

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07280

研究課題名(和文) 登熟期高温耐性遺伝子の作用機作の解明

研究課題名(英文) Identification of the mechanisms of high temperature tolerance at ripening stage in rice

研究代表者

寺尾 富夫 (TERAO, Tomio)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・グループ長

研究者番号：80355578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：高温登熟による白未熟粒の発生を抑えるハバタキが持つ第3染色体に座上するQTL、qtTW3-2の原因遺伝子を絞り込み、RNAiによる相補性試験を行った。相補性試験は完了しておらず、原因遺伝子の特定には至っていない。しかし、候補領域には、ハバタキにのみ挿入された遺伝子が存在していた。この遺伝子は、未熟種子を用いた発現解析で、ハバタキ型の系統を高温で登熟させたときにのみ発現し、平温での発現はほとんど無かった。したがって、高温での登熟で、この遺伝子の発現が白未熟粒の発生を抑えている可能性が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Identification of the causing gene for the QTL on chromosome 3, qtTW3-2, that is responsible for reducing the occurrence of white immature grains under high-temperature ripening conditions in the Habataki allele was performed. Complementation experiments were also performed using RNAi constructs of candidate genes, which were not completed until now. However, there is a new gene that is inserted only in Habataki within the candidate region. The expression of this gene at the immature stage of grains occurred only under high temperature ripening, but not under normal temperature ripening, only in the Habataki allele segregant. Therefore, it is highly possible that the expression of this new gene is working to suppress the occurrence of white immature grains under high-temperature ripening.

研究分野：イネの収量・品質に関する遺伝子・QTLの解析

キーワード：高温登熟 QTL 白未熟粒 イネ(Oryza sativa L.)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、夏期の気温が高温である年が増加しており、水稻の栽培にも深刻な影響を及ぼしている。特に、登熟期に高温になると、胚乳が白く濁るいわゆる白未熟粒の発生が頻発し、出荷米の等級落ちや収量減少、食味の低下等が起こるため、改善が求められている。

(2) そのための方策として、栽培時期の移動等の耕種的開発がなされており、筆者らも深水栽培の開発等を通して栽培法の改善を行なって来た。これに加えて、高温に強い系統の作出等の育種的解決法が必要であり、高温登熟耐性に関与した遺伝子・QTL の特定が求められる。

### 2. 研究の目的

(1) 前回の課題(24580030)で、インド型イネのハバタキが高温での登熟に強くて白未熟粒の発生が少なく、その第3染色体短腕側に、ハバタキ型で高温耐性を向上させる QTL が座上することを、ハバタキ-ササニシキの染色体置換系統を用いて明らかにした。

(2) 本研究では、この高温耐性 QTL の座上範囲を狭めて、マップベースクローニングにより、原因遺伝子を特定し、どのようなメカニズムで高温耐性が発動されるのかを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 日本型イネ品種ササニシキ、インド型イネ品種ハバタキ、およびササニシキの染色体中にハバタキの染色体の一部が挿入された染色体部分置換系統(Ando et al 2008)のうち、第3染色体にハバタキ型領域を持つ SL418 系統にササニシキを戻し交配し、その後代を用いて、登熟時の高温に対する耐性を評価した。

(2) この SL418 は本来、第5染色体の領域がハバタキ型に置換された系統であるが、その他にも第3染色体と第9染色体にもハバタキ領域が存在している。これらの領域の効果を調べた結果、第3染色体のハバタキ型領域が高温耐性の効果を持つことが明らかになったことから、交配後代のうち第3染色体のみがヘテロ型に置換され、他の染色体領域はササニシキ型の系統(SL418SaH3)を用いて、染色体相互乗換えを起こしてヘテロ領域が狭まった系統を見出し、次世代での分離系統を用いて高温耐性を評価した。

(3) 分離系統並びにヘテロ系統は、北陸研究センター(37°7'N, 138°16'E)の圃場で栽培した。圃場に穂首より上をビニルで覆ったビニルハウスを設置して高温処理を行い、これを処理をしていない平温栽培と比較した。

(4) 温度反応を詳しくみる場合、あるいは冬

場に検証試験を行う場合には、グロースチャンパー(小糸工業, 農業気象実験施設, 製造番号 K31-6389)において温度制御を行い、メタルハイドランプによる人工光により栽培した。

(5) 収穫後、玄米の外観品質を、静岡製機 ES-1000 穀粒判別器により測定した。乳白粒、背腹白粒、基部未熟粒、死米を合計したものを総白未熟粒とした。

(6) QTL 解析は、QTL Cartographer 2.5 (Wang et al 2012)により行った。また、統計解析は、農林水産研究情報総合センターのシステムを利用して SAS Ver.9.4 により行った。

(7) 絞りこまれた範囲に存在する候補遺伝子について、RNAi による発現抑制コンストラクトを作成し、ササニシキ背景にハバタキ型高温耐性領域が狭い範囲で導入された準同質遺伝子系統に導入して再分化個体を得、隔離温室内で栽培した (Kuroda et al. 2010)。T1 世代で導入遺伝子の検定を行い、遺伝子が導入されていないヌル個体と導入遺伝子がホモで導入されたホモ個体から採種された T2 世代種子を得た。これを、高温(34 /29 12h 日長)並びに平温(27 /25 12h 日長)の組換え温室で栽培し種子を得て品質の検定を行った。一部の遺伝子については、過剰発現コンストラクトを作成し、ササニシキに導入して、T2 世代を同様に高温と平温で栽培し品質の検定を行った。

(8) 高温耐性領域がハバタキ型とササニシキ型に分離した準同質遺伝子系統を、グロースチャンパーで高温条件(32 /27 :昼温/夜温、12時間日長)および平温条件(27 /22 , 以下同)で栽培し、受精後約5日のもみ殻を除いた種子から RNA を採取し、次世代シーケンサーにより RNA シーケンスを行って、遺伝子の発現量を調査した。

### 4. 研究成果

(1) QTL 解析については、前課題(24580030)で得られた結果を検証すると共に、QTL の座乗範囲の絞り込みを行った。第3染色体の約 1.26Mbp にある RM14314 近辺にハバタキ型で総白未熟粒発生を増やす QTL(*qTW3-1*)が、また、約 8.6Mbp にある RM14702 近辺にハバタキ型で総白未熟粒発生を減少させる QTL(*qTW3-2*)が見出された。整粒割合については、RM14314 近辺にハバタキ型で整粒割合を減少させる QTL(*qRG3-1*)が見つかり、また、約 6.9Mbp の RM3766 近辺にハバタキ型で整粒割合を増加させる QTL(*qRG3-2*)が見つかった。白未熟粒割合が増えると、整粒割合は減少するので、両者は同位置に逆向きの QTL として現れる可能性が高い。実際 *qTW3-1* と *qRG3-1* は、同位置に逆向きの QTL として検出された。また、この2つは、

高温処理による影響を受けないことから、温度感受性が無いと考えられ、高温耐性とは関係が無い玄米品質に関する QTL(ハバタキ型で品質が低下)と考えられる(Terao and Hirose 2018)。しかしながら、*qTW3-2* と *qRG3-2* は、約 8.6Mbp と約 6.9Mbp という異なる領域に検出された。これは、*qTW3-2* により白未熟粒が減少しても、粒が細くなるやせ粒が増えること、および *qRG3-2* では、胴割れ粒が減少することにより、白未熟粒減少の効果が整粒割合の増加に結び付かないためと考えられる(Terao and Hirose 2018)。この *qTW3-2* と *qRG3-2* は、ハバタキ型で白未熟粒が減少し、整粒割合が増加するのだが、この効果は、高温下での登熟により増加した。これは、これらの QTL がササニシキ型の場合には、高温での白未熟粒増加や整粒割合の減少が大きいが、ハバタキ型に変わると、白未熟粒の増加割合がわずかになり、また整粒割合もわずかしか減少しないため、高温でのダメージが減少するからである(Terao and Hirose 2018)。

(2) このうち、白未熟粒発生の QTL である *qTW3-2* の詳細を検討した。*qTW3-2* は、乳白粒、基白粒、背腹白粒、死米の合計であるが、これら 4 種の白未熟粒のうち、どれが主要因であるかを、2015 年に検討した(図 1)。その結果、*qTW3-2* は、8.2Mbp 近辺に検出され、乳白粒が主な要因であり、基白、死米にも同位置にピークが認められたが、背腹白の影響はほとんど無かった。この割合は年次によって変化し、2010 年の結果では、背腹白も重要な貢献をしていたが(Terao and Hirose 2018)、乳白粒が主要因であり、環境要因により、穀粒判別機の判定基準を超えて変動するものと思われる。

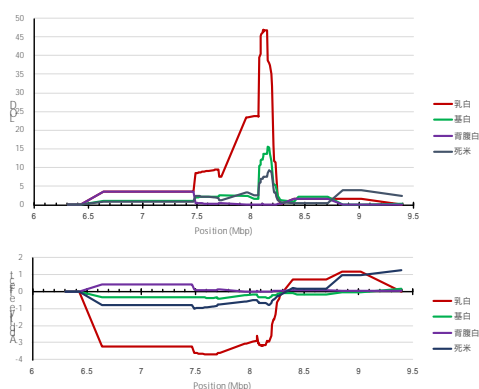


図 1 : *qTW3-2* を構成する 4 種の白未熟粒の内訳。

(3) *qTW3-2* は、やせ粒の QTL である *qNG3* と密接に関係していたため、その関係を調べた(図 2)。その結果、玄米の粒長と粒幅を決める QTL は別に存在すると考えられる。粒長を決める QTL は、7.5~8Mbp に座乗する

と考えられ、やせ粒の QTL と似た位置に存在することから、これが *qNG3* に影響すると考えられる。粒幅の QTL は *qTW3-2* と同位置である 8.2Mbp 近辺に検出され、これは粒の長幅比の QTL と重なっていた。したがって、粒幅の QTL を *qTW3-2* から分離することは困難と思われる。これら両 QTL はハバタキ型で粒長を増加させ、粒幅を減少させるため、どちらも粒を細長くする効果がある。しかし、両 QTL を共にハバタキ型で持つ系統でも、粒の長粒化の傾向はわずかであり、既存の日本型品種の長幅比の変動範囲内にあり(Terao and Hirose 2018)、粒幅の QTL 片方の効果だけであれば、影響はより小さくなることから、事実上問題無いと思われる。

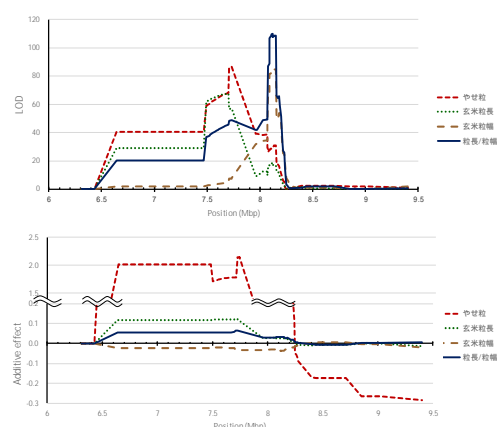


図 2 : やせ粒を構成する玄米の粒長と粒幅の関係。

(4) この *qTW3-2* の存在位置を調べた結果、*C3HT1*、*C3HT2*、*C3HT3*、*C3HT4* の 4 遺伝子が候補として挙がった。しかし、候補遺伝子領域がハバタキ型とササニシキ型に分離した系統をグロースチャンパーにより、高温(32 /27 )と平温(27 /22 )で登熟させ、受精後 5 日目の未熟種子での遺伝子発現を RNA シーケンスにより調べた結果、遺伝子型や温度処理によって明瞭に発現変動する遺伝子は見出せなかった(図 3)。



図 3 : RNA シーケンスによるハバタキ型およびササニシキ型系統の受精後 5 日目の未熟種子での遺伝子発現。

(5) 日本晴では、*C3HT3*と*C3HT4*の2つの候補遺伝子の間は約 15.6kbp 離れていたが、この距離はササニシキでは約 3.6kbp に縮まっており、八バタキでは約 6kbp に広がっていた。特に、135206-1.9と135206-1.95と名付けた2つのマーカーの間は、日本晴、ササニシキ共に約 600bp であったが、八バタキではこの間が約 6kbp に広がっており、遺伝子の挿入が疑われた。そこで八バタキのこの領域のシーケンスを行った結果、Zinc finger 遺伝子との関係が疑われる遺伝子 *C3HT5* が挿入されていた(図4)。*C3HT5*と類似構造を持つ遺伝子と思われる領域は、日本晴では第3染色体と第5染色体に存在したが、どちらも発現量は微量である。

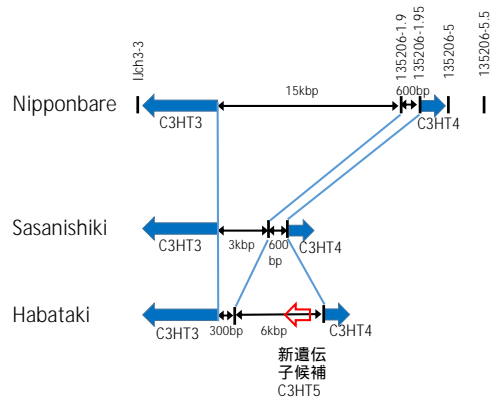


図4：日本晴、ササニシキ、八バタキの高温耐性候補遺伝子の配置。

(6) 八バタキおよびササニシキの *C3HT5* 遺伝子の発現が日本晴を基準とした発現遺伝子の解析では、これら2つの遺伝子領域に間違えて張り付けられている可能性があるため、その遺伝子の発現量を調査した。その結果、両遺伝子共に、ササニシキ型では、温度処理に関わらず、ほとんど発現していなかつ

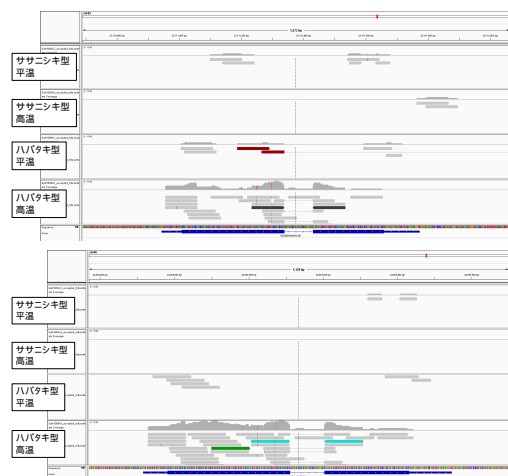


図5：八バタキ型およびササニシキ型系統を高温および平温で育てた場合の *C3HT5* 遺伝子の発現。

た(図5)。これに対して、八バタキ型系統では、平温で登熟した場合には、ササニシキ型と同じく、ほとんど発現が無かったが、高温登熟下では、発現量が大きく増加した(図5)。また、シーケンス内の SNP の違いにより、高温での八バタキ型系統で発現増加したのは、*C3HT5* 遺伝子であり、これら2領域に間違えて張り付けられたことが明らかになった。遺伝子発現が、八バタキ型で高温条件下での登熟でのみ上昇したことから、*C3HT5* が高温登熟耐性の原因遺伝子である可能性が高い。

(7) これらの候補遺伝子の影響を調べるために、*C3HT2*、*C3HT3*、*C3HT4*、*C3HT5* の4遺伝子について、RNAiのコンストラクトを作成し、ササニシキ背景で *qTW3-2* の候補遺伝子周辺のみが八バタキ型に変化した準同質遺伝子系統に導入して、これら4遺伝子の発現を抑制した遺伝子組換え系統を作成した。T1世代の植物から採種したT2世代の種子の品質を調べた限りでは、平温で登熟した種子では、どの遺伝子を発現抑制しても、白未熟粒になった粒は無く、候補遺伝子を絞り込むことはできなかった。現在、T2世代で、導入遺伝子が分離して、導入遺伝子ホモとなった系統と導入遺伝子が抜け落ちたヌル系統を用いて、高温と平温で登熟させており、今後遺伝子発現抑制と白未熟粒発生の影響を調べる予定であるが、結論は出ていない。

(8) *C3HT5* 遺伝子は、発現解析から原因遺伝子である可能性が高いため、この遺伝子については、35Sプロモーターによる発現増加の組換え体も作成した。こちらも現在T2世代を栽培中であり、結論は出ていない。

(9) *qTW3-2* の効果として、ササニシキ型では高温に弱い、*qTW3-2* が八バタキ型になると、高温に耐えられるようになる。このことは、ササニシキ型では、高温になると何らかの機能が失われるが、八バタキ型では、その機能が高温でも失われにくい可能性を示している。RNA シーケンスにより、ササニシキ型では高温で発現量が1/2以下に減少するが、八バタキ型では発現量の減少が少なく、その結果、高温でササニシキ型に比べて八バタキ型での発現が2倍以上に高まった遺伝子を調べると(平温で既に2倍以上のものを除く)、41遺伝子あり、これらの遺伝子のどれかが、高温下での機能低下を補っている可能性がある。このうち11遺伝子は、熱ショックタンパク質であり、八バタキ型での高温での登熟機能を保護している可能性も考えられる。*qTW3-2* が八バタキ型になることにより、高温下でも遺伝子機能の低下が起きにくくなり、その結果デンプン合成が順調に進むことにより、白未熟粒の発生が抑制されるのではないかと考えている。



表1: ササニシキ型で、高温で発現量が1/2以下に減少し、高温でササニシキ型に比べてハバタキ型での発現が2倍以上に高まった遺伝子。緑の網掛けは熱ショックタンパク質。

transcript	description	Chromosome
Os01t0178850-00	Similar to predicted protein.	chr01
Os01t0268800-01	Ubiquitin-associated/translocation elongation factor EF1B, N-terminus, eukaryote domain containing protein.	chr01
Os01t0367100-01	NAD(P)-binding domain containing protein.	chr01
Os01t0600300-01	Conserved hypothetical protein.	chr01
Os01t0840100-01	Heat shock protein Hsp70 family protein.	chr01
Os01t0958100-02	Similar to chloroplast srp54 receptor1.	chr01
Os02t0115900-02	Endosperm lumenal binding protein.	chr02
Os02t0491400-01	Similar to Peptidylprolyl isomerase.	chr02
Os02t0550900-01	FAR1 DNA binding domain domain containing protein.	chr02
Os02t0758000-01	Similar to Low molecular weight heat shock protein precursor (Mitochondrial small heat shock protein 22).	chr02
Os03t0266300-01	Class 1 low-molecular-weight heat shock protein 17.9.	chr03
Os03t0266900-02	Low molecular mass heat shock protein Oshsp17.3.	chr03
Os03t0276500-01	Similar to Heat shock protein 70.	chr03
Os03t0293000-01	Similar to DnaJ domain containing protein, expressed.	chr03
Os03t0387900-01	Conserved hypothetical protein.	chr03
Os03t0659200-03	Similar to ferredoxin.	chr03
Os03t0728100-01	Heat shock protein DnaJ, N-terminal domain containing protein.	chr03
Os04t0352400-01	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type domain containing protein.	chr04
Os04t0396800-02	Similar to serine carboxypeptidase K10B2.2.	chr04
Os04t0576800-02	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase, C-terminal domain containing protein.	chr04
Os05t0150900-01	Histidyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.21) (Histidine--tRNA ligase) (HisRS).	chr05
Os05t0156401-00	Hypothetical gene.	chr05
Os05t0156500-01	Similar to Apobec-1 binding protein 2.	chr05
Os05t0407100-01	Four F5 protein family protein.	chr05
Os05t0460000-01	Similar to 70 kDa heat shock cognate protein 1.	chr05
Os05t0542500-02	LEA-like protein.	chr05
Os06t0191300-02	Similar to Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (Fragment).	chr06
Os06t0593100-01	Similar to UDP-galactose/UDP-glucose transporter.	chr06
Os06t0716700-02	Similar to Heat shock protein 90.	chr06
Os07t0424400-01	Similar to Cellulose synthase-7.	chr07
Os07t0486500-01	RhoGAP domain containing protein.	chr07
Os07t0633200-02	Similar to SC35-like splicing factor SCL30a, 30a kD.	chr07
Os07t0661450-00	Similar to predicted protein.	chr07
Os07t0694700-01	L-ascorbate peroxidase.	chr07
Os08t0278900-01	MIR domain containing protein.	chr08
Os08t0500700-01	Similar to Heat shock protein 82.	chr08
Os08t0525600-01	Similar to Peptidylprolyl isomerase%3B FK506-binding protein.	chr08
Os09t0275300-00	Conserved hypothetical protein.	chr09
Os09t0526600-02	Similar to Heat shock factor protein 3 (HSF 3) (Heat shock transcription factor 3) (HSTF 3).	chr09
Os10t0456400-02	Conserved hypothetical protein.	chr10
Os11t0246950-00	Hypothetical protein.	chr11

(10) 以上の結果、ハバタキ型で高温下での登熟に強くなる QTL *qTW3-2* の原因遺伝子の絞り込みはできたが、原因遺伝子の特定には至らなかった。しかし、ハバタキ型で、高温で登熟したときのみ発現量が増加する、ハバタキ型にのみ挿入された遺伝子 *C3HT5* が見つかри、これが原因遺伝子である可能性が高い。

#### <引用文献>

Ando T, Yamamoto T, Shimizu T, Ma XF, Shomura A, Takeuchi Y, Lin SY, Yano M. (2008) Genetic dissection and pyramiding of quantitative traits for panicle architecture by using chromosomal segment substitution lines in rice. *Theor. Appl. Genet.* 116: 81-890.

Hirose T, Terao T. (2004) A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 220: 9-16. DOI 10.1007/s00425-004-1314-6

Kuroda M, Kimizu M, Mikami C. (2010) A simple set of plasmids for the production on transgenic plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 2348-2351. doi: 10.1271/bbb.100465

Wang S, Basten CJ, Zeng Z-B. (2012) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Terao T., T. Hirose (2018) Temperature-dependent QTLs in *indica* alleles for improving grain quality in rice: increased prominence of QTLs responsible for reduced chalkiness under high-temperature conditions. *Molecul. Breed.* 38:52. (査読有) doi:10.1007/s11032-018-0807-0

Chiba M., T. Terao, H. Watanabe, O. Matsumura, Y. Takahashi (2017) Improvement in rice grain quality by deep-flood irrigation and its underlying mechanisms. *JARQ* 51(2): 107-116. (査読有)

Terao T., M. Chiba (2016) An Improved Open-Top Chamber with Solar-Heated Double Funnel That Can Adapt to All Wind Directions for Simulating Future Global Warming Conditions in Rice Paddy Fields. *Agricultural Sci.* 7(10): 716-731. (査読有) doi:10.4236/as.2016.710067

Chiba M., T. Terao (2015) Improvement in high-temperature treatments using solar radiation for heat tolerance screening under unstable wind condition. *Plant Prod. Sci.* 18(3): 414-420. (査読有) doi: 10.1626/pp.s.18.414

Tsukahara K., H. Sawada, Y. Kohno, M. Takakazu, I. C. Mori, T. Terao, M. Ioki, T. Tamaoki (2015) Ozone-induced rice grain yield loss is triggered via a change in panicle morphology that is controlled by ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1 gene. *PLOS ONE* 10(4) (査読有) doi:10.1371/journal.pone.0123308

[学会発表](計1件)

細野 達夫, 寺尾 富夫. 局地風を利用したパッシブ TGC の可能性を探る予備的調査. 日本農業気象学会北陸支部大会 2016 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺尾 富夫 (TERAO, Tomio)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合  
研究機構・中央農業研究センター・グルー  
プ長  
研究者番号：80355578

### (2) 連携研究者

廣瀬 竜郎 (HIROSE, Tatsuro)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合  
研究機構・中央農業研究センター・上級研  
究員  
研究者番号：90355579