

# 研 究 報 告 書

## 「化学遺伝学的手法を利用した乾燥ストレス適応型作物設計」

研究タイプ：通常型

研究期間：2015 年 12 月～2019 年 3 月

研 究 者：岡本 昌憲

### 1. 研究のねらい

乾燥地にとって水は極めて重要な資源である。限られた水を有効的に利用することは、人類の生活のみならず、作物生産においても次世代農業を実現するためには必要不可欠である。地中に地下水が豊富に存在するような乾燥地では、深根性の形質を示す植物が乾燥地における水の獲得に有利であるが、地下水が存在しない乾燥地も広く存在し、このような乾燥地では、植物が根を地中深くに伸ばしても、水を獲得することができない。地下水の存在しない多くの乾燥地では、人工灌漑や雨水により、地表層に水を蓄え、農業に利用する。つまり、このような状況では、限られた貴重な水を無駄に使用せず、生長できる節水型乾燥耐性の形質が有効的である。植物の節水性と耐乾性を向上させる技術、あるいはそれらの性質を兼ね備えた作物が開発できれば、乾燥ストレスによる生産量の損失を軽減できるため、乾燥地における農業生産に対する影響は大きいものとなる。

植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)は高等植物に普遍的に広く存在し、陸上植物の乾燥ストレス耐性に関わる重要なシグナル物質である。モデル植物のシロイヌナズナを中心に主要な ABA 代謝経路とシグナル伝達の概要が明らかにされているが、実用作物への展開は乏しく、モデル植物で得られた耐乾性を向上させる方法論を実際の作物で検証する必要がある。そこで、本研究では、世界の乾燥地で広く栽培されている重要作物のコムギを研究材料に用いて、耐乾性と節水性に ABA がどれだけ寄与するかを検証するとともに、遺伝的多様性が乏しいコムギに耐乾性を付与するための新たな育種素材の選抜と QTL の同定を行い、少ない水資源で作物生産を可能とするための作物設計実現のための基盤研究を実施することとした。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

遺伝子組み換えが困難とされているコムギで ABA 受容体を過剰発現させた形質転換体(TaPYLox)の創出に成功し、分子的な特徴付け、および生理学的な評価を行った。次世代シーケンス(NGS)を用いた解析によって、TaPYLox は期待通りに ABA に対して高感受性の性質を有することが明らかとなり、耐乾性が向上した。興味深いことに、TaPYLox は、葉からの蒸散量が低下しているにもかかわらず、生育障害が生じなかった。この不思議な現象は、TaPYLox ではルビスコによる光合成活性が向上したために、気孔の開度が十分に開いていなくとも、炭酸固定が行えることに起因していた。そこで、葉で得られた節水性の形質が穀物の生産においても同様であるかを検証した結果、TaPYLox は湿潤土壌では、種子の生産においては、コントロール(非形質転換体)と同等であったが、水の消費量が約 20%抑えられていた。さらに、コントロール系統の種子生産に問題が生じる少ない水の量で生育させた場合は、TaPYLox の種子生産性の減少は緩和された。以上のことから、ABA 受容体を強化する

ことで、節水型耐乾性コムギが創出できることが示された。

世界の乾燥地で栽培されているコムギ品種から ABA の感受性が高い Halberd 品種を同定した。ABA 非依存的な形質で耐乾性を示す実用品種 Cham6 と交配し、ABA 依存的・非依存的な両者の性質を兼ね備えたコムギ創出を試みたが、F1 個体がネクロシスを生じてしまった。Halberd 品種の ABA 感受性は TaPYL<sub>ox</sub> と比べマイルドである。より ABA 感受性が高いコムギを選抜するために、遺伝的多様性に富む多重合成コムギ(MSD)集団から ABA 感受性が向上した系統を選抜した。幾つかの系統に関しては、海外の実際の乾燥地(モロッコ)で収量試験を実施したが、2017~2018 年のモロッコでは、異常な多雨に見舞われ、乾燥地としての試験が成立しなかった。しかし、国内のハウスの擬似乾燥区で実施した試験では、コントロールの農林 61 号よりも、単離した系統の幾つかにおいては、種子の生産性が向上していた。さらに、ABA 感受性が向上した系統群は、共通のタルホコムギ由来の染色体断片を持つことから、これらの染色体断片が節水型耐乾性の QTL になり得ることが示された。

