

委託プロジェクト研究
「ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発」
平成29年度 最終年度報告書

13406654

イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発

研究実施期間	平成25年度～平成29年度（5年間）
代表機関	国立大学法人 東京大学 大学院農学生命科学研究科
研究開発責任者	藤原 徹
共同研究機関	国立大学法人 京都大学農学研究科、広島大学生物圏科学研究科、山形大学農学部、九州大学農学研究院、名古屋大学生命農学研究科、岡山大学資源植物科学研究所
	公立大学法人 滋賀県立大学環境科学部
	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構、農林水産業研究センター、農業生物資源研究所、農業環境技術研究所
	愛知県農業総合試験場 山間農業研究所
普及・実用化支援組織	
研究開発責任者 連絡先	TEL : 03-5841-5104 FAX : 03-5841-8032 E-mail : atorufu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

別紙様式3. 最終年度報告書 1頁 ～ 57頁

<別紙様式3. 最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
1. イネの栄養利用効率を向上する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発							
(1) 変異系統の収集	←		→			東京大学大学院農学生命科学研究科	植物栄養・肥料学研究室
(2) 遺伝解析と生理解析	←				→		
(3) 原因遺伝子の特定			←			岩手生工研	ゲノム育種研究部
(4) 圃場試験			←		→		
(5) プロジェクト運営	←				→		

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
(1) トレーサーを用いたイネの栄養効率化遺伝子の機能解析(東京大学・田野井慶太郎・2,300 千円) ① ³² P-リン酸の実験系の確立 ② ⁴² K ⁺ の実験系の確立 ③新規変異株の解析	↔					東京大学大学院農学生命科学研究科	附属放射性同位元素施設
	↔						
	↔						

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
1. イオノームを用いたイネの栄養改善遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (1)カスパリー線形成に關与するイネオルソログ遺伝子の解析 ①遺伝子破壊株の作成 ②表現型確認 ③遺伝子同定、機能解析、圃場試験 (2)イオノーム解析による栄養吸収特性が改善した変異株の遺伝子同定 ①変異体原因遺伝子の同定 ②変異体の圃場試験	↔					東京大学	大学院農学生命科学研究科
		↔					
			↔				
				↔			

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
1. イネの窒素・カリウム施肥を効率化する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (1)イネの窒素施肥を効率化する遺伝子についての検討 (2)イネのカリウム施肥を効率化する遺伝子についての検討						京都大学	農学研究科
						京都大学	農学研究科

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
1. イネのリン酸吸収と利用を改善する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (1) イネのリンリサイクリングに関わる有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (2) イネのリン酸吸収を改善する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発						広島大学 山形大学	生物圏科学研究科 農学部
						滋賀県立大学	環境科学部・生物資源管理学科

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
イネの効率的な窒素吸収に関わる遺伝子の同定とDNAマーカーの開発						国際農林水産業研究センター	生物資源・利用領域
(1) 自然変異を用いたイネの効率的な窒素吸収に関わる変異系統の遺伝子領域の同定	←		→				
(2) 窒素応答性遺伝子の同定	←	→					
(3) 突然変異を用いたイネの効率的な窒素吸収に関わる変異系統の遺伝子領域の同定	←		→				
(4) イネの効率的な窒素吸収に関わる変異系統の遺伝子の同定とDNAマーカーの開発	←				→		
(5) イネの効率的な窒素吸収に関わる育種素材の開発	←				→		
(6) イネの効率的な窒素吸収に関わる変異系統の生理解析と圃場試験	←				→		

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
1. イネのヒ素蓄積に関与する遺伝子の同定とDNAマーカー開発							
(1) ヒ素吸収・集積に関する生理的解析	←		→			農研機構農業環境変動研究センター	作物リスク低減ユニット
(2) 遺伝解析用の実験材料の養成、QTLマッピング、遺伝子の同定、機能解析 (農環研・石川覚・13,000千円)	←				→	農研機構農業環境変動研究センター	作物リスク低減ユニット
(3) DNAマーカーの開発				←	→	農研機構農業環境変動研究センター	作物リスク低減ユニット
(4) ヒ素とカドミウムの両元素の低減に寄与するイネ系統の育成				←	→	農研機構農業環境変動研究センター	作物リスク低減ユニット
(5) 低ヒ素有用素材における新たな遺伝資源の選抜				←	→	農研機構農業環境変動研究センター 次世代作物開発研究センター	作物リスク低減ユニット 育種素材湯ユニット 情報解析ユニット

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
1. イネの吸汁性昆虫に対する抵抗性遺伝子のDNAマーカー開発と遺伝子集積系統の作出・評価							
(1) 新規の耐虫性有用遺伝子資源の開発	←	→				九州大学大学院農学研究	植物育種学研
(2) DNAマーカー選抜による新規抵抗性アリルに関する近似同質遺伝子系統 (NIL) の育成			←	→		九州大学大学院農学研究	植物育種学研
(3) DNAマーカー選抜による新旧抵抗性アリルに関する遺伝子集積系統(PYL)の作出	←				→	九州大学大学院農学研究	植物育種学研
(4) 新旧抵抗性アリルが導入されたNILやPYLのウンカ・ヨコバイ類に対する抵抗性評価						九州沖縄農業研究センター	生産環境研究領域虫害グループ

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
1. イネのウンカ・ヨコバイ類抵抗性遺伝子の単離と抵抗性発現機構の解明 (LCT0011)							
(1) 持続性の高い新規抵抗性遺伝子の単離と利用	←	→				生物研	加害・耐虫機構研究ユニット
(2) 耐虫性R遺伝子の抵抗性発現のメカニズムの解析	←	→				生物研	耐病性作物研究開発ユニット
						名古屋大学大学院	生物関連防御学研究分野

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
<p>1. イネの抵抗性を打破するトビイロウンカ加害性バイオタイプの発達機構の解明</p> <p>(1) トビイロウンカの品種加害性の遺伝解析およびQTL解析</p> <p>(2) トビイロウンカの高密度連鎖地図とジェノタイピング法の開発</p> <p>(3) 発現遺伝子解析による加害因子候補の探索</p> <p>(4) さまざまな品種加害性を持つトビイロウンカ系統のスクリーニングと近交系の樹立、維持および交配集団の加害性検定</p>						<p>農業生物資源研究所</p> <p>農研機構・九州沖縄農業研究セン</p>	<p>加害耐虫機構研究ユニット 昆虫ゲノム研究ユニット</p> <p>虫害研究グループ</p>

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
(1) 中部22号由来いもち病抵抗性遺伝子のマッピング							
① QTL の検出と効果の検証	←		→			愛知県農業総合試験場	稲作研究室
② 候補遺伝子絞り込み			←		→	農研機構	次世代作物開発研究センター
(2) NERICA品種等いもち病抵抗性遺伝子のマッピングとマーカーの開発							
① QTL の検出と効果の検証	←		→			農研機構	生物機能利用研究部門
② 候補遺伝子絞り込み			←		→		
(3) コアコレクション等の多様な遺伝資源からのいもち病抵抗性 QTL の発掘	←				→	農研機構	次世代作物開発研究センター
(4) 関東209号の抵抗性低下因子のマッピングとマーカーの開発							
① QTL の検出と効果の検証	←		→			農研機構	生物機能利用研究部門
② 候補遺伝子絞り込み			←		→	農研機構	生物機能利用研究部門
(5) 圃場抵抗性遺伝子の菌株特異性(安定性)の解析							
		←			→	農研機構	次世代作物開発研究センター
(6) <i>qBS9</i> 遺伝子の機能解析	←				→	農研機構	生物機能利用研究部門

I-2. 実施体制

課題 番号	研究項目	担当研究機関・研究室			研究担当者
		機関		研究室	
LCT 0001	研究開発責任者	東京大学	大学院農学生 命科学研究科	植物栄養・肥 料学研究室	◎ 藤原 徹
	イネの栄養利用効率 を向上する遺伝子の 同定とDNAマーカー の開発	東京大学	大学院農学生 命科学研究科	植物栄養・肥 料学研究室	○ 藤原 徹 (H25～H29)
		(公財) 岩手 生物工学研究 センター	ゲノム育種研 究部		寺内 良平 (H25～H27)
		(公財) 岩手 生物工学研究 センター	ゲノム育種研 究部		阿部 陽 (H28～H29)
		京都大学	農学研究科	植物栄養学研 究室	落合 久美子 (H28～H29)
		京都大学	農学研究科応 用生命科学専 攻	植物栄養学分 野	間藤 徹 (H28～H29)
		東京大学	大学院農学生 命科学研究科	植物栄養・肥 料学研究室	神谷 岳洋 (H28～H29)
		東京大学	大学院農学生 命科学研究科	生態調和農学 機構	佐々木 和浩 (H27～H29)
東京大学	大学院農学生 命科学研究科	放射線植物生 理学	田野井 慶太郎 (H27～H29)		
LCT 0002	トレーサーを用いた イネの栄養効率化遺 伝子の機能解析	東京大学	大学院農学生 命科学研究科	放射線植物生 理学	○ 田野井 慶太 朗 (H25～H26)
LCT 0003	イオノームを用いた イネの栄養改善遺伝 子の同定とDNAマ ーカーの開発	東京大学	大学院農学生 命科学研究科	植物栄養・肥 料学研究室	○ 神谷 岳洋 (H25～H27)
LCT 0004	イネの窒素・カリウム 施肥を効率化する遺 伝子の同定とDNAマ ーカーの開発	京都大学	農学研究科応 用生命科学専 攻	植物栄養学分 野	○ 間藤 徹 (H25～H27)
		京都大学	農学研究科	植物栄養学研 究室	落合 久美子 (H25～H27)
LCT 0005	イネのリン酸の効率 的吸収に関わる遺伝 子の同定とDNAマ ーカーの開発	滋賀県立大学	環境科学部	生物資源管理 学科	○ 清水 顕史 (H25～H27)

LCT 0006	イネのリン酸吸収と利用を改善する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発	広島大学	生物圏科学研究科	植物環境評価論研究室	○ 和崎 淳 (H25～H29)
		山形大学	農学部	植物栄養学・土壌学研究室	俵谷 圭太郎 (H25～H29)
		滋賀県立大学	環境科学部	生物資源管理学科	清水 顕史 (H28～H29)
LCT 0007	イネの効率的な窒素吸収に関わる遺伝子の同定とDNAマーカーの開発	国際農林水産業研究センター	生物資源・利用領域		○ 小原 実広 (H25～H29)
		国際農林水産業研究センター	生物資源・利用領域		柳原 誠司 (H27～H29)
LCT 0008	イネのヒ素蓄積に関与する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発	農研機構 農業環境変動研究センター	有害化学物質研究領域	作物リスク低減ユニット	○ 石川 覚 (H25～H29)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	基盤研究領域	育種素材開発ユニット	杉本 和彦 (H28～H29)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	基盤研究領域	情報解析ユニット	常松 浩史 (H28～H29)
		農研機構 農業環境変動研究センター	有害化学物質研究領域	作物リスク低減ユニット	安部 匡 (H28～H29)
LCT 0009	イネのリン酸輸送効率化およびヒ素輸送低減に関わる遺伝子の同定とDNAマーカーの開発	岡山大学	資源植物科学研究所	植物ストレス学グループ	○ 山地 直樹 (H25～H26)
LCT 0010	イネの吸汁性昆虫に対する抵抗性遺伝子のDNAマーカー開発と遺伝子集積系統の作出・評価	九州大学	大学院農学研究院	植物育種学研究室	○ 安井 秀 (H25～H29)
		農研機構 九州沖縄農業研究センター	生産環境研究領域	虫害グループ	松村 正哉 (H25～H29)
LCT 0011	イネのウンカ・ヨコバイ類抵抗性遺伝子の単離と抵抗性発現機構の解明	農業生物資源研究所	昆虫科学研究領域	加害・耐虫機構研究ユニット	○ 田村 泰盛 (H25～H26)
		農業生物資源研究所	遺伝子組換え研究センター	耐病性作物研究開発ユニット	高辻 博志 (H26)

LCT 0012	イネの抵抗性を打破するトビイロウンカ加害性バイオタイプの発達機構の解明	農業生物資源研究所	遺伝子組換え研究センター	耐病性作物研究開発ユニット	高橋 章 (H25～H26)
		農業生物資源研究所	昆虫科学研究領域	加害・耐虫機構研究ユニット	松本 由記子 (H25～H26)
		名古屋大学	大学院生命農学研究科	生物相関防御学研究分野	吉岡 博文 (H25～H26)
		農業生物資源研究所	昆虫科学研究領域	加害・耐虫機構研究ユニット	○ 小林 徹也 (H25～H26)
		九州沖縄農業研究センター	生産環境研究領域	虫害研究グループ	真田 幸代 (H25～H26)
LCT 0013	いもち病圃場抵抗性遺伝子の同定とDNAマーカー開発	農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	昆虫ゲノム研究ユニット	末次 克行 (H25～H26)
		農業生物資源研究所	遺伝子組換え研究センター	耐病性作物研究開発ユニット	○ 林 長生 (H25～H27)
		農研機構 生物機能利用研究部門	植物・微生物機能利用研究領域	植物機能制御ユニット	○ 井上 晴彦 (H28～H29)
		愛知県農業総合試験場	作物研究部	作物研究室	池田 彰弘 (H25～H29)
		愛知県農業総合試験場	山間農業研究所	稲作研究室	中村 充 (H25～H29)
		愛知県農業総合試験場	山間農業研究所	稲作研究室	吉田 朋史 (H25)
		愛知県農業総合試験場	山間農業研究所	稲作研究室	鈴木 太郎 (H26～H29)
		農業生物資源研究所	遺伝子組換え研究センター	耐病性作物研究開発ユニット	井上 晴彦 (H25～H27)
		農業生物資源研究所	遺伝資源センター	保存・情報研究ユニット	山本 伸一 (H27)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	イネゲノム育種研究ユニット	福岡 修一 (H25～H27)
	農研機構 次世代作物開発研究センター	稲研究領域	稲形質評価ユニット	山内 歌子 (H25～H29)	

		農研機構 次世代作物開発研究センター	稲研究領域	稲形質評価ユニット	溝淵 律子 (H25～H29)
		農研機構 生物機能利用研究部門	植物・微生物機能利用研究領域	植物機能制御ユニット	林 長生 (H28～H29)

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

中課題番号	13406654	研究期間	平成25～29年度
大課題名	ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発		
中課題名	イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発		
代表機関・研究開発責任者名	国立大学法人東京大学大学院農学生命科学研究科・ 藤原 徹		

I-1. 研究目的

イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減は将来の農業に不可欠である。これらを実現するために、プロジェクトではこれらの農業形質を持つイネの育種に資する遺伝子を同定し、DNAマーカーを開発することを目的とする。このため、本研究では、

1. イネの栄養利用効率を向上する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発
2. トレーサーを用いたイネの栄養効率化遺伝子の機能解析
3. イオノームを用いたイネの栄養改善遺伝子の同定とDNAマーカーの開発
4. イネの窒素・カリウム施肥を効率化する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発
5. イネのリン酸の効率的吸収に関わる遺伝子の同定とDNAマーカーの開発
6. イネのリンリサイクルに関わる有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発
7. イネの効率的な窒素吸収に関わる遺伝子の同定とDNAマーカーの開発
8. イネのヒ素蓄積に関与する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発
9. イネのリン酸輸送効率化およびヒ素輸送低減に関わる遺伝子の同定とDNAマーカーの開発
10. イネの吸汁性昆虫に対する抵抗性遺伝子のDNAマーカー開発と遺伝子集積系統の作出・評価
11. イネのウンカ・ヨコバイ類抵抗性遺伝子の単離と抵抗性発現機構の解明
12. イネの抵抗性を打破するトビイロウンカ加害性バイオタイプの発達機構の解明
13. イネいもち病圃場抵抗性遺伝子の同定とDNAマーカー開発

により、イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子として、肥料施用の低減化に寄与する遺伝子、ヒ素の蓄積低減に寄与する遺伝子、トビイロウンカやツマグロヨコバイに対する耐性を付与する遺伝子、いもち菌に対する圃場耐性を付与する遺伝子を対象として、それらの遺伝子を同定し、育種に利用できるマーカーの開発を目標とする。

その結果、

1. 肥料利用低減による低コスト化と環境負荷低減
2. ヒ素の蓄積低減による低コスト化・省力化
3. 害虫耐性付与による低コスト化・省力化・環境負荷低減
4. いもち病耐性付与による低コスト化・省力化・環境負荷低減

が期待される。

I-2. 研究結果

イネの栄養利用効率を向上する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発に関しては全体としては、イネの変異系統や野生イネ染色体置換系統などを材料に、主に幼植物の栄養欠乏条件での生育を指標にして栄養欠乏系統を単離し、その圃場での栽培特性を解析するとともに、生理的、遺伝的な解析を通じてその特徴を解析、原因遺伝子を同定、マーカーを開発することを目的に行った。本研究においては低肥料条件での幼植物の成長が改善した系統を50以上同定し、それらの遺伝的な解析を通じて、原因遺伝子を6個見出した。また、得られた系統には、3年間にわたる日本各地の低肥料水田における栽培試験において、品種よりも収量が増加しているものが見出され、低肥料での耐性育種に資する母本とマーカーを得た。

岩手生物工学研究センターで変異原処理されたひとめぼれ由来の変異系統およそ6000系統や野生イネ染色体置換系統を用いて、幼植物段階での生育を指標に低肥料耐性系統を選抜した。図1は水耕栽培による選抜の様子である。このような選抜を進めたところ多くの変異系統が得られた。一例としては、88-nという系統が挙げられる。この系統は窒素欠乏での主根の成長が良いものである。この系統については本プロジェクトの研究により原因遺伝子を見出した。また、本系統の圃場試験において通常の施肥条件や低施肥条件で収量が増加する例が見られ、本プロジェクトで同定できた有望な系統・遺伝子である。また、リン酸欠乏条件でも初期成長の改善した多くの系統と同定した。一例を図3に示す。この中では、520-6という系統が圃場試験でも良好な生育や収穫を示し、かつ原因遺伝子を推定することができたものである。この520-6については、他の栄養欠乏でも初期生育が改善する傾向が見られた。

得られた系統については、遺伝的な解析を進めていった。遺伝的な解析は原則としては母本と交配し得られたF₂を用いて表現型の分離を観察し、分離が見られた場合には、岩手生物工学研究センターで開発された野生型F₂と変異型F₂をバルクで次世代配列解析を行うMutMap+などの方法を用いて、原因遺伝子の推定を進めた。

選抜された系統は圃場試験に供した。圃場試験は日本各地の大学や研究所、それに農家の方にお世話になり、低肥料条件で通常の圃場栽培を行い、生育や収量の調査を行なった(図7)。3年にわたる試験は地域により、天候により、水管理などの影響によって、結果にばらつきが大きかったものの、それぞれの圃場の土壌の物理化学的性質によって影響を受ける可能性も考えられたため、土壌分析を行い、栄養の欠乏の程度を推定するとともに、対照となる系統や品種を栽培し試験区ごとの収量を比較するなどして、可能な限り標準化に努めた。その結果、低肥料条件で収量の改善が見られる系統があった。さらにこれらの系統について原因遺伝子を同定した。

トレーサーを用いたイネの栄養効率化遺伝子の機能解析については、K-42を用いたトレーサー実験を可能にした。また、realtime radioisotope imaging systemを利用することでシロイヌナズナを用いたカリウムの吸収実験を行なった。またP-33の凍結切片法での可視化やP-32のライブイメージング装置での解析を可能にした。

また、フォスファターゼをコードする遺伝子を破壊したイネにおいて、無機リン酸やATPを供してリンの再利用について解析したところ、野生型株と差がないことが示された。

イオノームを用いたイネの栄養改善遺伝子の同定とDNAマーカーの開発については、イオノームと呼ばれる多元素分析手法を用いることにより、(1)カスパリー線形成に関与するイネオルソログ遺伝子の解析、(2)イオノーム解析による栄養吸収特性が改善した変異株の遺伝

子同定、を行い、原因遺伝子としてOsCASP2を同定した。また、玄米でのカリウムおよびリンの蓄積が低下した系統について圃場試験と原因遺伝子同定を進めた。

イネの窒素・カリウム施肥を効率化する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発については、
(1)イネの窒素利用効率に関わる遺伝子の検討と(2)イネのカリウム利用効率に関わる遺伝子の検討を行い、(1)では高収量品種のタカナリは窒素無施肥条件でも他の品種に比べて籾収量が大きいことを見出し、この現象を引き起こす遺伝子領域の絞りこみを進めた。(2)では低カリウム条件でのナトリウム吸収量に着目し、ナトリウム輸送体遺伝子*OsHKT2;1*がナトリウム吸収の品種間差の原因遺伝子であることを明らかにし、プロモーター領域の塩基多型をもとにナトリウム高吸収品種と低吸収品種を判別可能なDNAマーカーを開発した。さらに、低ナトリウム吸収品種のIR64にコシヒカリ由来の原因遺伝子を導入し、その効果を栽培試験により検証した。

イネのリン酸の効率的吸収に関わる遺伝子の同定とDNAマーカーの開発においては、日本の栽培イネを遺伝的背景とする染色体断片置換系統群を探索対象にして、低リンで根が伸長する形質に関与する遺伝子近傍のマーカーを同定した。また、無施肥水田での穂重に貢献するQTLや土耕栽培条件で収量性やリン吸収を増加する3種類のQTLを見出した。

イネのリンリサイクリングに関わる有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発においては、赤米(山形)が高いリンリサイクリング能を示すことを見出し、生理解析やLC-MSを用いた脂質のメタボローム解析を行い、赤米の上位葉と下位葉においてUDP-グルコースとUDP-ガラクトースがリン欠乏条件で増加する傾向を確認した。また、赤米とコシヒカリの地上部、根部を対象にトランスクリプトーム解析を行った。さらに、QTL-seqを用いた遺伝的解析により、12番染色体に低リン耐性の間に有意な関係を認める領域が染色体12番上に見出された。この領域には基地のリン酸効率化に関与する遺伝子は見られなかった。

イネの効率的な窒素吸収に関わる遺伝子の同定とDNAマーカーの開発においては、網羅的な遺伝子発現解析から、窒素の吸収に関する負の調節因子を同定し、その機能欠損変異が効率的に窒素を吸収させることを明らかにした。また、機能欠損型の遺伝子を識別できるDNAマーカーを開発し、日本型の品種と識別が可能であることを確認した。

さらに開発したDNAマーカーを用いて、日本晴と出穂日に大きな差異がない、日本晴の遺伝的背景を持つ育種素材を開発した。

イネのヒ素蓄積に関与する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発においては、イオンビーム照射によって得られた変異系統から玄米ヒ素濃度が高い2つの変異体(has1とhas2)および低い3つの変異体(las1, las2, las3)を選抜し、これらの生理的な解析と並行して遺伝的解析を行い原因遺伝子を同定した。さらにlas1とlas3の遺伝子を識別できる遺伝子マーカーを作出した。さらに両変異体をカドミウムをほとんど吸収しない水稻品種「コシヒカリ環1号」と交配し、ヒ素とカドミウムの両方が低い個体の選抜に得られた遺伝子マーカーを活用した。コシヒカリ環1号にlas1遺伝子を導入した系統、コシヒカリ環1号にlas3遺伝子を導入した系統、コシヒカリ環1号にlas1とlas3遺伝子の両方を導入した個体を作成し、栽培試験を行なったところ、弱勢が見られ、母本のコシヒカリよりは草丈で約10cm程度低く、また玄米収量は10%程度低いものが見られた。しかし、玄米ヒ素濃度は低下しており、las1導入で約40%、las3導

