

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22580020

研究課題名(和文) 極穂重型イネ品種の登熟能力向上に寄与する良登熟型遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Analysis on the function of alleles of good grain filling contributing to the improvement of grain filling ability of rice extra-heavy panicle types

研究代表者

加藤 恒雄 (KATO, Tsuneo)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：70149748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：イネ極穂重型品種の登熟向上に貢献する良登熟型遺伝子を探索したところ、ADPグルコースピロホスホリラーゼ(AGPase)小サブユニット2座、同酵素の大サブユニット2座およびショ糖トランスポーター1座に、それぞれAPS2-2、APL2-2およびSUT1-2が候補遺伝子として検出された。これら遺伝子をもつものは、発育胚乳中でAGPase活性が高く、成熟後の登熟程度も高いことが分かった。またこれら3遺伝子の中でもAPL2-2が最も強力な作用を示すことが推察された。これら3遺伝子はインド型品種に比較的高頻度で存在していた。一方、これら遺伝子を保有しても必ずしも飛躍的多収には繋がらないことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Alleles for good grain filling contributing to the improvement of poor grain filling in extra-heavy panicle types of rice were explored. As a result, APS2-2, APL2-2 and SUT1-1 at the locus for ADPglucose pyrophosphorylase (AGPase) small subunit 2 (OsAGPS2), large subunit 2 (OsAGPL2) and sucrose transporter 1 (OsSUT1), respectively, were detected as candidate alleles. The cultivars with all of these three alleles showed higher AGPase activity in developing endosperm, and higher degree of grain filling at maturity. Among these three alleles, APL2-2 might display the highest effect on grain filling. These three alleles tended to be included together in indica cultivars. Therefore, alleles for good grain filling should be searched among indica rice cultivars to serve the poor grain filling problems. However, these alleles could not contribute directly to higher yield.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、作物学・雑草学

キーワード：イネ 極穂重型品種 登熟 ADPグルコースピロホスホリラーゼ ショ糖トランスポーター 塩基配列

1. 研究開始当初の背景

イネの多収を達成するために、従来の品種よりも極めて多くの穎花数/穂を有する「極穂重型品種」が近年育成されつつある。国際イネ研究所が開発した“New Plant Type”，中国で主として開発されている Hybrid Rice あるいは Super Rice 等はこの範疇に入る。このような極穂重型品種は穎花数/穂の増大で収量シンク容量を大きく拡大したが、この穎花数/穂の増大は、登熟が不良である弱勢穎花、すなわち 2 次枝梗上穎花数の増大に専ら依存している。したがって、収量シンク容量は拡大したもののそれに対する同化産物の充填率が低下したために、必ずしも多収を安定的に達成していない。このような極穂重型イネ品種の登熟程度を向上することが、これからのイネ多収育種戦略の極めて重要な鍵となる。

研究代表者は、極穂重型の中での登熟程度の変異を広島(庄原市)と和歌山(紀の川市)の 2 か所で 7 年間に亘って解析した結果、極穂重型の中でも比較的登熟程度が高く、特に良好な環境下で登熟程度および粒重増加速度が向上するものと、登熟程度がどのような環境下でもこれらが低いものが存在することを見出した(Kato, T., Plant Production Science 13 (2010):185-192)。このような極穂重型品種内での登熟程度の変異をもたらす要因を、発育胚乳中で機能するショ糖-デンプン代謝関連酵素活性の差異に注目して検討したところ、比較的良好な登熟程度を示す極穂重型品種はそうでない極穂重型品種よりも、特に 2 次枝梗上穎花において異なる環境下でも共通して ADP グルコースピロホスホリラーゼ活性が量的にかつ有意に高いことが明らかになった(Kato, T. et al., Plant Production Science 10 (2007): 442-450)。このような酵素に関連する遺伝子座には登熟良好な極穂重型品種が共通してもつ良登熟型対立遺伝子が存在することが予想されたが、詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、上記のような極穂重型イネ品種の登熟能力に関わり登熟程度向上に寄与するような良登熟型対立遺伝子を探索し、それらの機能を様々な角度から解析することを目的とした。これによって得られた成果は、今後の極穂重型イネ品種の安定多収に向けたさらなる育種、栽培技術開発に大きく貢献することが予想できる。

3. 研究の方法

(1) 良登熟型対立遺伝子の探索

登熟程度が比較的良好な極穂重型品種、密陽 23 号、南京 11 号、登熟程度が中位であるタカナリ、登熟程度が低いアケノホシ、および非極穂重型である中生新千本とコシヒカリ、以上 6 品種を用いた。これらの葉身から全 DNA を抽出し、前述のような登熟程度の変

