

イネの出穂期を支配する遺伝子の研究

一谷 勝之

鹿児島大学 農学部 生物生産学科 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 3 系統見出された。それらは、KGM25, KGM26, KGM27 と名付けられた。T65 とこれら 3 晚生突然変異系統との交雑 F_2 集団は、T65 並に出穂する早生個体：突然変異系統並に遅く出穂する晚生個体がおよそ 3:1 の割合で出現したことから、1 劣性遺伝子によって晩生化したと考えられた。晩生突然変異遺伝子の染色体上の座乗位置を明らかにするため、T65 との間で高い頻度の DNA 多型を示すインド型品種 Kasalath を供試し、晩生突然変異系統と Kasalath の雑種第一代に晩生突然変異系統を交配した戻し交雑第一代を育成した。どの集団もやや連続的ながら、早生個体：晩生個体の割合は 1 : 1 の一遺伝子分離の期待比に適合した。このため、DNA マーカーと晩生遺伝子との連鎖分析を行ったところ、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。最近接する DNA マーカーが互いに異なることから、KGM25 と KGM27 のもつ晩生遺伝子が互いに異なることも明らかになった。

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.¹⁾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が 3 系統見出された (Table 1)。本研究では、これらの晩生突然変異系統の遺伝子分析を行うとともに、原因遺伝子の連鎖分析を行い、染

色体上の座乗位置を決定した。また、今後、遺伝子を単離するために有用な実験材料の育成を行った。

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、突然変異を誘発することにした。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²⁾ことから、Kasalathを連鎖分析に供試した。

T65へのイオンビーム照射は、Yamaguchi et al. (2009)³⁾の方法に従った：糊殻を除去した種子を、胚が上を向くように直径6cmのプラスチック製シャーレに貼り付け、日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所イオンビーム照射研究施設(TIARA)に設置されているAVFサイクロトロンの深度制御種子照射装置によって220MeV炭素イオンビーム(¹²C⁵⁺)を照射した。照射線量は25Gyまたは30Gyであった。照射当代(M₁世代)の種子を鹿児島に持ち帰ったのち、シャーレ内で催芽し、鹿児島大学農学部植物育種学研究室の温室で約2週間育苗した。その後、露地で更に3~4週間育苗後、鹿児島大学農学部附属農場の水田に栽植した。M₁世代の自殖後代であるM₂世代は催芽せずに育苗用ポットに約35粒播種し、その後はM₁世代と同じ方法で育苗し、1系統当たり約30個体栽植した。M₂世代の中に見出された晩生個体を選抜し、更にM₃世代を栽培することによって、晩生が遺伝することを確かめ、KGM25, KGM26, KGM27と名付けた(Table 1)。

Table 1. Days to heading(DH) of parental lines (about 20 plants × two replications). They were planted in 2010

Parental line	Description	Days to heading			
		Average	Range	~	
T65	Original cultivar	88.3	85	~	92
KGM25	late-heading mutant line	154.9	152	~	166
KGM26	late-heading mutant line	148.8	145	~	158
KGM27	late-heading mutant line	143.7	140	~	149
Kasalath	an Indica cultivar used for molecular mapping of late heading time genes	81.4	79	~	84

2.2 遺伝子分析

KGM25, KGM26, KGM27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(F₂)を得た。KGM25, KGM26, KGM27はKasalathとも交配し、

雑種第一代に晩生突然変異系統を戻し交雑して BC₁F₁ 世代を得た。遺伝子分析では、これらの F₂ 世代、BC₁F₁ 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⁴⁾。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。BC₁F₁ 集団では 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 2010 年と 2012 年に行った。2010 年の播種日は 5 月 31 日、移植日は 6 月 24 日、2012 年の播種日は 5 月 27 日、移植日は 7 月 3 日であった。