入で約30%、両遺伝子導入で約50%低減した。生育の改善は必要であるが、コシヒカリ環1号にこれら遺伝子を導入することで、ヒ素とカドミウムの両有害元素濃度が低い系統を作ることができた。

イネの吸汁性昆虫に対する抵抗性遺伝子のDNAマーカー開発と遺伝子集積系統の作出・評価においては、新規の耐虫性有用遺伝子資源を探索し、ウンカ類に対する8つの抵抗性アレルとヨコバイ類に対する3つの抵抗性アレルを同定した。さらに、トビイロウンカ抵抗性4品種・系統と台中65号との交雑後代においてDNAマーカー選抜により新旧10アレルに関するNIL (BC3 F4) を育成した(図1)。また2遺伝子PYL作出のために、NIL間の交配に由来するF2集団より両抵抗性アレルに関するホモ接合体を選抜し、その後代植物を育成して12組み合わせのPYLを作出した。これらの系統についてウンカ・ヨコバイ類に対する抵抗性評価を行ったところ、7アレル中6アレルが、トビイロウンカに対して抵抗性を示した。

イネのウンカ・ヨコバイ類抵抗性遺伝子の単離と抵抗性発現機構の解明においては、インド型イネ品種の保有するトビイロウンカ抵抗性遺伝子*BPH26*をマップベースクローニング法で単離し*BPH26*の遺伝子座情報をもとに、マーカー育種に用いるPCRベースのDNAマーカーを開発した。さらに、インド型イネ品種Rathu Heenatiの抵抗性遺伝子が導入された水稻中間母本農10号や、インド型イネ品種IR64由来のトビイロウンカ抵抗性遺伝子についても遺伝子座の解析を進めたところ、持続性の高い抵抗性品種は、いずれも複数の抵抗性遺伝子を保有している可能性が示唆された。また、耐性の機構としては、トビイロウンカの吸汁行動を電気的に測定する装置を用い吸汁行動を測定したところ*BPH26*による抵抗性は、篩部での吸汁阻害である事が示唆された。

イネの抵抗性を打破するトビイロウンカ加害性バイオタイプの発達機構の解明においては、加害性個体34のDNAをプールしたライブラリと非加害性個体154のDNAをプールしたライブラリをwhole genome shotgun sequencingを行い、候補SNPについてF2個体81の遺伝子型を決定し加害性と連鎖するものを同定し、加害因子の座乗位置を特定した。

また、*Bph1*、*bph2*、*bph4* に対して異なる加害性を保有するトビイロウンカ8系統について、RNA-seqによる発現遺伝子の網羅的解析と比較を行い、系統間で顕著な発現量差を示す遺伝子を多く見出した。特に、交配実験で用いているI87i近交系(*Bph1* 加害性なし)とC89i近交系(*Bph1* 加害性)の間で10倍以上の発現量差を示すassembled contigは6,887個(全体の約7%)あった。

イネいもち病圃場抵抗性遺伝子の同定とDNAマーカー開発においては、中部22号由来のいもち病抵抗性遺伝子の同定を進めた。中部22号とコシヒカリのF2集団において第11染色体上に見出した穂いもち抵抗性を高めるQTLについて、雑種後代系統群(F4)を用いてマッピングを行い、20から24Mbの範囲にあることを確認後、雑種後代系統群の規模を拡大してマッピングを行ったところこの領域には少なくとも2個のQTL(*qBR11-1* および*qBR11-2*)が存在することを見出した。さらにこの領域を100kb程度まで縮めた。

また、穂いもち抵抗性の改良に役立つ新規のQTLとして*qBR11-2*を見出し、これを選抜できるマーカーを整備した。さらに、NERICA品種群由来のいもち病抵抗性遺伝子の解析から複数のQTLが見出された。さらにコアコレクション等の多様な遺伝資源や関東209号についてからいもち病抵抗性QTLを見出した。

I-3. 今後の課題

本プロジェクトでは当初の目的を達成し、低コスト化に資する遺伝子やマーカーを同定した。今後の課題としては、これらの遺伝子やマーカーの育種利用が挙げられる。すでに実用品種にお導入された例もあるが、今後は各方面と協力し、本プロジェクトで見出された新しい有用遺伝子の育種利用をより強力に進めることが重要であると考えている。

「イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号：13406654

研究期間：平成25～29年度

中課題名：イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発(LCT)

小課題番号：LCT0001(平成27年度にLCT0002(平成25～26年度実施課題)と統合、平成28年度にLCT0003, LCT0004(平成25～27年度実施課題)と統合)

小課題名：イネの栄養利用効率を向上する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：東京大学・大学院農学生命科学研究科・植物栄養・肥料学研究室・藤原 徹

1) 研究目的

イネの栽培において、肥料にかかる経費はおおよそ10%程度を占めており、肥料成分としては、窒素、リン酸、カリウムが大部分である。これらの肥料をより少なくしても栽培可能にする一つの方法は、栄養吸収利用効率の向上である。また、収穫による籾の持ち出しによる水田からの栄養素の収奪は、リンで投入量の30-50%、カリウムで20-30%との報告がある。圃場から持ち出される籾(玄米)へのリン、カリウムの蓄積の低減も重要である。本研究では窒素、リン酸、カリウムの吸収利用効率や玄米への蓄積を制御するイネの遺伝子の同定とDNAマーカーの開発を行うことを目的とする。

2) 研究成果

本研究は全体としては、イネの変異系統や野生イネ染色体置換系統などを材料に、主に幼植物の栄養欠乏条件下での生育を指標にして栄養欠乏系統を単離し、その圃場での栽培特性を解析するとともに、生理的、遺伝的な解析を通じてその特徴を解析、原因遺伝子を同定、マーカーを開発することを目的に行った。本研究においては低肥料条件下での幼植物の成長が改善した系統を50以上同定し、それらの遺伝的な解析を通じて、原因遺伝子を6個見出した。また、得られた系統には、3年間にわたる日本各地の低肥料水田における栽培試験において、品種よりも収量が増加しているものが見出され、低肥料での耐性育種に資する母本とマーカーを得た。



96穴PCRプレート140枚



水耕容器23個

図1水耕栽培による大規模なスクリーニング

96穴PCRプレート当たり48個体×6×水耕容器23個=6640個体を栽培できるシステムを確立し、生育測定、元素含量測定を行なった。

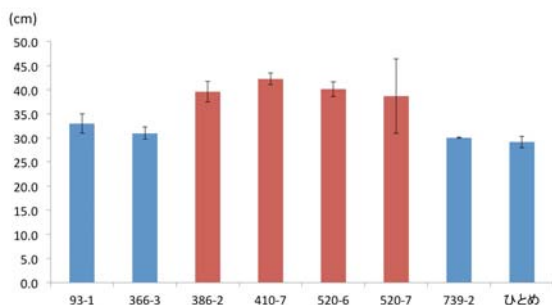


図3 リン酸欠乏耐性変異系統の取得2

図1の試験同様、昨年度リン酸欠乏水耕培地でおおよそ5000系統のヒトメボレ由来変異系統を栽培し、選抜した系統の表現型の再現性を調べた結果の一部。4つの系統で、ヒトメボレの親系統よりもリン酸欠乏での生育の改善が見られた。縦軸は草丈(cm)

以下に
主な
研究
経過
と成
果を
述べ
る。

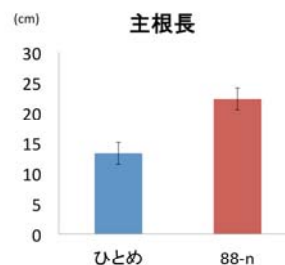


図2 N欠乏耐性変異系統の取得1

N欠乏水耕培地でおおよそ5000系統のヒトメボレ由来変異系統を栽培し、水耕開始から3週間目に根の長さを目視で比較し、根が長い系統を選抜したもの。選抜した系統について、再度同様の試験を行った結果の一部を示す。88-nはヒトメボレよりも主根の伸長が良いことが確認された(単位cm)。

岩手生物工学研究センターで変異原処理

されたひとめぼれ由来の変異系統およそ6000系統や野生イネ染色体置換系統を用いて、幼植物段階での生育を指標に低肥料耐性系統を選抜した。図1は水耕栽培による選抜の様子である。このような選抜を進めたところ多くの変異系統が得られた。一例(図2)としては、88-nという系統が挙げられる。この系統は窒素欠乏での主根の成長が良いものである。この系統については本プロジェクトの研究により原因遺伝子を見出した。また、本系統の圃場試験において通常の施肥条件や低施肥条件で収量が増加する例が見られ、本プロジェクトで同定できた有望な系統・遺伝子である。また、リン酸欠乏条件でも初期成長の改善した多くの系統と同定した。一例を図3に示す。この中では、520-6という系統が圃場試験でも良好な生育や収穫を示し、かつ原因遺伝子を推定することができたものである。この520-6については、他の栄養欠乏でも初期生育が改善する傾向が見られた(図4)。

得られた系統については、遺伝的な解析を進めていった。遺伝的な解析は原則としては母本と交配し得られたF2を用いて表現型の分離を観察し、分離が見られた場合には、岩手生物工学研究センターで開発された野生型F2と変異型F2をバルクで次世代配列解析を行うMutMap+などの方法

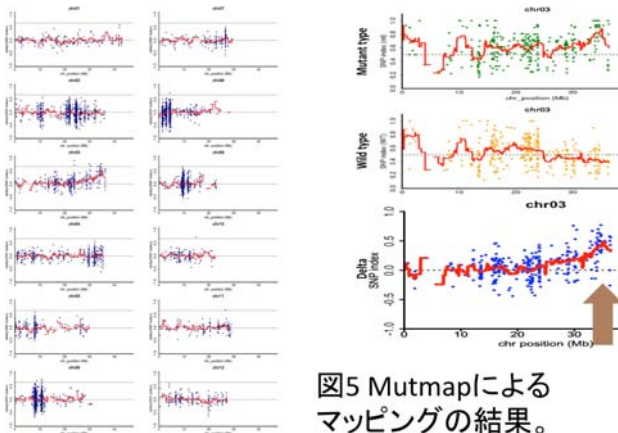


図5 Mutmapによるマッピングの結果。

520-6の原因遺伝子は、3番染色体の34Mb付近に座していると思われる

を用いて、原因遺伝子の推定を進めた。その1例を図5に示す。図5の例では、520-6の解析をしたものであり、野生型と変異型のリードの偏りの分布から、原因遺伝子は染色体3番の末端に近い領域にあることが推定された。さらに詳細なこの染色体領域についての遺伝解析やゲノム配列情報から原因遺伝子を推定していった。図6には520-6の原因遺伝子解析の結果を示している。原因遺伝子はHd16であると推測された。

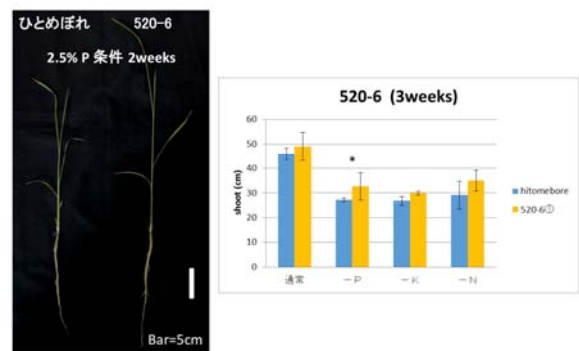


図4 P欠乏耐性系統の520-6の他の栄養欠乏の影響

検索によって得られた有望株520-6を通常条件、N, P, Kそれぞれの欠乏条件で栽培した際の幼植物の草丈(縦軸、単位cm)。*は5%水準で有意差がある。

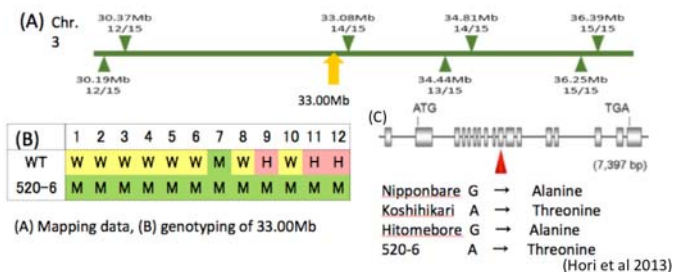


図6 リン酸欠乏耐性株520-6の原因遺伝子解析

昨年度までに同定し、原因遺伝子の存在する領域を染色体3番と推定していた、低リン酸耐性欠乏変異株520-6の原因遺伝子を推定した。(A)はマッピングの詳細を示している。F2でリン酸欠乏で幼植物の生育の良かった株についての組換えを示した。この株のF2の分離は連続的であり、表現型を見間違えている可能性も捨てられないが、この領域では連鎖が認められた。さらに原因遺伝子の存在が推定された33Mb付近にHd16遺伝子が見いだされた。(B)はF2で耐性を示した株のHd16遺伝子のSNPのタイピングの結果であり、表現型520-6のF2個体は全てHd16が変異型であった。この変異はコンヒカリを持つ変異と共通であった(C, Hori et al 2013 Plant J)。

図7 本研究における圃場試験水田

ご協力いただいた農家、大学、研究所の方々にここよりお礼申し上げます次第である。



選抜された系統は圃場試験に供した。圃場試験は日本各地の大学や研究所、それに農家の方にお世話になり、低肥料条件で通常の圃場栽培を行い、生育や収量の調査を行なった(図7)。3年にわたる試験は地域により、天候により、水管理などの影響によって、結果にばらつきが大きかったものの、それぞれの圃場の土壌の物理化学的性質に

よって影響を受ける可能性も考えられたため、土壌分析を行い、栄養の欠乏の程度を推定するとともに、対照となる系統や品種を栽培し試験区ごとの収量を比較するなどして、可能な限り標準化に努めた。(図8)



図8 福島市圃場の状況

通常施肥した場合でも欠乏させた場合でも見られていた。(図9)。一方で、このような傾向が見られない年もあった。

滋賀県立大学圃場についても本プロジェクトでは各系統の栽培試験を行った。福島圃場や他の圃場と同様に土壌試験を行い(図10)、標準品種の栽培により圃場の特性を確認した上で、選抜された系統の栽培を行った。本圃場でも520-6は収量の改善傾向が見られた(図11)。

水田によって違いはあり、年によっても傾向が違っている場合もあり統計的に有意な違いが見られない場合も多いものの、全体の傾向としては520-6系統と88-n系統はいずれも、低肥料(無施肥)でも通常区でも穂重がヒトメボレと同等か高い傾向にあった。本プロジェクトで行なった圃場試験により、幼植物の成長を元に選抜した系統の収量の改善傾向は確認できたと考えている。

88-nの原因遺伝子については、マッピングを

図8に示す福島市の圃場での栽培試験の結果、本研究で選抜され系統の一つ520-6が親系統であるひとめぼれよりも一株あたりの穂重が重い傾向が見られた。この傾向は水田に

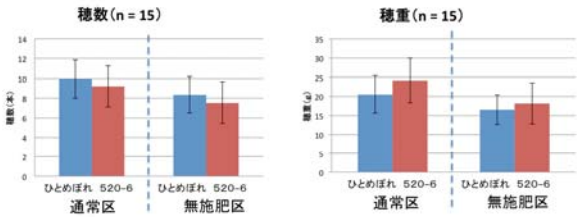


図9 520-6系統の福島の通常及び無施肥水田での栽培結果

520-6系統を福島市の通常施肥の水田および無施肥の水田で栽培した。穂数には差は認められなかったが、穂あたりの重量が有意に高く、株当りの穂重も大きかった。

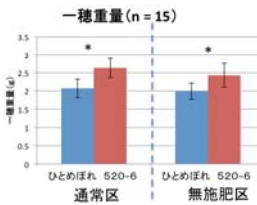


図10 滋賀県立大学圃場

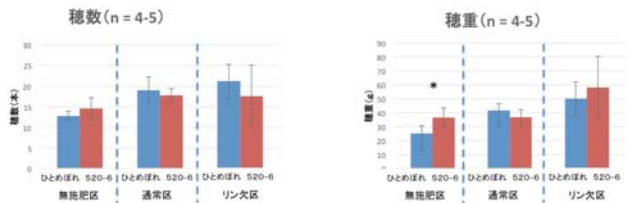


図11 520-6系統の滋賀の通常、リン酸欠乏、無施肥水田での栽培結果

清水博士の多大な協力を得て、520-6系統を滋賀県立大学の水田で栽培した。無通常栽培では大きな違いが認められなかったが、無施肥やリン酸欠乏水田では穂あたりの重量が有意に高く、株当りの穂重も大きかった。

進め変異の可能性のある遺伝子を見出していたが、その中にある転写因子が存在していた。この遺伝子のシロイヌナズナの相同遺伝子の変異株の表現型と88-nの性質に共通点が見られることから、この遺伝子が原因遺伝子である可能性が高いと考えられる。さらに、この遺伝子のCRISPR/Cas9による破壊系統を作出し原因遺伝子の確定を進めている。



例年通常区に比べ、
低N区で2割の収量減

図12 東北大学
鹿島台圃場の状況

通常区
N:P:K=3.2 kg : 3.2 kg : 3.2 kg (/10a)

低N区
N:P:K=0.0 kg : 3.0 kg : 3.0 kg (/10a)

2004年から2016年までN無施肥

	通常区	低N区
pH	5.1	5.3
有効態P [mg/100g]	8.9	9.3
交換性K [mg/100g]	40.7	38
交換性Mg [mg/100g]	85.4	102.9
交換性Ca [mg/100g]	277.4	324.7
Mg:K比	4.9	6.3
Ca:Mg比	2.3	2.3
Ca飽和度 [%]	47.3	51.9
塩基飽和度 [%]	71.7	78.3
全窒素 [%]	0.17	0.15
硝酸態窒素 [mg/100g]	0.19	0.23
アンモニア態窒素 [mg/100g]	3.42	3.28
リン酸吸収係数	789	895
CEC [mg/100g]	20.9	22.3
仮比重	0.93	0.93

5 20-6系統については、原因遺伝子はHd16であり、この遺伝子については、染色体の部分置換系統を分与していただき、その生育を圃場栽培により調査した。東北大学鹿島台水田（図12）において窒素欠乏圃場でもHd16の染色体置換系統は窒素欠乏での収量維持に効果があることが見出された（図13）。このような傾向は他の圃場では見られないこともあり、Hd16用は栽培環境やニーズをよく勘案する必要があるものと考えている。Hd16は開花時期に影響を及ぼす遺伝子であり、520-6

には晩生の傾向があるが、88-nにはそのような傾向は見られず、より汎用性の高い遺伝子（マーカー）であると考えられる。

また本研究は遂行途中でLCT0002, LCT0003, LCT0004を統合した。LCT0002においてはトレーサーを用いた元素輸送解析系の開発を、LCT0003ではイオノームを用いた低肥料耐性系統の選抜と遺伝解析を、LCT0004では、窒素利用効率改善と低カリウム耐性遺伝子の同定とマーカー化を行なった。

全体として本研究においては、多くの系統を選抜し、遺伝的解析、生理的な解析、圃場での栽培試験を行ってきた。この中で6個の遺伝子を同定し少なくともそのうち二つについては、低肥料や通常条件での収量増加に効果が見られることを明らかにすることができ、当初の目標を達成することができたと考えている。

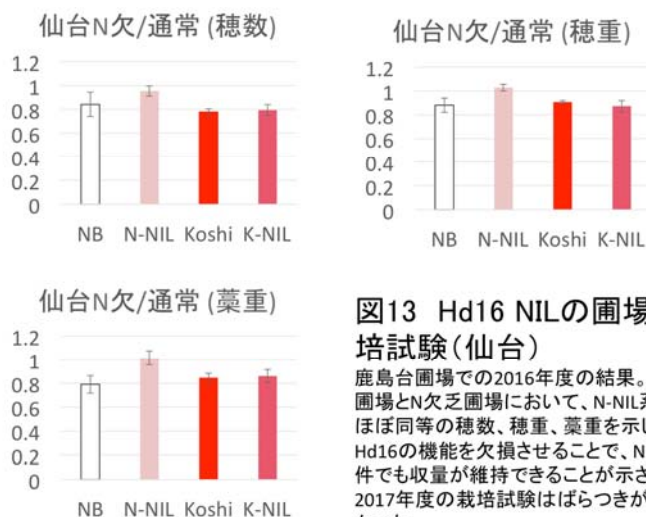


図13 Hd16 NILの圃場栽培試験(仙台)

鹿島台圃場での2016年度の結果。通常圃場とN欠乏圃場において、N-NIL系統はほぼ同等の穂数、穂重、藁重を示した。Hd16の機能を欠損させることで、N欠乏条件でも収量が維持できることが示された。2017年度の栽培試験はばらつきが大きかった。

3) 成果活用における留意点

本研究により、低肥料条件で収量の改善傾向のみられる系統を同定し、その原因遺伝子を見出した。得られた原因遺伝子は低肥料耐性以外の性質を変化させる可能性もあり、開花の遅延を引き起こす (Hd16) 場合もあるため、栽培体系の確立が重要であると考えている。

4) 今後の課題

本研究により、得られた遺伝子(変異)を様々な品種に導入するとともに低肥料での栽培体系との組み合わせでより低コスト化を図ることが重要であると考えている。

「イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号：13406654

研究期間：平成25～29年度

中課題名：イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発(LCT)

小課題番号：LCT0006(平成28年度にLCT0005(平成25～27年度実施課題)と統合)

研究期間：平成25～29年度

小課題名：イネのリン酸吸収と利用を改善する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発(平成28年度にイネのリン酸の効率的吸収に関わる遺伝子の同定とDNAマーカーの開発(平成25～27年度実施課題)と統合)

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：広島大学・生物圏科学研究科・植物環境評価論研究室・和崎淳

1) 研究目的

我が国で持続的な農業を行うためには、リン肥料への依存度を減らすための品種改良が必要である。リン肥料は、限られた産出国から輸入しているリン鉱石を原料としており、数十年後には資源の枯渇も危ぶまれている。そのため本研究課題では、遺伝解析材料や近縁野生種遺伝資源などこれまでのイネゲノムプロジェクトで整備されてきた様々な研究リソースを活用し、土壌中に固定したリン酸の効率的吸収・利用に関わる遺伝子の同定と低リン耐性関連形質のマッピングおよび選抜用DNAマーカーの開発を行うことを目的とする。

2) 研究成果

①イネのリンリサイクルに関わる有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発を行うため、以下の研究を実施した。

1) リンリサイクル能の品種間差の比較

生育初期のリンリサイクル能を評価するため、リン欠乏条件下で21日間水耕栽培した品種の部位毎のリン含有量について比較したところ、赤米で下位葉（第1～第3葉）のリン含有量が低く、上位葉（第4葉以降）のリン含有量が最も高く維持された一方で、コシヒカリで上位葉のリン含有量が最も低いなど、品種間でリンリサイクル能が大きく異なることが示された(図1-1)。品種間での地上部の生育速度を考慮するため、生育量の割合とリン含有量の割合を比較した場合にも赤米(山形)で最も上位葉へのリンの分配が高いことが示唆された。以上のことから、生育初期においては

