

イネ転移因子 *mPing* の収量関連
形質に対する変異誘発効果

2018

許 冲

目次

第 1 章. 緒論	・ ・ ・ 1
第 2 章. 生育強勢個体の後代における収量関連形質の QTL 解析	・ ・ ・ 5
2.1. はじめに	・ ・ ・ 5
2.2. 材料および方法	・ ・ ・ 7
2.2.1. 供試材料	・ ・ ・ 7
2.2.2. DNA 抽出	・ ・ ・ 7
2.2.3. PCR	・ ・ ・ 8
2.2.4. 遺伝地図構築と農業形質に関する QTL 解析	・ ・ ・ 8
2.3. 結果	・ ・ ・ 13
2.3.1. F ₂ 個体の農業形質における変異	・ ・ ・ 13
2.3.2. 遺伝地図	・ ・ ・ 13
2.3.3. QTL 解析	・ ・ ・ 13
2.4. 考察	・ ・ ・ 18
第 3 章. <i>mPing</i> タグライン突然変異系統群を利用する収量関連形質の分析	・ ・ ・ 20
3.1. はじめに	・ ・ ・ 20
3.2. 材料および方法	・ ・ ・ 21
3.2.1. 供試材料	・ ・ ・ 21
3.2.2. 収量関連形質の測定	・ ・ ・ 21
3.3. 結果	・ ・ ・ 23
3.3.1. 粒形質に対する変異誘発効果	・ ・ ・ 23

3.3.2. 出穂期に対する変異誘発効果	・ ・ ・ 28
3.3.3. 穂形質に対する変異誘発効果	・ ・ ・ 30
3.4. 考察	・ ・ ・ 37
第4章. ML 系統の誘発変異と関連する <i>mPing</i> 挿入の探索	・ ・ ・ 40
4.1. はじめに	・ ・ ・ 40
4.2. 材料および方法	・ ・ ・ 41
4.2.1. 供試材料	・ ・ ・ 41
4.2.2. DNA 抽出	・ ・ ・ 41
4.2.3. NGS ライブラリーの調整	・ ・ ・ 41
4.2.4. NGS および誘発変異に関連する <i>mPing</i> 挿入の検索	・ ・ ・ 43
4.3. 結果	・ ・ ・ 45
4.3.1. NGS 解析結果および <i>mPing</i> 隣接配列の抽出	・ ・ ・ 45
4.3.2. 変異系統における <i>mPing</i> 挿入の検証	・ ・ ・ 48
4.4. 考察	・ ・ ・ 49
第5章. 総括	・ ・ ・ 51
謝辞	・ ・ ・ 53
引用文献	・ ・ ・ 54
摘要	・ ・ ・ 59

第 1 章. 緒論

細胞内においてゲノム上の位置を何らかの条件下で転移のできる、より短い塩基配列は転移因子といい。転移因子は、ゲノム中の遺伝子あるいはその近傍に切出、転移もしくは挿入して、DNA 配列の構造や発現パターンを変化させ、突然変異の原因の一つとなっている (Shan et al. 2005)。転移因子は事実上あらゆる生物種に存在する。トウモロコシでは、ゲノム配列の主要な構成要素であり、85%以上が転移因子を含有している (Schnable et al. 2009)。イネ染色体 4 の配列分析により、全配列の半分以上が転移因子を占めている (Feng et al. 2002)。ほかにシロイヌナズナなどの植物、ヒトおよび動物のゲノムにも広く分布している (Turcotte et al. 2001, Kazazian 2004, Paterson AH et al. 2009 and de Koning et al. 2011)。

転移因子は、一般的に移動の仕組みによって、クラスIおよびクラスIIの2種類に分類される。この2種類は構造のみならず、転移様式も大きく異なっている (Feschotte, Jiang, and Wessler 2002)。DNA 型転移因子の転移では、転移因子がゲノムから切出され、他の部位に挿入される。さらに、挿入した因子は再び切出される時に表現型が元に戻ることがあるため、不安定な変異を引き起こす場合が多い。その一方、レトロ転移因子の転移では、転写、逆転写を介して複製され、ゲノムの他の部位に挿入される。また、レトロは一度挿入すれば、再び切出されることがないため、DNA 型より安定な変異を引き起こす (Takeda et al. 1999)。

Miniature Inverted-Repeat Transposable Element (MITE) は非自律性 DNA 型転移因子のことを示し、植物ゲノムの中で多数存在している。特にイネゲノムの中で、MITEs は 90,000 コピー以上存在しているが、多くはユークロマチン領域に分布し、遺伝子発現の制御に関与していると報告された (Feng et al. 2002)。

miniature Ping (*mPing*) はイネゲノムで初めて同定された非自律性の活性型 MITE である (Jiang et al. 2003; Kikuchi et al. 2003; Nakazaki et al. 2003)。全長が 430bp の DNA 配列であ

り、両端に 15bp の TIR (Terminal Inverted Repeats) を含んでいる。*mPing* は ORF (Open Reading Frame) を含んでいないため、*Ping* または *Pong* の二つの ORF (myb 転写因子の DNA 結合ドメインと類似したタンパク質をコードする ORF1 および転移酵素をコードする ORF2) によって転移されている (Jiang et al. 2003; Kikuchi et al. 2003 and Yang et al. 2007)。

イネ品種日本晴において *mPing* は 50 コピーがあるに対して、銀坊主は 1000 コピー以上を持つことから、*mPing* は一部のイネ品種でいまなお活発的に転移している (Naito et al. 2006)。近年の研究から、*mPing* の新規挿入により、近傍遺伝子への機能的変異をもたらした。

銀坊主および愛国系 A123 において、遺伝子 *Os02g0135500* の上流 41bp に *mPing* 挿入を有することが分かっている。この 2 系統に加え、同位置に挿入を持っていない日本晴および愛国系 A157 に低温ストレス、塩ストレスおよび乾燥ストレス処理を行って遺伝子 *Os02g0135500* の発現量を調べた。その結果、自然条件下で、この遺伝子の発現量は 4 系統においてほぼ同じになっているが、一方、低温ストレスおよび塩ストレス条件下では *mPing* 挿入のある銀坊主および A123 において、明らかにその発現量が上昇したことが明らかにした (Naito et al. 2009)。早生突然変異系統 HS110 は出穂期関連遺伝子 *Hdl* のイントロに *mPing* を挿入した結果、転写産物に機能型を加え、一部の *mPing* 配列が転写される産物および *mPing* の全配列を転写されたがエキソン 2 が転写されなかった産物も含んでいるため、機能型転写産物の含量が低下し、出穂日が早生化した結果に至った (Kum et al. 2015)。晩生突然変異系統 HS169 にある出穂期関連遺伝子 *ehd1* の第 2 エキソンに *mPing* の挿入を有することによって、*mPing* を含むエキソン 2 の一部もしくは全部が欠失した転写産物が生じた (Nishida et al. 2002; Saito et al. 2009 and Xu et al. 2014) ため、晩生化した。したがって、*mPing* の挿入によって転写のタイミングや転写産物の構造を改変されると考えられる。また、

mPing の転移メカニズムにおけるゲノムへのわずかな改変は、より少ない遺伝子を破壊することによって原ゲノムにあたって有害ではない可能性があるとの報告もあった (Gilbert et al. 2015)。

mPing が特異的に銀坊主の中で転移活性が高いが、多くは原因遺伝子の上流に挿入したため、表現型がそれに応じた多様性を示していなかった。しかし、銀坊主種子を γ 線照射し、得られた変異個体集団の中で、生育低下を示した細粒突然変異個体 IM294 を含んでいる。その原因はユビキチン様タンパク質をコードする遺伝子 *Rurm1* (*rice ubiquitin related modifier-1*) のエキソン 4 に *mPing* を挿入することによって、遺伝子の機能喪失を生じた (Ohmori et al. 2008)。IM294 の自殖次代において、原因遺伝子から *mPing* が正確な切り出しによって銀坊主へ正常復帰する個体を得られた。しかし、復帰個体の中には IM294 および銀坊主よりも旺盛に生育する強勢変異体 (Vigorous Growing IM294、以下、VGI) が低頻度で出現した。VGI 以外にも農業形質に関係する様々な変異が復帰突然変異に伴って誘発される個体がしばしば得られた。これらの農業形質に関連する突然変異は *mPing* の活発的な転移によって生じた結果になり得ると推測した。突然変異集団を用いて原因を探索することで、有用かつ新たな育種方法の開発に貢献できたらと考えられる。

以上のことから、本研究は銀坊主から得られた様々な表現型を持つ突然変異集団を用いて、転移因子 *mPing* とイネ表現型の関係を調べ、IM294 および IM294 からの派生系統に分離する復帰型個体の自殖後代を用いて収量構成要素に関する誘発変異と *mPing* 転移との関係を調査した。第二章では銀坊主後代に出現した強勢形質変異系統 VGI (Vigorous Growing IM294) の QTL 解析を行った。第三章では *mPing* タグライン突然変異系統群を利用する収量構成要素の解析を行った。そして第四章は第三章の結果と次世代シーケンサーに基づいて、表現型の変異と *mPing* の関係を解析した。最後に第五章で全体的まとめ

をした。

第2章. 生育強勢個体の後代における収量関連形質の QTL 解析

2.1. はじめに

銀坊主の種子を γ 線照射した後代より得られた細粒突然変異系統 IM294 は、*Rurm1* (*rice ubiquitin related modifier-1*) 遺伝子のエキソン 4 への *mPing* 挿入によって生じた劣性の細粒突然変異系統である。原因遺伝子からの *mPing* の正確な切り出しによる正常粒個体への復帰突然変異は極めて高い頻度で生じる (Nakazaki et al. 2003)。多くの DNA 型転移因子でも転移因子がゲノムから切出されると表現型が原品種型に復帰する。しかし、IM294 の場合は、細粒変異系統の自殖次代では粒形が原品種銀坊主に復帰するだけでなく、一部の個体は銀坊主よりも著しく生育が旺盛となる生育強勢個体 (Vigorous Growing IM294、以下、VGI 系統) が分離する (Horibata & Yamagata 2000, Yamagata & Shakudo 1968)。多くの場合、VGI は銀坊主に比べて高い草丈、多い分けつ数、長い穂長および大きな種子サイズなどの収量関連形質にも変異が認められる。他の系統・品種との交雑の可能性は、IM294 に特異的な *Ping* の挿入箇所をマーカーに用いることで比較的容易に区別できる。また、トランスポゾンディスプレイ (Transposon Display、以下、TD) の結果、*mPing* の転移頻度は VGI において爆発的に上昇していると推定されている (Tsukiyama, 2013)。これらのことから、VGI に観察される生育強勢は *mPing* の転移と密接に関連すると推定される。しかし、VGI 個体において強勢形質が発現する機構の詳細は未解明である。VGI に観察される生育強勢に関わる形質の遺伝を明らかにできれば、VGI の後代に誘発された収量関連形質における変異を育種的に利用することが可能になると期待される。

本章では、VGI の生育強勢に関連する特性の遺伝を調査するため、1 個体の VGI の自殖次代系統 VG-15 の中から生育強勢に関連する特性をもつ個体と日本晴とを交雑し、得られた F₂ 集団 (Fig.1) を用いて収量関連形質に関する QTL 解析を行った。なお、遺伝地図の作

製には、SSR マーカーと *mPing*-SCAR (Monden et al., 2009) を用いた。

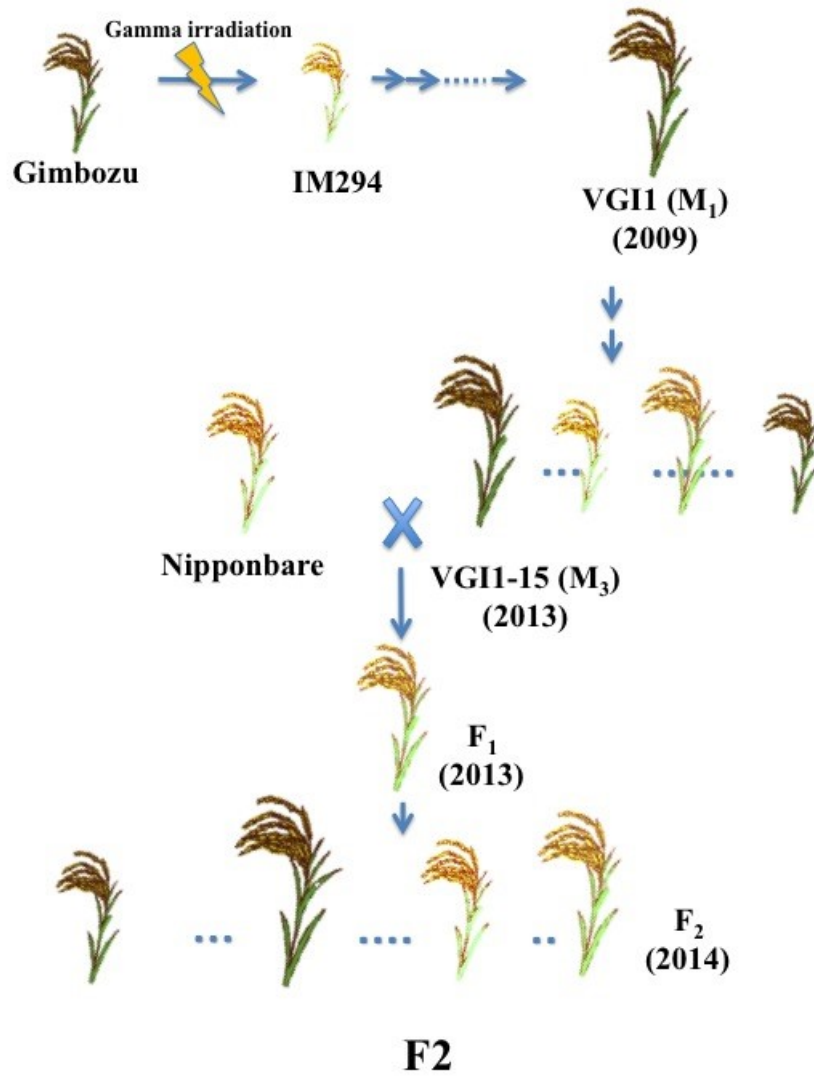


Fig.1. F₂ population originated from the cross between VG-15 and Nipponbare

2.2. 材料および方法

2.2.1. 供試材料

イネ品種銀坊主と日本晴ならびに、細粒突然変異系統 IM294 および VGI の自殖後代 VG-15 を供試した。VGI 関連形質の遺伝分析には日本晴と VG-15 の交雑後代 F₂ 世代を用いた。

2008 年に IM294 (細粒) の自殖後代に分離した単一の復帰変異個体 (正常粒) が生育強勢を表したため VGI と見做し、VGI の自殖次代系統 (VG 系統) を育成した。2013 年、日本晴、銀坊主、IM294 および VG 系統を京都大学農学研究科付属京都農場 (北緯 35°01′、東経 135°47′) に株間 10cm、畝間 30cm で栽培した。VG 系統では草丈、分けつ数、穂長と粒形に関して大きな分離が認められた。VG 系統のなかの 1 個体 VG-15 は日本晴と比較して草丈が高く、穂長が長く、粒形が大きいなど、VGI に特徴的な表現型を示した。VG-15 が保有する VGI 関連形質の遺伝解析を行うために、VG-15 と日本晴の交配を行った。2014 年、合計 94 個体の F₂ を 1 つのワグネルポットに 1 植物体ずつ移植した。各ポットに 2.38g (NH₄)₂SO₄、0.83g Ca(H₂PO₄)₂·H₂O+CaSO₄ および 2.86g KCl を施肥した。成熟期に、すべての F₂ 植物の種子を収穫した。なお、両親として日本晴 3 個体、VG-15 の自殖次代から無作為に選んだ 3 個体も同じ要領でワグネルポットで栽培した。

