

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05513

研究課題名(和文) イネ幼苗期のプラスチドゲノムコピー数を指標とした雑種強勢評価法の検討

研究課題名(英文) Investigation of a method for evaluating heterosis in rice based on plastid Genome Copy Number in Seedlings

研究代表者

久保山 勉 (Kuboyama, Tsutomu)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：10260506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：雑種強勢の見られるイネの雑種で両親よりもプラスチドコピー数が多いように見えたのは、標準として用いた18S rDNAのPCR増幅効率が雑種で低下するのが原因であった。そこで、DNAのメチル化を調査したところ播種後10日目に生育の良い系統では5日目のメチル化レベルが高い傾向があり、18S rDNAのメチル化レベルが植物の生育に影響している可能性が示唆された。また、世界イネコアコレクションの系統群と台中65号の間で雑種の初期生育を評価し、雑種強勢を強く示す組み合わせを見出した。さらに、QTL解析やGWASで雑種強勢程度に影響する染色体領域の検出を行い、初期生育に負の影響を与える相互作用が複数検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は18S rRNA遺伝子のメチル化レベルによって植物の生育が制御を受けている可能性を示した。これまでrRNA遺伝子がメチル化を受けている報告はあるが、植物の生育と関連づけられたものはなかった。また、塩基配列データが整備されている世界のイネと台中65号の雑種を作成し、遺伝的距離と雑種強勢程度との関係を明らかにした。このデータはハイブリッドライスで雑種強勢を利用する際に親品種を選択する指標として有効である。さらに、QTL解析で雑種強勢程度に負の影響を与える相互作用因子を検出した。この結果は、ハイブリッド品種の育種で組み合わせ能力の改良を行う際に有用である。

研究成果の概要(英文)：In rice hybrids exhibiting heterosis, the apparent increase in plastid copy number compared to their parents was due to a decrease in the PCR amplification efficiency of the 18S rDNA used as a standard. Investigation of DNA methylation revealed that strains with better growth on the tenth day after sowing tended to have higher methylation levels on the fifth day, suggesting that the methylation level of 18S rDNA may affect plant growth. Additionally, an evaluation of early growth in hybrids between strains from the World Rice Core Collection and Taichung 65 identified combinations showing strong heterosis. Furthermore, QTL analysis and GWAS were conducted to detect chromosomal regions affecting the degree of heterosis, resulting in the identification of several interactions negatively impacting early growth.

研究分野：植物育種学

キーワード：雑種強勢 ヘテロシス イネ *Oryza sativa* コアコレクション DNAメチル化 QTL 初期生育

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

初期生育で雑種強勢を評価することができれば、雑種第一代を利用した品種改良の効率化につながる。初期生育においては植物体が小さく、人工気象器を使って光、温度などを一定に保ち、同じ環境のもとで植物の生育を評価することができるという他の世代にはない利点がある。そこで、イネにおいて初期生育において雑種強勢を評価するための条件検討を行った。まず、植物の栄養条件を揃えるために 1/2MS 無機塩類を使い管ピンを用いた無菌播種を行った。また、栽培法を検討する中で、5 日目に蓋を取り除き、無菌状態を放棄し、一定の高さまで湛水するようにしたところ、蓋をしたままの時に比べて良好に栽培することができた。