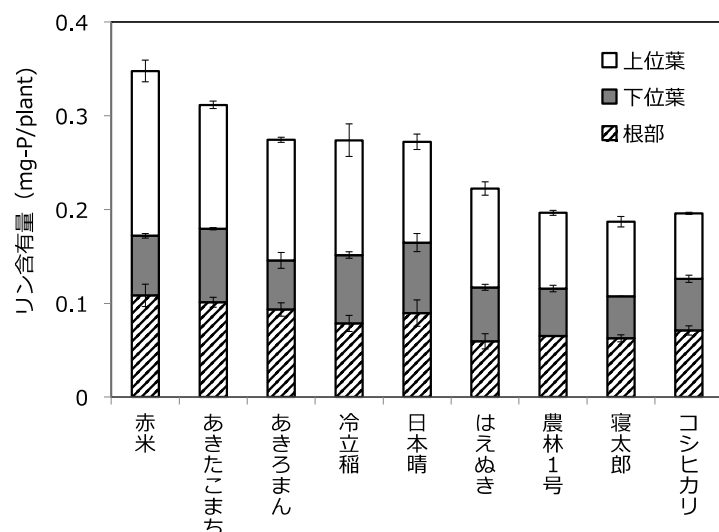


図1-1 リン欠乏条件下で栽培したイネ9品種における部位毎のリン含有量。上位葉のリン含有量が多いものから並べた

赤米（山形）で低リン耐性が高く、その耐性の高いことの要因の一つとしてリンリサイクリング能が高いものと判断された。

以上の結果より、解析対象としてリンリサイクリング能が高い系統を赤米（山形）、低い系統をコシヒカリに絞って解析を行うこととしたが、この形質は生育初期に判断したものが中心であり、実際にリンリサイクリングが生育期間を通して認められるかどうかについて、土耕栽培を行って検討した。その結果、栄養成長期から開花期まで、リン欠乏条件下では赤米（山形）で生育が良好であった。部位ごとのリン濃度を調査したところ、リン欠乏条件下で赤米の下位葉における顕著なリン濃度の低下が認められた。下位葉から上位葉へのリン濃度から、リン再転流効率を求めたところ、赤米では高いリン再転流効率がリン欠乏条件下で高まったのに対し、コシヒカリでのリン再転流はリン施肥に反応していないことが示された（図1-2）。以上の結果より、赤米（山形）の低リン耐性はリンの採点流を含むリンリサイクリング能が重要であることが示された。

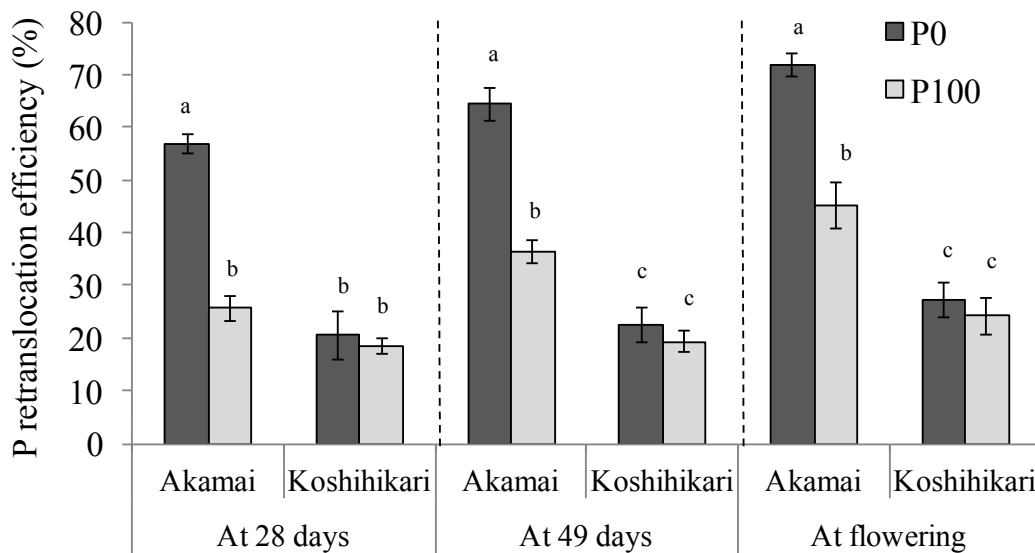


図1-2 P0（リン無施肥）、P100（リン肥料を100 mg/kg土壌で与えた）で土耕栽培した赤米とコシヒカリのリン再転流効率。

2) リンリサイクリングに関わる有用形質のシステム生物学的的手法による単離・解析
 リンリサイクリング能が高い赤米（山形）および低いコシヒカリを28日間水耕栽培し、上位葉と下位葉に分けて採取した。凍結試料を粉碎後、LC-MSを用いた脂質のメタボローム解析に供した。その結果の概要を表1-1にまとめた。コシヒカリと比較して、赤米ではDGDGやGlcADGの増加割合が大きく、リン脂質の減少割合がPGを除いて顕著に高かった。下位葉でその傾向は大きいですが、赤米ではその傾向は上位葉でも強く認められた。また、糖脂質のうち、DGDGの絶対量が多いことはこれまでにわかっているため、リン脂質から糖脂質へ置き換える能力が高いことが脂質におけるリンリサイクリングを支えていると考えられる。赤米（山形）における高いリンリサイクリング能の一部には、脂質の再編が早く、大きく、全身的に起きることが重要であると考えられた。

表1-1 播種後28日目のコシヒカリと赤米の上位葉と下位葉の脂質種の相対面積値の比(-P/+P).

品種	部位	MGDG	DGDG	GlcADG	SQDG	PC	PE	PG	PI	lysoPC	DAG	TAG
コシヒカリ	上位葉	1.87	1.89	5.42	1.21	0.48	0.17	0.50	0.15	0.47	0.98	3.35
	下位葉	1.31	1.48	4.25	1.05	1.04	0.45	0.38	0.37	0.70	0.91	2.10
赤米	上位葉	1.07	1.59	5.17	1.08	0.23	0.11	0.20	0.10	0.22	0.83	1.24
	下位葉	0.79	1.07	2.92	0.91	0.30	0.19	0.14	0.14	0.34	0.69	1.45

CE-TOF-MSによるメタボローム解析の結果、赤米の上位葉と下位葉においてUDP-グルコースとUDP-ガラクトースがリン欠乏条件で増加する傾向が認められた(図1-3)。リンが不足する条件下で起きる膜脂質再構成によってリン脂質を減らし、糖脂質(MGDG, DGDG, SQDG, GlcADG)を増加させるが、上記の通りその機能は特に赤米で高い(表1-1)。UDP-グルコースとUDP-ガラクトースは、糖脂質の合成に必要な基質であることから、その量が増加していることは糖脂質の合成に寄与しているものと推察された。

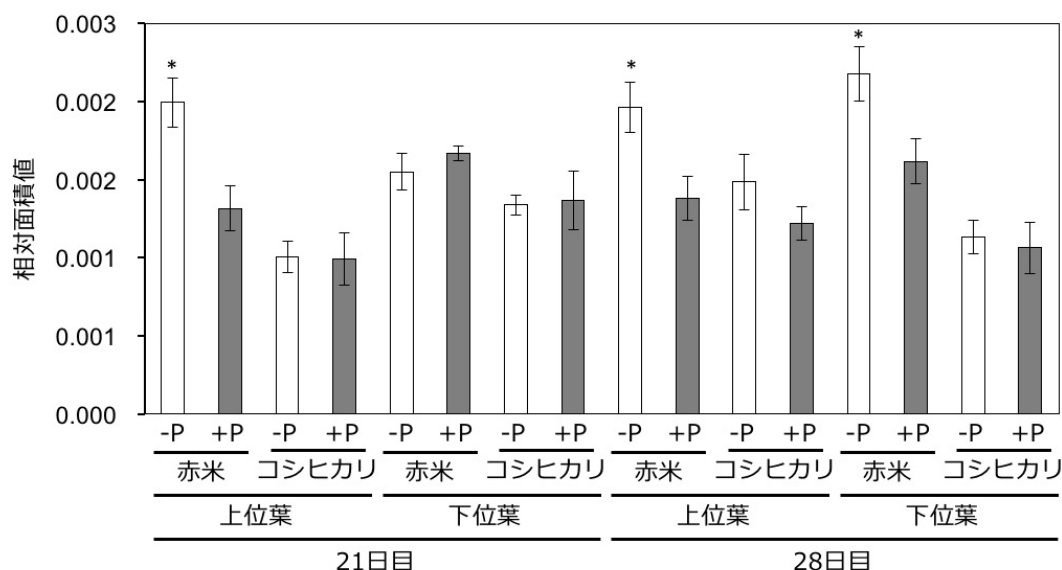


図1-3 UDP-グルコースとUDP-ガラクトースを合わせたピークの相対面積値. -P区で有意に増加したものに*を付した.

赤米とコシヒカリの地上部、根部を対象にマイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を行った。発現量が変動した遺伝子について図1-4にまとめた。いずれの品種とも、時間を追って発現変動した遺伝子の数は増加した。発現が変動した遺伝子の数は、10日目では赤米で多くなっており、低リン耐性を示す上で必要な遺伝子が多く変動しているものと考えられた。赤米の地上部において、P0区で発現量が多くなったもの上位には脂質の変動に関わる可能性のある遺伝子が4種類含まれ、早い段階での脂質再編が重要な低リン耐性機構の一つであることが示唆された。

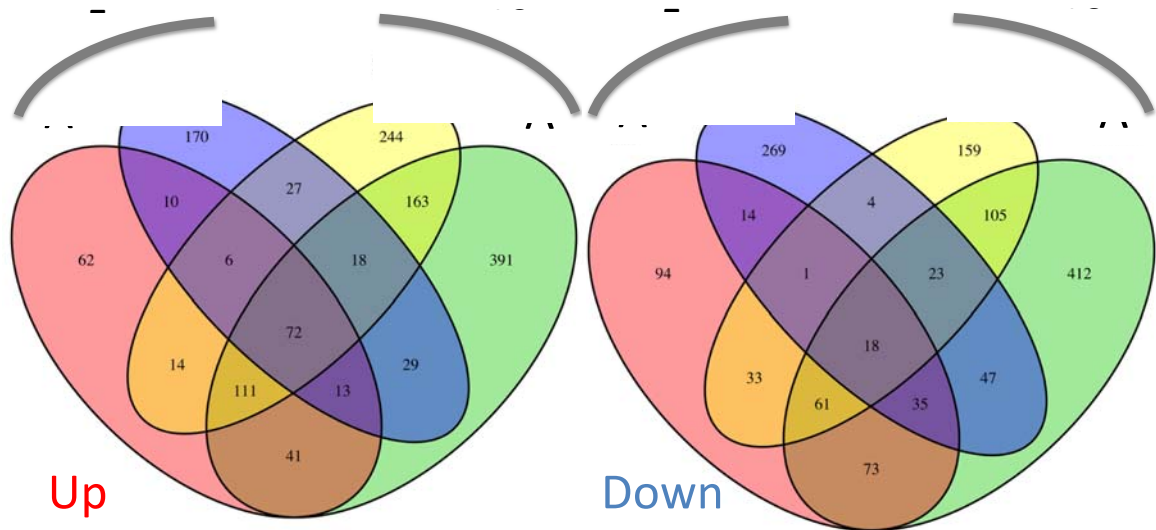


図1-4 イネ各品種のトランスクリプトーム解析によりリン欠乏で変動が示された遺伝子の数. 左にリン欠乏によって発現が2倍以上増加したもの、右に2倍以上発現が減少したものを示した。A, Kはそれぞれ赤米、コシヒカリを示す。5, 10はそれぞれ処理日数を示す。

3) リンリサイクルに関わる有用遺伝子DNAマーカーの開発

リンを与えない培養土に30日間栽培したF5系統および親系統の草丈を指標に、母本と父本の異なる組み合わせからそれぞれ草丈の高い10個体（耐性群）と草丈の低い10個体（感受性群）ずつを選んだ。コシヒカリx赤米の耐性群と感受性群について、次世代シーケンサーを用いたQTL-seqを行い、そのデータ解析を進めたところ、12番染色体に低リン耐性間に有意な関係を認めるピーク(23.6-27.5 Mb)が見いだされ、これを*qLPT1* (*QTL for low-P tolerance 1*)と命名した(図1-5)。12番染色体にはこれまでにカサラスから低リン耐性を示すQTL (Pup1, 15.31-15.47 Mb)が見いだされているが、この領域とは重ならない。また、これまでの調査では赤米(山形)では日本晴など他のジャポニカ品種と同様にPup1の原因遺伝子であるPstol1の発現は認められていないことから、今回同定されたQTLの原因遺伝子はPstol1でないと考えられる。

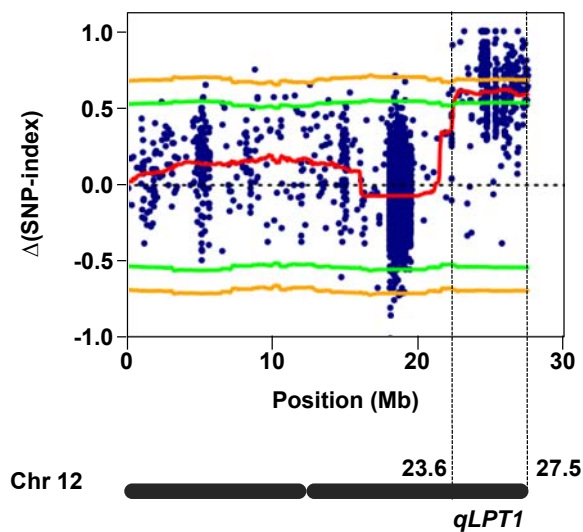


図1-5 QTL-seqの結果得られた、赤米由来の配列と低リン耐性間に有意な関係が認められたQTL (*qLPT1*)。

QTL-seqの結果得られたqLPT1領域には445の遺伝子が存在した。ここにはSNPsが45遺伝子79か所に認められ、そのうちORF（翻訳領域）に含まれるものが13遺伝子、イントロンに含まれるものが17遺伝子、5'-または3'-の非翻訳領域に含まれるものが9遺伝子、推定プロモーター領域に含まれるものが38遺伝子（重複を含む）であった。また、ORFに含まれるSNPsのうち、アミノ酸置換が起こる非同義置換は5遺伝子に存在した（表1-2）。

表1-2 qLPT1領域に非同義置換の認められた5遺伝子

SNP position	Locus ID	推定される機能	非同義置換SNPs		Δ (SNP-index)	SNPs頻度 (Kb ⁻¹)	文献
			コシヒカリ	赤米			
24,703,693			A T C/Ile	G T C/Val	0.83		
24,706,749	Os12g0590500	Kinesin-like protein	C Q G/Pro	C A G/Gln	0.67	0.56	
24,707,031			A C C/Thr	A I C/Ile	0.78		
24,707,782			A G T/Ser	G G T/Gly	0.54		
25,250,306			Os12g0600200	RING finger-containing protein	A G T/Ser		A C T/Thr
25,307,956	Os12g0601200	Uridine kinase family protein	Q G G/Arg	I G G/Trp	0.67	0.76	
25,921,238	Os12g0612700	Homeodomain transcription factor-like protein (OsHOX33)	T Q G/Ser	T I G/Leu	0.72	0.49	Luan et al. 2013
26,371,075	Os12g0619000	Calmodulin-binding domain containing protein	Q C A/Ala	A C A/Thr	0.75	0.19	

*IRGSP annotation (v. 1.0.22); ** SNP frequency Kb⁻¹ of exon region.

Os12g0590500はシロイヌナズナの*PHRAGMOPLAST ORIENTING KINESIN 2 (POK2)* と近縁である。*POK2* は細胞質分裂に関与し、植物の成長に必須の働きを担うため、赤米における低リン条件下での根の大きさを維持することに役立つ可能性がある。

Os12g0600200 はシロイヌナズナの*DREB2A-INTERACTING PROTEIN 2 (DRIP2)*と近縁である。DRIP2は、乾燥や塩ストレスに応答するDREB2A転写因子の負の制御因子として知られている。ストレス応答という点でリン欠乏と共通点がある可能性が考えられる。

Os12g0611200はUridine kinaseのドメインを有すると推定される。Uridine kinaseにより生成されるUMPはUDP-GlcやUDP-Galなどリン欠乏条件下での脂質再構成に関わる分子の前駆体であり、これが低リン耐性に重要である可能性が考えられる。

Os12g0612700はOsHOX33として報告されている転写因子をコードする遺伝子であり、葉の老化に関与するとの報告がある(Luan et al. 2013)。葉の老化とリンの利用効率には関係が深いことから、この遺伝子の関与が考えられる。

Os12g0619000はシロイヌナズナの*IQ-DOMAIN 1 (IQD1)* と近縁である。IQD1はカルモジュリンと結合する核タンパク質で、生物ストレスに応答して蓄積するグルコシノレートの制御にCa²⁺濃度依存的に関わると報告されている。ストレス応答という点でリン欠乏と共通点がある可能性が考えられる。

推定プロモーター領域、非翻訳領域にSNPsがある遺伝子については、発現量の大きな変動が認められる場合に重要な影響をもたらす可能性が考えられるため、すべての遺伝子についてqRT-PCRを行って発現量の調査を行った。その結果、Os12g0601500は赤米特異的に発現量が高く、特に若い葉で発現量が高いことが示された。この遺伝子は機能未知のタンパク質をコードしており、機能の推定は行えなかった。また、Os12g0638300はコシヒカリの下位葉で発現量が高い一方で、赤米では発現量の変動が起きておらず、コシヒカリの発現量の変動が低リン耐性に対して負に寄与している可能性が考えられた。なお、この遺伝子はpeptide transporterに近縁である。この遺伝子のプロモーターは転写開始点の921塩基上流に低リン応答に重要なPHR転写因子が結合するP1BS配列が存在するが、その12塩基上流

にSNPsのうちの一つが位置しており、赤米型になるとこの配列を含む8塩基のパリンドローム配列になることを見出した。この点が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

赤米とコシヒカリの掛け合わせF5系統から、低リン土壌で生育の良好な集団(T)と劣悪な集団(S)に分けてF6系統の種子を採取した。このF6種子の一部をリン欠乏の土壌を用いて土耕栽培し、12番染色体のqLPT1領域に含まれるDNAマーカーを用いて遺伝子型を検証したところ、葉身長の大きい群に赤米型が多く、小さい群にコシヒカリ型が多かった。また、T集団においては赤米型、S集団においてはコシヒカリ型が卓越していた。このことから、本DNAマーカーの実用可能性が支持された。

② イネのリン酸吸収を改善する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発に向けて、日本の栽培イネを遺伝的背景とする染色体断片置換系統群を探索対象にすることで、見出した有望形質のマッピング・クローニングと育種母本になりうる準同質遺伝子系統の作成を試みた。そのうち、コシヒカリと日本晴の染色体断片置換系統群(CSSLs)を用いた成果と、その他の近縁野生種の断片導入系統(ILs)などを用いた成果を報告する。

イネゲノム・リソースが配布するCSSLsのうち、コシヒカリを遺伝的背景に持ち日本晴の染色体断片を置換したSL601~641を水耕栽培したところ、染色体1が日本晴に置換したSL602はコシヒカリの持つ低リンで根が伸長する形質を失うことがわかった。コシヒカリ×SL602のF₂(以下SL602F₂)384個体を用いたQTL解析により、置換領域内のSSRマーカーRM1003(33.5Mb)近傍にLODスコア12.9で寄与率41.8%の有意な遺伝子座領域が検出できた(図2-1)。また、SL602F₂の自殖F₃151系統を20年連続で無施肥使用した水田で栽培したところ、RM1003とCAPSマーカー(37.9Mb)間のインターバルにLODスコア2.75で寄与率8.9%の穂重に関するQTLが検出された(このQTLは日本晴対立遺伝子が穂を有意に重くした)。つまりSL602の置換領域にはリン欠乏ストレス応答形質と無施肥栽培での収量性に寄与する形質が存在することが示唆されたため、SL602F₂の自殖後代集団を用いて原因遺伝子のマッピング・クローニングを行うことにした。

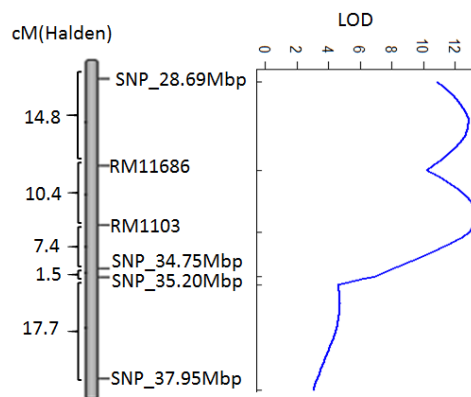


図2-1 コシヒカリ×SL602F₂の置換領域(28.69–37.95Mbp)に検出された低リン誘導性根伸長形質QTLのLODプロファイル

染色体1の28.6~35.2Mb間でDNAマーカー組換がみられたSL602F₃~F₄を選抜し、その自殖後代のコシヒカリ型ホモ接合体と日本晴型ホモ接合体のリン欠乏水耕栽培条件での最大根長の分離を調べることで、後代で形質の分離が観られた系統のグラフィカルジェノタイプに基づいて、約2.1Mbの範囲に候補領域を絞り込んだ。さらにSL602F₅のSNPマーカーによる選抜で候補領

域を179kbにまで絞り込んだ(図2-2) (Kokaji et al 投稿準備中)。この領域内の発現遺伝子変動の品種間差を44Kマイクロアレイで調べたところ、リン欠乏水耕条件で2倍以上の発現量比を示すピリドキサルリン酸依存性酵素とMDR-like ABCトランスポーター(類似)が見つかり、また1.5倍以上の発現量比を示すMYB転写因子1つと機能不明遺伝子が1つ見つかった。現在、これら候補遺伝子の絞り込みと相補性検定の準備を進めている。

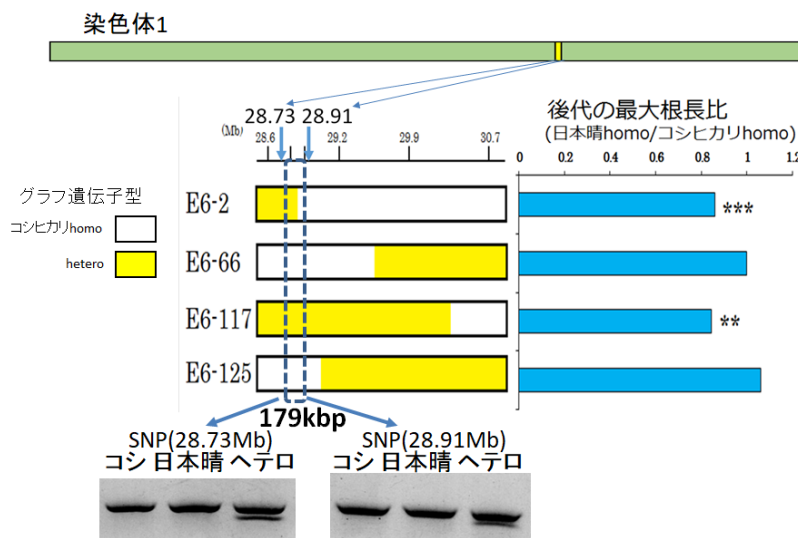


図2-2 コシヒカリ×SL602F₅集団を用いた遺伝子領域の絞り込みと選抜用SNPマーカーの作成

また、日本イネ品種を背景とし近縁野生種やインディカ品種を染色体断片として持つ置換系統群を用い、水耕や土耕栽培およびリン欠乏圃場栽培で低リン耐性関連形質のスクリーニングを行った。そのうちリン欠乏水耕栽培で見出した最大根長を増加する形質については2種類の遺伝子座のファインマッピングと選抜用DNAマーカーの作成を行い(共に染色体6長腕であるが物理地図位置は異なる)、また圃場および土耕栽培条件で収量性やリン吸収を増加する遺伝子座については3種類のQTLを検出できた(表2-1)。

