

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23248002

研究課題名(和文)形質QTLと発現QTLデータの融合による穂形成の遺伝子ネットワーク構築

研究課題名(英文)Construction of Gene network for panicle development based on trait and expression QTL analysis.

研究代表者

松岡 信(MATSUOKA, Makoto)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：00270992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 39,300,000円、(間接経費) 11,790,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、多収インド品種ハバタキとコシヒカリの交雑自殖系統群を用いて、穂構造を規定する34の形質調査(着粒数、穂長、1次枝梗数、2次枝梗数等)による形質QTLと、マイクロアレイによる穂形成時のイネ全遺伝子の発現QTLを行い、穂構造に関与する遺伝子群の遺伝子ネットワークの構築を試みた。その結果、合計83個の穂構造または収量性を制御するQTLを同定することができた。さらに、発現QTL情報をもとにQTL原因遺伝子探索を行うことでGn1a遺伝子をin silicoで予想できることを示し、同様な方法で上記のqPBL-6, qPBL-7, qUPB-8の候補遺伝子の数を数個に絞ることが可能なことを示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular mechanism of rice panicle development by using 83 BILs crossed between an indica variety, Habataki, and Japonica, Koshihikari. For QTL analysis, we evaluated 34 traits, such as panicle number per panicle, the length of panicle, etc (traitQTL). We also analyzed the expression level of all rice genes by microarray analysis for performing expression QTL analysis (eQTL). By the results of trait QTL, we identified 83 QTLs involved in determining the panicle structure. Furthermore, we suggested a validity of comparative analyses between trait-QTL and eQTL data for prediction of candidate genes of QTL. We first focused on OsCKX2/Gn1a, which is involved in increasing the secondary rachis number per panicle and already isolated by a positional cloning previously, and succeeded to predict the most feasible candidate of the Gn1a locus. Using the same method, we succeeded to predict several candidates for qPBL-6, qPBL-7 and qUPB-8.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：育種学 遺伝学 遺伝子 植物

### 1. 研究開始当初の背景

イネの収量性向上、特にシンク能力の向上を考えると、穂は最重要な器官と言える。穂は穂軸から分枝する枝梗と小枝梗からなる階層的複合構造をとるため、着粒する種子数や穂の大きさに加えて、穂の着粒パターンも収量決定の主要因となる(図1)。また、これらの形質はQTL的な遺伝様式を示すため、それに関与する遺伝子の同定はQTL解析により行う必要がある。

図1. 穂構造を表現する全34穂形質について



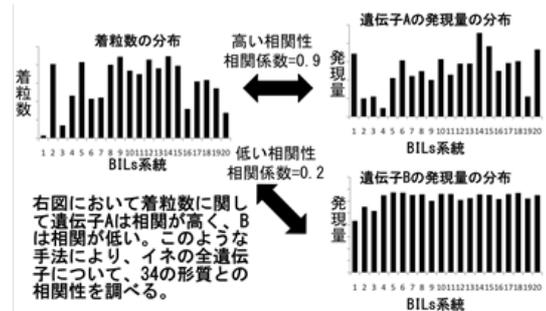
これまで我々は、着粒数の多いインド稲八バタキと少ない日本稲コシヒカリの BILs 集団を用いた QTL 解析から、2 次枝梗数を増加させる効果を持つ *GN1A* 遺伝子 (Science 2005) や 1 次枝梗数を増加させる *WFP* 遺伝子を単離し (Nature Genetics 2010)、イネの着粒数決定にサイトカイニンや転写調節ネットワークが重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。また、これらの研究を通して、これら鍵遺伝子の発現量の差異が穂構造に大きく影響することを明らかにした。さらに最近の研究から、形態形成遺伝子として単離された *AP01* も穂や稈構造の決定に重要であることも明らかにした (Nature Communications 2010)。

これらの先行研究は、QTL 解析が穂構造決定機構の理解に有効であることを示している。しかしその一方、QTL 解析では遺伝子の単離に多大な時間と労力が必要であり、さらに一つの QTL 遺伝子を積み上げていく解析方法では穂形成の全体像を包括的に把握するのが困難であることも明らかにした。すなわち、穂形成の全体像を包括的に理解するためには、従来の QTL 遺伝子の単離・解析とそれらの積み上げではなく、穂構造関連遺伝子群を包括的に探し出し、それらのネットワーク構築に向けた新しい手法が必要である。

一方、既に述べたように、*GN1* や *WFP* 等の鍵遺伝子の発現量の違いが穂構造に大きな影響を与えることがこれまでの研究によって明らかになってきた。このことは、様々な異なった穂構造を持つ BILs 集団の穂メリステム RNA を用いたマイクロアレイから、イネの全遺伝子の発現量を測定し、BILs 集団内における遺伝子発現量と穂構造の計測値(着粒

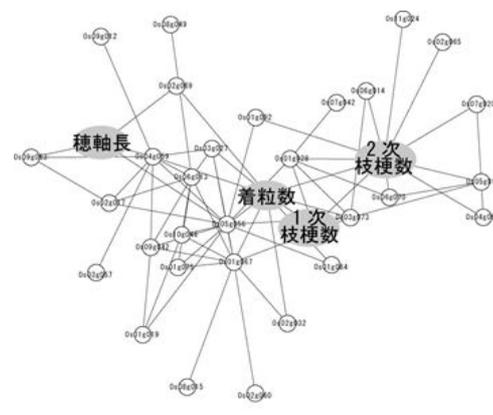
数、穂長、1 次枝梗数、2 次枝梗数等)との間に相関性があるかを評価する(相関解析すること)ことで、穂構造の決定に関する新規遺伝子の単離が可能であることを示唆している(図2)。

図2. 相関解析の具体例



さらに抽出された候補遺伝子を用いた発現 QTL 解析と形質 QTL 解析を統合して穂形質-遺伝子ネットワーク(発現 QTL ネットワーク)を構築することで、穂構造決定機構の包括的な理解が可能であると考えた(図3)。

図3. 形質と発現 QTL の統合による遺伝子制御ネットワークの模式図



このような形質 QTL と発現 QTL による複雑形質の統合遺伝子ネットワークを解析した先行研究は存在しないが、我々が以前行った小規模の BILs 集団を用いた予備実験においては、形質 QTL と発現データ(相関解析と発現 QTL)の統合が候補遺伝子の抽出に極めて有効であることが確かめられた。従って、本研究で予定した大規模集団を用いて実験を行えば、遙かに高い精度の相関情報を得ることが可能であり、それを利用して穂構造関連遺伝子群を網羅的に抽出することで、遺伝子ネットワーク構築が可能であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、イネの穂におけるタネの付き方(穂構造)の分子機構を明らかにすることに設定した。イネの穂構造は収量に係わる重要形質であり、これまでも様々な研究が行われてきた。また最近では、QTL 解析を用いて穂構造関連遺伝子が単離され始めている。

しかし一つ一つの QTL 遺伝子を単離・解析しても、穂構造構築に対する包括的理解にはほど遠い。本研究では、多収インド型品種ハバタキとコシヒカリの交雑自殖系統群 (BILs) を用いて、穂構造を規定する 34 の形質調査 (着粒数、穂長、1 次枝梗数、2 次枝梗数等) による形質 QTL と、マイクロアレイによる穂形成時のイネ全遺伝子の発現 QTL を行い、形質と発現 QTL を統合することで、穂構造に関与する遺伝子群を網羅的に抽出することを目的とした。さらにこれらの解析により、穂形成の遺伝子ネットワークを構築も試みた。

### 3. 研究の方法

コシヒカリと多収インド型品種ハバタキとの BILs82 系統を用い、穂構造 34 項目についての形質調査及び QTL 解析、BILs 集団の枝梗分化期の穂メリステムから RNA 単離 (終了済み)、RNA を用いたマイクロアレイ及び発現 QTL 解析を行った (図 4)。



図 4. 発現 QTL 解析に用いた二次枝梗分化期の茎頂分裂組織

BILs 系統間における、穂構造 34 項目データ値の大小と一致 (もしくは相反) する発現パターンを示す遺伝子群を相関解析により抽出し、相関性の高いいくつかを穂構造制御に関わる遺伝子候補とした (図 2)。候補遺伝子について、発現の詳細な解析および、遺伝子機能を喪失または向上させた転換体を作成し、候補遺伝子が穂構造決定に関与することを分子生物学的に証明することを試みた。また、形質 QTL と発現 QTL の統合については、既成のプログラムが本研究に利用できないので本研究に合致したプログラムを開発した。

