

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「二酸化炭素資源化を目指した
植物の物質生産力強化と生産物活用のための
基盤技術の創出」
研究課題
「作物の地下茎による栄養繁殖化に向けた基盤技術の開発」

研究終了報告書

研究期間 平成25年10月～平成31年3月

研究代表者：芦 莉 基行
(名古屋大学生物機能開発利用研究センター、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

生物はこれまで多種多様な繁殖様式を獲得してきたが、その中でも植物は「種子繁殖」と「栄養繁殖」の2つに大別される独特の繁殖様式を進化させてきた。種子繁殖については先端的研究が進み多くの知見が蓄積しているが、植物の栄養繁殖の分子メカニズムはほとんど明らかにされておらず、種子繁殖植物から栄養繁殖植物への転換にも成功していない。また、栄養繁殖する植物の中には旺盛な繁殖性を保持しているものも多い。植物の栄養繁殖性を理解し、人為的に制御出来れば、作物の低コストかつ省力的な栽培体系化と高バイオマス化による物質生産力の向上につながる可能性が広がる。そこで、本課題ではイネ野生種(アフリカ原産のイネ野生種「ロンギスタミナータ」)が保持する旺盛な地下茎栄養繁殖性について着目し、遺伝学、形態学、生理学、分子生物学的な解析を行い、地下茎による栄養繁殖性を理解することを目指すとともに、その応用を目指した基盤技術研究を行った。

まず、経塚らのグループはロンギスタミナータの地下茎成長システムを成立させる発生のキープロセスを明らかにするために、地下茎腋芽が分化し地下茎として成長するまでの一連の過程を光学顕微鏡、実体顕微鏡、走査型電子顕微鏡、核磁気共鳴画像法等を用いて詳細に観察した。その結果、地下茎として成長する腋芽は、発生初期から地上部の腋芽とは異なる特徴的な成長様式をとることが明らかになった。また地下茎の発生段階をステージ分けした観察から、地下茎腋芽としての運命は腋芽の発生初期に決定されることが明らかになるとともに、遺伝子発現解析から腋芽発生初期に地下茎としての運命決定に関わる遺伝子群を同定した。さらに、地上茎と地下茎の成長パターンを比較することにより、地下茎では葉が幼若相の構造を保持していること、地上茎が生殖成長に移行し花芽を分化しても地下茎では花芽分化しないことが判明し、地上部と地下部で成長相の進行様式が異なることが明らかになった。また、地下茎では幼若相維持に関わる複数の遺伝子や花成ホルモンの働きを阻害する遺伝子が発現していることを見だし、地下茎を幼若相に維持する分子メカニズムを明らかにした。

芦荻らのグループは地下茎形成・伸長メカニズムを遺伝的・生理学的に明らかにすることを目指した。まず、地下茎形成・伸長に関わる遺伝子を QTL 解析によって見出すために、GBS 法を用いた高速遺伝子判定システムを確立した。その後、栽培種であるサティバ(ジャポニカ)とロンギスタミナータの F₂ 集団を育成し、QTL 解析によって、地下茎形成および伸長に関わる多数の QTL を見いだした。地下茎形成には多数の QTL の集積が必要であるが、そのうち、地下茎伸長に関わる候補遺伝子を見いだした。この遺伝子を両種で比較すると、サティバに変異が入り、機能を喪失していた。サティバ型の遺伝子を過剰発現しても茎伸長は起らないが、ロンギスタミナータ型の遺伝子を過剰発現すると茎伸長を顕著に誘導した。また一般的なイネでは栄養成長期に GA₁ を生産するが、ロンギスタミナータでは主に GA₄ を生産していることを見いだした。ロンギスタミナータでは、GA 合成酵素の *GA20ox2* に変異があり、サティバに比べ GA₄ を生産する酵素活性が顕著に高いことを見いだした。また GA₄ は GA₁ に比べ茎伸長能が高いことから、効率良く GA₄ を生産することで地下茎伸長を促進していると考えられた。地下茎は地中を伸長する茎であるが、常に地下に居続けるわけではなく、ある時点で成長方向を変え、地上茎としての運命を獲得する。ロンギスタミナータを用いてこの分子機構を調査したところ、地上茎化する段階の地下茎先端では様々な糖の中でもスクロースの含量が低下していることを見いだした。また、地下茎に各種糖を投与した結果、スクロースにより地下茎の地上茎化が強く抑制され、地下茎の地上茎化にスクロースが関与していることが明らかになった。

