

最新イメージング技術を用いたイネ染色体断片置換系統群における根系形態 に關与する遺伝子領域の同定

Identification of genomic regions associated with root system architectures in advanced mapping populations of rice using a novel imaging and software platform

コーネル大学	宇賀 優作
派遣期間	2014年8月25日～2015年8月23日
研究機関	Department of Plant Breeding & Genetics, Cornell University, Ithaca, NY 14853-190, United States
研究指導者	Prof. Susan McCouch

The plant root system is an essential organ for the absorption of water and nutrients from the soil. The distribution of different root types in a root system determines its ability to efficiently take up water and nutrients because these resources are heterogeneously distributed in the soil. To improve water- and nutrient-uptake in rice, we identified a rice genomic region associated with root system using 2D and 3D root-phenotyping systems. We used a set of 26 chromosome segment substitution lines (CSSLs) derived from a cross between ‘IR64’ and ‘Kinandang Patong’. The root systems of 26 CSSLs grown under hydroponic conditions were evaluated using 2D image analysis. Based on these results, we selected 8 CSSLs that exhibited greater root growth compared to control variety ‘IR64’. Three-dimensional analysis for the 8 CSSLs grown in gellan gum revealed that only one CSSL (SL1003) showed significantly longer total root length than ‘IR64’ although total root number, centroid of root system, and maximum root depth did not differ significantly between SL1003 and ‘IR64’. The SL1003 has a ‘Kinandang Patong’ introgression on the long arm of chromosome 1. These results suggest that this region includes gene(s) primarily controlling root elongation rather than other root traits.

研究目的

人口増加と経済成長に伴い、2050年までに現在の2倍の食料を世界全体で生産する必要があると報告されている (FAO, <http://www.fao.org>)。しかし、近年、地球規模の環境変動に伴う大規模な干ばつが農業生産に甚大な被害を及ぼしている。とくに発展途上国では用水路などの農業インフラがない地域が多く、資本の少ない農家は十分な水を利用できず、干ばつの被害を受けやすい。また、同様の理由で彼らは十分な量の化学肥料を購入・利用できないため、収穫量は日本の半分程度である。それゆえ、水や肥料などの資源が乏しい土壌環境でも高い生産性を発揮できる品種の開発が強く求められている。

近年イネゲノムの解読とともに、DNA マーカーを用いたゲノム育種により新品種の開発は短い年月で

可能になった。しかし、ゲノム育種により品種改良するためには目的の形質に關与する遺伝子を同定しなければならない。地上部の形質に關しては、1960~70年代に草丈を1mほどに抑えることで「緑の革命」をもたらした半矮性遺伝子 *sdl* で知られるように、品種改良や遺伝子の同定が進んできた。一方、地下に存在する根系は土壌からの養水分の吸収などに影響する重要な形質にもかかわらず、調査の困難さもあり、有効な遺伝子は得られず「根の改良による第二の緑の革命 (Gewin, 2010)」が待ち望まれてきた。

最近我々は世界で初めてゲノム育種に利用できる深根性遺伝子 *DROI* を単離・同定した (Uga et al., 2013)。インドやインドネシアを中心に世界で広く栽培されている水稻品種「IR64」は水と肥料が十分あ

る環境では多収となるが、IR64は浅根で干ばつなどに弱く、不良環境では十分な収獲量が得られない。そこで、我々は深根で干ばつに強い陸稲品種「Kinandang Patong (KP)」から単離した *DROI* を DNA マーカー選抜法により IR64 に導入した。*DROI* を導入した IR64 は深根化により干ばつ時にも土壌下層からの水を吸収することで干ばつに強くなり、収獲量が増大した。しかし、厳しい干ばつで多収をめざすには、より土壌下層の水を獲得できるようにさらなる深根化が必要である。

深根化には根伸長角度と最長根長の2つの形質が関与している。*DROI* は機能型で根伸長角度が大きくなり、根が下方向へ伸長した。一方で、*DROI* は最長根長などの他の根系形態や地上部形態には影響しなかった。つまり、機能型 *DROI* を持ったイネがさらに土壌下層の水を獲得するためには根をより長く改良することが有効であると推察できる。

本研究では根の伸長に関与する遺伝子を単離し、ゲノム育種に利用することを目的に、IR64 と KP の交配由来の染色体断片置換系統群 (CSSLs, Uga et al. 2005) に対して 2 次元 (2D) および 3 次元 (3D) の根系画像を取得し、根系形態の定量的解析を行った。得られた表現型データから根長に特異的に関与する染色体領域を同定した。

研究経過

土壌環境において KP は IR64 よりも根長が2倍ほど長くなるのがわかっている。遺伝子単離には大量のイネ個体を調査する必要があるが、自然の土壌環境で膨大な数のイネの根長を調査することは非現実的である。そこで、本研究では、水耕やゲル等の人工環境条件下で根長に関与する遺伝子領域を見出すことを試みた。