2.2.2. DNA 抽出

ポットへの移植前にすべての個体の幼苗から葉身約 3cm をサンプリングした。それぞれ液体窒素で凍らせて、マルチビーズショッカー (安井器械、大阪、日本) で破碎した。60°C に加温した CTAB 溶液 (2xCTAB を 40ml、SDS を 0.4g、PVP(K30)を 0.4g、2-メルカプトエタノールを 100 μ l) を加えて 60°C で 30~120 分間振とうした。サンプルを室温まで冷却し CIA を 1ml ずつ加えて室温で 30 分間穏やかに振とうした。その後 15000G で 5 分間遠心 (ト

ミー精工、東京、日本) 後、回収した上清に等量のイソプロピルアルコールを添加した。15000G で 10 分間遠心して沈殿した DNA ペレットを 70%エタノールでリンス・乾燥した。さらに、RNase 添加 1/10 TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 および 1 mM EDTA) を加え 37 °C、30 分間処理した後、DNA サンプルを -30°C で保存した。

2.2.3. PCR

F₂ 個体および両親の DNA サンプルを用いて、遺伝地図作成のために 48 個の *mPing*-SCAR マーカー (Monden et al., 2009, Table.3) と 9 個の SSR マーカー (Table.2) の遺伝子型を PCR によって決定した。

SSR マーカーの PCR は鋳型 DNA・1 μ l (30ng) 、2.5 μ l・2 \times GoTaq[®]Green Master Mix (Promega、WI、USA)、0.25 μ l・STDW 、0.5 μ l・2.5 μ M 各プライマーおよび 0.25 μ l・ジメチルスルホキシドの全量 5 μ l でおこなった。PCR サイクルは、94 °C・10 分間熱解離した後、94 °C・30 秒間、50°C・1 分間、72 °C・30 秒間を 35 サイクル行った。PCR 産物は 15% プリアクリルアミドゲルで電気泳動により分離した。

mPing-SCAR マーカーの PCR は、鋳型 DNA・1 μ l (30ng)、2.5 μ l・2 \times GoTaq[®]Green Master Mix (Promega、WI、USA)、0.75 μ l・STDW 、0.5 μ l・2.5 μ M プライマーおよび 0.25 μ l のジメチルスルホキシドの全量 5 μ l でおこなった。PCR サイクルは、94 °C で 3 分間熱解離した後、94 °C・30 秒間、57°C・45 秒間、72 °C・1 分間を 35 サイクル行った。PCR 産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動により分離した。

2.2.4. 遺伝地図構築と農業形質に関する QTL 解析

Mapmarker ver.3.0.を用いて、94 個体の F₂ 個体の遺伝子型データから遺伝地図を構築した。全 F₂ 個体を収穫して、一穂穎花数 (number of filled spikelet per panicle、以下 NFS)、穂長 (panicle length 、以下 PAL)、一次枝梗数 (number of primary branches per panicle、以下 NPB)、二次枝梗数 (number of secondary branches per panicle、以下 NSB)、百粒重 (100-seed-weight 、以下 HSW) ならびに地上部乾物重 (air-dried weight above ground part 、以下 DGW) を測定した。また、10粒をとって画像解析ソフトを用いて、粒面積 (surface area size of glume、以下 SAG)、粒長 (glume length、以下 GLH) および粒幅 (glume width、以下 GWH) を測定した。得られたデータを用いて9つの形質の QTL 解析を行った。解析ソフトは QTL Cartographer 2.0 を使い、LOD スコアの閾値は順列試験を 500 回計算した後に決定した。

Table.2. Nine SSR markers used for genetic map

Primer Sequence			
Name	Chromosome	Forward primers	Reverse primers
*RM5654	2	TGCAACTCGCGTATAACAATA	CCAAGTTCGTTACAGCAGAG
*RM1358	2	TCACGAGTCGTTTCGTTCTTG	CTTGCTGCTCAAGTGGTGAG
*RM208	2	TCTGCAAGCCTTGTCTGATG	TAAGTCGATCATTGTGTGGACC
*RM3394	7	CCCTTACGTGCAGTACATTG	ATGCAGGCTACTTACTAGCG
*RM5432	8	GTTTCCCCACTTATCTCCCC	AAGCGAGGAGGGGTTTAGAG
*RM223	8	GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC	GAAGGCAAGTCTTGGCACTG
*RM2855	9	GGAGCTTAGAATCTCACCTA	CGCATTTTCCTATACATACA
*RM1125	10	GGGGCCAGAGTTTTCTTCAG	GTACGCGCAGAAAATGAGAG
*RM17	12	TGCCCTGTTATTTTCTTCTCTC	GGTGATCCTTTCCCATTICA

Table.3 *mPing*-SCAR markers used for genetic map

Name	Chr. No.	Primer Sequence	
		Forward Primer	Reverse Primer
MK1_62	1	AGGTGGTTGTGTGGGAAGAG	TCTAGCTTGCTGCCTACCAG
MK1_92	1	TCCCTTTCCATTTCCCGAC	AAGGAAGCTGTGGCATTGG
MK1_113	1	AATGTCCGAGGAGTTGGGTG	TGTGAACTAGGTGGAGATGCC
MK1_131	1	ATCTCCAGCCCTTCACATCC	CGCTGCTCTTCTCTCTCCTC
MK2_2	2	GTAGCTGCTTGCGTCCTCTA	TAAAACGGTTTCGTCTCGTG
MK2_80	2	CACAAGAACTCCAGACAGCG	AAGAGAGAAGAGCAGCGGAC
MK3_59	3	GAAGTGGCACTCTCTCTCCG	TCCTCCTCCTCTCCTTCTCC
MK3_14	3	AATCAACGCGTGGTTGTGCT	GGTGAAGTTTCAACGCAGGA
MK3_86	3	TAATTCGGACGGAGCCCTG	CGCAGTTAAGACGGCTAAGG
MK3_142	3	GGTGTGAAATGGCCTACGTG	GCATGGTCGGAGAGAGAGAC
MK4_6	4	TGTAAACTTCTTGCCCGGAC	CATCAAGCTCATGTTTCATCC
XC4_2	4	CCTGGGTATGGGAAATGTTG	CGGTTAAGTTTGTCCCCGTA
XC4_3	4	TCTCCCAATCTCCTTTGAA	TTGCCTTGGATTGAGTGGAT
XC4_4	4	TCATGCAAGACATGGTGTCC	CCCTCTGTGGCTGATTGTTT
XC4_5	4	ATGGACAGGTTTCATGGGAGA	CCGGCATTTCGTTGATATCTT
XC4_6	4	GGGGGTTTGGTTAGGGTTTA	AACGTGGGAGAATTGAGACG
XC5_17	5	GCGAGAGGGAGAGATTGGTT	AGAATTCCCAGTCCACGACG
XC5_18	5	CCCATTGCACAGGACAAACG	GCCCTTAATGTAACCATCTAGTGC
XC5_16	5	AGTGCATAGCTCAAGGCATCA	TCTACGGCTCTTCTCTGTGC
XC5_20	5	GACGTACCGTGCATTTGCTG	CCCCCTGAATCGAAGGCAAT
XC5_22	5	TATGGCTTGCACTGCGAGAA	GTCCAGCGCTACAGGAGTAC
XC5_23	5	TTCGCACAACACATCTCGGA	ATTTGCCACACACCTCTCC
MK6_29	6	AAACCCATTTGCTACGCATC	CAGGGAAAGTGTTACCTGGC
MK6_30	6	AATTAGTGCCCAAACATCCG	GATTTGGGAATCTGTCTCGC
MK6-47	6	GCACCAAGCCGTAGGAATAC	TCCATAGTGGCAAATTGTGG

(To be continued)

(Continued)

Primer Sequence			
Name	Chr. No.	Forward Primer	Reverse Primer
MK6_9	6	TGTGCTGTTGGAGTAGTACT	TAACCGTTGGCTGATGCATG
MK7_9	7	AAGCACCATTCTAGAAGGTC	CCTCATGAGTCAGAGATCGA
MK7_8	7	TCCTCATCCATTCCCACGAC	CGACATAAGCAACCGCATGG
XC7_1	7	TTATTTTTGCGGCGATTTTC	ACATCATGCCACATTTTCCA
MK8_44	8	GCCATCGGAAGAGAAAGGAG	TTCAACATTCCAACCCATCG
MK8-7	8	ACAGATCGACACAAACGTCG	TCCAGATGCATCCTTAGCTG
MK8-8	8	TCGTCATGGTCGTCGAAATC	GCTACTCCTACTAGCTGAAG
MK8_65	8	TAGTGGCCTTGCATGTGTTG	GGTCCATGAGCTTGGGTTTG
MK9_16	9	CCATACCCATCATTCCCATCC	CCACGTAAAGACAAGCGAGG
XC9_1	9	ATGCGCAATTGACTACGATG	TTCTTGCTGCAACGTTATGG
MK9_23	9	GTCTTCAGCACCTCCTACCC	TGTCTTCTAGCCATGAGCCC
XC9_3	9	CGTTCACAGGCATTGTTAC	GTAGACAGGGGCAGTTCCAA
MK9_10	9	GAGAGAAGAGATGAGAGAGA	ATGCATGCATGATGAGTAGG
MK10_37	10	GCGTGCGTATGGTAGGAAAG	ACGTGGGCTAATTCTGTGC
MK10_10	10	GATGATGCTTCTGCATGCAC	AATCGGCAGGCCTGAATTAA
MK10-13	10	TCCTTCTCTAGGAGTGGAGT	CTTAACTAGGGAAGGCAATG
MK10-32	10	GCACCATTATTCCTGCTGGC	TAGCCGGTAGCCACTCACAG
MK11_47	11	TGCATGGTATCGTCCTCACC	TCCCTCCAGTCACAAACAGG
MK11_50	11	ATGACCTGAAACGGAGGGAG	GTTGCACTGGTCGTTCTTG
MK11_52	11	AAGGCATCACACAAACTGAC	AGCGACGAAGAATATGTGCG
MK11_55	11	TGAGCATTGTGGTCAGTGC	TTGATTGCCGTGTCAGTACG
MK12_88	12	CGGCGTTTAGCCCAGTAATC	CTCCAAGCCACCTGCTATATG
XC12_11	12	AGTGTGTTTGGGCTTTTGG	GCAGAGTAGCAAGCACCACA

2.3. 結果

2.3.1. F₂個体の農業形質における変異

VGIの自殖後代系統VG系統では、ほとんどの個体は日本晴と比較して草丈が高く、とりわけVG-15は草丈が高いだけでなく、日本晴と比較して穂長が長く、一穂粒数ならびに種子サイズが増大していた。

VG-15と日本晴との交雑後代F₂集団において、測定した9形質の頻度分布を親系統である日本晴とVG-15の平均値とともに示した(Fig. 4)。NFS、PAL、NSB、HSWおよびDGWでは両親間の差異が見られなかったが、分布全体が日本晴に比べて明らかに大きな値の方向に偏っていた。NBPでは、日本晴の平均値がVG-15より大きくなった。粒形質では、VG-15の値が日本晴よりも大きな値を示し、SAG、GLH、GWHの頻度分布では大部分のF₂個体が両親間に分布した。粒形以外の形質において、前の世代ではVG-15と日本晴との間に観察された生育強勢に関連する形質値の差異がVG-15の後代で認められなくなったのは、VG-15の特性が後代で分離したためと考えられた。

2.3.2. 遺伝地図

遺伝地図はF₂集団の9個のSSRマーカーと48個の*mPing*-SCARマーカーの遺伝子型データを用いて作製した。遺伝地図作製にはMapmarker ver.3.0を用いた結果(Fig.5)、全長1780.5cM、12リンケージグループから成る平均マーカー間距離31.2cMの遺伝地図が作製できた。

2.3.3. QTL解析

区間マッピングの結果、7形質に9QTLが検出された。百粒重に関しては、3QTLs

(*qHSW1*, *qHSW2*, *qHSW3*) が、それぞれ Chr. 1、Chr. 3 と Chr. 5 に検出された。また、Chr. 7 には、地上部乾物重の QTL (*qDGW*) が検出された。一穂穎花数の QTL(*qNFS*)と二次枝梗数の QTL(*qNSB*)は Chr.2 で検出された。粒面積の QTL(*qSAG*)と粒長の QTL(*qGLH*)が Chr. 8 のほぼ同じ位置に検出された。また、粒幅の QTL(*qGWH*)は Chr.5 の *qHSW3* 近傍に検出された。(Table. 6)。

qSAG と *qGLH* は Chr.8 の同じ場所に検出されたため、この位置に座乗する遺伝因子は主に粒長を通して粒面積の大きさに寄与すると考えられる。*qHSW3* と *qGWH* は Chr.5 に検出され、両者ともマーカーXC5_18 と連鎖するため、この QTL は百粒重を粒幅で制御していると考えられる。*qNFS* と *qNSB* は Chr.2 に検出されたが、検出された位置は大きく異なり、F₂ 集団では一穂穎花数と二次枝梗数の間に相関が見られなかった。

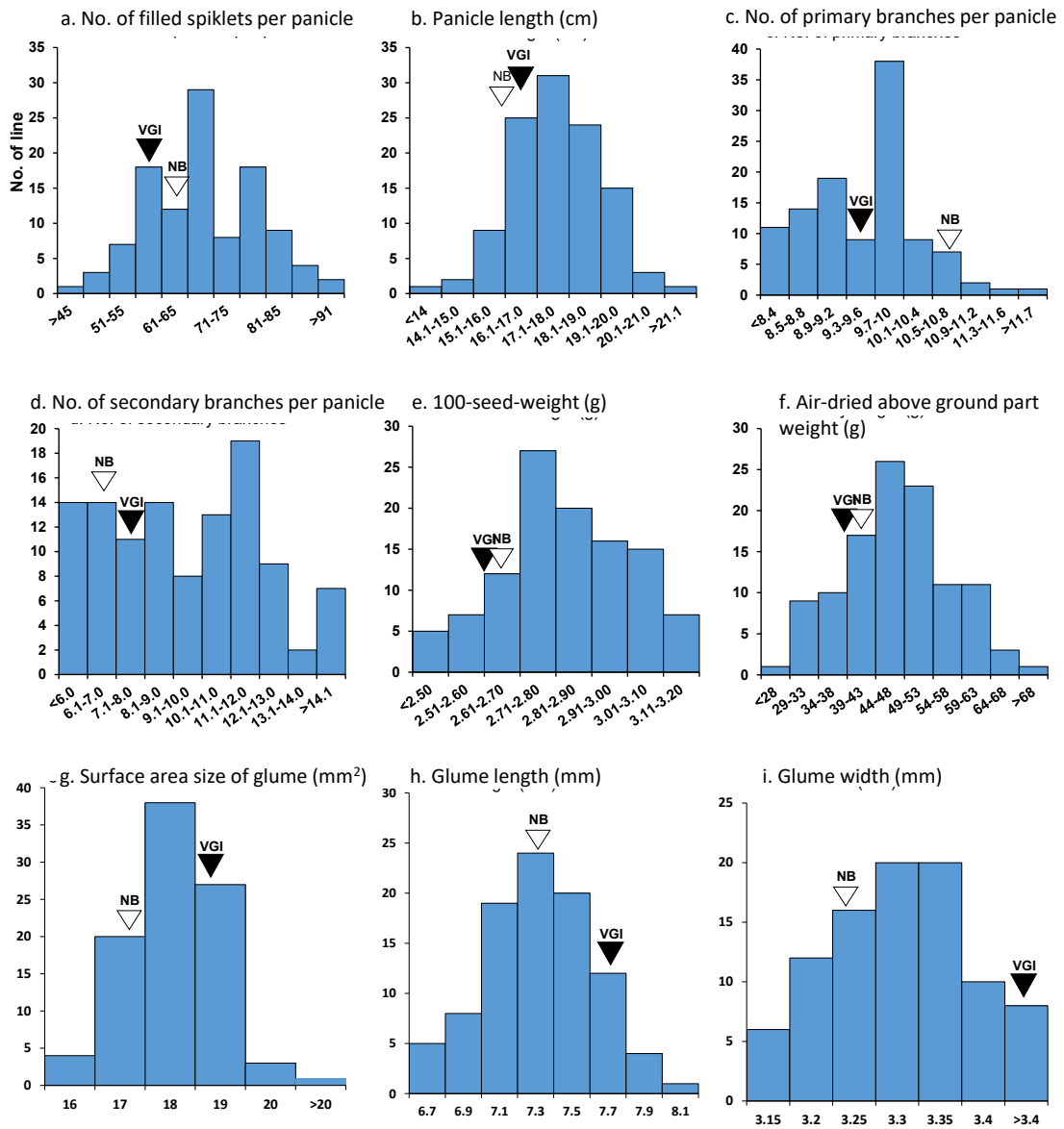


Fig.4. Frequency distributions of nine agronomic traits segregating in the F₂ population originated from the cross of Nipponbare and VG-15.