上記の栽培法を用いて、両親系統と雑種で初期生育における生体重を指標に雑種強勢程度を評価し、研究を行った。イネ品種日本晴と Kasalath の交雑組み合わせにおいて雑種と両親で *18rDNA* を内部標準としてプラスチドゲノムコピー数を評価したところ両親に比べて雑種のコピー数が多くなるという結果が得られた。しかし、本課題の申請後にプラスチドゲノムコピー数についてシングルコピーの *OsActin1* など複数の内部標準を用いて評価し直したところ、雑種と両親に有意な差がないことが明らかとなった。これは、ミトコンドリアゲノムコピー数についても同様であった。そのため、プラスチドゲノムコピー数が両親と雑種で異なる結果が得られた原因は *18S rDNA* を内部標準として用いたためであると考えられた。そこで、*18S rDNA* のコピー数を *OsActin1* を用いて評価したところ雑種のコピー数が両親より少ない結果となった。この結果を検証するために複数の位置で qPCR によるコピー数の評価を行ったところ、プライマーを設計した位置によって異なる結果が得られ、*18S rDNA* の実際のコピー数に変動があるとは考えられなかった。むしろ *rDNA* の位置によって PCR 増幅効率が異なること、*18S rDNA* の特定のプライマー対では雑種で両親よりも増幅効率が低下するのだと考えられた。これまで、*rDNA* では DNA のメチル化が起きていること (Riddle *et al.* 2005)、メチル化は PCR の増幅に影響するという報告があること (Kiselev *et al.* 2015) から、本研究課題では両親と雑種で *18S rDNA* のメチル化レベルにどのような違いが生じるかを調査することにした。

### 2. 研究の目的

ハイブリッド品種の育成において、組み合わせによる雑種強勢(ヘテロシス)の程度を評価することは重要であり、もし、苗の段階で雑種強勢程度を評価することが可能となればハイブリッド育種をより効率よく実施することができる。そのため、本研究においては、イネの幼苗期におけるヘテロシスの強さが、成長した植物の雑種強勢程度の指標となるかどうかを世界のイネ品種コアコレクションと台中 65 号との雑種を用いて検証した。一方、ヘテロシスが生じる遺伝的メカニズムについてはまだ不明な点が多いため、GWAS や QTL 解析といった方法を用いて初期生育におけるヘテロシスに焦点をあてて遺伝機構解明を目的に研究を行った。さらに、両親と雑種で *18S rDNA* のメチル化程度を調査し、雑種強勢との関係を調査した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 植物材料

台中 65 号(T65)は鹿児島大学の系統を用いた。国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研機構遺伝資源センター(農研機構ジーンバンク)の世界イネコアコレクション(WRC)69 系統を

農研機構ジーンバンクより分譲を受け、研究に用いた。WRC 系統と T65 の交雑は主に鹿児島大学で実施し、一部茨城大学でも行った。WRC13 と T65 の両方向の BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 集団を作成するための交雑は鹿児島大学で実施した。

#### (2) 植物の栽培法

①管ピンによる生育初期の評価： 種子を休眠打破した後、表面殺菌を行い、1/2MS 培地を分注した管ピンに無菌播種した。管ピンを 28°C の人工気象器に置き、栽培した。播種後 10 日目に、シュート長、全生体重、シュート生体重、根生体重を計測・秤量した。さらに、それらの値を用いて、中間親ヘテロシス {MPH = (F<sub>1</sub> の平均 - 両親の平均) × 100 / 両親の平均 (%)} と、優良親ヘテロシス {BPH = (F<sub>1</sub> の平均 - 優良親) × 100 / 優良親 (%)} を算出した。DNA マーカーを用いて雑種性検定を行い、雑種と確認された個体のデータのみを評価に用いた。

②ワグネルポット (1/2000) を用いた栽培： 発芽と生育が良好かつ、DNA マーカーで雑種であることが確認された 5 個体を播種後 30 日にワグネルポット (1/5000a) に定植し、茨城大学農学部構内 (茨城県稲敷郡阿見町) の屋外で栽培した。播種後 60 日目にシュート長、分げつ数、全生体重、シュート生体重、根生体重、シュート乾燥重、根乾燥重を測定した。

#### (3) DNA の抽出と遺伝子型決定

DNA マーカー用の DNA 抽出は DNA すいすい-S (株式会社リーゾ) を用いて行った。DNA マーカーのプライマーは RAP-DB の TASUKE+ で得た一塩基多型 (SNP) 情報を用い、Primer3 によって設計した。各 DNA マーカーの遺伝子型は、PCR 後に HRM 解析を行い決定した。また、DNA メチル化解析で用いる DNA は DNeasy Plant mini kit (QIAGEN) を用い、キットプロトコールの手順に従って抽出した。

