

イネRafタイプMAP3K遺伝子*Os11g45280*は分げつを正に調節し、収量の増加に関与する

Rice Raf type MAP3K gene *Os11g45280*
positively regulates tiller number and grain yield

松岡 大 介^{1,2}、新 多 智 明¹、高 岡 翔 平¹、
深 山 浩³、三十尾 修 二⁴、南 森 隆 司^{1,5}

1. 神戸大学農学部生命機能科学科農環境生物学コース 細胞機能制御学研究室
2. 甲子園大学栄養学部フードデザイン学科
3. 神戸大学農学部資源生命科学科応用植物学コース 熱帯植物学研究室
4. 神戸大学農学部資源生命科学科応用植物学コース 資源植物生産学研究室
5. 大手前大学健康栄養学部

要 約

近年、アジアやアフリカなどの発展途上国において急激な人口増加が進んでおり、人口に対して穀物の供給が追いつかなくなることが予想される。これらのことからイネを含めた作物において収量を飛躍的に増加させる技術やストレス耐性をもつイネを作出することは食糧問題を解決する上で極めて重要だと考えられている。本研究では、シロイヌナズナにおいてストレス耐性や収量に関与する遺伝子である*MAP3K64*と相同な遺伝子*Os11g45280*及び*Os12g37570*をイネから同定し、RT-PCRによる遺伝子発現解析により、*Os11g45280*遺伝子が葉鞘で発現が高く、解糖系の基質であるグルコースには応答しないが、糖の輸送形態であるスクロースに応答して発現が上昇することを明らかにした。さらに*Os11g45280*遺伝子ノックアウトイネを確立し、屋外圃場において自然条件化で栽培するとことで、*Os11g45280*遺伝子イネの分げつを正に制御にする役割を持つこと、さらに高品質なコメの作出につながる形質を得ることができた。これらの成果は、作物の増収につながる重要な研究成果であると考えられる。

キーワード

イネ、分げつ、収量、MAP3K

緒 論

近年、アジアやアフリカなどの発展途上国において急

激な人口増加が進んでおり、国際連合の予測では2050年には90億人を超える見込みである。一方、世界のイネやコムギなどの主要な穀物生産量の増加は鈍化しており、人口に対して穀物の供給が追いつかなくなることが予想される。これらのことからイネにおいて収量を飛躍的に増加させる技術やストレス耐性をもつイネを作出することは食糧問題を解決する上で極めて重要だと考えられている。

本論文では、イネの収量に直接的に関与する形質である枝分かれに着目して研究を行った。植物の枝分かれは最終的な花や種子の数を決める重要な因子である。したがって、枝分かれを制御することは穀物の生産性や栽培作業の効率化に深くつながることが期待できる。枝分かれを制御する要素の一つとして腋芽の休眠が知られている。腋芽とは花茎から枝分かれをする際に茎生葉の根元につくられる芽で、イネでは分げつ芽と呼ばれている。腋芽を制御する仕組みとして代表的なものに頂芽優勢があるが、イネでも他の植物と同じように頂芽優勢が観察されることがわかっている (Arite *et al.* 2007)。さらに、腋芽 (分げつ芽) の休眠が弱い突然変異体の解析から、イネ分げつ芽の伸長はシロイヌナズナなどと同じシステムによりコントロールされていることが報告されている。(Ishikawa *et al.* 2005; Arite *et al.* 2007)。頂芽優勢の制御には、オーキシン、サイトカイニンやストリゴラクトンなどの植物ホルモンが働いていることが知られているが、これらの植物ホルモンの合成は、生育環境の変化に大きく影響を受ける。

投 稿 2021年 1月 7日 連絡先 松岡 大介 matsuoaka@koshien.ac.jp
改 訂 2021年 2月 8日
受 理 2021年 2月 9日

MAPK (Mitogen activated protein kinase) カスケードは真核生物に高度に保存されているシグナル伝達機構である。MAPKカスケードは植物において環境ストレス応答だけでなくホルモン応答、細胞分化、成長過程にも関わっていることが知られている (Colcombet and Hirt 2008; Sinha *et al.* 2011)。MAPKカスケードはMAPK、その上流のMAPK kinase (MAP2K)、さらに上流のMAPKK kinase (MAP3K) の三種類のリン酸化酵素からなり、MAP3KからMAP2K、MAP2KからMAPKへとリン酸化を起し、さらに下流の因子に情報を伝達することによって様々なストレスや植物ホルモンなどの刺激に応答する。

