

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450001

研究課題名(和文) イネ幼芽期低温抵抗性の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism for chilling tolerance at the plumule stage in rice

研究代表者

大西 一光 (Onishi, Kazumitsu)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：50526704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネの低温抵抗性の分子的基盤の理解を目的として、幼芽期低温抵抗性遺伝子qCTP11の解析および単離を行った。幼芽期に0～8℃で低温処理を行った結果、qCTP11座の効果は4～6℃以下で見られることが明らかとなった。また乾燥や塩ストレスには効果を示さなかった。マイクロアレイ解析を行ったところ、低温ストレスに応じて発現が変動した遺伝子数は、感受性系統に比べ、抵抗性系統で少なくなった。qCTP11の候補遺伝子について、「日本晴」由来のBACクローンをを用いてプロモーター領域およびコード領域を含む約10 kbpの領域を増幅できた。現在は定量的RT-PCRによる発現解析と形質転換体の作出を進めている。

研究成果の概要(英文)：The analysis and cloning of the gene for chilling tolerance at the plumule stage (qCTP11) were conducted to understand molecular mechanisms for chilling tolerance in rice. By evaluating the chilling tolerance under the temperature over the range from 0 to 8 °C, qCTP11 was revealed to have the effect on chilling tolerance below 4-6 °C. qCTP11 had no effects on drought and salt tolerance. By microarray analysis, the chilling-sensitive strains showed more changes in gene expression when compared with the tolerant strain. For the candidate gene of qCTP11, the 10 kbp region containing promoter and coding sequences was amplified by using the BAC clone derived from cultivar "Nipponbare". Real-time PCR analysis and the generation of transgenic rice plants for the candidate gene were now in progress.

研究分野：植物育種学

キーワード：イネ 低温抵抗性 QTL

1. 研究開始当初の背景

低温はイネの栽培地域や生産性を制限する最大の要因の一つである。低温抵抗性育種を効率的に進めるためには、関与遺伝子(QTL)を単離し、抵抗性発現の分子機構を明らかにすることが重要と考えられる。我々は、これまでイネの生育初期の低温抵抗性の解析を進め、北海道の在来品種 A58 が発芽直後の幼芽期において極めて高い低温抵抗性を持つことを明らかとし(図1), A58 と熱帯産野生イネ W107 との交雑に由来する組換え自殖系統を用いた解析より、抵抗性に関与する効果の大きい二つの QTL ($qCTP11$ と $qCTP12$)を見出している(Baruah *et al.* 2009)。また A58 と北海道栽培品種「ほしのゆめ」の抵抗性の違いには $qCTP11$ 座の一遺伝子が関与し、抵抗性(A58)型が劣性の遺伝様式を示すことを明らかにしている(日本育種学会第118回講演会)。

$qCTP11$ に関しては、A58 に W107 から $qCTP11$ 領域を導入した BC₄ 集団 4500 個体の分離集団を用いてファインマッピングを行い、候補領域を第 11 染色体長腕の約 5 kbp の領域に絞り込んだ(2009-2011 年科学研究費基盤 C 成果)。候補領域の塩基配列を比較した結果、A58 型対立遺伝子は 73 bp の欠失が見られ、フレームシフト変異によりその機能を欠損していると考えられる。これらの結果、すなわち(1) $qCTP11$ 座による低温抵抗性の発現は劣性の遺伝様式を示すこと、(2) ファインマッピングにより絞り込まれた候補遺伝子に関して、A58 型(抵抗性型)対立遺伝子は機能欠損型のタンパク質をコードすること、の 2 点からの機能欠損により低温抵抗性が付与される可能性が極めて高いことが示された。



図1. 幼芽期(幼芽長1-2cm)の低温処理(0-1℃、2日間)による抵抗性の差異。

低温処理後10日間昼25℃/夜20℃で育成。A58は大きな傷害は認められないが、「ほしのゆめ」は低温処理により枯死する。

2. 研究の目的

本研究では以下の実験を行い、イネ幼芽期低温抵抗性遺伝子 $qCTP11$ の原因遺伝子の単離と低温抵抗性発現の遺伝・分子機構の調査を行う。

- (1) $qCTP11$ 座準同質遺伝子系統を育成し、低温ストレス応答を詳細に調査する。また他の非生物的ストレス(塩と乾燥)への抵抗性に対する効果の有無を明らかにする。
- (2) 候補遺伝子および下流に存在する低温応答性遺伝子の発現を調査する。
- (3) $qCTP11$ 座の原因遺伝子を、形質転換体作出による相補性検定により明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) $qCTP11$ 座について、A58 および「ほしのゆめ」を遺伝背景とした準同質遺伝子系統を作成する。この準同質遺伝子系統(NILs)を用いて、温度や生育ステージによる低温抵抗性の変化や、 $qCTP11$ 座の非生物的ストレス(塩や乾燥)への効果を調査する。また候補遺伝子および低温応答に関わる遺伝子の発現を調査する。
- (2) $qCTP11$ 座の候補遺伝子について、機能欠損型(抵抗性型)対立遺伝子を持つ系統に W107 または「日本晴」由来の機能型(感受性型)対立遺伝子を導入した形質転換体を作成し、相補性検定を行う。

