

遺伝学的解析手法を取り入れたイネの収量及び関連形質の制御機構に関する研究

石丸健 (農研機構 次世代作物開発センター)・柏木孝幸 (宇都宮大学農学部)・廣津直樹 (東洋大学生命科学部)

イネは全世界人口の1/3を支える最も重要な作物である。アジア地域の人口増に対応するために主食であるイネの収量を高めることは喫緊の課題である。1990年代にスタートしたイネゲノム研究により、シーケンスデータに加え多数のDNAマーカーや遺伝解析素材が開発された。98年から石丸・柏木・廣津氏(以下、三氏)の研究グループは作物学が培ってきた知識や解析技術と遺伝学的解析手法を融合し、イネの収量及び関連形質を制御する機構の解明を進めてきた。その結果、多くの形質に関わる量的形質遺伝子座(QTL)を一つの染色体(連鎖)地図上に位置付け、収量や個々の形質間の連鎖関係を網羅的に示す機能地図の作出、準同質遺伝子系統(NIL)を用いた機構解明や遺伝子単離、耐倒伏性向上のための新しいターゲットの提示等の多くの成果をあげた。三氏の研究は以下のように要約される。

1. 網羅的解析による機能地図の作成

収量等の農業形質は複数の遺伝子により決定される量的形質であり、DNAマーカーとの連鎖を利用することで、形質を決定する要因に分解し連鎖地図上に量的形質遺伝子座(QTL)として位置づけることができる。彼らが研究を開始した当時、ほとんどのQTL解析では対象とする形質が数種類に限定されていた。三氏は、多様な農業形質に関わるQTLsを一つの連鎖地図上に位置づけた「機能」地図(Function map)を発表し、様々な表現型(形質)を対象として形質間の遺伝学的関係を網羅的に解き明かし全体像を示す研究(フェノミックス)の重要性を先駆的に提言した(業績1)。また、当時育種学分野では解析対象にされていなかった穂揃い期間の長さや $\delta^{13}C$ 値等の作物学にとって重要な13形質を含む30形質に関わるQTLを見出した(業績1-4)。

2. NILsを用いた機能解明

次に三氏は、収量及び関連形質をQTLとして位置づけ、均一な遺伝的背景を有すNILsを作物学の視点や手法を用いて解析することで制御機構を解き明かしていった。以下、成果を形質毎に示す。

2.1. 収量・構成要素

三氏は、3年分のデータを用いて収量及び構成要素に関与するQTLを位置づけた(業績5, 6)。ほとんどのQTLは環境要因に強く影響されたが、安定的に千粒重を増加させるQTL(TGW6)を見出した。NILを用いた解析の結果、TGW6はシンクとソース両方で作用すると考えられた。次に、TGW6の機能については千粒重決定機構を解明するために分子レベルでの解析を行った。原因遺伝子の単離には大量サンプルの遺伝子型を特定する必要があるが、時間、労力、コストがかかり研究を律速していた。三氏は蛍光分析とアレル特異的プライマーを組み合わせて、高速・低コストかつ設計の自由度が高い判別法を確立した(業績7)。この判別法により原因遺伝子をインド来種「カサラス」から特定し、その機能解析を行った(業績8)。TGW6は、インドール-3-酢酸(IAA)-グルコース加水分解活性を有する新規タンパク質をコードしていた。日本晴の対立遺伝子*tgw6*は、IAAの供給を制御してシンチウム(多核体)形成期から細胞分裂期への移行タイミングに影響を与えることにより、胚乳細胞数及び粒長を抑制していることを明らかにした。また、ソース能も抑制していた。一方、カサラスの対立遺伝子TGW6は機能欠失型変異を持つため、シンクとソース両器官において抑制作用が働かず、粒重については収量増をもたらすことを明らかにした。彼らが見出したTGW6は現在ゲノム育種やゲノム編集のターゲットとして活用されている(参考1)。更に小麦からも同祖遺伝子が発見されるなど広く注目を集めている(参考2, 3)。

