

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25252007

研究課題名(和文) 直播水稻の収量ポテンシャル向上に関わる遺伝子座の作用機構と集積効果の統合的解明

研究課題名(英文) Functional analysis and pyramiding effects of quantitative trait locus for improving yield potential of direct seeded rice

研究代表者

平沢 正 (HIRASAWA, Tadashi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：30015119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネの低温土中出芽性、倒伏抵抗性、葉の光合成速度を高める遺伝子座を、マーカーを使って集積し、その効果を検討した。その結果、複数の遺伝子座を集積することによって、低温発芽性、倒伏抵抗性、葉の光合成速度が一層高まることが分かった。そして、遺伝子座を組み合わせて、穂発芽耐性を低下させることなく低温土中出芽性の高い準同質遺伝子系統を育成した。さらに、光合成速度を高める遺伝子座の中から、乾物生産量を高めて子実収量を高める遺伝子座を見出した。以上の研究によって、適切な遺伝子座を組み合わせて導入することによって、湛水直播水稻の収量性に関わる形質を改良し、収量を安定して高め得る可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Quantitative trait loci (QTLs) for the seedling emergence under low-temperature field conditions, lodging resistance and leaf photosynthesis were combined by the marker-assisted selection. Each trait was improved significantly in the pyramided near-isogenic line (NIL) carrying more than one QTL compared with the NIL carrying a single QTL. By combining QTLs for the seedling emergence and the preharvest sprouting, a NIL with improved seedling emergence was developed without increasing preharvest sprouting. We also found a QTL which enhanced leaf photosynthesis and increased dry matter production and grain yield. From the research, it was suggested that we could improve grain yield of direct seeded rice in flooded paddy field by selecting appropriate QTLs and pyramiding them into it.

研究分野：作物学

キーワード：作物学 植物育種学 イネ ゲノム 直播栽培 発芽 倒伏 光合成

1. 研究開始当初の背景

(1) 水稻の直播栽培はコメの生産コストを大幅に削減するための切り札的技術とされている。しかるに、直播栽培は出芽・苗立ちの不安定性と倒伏が発生しやすいこととによって、収量が低く、かつ不安定で、直播栽培の普及はまだ進んでいない。問題となる出芽・苗立ち性、倒伏抵抗性を改善し、個体群を構成する葉の光合成速度を高めることができれば、直播水稻の収量ポテンシャルを安定して大きく向上させることができ、ひいてはコメの生産コストを大幅に削減することが可能となる。

(2) 湛水直播栽培では、春先の気温の低い地域では低温による出芽・苗立ち(低温出芽性)の不良や土壤還元による出芽・苗立ち(還元出芽性)の不良が問題となる。加えて、茎基部が土中の浅いところにあることによって、倒伏しやすいという問題がある。土中に播種し、出芽まで落水することによって、近年出芽・苗立ちの不安定性はかなり改善され、倒伏も株が少し深くなることによって軽減されたが、出芽・苗立ち性と倒伏は依然として湛水直播栽培の大きな問題である。

2. 研究の目的

(1) 低温出芽性と還元出芽性を示す低温土中出芽性、倒伏抵抗性、光合成速度を高める量的形質遺伝子座(QTL)の作用機構を解明する。併せて、これらの遺伝子座が乾物生産と収量形成の諸プロセスに及ぼす影響を明らかにする。

(2) 低温土中出芽性、倒伏抵抗性、光合成速度を高める QTL 領域を 1 Mb 以下に絞り込んだコシヒカリ遺伝背景の準同質遺伝子系統(コシヒカリ NIL)を作出する。

(3) NIL を交配して QTL をいろいろな程度に集積したコシヒカリ NIL を作出し、低温土中

出芽性、倒伏抵抗性、光合成速度を相互に比較して、遺伝子座の集積効果と相互作用の機構を解明し、直播水稻の収量を大きく向上させる可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 種子の低温土中出芽性の評価と低温発芽性を高める遺伝子座の作用機構の検討

低温土中出芽性の評価では、代掻きした土壌を充填し湛水状態としたバットへ、浸種物を深さ 1cm に播種し、15 の恒温器に 25 日間おき、出芽率を測定した。穂発芽性の評価は、収穫後 48 時間以内の成熟種子を、湿度 100%、28 の恒温器中に 10 日間置き、発芽率を調査した。