我々の研究グループでは、これまでシロイロナズナのMAP3Kの一つであるMAP3K84に着目し、研究を行ってきた。MAP3K84とはN末端側にPASドメイン、C末端側にキナーゼドメインを有する遺伝子である。これまでの研究結果より、MAP3K84とは塩、乾燥といった環境ストレスや植物ホルモンの一つであるアブシジン酸 (ABA)、によって遺伝子発現レベルが変動すること、さらにMAP3K84との全長遺伝子 (Full length : FL) を過剰発現させたシロイロナズナでは野生型と比較して成長が促進されており、植物体が大型化し種子重量も増加することを明らかにしている。また、キナーゼドメイン不活性型の遺伝子 (Kinase Negative : KN) を過剰発現させたシロイロナズナでは枝分かれが増加し、種子数の増加がみられた。これらの過剰発現体は塩ストレスや浸透圧ストレスなどの環境ストレスに対して耐性を持つことも観察されており、MAP3K84は成長制御とストレス応答の両方に関連した非常に重要な遺伝子であると考えられる (Sasayama *et al.* 2011; Shitamichi *et al.* 2013)。

そこで本研究では、日本の主要作物であるイネを材料とし、MAP3K84と相同遺伝子の機能を明らかにすることを目的とした。遺伝子データベース検索によりMAP3K84と相同遺伝子であるOs11g45280及びOs12g37570を同定し、他の植物種と比較することでPASドメインを持つMAP3Kの植物における機能を考察した。さらにOs11g45280遺伝子破壊株の作出を行い、屋外圃場における生長解析によりOs11g45280がイネの収量に関わる分けつの制御において重要な役割を果たすことを明らかにした。これらの成果は、作物の増収につながる重要な研究成果であると考えられる。

材料と方法

イネの栽培、糖処理、total RNAの抽出、cDNAの調製

日本型水稲日本晴 (*Oryza sativa* L. cv. 日本晴) を供

試材料とした。完熟種子を、界面活性剤Tween 20を1滴加えた次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素濃度1%) で約30分間、スターラーでゆっくり攪拌しながら滅菌した。水道水で十分洗浄した後、ビーカーに1 cmほどの水を入れ、30℃で1-2日置き催芽させた。鳩胸状になった種子を育苗培養土 (くみあい粒状培土; 揖斐川工業) が入った株まきポットに播き、播種後12日目に植物体を0.15g Nに相当する化成肥料 (N:P:K = 8:8:8)、0.15 gの微量要素、2gのケイ素を含む赤玉土 (Green Plan) が満たされた500 mLプラスチックカップ (アズワン) に移植し、神戸大学農学部ファイトトロン、または温室で自然光下で栽培した。糖処理は10葉期のイネを2日間暗処理した後、最上位の葉をサンプリングし、50mMの濃度のグルコースもしくはスクロースに8時間浸すことにより、行った。各組織及び糖処理したサンプルからのtotal-RNAの抽出は、RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) を用いて行い、1st strand cDNAの合成には、タカラバイオ社のPrimeScript[®] II 1st strand cDNA Synthesis Kitを使用した。

RT-PCRによるOs11g45280、Os12g37570遺伝子発現量の解析

RT-PCR反応はHot Start Taq DNA Polymearse (New England Biolabs社) を用いて行った。PCR反応は遺伝子増幅装置 PC-700型 (アステック社) を用いて行った。PCRに用いたプライマーは、それぞれOs11g45280 (Forward primer : 5'-TGGGAAGACCTGGCAATTGG-3'、Reverse primer : 5'-TGCTGGCCTGCTGGGACCTC-3')、Os12g37570 (Forward primer : 5'-CCAGAGGTGTTGCGCAATGA-3'、Reverse primer : 5'-ACCGCCTGCAAAATTGTGTC-3') である。また、遺伝子発現のコントロールとしてActin1のRT-PCRも行った。以下にActin1のプライマーの配列を示す。Forward Primer : 5'-CGCCCCCTCCTGAAAGGAAGT-3'、Reverse Primer : 5'-GCAGGAGGACGGCGATAACA-3'。

