

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19380043

研究課題名(和文) ホウ素過剰耐性イネの分子育種

研究課題名(英文) Breeding of rice plants which are tolerant to boron toxicity

研究代表者

間藤 徹 (MATOH TORU)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：50157393

研究成果の概要：研究成果の概要：イネは土壌中のホウ素濃度が高いと生育障害を受ける。このホウ素過剰に対する耐性には、しかし、品種間で顕著な差がある。特に日本稲は耐性があり、インド稲には耐性がなかった。ホウ素過剰害を受けたイネは分けつ数が少なくなり、これが収量低下の理由の一つであった。また、ホウ素過剰耐性の日本稲熱研1号と感受性のインド稲IR36を交配して育成したRILを用いて、ホウ素過剰耐性に関係する遺伝子の探索を進め、その遺伝子が4番染色体に座乗することを示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
年度			
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学、土壌学

キーワード：ホウ素、ホウ素過剰、イネ

## 1. 研究開始当初の背景

ホウ素は高等植物の必須元素である。しかしながら、作物の生育に適した根圏ホウ素濃度の範囲は狭く、ホウ素過剰による作物の生育障害も発生しやすい。土壌中ではホ

ウ素は主に水溶性のホウ酸の形で存在するため、ホウ酸が集積した土壌はオーストラリア南西部、アメリカ合衆国カルフォルニア州、チリ北部、イスラエル、パキスタンなど乾燥気候下に分布し、これらの地域における穀物生産に害を与えている。また、

海水の影響を受ける沿岸地域や、灌漑水中のホウ酸濃度が高い場合にもホウ素過剰害が発生する。

## 2. 研究の目的

降雨の多いわが国では自然環境下ではホウ素過剰は発生しない。しかし朝日新聞に取り上げられたように、産業廃棄物として排出されるホウ酸が灌漑水を汚染し水稻にホウ素過剰害が見られる例が何件か知られている。記事中にみられるホウ素の排水規制については、2001年、水質汚濁防止法によって10 mg/L以下に定められた。しかし、排水処理の困難さから現在も一部の事業所については暫定的基準値 (500mg/L) が用いられている。そこでイネのホウ素過剰について検討を始めた。

## 3. 研究の方法

コムギ、オオムギ、ナタネなど多くの作物種においてホウ素過剰耐性に品種間差が存在することが知られている。乾燥気候下の主要作物であるコムギ、オオムギでは耐性品種の選抜と育種への利用が盛んである。コムギ、オオムギではホウ素過剰耐性の品種は感受性品種に比べ地上部のホウ素含有率が小さく、根におけるホウ素排除能の違いがホウ素過剰耐性の品種間差に寄与することが示唆されている。オオムギでは4H染色体上にホウ素過剰耐性に関与する主要なQTL (quantitative trait locus) が検出されているが、このQTL 遺伝子は昨年ホウ酸排出トランスポーターとして単離された。また、シロイヌナズナにおいても、ホウ酸排出トランスポーター遺伝子を過剰発現させることによってホウ素過剰耐性が

増強されることが示されている。本研究はホウ素過剰に比較的感受性が高い作物であるイネのホウ素過剰耐性を増強することを目的として1997年に耐性品種の選抜を開始した。

## 4. 研究結果

約70品種のイネを30ppm または60ppm ホウ素を添加して土耕栽培し、ホウ素過剰耐性を比較したところ、インディカ品種は一般に感受性、ジャポニカ品種は耐性であった。下の写真はホウ素濃度を変えてコシヒカリを栽培した時の収穫時の様子である。

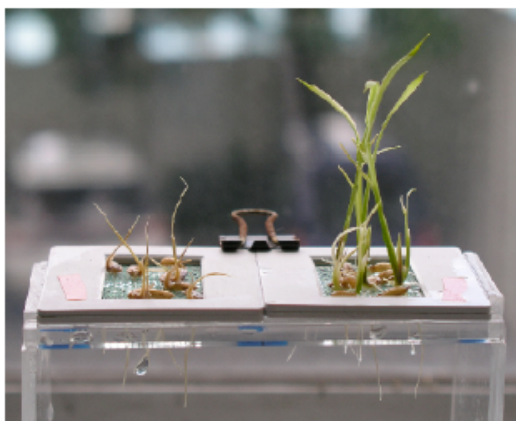


ホウ素過剰によるコシヒカリの生育障害 与えたホウ素濃度は0, 3, 10, 30 ppm. 30 ppm では分げつが低下し穂数が少ない

灌漑水のホウ素濃度が3 ppmではモミ収量はむしろ増加した。これまでイネはホウ素に感受性で1 ppm程度以上で生育が阻害されるとされていたが、10 ppmホウ素でも生育はほとんど低下しなかった。日本稲を用いた結果ではむしろホウ素を添加しないと登熟期にはホウ素欠乏を受けていることが示唆された。このような矛盾が生じた理由の一つは、これまでの試験がホウ素過剰に

感受性の高いインド稲で得られた結果をそのまま用いたためであろう。さらに生育の低下した30 ppm処理区コシヒカリの収量構成因子を分析すると、収穫の低下の大きな理由は穂数の低下、すなわち分げつの低下であり、30 ppmのホウ素過剰は穎花数、登熟歩合、千粒重にはほとんど影響しなかった。つまりイネはホウ素過剰に対し、生育初期の分げつ期の感受性が高く、開花結実にはあまり影響しないことが示された。現場でのホウ素過剰対策に示唆を与えるものである。

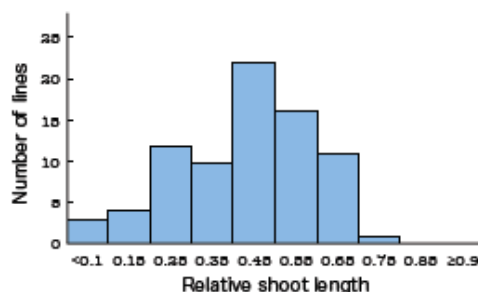
そこでイネ幼植物を用いてホウ素過剰に対する感受性の検討を進めた。下の写真は日本稲熱研1号(右)とインド稲IR36(左)を60 ppmのホウ素を含む培養液で1週間栽培した時の様子である。



60ppmのホウ素を含む培養液で栽培したホウ素過剰に感受性のIR36(インディカ種左)と耐性の熱研1号(ジャポニカ種右)

熱研1号は生育量は低下するものの生存したのに対しIR36はほとんど枯死した。そこでこれらの品種から、京都大学育種学研究室によって作出された熱研1号とIR36の交雑に由来する組換え自殖系統群(RIL)を用いて、ホウ素過剰耐性の品種間差に寄与する染色体領域を同定するためQTL解析を行った。ホウ素過剰耐性の指標値として、

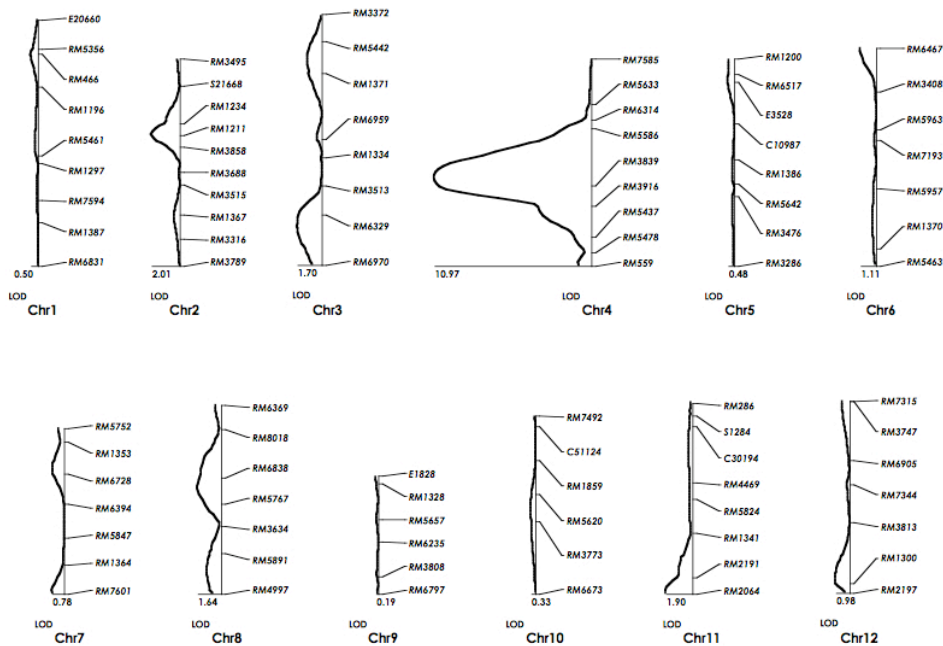
60ppmホウ素を与えて播種後7日間栽培したイネの地上部の長さをホウ素を与えていない対照区での地上部の長さで除した値(RSL: relative shoot length)を用いた。