2.3 DNA 分析

BC₁F₁ 集団は無作為に 96 個体(KGM25 の集団では 48 個体)選抜され、DNA マーカーを用いた連鎖分析に回された。DNA の抽出法は、イネゲノムプロジェクト the Rice Genome Project (RGP) のインターネットサイトに掲載された方法を一部変更して行った(<http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/rgp/protocols/index.html>, written in Japanese)。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。PCR および電気泳動は既報²⁾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)⁵⁾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。プライマーの設計方法は既報²⁾に記した。本研究では、KGC9M4 と KGC9M14 を自作した(Figs. 4, 5)。連鎖分析にはコンピュータープログラム MapDist ver. 1.7⁶⁾を用いた。地図距離は、コサンビ関数を用いて推定した。

2.4 今後の研究に向けた実験材料の育成

本研究の材料のように著しく出穂が遅れる突然変異系統は出穂期を決定する分子機構の研究に役立つことから、将来的には、遺伝子の特定が望まれる。その方法の一つが、上記の連鎖分析を大規模に行い染色体上の座乗領域を狭めていく「高密度連鎖解析」である。この方法では千単位の多数個体を扱うが、解析を効率的に行うには、遺伝子の分離が明瞭で、分析しやすい材料を育成することが望まれる。そのためには、倒れやすく背が高い Kasalath の染色体領域をできるだけ減らし、栽培しやすい T65 の染色体領域をできるだけ増やすとよい。本研究では、上記の 3 組合せの BC₁F₁ にそれぞれ突然変異系統を反復親にして連続戻し交雫を行った。それぞれの集団の早生群で外観が T65 に近いものを選び、出穂後の穂をこまめに抜いて、ひこばえの開花期が突然変異系統に合うようにして、突然変異系統を花粉親にして戻し交雫を行った。株親の除雄は、温湯除雄法(43.0°C, 7 分)で行った。

3 結果

3.1 遺伝子分析

突然変異系統と原品種 T65 の F_2 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 (Fig. 1). KGM25 の場合、早生 : 晩生 = 56: 12, $\chi^2=2.573$, $P=0.16$ であった。KGM26 の場合、早生 : 晩生 = 73: 21, $\chi^2=0.255$, $P=0.55$ であった。KGM27 の場合、早生 : 晩生 = 68: 23, $\chi^2=0.004$, $P=0.95$ であった。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。そのため、KGM25, KGM26, KGM27 のもつ晩生突然変異遺伝子をそれぞれ *lhd1(t)*(late heading 1 (tentative)), *lhd2(t)*, *lhd3(t)* と仮称することにする