山口らのグループは、特に地下茎とストリゴラクトンの関係について研究を進めた。ロンギスタミナータの地下茎におけるホルモン解析を行ったところ、主要なストリゴラクトン(4-デオキシオロバンコール、オロバンコール)を殆ど生産していないことが判明した。そこで、地下茎とストリゴラクトンの関係を調査した。まず、ロンギスタミナータへのストリゴラクトン外部投与実験、およびストリゴラクトン生合成遺伝子ノックアウト形質転換体の作出を行い、ストリゴラクトンが地下茎腋芽の伸長を抑制することを明らかにした。また、いずれの植物種においても完全には解明されていなかったストリゴラクトン生合成経路を、サティバおよびシロイヌナズ

ナを用いて調べ、カーラクトン、カーラクトン酸、カーラクトン酸メチルを内生物質として同定し、これらのうちカーラクトンおよびカーラクトン酸が生合成中間体であることを証明した。加えて、受容体との相互作用を解析し、カーラクトン酸メチルが枝分かれを抑制する活性型ストリゴラクトン分子種の一つの有力候補であることを明らかにした。さらに、ロンギスタミナータとサティバの間で、ストリゴラクトン生合成遺伝子配列および組換えタンパク質の酵素活性を比較し、サティバで、カーラクトンからカーラクトン酸を経て 4-デオキシオロバンコールおよびオロバンコールへと変換する酵素が、ロンギスタミナータではカーラクトン酸までしか変換しないことを突き止めた。以上のように、サティバの根および根浸出液中に見られる主要なストリゴラクトンが、ロンギスタミナータで検出されない原因を明らかにした。

榊原らのグループは、地下茎の無機窒素栄養およびリン栄養に対する分枝成長の制御様式の解明を目指し、窒素やリンに対する地下茎の反応性について解析を行った。その結果、窒素栄養が地下茎腋芽伸長に促進的であるのに対し、リン栄養は逆に抑制効果を持つことを明らかにした。窒素栄養に応答した地下茎腋芽の伸長促進制御のしくみについてさらに解析を進め、サイトカニン生合成の活性化とストリゴラクトン生合成の抑制が、腋芽伸長制御遺伝子の発現制御に深く関わることを明らかにした。さらに、地下茎で連結された二つのラメット間における窒素栄養情報伝達様式について解析を行い、二つのラメットを異なる窒素栄養条件においた場合、低窒素に置かれた側のラメットから高窒素処理側に窒素要求情報が伝えられ、高窒素処理側の根での窒素吸収関連遺伝子や同化系遺伝子の発現を促進することを明らかにした。

以上の様に経塚グループが中心となって地下茎の分枝成長パターン決定機構を明らかにし、芦荻グループは、地下茎形成・伸長メカニズムの一端を遺伝・生理学的に明らかにした。山口グループと榊原グループは、地下茎の形成・伸長におけるストリゴラクトンの役割や無機栄養による地下茎分枝成長の調節機構の解明をすすめ、地下茎による栄養繁殖機構の一端を明らかにした。また、地下茎とバイオマスとの関係を雑種集団を用いて実際の圃場で調査したところ、地下茎が有ることで高バイオマス性の上限を引き上げ、高バイオマス性 QTLs の最適化だけでは到達できない巨大なバイオマス生産を地下茎とともに達成できる可能性が示された。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. ロンギスタミナータ地下茎伸長機構1