## (2) 詳細

### ① ABA 受容体を過剰発現させたコムギ形質転換体(TaPYL<sub>ox</sub>)の分子生理学的解析

コムギから 9 種類の ABA 受容体を単離し、ABA 受容体の標的タンパク質である 6 種類の PP2C を単離して、生化学的な解析と遺伝子発現解析を行った。その結果、様々な組織で高い発現量を示し、ABA との結合親和性の高い受容体 TaPYL4 に標的を絞り、これを過剰発現させた形質転換体コムギ(TaPYL<sub>ox</sub>)を創出した。TaPYL<sub>ox</sub> は、NGS を用いたトランスクリプトームからも ABA の感受性が期待通りに向上しており、乾燥ストレス実験においても耐乾性が向上していた。TaPYL<sub>ox</sub> の耐乾性は、乾燥地での実用品種である Cham6, Nesser や Roelf-F2007 の近代品種よりも強いことが判明した。TaPYL<sub>ox</sub> は気孔の開度がコントロール(非形質転換体; Null 系統)に比べ、約 25%程度閉じているにもかかわらず、植物体では生育阻害が観察されなかった。光合成測定装置 LI-6800 を用いた解析から、TaPYL<sub>ox</sub> は葉からの蒸散量が低下しているにもかかわらず、CO<sub>2</sub> の炭酸同化速度(光合成速度)は低下していなかった。さらに光合成速度(A)と葉内二酸化炭素濃度(Ci)の関係性を明らかにできる A-Ci 曲線解析から、TaPYL<sub>ox</sub> ではルビスコにおける最大カルボキシル化速度(V<sub>cmax</sub>)が向上していた。つまり、TaPYL<sub>ox</sub> が水の消費量を抑えながら生育可能な理由は V<sub>cmax</sub> が向上したことに起因していると考えられた。さらに、葉で得られた節水性の性質の理論が、最終的に個体全体あるいは穀物生産においても、同様に節水性を示すかどうかを解析した。湿潤土壌で育てた場合に、TaPYL<sub>ox</sub> は植物体の地上部のバイオマスと種子生産量はコントロールと比較して差はなかったが、水の消費量は 20%抑制されていた。つまり、水消費量あたりの生産性は向上したことが明らかとなった。さらに、水の供給量を制限して、コントロール系統が種子生産性に問題(生産性の低下と不良形状の種子)が生じる限定的な水量においても、TaPYL<sub>ox</sub> では種子の生産性の低下が、さらには、種子の不良形状も緩和されていた(図 1. A と B)。また TaPYL<sub>ox</sub> の種子に含まれる成分を NMR で分析した結果、湿潤生育では、コントロールと TaPYL<sub>ox</sub> の両者の種子成分に差がなかった。一方、乾燥環境下では、コントロールの種子成分が湿潤区栽培での種子成分と大きく異なるのに対して、乾燥環境下で生育させた TaPYL<sub>ox</sub> の種子の成分は湿潤区に類似していた(図 1. C の NMR のプロット参照)。以