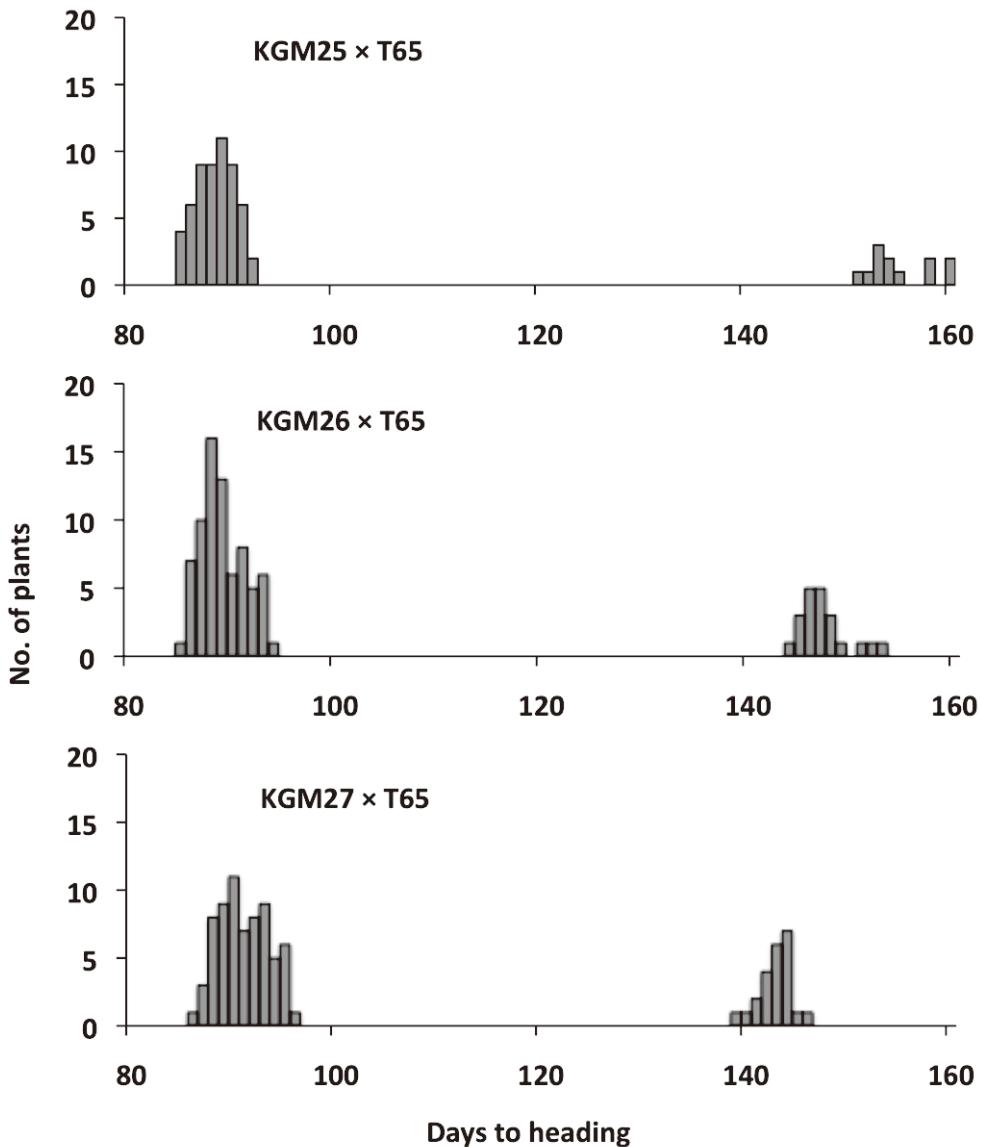


Fig. 1. Frequency distribution of days to heading of the F_2 populations.

3.2 DNA マーカーを用いた連鎖分析

BC_1F_1 集団の到穂日数 (Fig. 2) は、KGM25 では早生 : 晩生が明瞭に分かれ、早生 : 晩生 = 24: 24 で

あり、1遺伝子分離の期待比1:1に完全に適合した。KGM26, KGM27では分離が連続的であった。しかし、到穂日数100日周辺に分布の谷間が見出され、これを境目(Fig. 2の矢印)にして早生：晩生に分けるとその比は1遺伝子分離の期待比1:1に適合した。KGM26では、早生：晩生=45:51, $\chi^2=0.375$, $P=0.54$ であった。KGM27では、早生：晩生=57:39, $\chi^2=3.375$, $P=0.07$ であった。以前に行われた研究で、カサラスとT65の雑種後代では、大多数の個体の到穂日数の変異幅は親品種の間に収まり、本研究の晩生突然変異系統のような晩生個体は出現しなかった。このことから、 BC_1F_1 集団に見られる到穂日数の分離は突然変異系統がもつ晩生突然変異遺伝子によって支配されていると判断された。