#### (4) GWAS

日本晴ゲノム塩基配列を参照配列として WRC 系統に含まれる 69 系統の全ゲノムリシーケンス解析を行い得られた一塩基多型 (SNP) 情報 (Tanaka *et al.* 2020) を解析に用いた。GWAS 解析は Tanaka *et al.* (2020) の方法に従って行った。

#### (5) QTL 解析

DNA マーカーによって決定した遺伝子型を基に、QTL IciMapping (Version 4.1) を用いて、連鎖地図を作成し、QTL 解析を行った。QTL 解析には R/qtl Version 4.2.1 (Broman *et al.* 2003) を用いて行った。

#### (6) DNA のメチル化解析

DNA に、バイサルファイト処理を行い非メチル化シトシンをウラシルに変換した。次に、バイサルファイト処理した DNA を鋳型に、メチル化特異的 PCR (Methylation Specific PCR: MSP) を行いメチル化レベルを調査した。さらに、バイサルファイト処理した DNA を鋳型に 18S rDNA の 5'側 570 bp を PCR 増幅後、PCR 産物を次世代シーケンサーで解読するバイサルファイトアンプリコンシーケンス解析 (BSAS) によりメチル化レベルの調査を行った。

## 4. 研究成果

### (1) T65 を種子親にして WRC 系統と交雑して得られた雑種の雑種強勢程度

WRC 系統を花粉親にして T65 と交雑して得られた雑種において播種後 10 日目の雑種強勢程度を調査したところ、多くの系統で雑種強勢が観察された。雑種の全生体重の実測値の平均を高い方から並べると WRC65 (T65: 333 ± 78 mg, F<sub>1</sub>: 591 ± 48 mg, WRC65: 330 ± 62 mg), WRC98 (F<sub>1</sub>: 583 ± 97 mg, WRC98: 150 ± 63 mg), WRC100 (F<sub>1</sub>: 569 ± 92 mg, WRC100: 436 ± 160 mg)

であった．中間親ヘテロシスで評価すると WRC13(151%) , WRC98 ( 141% ) , WRC31 ( 83% ) が高い値を示した．優良親ヘテロシスでは WRC65 ( 78% ) , WRC98 ( 75% ) , WRC13 ( 69% ) が高い値を示した．一方, WRC10 や WRC37 では雑種が両親より生育不良となっていた．

遺伝的距離と雑種強勢の関連を調査するため, WRC 系統に含まれる 69 系統の全ゲノムシーケンズを行い, 日本晴ゲノム ( Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0 ) を参照として得られた 2,805,329 個の一塩基多型 ( SNP ) ( Tanaka *et al.* 2020 ) を基に, 各系統の SNP 数と雑種の実測値, MPH, BPH それぞれの相関を調査した．その結果, どの形質においても MPH や BPH と有意な相関は示さなかった ( 図 1 ) . しかし, 日本晴との遺伝的距離がある程度以上大きい品種でしか雑種強勢程度が高い系統は出現しなかったため, 雑種強勢程度が高くなるため

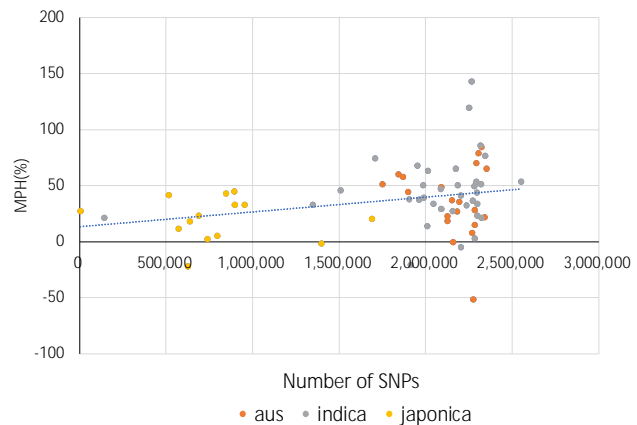


図 1 . WRC 系統と日本晴の間の SNP 数と中間親ヘテロシスの散布図

には一定程度の遺伝的距離が必要であると考えられた．また, 遺伝的距離が遠くなると生育の良い組み合わせと悪い組み合わせで生育程度のばらつきが大きくなることが明らかになった．

### (2) 初期生育と播種後 60 日間の雑種強勢程度の比較

播種後 10 日目の雑種強勢程度が異なる 11 交雑組合せにおいて播種後 60 日目に雑種と両親の生育を調査した．茨城大学農学部構内の屋外で 1/5000a ワグネルポットを用い栽培したところ, 初期生育で生体重が大きく, 雑種強勢程度の高かった T65 × WRC65 は播種後 60 日目でもシュート長, 分けつ数, 生体重で強い雑種強勢を示した．一方, T65 × WRC13 では, 雑種は旺盛な生育を示したものの, WRC13 が雑種と同様の生育を示したため, 雑種強勢程度は播種後 10 日目のように高い値とはならなかった．播種後 10 日目で生体重が重く, 雑種強勢程度が高かった WRC98 は播種後 60 日目の調査では雑種強勢程度が高くなかった．

初期生育における雑種のシュート長は, 播種後 60 日目の全生体重 ( $r=0.53$ ) やシュート乾燥重 ( $r=0.58$ ) , 分けつ数 ( $r=0.61$ ) との間に相関がみられ, 播種後 10 日目における雑種の生育程度によって, 播種後 60 日目における雑種の生育をある程度予測可能であると考えられた．

### (3) WRC 系統と T65 系統の雑種強勢程度の GWAS

WRC 系統の SNP 多型情報を用い, T65 と WRC 系統の雑種において初期生育の GWAS を行った．その結果, シュート生体重の MPH を用いた解析で 12 番染色体の 2,768,130bp の位置に  $-\log_{10}(P_{corr})=5.89$  のピークが検出された ( 図 2 ) . この SNP では C を持つ系統が A を持つ系統に比べて, 雑種のシュート長, 全生体重, シュート生体重, 根生体重の平均値が高くなっていった．また, Rice Annotation project(RAP)ではこの SNP から 281bp 下流に bZip 型の転写因子と推定される遺伝子(Os12g0156200)が存在した．一方, Rice Genome Annotation Project (MSU-RGAP) では同じ遺伝子がレトロトランスポゾンとしてアノテーションされていた

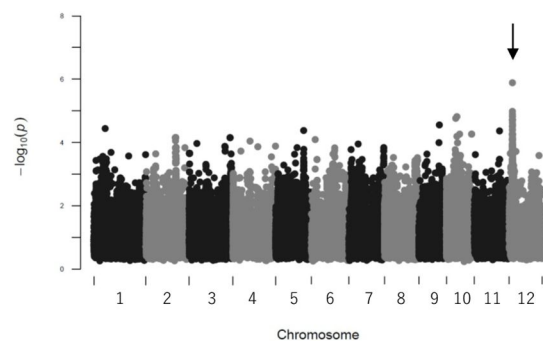


図 2 . シュート生体重 MPH の GWAS 解析

( LOC\_Os12g06010 ).

#### (4) T65 と WRC13 系統との BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 集団における初期生育の QTL 解析

T65×(T65×WRC13)の BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 集団において、播種後 10 日目の初期生育における QTL 解析を行い、雑種強勢に関連する QTL を探索した。シュート生体重で QTL 解析を行った結果、6 つの QTL とそれらの相互作用を含む Multiple-QTL モデルが作成され、このモデルによって表現型分散の 56.9% が説明された。検出された QTL は雑種強勢を *qSHT1a*, *qSHT2*, *qSHT12* の 3 つの QTL が、F<sub>1</sub> と同様すべてヘテロの個体は、シュート生体重が集団中で上位に来ることはできず、3 つの QTL には負の相互作用が生じていると考えられた。