低温発芽性を高める遺伝子座の作用機構の検討では、開花後 15 日(15 DAF)から 40 DAF まで 5 日おきに種子を採取し、15 の暗条件で吸水させ低温発芽性を評価し、プロテオーム的な解析を行った。胚から抽出したタンパク質は二次元電気泳動で分離し、MALDI-TOF mass を用いたペプチドマスフィンガープリンティング法で同定した。成熟種子(40 DAF)中に存在する mRNA は RNA-seq 法で網羅的に解析し、また登熟期間中の転写産物の変動は real time RT-PCR 法で解析した。

(2) 倒伏抵抗性と葉の光合成速度の評価

倒伏抵抗性と葉の光合成速度の評価には、東京農工大学農学部附属広域都市圏フィールドサイエンス教育研究センター(府中市)の水田(多摩川沖積土壌)に 22.2 株/m²(30cm×15cm)の栽植密度で 5 月下旬に移植した水稻を主として用いた。他に、1/5000 a ポットに生育する水稻も一部用いた。

倒伏抵抗性の指標である稈の挫折時モーメント、曲げ剛性は、出穂 15 日後に材料試験機テンシロン(RTG1210、エーアンドディ社)を用い、主茎の第 1 節間中央部を測定した。押し倒し抵抗値は株地際から 15 cm に、倒伏試験器(DIK-7401、大起理化工業)を押し

当て、稲株を垂直から 45 度の角度まで傾斜させた時の最大荷重（押し倒し抵抗値）を測定した。

光合成速度は、携帯用光合成蒸散測定装置 (LI-6400、LI-COR 社) を用い、穂揃い期に主茎の止葉について、気温 30、光強度 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、同化箱内の CO_2 濃度 370 あるいは 400 $\mu\text{l l}^{-1}$ 、飽差 1.2~1.5 kPa の条件で測定した。

(3) 育成したコシヒカリ NIL の生育、乾物生産、子実収量の評価

育成した水稻の生育、乾物生産、子実収量は、湛水直播栽培と移植栽培を行って評価した。湛水直播栽培は 2017 年に富山県農林水産総合技術センターの水田（富山市）と上記東京農工大学農学部（府中市）の 2 地点で行った。富山県農林水産総合技術センター水田では、代掻きした水田に、乾物換算で 3.0 kg/10a の浸種籾を 4 月 17 日に点播し、落水出芽法により出芽を促進した。N 施肥量は 5.9 kg/10a であった。東京農工大学農学部では、代掻き後落水した水田に 4 月 28 日に催芽種子を約 1 cm の深さで点播（30 cm × 15 cm）した。基肥は N、 P_2O_5 、 K_2O をそれぞれ 3、6、6 kg/10a 施用した。うち N 肥料は 1/3 を硫酸、2/3 を緩効性肥料（LP-50：LP-100=1:1）とした。追肥は行わなかった。

移植栽培は東京農工大学農学部の水田で上記 3 . (2) に準じて行った。施肥は直播栽培に準じて基肥のみとした。

4 . 研究成果

(1) 低温土中出芽性を高める遺伝子座をもつコシヒカリ NIL の育成

第 11 染色体に見出していた低温土中出芽性を高める阿波赤米の対立遺伝子（*qESS11*）は穂発芽耐性を弱めることも併せて明らかとなった。第 3 染色体の Kasalath 型対立遺伝子（*Sdr1*）は穂発芽耐性を高める。そこで、低温土中出芽性を高める阿波赤米の第 11 染

色体断片（201 kb）をもつコシヒカリ NIL（NIL-qESS11）と穂発芽耐性を高める Kasalath の第 3 染色体断片（450 kb）をもつコシヒカリ NIL（NIL-Sdr1）を育成し、両 QTL を集積する NIL を作出した。その結果、2 つの QTL を集積した NIL は、低温土中出芽性はコシヒカリに比較して高く、穂発芽耐性はコシヒカリ並みに改善されることが明らかとなった。

(2) 低温出芽性を高める遺伝子座の作用機構 *qLTG3-1* 遺伝子産物の作用機構

第 3 染色体に見出されている阿波赤米由来の低温出芽性を高める遺伝子 *qLTG3-1* を持つコシヒカリ NIL（と系 1534）の低温条件（15）での発芽能は、コシヒカリと比較して明らかに高かった。発芽前の乾燥した種子をプロテオーム的に解析した結果、と系 1534 の胚のタンパク質組成はコシヒカリと異なっていることが明らかになった。このことは、*qLTG3-1* 遺伝子産物は種子が吸水して発芽が誘導される前の種子形成期間中に機能していることを示唆している。形成過程における種子の低温発芽性を調べたところ、コシヒカリは種子形成の早い時期の開花後 25 日（25 DAF）前後までは比較的高い低温発芽性を示すが、登熟後期（35~40 DAF）になると低温発芽性は著しく低下した。これに対して、と系 1534 では 30 DAF 以降の種子でも高い低温発芽性が維持されていた。さらに、RNA-seq 法や real time RT-PCR 法による解析によって、(i) と系 1534 の *qLTG3-1* の mRNA は種子形成後期に増加すること、および (ii) と系 1534 の成熟種子には脂質代謝に関わる遺伝子や低温順化に関与するキチナーゼ等の遺伝子の転写産物がコシヒカリと比較して有意に多く蓄積していることが明らかになった。以上の結果から、*qLTG3-1* 遺伝子産物は種子形成期間の後期に機能して低温発芽性を高く維持していることが考えられた。