概要：一般的なイネは栄養成長期に活性型ジベレリンとして GA₁ を生産しているが、ロンギスタミナータの地下茎では主に GA₄ を生産することを見いだした。この両者の違いの原因を調査したところ、ジベレリン合成酵素の GA20ox2 の配列に変異があり、ロンギスタミナータが保持する GA20ox2 (GR型) は、栽培種の GA20ox2 (EQ型) に比べ、GA₁₂ から GA₉ までの触媒活性が約 270 倍も高いことが明らかとなった。また GA20ox2 (GR型) は2つの前駆体 (GA₅₃ と GA₁₂) のうち GA₅₃ より GA₁₂ を優先的に基質にすることで、ロンギスタミナータは一般的なイネが栄養成長期に合成できない GA₄ を作出することが明らかとなった。また GA₄ は GA₁ に比べ茎伸長を約10倍誘導する能力があることを明らかにした。以上の様に、ロンギスタミナータの地下茎伸長の分子メカニズムの一端を明らかにした。

2. ロンギスタミナータ地下茎伸長機構2

概要：遺伝学的解析から、地下茎伸長を制御する候補遺伝子を見いだした。ロンギスタミナータとサティバのこの遺伝子を比較したところ、栽培種ではこの遺伝子に変異を有しており、栽培種とロンギスタミナータでは全く異なるアミノ酸配列を保持していた。この遺伝子のサティバ(T65)アレルを T65 に過剰発現しても茎伸長は起こらないが、ロンギスタミナータアレルをサティバ(T65)に導入したところ、栄養成長期においても茎伸長を誘導することが判明した。また、ミナトカモジグサやエネルギー作物であるサトウキビにロンギスタミナータ型のこの遺伝子を導入したところ、イネと同様に茎伸長を誘導・促進した。以上の結果から、この遺伝子は単子葉植物の茎伸長を誘導する機能を保持していることが明らかになった。

3. ロングスタミナータ地下茎の地上茎化機構

概要：地下茎は地中を伸長する茎であるが、常に地中に居続けるわけではなく、ある時点で成長方向を変え、地上茎としての運命を獲得する。ロングスタミナータを用いてこの分子機構を調査したところ、地上茎化する段階の地下茎先端では様々な糖の中でもスクロースの含量が低下していることを見いだした。また、地下茎に各種糖を投与した結果、スクロースにより地下茎の地上茎化が強く抑制され、地下茎の地上茎化にスクロースが関与していることが明らかになった。さらにGAとスクロースが地下茎の地上茎化に対して拮抗的な役割を果たすことを遺伝子発現解析および組織切片の観察から明らかにした。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. ロングスタミナータのゲノム配列解読とゲノムブラウザーの公開

概要：ロングスタミナータのゲノム配列を独自に解読するとともに、遺伝子発現情報や各種アノテーションを付与したゲノムブラウザーを開発し、国立遺伝学研究所のサーバー上で公開した。イネ野生種13種ゲノムの配列については2018年国際コンソーシアムによって公開されたが、この中にロングスタミナータのゲノム情報は含まれていない。イネの進化系統において、サティバと近縁野生種が属するクレード(AAゲノムクレード)の中でも、ロングスタミナータはサティバと最も遠縁関係にあることから、ロングスタミナータの高精度ゲノム情報を世界に先駆け公開したことの意義は大きい。また、国際コンソーシアムなどによる大規模解析によらず1つの研究室グループにおいて *de novo* に野生種の高精度ゲノム解読ができること、またユーザーフレンドリーなデータベースが構築できることを実証した。ロングスタミナータは多様な有用農業形質遺伝子を保持しているため、本プロジェクトで公開したゲノム情報は国内外で遺伝解析や育種への利用が期待できる。

2. バイオマス増加遺伝子 *GW6a* の同定

概要：イネの多様性解析から、種子(コメ)のサイズおよびバイオマスを増加させる遺伝子(*GW6a*)を同定した。*GW6a* 遺伝子を過剰発現すると種子のサイズが大きくなり、発現を抑制すると種子のサイズが小さくなった。またこの遺伝子を導入するとイネ植物体も増大しバイオマスが上昇することが明らかになった。この遺伝子をシロイヌナズナに導入したところ、シロイヌナズナの種子サイズも増大した。発見した *GW6a* 遺伝子は作物の種子サイズやバイオマス増加に貢献すると期待される。

3. ストライガ非感染イネ品種の育種

概要：本研究に供試しているロングスタミナータは、これまでの生理学的解析から、主要なストリゴラクトンを根において殆ど生産せず、また根滲出液にはストライガ(根寄生植物)発芽誘導活性が殆ど無いことが明らかになった。特にロングスタミナータとサティバ(日本晴)の染色体断片置換系統群(Chromosome Segment Substitution Line: CSSL)を用いた解析から、ロングスタミナータの第1染色体の1部分を導入したサティバ(日本晴)は主要なストリゴラクトンを殆ど生産しないことが明らかになった。この成果は、アフリカをはじめ世界中の作物栽培に甚大な被害を及ぼしているストライガに対する耐性イネの品種育成に応用できるものと期待される。

< 代表的な論文 >

1. Kuroha T., Nagai K., Gamuyao R., Wang D., Furuta T., Nakamori M., Kataoka T., Adachi K., Minami M., Mori Y., Seto Y., Mashiguchi k., Yamaguchi S., Kojima M., Sakakibara H., Wu J., Ebana K., Mitsuda N., Ohme-Takagi M., Yanagisawa S., Yamasaki M., Yokoyama R., Nishitani K., Mochizuki T., Tamiya G., McCouch S., and Ashikari M. "Ethylene-Gibberellin Signaling Underlies Adaptation of Rice to Periodic Flooding". **Science** 361 (6398) 181-186 (2018)
2. Song X-J., Kuroha T., Ayano M., Furuta T., Nagai K., Komeda N., Segami S., Miura K., Ogawa D., Kamura T., Suzuki T., Higashiyama T., Yamasaki M., Mori H., Inukai Y., Wu J., Kitano H., Sakakibara H., Jacobsen SE and Ashikari M. "Rare Allele of A Novel Histone H4 Acetyltransferase Enhances Grain Weight, Yield and Plant Biomass in rice", **PNAS** 112 (1) 76-81. (2015)
3. Reuscher S., Furuta T., Bessho-Uehara K., Cosi M., Jena K. K., Toyoda A., Fujiyama A., Kurata N. and

Ashikari M. “Assembling the genome of the African wild rice *Oryza longistaminata* by exploiting synteny in closely related *Oryza* species”. **Communications Biology**. 162 (2018)

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「芦荊」グループ

研究代表者: 芦荊 基行 (名古屋大学生物機能開発利用研究センター 教授)

地下茎形成・伸長メカニズムの遺伝・生理学的解析

研究項目

- ・高速遺伝子型判定システムの確立
- ・地下茎形成の量的遺伝子座解析(QTL解析)
- ・地下茎形成必須領域の証明
- ・地下茎形成関連遺伝子の発現ネットワーク解析
- ・環境および植物ホルモン応答に関する研究
- ・ロンギスタミナータ再分化の確立
- ・地下茎形成遺伝子の同定と機能解析

②「経塚」グループ

主たる共同研究者: 経塚 淳子 (東北大学大学院生命科学研究科 教授)

地下茎からの分枝成長パターン決定機構の解析

研究項目

- ・地下茎成長様式の解明
- ・腋芽関連遺伝子の発現解析
- ・可視化マーカーによる地下茎腋芽の解析

③「山口」グループ

主たる共同研究者: 山口 信次郎 (東北大学大学院生命科学研究科 客員教授)

