

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

13405960

遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発

研究実施期間	平成25年度～平成29年度（5年間）
代表機関	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 次世代作物開発研究センター
研究開発責任者	杉本 和彦
共同研究機関	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（九州沖縄農業研究センター、中央農業研究センター）
	国立大学法人 三重大学大学院生物資源学研究科
	国立大学法人 名古屋大学 生物機能開発研究センター
	国立大学法人 佐賀大学 農学部
	北海道立総合研究機構 北見農業試験場
	福井県農業試験場 ポストコシヒカリ開発部
	岩手生物工学研究センター ゲノム育種研究部
	佐賀県農業試験研究センター 作物部
	(株) 三菱スペース・ソフトウェア つくば事業部
普及・実用化支援組織	
研究開発責任者 連絡先	TEL : 029-838-7443 FAX : 029-838-7408 E-mail : kazuhiko@affrc.go.jp

<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. イネ突然変異スクリーニング系の構築							
(1) 突然変異ライブラリーの構築	←					農研機構 次世代作物開発研究センター	育種素材開発ユニット、放射線育種場
(2) 変異体スクリーニング系の構築	←		→			農業生物資源研究所	イネゲノム育種研究ユニット、ゲノムリソースユニット
(3) 標的遺伝子変異体の提供	←					農研機構 生物機能利用部門 農研機構 次世代作物開発研究センター	植物機能制御ユニット 育種素材開発ユニット
2. イネ高密度突然変異集団の作出・配列解析及び利用システムの開発（統合課題）							
(4) コシヒカリ高密度変異体の作出と評価	←		→			農業生物資源研究所 農研機構 北陸研究センター	ゲノムリソースユニット 作物開発研究領域
(5) コシヒカリ変異体データベース作成と利用システムの開発	←					農研機構 次世代作物開発研究センター 三菱スペース・ソフトウェア（株）	フィールドオミックスユニット 第一グループ

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. IVG1003 ムギ類変異集団の作出と利用							
＜突然変異系統の作出と検出法の確立＞							
(1) 「きたほなみ」突然変異集団の開発	←				→	農研機構・次世代作物開発研究センター	育種素材開発ユニット、育種法開発ユニット、麦類形質評価ユニット
(2) 「シロガネコムギ」突然変異集団の開発			←		→	農研機構・九州沖縄農業研究センター	小麦・大麦育種グループ
(3) 野生オオムギ系統「OUH602」と栽培オオムギ品種「ニューサチホゴールデン」の突然変異集団の開発		←			→	農研機構・次世代作物開発研究センター	遺伝子機能解析ユニット 麦類形質評価ユニット
＜きたほなみ有用形質変異系統の検出と育種素材化＞							
(1) 有用変異系統の選抜	←				→	北海道立総合研究機構・北見農業試験場	麦類グループ
(2) ABA代謝酵素遺伝子 ( <i>TaABAS'</i> <i>OHI</i> ) 変異系統の検出	←				→	農研機構・次世代作物開発研究センター	育種素材開発ユニット、育種法開発ユニット、麦類形質評価ユニット
(3) 雪腐病抵抗性変異系統の検出	←				→	北海道立総合研究機構・北見農業試験場	麦類グループ
(4) 閉花型変異系統の開発	←				→	三重大学	生物資源学研究科

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	2 5	2 6	2 7	2 8	2 9	機関	研究室
1. ソルガム突然変異集団の作出とスクリーニング系の構築 (1) 突然変異体及び変異体DNAライブラリーの構築 (2) 高解像度溶融曲線分析による遺伝子スキニング法の構築						名古屋大学 農業生物資源研究所	植物分子育種分野 イネゲノム育種研究ユニット
1. ダイズの変異リソースの作出とスクリーニングシステムの開発 (IVG1005) (1) エンレイEMS変異体ライブラリーの作成 (2) フクユタカEMS変異体ライブラリーの作成 (3) フクユタカDEB変異体ライブラリーの作成 (4) エンレイDEB変異体ライブラリーの作成 (5) 次世代型シーケンサー等を用いた迅速な変異検出法の開発 (6) 組換えMutSを利用した簡易検出法の開発						農研機構 次世代作物開発研究センター 佐賀大学 佐賀県農業試験研究センター	基盤研究領域、畑作物研究領域・畑作物形質評価ユニット 農学部応用生物科学科・植物育種学分野 作物部・作物育種研究担当 前出 前出
2. ダイズ開花・登熟関連遺伝子スーパーアリの作成と育種的利用 (IVG3006) (1) 開花期関連遺伝子の新規アリの取得と評価 (2) 開花期関連遺伝子の新規アリを導入した系統群の開発						次世代作物開発研究センター 次世代作物開発研究センター 佐賀大学	畑作物形質評価ユニット 畑作物形質評価ユニット 前出
						次世代作物開発研究センター	畑作物形質評価ユニット
						次世代作物開発研究センター	畑作物形質評価ユニット
						佐賀大学	前出
						次世代作物開発研究センター	畑作物形質評価ユニット
						次世代作物開発研究センター	畑作物研究領域・大豆育種ユニット

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
<p>1. 自然変異アリルと表現型情報の連関データベースの開発</p> <p>(1) レファレンスゲノム及びそのデータベースの整備</p> <p>(2) 遺伝子アノテーション</p> <p>(3) 自然変異アリルデータベースの構築</p>						農研機構 高度解析センター、次世代作物開発研究センター	ゲノム情報大規模解析チーム 情報解析ユニット
						農研機構 高度解析センター、次世代作物開発研究センター	ゲノム情報大規模解析チーム 情報解析ユニット
						農研機構 高度解析センター、次世代作物開発研究センター	ゲノム情報大規模解析チーム 育種法開発ユニット
<p>1. 正逆遺伝学的手法を用いた自然変異アリルの機能アノテーション</p> <p>(1) 正逆遺伝学的手法を用いた有用遺伝子の単離とその利用</p> <p>①機能遺伝子におけるイネ自然変異カタログの構築</p> <p>②未知の出穂に関する新奇アリルの探索</p> <p>③ゲノムワイドIndelマーカー開発</p> <p>(2) 正遺伝学的手法による候補遺伝子の絞り込み</p> <p>①TILLINGによる候補遺伝子の特定</p> <p>②種子品質および穂発芽形質における本手法の有効性検証</p>						次世代作物開発研究センター	育種法開発ユニット、稲形質評価ユニット、育種素材開発ユニット、高度解析センター
						次世代作物開発研究センター	育種法開発ユニット
						次世代作物開発研究センター	育種法開発ユニット
						次世代作物開発研究センター	育種法開発ユニット

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. 染色体断片置換系統の基本特性評価 (1) Davao1、唐干、CG14のCSSLの作成 (2) Naba等4品種のCSSLの評価、採種 (3) Muha等3品種のCSSLの評価、採種 (4) Davao1等3品種のCSSLの評価、採種						農研機構 次世代作物開発研究センター	稲形質評価ユニット		
2. 派生分離集団における粒形の網羅的QTL解析 (1) IR64等4品種の解析 (2) Beike等4品種の解析 (3) Naba等4品種の解析 (4) Muha等2品種の解析								農研機構 次世代作物開発研究センター	稲形質評価ユニット
3. 粒形に関するQTLの後代検定 (1) 新規QTLの後代検定 (2) 新規QTLの精密連鎖解析									
4. sub-CSSLs (ヘテロ) の整備 (1) IR64等4品種のsub-CSSLsの選定 (2) Beike等4品種のsub-CSSLsの選定 (3) Naba等4品種のsub-CSSLsの選定 (4) Muha等2品種のsub-CSSLsの選定 (5) Davao1等2品種のsub-CSSLsの選定								農研機構 次世代作物開発研究センター	稲形質評価ユニット

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
<p>1. デンプン代謝の改変による乳白粒低減高品質イネの開発</p> <p>(1) デンプンおよびリン脂質代謝の改変による乳白粒低減イネの開発</p> <p>(2) アミロース含量のファインチューニングによる良食味イネの開発</p>						中央農業研究センター 新潟大学	作物開発研究領域 農学部
<p>1. アミロペクチン改変により食味を改良したイネの開発</p> <p>(1) アミロペクチン合成に関わる突然変異体の取得</p> <p>(2) 食味特性を制御するアミロペクチン合成に関わる遺伝子の推定</p> <p>(3) アミロペクチン合成に関わる遺伝子の発現と食味特性の関係の確認</p>						福井農試 福井農試 福井農試	ポストコシヒカリ開発部 ポストコシヒカリ開発部 ポストコシヒカリ開発部
<p>1. イネ穂発芽耐性遺伝子の解析とコムギスーパーアリの取得</p> <p>(1) イネ穂発芽耐性遺伝子の単離と解析</p> <p>(2) イネ穂発芽耐性の遺伝子レベルでの理解</p> <p>(3) コムギスーパーアリの取得</p>						農研機構 次世代作物開発研究センター 農研機構 次世代作物開発研究センター 農研機構 次世代作物開発研究センター	育種素材開発ユニット、イネ形質評価ユニット 育種素材開発ユニット、イネ形質評価ユニット 育種素材開発ユニット、イネ形質評価ユニット

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
<p>1. 北東北水稲育種にむけたイネ突然変異系統および遺伝子資源の開発と活用</p> <p>低温発芽性等の育種に寄与する遺伝子同定により育種素材を開発するとともに、突然変異原因遺伝子を同定する新しい手法を開発する。</p> <p>(1) イネにおける低温発芽性遺伝子の同定とその育種利用</p> <p>(2) Advanced MutMap+法の開発</p> <p>(3) 蒙古稲いもち病罹病性QTL同定</p> <p>(4) Nested Associationマッピング法</p>						岩手生物工学研究センター	ゲノム育種研究部
	←				→		
	←				→		
	←	→					
	←	→					

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	
IVG 1001	研究開発責任者	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
	イネ高密度突然変異集団の作出・配列解析及び利用システムの開発	農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ゲノムリソースユニット	○ 長村 吉晃 (H25～H26)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ゲノムリソースユニット	○ アントニオバルタザール (H27)
		三菱スペース・ソフトウェア (株)	つくば事業部	第三技術部 第二グループ	伊川 浩司 (H25～H27)
		三菱スペース・ソフトウェア (株)	つくば事業部	第三技術部 第二グループ	大柳 一 (H25～H26)
		三菱スペース・ソフトウェア (株)	つくば事業部	第三技術部 第二グループ	釜付 香 (H25～H27)
		三菱スペース・ソフトウェア (株)	つくば事業部	第三技術部 第二グループ	新堀 航大 (H25～H27)
		三菱スペース・ソフトウェア (株)	つくば事業部 第三技術部 第二グループ		並木 信和 (H25～H27)
		中央農業総合研究センター	北陸研究センター	作物開発研究領域	山川 博幹 (H25～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	杉本 和彦 (H25～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	ゲノムリソースユニット	アントニオバルタザール (H25～H26)
農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ゲノムリソースユニット	佐藤 豊 (H25～H27)		
IVG 1002	イネ突然変異スクリーニング系の構築	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 (H25～H29)

IVG 1003	ムギ類変異集団の作出 と利用	三菱スペース・ソフトウェア (株)	つくば事業部	第三技術部 第一グループ	伊川 浩司 (H28~H29)
		三菱スペース・ソフトウェア (株)	つくば事業部	第三技術部 第一グループ	釜付 香 (H28)
		三菱スペース・ソフトウェア (株)	つくば事業部	第三技術部 第一グループ	竹下 紗由美 (H29)
		三菱スペース・ソフトウェア (株)	つくば事業部	第三技術部 第二グループ	新堀 航大 (H28~H29)
		三菱スペース・ソフトウェア (株)	つくば事業部 第三技術部第 一グループ		並木 信和 (H28)
		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)
		農業生物資源 研究所	農業生物先端 ゲノム研究セ ンター	ゲノムリソー スユニット	アントニオ バル タザール (H27)
		農研機構 次 世代作物開発 研究センター	企画管理部	企画連携室・ ゲノム育種推 進室(併任)	宮尾 安藝雄 (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	フィールドオ ミクスユニッ ト	佐藤 豊 (H28~H29)
		農研機構 次 世代作物開発 研究センター	放射線育種場		西村 宜之 (H26~H28)
		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	高橋 章 (H25~H29)
		農業生物資源 研究所	農業生物先端 ゲノム研究セ ンター	作物ゲノム研 究ユニット	○ 半田 裕一 (H25~H27)
		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	○ 大野 陽子 (H28~H29)
九州沖縄農業 研究センター	水田作研究領 域	小麦・大麦育 種グループ	西尾 善太 (H27)		

IVG 1004	ソルガム突然変異集団 の作出とスクリーニン グ系の構築	三重大学	大学院生物資 源学研究科	分子遺伝育種 学研究室	掛田 克行 (H28~H29)
		北海道立総合 研究機構北見 農業試験場	研究部	生産環境グル ープ	山名 利一 (H25)
		北海道立総合 研究機構北見 農業試験場	研究部	生産環境グル ープ	池田 幸子 (H26~H29)
		北海道立総合 研究機構北見 農業試験場	研究部	麦類グループ	粕谷 雅志 (H25~H29)
		北海道立総合 研究機構北見 農業試験場	研究部	麦類グループ	神野 裕信 (H25~H29)
		農業生物資源 研究所	農業生物先端 ゲノム研究セ ンター	作物ゲノム研 究ユニット	大野 陽子 (H25~H27)
		農研機構 九 州沖縄農業研 究センター	水田作研究領 域	小麦・大麦育 種グループ	松中 仁 (H27~H29)
		農研機構 九 州沖縄農業研 究センター	水田作研究領 域	小麦・大麦育 種グループ	中村 和弘 (H27~H29)
		農研機構 次 世代作物開発 研究センター	基盤研究領域	遺伝子機能解 析ユニット	小松田 隆夫 (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	育種法開発ユ ニット	小林 史典 (H25~H29)
		農研機構 次 世代作物開発 研究センター	麦研究領域	小麦・大麦育 種ユニット	藤田 雅也 (H27~H29)
		農研機構 次 世代作物開発 研究センター	麦研究領域	麦類形質評価 ユニット	蝶野 真喜子 (H25~H29)
		名古屋大学	生物機能開発 利用研究セン ター	植物分子育種 分野	○ 佐塚 隆志 (H25~H26)
		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	米丸 淳一 (H25~H26)

IVG 1005	ダイズの変異リソースの作出とスクリーニングシステムの開発	名古屋大学	生物機能開発利用研究センター	有用農業形質保存分野	北野 英己 (H25~H26)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ダイズゲノム育種研究ユニット	○ 加賀 秋人 (H25~H27)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	基盤研究領域		○ 石本 政男 (H28~H29)
		佐賀県農業試験研究センター	作物部		森 敬亮 (H26)
		佐賀県農業試験研究センター	作物部	作物育種研究担当	三原 実 (H26~H29)
		佐賀県農業試験研究センター	作物部	作物育種研究担当	松本 和大 (H26~H27)
		佐賀県農業試験研究センター	作物部	作物育種研究担当	池上 紀子 (H27~H29)
		佐賀県農業試験研究センター	作物部	作物育種研究担当	條島 真紀子 (H28~H29)
		佐賀大学	農学部応用生物科学科	植物育種学分野	穴井 豊昭 (H25~H29)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ダイズゲノム育種研究ユニット	石本 政男 (H25~H27)
IVG 2001	自然変異アレルと表現型情報の連関データベースの開発	農業生物資源研究所	放射線育種場兼技術支援室		武弓 利雄 (H26)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	畑作物研究領域	畑作物形質評価ユニット	福田 篤徳 (H28~H29)
		農研機構 高度解析センター	ゲノム情報大規模解析チーム		○ 伊藤 剛 (H25~H29)
		農研機構 高度解析センター	ゲノム情報大規模解析チーム		沼 寿隆 (H25~H28)

IVG 2002	正逆遺伝学的手法を用いた自然変異アリの機能アノテーション	農研機構 高度解析センター	ゲノム情報大規模解析チーム		坂井 寛章 (H25～H28)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	基盤研究領域	育種法開発ユニット	米丸 淳一 (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	情報解析ユニット	田中 剛 (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	情報解析ユニット	川原 善浩 (H27～H29)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	基盤研究領域	育種法開発ユニット	○ 米丸 淳一 (H25～H29)
		農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター		矢野 昌裕 (H25)
		農研機構 高度解析センター	ゲノム情報大規模解析チーム		坂井 寛章 (H25～H28)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	ゲノム育種推進室		呉 健忠 (H25～H29)
IVG 2003	実験系統群を用いたフェノーム解析と連鎖遺伝子の同定	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	堀 清純 (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 (H25～H29)
		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	○ 山本 敏央 (H28～H29)
		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	杉本 和彦 (H25～H26)
		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	田口 文緒 (H25)

IVG 3001	デンプン代謝の改変による乳白粒低減高品質イネの開発	農業生物資源研究所	農業生物先端ゲノム研究センター	ゲノムリソースユニット	アントニオ バルタザール (H27)
		農研機構 中央農業研究センター 新潟大学	作物開発研究領域 農学部	育種素材開発・評価グループ	○ 山川 博幹 (H25~H29) 西村 実 (H25~H29)
IVG 3002	アミロペクチン改変により食味を改良したイネの開発	農研機構 中央農業研究センター	作物開発研究領域	育種素材開発・評価グループ	山口 武志 (H25~H29)
		福井県農業試験場	ポストコシヒカリ開発部		○ 小林 麻子 (H25~H29)
		福井県農業試験場	ポストコシヒカリ開発部		富田 桂 (H25~H29)
		福井県農業試験場	ポストコシヒカリ開発部		林 猛 (H25~H27)
		福井県農業試験場	ポストコシヒカリ開発部		町田 芳恵 (H25~H29)
IVG 3003	イネ穂発芽耐性遺伝子の解析とコムギスーパーアリの取得	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 (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	山内 歌子 (H25~H29)
		農研機構 次世代作物開発研究センター	放射線育種場		西村 宜之 (H26~H28)
IVG 3004	完全閉花性コムギの作出	三重大学	大学院生物資源学研究所	分子遺伝育種学研究室	○ 掛田 克行 (H25~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	作物ゲノム研究ユニット	小松田 隆夫 (H25~H27)
IVG 3005	イネ出穂・登熟関連遺伝子スーパーアリの作成と育種学的利用	農業生物資源研究所	植物科学研究領域	植物生産生理機能研究ユニット	○ 伊藤 博紀 (H25~H26)
		作物研究所	稲研究領域	稲育種研究分野	石井 卓朗 (H25~H26)

IVG 3006	ダイズ開花・登熟関連 遺伝子スーパーアレル の作成と育種的利用	農業生物資源 研究所	植物科学研究 領域	植物生産生理 機能研究ユニ ット	井澤 毅 (H25～H26)
		農業生物資源 研究所	農業生物先端 ゲノム研究セ ンター	ダイズゲノム 育種研究ユニ ット	○ 石本 政男 (H25～H27)
		作物研究所	畑作物研究領 域		南條 洋平 (H25～H26)
		作物研究所	畑作物研究領 域		西澤 けいと (H25～H27)
		作物研究所	畑作物研究領 域		山田 哲也 (H25～H27)
		作物研究所	畑作物研究領 域	大豆育種研究 分野	羽鹿 牧太 (H25)
		作物研究所	畑作物研究領 域	大豆育種研究 分野	菱沼 亜衣 (H26～H27)
		作物研究所	畑作物研究領 域	大豆育種研究 分野	高橋 浩司 (H27)
		中央農業総合 研究センター	水田利用研究 領域		中山 則和 (H25～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	ダイズゲノム 育種研究ユニ ット	田口 文緒 (H26～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	ダイズゲノム 育種研究ユニ ット	加賀 秋人 (H25～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	ダイズゲノム 育種研究ユニ ット	佐山 貴司 (H25～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	ダイズゲノム 育種研究ユニ ット	小木曾 映里 (H27)
IVG 3007	北東北水稲育種にむけ たイネ突然変異系統お よび遺伝子資源の開発 と活用	(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)
		(公財) 岩手 生物工学研究 センター	ゲノム育種研 究部		高木 宏樹 (H25～H27)

(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	13405960	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	遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発		
代表機関・研究開発責任者名	農業・食品産業総合研究機構・杉本和彦		

### I-1. 研究目的

我が国の農産物の競争力を高めるためには、多様な環境下における栽培に適した品種、栽培環境の多様性を生かした地域の経営戦略に答える品種の開発が必須である。また、近年の分子遺伝学やゲノム研究により農業上重要な遺伝子の単離が進んでいる。

このため、本研究では、

1. イネ高密度突然変異集団の作出・配列解析及び利用システムの開発
2. イネ突然変異スクリーニング系の構築
3. ムギ類突然変異集団の作出と利用
4. ソルガム突然変異集団の作出とスクリーニング系の構築
5. ダイズの変異リソースの作出とスクリーニングシステムの開発
6. 自然変異アレルと表現型情報の連関データベースの開発
7. 正逆遺伝学的手法を用いた自然変異アレルの機能アノテーション
8. 実験系統群を用いたフェノーム解析と連鎖遺伝子の同定
9. 澱粉代謝の改変による乳白粒低減高品質イネの開発
10. アミロペクチン改変により食味を改良したイネの開発
11. イネ穂発芽耐性遺伝子の解析とコムギスーパーアレルの取得
12. 完全閉花性コムギの作出
13. イネ出穂・登熟関連遺伝子スーパーアレルの作成と育種学的利用
14. ダイズ開花・登熟関連遺伝子スーパーアレルの作成と育種学的利用
15. 北東北水稲育種にむけたイネ突然変異系統および遺伝子資源の開発と活用

により、変異体ライブラリーから目的遺伝子の変異体を選抜、提供し、遺伝資源の利活用をすすめるためのゲノム配列などの情報処理、実験系統の作成をすすめた。さらに、これら実験、情報リソースを用いてイネ、ムギ、ダイズにおいて、短稈、開花期、高温登熟性、食味、耐冷性、穂発芽耐性など重要な形質が向上した育種素材を開発した。これら育種素材は育種家の手にゆだねられることで、品種育成に資するものである。

その結果、

1. 実験リソースと情報リソースが得られ、品種育成の原動力となる遺伝資源の利活用を容易にしたことにより、作物の開発の加速化が期待される。

## I-2. 研究結果

1系課題では突然変異体ライブラリーの構築に取り組み、イネでは日本で最大の栽培面積を誇るコシヒカリ、超多収品種である北陸193号、タカナリ、酒米として人気の高い山田錦、合計1万6千系統の変異体ライブラリーを構築した（IVG1001及びIVG1002）。コムギでは「きたほなみ」など1万系統からなる突然変異ライブラリー、野生オオムギに由来する変異体集団8,700を作成した。ダイズではやはり主要品種であるエンレイおよびフクユタカの1万系統のライブラリーを構築した（IVG1005）。これら変異体ライブラリーは重篤な変異から軽微な変異まで、さまざまなバリエーションを提供することが可能となり、適度な変異をもつ系統が得られることが期待される。本課題の期間中にイネでは990系統、コムギでは220系統、ダイズでは418系統の変異体をコンソ内外に提供し、育種素材開発に貢献した。

2系課題ではRAP-DBの1200件以上の遺伝子情報を更新、333個のゲノムギャップ解消、百万塩基対の配列追加、44000件以上の遺伝子の発現情報を関連付けするなど、イネの基幹ゲノム情報データベースであるRAP-DBの高度化を進めた（IVG2001）。海外の主要なデータベースの更新が途絶えた中、本課題がイネのゲノム情報の中核的な役割を果たしており、イネの遺伝子研究、品種育成へ大きく貢献した。また、自然変異のゲノム情報の活用をすすめるために、様々な品種、43系統の多型情報を提供するアレルマイニングツールを開発した。遺伝資源はそのままでは形態、栽培特性、品質などが大きく日本品種とは異なることから、品種育成への利用の際に大きな負担となっていたが、本課題ではほとんどの領域が90%以上がコシヒカリで有りながら、18の供与親のゲノム断片の一部を持つ染色体断片置換系統群を整備した。遺伝資源を直接品種を親として利用した場合、その後代は日本品種とはかけ離れたものとなるが、前もって、日本の代表品種であるコシヒカリに背景をそろえることで、遺伝子の検出感度やノイズとなる劣悪形質を排除することを可能にする実験リソースが完成した。これら集団を用いることで、遺伝資源が持つ有用な遺伝子を利用する事が容易になった。さらに、これまで、利用の進んでいなかった、インド稲の遺伝子の利用促進が期待される。

3系課題では高温登熟性、食味、穂発芽耐性、開花期耐冷性、耐病性などを改良した57の育種素材を開発した。

## I-3. 今後の課題

本課題では、様々な実験リソース、情報リソースとこれらを用いた育種素材を開発した。今後、これらの成果の利用促進が課題となる。突然変異体ライブラリーや染色体断片置換系統群などの実験リソースに関しては、速やかに論文を公表す、学会やシンポジウムでの発表などにより、利用者への周知に取り組む必要がある。また、実験リソースを維持管理するために、受託機関を中心とした、保存体制、配布体制の構築が必要である。変異体に関しては選抜の技術の継承、維持が必須であるが、例えば、オープンラボを設置するなどにより、その利用促進を図ること等が考えられる。情報リソースの構築も、速やかに論文を公表、利用者への周知とデータベース等の公開が必要である。

これらリソースを利用して作成した育種素材群に関しては、論文公表、周知とともに、育種家への移転をすすめ、育種母本としての利用をすすめる必要がある。特に、特定の形質を改良する、ピンポイント改良には最適の素材であることから、従来品種の問題点を改良した品種育成が簡便に行える。そのため、ここで整備した高温登熟性、食味、穂発芽耐性、開花期耐冷性、耐病性などを改良した57の育種素材による改良が見込まれる品種の把握や改良の提案に積極的に取り組む必要である。

## 「遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13405960

研究期間：平成25～29年度

中課題名：遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発(IVG)

小課題番号：IVG1002(平成28年度にIVG1001(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：イネ突然変異スクリーニング系の構築(平成28年度にイネ高密度突然変異集団の作出・配列解析及び利用システムの開発(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：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

### 1) 研究目的

近年の植物科学の進展により生命現象の遺伝子レベルでの理解が深まりつつある。さらに、イネの量的形質遺伝子の単離により農業形質の制御機構にも分子レベルでの理解が進み始めている。農業形質を理解するためには圃場での栽培が可能な突然変異による機能解析が有効である。また、遺伝子レベルでの理解を元に突然変異を誘導し、有用な変異を取得する、次世代型の突然変異育種にも利用することが出来る。

そこで、本課題では遺伝子の単離機能解析と有用なアリルを創出するために変異体ライブラリーの構築と標的遺伝子に変異を持つ系統の取得と3系課題や次世代ゲノム基盤の課題に変異体を提供することを目的とする。

### 2) 研究成果

#### (1) 突然変異ライブラリーの構築

IVG1002ではIVG1001で構築したコシヒカリMNU変異体集団以外に、変異スペクトラムの異なる変異原処理を施し、ライブラリーを拡大したほか、コシヒカリ以外の品種の変異体集団の育成に取り組んだ。コシヒカリに対して、EMS(エチルメタンサルフォン酸)処理を施したM2世代1,536、ENU(エチルニトロソウレア)768、Az(アジ化ナトリウム)768、DEBを二回処理した3,072、さらに、Az処理後さらにEMSで処理した1,536の合計7,680の採種、DNA調製を行い、ライブラリー化した。IVG1001で構築したライブラリーと合わせて、10,752のライブラリーとなった。さらに、超多収品種であるタカナリのEMSライブラリー1,536、やはり超多収系統である北陸193号のEMSライブラリー1,536、酒米品種である山田錦のEMSライブラリー1,536を構築した。これら変異体集団のDNAを用いて(2)で構築した変異体選抜系を用いて、(3)の通り、変異体の選抜と種子の提供を行った。MNU処理、Az処理、ENU処理、DEB二回処理の変異体ライブラリーの変異密度、変異のスペクトラムを(3)で取り組んだ7遺伝子の結果を集計した。その結果、MNU処理集団の密度が246-kbに一つと、最も高かった。次いで、Az処理で402-kbに一つと変異密度が高く、ENU処理で550-kb、DEB二回処理が2,065-kbと続いた。なお、今回の密度に関してはアンプリコンサイズ(増幅するPCR産物の長さ)を基に算出しているが、およそ、両端の1割は変異が存在してもTILLING法による補足が出来ないことから、2割程度過小評価しており、文献値と同様の値を示している。MNU集団は受精卵法により作成されているため、M1世代のDNAを用いており、変異密度が高