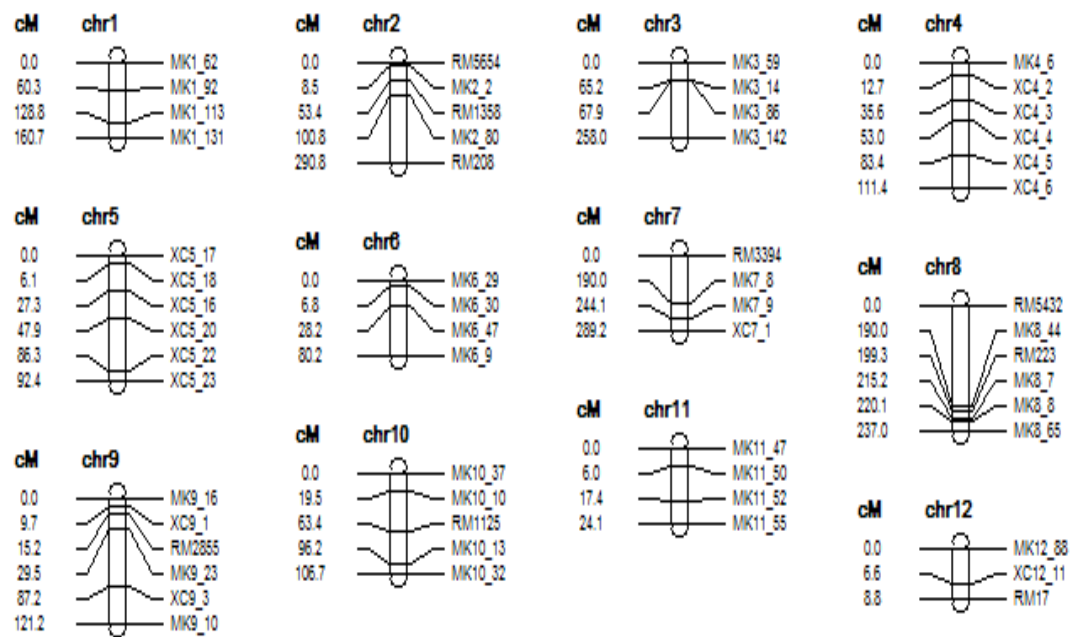


Fig.5. Genetic map constructed using F₂ population of the cross between Nipponbare and VG-15.

Table.6. Detected QTL regions in F₂ population of the cross between Nipponbare and VG-15

Trait Name	QTL Name	Chr.	Postion(cM)	Nearly Marker	LOD	Additive effects	Contribution
Air-dried above ground part weight	<i>qDGW</i>	7	56.01	RM3394	2.84	5.53	0.20
100-Seed-Weight	<i>qHSW1</i>	1	60.01	MK1_92	2.89	5.05	0.04
100-Seed-Weight	<i>qHSW2</i>	3	92.95	MK3_86	3.37	13.25	0.26
100-Seed-Weight	<i>qHSW3</i>	5	6.01	XC5_18	3.35	4.61	0.03
No. of filled spiklets per panicle	<i>qNFS</i>	2	163.8	MK2_80	2.60	0.02	0.08
No. of secondary branches per panicle	<i>qNSB</i>	2	38.52	MK2_2	2.99	4.89	0.75
Surface area size of glume	<i>qSAG</i>	8	236.14	MK8_8	3.88	0.67	0.19
Glume length	<i>qGLH</i>	8	236.14	MK8_8	4.33	0.22	0.20
Glume Width	<i>qGWH</i>	5	19.07	XC5_18	2.90	0.03	0.05

2.4. 考察

圃場栽培条件下で VGI の自殖後代に分離した VG-15 は日本晴より粒形サイズが大きく、収量関連形質に関しても増収方向への変異を示した。日本晴と VG-15 の交配後代 F₂集団では、9 農業形質が連続分布を示し、穂長、一穂穎花数、地上部乾物重および百粒重では日本晴よりも大きな値を示す個体が多く分離した。これらの形質は VGI で観察された生育強勢と密接に関連すると考えられた。

QTL 解析では、粒形質に関して複数個の QTL 領域が検出された。既に報告されている粒形関係の QTL の中には、Chr.3 にある粒長に関する QTL *GS3* (Fan et al. 2006)、Chr.5 にある粒幅に関する QTL *GS5* (Li et al. 2011) および Chr.7 にある粒形に関する QTL *SLG7* (Zhou et al. 2015) がある。したがって、Chr.5 に見出された粒幅に関する QTL (*qDWH*) は、*GS5* と同座である可能性が高い。また、Chr.8 に見出された粒長に関する QTL、*qGLH* は新規 QTL であると判断される。Chr.7 には、バイオマス関連の QTL (*qGDW*) も検出されたが、ポット栽培であるためこれ以上の解析は実施しなかった。ただし、Gramene QTL Database (<http://archive.gramene.org/qlt/>)によれば、検出された地上部乾物重に関する QTL (*qDGW*) は Chr.7 の同じ位置にすでに報告されている。二次枝梗数の QTL が Chr. 2(111.2- 114.2cM)に報告されているが、本研究で検出された二次枝梗数に関する QTL (*qNSB*) は Chr.2 の 38.52cM (近傍マーカー：MK2_2) 付近に位置するため、*qNSB* も新規 QTL と考えられる。

本研究では、VGI の後代個体から生育強勢に関連する複数個の QTL を検出することができた。検出された QTL の中には、粒長に関する QTL (*qGLH*) および二次枝梗数に関する QTL (*qNSB*) のように従来報告のない位置に検出された QTL も含まれていた。これらの結果から、VG-15 には複数箇所のゲノムに変異が生じていることが明らかになった。このことから、VGI に認められる生育強勢にも *mPing* 転移の活性化に伴って、なんらかの原因で生

育強勢に関連する複数の形質に対して同時に生じる変異が密接に関連していると推察された。したがって、今後は誘発される変異と *mPing* の新規挿入との関連を明らかにして、VGI が分離する機構を解明する必要がある。

第3章. *mPing* タグライン突然変異系統群を利用する収量関連形質の分析

3.1. はじめに

イネ品種銀坊主の γ 線照射後代に生じた細粒突然変異系統 IM294 は発見してから年々と自殖させることによって、細粒形質を維持できるようになった。自殖して得られた復帰個体集団の中で、前章に述べたような強勢形質を持つ系統のみならず、例えば出穂期、粒形、穂長、一次枝梗数、二次枝梗数、分けつ数など収量と関係する重要な農業形質を含む様々な形質の変異も現れた。ただし、細粒系統と正常粒個体を交配すれば、生じた後代も正常粒であるため、この正常粒と細粒突然変異系統による復帰個体から生じた正常粒個体は目視で見分けることが困難である。そこで、堀端らは目視で簡単に見分けることができる ML 細粒系統を作った（堀端、2015）。前章では、*mPing* が活発的に転移する個体 VGI を用いて、百粒重および一穂あたりの穎花数に関する収量関連形質の誘発効果を認められた。このような効果において IM294 の復帰型後代での遍在性を確認するために、本章では、積極的な *mPing* 転移を有する ML 細粒系統を用いて、IM294 の復帰後代の中で非細粒系統の収量関連農業形質を分析した。

3.2. 材料および方法

3.2.1. 供試材料

細粒系統 IM294 の復帰後代に表現型が正常粒後代と他殖に生じた正常粒後代を区別するため、堀端らはマーカー遺伝子 *GLOD HULL AND INTERNODE 2(gh2)* を導入した IM294 の派生系統を育成し、派生した細粒系統に分離した復帰型個体（正常粒）の後代から ML 系統群を育成した。*gh2* をもたない系統・品種との他殖個体の穎は黄褐色を呈する (Zhang et al. 2006) ことがないことを利用して、穎が黄褐色を呈する *Rurm1* 座の復帰突然変異による正常粒個体と区別した。

2005 年に細粒系統に分離した *gh* 形質を示す正常粒個体 (R1) は、次年度に R1 個体別自殖次代系統 (R2 系統) として栽培し、R2 個体別に単粒系統法により個体別に自殖を繰り返して誘発変異を固定することにより *mPing* タグライン (ML) を育成した。2015 年に、4 個体の R1 個体に由来する 4 ML 群、すなわち RA 系統群、RK 系統群、RL 系統群、および RV 系統群の R6 個体に着生した種子 (R7) を近畿大学生物理工学部の堀端博士より分譲頂いた。本章では、4 ML 群を用いて復帰個体に誘発された農業形質に対する誘発変異を調査した。

RA 系統群 130 系統、RK 系統群 101 系統、RV 系統群 121 系統、および RL 系統群 133 系統を用いた。RL 系統群以外は各系統 5 個体ずつ 2016 年 5 月 7 日に播種し、2016 年 5 月 31 日に京都大学農学研究科附属京都農場（北緯 35°01'、東経 135°47'）に株間 10cm、畝間 30cm で移植した。RL 系統群も同じ要領で 2016 年 5 月 23 日に播種し、2016 年 6 月 14 日に京都大学農学研究科附属京都農場に移植した。

3.2.2. 収量関連形質の測定

4系統群のすべての系統について、出穂期、穂長、一穂穎花数、一次枝梗数、二次枝梗数、百粒重を測定した。R7系統の出穂期は穂揃い期を調査した。また、成熟後、各R7系統の3個体から代表的な1穂を収穫して、穂長、一次枝梗数、二次枝梗数、一穂穎花数を調査した。種子形質の測定にはEPSON Scannerr GT-X830を用いて粒形の画像をスキャンして保存した後、SmartGRAINソフトによって粒長、粒幅、粒面積、粒円周長、粒長/粒幅、真円度を求めた。R7系統の種子については各系統1個体からサンプルした10粒について、R7系統の親R6個体に着生した種子については10粒について種子形質を測定した。

3.3. 結果

3.3.1. 粒形質に対する変異誘発効果

R6 個体および R7 系統について、系統群毎に粒形質に関する頻度分布を示した。RA 系統群の R6 個体は Fig.8 に、R7 系統は Fig.9 に示した。R6 個体では粒面積、粒長、粒幅、粒円周長が明瞭な不連続分布を示したが、R7 系統では粒面積、粒長、粒幅、粒円周長はいずれも連続分布であり、R6 世代の不連続分布は認められなかった。また、真円度についても、R6 世代と R7 世代とも大きな差異はなかった。R6 個体と R7 系統で粒形の分布の様子が大きく異なる理由は不明であるが、RA 系統群では粒形に関する大きな変異は生じていないと考えられた。同様にして RK 系統群の頻度分布を、R6 個体は Fig.10 に、R7 系統は Fig.11 に、RL 系統群の頻度分布を、R6 個体は Fig.12 に、R7 系統は Fig.13 に、RV 系統群の頻度分布を、R6 個体は Fig.14 に、R7 系統は Fig.15 にそれぞれ示した。

RK 系統群の R6 個体では、粒面積が 13~19 mm²、粒長が 6.2~8.0 mm、粒幅が 2.4~3.4 mm、粒円周長が 16~21 mm、真円度が 0.52~0.68 であったのに対して、R7 系統の粒面積は 13.5~21.5 mm²、粒長が 6.2~8.2 mm、粒幅が 2.9~3.6 mm、粒円周長が 15.5~20.0 mm であり、観察値のレンジは R6 個体を R7 系統との間で大きく異なることはなかった。

RL 系統群の R6 個体では粒面積が 15.5~21.0 mm²、粒長が 6.4~8.4 mm、粒幅が 2.9~3.8 mm、粒円周長が 16.5~21.0 mm、真円度が 0.60~0.74 であり、R7 系統では粒面積が 13.5~19.5 mm²、粒長が 6.4~8.2 mm、粒幅が 2.5~3.6 mm、粒円周長が 16~20 mm、真円度が 0.56~0.77 であり、観察された形質の分離に関して両世代間に大きな差異は見られなかった。

RV 系統群の R6 個体では、粒面積が 9~20 mm²、粒長が 5.8~8.4 mm、粒幅が 2.8~3.6 mm、粒円周長が 15~22 mm、真円度が 0.5~0.8 であり、R7 系統では粒面積が 14~20 mm²、粒長が 6.2~8.0 mm、粒幅が 2.9~3.6 mm、粒円周長が 15.5~19.5 mm、真円度が 0.63~0.73 であった。

RL 系統群と同様に RV 系統群も両世代間に大きな差異は見られなかった。

R7 系統の形質の頻度分布はいずれの系統群でも連続分布であり、分布の様子から誘発変異の分離を確認できなかった。遺伝変異の分離を確認するため、親子回帰から形質毎に遺伝率を調べた。Table.16 に示した通り、いずれの系統群でも粒長および粒長/粒幅比において粒面積および粒幅に比べて高い遺伝率が認められた。とりわけ、RK 系統群および RV 系統群では粒長に関する遺伝的変異が分離している可能性が高い。