Os11g45280ノックアウトイネの確立、RT-PCRによる遺伝子発現確認

イネ内在性レトロトランスポゾン Tos17を用いた日本晴の遺伝子破壊システムのデータベース (ミュータントパネル) にOs11g45280遺伝子領域にレトロトランスポゾンが挿入されているOs11g45280ノックアウトイネ候補システムが3系統登録されていた。そこで、同3系統のイネを、ミュータントパネルを管理されている農研機構次世代作物開発センターイネゲノムリソースセンターの宮尾 安藝雄氏より分与いただき、同種子を発芽、栽培することにより、Os11g45280ノックアウトイネホモ系統の確

立を行った。遺伝子破壊の確認はRT-PCRにより行った。*Os11g45280*ノックアウトイネ候補系統植物からのTotal RNAの抽出、cDNAの調製及びRT-PCRは上述の方法により行った。

圃場栽培による生長解析

草丈の調査は最上位にある葉の先端から地上部基部までの長さを草丈とし、植え始めてから2週間ごとに草丈を測定した。また各個体の分けつ数を2週間ごとに調査した。植物体の収量の調査は、収穫後、穂は60℃、穂を取った植物体は80℃で3日間乾燥させた後、乾燥重、全穂重、穂数、精粒数を測定することにより行った。50粒重の測定は、収穫後登熟した種子からランダムに50粒取り出し、その重さを測定することにより行った。データはこの操作を三回ずつ行った平均値を示した。

結果及び考察

イネにおけるMAP3Kδ4相同遺伝子の同定と他の植物種との比較

シロイヌナズナの生育やストレス応答において重要な役割を果たすMAP3Kδ4はN末端側にPASドメイン、C末端側にキナーゼドメインを有する遺伝子である。またそのキナーゼドメインのアミノ酸配列を用いた系統解析により、MAP3Kδ4はRafタイプのMAP3Kに分類される。シロイヌナズナでは同様の構造を持つMAP3KがMAP3Kδ4以外に5つ（*At1g67890*、*At3g06620*、*At3g06630*、*At3g06640*、*At5g49470*）存在する。これらのうち*At1g67890*、*At3g06620*、*At5g49470*はABAに発現誘導され、種子休眠の制御に関与することが報告されている（Lee *et al.* 2015）。他の植物種においてはこれまでのところ、MAP3Kδ4相同遺伝子に関する報告はなされていなかった。そこで、まず他の植物種におけるMAP3Kδ4相同遺伝子の同定を試みることにした。Lehti-Shiuらは、シロイヌナズナ（*Arath6*）、イネ（*Orysa4*）、ポプラ（*Poptr1*）、クラミドモナス、ヒメツリガネゴケ及び緑藻のゲノム中に存在するプロテインキナーゼ遺伝子のキナーゼドメインのアミノ酸配列に基づく系統解析（NJ法）を行った結果（Lehti-Shiu *et al.* 2009）を報告しているが、その中でPASドメインを持つMAP3K遺伝子を含むクレードを抜粋して、図1に示した。

本論文の研究対象であるイネには、*Os11g45280*、*Os12g37570*という2つの遺伝子のみが存在し、またポプラでは55332、354024及び554320の3種の遺伝子が存在していた。このことはMAP3Kδ4相同遺伝子が植物の中で多様性を持って存在していることを示しており、それぞれの植物で特有の機能を有している可能性がある

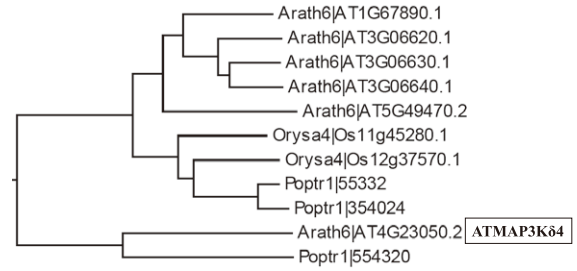


図1. 植物におけるPASドメインを持つMAP3K遺伝子の系統解析

シロイヌナズナ（*Arath6*）、イネ（*Orysa4*）、ポプラ（*Poptr1*）、クラミドモナス、ヒメツリガネゴケ及び緑藻のゲノム中に存在するプロテインキナーゼ遺伝子のキナーゼドメインのアミノ酸配列に基づく系統解析（NJ法）を行った結果（Lehti-Shiu *et al.* 2009）より、本論文で紹介するPASドメインを持つMAP3K遺伝子を含むクレードを抜粋した。

考えられる。さらに興味深いことに、これら高等植物の起源となるクラミドモナスやヒメツリガネゴケにはMAP3Kδ4相同遺伝子が同定できなかった。このことは、MAP3Kδ4相同遺伝子が高等植物の進化において重要な役割を果たしてきた可能性を示唆しており、それぞれの植物におけるMAP3Kδ4相同遺伝子の機能を明らかにしていくことが必要であるのではないかと考えられる。

MAP3Kδ4相同遺伝子がN末端側に持つPASドメインは、原核生物や真核生物を問わず様々な生物種で同定されている機能ドメインであるが、光、酸素濃度、酸化還元状態など多様なシグナルを受け取るセンサーとして働くことや（Barry *et al.* 1999）、ホモ二量体あるいはヘテロ二量体を形成する相互作用の場として働くことが知られている（Andreas *et al.* 2009）。さらにPASキナーゼのPASドメインには、キナーゼ活性を調節するスイッチを入れるような調節性センサーとして作用するものが存在する（Amezcuca *et al.* 2002）。このようにシグナル伝達において重要な機能を持っているPASドメインは、もちろんクラミドモナス、ヒメツリガネゴケ及び緑藻のゲノム中にも存在するが、C末端側にMAP3Kのキナーゼドメインを融合したものは、これまでのところ高等植物のみで同定されている。このことから高等植物の進化の過程でMAP3Kδ4相同遺伝子がどのように獲得され、多様化してきたかを明らかにすることは重要であると言える。

Os11g45280、Os12g37570遺伝子発現量の解析

イネにおけるMAP3Kδ4相同遺伝子*Os11g45280*、*Os12g37570*の機能を明らかにするため、まず各組織における遺伝子発現を解析した（図2A）。その結果、*Os11g45280*は葉鞘で発現が高く、*Os12g37570*は種子で発現が低い、また両遺伝子ともそのほかの組織では一定

の発現を示していることが明らかになった。葉鞘は光合成産物である糖を貯蔵する組織であることから、*Os11g45280*と光合成産物である糖との関連を検証するため、糖処理での*Os11g45280*の発現解析をRT-PCRにより行った。10葉期のイネを2日間暗処理し、その後最上位の葉をサンプリング、50mMの濃度のグルコースもしくはスクロースで8時間処理した。その結果、*Os11g45280*は解糖系の基質であるグルコースには応答しないが、糖の輸送形態であるスクロースに反応して発現が上昇することが明らかになった (図2B)。

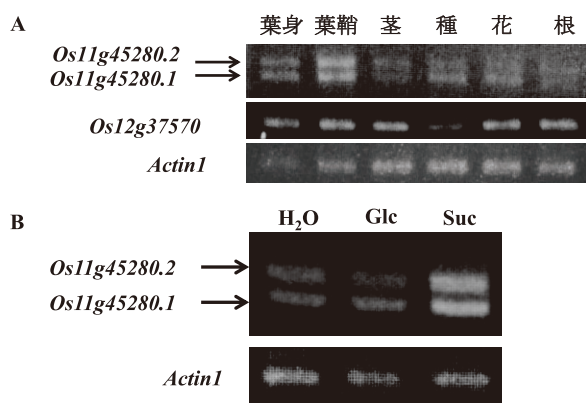


図2. イネPASM3Kの遺伝子発現解析

- A. イネ各組織における、遺伝子発現。イネ (日本晴)各組織より抽出したtotal RNAを鋳型にRT-PCRを行った。*Actin1*遺伝子の発現量をコントロールとして、2種のPASM3K遺伝子 (*Os11g45280*及び*Os12g37570*)のイネ各組織における遺伝子発現を比較した。
- B. *Os11g45280*遺伝子の糖処理による遺伝子発現誘導。10葉期のイネを2日間暗処理した後、最上位の葉をサンプリングし、50mMの濃度のグルコース (Glc)もしくはスクロース (Suc)に8時間浸すことにより、糖処理を行った。処理後、抽出したtotal-RNAを鋳型にAと同様にRT-PCRを行った。