異に関連すると思われる ADP グルコースピロホスホリラーゼ (AGPase) のサブユニットをコードする遺伝子のうち発育胚乳中で機能することが知られている小サブユニット 2 遺伝子 (*OsAGPS2*, *APS2*) および大サブユニット 2 遺伝子 (*OsAGPL2*, *APL2*)、さらに胚乳中で機能するショ糖トランスポーター 1 遺伝子 (*OsSUT1*, *SUT1*) 以上の 3 遺伝子座について、既に登録されている塩基配列、それぞれ 0s08g0345800, 0s01g0633100 および 0s03g0170900 を基に、それぞれの末端が互いに重複し個々の遺伝子座を転写調節領域までカバーできるような断片群を増幅できるプライマーを設計した。これらによって増幅された断片を精製し、サンガー法によって塩基配列を決定、コンティグ化の後、供試 6 品種の配列を表受品種日本晴のそれと比較した。

(2) 良登熟型対立遺伝子の選抜に供し得る分子マーカーの開発

後述のように、3 遺伝子座ともに良登熟型対立遺伝子の候補が検出されたので、これら遺伝子を簡便に識別できる分子マーカーを開発した。まず、6 品種間の配列多型に基づき、可能な In/Del マーカー、SSR マーカーおよび CAPS マーカーを設計した。これらを多数の品種に対して適用し、その有効性を検証した。

(3) 良登熟型対立遺伝子の登熟に及ぼす影響

後述のように、登熟に関する遺伝子座 *APS2*, *APL2* および *SUT1* について対立遺伝子 *APS2-2*, *APL2-2*, *SUT1-2* をもつことが分かった密陽 23 号および南京 11 号、また別の対立遺伝子 *APS2-1*, *APL2-1*, *SUT1-1* をもつことが分かったアケノホシを供試し、開花後の粒重増加速度、発育胚乳中の AGPase 活性、および成熟後の登熟程度 (比重 1.00 以上の穎果の割合である精歩合および比重 1.15 以上の穎果の割合である良登熟歩合) を調査した。

さらに、上記のアケノホシと密陽 23 号の交雑 F_4 世代において、穎花数/穂がおよそ 200 以上である上記 3 遺伝子座における全遺伝子型 8 種類を系統として栽培し、成熟後に上記の精歩合および良登熟歩合を調査した。

(4) 良登熟型対立遺伝子の品種間分布

イネ日本型、インド型品種を含む 181 品種について、上記の *APS2*, *APL2* および *SUT1* の各々に関する対立遺伝子を前述の分子マーカーによって調査し、広範囲な品種間における対立遺伝子の分布および分布の関連性を調査した。

(5) 登熟が良好な超極穂重型イネ遺伝子型の開発

後述のように、両親ともに *APS2-2*, *APL2-2*, *SUT1-2* をもつ密陽 23 号と南京 11 号の交雑に由来する後代系統を、毎世代において穎花数/穂について上方向への定向選抜を加えて育

成した4「超極穂重型」系統を、対照として同じ組み合わせに由来する4無選抜系統、両親品種およびアケノホシとタカナリを通常栽培し、玄米収量(kg/10a)を調査した。これによって、登熟が良好でかつ多収であるような遺伝子型が育成されたか否かを検証した。

4. 研究成果

(1) 良登熟型対立遺伝子の探索

供試6品種の3遺伝子に関する塩基配列多型を、標準品種である日本晴とともに探索した。

その結果、3遺伝子座ともに数多くの配列多型がコード領域および5'側非翻訳領域において認められた。一方、コード領域における全ての場合、これらの配列の変化はアミノ酸の変化を伴うものではなかった。また、スプライシング部位の周辺には多型は存在しなかった。

このような配列多型から、供試6品種で共通するハプロタイプすなわち対立遺伝子の存在が認められた。すなわち、*APS*座には*APS2-1*、*APS2-2*および*APS2-3*、*APL2*座には*APL2-1*、*APL2-2*および*APL2-3*、そして*SUT1*座には*SUT1-1*、*SUT1-2*が存在していた。なお*SUT1*座の-287の中生新千本のSSR数および-81のタカナリのAの挿入については誤差の可能性もあるので考慮しなかった。

得られた対立遺伝子をみると、*APS2*および*SUT1*座では極穂重型品種の中では比較的登熟程度の高い密陽23号および南京11号が、ともに*APS2-2*、*APL2-2*および*SUT1-2*を共通して保有していた。さらに、*APL2-2*に関しては、過去の報告でやはり比較的登熟程度の高いことが知られているタカナリもまた保有していることが明らかになった。一方、登熟程度の低いことが知られている極穂重型品種アケノホシは、上記3遺伝子座ともに、密陽23号、南京11号とは異なり、*APS2-1*、*APL2-1*および*SUT1-1*を有していた。タカナリについては*APS2*および*SUT1*座については、それぞれ*APS2-1*および*SUT1-1*とアケノホシと同じであった。なお、供試した6品種に関しては、*APS2*座で中生新千本が*APS2-3*、また*APL2*座でコシヒカリが*APL2-3*と他とは異なる対立遺伝子を保有していることが分かった。以上の結果から、極穂重型で登熟程度の高いものは共通した対立遺伝子を共有している傾向にあることから、今回検討した3遺伝子座に関しては、極穂重型品種の登熟程度を高めるような「良登熟型対立遺伝子」(すなわち*APS2-2*、*APL2-2*および*SUT1-2*)の存在することが強く推察された。

(2) 良登熟型対立遺伝子の選抜に供し得る分子マーカーの開発

上記の良登熟型対立遺伝子を容易に識別するため、表1に示した遺伝子座内多型箇所のうち、転写開始点以降のものでCAPSマーカー、SSRマーカー、In/Delマーカーになりうるものについて検討し、プライマー等を設

計した。これらの分子マーカーを用いて前述の供試6品種に適用したところ、すべて遺伝子型の違いを識別できることが確認された。

(3) 良登熟型対立遺伝子の登熟に及ぼす影響

前述のように、*APS2*、*APL2*および*SUT1*座の各々に良登熟型対立遺伝子の存在が推察されたので、3座ともに良登熟型対立遺伝子、*APS2-2*、*APL2-2*、*SUT1-2*をもつ極穂重型品種、密陽23号と南京11号、そして3座ともに非良登熟型遺伝子、*APS2-1*、*APL2-1*、*SUT1-1*をもつ極穂重型品種、アケノホシを供試して、2006年、2007年および2011年に水田にて通常栽培した。これら3品種の3カ年にわたる、出穂後の粒乾物重の出穂後の累積平均気温に対する増加速度(mg/GDD)を、登熟が特に問題になる2次枝梗上穎花について2直線回帰によって推定した。

その結果、3カ年中、2006年と2011年には*APS2-2*、*APL2-2*、*SUT1-2*をもつ密陽23号と南京11号は*APS2-1*、*APL2-1*、*SUT1-1*をもつアケノホシよりも高い粒重増加速度を示し、2006年においてはその差は有意水準5%で有意となった。しかし、年次間での両群の違いに関する変動は大きかった。

次に、上記の3品種について、胚乳が最も活発に成長している出穂後10日目の2次枝梗上穎花の胚乳に関するAGPase活性を同じく3カ年にわたり測定した。

その結果、年次間変動は大きいものの、どの年次においてもをもつ密陽23号と南京11号はをもつアケノホシよりも有意に高いAGPase活性を示した。このことは、表2、3における粒重増加速度では明確ではなかったが、前2品種がもつ対立遺伝子によって発育胚乳中のAGPase活性が増加し、胚乳に転流してくるショ糖を活発にデンプンへと変換することで胚乳細胞に接する師部末端のショ糖濃度を低下させてショ糖のソースからの転流を継続していることが推察できる。

最後に、上記と同様に3品種、3カ年にわたる2次枝梗上穎果の精歩合(比重1.00以上の穎果の割合)および良登熟歩合(比重1.15以上の穎果の割合)を表1に、その分散分析の結果を表2に示す。

表1 イネ極穂重型品種密陽23号(ML)、南京11号(NJ)およびアケノホシ(AK)の3カ年にわたる2次枝梗上穎果の精歩合および良登熟歩合

年次	精歩合			良登熟歩合		
	ML	NJ	AK	ML	NJ	AK
2006	64.7	61.9	82.0	51.2	50.1	44.8
2007	76.6	64.3	77.2	59.6	36.1	9.8
2011	55.6	63.0	49.8	39.9	39.4	11.3

表2 イネ極穂重型品種密陽 23 号, 南京 11 号およびアケノホシの3カ年にわたる2次枝梗上穎果の精粉歩合および良登熟歩合に関する分散分析(値は逆正弦変換値)

変動因	df	精粉歩合		良登熟歩合	
		F	P	F	P
年次	2	16.388	<0.0001	20.386	<0.0001
品種比較	2	2.917	0.0644	59.806	<0.0001
(222) vs (111)	1	4.754	0.0345	110.365	<0.0001
群内変動	1	1.079	0.3045	9.248	0.0039
年次×品種	4	6.612	0.0003	15.619	<0.0001
年次×比較	2	9.919	0.0003	24.908	<0.0001
年次×群内変動	2	3.305	0.0458	6.331	0.0038

(222)および(111)はそれぞれ *APS2-2 APL2-2 SUT1-2* および *APS2-1 APL2-1 SUT1-1* を表わす

このように、良登熟歩合に関しては年次、品種の違いおよび両者間の交互作用すべて高度に有意となった。このことは、品種間差異を除く精粉歩合についても認められた。供試3品種を、良登熟型対立遺伝子をもつ2品種とまたない1品種に群別しそれらの間で比較すると、年次と群間の交互作用がいずれも有意になるものの精粉歩合および良登熟歩合ともに *APS2-2 APL2-2 SUT1-2* の良登熟型対立遺伝子を持つ方が持たないものに比べて有意に高い登熟程度を示すことが明らかになった。

以上のように、遺伝子型 *APS2-2 APL2-2 SUT1-2* をもつ密陽 23 号と南京 11 号は、*APS2-1 APL2-1 SUT1-1* をもつアケノホシに比べ、出穂後の粒重増加速度が一部高く、発育胚乳中の AGPase 活性が高く、かつ成熟後の精粉歩合および良登熟歩合も高いことが明らかになった。したがって、*APS2*、*APL2* および *SUT1* 座におけるそれぞれ *APS2-2 APL2-2* および *SUT1-2* 対立遺伝子は極穂重型品種の登熟程度を向上させる「良登熟型対立遺伝子」であることが強く示唆された。しかし、これら結果はごく少数の遺伝子型で検討されたにすぎない。そこで、上記の供試験品種のうち3遺伝子座とともに異なる対立遺伝子をもつ密陽 23 号とアケノホシの交雑 F_4 世代(2013年)において、3遺伝子座の対立遺伝子の全8組み合わせのうち1組み合わせ

(*APS2-1 APL2-1 SUT1-2*)を除き、かつ穎花数/穂がおよそ200以上である系統を用いて、水田で通常栽培した成熟後に2次枝梗上穎果を採取し、それらの精粉歩合および良登熟歩合を測定した。その結果を表3に示す。

表3 イネ *APS2*、*APL2* および *SUT1* 座における遺伝子型における極穂重型イネの精粉歩合と良登熟歩合

遺伝子型	精粉歩合 (%)	良登熟歩合 (%)
111	31.4 a	20.0 a
121	65.4 c	46.0 c
211	48.7 abc	27.2 ab
221	58.8 bc	47.2 c
122	54.1 bc	42.6 bc
212	36.9 ab	18.4 a
222	61.9 c	46.6 bc

表中遺伝子型の数値は左から *APS2*、*APL2*、*SUT1* 座の対立遺伝子を表わす。同じ英文字を付した平均値間には有意水準1%有意差なし

このように、精粉歩合においても良登熟歩合においても、*APL2* 座に *APL2-2* をもつものは、*APL2-1* をもつものに比べて、他の2座の遺伝子型に関わらずほとんどの場合有意に登熟程度が高いことが明らかになった。したがって、本実験の結果に関する限り、*APL2-2* が他の登熟関連遺伝子座との相互作用もなく最も強力に極穂重型遺伝子型の登熟程度を向上させることが推察された。さらに、これまで他の研究で比較的登熟良好であることが報告されている極穂重型品種タカナリは、*APS2* 座には *APS2-1*、*SUT1* 座には *SUT1-1* をもつものの *APL2* 座には *APL2-2* が存在していた。しかし、本実験で用いた遺伝子型には *APS2-1 APL2-1 SUT1-2* が欠けており、また遺伝的背景も必ずしも斉一ではない。今後は、より均一な遺伝的背景の下で、8種類すべての遺伝子型の能力を詳細に比較する必要がある。

(4) 良登熟型対立遺伝子の品種間分布

前述のように、*APS2*、*APL2* および *SUT1* 座内の塩基配列多型の一部を識別できる分子マーカーを用いて、日本型、インド型を含むイネ181品種の遺伝子型を探索した。その結果、6品種を用いて座位内前塩基配列を決定して明らかになった対立遺伝子を含み、さらに多数の対立遺伝子が見出された。このうち、稀に存在した対立遺伝子を除いたものについて検討すると、*APS2* 座においては *APS2-1* と *APS2-3* および *APS2-2* と *APS2-4*、*APL2* 座においては *APL2-1* と *APL2-4* および *APL2-3* と *APL2-5*、そして *SUT1* 座においては *SUT1-1* と *SUT1-3* および *SUT1-2* と *SUT1-4* がそれぞれ

れ類似した変異を示した。これらはイネの進化、分化において相対的に最近変異が生じたと推察できる。また、以上の対立遺伝子の検出に用いたのはいずれの座においても前述の6品種で見られた多型箇所の一部であり、今後dCAPSマーカー等により検討すると、さらに複対立遺伝子が増える可能性もある。

このように検出された3座の対立遺伝子の分布に関する相関関係を、インド型品種、日本型品種ごとにさらに検討した。

その結果、3座ともにインド型品種と日本型品種の間で遺伝子頻度に関する大きな偏りが存在することが分かった。すなわち、インド型品種では*APS2-2*、*APL2-2*および*SUT1-2*がそれぞれの座で最も高頻度となり、これらの3対立遺伝子を全て共有する品種が多く見られた。それに対して日本型品種では上記の3対立遺伝子の頻度は低く、*APS2-3*、*APS2-1*、*APL2-4*、*APL2-1*、*APL2-3*、*SUT1-1*が高頻度であり、特に*SUT1-1*は90.9%を占めた。このうち、*SUT1-1*は*APS2-1*および*APL2-1*と共有される傾向にあったが、*APS2-1*と*APL2-1*の間には特別強い共有関係は認められなかった。このような、本来独立に分離するべき対立遺伝子が同じ品種内に共有される傾向については、何らかの人為的あるいは自然選抜が機能している可能性が考えられる。また、インド型と日本型間での分布の違いは、両亜種の分化過程と関連させて今後検討していく必要がある。

いずれにせよ、極穂重型品種の登熟向上に関連することが強く示唆された*APL2-2*は、*APS2-2*や*SUT1-2*とともにインド型品種において高頻度で存在していることが分かった。今後はこのようなインド型品種から良登熟型対立遺伝子を導入して育種に資することが考えられる。

(5) 登熟が良好な超極穂重型イネ遺伝子型の開発

これまでの結果から良登熟型対立遺伝子の可能性の強い*APS2-2*、*APL2-2*、*SUT1-2*をもつ密陽23号と南京11号の交雑に由来する後代系統を、 F_2 から F_5 までの毎世代において穎花数/穂について上方向への定向選抜を加えた。その結果得られた3種類の超極穂重型系統と両親を含む4極穂重型品種を水田で2013年に通常栽培し、収量(kg 精玄米重/10a)等を測定した。

超極穂重型系統は、いずれも両親や既存の極穂重型品種に比べて穎花数/穂が増大していた。したがって、これまでの穎花数/穂に対する上方向への選抜は有効であったと考えられる。一方、これらの選抜系統の良登熟歩合は両親品種並みかもしくはやや下回った。その結果、精玄米重についてはFSP 7が両親と同等のほかは両親よりもやや低くなっていた。このように、穎花数/穂のみに対する選抜では飛躍的な多収は達成できず、ソース能力等、総合的に改良していく必要がある。

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3件)

Kato, T., A trial to develop novel genotypes of extra-heavy panicle types with good grain filling in rice, 作物研究 査読有 58, 2013, 15-20,

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009646234>

Kato, T., Horibata, A., Non-random distribution of the alleles for good grain filling at *OsAGPS2* and *OsSUT1* among a wide range of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars, Breeding Science 査読有 61, 2011, 217-220,

<http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs.61.217>

Kato, T., Taniguchi, A., Horibata, A., Effects of the alleles at *OsAGPS2* and *OsSUT1* on the grain filling in extra-heavy panicle type of rice, Crop Science 査読有 50, 2010, 2448-2456
doi:10.2135/cropsci2009.11.0690

[学会発表](計2件)

久保 竜一, 堀端 章, 加藤 恒雄, イネ組換え近交系の出穂後の稈におけるデンプン含量およびデンプン代謝関連遺伝子発現量の推移, 近畿作物・育種研究会第175回例会, 2013年7月13日, 近畿大学生理工学部(和歌山県紀の川市)

加藤 恒雄, 登熟良好な新規極穂重型イネ遺伝子型を開発する試み, 近畿作物・育種研究会第173回例会, 2012年7月14日, 近畿大学農学部(奈良県奈良市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://researchmap.jp/search/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 恒雄 (KATO, Tsuneo)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号: 70149748

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

堀端 章 (HORIBATA, Akira)

近畿大学・生物理工学部・講師

研究者番号: 70258060