2.2. ソース能・転流

イネは、止葉等の上位葉による炭水化物生産と出穂前に稈・葉鞘に蓄積した炭水化物の再転流に起因する2つのソースを有している。ルビスコ含量とその窒素に対する比率を高めることや気孔数の増加は止葉の光合成についてはソース能を改善する上で重要である。三氏は単位面積当たりのルビスコ含量および窒素に対するルビスコ含量比を変化させるQTLや止葉の裏と表の気孔数それぞれに関わるQTLを見出した(業績9, 10)。QTLが存在することは光合成能の向上が期待されるこれらの形質が遺伝学的に制御可能であることを示している。一方、収量を増加させるには群落全体の乾物生産能力を高めることが重要であるが、群落光合成に関わる遺伝学的研究はほとんど行われていなかった。三氏は、止葉の光合成能に直結する窒素含量を高めるQTLの原因遺伝子が既知の葉幅を細くする遺伝子*NALI*であり、下位葉の老化を抑え群落光合成を向上させることを明らかにした(業績11)。炭水化物の出穂前蓄積に関しても、主に蓄積を担う葉鞘一枚の中に機能分化が存在し、ほとんど蓄積しない上部は光合成に関わる遺伝子群の発現が高く、蓄積する下部ではデンプン合成に関わる遺伝子群の発現が高いことを明らかにした(業績12)。また、炭水化物の蓄積量を高めるQTLを位置づけた(業績13)。加えて将来予想される高CO₂環境下では植物体内の元素(例えば亜鉛や鉄)の転流が強く影響を受けること、また、穀物のみならず牧草など広い作物種においていくつかの元素含量が低下することやシンクサイズを拡大するアレルを導入したNILでは転流量が増し複数元素の含量低下が起こらないことを明らかにした(業績14)。更に、Cdの転流及び蓄積に関わるQTLを特定した(業績15)。

2.3. 成長関連形質

イネの生育速度は乾物生産性を評価する指標として古くから注目されてきた。三氏は、生育速度を制御するQTLを特定し、NILを使った解析によりこのQTLが炭水化物代謝に関わる機能を有することを示した。この結果とQTLの存在領域に含まれる遺伝子のリストから*OsSPSI*を候補遺伝子として絞り込み、遺伝子組換え体を用いた補完実験により原因遺伝子であること明らかにした(業績16)。また、*OsSPSI*に加え、窒素吸収速度が初期生育を決定することを見出した(業績17)。更に、イネの成長を制御する複数のQTLが存在し、これらが時期特異的に作用して成長を制御していることを見出した(業績18)。

2.4. 耐倒伏性

倒伏は収量低下を引き起こす最も深刻な障害の一つである。植物体の支持力を高めることが、倒伏性向上につながることは古くから想定されていたが、評価法が確立されておらず、育種に活用されてこなかった。三氏は、支持力を評価する方法(植物体上部を除去した状態での押し倒し抵抗値)を確立し、支持力を二倍に高めるQTL(*prl5*)を特定した。次に、*prl5*の機能解析を行い炭水化物が茎に多く貯まることで支持力、更に耐倒伏性を高めることを明らかにした(業績19-21)。*prl5*は他の農業形質に影響しないことから耐倒伏性向上に向けて実用性が高いターゲットである。強稈に関しても稈の下位部の直径や重量増が耐性の強さを決定する要因であることを示した(業績22, 23)。また、収穫時期に台風が直撃するとドミノ状に倒伏が発生することを見出し、植物体上部の節の柔軟性を高めることが台風時の耐倒伏性向上に関与することを示した(業績24)。

以上のように、石丸・柏木・廣津三氏は、収量と関連形質を遺伝学的に解析することでイネの収量性向上に向けた多くの新規かつ重要な知見を得た。三氏の研究は、作物学研究において蓄積されてきた知識や視点がゲノム研究や遺伝学においても有効であることを示しており、作物学と遺伝学の融合という新分野を切り拓くパイオニア研究として高く評価できる。三氏は得られた成果を *Plant Production Science*, *Nature Genetics*, *Plant Physiology*, *Planta* 等に発表している他、日本作物学会紀事等に多くの総説（業績 25-30）も著し、学会内外の広範囲の読者に研究成果を発信してきた。本研究は、石丸氏の主導のもとに三氏の密接な連携により得られたものであり、今後の作物学研究における新たな潮流の一つになるものと考えられる。よって三氏は日本作物学会賞を授与するに値するものである。

