

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20780008

研究課題名（和文） 日本のイネ品種の地域適応性に関わる出穂期QTLの単離

研究課題名（英文） Positional cloning of flowering time QTLs conferring adaptability to wide cultivation area in Japanese rice cultivars.

研究代表者

堀 清純 (HORI KIYOSUMI)

独立行政法人農業生物資源研究所・QTLゲノム育種研究センター・任期付研究員

研究者番号：50442827

研究成果の概要（和文）：イネの開花時期（出穂期）は品種の地域適応性を決定する重要な農業形質である。本研究では、日本晴とコシヒカリから見出された新規の出穂期QTL（*Hd16*および*Hd17*）の遺伝子単離を進め、形質転換体を用いた相補性試験により見出した候補遺伝子が*Hd16*であると証明し、*Hd17*については候補遺伝子を推定した。また、出穂期遺伝子を異なる組み合わせで持つ系統群を用いて遺伝子間相互作用の存在を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Flowering time of rice cultivars has diversified to adjust to the growing season in each local cultivation area. Quantitative trait locus (QTL) analysis revealed that two QTLs (*Hd16* and *Hd17*) were involved in the difference of flowering time between the rice *japonica* cultivars Koshihikari and Nipponbare. High-resolution mapping and sequence analysis of the genomic regions enabled us to focus on candidate genes for each QTL. Compared to control lines, flowering time in transgenic plants with a genomic fragment containing the *Hd16* candidate gene was changed under short and long day-length conditions. Significant digenic interaction of *Hd16* was observed with *Hd2*, which was previously identified as a flowering time QTL in rice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、育種学

キーワード：イネ、出穂期、QTL、コシヒカリ、ポジショナルクローニング

1. 研究開始当初の背景

イネ品種は低緯度から高緯度地域までの多様な環境や二期作などの作付体系に適応

するため、出穂期に関して極めて大きな変異をもっている。近年、ゲノム研究によって生み出された情報や実験材料を活用して、短日

植物であるイネの出穂期を決めている遺伝子が次々に単離・同定されてきた。これらの遺伝子の一部は、長日植物であるシロイヌナズナの開花遺伝子と類似する構造や機能をもっている。また、単離された遺伝子間の相互作用（ネットワーク）についても解析が進んでおり、*Hd1* が長日条件では出穂を遅延するのに対して短日条件では出穂を促進するなど、日長条件によって異なる制御機構が存在していることが明らかになってきた。

しかしながら、全ての出穂期に関与する遺伝子が明らかになっているとはいえない。例えば、日本晴とコシヒカリの出穂期の差を決定している遺伝子については、最近になって関与する QTL が検出されたのみである。これは、イネゲノム解析の進展によって、近縁品種間でも利用できる DNA マーカーが充実してきたことで、これまで困難であった日本型品種間の遺伝解析が可能になったことによる。申請者の所属する研究グループでは、日本晴とコシヒカリの交雑由来の戻し交雑自殖系統 (BIL) を育成し、出穂期に関与する遺伝子座 (QTL) の検出を試みた。QTL 解析の結果、第 3 染色体長腕と第 6 染色体短腕に出穂期の QTL を検出した。効果の大きな第 3 染色体の QTL はコシヒカリのアレルが早生の効果を、第 6 染色体の QTL は日本晴のアレルが早生の効果を示していた。そこで、第 3 染色体および第 6 染色体の QTL が分離する 88 および 83 個体の BC₂F₂ 集団を栽培し、出穂期の後代検定を行った。解析の結果、第 3 染色体の QTL の候補領域を 540 kb 以内に、第 6 染色体の QTL の候補領域を 340 kb 以内に絞り込むことができた。第 3 染色体長腕には出穂期 QTL の *Hd6* がすでに同定されており、casein kinase II をコードしていることが明らかになっている。しかしながら、日本晴とコシヒカリ間で *Hd6* の塩基配列に違いはなく、本研究で検出した QTL の座乗位置も *Hd6* と異なっていた。また、第 6 染色体短腕には *Hd3a*、*Hd3b* および *RFT1* などの出穂期 QTL が報告・単離されている。*Hd3a* については日本晴とコシヒカリ間で塩基配列に違いがなく、本研究で検出した QTL と座乗位置は異なっていた。