*Os11g45280*ノックアウトイネの確立、圃場栽培による生長解析

*Os11g45280*のさらなる機能解明のため、同遺伝子が破壊されたノックアウトイネを作成し、その表現型を解析することとした。イネ内在性レトロトランスポゾン*Tos17*を用いた日本晴の遺伝子破壊系統のデータベース、ミュータントパネルから*Os11g45280*遺伝子中に*Tos17*が挿入されたノックアウト候補系統を3系統 (NF7035、NE4024、NE4045) 取り寄せ、ノックアウトイネの選抜を行った (図3)。ミュータントパネルに存在する3系統のうち、NF7035は第2イントロンに、またNE4024、NE4045系統は第3エクソンに*Tos17*が挿入されている。それぞれの系統より抽出したtotal RNAを鋳型にRT-PCRを行った。*Actin1*遺伝子の発現量をコントロールとして、*Os11g45280*全長遺伝子の増幅によりノックアウトの確認を行った。その結果、取り寄せた3系統のうち、第3エクソンに*Tos17*が挿入されているNE4024、NE4045系統について*Os11g45280*全長遺伝子の増幅が確認できず、これら両系統を*Os11g45280*ノックアウトイネとして以降の実験に使用することにした。

イネ内在性レトロトランスポゾン*Tos17*の挿入により作出されたノックアウト系統は、通常の遺伝子組換えによる遺伝子破壊株とは異なり、外部遺伝子を組み込んだものではないため、通常実験圃場での栽培が可能である。そこで、野生型日本晴及び確立したノックアウト2系統を神戸大学農学部実験圃場で7月から9月にかけて栽培し、生長解析を行った。草丈は、最上位にある葉の先端から地上部基部までの長さとして2週間ごとに測定したが、野生型と*Os11g45280*ノックアウトイネ2系統で差

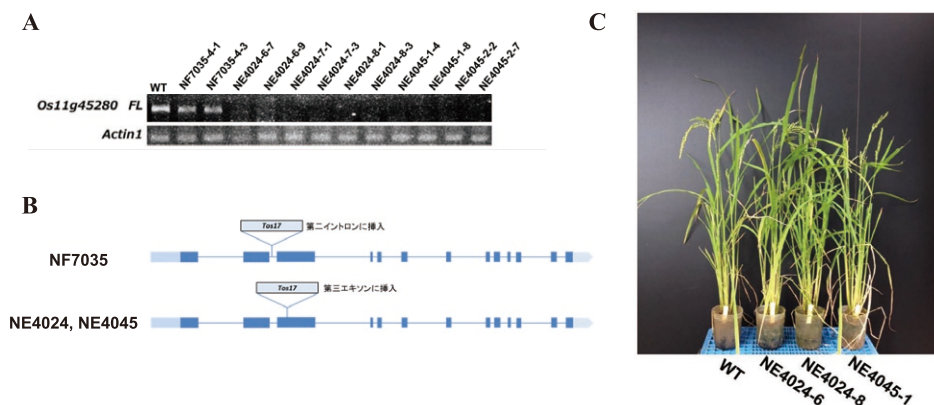


図3. *Os11g45280*ノックアウトイネの選抜

イネ内在性レトロトランスポゾン*Tos17*を用いた日本晴の遺伝子破壊系統のデータベース、ミュータントパネルから*Os11g45280*遺伝子の破壊系統を3系統 (NF7035、NE4024、NE4045) 取り寄せて、ノックアウトイネの選抜を行った。

- A. それぞれの系統より抽出したtotal RNAを鋳型にRT-PCRを行った。*Actin1*遺伝子の発現量をコントロールとして、*Os11g45280*全長遺伝子の増幅によりノックアウトの確認を行った。
- B. 取り寄せた*Os11g45280*遺伝子の破壊系統を3系統 (NF7035、NE4024、NE4045)のイネゲノムにおける*Tos17*レトロトランスポゾン挿入位置を示した。
- C. 播種後84日の各系統の写真。左からWT (日本晴)、NE4024-6、NE4024-8、NE4045-1。育苗箱で2週間育てた後、500mlポットに移植し、温室・自然光条件化で育てた。

は観察されなかった(図4)。それに対して、分けつ数は、ノックアウトイネ2系統とも野生型に比べ、少ない傾向にあり、NE4045系統については有意に減少した。収穫後、乾燥重、全穂重、穂数及び精糲数の調査を行い、*Os11g45280*ノックアウトの収量における影響を調査した。その結果、乾燥重、全穂重、穂数、精糲数すべての調査項目について、ノックアウトイネ2系統とも野生型に比べ、有意に減少することが明らかになった(図5)。

分けつ数の低下に伴い、収量の減少が起こったと考えられるが、今後分けつの制御における*Os11g45280*遺伝子の役割を検証すること重要である。収穫された種子の

重量(50粒重)を比較したところ、興味深いことにノックアウトイネ2系統とも野生型に比べ、有意に増加していた(図5)。分けつ数が低下したことにより、種子数は減少したが、大型で高品質の種子である可能性がある。今後、種子の成分分析など詳細に調べる必要があるが、品質の良いコメ作出につながる遺伝子変異ではないかと考えられる。これまでに、日本晴のオーキシンの合成に関与する*TGW6*遺伝子の欠失によりコメの粒が長くかつ重くなることが報告されている(Ishimaru *et al.* 2013)。*TGW6*遺伝子の欠失を育種に利用することで、収量性や品質の安定した品種の開発が期待されている。

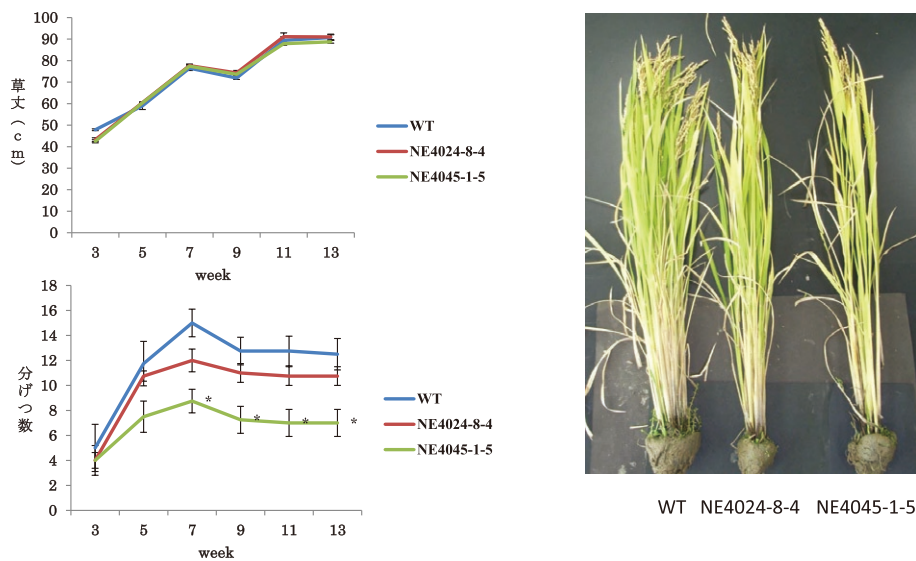


図4. 圃場で栽培した*Os11g45280*ノックアウトイネの生長解析

イネ日本晴 (WT)、及び*Os11g45280*ノックアウトイネ2系統 (NE4024, NE4045)を神戸大学農学部実験圃場にて、自然条件化で栽培し、図に示す週ごとに草丈と分けつ数を調査した。写真は収穫時期における各系統の典型的な植物体の様子である。データは平均値と標準偏差を示す。*はWTと比較して有意に差 ($P < 0.05$)があったものを示す。