表2-1 日本イネ品種背景の染色体断片置換系統を用いてマッピングできた低リン耐性関連形質

交配集団	評価方法	形質	状況
みずかがみ ^{*1} ×OHA15 ^{*2}	水耕	最大根長	131.8kbに絞り込み(7.72-7.85Mb)
IBIL34 ^{*3} ×IBIL44 ^{*3}	水耕	最大根長	136kbに絞り込み(29.69-29.83Mb)
コシヒカリ×KRIL21 ^{*4}	圃場	穂重、粒重など	QTLマッピング(LOD3)
KRIL24 ^{*4} ×KRIL39 ^{*4}	圃場	穂重など	QTLマッピング(LOD14)
IRIL9 ^{*5} ×IRIL3 ^{*5}	土耕(Fe-P)	分けつ	QTLマッピング(LOD4)

*1 滋賀県奨励の良食味品種。見つけた耐性遺伝子の社会的実装のために交配

*2 コシヒカリ背景でインディカ多収品種ハバタキの染色体6長腕断片を持つ置換系統(ホンダ技研)

*3 いただき背景の *Oryza barthii* (IRGC acc 101243)染色体断片導入系統(NARO平林氏が作出)で、IBIL34は染色体6にIBIL44は染色体8にそれぞれ主な導入断片を持つ。

*4 コシヒカリ背景の *Oryza rufipogon* (IRGC acc 104814)染色体断片導入系統(NARO平林氏が作出)で、KRIL21は染色体6にKRIL24は染色体7にKRIL39は染色体12にそれぞれ主な導入断片を持つ。

*5 いただき背景の *Oryza rufipogon* (IRGC acc 103814)染色体断片導入系統(NARO平林氏が作出)で、IRIL3は染色体1にIRIL9は染色体2にそれぞれ主な導入断片を持つ。

3) 成果活用における留意点

- ① *qLPT1* を判別するための DNA マーカー情報を提供することが可能である。ただし、既存の品種にどの程度分布しているかを検討していないため、これを含めて検討する必要は残る。
- ② 報告した形質を挟み込む DNA マーカー情報は提供可能である。遺伝子の絞り込みに用いた系統については、遺伝資源材料の提供元（SL602 はイネゲノム・リソース、OHA15 は本田技研、ILs は NARO 平林氏）の了解を得た上で提供することができる。

4) 今後の課題

- ① *qLPT1* が低リン耐性形質に有用であることは示されたが、どの程度の肥料削減効果があるかについて、さらなる検証が必要である。現在、コシヒカリ x 赤米（山形）のコシヒカリへの戻し交雑系統を BC4F2 まで育成を進めており、これを活用して農業形質への効果について検証を行うとともに、リン酸質肥料を削減可能な新品種の育成を行う必要がある。
- ② 圃場や土耕栽培で見出した QTL 領域の絞り込みは、効率的に行うための工夫が必要である。

「イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13406654

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (LCT)

小課題番号: LCT0007

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: イネの効率的な窒素吸収に関わる遺伝子の同定とDNAマーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・小原実広

1) 研究目的

イネの栽培における肥料コストの抑制、および施肥された肥料の環境への流出による環境負荷の低減を達成させる遺伝子の同定とDNAマーカーの開発を目的とする。さらに、同定した遺伝子を日本型の品種に導入した育種素材を開発することを目的とする。

2) 研究成果

網羅的な遺伝子発現解析から、窒素の吸収に関する負の調節因子を同定し、その機能欠損変異が効率的に窒素を吸収させることを明らかにした。また、機能欠損型の遺伝子を識別できるDNAマーカーを開発し、日本型の品種と識別が可能であることを確認した。

DNAマイクロアレイ解析は、以下の2つの条件で栽培したイネの根を用いた。0.005 mMあるいは1 mMの塩化アンモニウムを唯一の窒素源となるように調整した水耕液で10日間イネを栽培した。全RNAを調整するまで、根は-80度に保存した。イネ根より全RNAを抽出し、オリゴDNAマイクロアレイ(4 × 44 K RAP-DB)によるマイクロアレイ解析を行った。この解析においては、異なる4サンプルの根から、独立して調整したRNAを用いて、一色法によるDNAマイクロアレイ解析を実施した。

その結果、窒素欠乏なアンモニウム濃度(0.005 mM)に比較して、十分なアンモニウム濃度(1 mM)で50倍以上発現している遺伝子を68個、100倍以上発現している遺伝子を35個同定した(表1)。

表1 0.005 mM NH₄Clに比較して、1 mM NH₄Clで栽培したイネの根で顕著に変動する遺伝子の数

発現・蓄積比 (倍)	遺伝子数
50倍以上	68遺伝子
100倍以上	35遺伝子

これらのうち、100倍以上の発現・蓄積が認められた遺伝子 Os02g0120100 の解析を行った。この遺伝子に *Tos17* が挿入された系統の窒素吸収を評価した。水耕法で栽培したところ、対照である日本晴に比較して、Os02g0120100 への *Tos17* 挿入系統における窒素の蓄積量は約 42 %高かった(図1)。

これより、Os02g0120100 の機能欠損型変異は、効率的に窒素を吸収させることが明らかとなった。
 開発した DNA マーカー（図 2）は、多くの日本型品種で有効であることが確認された。
 開発した DNA マーカーを用いて、日本晴と出穂日に大きな差異がない、日本晴の遺伝的背景を持つ育種素材を開発した。

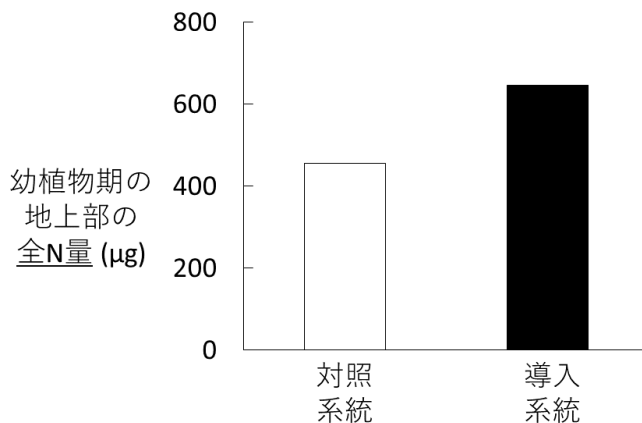


図 1 水耕法で栽培したOs02g0120100への*Tos17*挿入系統の窒素蓄積量
 对照系統は、日本晴。

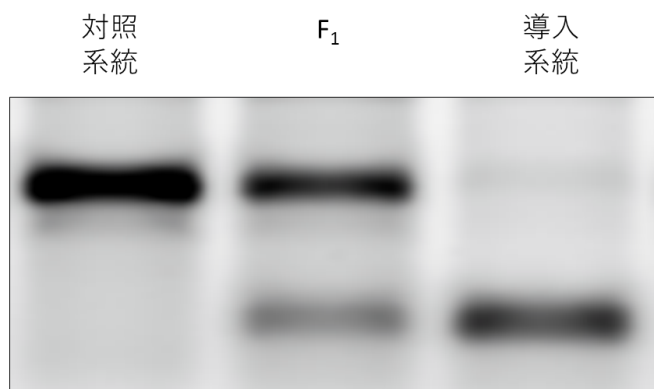


図 2 Os02g0120100への*Tos17*挿入変異を識別する DNA マーカーの開発
 对照系統は日本晴、F₁は对照系統と導入系統の交配第1世代の個体。

3) 成果活用における留意点

開発した DNA マーカーの検出は、2% (w/v) のアガロースゲルを用いる必要がある。
 Os02g0120100 への *Tos17* 挿入による変異は、アンモニウム態窒素の吸収に特異的に効果がある。
 Os02g0120100 への *Tos17* 挿入による変異は、幼苗期における窒素吸収に関わっていることは明らかになったが、水田で栽培したイネにおいても同様の効果があるかを検証する必要がある。

4) 今後の課題

Os02g0120100 への *Tos17* 挿入による変異が、水田で栽培したイネにおいても効率的な窒素吸収に関わっていることを検証する必要がある。

Os02g0120100 への *Tos17* 挿入による変異の効果がある水田環境を明らかにするために、施肥が異なる水田での実証試験を行う必要がある。

有効な肥培管理技術を適用し、最も効果のある栽培方法を明らかにする必要がある。

「イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13406654

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (LCT)

小課題番号: LCT0008

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: イネのヒ素蓄積に関する遺伝子の同定とDNAマーカーの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 農業環境変動研究センター・有害化学物質研究領域・作物リスク低減ユニット・石川覚

1) 研究目的

コメ中に含まれる無機ヒ素の国際基準値(精米で0.2 mg/kg、玄米で0.35 mg/kg)が設定され、今後水稻のヒ素吸収抑制対策が喫緊の課題と言える。ヒ素集積の低い水稻品種を開発する上で、ヒ素の吸収や移行に関わるメカニズムの解明は必要であるが、未だ明らかでない。

そこで本研究では、ヒ素蓄積性に変異が生じたコシヒカリ変異体を用いて、ヒ素の吸収や集積に関連する遺伝子を特定し、それら遺伝子が関与するヒ素集積メカニズムを解明するとともに、品種育成に利用できるDNAマーカーを開発することを目的とする。さらに、コシヒカリの低ヒ素変異体とカドミウムをほとんど吸収しない「コシヒカリ環1号」を交配して、ヒ素とカドミウムの両方の低減に寄与できる新たな系統を育成することを目的とする。

2) 研究成果

(1) ヒ素吸収・集積に関する生理的解析

(方法) イオンビーム照射によって変異を誘発させた個体の中から、コシヒカリよりも玄米ヒ素濃度が高い2つの変異体(*has1*と*has2*)および低い3つの変異体(*las1*, *las2*, *las3*)を選抜した。部位別のヒ素濃度を比較するために、これらの変異体および親品種であるコシヒカリを常時湛水下で圃場栽培(1M塩酸抽出性の土壌ヒ素濃度: 1.2mg/kg)した。収穫後は各部位別に分け、濃硝酸-過酸化水素で酸分解後、誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)で分析した。また、玄米は形態別ヒ素濃度を測定するため、希硝酸で抽出したサンプルをODSカラムを付属したHPLCでヒ素を分離し、ICP-MSで各形態のヒ素濃度を測定した。

(結果) *has1*と*has2*の玄米ヒ素濃度はコシヒカリよりも明らかに高い値を示した。特に玄米の無機ヒ素濃度は両高ヒ素変異体でコシヒカリの5倍高い値を示した(図1(a))。メチルヒ素化合物であるジメチルアルシン酸(DMA)の濃度には有意な違いはなかった。一方、葉や穂に養分を分配する機能を持つ「節」のヒ素濃度は、コシヒカリの約1/16と著しく低い値となった(図1(b))。このことから、節は無機ヒ素をトラップすることで玄米への移行を抑える役割を持つと考えられ、高ヒ素変異体はそのトラップ能が失われていた。

低ヒ素変異体のうち、*las2*は著しく弱勢を示した。*las1*と*las3*も弱勢傾向にあったが、低ヒ素系統の育成に向けて、有用な遺伝資源と判断し、以後の解析に利用した。*las1*と*las3*の玄米ヒ素濃度はコシヒカリの約30 - 40%低く、その違いは無機ヒ素濃度に由来した。低ヒ素変異体の茎葉ヒ素濃度はコシヒカリの1/3程度であった。このことから、玄米ヒ素濃度の低い理由として、茎葉ヒ素濃度の低さが関連すると思われる。

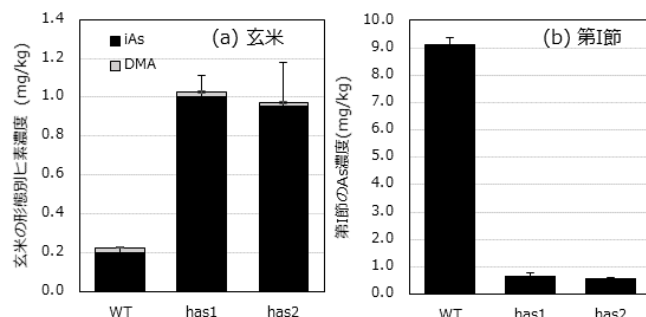


図1 コシヒカリ(WT)と高ヒ素変異体 (*has1*と*has2*) の玄米の形態別ヒ素濃度(a)と第1節の総ヒ素濃度 (b)

(2) 遺伝子の同定と機能解析

(方法) 各変異体の原因遺伝子を特定するために、変異体とハバタキの F2 集団を作製し、遺伝子型と表現型を調査した。遺伝子型は SNP アレイを利用して調査した。表現型は高ヒ素変異体の場合は玄米ヒ素濃度で、低ヒ素変異体は茎葉のヒ素濃度の比較で評価した。それらのデータをもとに、量的形質遺伝子座 (QTL) 解析を行い、候補となる遺伝子座を絞り込んだ。さらに、次世代シーケンサで、コシヒカリと各変異体の全ゲノムを解読し、候補領域となる部分の変異を抽出することで、原因遺伝子の特定を行った。また、マイクロアレイによる発現解析も行った。

has2 の原因遺伝子 (*OsPCS1*: ファイトケラチン合成酵素遺伝子) に関しては、相補性試験と過剰発現体による形質評価試験、および組換え大腸菌を用いたバイオアッセイを行い、遺伝子機能を評価した。

(結果) *has1* の QTL 解析の結果、原因遺伝子を第 4 染色体上の 1.4Mbp に絞り込んだ。その領域内において転写レベルが著しく低下している遺伝子 *OsABCC1* (RAP-DB における locus: *Os04g0620000*) が存在した。*OsABCC1* は ATP 結合カセットトランスポーターに属し、液胞内にヒ素を輸送することが知られている (Song et al., 2014)。 *has1* のシーケンス解析の結果、*OsABCC1* の一部を含む領域が切断され、同一染色体内で転座が起こっていることがわかった (図 2(a))。その切断によって、*OsABCC1* タンパク質のヌクレオチド結合ドメインが消失し、トランスポーターとしての機能が失われていると考えられた (図 2(b)) (Hayashi et al., 2017)。

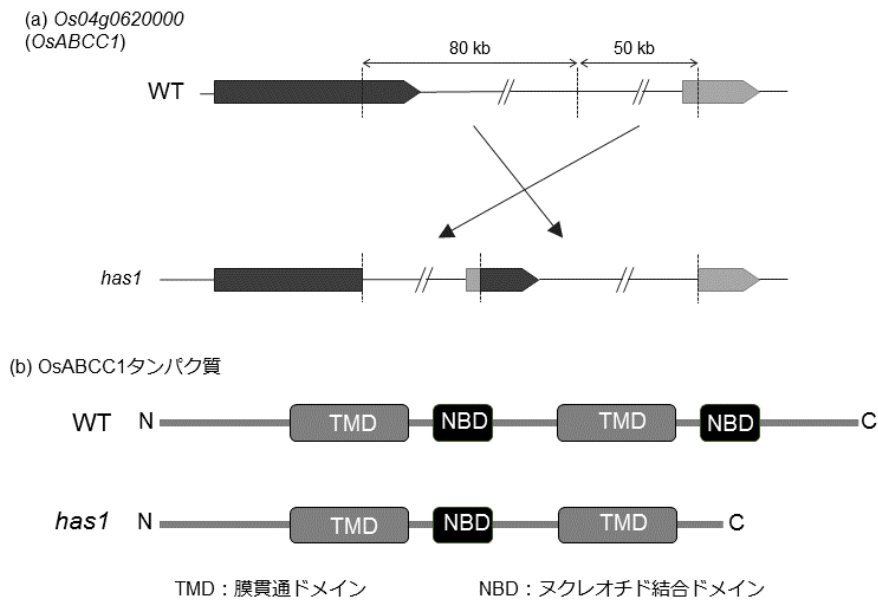
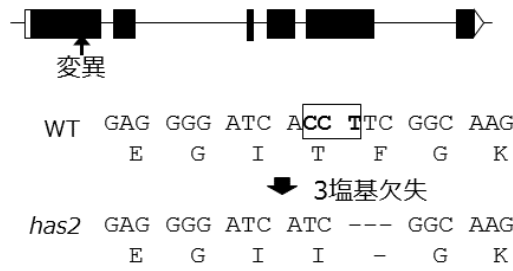


図2 高ヒ素変異体*has1*の原因遺伝子の特定(a)とタンパク質の変化(b)

has2 の QTL 解析の結果、原因遺伝子を第 5 染色体上の 1.0Mbp にしぼり込んだ。シーケンス解析の結果、候補領域内では 1 カ所のみ変異が見つかった。それはファイトケラチン合成酵素をエンコードする *OsPCS1* (*Os05g0415200*) であり、N 末端側の触媒領域内に 3 塩基の欠損が生じていた (図 3(a))。その欠損により、スレオニン (118) とフェニルアラニン (119) がイソロイシン (118) に置き換わった (図 3(b))。 *OsPCS1* の変異が *has2* の原因遺伝子であるかどうか確認するため、野生型 *OsPCS1* 遺伝子を自身のプロモーター制御下で発現する *has2* の形質転換体を作製し、土耕栽培後玄米ヒ素濃度を測定した。その結果、野生型のコシヒカリレベルまで玄米ヒ素濃度が低下し相補されたため、 *OsPCS1* が原因遺伝子であることがわかった。イネは *OsPCS1* の他に配列や構造が類似する *OsPCS2* を持つ。 *OsPCS2* が *OsPCS1* の機能を代替可能であるか検証するため、同様な手法で *OsPCS2* を導入した組換え体を作製し、形質評価した。その結果、玄米ヒ素濃度は有意に低下しなかったため、 *OsPCS2* は *OsPCS1* の替わりにはなり得ないと考えられた。

(a) *OsPCS1*
(*Os05g0415200*)



(b) *OsPCS1*タンパク質

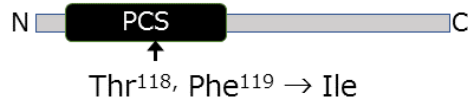


図3 高ヒ素変異体*has2*の原因遺伝子の特定(a)とタンパク質の変化(b)

さらに野生型の *OsPCS1* と *OsPCS2* を導入した大腸菌を用いて、組換えタンパク質によるファイトケラチン (PC) 合成のアッセイ試験を行った。その結果、*OsPCS1* はカドミウムよりもヒ素との基質特異性が高いことがわかった (図 4(a))。一方、*OsPCS2* はカドミウム処理で著しく PC 合成が高まった (図 4(b))。このことから、*OsPCS1* と *OsPCS2* は有害元素応答に対する役割が異なることが示唆された。

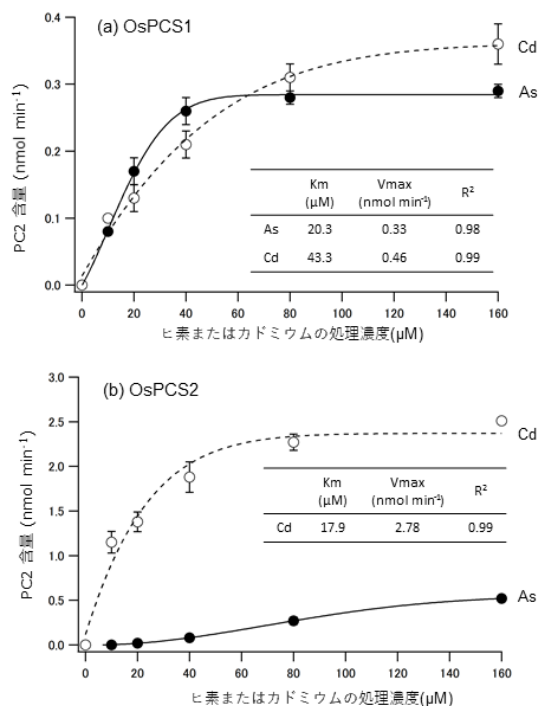


図4 組換えタンパク質を用いたファイトケラチン合成のアッセイ試験

OsPCS1 の過剰発現によって、玄米ヒ素濃度が低下するかどうか検証するため、野生型の *OsPCS1* を CaMV 35S プロモーター制御下で発現する *has2* 組換え株を作製し、土耕栽培後玄米ヒ素濃度を測定した。その結果、玄米ヒ素濃度は野生型コシヒカリの 1/4 まで低下した (図 5)。このことから、*OsPCS1* の働きを強化することでコメの無機ヒ素濃度が少ない品種の開発が可能になると思われる (Hayashi et al., 2017)。

las1 と *las3* の QTL 解析の結果、各々第 2 染色体と第 11 染色体に候補となる遺伝子座を特定した。さらにシーケンス解析から、その候補領域内に原因となる遺伝子を特定することに成功した。

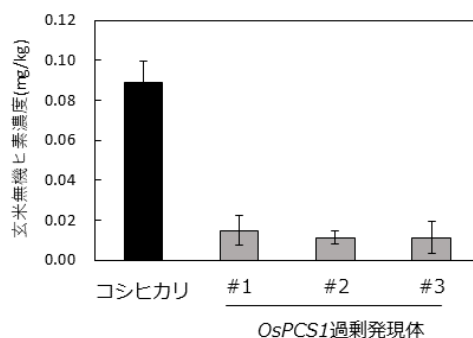


図5 *OsPCS1*過剰発現体の玄米無機ヒ素濃度

(3) DNA マーカーの開発

las1 と *las3* の遺伝子を識別できる遺伝子マーカーを作出した。さらに両変異体をカドミウムをほとんど吸収しない水稻品種「コシヒカリ環 1 号」と交配し、ヒ素とカドミウムの両方が低い個体の選抜に遺伝子マーカーを活用した。

(4) ヒ素とカドミウムの両元素の低減に寄与するイネ系統の育成

DNA マーカー選抜によって、3つの系統を育成した。

[1] コシヒカリ環 1 号に *las1* 遺伝子を導入した系統、[2] コシヒカリ環 1 号に *las3* 遺伝子を導入した系統、[3] コシヒカリ環 1 号に *las1* と *las3* 遺伝子の両方を導入した個体。

las1 を導入した環 1 号の生育は、*las1* と同じく草丈や玄米収量が低下した。*las3* は *las1* に比べて、弱勢程度は小さいが、コシヒカリよりは草丈で約 10cm 程度低く、また玄米収量は 10% 程度低い。*las3* を導入した環 1 号の生育も *las3* と同様であった。両遺伝子を導入した環 1 号の生育は単独遺伝子導入系統よりもさらに低下傾向であった。このことから、特定した 2 つの低ヒ素遺伝子は生育に負の影響を及ぼすことがわかった。玄米ヒ素濃度は、*las1* 導入で約 40%、*las3* 導入で約 30%、両遺伝子導入で約 50% 低減した。生育の改善は必要であるが、コシヒカリ環 1 号にこれら遺伝子を導入することで、ヒ素とカドミウムの両有害元素濃度が低い系統を作ることができた。

(5) 低ヒ素有用素材における新たな遺伝資源の選抜

薬剤処理によって作られたコシヒカリの変異体ライブラリーおよび世界のイネコアコレクション (WRC) から、低ヒ素形質を示す新たな遺伝資源や低ヒ素アレルの獲得を目指した。約 4,000 個体の変異体の中から、玄米のヒ素濃度が半減した個体が見つかった。また、WRC の中に低ヒ素品種が存在し、コシヒカリとの交配を進めている。