また、申請者の所属する研究センターでは、コシヒカリの一部の染色体断片だけを日本晴に導入した染色体置換系統群 (CSSL) を作出している。2 つの QTL 領域が置換した CSSL 系統を異なる日長条件で栽培したところ、長日条件下で出穂期が大きく遅延した。従って、本研究で単離を目指す 2 つの QTL は日長反応性に関与していると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 日本晴とコシヒカリから見いだされた 2 つの新たな出穂期 QTL についてポジショナルクローニングを行う。

(2) 単離した遺伝子を既報の出穂遺伝子ネットワーク上に位置づける。

3. 研究の方法

(1) 候補ゲノム領域の絞り込みおよび候補遺伝子の特定

2 つの QTL について、約 3,000 個体の分離集団から候補領域内で組換えの起きた個体を選抜する。選抜個体から自殖種子を採種して後代検定を行う。各個体の QTL 近傍 DNA マーカーの遺伝子型を調査してさらに QTL 領域を絞り込む。QTL の候補領域を網羅するコシヒカリの BAC クローンをスクリーニングして塩基配列を解読する。得られた塩基配列を日本晴のゲノム配列と比較し、候補遺伝子 (変異) を特定する。

(2) 形質転換体の作出による相補性検定

候補遺伝子を含むゲノム配列を導入した形質転換体を作成して相補性検定を行う。さらに、候補遺伝子の RNAi 形質転換体を作成する。イネゲノムリソースセンターから分譲されている候補遺伝子の完全長 cDNA クローンを入手して過剰発現体を作成する。形質転換体を作成後、導入コピー数の確認や発現解析を行う。形質転換体を世代促進して T₁、T₂ 種子を採種し、各系統の表現型を調べる。

(3) 候補遺伝子の突然変異系統の選抜

候補遺伝子の Tos17 または T-DNA の挿入変異体をミュータントパネルや OryGenesDB、RiceGE などのデータベースから探索する。見つけた変異体を導入して表現型を調査する。

(4) 単離した遺伝子と他の出穂遺伝子について遺伝学的な相互作用の調査

QTL 領域だけが日本晴に置換したコシヒカリ背景の CSSL にコシヒカリを戻し交雑し、コシヒカリ背景の準同質遺伝子系統 (NIL) を育成する。単離する QTL の NILs と他の出穂遺伝子のコシヒカリ背景 NILs を交雑し、複数の出穂遺伝子の組み合わせを持つ系統を育成する。これらの系統の出穂期を調査して遺伝学的な相互作用を明らかにし、単離した QTL を出穂期遺伝子ネットワーク上に位置づける。

4. 研究成果

(1) 候補ゲノム領域の絞り込みおよび候補遺伝子の特定

戻し交雑後代の約 3,000 個体について、*Hd16* 候補領域内で組換えが生じている 65 個体を選抜し出穂期の後代検定を行った。さらにコシヒカリ BAC ライブラリーからこの領域をカバーする 5 つの BAC クローンを選抜して塩基配列を解読し、日本晴とコシヒカリ間

で42個の挿入欠失変異 (Indel) や一塩基置換 (SNP) を検出した。これらの多型を DNA マーカー化し組み換え個体を解析するとともに後代検定の結果と合わせることで、*Hd16* の候補領域を 29.4 kbp に絞り込んだ。候補領域内の塩基配列変異は非同義置換を起こす1ヶ所だけであり、この変異を含む遺伝子が *Hd16* の候補と考えられた (図1)。

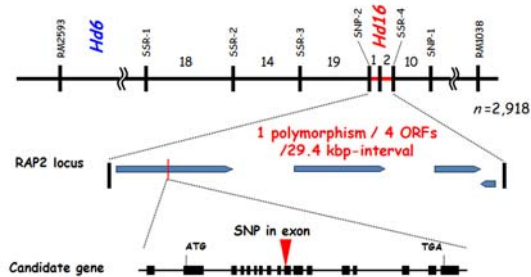


図1. *Hd16*候補領域の絞り込みと候補遺伝子の検出

また、*Hd17* の候補ゲノム領域をカバーするコシヒカリ BAC クローンを選抜し、塩基配列を解読した。塩基配列情報を利用し新たな DNA マーカーを作成して、さらに候補ゲノム領域を限定した。その結果、*Hd17* の候補ゲノム領域は 43.6 kbp に絞り込まれた。この候補領域内には RAP2 で予測された2個の ORFs が存在し、1 個の ORFs 内に非同義置換を引き起こす変異が生じていた。