1. 2D 画像解析による CSSLs の根系形態の解析

はじめに、水耕栽培条件で IR64 と KP 間で根長に有意な差がみられるか調査した。発泡ポリエチレン板に発芽したイネを固定し、改変 Magnavaca 水耕液 (pH=5.5) を満たしたコンテナに浮かべ、人工気象室内で栽培した。栽培期間中、隔日で水耕液を交換し、毎日、水耕液の pH を 5.5 に調整した。発芽後 6 日目から 16 日目まで毎日、ガラスの水盤に根を 2 次元的に広げ、デジタルカメラで撮影した。根系画像解析ソフト RootReader2D (Clark et al., 2013) を用いて画像データから種子根長と冠根長を測定した。

その結果、KP は IR64 に比べ、播種後 6 日目から種子根が有意に長いことが分かった。また、冠根については、第 1、第 2、第 3 冠根長がそれぞれ 9、11、12 日目から IR64 よりも KP が有意に長くなることが分かった。

つぎに、IR64 と KP の交配由来の CSSLs 26 系統を両親と同じ条件で水耕栽培し、同じ方法で画像データ取得後、根長を測定した。CSSLs は IR64 と KP を交配した後、DNA マーカー選抜と戻し交配を繰り返すことで、IR64 を遺伝背景とし、各染色体の一部断片が KP 由来のゲノムに置換された系統群である。全 26 系統で第 1 染色体から第 12 染色体がすべてカバーされている。CSSLs を解析した結果、IR64 (親コントロール) よりも有意に種子根長が長いものが、12 系統あった。このうち、第 1~3 冠根長の合計が IR64 より長いものが 8 系統存在した。これらの系統は、それぞれ第 1、2、5、6、7、8 染色体が KP 型のゲノムに置換されており、これらの領域に種子根および冠根の長さをコントロールする遺伝子が存在することが推測された。

2. 3D 画像解析による CSSLs の根系形態の解析

1.の結果から 8 系統を選抜し、これら系統の根系形態を経時的かつ非破壊的に計測するため、寒天培地的一种であるゲランガムを根の支持体として用いた。ゲランガムは通常の寒天よりも透明で根の観察に適している。ゲランガムを充填した円柱状のシリンダーにイネを移植し、播種後人工気象室内で栽培した。3 日目から 11 日目まで隔日で、デジタルカメラにより根系の画像データを取得した。専用の撮影テーブルにイネの入ったシリンダーをセットし、テーブルを自動で回転させながら、横から計 40 枚の 2 次元画像を取得した。得られた画像データを根系画像解析ソフト RootReader3D (Clark et al., 2011) によって 3 次元画像に再構築し、種子根と冠根の総根長や最深根長、根系の重心などの根系形態を数値化した。解析結果から、8 系統のうち IR64 よりも総根長が有意に長かった CSSL 系統は SL1003 のみであった。総根長は種子根と冠根の主根長と側根長の総和である。SL1003 は総根長が長くなっていたが、種子根長は有意に長くなっていないことから、冠根長が長くなったこと、もしくは、種子根および冠根の側根が長くなったことにより総根長が長くなったと推察された。

つぎに、SL1003 の根系発達が土壌条件で再現性が

あるかを調べるために、Turface (焼成粘土) を培地として用いた。一般的な土は根に絡みやすく、根を洗い、観察することが難しい。一方、Turface は水中で根から簡単に離れるため、根の観察に適している。本試験では、コンテナに塩ビ管を配置し、塩ビ管内にメッシュ・タワー (3D プリンターで 8 枚のメッシュ状の円盤を作製し、各円盤を数 cm ずつ離して円柱状に固定したもの) を入れた後、Turface を流しこんだ。その後、改変 Magnavaca 水耕液を満たし、発芽したイネ種子をメッシュ・タワーの一番上の円盤中央部の穴に播種した。各コンテナは栽培期間中エアレーションを行い、水耕液を 3 日ごとに交換した。IR64、KP、SL1003 の 3 系統それぞれを 10 個体ずつ調査した。播種後 15 日目に水の張った水槽内で塩ビ管からメッシュ・タワーをゆっくり取り出し、Turface を取り除いた。メッシュ・タワーの各円盤にはイネの根系が伸長したままの状態に固定されており、この状態のまま撮影用の専用水槽内テーブルにメッシュ・タワーをセットした。テーブルを自動で回転させながら、横から計 100 枚の 2 次元画像を取得した。得られた画像データを根系画像解析ソフト RootReader3D によって 3 次元画像に再構築し、種子根と冠根の総根長や最深根長、根系の重心などの根系形態を数値化した。解析結果から、SL1003 の総根長は IR64 よりも約 32 cm 長かった。ただし、個体間のばらつきが大きいため、統計的に有意な差は得られなかった。この総根長の違いが何に由来するのかを明らかにするため、より詳細な解析を行った。主根の総根長を調べたところ、SL1003 は IR64 よりも約 29 cm 有意に長かった。つぎに、主根を種子根と冠根に分けて測定したところ、冠根の総根長は SL1003 が IR64 より約 27 cm 有意に長いことがわかった。一方、種子根は有意な差はなかった。また、最深根長や根系の重心は両系統に有意な差は見られなかった。ただし、SL1003 の総根数は IR64 よりも有意に増えていたことから、根数の増加が総根長に影響していることが考えられた。そこで、各個体の個々の冠根長を測定し、総根長の差が冠根長の増大によるものなのか、冠根数の増加によるものなのかを調べた。その結果、すべての冠根で IR64 よりも SL1003 が長くなっていることがわかった。増えた冠根自体の長さは数 cm 程度と、総根長の増加を説明するほど長くはなっていなかった。以上のことから、SL1003 の総根長が IR64 より長くなった原因は冠根長が長くな