く維持されるが、DEBx2、Az、ENUともに種子法による変異誘導であるため、M2世代のDNAを解析している。前者はキメラになる場合は後代の種子の中の変異体の割合が低下するが、後者は1世代を経ているため、基本的には変異がメンデル遺伝するメリットがある。

変異の種類に関してはアジ化ナトリウム処理とMNU処理がGからAあるいはCからTのトランジション変異が、DEB処理とENU処理はTからAあるいはAからTのトランスバージョン変異の割合が高かった。挿入、欠失変異はDEB処理で最も高く、これら変異はフレームシフトを起こすことから、頻度は低いながら、影響は大きくなる。DEB処理の変異密度はMNUのおよそ1/10であるが、比較的exonに変異が入りやすく (In/Total)、さらに、この7遺伝子で見ると100%非同義置換 (NS/(NS+S)) となるなどのメリットがある。

### (2) 変異体スクリーニング系の構築

IVG1002では変異体選抜のために高感度溶解曲線法 (HRM法) とミスマッチを特異的に切断するセロリ由来のCel-I処理によるTILLING法の2つの系の構築に取り組んだ。HRM法に関しては、様々なポリメラーゼを比較した結果、コストが低く、増幅率の高いGoTaqポリメラーゼを使用した。解離曲線を取得するためにBioRad社のリアルタイムPCR装置を使用し、インターカレーターとしてはSYTO9を使用した。また、TILLING法はGelRedによるプレステイン後にアガロース電気泳動を行い、冷却CCDカメラを用いて検出を行った。HRM法はイントロン-エキソン構造が複雑な遺伝子の選抜に用い、エキソンが長い、あるいは、単一の遺伝子の選抜はTILLING法により行った。HRMのアンプリコンサイズは小さいほど検出感度が高いため、最大で200-bp程度とした。TILLING法では1~1.6-kb程度とした。

### (3) 標的遺伝子変異体の提供

IVG1001やIVG1002で構築した変異体ライブラリーを用いて、プロジェクト期間中 (平成25年から平成29年12月11日まで) に選抜した遺伝子の総数は表1の通りである。85の遺伝子を標的とし、総選抜数は32万件の選抜を行った。その結果、1,882の変異を見出し、内922件の非同義置換、32件のスプライシングジャンクション変異、28件のナンセンス変異、8件のフレームシフト変異が見出され、990系統の種子を課題内外に提供した。

表1では選抜したアンプリコンサイズが記載されていないが、遺伝子が大きいものは重篤な変異が得られており、ほぼ、飽和変異誘導は達成出来ていると考えられる。この課題で得られた変異体からさまざまな素材が創り出されている。

遺伝子	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
選抜数合計	3,072	768	1,536	1,536	3,072	1,536	3,072	2,304	1,536	2,304	4,608	2,304	3,840	4,608	6,144	4,608	6,144	4,608	3,840	3,072	3,072	2,304	3,072	768	768	3,840	2,304	3,072	3,072	3,072	
変異合計	11	5	5	8	11	3	13	17	17	3	18	7	13	22	17	12	29	13	33	36	26	11	54	5	20	11	6	5	53	24	
同義置換	2	1	0	1	7	0	8	7	7	1	8	2	0	2	2	7	0	14	8	4	1	2	0	4	0	1	1	14	0		
非同義置換	3	3	5	1	3	3	4	9	8	2	9	3	5	16	15	8	24	12	11	18	16	6	31	4	14	9	4	1	19	5	
非コード領域	5	1	0	6	0	0	0	0	2	0	1	0	7	3	0	2	4	0	7	8	5	3	21	1	2	2	1	3	25	19	
スプライシング変異	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
ナンセンス変異	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
フレームシフト	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
遺伝子	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
選抜数合計	3,072	2,304	2,304	4,608	2,304	1,536	1,536	3,072	1,536	3,072	1,536	2,304	4,608	1,536	2,403	4,608	1,536	1,536	768	3,072	2,304	3,072	768	3,072	1,536	1,536	2,304	4,608	3,072	4,608	
変異合計	18	10	14	18	11	28	12	25	6	9	5	36	37	2	6	15	26	17	14	32	8	56	5	40	9	9	25	51	20	15	
同義置換	3	1	8	7	0	9	7	6	0	3	1	12	8	1	0	2	8	9	5	7	1	13	0	12	3	2	3	18	2	4	
非同義置換	9	7	6	9	9	17	2	8	4	6	1	9	13	1	4	9	17	8	6	14	5	30	0	12	6	4	11	18	16	10	
非コード領域	6	0	0	2	2	3	10	0	0	3	15	14	0	2	3	1	0	3	11	1	11	5	14	0	0	11	11	6	13		
スプライシング変異	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	1	2	1	
ナンセンス変異	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	3	0	0	
フレームシフト	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
遺伝子	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	合計					
選抜数合計	9,216	9,216	3,072	7,680	7,680	7,680	7,680	3,072	4,608	7,680	4,608	4,608	4,608	8,448	4,608	4,608	4,608	4,608	8,448	8,448	4,608	4,608	4,608	8,448	8,448	321,891					
変異合計	44	32	32	47	59	32	41	11	19	27	24	21	29	39	34	43	15	11	35	18	12	14	40	53	63	1882					
同義置換	16	6	15	9	23	13	10	1	4	13	4	2	5	0	4	0	3	5	10	6	2	0	0	10	16	438					
非同義置換	27	24	17	24	34	19	29	10	15	12	5	19	15	0	10	0	7	5	22	8	10	5	0	40	23	922					
非コード領域	4	11	0	22	5	16	11	2	5	4	15	0	7	39	18	43	5	1	3	4	0	7	40	3	23	565					
スプライシング変異	1	2	0	1	1	0	1	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	32					
ナンセンス変異	1	0	0	0	1	1	0	2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28					
フレームシフト	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8					

表1：プロジェクト開始から平成29年12月11日までに選抜した変異体の総数  
85の遺伝子を標的とし、32万の選抜を行った。その結果、1,882の変異を見出し、内922件の非同義置換、32件のスプライシングジャンクション変異、28件のナンセンス変異、8件のフレームシフト変異が見出され、990系統の種子を課題内外に提供した。

#### (4) コシヒカリ高密度変異体の作出と評価

IVG1001では受精卵法によりコシヒカリをMNU処理し、4,000のM<sub>1</sub>個体を栽培し、念実が認められた3,500個体から採種と葉からのDNA抽出を行った。これらの中から、411個体に関しては次世代シーケンサーによる解析を行い、変異を抽出し(5)のコシヒカリ変異体データベースに収容した。変異の抽出には1変異体(1ゲノムDNA当たり)2ライブラリーを構築し、10ゲノムサイズのNGS解析、日本晴ゲノムへのマッピングにより、変異を抽出した。NGS解析では不可避のエラー頻度が、変異の頻度を上回ることから、2ライブラリーに共通して見出される結果を比較し、両ライブラリーに共通して見出された変異のみを抽出した。さらに、本課題で利用したコシヒカリと完全解読されている日本晴の間の多型を排除するために、100個体のデータを集約し、変異頻度が平衡化する2%を下回った変異のみをMNU処理により誘導された変異としてフィルタリングした。この手法によって見出された変異に関して、制限酵素処理により変異を特定するCAPSマーカーを用いて検証した結果、PCRにより増幅された154箇所の制限酵素処理により、145箇所で切断、すなわち、突然変異が確認された。その確率は、実に97%に達した。一部PCR産物の配列をサンガー法により確認し、変異が存在することを改めて確認出来た。以上の手法により抽出した変異は下記の(5)の変異体データベースに収容し、Web上で変異体を選抜する事が可能になった。

#### (5) コシヒカリ変異体データベース作成と利用システムの開発

IVG1001では、コシヒカリ高密度変異体集団で見出された変異を容易に検索できるシステム、RiceMMDBを開発した。RiceMMDBではRA-IDによる検索、ゲノム領域による検索機能を付与したほか、検索して見出された変異によるインパクトをイネゲノム参照配列IRGSP1のA

ノテーションを元に、SnEffのルールに基づき評価し、表示することが出来る。

本データベースに掲載された変異は（４）の通り、極めて高い精度で変異を抽出しているが、M1世代の葉のDNAを元に抽出されたもので有ることから、次代への遺伝を確認する必要がある。そこで、IVG1002では、RiceMMDBに掲載された変異の中から、合計63遺伝子に関して、後代の種子16粒を播種し、発芽、生長した個体からDNAを抽出し、HRM法により、変異を検出した結果、49系統で後代への遺伝が確認出来た。なお、変異系統の発芽率が7割程度と低く、補足率は過小評価されているものと考えられた。

### 3) 成果活用における留意点

本課題では1万を超えるコシヒカリ変異体のほか、超多収品種のタカナリ、北陸193号、酒米の山田錦のライブラリーの構築を行った。また、コシヒカリRiceMMDBでは411個体のMNUに誘導された変異をデータベース化した。これら実験リソースは利用されることにより波及効果が得られることから、プロジェクト後も維持することが必要である。

### 4) 今後の課題

RiceMMDBに収容された情報を活用するためには、変異系統の維持や管理が必要である。M2種子は数に限りがあるため、M2世代を系統栽培し、M3世代の種子を採種、保存することで、RiceMMDBの利用の拡大につとめる必要がある。

「遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発」  
最終年度報告書

中課題番号：13405960

研究期間：平成25～29年度

中課題名：遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発(IVG)

小課題番号：IVG1003(平成28年度にIVG3004(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：ムギ類変異集団の作出と利用(平成28年度に完全閉花性コムギの作出(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：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・大野陽子

### 1) 研究目的

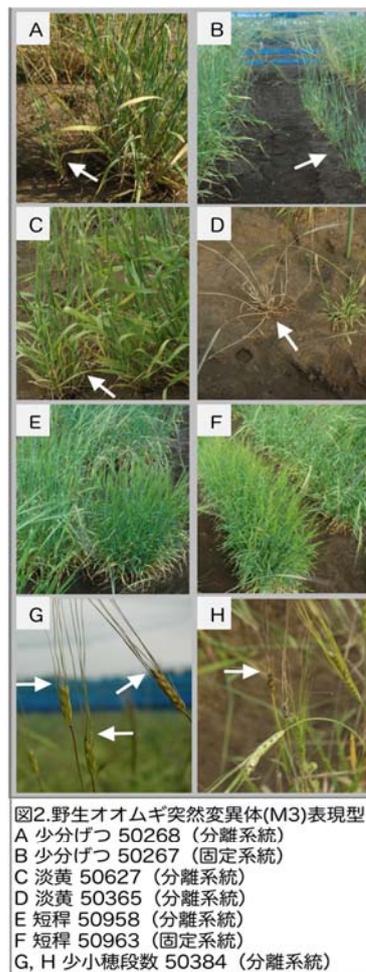
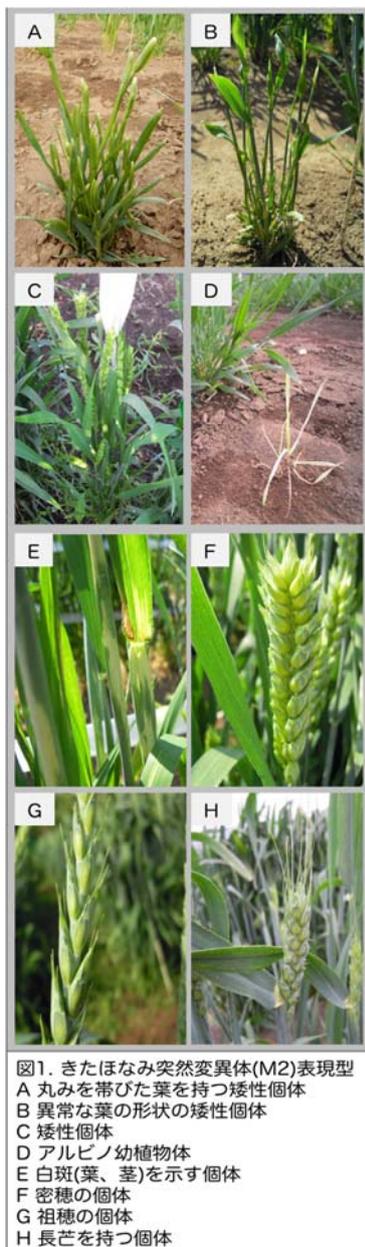
本研究課題では、ムギ類の有用形質遺伝子の単離や解析に有効な基盤として、任意の遺伝子の破壊系統が得られる突然変異系統群の作出と、変異体のハイスループットな検出手法の確立を図ることを第一の目的としている。系統群の作出と検出手法を確立した後は、マーカー遺伝子に関する変異系統や、ムギ類の作期や生産量に影響する出穂性関連遺伝子、穂発芽に影響する種子発芽関連遺伝子、雪腐病耐性等に関わる変異体を検出して、その有効性を実証するとともに、得られた変異体については必要に応じて育種素材として提供していく。

### 2) 研究成果

#### 1. 突然変異系統の作出と検出法の確立

1) 北海道基幹コムギ品種の「きたほなみ」突然変異集団 ( $\gamma$ 線：2,542系統、EMS：2,186系統、重イオンビーム：2,258系統)と暖地向け基幹品種「シロガネコムギ」突然変異集団 (EMS：533系統、重イオンビーム：2,471系統)の全DNAパネル化を完了させ、総計9,990系統突然変異系統集団(M2)を完成させた(表1)。M<sub>2</sub>植物体において各集団の7%程度で明確な表現型が葉や茎等で観察できた(図1)ことから、突然変異体集団としての有効性が確認できた。これは国内外最大規模のコムギ突然変異集団であり、国内向け育種素材リソースとして、今後の活用が期待される。これら各集団のM<sub>3</sub>種子は全て系統別に保存しているため、需要に応じて供給することが可能である。

	品種	処理		M 2	
				作出年度	系統数
コムギ	きたほなみ	$\gamma$ 線	250 Gy	2013	2,542
		EMS	0.5, 0.7, 0.75%	2014, 2015	2,186
		重イオンビーム	50 Gy	2013	2,258
	シロガネコムギ	EMS	0.55%	2017	533
		重イオンビーム	50, 75 Gy	2015, 2016	2,471



2) 作出した野生オオムギ系統の「OUH602」突然変異集団 (γ線: 7,584系統)のうち、1,080系統の形質調査を実施した結果、複数のM2系統で明瞭な変異表現型が観察された(図2)。小分げつ形質の変異系統は、変異集団の中でもっとも多く得られ、野生型では概ね40-50本の分げつが生ずるところ変異系統は2-6本しか生じなかった(図2A, 2B)。また淡黄色の葉の変異系統(図2C, 2D)、野生型の全長1/2程度の短稈変異系統(図2E, 2F)、粒数が変わらずに穂軸長のみが野生型の3/4程度に短縮する全穂が密穂の変異系統などが選抜できた。この短稈変異には100本前後の多分げつが伴う興味深い形質も併せて認められた。通常の穂の先端部に見られる小穂の退化と類似した、ユニークな変異系統も新たに観察された(図2Gと2H)。この少小穂段数変異系統は、穂の下から1/4ないし1/3の小穂段のみ発達し、穂の上部が完全に退化していた。小分げつ形質の変異系統(図2B)や短稈変異系統(図2F)の固定化M<sub>3</sub>系統で明瞭な表現型が観察されたため、それらの形質がM<sub>3</sub>世代へ遺伝する事を確認した。これは国内外最大規模のオオムギ突然変異集団であり、コムギ突然変異集団と併せて、今後の活用が期待される。

## 2. きたほなみ有用形質変異系統の検出と育種素材化

きたほなみ突然変異系統集団から新規育種素材候補の系統を継続的に選抜しており、系統により進捗状況は異なるが、後代形質の確認、農業特性・品質特性の評価、同祖変異体集積等を行い、有用形質変異系統を育種素材として迅速に活用をするという一貫した目標のもと実施している。そして、順遺伝子学的手法だけでなく、逆遺伝学的手法(PCR法でのnu11変異系統、TILLING法での点変異系統)でターゲット遺伝子の変異系統(1プライマーあたりそれぞれの方法で平均2個、10個程度)を検出してきた。以下は、着目している主な突然変異系統である。

1) 雪腐病抵抗性母材(雪腐病発病程度が低い)として $\gamma$ 線変異体2系統(図3)、EMS変異体37系統を選抜した。

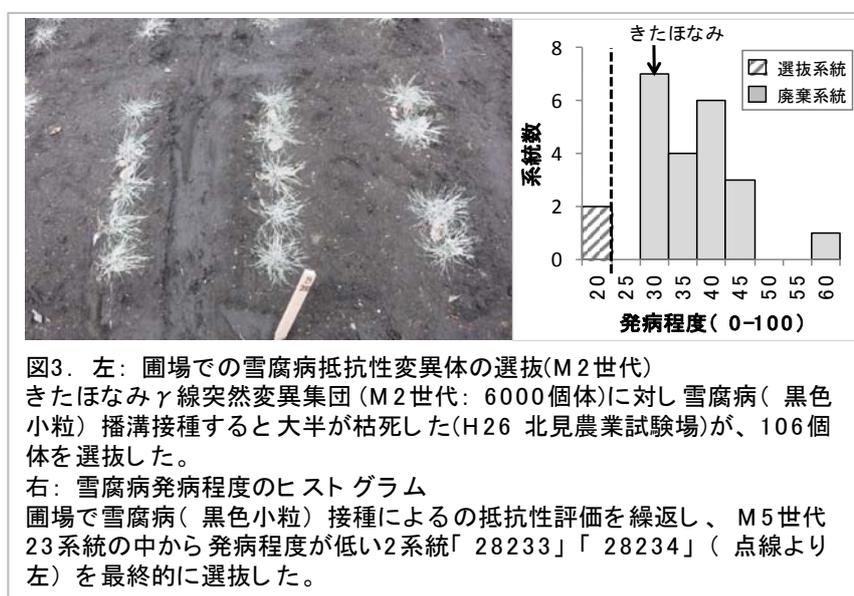


図3. 左: 圃場での雪腐病抵抗性変異体の選抜(M2世代)  
きたほなみ $\gamma$ 線突然変異集団(M2世代: 6000個体)に対し雪腐病(黒色小粒)播溝接種すると大半が枯死した(H26 北見農業試験場)が、106個体を選抜した。  
右: 雪腐病発病程度のヒストグラム  
圃場で雪腐病(黒色小粒)接種によるの抵抗性評価を繰返し、M5世代23系統の中から発病程度が低い2系統「28233」「28234」(点線より左)を最終的に選抜した。

先行して解析を進めている $\gamma$ 線変異体2系統「28233」「28234」について、黒色小粒菌核雪腐病及び、その他の雪腐病の発病程度に基づいた雪腐病検定の結果を表2に示す。雪腐病は菌により病気が複数あり、地域(気象)によって発病する雪腐病は異なる。北見地域でもっとも被害が多い黒色小粒菌核雪腐病に特に着目しているが、比較のためその他の雪腐病についての調査も実施した。検定した年度の地域気象条件は年によってばらつき、H29冬は積雪期間が長い・越冬前積算気温が低かったことから、コムギ(H28播種)の雪腐病発病は激発したが、H28冬は気象が平年並であり、コムギ(H27播種)の雪腐病は少発であった。黒色小粒菌核雪腐病は、「きたほなみ」と比べて「28233」「28234」は昨年はやや優れていたが本年度はやや劣っており、2ヶ年の発病状況が異なり、検定結果が異なるため(表2, 黒い太枠)、継続した評価が必要であると判断した。その他雪腐病と耐寒性の「28233」「28234」の抵抗性は、概ね「きたほなみ」並であった。

また今年度は、再調査を実施していた他の $\gamma$ 線突然変異体19系統とEMS変異体37系統の雪腐病抵抗性も検定し、「きたほなみ」より発病程度の低い7系統( $\gamma$ 線2系統、EMS5系統)を選抜した。

表2. 黒色小粒菌核雪腐病及び、その他の雪腐病の発病程度に基づく雪腐病検定(H26, H27, H28播種)、並びに耐寒性検定の結果

	黒色小粒菌核雪腐病 (北見)		褐色小粒菌核雪腐病 (上川)				紅色小粒菌核雪腐病 (北見)		大粒菌核病 (北見)		褐色雪腐病 (滝川)		耐寒性検定 (北見)				
	H28播種		H27播種		H28播種		H27播種		H28播種		H28播種		-18, -19°C平均値				
	発病程度 平均(n=3)	判定	発病程度 平均(n=3)	判定	発病程度 平均(n=3)	判定	発病程度 平均(n=2)	判定	発病程度 平均(n=3)	判定	発病程度 平均(n=3)	判定	被害程度	枯死率	判定		
きたほなみ	68 bcd	やや強	34		79 d	やや強	31	56	38	やや強	45	中	62	中	86	47	中
28233	74 bcde	やや強	23		79 d	やや強	28	38	51	中	40	中	74	やや弱	87	59	中
28234	89 de	中	23		73 cd	やや強	28	38	40	中	36	やや強	64	中	84	59	中
基準 品種	Münstertal	27 a	極強		38 a	極強			9	極強	36	やや強	27	強	74	41	やや強
	P.I.173438	60 bc	やや強	24	48 ab	極強	19	50	21	強	81	弱	28	強	94	80	やや弱
	北系1791	51 ab	強		58 bc	強											
	ホロシリコムギ	80 cde	中		88 de	中			41	中	57	中	69	やや弱	88	61	中
	チホクコムギ	97 e	やや弱	67	96 e	やや弱	63	56	46	中	61	やや弱	85	弱			
CV (%)	16.9			5.2				24.8		22.3		14.5		15			
LSD (5%)	20.1			6.7				19.2		16.6		17.2		16.5			
LSD (1%)	26.7			8.9				25.6		22.1		0.6		21.9			

背景がドットは、「きたほなみ」より変異体の発病程度が低いことを示している。  
 < 黒色小粒 > 判定基準: 極強<35, 35<強<55(55以上でも枯死率が30%以下は強), 55<やや強<75, 75<中<95, 95<やや弱, 注)CV, LSDは特性検定に供試した53品種系統にて計算した。発病程度の後者のアルファベットは上記8品種系統におけるHSD検定の結果  
 < 褐色小粒 > 判定基準: 極強<55, 55<強<70, 70<やや強<85, 85<中<95, 95<やや弱, 注)CV, LSDは特性検定に供試した37品種系統にて計算した。発病程度の後者のアルファベットは上記8品種系統におけるHSD検定の結果  
 < 紅色小粒 > 判定基準: 極強<10, 10<強<22, 22<やや強<40, 40<中<55, 55<やや弱, 注)CV, LSDは特性検定に供試した53品種系統にて計算した。  
 < 大粒 > 判定基準: 強<20, 20<やや強<40, 40<中<60, 60<やや弱<80, 80<弱, 注)CV, LSDは特性検定に供試した29品種系統にて計算した。  
 < 褐色雪腐 > 判定基準: 強<35, 35<やや強<50, 50<中<65, 65<やや弱<80, 80<弱, 注)CV, LSDは特性検定に供試した135品種系統にて計算した。

表3に「28233」「28234」の農業特性および品質特性評価の結果を示す。選抜した2つのγ線突然変異系統(H28播種)のうち、「28234」は「きたほなみ」と概ね同等の農業特性(子実重、品質特性)を示したことから、有望な雪腐病抵抗性育種素材の候補としている。

表3. 小規模生産力検定試験結果 (H28播種)

品種名 および 系統名	世代	訓交番号	子実重 (kg/10a)	標準 対比 (%)	千粒重 (g)	容積重 (g/L)	外観 品質	原粒 蛋白 (%)	系統養成生産物(H28産) の品質成績							注) 強靭性は1(強) - (弱)の5段階評価。
									製粉 歩留 (%)	製粉 効率 (%)	粉蛋白 (%)	アミロ 含量 (%)	粉色 (日本電色ZE-6000)			
													明度 L*	赤みの 程度 a*	黄色みの 程度 b*	
28233	M6	IVG01	700	92	43.1	840	上下-	11.6	73.7	89.5	7.7	22.9	87.85	-0.82	16.62	背景がドットは欠点の箇所
28234	M6	IVG01	753	99	42.4	834	上下-	11.5	74.2	88.3	8.3	23.2	88.26	-0.72	15.42	
きたほなみ			758	100	40.7	835	上下-	11.2	72.5	80.9	7.6	22.9	88.60	-0.73	16.37	

品種名 および 系統名	冬損 程度 (0-5)	出穂期 (月/日)	成熟期 (月/日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/m)	倒伏 程度 (0-5)	強靭性 (1-5)	特性検定試験					遺伝子型	
									うどんこ 病 (0-5)	赤さび 病 (0-100)	赤かび 病 灌水	穂発芽性		縞萎縮	
												H27 系統	H28 十勝	2D	3B
28233	1.0	6/9	7/23	79	8.1	410	0.0	4	2.0	30	やや弱	2.3	2.5	S	S
28234	1.5	6/10	7/24	77	8.3	627	0.0	3	2.0	30	やや弱	0.9	1.8	S	S
きたほなみ	0.7	6/9	7/23	76	8.0	590	0.0	4	0.0	10	中	1.4	1.5		

2) 出穂時期や種子の品質を調査し、γ線突然変異系統集団より早生かつ硬質の「28505」を選抜した(表4)。「28505」は「きたほなみ」よりも成熟期が3日早く、子実重は95%とやや劣ったが、粒硬度が非常に高く、有望な育種素材候補である。

表4 早生および穂発芽性に関する有用変異体の特性調査結果 (H27、H28播種)

新系統名 (H27播種)	選抜変異 前年度	世代	出穂期 (月/日)	稈長 (観察)	穂長 (観察)	製粉歩留 (%)	粉蛋白 (%)	粉色(ZE-6000)			千粒重 (g)	穂発芽程度 (0-5)	粒硬度
								L*	a*	b*			
(比較)	きたほなみ	-	6/9	ML	M	73.8	8.3	88.07	-0.63	15.11	45.6	3.0	41.8
28514	竹早生	M6	6/8	ML	ML	73.5	8.1	88.18	-0.58	15.06	40.1	-	43.5
28503	早生・長稈・硬質	M6	6/6	L	ML	73.3	9.5	88.00	-0.62	16.29	43.8	-	83.8
28504	早生・長稈・硬質	M6	6/6	L	M	73.4	8.6	88.23	-0.66	16.29	40.5	-	71.5
28505	早生・長稈・硬質	M6	6/7	L	ML	75.7	9.5	88.30	-0.63	16.50	42.0	-	80.1
28515	竹早生	M6	6/8	ML	M	74.2	8.3	88.33	-0.56	15.43	43.9	-	41.0
28506	短稈(耐倒伏)	M6	6/9	M	MS	72.4	7.9	88.22	-0.57	15.09	42.4	-	44.5
28507	晩生	M6	6/11	ML	M	73.8	9.1	87.92	-0.60	16.56	43.3	-	49.1
28508	晩生・短稈	M6	6/12	M	MS	73.5	7.8	88.20	-0.85	16.80	40.2	-	33.0
28509	有芒	M5	6/9	ML	M	73.4	9.1	87.93	-0.50	14.92	40.5	-	50.2
28510	耐穂発芽	M6	6/10	LS	-	74.2	9.1	87.71	-0.58	15.36	38.4	0.6	41.6
28511	耐穂発芽	M6	6/11	ML	-	72.9	9.5	87.79	-0.42	15.59	36.3	0.2	43.2
28512	耐穂発芽	M6	6/8	ML	-	73.2	8.6	88.28	-0.65	15.23	39.9	1.1	54.0
28513	耐穂発芽	M6	6/9	ML	-	73.4	9.4	88.24	-0.70	15.87	35.5	1.9	54.1

選抜した候補系統(H27)

選抜後、翌年再調査

新系統名 (H28播種)	選抜変異 前年度	世代	成熟期 (月/日)	稈長 (cm)	穂数 (本/m)	製粉歩留 (%)	粉蛋白 (%)	粉色(ZE-6000)			千粒重 (g)	穂発芽程度 (0-5)	耐雪性 (0-100)	子実重 (kg/10a)	標準対比 (%)
								L*	a*	b*					
(比較)	きたほなみ	-	7/25	75	523	71.0	10.1	87.34	-0.94	15.43	41.5	1.1	78	747	100
28505	早生・硬質	M7	7/22	82	540	71.2	11.2	87.31	-0.90	17.04	39.2	0.7	69	710	95
28510	耐穂発芽	M7	7/26	83	490	69.3	10.8	87.09	-0.75	15.34	39.0	0.3	63	668	89
28511	耐穂発芽	M7	7/26	77	470	70.1	11.8	86.55	-0.56	14.38	36.9	0.3	88	646	87