3) 成果活用における留意点

[1] *OsPCS1* を過剰発現させることでコメのヒ素濃度を減らすことは可能だが、組換え体であるため、一般的な栽培はできない。

[2] 低ヒ素形質を付与する las1 と las3 遺伝子は様々なイネ品種に導入することが可能であるが、ヒ素低減と同時に生育に負の影響を及ぼす可能性がある。

4) 今後の課題

[1] OsPCS1 の機能を高めることでコメのヒ素濃度が著しく減少することがわかった。今後、遺伝子組換え技術を使わずに、その働きを強化したイネの開発が必要である。

[2] コメのヒ素濃度低減につながるアリルは複数見つかったが、生育に負の影響を及ぼす可能性がある。今後、ヒ素低減につながる新たな遺伝資源を見つけ出し、育種に活用できる有望な低ヒ素アリルを特定する必要がある。

「イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13406654

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (LCT)

小課題番号: LCT0010

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: イネの吸汁性昆虫に対する抵抗性遺伝子の DNA マーカー開発と遺伝子集積系統の作出・評価

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 九州大学・大学院農学研究院・植物育種学研究室・安井秀

1) 研究目的

昆虫の加害力の変化による耐虫性遺伝子資源の無力化により、既存の耐虫性遺伝子資源の利用のみによる耐虫性育種には限界が見えてきた。この限界を突破して有効な耐虫性遺伝子資源を開発するためには、これまで利用が限られていた近縁種や野生種の有用遺伝変異を利用した耐虫性に関する新規遺伝子座や新規アレルの同定が不可欠である。その上で、耐虫性に関する近似同質遺伝子系統 (NIL) や遺伝子集積系統 (PYL) を作出して、有効かつ安定な抵抗性を保有する耐虫性系統の育成を図る。その際、イネゲノムを高密度に網羅する SNP マーカー群を利用して迅速かつ効率的な有用遺伝子の同定と遺伝子集積を実行し、日本型品種の遺伝的背景を保有するより均一性の高い高品質有用 PYL を育成する。

2) 研究成果

(1) 新規の耐虫性有用遺伝子資源の探索 (耐虫性に関する新規有用アレルの同定)

ウンカ類に対する 8 つの抵抗性アレルとヨコバイ類に対する 3 つの抵抗性アレルを同定した。

(2) DNA マーカー選抜による新規抵抗性アレルに関する NIL と PYL の育成

トビイロウンカ抵抗性 4 品種・系統と台中 65 号との交雑後代において DNA マーカー選抜により新旧 10 アレルに関する NIL (BC₃F₄) を育成した (図 1)。

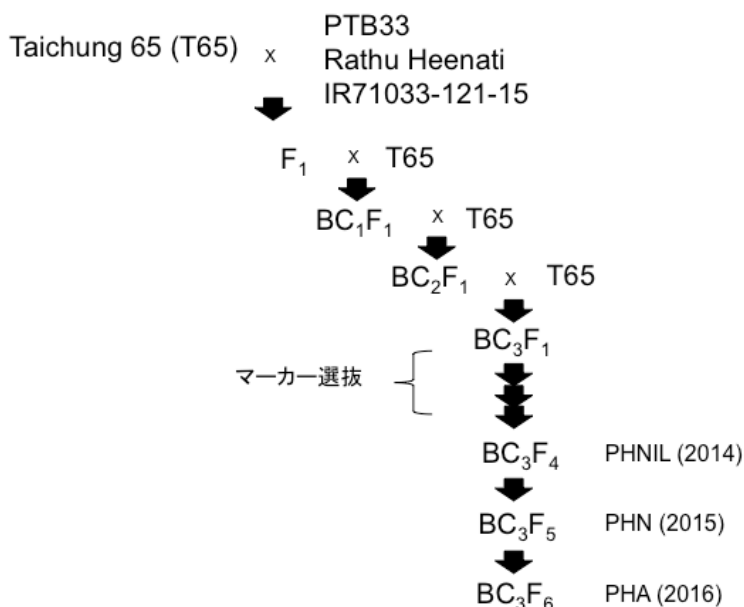


図1. トビイロウンカ抵抗性遺伝子に関する NIL の育成過程

さらに、2 遺伝子 PYL 作出のために、NIL 間の交配に由来する F₂ 集団より両抵抗性アリルに関するホモ接合体を選抜し、その後代植物を育成して 12 組み合わせの PYL を作出した (表 1)。

表 1. 台中 65 号を遺伝的背景にもつトビイロウンカ抵抗性に関するイネ遺伝子集積系統 (12 組み合わせ)

PYL	染色体	遺伝子座	アリル	PYL	染色体	遺伝子座	アリル
507, 509	4S	<i>BPH17</i>	Rathu Heenati	MAB6	4S	<i>qBPH4S</i>	PTB33
	6S	<i>BPH3</i>	PTB33		6S	<i>BPH25</i>	ADR52
408, 503	4S	<i>qBPH4S</i>	PTB33	MAB1	4S	<i>qBPH4S</i>	PTB33
	6S	<i>BPH3</i>	PTB33		12	<i>BPH21</i>	IR71033-121-15
516	4S	<i>BPH20</i>	IR71033-121-15	MAB2	4S	<i>BPH17</i>	Rathu Heenati
	6S	<i>qBPH6S</i>	IR71033-121-15		12	<i>BPH21</i>	IR71033-121-15
514	4S	<i>BPH20</i>	IR71033-121-15	MAB7	6S	<i>BPH25</i>	ADR52
	12	<i>BPH21</i>	IR71033-121-15		12	<i>BPH2</i>	PTB33
302	6S	<i>BPH25</i>	ADR52	MAB8	6S	<i>BPH25</i>	ADR52
	12	<i>BPH26</i>	ADR52		12	<i>BPH21</i>	IR71033-121-15
603	6S	<i>qBPH6</i>	ASD7	MAB9	11	<i>GRH2</i>	DV85
	12	<i>qBPH12</i>	ASD7		12	<i>BPH26</i>	ADR52

(3) 新旧抵抗性アリルが導入された NIL や PYL のウンカ・ヨコバイ類に対する抵抗性評価 < 2014 年 >

材料には、DNA マーカー選抜により作出した NIL (BC₃F₃ 世代) を供試し、トビイロウンカ羽化メス成虫を用いた耐虫性評価 (成虫死亡率、腹部肥大メスの割合) を実施した。供試昆虫には、1966 年日本採集トビイロウンカ個体群を用いた。本個体群は、ウンカに対する抵抗性遺伝子が育種利用される以前の昆虫であるので、イネの新規ウンカ類抵抗性遺伝子を検出する上で最も適した個体群である。その結果、7 アリル中 6 アリルが、トビイロウンカに対して抵抗性を示した (表 2)。

表 2. 新規アリルのトビイロウンカに対する抵抗性反応

候補NIL	抵抗性遺伝子	ゲノム領域	供与親	放飼5日目			抵抗性
				昆虫死亡率	蔵卵率		
PHNIL 7	<i>BPH3</i>	A	PTB33	44.0 ± 29.7	20.0 ± 24.5		MR
PHNIL 3	<i>BPH2</i>	B	PTB33	84.0 ± 21.9	8.0 ± 11.0		R
PHNIL 32	<i>BPH9</i>	B	Balamawee	4.0 ± 8.9	88.0 ± 17.9		S
PHNIL 46	<i>BPH21</i>	B	IR71033-121-15	60.0 ± 40.0	32.0 ± 46.0		MR
PHNIL 18	<i>qBPH4S</i>	C	PTB33	50.0 ± 34.6	20.0 ± 23.1		MR
PHNIL 22	<i>BPH17</i>	C	Rathu Hennati	84.0 ± 16.7	12.0 ± 11.0		R
PHNIL 37	<i>BPH20</i>	C	IR71033-121-15	52.0 ± 11.0	20.0 ± 28.3		MR
PHNIL 1	Taichung65			4.0 ± 8.9	88.0 ± 11.0		S
PHIR3	PTB33			100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		R
PHIR 4	Rathu Hennati			100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		R
PHIR7	Balamawee			92.0 ± 17.9	8.0 ± 17.9		R
PHIR 23	IR71033-121-15			100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		R

R: 高度抵抗性, MR: 中度抵抗性, S: 感受性

< 2015 年 >

材料には、DNA マーカー選抜により作出した新旧 8 つのトビイロウンカ抵抗性アリルに関する NIL (BC₃F₅ 世代) を供試し、トビイロウンカ羽化メス成虫を用いた耐虫性評価 (成虫死亡率、腹部肥大メスの割合) を実施した。供試昆虫には、2013 年日本採集トビイロウンカ個体群と 2010 年北部ベトナム採集トビイロウンカ個体群を用いた。表 3 に、昆虫放飼 5 日目における各 NIL 上の成虫死亡率と腹部肥大メスの割合を示した。なお、表 3 には、1966 年日本採集トビイロウンカ個体群のデータ (2011 年と 2014 年) を引用した。

表 3. 台中65号を遺伝的背景にもつトビイロウンカ抵抗性に関する 8 アリルのイネNILにおけるトビイロウンカ放飼 5 日目のメス成虫死亡率と腹部肥大メスの割合

NIL	染色体	抵抗性 遺伝子 座	供与親アリル	メス成虫死亡率 (%) ^{a)}			腹部肥大メスの割合 (%) ^{a)}		
				1966年 日本 採集 BPH 個体 群 ^{b)}	2013年 日本採 集 BPH 個体 群	2010年 北部ベ トナム採集 BPH 個体群	1966年 日本 採集 BPH 個体 群 ^{b)}	2013年 日本採 集 BPH 個体 群	2010年 北部ベ トナム採集 BPH 個体群
444 [22]	4S	<i>BPH17</i>	Rathu Heenati	84.0 ± 16.7	100.0 ± 0.0	60.0 ± 34.6	12.0 ± 11.0	0.0 ± 0.0	20.0 ± 20.0
448 [37]	4S	<i>BPH20</i>	IR71033-121-15	52.0 ± 11.0	46.7 ± 50.3	46.7 ± 11.6	20.0 ± 28.3	53.3 ± 50.3	60.0 ± 0.0
434 [18]	4S	<i>qBPH4S</i>	PTB33	50.0 ± 34.6	15.0 ± 13.2	6.7 ± 11.6	20.0 ± 23.1	85.0 ± 13.2	93.3 ± 11.6
412 [14] ^{c)}	6S	<i>BPH3</i>	PTB33	44.0 ± 29.7	60.0 ± 34.6	51.7 ± 20.2	20.0 ± 24.5	40.0 ± 34.6	40.0 ± 34.6
51	6S	<i>BPH25</i>	ADR52	44.0 ± 17.9	73.3 ± 30.6	70.0 ± 26.5	56.0 ± 19.7	26.7 ± 30.6	15.0 ± 13.2
407 [3]	12	<i>BPH2</i>	PTB33	84.0 ± 21.9	93.3 ± 11.6	60.0 ± 40.0	8.0 ± 11.0	6.7 ± 11.6	46.7 ± 30.6
463 [46]	12	<i>BPH21</i>	IR71033-121-15	60.0 ± 40.0	0.0 ± 0.0	13.3 ± 11.6	32.0 ± 46.0	100.0 ± 0.0	86.7 ± 11.6
101	12	<i>BPH26</i>	ADR52	60.0 ± 23.9	0.0 ± 0.0	33.3 ± 11.6	40.0 ± 23.9	100.0 ± 0.0	80.0 ± 0.0
PTB33				100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Taichung 65				4.0 ± 8.9	0.0 ± 0.0	13.3 ± 11.6	88.0 ± 11.0	100.0 ± 0.0	86.7 ± 11.6

a) 平均 ± 標準偏差

b) TPH 51と TPH 101については2011年、そのほかのNILについては 2014年取得データより転載

c) 1966 年日本採集BPHに関するデータについては、14PHNIL14の姉妹系統である14PHNIL7を使用

本評価基準に基づいて識別した NIL のトビイロウンカ抵抗性を表 4 に示した。2013 年日本採集トビイロウンカ個体群と 2010 年北部ベトナム採集トビイロウンカ個体群両個体群に対して、染色体 4 の *BPH17*-Rathu Heenati アリルと染色体 6 の *BPH25*-ADR52 アリルが高度抵抗性を示した。染色体 12 の *BPH2*-PTB33 アリルは 2013 年日本採集トビイロウンカに高度抵抗性を示したが、2010 年北部ベトナム採集トビイロウンカ個体群には中度抵抗性もしくは感受性であった。染色体 4 の *BPH20*-*O. officinalis* アリルと染色体 6 の *BPH3*-PTB33 アリルは、両個体群に対して中度抵抗性を示した。残りの 3 抵抗性アリル (*qBPH4S*-PTB33、*BPH21*-*O. officinalis*、*BPH26*-ADR52) については、いずれのトビイロウンカ個体群に対しても感受性であった。

以上のことから、*BPH17*-Rathu Heenati アリルと *BPH25*-ADR52 アリルは、トビイロウンカ抵抗性遺伝子集積のために最も効果的なアリルであると考えられた。次いで、*BPH20*-*O. officinalis* アリルと *BPH3*-PTB33 アリルが、単一遺伝子としてある程度の昆虫増殖抑制効果を示すので、遺伝子集積育種への利用が期待される。一方、*BPH2*-PTB33 アリルや単一遺伝子としての抵抗性が見られなかった 3 アリル (*qBPH4S*-PTB33、*BPH21*-*O. officinalis*、*BPH26*-ADR52) については、遺伝子集積効果を慎重に見極める必要があると考えられた。

表 4. 台中65号を遺伝的背景にもつトビイロウンカ抵抗性に関する 8 アリルのイネ NILにおけるトビイロウンカ放飼5日目の抵抗性反応

NIL	染色体	抵抗性遺伝子座	供与親アリル	BPHに対する反応 ^{a)}		
				1966年 日本採集 BPH 個体群 ^{b)}	2013年 日本採集 BPH 個体群	2010年 北部ベトナム採集 BPH 個体群
2015 TPH [14PHNIL]						
444 [22]	4S	<i>BPH17</i>	Rathu Heenati	R	R	R
448 [37]	4S	<i>BPH20</i>	IR71033-121-15	MR	MR	MR
434 [18]	4S	<i>qBPH4S</i>	PTB33	MR	S	S
412 [14] ^{c)}	6S	<i>BPH3</i>	PTB33	MR	MR	MR
51	6S	<i>BPH25</i>	ADR52	MR	R	R
407 [3]	12	<i>BPH2</i>	PTB33	R	R	MR
463 [46]	12	<i>BPH21</i>	IR71033-121-15	MR	S	S
101	12	<i>BPH26</i>	ADR52	R	S	S
PTB33				R	R	R
Taichung 65				S	S	S

a) R: 高度抵抗性, MR: 中度抵抗性, S: 感受性

b) TPH 51と TPH 101については2011年、そのほかのNILについては2014年取得データより転載

c) 1966 日本採集BPHに関するデータについては、14PHNIL14の姉妹系統である14PHNIL7を使用

< 2016 年 >

材料には、DNA マーカー選抜により作出した 10 個のトビイロウンカ抵抗性アリルに関するイネの NIL と 6 組み合わせの 2 遺伝子 PYL を供試し、トビイロウンカ羽化メス成虫を用いた耐虫性評価（成虫死亡率、腹部肥大メスの割合）を実施した。供試昆虫には、アジア地域で採集した 5 つのトビイロウンカ個体群（1966 年、1989 年、2013 年の各日本採集トビイロウンカ個体群と、2010 年北部ベトナム採集ならびに 2008 年南部ベトナム採集の両トビイロウンカ個体群）を用いた。

<1> NIL の日本採集トビイロウンカ個体群に対する抵抗性反応

表 5 に、昆虫放飼 5 日目における 10 個の抵抗性アリルに関する各 NIL の日本採集トビイロウンカ個体群に対する抵抗性反応を示した。

1989 年日本採集 BPH 個体群に対して、染色体 4 の *BPH17* -Rathu Heenati、*BPH20* -IR71033、*qBPH4S* -PTB33 の 3 アリル、染色体 6 の *BPH3* -PTB33 と *BPH25* -ADR52 の 2 アリル、染色体 12 の *BPH2* -PTB33 アリルが高度抵抗性を示した。

2013 年日本採集 BPH 個体群に対して、染色体 4 の *BPH17* -Rathu Heenati アリルと染色体 6 の *BPH25* -ADR52 アリルが高度抵抗性を、染色体 6 の *BPH3* -PTB33 アリルが中度抵抗性を示した。

表5. 台中65号を遺伝的背景にもつトビイロウンカ抵抗性に関する 10 アリルのイネ近似同質遺伝子系統の日本採集トビイロウンカ個体群に対する反応 (放飼5日目)

NIL 2016 TPH	染色体	遺伝子座	アリル	トビイロウンカに対する抵抗性反応 ^{a)}		
				1966BPH	1989BPH	2013BPH
417	4S	<i>BPH17</i>	Rathu Heenati	R	R	R
423	4S	<i>BPH20</i>	IR71033-121-15	R	R	S
412	4S	<i>qBPH4S</i>	PTB33	R	R	S
409	6S	<i>BPH3</i>	PTB33	R	R	MR
51	6S	<i>BPH25</i>	ADR52	MR	R	R
601	6S	<i>qBPH6S</i>	ASD7	S	S	S
404	12	<i>BPH2</i>	PTB33	R	R	S
426	12	<i>BPH21</i>	IR71033-121-15	R	S	S
101	12	<i>BPH26</i>	ADR52	MR	S	S
602	12	<i>qBPH12</i>	ASD7	MR	S	S
PTB33				R	R	R
ADR52 ^{b)}				R	R	-
ASD7 ^{b)}				MR	S	S
Taichung 65				S	S	S

a) R: 高度抵抗性, MR: 中度抵抗性, S: 感受性

b) ADR52 と ASD7については、それぞれ2012年と2015年取得データより転載

< 2 > NIL の南北ベトナム採集トビイロウンカ個体群に対する抵抗性反応

表 6 に、昆虫放飼 5 日目における 10 個の抵抗性アリルに関する各 NIL の南北ベトナム採集 BPH 個体群に対する抵抗性反応を示した。南北ベトナムの BPH 個体群に対しては、現有の 10 個の抵抗性アリルは単一では抵抗性反応を示さなかった。

表6. 台中65号を遺伝的背景にもつトビイロウンカ抵抗性に関する 10 アリルのイネ近似同質遺伝子系統の南北ベトナム採集トビイロウンカ個体群に対する反応 (放飼5日目)

NIL 2016 TPH	染色体	遺伝子座	アリル	トビイロウンカに対する抵抗性反応 ^{a)}	
				北部ベトナム ^{b)}	南部ベトナム ^{c)}
417	4S	<i>BPH17</i>	Rathu Heenati	S	S
423	4S	<i>BPH20</i>	IR71033-121-15	S	S
412	4S	<i>qBPH4S</i>	PTB33	S	S
409	6S	<i>BPH3</i>	PTB33	S	MR?
51	6S	<i>BPH25</i>	ADR52	MR?	S
601	6S	<i>qBPH6S</i>	ASD7	S	S
404	12	<i>BPH2</i>	PTB33	S	S
426	12	<i>BPH21</i>	IR71033-121-15	S	S
101	12	<i>BPH26</i>	ADR52	S	S
602	12	<i>qBPH12</i>	ASD7	S	S
PTB33				R	R
Taichung 65				S	S

a) R: 高度抵抗性, MR: 中度抵抗性, S: 感受性

b) 2010年採集個体群

c) 2008年採集個体群

< 3 > 2 遺伝子 PYL の日本採集トビイロウンカ個体群に対する抵抗性反応

表 7 に、昆虫放飼 5 日目における 6 組み合わせの 2 遺伝子 PYL の日本採集トビイロウンカ個体群に対する抵抗性反応を示した。*BPH17*-Rathu Heenati と *BPH3*-PTB33、*qBPH4S*-PTB33 と *BPH3*-PTB33、*BPH20*-IR71033 と *qBPH6S*-IR71033 の 3 組み合わせが高度抵抗性を示し、残りの 3 組み合わせ (*BPH20*-IR71033 と *BPH21*-IR71033、*BPH25*-ADR52 と *BPH26*-ADR52、*qBPH6*-ASD7 と *qBPH12*-ASD7) では感受性であった。

表 7. 台中65号を遺伝的背景にもつトビイロウンカ抵抗性に関するイネ遺伝子集積系統の日本採集トビイロウンカ個体群に対する反応 (放飼5日目)

NIL 2016 TPH	染色体	遺伝子座	アレル	トビイロウンカに対する抵抗性反応 ^{a)}		
				1966BPH	1989BPH	2013BPH
507, 509	4S	<i>BPH17</i>	Rathu Heenati	R	R	R
	6S	<i>BPH3</i>	PTB33	R	R	R
408, 503	4S	<i>qBPH4S</i>	PTB33	R	R	R
	6S	<i>BPH3</i>	PTB33	R	R	R
516	4S	<i>BPH20</i>	IR71033-121-15	R	R	R
	6S	<i>qBPH6S</i>	IR71033-121-15	R	R	R
514	4S	<i>BPH20</i>	IR71033-121-15	MR	S	S
	12	<i>BPH21</i>	IR71033-121-15	MR	S	S
302	6S	<i>BPH25</i>	ADR52	R	R	S
	12	<i>BPH26</i>	ADR52	R	R	S
603	12	<i>qBPH6</i>	ASD7	MR	S	S
	12	<i>qBPH12</i>	ASD7	MR	S	S
PTB33				R	R	R
ADR52 ^{b)}				R	R	-
ASD7 ^{b)}				MR	S	S
Taichung 65				S	S	S

a) R: 高度抵抗性, MR: 中度抵抗性, S: 感受性

b) ADR52 と ASD7については、それぞれ2012年と2015年取得データより転載

3

< 4 > 2 遺伝子 PYL の南北ベトナム採集トビイロウンカ個体群に対する抵抗性反応

表 8 に、昆虫放飼 5 日目における 6 組み合わせの 2 遺伝子 PYL の南北ベトナム採集 BPH 個体群に対する抵抗性反応を示した。南北ベトナムの BPH 個体群に対しては、今回育成した 6 組み合わせの 2 遺伝子集積 (*BPH17*-Rathu Heenati と *BPH3*-PTB33、*qBPH4S*-PTB33 と *BPH3*-PTB33、*BPH20*-IR71033 と *qBPH6S*-IR71033、*BPH20*-IR71033 と *BPH21*-IR71033、*BPH25*-ADR52 と *BPH26*-ADR52、*qBPH6*-ASD7 と *qBPH12*-ASD7) は抵抗性を示さなかった。

表8. 台中65号を遺伝的背景にもつトビイロウンカ抵抗性に関するイネ遺伝子集積系統の南北ベトナム採集トビイロウンカ個体群に対する反応 (放飼5日目)

NIL 2016 TPH	染色体	遺伝子座	アリル	トビイロウンカに対する抵抗性反応 ^{a)}	
				北部ベトナム ^{b)}	南部ベトナム ^{c)}
507, 509	4S	<i>BPH17</i>	Rathu Heenati	S	S
	6S	<i>BPH3</i>	PTB33	S	S
408, 503	4S	<i>qBPH4S</i>	PTB33	S	S
	6S	<i>BPH3</i>	PTB33	S	S
516	4S	<i>BPH20</i>	IR71033-121-15	S	S
	6S	<i>qBPH6S</i>	IR71033-121-15	S	S
514	4S	<i>BPH20</i>	IR71033-121-15	S	S
	12	<i>BPH21</i>	IR71033-121-15	S	S
302	6S	<i>BPH25</i>	ADR52	S	S
	12	<i>BPH26</i>	ADR52	S	S
603	12	<i>qBPH6</i>	ASD7	S	S
	12	<i>qBPH12</i>	ASD7	S	S
PTB33				R	R
Taichung 65				S	S

a) R: 高度抵抗性, MR: 中度抵抗性, S: 感受性

b) 2010年採集個体群

c) 2008年採集個体群

4

以上の結果から、トビイロウンカ抵抗性の遺伝子資源として、日本では、染色体4の*BPH17*-Rathu Heenati、染色体6の*BPH25*-ADR52、染色体6の*BPH3*-PTB33の3アリルが有用であった。しかし、南北ベトナムのBPH個体群に対しては、現有の10個の抵抗性アリルは単一では抵抗性反応を示さず、今回育成した6組み合わせの2遺伝子集積も抵抗性反応を示さなかった。

3) 成果活用における留意点

本研究期間中に、新たに3つのウンカ類抵抗性遺伝子が海外の研究グループによって同定され、これまでに全部で5つの抵抗性遺伝子座のゲノム情報が明らかとなった。これにツマグロヨコバイに対する4つの抵抗性遺伝子座を加えて9つのウンカ・ヨコバイ類抵抗性遺伝子座が同定されたことになる。したがって、これら抵抗性遺伝子の育種利用には、積極的なマーカー選抜育種が適用可能である。ウンカ・ヨコバイ類抵抗性では、圃場抵抗性や穂いもち抵抗性遺伝子*Pb1*に見られるような単一遺伝子利用による持続的抵抗性の遺伝変異が見出されていない。いまのところ、複数の抵抗性遺伝子による遺伝子集積育種により、イネにウンカ類に対する抵抗性を付与する以外に方法がない。

4) 今後の課題

ウンカ抵抗性育種へ利用できる(1)マーカー情報・(2)育成系統・(3)抵抗性スペクトラムの情報を収集した。本研究期間内に、日本のウンカ・ヨコバイ類抵抗性育種に利用可能な遺伝子資源が複数開発されたが、ウンカの飛来源であるベトナム北部や中国においては、これら遺伝子資源を乗り越えることのできる加害性の昆虫が出現している。単一の抵抗性遺伝子の長期使用は抵抗性崩壊の引き金となるので、日本(特に西南暖地)で利用する抵抗性遺伝子資源のバリエーションを確保することが不可欠である。したがって、引き続き、抵抗性遺伝子資源を探索し、さらなる抵抗性遺伝子資源を確保することが必須である。また、飛来するウンカ類の加害性のモニタリングを継続して、研究機関や育種現場で情報を共有し、抵抗性崩壊を回避する対策を講ずる必要がある。

「イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号：13406654

研究期間：平成25～29年度

中課題名：イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発(LCT)

小課題番号：LCT0011

研究期間：平成25～26年度

小課題名：イネのウンカ・ヨコバイ類抵抗性遺伝子の単離と抵抗性発現機構の解明

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・加害・耐虫機構研究ユニット・田村泰盛

1) 研究目的

トビイロウンカに抵抗性を示す幾つかのインド型イネ品種の中には、トビイロウンカが恒常的に発生する東南アジアで利用実績がありながらも抵抗性が維持されているものがあり、持続性が高い抵抗性(R) 遺伝子を有している事が示唆されている。本研究では、ウンカ・ヨコバイ類に対して持続性の高い新規抵抗性遺伝子の単離とDNAマーカーの開発を行い、実用品種の遺伝背景を持つウンカ・ヨコバイ類抵抗性品種の作出を目指す。さらに、単離された抵抗性遺伝子の安定的な利用や安全性の検証を目指して抵抗性の発現機構を解析し、殺虫剤使用量を低減した低コスト・環境保全型農業を実現する事を目的とする。

2) 研究成果

(ア) 持続性の高い新規抵抗性遺伝子の単離と利用

インド型イネ品種の保有するトビイロウンカ抵抗性遺伝子*BPH26*は、*BPH25*との共存により現在日本に飛来するトビイロウンカに抵抗性を示すことが知られている。*BPH26*をマップベースクローニング法で単離したところ、*BPH26*は3つのエキソンからなる、CC-NBS-LRR (a coiled-coil-nucleotide-binding-site-leucine-rich repeat) と呼ばれるタンパク質をコードする遺伝子であることが明らかになった。トビイロウンカ抵抗性タンパク質*BPH26*は、いもち病抵抗性タンパク質*PIB*と配列の類似性が高いことが示唆された(図1)。*BPH26*の遺伝子座情報をもとに、マーカー育種に用いるPCRベースのDNAマーカーを開発した(表1)。他に、インド型イネ品種Rathu Heenatiの抵抗性遺伝子が導入された水稻中間母本農10号や、インド型イネ品種IR64由来のトビイロウンカ抵抗性遺伝子についても遺伝子座の解析を進めた。その結果、これらの持続性の高い抵抗性品種は、いずれも複数の抵抗性遺伝子を保有している可能性が示唆された。

(イ) 耐虫性R遺伝子の抵抗性発現のメカニズムの解析

病害抵抗性のNBS-LRRタンパク質は、病原菌の侵入を認識して活性化され、防御反応を誘導すると考えられている。*BPH26*タンパク質も類似の構造を保有することから、病害抵抗性タンパク質と同様、防御反応を誘導すると考え、*BPH26*を保有するNIL(*BPH26*-NIL)系統を用い、虫害応答時のトランスクリプトーム解析を行った。トビイロウンカ加害時の、*BPH26*-NILと感受性品種のトランスクリプトームを比較したところ、*BPH26*-NILで特異的に上昇する遺伝子の存在が示唆された。

トビイロウンカの吸汁行動を電氣的に測定する装置を用い、*BPH26*を保有する*BPH26*-NIL上でのトビイロウンカの吸汁行動を測定した(図2)。トビイロウンカの口針がイネの篩部まで到達している事を示す波形は観察されたが、篩管液の吸汁を示す波形は短時間しか観

測されなかった。よってBPH26による抵抗性は、篩部での吸汁阻害である事が示唆された。トビイロウンカは篩管液が十分吸汁できないために、栄養を摂取できずに死に至るものと考えられる。

in situ ハイブリダイゼーション法でBPH26の発現組織を解析した。BPH26は維管束で比較的強く発現しており、トビイロウンカに加害される維管束において機能していることが示唆された。

トビイロウンカ抵抗性タンパク質(BPH26)



いもち病抵抗性タンパク質(PIB)



図1. NBS-LRR構造を保有するトビイロウンカ抵抗性タンパク質BPH26の模式図
トビイロウンカ抵抗性タンパク質BPH26(上段)といもち病抵抗性タンパク質PIB(下段)は
相同性が高く、構造が類似している。

表1. BPH26の近傍に開発したPCRベースのInDelマーカーの例

Primer name	Forward primer (5' -3')	Reverse primer (5' -3')
ID-28L4	GAAGGGAAATGGAAGCATGA	TACACCGACAAGGAACACA
ID-174	TGCTCGTACGATGGAGTCAT	CGGGCTTCATTCATCGTTA
ID-161	CTGTCAAATTCGTTTCGAT	CATTCCCCTGAATTTGAAACA
ID-161-2	ATCCTTTCGGACAGGGTGAT	GGACGGGATGATACCTCAGA

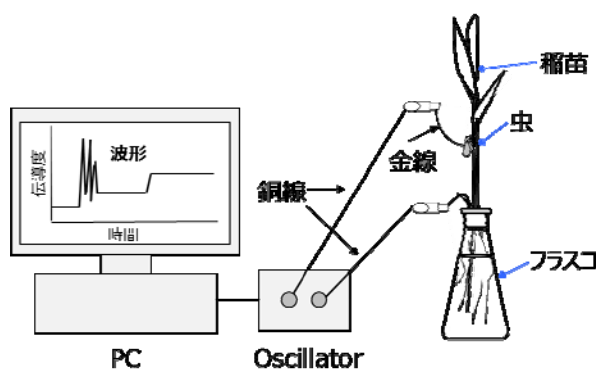


図2. トビイロウンカの吸汁行動を解析する電氣的測定装置の模式図

トビイロウンカの頭背部に金線を装着して、トビイロウンカとイネの間に電気回路を作り、微弱な電流を流して伝導度を記録して波形として表示させ、吸汁行動の各段階で得られる特徴的な波形をもとに吸汁行動を解析する。

3) 成果活用における留意点

*BPH26*は単独では加害性のトビイロウンカ (*BPH26*加害性バイオタイプ) に加害されるため、使用にあたっては、*BPH25*等、*BPH26*との共存により加害性バイオタイプにも抵抗性を示す遺伝子と集積させて使用する必要がある。

*BPH26*タンパク質はその構造から防御反応のシグナル伝達にかかわる受容体であると予想され、篩部での吸汁阻害を引き起こすことが明らかになった。よって、*BPH26*自体は毒性のあるタンパク質ではないと考えられるため、*BPH26*遺伝子を導入した品種は、消費者にも受け入れられやすい品種であると期待される。

4) 今後の課題

持続性の高いトビイロウンカ抵抗性品種は、複数の抵抗性遺伝子を保有する可能性が示唆された。今後は、このような抵抗性が持続している品種の保有する抵抗性遺伝子を特定し、抵抗性が持続する機構を調べることで、持続性を高めるために必要な遺伝子のペアやその利用法が明らかになると期待される。

「イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号：13406654

研究期間：平成25～29年度

中課題名：イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発(LCT)

小課題番号：LCT0012

研究期間：平成25～26年度

小課題名：イネの抵抗性を打破するトビロウンカ加害性バイオタイプの発達機構の解明

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：農業生物資源研究所・加害・耐虫機構研究ユニット・小林徹也

1) 研究目的

1970年代以降トビロウンカに対する抵抗性イネ品種がアジア各地で普及した結果、これを打破するウンカの加害性バイオタイプが出現している。加害性バイオタイプが出現した地域では抵抗性イネ品種においてもウンカ類が高密度に発生し、結果、吸汁害や媒介ウイルス病害によってイネの減収が起こる。品種抵抗性の利用による省力かつ環境保全型稲作を行うためには、加害性バイオタイプの出現を極力抑える必要があるが、ウンカ類が短期間に抵抗性イネ品種に対する加害性を獲得する機構はほとんどわかっていない。抵抗性の効果が持続するウンカ抵抗性イネ品種を開発するためには、抵抗性イネ品種を加害するウンカ集団が発達する機構を明らかにし、加害性バイオタイプの発生を抑える抵抗性イネ品種の育成方法を検討する必要がある。本研究では、様々な抵抗性イネ品種に対して異なる加害性を持つトビロウンカバイオタイプを材料に遺伝解析、QTL解析法によって加害性に関する遺伝因子の位置、数、効果を明らかにし、ポジショナルクローニング法によって加害性を支配するウンカ側の因子を明らかにする。これにより、ウンカがイネ品種の持つ抵抗性を打破するメカニズムを明らかにし、これを回避するために最適な抵抗性遺伝子の利用法を提案して、持続性の高い抵抗性イネ品種の育種に資する。具体的には、トビロウンカ抵抗性遺伝子*Bph1*, *bph2*, *BPH26*を保有するイネ品種に対する加害性を獲得したトビロウンカバイオタイプを用いて遺伝解析とQTL解析を行い、加害性を支配する遺伝因子の数と寄与度を明らかにする。また、研究に必要となるトビロウンカの高密度連鎖地図とジェノタイピング法を開発する。これらを利用して、ポジショナルクローニング法と発現遺伝子解析を併用して、品種加害性を支配する原因遺伝子を同定する。加害性因子の連鎖群上の位置や塩基配列等から、バイオタイプの発達メカニズムを推定し、ウンカ抵抗性遺伝子のイネ品種への効果的な集積方法と利用方法を提案する。

2) 研究成果

(ア) 遺伝解析のためのトビロウンカ近交系の作出と加害性の評価

イネのトビロウンカ抵抗性遺伝子*Bph1*, *bph2* に対して異なる加害性を持つウンカ系統I87、C89およびN99について遺伝的に均一にした近交系I87i、C89i、N99iを作出した。作出したトビロウンカ系統の*Bph1*, *bph2*, *Bph3*, *bph4* に対する加害性を、検定用標準4品種(Mudgo(*Bph1*), ASD7(*bph2*), Rathu Heenati(*Bph3*), Babawee(*bph4*))と遺伝解析用ジャポニカ3品種(西海190号(*Bph1*), 南海133号(*bph2*), コシヒカリ(抵抗性遺伝子なし))で評価した。羽化後24時間以内のトビロウンカ短翅雌成虫を播種後4～5週間の各品種イネ体に放飼し、5日後の生死と腹部肥大個体数を調査した。

作出した近交系I87i、C89i、N99iの抵抗性品種に対する加害性には顕著な系統間差があった(図1)。I87iは抵抗性を持たないコントロール(コシヒカリ)を加害したが、*Bph1*、*Bph3*、*bph4*を加害できず、*bph2*に対しては品種により強弱が分かれた。C89iは*Bph1*に対してコントロールと同様の加害性を示したが、*bph2*、*Bph3*、*bph4*は加害できなかった。N99iは*bph2*に対してはコントロールとほぼ同等の加害性を示したが、*Bph1*、*Bph3*、*bph4*は加害できなかった。

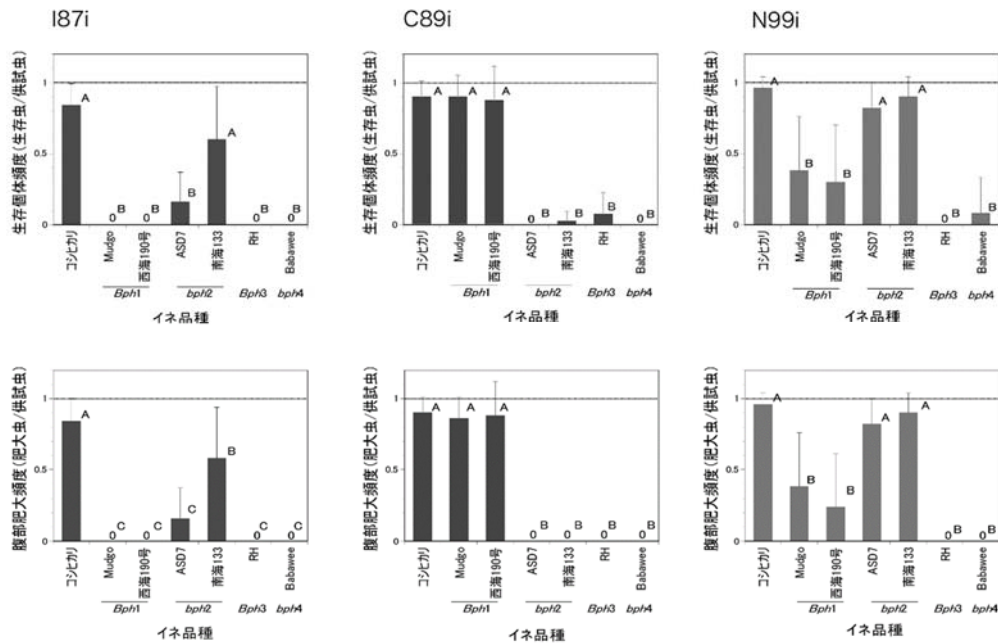


図1 作出したトビイロウンカ近交系の抵抗性標準品種と遺伝解析用品種に対する加害性。上図は生存率、下図は腹部肥大度で加害性を検定。グラフの異なる英字は有意差 ($p < 0.05$) を表す。

(イ) *Bph1* と *bph2* に対する加害性の遺伝解析

C89i ♀ と I87i ♂ を交配して F_1 と F_2 集団を作製し、*Bph1* を保有するイネ品種西海190号に対する加害性をパラフィルム・サッシュュ法を用いて個別に評価した。また、N99i ♀ と I87i ♂ を交配して F_1 と F_2 集団を作製し、*bph2* を保有するイネ品種南海133号に対する加害性を同様に評価した。加害個体の割合から *Bph1* と *bph2* に対する加害性の遺伝様式を明らかにした。

Bph1 に対する加害性は劣性の単一因子による遺伝様式を示した。*bph2* に対する加害性は、 F_1 において加害性個体と非加害性個体に分かれ、劣性因子と優性因子が関わる遺伝様式を示した。

(ウ) SNPマーカーの探索、連鎖地図の作製およびQTL解析

C89i と I87i の成虫から total RNA を抽出し、whole transcriptome shotgun sequencing (RNA-seq) を行った。I87i のリードをアセンブルしてコンティグ化した。これに C89i 系統のリードをマッピングして 2 系統間の SNP マーカー候補を得た。(イ) で得た C89i と I87i の交配 F_2 集団について、各 SNP マーカーの遺伝子型を個別に解析した。SNPs 連鎖地図を作製するとともに QTL 解析を行い、*Bph1* に対する加害性に関与する連鎖群領域を明らかにした。

I87i系統のトランスクリプトームから得た約8万のコンティグにC89i系統のSNPをコールして2,345のSNPs候補を得た。このうち127個のSNPsマーカーを用いて連鎖地図を作製した(図2)。QTL解析の結果、加害性に関与する領域はトビイロウンカの第10連鎖群にのみ存在し(図3)、このQTL領域は加害性に対して高い寄与率を示した。

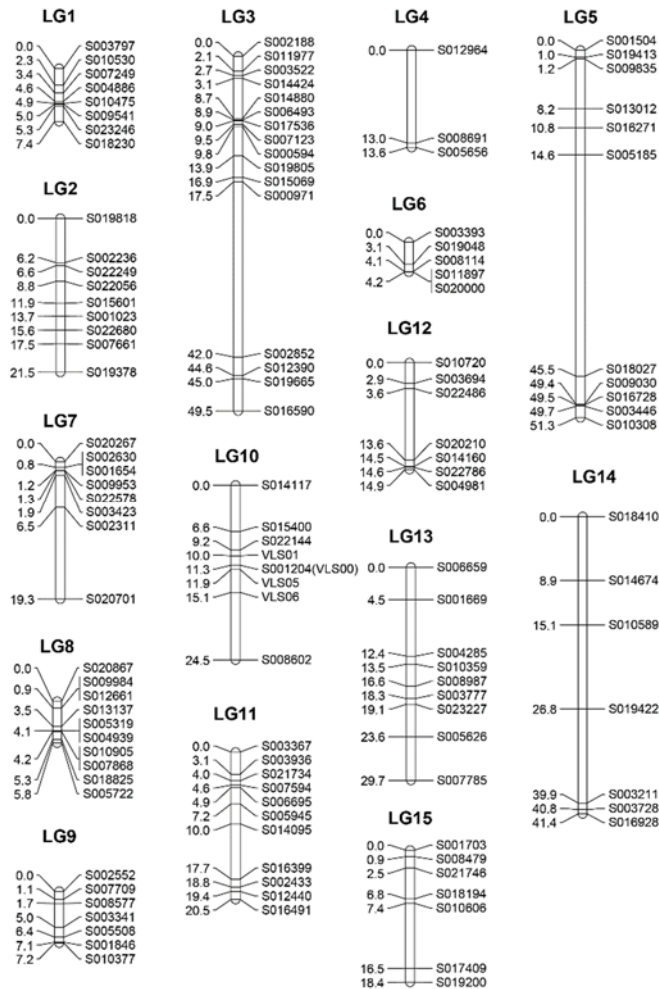


図2 SNPマーカーを用いて作製したトビイロウンカの連鎖地図

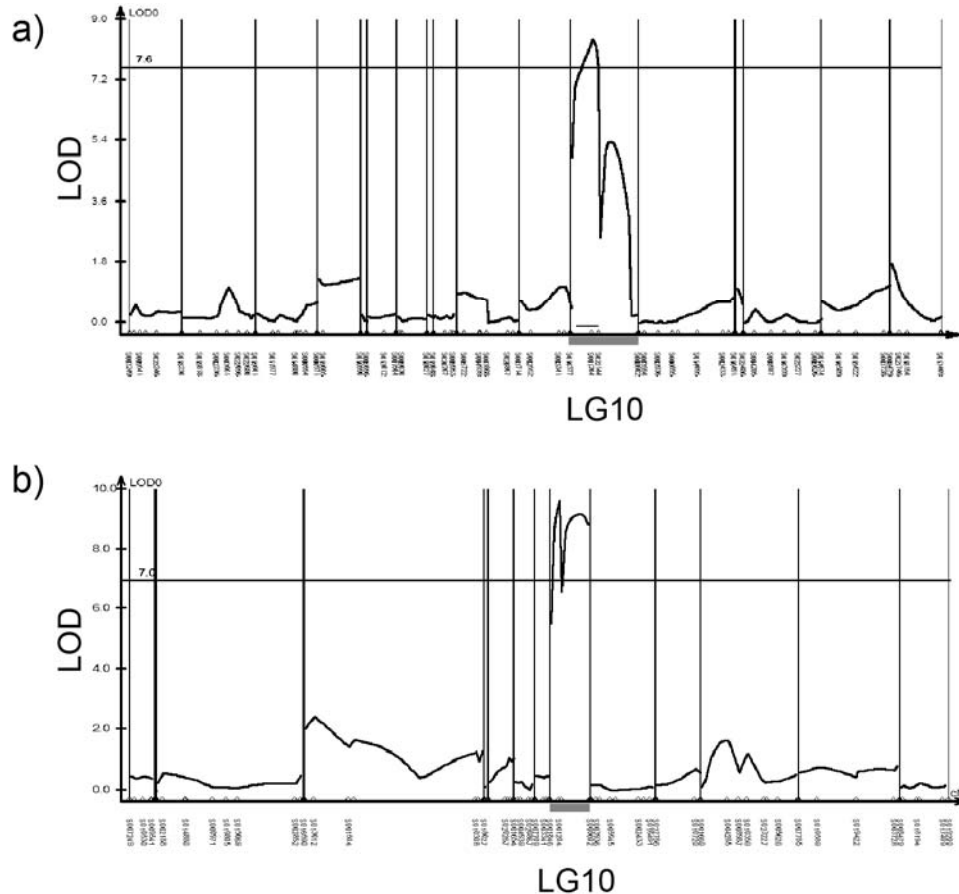


図3 トビイロウンカ抵抗性遺伝子*Bph1*に対するウンカの加害性のQTL。第10連鎖群にのみ加害性を支配する領域がある。a) F₂-C集団 (27個体)、b) F₂-E集団 (54個体)。

(エ) DNAプール法による連鎖マーカーの探索と遺伝子の座乗位置の特定

(ウ)で得た交配集団について加害性個体34のDNAをプールしたライブラリと非加害性個体154のDNAをプールしたライブラリを調製した。両DNAプールについてwhole genome shotgun sequencingを行い、塩基配列を比較した。加害因子を単一の劣性因子と想定した際、加害系統 (C89i) 由来のアリルの出現頻度は加害個体DNA プールでは1.0、非加害個体DNAプールでは0.33となることが予想されるため、これに当てはまるアリル頻度を持つSNPを探索した。候補SNPについてF₂個体81の遺伝子型を決定し加害性と連鎖するものを同定した。これをもとに加害因子の座乗位置を特定した。

DNAプール解析から得た7個の候補SNPを個別別にタイピングし、加害遺伝子の座乗位置を2つのSNPsマーカーVLS01とVLS05の間約1.3cMの範囲に絞った。

