イネの高緯度地域への適応形質に関する遺伝・育種学的研究

誌名	育種学研究 = Breeding research
ISSN	13447629
著者名	藤野,賢治
発行元	日本育種学会
巻/号	11巻4号
掲載ページ	p. 185-189
発行年月	2009年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

特集記事

イネの高緯度地域への適応形質に関する遺伝・育種学的研究

藤野賢治

ホクレン農業協同組合連合会，長沼町，〒069-1317

Adaptability of rice to northern-limit of rice cultivation

Kenji Fujino

HOKUREN Federation of Agricultural Cooperatives, Naganuma 069-1317, Japan

キーワード

量的形質，低温発芽性，遺伝子単離，イネ

1. はじめに

作物の安定生産には，環境ストレス耐性の付与が不可欠である．寒冷地である北海道でのイネの安定生産においては，耐冷性の向上が重要な育種目標である．特に，播種期と穂孕み期の低温ストレス障害がイネの生育において大きな問題となっている．播種期の耐冷性については，穂孕み期に比して遺伝解析および品種改良研究の蓄積が少ない．これは，北海道におけるイネの栽培方法が直播から移植へと変遷し，栽培技術によって安定生産が可能になったためである．

しかしながら，農業就労人口の減少・高齢化，生産費の低コスト化，大規模化等の近年の農業情勢の変化から，今後北海道におけるイネの直播栽培の必要性が大きくなっている．そのため，低温下において安定した発芽・苗立ち性を示す品種の開発が必要である．

以上の背景から，本研究ではイネの高緯度地域への適応形質として，低温発芽性に着目し，関与遺伝子の同定と遺伝子の単離を行った．

2. 低温発芽性遺伝子の同定

低温発芽性は複数の遺伝子が関与する量的形質と考えられ，その遺伝特性を明らかにすることは，低温発芽性の改良を行う上で重要である．これまでに，低温発芽性に関する多数の遺伝資源の評価が行われ，大きな変異が存在することおよび低温発芽性に優れる系統が明らかにされた（小高・阿部 1988）．本研究では，低温発芽性に極めて優れるイタリア由来の「Italica Livorno」を解析材料に用いた．

「Italica Livorno」と北海道の品種「はやまさり」との組合せに由来する F_1 に「はやまさり」を戻し交雑した BC_1F_1 世代から，単粒系統法により 122 系統の組換え自殖系統（Backcrossed Inbred Lines, BILs）を作出した．両親では明瞭な低温発芽性（15°C，置床後 7 日目の発芽率）の品種間差異が認められた．「Italica Livorno」は 98.7% の発芽率であったのに対し，「はやまさり」は 26.8% であった．一方，BILs では 0–83.3% の連続変異が観察された．

次に，連鎖地図の作成を行った．「Italica Livorno」および「はやまさり」は共に温帯ジャポニカに分類されることから（Mackill 1995），マーカーの多型率が低いと予想された．1,063 個の DNA クローンについて RFLP 多型解析を行った結果，201 の DNA クローン（18.9%）で両親間に多型が検出された．RFLP マーカーで多型が得られなかった領域については，SSR マーカーを用いて連鎖地図を作成した．276 プライマー対を供試した結果，84 プライマー対（30.8%）で多型が検出された．これらの多型マーカーのうち，染色体上の位置を考慮して 139 個の RFLP マーカーと 47 個の SSR マーカーを選抜し，連鎖地図の構築を行った．構築した連鎖地図は，イネ高密度連鎖地図（Harushima *et al.* 1998）の約 87.9% に対応していた．

BILs における低温発芽性について，この連鎖地図を用いて composite interval mapping による QTL 解析を行ったところ，3 個の QTL が検出された（図 1）．いずれの QTL においても「Italica Livorno」型の対立遺伝子が発芽率を高くする作用を示した．第 3 染色体短腕末端領域の DNA マーカー GBR3001 の近傍に，最も作用力の大きな QTL（*qLTG3-1*）が検出された．この *qLTG3-1* は，BILs における低温発芽性の全変異の 35.1% を説明する極めて作用力の大きな QTL であった．第 3 染色体長腕上の DNA マーカー RM3436 の近傍に *qLTG3-2* が，また第 4 染色体短腕末端領域の DNA マーカー R1854 近傍に *qLTG4* が検出された．これらは，それぞれ全変異の 19.3 および 5.5% を説明しうるものであった（Fujino *et al.* 2004）．