3) 穂発芽耐性を調査し、γ線突然変異系統集団より耐穂発芽の「28510」、「28511」を選抜した(表4)。「28510」および「28511」は、成熟期が1日遅く、子実重は87~89%と劣ったが、降雨処理後の穂発芽程度は「きたほなみ」の1.1に対して0.3と極めて低かった(表4, 図4)。品質特性はどちらも「きたほなみ」と概ね同等であるため、有望な育種素材候補である。

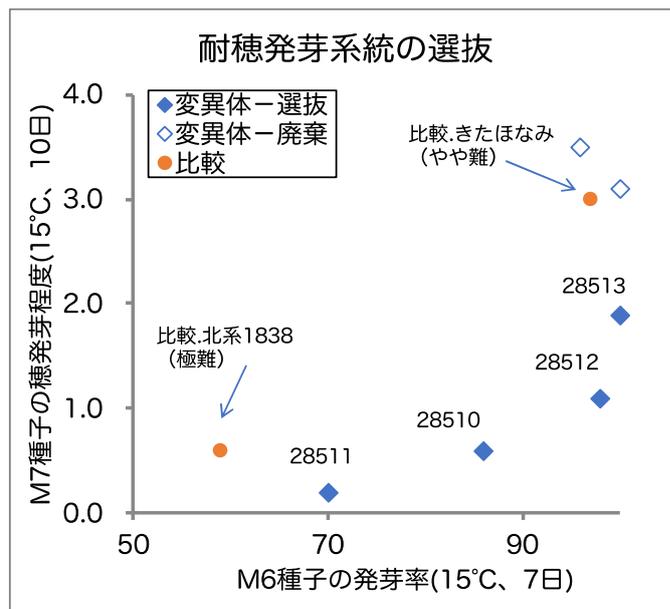


図4. 耐穂発芽系統の選抜  
M6種子の発芽率、M7種子の穂発芽程度の調査により、「28511」、「28510」を耐穂発芽系統として選抜した。

4) 重イオンビーム突然変異系統集団より、逆遺伝学的にABA代謝酵素(*TaABA8'OH*)欠損変異系統(*TaABA8' OH-B*, *TaABA8' OHI-D*)を選抜し、交配で変異集積系統(*TaABA8' OH-B,D*二重欠損変異系統)を作出した。各変異系統及び「きたほなみ」の発芽率変動を調査した結果、原因遺伝子の変異の導入により発芽抑制効果が認められた(図5)。BD二重欠損変異体は、すでに発芽抑制効果を示したD欠損変異体と比較した場合、さらにわずかに発芽が抑制された。また *TaABA8'OH-D* 変異は生育を阻害することなく発芽抑制に機能するため、穂発芽耐性(種子休眠生の向上)を付与できる有望な育種素材候補である。

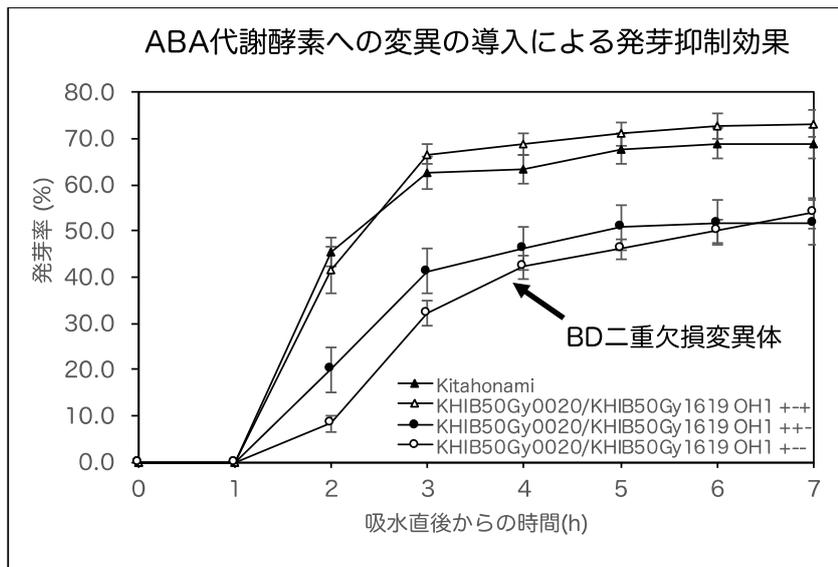
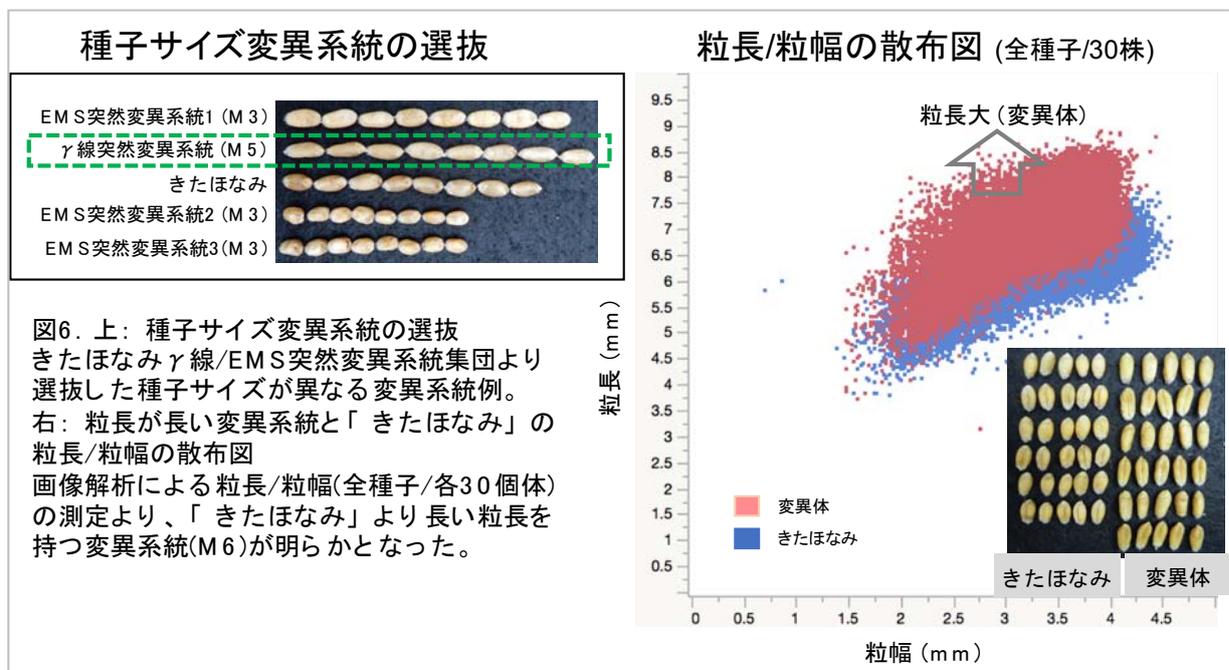


図5. ABA代謝酵素(TaABA8'OH)変異系統の発芽率の変化  
TaABA8'OH1-B欠失変異体 (Khib50Gy1619)、TaABA8'OH1-D欠失変異体 (Khib50Gy0020)、それらの交配後代のTaABA8'OH1-BD二重欠失変異体及び「きたほなみ」の各系統の種子(雨よけ栽培下で開花60日後採取)の発芽率変動(15 °C・7日間)を調査した。

5)  $\gamma$ 線/EMS突然変異系統集団より、種子サイズが異なる複数の変異系統を選抜した(図6上)。粒長が長い変異系統は不稔が多い傾向が見られたが、画像解析で粒長/粒幅の数値化により、「きたほなみ」より粒長が長い変異を持つことが確認できた(図6右)。この変異系統のもつ負の形質を除き、粒長に関わる原因因子を明らかにすることで、新規育種素材候補の開発を進めている。



6)  $\gamma$ 線/EMS突然変異系統集団より、オオムギ閉花性遺伝子(*cly1*)のコムギオルソログ(*AP2-A*, *-B*, *-D*)の変異系統を選抜した。各種変異系統間の相互交配F1の自殖次代F2植物のジェノタイプピング

の結果、以下のI)~VI)の遺伝子型を選抜した。遺伝子型の表記については、AP2-A, -B, -D遺伝子の順で、それぞれの野生型アリルをA,B,D、閉花性変異(SNP)アリルをA<sup>m</sup>, D<sup>m</sup>、各欠失変異を(-)で示す。B<sup>m</sup>は同定されておらず、AP2-B,Dの二重欠失変異体[AA (-) (-)]は致死であった。

- I) (-) (-) D<sup>m</sup>D<sup>m</sup>
- II) AA (-) D<sup>m</sup>D<sup>m</sup>
- III) (-) BB D<sup>m</sup>D<sup>m</sup>
- IV) A<sup>m</sup>A<sup>m</sup> (-) DD
- V) A<sup>m</sup>A<sup>m</sup> BB (-)
- VI) A<sup>m</sup>A<sup>m</sup> BB D<sup>m</sup>D<sup>m</sup>

閉花性変異のSNPアリルは、AP2遺伝子のmiRNA172ターゲット領域(21bp)にSNP変異が入ったために、miR172のターゲット領域への結合が解除され、抑制されていたAP2機能の回復で、閉花性機能を有することが期待される。閉花性変異アリルのみを有する遺伝子型 I) は、理論的に閉花性形質を示すことが予測される。また、2つのAP2同祖体の閉花性変異アリルを集積させた遺伝子型VI) についても、閉花性形質の発現が期待される。閉花性コムギは、赤カビ病等の穂への病原菌感染リスクの低下が見込まれ、育種素材としての期待が非常に高い。現在、冬季温室ポット栽培における選抜個体の予備調査を進めており、春季圃場栽培において開花・閉花性の形質評価を実施する予定である。

7) EMS突然変異系統集団より、カドミウム吸収、乾燥耐性に関わる各遺伝子の変異系統をA, B, Dゲノムでそれぞれ13系統、9系統、14系統と12系統、6系統、8系統を選抜した。またシロガネコムギ重イオンビーム突然変異体集団より、カドミウム吸収、乾燥耐性に関わる各遺伝子の変異系統をA, B, Dゲノムで4系統、3系統、1系統と1系統、4系統、2系統を選抜した。これらのホモ系統化、相互交配による変異アリルの集積を進め新規育種素材の開発を進めている。

### 3) 成果活用における留意点

本プロジェクトで育成した麦類変異体集団は、世界最大規模の国内向け育種素材リソースとして位置付けられる。このリソースの外部機関からの利用は、突然変異系統集団の開発機関と共同研究契約を結ぶ必要がある。

### 4) 今後の課題

コムギ、オオムギは近年全ゲノム配列の解読がなされたため、世界各国でDNAマーカーの整備、効率の良い形質転換系の確立、変異体の整備などが実施されている。本プロジェクトで育成した国内外最大規模のコムギ(きたほなみ、シロガネコムギ 総計約9,990系統)突然変異系統集団は、国内向けの育種素材リソースとして位置付けられ、耐病性、耐環境ストレスによる生産安定化、収量増加を目指す開発研究に積極的に活用できる。オオムギ突然変異集団と併せた利用、また今後、目的形質を持つ変異体のゲノム情報を収集することで有用新規遺伝子の特定・リソース化が可能である。このため機能ゲノムクス研究といった基礎研究にも役に立つ。

以上のことから、育種に活用できるリソース基盤の開発という目標は十分達成できたため、整備したリソースを用いて麦類品種改良の加速化に貢献することを今後の課題としたい。

## 「遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13405960

研究期間：平成25～29年度

中課題名：遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発(IVG)

小課題番号：IVG1004

研究期間：平成25～26年度

小課題名：ソルガム突然変異集団の作出とスクリーニング系の構築

小課題代表研究機関・研究室・研究者名：名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・植物分子育種分野・佐塚隆志

### 1) 研究目的

本研究課題では、有用農業遺伝子の育種への活用と機能解析を行うため、突然変異を誘起したソルガムの変異体集団を作製することを第一の目的とする。また、その変異体集団の持つ多様な変異の中から、特定の遺伝子の変異を同定する実験系を構築し、これまで順遺伝学では困難だった変異体の同定や、特定遺伝子についてさまざまな強さのアリル系統の同定（アリルマイニング）を第二の目的とする。

### 2) 研究成果

#### (1) 突然変異体及び変異体DNAライブラリーの構築（担当：名古屋大学）

平成25年度はソルガム品種SIL-05を母本として用い、250Gyのガンマ線照射により突然変異を誘起し、505系統の変異体を得た。5月10日～5月28日にかけて各系統14粒ずつセルトレイに播種し、発芽率が悪かったものは再播種を行った。苗は温室にて約3週間育成し、各系統8個体ずつ圃場に定植した。8月上旬、育成した全個体から若い葉片（約10×3cm）をゲノムDNA抽出用にサンプリングした。葉片は減圧乾燥し、乾燥剤・脱酸素剤と共に密封シールし、10℃で保管した。本年は8月中旬に降水量が0mmであったため、8月20日に圃場へ灌水チューブを設置した。また虫害対策として、6月中旬及び8月下旬にオルトランを散布した。10月上旬以降、各系統につき4個体ずつ種子を収穫した。当該圃場において、本年は記録的な異常気象の年であり、先の8月の小雨に加え、37℃を超える猛暑日が12日記録された。また、9月4日、16日、26日には集中豪雨と台風に見舞われ、本プロジェクトの研究材料である植物体は、ほぼすべて倒伏した。これらの理由から、平成25年度は一番穂、二番穂ともに稔実率が低く、種子が得られた系統は259系統に留まった。そこで、名古屋大学において過去に収穫し保管されている種子で対応し、この保管種子を含め465系統となり、本プロジェクトの目標をほぼ達成した。

平成26年度では、母本SIL-05に175または250Gyのガンマ線照射を行うことで突然変異を誘起し、得られた535系統の変異体を供試した。植物体が十分に育成した後、全個体から若い葉片をゲノムDNA抽出用にサンプリングした。また、各系統につき4個体ずつ種子を収穫した。平成26年度も異常気象であり、平成25年度とは逆に冷夏に見舞われ、また8月上旬には大型台風12号の影響で暴風雨となり、植物体はほぼすべて倒伏した。その後9月、10月にも台風が到来し、結果、三度の台風被害が災いしたため一番穂、二番穂ともに稔実率が低かった。しかし、採種努力の結果、目的とする535系統に達したことから、本プロジェクトの目標（2年間で1,000系統）は達成された。

#### (2) 遺伝子スキャンニング法の構築（担当：生物研）

ソルガムゲノムにおける遺伝子スキャニング法の確立に関しては、平成25年度ではまず、既知遺伝子の既知変異をモデルに実験条件を検討するため、新農業展開ゲノムプロジェクトQTL5505にて同定され、本プロジェクトによって系統化された*sbslr1*突然変異体を突然変異体ライブラリー505系統のうちの3系統 (*sbslr1-1*を2系統、及び*sbslr1-2*を1系統)として育成した(図1)。

各系統では、ヘテロ個体(*SbSLR1sbslr1*)の後代分離系統(*SbSLR1SbSLR1*、*SbSLR1sbslr1*、*sbslr1sbslr1*)を播種し、8株ずつ育成した。ただし、ホモ型個体(*sbslr1sbslr1*)については、徒長型表現型のため圃場では育成困難であった。このため、野生型ホモ型及びヘテロ型(*SbSLR1SbSLR1*、*SbSLR1sbslr1*)のみを定植し、サンプリングした。*SbSLR1*は、イネにおいてジベレリン信号伝達の抑制因子として働くSLR1のソルガムのオルソログ遺伝子であり、*SbSLR1*突然変異体は、タンパクコード領域のC末端側SAWドメインをコードする領域に2bpの欠失があることが明らかとなっていた。この2 bp欠失をケーススタディ

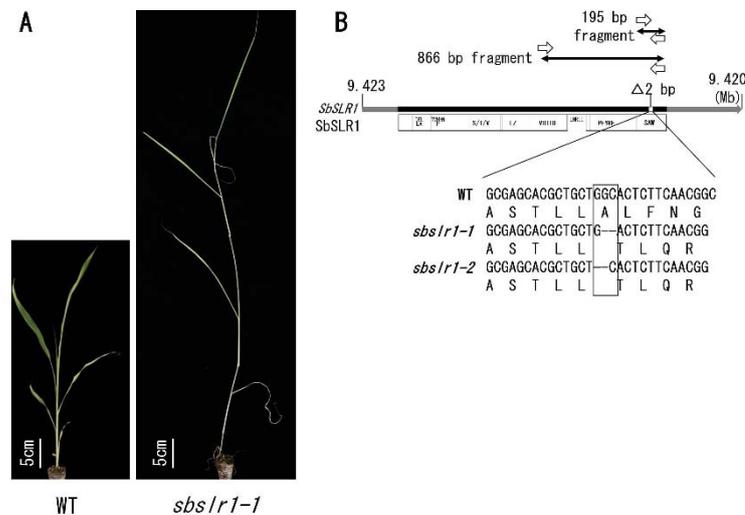


図1 モデル実験用に用いられた*sbslr1*変異体

(A)左：野生株、右：*sbslr1-1*変異体の幼苗期の写真(播種後約3週間)、(B)同定された*sbslr1-1*、*sbslr1-2*の変異部位。図上部の白矢印は変異部位検出用のプライマーを示し、両矢印は、これらプライマーで増幅が予想されるPCR断片を示す。

として、遺伝子スキャニング法の実験条件検討を行った。具体的には、表現型変異が既知のソルガム突然変異体505系統(M<sub>3</sub>世代の各1-8個体が育成された)の内、384系統の各4個体からDNAを抽出し、1系統ごと各4個体を混合することでスクリーニング用のバルクDNAを調製した。さらにこれらの4系統由来のDNAを混合することで、スクリーニング用のバルクDNA(96サンプル)を調製した。この96サンプルのバルクDNAには*sbslr1*突然変異体ゲノムDNAが含まれているので、これを検出すべく*SbSLR1*のHRM解析を行った。その結果、変異体が含まれる2サンプルのバルクDNAにおいて、より低温での解離が検出された。このことから、ソルガムにおいてもHRMを用いた突然変異スクリーニングが可能であると考えられた。

平成26年度では、平成25年度に調整したゲノムDNAライブラリーを用いて、TILLING法により*SbISA1*、*SbISA2*、*SbISA3*及び*dw1*のアリルを探索した。遺伝子構造及びプライマー位置情報は図2に、TILLINGの結果は表1にまとめた。表1では、明瞭に電気泳動度の異なるバンドを検出した結果(表中の「検出された系統」と、不明瞭な結果(表中の「可能性のある系統」)に分けて記載した。

結果として、*SbISA1*については5ヶ所において電気泳動度の異なるバンドが検出された(図2E、表1)。同様に*SbISA2*、*SbISA3*、*dw1* 候補遺伝子はそれぞれ9、19、4ヶ所において電気泳動度の異なるバンドが検出された。以上のことから、今回のTILLING 解析の実験系は十分な検出能力を持ち、アレル同定方法として十分に機能していることが明らかとなった。

### 3) 成果活用における留意点

HRMによる検出結果は予想通りのものであったが、TILLINGによる結果では比較的多くのアレルが検出された。特に特定の系統で検出される場合も見受けられた。例えば、No. 8の系統は9プライマーセットで異なる電気泳動度のバンドが検

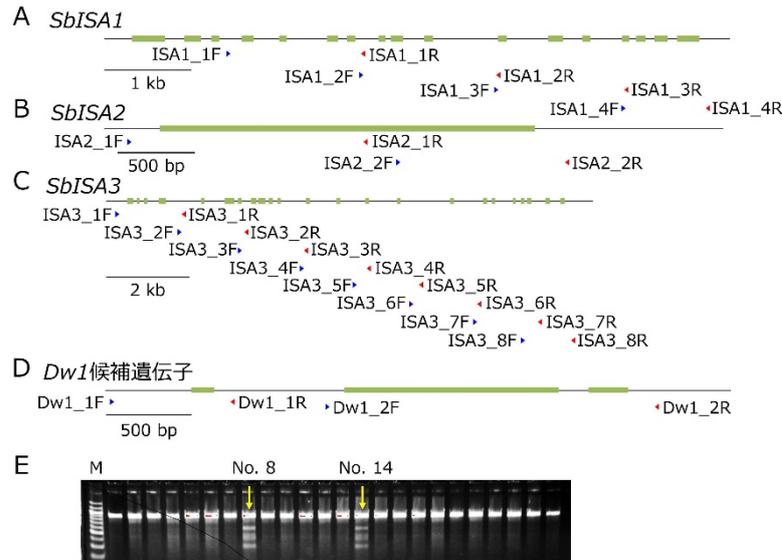


図2 TILLING解析の結果

(A-D) TILLING解析に用いたプライマーの位置。A: *SbISA1*, B: *SbISA2*, C: *SbISA3*, D: *Dw1* 候補遺伝子。四角はエキソン、黒線はイントロンもしくは遺伝子間領域、矢頭はプライマーの位置を示す。(E) 酵素消化産物の電気泳動の一例。24系統の変異体DNAを鋳型DNAとし、*Dw1\_1F/Dw1\_1R*のプライマーで増幅したDNAを供試したところ、系統No. 8, No. 14で移動度の早いバンドが検出された。

(A)左: 野生株、右: *sbs/r1-1*変異体の幼苗期の写真(播種後約3週間)、(B)同定された*sbs/r1-1*, *sbs/r1-2*の変異部位。図上部の白矢印は変異部位検出用のプライマーを示し、両矢印は、これらプライマーで増幅が予想されるPCR断片を示す。

表1 TILLING解析のまとめ

primer-F	primer-R	検出された系統 <sup>a</sup>	可能性のある系統 <sup>b</sup>
ISA1_1F	ISA1_1R	なし	No.8, 45
ISA1_2F	ISA1_2R	なし	No.8, 45
ISA1_3F	ISA1_3R	No.8, 45	なし
ISA1_4F	ISA1_4R	No.8, 30, 151	なし
ISA2_1F	ISA2_1R	No.8, 14, 30, 39, 45, 142, 151, 349, 359	No.291
ISA2_2F	ISA2_2R	なし	なし
ISA3_1F	ISA3_1R	No. 8, 30, 47, 48, 151, 216	なし
ISA3_2F	ISA3_2R	No.39	なし
ISA3_3F	ISA3_3R	No.361	No.337, 369
ISA3_4F	ISA3_4R	No.8, 14, 39	なし
ISA3_5F	ISA3_5R	No.39, 151	No.8, 14, 30
ISA3_6F	ISA3_6R	なし	なし
ISA3_7F	ISA3_7R	No.14, 30, 39, 142, 151	No.10, 11, 17
ISA3_8F	ISA3_8R	No.30	なし
dw1_1F	dw1_1R	No.8, 14, 151	なし
dw1_2F	dw1_2R	No.39	なし

a: 異なる移動度のバンドが明確に検出された系統。

b: 異なる移動度のバンドの可能性のある系統。

出された（表1）。これについては次の3つの可能性が考えられた。（1）SIL-05の自殖による固定が完全ではなく、ゲノム中でヘテロの領域が残存していた。

（2）種子に対するガンマ線処理（または感受性）が不均一であり、系統によって変異率が異なっていた。（3）ソルガムは不完全自殖性の作物であり、また属間交雑も起きる。今回供試した材料にはこのようなSIL-05 ゲノム以外から由来するDNAが他殖により夾雑していた。

（1）については、最近、我々は次世代シーケンサーによってSIL-05のリシーケンシングを行ったが、この結果では多品種に比べ明らかに多くのヘテロ遺伝子座（多くはSNP）が検出された。このことから、今回の結果は、少なくとも一部はこのことに由来すると考えられた。（2）については系統間のばらつきを説明するもので、それぞれのM<sub>1</sub>種子のガンマ線照射時の位置や向き、あるいは含水率によって感受性が異なった可能性が考えられた。（3）についても系統間のばらつきを説明するもので、特に突然変異により雄性不稔になったケースでは、他殖率が極めて高くなると考えられた。

以上、変異率のばらつきがあったものの、目的であるアリの同定という面に関しては、人為的突然変異に加え他ゲノムの多型の可能性を含めて幅広くスクリーニングできるという観点から、多様性のあるライブラリーから特定遺伝子のアリ同定を行う有用な系が確立したと考えられた。

#### 4) 今後の課題

今回供試した材料は、他殖率の検定を行っていないので結論することは難しいが、次回の突然変異体M1系統の育成では、隔離温室などで他系統からの他殖を防ぎ採種したM2種子を準備し今回の結果と比較することで、この可能性について検討できると考えられた。今後は電気移動度の異なったバンドを示した系統とプライマーセットを用いて、その増幅断片をシーケンスすることで非同義置換かどうかなども検定する必要があり、また、変異体系統の表現型も調査する必要があると考えられた。

## 「遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13405960

研究期間：平成25～29年

度

中課題名：遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発(IVG)

小課題番号：IVG1005(平成27年度にIVG3006(平成25～26年度実施課題)と統合)

研究期間：平成25～29年度

小課題名：ダイズの変異リソースの作出とスクリーニングシステムの開発(平成27年度にダイズ開花・登熟関連遺伝子スーパーアリの作成と育種的利用(平成25～26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：農研機構 次世代作物開発研究センター・基盤研究領域・石本政男

共同研究機関・研究室・研究者名等：農研機構 次世代作物開発研究センター・畑作物研究領域・畑作物形質評価ユニット・福田篤徳、佐賀大学・農学部応用生物科学科・植物育種学分野・穴井豊昭、佐賀県農業試験研究センター・作物部・作物育種研究担当・三原実、佐賀県農業試験研究センター・作物部・作物育種研究担当・條島真紀子、佐賀県農業試験研究センター・作物部・作物育種研究担当・池上紀子、佐賀県農業試験研究センター・作物部・作物育種研究担当・多々良泉、佐賀県農業試験研究センター・作物部・作物育種研究担当・松本和大、農研機構 次世代作物開発研究センター・畑作物研究領域・大豆育種ユニット・南條洋平、農研機構 次世代作物開発研究センター・畑作物研究領域・大豆育種ユニット・山田哲也、農研機構 次世代作物開発研究センター・畑作物研究領域・大豆育種ユニット・菱沼亜衣、農研機構 次世代作物開発研究センター・畑作物研究領域・畑作物形質評価ユニット・西澤けいと、農研機構 次世代作物開発研究センター・畑作物研究領域・畑作物形質評価ユニット・佐山貴司、農研機構 次世代作物開発研究センター・畑作物研究領域・畑作物形質評価ユニット・田口文緒

### 1) 研究目的

ダイズはゲノム情報の公開とともに、逆遺伝学的手法による遺伝子の機能同定が進みつつあるが、突然変異体の育種利用は限られている。目的の遺伝子に変異した突然変異体を育種素材として品種育成に利用するためには、多様な変異を包含した変異体集団を創出するとともに、目的の変異体を確実に見つけ出す必要がある。そこで本課題では、優良な国産ダイズ品種である「エンレイ」と「フクユタカ」について、高頻度に突然変異を集積した変異体ライブラリーを作成する。そして、変異を迅速に検索する基盤を整備し、これら優良品種の遺伝背景に新規対立遺伝子を創出し、育種素材あるいは遺伝子機能解析の素材として変異体を提供する。

ダイズは栽培地域ごとに求められる播種期や成熟期が異なり、多くの品種は比較的狭い地域で栽培されている。そのため、品種ごとのロットが小さく、生産量の年次間差が大きく、価格が変動しやすい。これが国産ダイズの最大の弱点となっている。そのため地域適応性を拡大した品種を育成し、生産量の安定確保を図ることが重要な課題である。開花期関連遺伝子のアリル構成を変えた同質遺伝子系統群を広い地域で栽培することができれば、大ロット化や危険分散を実現できると期待できる。そこで、突然変異体ライブラリーのなかから開花期関連遺伝子の新規アリルを探索し、見出した新規アリルは元品種や育成系統などへ導入し、広い地域で栽培可能な同一の品種群（同質遺伝子系統群）として育種素材

化を進める。本研究を通じて、遺伝資源から交配によって有用遺伝子を導入する従来の手法に代わって、同定された遺伝子の情報を利用して特定の品種や有望系統に新たなアレルを創生し、育種的に利用する技術基盤を確立する。