(オ) 次世代シーケンサーを用いた大規模・省コストSNPsジェノタイプ法の開発

今後の加害遺伝子の単離に備え、次世代シーケンサーを用いたトビイロウンカの大規模SNPsジェノタイプ法としてdouble digest restriction site associated DNA sequencing法 (ddRAD-seq 法) の適用を検討した。実験に先立ちゲノム配列を用いてシミュレーションを行い、十分な数の制限断片を得られることを確認した。次にF₂集団8個体からなる小規模なddRAD-seqライブラリを作成し、MiSeqによる配列解読を行って実験条件を

検討した。最後に(ウ)で得た交配後代81個体を用いてddRAD-seqのライブラリ作製を行い、HiSeq2000による配列解読を行った。

条件検討のために調整したddRAD-seqライブラリは解析に十分なクオリティを持っていた。得られたリードから879のマーカを得られ、RAD-seq法の有用性を確認できた。*Bph1*加害性交配集団81個体を用いて調整したddRAD-seqライブラリからは8,738個のSNPが得られた。そのうち1,790個を連鎖地図上にマッピングし、*Bph1*加害遺伝子が存在する第10連鎖群上に48の新たなSNPマーカを設定した。

(カ) 異なる加害性を持つ系統のRNA-seqによる発現遺伝子解析

Bph1、*bph2*、*bph4* に対して異なる加害性を保有するトビイロウンカ8系統について、RNA-seqによる発現遺伝子の網羅的解析と比較を行った。一部の系統については発育の各ステージと唾液腺のデータも収集した。これらのデータをアセンブルしたのち、発現量を系統間で比較した。

RNAseqのデータから98,543のtranscript assemblyを得た。これらの中には、系統間で顕著な発現量差を示す遺伝子が多く含まれていた。特に、交配実験で用いているI87i近交系(*Bph1*加害性なし)とC89i近交系(*Bph1*加害性)の間で10倍以上の発現量差を示すassembled contigは6,887個(全体の約7%)あった。このうち有望と思われる遺伝子について連鎖地図上にマッピングしたところ、それらは加害遺伝子の候補領域には存在しなかった。

(キ) 野外トビイロウンカ個体群の抵抗性品種に対する適応のモニタリング

トビイロウンカ野外個体群の抵抗性イネ品種に対する反応の変化をモニタリングするため、2012-2014年に日本で採集した系統を用いて抵抗性判別品種に対する加害性を検定した。検定方法は(ア)と同様と用いた。

2012年、2013年、2014年日本飛来個体群ともに*Bph1*、*bph2*に対しては高い加害性を示した一方、*Bph3*を加害しなかった。*bph4*に対しては、2012年個体群は加害性が低く、2013年個体群はやや高く、2014年個体群は非常に低くなど年次による変動が大きかった(表1)。

近年日本に飛来するトビイロウンカは、*Bph1*、*bph2*抵抗性遺伝子に対しては安定してこれを加害する能力を有しており、これらの抵抗性遺伝子を単独で品種に導入しても効果がないことが改めて示された。一方、*Bph3*抵抗性遺伝子は飛来するトビイロウンカに対して安定した効果を発揮しており、これらの抵抗性遺伝子を保有する品種は今後の品種育成の材料として有用であると考えられる。

表1 2012-2014年に日本に飛来したトビイロウンカの抵抗性判別品種に対する加害性。同一英字の間には生存率を角変換後にTukey-Kramer検定による有意差なし($P > 0.05$)。

判別品種	遺伝子	2012年個体群		2013年個体群		2014年個体群	
		生存率[%±S.E.] (腹部肥大率%)		生存率[%±S.E.] (腹部肥大率%)		生存率[%±S.E.] (腹部肥大率%)	
Mudgo	<i>Bph1</i>	96.0 ± 2.7 (92.0) a		96.0 ± 4.0 (96.0) a		92.0 ± 3.3 (92.0) a	
ASD7	<i>bph2</i>	96.0 ± 4.0 (96.0) a		94.0 ± 4.3 (90.0) a		96.0 ± 2.7 (94.0) a	
Rath Heenati	<i>Bph3</i>	2.0 ± 2.0 (0.0) c		2.0 ± 2.0 (0.0) c		0.0 ± 0.0 (0.0) b	
Babawee	<i>bph4</i>	20.0 ± 6.7 (0.0) b		52.0 ± 10.8 (28.0) b		4.0 ± 4.0 (0.0) b	
Baramawee	<i>Bph9,17</i>	2.0 ± 2.0 (0.0) c		14.0 ± 10.3 (2.0) c		6.0 ± 4.3 (0.0) b	
T65	-	100.0 ± 0.0 (100.0) a		98.0 ± 2.0 (98.0) a		92.0 ± 4.4 (92.0) a	

3) 成果活用における留意点

トビイロウンカにおいてはポジショナルクローニングの成功例は報告がなく、分子マーカーや連鎖地図の整備も不十分であることから、研究基盤のさらなる充実を図る必要がある。*bph2*加害性の遺伝的支配については*Bph1*ほど単純には説明できないが、今後QTL解析の結果をもとに加害性の責任領域をウンカゲノム上に決定することは可能であると考えられる。

4) 今後の課題

(ア) イネの抵抗性が打破される機構の解明

*Bph1*を加害する因子についてウンカゲノム上に原因遺伝子を特定し、抵抗性イネ品種が抵抗性を失う機構を明らかにする必要がある。*Bph2*に対する加害性についても同様に原因遺伝子の特定を急ぐ必要がある。

(イ) 飛来個体群のモニタリングの必要性

日本に飛来するトビイロウンカの各抵抗性遺伝子に対する反応は年次変動するため、継続的なモニタリングによって常に最新の状況を把握しておく必要がある。

「イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発」最終年度報告書

中課題番号: 13406654

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: イネの低コスト化・省力化・環境負荷低減に資する有用遺伝子の同定とDNAマーカーの開発 (LCT)

小課題番号: LCT0013

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: いもち病圃場抵抗性遺伝子の同定とDNAマーカー開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 生物機能利用研究部門・植物・微生物機能利用研究領域・植物機能制御ユニット・井上晴彦

1) 研究目的

いもち病はイネの最重要病害であり、特に低温多雨寡照の気象条件において大発生し被害をもたらす。近年、外国品種の真性抵抗性を導入した飼料稲品種の罹病化が相次いだ。また、導入した遺伝子が効果を発揮せず、実用性を担保できない場合があることが明らかになってきた。そこで本研究では、新規圃場抵抗性遺伝子および、圃場抵抗性の安定化に関与する遺伝子や領域を同定または単離し、DNAマーカーを開発することにより圃場抵抗性の利用および利便性の拡大を図る。

2) 研究成果

(1) 中部 22 号由来のいもち病抵抗性遺伝子の解析

中部 22 号とコシヒカリの F₂ 集団において第 11 染色体上に見出した中部 22 号の対立遺伝子が穂いもち抵抗性を高める QTL について、雑種後代系統群 (F₄) を用いてマッピングを行い、20 から 24Mb の範囲にあることを確認した。次に、雑種後代系統群の規模を拡大してマッピングを行い、この領域には少なくとも 2 個の QTL (*qBR11-1* および *qBR11-2*) が存在することが明らかにした。さらに、規模して詳細な解析を行い、*qBR11-1* および *qBR11-2* の存在する範囲を 269Kb および 600Kb に狭めた。前者は、効果が大きく複数年度にわたって効果を確認できたのに対して、後者は効果が小さく、効果を確認できない場合があった。この成果に基づき *qBR11-1* および *qBR11-2* を選抜できる DNA マーカー (ID21-48、ID21-38 等) を作出した。*qBR11-1* および *qBR11-2* の効果を検証するため、コシヒカリ (基準) に対する被害率の低減効果 (防除価) を調べたところ、*qBR11-1* と *qBR11-2* の両方を持つ系統では 91 %、*qBR11-1* を単独で持つ系統では 86 % であった。前者は *Pb1* を持つ系統 (78 %) よりも高く、これらと座乗位置が近い *Pi34* 遺伝子を持つ系統 (94 %) とほぼ同等であった。一方、9 種類のいもち病菌株を用いて葉いもち抵抗性を調査したところ、*qBR11-1* と *qBR11-2* の両方を持つ系統の病斑面積率 2.7 % は、*Pi34* 遺伝子を持つ系統の 4 % に比べて低かった。*qBR11-1* を単独で持つ系統は 1.6 % と、これを *qBR11-2* と併せ持つ系統や *Pi34* を持つ系統に比べて低く、穂いもち抵抗性とは傾向が異なった。以上の結果から、中部 22 号の *qBR11-1* および *qBR11-2* は穂いもち抵抗性の改良に役立つ新規の QTL であり、これを選抜できるマーカーが整備された。

(2) NERICA 品種群由来のいもち病抵抗性遺伝子の解析

NERICA6 に由来する 3 個の抵抗性遺伝子のひとつ *pi21-N6* が存在する領域を、2011-260F1 から養成した F₂ 解析集団を DNA マーカーによる genotype 解析と接種検定により 38kb に狭めた。*pi21-N6* を含む領域のシーケンスは両親の CG14 と WAB56-104 の組換え型であった。いもち病常発圃場での検定を行ったところ、この遺伝子は葉いもちに対して効果が高いものの、穂いもちには効果が低かった。*qBR4-N6* 遺伝子については、2011-276F1 から養成した F₂ 解析集団を DNA マーカーによる genotype 解析と接種検定により 1.03Mb に狭めた。いもち病常発圃場での検定を、2014 年と 2017 年に行い、葉いもち、および穂いもちの両方に対して強い抵抗性が確認された。*qBR9-N6* 遺伝子については、まず、NERICA6/コシヒカリ交雑後代から得た派生系統 2011-A215-5 が *Piz* および、*Pii* の周辺を含む既報とは異なる領域に抵抗性遺伝子を持つと推定した。次に、*Piz* 領域を持たないマツ

ピング集団 2013-A251-1 を用いて解析を行うことで *qBR9-N6* を 1.5Mb に狭めた。この遺伝子は既知の真性抵抗性遺伝子 *Pii* および *Pi56(t)* とは異なったことから、戻し交配により背景の抵抗性を除き、優性劣性および菌株安定性の形質の評価に供試した。その結果、2017 年のいもち病常発圃場での検定では、葉いもちおよび穂いもちの両方に対して効果が高かった。

NERICA3 については、予備的な実験で穂いもち抵抗性 QTL の存在が示唆された第 2、第 4、および第 8 染色体について QTL の確認を進めたところ、第 2 染色体については、マーカー遺伝子座 RM166 座近傍に QTL の存在を確認し、第 4 染色体では抵抗性との弱い相関を認めたものの、第 8 染色体では相関が認められなかった。レース検定を行った結果、第 2 染色体の QTL は *Pib* 遺伝子である可能性が高いと考えられる。第 4 染色体については有意ではないものの、25-34Mb において *Nerica3* の対立遺伝子を持つ個体群が、コシヒカリの対立遺伝子を持つ場合よりも発病率が低かった。また、解析の過程で第 11 染色体 16-20Mb において *Nerica3* の対立遺伝子を持つ個体群が抵抗性を示す傾向を認めた。以上のことから、NERICA3 の穂いもち抵抗性は、機知の抵抗性遺伝子を含めた複数の QTL で構成され、効果の程度からこれらを用いることによって穂いもち抵抗性を大幅に改善することは困難と判断される。

(3) コアコレクション等の多様な遺伝資源からのいもち病抵抗性 QTL の発掘

多様な変異を含むコアコレクションを用いて作成した染色体置換系統 (CSSL: コシヒカリ背景) は、有用変異の発掘に有効である。いもち病抵抗性に関わる新規の QTL を発掘するため、合計 10 品種に由来する CSSL について畑晩検定によっていもち病抵抗性 (葉いもち) を評価した。その結果、新規と考えられる QTL を含め、抵抗性に関与する多数の QTL を検出した (論文準備中)。次に、検出された QTL のうち、複数の品種 (Qiu Zhao Zong, Naba, BeiKhe, Tupa121-3 および Khau Mac Kho) で抵抗性 QTL の存在が示唆される第 3 染色体の領域 (*qBR3-1*) に着目し、染色体領域を短く断片化した Sub-CSSL を用いて畑晩検定を行った。その結果、*qBR3-1* の効果を確認するとともに、その範囲を約 8.0Mb に狭めることができた。

(4) 関東 209 号の抵抗性低下因子のマッピング

Pb1 はいわゆる圃場抵抗性遺伝子に分類され、菌系特異性が無く生育の後期で抵抗性が発動する。関東 209 号 (さとじまん) は *Pb1* を持っているにも関わらず、その抵抗性を発揮できない。その原因を明らかにするため、いもち病の感染過程において植物活性化剤を処理した時の発現解析を行った。その結果、関東 209 号では WRKY45 に依存的な植物活性化剤 (BTH) が誘導する葉いもち病抵抗性は通常レベルで保たれていた。しかしながら、BTH で処理によって通常は上昇するサリチル酸経路上の転写因子である *WRKY45* や、転写補助因子である *NPR1* などの発現が低いことが明らかになった。そのときの植物体内のサリチル酸のレベルを測定すると、対象区と同レベルであったことから、関東 209 号はサリチル酸非感受性株であることが明らかとなった。遺伝的解析を行うとイネゲノム中に、*Pb1* による抵抗性に関わる 4 カ所の領域に見出し、そのうちのひとつ、QTL7 は 1.2 Mb に限定された。

(5) 圃場抵抗性遺伝子の菌株特異性 (安定性) の解析

圃場抵抗性遺伝子への特異性などが知られている内外のいもち病菌をイネ葉に接種し、病斑数および病斑面積率を調査した。その結果、*pi21-N6* では系統 2011-A202-1 を供試しワイドスペクトラムの菌系を含む 5 菌系で抵抗性を評価した、その結果菌系特異性はみられなかった。*qBR4-N6* については *qBR4-N6* を狭めた BC₁ の固定系統を用いて検定した。結果は抵抗性が安定し特異性は見られなかった。さらに、BC₃ の固定系統に多様な 6 菌系を用いた検定では、ほとんどの菌系に対して抵抗性であった。*qBR9-N6* については、*Piz* 座を除外した BC₁ 系統 2014-A102-3 に多様なレースの 6 菌系を供試した。結果はこの 6 菌系に強い抵抗性を示した。さらに BC₃ および BC₄ の固定系統に対して、6 菌系は抵抗性を示した。また、中部 22 号のもつ *qBR11-1* と *qBR11-2* は、一部の菌株に対し

て特異性を認めたものの、上述の様にその効果は実用性を担保するものであることを確認した。

(6) *qBS9* 遺伝子の解析

基本抵抗性に関与する *qBS9* 遺伝子の機能を確認するため、この遺伝子を低機能型の対立遺伝子を持つ系統（コシヒカリ *qBS9*）へ導入した形質転換体、およびコシヒカリの *qBS9* 遺伝子の発現抑制形質転換体（ T_2 世代）を作出して特性を調査したところ、*qBS9* 遺伝子の発現量に比例していもち病抵抗性が高まった。また、*qBS9* の発現低下形質転換体では不飽和脂肪酸の比率が低下していた。promoter-GUS 系統形質転換体によって組織レベルでの発現特性を調べたところ、いもち病に弱い品種 Brizde では対象の日本晴に比べて葉や葉鞘などで *qBS9* 遺伝子の発現レベルが低く、各組織内で発現の勾配等は認められなかった。*qBS9-GFP* 融合タンパク質は植物の細胞質に存在しており、核には存在しなかった。様々な品種の葉での *qBS9* の発現を調査したところ、多くの品種で対象の日本晴と同レベルであったが、インド型品種の中には、発現レベルが日本晴に比べて 1.5 倍から 2 倍程度高い品種が見られた。以上のことから、*qBS9* 遺伝子がイネにおけるいもち病抵抗性の変異の一部を説明するものと推定される。

3) 成果活用における留意点

・中部 22 号由来の *qBR11-1* を単独、あるいは *qBR11-2* と併せ持つ系統では、葉いもち、および穂いもち抵抗性の程度が逆転することから、*qBR11-2*、あるいは *qBR11-1* と *qBR11-2* の両抵抗性に対する効果は生育段階や環境の影響を受けて変動する可能性がある。

・NERICA3 由来の抵抗性については、単独の QTL の効果が小さく、他の QTL と組あわせる必要がある。

・コアコレクションから見出した *qBR3-1* については、由来する品種が異なるといもち病菌株に対する反応性が異なったため、多様な品種から見出した QTL の育種利用を図る場合には、あらかじめ、複数のレースに対する反応性を明らかにする必要がある。

・関東 209 号の *Pb1* 抵抗性を低下させる因子については、主要な第 7 染色体の QTL を絞り込み、遺伝子の存在を確認した。この遺伝子は、関東 209 号がサリチル酸に対して非感受性である原因の一つであることが分かったものの、原因遺伝子は特定されていない。

・*qBS9* 遺伝子については、コシヒカリ等大半の品種が抵抗性型の対立遺伝子を持つ。陸稲等一部の品種が罹病性型の対立遺伝子を持つので、そのような遺伝資源を用いる際には罹病性型の対立遺伝子を入れないように注意することが必要である

4) 今後の課題

・中部 22 号由来のいもち病抵抗性遺伝子 *qBR11-1* および *qBR11-2* については、有用性が確認されたので、育種利用をすすめ、導入系統における不良形質の有無を調査する。

・コアコレクションの複数の品種から見出した *qBR3-1* については、由来によってレースに対する反応性が異なるため、引き続きレース検定を行い、最も安定性を示す QTL を選定し、論文として公表する予定である。

・関東 209 号の *Pb1* 抵抗性を低下させる因子については、第 7 染色体の QTL の候補遺伝子を絞り込み、原因遺伝子を特定する。原因遺伝子は、サリチル酸の輸送や受容に関わるものと推定される。

・*qBS9* 遺伝子については、タンパクの局在性や発現などの基本的な特徴が明らかとなった。一方で、いもち病抵抗性の環境変動を理解する上で、この遺伝子の様々な環境下での応答性や機能に関する情報をさらに蓄積する必要がある。

成果等の集計数

課題番号	学術論文		学会等発表(口頭またはポスター)		出版図書	国内特許権等		国際特許権等		報道件数	普及しうる成果	発表会の主催(シンポジウム・セミナー)	アウトリーチ活動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得				
13406654	6	14	55	20	2	0	0	0	0	2	1	0	0

(1)学術論文

区分: ①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	機関名	タイトル	著者	掲載誌	巻(号)	掲載ページ	発行年	発行月
1	①	東京大学	Exogenous Boron supplementation partially rescues fertilization defect of osbor4 mutant	N. Tanaka, S. Uraguchi, T. Fujiwara	Plant Signal Behav	9(3)	2835-6	2014	2
2	①	農業生物資源研究所	Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast	Shuichi Fukuoka, Shin-Ichi Yamamoto, Ritsuko Mizobuchi, Utako Yamanouchi, Kazuko Ono, Noriyuki Kitazawa, Nobuko Yasuda, Yoshikatsu Fujita, Thuy Thi Thanh Nguyen, Shinzo Koizumi, Kazuhiko Sugimoto, Takashi Matsumoto, Masahiro Yano	Sci Rep.	4	4550	2014	4
3	①	農業生物資源研究所、九州沖縄農業研究センター	Genetic mapping of the rice resistance-breaking gene of the brown planthopper Nilaparvata lugens	T. Kobayashi, K. Yamamoto, Y. Suetsugu, S. Kuwazaki, M. Hattori, J. Jairin, S. Sanada-Morimura, M. Matsumura	Proc Biol Sci	281(1787)		2014	7
4	①	名古屋大学、農業生物資源研究所	Map-based cloning and characterization of a brown planthopper resistance gene BPH26 from Oryza sativa L. ssp. indica cultivar ADR52	Y. Tamura, M. Hattori, H. Yoshioka, M. Yoshioka, A. Takahashi, J. Wu, N. Sentoku, H. Yasui	Sci Rep	4	5872	2014	7

5	①	農業生物資源研究所	Rice blast resistance gene Pikahei-1(t), a member of a resistance gene cluster on chromosome 4, encodes a nucleotidebinding site and leucine-rich repeat protein	Xu Xin, Hayashi Nagao, Wang Chun-Tai, Fukuoka Shuichi, Kawasaki Shinji, Takatsuji Hiroshi, Jiang Chang-Jie	Mol. Breed.	34(2)	691-700	2014	8
6	①	農業生物資源研究所	Mapping of a QTL for field resistance to blast (<i>Pyricularia oryzae</i> Cavara) in Inggoppor-tinawon, a rice (<i>Oryza sativa</i> L.) landrace from the Philippines	Mizobuchi R, Sato H, Fukuoka S, Yamamoto S, Kawasaki-Tanaka A, Fukuta Y	Japan Agricultural Research Quarterly	48(4)	425-431	2014	10
7	①	京都大学	Expression level of the sodium transporter gene OshKT2.1 determines sodium accumulation of rice cultivars under potassium-deficient conditions	Miyamoto T, Ochiai K, Nonoue Y, Matsubara K, Yano M, Matoh T	Soil Sci. Plant Nutr.	61(3)	481-492	2015	2
8	①	東京大学	Application of 42K to Arabidopsis tissues using real-time radioisotope imaging system (RRIS)	Toshinori Aramaki, Ryohei Sugita, Atsushi Hirose, Natsuko I. Kobayashi, Keitaro Tanoi, Tomoko M. Nakanishi	RADIOISOTOPES	64(3)	169-176	2015	3
9	①	国際農林水産業研究センター	講座名:植物栄養学を活かした農業生産技術について 2. QTL解析を用いた水稲の窒素利用機能	小原 実広	日本土壌肥料学雑誌	86(2)	132-138	2015	4
10	②	広島大学, 山形大学	植物栄養学を生かした農業生産技術について. 3.リン酸栄養について—植物における難利用性リンの有効利用法—	和崎 淳, 丸山 隼人, 俵谷 圭太郎	日本土壌肥料学雑誌	86(3)	213-218	2015	6
11	②	京都大学	植物栄養学を活かした農業生産技術について 4. 土壌ナトリウムの利用によるカリウム施肥量低減の可能性	落合久美子	土肥誌	86	319-323	2015	8
12	①	滋賀県立大学	水稲インディカ品種Kasalathに由来する2種類の低リン応答性QTLの、コシヒカリへの集積	山本竜也, 小梶裕之, 田端友樹, 飯村康夫, 清水顕史	Journal of Crop Research	(60)	31-35	2015	11