ったことによると考えられた。また、他の根系形態にはほとんど影響しないことから、SL1003 が持つ KP のゲノム断片には冠根長を特異的に伸長させる遺伝子が存在すると推察される。

考察

植物の根系は土壌中に存在するため、自然の状態の根を観察するためには、根系を掘り起こすなどの作業を要する。従来品種改良では通常数千から数万個体の調査を必要とする。一方、ゲノム育種の進歩により形質の調査をしなくても、対象遺伝子の近傍に位置する DNA マーカーを用いることで簡単にめざす個体の選抜が可能になった。しかし、対象とする遺伝子を同定するためにはやはり数百から数千個体の植物を調査する必要があるが、土壌からの掘り起こしは現実的ではない。本研究に用いた CSSLs は小さい集団でイネゲノム全体をカバーしており、各個体の反復を増やしても一度に大量のイネを調査する必要がない。本研究では人工的な栽培環境で少数のイネを栽培し、2D と 3D の 2 つの画像解析システムを用いて効率的に根系形態を調査することができた。26 系統の CSSLs のうち、SL1003 は種子根長が親系統である IR64 と有意な差は見られないが、冠根長は有意な差が見られた。また、最深根長や根系の重心などのその他の形態には影響しないことが分かった。SL1003 は第 1 染色体長腕部のみが KP 由来のゲノムに置換されている。また、前後の系統と比較することで、冠根長に関与する領域が 8.51Mb であることが分かった。本領域には冠根伸長に特異的に関与する遺伝子が存在すると推察される。そこで、仮に対象の遺伝子を *qCRL1* (*quantitative trait locus for Crown Root Length 1*) と命名した。今後は当該遺伝子の単離・同定を行い、その機能解明を進めるとともに、準同質遺伝子系統を作製し、干ばつ耐性に対する効果を明らかにする予定である。

Clark R.T., Famoso A.N., Zhao K., Shaff J.E., Craft E.J. et al. (2013) High-throughput two-dimensional root system phenotyping platform facilitates genetic analysis of root growth and development. *Plant Cell Environment* 36: 454–466.

Clark R.T., MacCurdy R.B., Jung J.K., Shaff J.E., McCouch S.R. et al. (2011) Three-dimensional root phenotyping with a novel imaging and software

platform. *Plant Physiology* 156: 455–465.

Gewin V. (2010) An underground revolution. *Nature* 466: 552–553

Uga Y., Kitomi Y., Yamamoto E., Kanno N., Kawai S. et al. (2015) A QTL for root growth angle on rice chromosome 7 is involved in the genetic pathway of *DEEPER ROOTING 1*. *Rice* 8: 8.

Uga Y., Sugimoto K., Ogawa S., Rane J., Ishitani M. et al (2013) Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* increases rice yield under drought conditions. *Nature Genetics* 45: 1097–1102.

研究の発表

口頭発表

1. 宇賀優作, 木富悠花 (2015) 干ばつ耐性向上をめざした根型育種の有効性と今後の展望. 第 43 回根研究集会特別シンポジウム (招待講演).
2. Uga Y., Assaranurak I., Larson B.G, Craft E.J., Shaff J.E., Kitomi Y., McCouch S.R., Kochian L.V. (2015) 2D&3D 画像解析によるイネ第 1 染色体の根系発達に関与するゲノム領域の発見. 日本育種学会第 128 回講演会.
3. 宇賀優作 (2015) 深根性遺伝子を活用したイネの耐乾性および収量性の遺伝的改良. 日本植物学会第 79 回大会シンポジウム (招待講演).
4. Uga Y. (2015) Genetic control of root system architecture enhances rice yield under deficiencies of water and nitrogen. Lynch's Lab seminar. The Pennsylvania State University.
5. Uga Y. (2015) Genetic control of root system architecture enhances yield performance under drought in rice. Benfey's Lab seminar. Duku University.
6. Uga Y. (2015) Genetic control of root system architecture is promising breeding strategy for drought resistance in rice. Grass Group meeting. Cornell University.
7. 宇賀優作 (2014) Genetic control of root system architecture improves drought avoidance in rice. International Workshop on Plant Water Stress Responses and Water-Use Efficiency (招待講演).