## 2) 研究成果

1-(1)「エンレイ」エチルメタンスルホン酸 (EMS) 変異体ライブラリーの作成：突然変異を集積するため変異原を2回処理した約6,000のM2' 個体を育成し、DNAとM3' 種子を取得してライブラリーを完成した(図1)。変異率を推定するために、次世代シーケンサーを用いて任意に選出した変異系統の全塩基配列を解読して原品種と比較したところ、各系統の塩基置換数は約9千から35万、平均1系統当たり1万7千箇所であった。変異体ライブラリー当たりでの換算では概ね60kbに1個の塩基配列変異が存在していた。平均1系統当たり1000カ所はアミノ酸配列を変異させる非同義置換であり、そのうち約50カ所は遺伝子機能を消失する可能性の高い終止コドンに変化するナンセンス変異であり、変異の集積度は非常に高いことがわかった。

1-(2)「フクユタカ」EMS変異体ライブラリーの作成：突然変異を集積させるため変異原を2回処理した約5,000のM2' 個体を育成し、DNAとM3' 種子を取得してライブラリーを完成した。表現型の調査結果では、このEMS変異体集団は「エンレイ」EMS変異体集団よりも変異率がやや低いと考えられた。

1-(3)「フクユタカ」ジエポキシブタン (DEB) 変異体ライブラリーの作成：DEB では0.5mMを超える濃度は胚軸伸長を著しく阻害し、実生が正常に生育できないことが明らかとなり、乾燥種子に処理する場合は0.5mM、5時間の処理が最適と考えられた。しかし、変異率推定のために育成したM2集団約1000個体の開花期関連遺伝子*E1*の塩基配列約500bpをダイレクトシーケンス法で解析したが、変異は全く検出されなかった。エンレイEMS変異体ライブラリーの変異率と比較した場合、この条件での変異誘発率は不十分で、より高濃度での処理が可能な方法を開発する必要があると考えられた。

1-(4)「エンレイ」DEB変異体ライブラリーの作成：M1集団より得られた約6,000粒のM2種子に対してフクユタカでの変異原処理よりもさらに高濃度の1.5mMのDEB溶液中に4時間浸漬する処理を行い、約3000個体のM1' 集団を育成し、変異体ライブラリー作成に利用できるエンレイDEB変異体M2' 種子を確保した。

1-(5)突然変異検出方法の開発：変異体検索の高精度化と効率化のため、複数のDNAサンプルを混ぜ合わせるDNAプールの条件検討を行い、標的遺伝子をDNAプールからPCR増幅し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を解読するアンプリコンシーケンス法によって、変異体ライブラリーに含まれる突然変異箇所を特定する条件を見出した。この方法とHRM法と組み合わせれば、変異体ライブラリーの変異率に依存するものの、標的遺伝子の変異体を高い捕捉率で検出できることを示した。

1-(6) DNAのミスマッチを識別できるタンパク質を利用した安価な突然変異検出方法を開発するため、好熱性細菌のMutS遺伝子の一部を大腸菌のコドンに最適化した人工遺伝子を発現用プラスミドに組み込んだ。このプラスミドを発現用大腸菌株に導入し、組換えMutSタンパク質の効率的な発現条件と精製条件を検討した。

2-(1) 開花期関連遺伝子の新規アレルの取得と評価：高解像度融解曲線 (HRM) 解析法を確立し、この方法を用いてエンレイのEMS突然変異体ライブラリーより主要なサイズの開花期関連遺伝子*E1* の終止変異1個体とアミノ酸置換変異2個体および開花期関連遺伝子

*E4*の終止変異2個体とアミノ酸置換変異9個体を同定した。フクユタカの突然変異体ライブラリーからは*E1*、*E2*、*E3*、*E4*のアミノ酸置換変異体をそれぞれ2~4個体取得した。

2-(2)開花期関連遺伝子の新規アレルを導入した系統群の開発：目的遺伝座以外に生じた変異を除去するために、見出した系統に現品種を戻し交雑した。圃場で栽培し、開花登熟期の変化を調査したところ、*E1*については終止変異1系統とアミノ酸置換変異1系統、*E4*については終止変異2系統とアミノ酸置換変異2系統において、遺伝子変異に基づく早生化を確認した。

### 3) 成果活用における留意点

開発した突然変異体ライブラリーは小規模な集団のなかに多様な変異が濃縮されており、従来の突然変異育種では見つけられなかった変異が見つかること期待できる。しかし、変異体を用いた品種育成では、高頻度で集積された不要な突然変異を戻し交配等で取り除く必要がある。

### 4) 今後の課題

ダイズの突然変異リソースの整備と変異体を効率よく同定する技術の開発を主体に進め、様々なニーズに答えられる国内最大規模の突然変異リソースになった。変異体の提供に関しても、成分や品質まで多岐にわたる育種形質の需要が年々増加しており、育種素材としての評価や利用が今後進むと期待される。しかしながら、整備した突然変異リソースの維持管理や配布に関して、プロジェクト終了後の予算措置が定まっておらず、今後の大きな課題である。また、次世代シーケンサーを用いたバルク法により変異遺伝子を効率よく特定できるようになってきたことから、今後は整備した突然変異体の表現型に基づいて遺伝子同定を加速させる必要がある。

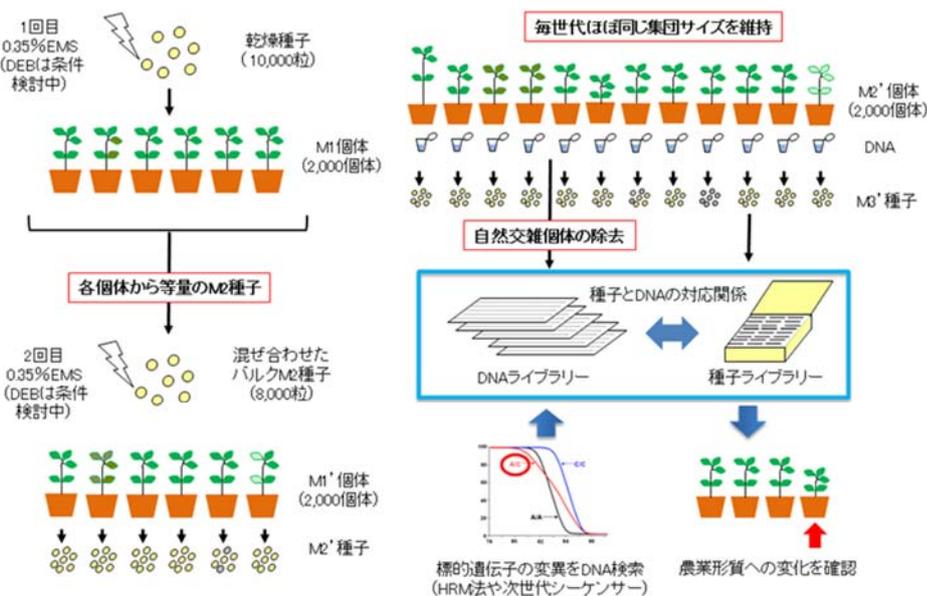


図1 突然変異体ライブラリー作成の概要

本課題では限られた数の変異体集団のなかに、高度に突然変異を集積させるため、変異原処理を2回繰り返す。そのため、変異体の世代の表示方法は通常とは異なり、2回目の変異原処理後の世代と1回目(M1)とは区別するため、2回目の変異原処理後の世代を基点に、ダッシュ(M1')を付した。

# 「遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405960

研究期間: 平成 25～29 年度

中課題名: 遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発 (IVG)

小課題番号: IVG2001

研究期間: 平成 25～29 年度

小課題名: 自然変異アリルと表現型情報の連関データベースの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 高度解析センター・ゲノム情報大規模解析チーム・伊藤剛

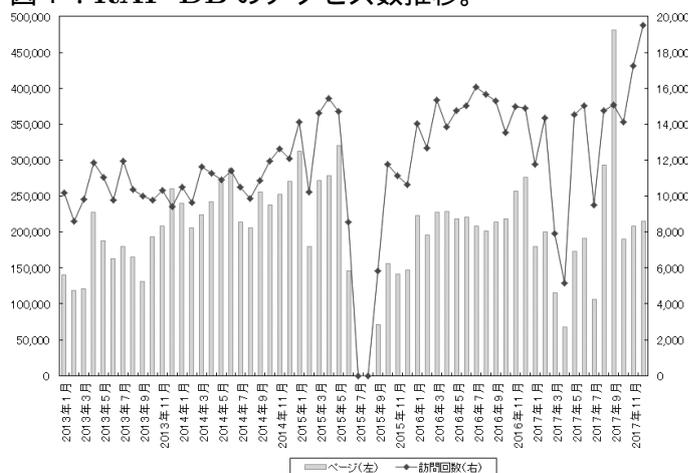
## 1) 研究目的

塩基配列解読がきわめて安価かつ容易になったことから、栽培種や野生種の多様な品種で大規模ゲノム解読が進んでおり、今後更に多数の遺伝子配列が明らかになることは間違いない。また、これまでは限られたレファレンスに対して品種のショートリードを比較するといった形態が主流であったが、配列決定技術の進展に伴い、レファレンスとなるゲノム自体の増加も期待される。このような状況下、自然変異によって生じた多数のアリルの比較解析は魅力的な研究課題であり、これらの材料を研究者が利用しやすいように提供するデータベースの整備は喫緊の課題である。そこで、自然変異アリルの情報を加工し、ウェブ上のデータベースとして提供することで、効率よく情報取得ができるようにする。このため、自然変異を含む既知の機能情報については文献を精査し、データを集積する。これまでに我々のグループはイネのアノテーションデータベース (RAP-DB) などを構築、運用してきた実績があることから、このような配列情報については RAP-DB を核として拡張しながら多数の自然変異アリルを効率的に表示するデータベースのためのプログラムを作成する。

## 2) 研究成果

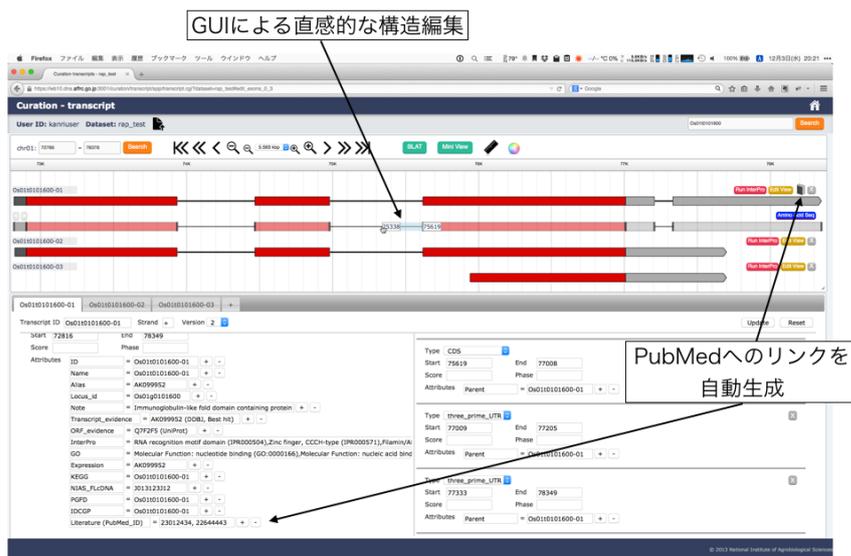
イネのゲノム配列とアノテーションのデータベース (RAP-DB) について、運用を行った。機器の入れ替えに伴う停止等もあったが、全体としてアクセス数は高いレベルで推移し、幅広く活用されている (図 1)。当初は日本晴品種のレファレンスゲノム中心に運用してきたところ、他品種を含めた多ゲノム表示ブラウザとの連携を強化したので、品種間比較にも対応できるようになった。また、イネの機能に関する情報を強化するため、全遺伝子発現情報 (140 条件の RNA-seq) のデータベース TENOR (<http://tenor.dna.affrc.go.jp/>) についても一般公開を行い、RAP-DB とリンクさせている。

図 1 . RAP-DB のアクセス数推移。



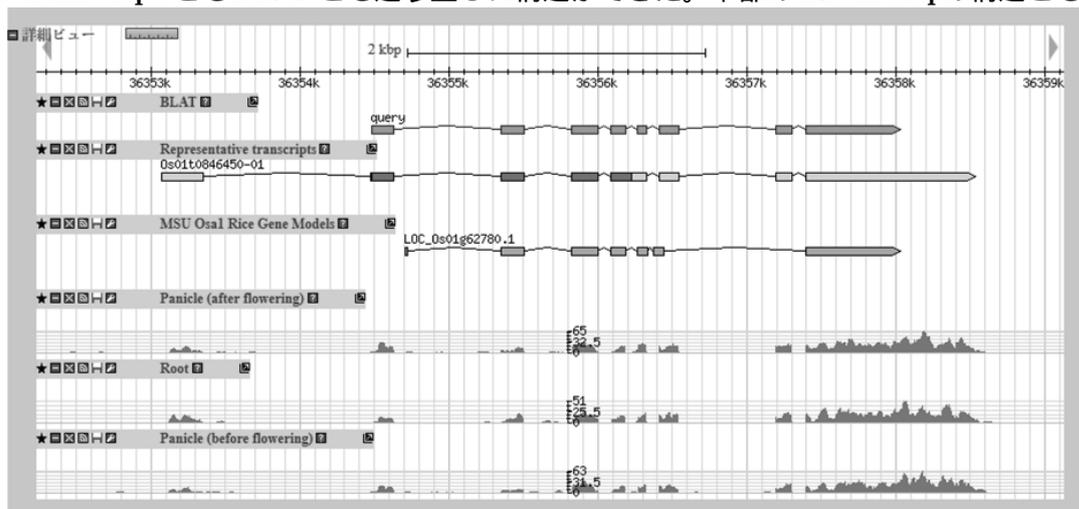
イネの遺伝子に関するキュレーション（データ精査）のため、品種、機能の違い、文献のID情報等を整理し、データ公開した。特に、遺伝子の一次構造（エクソン-イントロン構造）は、フレームシフト変異、スプライス部位の変異などによって変化するとアミノ酸構造に著しい変化をもたらし、表現型に強く影響すると考えられるので、この目的のために作成したキュレーションシステムを活用した（図2）。キュレーションの結果、これまでに公開してきた遺伝子情報は合計で1,087件である。年別では、2013年に8件、2014年に260件、2015年に276件、2016年に309件、2017年に234件であった。また、公開準備中のものも含めたキュレーション済み件数は、1,200を超えている。

図2 . 詳細なデータ精査のために開発したキュレーションシステム。



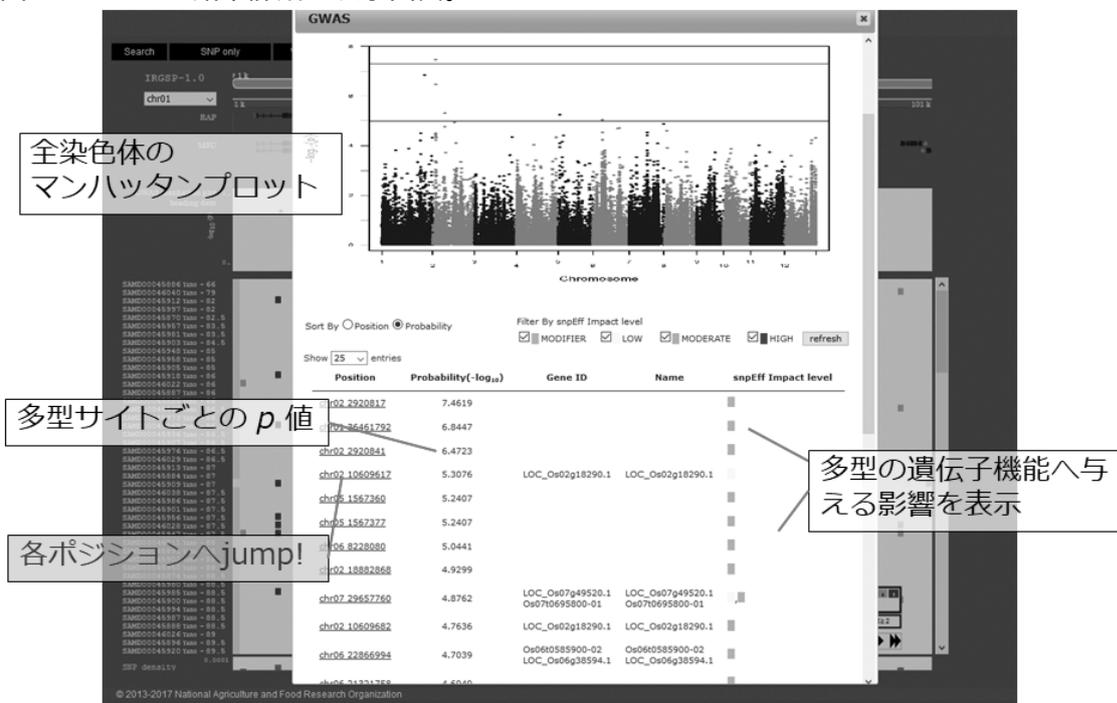
キュレーションの例として、Os01g0846450 (HESO1, a homolog of Arabidopsis thaliana HEN1 suppressor 1) を挙げる。Yano K et al. (Nat Genet 2016 48(8):927-934) に発表された遺伝子の配列は、RAP-DB および米国ミシガン州立大 (MSU) の登録配列のいずれとも異なり、両データベースが間違っていることが分かった。論文よりアミノ酸配列情報を取得後、塩基配列に変換してBLAT検索し、正しいエクソン-イントロン構造を新しく作る事ができたので（図3）、Os01t0846450-02として構造の追加を行った。この新しい構造はRNA-seqのデータとも一致している。また、Os01t0846450-01とRNA-seqのデータを参照して、UTR配列もつけた。

図3 . Os01t0846450-02 のコード領域部分を BLAT のトラックに示す。RAP の Representative transcript と MSU と違う正しい構造ができた。下部の RNA-seq の構造とも一致する。



多数の自然変異アリルを効率よく表示するブラウザについては、SNP や Indel を効率的に表示する TASUKE を活用し、多様な表現型情報に対応して全ゲノム関連解析 (GWAS) を行った結果を表示できるようにした。全ゲノム配列上のマンハッタンプロットを表示し、各多型サイトの  $p$  値と、その多型が遺伝子機能に与える影響についての情報リストを表示することができる (図4)。最大 10 Mb の領域から 1 bp の解像度まで即座にズームイン/アウトが可能で、 $p$  値の低い有力候補領域の周辺で遺伝子機能の影響が大きそうな SNP 等を簡単に探すことができる。

図4 . GWAS 結果詳細の表示画面。



これら研究成果により、正確な遺伝子情報を多数の品種で比較検討し、イネゲノム情報を多様な角度からさらに利活用できるようになった。

### 3) 成果活用における留意点

本研究の成果は、幅広いユーザーに活用されることによって研究全体を底上げし、更に多様な成果につながっていくというものである。現状でのデータベース等の利用数を維持し、あるいは増大させていく工夫が必要である。このためにはまず第一に、データベースのコンテンツを更新しなければならない。内容に更新のないデータベースで利用を維持することは困難である。実際、新たな塩基配列解読は引き続き増える傾向にあり、そのような新規データを取り込んでいく必要がある。

### 4) 今後の課題

さらなるデータ増大に対応しつつ、今後もデータベースを維持運用していく必要がある。本研究に関連するデータベースは重要な研究基盤としてすでに広く利用されており、これを途中で止めることはできない。また、ユーザーの側には、単にデータを閲覧するだけでなく、自ら作成した研究データをアップロードし描画したいというような要望も増えてきている。このようなものを実現する機能も今後は開発し実装していくことが重要であると考えられる。

「遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405960

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発 (IVG)

小課題番号: IVG2002

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: 正逆遺伝学的手法を用いた自然変異アレルの機能アノテーション

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 次世代作物開発研究センター・基盤研究領域・育種法開発ユニット・米丸淳一

## 1) 研究目的

イネの品種改良は、種々の自然変異アレルの組み合わせによって行われている。現在まで、イネゲノムの解読や技術革新により、自然変異に関する複数の遺伝子が単離されてきたが、まだ品種改良に貢献する遺伝子の全容解明と利用にはほど遠い状態にある。その理由として、近縁品種間の遺伝解析集団では DNA マーカー作製に手間がかかる、複雑な遺伝背景下における集団では作用力の小さな遺伝子の効果が捕えにくいなどがあった。近年、次世代シーケンサー技術や同一の遺伝背景（コシヒカリ）における染色体断片置換系統群 (CSSLs) が作出されることにより、これらの問題は解決されつつある。さらに、遺伝子発現データベースなどにより、遺伝子のプロファイルも一部解明されている。これらの情報基盤を効率的に利用することにより、遺伝子単離・機能解明の速度を飛躍的に高められると予想される。そこで、本研究では情報基盤を効率的に利用（一部作製も含む）しながら、未知の遺伝子単離・機能解明を行い、その方法を確立することを目的とする。

## 2) 研究成果

### (1) 正逆遺伝学的手法を用いた有用遺伝子の単離とその利用

#### 1. 機能遺伝子におけるイネ自然変異カタログの構築

##### 【材料および方法】

有用遺伝子単離に利用する染色体断片置換系統群 (CSSLs) のドナー品種における全遺伝子における変異リストを作成するために、日本晴のリファレンスゲノムに対して 30x をカバーする量の次世代シーケンサーによる配列解析を行い、全遺伝子における変異リストを作成した。また、それらの結果をもとにアレルマイニングツール構築を行った。構築されたアレルマイニングツールについては、CSSLs の BC3F2 や BC4F2 集団を用いた出穂期の QTL 解析 (Hori et al. 2015) で検出された領域と既知の出穂遺伝子座における配列と比較し検証を行った。

##### 【結果および考察】

遺伝子の変異は多様であることから、多数系統における多数遺伝子について概観することは困難である。そこで、配列変異が遺伝子機能に及ぼす影響を概観するための指標として SNP Effect (Cingolani et al, 2012、遺伝子機能への影響度合い: High, Moderate, Low, Modifier の 4 段階) を利用し、配列変異について評価した (表 1)。

表 1 . SNP effect のカテゴリー

Impact	Effect	Note & Example
HIGH	CHROMOSOME_LARGE_DELETION	A large part (over 1% or 1,000,000 bases) of the chromosome was deleted.
HIGH	CHROMOSOME_LARGE_DUPLICATION	Duplication of a large chromosome segment (over 1% or 1,000,000 bases).
HIGH	CHROMOSOME_LARGE_INVERSION	Inversion of a large chromosome segment (over 1% or 1,000,000 bases).
HIGH	EXON_DELETED	A deletion removes the whole exon.
HIGH	EXON_DELETED_PARTIAL	Deletion affecting part of an exon.
HIGH	EXON_DUPLICATION	Duplication of an exon.
HIGH	EXON_DUPLICATION_PARTIAL	Duplication affecting part of an exon.
HIGH	EXON_INVERSION	Inversion of an exon.
HIGH	EXON_INVERSION_PARTIAL	Inversion affecting part of an exon.
HIGH	FRAME_SHIFT	Insertion or deletion causes a frame shift e.g.: An indel size is not multiple of 3
HIGH	GENE_DELETED	Deletion of a gene.
HIGH	GENE_FUSION	Fusion of two genes.
HIGH	GENE_FUSION_HALF	Fusion of one gene and an intergenic region.
HIGH	GENE_FUSION_REVERSE	Fusion of two genes in opposite directions.
HIGH	GENE_REARRANGEMENT	Rearrangement affecting one or more genes.
HIGH	PROTEIN_PROTEIN_INTERACTION_LOCUS	Protein-Protein interaction loci.
HIGH	PROTEIN_STRUCTURAL_INTERACTION_LOCUS	Within protein interaction loci (e.g. two AA that are in contact within the same protein, possibly helping structural conformation).
HIGH	RARE_AMINO_ACID	The variant hits a rare amino acid thus is likely to produce protein loss of function
HIGH	SPLICE_SITE_ACCEPTOR	The variant hits a splice acceptor site (defined as two bases before exon start, except for the first exon).
HIGH	SPLICE_SITE_DONOR	The variant hits a splice donor site (defined as two bases after coding exon end, except for the last exon).
HIGH	STOP_LOST	Variant causes stop codon to be mutated into a non-stop codon e.g.: Tga/Cga, */R
HIGH	START_LOST	Variant causes start codon to be mutated into a non-start codon. e.g.: aTg/aGg, M/R
HIGH	STOP_GAINED	Variant causes a STOP codon e.g.: Cag/Tag, Q/*
HIGH	TRANSCRIPT_DELETED	Deletion of a transcript.
MODERATE	CODON_INSERTION	One or many codons are inserted e.g.: An insert multiple of three in a codon boundary
MODERATE	CODON_CHANGE_PLUS_CODON_INSERTION	One codon is changed and one or many codons are inserted e.g.: An insert of size multiple of three, not at codon boundary
MODERATE	CODON_DELETION	One or many codons are deleted e.g.: A deletion multiple of three at codon boundary
MODERATE	CODON_CHANGE_PLUS_CODON_DELETION	One codon is changed and one or more codons are deleted e.g.: A deletion of size multiple of three, not at codon boundary
MODERATE	GENE_DUPLICATION	Duplication of a gene.
MODERATE	NON_SYNONYMOUS_CODING	Variant causes a codon that produces a different amino acid e.g.: Tgg/Cgg, W/R
MODERATE	SPLICE_SITE_BRANCH_U12	A variant affective putative (Lariat) branch point from U12 splicing machinery, located in the intron.
MODERATE	UTR_3_DELETED	The variant deletes an exon which is in the 3'UTR of the transcript
MODERATE	UTR_5_DELETED	The variant deletes an exon which is in the 5'UTR of the transcript
LOW	CODON_CHANGE	One or many codons are changed e.g.: An MNP of size multiple of 3
LOW	NON_SYNONYMOUS_START	Variant causes start codon to be mutated into another start codon (the new codon produces a different AA). e.g.: Atg/Ctg, M/L (ATG and CTG can be START codons)
LOW	NON_SYNONYMOUS_STOP	Variant causes stop codon to be mutated into another stop codon (the new codon produces a different AA). e.g.: Atg/Ctg, M/L (ATG and CTG can be START codons)
LOW	SPLICE_SITE_REGION	A sequence variant in which a change has occurred within the region of the splice site, either within 1-3 bases of the exon or 3-8 bases of the intron.
LOW	SPLICE_SITE_BRANCH	A variant affective putative (Lariat) branch point, located in the intron.
LOW	START_GAINED	A variant in 5'UTR region produces a three base sequence that can be a START codon.
LOW	SYNONYMOUS_CODING	Variant causes a codon that produces the same amino acid e.g.: Ttg/Ctg, L/L
LOW	SYNONYMOUS_START	Variant causes start codon to be mutated into another start codon. e.g.: Ttg/Ctg, L/L (TTG and CTG can be START codons)
LOW	SYNONYMOUS_STOP	Variant causes stop codon to be mutated into another stop codon. e.g.: tAA/tAG, */*
MODIFIER	CDS	The variant hits a CDS.
MODIFIER	DOWNSTREAM	Downstream of a gene (default length: 5K bases)
MODIFIER	EXON	The variant hits an exon (from a non-coding transcript) or a retained intron.
MODIFIER	GENE	The variant hits a gene.
MODIFIER	INTERGENIC	The variant is in an intergenic region
MODIFIER	INTERGENIC_CONSERVED	The variant is in a highly conserved intergenic region
MODIFIER	INTRAGENIC	The variant hits a gene, but no transcripts within the gene
MODIFIER	INTRON	Variant hits and intron. Technically, hits no exon in the transcript.
MODIFIER	INTRON_CONSERVED	The variant is in a highly conserved intronic region
MODIFIER	MICRO_RNA	Variant affects an miRNA
MODIFIER	TRANSCRIPT	The variant hits a transcript.
MODIFIER	REGULATION	The variant hits a known regulatory feature (non-coding).
MODIFIER	UPSTREAM	Upstream of a gene (default length: 5K bases)
MODIFIER	UTR_3_PRIME	Variant hits 3'UTR region
MODIFIER	UTR_5_PRIME	Variant hits 5'UTR region
MODIFIER	NEXT_PROT	A 'NextProt' based annotation. Details are provided in the 'feature type' sub-field (ANN), or in the effect details (EFF).

