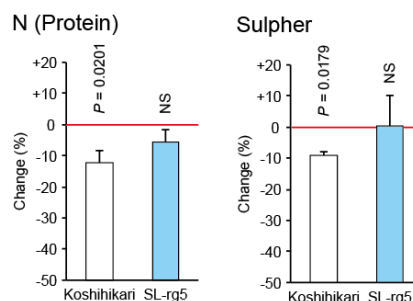


図6. 高二酸化炭素条件下でRG5の導入が玄米に含まれる窒素及び硫黄含量に及ぼす影響

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Ujiie K, Ishimaru K (2014) Alleles affecting 30 traits for productivity in two japonica rice varieties, Koshihikari and Nipponbare (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science* 17(1):47-65

Ujiie K, Yamamoto T, Yano M, Ishimaru K (2015) Genetic factors determining varietal differences in characters affecting yield between two rice (*Oryza sativa* L.) varieties, Koshihikari and IR64. *Genetic Resources and Crop Evolution* (in press).

石丸健, 氏家和広 (2014) イネの粒形制御に関わる遺伝子の単離とその作用. *日本作物学会紀事* 83(4):299-304

[学会発表](計1件)

氏家和広, 石丸健 (2012) IR64/コシヒカリ//コシヒカリ染色体断片置換系統群を用いたソース能に関する染色体領域の解析. *日本作物学会紀事* 81(別2):324-325

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

石丸 健 (ISHIMARU KEN)

農業生物資源研究所・植物生産生理機能研究ユニット

研究者番号: 80370641