qESS11 遺伝子産物の作用機構

阿波赤米由来の *qESS11* を持つコシヒカリ NIL (NIL-*qESS11*) の種子は、と系 1534 の場合と同様、種子形成後期(35 ~ 40 DAF)でも高い低温発芽性が維持されていた。しかし、と系 1534 の種子で多く蓄積していた脂質代謝に関わる遺伝子などの存在量は、コシヒカリと同等か、むしろ少なくなっていた。一方、ABA のシグナル伝達を阻害するプロテインホスファターゼ 2C (PP2C30) の転写産物は、種子形成後期の種子でコシヒカリよりも多く蓄積していることが明らかになった。以上の結果から、*qESS11* 遺伝子産物も登熟後期の低温発芽性を維持する上で重要な役割を果たしているが、その作用機構は *qLTG3-1* 遺伝子産物とは異なることが示唆された。

低温発芽性における *qLTG3-1* と *qESS11* の集積効果

qLTG3-1 と *qESS11* の 2 つの遺伝子産物の作用機構が異なることが示唆されたので、低温発芽性に関してはこれらの遺伝子の集積効果が期待できる。そこで 2 つの遺伝子を集積した結果、集積系統の低温発芽性は有意に向上し、15 で吸水させた時の発芽率が 90% に達するまでに要する時間は、各遺伝子を単独で持つ系統よりも 24 時間以上短縮された。

以上の結果から、2 つの遺伝子を集積すれば、優れた低温発芽性を有する水稻品種の育成が可能になることが示された。

(3) 倒伏抵抗性を高める強稈遺伝子の集積効果の検討

八バタキに由来する強稈遺伝子 *SCM1* (第 1 染色体)、*SCM2* (第 6 染色体) と中国 117 号に由来する *SCM3* (第 3 染色体)、*SCM4* (第 2 染色体) を有するコシヒカリ NIL を育成した (それぞれ、NIL-*SCM1*、NIL-*SCM2*、NIL-*SCM3*、NIL-*SCM4*)。NIL-*SCM1*、NIL-*SCM2* における八バタキの染色体断片は、それぞれ 3.57 Mb、484 kb、NIL-*SCM3* と NIL-*SCM4* における中国

117 号の染色体断片は、それぞれ 2.1 Mb、163 kb であった。そして、これらの NIL を相互に交配し、マーカー選抜により遺伝子を集積した NIL (2 集積 NIL; *SCM1+2*、*SCM1+3*、*SCM1+4*、*SCM2+3*、*SCM2+4*、*SCM3+4*、3 集積 NIL; *SCM1+2+3*、*SCM1+2+4*、*SCM1+3+4*、*SCM2+3+4*、4 集積 NIL 系統; *SCM1+2+3+4*) を作出した。

挫折型倒伏抵抗性に関わる断面係数は強稈遺伝子を多く集積するほど大きくなり、4 集積系統の *SCM1+2+3+4* の断面係数はコシヒカリの約 1.8 倍に増加した。曲げ応力は集積により減少したが、断面係数と曲げ応力の積である稈の挫折時モーメントは集積により増加し、*SCM1+2+3+4* はコシヒカリに比べ約 1.3 倍となった。たわみ型倒伏抵抗性に関わる断面 2 次モーメントも強稈遺伝子を多く集積するほど大きくなり、*SCM1+2+3+4* はコシヒカリの約 2.2 倍と著しく増加した。ヤング率は集積により増加し、その結果、断面 2 次モーメントとヤング率の積である曲げ剛性は集積により著しく増加し、*SCM1+2+3+4* はコシヒカリに比べて約 2.7 倍となった。

強稈遺伝子の集積効果は *SCM1* を含む系統で大きく、重回帰分析により集積効果への貢献度を比較した結果、*SCM1*、*SCM3* の貢献度が高く、とくに *SCM1* の貢献が大きかった。その要因を系統した結果、*SCM1* を含む系統では、稈外径が大きくなると同時に皮層繊維組織が厚く発達して強稈質となること、細胞数が増えることが関係していた。このことから、*SCM1* は、稈の柔細胞の細胞分裂による外径の拡大に加えて稈外周部の機械組織である皮層繊維組織の細胞分裂を促進することを通じてヤング率が大きくなり、集積効果に寄与することが明らかとなった。

以上の結果から、強稈遺伝子の優良なアリルを複数集積することによって、倒伏抵抗性が高まり、最良の強稈遺伝子の組み合わせによって集積効果が一層高まり、倒伏抵抗性の改良が可能であることがわかった。

(4) 光合成速度を高める QTL の作用機構と QTL の集積効果の検討、および光合成速度を高める QTL を持つコシヒカリ NIL の作出

インド型多収品種ハバタキあるいはタカナリの対立遺伝子がコシヒカリの光合成速度を高める QTL を、第 4、5、8、11 染色体に見出してきた。そこで、まず第 4、5、8 染色体の QTL の機能を検討し、第 4 染色体のタカナリ対立遺伝子は、気孔伝導度、葉肉伝導度、最大電子伝達速度を高めて、光合成速度を高め、これには、葉身窒素含量を高めることが一部関係していること、第 5 染色体のハバタキ対立遺伝子は、葉身の窒素含量を高めて光合成速度を高めることに加えて、葉身窒素含量が等しくても、最大電子伝達速度を高め、さらに根の水伝導度を高めて気孔伝導度を大きくして光合成速度を高めること、第 8 染色体のハバタキ対立遺伝子は、根の表面積当たり水伝導度を増加させることによって、気孔伝導度を大きくして光合成速度を高めること、を明らかにした。

第 4 染色体と第 8 染色体の光合成速度を高めるハバタキ対立遺伝子をコシヒカリに集積した系統の光合成速度はハバタキに匹敵するまでに高まり、葉の光合成速度においても遺伝子の集積によって、葉の光合成速度を大きく改善することが可能であることが分かった。

コシヒカリ NIL の育成においては、まず、光合成速度を高める第 11 染色体のハバタキ染色体領域を 356 kb に狭めた NIL (NIL-CAR11) を育成し、ついで、第 4 染色体のハバタキ染色体領域を 910 kb に狭めた NIL (NIL-CAR4) および第 8 染色体のハバタキ染色体領域を 959 kb に狭めた NIL (NIL-CAR8) を育成した。さらに NIL-CAR4 と NIL-CAR8 を交配し、光合成速度を高める QTL を集積した NIL を育成した。

(5) 光合成速度を高める QTL をもつコシヒカ

リ NIL の乾物生産と子実収量

第 5 染色体に光合成速度を高めるハバタキ対立遺伝子をもつコシヒカリ NIL は、コシヒカリに比較して、出穂期、葉面積指数、個体群構造に相違はないが、出穂期以降の光合成速度が高くなることによって、収穫期乾物重と子実収量が有意に大きくなった。しかし、第 4 染色体、あるいは第 8 染色体に光合成速度を高めるハバタキ対立遺伝子をもつコシヒカリ NIL は、コシヒカリに比較して、個葉光合成速度は高まるが、葉面積指数が小さくなること(第 4 染色体)、出穂期が早まること(第 8 染色体)などによって、収穫期乾物重と子実収量が大きくなることはなかった。これら第 4 染色体と第 8 染色体を集積しても、同様な理由によってコシヒカリに比較して収穫期乾物重と子実収量が大きくなることはなかった。

以上の結果から、光合成速度を高める QTL を導入して乾物生産や子実収量の高いイネを育成するためには、導入する QTL の出穂期、葉面積指数、受光態勢などの乾物生産や子実収量に関わる他の形質への影響やこれら形質の多面発現を十分に考慮する必要があることが分かった。低温土中出芽性、倒伏抵抗性の遺伝子導入においても、同様なことを考慮する必要があるものと考えられる。

(6) 低温出芽性、穂発芽耐性、倒伏抵抗性、個葉光合成を高める QTL を集積したコシヒカリ NIL の生育と乾物生産、子実収量

低温出芽性に優れる阿波赤米由来の遺伝子座(第 11 染色体、阿波赤米の染色体断片は 236 kb)、穂発芽耐性に優れる Kasalath 由来の遺伝子座(第 3 染色体、Kasalath の染色体断片は 450 kb)、倒伏抵抗性に優れるハバタキ由来の遺伝子座(第 6 染色体、ハバタキの染色体断片は 484 kb)と中国 117 号由来の遺伝子座(第 3 染色体、中国 117 号の染色体断片は 163 kb)、および光合成速度を高める

八バタキ由来の遺伝子座(第11染色体、八バタキの染色体断片は356 kb)をもつコシヒカリNILを交配し、4ヶ年かけて計5つのQTLを持つNIL(5QTL集積系統)を育成した。研究最終年にこれを水田で湛水直播栽培と移植栽培し、生育特性と乾物生産、子実収量をコシヒカリと比較した。その結果、5QTL集積系統はコシヒカリに比較して、湛水直播栽培では低温苗立ち性が高まり、倒伏に関する押し倒し抵抗は両栽培とも明らかに高まった。しかし、5QTL集積系統はコシヒカリに比較して、両栽培とも光合成速度、乾物生産と収量に有意差はなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Mulsanti, I.W., Yamamoto, T., Ueda, T., Samadi, A.F., Kamahora, E., Rumanti, I.A., Thanh, V.C., Adachi, S., Suzuki, S., Kanekatsu, M., Hirasawa, T., Ookawa, T. Finding the superior allele of *japonica*-type for increasing stem lodging resistance in *indica* rice varieties using chromosome segment substitution lines, *Rice*, 査読有, 2018, 11, 25
DOI: org/10.1186/s12284-018-0216-3

He, W., Adachi, S., Sage, F.R., Ookawa, T., Hirasawa, T. Leaf photosynthetic rate and mesophyll cell anatomy changes during ontogenesis in backcrossed *indica* × *japonica* rice inbred lines, *Photosynthesis Research*, 査読有, 2017, 134, 27-28
DOI: 10.1007/s11120-017-0403-x

Ookawa, T., Aoba, R., Yamamoto, T., Ueda, T., Takai, T., Fukuoka, S., Ando, T., Adachi, S., Matsuoka, M., Ebitani, T., Kato, Y., Mulsanti, I.W., Kishii, M., Reynolds, M., Piñera, F., Kotake, T., Kawasaki, S., Motobayashi, T., Hirasawa, T. Precise estimation of genome regions controlling lodging resistance using a set of reciprocal chromosome segment substitution lines in rice, *Scientific Reports*, 査読有, 2016, 6, 30572
DOI:10.1038/srep30572

Adachi, S., Baptista, L.Z., Sueyoshi, T., Murata, K., Yamamoto, T., Ebitani, T., Ookawa, T., Hirasawa, T. Introgression of two chromosome regions for leaf photosynthesis from an *indica* rice into the

genetic background of a *japonica* rice, *Journal of Experimental Botany*, 査読有, 2014, 65, 2049-2056
DOI: 10.1093/jxb/eru047

〔学会発表〕(計52件)

山口琢也、川原善浩、仲條眞介、遠藤貴司、石森裕貴、伊山幸秀、荘司和明. 阿波赤米に由来する低温土中出芽性遺伝子は障害型耐冷性を向上させる、日本育種学会、2017年10月8日、岩手大学(岩手県・盛岡市)
高橋潤平、水鳥希洋人、木俣花音、山口琢也、山田哲也、金勝一樹. 阿波赤米由来のイネ低温発芽性に関わる遺伝子産物の種子登熟期間における役割の解析、日本育種学会、2017年3月29~30日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)
水鳥希洋人、山口琢也、山田哲也、金勝一樹. qLTG3-1を持つ準同質遺伝子系統を用いた低温条件下で吸水させた種子のプロテオーム解析、日本植物生理学会、2015年3月18日、東京農業大学(東京都・世田谷区)
Yamaguchi, T., Iyama, Y., Sugimoto, K., Yano, M., Omoteno, M., Fujita, K., Murata, K., Ebitani, T. Optimization of seed germinability for direct seeding by stacking QTLs in rice, *Plant and Animal Genome XXIII Conference*, 2015年1月10~14日、San Diego (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平沢 正 (HIRASAWA, Tadashi)
東京農工大学・(連合)農学研究科・名誉教授
研究者番号: 30015119

(2) 研究分担者

山口 琢也 (YAMAGUCHI, Takuya)
富山県農林水産総合技術センター・農業研究所・主任研究員
研究者番号: 40538170

金勝 一樹 (KANEKATSU, Motoki)
東京農工大学・(連合)農学研究科・教授
研究者番号: 60177508

大川 泰一郎 (OOKAWA, Taiichiro)
東京農工大学・(連合)農学研究科・教授
研究者番号: 80213643

(4) 研究協力者

蛭谷 武志 (EBITANI, Takeshi)
安達 俊輔 (ADACHI, Shunsuke)