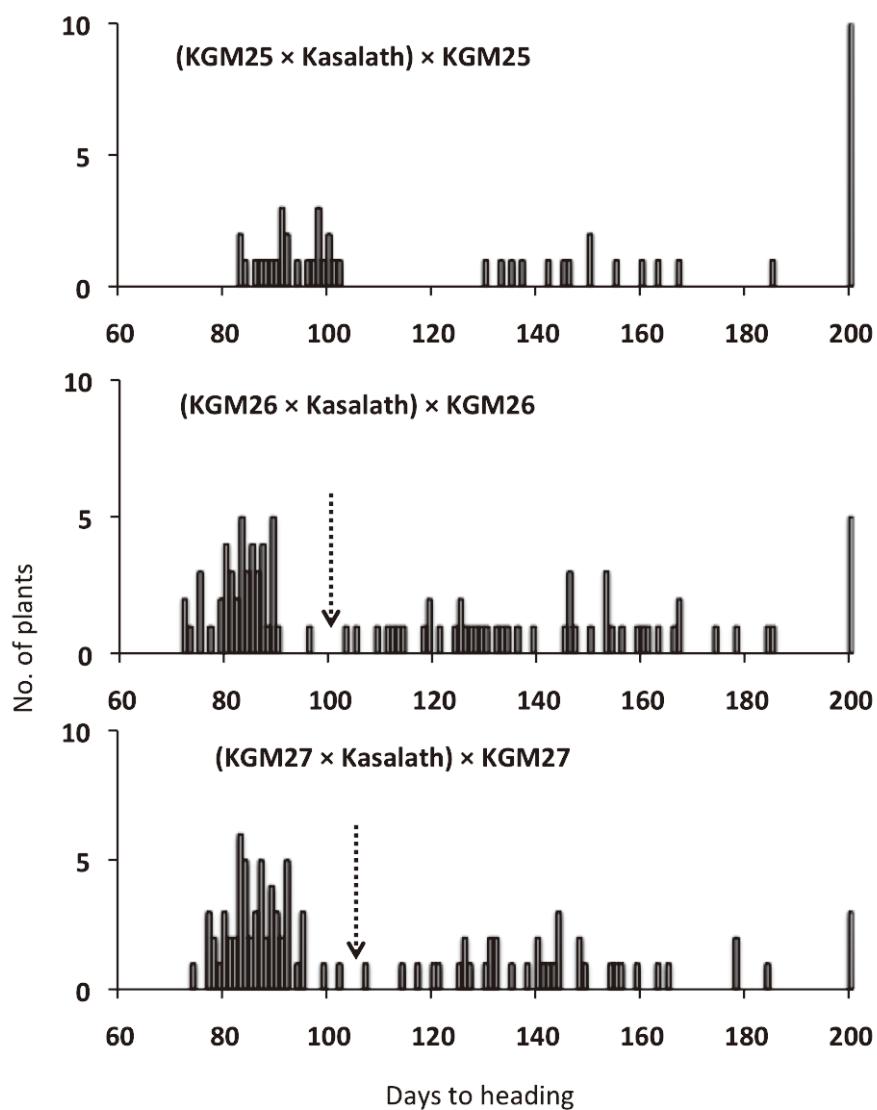


Fig. 2. Frequency distribution of days to heading of the BC_1F_1 populations.

連鎖分析は2010年に栽植されたKGM26, KGM27の晩生遺伝子から行われた。BC₁F₁世代で、それぞれ明らかに早生群に属する6個体と晩生群に属する6個体を選抜し、イネゲノム全体をカバーするDNAマーカーを用いて予備的な連鎖分析を行った。その結果、KGM26の晩生遺伝子*lhd2(t)*は第8染色体短腕末端に座乗すると推定された。また、KGM27の晩生遺伝子*lhd3(t)*は第9染色体短腕末端に座乗すると推定された。

次に、第8染色体に座乗する9DNAマーカーと晩生遺伝子と*lhd2(t)*の連鎖分析を行ったところ、*lhd2(t)*はDNAマーカーRM22196とRM22236の間に位置し、RM1019, RM22220と共に分離した(Fig.3)。

次いで、第9染色体に座乗する7DNAマーカーと*lhd3(t)*との連鎖分析を行ったところ、*lhd3(t)*は、DNAマーカーKGC9M4とKGC9M14の間に位置し、RM23668と共に分離した(Fig.4)。

KGM25のもつ*lhd1(t)*についても、ほかの系統と同様に12個体選抜して、予備的な連鎖分析を行ったが、KGM27の連鎖分析に使った第9染色体のDNAマーカーを使ったところ、*lhd1(t)*との強い連鎖が認められたことから、他の染色体の分析は行わなかった。*lhd1(t)*は、DNAマーカーE1828とRM24013の間に座乗した(Fig.5)。

