

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780002

研究課題名（和文） 多重突然変異系統を用いたイネの新規花成誘導機構の解明

研究課題名（英文） Identification of novel regulatory of flowering time using multiple mutants of rice (*Oryza sativa* L.)

研究代表者

齊藤 大樹 (SAITO HIROKI)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：10536238

研究成果の概要（和文）：出穂期突然変異系統を利用し、イネの出穂期制御に関与する新規遺伝子を単離することを目的として、すでに変異遺伝子の候補領域が決定されている早生突然変異系統 HS112 および HS254 については、詳細マッピング集団を育成し、変異遺伝子を単離した。その結果、HS112 の原因遺伝子は染色体 3 に座乗する遺伝子 (Os03g0151300) であることが明らかになった。一方、HS254 の原因遺伝子は染色体 10 に座乗する遺伝子であることが明らかになった。発現解析の結果から、これらの系統はともに早生遺伝子 *Ehd1* の発現制御に関与し、突然変異系統では *Ehd1* の発現が長日条件下において誘導されることでそれぞれ出穂期が早生化することが明らかとなった。これらの遺伝子は出穂期制御に関わる新規の遺伝子であることから、出穂期制御機構の解明に向け大きく貢献すると考えられる。次に、多重突然変異系統を用いた未同定の出穂期遺伝子の探索を目的として、すでに遺伝子が単離されている早生突然変異系統 X61、晩生突然変異系統 HS169 およびそれらの 2 重突然変異系統 DMG2 に新たな突然変異を誘発し、出穂期突然変異系統を作出した。各系統 M2 個体由来 M3 種子を播種し、3 系統合計約 15,000 系統から出穂期突然変異と思われる系統を 168 系統選抜した。これらの個体の中には、野生型への変異誘発では表現型に反映されなかった遺伝子への変異も含まれていると考えられることから、今後の解析によって未同定の出穂期遺伝子の単離が期待される。

研究成果の概要（英文）：To identify novel genes controlling flowering time in rice, flowering time mutants were investigated. High resolution molecular marker analyses showed that an early flowering time mutant, HS112, harbored a mutation in the gene (Os03g0151300) in chromosome 3, and another early flowering time mutant, HS254, harbored a mutant gene in chromosome 10. It is not reported that these genes involve in controlling flowering time. Therefore, it is considered that these genes are novel flowering time genes, called *Se14* and *Se15*. Expression analyses demonstrated that a flowering time gene, *Ehd1*, was highly up-regulated under long-day condition in both of these mutants. These results indicate that *Se14* and *Se15* repress the expression of *Ehd1* under long-day condition. Multiple mutants based on known mutant lines, X61, HS169 and double-mutant line of these two lines, were obtained. In total 15,000 lines, 168 plants were selected as flowering time mutants. These novel mutants will provide us new knowledge to understand how to control flowering time in rice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000

年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：育種学、遺伝学、植物、発生・分化

### 1. 研究開始当初の背景

花成は種子植物にとって遺伝子の存続の成否にかかわる最も基本的な形態形成の一つであり、環境適応を左右する重要な形質である。特にイネにおいては種子生産(収量)の安定・増産にかかわる重要な形質であることから、イネの花成誘導機構の解明は、花成の人為的制御により収量の安定化を可能にするだけでなく、栽培地域の拡大にも貢献する。双子葉植物のモデル植物であるシロイヌナズナでは、突然変異系統を利用した研究から花成誘導関連遺伝子が数多く単離されている。また、これら突然変異系統の相互交配やさらなる突然変異の誘発から得られた多重突然変異系統の解析により、複数の花成誘導機構が存在していることが明らかにされている。イネにおいても複数の花成誘導機構が存在することが示唆されているが、特に効果の大きい一部の花成誘導機構についてのみ研究されただけに過ぎずない。また、これらの研究は遺伝的背景の異なる材料を用いているため、総合的にイネの花成誘導機構を理解することができないため、依然としてイネの花成誘導については未知の部分が多い。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、イネ品種‘銀坊主’に由来する出穂期突然変異系統を用いて、イネの花成誘導に関与する新規遺伝子を単離することである。特に本研究では、これまで明らかにされている主要な出穂期関連遺伝子が欠損した系統に新たな変異を誘発して得られた多重突然変異系統を利用し、これまで知られていないイネの花成誘導機構の同定を目指すものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規花成誘導関連遺伝子の単離

