

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18627

研究課題名(和文) イネの籾数増加に関する新規対立遺伝子の創出と相互作用の解明

研究課題名(英文) Development for new alleles of increasing spikelet number in rice

研究代表者

藤田 大輔 (Fujita, Daisuke)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：80721274

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)：本研究は、以下の3つの研究目的から構成されている。  
(1) SPIKE遺伝子座の原因変異の特定と機能解析を行う為に、栽培イネ内(日本型、インド型、熱帯日本型)のSPIKE遺伝子座の変異を明らかにし、機能に關与する原因変異を推定した。(2) 複数のSPIKE遺伝子がIR64へ導入された形質転換が、籾数増加を示す傾向があり、コピー数と籾数や葉の幅の間には正の相関がみられた。  
(3) SPIKE遺伝子座と他の籾数増加に関する遺伝子座との相互作用を解明するため、IR24-SPIKEの個体の選抜を行った。

研究成果の概要(英文)：Grain yield in rice is determined by the balance of four factors, Spikelet number, grain fertility, grain weight, and panicle number. SPIKELET NUMBER (SPIKE) is a gene identified from tropical japonica rice landrace which is identical to NARROW LEAF1 (NAL1) gene and enhance the grain productivity of indica cultivars through pleiotropic effect such as increasing leaf width and spikelet number. However, the outcomes of different alleles of NAL1 from different cultivars are not easily predicted and gene function for SPIKE was not fully understood. In this study, the genomic region of NAL1 was sequenced from the 78 accession and the maximum likelihood tree was estimated. The predicted cDNA sequences were classified into 5 types according to their predicted. This study can reveal that the Arg493Asp substitution located on 3rd exon have the main effect of FLW enhancement. We analyzed transgenic plants with different copy number and there is relationship between copy number and leaf width.

研究分野：植物育種学

キーワード：イネ 籾数 多様性

1. 研究開始当初の背景

イネ (*Oryza sativa* L.) は、世界人口の約半数が主食としている主要な作物である。米の全世界生産量約 6 億トンのうち、90%以上がアジアにおいて生産・消費されており、多くのアジア諸国において基幹作物となっている。しかしながら、発展途上国における急激な人口増加と、経済発展による耕地面積の減少により、2035 年までに、イネの生産量を約 26%増加する必要がある。これまでに、多収性イネ品種が保有する収量構成要素 ( 籾数・籾重・穂数・稔実 ) に関する遺伝子座が特定されており、籾数が増加する遺伝子 *Gn1a* ( Ashikari et al. 2005, Science 309:741-745 ) *WFP* ( Miura et al. 2010, Nat Genet 42:545-549 ) などの遺伝子座が単離されている。しかしながら、インド型品種の収量性の改良に関わる遺伝子は、ほとんど報告されていない。また、籾数増加に関わる主要な遺伝子座間の相互作用に関しては、明らかにされていない。

熱帯地域に適したインド型イネ品種の育種素材の開発を目指し、これらの地域で広く栽培されているインド型品種 IR64 を遺伝的背景にもち、熱帯日本型品種の特性が導入された NPT 品種由来の染色体断片導入系統群を育成した。育成した系統は熱帯日本型から引き継がれた形態特性を保有しており、特に 1 穂籾数が増加した系統について解析した。高精度連鎖解析と形質転換により、籾数の増加に関わる遺伝子 (*SPIKE*) を特定した。*SPIKE* を IR64 に導入した近似同質遺伝子系統 ( NIL-*SPIKE* ) を作出し、単位面積あたりの収量が約 13-36%増加することを明らかにした。だが、*SPIKE* の原因変異や詳細な機能に関しては解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、イネの籾数増加に関する *SPIKE* 遺伝子座の原因変異を特定すると共に、形質転換作出などにより、自然変異を超える籾数増加の効果がある新規対立遺伝子座の創出を試みる。また、*SPIKE* と他の籾数増加に関わる遺伝子座の相互作用を解明する為、集積系統を作出し評価する。本研究により、*SPIKE* の機能解明を進めると共に、栽培イネの多様性を解明する。また、更なる籾数増加の効果がある *SPIKE* 新規対立遺伝子座を創出すると共に、籾数増加の遺伝子座の集積系統を作出し、イネの収量性の改良を目指す。

3. 研究の方法

インド型イネ品種の収量増加に関わる遺伝

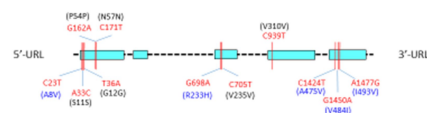
子 *SPIKE* の原因変異を特定する為に、

( 1 ) 在来イネ品種における *SPIKE* 遺伝子座の塩基配列を網羅的に解読し、塩基配列の比較から原因変異を推定する。また、トランスクリプトーム解析を行い、相互作用のある遺伝子座を網羅的に調べる。さらに、( 2 ) 形質転換により、*SPIKE* の塩基配列を一部改変した植物体を作成し、更に籾数が増加する新規対立遺伝子座を創出する。そして、( 3 ) *SPIKE* と他の籾数増加に関連する遺伝子座との相互作用を明らかにする為、交雑育種により、籾数増加に関する遺伝子が集積された系統を作出する。

4. 研究成果

本研究は、以下の 3 つの研究目的から構成されている。( 1 ) 籾数増加に関わる *SPIKE* の原因変異の特定と機能解明を行う。( 2 ) 自然変異を超える新規対立遺伝子の創出を目指す ( 3 ) 他の籾数増加に関わる遺伝子と *SPIKE* の相互作用を解明する。

( 1 ) *SPIKE* 遺伝子座の原因変異の特定と機能解明を行う為に、87 品種の *SPIKE* 遺伝子座の領域を PCR で増幅し、シーケンサーにより塩基配列を解読した。栽培イネ内 ( 日本型、インド型、熱帯日本型 ) の *SPIKE* 遺伝子座の変異を明らかにし、機能に関与する原因変異を推定した ( 図 1 )。推定した原因変異の領域は、アミノ酸置換に関わっており、このアミノ酸置換は葉の幅との間に相関がみられた ( 図 2 )。 *SPIKE* は、葉の大きさを制御する *NAL1* と同座であり、遺伝子の多面的な効果の一部であると考えられる。



Type	SNP position in exon region (bp)										N	
	23	33	36	162	171	698	705	939	1424	1450		1477
IR lind	C	A	T	G	C	G	C	C	C	G	A	41
A	C	A	A	A	C	G	C	C	C	G	A	5
B	C	A	T	G	C	G	T	C	C	G	A	1
C	T	A	A	G	C	G	C	T	C	G	A	1
D	C	C	T	G	C	A	C	C	T	A	A	7
E	C	C	T	G	C	A	C	C	T	A	G	18
	C	A	T	G	C	A	C	C	T	A	G	2

図 1 . 87 品種の *SPIKE* のアミノ酸配列比較

さらに、3000 品種の塩基配列と表現型のデータ (<http://snp-seek.irri.org/>) を用いて、*SPIKE* の塩基配列を確認し原因変異部分や他のアミノ酸置換ごとにハプロタイプを分類したところ、大きく 2 つのグループに分類された。2 つのグループは、大きく分けてインド型品種と、日本型・熱帯日本型の品種群に

分けられた。近年発表された論文において、形質転換体を用いて、*NAL1*の同じアミノ酸置換が原因変異であることを証明しており、それらの研究結果と同様の結果が得られた。そのため、レトロトランスポゾンとプロモーター領域に関しては、関連性が低いと推定された。

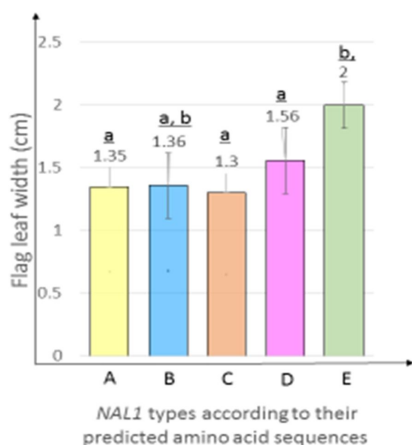


図2 . アミノ酸配列と止葉長の比較

(2) 複数の *SPIKE* 遺伝子のコピーが IR64 へ導入された形質転換が、籾数増加を示す傾向があることから、それらの作出された個体に関する農業形質の調査と解析を網羅的に行った。サザンブロッティングと半定量的 RT-PCR の結果、*SPIKE* 遺伝子のコピー数が増加するにつれて、遺伝子の発現量は増加する傾向にあり、コピー数と籾数や葉の幅の間には正の相関がみられた。また、複数の遺伝子が導入された形質転換体を用いて、農業形質が向上する原因について解析を行った。複数の *SPIKE* 遺伝子が導入された植物体では、植物体あたりの籾重がコントロールの植物体と比較して増加していた。これらは、*SPIKE* により通常は穂数が減少するが、穂数があまり減少せず、籾数の増加が顕著にみられたためであると推定された。

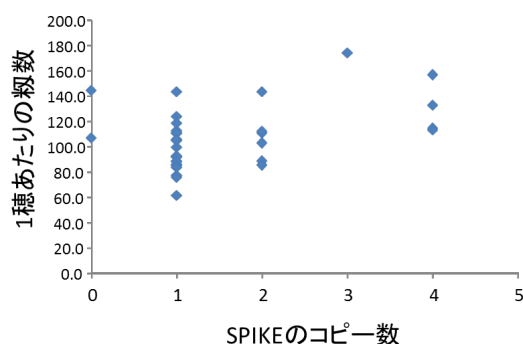


図3 . 形質転換体のコピー数と籾数の関係

(3) *SPIKE* 遺伝子座と他の籾数増加に関する遺伝子座との相互作用を解明するため、まず IR24-*SPIKE* の農業形質への効果を評価した。用いた実験材料の農業形質( 籾長、穂長、葉身長、葉身幅、穂数、1穂あたり籾数 ) の評価を行ったが IR24 と同じ特色を持っていた。そのため、SSR マーカー を用いて遺伝子型の調査を行った所、*SPIKE* 遺伝子の領域に、日本型品種あそみのりの染色体断片が導入されていないことが確認されたため、交雑集団の作出を進めた。

## 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 )

Z. Demeter, T. Ishimaru, N. Kobayashi, D. Fujita, Allelic diversity of *NAL1* on local varieties in *Oryza sativa* L. 7<sup>th</sup> International Crop Science Congress, China, August 2016

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

藤田 大輔 (FUJITA, Daisuke)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：80721274

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

石丸 努 (ISHIMARU, Tsutomu)

Inez Hortense Slamet-Loedin