これらの情報をもとに、新奇出穂関連遺伝子の解析に利用している集団のドナー品種 (Deng Pao Zhai (DPZ)、Khao Nam Jen(KNJ)、Qiu Zao Zhong(QZZ) および Tupa 121-3(TUP)) に対して、機能に与える影響 (IRGSP ver.1, Nipponbare を基準とする) が High を示す遺伝子座を全遺伝子座 (45,900 loci) に対して計数した。その結果、熱帯日本型品種の Khao Nam Jen では重篤な変異が少なく、他のインド型品種では多い傾向がみられた (表 2)。インド型品種ではもっとも重篤な変異である High に属する遺伝子数は、全遺伝子数の約 9% を占めており、イネゲノムのサイズを 373Mb とすると約 12 loci/Mb 存在することが明らかとなった。これに加えて Moderate の変異を加えると多数の変異候補遺伝子が存在すると考えられた。すなわち、配列情報を用いたアリルマイニングによって遺伝子を絞りこむためには、正遺伝学的にかなり領域を狭める必要があることが明らかとなった。一方で、多型頻度の少ない熱帯日本型品種などの場合は、アリルマイニングが容易になる可能性が示唆された。

表 2. ドナー品種における遺伝子座の変異程度

	High	Modelate	Low	Modifier
DPZ	4565	20951	21615	35355
KNJ	1624	6923	6455	33507
QZZ	4136	19499	20334	35356
TUP	4284	19942	20723	35389

遺伝子の変異状況を可視化すると同時に、それらの機能変異に応じてアレルを分類するためのアレルマイニングツールを構築するためのプラットフォームとして TASUKE (Kumagai and Kim et al.,2013) を利用した。具体的には、TASUKE の 'Tools 'タブに 'Allele Mining 'メニューを追加し、その下にフィルタリング用のフォームを用意することで、品種間および品種群間で機能変異がみられる遺伝子座のリストおよび変異の抽出が可能となるようにした。さらに、リファレンスゲノムである日本晴との比較のみならず、任意の 2 品種間における変異を抽出することも可能とした ( 図 1 )。

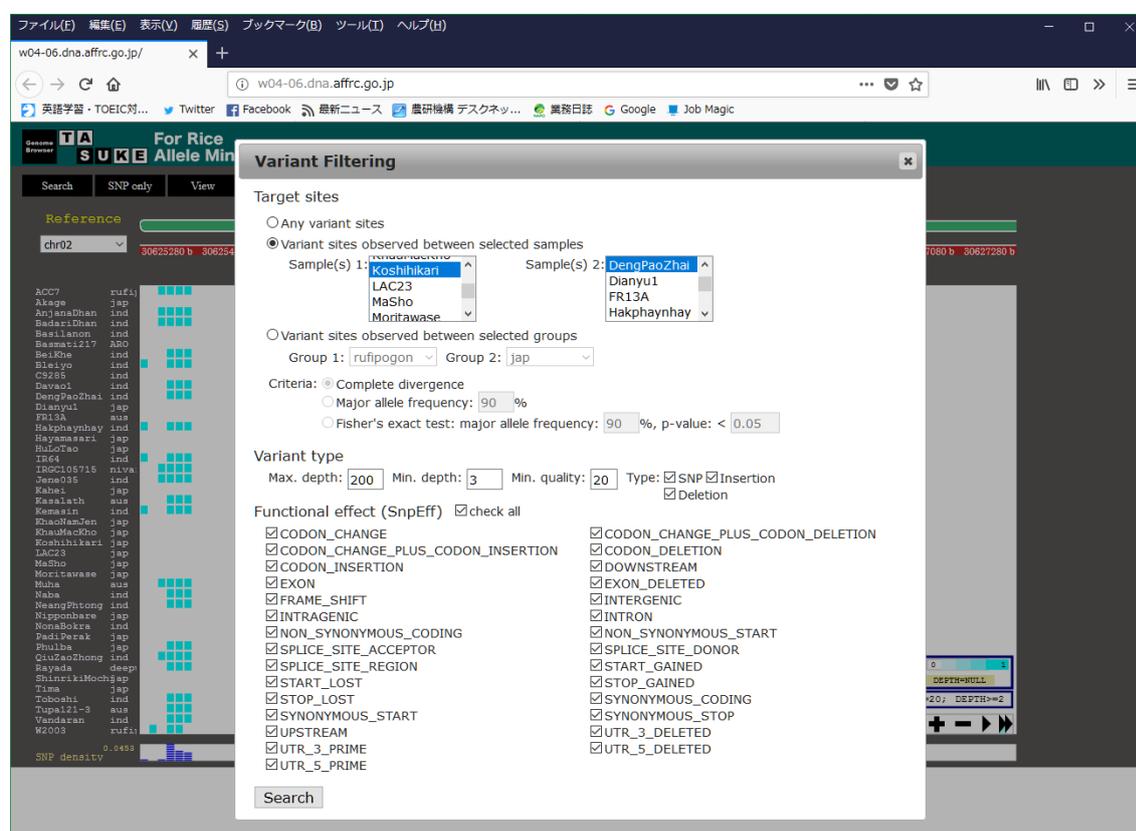


図 1 . アレルマイニングツール画面

構築したアレルマイニングツールの有効性を検証するため、アレル解析で利用した QZZ、KNJ、DPZ および TUP に加え、前述の論文で QTL 解析に利用されている、はやまさり (HAY)、Muha (MUH)、Basilanon (BAS)、Khau Mac Kho (KMK)、Naba (NAB)、Bei Khe (BAK)、Bleiyo (BLE) の 11 品種における QTL 検出の有無と、既知の出穂関連遺伝子 *Ghd7* (Xue et al. 2008) に関する遺伝子変異に

ついて調査した。具体的には、11品種とコシヒカリをアリルマイニングツール上で抽出表示し、*Ghd7*の遺伝子座における変異パターンとQTL検出の有無(Hori et al. 2015)を比較した結果、3種類のハプロタイプが存在し、それらと表現型が一致していた。HAYとQZZではこの領域に欠失とみられる変異が検出されると同時に相加効果が7.1~10.9と正の値を示し、NAB、BAK、BLEおよびDPZでは複数の共通したSNPがされると同時に-3.1~-7.0と負の値を示していた(図2)。このことから、候補遺伝子が選抜された場合には表現型との連関からアリルマイニングツールを使ったマイニングできる可能性が見出された。



図2. *Ghd7* 遺伝子座におけるハプロタイプ変異

## 2. ゲノムワイド Indel マーカー開発

### 【材料および方法】

有用形質に關与するゲノム領域の特定および有用形質に關与するゲノム領域を導入した準同質遺伝系統を作製するためには、それらの領域を遺伝背景と識別するためのマーカーが多数必要である。そこで、次世代シーケンサーで解読した複数品種の配列情報を一部利用し、多型検出が容易な挿入欠失 (Indel) マーカーの開発を進めた。具体的には、温帯日本型品種 (コシヒカリ)、熱帯日本型品種 (KNJ、Khau Mac Kho)、インド型品種 (Bei Khe、Bleiyo、DPZ、Basilanon、Nona Bokra、QZZ)、アウス型品種 (Kasalath、TUP) における次世代シーケンサーを用いた配列解析を行い、コシヒカリと多型が得られるような精度の高い検出が容易な Indel 領域 (DP > 5、Indel size > 10) を特定した。そして、Khao Nam Jen を含む 8 品種以上で共通に検出された 915 マーカー (KNJ8-indel) および、5 品種以上で同位置に検出された 9,899 マーカー (C5-indel) をそれぞれデザインした。それらの中でそれぞれランダムに選んだ 120 および 785 マーカーについてコシヒカリとドナー 9 品種を含む 23 品種で検証を行った。

### 【結果および考察】

10 品種の配列解析情報を用いて全ての挿入欠失領域の数をコシヒカリと比較した結果、熱帯日本型は約 5 倍、インド型は 14 倍、アウス型は 13 倍程度あることが明らかになった (表 3)。また、アガロースゲルを用いて検出が容易と考えられる Indel 数は 9,462 ~ 35,921 個存在し、ゲノムワイドにマーカーを作出するには十分であると考えられた。そしてこれらの Indel 領域を包含するマーカーを一部作出し、23 品種に対して電気泳動を行った結果、21 品種でシングルバンドが得られたマーカーが、KNJ8-indel で 100 (83.3%) および C5-indel で 580 (73.9%) であったことから、これらのマーカーセットは高い確率で利用可能と考えられた (図 3)。

表3. 次世代シーケンサーで解析された塩基数と Indel 数

品種	品種群	リード配列の塩基数 (Gb)	Indel総数	コシヒカリに対するIndel割合	Indel数 (DP>5 & indel size >10)
Basilanon	熱帯日本型	17.7	234,431	9.4	22,815
Bei Khe	インド型	16.6	341,433	13.7	32,514
Bleiyo	インド型	22.6	336,533	13.5	34,069
Deng Pao Zhai	インド型	17.9	334,157	13.4	32,953
Kasalath	アウス型	14.2	334,087	13.4	29,871
Khao Nam Jen	熱帯日本型	21.0	107,797	4.3	9,462
Khau Mac Kho	熱帯日本型	22.9	125,815	5.1	11,755
Koshihikari	温帯日本型	19.9	24,898	1	1,648
Nona Bokra	インド型	26.1	347,557	14	35,921
Qiu Zao Zhong	インド型	17.3	324,021	13	31,215
Tupa 121-3	アウス型	16.8	323,633	13	29,388

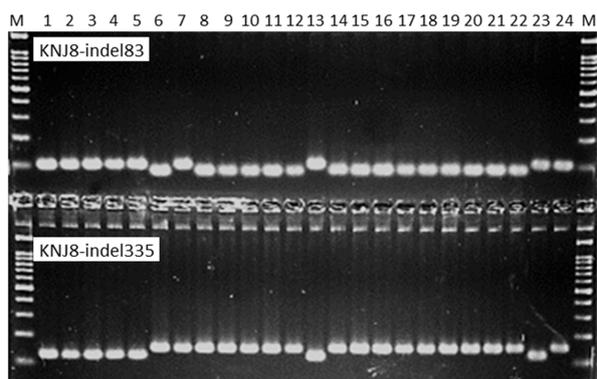


図3. KNJ-8 indel マーカーセットにおける電気泳動例

(2) 正遺伝学的手法による候補遺伝子の絞り込み

1. TILLING による候補遺伝子の特定

【材料および方法】

新奇出穂関連遺伝子が座上していると考えられる候補領域において、配列変異およびシロイヌナズナの開花関連遺伝子のオルソログなどから 5 個の候補遺伝子を選抜した。そして、コシヒカリの突然変異系統を用いた TILLING 法により当該遺伝子に変異が包含されている 18 系統を選抜して出穂調査を行い、当該遺伝子の出穂に与える影響を調査した。

【結果および考察】

TILLING 法で選抜したコシヒカリ突然変異 18 系統の到穂日数を調査し、コシヒカリ原品種と比較した結果、5 系統で有意に晩生、1 品種で有意に早生の表現型を示した(図4)。一方、晩生系統の大半は早生と晩生の両方に分離を示したことから、生理的な生育遅延などの可能性も考えられた。有意に早生を示した系統では、早生への分離が多かったことから候補遺伝子との関係が示唆された。

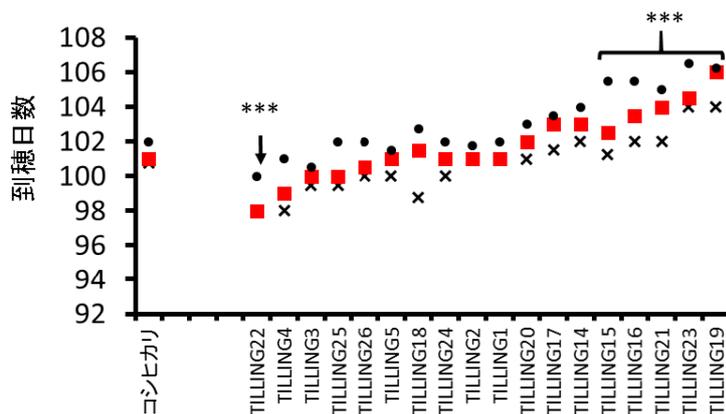


図4.TILLING 18 系統各最大 20 個体の到達日数

( □ : 第 3 四分位、● : 中央値、× : 第 2 四分位 )

(\*\*\*:系統平均値とコシヒカリ平均値の比較における Dunnett 検定で  $P < 0.01$  で有意差有り)

### 3) 成果活用における留意点

アレルマイニングツールについては、配列情報および論文とともに公開する予定であることから、IVG2003 で公開される CSSLs と合わせて広く利用することが可能である。また、Indel マーカーについては、すでに論文として公開していることから研究および育種に幅広く利用可能である (Yonemaru et al. Breed Sci. 2015 65(3):249-256 )。

### 4) 今後の課題

現在、アレルマイニングを行っている新奇出穂関連遺伝子については、引き続き研究を進め遺伝子単離を行う必要がある。また、出穂関連形質には生理的な要因を含め多数の遺伝子が関与していることが予想されることから、複数遺伝子に変異を包含する可能性の高い TILLING 系統の直接評価では、変異遺伝子との関係は必ずしも明確にならない可能性があり、迅速に戻し交雑を行い評価する必要性がある。

「遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405960

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発 (IVG)

小課題番号: IVG2003

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: 実験系統群を用いたフェノーム解析と連鎖遺伝子の同定

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 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・山本敏央

## 1) 研究目的

農業形質に關与する複数の遺伝子は互いに解析のノイズとなるため、個々の遺伝子の特定が難しい。有用な遺伝子を効率よく見出すためには、均一な遺伝背景に、単一あるいは少数の染色体断片を導入し、そのようなノイズを減らした実験系統群（染色体断片置換系統、CSSL）を利用することが望ましい。本課題では、多様な世界のイネ品種等を対象に CSSL を作成し、稈長や穂形質などの基本特性データを収集する。さらに、農業特性の例として種子の形（粒形）を解析し、従来の方法では検出の難しい遺伝子座を網羅的に見出し、開発する実験系統群の有用性を実証する。また、CSSL に比べて置換領域をさらに狭めた実験系統 sub-CSSLs（ヘテロ）を整備する。以上の取り組みによって、多様な品種から効率的に遺伝子の発掘し利用するためのしくみを構築する。

## 2) 研究成果

### (1) 染色体断片置換系統の基本特性評価

アジア栽培稲品種 Davao1、唐干、および NERICA 品種の片親のアフリカ栽培稲品種 CG14 について、標的領域および遺伝背景の遺伝子型調査と戻し交雑を行うことで CSSL 作成し、親品種とともに出穂日、稈長、穂長、穂数、および粒形等の特性を調査した。同様に、アジア栽培稲品種 Deng Pao Zhai、Naba、Bleiyo、Qiu Zhao Zong、Muha、Basilanon、あるいは Silewah およびそれらに關する CSSL（Silewah はひとめぼれを片親、それ以外はコシヒカリを片親として作出）の特性を評価した。その結果、各系統群の親品種はコシヒカリあるいはひとめぼれとは特性が大きく異なったが、作出した系統群の特性は、コシヒカリ、あるいはひとめぼれに近く、DNA レベルあるいは詳細な形質比較によって相互に違いを見出した。このことから、両親間の特性の違いは、効果の大きな少数の遺伝子によって決定されるのではなく、効果の小さな多数の遺伝子が関わることを確認した。今回作出した実験系統群を用いることで、農業形質に關わる遺伝子を効率的に検出できるものと期待される。実際に、重回帰分析を用いて各形質に關与する遺伝子の数を推定したところ、調査してケースの約 73 % において集団 × 形質の組合せにおいて、10 個以上の遺伝子の存在が示唆される。

### (2) 派生分離集団をもちいた粒形の網羅的な解析

14 種類の BC4F2 集団（コシヒカリ背景：IR64、LAC23、オワリハタモチ、Bei Khe、Tupa121-3、Khao Nam Jen、Khau Mac Kho、Deng Pao Zha、Naba、Bleiyo、Qiu Zhao Zong、Muha、Basilanon、IR64 背景：コシヒカリ）について粒形（粒長および粒幅）を調査し、これらの特性に關する遺伝子を探索した。コシヒカリ背景の IR64 に關する系統、および IR64 背景のコシヒカリに關する系統を用いることで、合計 65 カ所にコシヒカリと IR64 の粒長と粒幅の違いを決定する遺伝子を検出した（図）。同様に他の品種に關する系統に關する調査を行うことで、粒形に關する新規を含め多数の遺伝子座を見出した。14 種類の集団での結果を染色体上の位置、効果の大きさ等を考慮して整理したところ、粒長で合計 123 カ所、粒幅で 113 カ所に遺伝子を見出した。このことから、アジア栽培稲品種の粒形の多様性は、多数の遺伝子の組合せによって決定されることがわかった。

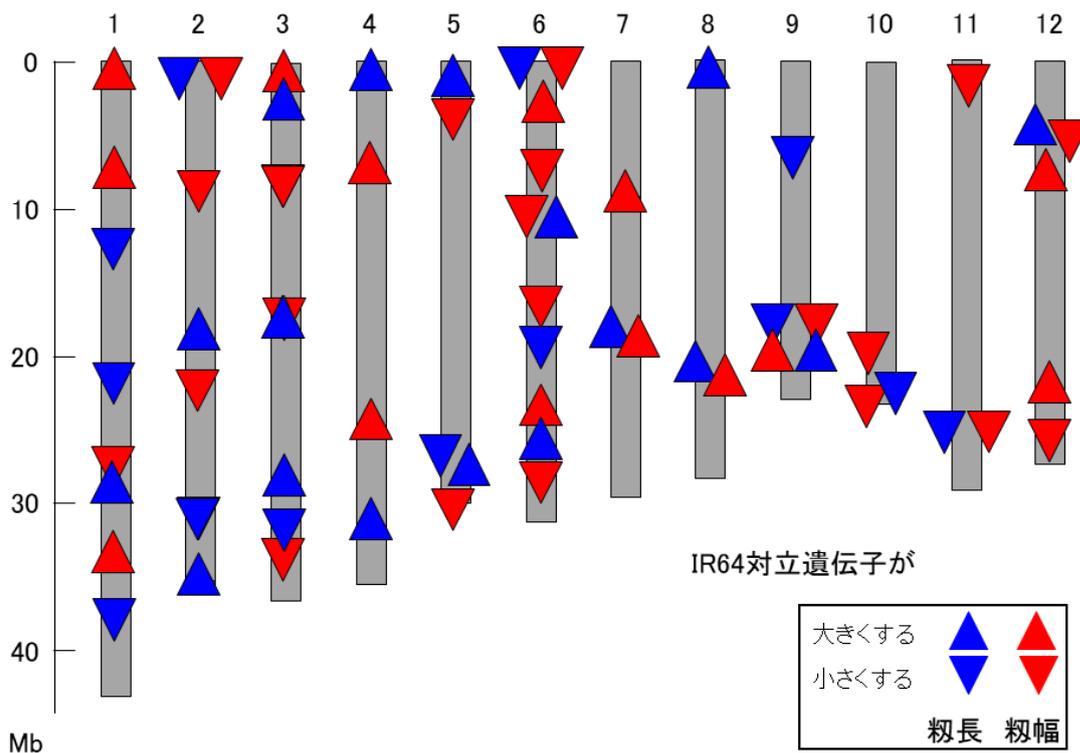


図. コシヒカリとIR64の種子形(籾長・籾幅)の違いを決定する65カ所の染色体領域

### (3) 粒形に関する見出した遺伝子の確認

派生分離集団で見出した遺伝子の効果を確認するため、別の集団(BC4F3)を用いて解析し、存在する領域の限定を試みた。新規と考えられる遺伝子を含むと考えられる場所を中心に、合計45カ所を調査したところ、41カ所で効果を確認でき、遺伝子が存在する範囲を、0.5-4.5Mbに限定した。今回の解析では、既報の大きな効果を持つ遺伝子を多少とはしておらず、調査した場所の90%以上において遺伝子の存在を確認できたことは、派生分離集団を用いた解析の精度を裏付けるものである。

### (4) sub-CSSLs(ヘテロ)の整備

派生分離集団を用いた解析の有用性が示されたことから、汎用的な派生分離集団として、遺伝背景の固定度がさらに高く、分離する染色体領域の範囲がCSSLと同等あるいは短い集団を作成した。CSSLとこの集団sub-CSSLs(ヘテロ)とを組み合わせることで、遺伝子の発掘から、確認、存在範囲の限定までを迅速に行うことができる。IR64、LAC23、オワリハタモチ、Bei Khe、Tupa121-3、Khao Nam Jen、Khau Mac Kho、Deng Pao Zhai、Naba、Bleiyó、Qiu Zhao Zong、Muha、Basilanon等について、sub-CSSLs(ヘテロ)に利用できる個体を選定した。同一の染色体領域を標的とするが、遺伝背景の状態が異なるものなどを含めて、各品種について、275-527集団を選定した。

### 3) 成果活用における留意点

Deng Pao Zhai、Naba、Bleiyó、Qiu Zhao Zong、Muha、Basilanon、あるいはSilewahに関するCSSは材料移転契約(MTA)にて配布する。CSSLを構成する一部の系統では、標的領域がヘテロとなっており、形質評価、採種の際に注意が必要である。そのような系統の後代から得られる標的が固定した個体の種子稔性は著しく低い場合が多い。CSSLを構成する一部の系統では、他と採種年度が異なるものが含まれる。したがって、配布種子で種子の成分等の比較、あるいは初期生育特性を評

価する際に注意が必要である。

#### 4) 今後の課題

Davao1、唐干、およびNERICA 品種に関するCSSLについては、一部種子の増殖を行う必要がある。本研究で得たCSSLの遺伝子型に関する情報等は、順次公開する。

「遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405960

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発 (IVG)

小課題番号: IVG3001

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: デンプン代謝の改変による乳白粒低減高品質イネの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 農研機構 中央農業研究センター・作物開発研究領域・育種素材開発・評価グループ・山川博幹

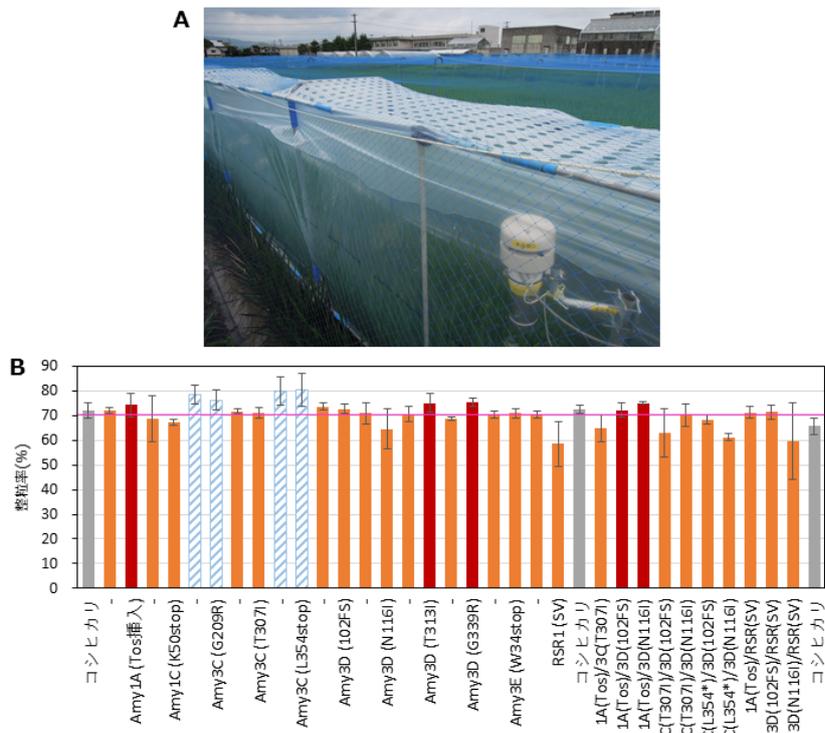
## 1) 研究目的

近年の温暖化によって、乳白粒の発生による米品質の低下や、従来良食味とされた品種の食味変化が問題となっている。乳白粒は登熟期の高温によって白米部分へのデンプンの蓄積が阻害されて生じると考えられており、デンプン分解酵素  $\alpha$ -アミラーゼの抑制およびリン脂質代謝酵素の改変によって乳白粒を低減できることが示されている。一方、食味変化については、登熟期の気温によってデンプン構成成分アミロースの含量が変動することが要因と考えられている。本課題では、(1)  $\alpha$ -アミラーゼおよびリン脂質代謝酵素の遺伝子機能欠損変異等の探索・活用による実用的な乳白粒低減イネ素材の開発、および(2) 遺伝変異の活用による気候変動下でも安定して良食味を示すアミロース含量制御素材の開発を行う。

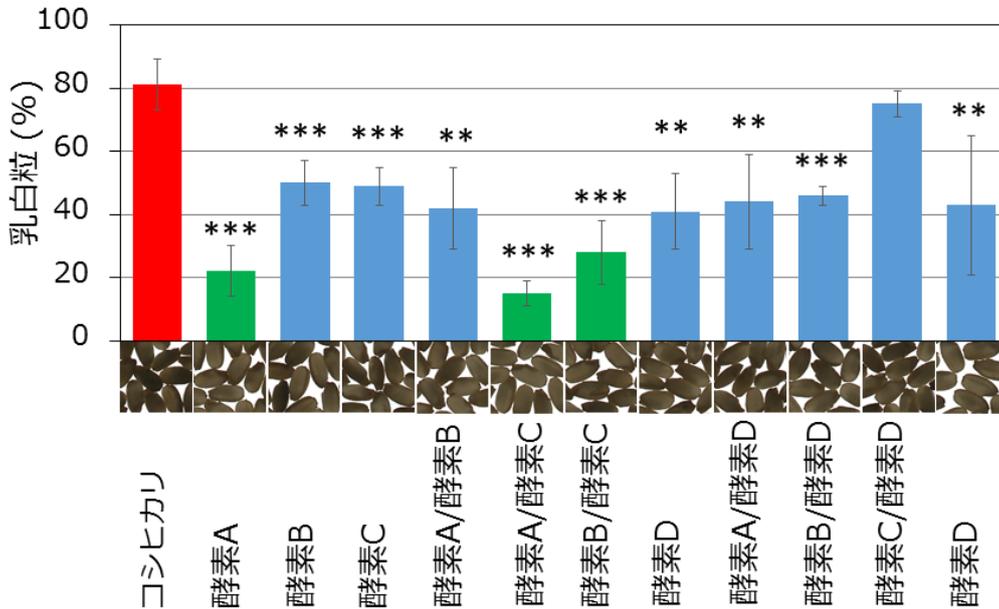
## 2) 研究成果

### 1) デンプンおよびリン脂質等の登熟代謝の改変による乳白粒低減イネの開発(中央農研)

すべての  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子および主要なリン脂質代謝酵素の機能欠損型変異を取得し、戻し交配によってそれらの単欠損および二重欠損変異イネを作出して、加温圃場および温室において登熟期に高温処理を施し、玄米外観品質への影響を評価した。その結果、登熟期種子の胚乳で発現する  $\alpha$ -アミラーゼに相当する *Amy1A* 欠損、*Amy3D* 欠損、*Amy1A / Amy3D* 二重欠損によって、乳白粒低減効果が認められた(図1)。リン脂質代謝酵素では、酵素 A、酵素 B、酵素 C、酵素 D のいずれかの遺伝子欠損で乳白粒が低減し、酵素 A 欠損、酵素 A/酵素 C 二重欠損、酵素 B/酵素 C 二重欠損では著しい乳白粒低減効果が認められた(図2)。



**図1 α-アミラーゼ変異系統の玄米品質**  
 (A)圃場でのビニル被覆高温処理。天面も有孔ポリで被覆した。  
 (B)整粒率。出穂後20日平均気温は26.2℃。  
 斜線系統は出穂遅延のため登熟気温が1.9℃低い。



**図2 リン脂質代謝酵素変異系統の玄米品質**  
 出穂後20日平均気温は31.5℃(昼温34℃/夜温29℃)。  
 写真は玄米の透過光像。

## 2) アミロース含量のファインチューニングによる良食味イネの開発（新潟大）

コシヒカリおよびひとめぼれの変異集団から、アミロース含量が低減した変異系統を選抜し、原品種の連続戻し交配によって準同質遺伝子系統（NIL）を育成した。本系統群はそれぞれ1-2%刻みのアミロース含量を示し、アミロース含量の自在な微調整が可能となった（図3）。これらの構成系統を多様な登熟温度条件で圃場栽培し、アミロース含量を測定したところ、コシヒカリの低アミロース含量変異NILの内の2系統は、登熟気温の影響を受けにくく安定して10%程度のアミロース含量を示すことが明らかとなった。また、コシヒカリとミルククイーンの間程度のアミロース含量を示す1系統は、反復試験が必要ではあるが、コシヒカリを上回る食味を示した。

