

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：87110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07267

研究課題名(和文) 水稲玄米の登熟過程における貯蔵タンパク質蓄積に関する遺伝的制御機構の解明

研究課題名(英文) Uncovering genetic controlling system of protein content of brown rice grains while maturing duration

研究代表者

和田 卓也 (Wada, Takuya)

福岡県農林業総合試験場・生産環境部・チーム長

研究者番号：90502435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：食味に関与する水稲玄米のタンパク質含有率に関するQTL効果の実証および遺伝子同定を試みた。第2染色体上のQTL(qPC2)でコシヒカリ型アレルを有する準同質遺伝子系統(NIL)は原品種に比較して、タンパク質含有率を約0.5%低減する効果が認められ、千粒重が重い傾向にあった。戻し交配材料とマイクロアレイ解析で、候補領域を下流側(30Mb付近)に絞り込んだ。主要なタンパク質画分のグルテリン、プロラミンの構成比に大きな差は認められなかった。以上から、タンパク質含有率に関する主要なQTLは第2染色体30Mb付近に存在し、粒を大きくして相対的にタンパク質含有率を低下させる効果を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We validated the effect of QTLs for protein content of brown rice, which is related to eating quality of cooked rice, and tried to identify the responsible genes of those QTLs. The near isogenic lines harboring 'Koshihikari' allele of QTL for protein content, which is located in chromosome 2 (qPC2), decreased the protein content of brown rice at approximately 0.5%, compared to the recurrent parent cultivar. The NIL also showed heavier grain weight. The analysis using backcrossed population and micro-array analysis revealed that qPC2 was located in the lower position of candidate regions (around 30Mb region of chromosome 2). We also performed protein fraction analysis, but did not detect any significant difference of prolamin / glutelin ratio. These facts suggested that major QTL for protein content was located around 30Mb region on chromosome 2, and the QTL increased grain weight and consequently decreased protein content in rice grain.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：イネ QTL タンパク質 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

(1) イネ玄米の主要な化学成分はデンプンとタンパク質である。デンプンのうち、アミロース含有率は炊飯米の食味と負の相関があり(稲津 1988)、食味に関する育種の主要な選抜対象となっている。またアミロース含有率に関する遺伝解析の事例も多数報告されている(Bao et al. 2002, Wan et al. 2004, 2005, Zhang et al. 2014)。

(2) 一方、もう一つの主要な化学成分であるタンパク質含有率も米の食味を決める重要な要素である(石間ら 1974)が、その遺伝解析に関する報告はほとんどない。我々はこれまでにタンパク質含有率に関し、森多早生(高タンパク)/コシヒカリ(低タンパク)の交配後代の材料を用いた QTL 解析で、第 2 および第 6 染色体にコシヒカリ型アリルでタンパク質含有率を低減させる QTL を検出していた(Wada et al. 2006)。

2. 研究の目的

上記の申請者らの過去の研究では RI 系統を用いて行ったものである。これを受け、本研究では

準同質遺伝子系統を用いた QTL の実証マップベースクローニングによる候補遺伝子のファインマッピング

マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

タンパク質画分析により、検出した QTL の本体を明らかにすることを通じて、イネ玄米におけるタンパク質の蓄積機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

準同質遺伝子系統を用いた QTL の実証

森多早生/コシヒカリの F₁ に森多早生を 4 回戻し交配して育成した準同質遺伝子系統(NIL)を供試材料とした。NIL 育成の際は、第 2 染色体上の QTL (*qPC2*) にコシヒカリ型アリルを保有する NIL2.1、2.3 および第 6 染色体上の QTL (*qPC6*) に同じくコシヒカリ型アリルを保有する NIL6.1、6.3 を、各々の QTL の連鎖マーカーで選抜した。

上記 NIL および親品種(森多早生、コシヒカリ)を 2015~2017 年の 3 カ年、福岡県における標準栽培で栽培し、収穫後の玄米を用いてタンパク質含有率(ビーエルテック社: オートアナライザー 型による)および千粒重を調査した。