地下茎の形成・伸長におけるストリゴラクトンの役割の解明

研究項目

- ・ストリゴラクトン投与実験
- ・ストリゴラクトンおよび生合成中間体の分析
- ・CSSLラインのストリゴラクトン分析
- ・ストリゴラクトン生合成酵素活性測定および遺伝子発現解析

④「榊原」グループ

主たる共同研究者: 榊原 均 (名古屋大学大学院生命農学研究科 教授; 国立研究開発法人理化学研究所環境資源科学研究センター 客員主幹研究員)

無機栄養による地下茎分枝成長の調節機構の研究

研究項目

- ・栄養環境による地下茎分枝成長様式の解析
- ・栄養環境による地下茎分枝成長制御メカニズムの解明
- ・地下茎を介した個体(ラメット)間の栄養情報伝達機構の解明
- ・ロンギスタミナータのホルモン動態解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- 新規茎伸長遺伝子のミナトカモジグサへの導入は理化学研究所の小林正智氏の協力を得て作成した。また同遺伝子のサトウキビへの導入は国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門の高橋亘氏の協力を得て作成した。
- CRISPR/Cas9 によるイネの遺伝子破壊は、農業生物資源研究所の土岐精一氏・遠藤真咲氏からベクター分譲の協力を得た。
- ロングスタミナータ栽培と育成に関しては、国際イネ研究所の Kshirod Jena 博士の協力を得た。
- ロングスタミナータ形質評価に関しては、国立ベトナム農業大学の Cuong Pham 博士の協力を得た。
- ロングスタミナータのゲノム配列決定および公開には国立遺伝学研究所の協力を得た。
- 糖の地下茎への流入実験では、名古屋大学の村瀬潤准教授の協力を得た。
- 農業生物資源研究所の内藤健博士より、PacBio を用いたロングリードシーケンスデータの De novo assemble について、解析手法を教示いただくなど協力を得た。
- Genotyping by sequencing (GBS) 法による遺伝子型判定パイプラインの構築に当たり、名古屋大学の土井一行准教授および西内俊策助教、またコーネル大学の Edward Buckler 教授の協力を得た。
- 核磁気共鳴画像法 (Magnetic Resonance Imaging; MRI) によるロングスタミナータ地下茎腋芽の非破壊連続観察は、筑波大学の巨瀬勝美教授、寺田康彦准教授の協力を得た。
- ストリゴラクトン受容体である D14 の細胞間移行の研究については、フランス INRA の Catherine Ramou 博士、オーストラリアクイーンズランド大学の Christine Beveridge 教授との共同研究を進めた。
- ストリゴラクトン受容体である D14 の細胞内局在の観察は、岡山大学の馬健峰教授、山地直樹准教授の協力を得た。
- ロングスタミナータの花粉培養の手法について東北大学の鳥山欣也教授の助言を得た。
- ロングスタミナータとサティバの交配 F₂ 種子を岡山大学の前川雅彦教授より分譲頂いた。
- レーザーマイクロダイセクションによるロングスタミナータ地下茎腋芽の組織採集実験は、理化学研究所 CSRS の豊岡公德氏との共同研究により行った。
- ストリゴラクトン生合成中間体やその安定同位体標識体は、大阪府立大学の秋山康紀教授に合成して頂いた。
- シクロム P450 酵素である CYP711A ファミリーの機能解析は、宇都宮大学の野村崇人准教授との共同研究として行った。
- ストリゴラクトン生合成酵素として同定された OsLBO の機能解析は、オーストラリアクイーンズランド大学の Christine Beveridge 教授との共同研究として進めている。
- ロングスタミナータの RNA シーケンス解析は、中部大学の鈴木孝征講師の協力を得た。
- ロングスタミナータの安定同位体標識窒素によるトレーサー実験は、東京大学の寺島一郎研究室から標識試薬の提供を受けて行った。