4. 研究成果

(1) 準同質遺伝子系統を用いた $qCTP11$ 座の遺伝子作用の検証

抵抗性品種 A58 に野生イネ W107 から感受性型対立遺伝子を導入した BC₆-NIL (A58 $qCTP$ -W)、感受性品種「ほしのゆめ」に A58 から抵抗性型対立遺伝子を導入した BC₄-NIL (HY $qCTP$ -A) を育成した。これら NILs を用いて遺伝子作用を調査した。幼芽期に 0.5, 2, 4, 6, 8 で低温処理を行った結果、 $qCTP11$ 座の効果は 4~6 以下で見られることが明らかとなった(図2)。また幼芽期に乾燥処理を行った結果、A58 は強く、「ほしのゆめ」は弱いという明瞭な差が見られたが、それぞれの系統と NIL 間では差がなかった。このことから、 $qCTP11$ は乾燥耐性に関与していない可能性が考えられた。塩処理に関してはすべての系統間に差異は認められなかった。

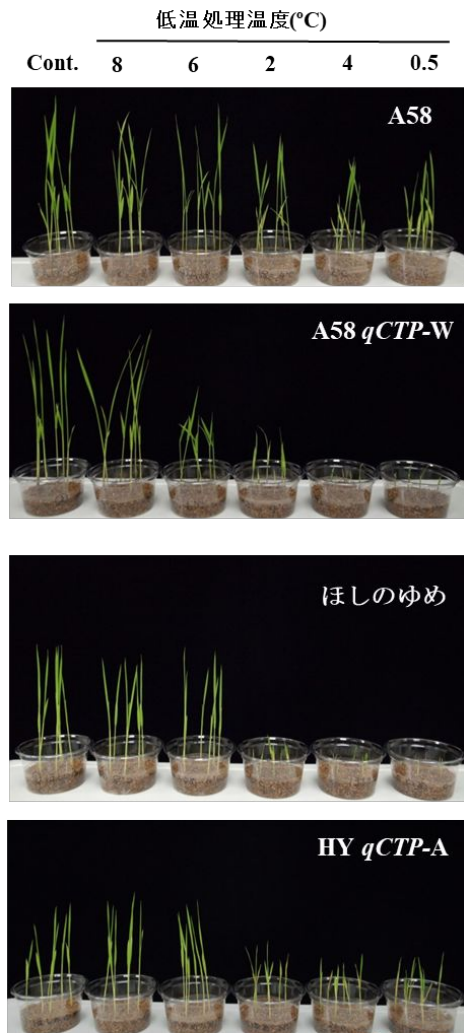


図2. A58とA58qCTP-Wおよび「ほしのゆめ」とHYqCTP11-Aにおける異なる温度条件下での低温抵抗性の差異.

(2) qCTP11 遺伝子およびその下流の低温応答性遺伝子の発現

qCTP11 遺伝子の発現解析:A58 ,A58qCTP-W および「ほしのゆめ」の3系統での qCTP11 候補遺伝子の発現レベルを比較するため, RT-PCR 解析を行なった. 解析に用いた RNA は, 30 日・長日条件 (16h 明期-8h 暗期) 下で発芽させた幼芽 (地上部が 1.0-1.5 cm に成長したもの), の幼芽に低温処理 (0-1 °C, 2 日間, 暗所) を行ったもの, および低温処理後の幼芽を 30 日・長日条件下に 2 日間置いたもの, のそれぞれから調製した. RT-PCR の結果, いずれの処理条件下でも候補遺伝子の発現が検出された. また処理条件に関わりなく, 異なる系統の間で発現レベルには顕著な差が認められなかった.

低温処理にตอบสนองする遺伝子の探索: qCTP11 遺伝子の下流にあり低温応答に関与する遺

伝子群を特定するため, 前述の3系統で低温処理の前と後の個体よりそれぞれ抽出した RNA に対して, マイクロアレイ解析を実施した. マイクロアレイとして Ishiguro et al. (2014) によるカスタムアレイ (反復配列 31,366 個, 遺伝子配列 9563 個, miRNA 864 個) を用いた. 系統ごとに低温処理の前後で発現レベルが異なったプロンプ (up = 低温処理後にレベルが 2 倍以上上昇したもの, down = 低温処理後にレベルが 2 倍以上減少したもの) の数を調査したところ, A58 では 5079 個 (up = 152, down = 4927), A58qCTP-W では 7887 個 (up = 154, down = 7733), 「ほしのゆめ」では 10237 個 (up = 1472, down = 8765) であった. この結果から, 低温ストレスに応じて変動したプロンプの数は, A58 品種が最も少なく, A58qCTP-W は A58 と「ほしのゆめ」の中間だった. このことから幼芽期に低温抵抗性を示す品種 A58 では低温によるストレス応答が鈍化している可能性が示された.

(3) qCTP11 座の候補遺伝子に関する形質転換体作出

A58 は「ほしのゆめ」に比べ再分化効率が劣っていたため, HYqCTP-A を用いて形質転換体の作出を試みた. プロモーター領域およびコード領域を含む約 10 kbp の領域についてゲノム DNA からの PCR を試みたが, 候補遺伝子が反復性の高い遺伝子であるため特異的の増幅ができなかった. そこで, qCTP11 領域を含む「日本晴」由来の BAC クローンを入手し PCR を行ったところ, 目的サイズの断片を得ることができた. 現在はこの断片をイネ形質転換用ベクターへの導入しており, ベクターが得られ次第, 形質転換体の作出を行う予定である.

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 1 件)

河野 周一, 石黒 聖也, Akhil Ranjan Baruah², 貴島 祐治, 山田 恭司, 若杉 達也, 大西 一光, 山本 将之
イネの幼芽期低温耐性に関与する遺伝子群の探索
北陸植物学会第 5 回大会
金沢大学サテライト・プラザ(石川県金沢市),
平成 27 年 6 月 2 1 日(日)

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大西 一光 (ONISHI KAZUMITSU)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：50526704

(2)研究分担者

山本 将之 (YAMAMOTO MASAYUKI)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・

講師

研究者番号：10456402