上の一連の研究から、ABA 受容体を強化することで、節水型耐乾性コムギが創出できることを明らかにした。

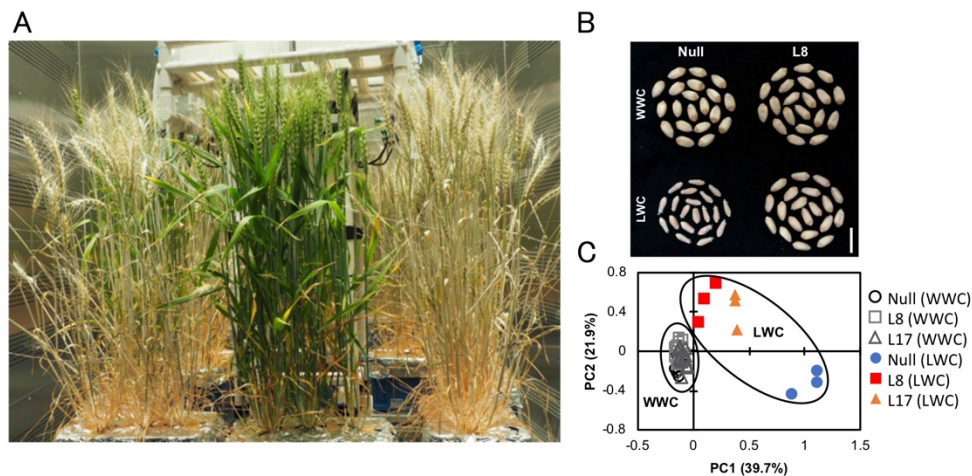


図1. ABA受容体を過剰発現させたコムギ(TaPLYox)の節水性評価

A. 少ない水で生育させた場合、中央がTaPLYoxのL8系統。B. コントロール(null)とTaPLYoxのL8系統の種子の形状。WWCは湿潤区、LWCは少ない水で生育させた環境(水量限定区)。C. NMRによる種子成分の比較。少ない水で生育させ生産されたTaPLYoxのL8系統の種子は、湿潤区と同等の成分である。

## ②ABA 非依存的なストレス耐性コムギ系統および、ABA 高感受性コムギ系統を利用したABA 非依存性・ABA 依存性ストレス応答機構の解明

CIMMYT などの国際研究機関には、従来の育種方法によって作成された、乾燥地で主要な品種となっているコムギが存在する。しかしながら、世界の乾燥地で栽培されているコムギ品種間での性質の一致点あるいは相異点が分子レベルで不明である。ABA の投与実験により、Halberd 品種が ABA に対して高感受性を示すことが明らかとなった。一方、Cham6 や Nesser などの乾燥地で栽培されている系統に関しては、ABA 非依存的な耐乾性系統であると推測された。これら性質の異なる系統の分子特徴を明らかにするために、メタボロームとトランスクリプトームの統合解析を進めていたが、所属機関の異動の問題や RNA のライブラリー調製時の問題などがあり、十分に解析ができなかった。また、ABA 依存的な耐乾性品種 Halberd と ABA 非依存的な Cham6 を掛け合わせ、両者の性質を兼ね備えたコムギの創出を試みたが、F1 植物が極矮性でかつ成長不良のため開花が起こらず F2 種子を得ることができず、この研究テーマはさきがけの期間内では低調であった。

## ③遺伝的多様性に富む多重合成コムギ(MDS)集団から単離した ABA 高感受性系統の表現型を支配する QTL の同定

約 8,500 年前に偶発的な交配により誕生したコムギは A, B, D のゲノムを持つ 6 倍性の作物であり、世界のパンコムギ品種はその当時に誕生したごく少数コムギを由来として育種されてきたために、他の作物種と比較して遺伝的多様性が乏しい。コムギの D ゲノムの一部だけを様々なタルホコムギの近縁野生植物由来に置換させ、従来のコムギに遺伝的多様性を持たせた多重合成コムギ(MDS)集団を利用し、ABA による感受性スクリーニングを行い、2 万個体を試験して、ABA 高感受性系統を選抜した。これらがどのタルホコムギの染色体断



片を持つかを NGS 解析により分析した結果、ABA 高感受性系統 8 系統は Synthetic40 系統(タルホキムギ KU-2098 系統)由来の D ゲノム断片を共通に保有していることが判明し、共通の複数の3箇所が ABA の感受性に関わることが推定された(図 2)。