2009 年 8 月 26 日受領　日本育種学会奨励賞受賞（第 29 号）
Correspondence: fujino-kenji@hokuren.jp

3. *qLTG3-1*の確認

qLTG3-1 の存在を確認するため，戻し交雑による材料作出を行った（図2）．まず，BILsから *qLTG3-1* の座乗染色体領域の遺伝子型および低温発芽性の表現型に基づき，系統BIL116を選抜した．BIL116では，*qLTG3-1* の座乗染色体領域は「Italica Livorno」型であるが，*qLTG3-2* および *qLTG4* の染色体領域は「はやまさり」型に置換されていた．このBIL116に「はやまさり」を戻し交雑し，F_2 集団256個体を作出した．

この F_2 集団では，明瞭な低温発芽性（15°C，置床後6日目の発芽率）の分離がみられた（図3）．すなわち，発芽率40%を境界として，低温発芽性の低い「はやまさり」型が63個体，低温発芽性の高い「Italica Livorno」型が179個体となり，1遺伝子の分離比に適合していた（1：3，χ^2=0.14，0.90>p>0.70）．*qLTG3-1* に密接に連鎖するDNAマーカーGBR3001の遺伝子型は明瞭に低温発芽性の表現型と一致していた（図3）．GBR3001の遺伝子型が「はやまさり」型ホモ個体では低い発芽率を示した．一方，「Italica Livorno」型ホモ個体およびヘテロ個体は，高い発芽率を示した．以上のことから，*qLTG3-1* は優性の遺伝子であり，極めて作用力の大きな遺伝子であることが明らかとなった（Fujino *et al.* 2008b）．

次に，*qLTG3-1* 遺伝子単独での遺伝子作用力の評価を行うために，DNAマーカー選抜を用いて，*qLTG3-1* に関する準同質遺伝子系統（Near isogenic line, NIL）を作出した（図2）．BIL116に「はやまさり」を戻し交雑し，BC_2F_1 世代66個体から，*qLTG3-1* の極近傍で組換えを生じている#59を選抜した．更に，この個体に「はやまさり」を戻し交雑した BC_3F_1 世代11個体から，全ゲノム領域の遺伝子型に基づき#59-11を選抜した．この個体に由来する BC_3F_2 集団から *qLTG3-1* 領域をホモに持つ個体をNILとして選抜した．NILには *qLTG3-1* を含む「Italica Livorno」由来の350 kb程度の極めて小さな染色体領域が導入され

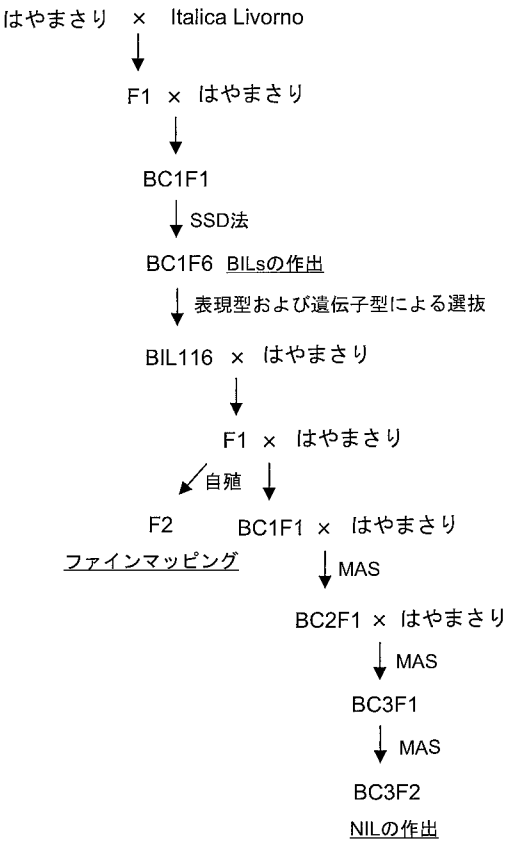

図2. 材料の養成過程

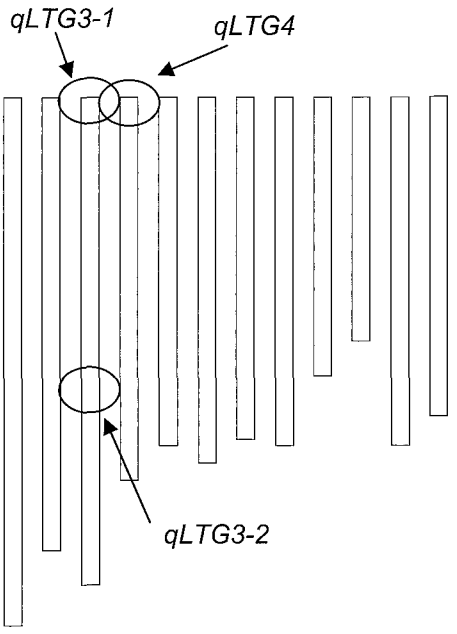

図1. イネ低温発芽性に関するQTLsの染色体領域
イネ高密度連鎖地図（Harushima *et al.* 1998）に対応して位置づけている．

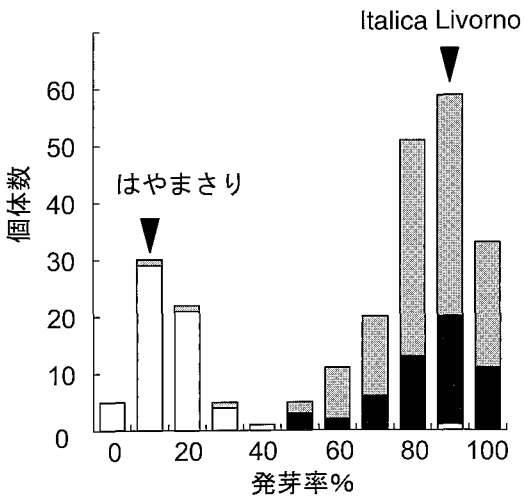

図3. BIL116と「はやまさり」の組合せに由来する F_2 集団における15°C 6日目の発芽率の変異
DNAマーカーGBR3001の遺伝子型によって，「Italica Livorno」ホモ型個体（黒），「はやまさり」ホモ型個体（白），ヘテロ型個体（灰色）に区分している．

ていた．NILの全ゲノム域のほとんどが反復親の「はやまさり」に置換されていた．

NILは，反復親の「はやまさり」に比較して極めて高い低温発芽性を示した（図4）．NILでは，置床後5日目から発芽が始まり，その後2日でほぼ全ての種子が発芽した．一方，「はやまさり」は発芽を終えるのに10日以上を要した（Fujino *et al.* 2008b）．

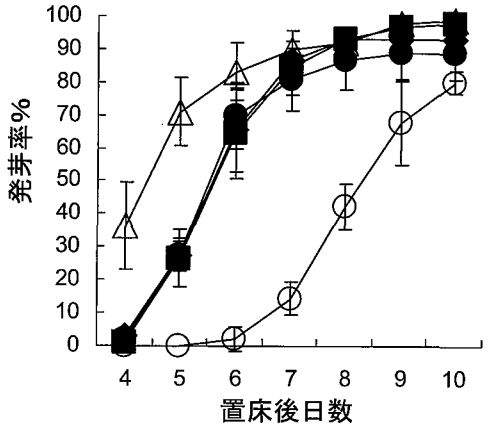

図4. 準同質遺伝子系統の15℃における発芽率の推移
「はやまさり」（○），「Italica Livorno」（△），準同質遺伝子系統（3系統，黒）の発芽率の平均値と標準偏差（n=3）を示している．