(2) 形質転換体による相補性検定

Hd16 の候補遺伝子を含む約 10.7 kbp の日本晴ゲノム断片を導入したコシヒカリの形質転換体を作成した。T₀ 世代の形質転換体は

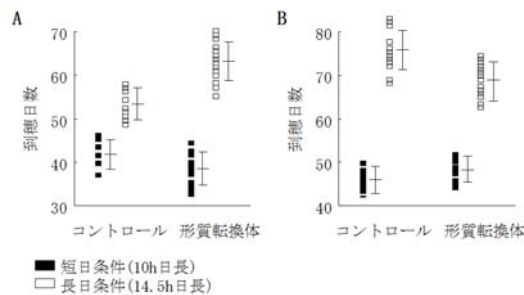


図2. *Hd16*候補遺伝子の相補性検定の結果

A: 日本晴ゲノム配列を導入したコシヒカリの形質転換体、
B: 日本晴のRNAi形質転換体

短日条件下で出穂が促進し、長日条件下で出穂が遅延した。日本晴の T₀ 世代の RNAi 形質転換体は短日条件下で出穂期が遅延し、長日条件下で出穂期が促進した。これらの結果から、候補遺伝子が *Hd16* であると証明できた (図2)。現在作出した形質転換体について T₁ 世代における後代検定を進めている。

Hd17 に関しては、連鎖解析によって候補ゲノム領域をさらに限定できた。候補ゲノム領域中の2つの予測遺伝子について RNAi 形質転換体を作成して機能証明に取り組んだが、候補遺伝子特異的な発現抑制個体を作成で

きなかった。

(3) 候補遺伝子の突然変異系統の選抜

Hd16 および *Hd17* について、農業生物資源研究所が所有する約5万系統の Tos17 変異体パネルをスクリーニングしたが、候補遺伝子の変異体は検出できなかった。*Hd16* についてはさらに農業生物資源研究所が所有する炭素イオンビーム照射変異体パネル (約1万4千個体) からスクリーニングしたが、候補遺伝子の変異体は検出できなかった。

(4) 単離した遺伝子と他の出穂遺伝子について遺伝学的な相互作用の調査

Hd16 と他の出穂期遺伝子を異なるアレル組み合わせで持つ置換系統群について出穂調査を行い、*Hd16* と *Hd1* および *Hd6* の組み合わせでは出穂期が相加的に変化し、*Hd16* と *Hd2* の組み合わせでは *Hd2* が機能欠損型になると *Hd16* の効果の差が見えなくなった。従って、*Hd16* と *Hd2* の間には遺伝的な相互作用が存在すると考えられた (図3)。しかしながら、*Hd16* を出穂期遺伝子ネットワーク上に位置づけることはできなかった。

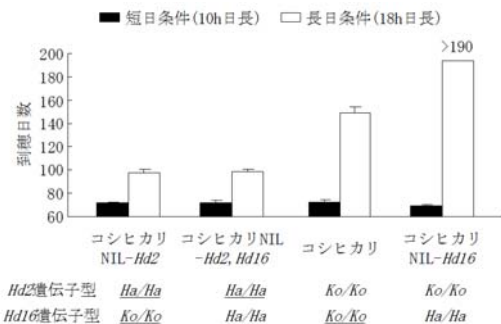


図3. 出穂期QTLの *Hd16* と *Hd2* を組み合わせたNILsの到穂日数
Ko: コシヒカリ型、Ha: はやまさり型 (日本晴型)、
下線は機能欠損または低下型アレルを示す。

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1件)

- ① Matsubara K, Kono I, Hori K, Nonoue Y, Ono N, Shomura A, Mizubayashi T, Yamamoto S, Yamanouchi U, Shirasawa K, Nishio T, Yano M, Novel QTLs for photoperiodic flowering revealed by using reciprocal backcross inbred lines from crosses between japonica rice cultivars, *Theoretical and Applied Genetics*, 査読有, Vol. 117, 2008, pp. 935-945

[学会発表] (計2件)

- ① Hori K, Matsubara K, Yamanouchi U, Yano M, Detection of novel flowering time QTLs associated with wide adaptability

from Japanese rice cultivar Koshihikari, Control of Flowering Time and Applications for Plant Breeding, 2008年9月24日、Salzau、Germany

- ② Hori K, Matsubara K, Ogiso E, Yamanouchi U, Yano M, A novel photoperiod sensitivity QTL, *Hd16*, conferring adaptability to wide cultivation area in rice, Plant and Animal Genome XVIII Conference, 2010年1月9日、San Diego、USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 清純 (HORI KIYOSUMI)

独立行政法人農業生物資源研究所・QTL
ゲノム育種研究センター・任期付研究員

研究者番号：50442827