一方、選抜した ABA 高感受性が実際のフィールドの乾燥地で生産性が向上するかどうかを検証するために、鳥取大学と国際乾燥地農業研究センター(ICARDA)の協力を経て、モロッコでフィールド試験を実施した。灌漑により湿润区を作成し、乾燥地は天水に依存した形で実施する予定であったが、2017-2018 年のモロッコは例年になく多雨に見舞われ、乾燥地としての収量解析が成立しなかった。一方、2017-2018 年の国内のハウスで灌漑コントロールにより作成した擬似乾燥地を使って実施した収量試験では、コントロールとなる農林 61 号比べて ABA 高感受性系統で収量が高い系統(Oka7 と Oka56 系統)があった。Oka56 に関しては、乾燥地の実用品種である Cham6 よりも収量が高かった(図 3)。

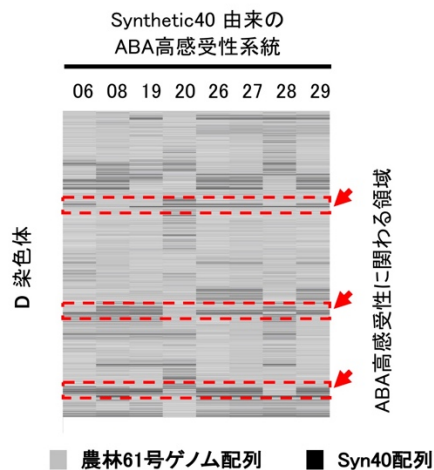


図2. ABA感受性に関わると考えるDゲノム領域

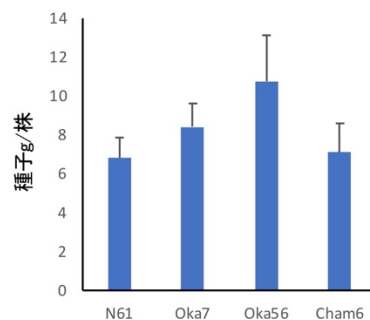


図3. 擬似乾燥区における種子の生産量  
Synthetic29 由来のABA高感受性系統は Cham6品種より種子の生産量が高かった。

### 3. 今後の展開

ABA の受容体を強化することで、節水型耐乾性コムギの創出が可能になったことが明らかとなった。本研究では、トウモロコシのユビキチンプロモーターを使った過剰発現の方法を用いたが、ABA 受容体に特定のアミノ酸を変化させるだけで、ABA 受容体自身の機能が高められることが報告されている。ゲノム編集穀物が米国やカナダで承認されれば、相同組換えにより、TaPLY4 にアミノ酸変異を起こして ABA 受容体を強化した節水型耐乾性コムギを創出したいと考えている。

また、さきがけの研究期間内では低調であった、トランスクリプトームとメタボロームの統合解析は、今後、低コストで実施可能なメタボローム解析(宇都宮大での GC-MS を利用)で乾燥ストレスと ABA の関係性を詳細に解析するとともに、異なる耐乾性系統の特徴をメタロボームの解析を中心に実施して、明確な特徴が見いだせれば、トランスクリプトームによる分子的な特徴付けを行いたい。

一方で、MSD から同定した ABA の感受性を向上させるタルホキムギ KU-2098 の断片を近代品種(Roelf-F2007 や BORLAUG100)に導入して、節水性が付与できるかを国内で試験し、国

内で有望な結果が得られた場合には、CIMMYT や ICARDA などの協力を経て、実際の乾燥地で収量試験を行う。また、近年は、地球温暖化がコムギ生産性の低下をもたらしているため、節水型形質が高温環境下ではネガティブに作用する可能性もあり、この点も検証していく必要がある。もし、ネガティブな影響が無ければ、耐暑性を持つ品種(NAVOJOA や Imam)に、節水型の形質を付与して、生産性が保たれるか否かを検証していく。耐暑性に関しては、鳥取大学とスーダン農業研究機構などと協力して実施していく予定である(地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム 2018-2022; 鳥取大学 辻本教授代表の分担研究として実施予定)。