熱研1号とIR36のRIL98系統のホウ素過剰耐性の度数分布 熱研1号のRSL値は0.47、IR36のRSL値は0.15であった

上の図はRILの相対地上部長の度数分布を示した。親品種の値に対しRILの値が広く分布していた。相対地上部長とそれぞれのRILの遺伝子型について解析したところ、4番染色体上に寄与率45%の大きな効果をもつQTLが検出された(下図)。

そこで、この4番染色体上に検出されたQTL遺伝子BET1(boron excess tolerant 1)の単離をマップベースドクローニングの手法を用いて進めた。これまでに、約25,000個体から候補領域内に組換えのある個体の選抜を行い、選抜された個体の自殖種子を採種し、そのホウ素過剰耐性を検定した。この結果、遺伝子座乗の候補領域は約49 kbpに絞り込まれた。データベース上ではこの領域内に8つの遺伝子の存在が予測されているが、この中にはホウ酸トランスポーター遺伝子は存在しない。IR36と熱研1号の候補領域におけるDNA配列には多型部位が数多く存在するため、原因遺伝子を特定することはできなかった。



そこで次に、DNA 配列の相同性が高いジャポニカ品種同士について、ホウ素過剰耐性程度とDNA 配列の比較検討を行った。この検討には農業生物資源研ジーンバンクから分譲を受けた日本在来イネコアコレクションの44 品種を用いた。ジャポニカ品種の中にも感受性の品種が存在し、ホウ素過剰耐性の指標値RSL は0.05 から0.45まで幅広い分布を示した。さらに、BET1座乗候補領域内のDNA 配列を網羅的に比較したところ、遺伝子型とRSL 値の大きさがよく一致するDNA 多型部位が4 カ所存在した(未発表)。この、4 カ所のDNA多型の内、ORF 配列内に存在する多型は1カ所のみであった。そこで、このDNA 多型をもつ遺伝子をBET1 の有力な候補遺伝子であると考えた。

申請者らはこれまでに、イネのホウ素過剰耐性の品種間差に関与する遺伝子BET1が4 番染色体に座乗することをQTL 解析手法によって明らかにした。詳細なマッピングによってBET1 座乗の候補領域は約49 kbp に絞り込まれた。この領域内にはデータベース上で8 つの遺伝子が存在するが、44 品種のジャポニカ稲の候補領域のDNA配列とホウ素過剰耐性の比較によって、候補遺伝子は1 つに絞られた。この候補遺伝子がBET1 と同一であることを形質転換イネを作出して確認する。

配列情報の検討から、この候補遺伝子は感受性品種で機能型の配列を持ち、ホウ素過剰耐性品種においてナンセンス変異によって機能欠損していることが示唆された。

そこで、次の(1)及び(2)の形質転換体を作成する。

(1)感受性系統SL18 の候補遺伝子の発現をRNAi 法で抑制した形質転換体

(2)耐性品種日本晴に機能型の感受性品種の候補遺伝子を35Sプロモーターで過剰発現させた形質転換体

(1)の材料となるSL18 はイネゲノムリソースセンターより分譲を受けた日本晴とカサラスに由来する染色体部分置換系統である。遺伝的背景は日本晴であるが、4番染色体のQTL 領域がカサラス断片に置換され、ホウ素過剰に著しく感受性である。イネの形質転換効率は品種によって著しく異なり、確立されている形質転換方法は日本晴を材料に用いることを前提としている。QTL マッピングに用いてきた熱研1号やIR36 では形質転換効率が低いと予測されるため、SL18 と日本晴を形質転換の材料とする。(1)ではバイナリーベクターとしてpANDA、(2)ではpGWB502 $\Omega$  を用いアグロバクテリウム法による形質転換を行う。

#### 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)

K. Ochiai, S. Uemura, A. Shimizu, Y. Okumoto and T. Match Boron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.).I. Quantitative trait locus (QTL) analysis of tolerance of boron toxicity. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 125-133 (2008) 査読あり

[学会発表] (計1件)

落合久美子、清水彰史、奥本裕、間藤徹、イネのホウ素過剰耐性遺伝子の単離、日本土壤肥料学会2008年度大会、2008年9月、名古屋

屋市立大学 (土壤肥料学会ポスター賞受賞)

#### 6. 研究組織 (1)研究代表者

間藤 徹 (MATOH TORU)

(京都大学・大学院農学研究科・教授)

研究者番号: 50157393