WRC13×(T65×WRC13)の BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 集団においても同様に QTL 解析を行い 8 つの QTL を含む Multiple-QTL モデルが作成され、このモデルによって表現型分散の 53% が説明された。2 つの主要な相互作用が検出され、これらにおいてはいずれも片方の QTL が WRC13 のホモ接合で片方がヘテロ接合の時に最も生育が良好であった。得られた結果は両親の QTL の対立遺伝子を置換することで初期生育の雑種強勢程度を改良する可能性を示すものであった。

#### (5) 雑種における *18S rDNA* のメチル化解析

*18S rDNA* の 5'領域の塩基において MSP 解析を行ったところ、播種後 10 日目に顕著な雑種強勢を示す T65×WRC13 の交雑組合せにおいて、F<sub>1</sub> が両親と比較してメチル化レベルが有意に上昇した。この結果は BSAS による解析でも確認された。しかし、雑種強勢が中程度の WRC02 を用いた場合、雑種でのメチル化レベルは MSP や BSAS で調査した CG メチル化については上昇が見られず、CHG でメチル化レベルの上昇が観察された。一方、雑種強勢があまり現れない WRC01 の雑種ではいずれも雑種でのメチル化レベルの上昇は観察されなかった。WRC01, WRC02, WRC13, WRC37, WRC41 と T65 の雑種と両親で播種後 5 日目に MSP を行った結果と播種後 10 日目の生体重の相関を調査した結果、相関が見られた ( $r = 0.74$ )。この結果は、生育が旺盛な植物では *18S rDNA* のメチル化レベルが高い傾向をもつことを示している。また、5 日目の結果が 10 日目の生体重と相関することから *18S rDNA* のメチル化レベルが生育に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

Broman, K.W., H. Wu, S. Sen and G.A. Churchill (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889-90.

Kiselev, K.V., A.S. Dubrovina and A.P. Tyunin (2015) The methylation status of plant genomic DNA influences PCR efficiency. *J Plant Physiol* 175: 59-67.

Riddle, N.C. and E.J. Richards (2005) Genetic variation in epigenetic inheritance of ribosomal RNA gene methylation in *Arabidopsis*. *Plant J* 41: 524-32.

Tanaka, N., M. Shenton, Y. Kawahara, M. Kumagai, H. Sakai, H. Kanamori, J. Yonemaru, S. Fukuoka, K. Sugimoto, M. Ishimoto, *et al.* (2020) Whole-Genome Sequencing of the NARO World Rice Core Collection (WRC) as the Basis for Diversity and Association Studies. *Plant Cell Physiol* 61: 922-932.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仲村 洋輔, 一谷 勝之, Shenton Matthew, 田中 伸裕, 久保山 勉
2. 発表標題 世界イネコアコレクションと台中65号の雑種における初期生育ヘテロシスの検討
3. 学会等名 日本育種学会第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲村 洋輔, 一谷 勝之, Shenton Matthew, 田中 伸裕, 久保山 勉
2. 発表標題 WRC系統と台中65号の雑種におけるイネ初期生育ヘテロシスのGWASとBC1F1を用いたQTL解析
3. 学会等名 日本育種学会第143回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大槻 日向子, 高間 梨央, 仲村 洋輔, 一谷 勝之, 久保山 勉
2. 発表標題 イネ雑種の初期生育において 18S rDNA の 5' 領域に見られたメチル化レベルの上昇
3. 学会等名 日本育種学会第144回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 仲村 洋輔, 荻原 周平, 一谷 勝之, 久保山 勉
2. 発表標題 BC1F1世代を用いたイネ品種台中65号とKasalathとの間の雑種第一代に見られる雑種強勢のQTL解析
3. 学会等名 日本育種学会第145回講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大槻 日向子, 仲村 洋輔, 一谷 勝之, 久保山 勉
2. 発表標題 イネ雑種の初期育成においてパイサルファイトアンプリコンシーケンスで検出された 18S rDNA のメチル化レベルのヘテロシス
3. 学会等名 日本育種学会第145回講演会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	一谷 勝之  (Ichitani Katsuyuki)  (10305162)	鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授   (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------