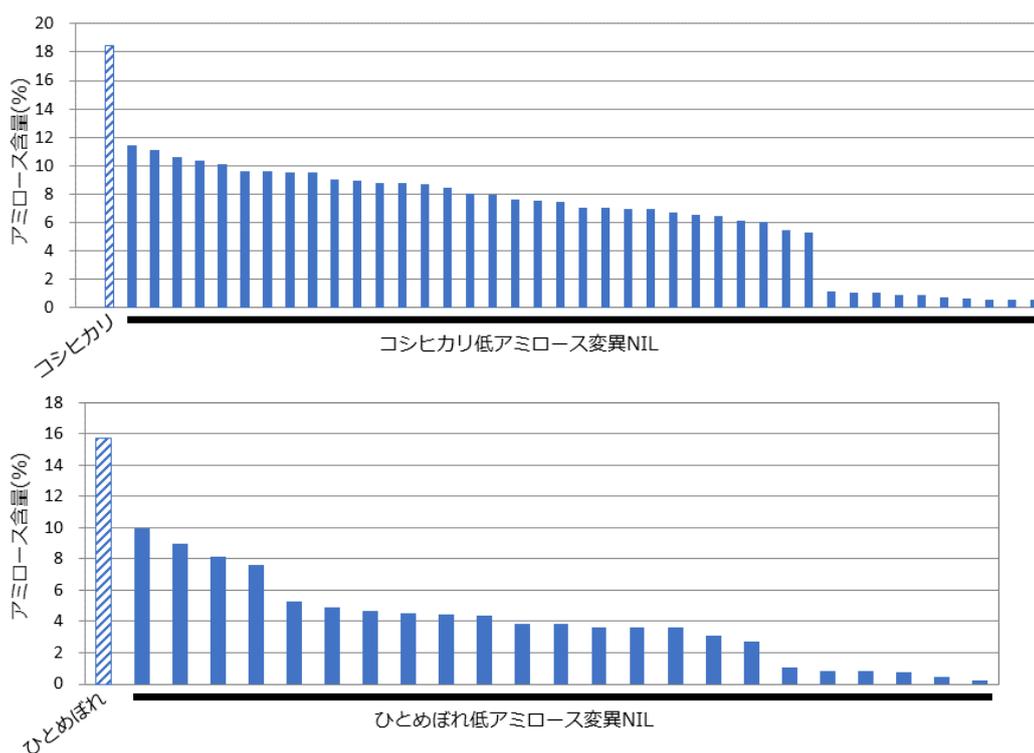


図3 玄米アミロース含量が低減したコシヒカリNILおよびひとめぼれNIL

## 3) 成果活用における留意点

- ・ -アミラーゼ (*Amy1A* と *Amy3D*) およびリン脂質代謝酵素 (酵素 A-D) の6 遺伝子の欠損で乳白粒低減効果が認められたが、コシヒカリ背景での結果である。これらの変異アリルは、作成された連鎖 DNA マーカーを用いて、任意の品種へ導入することで高温登熟耐性品種開発に利用できるが、育成系統において粒形等の収量性や発芽勢等の農業形質に影響がないことを、圃場での生産力検定等で確認する必要がある。

- ・ アミロース含量低減コシヒカリおよびひとめぼれは、劣悪形質を除去した NIL が育種利用可能であるが、連鎖 DNA マーカーが未開発であるため、現時点では、交配後代のアミロース含量を確認しながら利用する必要がある。

#### 4) 今後の課題

リン脂質代謝酵素のうち、集積による相乗効果の大きい酵素 A、酵素 B、酵素 C について三重変異を作出し、高温登熟耐性のさらなる強化を目指す。また、低温年でも十分な高温処理が施せる加温方法の検討、有望系統の圃場生産力検定が残された課題である。

アミロース含量低減変異では、原因遺伝子同定、DNA マーカー作成、育種利用が残された課題である。

「遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405960

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発 (IVG)

小課題番号: IVG3002

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: アミロペクチン改変により食味を改良したイネの開発

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 福井県農業試験場・ポストコシヒカリ開発部・小林麻子

## 1) 研究目的

近年、食味の多様化が進み、コシヒカリとは異なる食味特性をもつ品種が育成されている。それらの食味特性はアミロース含有率やタンパク質含有率のみでは説明できず、澱粉の約 8 割を占めるアミロペクチンが、食味特性に影響を与えていると考えられる。

本研究では、食味特性を制御するアミロペクチン合成に関わる遺伝子を推定し、アミロペクチン含有率や側鎖の鎖長分布の改変によって、人為的に炊飯米の食味特性を変化させ、コシヒカリとは異なる新しい食感をもつ米、澱粉が老化しにくい米、登熟温度に影響されない安定した食味特性をもつ米など、それぞれの育種目的に最適化した食味特性を有する育種素材を作出することを目的とする。これらの素材は、高温でも食味が低下しない温暖化適応イネの育種へも提供する。

## 2) 研究成果

### 1) アミロペクチン生合成に関する突然変異体の取得

アミロペクチン生合成に関与する遺伝子 (*SSIIa*, *SSI*, *BEIIb*, *BEI*, *ISA1*) についての日本晴またはコシヒカリの突然変異体、およびインド型イネの染色体断片を導入したコシヒカリの CSSL について、食味官能試験と理化学分析 (アミロース含有率、アミロペクチン鎖長分布、糊化粘度特性) を行った。

突然変異体について、原品種コシヒカリとは明らかに異なる食味を持つ 9 系統、原品種日本晴とは明らかに異なる食味を持つ 3 系統を得た (表 1)。代表例として、コシヒカリの DEB × 2 変異体 (*BEIIb* 変異) である系統 K4 は硬く粘りが弱い食感を示し、アミロペクチンの短鎖が大きく減少した (図 1)。日本晴の *Tos* ミュータント (*BEIIb* 変異) である系統 N2 は硬く粘りが弱い食感を示し、アミロペクチンの短鎖が減少した (図 1)。

CSSL について、コシヒカリとは明らかに異なる食味特性を示す 8 系統 (C1 ~ C8) を得た (表 2)。

表1 コシヒカリまたは日本晴突然変異体において食味変化が見られた系統\*

原品種	系統番号	遺伝子	粘り	硬さ	アミロース含有率	アミロペクチン変化
コシヒカリ	K1	<i>SSIIa</i>		-	↑	<未調査>
	K2	<i>SSI</i>	-	+		
	K3			-	↑	極短鎖↑、中鎖↑
	K4	<i>BEIIb</i>	-	+		短鎖↓↓、中鎖↑
	K5		-			短鎖↑
	K6				-	
	K7	<i>BEI</i>		-		
	K8	<i>ISA1</i>		-		<未調査>
	K9				-	短鎖↑↑
日本晴	N1	<i>SSIIa</i>	-	+		短鎖↓↓、中鎖↑
	N2	<i>BEIIb</i>	-	+		短鎖↓
	N3		-	+		<未調査>

\*2015、2016、2017年の3カ年（一部の系統は2016、2017年の2カ年）で共通してコシヒカリまたは日本晴と異なる食味を示した系統。

-：粘りが弱くなる、軟らかくなる +：硬くなる

↓：含有率減少 ↑：含有率増加

表2 コシヒカリのCSSLにおいて食味変化が見られた系統\*

ドナー	系統番号	導入領域に含まれる遺伝子	粘り	硬さ	アミロース含有率	アミロペクチン変化
Bei Khe	C1	<i>BEIIb, Amy1A,1C</i>		-	↓	
	C2	<i>Amy3A,3B,3C</i>		-		短鎖↓、中鎖↑
Tupa121-3	C3	<i>BEIIb</i>		-	↓	
	C4	<i>Amy3D,3E</i>	-	+		短鎖↑
Bleiyo	C5	<i>BEIIb</i>		-	↓	
	C6	<i>SSIVa, AGPL1</i>		-		短鎖↓、中鎖↑
Qiu Zao Zhong	C7	<i>BEIIb</i>		-	↓	短鎖↓、中鎖↑
	C8	<i>BEIIIb</i>		-	↓	

\*2015、2016、2017年の3カ年（一部の系統は2015、2016の2カ年）で共通してコシヒカリと異なる食味を示した系統。

-：粘りが弱くなる、軟らかくなる +：硬くなる

↓：含有率減少 ↑：含有率増加

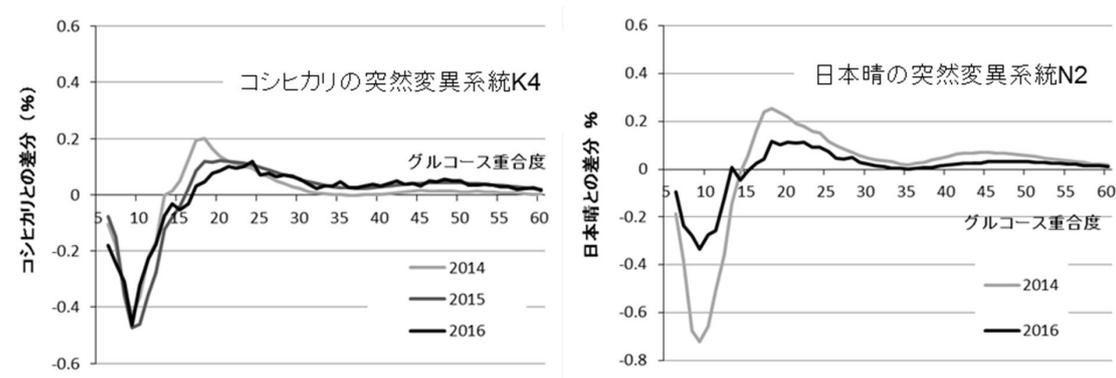


図1 アミロペクチン鎖長分布

※コシヒカリまたは日本晴との差分で示した。

## 2) 食味特性を制御するアミロペクチン生合成に関わる遺伝子の解明

コシヒカリおよび日本晴突然変異体の食味特性の変化と理化学分析の解析結果は表1のとおりである。BEIIb、BEI 遺伝子の変異体では、アミロペクチン短鎖が減少し、硬く、粘りが弱くなる傾向が見られた。SSIIa、SSI 遺伝子の変異体では、硬くなる系統と軟らかくなる系統の両方が見られた。ISA1 遺伝子の変異体では、軟らかくなる系統および粘りが弱くなる系統が見られた。

CSSL について、インド型イネ Tupa121-3 の Amy3D 及び Amy3E 遺伝子を含む領域が導入された系統では、炊飯米が硬く、粘りが弱くなった。一方、インド型イネ Tupa121-3、Bleiy0 および Qiu Zao Zhong の BEIIb または BEIIIb 遺伝子を含む領域が導入された系統では、炊飯米が軟らかくなる傾向があった(表2)。

コシヒカリ第6染色体短腕の GBSSI、SSI、SSIIa 遺伝子を含む領域をインド型イネ Tupa121-3 で置換した sub-CSSL を用いて食味特性の解析を行った。GBSSI 領域を置換すると高アミロースとなり、SSIIa 領域を置換するとアミロペクチン短鎖の割合が大きく減少し、SSI 領域を置換するとやや硬く、粘りがやや弱い食感となることが確認された。

以上から、アミロペクチン構造は炊飯米の物性に大きく関与し、短鎖が少ないと粘りが弱く、硬くなることが明らかとなった。また、アミロペクチン生合成に関与する遺伝子のうち、SSI、SSIIa、BEIIb、ISA1 の変異により、アミロペクチン短鎖の割合が変化したが、同一遺伝子でも変異の入り方により鎖長分布や食味の変化は多様であることも示唆された。

## 3) 登熟温度とアミロペクチン鎖長分布および食味特性の関係解明

既存7品種(コシヒカリ、つや姫、あきさかり、日本晴、ヒノヒカリ、にこまる、さがびより)を高温ハウスおよび圃場で栽培し、食味官能試験と理化学分析(アミロース含有率、アミロペクチン鎖長分布、糊化粘度特性)を行った。登熟気温と糊化開始温度の間には年次を通して有意な正の相関が見られた(図2)。アミロペクチン短鎖が少ないと糊化開始温度が高くなることが知られており、高温登熟では、アミロペクチン短鎖が減少し、米飯の粘りの低下を引き起こすことが明らかとなった。また、この関係には供試した7品種の中では品種間差がないことも明らかとなった。

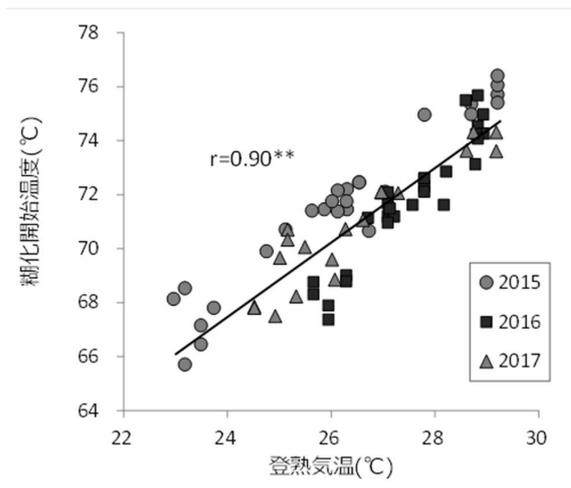


図2 登熟気温と糊化開始温度との関係

※糊化開始温度はRVAにより測定した。

### 3) 成果活用における留意点

アミロペクチン生合成に關与する遺伝子の発現は、登熟気温によって変化することが知られているため、今回得られた変異体や CSSL の食味は栽培環境により異なる可能性がある。

### 4) 今後の課題

突然変異体および CSSL の解析により、同じ遺伝子でも、変異の入り方で食味への影響は多様であった。今後も食味を制御するアミロペクチン生合成に關与する遺伝子と食味との関係解析を継続する必要がある。

高温登熟と食味との関係について、今回用いた7品種では品種間差が見られなかった。登熟温度に影響されない安定した食味特性を示す遺伝資源の探索を進める必要がある。

# 「遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405960

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発 (IVG)

小課題番号: IVG3003

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: イネ穂発芽耐性遺伝子の解析とコムギスーパーアリの取得

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: 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

## 1) 研究目的

本来乾燥した気候を好むコムギにとって日本での栽培条件は多湿であることから、降雨により収穫前に発芽することで品質が極端に低下する穂発芽による被害が見られる。そのため、穂発芽耐性を付与する事が品種の育成上重要な課題となっている。本課題はゲノム配列が解読され、穂発芽耐性が強い品種が存在するイネの穂発芽耐性遺伝子の単離を通して穂発芽耐性機構を理解し、その知見をもとに、コムギに穂発芽耐性を付与する有用遺伝子、スーパーアリの取得を目的とする。

## 2) 研究成果

### (1) イネ穂発芽耐性遺伝子の単離と解析

本課題ではイネの自然変異を活用した遺伝子単離に取り組んできた。この中で近縁野生種であるグルメパチュラを供与親とするイントログレッション系統 (IL) を用いた穂発芽耐性遺伝子の検出に取り組んだ結果、第 11 番染色体が置換されている系統で穂発芽耐性が見出された。そこで、F3 世代を用いた QTL 解析の結果、2 つの QTL が検出され、これらを *Sdr14a* と *Sdr14b* と名付けた。さらに、高精度連鎖解析により、*Sdr14a* の候補領域は 35-kb まで縮小され、グルメパチュラ BAC 配列の結果から、5 個の遺伝子が候補領域内に座乗することが明らかとなった。同候補領域内には植物ホルモンのシグナル伝達に係わる転写調節因子が見出されたことから、IVG1002 に依頼し、2 つのスーパーインジゲンジャンクション変異体を得た。両系統ともに強い穂発芽耐性を示したことから、同遺伝子が *Sdr14a* であることが示された。

また、穂発芽耐性が易であるモチ品種、オワリハタモチの染色体断片置換系統を用いた穂発芽性に関わる QTL の検出に取り組んだ結果、意外なことに、数多くの穂発芽耐性 QTL が見出された (図 1)。

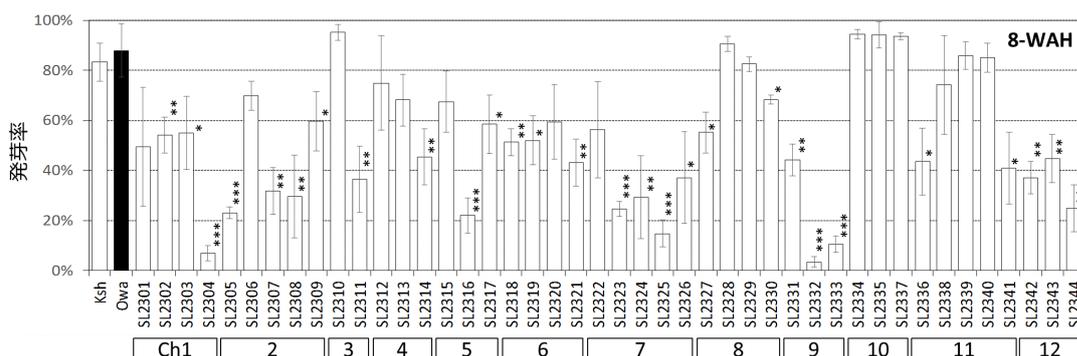


図 1: コシヒカリ/オワリハタモチ染色体断片置換系統を用いた穂発芽耐性 QTL の検出

コシヒカリを背景とし、一部がオワリハタモチゲノムに置換されている系統を栽培し、出穂後8週目に発芽試験を行った。その結果、数多くの優位な差が見出された (\*:  $P < 5\%$ , \*\*:  $P < 1\%$ , \*\*\*:  $P < 0.1$ )。

特に、第9染色体に座乗するQTLに注目し、ファインスケールマッピングを行った結果、2つのQTLが確認された(図2)。

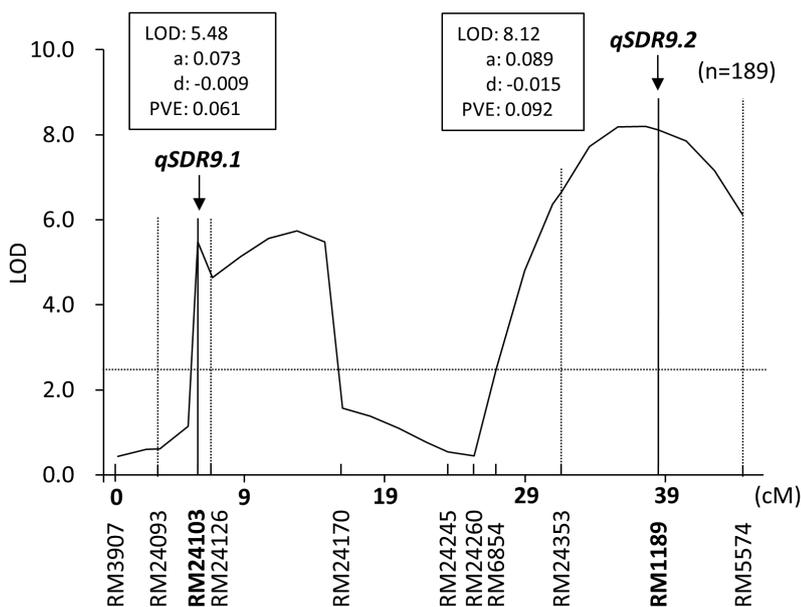


図2:第9染色体の穂発芽耐性QTLのファインマッピング

第9染色体が置換された染色体断片置換系統のBC4F2世代を用いて穂発芽耐性のQTL解析を行った。その結果、二つのピークに分離した。これにより、この2つをqSDR9.1と9.2と命名した。

そこで、これらのQTLをqSDR9.1、qSDR9.2と名付け、さらに解析を続けた。後代検定を行った結果、候補領域は4.1-Mbと2.3-Mbの領域に縮小された(図3)。

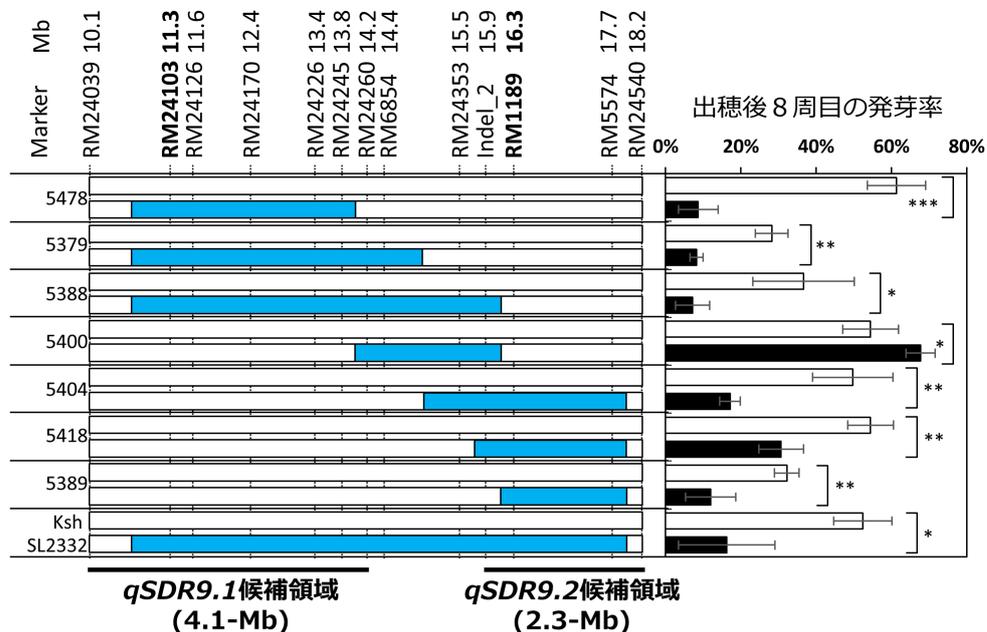


図3:第9染色体の穂発芽耐性QTLの後代検定

QTL解析に用いたBC4F2の後代から得られた組換え系統対の発芽試験を行い、有意性検定を行った。その結果、qSDR9.1と9.2の候補領域は、それぞれ、4.1-Mbと2.3-Mbとなったほか、両者の間に置換断片を持つ系統対(5400)では有意差があるものの、発芽率を上昇させていることから、2つのQTLが存在することが明確に示された。(\*:P < 5%、\*\*:P < 1%、\*\*\*:P < 0.1)

置換断片が縮小された系統を用いて、既知の穂発芽耐性遺伝子 *Sdr4* や *OsDOG1-L2*、発芽関連遺伝子の *OsHB20* の発現を解析した。その結果、*qSDR9.1* を持つ系統は吸水による両遺伝子の発現誘導のレベルが優位に高まっていた ( 図 4 )。

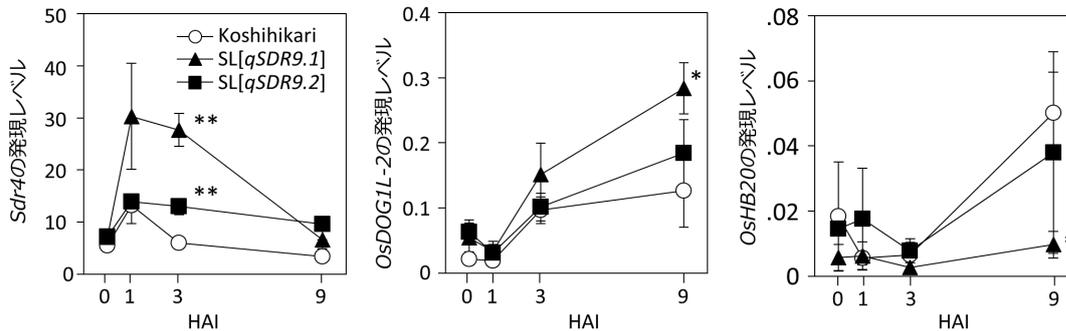


図 4 : 組換え系統を用いた発現解析

穂発芽耐性を示し、*qSDR9.1* または *qSDR9.2* を持つ系統の種子を吸水させ、経時的に休眠、発芽関連遺伝子の発現解析を行った。その結果、特に *qSDR9.1* では、穂発芽耐性遺伝子 *Sdr4* の吸水による発現誘導が高まり、*Sdr4* の下流の因子と考えられる *OsDOG1-L2* の発現誘導も促進されていた。逆に発芽因子と考えられる *AtHB20* のイネ同祖体遺伝子である *OsHB20* の発現誘導は抑制されていた。

このことから、*qSDR9.1* は *Sdr4* の上流に位置する制御因子であることが示唆された。

### ( 2 ) イネ穂発芽耐性の遺伝子レベルでの理解

これまでに単離した穂発芽耐性遺伝子 *Sdr1* は MAP キナーゼ・キナーゼ・キナーゼをコードする。そのため、MAP キナーゼ・キナーゼと相互作用し、リン酸化することが推定された。そこで、酵母ツーハイブリッドシステムにより相互作用する MAP キナーゼ・キナーゼを探索した結果、*MKK3* と相互作用することが示された。*in vitro* リン酸化実験により、*Sdr1* が *MKK3* をリン酸化したことから、*Sdr1* の下流には *MKK3* が位置することが示された。さらに、*IVG1002* に選抜を依頼し、得られた *MKK3* の変異体は発芽率が低下し、恒常的な活性型である *MKK3DD* の過剰発現により発芽率が上昇していた。これにより *in vivo* でも *MKK3* が穂発芽耐性に関与していることが示された。*MKK3* が相互作用し、リン酸化する MAP キナーゼを特定し、*IVG1002* から提供された変異体の発芽試験により、発芽率が低下することが示された。これらの解析により自然変異を利用して得られた穂発芽耐性遺伝子の下流の因子を探索することで、*MKK3* 変異体、MAP キナーゼ変異体も同様に穂発芽耐性になるなど、ネットワークの解析が素材開発につながった。

### ( 3 ) コムギスーパーアレルの取得

イネ穂発芽耐性遺伝子 *Sdr1* は発芽を促進、あるいは、休眠を打破する因子であり、破壊により穂発芽耐性を付与できる可能性がある。そこで、*Sdr1* のコムギ同祖体である *TaSdr1* の変異体を取得し、変異を集積してきた。*TaSdr1A* ナンセンス変異、*TaSdr1B* 欠失変異、*TaSdr1D* ナンセンス変異は単独では発芽への影響は全く見られず、さらに *TaSdr1A* ナンセンス変異と *TaSdr1D* のナンセンス変異を持つ二重変異系統、*TaSdr1B* 欠失変異と *TaSdr1D* ナンセンス変異の二重変異系統ともに、発芽率への影響は見られなかった。現在、*TaSdr1A* ナンセンス変異と *TaSdr1B* 欠失変異の二重変異体、*TaSdr1A*、*B*、*D* の三重変異系統の取得に取り組んでおり、こらら系統の解析が待たれる状態である。

### 3 ) 成果活用における留意点

*IVG* では遺伝子の単離や機能解析をベースとして逆遺伝学的に形質の改善に取り組んできた。一

方、自然変異は長い栽培による自然選抜、人為的な品種改良で選ばれてきた変異で有り、大きな副次的な効果を伴わない、あるいは、軽微なものと推定される。一方、遺伝子の機能から推定して得られた変異体は、本課題の場合は穂発芽耐性の付与を実現してきたが、それ以外の副次的な形質に対する影響は排除できていない。戻し交配による背景の変異の除去と、栽培により、そのような副次的な変異を持たないことを確認するなど、素材を育てることが必要である。

#### 4) 今後の課題

5年間を通して、自然変異を元にした遺伝子単離と突然変異による形質の評価を組み合わせることで形質の理解、素材開発に努めてきた。自然変異とは異なるアリルを突然変異で誘発した結果、期待通りの形質が得られている。このことから、突然変異により見出された遺伝子に自然変異が存在し、その品種の形質を決定づけている可能性も十分考えられる。自然変異は品種間差を追うことから、300塩基に1塩基程度の置換があり、候補領域を数キロ、数十キロまで縮小してもなお、遺伝子の特定は困難を極める。そのため、今後の課題としてはこれまでに構築してきた突然変異集団に内在する有望な変異を特定すると言った、順遺伝学的な手法も検討すべきである。古くから順遺伝学的なアプローチは行われてきたが、近年のゲノム解読の低コスト化により、突然変異の原因遺伝子の特定が簡便、迅速になっており、突然変異の利用が復興する時期にあると考えている。

# 「遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発」最終年度報告書

中課題番号：13405960

研究期間：平成25～29年

度

中課題名：遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発(IVG)

小課題番号：IVG3005

研究期間：平成25～29年度

小課題名：イネ出穂・登熟関連遺伝子スーパーアレルの作成と育種学的利用

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・植物科学研究領域・植物生産生理機能研究ユニット・伊藤博紀(現 次世代作物開発研究センター・基盤研究領域・フィールドオミクスユニット)

## 1) 研究目的

イネの出穂期および登熟期は、収量性や米の品質といった品種の地域適応性に影響を与える重要な農業形質である。出穂期調節は植物に固有の環境適応能力である光周性花成反応の調節により引き起こされることが明らかとなったことにより、コシヒカリの出穂期改変を目的として、インディカ品種由来の*Hd1*遺伝子や*Hd5*遺伝子を導入した関東HD1号(7日程度早生)や関東HD2号(10日程度晩生)が品種登録されている。また、日本稲間の出穂期QTLとして同定された出穂期遺伝子(*Hd16*(12日程度晩生)、*Hd17*(5日程度早生)、*Hd18*(4日程度晩生))は、ゲノム育種のツールとして導入され始めている。しかしながら、出穂期は、複数の出穂期遺伝子が関与する量的形質であり、導入する遺伝背景の影響により、出穂期改変アレルの及ぼす効果は一定とはならないため、より効率的な出穂期のデザインには、さらに多様な出穂期変異の蓄積が必要と考えられる。本課題では、コシヒカ리를母本として、本州のイネ育種への利用が行われていない花成抑制因子*Ghd7*等、既存の有用変異が希少な既知出穂期関連遺伝子について新規変異を人為突然変異集団から取得および既成CSSL系統から段階的な出穂期変化をコシヒカリ背景で誘導する出穂期変化型コシヒカリ準同質遺伝子系統群の作出を通じて、出穂期のファインチューンに有用な新規育種素材の開発を目指す。

## 2) 研究成果

### (1) 出穂期関連遺伝子の新規変異体のスクリーニングおよび系統化

既知出穂期関連遺伝子の新規変異取得は、IVG1002で構築されたミュータントライブラリーDNAを用いてTILLING法により選抜し、合計54種のアミノ酸置換変異を同定した。*Ghd7*遺伝子については、既存の*ghd7*欠損と同等の効果を有するナルアレルに加えて、マイルドな出穂変化を誘導する系統を独立の複数変異として単離することに成功した。また、花成抑制遺伝子*OsELF3-1*および*Ehd3*、概日時計関連遺伝子*OsLHY*については、明瞭な遅延を引き起こす新規の出穂変化系統を4系統単離した。

### (2) 出穂期変化型準同質遺伝子系統シリーズの作出

つくば市観音台地区の試験圃場において、2年間に渡り、10集団429系統からなるコシヒカリCSSL集団を5月上旬植(早期植)、6月上旬植(普通植)、6月下旬植(晩植)で栽培し、出穂調査を行った。コントロールであるコシヒカリに対して、有為に(t-test,  $p$ 値<0.01)

出穂期を改変した系統は、123系統見出された。各ドナー品種由来のゲノム置換断片を精査した結果、マイルドな出穂期変化効果を引き出すゲノム領域の多くは、インディカ品種由来であり、未同定のQTLの可能性が示唆された。また、既存の出穂期遺伝子が座乗する第2染色体 (*DTH2*)、第3染色体 (*Ehd4*, *Hd6*, *Hd16*)、第6染色体 (*Hd17*, *RFT1*, *Hd1*)、第7染色体 (*Ghd7*, *OsPRR37*)、第8染色体 (*Hd18*, *DTH8*) の領域を有する系統は、安定した出穂期変化を引き起こし、また、系統間差も生じていた。これらの対象出穂遺伝子DNA配列と表現型は非常に高い相関を示し、既知出穂期遺伝子のアリル間差は同一遺伝背景で2-3日おきの段階的な出穂期変化を可能となった (図1)。選抜したCSSL14系統はNIL化を行った。

CSSL系統群の早期植と晩植時の出穂性の比較から、既存の早咲き変異*OsPRR37*欠損変異が、コシヒカリ背景では、晩植時に特異的な出穂遅延を引き起こすことを明らかにした (図2)。北関東では、麦後の二毛作で稲の作付けが、6月下旬に行われる。このような晩植栽培では、生育期間の確保と出穂後刈り取りまでの登熟期間の両方の確保が重要となってくる。今後、晩植時の相転換期調節に利用可能なより出穂調節アリルを選定するために、晩植時と早期植時の転換期でフロリゲンの転写制御に影響する環境要因を特定する予定である。

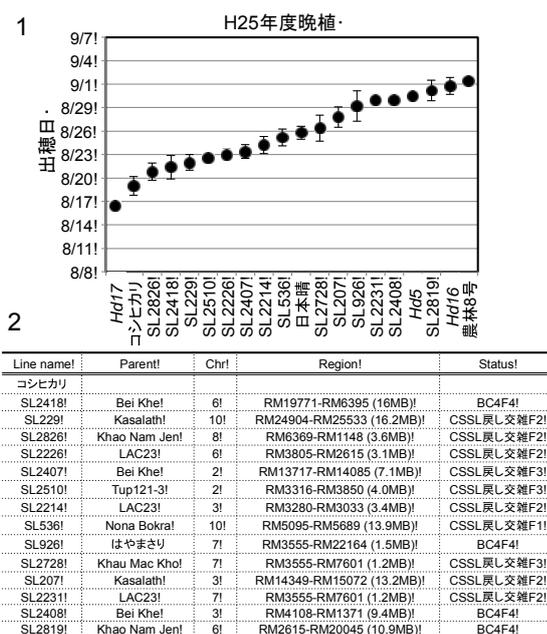


図1 コシヒカリ背景で出穂期を段階的に変化させる系統群

- 1) 選抜系統が示す段階的な出穂期変化 (2013年)。Hd5およびHd16、Hd17は既存系統である。
- 2) ドナー品種由来の出穂期変化ゲノム領域

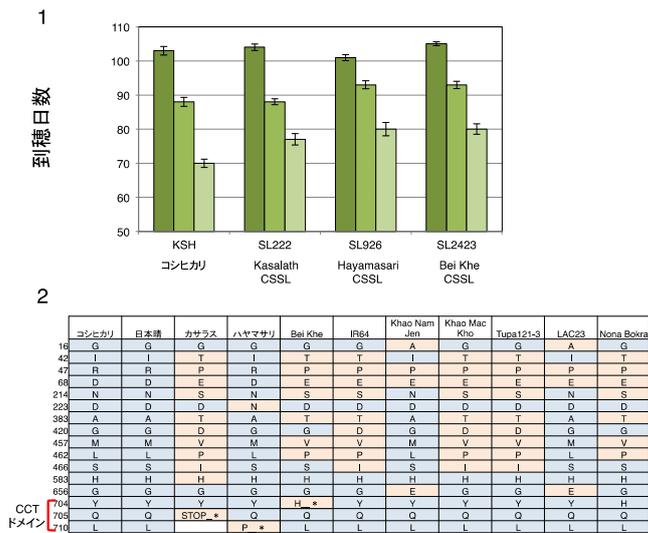


図2 第7染色体長腕端を置換するCSSL系統の移植時期別到達日数と*OsPRR37*の配列

- 1) 出穂期調査の結果（2013年）。緑：早期植、黄緑：普通期、薄緑：晩植。
- 2) ドナー品種が有する*OsPRR37*アレルのアミノ酸置換。ハヤマサリ、Kasalath、Bei Kheは、CCTドメイン内に機能欠失型変異が存在する。

### 3) 成果活用における留意点

出穂期変化型準同質遺伝子系統シリーズは、ドナー品種の導入断片が比較的大きいため、育種母本として利用する際に、不良形質のリンケージドラッグの可能性を考慮する。

選抜した人為突然変異系統については、外観上の差異を生じないが別のDNA変異が残存する可能性があるため、戻し交雑により不必要な変異の除去が必要である。

### 4) 今後の課題

多様な品種を早期植と晩植で移植し、相転換期のフロリゲンの発現パターンの解析から、晩植期の生育期間の調節に有効な出穂期アレルの選定を行う。

出穂期の違いは、収量性や出穂後の登熟歩合のと密接な関連が示唆されているが、詳細についてはほとんど明らかとなっていない。今後、本課題で育成したコシヒカリ背景の出穂期変化シリーズを用いて、出穂期遺伝子出穂期制御以外の農業形質に対する多面的な影響を精査する。

「遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発」最終年度報告書

中課題番号: 13405960

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

中課題名: 遺伝資源から多様な地域特性や経営戦略に即した有用遺伝子を効率的に特定する技術の開発 (IVG)

小課題番号: IVG3007

研究期間: 平成 25 ~ 29 年度

小課題名: 北東北水稲育種にむけたイネ突然変異系統および遺伝子資源の開発と活用

小課題代表研究機関・研究室・研究者名: (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

## 1) 研究目的

北東北は、日本の食料供給を担う地域である。この地域における水稲生産を促進するために、水稲の一層の育種が必要となる。本研究課題では、水稲の低温耐性、いもち病抵抗性などを増強することを目的に、イネ突然変異系統や、大規模交配集団を活用して、新規ゲノム解析技術により有用遺伝子領域を同定して DNA マーカーを同定し、効率的な育種に資する事を目的とする。

## 2) 研究成果

### (1) イネにおける低温発芽性遺伝子の同定とその育種利用

低温発芽性に優れるイネ品種「Arroz da Terra」と東北地域の早生品種「いわてっこ」の交雑後代 (Recombinant inbred lines, RILs) F7 世代 200 系統の 13 低温発芽性を調査した結果、吸水 8 日後の発芽率に大きな系統間差異がみられた (図 1)。発芽率が高い 20 系統および低い 20 系統による QTL-seq 法によって、3 箇所 QTL を検出した (図 2)。Chr.3 短腕末端のピークは *qLTG3-1* (Fujino et al. 2008) であると考えられたため、Chr.3 の *qLTG3-2* および Chr.11 の *qLTG11* に着目して以降の解析を進めた。

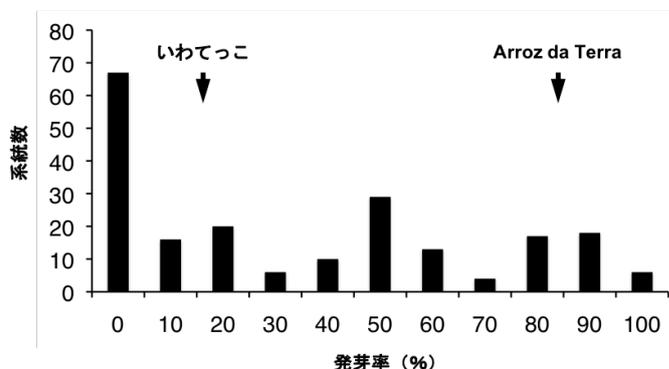


図 1 200 RILs (F7) の低温発芽率の頻度分布  
13°C吸水8日後、矢印は親品種の発芽率を示す。

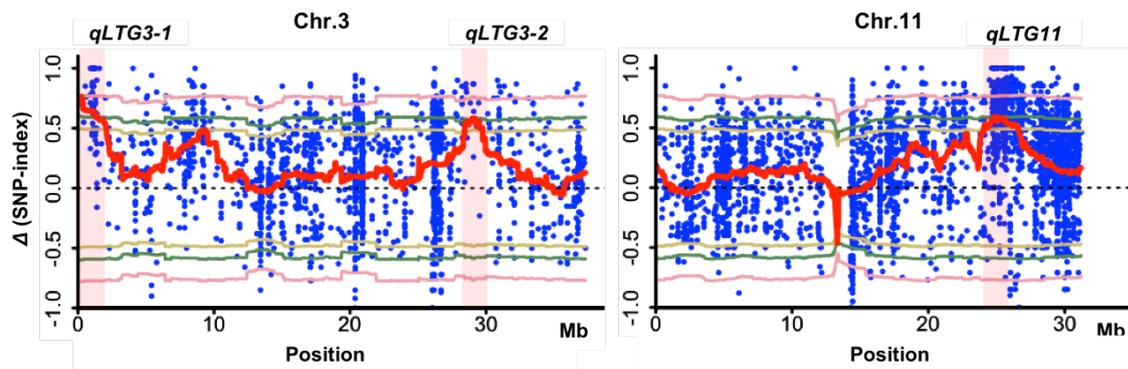


図2 QTL-seq解析結果  
有意なピークとして *qLTG3-1*, *qLTG3-2*, *qLTG11* を検出.

両 QTL を保有する RIL に品種「ひとめぼれ」を連続交配親とする戻し交配を行い、ひとめぼれゲノムの割合が高い系統 (BC2F3) を選抜した。*qLTG3-2* を有する NIL3-16-3、*qLTG11* を有する NIL11-5-2 および両方を有する NIL3-15x11-5 を low depth で全ゲノムシーケンスした結果、NIL3-16-2 は 3 番染色体の 27.6-33.9Mb、NIL11-5-2 は番染色体の 18.6-24.2Mb が Arroz da Terra 断片になっていること、NIL-3-15x11-5 は両断片を保有していることが判った (図 3)。いずれの系統も 1 番染色体に Arroz da Terra 断片が残っているが、その他の領域は「ひとめぼれ」であることが確認できた (図 3)。

移植後出穂日数は、「ひとめぼれ」が 78 日、NIL3-16-2 が 78 日、NIL11-5-2 が 77 日、NIL3-15x11-5 が 74 日であり、QTL を集積した NIL3-15x11-2 が他の系統に比較して 3 ~ 4 日早く出穂した (図 3)。「ひとめぼれ」と比較して、NIL3-15x11-2 は稈長が 3cm 程度短く、穂長が 1cm 程度長い (図 4)。*qLTG3-2* と *qLTG11* の 2 つが集積することで、出穂期および稈長の特性が変化している可能性が示唆された。穂数は、「ひとめぼれ」と比較して、NIL3-16-2 および NIL3-15x11-2 において有意に少ないことから、*qLTG3-2* が穂数に関与していることが推察された (図 4)。粗粒重は、いずれの NIL も「ひとめぼれ」と差がなかった (図 4)。

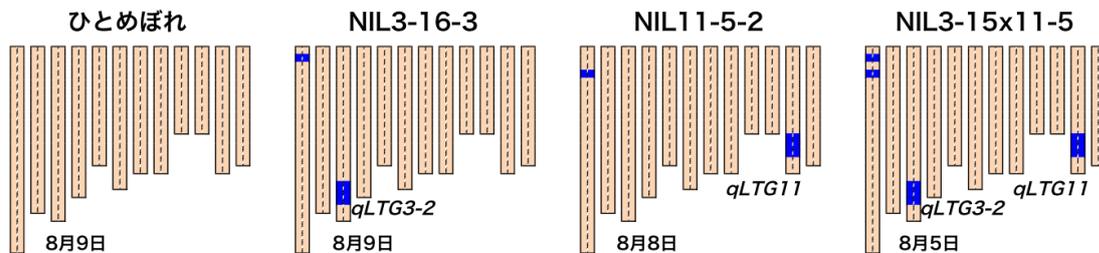


図3 準同質遺伝子系統のグラフィカルジェノタイプ (■ ひとめぼれ型 ■ Arroz da Terra型)  
日付は各系統の出穂期 (移植日 5月23日, 岩手県北上市で栽培)

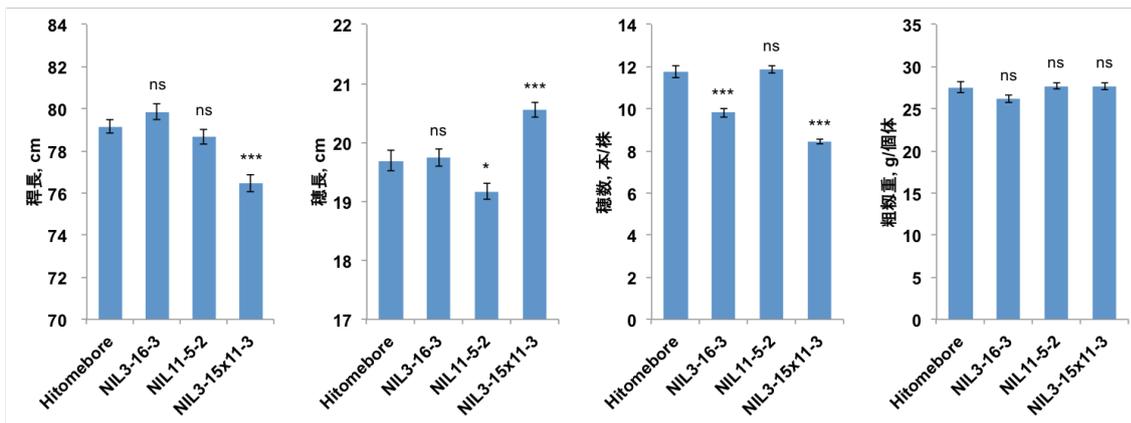


図4 準同質遺伝子系統の形質

\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , 「ひとめぼれ」を対照群としたDunnett test.  $n=52$ . エラーバーはSE.

15 浸漬条件で発芽試験を行った結果、*qLTG3-2* と *qLTG11* が集積した NIL3-15x11 - 2 が最も発芽が早く、次いで *qLTG11* を持つ NIL11-5-2 が早かった (図5)。*qLTG3-2* と「ひとめぼれ」に差は認められず、*qLTG3-2* の単独での効果を確認できなかった (図5)。本実験から、*qLTG11* の効果が大きいこと、*qLTG3-2* が集積することで発芽がさらに早くなることが推察された。

以上より、東北地域の水稲育種に有用な優れた低温発芽性を示す中間母本を育成した。

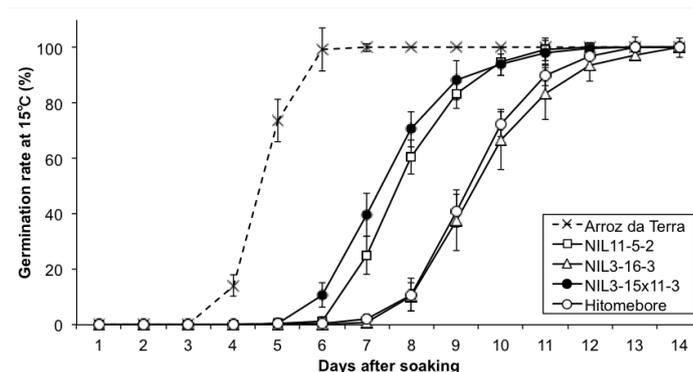


図5 15°C低温条件における発芽率の推移

各系統10個体30粒で試験し、その平均値を表記 ( $n=10$ )。エラーバーはSD.

## (2) Advanced MutMap+法の確立

Advanced MutMap+の解析の流れは次のとおりである (図6)。1> 興味ある変異体の分離集団を作出し、変異体型および野生型をそれぞれ複数個体選抜する。2> 原品種、変異体型バルクおよび野生型バルクの3種類のDNAを全ゲノムシーケンスする。3> *de novo* アセンブリにより原品種の Scaffold 配列を構築する。4> 原品種の Scaffold に変異体型バルクおよび野生型バルクのリードをアラインメントする。5> 統計的検定や遺伝子予想等により原因 DNA 変異を抽出する。

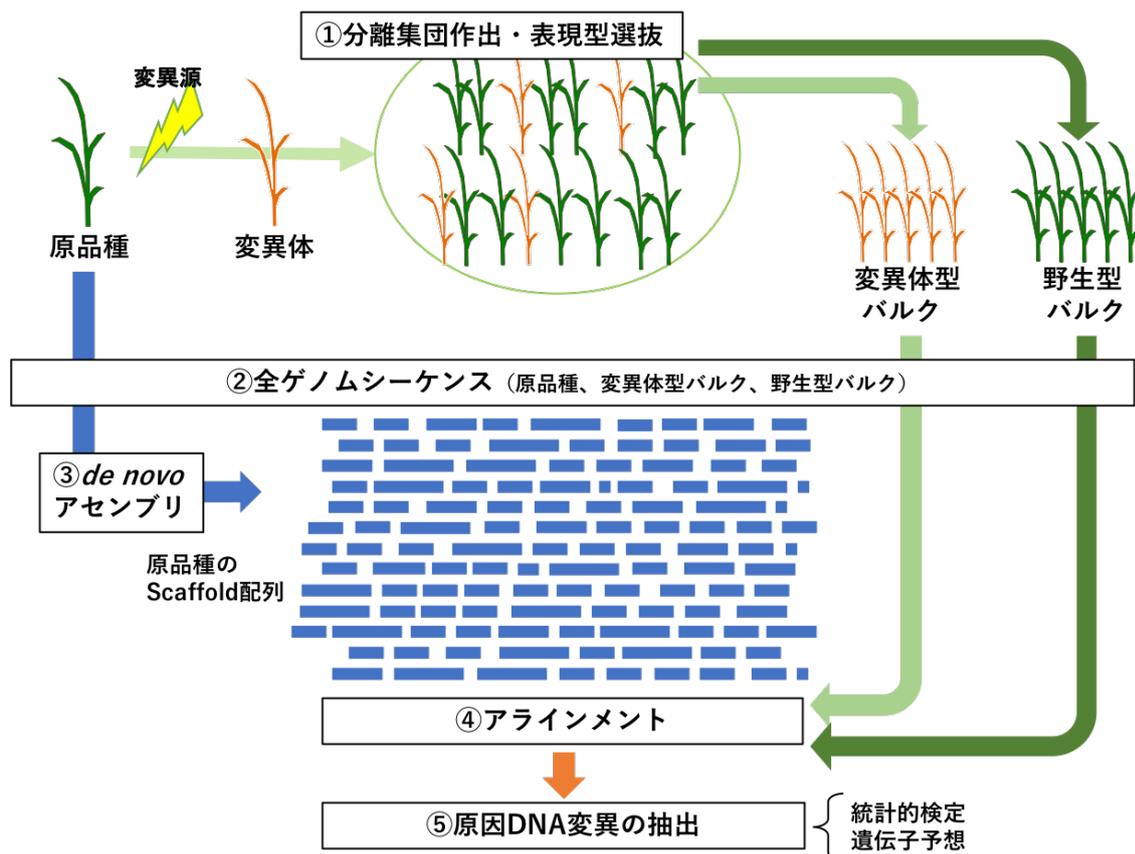


図6 Advanced MutMap+の概要

Advanced MutMap+による解析から、独立のイネアルビノ変異体 M3\_027 および M3\_127 の原因 SNP は Os03g0323200 に存在すること明らかにした。当該遺伝子に Tos17 が挿入された系統を分離いただき、その表現型を観察した結果、アルビノ個体が確認された。また、変異系統 M3\_027 および M3\_127 から原因 SNP をヘテロでもつ個体を選抜し、交配した F<sub>1</sub> の表現型は、WT 型 : mutant 型 = 10 : 3 (およそ 3 : 1) となった。すなわち、リファレンス配列を用いない Advanced MutMap+によって、突然変異の原因遺伝子を同定できることが確認された。

アワ矮性変異体に Advanced MutMap+法を適用し、候補遺伝子として Cytochrome P450, CYP88A1-like を同定した。矮性変異体では当該遺伝子の 5'UTR に SNP が存在し、遺伝子発現量を比較したところ mutant 型で発現量が低いことが確認された。CYP88 遺伝子の変異によってジベレリンに関連する矮性表現型が現れることが、オオムギ (*grd5*) およびトウモロコシ (*dwarf3*) で報告されており、本遺伝子が原因である可能性が高い。以上より、イネ以外でもリファレンス配列を用いずに変異体の原因 SNP を同定できることが確認できた。

### 3) 成果活用における留意点

- (1) 低温発芽性 QTL の多面的発現による農業形質への影響は不明である。

### 4) 今後の課題

- (1) 低温発芽性 QTL の遺伝子単離と多面的発現による農業形質への影響の確認。

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				
13405960	6	21	47	28	0	0	1	0	0	2	2	4	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	発行日
1	②	中央農業総合研究センター, 理化学研究所, 新潟大学	高温でコメに乳白粒が発生する原因を遺伝子レベルで解明-高温登熟耐性品種の開発に期待-	山川博幹, 羽方誠, 黒田昌治, 宮下朋美, 山口武志, 小嶋美紀子, 榎原均, 三ツ井敏明	JATAFFジャーナル	1(4)	24-27	2013	4
2	①	農業生物資源研究所	Structure, transcription and post-transcriptional regulation of the bread wheat orthologs of the barley cleistogamy gene Cly1	S. Ning, N. Wang, S. Sakuma, M. Pourkheirandish, J. Wu, T. Matsumoto, T. Koba, T. Komatsuda	Theor Appl Genet	126(5)	1273-1283	2013	5
3	②	中央農業総合研究センター 北陸研究センター	遺伝子情報を活用して暑さに強いイネを開発する-デンプンの分解を抑制し、乳白粒の発生を低減する-	山川博幹	グリーンレポート	528	18-19	2013	6
4	①	農業生物資源研究所, 他	Variation in the wheat AP2 homoeologs, the genes underlying lodicule development	S. Ning, N. Wang, S. Sakuma, M. Pourkheirandish, T. Koba, T. Komatsuda	Breed Sci	63(3)	255-266	2013	9
5	②	中央農業総合研究センター	植物におけるホスホリパーゼDの生理機能	山口武志, 黒田昌治, 山川博幹, 羽方誠	オレオサイエンス	13(10)	471-476	2013	10

6	①	農業生物資源研究所	HapRice, an SNP haplotype database and a web tool for rice	J. Yonemaru, K. Ebana, M. Yano	Plant Cell Physiol	55(1)	e9	2014	1
7	②	農業生物資源研究所	Critical gates in day-length recognition to control the photoperiodic flowering	Osugi A, Izawa T	Adv Bot Res	72(4)	103-130	2014	1
8	①	農業生物資源研究所	Transposon Insertion Finder (TIF): a novel program for detection of de novo transpositions of transposable elements	M. Nakagome, E. Solovieva, A. Takahashi, H. Yasue, H. Hirochika, A. Miyao	BMC Bioinformatics	15	71	2014	3
9	②	農業生物資源研究所	絶対的・光周性花成と条件的・光周性花成：短日植物イネを例に	井澤毅	植物の生長調節	49(1)	41-48	2014	5
10	①	名古屋大学, 農業生物資源研究所, 他	Gibberellin deficiency pleiotropically induces culm bending in sorghum: an insight into sorghum semi-dwarf breeding	R. L. Ordonio, Y. Ito, A. Hatakeyama, K. Ohmae-Shinohara, S. Kasuga, T. Tokunaga, H. Mizuno, H. Kitano, M. Matsuoka, T. Sazuka	Sci Rep	4	5287	2014	6
11	②	九州沖縄農業研究センター, 中央農業総合研究センター 北陸研究	$\alpha$ -アミラーゼ遺伝子はイネの高温登熟で発生する乳白粒に関与する	羽方誠, 山川博幹	応用糖質科学	4(3)	206-208	2014	8
12	①	農業生物資源研究所, 他	Genetic architecture of variation in heading date among Asian rice accessions	K. Hori, Y. Nonoue, N. Ono, T. Shibaya, K. Ebana, K. Matsubara, E. Ogiso-Tanaka, T. Tanabata, K. Sugimoto, F. Taguchi-Shiobara, J. Yonemaru, R. Mizobuchi, Y. Uga, A. Fukuda, T. Ueda, S. Yamamoto, U. Yamanouchi, T. Takai, T. Ikka, K. Kondo, T. Hoshino, E.	BMC Plant Biol	15	115	2015	5

13	①	農業生物資源研究所, 他	Genome-wide indel markers shared by diverse Asian rice cultivars compared to Japanese rice cultivar 'Koshihikari'	J. Yonemaru, S. H. Choi, H. Sakai, T. Ando, A. Shomura, M. Yano, J. Wu, S. Fukuoka	Breed Sci	65(3)	249-256	2015	6
14	①	農業生物資源研究所, 他	Advanced backcross QTL analysis reveals complicated genetic control of rice grain shape in a japonica x indica cross	K. Nagata, T. Ando, Y. Nonoue, T. Mizubayashi, N. Kitazawa, A. Shomura, K. Matsubara, N. Ono, R. Mizobuchi, T. Shibaya, E. Ogiso-Tanaka, K. Hori, M. Yano, S. Fukuoka	Breed Sci	65(4)	308-318	2015	9
15	①	農業生物資源研究所, 他	Natural Variation in the Flag Leaf Morphology of Rice Due to a Mutation of the NARROW LEAF 1 Gene in <i>Oryza sativa</i> L	F. Taguchi-Shiobara, T. Ota, K. Ebana, T. Ookawa, M. Yamasaki, T. Tanabata, U. Yamanouchi, J. Wu, N. Ono, Y. Nonoue, K. Nagata, S. Fukuoka, H. Hirabayashi, T. Yamamoto, M. Yano	Genetics	201(2)	795-808	2015	10
16	①	農業生物資源研究所, 佐賀大学, 他	Construction of a high-density mutant library in soybean and development of a mutant retrieval method using amplicon sequencing	M. Tsuda, A. Kaga, T. Anai, T. Shimizu, T. Sayama, K. Takagi, K. Machita, S. Watanabe, M. Nishimura, N. Yamada, S. Mori, H. Sasaki, H. Kanamori, Y. Katayose, M. Ishimoto	BMC Genomics	16(1)	1014	2015	11
17	②	中央農業総合研究センター	Molecular physiological aspects of chalking mechanism in rice grains under high-temperature stress.	Toshiaki Mitsui, Hiromoto Yamakawa, Tohru Kobata	Plant Prod Sci	19(1)	22-29	2016	2
18	①	農研機構、東京農業大学	The Nipponbare genome and the next-generation of rice genomics research in Japan	T. Matsumoto, Wu, J., Itoh, T., Numa, H., Antonio, B., Sasaki, T.	Rice (N Y)	9(1)	33	2016	7