4. *qLTG3-1*の単離

次に，ポジショナルクローニングにより，低温発芽性遺伝子 *qLTG3-1* の原因遺伝子の単離を行った（図5）（Fujino *et al.* 2008b）．BIL116と「はやまさり」の組合せに由来するF_2世代256個体を用いたマッピングの結果，96 kbまでに候補領域を絞り込んだ．この候補領域について両親の塩基配列を解析したところ，14箇所の変異を同定できた．これらをマーカー化し，大規模集団（3,200個体）から組換え個体の選抜を行った．その結果，候補領域を4.8 kbに絞り込むことが出来た．この領域には1遺伝子のみがアノテーションされていた．*qLTG3-1* は全長555 bpの新規なタンパク質をコードする遺伝子であった．このタンパク質には，2種類のドメイン構造（glycine-rich cell wall protein（GRP），lipid transfer protein（LTP））が認められたが，いずれのドメインも異なる機能を示す多くの遺伝子に存在しており，*qLTG3-1* の機能推定には至らなかった．

「Italica Livorno」は機能型の配列を持つのに対し，「はやまさり」では71 bpの欠失によるフレームシフトが生じ，非機能型となっていた．「Italica Livorno」由来の機能型遺伝子を「はやまさり」へアグロバクテリウム法により遺伝子導入したところ，得られた形質転換イネは高い低温発芽性を示した．このことから，この遺伝子変異が低温発芽性の品種間差異の原因であることが証明された．

qLTG3-1 の遺伝子発現は，種子の登熟過程や貯蔵中の種子では認められないが，発芽処理後速やかに種子の胚部分で強い発現が認められた．また，低温だけでなく発芽適温においてもその遺伝子発現が認められたことから，ストレスに誘導される遺伝子ではないことが明らかとなった．さらに，プロモーターGUS解析の結果，*qLTG3-1* は幼芽・幼根を覆っている胚組織および胚に面している糊粉層で発現していた．種子発芽は，胚の生長力（growth potential）と胚を覆う組織による胚の保護力（mechanical resistance）とのバランスによって生じる（Nonogaki 2006）．これらのことから，*qLTG3-1* は胚の保護力を低下させる過程に関与する遺伝子と考えられた．

また，種子発芽時の発芽に関連する遺伝子の組織特異的な遺伝子発現は，双子葉植物で明らかになっている．本研究により，種子の構造が全く異なる単子葉と双子葉植物において，保存された「発芽」メカニズムが存在することが明らかとなった．

5. 今後の展望

本研究で同定した低温発芽性遺伝子 *qLTG3-1* は作用力が大きく，低温発芽性の改良において有用な遺伝子と考えられる．しかしながら，低温発芽性は量的形質であり，

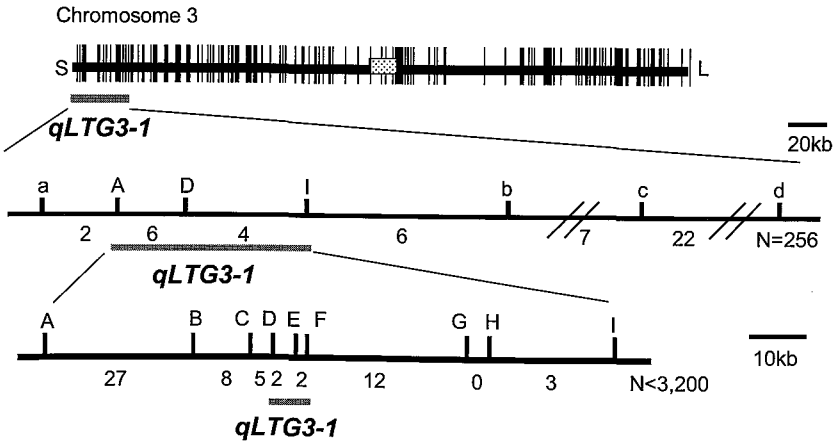

図5. *qLTG3-1* のポジショナルクローニングによる候補領域の絞込み．

qLTG3-1 以外にも多くの遺伝子がマッピングされている（Miura *et al.* 2001, Fujino *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2005, Jiang *et al.* 2006, Ji *et al.* 2009）．今後，これら遺伝子の同定と遺伝子間相互作用の理解により，安定した低温発芽性の確立が期待できる．

「Italica Livorno」は，長稈，脱粒，晩生等の多くの劣悪形質を有するが，これらの座乗染色体領域は不明である．そのため，「Italica Livorno」を用いた *qLTG3-1* に関するマーカー選抜を実施する場合，目的遺伝子の極近傍で組換えを生じた個体を選抜することが望ましい．しかしながら，この組換え個体の選抜には多大な労力を要する．また，目的遺伝子のみをマーカー選抜で導入することも極めて困難である．そこで，目的遺伝子近傍に座乗する遺伝子を同定し，組合せや選抜目標に合わせた対象領域のマーカー選抜を行うことが必要となる．「Italica Livorno」の *qLTG3-1* 領域には，複数の出穂日に関するQTLの存在が明らかとなっている（藤野ら 2008）．また，第3染色体の短腕末端領域にはコシヒカリの良食味に関するQTLの存在（Kobayashi and Tomita 2008, Wada *et al.* 2008, Takeuchi *et al.* 2008）および出穂日に関する遺伝子の存在（Lin *et al.* 2002, Lee *et al.* 2004, Fujino and Sekiguchi 2008）も報告されている．マーカー選抜を行う場合には，これらの関係に留意する必要がある．

今回，遺伝子を単離したことにより，他作物種への応用が可能となった．データベース検索の結果，*qLTG3-1* と相同な遺伝子は，トウモロコシ，コムギ，オオムギ，ダイズに存在していた．今後，これらの作物での遺伝子機能の解明とその利用を行うことで，これら作物の安定生産へ繋がることが期待される．また，イネにおいても，野生イネや栽培イネの広範な遺伝資源について，遺伝子配列を比較することで有用な新規対立遺伝子の同定とその利用が可能となる．特に，低温発芽性のように種子の登熟環境に表現型が大きく影響される形質においては，遺伝子配列をスクリーニングに加えることで効率的に遺伝資源の評価を行うことが可能になると考えられる．

また，本研究では温帯ジャポニカ間交雑に由来する材料を用いてポジショナルクローニング法により遺伝子を単離した．SSRマーカーの多型率はインディカ・ジャポニカ間に比すると低く，目的遺伝子のマッピングに際しては，マーカーのスクリーニングに労力を要する．一方で，100 kb程度まで候補領域が絞り込めると，「日本晴」配列を基にシーケンス解析を行うことで，表現型変異の原因となる遺伝子変異を同定することが可能である（Fujino *et al.* 2005, 2008a, 2008b）．今後，遺伝子の機能解析において，このような遺伝的に近縁関係にある系統の利用も有効な手段と考えられる．

6. おわりに

近年，農業構造の変化等への対応もあり，省力・低コスト技術である水稲の直播栽培は期待されている．特に，一戸当たりの栽培面積の大きい北海道では，稲作の栽培規模の拡大あるいは多角経営における春先の労働力の分散において，苗代管理を伴わない直播栽培は今後極めて重要な技術である．北海道で稲作が始まった明治後期には，直播栽培を行っていたが，低温による発芽・苗立ちの不安定さが大きな問題であった．その後，苗代を用いた育苗による移植栽培が確立された．また，ビニルハウス内で育苗を行う移植栽培は栽培期間の確保にも繋がった．このような栽培技術の開発に加え，耐冷性や食味等に関する品種育成の結果，現在北海道はイネの主要な産地となっている．今後の米の安定生産を確保するためにも，低温発芽性に加えて低温伸長性等の形質を付与し，低温下で安定した苗立ち性を発揮する直播用品種の開発が必要である．

謝 辞

本研究は，ホクレン農業総合研究所の多くの関係者および共同研究先である農業生物資源研究所，上川農業試験場の方々のご協力で達成されたものであり，全ての方々に深く感謝いたします．

引用文献

Fujino, K., H. Sekiguchi, T. Sato, H. Kiuchi, Y. Nonoue, Y. Takeuchi, T. Ando, S. Y. Lin and M. Yano (2004) Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 108: 794–799.

Fujino, K., H. Sekiguchi and T. Kiguchi (2005) Identification of an active transposon in intact rice plants. Mol. Genet. Genomics 273: 150–157.