マップベースクローニングによる候補遺伝子のファインマッピング

qPC2 のファインマッピングを目的として、の試験においてタンパク質含有率の低減効果が高かった NIL2.1(BC₄F₄)を母本、森多早生を父本として交配した F₂ 集団から、QTL 近傍マーカーで組換えを生じている個体を選抜し、タンパク質含有率を 2016、2017 年の 2 カ年に渡って調査し、候補領域の絞り込みを行った。

マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析
NIL および原品種間において、玄米登熟期間中の発現量差を示す遺伝子は *qPC2* の候補遺伝子である可能性が高いと考えられる。そこで、森多早生、コシヒカリ、NIL2.1 の開花後 7 日目の登熟種子を用いて、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を 2016~2017 年に行った(Agilent 社: イネ 4×44k マイクロアレイ使用)。

タンパク質画分析

1) SDS-PAGE

NIL および森多早生、コシヒカリの完熟種子中のタンパク質組成を、SDS-PAGE によって解析した。

2) 免疫顕微鏡解析

開花後 21 日目の登熟種子を供試材料とした。サンプリング後包埋して観察用の組織切片を作成後、プロラミン、グルテリンおよびグロブリン抗体を用いた免疫染色を行った染色後の組織を蛍光顕微鏡によって観察し、プロテインボディのサイズおよび数の品種・系統間差を明らかにした。

4. 研究成果

準同質遺伝子系統を用いた QTL の実証

NIL2.1、2.3、NIL6.1、6.3 および森多早生、コシヒカリを 2015 年に供試したところ、NIL6.1、6.3 は森多早生に比較したタンパク質含有率の低減効果は 0.1%程度と極めて小さく、遺伝子を特定することは困難と判断して試験を中止した(データ略)。一方、NIL2.1、NIL2.3 は安定したタンパク質含有率低減効果を示し、3 年間平均で森多早生よりも約 0.5%低いタンパク質含有率を示した(表 1)。このことから、コシヒカリが保有する *qPC2* アリルは一定のタンパク質含有率低減効果を有することが明らかとなった。さらに、*qPC2* を保有する NIL2.1 は森多早生に比較して千粒重が約 0.4g 重かったことから、粒重を増加させ、相対的にタンパク質含有率を低下させることが示唆された。

マップベースクローニングによる候補遺伝子のファインマッピング

NIL2.1/森多早生 F₂ 集団 1,045 個体より *qPC2* 近傍マーカーである RM5470、RM3515 の組換えホモ個体が 9 個体得られたことから、これらのタンパク質含有率調査を行った。その結果、候補領域(chr2: 23~33Mb)の上流側にコシヒカリ型断片を有する個体(D7、E159 など)はタンパク質含有率が高い傾向にあり、逆に下流側にコシヒカリ型断片を保有する個体(F16、D27 など)はタンパク質含有率が低い傾向にあった(表 2)。このことから、*qPC2* の遺伝子本体は候補領域の下流側の SNP マーカー Indel30538071 近傍に存在すると推定された。

表1 準同質遺伝子系統の生育調査結果

品種名 系統名	出穂期	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/m ²)	m ² 当り粗数 (×100)	登熟 歩合	収量 (kg/10a)	千粒重 (g)	タンパク質 含有率(%)
森多早生	8/10	80	16.1	343	209	90.2	399	21.5	8.30
コシヒカリ	8/11	85	17.9	342	229	80.8	419	22.8	7.20
NIL2.1	8/13	84	17.0	363	225	93.7	456	21.9	7.79

1)タンパク質含有率はオートアナライザー 型による測定。

表2 qPC2組換え個体のグラフ遺伝子型とタンパク質含有率(%)

個体番号	Indel 23209566	Indel 25329359	Indel 27106753	Indel 28887271	Indel 30538071	Indel 33126882	Indel 34681472	タンパク質 含有率(%)
D7	K	M	M	M	M	M	M	8.35
E159	K	K	K	M	M	M	M	8.17
E74	K	K	K	M	M	M	M	8.36
A41	K	K	K	K	K	M	M	8.53
D180	K	K	K	K	K	M	M	7.41
E122	K	K	K	K	K	M	M	7.46
D143	M	K	K	K	K	K	-	7.63
F16	M	M	M	K	K	K	K	7.90
D27	M	M	M	M	K	K	M	7.75
森多早生	M	M	M	M	M	M	M	8.07
コシヒカリ	K	K	K	K	K	K	K	7.39