3.3 材料育成

2012年秋に戻し交雑を行い、KGM26, KGM27では、BC₄F₁世代となる交雑種子を得た(KGM26: 82粒、KGM27: 43粒)。また、KGM25では、BC₃F₁世代となる交雑種子を51粒得た。

4 考察

本研究の結果、3晩生突然変異系統KGM25, KGM26, KGM27の晩生は、染色体上の座乗位置が異なる1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。Figs. 3, 4, 5は本研究で得られた連鎖地図とよく引用されるHarushima et al. (1998)の高密度連鎖地図との対応関係を表したものである。KGM25のもつ晩生遺伝子*lhd1(t)*は第9染色体長腕のおよそ1525 kbpの間に座乗する。KGM26のもつ晩生遺伝子*lhd2(t)*は第8染色体短腕のおよそ359 kbpの間に座乗する。KGM27のもつ晩生遺伝子*lhd3(t)*は第9染色体動原体付近の5759 kbpの間に座乗する。

Matsubara et al. (2011)⁸⁾らは、日本品種東北IL9にガンマ線を照射して誘発された晩生突然変異系統の原因遺伝子が第8染色体短腕末端に座乗するOs08g0105000であることを報告している。

KGM26の晩生遺伝子の候補領域にOs08g0105000が座乗することから、両晩生遺伝子が同じ場所に位置する可能性がある。

*lhd1(t)*と*lhd3(t)*が座乗する領域には、これまでこのように作用力の大きい遺伝子は報告されていないことから、これらは新しい遺伝子であると考えられる。*lhd3(t)*は動原体の近くに位置する。動原体付近では一般に組換えが抑制されることから、高密度連鎖解析が困難であることが予想される。従って、遺伝子の特定にはDNAマイクロアレイや次世代シークエンサーの利用が必要になるかもしれない。

Kasalathを1回親に用いたBC₁F₁集団では分離が連続的になり、変異系統よりもさらに晩生の個体が分離することから、*lhd1(t)*, *lhd2(t)*, *lhd3(t)*とカサラスの遺伝子との間で交互作用が起きていることが推定される。今後、量的形質遺伝子座(QTL)マッピングの手法を用いて、晩生突然変異遺伝子の作用に影響を与える遺伝子を特定する予定である。

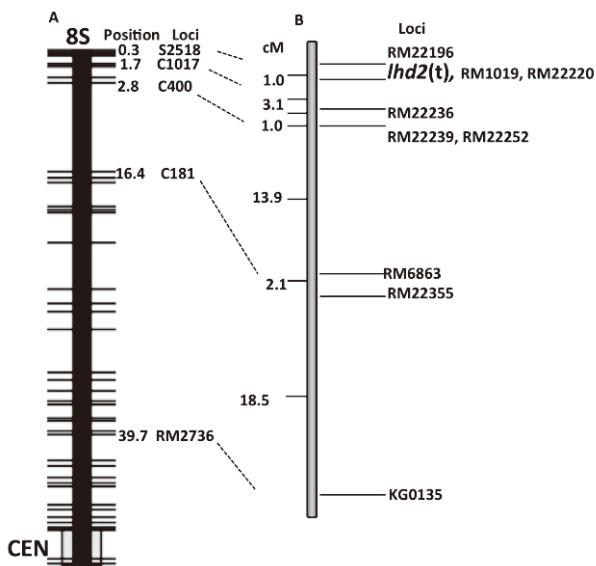


Fig. 3. Linkage map showing the location of the late heading-time gene of KGM26 on rice chromosome 8. A: RFLP framework map of chromosome 8 modified from Harushima et al. (1998)⁷⁾. B: Linkage map of *lhd2(t)* constructed from backcross population [(KGM26 × Kasalath) × KGM26] (n=96). DNA markers which are located near each other on Nipponbare pseudomolecules are connected with dotted lines.

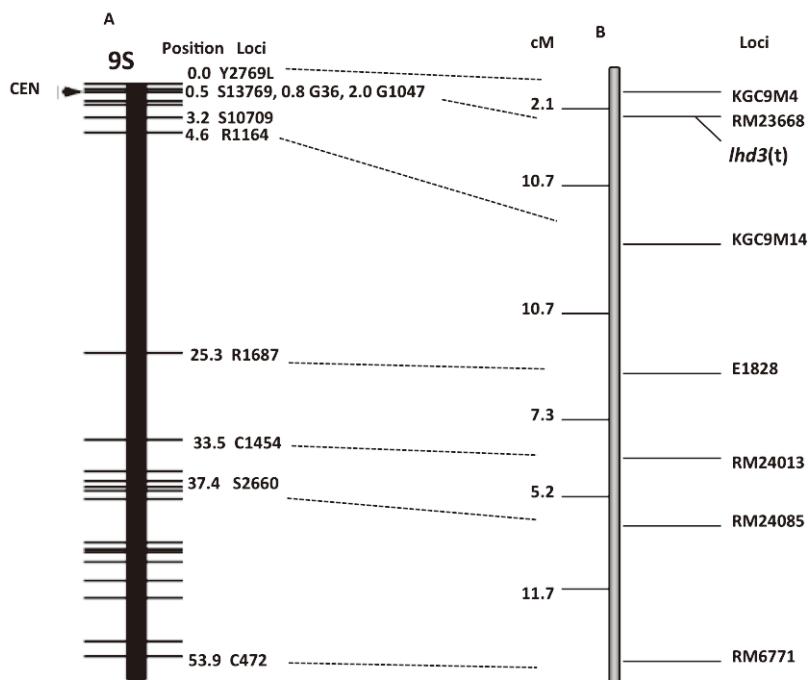


Fig. 4. Linkage map showing the location of *lhd3(t)* on rice chromosome 9. A: RFLP framework map of chromosome 9 modified from Harushima et al. (1998)⁷⁾. B: Linkage map of *lhd3(t)* constructed from backcross population [(KGM27 × Kasalath) × KGM27] (n=96). DNA markers which are located near each other on Nipponbare pseudomolecules are connected with dotted lines.