研究業績

1. Ishimaru, K., Yano, M., Aoki, N., Ono, K., Hirose, T., Lin, S. Y., et al. (2001) Toward the mapping of physiological and agronomic characters on a rice function map: QTL analysis and comparison between QTLs and expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 793-800.
2. Madoka, Y., Kashiwagi, T., Hirotsu, N., & Ishimaru, K. (2008) Indian rice "Kasalath" contains genes that improve traits of Japanese premium rice "Koshihikari". *Theoretical and Applied Genetics*, 116, 603-612.
3. Ujiie, K., & Ishimaru, K. (2015) Alleles affecting 30 traits for productivity in two japonica rice varieties, Koshihikari and Nipponbare (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science*, 17, 47-65
4. Ishimaru, K., & Kashiwagi, T. (2004) Identification of a locus for asynchronous heading in rice, *Oryza sativa* L. *Euphytica*, 139, 141-145.
5. Ishimaru, K. (2003) Identification of a locus increasing rice yield and physiological analysis of its function. *Plant Physiology*, 133, 1083-1090.
6. Ishimaru, K., Kashiwagi, T., Hirotsu, N., & Madoka, Y. (2005) Identification and physiological analyses of a locus for rice yield potential across the genetic background. *Journal of Experimental Botany*, 56, 2745-2753.
7. Hirotsu, N., Murakami, N., Kashiwagi, T., Ujiie, K., & Ishimaru, K. (2010) Protocol: a simple gel-free method for SNP genotyping using allele-specific primers in rice and other plant species. *Plant Methods*, 6, 12.
8. Ishimaru, K., Hirotsu, N., Madoka, Y., Murakami, N., Hara, N., Onodera, H., et al. (2013) Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene *TGW6* enhances rice grain weight and increases yield. *Nature Genetics*, 45, 707-711.
9. Ishimaru, K., Kobayashi, N., Ono, K., Yano, M., & Ohsugi, R. (2001) Are contents of Rubisco, soluble protein and nitrogen in flag leaves of rice controlled by the same genetics? *Journal of Experimental Botany*, 52, 1827-1833.
10. Ishimaru, K., Hirotsu, N., Higa, K., Suwa, R., & Kawamitsu, N. (2001) Identification of QTLs for adaxial and abaxial stomatal frequencies in *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 173-177.
11. Hirotsu, N., Ujiie, K., Perera, I., Iri, A., Kashiwagi, T., & Ishimaru, K. (2017) Partial loss-of-function of *NAL1* alters canopy photosynthesis by changing the contribution of upper and lower canopy leaves in rice. *Scientific Reports*, 7, 15958.
12. Ishimaru, K., Kosone, M., Sasaki, H., & Kashiwagi, T. (2004) Leaf contents differ depending on the position in a rice leaf sheath during sink-source transition. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 855-860.
13. Ishimaru, K., Hirotsu, N., Madoka, Y., & Kashiwagi, T. (2007) Quantitative trait loci for sucrose, starch, and hexose accumulation before heading in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 799-804.
14. Ujiie, K., Ishimaru, K., Hirotsu, N., Nakagawa, S., Miyakoshi, Y., Ota, M., Tokida, T., Sakai, H., Usui, Y., Ono, L., Kobayashi, K., Nakano, H., Yoshinaga, T., Kashiwagi, T. & Magoshi, J. (2019) How elevated CO₂ affects our nutrition in rice, and how we can deal with it. *PLoS One*, 14, e0212840
15. Kashiwagi, T., Shindoh, K., Hirotsu, N., & Ishimaru, K. (2009) Evidence for separate translocation pathways in determining cadmium accumulation in grain and aerial plant parts in rice. *BMC Plant Biology*, 9, 8.
16. Ishimaru, K., Ono, K., & Kashiwagi, T. (2004b) Identification of a new gene controlling plant height in rice using the candidate-gene strategy. *Planta*, 218, 388-395.
17. Nagai, Y., Matsumoto, K., Kakinuma, Y., Ujiie, K., Ishimaru, K., Gamage, D. M., et al. (2016) The chromosome regions for increasing early growth in rice: role of sucrose biosynthesis and NH₄⁺ uptake. *Euphytica*, 211, 1-10.
18. Hirotsu, N., Kashiwagi, T., Madoka, Y., & Ishimaru, K. (2008) Time-related identification of chromosome regions affecting plant elongation in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 517-523.
19. Kashiwagi, T. & Ishimaru, K. (2004) Identification and functional analysis of a locus for improvement of lodging resistance in rice. *Plant Physiology*, 134, 676-683.
20. Kashiwagi, T., Hirotsu, N., Ujiie, K., & Ishimaru, K. (2010) Lodging resistance locus *prl5* improves physical strength of the lower plant part under different conditions of fertilization in rice (*Oryza sativa* L.). *Field Crops Research*, 115, 107-115.
21. Kashiwagi, T., Madoka, Y., Hirotsu, N., & Ishimaru, K. (2006) Locus *prl5* improves lodging resistance of rice by delaying senescence and increasing carbohydrate reaccumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 152-157.
22. Kashiwagi, T., Sasaki, H., & Ishimaru, K. (2005) Factors responsible for decreasing sturdiness of the lower part in lodging of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science*, 8, 166-172.
23. Kashiwagi, T., Togawa, E., Hirotsu, N., & Ishimaru, K. (2008) Improvement of lodging resistance with QTLs for stem diameter in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 115, 749-757.
24. Ishimaru, K., Togawa, E., Ookawa, T., Kashiwagi, T., Madoka, Y., & Hirotsu, N. (2008) New target for rice lodging resistance and its effect in a typhoon. *Planta*, 227, 601-609.
25. 石丸健, 柏木孝幸, 円由香, 廣津直樹 (2007) コシヒカリの耐倒伏性改良に向けて. *農業および園芸*, 82, 365-368.