1)上段のIndel+数値はマーカー名で、数値は当該マーカーの物理位置(bp)を示す。Kはコシヒカリ型、Mは森多早生型を示す。

マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

NIL2.1 および森多早生、コシヒカリの開花7日目の登熟種子から RNeasy (キアゲン社)を用いて RNA を抽出し、イネ 4×44k マイクロアレイ (Agilent 社)を用いて 2 色法(1 枚目:森多早生 - コシヒカリ、2 枚目:森多早生 - NIL2.1)による遺伝子発現解析を 2016、2017 年の 2 カ年に渡って行った。

その結果、森多早生 - コシヒカリ、森多早生 - NIL2.1 間で 2 カ年共通して発現量の顕著な差(概ね 10 倍以上)が認められた遺伝子は、QTL 候補領域内 chr2 : 23 ~ 33Mb)の上流側に多かったが、下流側では唯一「Phi-1 protein」が該当し、森多早生に比較して NIL2.1 およびコシヒカリで 11 ~ 111 倍発現量が多かった(表 3)。「Phi-1 protein (Phosphate induced protein)」はリン酸存在下で発現誘導される遺伝子でありタバコ培養細胞で細胞肥大に関与することが報告されている(Sano et al. 1999)。このことは、試験で qPC2 の機能が粒重を増大させて相対的にタンパク質含有率を低減させると推定した内容と一致している。さらにマップベースクローニングを進める必要はあるものの、Phi-1 protein は qPC2 の本体遺伝子である可能性が示唆された結果となった。

タンパク質画分分析

1)SDS-PAGE

NIL および森多早生、コシヒカリの完熟種子から貯蔵タンパク質を抽出し、SDS-PAGE 解析を行った。その結果、主要な貯蔵タンパク質であるグルテリン、プロラミンの組成に差はほとんど差は認められなかった(図 1)。

2)免疫顕微鏡解析

NIL2.1、2.3、森多早生、コシヒカリの登熟種子(開花後約 21 日)を包埋後作製した切片を供試材料とし、プロラミン/グルテリン抗体、およびグロブリン/グルテリン抗体を用いた免疫染色により、蛍光顕微鏡によって観察した。

その結果、資料間で各タンパク質画分の局在性およびプロテインボディの形態に顕著な差は認められなかったものの、NIL2.3 においてプロテインボディ II (PBII) のサイズが若干小さく(図 2)、グルテリンおよびグロブリンの貯蔵量が森多早生に比較して少ない可能性が示唆された。

表3 シンク器官において顕著な発現差を示した *qPC2* 近傍遺伝子とシグナル強度比

遺伝子名	位置 (Mb)	効果の方向	年次	S1期		S2期		S3期	
				NIL2 1	Koshi	NIL2 1	Koshi	NIL2 1	Koshi
Protein phosphatase 2C-like domain containing protein.	23.4	up	2016	380.5	416.2	350.0	377.0	351.2	339.6
			2017	171.5	255.4	162.7	255.0	108.5	151.5
ANT (Ovule development protein aintegumenta).	24.3	up	2016	16.0	12.4	28.5	26.6	30.2	22.9
			2017	7.7	12.8	12.6	18.2	16.0	15.5
Stem cell self-renewal protein Piwi domain containing protein.	24.4	down	2016	47.3	53.2	36.7	50.9	35.4	43.9
			2017	112.8	87.6	60.1	90.4	47.4	85.7
Stem cell self-renewal protein Piwi domain containing protein.	24.4	down	2016	135.1	199.4	96.2	134.7	72.2	46.6
			2017	93.6	116.7	62.2	84.1	36.2	40.6
Conserved hypothetical protein.	24.5	up	2016	70.2	92.8	126.1	50.8	94.3	64.0
			2017	44.5	47.0	41.3	92.9	32.2	46.5
Phi-1 protein.	31.8	down	2016	13.0	15.0	17.6	34.5	38.9	42.6
			2017	62.2	111.3	66.6	44.6	76.8	55.6
Phi-1 protein.	31.8	down	2016	11.4	12.6	17.9	29.4	31.8	36.7
			2017	37.4	93.7	53.4	55.8	46.7	46.4

1)位置は第2染色体上の位置を、S1、S2、S3は各々胚乳の肥大初期、中期、後期を示す。太字はソース器官でも顕著な発現変動を示した遺伝子。

2)位置、年次以外の数値はアレイシグナル強度比を示し、効果の方向のupは森多早生に比較してNILまたはコシヒカリのシグナル強度が強いことを、downは弱いことを示す。

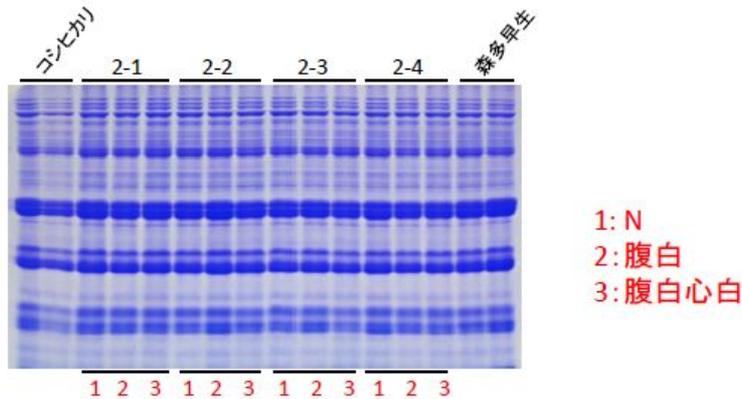


図1 貯蔵タンパク質の SDS-PAGE

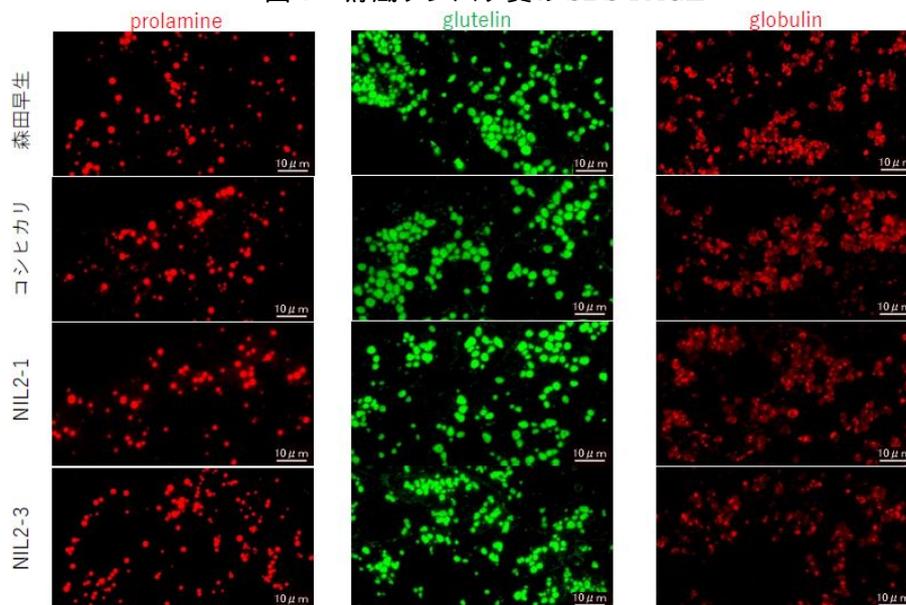


図2 貯蔵タンパク質の免疫染色画像

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 2件)

- ・和田卓也, 熊丸敏博, 宮原克典, 宮崎真行、「コシヒカリ」に由来するイネ玄米のタンパク質含有率に関する QTL の実証、日本育種学会第 130 回講演会、2017 年 3 月
- ・和田卓也, 熊丸敏博, 宮原克典, 宮崎真行、玄米のタンパク質含有率 QTL のマッピングおよび QTL 保有 NIL の遺伝子発現解析、日本育種学会第 132 回講演会、2017 年 10 月

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田卓也 (WADA Takuya)

福岡県農林業総合試験場・生産環境部バイオテクノロジーチーム・チーム長

研究者番号：90502435

(2)研究分担者

熊丸敏博 (KUMAMAU Toshihiro)

九州大学・遺伝子資源開発研究センター・

教授

研究者番号：00284555