### 4. 研究成果

(1) 本研究の形質 QTL 解析により検出された QTL 群について、着粒数・枝梗長・枝梗数に関与するものと、それらに関与することが既に報告されている遺伝子座乗位置を示した (図 5)。

(2) 形質 QTL と発現 QTL の融合による候補遺伝子絞り込みの有効性を確認するため、既に遺伝子が単離されている *GN1A* について試行した (図 6)。

その結果、一穂粒数及び 2 次枝梗数の 1 番染色体短腕における形質 QTL ピークは *GN1A* 発現に関する QTL ピークと非常良く一致、この領域内の 463 遺伝子について、形質 QTL ピークと合致する発現 QTL を示す遺伝子は *GN1A* を含む 4 個に限定できる、ことが確認出来た。この *GN1A* の結果は、「形質 QTL と発現 QTL を統合し穂構造に関与する遺伝子群を網

羅的に抽出する」ことが可能であることを強く示唆した。

図 5. 形質 QTL 解析と既知の穂形質に関わる遺伝子の染色体地図

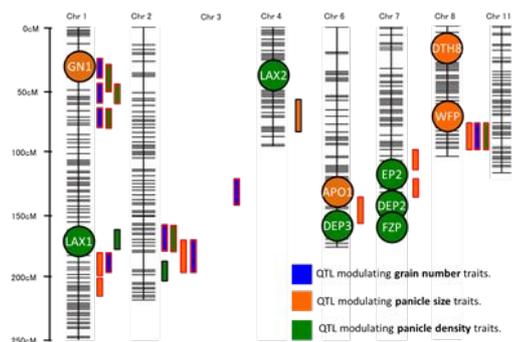
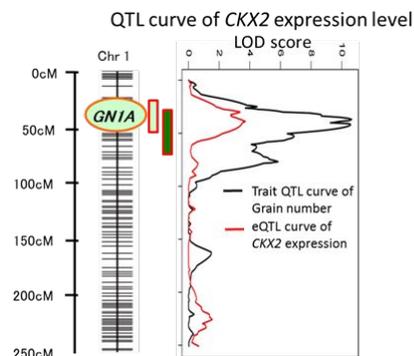
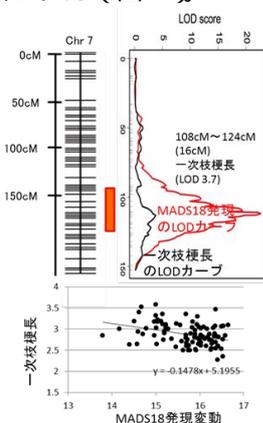


図 6. 形質 QTL と発現 QTL 解析の融合による候補遺伝子の効率的絞り込みの試み (*Gn1A* の場合)



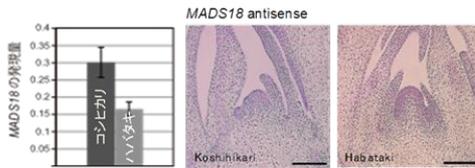
(3) 次に新規穂構造関連 QTL 遺伝子について同様な方法でその有効性の確認を試みた。その最初の試みとして、7 番染色体長腕に座乗する一次枝梗長伸長に関わる QTL (*qPBL7*) を取り上げた。形質 QTL 解析から予測された *qPBL7* 領域内には 395 個の遺伝子が座乗した。この 395 遺伝子について、発現 QTL 解析を行い、16 遺伝子が *qPBL7* 領域内での遺伝子型によって発現差異を生じる QTL 遺伝子であった。この 16 候補遺伝子の中、形質値 QTL と発現量 QTL の相関性の高さから MADS 型転写因子 *MADS18* 遺伝子が選抜された (図 7)。

図 7. 形質 QTL と発現 QTL 解析の融合による候補遺伝子の効率的絞り込みの試み (染色体 7 番の場合)



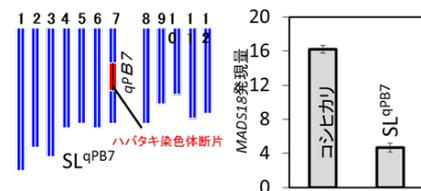
そこで、*qPBL7*が実際に *MADS18* 遺伝子であることを確認するために以下の実験を行った。  
 コシヒカリの穂メリステムにおける *MADS18* 発現はハバタキより高い(図8)。

図8 . 穂メリステムにおける *MADS18* の発現



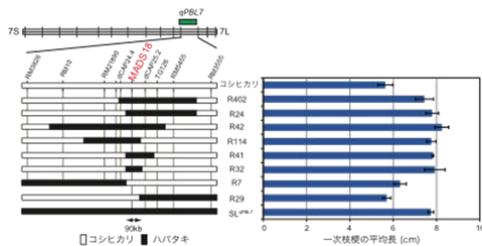
コシヒカリ遺伝背景の NIL 系統において *qPBL7*領域がハバタキ型になると *MADS18* 発現量は低下(ハバタキアレルと比較してコシヒカリアレルが機能獲得型と推定、図9)。

図9 . コシヒカリ NIL 系統で *qPBL7*領域がハバタキ型の場合 *MADS18* 発現量は低下



*MADS18* 周辺での染色体組替え系統群を用いたファインマッピングにより *qPBL7* は *MADS18* を含む 90kb の範囲に存在(図10)。

図10 . *qPBL7* のファインマップ  
*qPBL7* の原因遺伝子は *MADS18* 遺伝子を含む 90kb に存在する



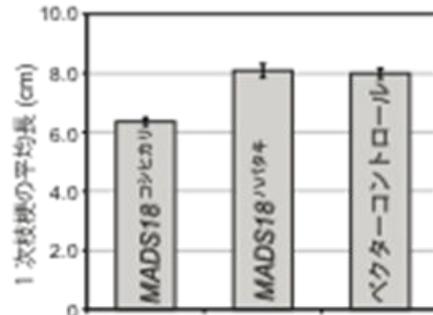
コシヒカリとハバタキ遺伝子間で 5' 非翻訳領域に 6bp の欠損が存在し、このインデルが *MADS18* 発現量の違いを引き起こす(図11)。

図11 . ハバタキ *MADS18* 遺伝子は 5' 非翻訳領域にコシヒカリにない 6bp 欠損が存在



コシヒカリ *MADS18* 遺伝子を、*qPBL7* 領域をハバタキゲノムに置き換えたコシヒカリ SL に導入すると、1次枝梗長が減少する(図12)。さらに *MADS18* アンチセンス形質転換体は 1次枝梗長が増加した。

図12 . *qPBL7* をハバタキゲノムに置き換えたコシヒカリに *MADS18* 遺伝子を導入すると 1次枝梗長が短くなる



さらに、これと平行して、1番染色体の穂サイズに関わる QTL (*qUPL1*)、7番の枝梗/小枝梗の配置に関わる QTL (*qLPA7*)、8番の2次枝梗数増加の QTL (*qUPB8*) についても同様の解析を進めており、候補領域の効率的な特定化に成功している。以上は実験開始から約3年でなされた成果であり、複数個の QTL 遺伝子領域を < 100kb に限定するのは従来法と比べて画期的なスピードと言え、今回の提案方法が優れていることを示している。

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11件)  
Aya, K., Hobo, T., Sato-Izawa, K., Ueguchi-Tanaka, M., Kitano, H., Matsuoka, M. (2014) A Novel AP2-type Transcription Factor, SMALL ORGAN SIZE1, Controls Organ Size Downstream of an Auxin Signaling Pathway. Plant and Cell Physiology accepted. 査読有. <http://pcp.oxfordjournals.org/content/early/2014/03/03/pcp.pcu023.full.pdf+html>  
 Sato, T., Miyanoiri, Y., Takeda, M., Naoe, Y., Mitani, R., Hirano, K., Takehara, S., Kainosho, M., Matsuoka, M., Ueguchi-Tanaka, M., Kato, H. (2014) Expression and purification of a GRAS domain of SLR1, the rice DELLA protein. Protein Expr. Purif. 査読有. doi: 10.1016/j.pep.2014.01.006.  
 Hirano, K., Aya, K., Morinaka, Y., Nagamatsu, S., Sato, Y., Antonio, BA., Namiki, N., Nagamura, Y., Matsuoka, M. (2013) Survey of genes involved in rice secondary cell wall formation through a co-expression network. Plant Cell Physiol. 54, (11)1803-1821. 査読有. doi: 10.1093/pcp/pct121.  
 Hirano, K., Kondo, M., Aya, K., Miyao,

A., Sato, Y., Antonio, BA., Namiki, N., Nagamura, Y., Matsuoka, M. (2013) Identification of transcription factors involved in rice secondary cell wall formation. *Plant Cell Physiol.* 54, (11) 1791-1802. 査読有.  
doi: 10.1093/pcp/pct122.

Inukai, Y., Sakamoto, T., Morinaka, Y., Miwa, M., Kojima, M., Tanimoto, E., Yamamoto, H., Sato, K., Katayama, Y., Matsuoka, M., Kitano, H. (2012) ROOT GROWTH INHIBITING, a Rice Endo-1,4- $\beta$ -D-Glucanase, Regulates Cell Wall Loosening and is Essential for Root Elongation. *J. Plant Growth Reg.* 31, (3) 373-381. 査読有.  
doi: 10.1007/s00344-011-9247-3.

Ikeda, M., Miura, K., Aya, K., Kitano, H., Matsuoka, M. (2013) Genes offering the potential for designing yield-related traits in rice. *Cur. Opin. in Plant Biology* 16, (2) 213-220. 査読有. doi: 10.1016/j.pbi.2013.02.002.

Abe, A., Takagi, H., Fujibe, T., Aya, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Uemura, A., Matsuoka, M., Terauchi, R. (2012) OsGA20ox1, a candidate gene for a major QTL controlling seedling vigor in rice. *Theor. Appl. Genet.* 125, (4) 647-657. 査読有.  
doi: 10.1007/s00122-012-1857-z.

Yano, K., Takashi, T., Nagamatsu, S., Kojima, M., Sakakibara, H., Kitano, H., Matsuoka, M., Aya, K. (2012) Efficacy of microarray profiling data combined with QTL mapping for the identification of a QTL gene controlling the initial growth rate in rice. *Plant Cell Physiol.* 53, (4) 729-739. 査読有.  
doi: 10.1093/pcp/pcs027.

Miura K, Ashikari M, Matsuoka M. (2011) The role of QTLs in the breeding of high-yielding rice. *Trends Plant Sci.* 16, (6) 319-326. 査読有.  
doi: 10.1016/j.tplants.2011.02.009.

Asano, K., Yamasaki, M., Taku, S., Miura, K., Katagiri, S., Ito, T., Do, K., Wu, J., Ebana, K., Matsumoto, T., Innan, H., Kitano, H., Ashikari, M., Matsuoka, M. (2011) Artificial selection for a green revolution gene during japonica rice domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108, (27) 11034-11039. 査読有.  
doi: 10.1073/pnas.1019490108.

Hirano, K., Aya, K., Kondo, M., Okuno, A., Morinaka, Y., Matsuoka, M. (2011) OsCAD2 is the major CAD gene responsible for monolignol biosynthesis in rice culm. *Plant Cell*

Rep. 31,(1) 91-101. 査読有.  
doi: 10.1007/s00299-011-1142-7.

〔学会発表〕(計 7 件)

矢野憲司, Is there alternative receptor(s) for gibberellin in rice aleurone cells?, 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014.3.18, 富山  
Matsuoka, M., Gibberellin signaling via the GID1-DELLA perception system and its modification during the course of plant evolution. International Conference on Plant Growth Substances 2013. 2013.6.18, 上海, China 招待講演  
池田真由子, 超多粒系統, NP-6 における 1 穂穎花数増加に与える QTL の集積がシンクおよびソース器官に与える影響, 日本育種学会第 123 回講演会, 2013.3.28, 東京  
池田真由子, 多収イネ、ハバタキの穂の着粒構造形成に関わる *Gn1* および QTL の集積系統が茎葉および収量関連形質に与える影響, 第 20 回育種学会中部地区談話会 2012.12.8, 名古屋  
Matsuoka, M. "New approach for enhancing the lodging resistance-beyond the sd1 mutation-" The Second International Symposium on Genomics and Crop Genetic Improvement, 2th GCCI 2011. 2011.7.4-7, Wuhan, CHINA, 招待講演  
矢野憲司, マイクロアレイと QTL マッピングを組み合わせたイネの初期成長性に関する QTL の同定, 日本育種学会第 121 回講演会, 2012.3.29, 宇都宮  
安藤考紀, 長穂性イネ系統を用いた穂形質に関する QTL 解析, 日本育種学会第 120 回講演会, 2011.9.24, 福井

〔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

松岡 信 (MATSUOKA, Makoto)  
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授  
研究者番号：00270992

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

安益 公一郎 (AYA, Kouichirou)  
名古屋大学・高等研究院  
研究者番号：10594054