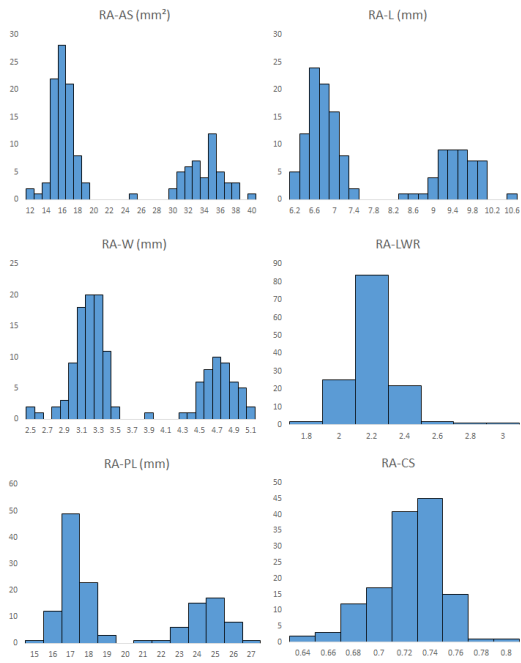


Fig.8. Grain data of RA line group F generation

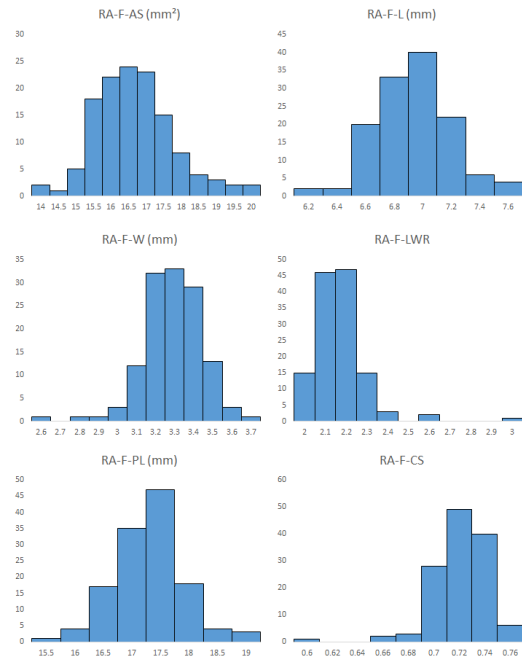


Fig.9. Grain data of RA line group F progeny

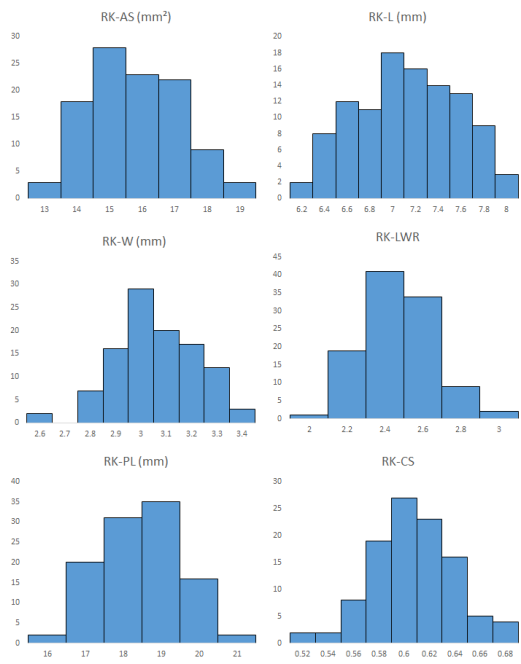


Fig.10. Grain data of RK line group F generation

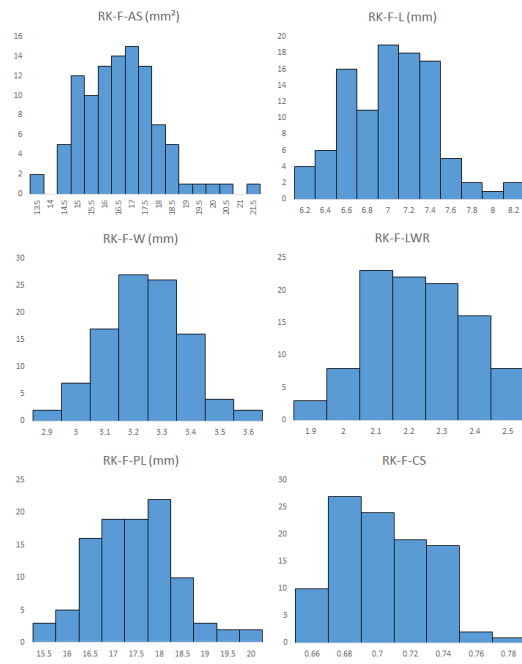


Fig.11. Grain data of RK line group F progeny

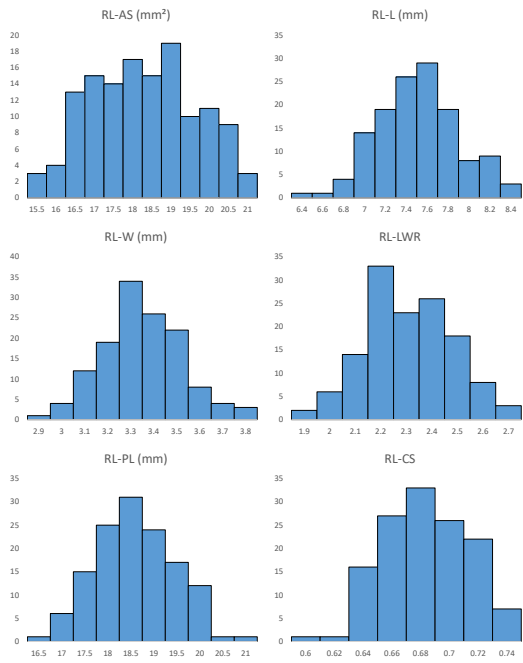


Fig.12. Grain data of RL line group F generation

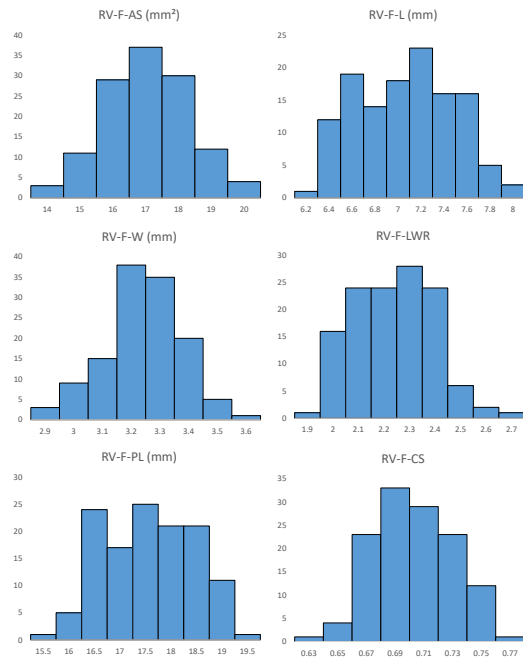


Fig.13. Grain data of RL line group F progeny

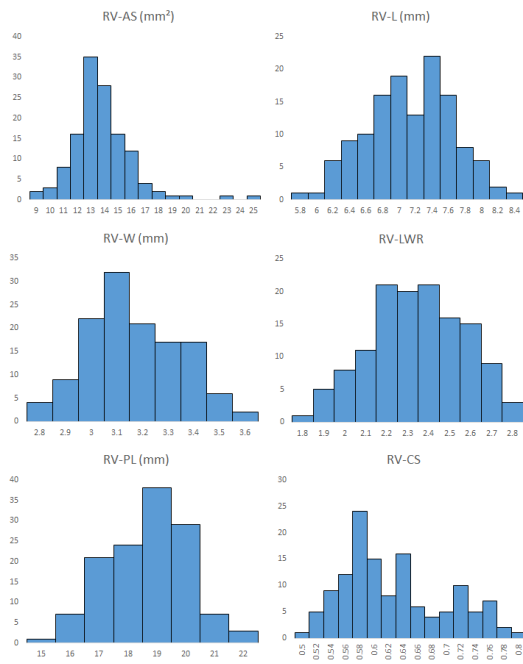


Fig.14. Grain data of RV line group F generation

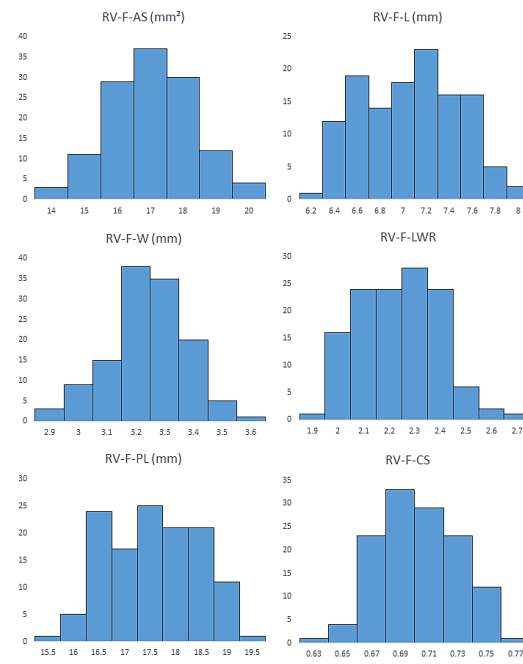


Fig.15. Grain data of RV line group F progeny

Table. 16 Heritability of all grain traits in four *mPing*-tag line groups

Trati	Line			
	RA	RK	RL	RV
Area size(AS)	0.31%	36.95%	7.29%	50.85%
Perimeter length(PL)	0.08%	62.67%	14.76%	33.93%
Length(L)	0.28%	67.44%	25.58%	56.35%
Width(W)	0.24%	16.45%	35.22%	32.39%
Length-to-width ratio(LWR)	23.98%	51.47%	58.28%	38.06%
Circularity(CS)	6.39%	24.54%	39.38%	4.30%

3.3.2. 出穂期に対する変異誘発効果

2016年7月下旬から9月下旬にかけて、4系統群の出穂期を調査した。RA、RK、RV系統群の到穂日数の頻度分布はFig.17に、RL系統群の到穂日数の頻度分布はFig.18に、それぞれ示した。

RA、RK、およびRV系統群では、到穂日数が100日よりも早生の系統と100日より晩生の系統に明瞭に分離した。また、RL系統群では、到穂日数が82日より早生の系統と82日よりも晩生の系統とに明瞭に分離した。分離の様子から、RA、RK、RV系統群では晩生変異が、RL系統群では早生変異が分離していると想定された。しかし、晩生誘発変異が1対の劣性突然変異遺伝子に起因する場合、R7世代では固定が進んでヘテロ個体の割合が減少するため、原品種型系統と晩生型系統の比率は1:1に近いはずであるが、観察された頻度分布ではRA、RK、RV系統群のいずれにおいても、原品種型系統の比率が明らかに高い。同様に、RL系統群でも、早生誘発変異が1対の早生突然変異遺伝子に起因する場合、R7系統では早生系統と晩生系統の比率は1:1に近くなるはずであるが、RL系統群の頻度分布では明らかに早生系統の比率が高い。R7系統では各系統5個体とし遺伝的固定を前提にして各系統の穂揃い期を出穂期とみなした。このため、系統内で出穂期に関する分離が生じて、1個体しか晩生個体が分離しない場合には当該系統を原品種型もしくは早生型系統をみなすことになる。単粒系統法で育成されたため、予想よりも多いヘテロ型系統が残っており、その系統のかなりの部分を誤って原品種型個体系統（RA、RK、RV系統群の場合）、あるいは早生系統（RL系統群の場合）と分類した可能性が高い。

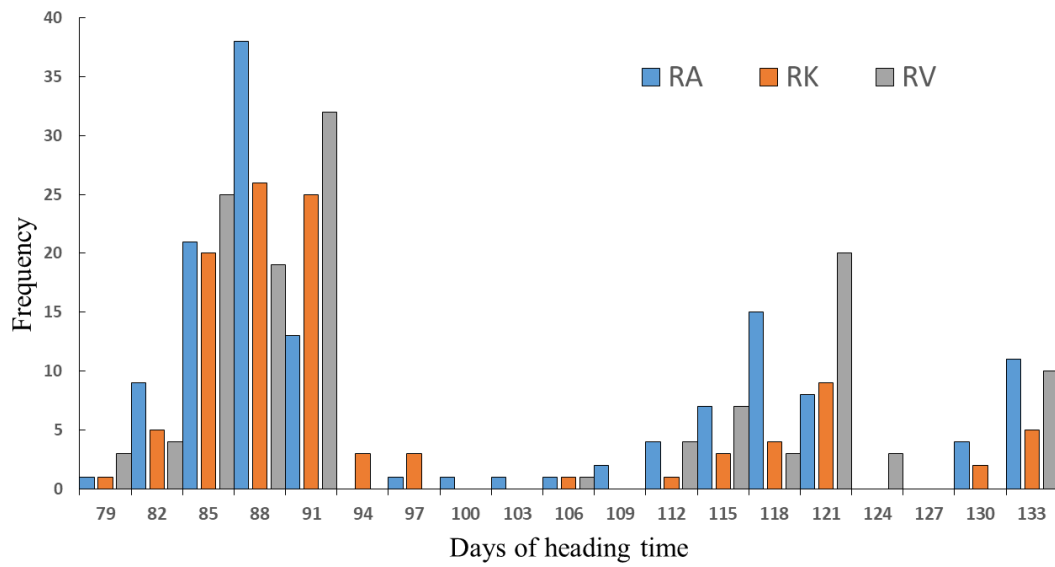


Fig.17 Days of heading time frequency of RA, RK and RV line group

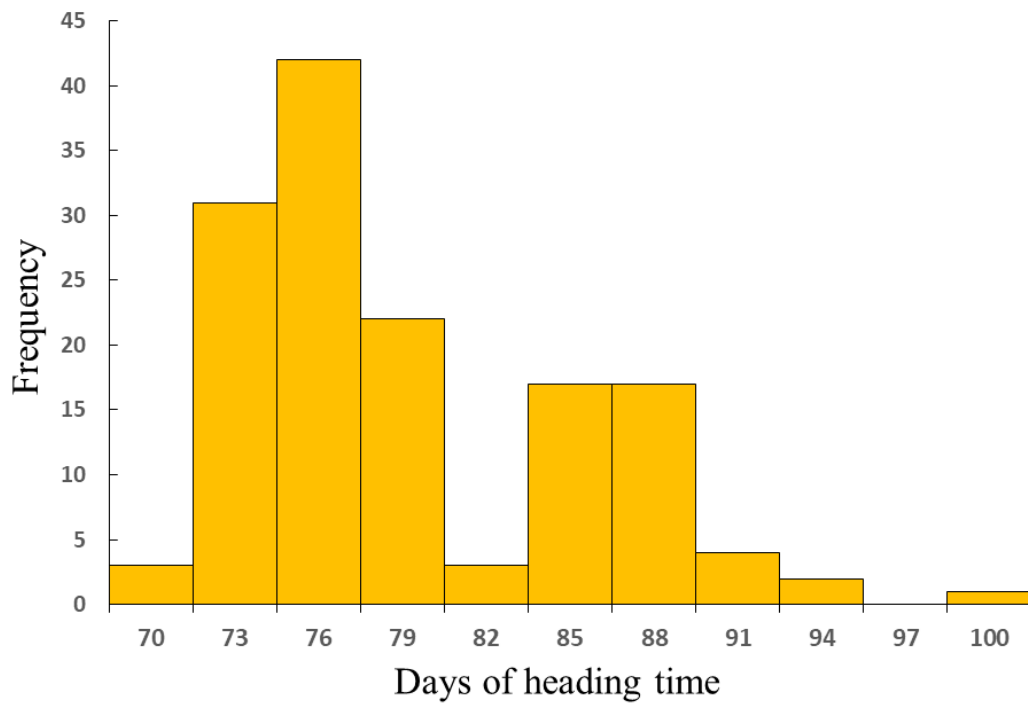


Fig.18 Days of heading time frequency of RL line group

3.3.3. 穂形質に対する変異誘発効果

穂形質として、穂長、一次枝梗数、二次枝梗数、一穂穎花数の4形質に着目した。4系統群の穂長を Fig.19、一次枝梗数を Fig.20、二次枝梗数を Fig.21、全粒数を Fig.22、一次枝梗辺りの二次枝梗数を Fig.23 にそれぞれ示した。