#### 4. 自己評価

本研究では、大きく分けて 3 つの課題を設定した。課題①では、コムギから 9 種の ABA 受容体を単理して性質を明らかにし、この情報を活用して、ABA 受容体を過剰発現したコムギ (TaPLYox) を創出した。その結果、耐乾性付与に加えて、節水性という性質も獲得していた。つまり、水消費量あたりの種子生産性が ABA 受容体の過剰発現によって向上できるということを示すものであり、得られた学術的意義は大きく、他の穀物への応用展開も考えられる。TaPYLox は遺伝子組換えコムギだが、節水型耐乾性コムギの育種を行っていく上でのモデルコムギとなりうるものであり、本課題では目標以上の成果が得られたと考えられる。課題②では、ABA 依存的・非依存的な耐乾性コムギ品種の分子的特徴を見いだせなかった。この点は、今後の課題で、メタボローム解析を中心に、ABA 依存的・非依存的な耐乾性コムギの違いを明らかにし、コムギ育種に利用可能な代謝物マーカーを作成することが今後の課題である。課題③では、MSD 集団から ABA 高感受性系統の選抜に成功して、海外の乾燥地におけるフィールド試験に挑むことができた。残念ながら、2018 年のモロッコにおける異常気象により乾燥地としての収量試験を成立させることはできなかった。しかし、ABA 高感受性系統はタルホコムギ KU-2098 の D ゲノム断片の 3 箇所を多く保有することが判明し、この領域が ABA の感受性に関わることを推定できたため、一定の目標には到達したと考えている。今後は、タルホコムギ KU-2098 の染色体断片を実用品種に導入し、国内での疑似乾燥地での収量評価も含め、節水性が実際の乾燥地で有効かどうかを海外の国際機関と共同で検証していく。また、高温環境下では、節水性の形質がネガティブになりうる可能性もあるため、この点も検証する必要がある。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Takeuchi J\*, Okamoto M.\* Mega R. Kanno Y. Ohnishi T. Seo M. Todoroki Y. (2016) Abscisinazole-E3M, a practical inhibitor of abscisic acid 8'-hydroxylase for improving drought tolerance. Scientific Reports. 14: 37060 \*Co-first
2. Okamoto M. Cutler SR. (2018) Chemical control of ABA receptors to enable plant protection against water stress. Plant Chemical Genomics. p127-141
3. Dejonghe W\*, Okamoto M.\* Cutler SR. (2018) Small molecule probes of ABA biosynthesis and signaling. Plant Cell Physiology. 59: 1490-1499\* Co-first
4. Mega R. Abe F. Kim JS. Tsuboi Y. Tanaka K. Kobayashi H. Sakata Y. Hanada K. Tsujimoto H. Kikuchi J. Cutler SR. Okamoto M.# (2019) Water-saving wheat: tuning water use

efficiency and drought tolerance using ABA receptors. Nature Plants. 5: 153–159

# Corresponding

5. Fujika H. Samejima H. Suzuki H. Mizutani M. Okamoto M.<sup>§</sup> Sugimoto Y.<sup>§</sup> (2019) Aberrant protein phosphatase 2C leads to ABA insensitivity in parasitic Striga. (2019) Nature Plants. 5: 258–262 <sup>§</sup> Co-corresponding

(2)特許出願

研究期間累積件数： 0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 岡本昌憲 「アブシジン酸受容体に作用する人工化合物の開発とその利用」 第 8 回 植物ストレス科学研究シンポジウム. 2016 年 3 月 8 日 (招待講演)
2. Okamoto M. 「Enhancement of abscisic acid receptor improves water use efficiency in crop production」 International Symposium on Environmental Stress Adaptation & Memory in Plants. 2017 年 2 月 28 日 (招待講演)
3. Okamoto M. 「Chemical regulation in ABA metabolism and signaling」 ISHS 13th International Symposium 2017 年 8 月 30 日(招待講演)
4. 岡本昌憲 「アブシジン酸の代謝と受容に関する化学遺伝学的研究」 植物の生長調節 (2016) 51 (1): 16–23
5. 「干ばつに強く、水を節約して育つコムギの開発に成功」 2019 年 2 月 8 日(プレスリリース)