銀坊主由来の出穂期突然変異系統のうち、すでに変異遺伝子の候補領域が決定されている系統(HS112、HS118 および HS254)については、銀坊主と出穂特性のほとんど変わらない日本晴の遺伝的背景に該当領域がインデイカ品種 Kasalath の染色体断片に置換された系統(CSSLs)と交雑し、詳細マッピング集団を育成する。交雑 F<sub>2</sub> 集団およそ 4000 個体圃場で栽培し、出穂期を調査するとともに、

分子マーカーを用いた連鎖解析により変異遺伝子の単離を試みる。これら以外の系統については、日本晴との交雑集団を育成し、座乗候補領域を特定する。しかし、銀坊主と日本晴は遺伝的に近縁なため、連鎖解析に用いることのできる分子マーカーが得られにくい。この問題点を解決するために、申請者が開発に携わった *mPing* SCAR マーカーを用いる。*mPing* SCAR マーカーは、トランスポゾン *mPing* の挿入多型を検出する共優性マーカーで、日本晴(50 コピー程度)に比べ、多数の *mPing* 挿入が確認されている銀坊主(1000 コピー以上)との交雑集団を用いることで、遺伝的背景の近い交雑集団においても、多数の多型マーカーを得ることができる。既知の花成誘導関連遺伝子と同領域に同定された場合は、塩基配列を解析し、異同について調査する。また、これらの突然変異系統において、既知の花成誘導関連遺伝子の RNA 発現量がどのように変化するかを調査し、遺伝子間の相互作用を明らかにする。

#### (2) 多重突然変異系統を用いた未同定の花成誘導機構の発掘

申請者のこれまでの研究から、いくつかの花成誘導関連遺伝子が単離されている。イネ品種銀坊主由来の早生突然変異系統 X61 は、日長に応答し花成制御する日長反応性機構を完全に喪失した系統であり、発色団合成に関わる酵素の一部の遺伝子 *Se13(=OsHY2)* に変異を有する。一方、晩生突然変異系統 HS169 は、短日条件下で花成が遅延する系統であり、花成誘導遺伝子 *Ehd1(=Eft)* に劣性の突然変異遺伝子 *efl-h* をもつ。また、それらの相互交配によって得られた二重突然変異系統 DMG2 に新たな突然変異を誘発し、花成誘導に関与する新規遺伝子を見出す。より効率的に突然変異を誘発するために、600Gy および 800Gy の高線量照射を行う。高線量照射による放射線障害を緩和するために、ヒートショック処理(-70℃で照射し、照射終了後 60℃の温水に 2 分間浸ける)を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規花成誘導関連遺伝子の単離

出穂期突然変異系統を利用し、イネの出穂

期制御に関与する新規遺伝子を単離することを目的として、すでに変異遺伝子の候補領域が決定されている早生突然変異系統 HS112 および晩生突然変異系統 HS254 については、詳細マッピング集団を育成し、変異遺伝子を単離した。その結果、HS112 の原因遺伝子は染色体 3 の DNA マーカー RM14388 と *mPing* SCAR マーカー MK3\_6 との間、約 1Mb 内に座乗することが明らかとなった。この領域内にはシロイヌナズナの花成制御に関わる遺伝子 *ELF6* のホモログ遺伝子 (Os03g0151300) が存在することから、この遺伝子の塩基配列を調査したところ、第 1 エキソンに 23bp の欠失が見つかった。以上のことから、HS112 の原因遺伝子は Os03g0151300 であると考えられ、これまでこの領域に出穂期制御遺伝子があるとした報告がないことから、この遺伝子を新規感光性遺伝子 *Se14* と命名した。一方、HS254 の原因遺伝子は染色体 10 の *mPing* SCAR マーカー MK10\_13 と MK10\_28 に座乗することが明らかになった。これまでの研究で、HS254 の候補領域内に出穂期制御遺伝子が存在することは報告されていないことから、HS254 の原因遺伝子は新規の出穂期遺伝子であると考えられ、*Se15* と命名した。発現解析の結果から、これらの系統はともに早生遺伝子 *Ehd1* の発現制御に関与し、突然変異系統では *Ehd1* の発現が長日条件下において誘導されることでそれぞれ出穂期が早生化することが明らかとなった(図)。これらの遺伝子は出穂期制御に関わる新規の遺伝子であることから、出穂期制御機構の解明に向け大きく貢献すると考えられる。HS118 について、原因遺伝子の候補領域は染色体 1 の *mPing* SCAR マーカー MK1\_2 と DNA マーカー RM1 との間、約 0.7Mb に絞り込まれることが明らかになった。この領域には 50 を超える遺伝子が座乗することから、さらなる詳細な解析によって、候補領域の特定が必要であると考えられた。