Fig.19 と Fig.20 に示したように、4系統群いずれも穂長では 13.0cm~26.5cm、一次枝梗数では 7.0 個~17.5 個の範囲で連続分布をしており、系統群間に大きな差異は見られなかった。これに対して、二次枝梗数、一穂穎花数および一次枝梗辺り二次枝梗数に関しては、RA、RK および RV 系統群が二次枝梗数 3~27、一穂穎花数 50~160、一次枝梗辺りの二次枝梗数が 0.5~3.0 であるのに対して、RL 系統群では二次枝梗数が 13~45、一穂穎花数が 100~230、一次枝梗辺り二次枝梗数が 1.5~4.5 であり、RL 系統群では二次枝梗数の増加に伴う一穂穎花数の増大方向への変異が分離している可能性が高い。この点を確認するため、一穂穎花数、穂長、一次枝梗数および二次枝梗数の関係を検討した。一次枝梗数と二次枝梗数の相関を Fig.24 に示した。RA、RK、および RV 系統群では一次枝梗数の増加に伴う二次枝梗数の増加は確認できなかった。このことから、穂の一次枝梗の発生が多いと一次枝梗数に着生する二次枝梗数が抑制される傾向があると推察された。また、RL 系統群の二次枝梗数は一次枝梗数が増えるにしたがって、RA、RK、および RV 系統群よりも多くなる傾向が認められ、RL 系統群には一次枝梗数の増加に対して二次枝梗数の発生を抑制する機構に変異が誘発されている可能性が認められた。Fig.25 には穂長と一次枝梗数の相関を示した。4系統群とも穂長と一次枝梗数の間に相関関係がなく、いずれの系統群にも一次枝梗数の増加を伴うような穂長に関する変異の誘発は認められなかった。Fig.26 には一穂穎花数と一次枝梗数の相関を示した。RA、RK、および RV 系統群では、一次枝梗数の増加に伴う一穂穎花数の増加傾向が認められたが、RL 系統群では一次枝梗数の増加に伴う一穂穎花数の増加系統

は明らかではなかった。一穂穎花数と二次枝梗数との相関を Fig.27 に示した。いずれの系統群でも二次枝梗数と一穂穎花数との間に強い相関関係があり、分化する二次枝梗の数が穂全体の穎花数を決める重要な要因と考えられた。RL 系統では一次枝梗に発生する二次枝梗数を抑制する機構に変異が生じた結果、一穂穎花数が増加していると考えられた。

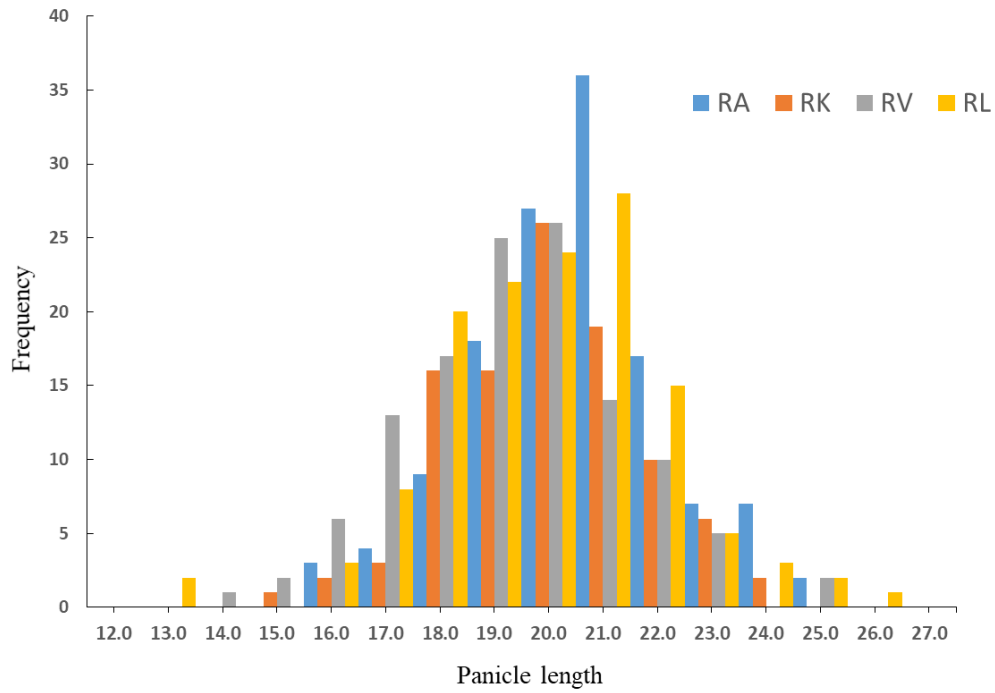


Fig.19 Panicle length of all line group (cm)

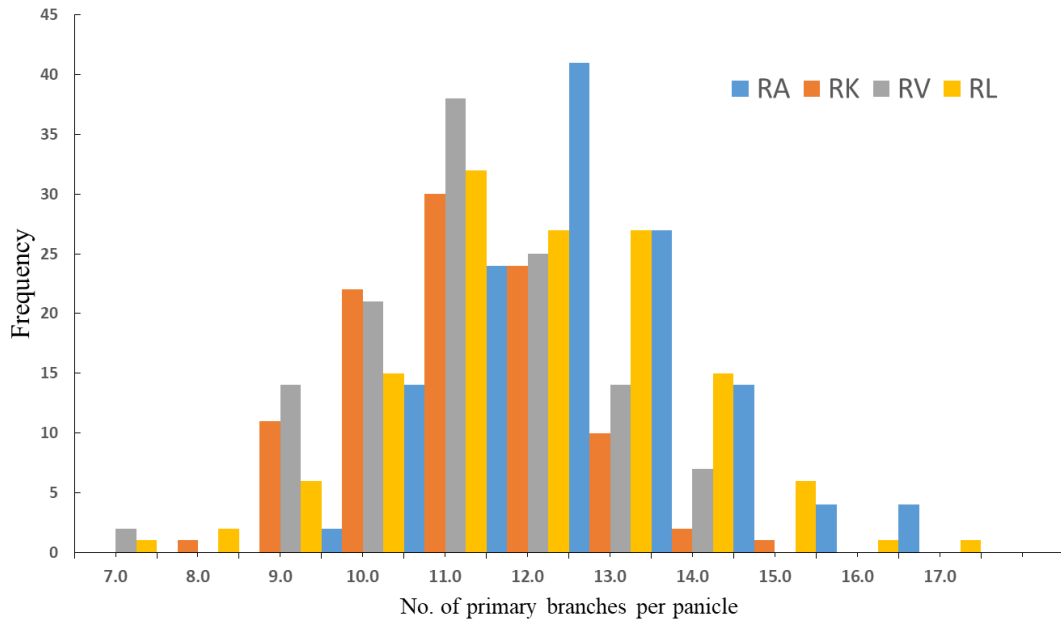


Fig.20 Number of primary branches per panicle of all line group

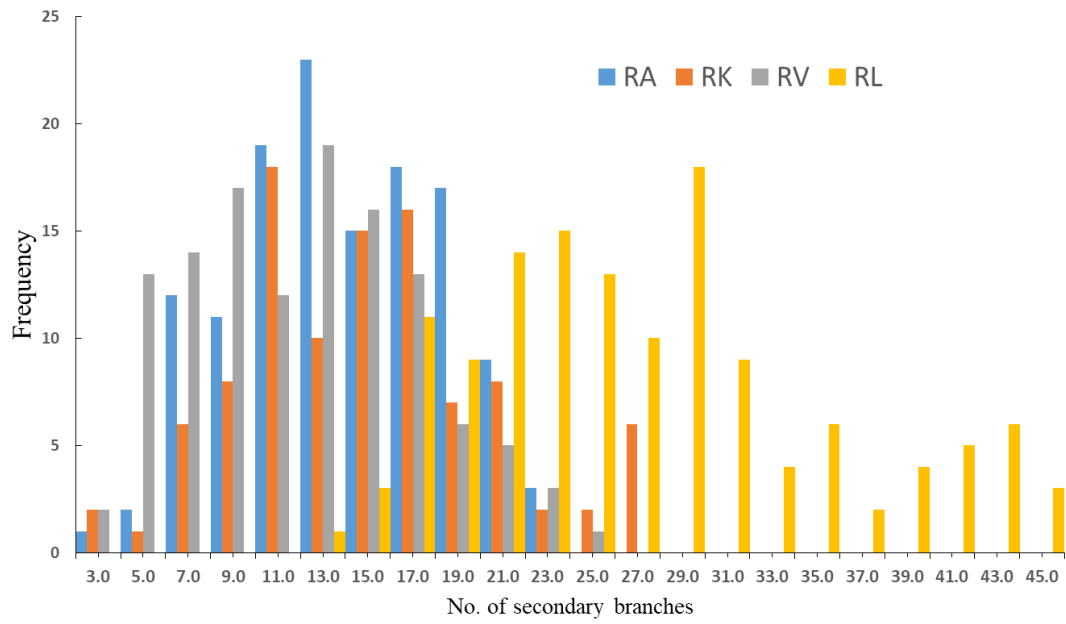


Fig.21 Number of secondary branches per panicle of all line group

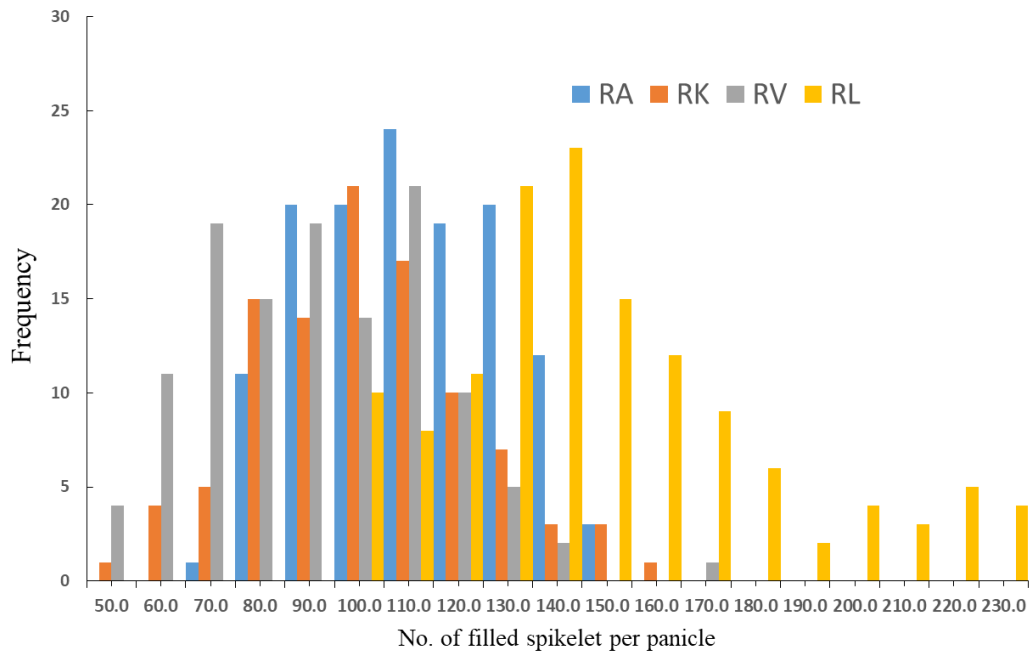


Fig.22 Number of filled spikelet per panicle of all line group

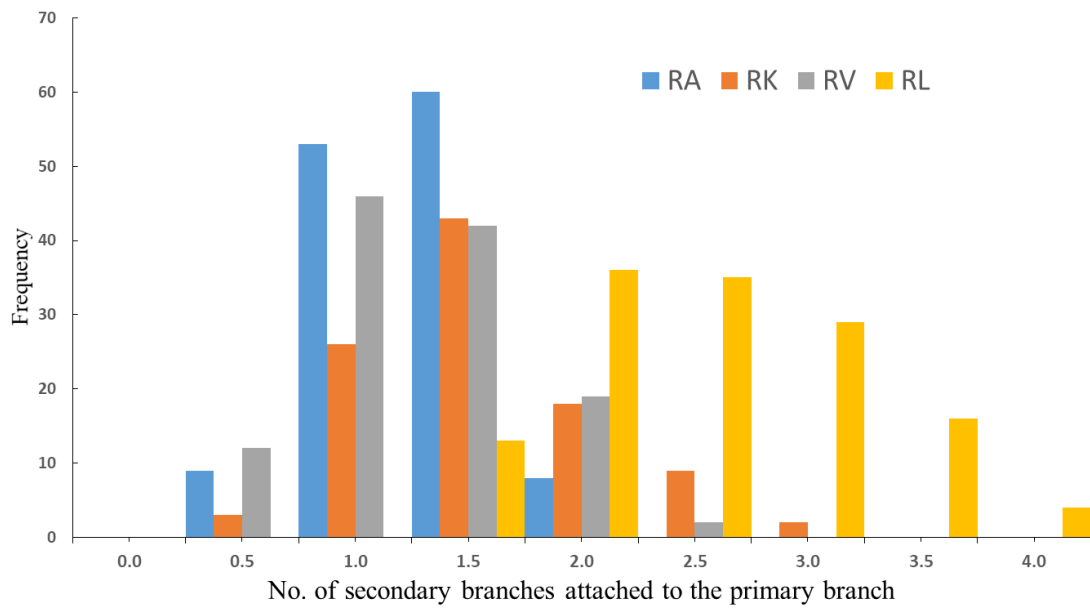


Fig.23 Number of secondary branches attached to the primary branch of all line group

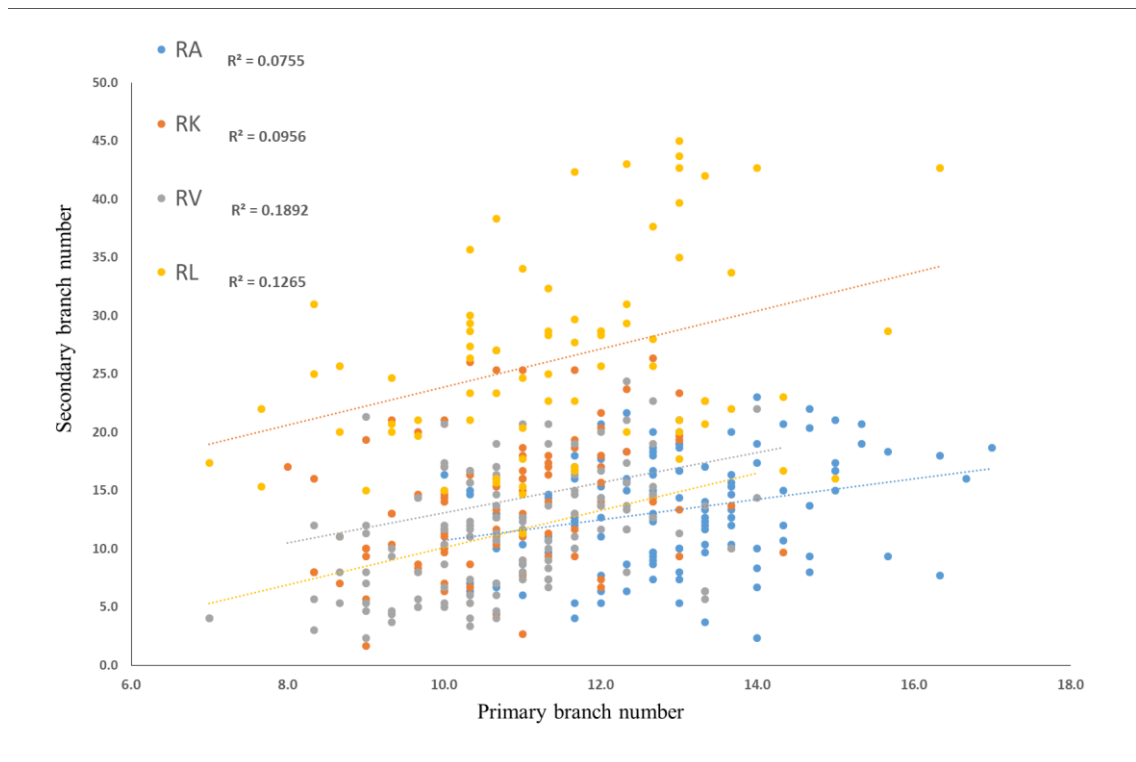


Fig.24 Correlation between primary branch number and secondary branch number

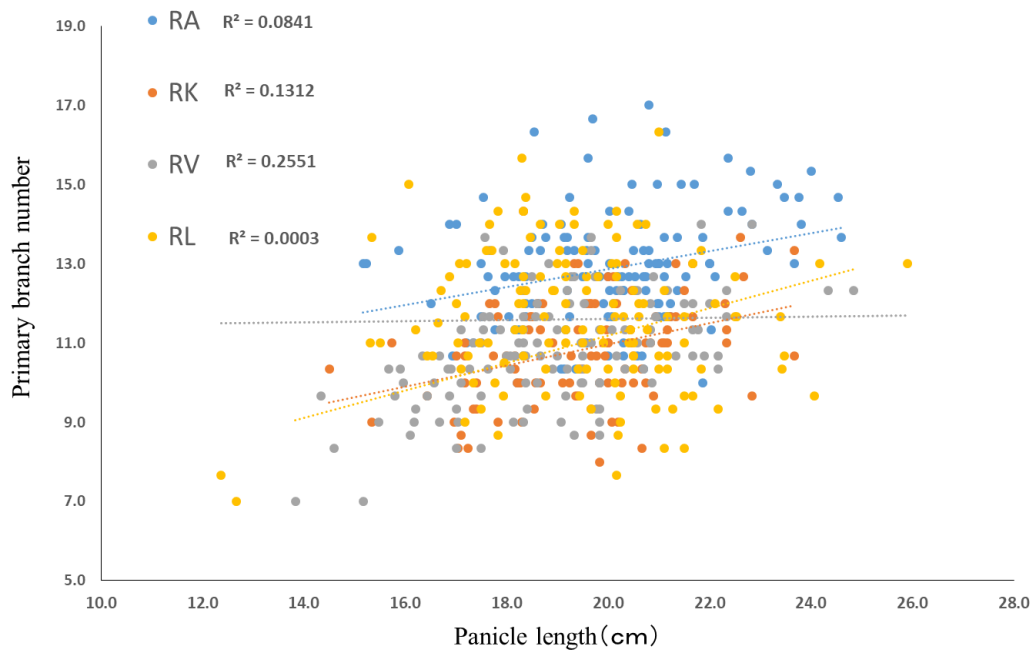


Fig.25 Correlation between panicle length and primary branch number

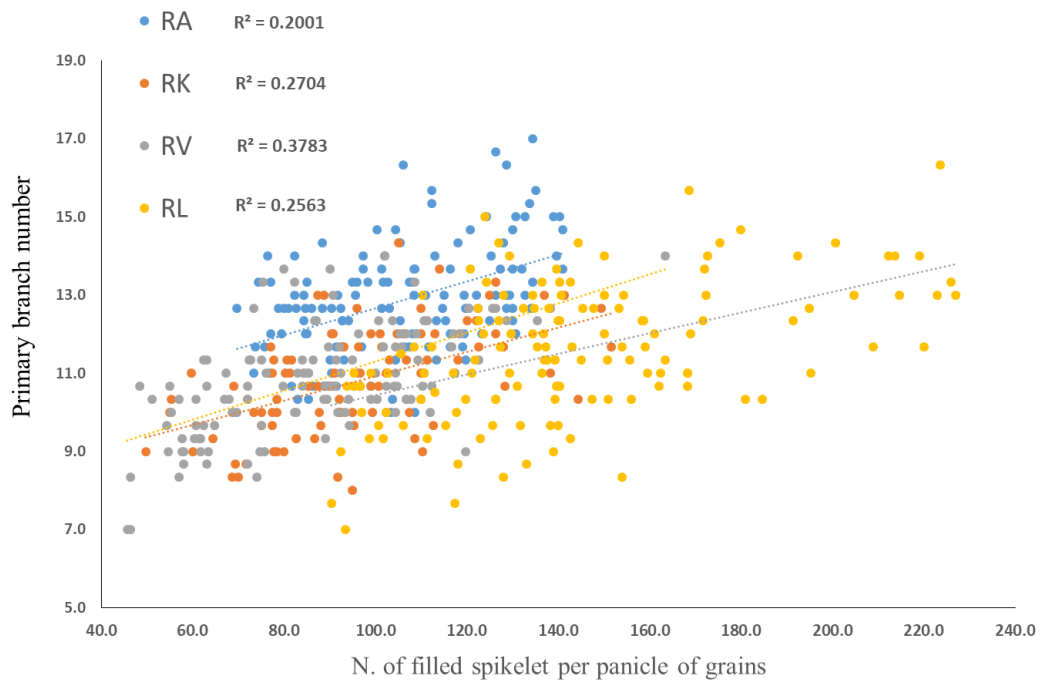


Fig.26 Correlation between number of filled spikelet per panicle of grains and primary branch number

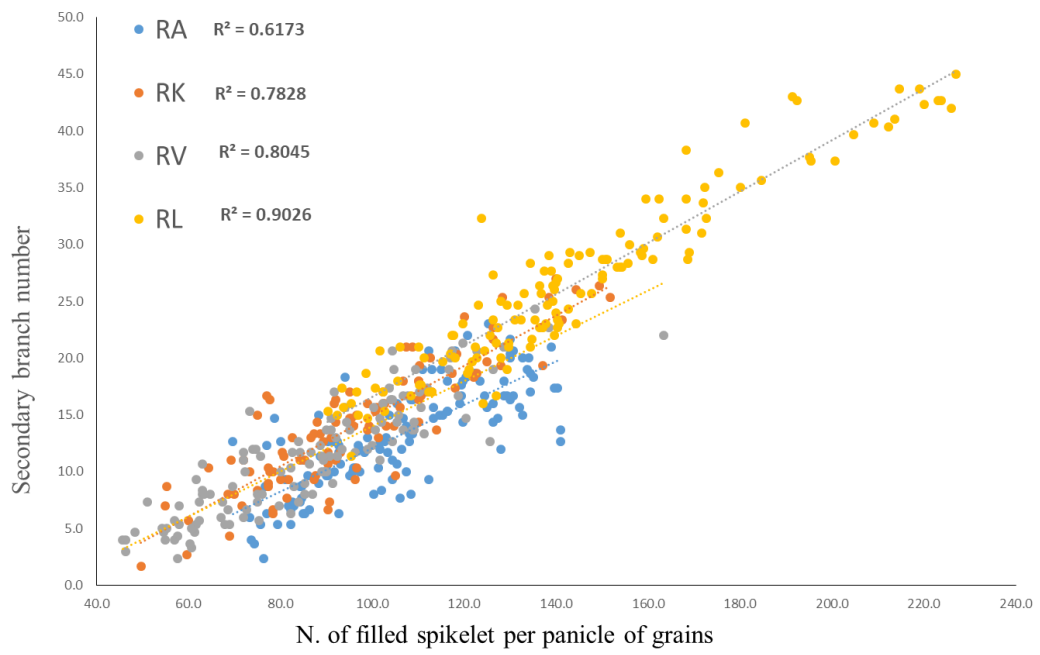


Fig.27 Correlation between number of filled spikelet per panicle of grains and secondary branch number

3.4. 考察

銀坊主では *mPing* が 1000 以上のコピー数を持つにもかかわらず、銀坊主の表現型が固定されており、何世代まで自殖させても形質の分離がないということは、日常的な栽培条件下で、*mPing* が活発的に転移させる条件に満たされていないと判断できる。そして、銀坊主に γ 線照射によって *mPing* が *Rurm1* に挿入し、細粒突然変異系統が得られた。この突然変異系統が銀坊主よりも最も転移しやすい *mPing* を持って自殖させれば、後代も活性化した *mPing* を有することと考えられる。

細粒突然変異系統 IM294 の自殖後代に出現した復帰後代にともなう新規突然変異の原因は *mPing* の動きに密接な関係があると予想されている。本章では、堀端らが近畿大学で作った *mPing* タグライン系統群を用いて、*mPing* の転移によるイネ収量構成形質への影響を調べた。これらの系統群は第 6 世代まで世代更新し、系統固定されている RA、RK、RL、RV 系統群を選抜した。系統群内に分離する形質を分析することにより、*mPing* の転移とイネ表現型の関係を探索した。

供試植物材料を 2016 年春に播種する前に、全系統群の各系統に 10 粒ずつ粒形の画像をスキャンし、ソフトウェア SmartGRAIN にて粒形データをパソコンに読み込んだ。Fig.10、Fig.12 および Fig.14 を示したように、F 世代の RK、RL および RV 系統群の粒形に関する形質は連続分布を有したが、Fig.8 に RL 系統群の粒面積、粒円周長、粒長、粒幅および粒長/粒幅は不連続分布になっている。前述のように、固定されている系統群を供試材料として実験を行ったため、2016 年秋に収穫した F 後代の粒形データも大きな変動がないはずと推定したが、実際に F 後代の粒形データを分析してみると、RK (Fig.11)、RL (Fig.13) および RV (Fig.15) 系統群の粒形に関する形質ごとの頻度分布図は F 世代と比較して、差異が見られなかったが、RA 系統群の形質がすべて連続分布になり (Fig.9)、RA 系統群の F 世代で

粒形形質の分離が見られなくなった。この世代間の表現型の変異は遺伝子の突然変異なのか環境に影響を受けて生じた変異なのかは判断できないため、さらに調査対象とした形質は本当に遺伝性があるかどうかを遺伝率によって確認した。

遺伝率を計算して結果を確認したところ (Table.16)、RA 系統群の粒長と粒幅は遺伝性を有したが、環境からの影響も避けられないため、世代間で観察された異なった形質の頻度分布は環境要因も考慮すべきである。なお、RK、RV 系統群とも粒長の高遺伝性を有することが分かって、この2系統群において、粒形形質が他の系統群と比べて、環境からの影響を受けにくく、より安定的な形質を維持できると推定した。実際に粒形の表現型に関する測定もこの結果と一致した。

RL 系統群では粒長と粒幅も一定な遺伝性を示したが、粒面積では低い遺伝率が見られた。粒の形に決める真円度が RL 系統群ではより高い遺伝率を持つことと加えて考えれば、RL 系統群では粒面積の大きさは環境から影響を受けて変化しやすいが、粒の形は環境を問わず、大きく変化しにくいと考えられる。

続いて、イネの収量と深く関係する出穂期の調査を行った。ただし4系統群の播種日が異なったため、この影響を除くために、それぞれの到穂日数を調べた (Fig.17、18)。先行研究によって、銀坊主の到穂日数が平均 110 日前後、IM294 細粒突然変異系統の到穂日数が銀坊主より平均が約 10 日遅れ (堀端、2000) の 120 日前後となるため、到穂日数が 115~128 日の範囲では銀坊主形質、132~140 日の範囲では細粒突然変異系統形質を表していることと判断した。4系統群とも 81~101 日の独特な到穂日数を持つので、これは R 系統群の新たに形成した形質であると考えられた。RL 系統群は他の3系統群と比べて最も短い到穂日数 (70~78 日) を有したが、*mPing* の移転に引き起こす変異である可能性も考えられる。

イネの収量は環境温度、施肥量、日照時間などの外部環境によって変化しやすい。従っ

て環境から影響されにくい形質の固定は極めて重要である。本章で最後に調査した各系統群の穂長、一次枝梗数、二次枝梗数、全粒数はより安定的なイネ形質となり、表現型と *mPing* のような転移しやすい転移因子との関係を探索しやすいと考えられる。本研究では、穂長と一次枝梗数の系統群間の差異が見られず、系統群内の分離も見られなかった (Fig.19、20) ことから、転移因子 *mPing* の動きは穂長と一次枝梗数への遺伝的影響を与えていないか、与えても表現型に反映されないと示唆した。これに対して、二次枝梗数と全粒数は系統群間の差異が表れ、RL 系統群が明らかに他系統群より増加し、RL 系統群内にも形質が分離した (Fig.21、22)。この増加の原因表現型を探索するために、さらに一次枝梗に付いた二次枝梗の数 (Fig.23)、一次枝梗数と二次枝梗数の相関 (Fig.24)、穂長と一次枝梗数の相関 (Fig.25)、全粒数と一次枝梗数の相関 (Fig.26)、全粒数と二次枝梗数の相関 (Fig.27) を解析した結果、全粒数の増加は二次枝梗数のみ関係していると解明した。並びにこの 4 系統群は同じ細粒突然変異系統の復帰後代から由来し、この顕著な表現型の分離は *mPing* の活発的な転移による結果の可能性が高いと考えられる。

従って、本章で観察された RL 系統群の到穂日数と二次枝梗数の表現型の改変は *mPing* の動きと関係する可能性が高いと考えられる。このような表現型と遺伝子型との関係を明らかにすることのために、更なる遺伝子の解析が必要とする。そして得られる *mPing* 転移因子の転移情報を利用し、イネの収量構成要素に対する変異の誘発効果を明らかにすることで、イネの増収に役に立つだろう。

第4章. ML 系統の誘発変異と関連する *mPing* 挿入の探索

4.1. はじめに

mPing タグラインである RA、RK、RL および RV 系統群を用いて、イネの収量関連形質に対する変異誘発効果を調査した結果、*Rurm1* 座に挿入された *mPing* の切り出しに伴い収量関連形質に対する誘発変異が確認できた。とりわけ、RL 系統群には到穂日数の早生化ならびに二次枝梗の分化に関して表現型に明瞭な分離を認めることができた。観察された誘発変異と *mPing* 転移との関係を明らかにするため、RL 系統群より極早生系統および極晩生系統、ならびに二次枝梗数が最大の系統および最小の系統を選んで、これら個体の *mPing* 挿入箇所を次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing; NGS) によって網羅的に解析した。観察された表現型が *mPing* 挿入に起因する変異であれば、RL 系統群に観察された早生系統ならびに二次枝梗の分化が多い系統に特異的な *mPing* 新規挿入が検出できる。

安田 (2015) は銀坊主集団を用いて各銀坊主個体をもつ *mPing* 挿入のデータベース (*STAmP* : Spontaneous Transposition of an Active transposable element *mPing* データベース) を構築すれば、*mPing* 挿入変異の効率的な利用に役立つとした。さらに、*STAmP* データベースの構築に、*mPing* 隣接配列を選択的に増幅したライブラリーを作製して NGS を実施する方法を提案した。本章では RL 系統群から選抜した系統に対して、安田が示した要領に従って DNA を調整し、NGS によって早生系統もしくは二次枝梗増加系統に特異的な *mPing* 挿入を特定し変異誘発機構の解明を試みた。

4.2. 材料および方法

4.2.1. 供試材料

RL 系統群から、到穂日数が 71 日～73 日の 5 系統 (RL3、RL42、RL69、RL108、RL146) および到穂日数が 87 日～89 日の 5 系統 (RL62、RL94、RL98、RL107、RL138)、ならびに二次枝梗数が 28 個～29 個の 4 系統 (RL16、RL23、RL70、RL129) および二次枝梗数が 42 個～43 個の 4 系統 (RL5、RL37、RL80、RL99) を供試した。

4.2.2. DNA 抽出

各系統から 1 個体に 1 穂から 5 粒ずつ採種し、DNA 抽出の対象とした。サンプルを 2.0ml マイクロチューブに入れて、液体窒素で凍らせて、マルチビーズショッカー (安井器械、大阪、日本) で破碎した。60°C 加温した CTAB 溶液 (2xCTAB・40ml、SDS・0.4g、PVP(K30)・0.4g、2-メルカプトエタノール・100 μ l) を加え、混合液を 60°C・30~120 分振盪してから、CIA・1ml 加えて室温で 30 分間穏やかに浸透した。その後 15000G で 5 分間遠心 (トミー精工、東京、日本) 後、取り分けた上清に等量のイソプロピルアルコールを添加・混和した。さらに 15000G で 10 分間遠心分離して沈殿した DNA を 70 %エタノールでリンス後、乾燥させた。得られた DNA ペレットに RNase 添加 1/10 TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 および 1 mM EDTA) を加えて 37 °C で 30 分処理して DNA サンプルとした。DNA サンプルはすべて -30°C で保存した。

4.2.3 NGS ライブラリーの調整

安田 (2015) の方法により、

1) ランダムプライミング : 10xNEB buffer 2 を 5 μ l、2.5mM dNTPs (TaKaRa) を 5 μ l、MilliQ

を 32 μl 、SQ1_random_N15 (100 μM) (Table.30.) を 4 μl 、DNA サンプルを 4 μl 含む 50 μl PCR 混合液が 94°C 5 分間加熱し、20 分間 4°C で処理した後、50 U/ μl DNA Polymerase I Klenow Fragment (New England BioLabs, MA, USA) を 1.5 μl ずつ混合液に加えた。4 °C から 37 °C で +1 °C/分アニーリングさせ、37 °C で 1.5 時間伸長反応を行い、70°C 10 分間 Polymerase の失活処理を行ってから 4°C で保存した。PCR 反応液を FastGene Gel/PEC Extraction Kit により精製し、25 μl に溶出した。

2) 1) に得られた精製産物を 2 μl と、2 \times PCR buffer を 12.5 μl 、2mM dNTPs (TOYOBO) を 5 μl 、SQ1_mPing40 (2.5 μM) (Table.30.) を 2.5 μl 、SQ1_random_withoutN (2.5 μM) (Table.30.) を 2.5 μl 、KOD FX Neo を 0.5 μl 含む 25 μl の PCR 混合液が 94°C 2 分間加熱し、98°C を 10 秒間、68°C から 1 サイクルごとに -1°C のアニーリングを 30 秒、68°C を 10 秒の 10 サイクル繰り返した後、98°C を 10 秒間、58°C を 30 秒、68°C を 10 秒 20 サイクルさらに繰り返した後、68°C 3 分間の次に 4°C 保存した。反応産物液を FastGene Gel/PEC Extraction Kit により精製し、50 μl に溶出した。

3) 2) から得られた精製産物を 8 μl と、2 \times PCR buffer を 25 μl 、2mM dNTPs (TOYOBO) を 10 μl 、SQ2_mPing Primer_2 (5 μM) (Table.30.) を 3 μl 、SQ2_index (5 μM) (Table.28. と Table.29.) を 3 μl 、KOD FX Neo を 1 μl 含む 50 μl の PCR 混合液が 94°C 2 分間加熱し、98°C を 10 秒間、68°C から 1 サイクルごとに -1°C のアニーリングを 30 秒、68°C を 10 秒の 10 サイクル繰り返した後、98°C を 10 秒間、58°C を 30 秒、68°C を 10 秒 25 サイクルさらに繰り返した後、68°C 3 分間の次に 4°C 保存した。得られた PCR 混合液を NucleoMag NGS Clean-up and Size Select キットにより 500bp サイズで精製した。最後に各サンプルの DNA 含量を測定し、等量の DNA を一つの 1.5ml のチューブに混合した。

4.2.4 NGS および誘発変異に関連する *mPing* 挿入の検索

計 18 バルクの DNA サンプルを 1 サンプルとしてシーケンスライブラリーを作成し、北海道システムサイエンス株式会社にシーケンス解析（Illumina Amplicon Deep Sequence、300 塩基/リード）を委託した。得られた NGS 解析結果から、*mPing* 隣接配列を抽出し、変異系統に特異的な *mPing* 挿入を検索した。

Table.28. Primer sequence

Name of Primer	Sequence
SQ1_Random_N15	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCNNNNNNNNNNNNNNNN
SQ1_mPing40	TTTGAGAGAAAGATGGTATAATATTTTGGGTAGCCGTGCAA
SQ1_Random_withoutN	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC
SQ2_mPing Primer_2	AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACA CTCTTCCCTACACGACGC TCTTCCGATCTNNNNNATGACACTAGCCATTGTGAC
SQ2_indexPrimer	CAAGCAGAAAGACGGCATACGAGATXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTTCCGATC

* Phosphorothioate bond, XXXXXX: index sequence (Table.31.)

Table.29. Index sequence in SQ2_index Primer for preparation of Illumina sequencing

Index ID	Index sequence
01	CGTGAT
02	GCCTAA
03	TCAAGT
04	CTGATC
05	AAGCTA
06	GTAGCC
07	GGCCAC
08	CGAAAC
09	CGTACG
10	CCACTC
11	ATCAGT
12	AGGAAT
13	CACGTT
14	ACCACT
15	TTGATG
16	CTACAG
17	AACTGG
18	CTTCGG

4.3. 結果

4.3.1. NGS 解析結果および *mPing* 隣接配列の抽出

早生変異の 5 系統および晩生の 5 系統の 10 系統から計 264,108 リードが得られた。系統辺りの平均リード数は 26,411 で、レンジは約 2.5~2.7 万であった。隣接配列の情報から 5bp 以内に検出された挿入は同一の挿入とみなして排除した後、計 70,667 個の *mPing* 挿入部位を検出した。各系統から検出できた *mPing* の挿入箇所は 7,067 箇所、レンジは約 6,400~7,500 箇所であった (Table.30.)。

二次枝梗に関して少ない 4 系統、多い 4 系統から調整した 8 ライブラリーからは合計 238,889 リードが得られ、系統の平均リード数 26,543、レンジは約 2.5~2.7 万リードとなった。上記と同様に 5bp 以内に検出された挿入を排除した後、計 67,398 個の *mPing* 挿入部位が検出された。平均挿入部位数は 7,489、レンジは約 6,800~8,200 の挿入部位が特定できた (Table.31.)。

得られた *mPing* の挿入 ID は Table.32.に示したように、到穂日数が短いほうの 5 サンプル全てから 09.fa18354394R に *mPing* 挿入が検出できた。二次枝梗数の少ないほうの全サンプルから 04.fa23571130R および 11.fa18459993R の 2 か所に特異的な挿入があり、二次枝梗数の多いほうの全サンプルから 09.fa21859387F02、fa32572258R および 01.fa38241949F の 3 か所に表現型に特異的な *mPing* の挿入を検出した。

Table.30. Information of total reads and number of *mPing* insertion in heading time group samples

Sample No.	Total reads	No. of <i>mPing</i> insertion
RL3	26,404	6433
RL42	26,488	6450
RL69	26,280	7214
RL108	25,678	7211
RL146	25,524	6834
RL62	27,268	7558
RL94	27,094	7206
RL98	26,644	7579
RL107	26,514	6753
RL138	26,214	7429
Average	26,411	7,067
Total	264,108	70,667

Table.31. Information of total reads and number of *mPing* insertion in secondary branch group samples

Sample No.	Total reads	No. of <i>mPing</i> insertion
RL16	25,810	6969
RL23	25,862	7617
RL70	25,692	8221
RL129	27,906	7907
RL5	27,416	6889
RL37	26,706	7028
RL80	26,816	7833
RL99	26,138	7445
Average	26,543	7,489
Total	238,889	67,398

Table.32. Information of STAmP DB insertion ID

Name of trait	Insertion ID
Days of heading time	09.fa18354394R
	04.fa23571130R
	11.fa18459993R
No. of secondary branches per panicle	09.fa21859387F
	02.fa32572258R
	01.fa38241949F

4.3.2. 変異系統における *mPing* 挿入の検証

検出された 6 個の挿入部位に基づき、それぞれ検証プライマーを設計した。ただし、PCR による結果、いずれの挿入部位にも *mPing* 挿入が確認できなかった。それぞれの挿入部位に NGS で検出された平均リード数を確認したところ、2~63 の極めて少ない平均リード数を有したことが分かった (Table.33.)。これは PCR による確認ができなかった原因であるかどうかを確かめるために、全サンプルに共通挿入のある平均リード数が 117 の 07.fa8346411F に基づきプライマーを設計し、再確認を行った。しかし、この挿入部位にも *mPing* 挿入の検出ができなかった。

Table.33 Average reads for each insertion

Insertion ID	Average reads
09.fa18354394R	4.4
04.fa23571130R	7.5
11.fa18459993R	63
09.fa21859387F	3.75
02.fa32572258R	4.75
01.fa38241949F	2.25

4.4. 考察

細粒突然変異系統 IM294 の派生系統に分離した復帰型個体の後代によって育成した *mPing* タグラインから RL 系統群を選抜した。この RL 系統群は到穂日数と二次枝梗数が特異的な頻度分布を持って、*mPing* の転移によって生じた変異であると予想された。本研究は安田 (2015) が構築されたシーケンスライブラリー調製法を利用して構築したデータベースを利用して誘発変異に特異的な *mPing* 挿入の検索を行った。

到穂日数に関して選んだ 10 系統および二次枝梗数に関して選んだ 8 系統のライブラリーから得られた合計 264,108 および 238,889 のリードから、*mPing* の挿入部位としてそれぞれ 70,667 箇所および 67,398 箇所を抽出できた。しかし、データベース上で変異系統に特異的な *mPing* 挿入として検出された 6 個の挿入部位について、RL 系統における挿入を確認できなかった。

次世代シーケンサーから構築したデータベース上では確認できた挿入が変異系統で挿入箇所を増幅する PCR 増幅産物では挿入を確認できなかった原因を考えてみた。先行研究では葉身から抽出した DNA サンプルで検出された *mPing* 挿入が、同じ個体の穂に着生した種子から育てた幼苗から抽出した DNA サンプルからは検出されない場合が認められている。また、銀坊主では、受精後 3~5 日の幼胚で *mPing* の転移が最も活性化され (Teramoto et al. 2013)、それ以降の生育ステージでの転移活性は低いとされている。このため、穂軸から抽出した DNA から検出された *mPing* 挿入は穂に着生した種子すべてが共有しているはずである。本研究で用いたサンプルの DNA 濃度が 50ng/ μ l 前後であり、調整したシーケンスライブラリーの品質検査では問題は認められなかった。

シーケンスライブラリー調製法について、安田は 6 つの方法を試行してシーケンスライブラリーの均一性、*mPing* の共通挿入の再現性および新規挿入数が最も優れた方法を選

択した。本研究も安田が採択した手法を用いてシーケンスライブラリーを調整した。材料および方法に詳述したように、DNA サンプルに対するランダムプライミングの後、*mPing* 隣接配列を増幅し、サンプル識別のための Index 配列を導入している。しかし、*mPing* 隣接配列を増幅するときに使用する *mPing* 配列プライマーSQ1_*mPing*40 が *mPing* とは無関係の配列にハイブリダイズをすると、増幅産物自体に PCR 後 *mPing* 配列を含むようになる。何らかの原因で、このステップで予備増幅産物に *mPing* 配列を導入されたことが NGS の結果と系統から抽出した DNA を用いた PCR との結果の差異だと考えられる。

今回の調製法を基づいて *mPing* の 3'隣接配列を濃縮するときに用いるプライマーは *mPing* 配列を外部から導入しないように新たに設計するか、アニーリングの条件を再検討し、目的配列への結合を厳密化するなど、NGS 実施に相応しいライブラリー調製法を工夫する必要がある。

第5章. 総括

本研究の目的はイネ転移因子 *mPing* の収量関連形質に対する変異誘発効果である。*mPing* はイネ品種「銀坊主」において今なお活発的に転移していると知られている。銀坊主に γ 線照射によってゲノム変異を誘発し、生じた後代は様々な変異形質を表した。その一つの代表的な突然変異系統は細粒突然変異系統 IM294 であり、細粒、低発芽率、低草丈、低稔性など様々な収量形質が劣化した方向への表現型を持っている。これはユビキチン様タンパク質をコードする *Rurm1* 遺伝子が *mPing* 挿入によりの機能喪失が主な原因となっている。さらに、IM294 の自殖後代には *Rurm1* からの *mPing* の正確な切り出しによって粒形が正常粒に復帰する個体が分離する。復帰個体の中には、原品種銀坊主よりも旺盛に生育する強勢個体 VGI が含まれる。VGI では *mPing* 転移頻度が顕著に上昇し、新たに多数の *mPing* 挿入が観察される。このことから、*mPing* の新規挿入と VGI との関連が推察されるが、復帰に伴って強勢個体が分離出現する分子機構は未解明であるため、本研究ではまず、VGI 個体の後代と日本晴との交雑によって得られた F2 集団を用いて、VGI に関連する特性に関する QTL 解析を行い、強勢形質を制御する遺伝因子が存在する染色体領域の同定を試みた。

QTL 解析の結果により、一穂あたりの穎花数 (PAL)、一次枝梗数 (NPB)、二次枝梗数 (NSB)、百粒重 (g) (HSW)、地上部乾物重 (g) (DGW)、粒面積 (mm²) (surface area size of glume、以下 SAG)、粒長 (mm) (GLH) および粒幅 (mm) (GWH) の9つの形質うち、7つの形質から9つの QTL を検出された。その中から、粒長に関する QTL (*qGLH*) および二次枝梗数に関する QTL (*qNSB*) が新規に検出された QTL であると明らかにした。これらの形質は典型的 VGI 形質と密接な関係を示しているが、本実験の結果からは *mPing* 転移因子と対応する遺伝子の修正と関係しているのと言い切れないため、これからは目的領域をさらに絞り込んで、目的遺伝子の特定と *mPing* との関係を明らかにする必要がある。

転移しやすい *mPing* を持つ IM294 細粒突然変異系統の自殖後代では、VGI 個体のみならず、他にも様々な収量関連形質の変異系統を存在している。VGI 個体より形質が固定されている IM294 の自殖後代 R 系統群を用いて、最もイネの収量関と関連する到穂日数、穂長 (cm)、一次枝梗数、二次枝梗数、一穂あたりの穎花数、粒長 (mm)、粒幅 (mm)、粒面積 (mm²)、粒円周長 (mm)、粒長/粒幅および真円度を調査した。RA、RK、RV および RL 系統群のうち、RL 系統群の到穂日数が最も短く、二次枝梗数の頻度分布も他の 3 系統群と明らかに異なったため、観察されたこの 2 形質による表現型の改変は *mPing* の活発的な転移に導いた結果であると示唆した。

当研究室は安田 (2015) が銀坊主集団を用いて、*mPing* 挿入部位を効率的に検出できる STAmPDB を構築した。このデータベースと次世代シーケンサーを用いて、RL 系統群内の *mPing* 新規挿入を特定してみた。しかし、次世代シーケンサー分析の結果により新規挿入を 6 個検出されたが、原因遺伝子を特定するには至らなかった。従って、NGS に用いる DNA ライブラリーの調製法、DNA サンプルの品質、検証プライマー設計条件の見直しなど今までのプロセスを再検討する必要がある。

以上のことから、イネ転移因子 *mPing* の転移により、イネの収量に関連する二次枝梗数の増加による一穂あたりの穎花数の増加および粒形変異による百粒重の増加などの有用変異誘発効果が期待できると考えられた。*mPing* 挿入と誘発変異との関係を解明するためには、次世代シーケンス用の DNA 調整法の改善ならびに *mPing* 新規挿入が原因遺伝子の機能に及ぼす効果の解明が必要である。

謝辞

本研究を遂行し学位論文を取りまとめるにあたって、ご指導ならびにご閲覧頂きました、京都大学大学院農学研究科育種学研究室教授 奥本裕 博士に深く感謝申し上げます。また、本研究を遂行するに当たり、日々の研究でご指導を頂きました京都大学大学院農学研究科育種学研究室講師 寺石政義 博士、近畿大学農学部農業生産科学科育種工学研究室准教授 築山拓司 博士に厚く感謝申し上げます。*mPing* タグライン材料を提供頂いた近畿大学生物理工学部生物工学研究科准教授 堀端章 博士にも厚く感謝申し上げます。

また、文部科学省 博士課程教育リーディングプログラム グローバル生存学大学院連携プログラム (Inter-Graduate School Program for Sustainable Development and Survivable Societies、略：GSS) から貴重な奨励金および研究活動経費をいただき、さらにご指導ご協力頂きました GSS 副指導教員方々、メンター教員方々およびスタッフの皆様に深く感謝申し上げます。

そして育種学研究室のスタッフ、卒業生ならびに在学生の方々には、研究生活の様々な面でご助力頂き、大きな励みとなったことを記すとともに、心より感謝申し上げます。

最後に、京都大学育種学研究室での 5 年間の研究および大学院の生活を心身共に健康な状態で過ごすことができたのは母国中国にいる家族の協力があったことであり、家族の研究に対する理解と温かい見守りに深く感謝いたします。

引用文献

- de Koning AP, Gu W, Castoe TA, Batzer MA, Pollock DD (2011)** Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet* 7: e1002384
- Fan C.C., Y.Z. Xing, H. L. Mao, T. T. Lu, B. Han, C. G. Xu, X. H. Li and Q. F. Zhang (2006)** *GS3*, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theor Appl Genet* 112: 1164.
- Feng, Q., Y. Zhang, P. Hao et al. (71 co-authors) (2002)** Sequence and analysis of rice chromosome 4. *Nature* 420:316–320.
- Feschotte, C., N. Jiang, and S. R. Wessler (2002)** Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat. Rev. Genet.* 3:329–341.
- Gilbert D. M., M. C. Bridges, A. E. Strother, C. E. Burckhalter, J. M. Burnette III and C. N. Hancock (2015)** Precise repair of *mPing* excision sites is facilitated by target site duplication derived microhomology. *Mobile DNA* 2015:15.
- 堀端 章 (2015)** イネの転移因子 *mPing* の転移活性発現と利用に関する研究 博士学位論文
- Horibata, A. and H. Yamagata (2000)** Reversion Mutability of a Slender-glume Gene *slg* and its Influence on the Activity of a Mutagenic Factor in Rice Breeding Research 2 :125-132
- Jiang N, Bao Z, Zhang X, Hirochika H, Eddy SR, McCouch SR, Wessler SR (2003)** An active DNA transposon family in rice. *Nature* **421**: 163-167
- Kazazian HH (2004)** Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303: 1626-1632
- Kikuchi K., Terauchi K., Wada M., Hirano H. (2003)** The plant MITE *mPing* is mobilized

in anther culture. Nature Vol 421:167-170, 9 January 2003

Kum R., Tsukiyama T., Inagaki H., Saito H., Teraishi M., Okumoto Y. and Tanisaka T.

(2015) The active miniature inverted-repeat transposable element *mPing* posttranscriptionally produces new transcriptional variants in the rice genome. Molecular Breeding (2015), 35(8)

Li Y. B., C. C. Fan, Y. Z. Xing, Y. H., Jiang, L. J. Luo, L. Sun, D. Shao, C. J. Xu, X. H. Li,

J. H. Xiao, Y. Q. He and Q. F. Zhang (2011) Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice. Nature Genetics 43, 1266–1269

Monden Y., K. Naito, Y. Okumoto, H. Saito, N. Oki, T. Tsukiyama, O. Ideta, T. Nakazaki,

S.R. Wessler and T. Tanisaka (2009) High Potential of a Transposon *mPing* as a Marker System in japonica × japonica Cross in Rice. DNA Res 16 (2): 131-140.

Naito K., E. Cho, G. Yang, M. A. Campbell, K. Yano, Y. Okumoto, T. Tanisaka, S. R.

Wessler (2006) Dramatic amplification of a rice transposable element during recent domestication. PNAS 103:17620-17625.

Naito K., F. Zhang, T. Tsukiyama, H. Saito, C. N. Hancock, A.O. Richardson, Y. Okumoto,

T. Tanisaka, S. R. Wessler (2009) Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression. Nature 461: 1130- 1135.

Nakazaki T., Y. Okumoto, A. Horibata, S. Yamahira, M. Teraishi, H. Nshida, H. Inoue

and T. Tanisaka (2003) Mobilization of a transposon in the rice genome. Nature vol.421 170-172

Nishida H, Inoue H, Okumoto Y, Tanisaka T (2002) A novel gene *efl-h* conferring an extremely

long basic vegetative growth period in rice. Crop Sci 42:348-354

Ohmori Y., M. Abiko, A. Horibata, H. Hirano (2008) A Transposon, *Ping*, is integrated into intron 4 of the *DROOPING LEAF* gene of rice, weakly reducing its expression and causing a mild drooping leaf phenotype. *Plant and cell physiology*, volume 49, issue 8, 1 August 2008, pages 1176–1184

Paterson AH, J. E. Bowers, R. Bruggmann, I. Dubchak, J. Grimwood, H. Gundlach, G. Haberer, U. Hellsten, T. Mitros, A. Poliakov, J. Schmutz, M. Spannag, H. B. Tang, X. Y. Wang, T. Wicker, A. K. Bharti, J. Chapman, F. A. Feltus, U. Gowik, I. V. Grigoriev, E. Lyons, C. A. Maher, M. Martis, A. Narechania, R. P. Ojilliar, B. W. Penning, A. A. Salamov, Y. Wang, L. F. Zhang, N. C. Carpita, Mi. Freeling, A. R. Gingle, C. T. Hash, B. Keller, P. Klein, S. Kresovich, M. C. McCann, R. Ming, D. G. Peterson, M. Rahman, D. Ware, P. Westhoff, K. F. X. Mayer, J. Messing and D. S. Rokhsar (2009) The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature* 457:551–556.

Saito H, Yuan Q, Okumoto Y, Doi K, Yoshimura A, Inoue H, Teraishi M, Tsukiyama T, Tanisaka T (2009) Multiple alleles at Early flowering 1 locus making variation in the basic vegetative growth period in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 119:315-323

Shan X. H., Z. L. Liu, Z. Y. Dong, Y. M. Wang, Y. Chen, X. Y. Lin, L. K. Long, F. P. Han, Y. S. Dong, and B. Liu (2005) Mobilization of the Active MITE Transposons *mPing* and *Pong* in Rice by Introgression from Wild Rice (*Zizania latifolia* Griseb.) *Molecular Biology and Evolution* vol. 22 no. 4

Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P, Reily AD, Courtney L, Kruchowski SS et al. (2009) The

B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326:1112–1115

Takeda S., Miyao A., Hirochika H. (1999) Functional Genomics of Plants Using Transposons. *Japanese Science of Breeding* 1 : 243~248

Tsukiyama T. (2013) Analysis of heterosis caused by transposition burst of a transposon *mPing* in rice. Unpublished.

Tsukiyama T., Teramoto, S., Yasuda, K., Horibata, A., Mori, N., Okumoto, Y. and Tanisaka, T. (2013) Loss-of-function of a ubiquitin-related modifier promotes the mobilization of the active MITE *mPing*. *Molecular plant*, 6(3), 790-801.

Turcotte K, Srinivasan S, Bureau T (2001) Survey of transposable elements from rice genomic sequences. *Plant Journal* 25: 169-179

Xu Q., Saito H., Hirose I., Katsura K., Yoshitake Y., Yokoo T., Tsukiyama T., Teraishi M., Tanisaka T. and Okumoto Y. (2014) The effects of the photoperiod-insensitive alleles, *se13*, *hdl* and *ghd7*, on yield components in rice. *Mol Breeding* (2014) 33:813–819.

Yamagata, H. and K. Syakudo (1968) A mutable gene system induced by radiation in rice. *Proc.XII Internat. Cong. Genet.* 1: 106.

安田 加奈子 イネ転移因子 *mPing* 挿入を利用した環境ストレス応答性の改変。博士学位論文

Yang G, Zhang F, Hancock CN, Wessler SR (2007) Transposition of the rice miniature inverted repeat transposable element *mPing* in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 10962-10967

Zhang K.W., Qian Q., Huang Z. J., Wang Y. Q., Li M., Hong L. L., Zeng D. L., Gu M. H., Chu C. C., and Cheng Z. K. (2006) *GOLD HULL AND INTERNODE2* Encodes a

Primarily Multifunctional Cinnamyl-Alcohol Dehydrogenase in Rice1. *Plant Physiology*,
March 2006, Vol. 140, pp. 972–983,

Zhou Y., J. Miao, H. Y. Gu, X. R. Peng, M. Leburu, F. H. Yuan, H. W. Gu, Y. Gao, Y. J. Tao,

J. Y. Zhu, Z. Y. Gong, C. D. Yi, M. H. Gu, Z. F. Yang and G. H. Liang (2015)

Natural Variations in *SLG7* Regulate Grain Shape in Rice. *Genetics* vol. 201 no.
4 1591-1599;

Zhang Z. G., Li X., Guan C. Y., Bai D.L. and Wu X. J. (2006) Improvement of SDS Method

for Isolating Genomic DNA and Total RNA from Rice Endosperm and
Arabidopsis Style, *植物生理学通讯* 第 42 卷 第 3 期

摘要

miniature-Ping (mPing) はイネの非自律性転移因子 MITE の一つであり、イネ品種「銀坊主」において 1,000 コピー数以上存在し、自然条件下でもいまなお活発的に転移している。銀坊主種子への γ 線照射より得られた細粒突然変異系統 IM294 は、ユビキチン様タンパク質 *Rurm1* の機能喪失により細粒形質以外に、様々な生育弱勢を示す。IM294 の自殖後代では *Rurm1* から *mPing* の正確な切り出しによって粒形が正常粒に復帰する個体が分離する。復帰個体の中には銀坊主型の表現型を回復するだけでなく、農業形質に関して変異が誘発された個体がしばしば分離する。イネの収量関連形質に対する転移因子 *mPing* の変異誘発効果を明らかにできれば、*mPing* を生産性向上育種に利用できる。本研究では、IM294 および IM294 からの派生系統に分離する復帰型個体の自殖後代を用いて収量関連形質に関する誘発変異と *mPing* 転移との関係を調査した。

細粒突然変異系統 IM294 の自殖後代において *Rurm1* 遺伝子への *mPing* 挿入の切り出しによって分離する復帰型個体の中には原品種の銀坊主よりも旺盛な生育を示す強勢個体 (Vigorous Growing IM294 個体、VGI) が少数含まれる。これまでの研究から、VGI では *mPing* 転移頻度が顕著に上昇していることが判明しているが、*mPing* 転移と VGI との関係は未解明である。本章では、IM294 系統に分離した 1 個体の VGI 個体の自殖後代個体 (VG-15) と日本晴との交雑によって得られた F₂ 系統を用いて、生育強勢に関係する遺伝的因子が座乗する染色体領域を決定した。まず VG-15 と日本晴との間の *mPing* 挿入多型を利用して遺伝地図を作成し、一穂穎花数、有効分けつ数、一次枝梗数、二次枝梗数、百粒重、地上部乾物重、粒面積、粒長および粒幅の 9 形質に関する QTL 解析を行った。この結果、7 形質に関して 9 個の QTL を検出した。百粒重に関する QTL は Chr.1 (*qHSW1*)、Chr.3 (*qHSW2*) および Chr.5 (*qHSW3*) に見出されたが、粒形に関する QTL と同じ位置に見出されたのは粒幅

に関する QTL (*qGWH*) だけであった。したがって、他の百粒重の QTL は粒形変化に伴う二次的なものではなく、登熟に関する QTL と考えられた。粒長の (*qGLH*) と粒面積 (*qSAG*) の QTL が Chr.8 の同じ位置に確認されたが、この位置に百粒重の QTL は確認されず、粒形の変化による百粒重の変化は認められなかった。このことから、粒大増加の効果が稔実不良などによって打ち消される場合があると考えられた。一穂穎花数 (*qNSF*) および二次枝梗数 (*qNSB*) に関する QTL が Chr.2 の同じ位置に見出され、二次枝梗数の増加に伴う一穂穎花数の増加変異を確認できた。また、一穂穎花数と二次枝梗数に関して検出された QTL の位置に過去に報告された QTL はなかった。これらの結果から、VGI では生育に関連する複数の形質に対する変異が独立に誘発されることにより、生育強勢が生じている可能性が高い。これらの変異が *mPing* 転移による同時誘発であることを確認するために、原因遺伝子を特定して *mPing* 転移との関係を明らかにする必要がある。

堀端ら (2015) は、IM294 の派生系統の自殖後代で分離した復帰個体型個体 (R1) の個体別自殖系統群を複数系統群育成することにより、*mPing* の転移によって誘発された突然変異遺伝子を含むと想定される *mPing* タグライン (R4) を作製した。*mPing* タグラインにおいては、出穂期、粒形、穂長、一次枝梗数、二次枝梗数、分けつ数などイネの収量関連形質を含む複数の農業形質に様々な変異の分離が確認されている。本章では、4 個体の R1 個体の自殖後代 (R2) 個体から単粒系統法により育成された 4 系統群の *mPing* タグライン (ML) を用いて、収量関連形質に関する分離を調査した。4 個体の R1 個体に由来する 4ML 群 RA (130 系統)、RK (101 系統)、RV (121 系統) および RL (133 系統) の R6 個体と R6 個体の自殖次代系統 (R7) を供試した。まず、R6 個体の粒形質を調査した後、各 R7 系統の到穂日数、穂長、一次枝梗数、二次枝梗数、一穂穎花数、粒長、粒幅、粒面積、粒円周長、粒長/粒幅および真円度を調査した。RA 系統群では R6 で認められた明瞭な粒形に関する分離

が、R7 では認めることができなかった。RK および RV 系統群では粒長に関して高い R6-R7 親子回帰が認められ、遺伝的分離が確認できた。これに対して、RL 系統群では出穂期および二次枝梗数に関する明瞭な分離が認められた。以上の結果を踏まえて、RL 系統群から極晩成および極早生個体を各 5 系統、二次枝梗数に関して最小数と最大数の各 4 系統から DNA を抽出して次世代シーケンスの材料として次章の研究材料に用いた。

安田（2015）は銀坊主集団において *mPing* 隣接する配列を次世代シーケンサーの利用により効率的に検出する DNA 調整法を構築した。本章では、この調整法を用いて RL 系統群内に分離した表現型変異と関連する *mPing* 新規挿入箇所の特異性を試みた。前章で選んだ 18 系統の DNA サンプルの次世代シーケンサー分析を行った。表現型の分離から、出穂日に関しては晩生変異が、二次枝梗数が変異型と推定されたので、変異型と関連する可能性のある新規挿入箇所を探索した。この結果、変異型と関連する 6 個箇所の *mPing* 挿入を検出した。しかし、次世代シーケンスの結果から推定された *mPing* 挿入を変異個体において確認することができず、原因遺伝子を特定するには至らなかった。安田の提案した DNA 調整法では最初にランダムプライミングを行ったあと、*mPing* 内部配列を用いた 2ndPCR を行うが、この時のプライマーが *mPing* とは無関係の配列に張り付く可能性がある。このことが、原因遺伝子の特定に至らなかった主な要因と推定された。したがって、*mPing* 新規挿入箇所を選択的に濃縮できるよう DNA 調整法を改善する必要がある。

以上のことから、イネ転移因子 *mPing* の転移により、イネの収量に関連する二次枝梗数の増加による一穂粒数の増加および粒形変異による百粒重の増加などの有用変異誘発効果が期待できると考えられた。*mPing* 挿入と誘発変異との関係を解明するためには、次世代シーケンス用の DNA 調整法の改善ならびに *mPing* 新規挿入が原因遺伝子の機能に及ぼす効果の解明が必要である。