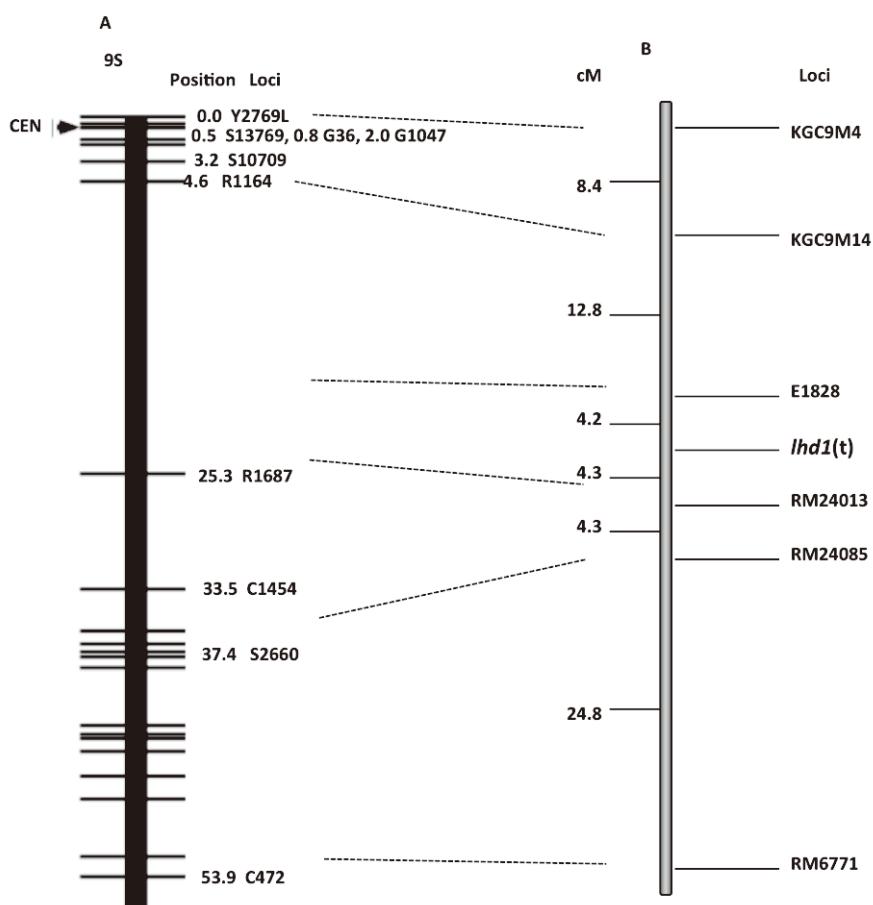


Fig. 5. Linkage map showing the location of *lhd1(t)* on rice chromosome 9. A: RFLP framework map of chromosome 9 modified from Harushima et al. (1998)⁷⁾. B: Linkage map of *lhd1(t)* constructed from backcross population [(KGM25 × Kasalath) × KGM25] (n=48). DNA markers which are located near each other on Nipponbare pseudomolecules are connected with dotted lines.

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。DNA マーカーによる分析にあたっては九州大学農学部 吉村淳教授の支援を受けました。記して、厚く御礼申し上げます。

6. 引用文献

1. 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.

2. 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.
3. Yamaguchi, H, Y. Hase, A. Tanaka, N Shikazono, K. Degi, A. Shimizu and T Morishita (2009) Mutagenic effects of ion beam irradiation on rice. Breed. Sci. 59: 169-177.
4. 奥本 裕, 吉村昭信, 谷坂隆俊, 山縣弘忠 (1922) イネ晚生遺伝子 E_1, E_2, E_3 に関する台中 65 号およびその早生同質遺伝子系統の解析. 育雑 42: 415-429.
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. Lorieux, M. (2007) MapDisto, a free user-friendly program for computing genetic maps. Computer demonstration (p958) given at the plant and animal genome XV conference, Jan 13-17 2007, San Diego, CA. URL: <http://mapdisto.free.fr/>.
7. 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_2 population. Genetics 148: 479–494.
8. Matsubara, K., U. Yamanouchi, Y. Nonoue, K. Sugimoto, Z. X. Wang, Y. Minobe and M. Yano. (2011) *Ehd3*, encoding a plant homeodomain finger-containing protein, is a critical promoter of rice flowering. Plant J. 66: 603-612.

The study on genes controlling heading time in rice

Katsuyuki Ichitani

Laboratory of Plant Beeeding, 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

Three extremely late heading mutants were induced by ion beam irradiation in rice cultivar ‘Taichung 65’, and were named KGM25, KGM26 and KGM27. The F₂ populations from the cross between the two mutants and Taichung 65 showed clear 3 early: 1 late segregation, suggesting that late heading was controlled by a recessive gene. The genes identified in KGM25, KGM26 and KGM27 were respectively tentatively named *lhd1(t)*, *lhd2(t)*, and *lhd3(t)*. Then the three genes were mapped using the crosses between the two mutants and an Indica cultivar ‘Kasalath’. The *lhd1(t)* gene was located on the long arm of chromosome 9. The *lhd2(t)* gene was located on the distal end of the short arm of chromosome 8. The *lhd2(t)* gene was located around the centromere of chromosome 9. The *lhd2(t)* might be the same locus as *EHD3* because their chromosomal location was overlapping. The *lhd1(t)* and *lhd3(t)* were thought to be a new gene because no gene with comparable effect as these genes was mapped on chromosome 9. In the crosses with Kasalath, homozygotes of late heading mutant genes showed a large variation of days to heading, suggesting the effect of the late heading mutant genes were largely affected by other genes.