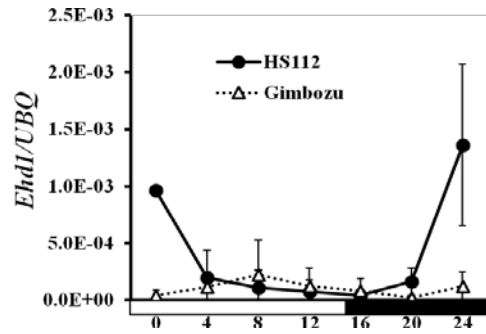


図 HS112 と銀坊主における *Ehd1* の発現解析(長日条件、播種後 30 日目)

## (2) 多重突然変異系統を用いた未同定の花成誘導機構の発掘

次に、多重突然変異系統を用いた未同定の出穂期遺伝子の探索を目的として、すでに遺伝子が単離されている早生突然変異系統 X61、晩生突然変異系統 HS169 およびそれらの 2 重突然変異系統 DMG2 に新たな突然変異を誘発し、出穂期突然変異系統を作出した。各系統 M2 個体由来 M3 種子を播種し、3 系統合計約 15,000 の M3 系統から出穂期突然変異と思われる系統を 168 系統選抜した(表)。これらの個体の中には、野生型への変異誘発では表現型に反映されなかった遺伝子への変異も含まれていると考えられることから、今後の解析によって未同定の出穂期遺伝子の単離が期待される。

表 ホモ型であると同定された変異系統数

	観察された変異の種類						合計
	早生	晩生	短稈	偽病斑	その他	変異なし	
X61 mutants	16	95	11	0	5	41	168
HS169 mutants	19	21	13	4	9	74	140
DMG2 mutants	7	10	0	0	0	127	144

\*: 姉妹系統による重複を排除した系統数

## 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 Saito H, Okumoto Y, Yoshitake Y, Inoue H, Yuan Q, Teraishi M, Tsukiyama T, Nishida H, Tanisaka T, Complete loss of photoperiodic response in the rice mutant line X61 is caused by deficiency of phytochrome chromophore biosynthesis gene、Theor. Appl. Genet. 査読有、122 巻、2011、109-118、DOI: 10.1007/s00122-010-1426-2

[学会発表] (計 5 件)

- ① 横尾敬行、齊藤大樹、浅見武人、徐銓、吉竹良洋、浅野翔、泉はるか、伊藤真、K. Mustafa、谷坂隆俊、奥本裕、*Ehd1*

の発現制御に関わる新規感光性遺伝子の単離、日本育種学会第 120 回講演会、2011 宇都宮大学

- ② 齊藤大樹、横尾敬行、徐銓、吉竹良洋、浅野翔、泉はるか、Kamal Mostafa、山川真梨恵、奥本裕、イネ早生突然変異系統の超長日条件における出穂遅延特性の多様性、日本育種学会第 119 回講演会、2011 横浜市立大学
- ③ 浅見武人、齊藤大樹、徐銓、奥本裕、袁清波、吉竹良洋、谷坂隆俊、*mPing* SCAR マーカーを用いた新規出穂期突然変異遺伝子の同定、日本育種学会第 116 回講演会、2009 北海道大学
- ④ 齊藤大樹、吉竹良洋、袁清波、奥本裕、谷坂隆俊、不感光性突然変異系統 X61 のもつ新規突然変異遺伝子の単離およびその育種的利用、日本育種学会第 116 回講演会、2009 北海道大学
- ⑤ 吉竹良洋、齊藤大樹、浅見武人、浅野翔、築山卓司、河内孝之、三瀬和之、奥本裕、谷坂隆俊、極早生突然変異系統 X61 のもつ不感光性遺伝子 *se13* の機能解析、日本育種学会第 116 回講演会、2009 北海道大学

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

齊藤 大樹 (SAITO HIROKI)  
京都大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：10536238

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし