

平成 21 年 6 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18310136

研究課題名（和文）イネゲノム DNA 変異の大規模解析

研究課題名（英文）Large-scale DNA polymorphisms study of rice

研究代表者

寺内 良平 (TERAUCHI RYOHEI)

財団法人岩手生物工学研究センター・生命科学研究所・研究部長

研究者番号：50236981

研究成果の概要：イネゲノム DNA 変異の大規模解析を実施した。イネ染色体上の 22 箇所の領域、計 26kb の DNA 配列を、栽培イネ *Oryza sativa* とその近縁野生種の 30 系統について決定した。DNA 変異の系統解析の結果、日本型イネとインド型イネは、野生種 *O. rufipogon* から独立に起原したことが明らかになった。さらに、品種「ひとめぼれ」において、5000 系統の突然変異系統群を作出した。「ササニシキ」突然変異系統を用いて、いもち病菌真性抵抗性遺伝子 *Pia* を同定した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2007 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学、応用ゲノム科学

キーワード：遺伝学、ゲノム、植物、進化、育種学

## 1. 研究開始当初の背景

イネは、人類にとって最も重要な農作物の一つである。2002年に、イネゲノムのほぼ全体の塩基配列が決定された。その結果、イネゲノムは約 5 億個の塩基と、3 万 - 5 万個の遺伝子を含むことが明らかになった。この限られた数の遺伝子とその調節領域の変異によって、多くのイネ品種の形態・生理・生態的な多様性が生じている。従って、イネのポストゲノム研究の展開方向の一点は、各遺伝子の変異とそれを保有する個

体の表現型を関連づける「機能ゲノム学」であり、本研究では、その基盤整備を実施した。

## 2. 研究の目的

(1) 優良イネ品種に突然変異処理を施した後、興味のある遺伝子に突然変異が入った系統を迅速に選抜して形質評価する逆遺伝学手法の実験系を確立する。

(2) 上記突然変異処理により育種上重要な形質に変異が生じた系統を選抜し、迅速に

マップベースドクローニングにより原因遺伝子を同定する。

(3)多数の栽培および野生イネ品種を用いて、形質調査するとともに22遺伝子座のDNA変異解析を実施し、連鎖不平衡マッピングによって育種上重要形質と連鎖したSNPマーカーを同定する。

### 3. 研究の方法

北部日本で多く栽培されているイネ2品種(「ひとめぼれ」および「ササニシキ」)を材料として、(i) EMSによる突然変異処理を施し、各個体当たりゲノム中約1000箇所を点突然変異が入ったようなM2系統を3年間で各品種4000系統作出して、(ii) TILLING法(McMallum et al., 2000, Nat. Biotech. 18:455)を利用して、迅速に目的遺伝子に突然変異が入った系統を選別する系を確立する。これにより、イネ研究者が興味を持つ遺伝子全てについて、null alleleを含めた対立遺伝子を多数得ることが可能になり、イネ逆遺伝学および交配母本の基礎材料として活用することが可能になる。さらに、(iii)各突然変異系統の表現型を評価し、北日本におけるイネ育種にとって重要な形質である耐冷性、直播適性、いもち病抵抗性の3重要形質に変異の生じた系統を選抜する。(iv)これらの形質に変異の生じた系統を、遠縁のインド稲品種と交配し、F2世代を用いて、突然変異遺伝子のマップベースドクローニングを実施する。マッピングおよび原因遺伝子同定を迅速化するためにEcoTILLING法(Comai et al., 2004, Plant J. 37:778)を活用する。(v)さらに、アジアの栽培イネおよび近縁野生種150系統を2年にわたり圃場で栽培し、形質調査を実施する。(vi)それらの系統のゲノムDNAを材料にして、ゲノム中から均等に選んだ22遺伝子座を対象に、各2KbずつEcoTILLING法(Comai et al., 2004, Plant J. 37:778)を活用してDNA変異を調査する。形質とDNA変異の連関を解析することにより、連鎖不平衡マッピングを実施して、重要形質と密接に連鎖したSNPマーカーを開発する。

### 4. 研究成果

イネ品種「ひとめぼれ」にEMSによる突然変異処理を実施して、約1万系統のM2世代を得た。これらの内、2700系統を圃場で展開し、形質調査を実施したところ、約700系統に変異形質が確認された。これらの系統からDNAを抽出して、ゲノム上の任意の領域1kbについて、TILLING法によってDNA変異を確認したところ、1000系統あたり平均2箇所の突然変異を検出することができた。

イネ品種「ササニシキ」にEMSによる突然変異処理を施した系統のM3世代約1000系統に対

して、いもち病菌レース031を接種したところ、野生型では抵抗性を示すのに対して、感受性を示す突然変異体が3系統得られた。ササニシキは*Pia*抵抗性(R-)遺伝子を保有するが、これらの突然変異体は*Pia*の機能を欠失したと考えて、過去に*Pia*遺伝子がマップされていた領域のR-遺伝子群のDNA変異を解析したところ、2つの突然変異系統において、RGA4と名付けた遺伝子に効果の大きなDNA変異がみつかった。このRGA4が*Pia*本体であると考えて現在相補試験を進めている。

イネゲノムDNA変異の大規模解析を実施した。イネ染色体上の22箇所の領域、計26kbのDNA配列を、栽培イネ*Oryza sativa*とその近縁野生種の30アクセッションについて決定した。DNA変異の系統解析の結果、日本型イネ ssp. *japonica* とインド型イネ ssp. *indica* は、野生種*O. rufipogon*から独立に起原したことが明らかになった。栽培種の内、インド型イネは高い遺伝的変異( $\pi=0.0024$ )を含むのに対し、日本型イネは極めて低い遺伝的変異( $\pi=0.0001$ )を保有することが示された。この発見は、供試した日本型イネの祖先集団サイズが小さいことを示している。日本型イネは、インド型イネと比較して、高い割合の非同義置換を固定していることが明らかになった。これは、日本型イネの集団の有効な大きさが小さいことが原因であると考えられる。DNA塩基配列およびEcoTILLING法による解析の結果、連鎖不平衡の程度は、野生種*O. rufipogon*で約5kb、栽培種のインド型イネで、約50kbの領域にわたっていることが判明した。

### 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2件)

Rakshit, S., Rakshit, A., Matsumura, H., Takahashi, Y., Hasegawa, Y., Ito, A., Ishii, T., Miyashita, N. T., Terauchi, R. Large-scale DNA polymorphism study of *Oryza sativa* and *O. rufipogon* reveals the origin and divergence of Asian rice. (2007) Theoretical and Applied Genetics 114:731-743.

Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., Tosa, Y., Chuma, I., Takano, Y., Win, J., Kamoun, S., Terauchi, R. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*, (2009) Plant Cell in press.

[学会発表](計3件)

Terauchi, R. "Searching for effectors of Magnaporthe oryzae: a multi-faceted genomics approach". 4<sup>th</sup> International Rice Blast Conference, Oct. 9-14, 2007, Changsha, China.

Terauchi, R. "Searching for effectors of Magnaporthe oryzae: a multi-faceted genomics approach". 5<sup>th</sup> International Symposium of Rice Functional Genomics, Oct 15-17, 2007, Tsukuba, Japan.

Terauchi, R. "Genome resequencing and association genetics reveals novel Magnaporthe oryzae avirulence genes." Biotechnology Havana 2008, Dec. 2, 2008, Havana, Cuba.

[図書](計4件)

Terauchi, R., Matsumura, H., Krueger, D. H., Kahl, G. SuperSAGE: The most advanced transcriptome technology for functional genomics. (2007) In: Handbook of plant functional genomics. (Kahl, G., Meksam, K. eds) Wiley VCH. 37-54.

Sharma, P.C., Matsumura, H., Terauchi, R. Use of Serial Analysis of Gene Expression in crop Improvement. (2007) Genomics-Assisted Crop Improvement. (Varshney and Tuberosa eds) Springer. 227-243.

Terauchi, R., Win, J., Kamoun, S. et al. A multi-faceted genomics approach toward understanding Magnaporthe-rice interactions. (2008) In: Biology of Molecular Plant-Microbe Interactions. (Lorito M. ed.) Vol 6.

Rakshit, S., Kanzaki, H., Matsumura H., et al. Terauchi R. Use of TILLING for forward genetics of rice (2009) In: Handbook of plant mutation detection (Kahl, G., Meksam, K. eds) Wiley VCH. in press.

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺内 良平

財団法人岩手生物工学研究センター・生命科学部・研究部長

研究者番号： 50236981

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし