

# イネの出穂期を支配する遺伝子の分子遺伝学的研究

一谷 勝之

鹿児島大学 農学部 農業生産科学科 植物育種学研究室

〒890-0065 鹿児島市郡元1-2 1-2 4

TEL: 099-285-8547

## 要旨

イネ品種 台中 65 号(T65)へのイオンビーム照射によって、T65 よりも約2ヶ月遅く出穂する突然変異体が多数見出されている。それらのうち、KGM25, KGM26, KGM27 については、2013 年度研究報告書<sup>1)</sup>にて、それぞれ1劣性遺伝子によって晩生化したと考えられたこと、KGM25 と KGM27 のもつ晩生遺伝子は第9染色体、KGM26 のもつ晩生遺伝子は第8染色体に座乗したこと、KGM25 と KGM27 のもつ晩生遺伝子が互いに異なることを明らかにした。本研究では、KGM27 の晩生の原因遺伝子 *FLT2*<sup>2)</sup> の高密度連鎖解析を実施し、遺伝子の本体に迫るとともに、新規突然変異体の遺伝子分析を行った。*FLT2* の候補領域は当初 5,759kb から約 2,900kb の範囲に狭まったが、動原体付近であって組換えが抑制されていることから、これ以上高密度連鎖解析で遺伝子の本体に迫るのは得策ではないと考えられた。この領域のハプロタイプ分析を行った所、品種分化に関する新たな考えが示唆された。また、2 新規突然変異体はいずれも 1 劣性遺伝子によって晩生化していることが明らかになった。

## 1 緒言

出穂期はイネの地域適応性や収量性を支配する重要な形質の一つである。鹿児島県の普通期水稻の主要品種はヒノヒカリであるが、近年の夏期の高温化に伴い、高温時期に出穂、成熟することによる品質低下が問題になっている。最近、鹿児島県で育成された普通期水稻「あきほまれ」は、出穂時期がヒノヒカリよりも遅いため、高温の時期の出穂、成熟を避けるように育成されており、良食味品種として普及が期待されている。また、出穂時期が異なる品種が育成され、出穂期が分散化することは、収穫時期の集中を避ける点で都合がよく、台風被害の危険分散となる。

近年、突然変異誘発原として、イオンビームが注目されている。Tanaka *et al.*<sup>3)</sup>によると、イオンビームによって誘発されている突然変異体には、従来の変異原であるガンマ線、X線、化学物質によって誘発されなかったものがある。ガンマ線と比べると、イオンビームは、塩基置換、小さな欠失、小さな挿入といった小さな DNA 変異を誘発するというよりは、むしろ、大きな欠失、大きな挿入、転座といった大きな DNA 変異を誘発する傾向にある。

東京大学大学院工学系研究科原子力専攻による原子力機構施設利用共同研究制度を利用し、1999 年からイネ種子にイオンビームを照射し、突然変異体の選抜を行ってきた。その中に、原品種である台中 65 号(T65)よりも2ヶ月近く出穂が遅れる変異系統、KGM25, KGM26, KGM27 が見出された (Table 1)。2013 年度研究報告書<sup>1)</sup>にて、それぞれ1劣性遺伝子によって晩生化したと考えられたこ

と、KGM25 と KGM27 のもつ晩生遺伝子はイネ第9染色体、KGM26 のもつ晩生遺伝子はイネ第8染色体に座乗したこと、KGM25 と KGM27 のもつ晩生遺伝子が互いに異なることを明らかにした。KGM26, KGM27 の分析によって見出された遺伝子はそれぞれ *FLT1*, *FLT2* と命名された<sup>2)</sup>。本研究では、*FLT2* 遺伝子の高密度連鎖分析を行うとともに、新規突然変異体 N21(仮称, 略して t), N31(t) の遺伝子分析を行った。

Table 1. Days to heading of late-heading mutant lines induced by ion beam irradiation, and reference lines. They were planted in 2016

Line	Description	Average		Range
KGM25	Late heading mutant line	162.3	158	~ 170
KGM26	late heading mutant line	154.5	153	~ 157
KGM27	late heading mutant line	152.3	151	~ 156
N21(t)	late heading mutant line	147.0	143	~ 151
N31(t)	late heading mutant line	156.3	154	~ 160
T65	original cultivar	109.2	105	~ 117
Kasalath	an Indica cultivar used for molecular mapping of late heading time genes	102.7	98	~ 106

## 2 材料及び方法

### 2.1 植物材料

イネ(*Oryza sativa*)は、インド型と日本型という品種群に大別される。本研究では、台湾産の日本型品種 T65 にイオンビームを照射して、突然変異を誘発した。その理由は、T65 は、これまでに多くの突然変異誘発に関する研究、出穂期の遺伝子に関する研究に供試されているからである。日本型とインド型の間には高頻度の DNA 多型が観察される。この DNA 多型を DNA マーカーとして遺伝子本体と同様に扱うことで、研究対象の晩生突然変異遺伝子の連鎖分析が効率よく行われることが期待される。先行する研究によって、T65 とインド産のインド型品種カサラス(Kasalath)との間に高い頻度の DNA 多型が検出される<sup>4)</sup>ことから、カサラスを連鎖分析に供試した。

T65 に由来する突然変異系統として、KGM27, N21(t), N31(t)を供試した。いずれも T65 よりも1ヶ月以上晩生である (Table 1)。KGM27 はイオンビーム照射によって *FLT2* 遺伝子に突然変異が誘発されたことが判明している<sup>2)</sup>。N21(t), N31(t)の晩生化の原因遺伝子数は判明していない。

### 2.2 遺伝子分析

KGM27 のもつ *FLT2* の染色体上の座乗位置を絞り込むために、高密度連鎖解析を実施した。2012

年には KGM27 とカサラスの F<sub>1</sub> 世代に KGM27 を戻し交雑した BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 世代の早生個体(*FLT2* 座の晩生遺伝子をヘテロ接合でもつことが期待される)にもう一度 KGM27 を戻し交雑した BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代から早生個体を選抜し、その自殖後代である BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> を約 1,600 個体 供試した。また、2016 年には、同じ方法で更に戻し交雑の世代を進めた BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 世代を約 5,100 個体供試した。このうち、約 4,300 個体は移植前に DNA 分析を行い、遺伝子の座乗位置の絞り込みに有用な個体を選抜し、水田に移植した。残りの約 800 個体は、無選抜で水田に移植した。

N21(t), N31(t)の晩生に関与する遺伝子数を明らかにするために原品種 T65 と交配し、雑種第一代を収穫して、雑種第二代(F<sub>2</sub>)を得た。これらの F<sub>2</sub> 世代を供試した。また、両親品種をこれらの材料に隣接して栽植した(約 20 個体×2 反復)。

催芽した種子を上記温室に置いた育苗箱に播種し、約 1 週間後、露地に移動した。播種後、約 1 ヶ月後に上記水田に移植した。出穂日は個体ごとに記録した。個体内で最初の穂の先端が葉鞘の先端より抽出した日をもってその個体の出穂日とした<sup>2)</sup>。実験データの解析では、出穂日を到穂日数(播種日から出穂日までの日数)に変換した。BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 集団は 12 月に入っても出穂しない個体が出現した。気温が下がり、出穂が見込めないことから、12 月になっても出穂しない個体の到穂日数は便宜的に 200 日にした。本材料の育成は 2014 年と 2016 年に行った。2012 年の播種日は 5 月 7 日、移植日は 6 月 18 日、2016 年の播種日は 5 月 6 日、移植日は 6 月 20 日であった。

## 2.3 DNA 分析

BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 集団は DNA マーカーを用いた高密度連鎖分析に回された。本研究で用いる DNA マーカーは全て PCR 法を利用しており、PCR 産物の電気泳動距離の違いを対立遺伝子と見なして連鎖分析を行った。DNA の抽出、PCR および電気泳動は既報<sup>2)</sup>にしたがって行った。

既知の多型を示す DNA マーカーが疎な染色体領域には、Xu *et al.* (2012)<sup>5)</sup>に掲載された 50 品種・系統の DNA 多型情報に基づき、多型を挟み込むようにプライマーを設計して、新しい DNA マーカーを作出した。また、カサラスの DNA 塩基配列が公表されていること<sup>6)</sup>、台中 65 号の DNA マーカー遺伝子型は、DNA 塩基配列が公表されている日本型品種 日本晴<sup>7)</sup>と同じであること<sup>4)</sup>から、カサラスと台中 65 号の間の DNA 多型は、カサラスと日本晴の DNA 多型とほぼ一致すると仮定し、カサラスと日本晴の DNA 塩基配列を比較し、多型を挟み込むようにプライマーを設計して、新しい DNA マーカーを作出した。多型プライマーの設計方法は既報<sup>2)</sup>に記した。

## 3 結果

### 3.1 遺伝子分析

N21(t) × T65, N31(t) × T65 の F<sub>2</sub> 集団は、いずれも早生 : 晩生 = 3 : 1 の明瞭な一遺伝子分離を示した(Figs. 1 and 2)。以上の結果は、いずれの突然変異系統の晩生も、一劣性遺伝子によって支配されていることを示している。

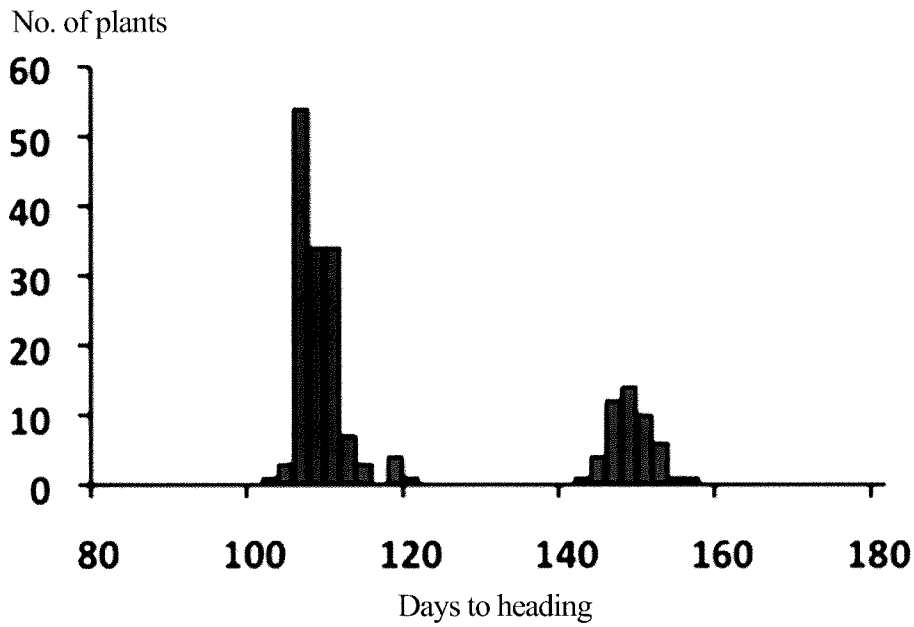


Fig. 1. Frequency distribution of days to heading of the F<sub>2</sub> population from the cross between N21(t) and T65.

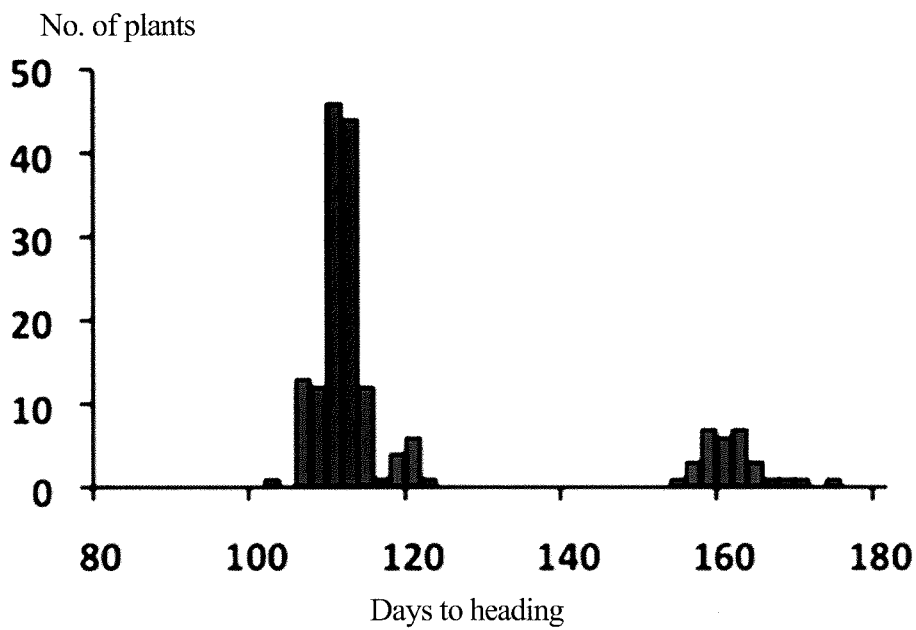


Fig. 2. Frequency distribution of days to heading of the F<sub>2</sub> population from the cross between N31(t) and T65.

### 3.2 *FLT2* 遺伝子の高密度連鎖解析

Fig. 3は KGM27 × カサラスの雑種第一代にKGM27を戻し交雑して得られたBC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>世代の到穂日数の頻度分布を示している。これは2013年度に報告している<sup>1)</sup>が、分布は連続的であって、早生遺伝子のホモ接合の群(早生群)とヘテロ接合の群(晩生群)の差は明瞭ではない。

Fig. 4はBC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>世代の到穂日数を*FLT2*に密接に連鎖するDNAマーカーKGC9M7で塗り分けたものである。これはBC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>世代12個体に由来するそれぞれ140個体弱のBC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>個体の合計を示している。合計の分布は連続的であるが、BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>世代1個体に由来する系統の中では不連続な分布を示しており、いずれも早生:晩生=3:1の分離を示している。既報を参考に、BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>世代はまず、KGC9M4とKGC9M11の2DNAマーカー間の組換え型を選抜し、それらの内側にあるDNAマーカーの遺伝子型を調査し、それらと到穂日数との関係から遺伝子の座乗位置を絞り込んだ。その結果、KGC9M6とKGC9M11の間 およそ約5,400kbの範囲に座乗することが判明した。

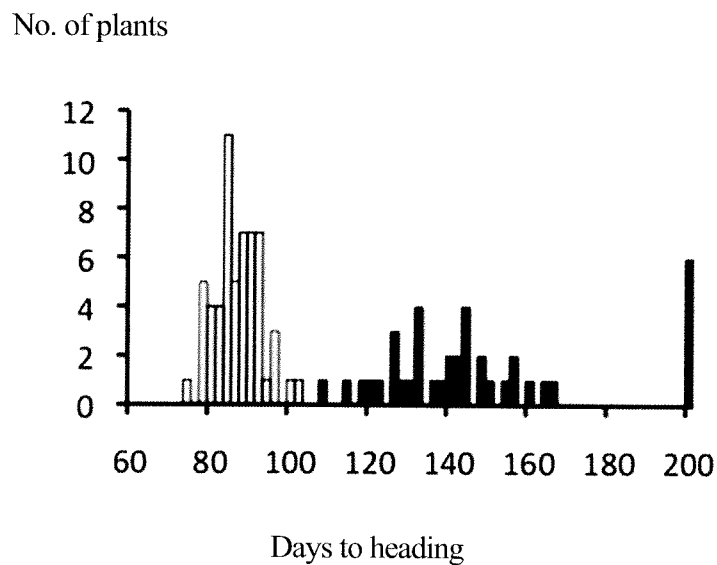


Fig. 3. Frequency distribution of days to heading of the BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> populations, [(KGM27 × Kasalath) × KGM27] classified by the genotype of KGC9M7 locus: light shaded boxes and dark shaded boxes indicate heterozygotes and homozygotes of KGM27 allele, respectively. Modified from Ichitani *et al.*<sup>2)</sup>.

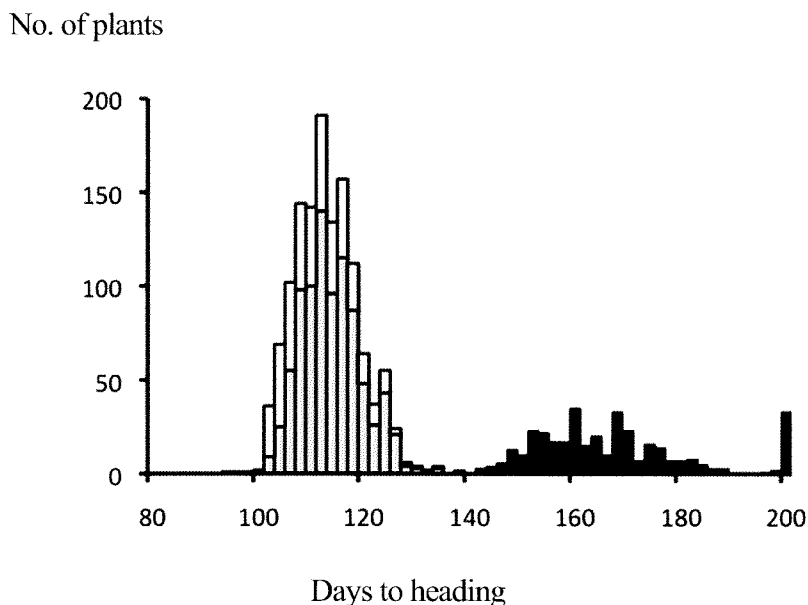


Fig. 4. Frequency distribution of days to heading of the BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> populations, with KGM27 used as recurrent parent and Kasalath used as non-recurrent parent, classified by the genotype of KGC9M7 locus: white boxes, light shaded boxes and dark shaded boxes indicate homozygotes of Kasalath alleles, heterozygotes and homozygotes of KGM27 allele, respectively.

BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 世代では、BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 世代の 3 倍近くの個体数を扱った。選抜を効率よく進めるため、以下の 2 つの点を改良した

(1) PCR の改良: KGC9M4 と KGC9M11 の 2DNA マーカーのプライマーを同じチューブに入れて PCR すると、それぞれから増幅産物が得られ、かつ電気泳動像が重ならないことが判明したので、2DNA マーカー同時の PCR を行った。

(2) 電気泳動の改良: これまでは 1 枚のポリアクリルアミドゲルに 24 個体分の試料を泳動していたが、コウムを改良することで、1 枚に 48 レーンの試料を流すことが可能になった。コウムの改良は日本エイドー(株)(東京都)と試行錯誤しながら行った。

以上の改良を加えて行った PCR, 電気泳動の結果を Fig. 5 に示す。

Fig. 6 は BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 世代の到穂日数を *FLT2* に密接に連鎖する DNA マーカー KGC9M7 で塗り分けたものである。これは BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub> 世代 9 個体に由来するそれぞれ 100 個体弱の BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 個体と DNA マーカーで田植え前に選抜した個体の総和を示している。KGM27 を反復親として BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 世代から更に 2 回戻し交雑を進めているため、到穂日数の分布は不連続である。BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 世代でも、KGC9M4 と KGC9M11 の 2DNA マーカー間の組換え型を選抜し、それらの内側にある DNA マーカーの遺伝子型を調査し、それらと到穂日数との関係から遺伝子の座乗位置を絞り込んだ。その結果、*FLT2* は RM23687 と C9M23(t)の間 およそ約 2,900kbp の範囲に座乗することが判明した (Fig. 7)。第 9 染色体の物理的距離は 23,013kbp であり<sup>7)</sup>、遺伝的距離は 96.1cM である<sup>8)</sup>。平均すると 1cM=239kbp であるが、*FLT2* 周辺では、染色体全体の 10%以上に相当する約 2,500kb の範囲で組換えが起こっていない。

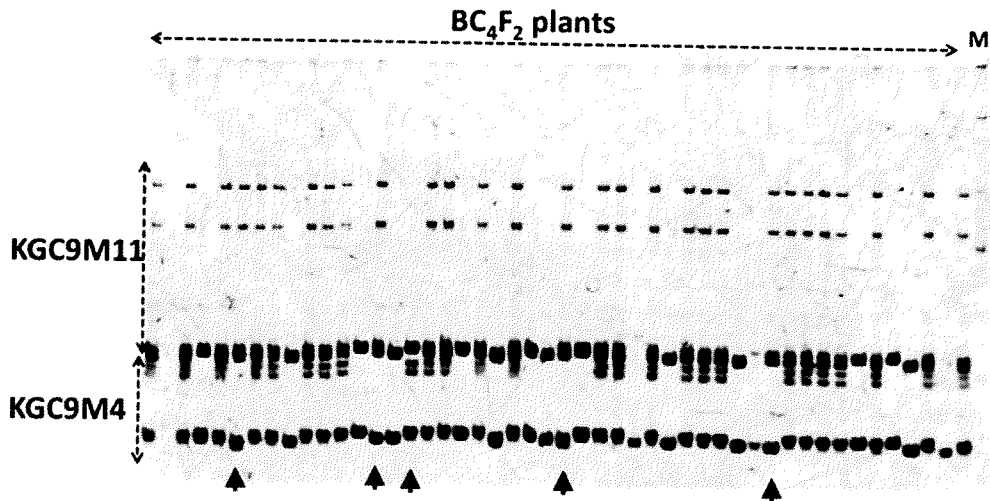


Fig. 5. Electrophoretic banding patterns of PCR products of 48 BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> plants derived from the cross Kasalath × KGM27, with KGM27 used as recurrent parent and Kasalath used as non-recurrent parent. PCR of the two DNA markers, KGC9M4 and KGC9M11, was run in one tube per plant. M denotes DNA 100bp ladder marker. Arrowheads indicate the recombinants.

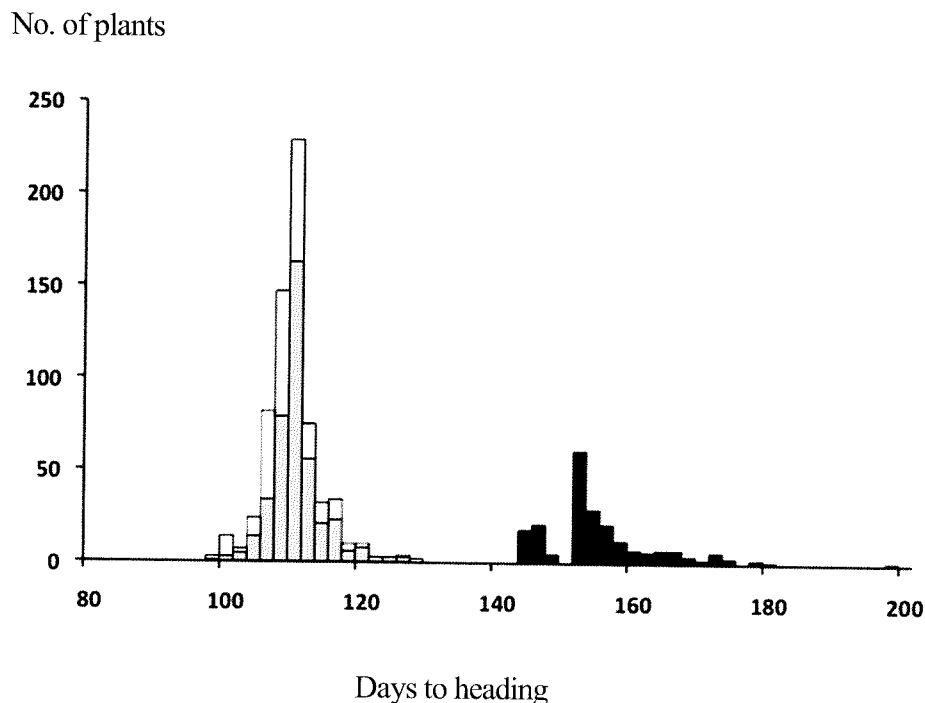


Fig. 6. Frequency distribution of days to heading of the BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> populations, with KGM27 used as recurrent parent and Kasalath used as non-recurrent parent, classified by the genotype of KGC9M7 locus: white boxes, light shaded boxes and dark shaded boxes indicate homozygotes of Kasalath allele, heterozygotes and homozygotes of KGM27 allele, respectively.

### 3.3 イネの品種分化の過程における *FLT2* 候補領域のハプロタイプ分析

*FLT2* の座乗する領域が真に組換えが抑制されている領域かどうかを推定するために *FLT2* 候補領域のハプロタイプ分析を実施した。できるだけ少ない系統数で全体の多様性をカバーする系統群としてコアコレクションが提案されている。本研究では農業生物資源研究所ジーンバンクが公開している世界イネコアコレクション(WRC 系統: Kojima *et al.*<sup>9)</sup>)ならびに日本在来イネミニコアコレクション(JRC 系統: Ebana *et al.*<sup>10)</sup>) をの分譲を受け、候補領域の DNA マーカー遺伝子型を明らかにした(Fig. 8) 供試系統は1から4の4つのハプロタイプに分かれ、それぞれ Ichitani *et al.*<sup>4)</sup>による J\_a (温帯日本型が多く含まれるグループ)ならびに J\_b (日本原産の熱帯日本型で陸稲が多く含まれるグループ), I\_a (*indica* が多く含まれるグループ), I\_b (*aus* が多く含まれるグループ), J\_c (日本以外の熱帯日本型が多く含まれる品種群)の4群が多く含まれた。ハプロタイプ1は日本晴と一致し、ハプロタイプ3はカサラスと完全に一致した。ハプロタイプ1とハプロタイプ3は全くバンドパターンが異なり、ハプロタイプ2とハプロタイプ3は1DNA マーカー遺伝子型だけ異なる。ハプロタイプ4はDNA マーカー C9M15(t) から C9M19(t)の範囲がハプロタイプ1,2の入れ子状態になっていた。

## 4. 考察

本研究の結果、2晩生突然変異系統 N21(t), N31(t)の晩生は、一劣性遺伝子によって支配されていることが明らかになった。また KGM27 の晩生の原因遺伝子 *FLT2* の第9染色体上の座乗位置はDNA マーカーRM23687 から C9M23(t)の間約 2,900 kbp の範囲であることが明らかになった。C9M15(t) から C9M22(t)の範囲では、これまでに供試した約分離個体の中に一度も組換えが起こっていないことから、この領域は動原体を含む組換え抑制領域であると考えられる。Choi *et al.*<sup>12)</sup>は *FLT2* の座乗候補領域に T-DNA の挿入によって引き起こされた晩生の原因遺伝子である *Oryza sativa Trithorax1* (*OsTrx1*)を見出している。そのため、*FLT2* と *OsTrx1* が同一遺伝子である可能性がある。

*FLT2* 候補領域のハプロタイプ分析では、温帯日本型品種、熱帯日本型のほとんどが含まれる日本型品種群と、*indica* と *aus* から成る広義のインド型から成る品種群が全く異なるハプロタイプを示したのに対して、日本以外が原産の熱帯日本型からなる品種群が、日本型とインド型を入れ子にしたようなハプロタイプを示していた。今回の多型の対象とした十数塩基の挿入・欠失は多くの場合、不可逆的な変異と考えられる。したがって、日本以外が原産の熱帯日本型からなる品種群のハプロタイプ4はハプロタイプ1とハプロタイプ2(または3)の交雑後代で組換え抑制領域で複数の組換えが起こった結果と考えるよりは、むしろハプロタイプ4が祖先型であって、これに2方向に突然変異が蓄積していくことによってハプロタイプ1とハプロタイプ2が、さらにハプロタイプ2の C9M19(t)に突然変異が生じてハプロタイプ3が生じたと考えるのが妥当と考えられる。



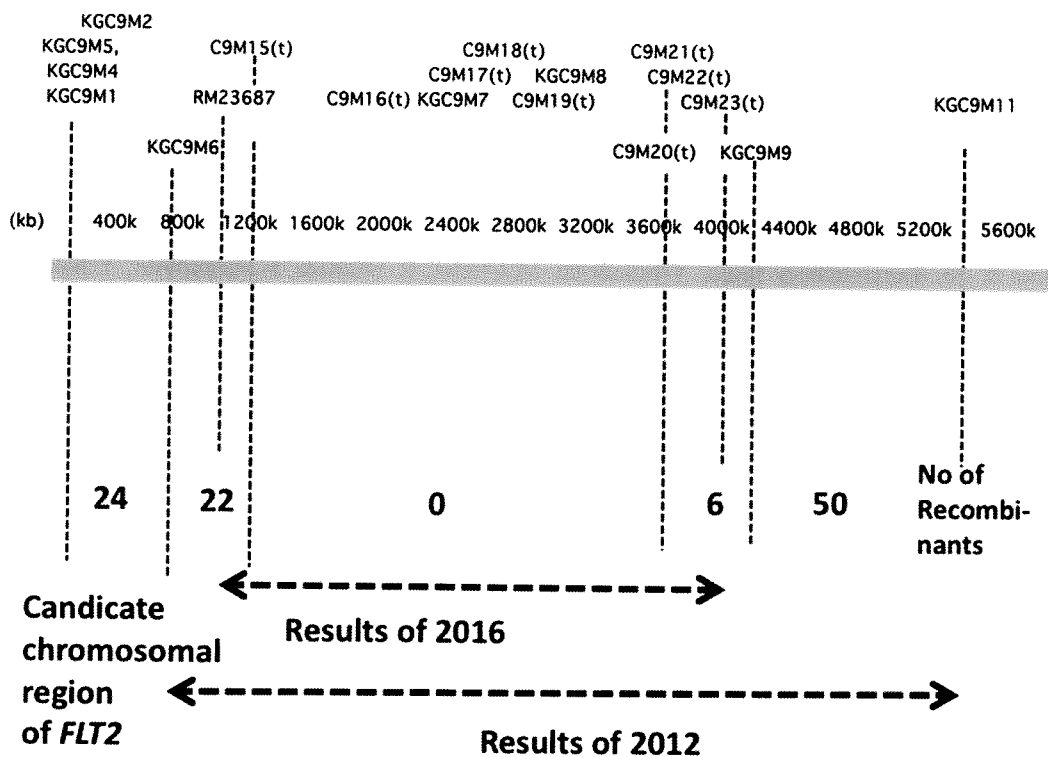


Fig. 7. High resolution linkage analysis around *FLT2* locus. The candidate location of *FLT2* was confined to the region between RM23687 and C9M23(t).

Haplo- type	Location at Pseudomolecule IRGSP 1.0 (Mb)									Number of WRC and JRC accessions classified by Ichitani et al. (2016)						
	1.3		1.9	2	2.5		2.7	3	3	3.6	J_a	J_b	J_c	Inter- mediate	I_a	I_b
	DNA marker	C9 M15	C9 M16	KG C9	C9 M17	C9 M18	C9 M19	KG C9	C9 M20							
1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	35	13	1	2	2	0	
2	B	B	B	B	B	A	B	B		0	0	0	4	28	6	
3	B	B	B	B	B	B	B	B		0	0	0	2	3	13	
4	B	A	B	A	B	A	C	A		0	0	8	1	1	0	

Fig. 8. Haplotype analysis around the *FLT2* locus.

## 5. 謝辞

本研究は原子力機構施設利用共同研究制度ならびにサンケイ科学振興財団の支援を受けて行われました。世界イネコアコレクション(WRC 系統)ならびに日本在来イネミニコアコレクション(JRC 系統)の種子は農業生物資源研究所ジーンバンクから分譲を受けました。記して、厚く御礼申し上げます。

ます。

## 6. 引用文献

1. 一谷勝之 (2013)イネの出穂期を支配する遺伝子の研究 2013 年度公益座談法人サンケイ科学振興財団研究報告書 51-60.
2. Ichitani K, D. Yamaguch, S Taura, Y Fukutoku, M Onoue, K Shimizu, F Hashimoto, Y Sakata, M Sato (2014) Genetic analysis of ion-beam induced extremely late heading mutants in rice. *Breeding Science* 64: 222-230.
3. Tanaka, A., N. Shikazono and Y. Hase (2010) Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants. *J. radiat. Res.* 51: 223-233.
4. Ichitani, K., S. Taura, T. Tezuka, Y. Okiyama and T. Kuboyama (2011) Chromosomal location of *HWA1* and *HWA2*, complementary hybrid weakness genes in rice. *Rice* 4: 29-38.
5. Xu, X., X. Liu, S. Ge, J. D. Jensen, F. Hu, Xin Li, Y. Dong, R. N. Gutenkunst, L. Fang, L. Huang *et al.* (2012) Resequencing 50 accessions of cultivated and wild rice yields markres for identifying agronomically important genes. *Nat. biotechnol.* 30: 105-111.
6. Sakai H., H. Kanamori, Y. Arai-Kichise, M. Shibata-Hatta, K. Ebana, Y. Oono , K. Kurita, H. Fujisawa, S. Katagiri, Y. Mukai *et al.* (2014) Construction of pseudomolecule sequences of the aus rice cultivar Kasalath for comparative genomics of Asian cultivated rice. *DNA Res.* 21: 397-405.
7. Kawahara, Y., M. Bastide, J. P. Hamilton, H. Kanamori, W. R. McCombie, S. Ouyang, D.C. Schwartz, T. Tanaka, J. Wu, S. Zhou, K.L. Childs *et al.* (2013) Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice* 6:4.
8. Harushima Y., M. Yano, A. Shomura, M. Sato, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Yamamoto, S. Y. Lin, B. A. Antonio, A. Parco *et al.* (1998) A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F<sub>2</sub> population. *Genetics* 148: 479-494.
9. Kojima, Y., K. Ebana, S. Fukuoka, T. Nagamine and M. Kawase (2005) Development of an RFLP based rice diversity research set of germplasm. *Breed. Sci.* 55: 431-440.
10. Ebana, K., Y. Kojima, S. Fukuoka, T. Nagamine and M. Kasase (2008) Development of mini core collection of Japanese rice landrace. *Breed. Sci.* 58: 281-291.
11. Ichitani K, S Taura, M Sato, T Kuboyama (2016) Distribution of *Hwc2-1*, a causal gene of a hybrid weakness, in the World Rice Core collection and the Japanese Rice mini Core collection: its implications for *variet al.* differentiation and artificial selection. *Breeding Science* 66: 776-789.
12. Choi S.C., S. Lee, S.R.Kim, Y.S. Lee, C. Liu, X. Cao, G. An (2014) Trithorax group protein *Oryza sativa* Trithorax1 controls flowering time in rice via interaction with early heading date *Plant Physiol.* 164: 1326-37.

## 7. 発表

一谷 勝之, 保木 良太, 植村 真郷, 田浦 悟, 吉津 祐貴 畠山 勝徳 (2017) イネ出穂期遺伝子 *FLT2* の高密度連鎖解析. 育種学研究 19(別 1): 108. 2017 年 3 月 29 日に日本育種学会第 131 回講演会 (於 : 名古屋大学)にて口頭発表した内容の要旨.

## The molecular genetics on genes controlling heading time in rice

Katsuyuki Ichitani

Laboratory of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Kagoshima University

1-21-24 Korimoto, Kagoshima, Kagoshima 890-0065, Japan

Tel +81-00-285-8547; E-mail: [ichitani@agri.kagoshima-u.ac.jp](mailto:ichitani@agri.kagoshima-u.ac.jp)

Extremely late heading mutants have been induced by ion beam irradiation in a rice cultivar ‘Taichung 65’(T65). Among them, KGM27 carries one mutant late heading time gene *flt2* at *FLT2* locus. In the present study, high resolution linkage analysis around *FLT2* locus was performed. The candidate region was confined to ca. 2,900 kb, surrounded by the two DNA markers, RM23687 and C9M23(t). The recombination events have been suppressed around *FLT2* locus. The haplotype analysis around *FLT2* locus shed new light on rice varietal differentiation. The genetic analysis of new late-heading mutant lines, N21(t) and N31(t), were also performed: both lines proved to carry one recessive late heading time genes.