13	①	九州大学、九州沖縄農業研究センター	Genetic basis of multiple resistance to the brown planthopper (<i>Nilaparvata lugens</i> Stal) and the green rice leafhopper (<i>Nephotettix cincticeps</i> Uhler) in the rice cultivar 'ASD7' (<i>Oryza sativa</i> L. ssp. <i>indica</i>)	T. Van Mai, D. Fujita, M. Matsumura, A. Yoshimura, H. Yasui	Breed Sci	65(5)	420-429	2015	12
14	②	北里大学、農業環境技術研究所	植物栄養学を活かした農業生産技術について 6. イネのカドミウム・ヒ素の輸送機構と低集積系統育種への応用	浦口晋平, 石川覚	日本土壌肥料学会誌	87(1)	54-63	2016	2
15	①	広島大学、山形大学	Landrace of Japonica rice, Akamai exhibits enhanced root growth and efficient leaf phosphorus remobilization in response to limited phosphorus availability.	D.M.S.B. Dissanayaka, Maruyama, H., Nishida, S., Tawaraya, K., Wasaki, J.	Plant Soil		in press	2016	12
16	①	九州大学大学院農学研究院	Characterization of resistance to the green rice leafhopper (<i>Nephotettix cincticeps</i> Uhler) in a core collection of landraces in rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	Tan Van Mai, Atsushi Yoshimura, Hideshi Yasui	American Journal of Plant Science	8(18)	in press	2017	1
17	①	農研機構 農業環境変動研究センター	水稻のヒ素輸送機構とヒ素低減対策	石川 覚	地球環境	22(1)	61-66	####	4
18	①	広島大学、山形大学	Identification of genomic regions associated with low phosphorus tolerance in japonica rice (<i>Oryza sativa</i> L.) by QTL-Seq.	Nishida, S., Dissanayaka, D.M.S.B., Honda, S., Tateishi, Y., Chuba, M., Maruyama, H., Tawaraya, K., Wasaki, J.	Soil Science and Plant Nutrition		accepted	####	
19	①	農研機構 農業環境変動研究センター	Phytochelatin synthase OsPCS1 plays a crucial role in reducing arsenic levels in rice grains.	Hayashi, S., Kuramata, M., Abe, T., Takagi, H, Ozawa, K., and Ishikawa, S.	Plant J.	91(5)	840-848	####	5
20	①	農研機構 生物機能利用研究部門	Panicle blast 1 (Pb1) resistance is dependent on at least four QTLs in the rice genome.	井上晴彦、中村充、水林達美、高橋章、菅野正治、福岡修一、林長生	Rice	10(36)	10	####	8

(2) 学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	Development of Low-Cadmium Rice by Ion-Beam Irradiation	Satoru Ishikawa	農業環境技術研究所	17th International Plant Nutrition Colloquium	2013	8
2	イネを用いたナトリウムのカリウム代替効果に関する検討(5) - HKT2.1発現レベルとプロモーター活性の品種間差-	宮本託志, 落合久美子, 間藤 徹	京都大学	日本土壌肥料学会2013年度名古屋大会講演要旨集	2013	9
3	次世代型シーケンサーを利用したトビイロウンカの加害性パイオタイプ発達機構の解析	末次克行, 小林徹也, 真田幸代	農業生物資源研究所, 九州沖縄農業研究センター	NGS現場の会第3回研究会	2013	9
4	イネのリン欠乏応答酸性ホスファターゼ遺伝子PiACP-8の単離と機能解析	佐々木恵美, 落合久美子, 間藤徹, 清水顕史	京都大学, 滋賀県立大学	日本育種学会第124回講演会 講演要旨集 育種学研究	2013	10
5	イネの転写因子PiTF-6は根の伸長およびリン欠乏応答性遺伝子の発現に影響を及ぼす	小梶裕之, 榎田智子, 市川裕章, 光田展隆, 高木優, 間藤徹, 清水顕史	農業生物資源研究所, 産業技術総合研究所, 京都大学	日本育種学会第124回講演会 講演要旨集 育種学研究	2013	10
6	A first generation microsatellite- and SNP-based linkage map of brown planthopper	Jirapong Jairin, Tetsuya Kobayashi, Masaya Matsumura, Hideshi Yasui	九州大学, 九州沖縄農業研究センター	7th International Rice Genetics Symposium	2013	11
7	Map-based cloning of Pi35, a gene for quantitative trait locus controlling blast resistance, identifies multiple functional polymorphisms in a disease resistance gene	福岡修一, 溝淵律子	農業生物資源研究所	The 7th International Rice Genetics Symposium (RG7), Book of Abstracts	2013	11

8	Molecular mapping of a major gene conferring resistance to green rice leafhopper, <i>Nephotettix cincticeps</i> Uhler, derived from an indica rice cultivar ASD7	Mai Van Tan, Atsushi Yoshimura, Hideshi Yasui	九州大学	7th Intl. Rice Genet. Symp.	2013	11
9	Recent advances in leafhopper and planthopper resistance in rice	Hideshi Yasui, Daisuke Fujita, Jirapong Jairin, Atsushi Yoshimura, Masaya Matsumura	九州大学, 九州沖縄農業研 究センター	7th Intl. Rice Genet. Symp.	2013	11
10	優性圃場抵抗性遺伝子Pi35・Pb1 ~真性抵抗性遺伝子と同じ構造を持ち、量的抵抗性を示す遺伝子~	林 長生	農業生物資源研究所	農研機構セミ ナー講演要旨集 イネいもち病「圃 場抵抗性」は本 当に持続的な のか？	2013	11
11	劣性圃場抵抗性遺伝子 pi21 ~育種利用可能な耐病性の負の制御因子~	福岡修一	農業生物資源研究所	農研機構セミ ナー講演要旨集 イネいもち病「圃 場抵抗性」は本 当に持続的な のか？	2013	11
12	水稲中間母本農10号が保有するインド型イネ品種Rathu Heenati由来のトビイロウンカ抵抗性遺伝子の解析	田村泰盛, 松本 由紀子, 他	農業生物資源研究所	第58回日本応用 動物昆虫学会大 会講演要旨集	2014	3
13	Genetic mapping of the rice-resistance-breaking gene of the brown planthopper <i>Nilaparvata lugens</i>	Kobayashi T, Yamamoto K, Suetsugu Y, Sanada- Morimura S, Matsumura M	農業生物資源研究所, 九州 沖縄農業研究センター	Hemipteran- Plant Interactions Symposium	2014	6

14	Metabolite profiling of shoot extracts, root extracts, and root exudates of rice under phosphorus deficiency	K. Tawaraya	山形大学	10th Annual International Conference of the Metabolomics Society	2014	6
15	陸稲品種「嘉平」由来いもち病抵抗性遺伝子Pikahei-1(t)の単離と特性解析	林長生, シュエシン, 王春台, 福岡修一, 川崎信二, 高辻博志, 姜昌杰	農業生物資源研究所	平成26年度日本植物病理学会大会 プログラム・講演要旨予稿集	2014	6
16	Virulence status of the brown planthopper (BPH) to resistant rice varieties and breeding for resistance to BPH in Japan	Matsumura M, Hirabayashi H, Fujita D, Yasui H	九州大学, 九州沖縄農業研究センター	Intl. Symp. Rice Breeding for planthoppers and virus disease under climate change, Book of Abstracts.	2014	7
17	いもち病抵抗性遺伝子の病害抵抗性の仕組み	林長生, 井上晴彦, 姜昌杰, 高辻博志	農業生物資源研究所	第53回ガンマーフィールドシンポジウム	2014	7
18	Comparison of P recycling abilities among rice cultivars showed an importance of lipid remodeling.	H. Maruyama, N. Tani, T. Mukada, K. Tawaraya, J. Wasaki	山形大学, 広島大学	5th International Symposium on Phosphorus Dynamics in the Soil-Plant Continuum	2014	8

19	Metabolite profiling of shoot extracts, root extracts, and root exudates of rice cultivars under phosphorus deficiency.	K. Tawaraya, Y. Yamazaki, T. Mukada, W. Cheng, H. Maruyama, J. Wasaki, M. Chuba, K. Saito, A. Oikawa, T. Wagatsuma	山形大学, 広島大学	5th International Symposium on Phosphorus Dynamics in the Soil-Plant Continuum	2014	8
20	イネのヒ素集積に関わる生理的・遺伝的解析	倉俣正人, 安部匡, 藤原徹, 石川覚	農業環境技術研究所	日本土壌肥料学会講演要旨集	2014	9
21	イネを用いたナトリウムのカリウム代替効果に関する検討(6) - OsHKT1;5による地上部へのナトリウム輸送制御 -	宮本託志, 織田有紀子, 落合久美子, 間藤 徹	京都大学	日本土壌肥料学会2014年度東京大会 講演要旨集	2014	9
22	イネ生態型boro品種に見出されたイネ根長のQTLマッピング	小原実広	国際農林水産業研究センター	日本土壌肥料学会2014年度東京大会 講演要旨集第60集	2014	9
23	インド型品種ASD7に由来するイネのトビイロウンカ抗生作用の遺伝的基盤	Mai Van Tan, 園田智広, 吉村 淳, 松村正哉, 安井秀	九州大学, 九州沖縄農業研究センター	日本育種学会第126回 講演要旨集 育種学研究	2014	9
24	窒素条件によって引き起こされるイネ地上部のイオノームの変化	平栗章弘, 藤原徹, 神谷岳洋	東京大学	日本土壌肥料学会2014年度大会	2014	9

25	低リン耐性の異なるイネ品種のリン欠乏下におけるトランスクリプトーム解析.	丸山 隼人, 向田 匠, 俵谷 圭太郎, 和崎 淳	山形大学, 広島大学	日本土壌肥料学会2014年度東京大会 講演要旨集	2014	9
26	低リン耐性の異なるイネ品種のリン欠乏下におけるメタボローム解析.	向田 匠, 山崎 優美子, 程 為国, 中場 勝, 齊藤 和季, 及川 彰, 丸山 隼人, 和崎 淳, 我妻 忠雄, 俵谷 圭太郎	山形県農業総合研究センター, 広島大学, 山形大学	日本土壌肥料学会2014年度東京大会 講演要旨集	2014	9
27	Genetic approaches for nitrogen utilization by improving root system development toward the developing breeding materials in rice	Obara M	国際農林水産業研究センター	XII France-Japan Workshop on Plant Science 2014	2014	10
28	Mapping QTL for root elongation of seedlings in response to nitrate in rice	Obara M, Abiko T, Fukuta Y	国際農林水産業研究センター	4th International Rice Congress	2014	10
29	新規に同定された圃場抵抗性遺伝子群とその利用に向けて	福岡修一	農業生物資源研究所	農研機構シンポジウム イネいもち病菌管理技術としてのマルチラインと圃場抵抗性	2014	11
30	低リン応答性QTLのコシヒカリへのピラミディング	山本竜也, 小椋裕之, 田端友樹, 清水顕史	滋賀県立大学	近畿作物・育種研究会第178回例会	2014	11
31	イネにおけるリンの分配に関与する輸送体OsSultr3;4の解析	竹本侑馬, 山地直樹, 馬建鋒	岡山大学	日本土壌肥料学会関西支部会	2014	12
32	コメのヒ素濃度を制御する節の役割	倉俣正人, 飯野真心, 谷川八大, 安部匡, 石川寛	農業環境技術研究所	第20回ヒ素シンポジウム	2014	12

33	育種現場で多用される穂いもち圃場抵抗性遺伝子Pb1に関する最新研究の紹介	林 長生	農業生物資源研究所	九州沖縄農業水田作推進会議水田作推進部会技術検討会	2015	1
34	イネのウンカ・ヨコバイ抵抗性遺伝子に関する近似同質遺伝子系統群の利用	藤田大輔, 松村正哉, Tan MV, 吉村淳, 安井秀	九州大学	日本育種学会 127回講演会 育種学研究	2015	3
35	インド型イネ品種ADR52の保有するトビイロウンカ抵抗性遺伝子BPH26の単離	田村泰盛, 服部誠, 吉岡博文, 吉岡美樹, 高橋章, 呉健忠, 千徳直樹, 安井秀	九州大学	日本応用動物昆虫学会第59回講演会 講演要旨集	2015	3
36	初期生育においてリン酸欠乏耐性を示すイネ変異体の同定と解析	吉田紗貴, 田中伸裕, 高木宏樹, 寺内良平, 藤原徹	(公財)岩手生物工学研究センター, 東京大学	日本植物生理学会2015年年会	2015	3
37	窒素、リン、カルシウム欠乏に応答して根の伸長を維持することができないイネ(<i>Oryza sativa</i>) 変異体HCA7の解析	吉永 良平, 田中伸裕, 大森良弘, 藤原 徹	東京大学	日本植物生理学会2015年年会	2015	3
38	東アジア・インドシナ地域におけるトビイロウンカの抵抗性判別イネ品種に対する加害性の長期的変動	松村正哉, Kin Kin Marlar Myint, 吉田和弘, 真田幸代, 安井秀, 小林徹也	九州沖縄農業研究センター, 九州大学, 農業生物資源研究所	日本応用動物昆虫学会第59回講演会 講演要旨集	2015	3
39	日本イネ集団を用いた、低リン耐性関連形質のゲノムワイド関連解析1.根分泌物による不可給態リンの可溶化	田端友樹, 藤田楓加, 山崎将紀, 清水顕史	滋賀県立大学	日本育種学会第127回講演会 講演要旨集 育種学会研究	2015	3
40	Virulence status of the brown planthopper to resistant rice varieties in Asia	Matsumura M, Yasui H.	九州大学, 九州沖縄農業研究センター	18th International Plant Protection Congress	2015	8

41	イネを用いたナトリウムのカリウム代替効果に関する検討(7) – 「Khu Tan Chiem」のナトリウム高吸収機構の解析 –	宮本 託志, 小田佳乃子, 落合久美子, 間藤 徹	京都大学	日本土壤肥料学会2015年度京都大会	2015	9
42	いもち病圃場抵抗性遺伝子の単離と機能解析	林長生, 福岡修一, 井上晴彦, 溝淵律子, 山内歌子, 山本伸一	農業生物資源研究所	植物微生物研究交流会	2015	9
43	リンリサイクル能の異なるイネ品種における短期間リン処理の影響.	丸山 章仁, 丸山隼人, 俵谷 圭太郎, 和崎 淳	山形大学, 広島大学	日本土壤肥料学会2015年度京都大会 講演要旨集	2015	9
44	リン欠乏条件下におけるイネの脂質代謝の品種間差.	本田 創一郎, 山崎 優美子, 程 為国, 中場 勝, 斉藤 和季, 及川 彰, 丸山 隼人, 和崎 淳, 我妻 忠雄, 俵谷 圭太郎	広島大学, 山形大学	日本土壤肥料学会2015年度京都大会 講演要旨集	2015	9
45	高収量イネ品種タカナリの窒素吸収利用能力の解析	永谷親彦, 落合久美子, 間藤 徹	京都大学	日本土壤肥料学会2015年度京都大会	2015	9
46	硝酸態窒素に応答したイネの根の伸長性の遺伝変異とQTLの同定	小原実広, 安彦友美, 福田善通	国際農林水産業研究センター	日本土壤肥料学会講演要集第61集	2015	9
47	窒素、リン、カルシウム欠乏条件下で短根表現型を示すイネ変異体 HCA7 の網羅的遺伝子発現解析	奥村啓史, 大森良弘, 吉永良平, 藤原徹	東京大学	日本土壤肥料学会2015年年会	2015	9
48	窒素源の種類によって生育の異なる変異株における網羅的遺伝子発現パターンの解析	長谷川雄大, 大森良弘, 矢野幸司, 田中伸裕, 林誠, 藤原徹	東京大学	日本土壤肥料学会2015年年会	2015	9

49	低栄養耐性イネ作出に向けた野生イネ遺伝資源の探索	大森良弘, 藤原徹	東京大学	日本土壌肥料学会2015年年会	2015	9
50	野生イネ染色体断片導入システムを用いた低リン耐性形質のマッピング	小梶裕之, 工藤真帆, 小田佳乃子, 平林秀介, 清水顕史	作物研究所, 滋賀県立大学	日本育種学会第128回講演会 講演要旨集 育種学研究	2015	9
51	リン欠乏条件下におけるイネ品種のリピドーム解析.	本田 創一朗, 山崎 優美子, 程 為国, 中場 勝, 岡咲 洋三, 及川 彰, 斉藤 和季, 丸山 隼人, 和崎 淳, 我妻 忠雄, 俵谷 圭太郎	広島大学, 山形大学	第9回メタボロームシンポジウム	2015	10
52	Cloning and characterization of Panicle resistance gene, Pb1	Haruhiko Inoue, Hiroshi Takatsuji, Nagao Hayashi	農業生物資源研究所	The 2nd Wuhan International Symposium on Biological Signal Transduction	2015	11
53	Mutagenic approaches for reducing Cd and As in rice grains	Ishikawa S, Kuramata M, Abe T., Arao T.	農業環境技術研究所	環太平洋国際化学会議	2015	12
54	ベトナム在来種Khau Tan Chiemのナトリウム吸収特性-コシヒカリとの比較-	小田佳乃子, 宮本託志, 落合久美子, 間藤 徹	京都大学	日本土壌肥料学会2015年度関西支部講演会	2015	12
55	非塩害条件下のイネで根から地上部へのナトリウム移行を抑制する機構の検討	織田有紀子, 宮本託志, 落合久美子, 間藤 徹	京都大学	日本土壌肥料学会2015年度京都大会	2015	9

56	Landrace of Japonica rice, Akamai (Yamagata) exhibits enhanced root growth and efficient leaf phosphorus remobilization in response to limited phosphorus availability.	D.M.S.B. Dissanayaka, H. Maruyama, S. Nishida, K. Tawaraya, J. Wasaki	広島大学、山形大学	日本土壌肥料学会2016年度佐賀大会	2016	9
57	イネ低硝酸吸収突然変異体の原因遺伝子のマッピングおよび推定	寺本翔太, 大森良弘, 長谷川博, 谷坂隆俊, 藤原徹	東京大学	日本育種学会第130会年会	2016	9
58	コメ中の無機ヒ素濃度を制御するOSPCS1の役割	林晋平, 倉俣正人, 安部匡, 高木宏樹, 石川寛	農業環境変動研究センター、生物機能利用部門、岩手生工研、石川県立大	日本土壌肥料学会	2016	9
59	リン欠乏条件におけるイネ品種の葉のリピドーム解析	本田 創一郎, 丸山 隼人, 和崎 淳, 程 為国, 中場 勝, 岡咲 洋三, 及川 彰, 齊藤 和季, 我妻 忠雄, 俵谷圭太郎	山形大学、広島大学	日本土壌肥料学会2016年度佐賀大会	2016	9
60	初期生育において低栄養耐性を示すイネ変異体の原因遺伝子の同定とその解析	吉田紗貴, 田中伸裕, 高木宏樹, 寺内良平, 藤原徹	東京大学	日本土壌肥料学会2016年年会	2016	9
61	コメのヒ素濃度はOSPCS1によって制御される	林晋平, 倉俣正人, 安部匡, 高木宏樹, 石川寛	農業環境変動研究センター、生物機能利用部門、岩手生工研、石川県立大	第22回ヒ素シンポジウム	2016	11
62	日本イネ品種群を用いたリン欠乏応答性根伸長形質に関わるQTLの探索	小椋裕之, 山崎将紀, 清水顕史	滋賀県立大学	近畿作物・育種研究会第182回例会	2016	11
63	野生イネOryza barthii染色体断片導入システムを用いた低リン耐性QTLの探索	工藤真帆, 小椋裕之, 平林秀介, 清水顕史	滋賀県立大学	近畿作物・育種研究会第182回例会	2016	11

64	Nobuhiro Tanaka, Masataka Kajikawa, Akihiro Saito, Yoshihiro Ohmori, Shimpei Uruguchi and Toru Fujiwara	Rice LC5 is essential for metals absorption via promotion of transporter genes for multiple metals in root	東京大学	日本植物生理学会2017年年会	2017	3
65	Pb1抵抗性は少なくとも4つのQTLに依存する	井上晴彦、水林達美、福岡修一、林長生	農研機構 生物機能利用研究部門	平成29年度 日本植物病理学会	2017	4
66	Response to phosphorus deficiency of two rice genotypes with contrasting tolerance is determined by plasticity of root growth and leaf phosphorus remobilization.	Dissanayaka, D.M.S.B., Nishida, S., Tawaraya, K., Wasaki, J.	広島大学、山形大学	18th International Plant Nutrition Colloquium, Proceedings Book	2017	8
67	Remodeling of membrane lipids in older and younger leaves of two rice cultivars under phosphorus deficient condition.	Tawaraya, K., Honda, S., Cheng, W., Chuba, M., Okazaki, Y., Saito, K., Oikawa, A., Maruyama, H., Wasaki, J., Wagatsuma, T.	山形大学、広島大学	18th International Plant Nutrition Colloquium, Proceedings Book	2017	8
68	Overexpression of OsPCS1 reduces arsenic concentration in rice grain	Ishikawa, S., Hayashi, S., Abe, T, and Kuramata, M.	農研機構 農業環境変動研究センター	International Plant Nutrition Colloquium	2017	8
69	リン利用効率からみた植物の低リン適応戦略.	和崎 淳、丸山 隼人、西田 翔、俵谷 圭太郎	広島大学、山形大学	日本土壌肥料学会2017年度仙台大会、講演要旨集	2017	9
70	寒天培地によるイネのリン酸鉄利用能に対するスクリーニング法の検討	工藤真帆・小梶 裕之・平林秀介・清水 顕史	滋賀県立大学	日本育種学会第132回公演会 講演要旨集 育種学研究	2017	10
71	Relationships between nitrogen use efficiency and root development in rice	Shota Teramot	東京大学	China-Japan Symposium on Rhizosphere Cross-talk	2018	1

72	Introduction to GWAS and MutMap for identification of genes/QTL using next-generation sequencing	Toru Fujiwara	東京大学	China-Japan Symposium on Rhizosphere Cross-talk	2018	1
73	OsNLP4 is a key gene regulating growth under nitrate condition in rice	Mengyao Wang, Takahiro Hasegawa, Makoto Hayashi, Yoshihiro Ohmori, Koji Yano, Takehiro Kamiya, Toru Fujiwara	東京大学	日本植物生理学会札幌年会	2018	3
74	A study of high Co and Ni mutant of rice isolated by ionome screening	Manman Kan, Toru Fujiwara, Takehiro Kamiya	東京大学	日本植物生理学会札幌年会	2018	3
75	窒素欠乏条件におけるイネの開花促進機構の解明	田中伸裕 藤原徹	東京大学	日本植物生理学会札幌年会	2018	3

(3) 出版図書

区分：①出版著書、②雑誌(注)(1)学術論文に記載したものを除く、重複記載をしない。)、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	②	植物防疫(インド型イネ品種の保有するトビロウンカ抵抗性遺伝子BPH26の単離とその利用に向けた展望)	田村泰盛, 安井秀	農業生物資源研究所, 九州大学		2015	11
2	①	Plant Macro-Nutrient Use Efficiency: Molecular and Genomic Perspectives.(Transgenic approaches for improving phosphorus use efficiency in plants.)	Maruyama, H., Wasaki, J.	広島大学	Academic Press	2017	11

(4) 国内特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日
	「該当無し」							

(5) 国際特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者(出願人等)	機関名	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	出願国
	「該当無し」								

(6) 報道等

区分：①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名等	掲載年	掲載月	掲載日	機関名	備考
①	トビロウンカに幅広い抵抗性を有するイネの作出に弾みートビロウンカを餓死させる遺伝子の特定に成功ー		2014	10	29	農業生物資源研究所、九州大学、名古屋大学	
②	トビロウンカに幅広い抵抗性を有するイネの作出に弾み	朝日新聞	2014	11	4	農業生物資源研究所、九州大学、名古屋大学	

(7) 普及に移しうる成果

区分: ①普及に移されたもの、製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの

区分	成果の名称	機関名	普及(製品化) 年月		主な利用場面	普及状況
			年	月		
③	日本土壌肥料学会2016年度佐賀大会ポスター賞(リン欠乏条件におけるイネ品種の葉のリピドーム解析)	山形大学、広島大学	2016	9		

(8) 発表会の主催の状況

(シンポジウム・セミナー等を記載する。)

整理番号	発表会の名称	年月日			開催場所	参加者数	機関名	備考
1	「該当無し」							

(9) アウトリーチ活動の状況

当事業の研究課題におけるアウトリーチ活動の内容は以下のとおり。

区分: ①一般市民向けのシンポジウム、講演会及び公開講座、サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展、大学及び研究所等の一般公開への参画、

③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	年月日			開催場所	参加者数	主な参加者	機関名	備考
1		「該当無し」								