Fujino, K. and H. Sekiguchi (2008) Mapping of quantitative trait loci controlling heading date among rice cultivars in the northernmost region of Japan. Breed. Sci. 58: 367–373.

藤野賢治・松田康之・関口博史（2008）イネ出穂期遺伝子 *qDTH3* の特性評価．育種学研究 10（別 2）：82.

Fujino, K., Y. Matsuda, K. Ozawa, T. Nishimura, T. Koshiba, M. Fraaije and H. Sekiguchi (2008a) *NARROW LEAF 7* controls leaf shape mediated by auxin in rice. Mol. Genet. Genomics 279: 499–507.

Fujino, K., H. Sekiguchi, Y. Matsuda, K. Sugimoto, K. Ono and M. Yano (2008b) Molecular identification of a major quantitative trait locus, *qLTG3-1*, controlling low-temperature germinability in rice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 12623–12628.

Harushima, Y., M. Yano, A. Shomura, M. Sato, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Yamamoto, S.Y. Lin, B.A. Antonio, A. Parco, H. Kajiya, N. Huang, K. Yamamoto, Y. Nagamura, N. Kurata, G.S. Khush and T. Sasaki (1998) A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F_2 population. Genetics 148: 479–494.

Ji, S.L., L. Jiang, Y.H. Wang, W.W. Zhang, X. Liu, S.J. Liu, L.M. Chen, H.Q. Zhai and J.M. Wan (2009) Quantitative trait loci mapping and stability for low temperature germination ability of

rice. Plant Breed. 128: 387–392.

Jiang, L., S. Liu, M. Hou, J. Tang, L. Chen, H. Zhai and J. Wan (2006) Analysis of QTLs for seed low temperature germinability and anoxia germinability in rice (*Oryza sativa* L.). Field Crops Res. 98: 68–75.

Kobayashi, A. and K. Tomita (2008) QTL detection for stickiness of cooked rice using recombinant inbred lines derived from crosses between *japonica* rice cultivars. Breed. Sci. 58: 419–426.

小高真一・安部信行 (1988) 低温条件下におけるイネの高出芽性品種の検索. 農業技術 43: 165–168.

Lee, S., J. Kim, J.J. Han, M.J. Han and G. An (2004) Functional analyses of the flowering time gene *OsMADS50*, the putative *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1/AGAMOUS-LIKE 20* (*SOC1/AGL20*) ortholog in rice. Plant J. 38: 754–764.

Lin, H., M. Ashikari, U. Yamanouchi, T. Sasaki and M. Yano (2002) Identification and characterization of a quantitative trait locus, *Hd9*, controlling heading date in rice. Breed. Sci. 52: 35–41.

Mackill, D.J. (1995) Classifying *japonica* rice cultivars with RAPD markers. Crop Sci. 35: 889–894.

Miura, K., S.Y. Lin, M. Yano and T. Nagamine (2001) Mapping quantitative trait loci controlling low temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). Breed. Sci. 51: 293–299.

Nonogaki, N. (2006) Seed germination—the biochemical and molecular mechanisms. Breed. Sci. 56: 93–105.

Takeuchi, Y., K. Hori, K. Suzuki, Y. Nonoue, Y. Takemoto-Kuno, H. Maeda, H. Sato, H. Hirabayashi, H. Ohta, T. Ishii, H. Kato, H. Nemoto, T. Imbe, K. Ohtsubo, M. Yano and I. Ando (2008) Major QTLs for eating quality of an elite Japanese rice cultivar, Koshihikari, on the short arm of chromosome 3. Breed. Sci. 58: 437–445.

Wada, T., T. Ogata, M. Tsubone, Y. Uchimura and Y. Matsue (2008) Mapping of QTLs for eating quality and physicochemical properties of the *japonica* rice 'Koshihikari'. Breed. Sci. 58: 427–435.

Zhang, Z.H., X.S. Qu, S. Wan, L.H. Chen and Y.G. Zhu (2005) Comparison of QTL controlling seedling vigour under different temperature conditions using recombinant inbred lines in rice (*Oryza sativa*). Annals of Botany 95: 423–429.