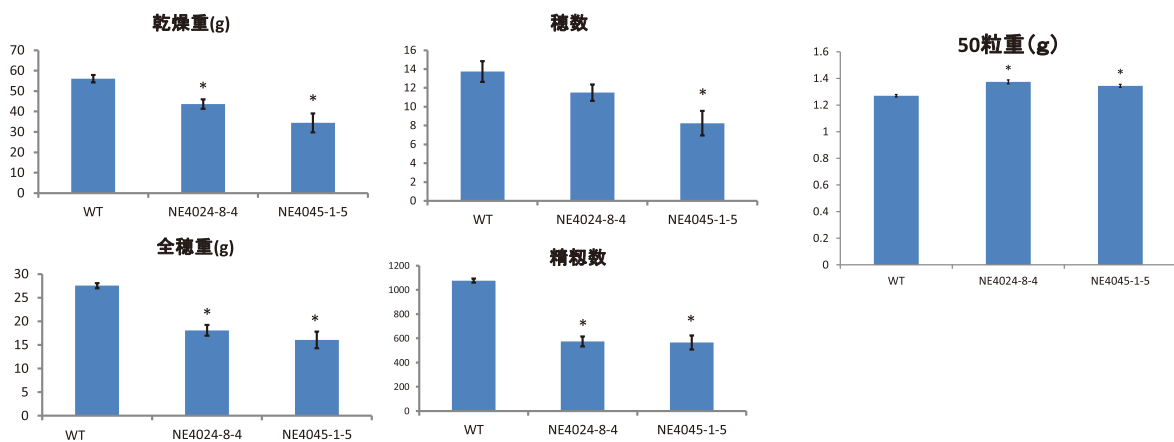


図5. 圃場で栽培した*Os11g45280*ノックアウトイネの収量の比較

イネ日本晴 (WT)、及び*Os11g45280*ノックアウトイネ2系統 (NE4024, NE4045)を神戸大学農学部実験圃場にて、自然条件下で栽培し、収穫後、それぞれに示す項目について調査した。データは平均値と標準偏差を示す。*はWTと比較して有意に差 ($P < 0.05$)があったものを示す。

Os11g45280 遺伝子の機能解明を進め、同遺伝子を利用した新品種の開発に利用していくことが重要である。

本研究では、シロイヌナズナにおいてストレス耐性や収量に関与する遺伝子である MAP3K64 と相同な遺伝子をイネから同定し、各組織における遺伝子発現や糖処理による発現誘導の制御を明らかにした。さらに Os11g45280 遺伝子ノックアウトイネを確立し、圃場において自然条件化で栽培するとことでイネの分けつの制御における役割を明らかにするとともに、高品質なコメの作出につながる形質を得ることができた。今後、これらを詳細に解析し、有用品種の作出に利用していくことで、食糧問題の解決の一助になることを強く願っている。

謝 辞

イネ突然変異系統 (Tos17) の種子を分譲していただきました農研機構次世代作物開発センターイネゲノムリソースセンターの宮尾 安藝雄 氏に感謝いたします。

参考文献

Amezcuca CA, Harper SM, Rutter J, Gardner KH (2002) Structure and Interactions of PAS Kinase N-Terminal PAS Domain: Model for Intramolecular Kinase Regulation. *Structure* 10(10):1349-61

Andreas M, Rebecca A, Keith(2009) Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. *Structure* 17(10):1282-1294

Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H, Kyojuka J. (2007) DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J.* 51(6):1019-29

Barry L. Taylor, Igor B. Zhulin (1999) PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light.: *Microbiol Mol Biol Rev.* 63(2): 479-506

Colcombet,J Hirt,H (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* 413: 217-226

Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamura I, Kyojuka J. (2005) Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol.* 46(1): 79-86

Ishimaru K, Hirotsu N, Madoka Y, Murakami N, Hara N, Onodera H, Kashiwagi T, Ujiie K, Shimizu B, Onishi A, Miyagawa H, Katoh E. (2013) Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene TGW6 enhances rice grain weight and increases yield. *Nat Genet.* 45(6): 707-11

Lee SJ, Lee MH, Kim JI, Kim SY (2015) Arabidopsis putative MAP kinase kinase kinases Raf10 and Raf11 are positive regulators of seed dormancy and ABA response. *Plant Cell Physiol* 56(1): 84-97

Lehti-Shiu MD, Zou C, Hanada K, Shiu SH. Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. (2009) *Plant Physiol.* 150(1): 12-26

Sasayama D, Matsuoka D, Oka M, Shitamichi N, Furuya T, Azuma T, Itoh K, Nanmori T (2011), MAP3K64 an Arabidopsis Raf-like MAP3K, regulates plant growth and shoot branching. *Plant Biotechnology* 28: 463-470

Shitamichi N, Matsuoka D, Sasayama D, Furuya T, Nanmori T (2013) Over-expression of MAP3K64, an ABA -inducible Raf-like MAP3K that confers salt tolerance in Arabidopsis. *Plant Biotechnology* 30: 111-118

Sinha AK, Jaggi M, Raghuram B, Tuteja N (2011) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal Behav.*6(2): 196-203