26. 柏木孝幸, 廣津直樹, 円由香, 大川泰一郎, 石丸健 (2007) イネの湾曲型倒伏に対する抵抗性の付与. 日本作物学会紀事, 76, 1-9.
27. 柏木孝幸, 円由香, 石丸健 (2007) イネポストゲノムにおける生理学研究の重要性. 化学と生物, 43, 426-428.
28. 廣津直樹, 柏木孝幸, 円由香, 石丸健 (2007) バイオマスエネルギー生産に向けたイネ草丈の制御. 日本作物学会紀事, 76, 501-504.
29. 石丸健, 廣津直樹 (2013) インドール酢酸-グルコース加水分解酵素の欠失はイネの粒重と収量を増加させる. ライフサイエンス 新着論文レビュー, 7055.
30. 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, 299-304.

<特許>

1. 石丸健, 廣津直樹, 円由香, 柏木孝幸 (特許第 5288608 号) 穀物の種子を増大させる遺伝子, 並びにその利用.
2. 石丸健, 市川裕章, 廣津直樹, 柏木孝幸, 氏家和広, 光原一郎, 石橋和大 (特許第 5594818 号) 植物体の子実を増大させる遺伝子, 並びにその利用.

<参考>

1. Han, Y., Luo, D., Usman, B., Nazawaz, G., et al. (2018) Development of high yielding glutinous cytoplasmic male sterile rice (*Oryza sativa* L.) lines through CRISPR/Cas9 based mutagenesis of *Wx* and *TGW6* and proteomic analysis of anther. *Agronomy*, 8: 290.
2. Hu, M.J., Zhang, H.P., Cao, J.J., Zhu, X.F., et al. (2016) Characterization of an IAA-glucose hydrolase gene *TaTGW6* associated with grain weight in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding*, 36: 25.
3. Hanif, M., Gao, F., Liu, J., et al. (2016) *TaTGW6-A1*, an ortholog of rice *TGW6*, is associated with grain weight and yield in bread wheat. *Molecular Breeding*, 36: 1.