19	①	農業生物研、筑波大、西日本農研、岩手大、佐賀大、東工大、理研	Metabolic switching of astringent and beneficial triterpenoid saponins in soybean is achieved by a loss-of-function mutation in Cytochrome P450 72A69, DOI:10.1111/tpj.13403	Ryoichi Yano, Kyoko Takagi, Yoshitake Takada, Kyosuke Mukaiyama, Chigen Tsukamoto, Takashi Sayama, Akito Kaga, Toyoaki Anai, Satoru Sawai, Kiyoshi Ohyama, Kazuki Saito, Masao Ishimoto	Plant J		in pres s	2016	10
20	②	農研機構 中央農業研究センター	特集 地球温暖化と農業 コメの品質に対する温暖化の影響と品種改良の現状	山川 博幹	理大科学フォーラム	33(10)	12-15	2016	10
21	①	農研機構 次世代作物開発研究センター	Genetic dissection of pre-harvest sprouting resistance in an upland rice cultivar.	Mizuno Y, Yamanouchi U, Hoshino T, Nonoue Y, Nagata K, Fukuoka D, Ando T, Yano M and Sugimoto K	Breed. Sci.		in pres s	####	
22	①	農研機構 次世代作物開発研究センター、西日本農研、筑波大学、岩手大学、理化学研究所、東京工業大学	Metabolic switching of astringent and beneficial triterpenoid saponins in soybean is achieved by a loss-of-function mutation in cytochrome P450 72A69.	Ryoichi Yano, Kyoko Takagi, Yoshitake Takada, Kyosuke Mukaiyama, Chigen Tsukamoto, Takashi Sayama, Akito Kaga, Toyoaki Anai, Satoru Sawai, Kiyoshi Ohyama, Kazuki Saito, Masao Ishimoto	The Plant Journal	89(3)	527-539	####	3
23	①	中央農業研究センター	An activity-staining method on filtration paper enables high-throughput screening of temperature-sensitive and inactive mutations of rice $\alpha$ -amylase for improvement of rice grain quality.	Hiromoto Yamakawa, Rieko Hirai-Kimura, Yuriko Nakata, Masaru Nakata, Masaharu Kuroda, Takeshi Yamaguchi	Plant and Cell Physiology	58(4)	658-667	####	4

24	①	中央農業研究センター、次世代作物開発研究センター、九州沖縄農業研究センター	Overexpression of TIFY genes promotes plant growth in rice through jasmonate signaling.	Makoto Hakata, Masayuki Muramatsu, Hidemitsu Nakamura, Naho Hara, Miho Kishimoto, Keiko Iida-Okada, Mariko Kajikawa, Naoko Imai-Toki, Seiichi Toki, Yoshiaki Nagamura, Hiromoto Yamakawa, Hiroaki Ichikawa	Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	81(5)	906-913	####	5
25	①	中央農業研究センター、石川県立大学、次世代作物開発研究センター	MutMapPlus identified novel mutant alleles of a rice starch branching enzyme IIb gene for fine-tuning of cooked rice texture.	Masaru Nakata, Tomomi Miyashita, Rieko Kimura, Yuriko Nakata, Hiroki Takagi, Masaharu Kuroda, Takeshi Yamaguchi, Takayuki Umemoto, Hiromoto Yamakawa	Plant Biotechnology Journal		in press	####	6
26	①	農研機構次世代作物開発研究センター、かずさDNA研、西日本農研、佐賀大学	Confirmation of the pleiotropic control of leaflet shape and number of seeds per pod by the Ln gene in induced soybean mutants.	Takashi Sayama, Takanari Tanabata, Masayasu Saruta, Testsuya Yamada, Toyoaki Anai, Akito Kaga, Masao Ishimoto	Breeding Science	67(4)	363-369	####	9
27	①	中央農業研究センター	High temperature-induced expression of rice $\alpha$ -amylases in developing endosperm produces chalky grains.	Masaru Nakata, Yosuke Fukamatsu, Tomomi Miyashita, Makoto Hakata, Rieko Kimura, Yuriko Nakata, Masaharu Kuroda, Takeshi Yamaguchi, Hiromoto Yamakawa	Frontiers in Plant Science	8	####	####	12

## (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	発行日
1	イネSNP情報に基づいたハプロタイプデータベースとwebツールの構築	米丸淳一, 江花薫子, 矢野昌裕	農業生物資源研究所	日本育種学会 2013年秋期講演会 講演要旨集 育種学研究	2013	1
2	日本晴ミュータントパネルの3次元DNAプールの次世代型シーケンサーを用いた隣接塩基配列解析	中込マリコ, 廣近洋彦, 宮尾安藝雄	農業生物資源研究所	日本育種学会	2013	1
3	Characterization of cleistogamous flowering and TaAP2 homoeologs in wheat	K. Kakeda, K. Ishigaki, S. Ning, M. Tomokazu, T. Komatsuda	三重大学, 農業生物資源研究所	12th International Wheat Genetics Symposium (IWGS)	2013	9
4	An analysis of bending dwarf (bdw) mutants of sorghum: Gibberellin-controlled symmetrical cell division in the culm and its influence on sorghum breeding.	Ordonio Reynante, 伊藤裕介, 畠山麻子, 篠原(大前)梢, Song Xian-Jun, 春日重光, 米丸淳一, 水野浩志, 徳永毅, 北野英己, 松岡信, 佐塚隆志	農業生物資源研究所, 名古屋大学	日本育種学会第124回講演会	2013	10
5	EMSによるエンレイ突然変異体ライブラリーの作出と評価	加賀秋人, 穴井豊昭, 渡辺啓史, 西村実, 山田直弘, 佐山貴司, 高木恭子, 清水武彦, 町田佳代, 森聡美, 佐々木晴美, 金森裕之, 片寄裕一, 石本政男	農業生物資源研究所, 佐賀大学, 新潟大学	日本育種学会	2013	10

6	OsELF3-1遺伝子は、何故、イネの花成を制御できるようになったのか？	伊藤博紀, 田中悠里, Gynheung An, 井澤 毅	農業生物資源研究所	日本育種学会第124回講演会 講演要旨集 育種学研究	2013	10
7	HapRice: SNP haplotype database and web tool for rice	Yonemaru J-i, Ebana K, Yano M	農業生物資源研究所	11th International Symposium on Rice Functional Genomics	2013	11
8	Molecular mechanisms of the critical day-length recognition triggering Hd3a expression in rice	Hironori Itoh, Takeshi Izawa	農業生物資源研究所	The 6th Asian & Oceania Conference on Photobiology	2013	11
9	Sdr7, a rice ortholog of Arabidopsis Delay of Germination 1, plays an important role in controlling preharvest sprouting resistance.	Tomoki Hoshino, Salem Marzougui, Yoshinobu Takeuchi, Utako Yamanouchi, Yosuke Mizuno, Masahiro Yano, Kazuhiko Sugimoto.	農業生物資源研究所	Plant Dormancy Symposium 2013	2013	11
10	次世代型シーケンサーを用いたイネ遺伝子破壊システムのスクリーニング系の構築	中込マリコ, 廣近洋彦, 宮尾安藝雄	農業生物資源研究所	日本分子生物学会	2013	12
11	Genetic diversity of wild soybean and its exploitation for efficient discovery of novel allelic variants	Takashi Sayama, Ryoichi Yano, Yuko Yokota, Akito Kaga, Masatsugu Hashiguchi, Ryo Akashi, Masao Ishimoto	農業生物資源研究所	The Plant & Animal Genome XXII Conference	2014	1

12	Integration of forward and reverse genomic approaches to identify and clone QTLs for agronomic traits in rice	Yonemaru J, Wu J, Sakai H, Nonoue Y, Fukuoka S, Hori K, Ebana K, Shibaya T, Ono N, Kanamori H, Sasaki H, Mori S, Ando T, Shomura A, Kono I, Mizubayashi T, Nagata K, Matsubara K, Mizobuchi R, Sugimoto K, Yamanouchi U, Uga Y, Taguchi-Shiobara F, Takai T, Ku	農業生物資源研究所	Plant & Animal Genome XXII Conference	2014	1
13	Polymorphisms in the wheat AP2 homoeologs orthologous to the barley cleistogamy gene Cly1	K. Kakeda, S. Ning, T. Komatsuda	三重大学, 農業生物資源研究所	XXII Plant and Animal Genome	2014	1
14	Function of rice $\alpha$ -amylase in production of chalky grains under high temperature.	Masaru Nakata, Tomomi Miyashita, Makoto Hakata, Masaharu Kuroda, Takeshi Yamaguchi, Hiromoto Yamakawa	中央農業総合研究センター	ASPB Plant Biology 2014, Book of Abstracts	2014	7

15	Suppression of $\alpha$ -amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature.	Hiramoto Yamakawa, Makoto Hakata, Masaharu Kuroda, Tomomi Miyashita, Takeshi Yamaguchi, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Toshiaki Mitsui	中央農業総合研究センター	ASPB Plant Biology 2014, Book of Abstracts	2014	7
16	65個 of QTL がコシヒカリ/IR64間の粒形の違いを説明する	永田和史, 安藤露, 野々上慈徳, 水林達実, 北澤則之, 正村純彦, 矢野昌裕, 福岡修一	農業生物資源研究所	日本育種学会第126回講演会 講演要旨集 育種学研究	2014	9
17	ガンマ線緩照射による野生オオムギ突然変異集団の作製(第126回講演会日本育種学会優秀発表賞受賞)	佐久間俊, Mohammad Pourkheirandish, 中川仁, 小松田隆夫	農業生物資源研究所	日本育種学会第126回講演会 講演要旨集 育種学研究	2014	9
18	ドナー品種の異なる染色体断片置換系統群(CSSLs)利用のためのIndelマーカーの開発	崔善熹, 坂井寛章, 呉健忠, 安藤露, 矢野昌裕, 福岡修一, 米丸淳一	農業生物資源研究所	日本育種学会第126回講演会 講演要旨集 育種学研究	2014	9
19	ヒノヒカリノにこまるのRILを用いた炊飯米の理化学特性に関するQTL解析	小林麻子, 片岡知守, 小木芳恵, 田村克徳, 富田桂	福井県農業試験場, 九州沖縄農業研究センター	日本育種学会第126回講演会要旨集 育種学研究	2014	9

20	陸稲品種オワリハタモチの第9染色体に座乗する穂発芽耐性遺伝子(Sdr12とSdr13)のマッピングと解析	水野陽介, 山内歌子, 星野友紀, 野々上慈徳, 永田和史, 福岡修一, 安藤露, 矢野昌裕, 杉本和彦	農業生物資源研究所	日本育種学会第126回講演会	2014	9
21	Accuracy of genomic selection for biomass traits in biparental rice populations	Yonemaru J, Matsubara K, Yamamoto T, Mizobuchi R, Yamamoto E, Tanaka J, Tsunematsu H, Kobayashi N, Kato H, Yano M	農業生物資源研究所	12th International Symposium on Rice Functional Genomics	2014	11
22	インド稲Kasalathに由来するイネ穂発芽耐性遺伝子Sdr1の単離とその制御機構の解析	杉本和彦, 竹内善信, 山内歌子, 矢野昌裕	農業生物資源研究所, 作物研究所	第35回種子生理生化学研究会	2014	11
23	米飯の食味官能評価とアミロペクチン構造の関係	小木芳恵, 小林麻子, 富田桂	福井県農業試験場	日本水稲品質・食味研究会第6回講演会 講演要旨集	2014	11
24	陸稲品種オワリハタモチの第9染色体に座乗する穂発芽耐性遺伝子(Sdr12とSdr13)のマッピングと解析	水野陽介, 山内歌子, 星野友紀, 野々上慈徳, 永田和史, 福岡修一, 安藤露, 矢野昌裕, 杉本和彦	農業生物資源研究所	第35回種子生理生化学研究会	2014	11
25	Development of wild barley mutant collections using cobalt 60 chronic irradiation.	Sakuma S, Pourkheirandish M, Chen G, Wang N, Ning S, Li C, Komatsuda T	農業生物資源研究所	1st International Workshop for Barley Mutant Research	2014	6

26	遺伝子変異の導入とその発芽抑制効果の解析(「きたほなみ」を遺伝的背景として)	蝶野真喜子	作物研究所	第18回穂発芽研究会	2014	1
27	日本のコムギ品種を材料とした変異集団の作出	蝶野真喜子	作物研究所	理化学研究所第7回品種改良ユーザー会報告書	2014	1
28	Construction and evaluation of an EMS induced mutant library of Japanese soybean cultivar, Enrei.	津田麻衣, 加賀秋人, 穴井豊昭, 渡辺啓史, 西村実, 山田直弘, 佐山貴司, 高木恭子, 清水武彦, 町田佳代, 森聡美, 佐々木晴美, 金森裕之, 片寄裕一, 石本政男	農業生物資源研究所, 佐賀大学	Plant animal genome XXIII Conference	2015	1
29	Map-base cloning and characterization of prehrvest sprouting resistance gene, Sdr1	竹内善信, 杉本和彦, 山内歌子, 矢野昌裕	農業生物資源研究所	Plant & Animal Genome XXIII	2015	1
30	The role of OsELF3-1 in flowering-time control has differentiated during evolution of rice	H. Itoh, Y. Tanaka, T. Izawa	農業生物資源研究所	XXIII Plant and Animal Genome	2015	1
31	エンレイ高頻度突然変異体ライブラリーの作出と次世代シーケンサーによる突然変異検索方法の開発	津田麻衣, 加賀秋人, 穴井豊昭, 渡辺啓史, 西村実, 山田直弘, 佐山貴司, 高木恭子, 清水武彦, 町田佳代, 森聡美, 佐々木晴美, 金森裕之, 片寄裕一, 石本政男	農業生物資源研究所, 佐賀大学	第127回日本育種学会	2015	3

32	ダイズ突然変異体ライブラリーの作出とスクリーニングシステムの開発	津田麻衣	農業生物資源研究所	第8回ダイズ研究会	2015	3
33	正逆遺伝学的手法を用いたアレルマイニング法 FANTASY	米丸淳一, 坂井寛章, 呉健忠, 杉本和彦, 福岡修一, 山本敏央, 矢野昌裕	農業生物資源研究所	NGS現場の会 第四回研究会	2015	7
34	イネNARROW LEAF 1遺伝子の1アミノ酸置換が止め葉形態の自然変異に寄与する	田口文緒, 大田竜也, 江花薫子, 大川泰一郎, 山崎将紀, 七夕高也, 山内歌子, 呉健忠, 小野望, 野々上慈徳, 永田和史, 福岡修一, 平林秀介, 山本敏央, 矢野昌裕	農業生物資源研究所	日本育種学会第128回講演会 講演要旨集 育種学研究	2015	9
35	イネ在来系統41系統のリシーケンシング解析とアレルマイニングツールの開発	坂井寛章, 米丸淳一, 金森裕之, 片寄裕一, 伊藤剛, 呉健忠	農業生物資源研究所	育種学研究	2015	9
36	ガンマ線緩照射並びにEMS処理によるコムギ突然変異集団の作製	大野陽子, 小林史典, 埜優美子, 河田大樹, 杉本和彦, 半田裕一	農業生物資源研究所	二本育種学会第128回講演会 講演要旨集 育種学研究	2015	9

37	栽培イネの有用変異発掘を促進する12種類の染色体断片置換系統群の作出	永田和史, 野々上慈徳, 溝淵律子, 小野望, 柴谷多恵子, 江花薫子, 松原一樹, 小木曾映里, 七夕高也, 杉本和彦, 田口文緒, 米丸淳一, 宇賀優作, 福田篤徳, 上田忠正, 山本伸一, 山内歌子, 高井俊之, 一家崇志, 近藤勝彦, 星野友紀, 山本英司, 安達俊輔, 孫健, 久家徳之, 木富悠花, 崔善熹, 飯島健, 長崎英樹, 正村純彦, 水林達実, 北澤則之, 堀清純, 安藤露, 山本敏央, 福岡修一, 矢野昌裕	農業生物資源研究所	日本育種学会第128回講演会 講演要旨集 育種学研究	2015	9
38	炊飯米の白さに関する遺伝的要因の解析	小林麻子, 町田芳恵, 富田桂他	福井県農業試験場	日本育種学会第128回講演会 講演要旨集 育種学研究	2015	9
39	米のアルカリ崩壊とアミロペクチン構造の関係	町田芳恵, 小林麻子, 富田桂	福井県農業試験場	日本育種学会第128回講演会 講演要旨集 育種学研究	2015	9

40	誘発突然変異体ライブラリーの利用によるダイズ開花期の改変	西澤けいと, 佐山貴司, 山田哲也, 南條洋平, 菱沼亜衣, 高橋浩司, 羽鹿牧太, 清水武彦, 加賀秋人, 穴井豊昭, 石本政男	作物研究所, 農業生物資源研究所, 佐賀大学	日本育種学会第128回講演会 講演要旨集 育種学研究	2015	9
41	Development of hexaploid wheat mutant populations for the crop improvement	Oono Y, Kobayashi F, Hanawa Y, Kawada D, Sugimoto K, Handa H	農業生物資源研究所	1th International Congress on Plant Molecular Biology	2015	10
42	イネの胚乳アミロースNILsを利用した温度反応の解析	石田恭平, 山口藍, 高橋ちづる, 小林麻子, 西村実	福井県農業試験場, 新潟大学	第36回 種子生理生化学研究会	2015	11
43	Development of hexaploid wheat mutant populations through nontransgenic approach to the crop improvement	Oono Y, Kobayashi F, Hanawa Y, Kawada D, Sugimoto K, Handa H	農業生物資源研究所	6th ISAJ Symposium on Recent Advances in Science and Technology	2015	12
44	ダイズにおける高密度突然変異ライブラリーの作出とNGSによるスクリーニングシステムの開発	加賀秋人, 津田麻衣, 穴井豊昭, 渡辺啓史, 西村実, 山田直弘, 佐山貴司, 高木恭子, 清水武彦, 町田佳代, 森聡美, 佐々木晴美, 金森裕之, 片寄裕一, 石本政男	農業生物資源研究所, 佐賀大学, 新潟大学	第38回日本分子生物学会年会	2015	12

45	The Induction and Detection of Novel Allelic Variants of TaAP2 Homoeologs for the Engineering of Cleistogamy in Wheat	Kakeda K, Tomokazu M, Ishihara M, Kobayashi F, Oono Y, Hanawa Y, Kawada D, Handa H, Sugimoto K, Komatsuda T	農業生物資源研究所	Plant and Animal Genome XXIII	2015	1
46	$\alpha$ -アミラーゼ遺伝子過剰発現イネにおける玄米品質	中田克, 宮下朋 美, 羽方誠, 黒田 昌治, 山口武志, 山川博幹	中央農業総合研究センター	第57回日本植物 生理学会年会 講 演要旨集	2016	3
47	イネの高温登熟障害に関わるカタラーゼ遺伝子	山口武志, 黒田 昌治, 山川博幹, 中田克	中央農業総合研究センター	第57回日本植物 生理学会年会 講 演要旨集	2016	3
48	米品質向上のための高温感受性および不活性型 $\alpha$ -アミラーゼ変異の探索	山川博幹, 平井 理恵子, 中田百 理子, 中田克, 山 口武志, 黒田昌 治	中央農業総合研究センター	第57回日本植物 生理学会年会 講 演要旨集	2016	3
49	Impact of high temperature on the transcriptome/metabolome in developing grains.	Hiromoto Yamakawa, Masaru Nakata, Makoto Hakata, Tomomi Miyashita, Rieko Kimura, Yuriko Nakata, Masaharu Kuroda, Takeshi Yamaguchi	農研機構 中央農業研究センター	IRRI-JIRCAS- NARO Joint Symposium, "Towards achieving sustainable rice production in Asia", Book of Abstracts	2016	9

50	イネ胚乳の低アミロース性と玄米粒大との関係	山口藍, 高橋ちづる, 石田恭平, 西村実	新潟大学	第242回日本作物学会講演会要旨集	2016	9
51	次世代シーケンサによる突然変異の抽出法の検討	伊川 浩司	三菱スペース・ソフトウェア株式会社	日本育種学会第130回講演会	2016	9
52	登熟気温が米のアミロペクチン構造に及ぼす影響	町田芳恵, 小林麻子, 富田桂	福井県農業試験場	日本育種学会第130回講演会 講演要旨集 育種学研究	2016	9
53	Genetic and molecular dissection of pre-harvest sprouting resistance of rice.	K Sugimoto, et al.	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	FFTC-JIRCA-NAROS合同セミナー	2016	11
54	Impact of high temperature on the transcriptome/metabolome in developing grains.	Hiramoto Yamakawa, Masaru Nakata, Makoto Hakata, Tomomi Miyashita, Rieko Kimura, Yuriko Nakata, Masaharu Kuroda, Takeshi Yamaguchi	農研機構 中央農業研究センター	JIRCAS-FFTC Joint Seminar on Advanced Breeding Methods for Developing Stress-tolerant Food Crops, Book of Abstracts	2016	11
55	北海道の秋まきコムギにおける病害と抵抗性育種	粕谷雅志, 池田幸子, 神野裕信	地方独立行政法人北海道立総合研究機構 農業研究本部 北見農業試験場	第11回ムギ類研究会イブニングワークショップ	2016	12
56	イネ穂発芽耐性遺伝子Sdr1、Sdr4、Sdr7が関与する穂発芽耐性機構の解析	杉本和彦ほか	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	第58回日本植物生理学会年会	2017	3

57	ガンマ線緩照射及びEMS処理によるコムギ突然変異集団の作製	大野 陽子、小林史典、塙 優美子、河田 大樹、杉本和彦、半田 裕一	農研機構 次世代作物開発研究センター（旧農業生物資源研究所）	育種学会 第128回	2015	9
58	Development of hexaploid wheat mutant populations for the crop improvement	大野 陽子、小林史典、塙 優美子、河田 大樹、杉本和彦、半田 裕一	農研機構 次世代作物開発研究センター（旧農業生物資源研究所）	11th International Congress of Plant Molecular Biology	2015	10
59	Development of hexaploid wheat mutant populations through nontransgenic approach to the crop improvement	大野陽子	農研機構 次世代作物開発研究センター（旧農業生物資源研究所）	6th ISAJ Symposium on Recent Advances in Science and Technology	2015	12
60	ガンマ線急照射並びにEMS処理によるきたほなみ突然変異集団の作出と有用遺伝子の同定	大野 陽子、小林史典、塙 優美子、河田 大樹、杉本和彦、半田 裕一	農研機構 次世代作物開発研究センター	第20回穂発芽研究会	2016	7
61	北海道の秋まきコムギにおける病害と抵抗性育種	粕谷雅志、池田幸子、神野裕信	地方独立行政法人北海道立総合研究機構 農業研究本部 北見農業試験場	第11回ムギ類研究会イブニングワークショップ	2016	12
62	水稲品種コンヒカリおよびひとめぼれの突然変異利用によるアミロースライブラリー育成	谷本涼、出澤侑也、小山田萌、小宮郁生、西村実	新潟大学	日本育種学会第131回講演会要旨集 育種学研究	2017	3
63	イネ種子の食物繊維増大変異体の探索・評価	出澤侑也、谷本涼、小山田萌、小宮郁生、西村実	新潟大学	日本育種学会第131回講演会要旨集 育種学研究	2017	3
64	品種改良につながる六倍体小麦の突然変異集団の作出状況	大野 陽子、小林史典、塙 優美子、河田 大樹、杉本和彦、半田 裕一	農研機構・次世代作物開発研究センター	8th International Triticeae Symposium	2017	6

65	デンプンおよびリン脂質代謝の改変による高温登熟性改良の試み	山川博幹、山口武志	中央農業研究センター	次世代作物開発研究センター主催シンポジウム「競争力の高い水稲品種開発に向けたDNAマーカー技術の活用と連携」	2017	6
66	Genetic and molecular dissection of seed dormancy and dormancy brake of rice.	杉本和彦	農研機構 次世代作物開発研究センター	農研機構国際シンポジウム「Weedy Rice, the stranger in our midst. Can we get along?」	2017	9
67	閉花性コムギの作出に向けたAP2遺伝子変異系統群の育成	掛田克行、Hlaing Moe Haine、石原雅之、大野陽子、小林史典、半田裕一、杉本和彦、小松田隆夫	三重大学、農研機構・次世代作物開発研究センター	育種学会 第132回講演会	2017	10
68	Relationships between AP2 gene mutations and cleistogamous flowering in hexaploid wheat	Hlaing Moe Haine, Youko Oono, Kazuhiko Sugimoto, Takao Komatsuda, Katsuyuki Kakeda	三重大学、農研機構・次世代作物開発研究センター	育種学会 第132回講演会	2017	10
69	MutMapPlus法による米デンプン糊化性変異原因遺伝子の同定と多様な米飯物性を示すイネ育種素材の開発	山川博幹、高木宏樹、中田克、宮下朋美、黒田昌治、山口武志、梅本貴之	中央農業研究センター、石川県立大学、次世代作物開発研究センター	日本育種学会第132回講演会要旨集 育種学研究	2017	10
70	リソースとしての六倍体小麦きたほなみの突然変異集団の作出状況	大野陽子、小林史典、埴優美子、河田大樹、杉本和彦、半田裕一	農研機構・次世代作物開発研究センター	Vavilov Conference 2017	2017	11
71	The rice reference genome revisited: extensive update by the PacBio SMRT sequencing technology	Takeshi Itoh, Yoshihiro Kawahara, Tomoko Kishikawa, Hiroaki Sakai	台湾植物學會	Taiwan-Japan Plant Biology 2017	2017	11

72	MutMapPlus identified novel mutant alleles of a rice starch branching enzyme IIb gene for fine-tuning of cooked rice texture.	Hiromoto Yamakawa, Masaru Nakata, Hiroki Takagi, Tomomi Miyashita, Masaharu Kuroda, Takeshi Yamaguchi, Takayuki Umemoto	中央農業研究センター、石川県立大学、次世代作物開発研究センター	Taiwan-Japan Plant Biology 2017 Program Book	2017	11
73	デンプン改変で新しい米をつくる-業務用米と温暖化対応米開発の試み	山川博幹	中央農業研究センター	新潟大KAAB特別セミナー	2017	11
74	コムギ突然変異体集団の使い方	小林史典	農研機構・次世代作物開発研究センター	第12回ムギ類研究会	2017	12
75	Cloning of the zero-rowed spike 1 in barley	Shun Sakuma, Martin Mascher, Takao Komatsuda, Thorsten Schnurbusch	NARO, 鳥取大学	Plant and Animal Genome 26	2018	1

(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	発行日
1		「該当無し」					

(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
1	イネ科植物の高温障害を低減させる方法、及び高温耐性イネ科植物	山口武志, 黒田昌治, 山川博幹	農業・食品産業技術総合研究機構	農業・食品産業技術総合研究機構	特許権	特許第5812386号	2015年10月2日	2015年10月2日

## (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	さまざまな突然変異を含む多数のダイズ系統を作出—新しい性質を持つダイズ品種の開発が可能に—		2016	3	1	農業生物資源研究所、佐賀大学	
①	ご飯の硬さと粘りを調節するDNAマーカーの開発	日本農業新聞、科学新聞、毎日新聞、食料新聞	2017	9	29	中央農業研究センター、石川県立大学、次世代作物開発研究センター	

## (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
③	第127回講演会日本育種学会優秀発表賞(エンレイ高頻度突然変異体ライブラリーの作出と次世代シーケンサーによる突然変異検索方法の開発)	農業生物資源研究所、佐賀大学	2015	6		
③	日本育種学会 優秀発表賞(栽培イネの有用変異発掘を促進する12種類の染色体断片置換系統群の作出)	生物研, 現・岩手生工研, STAFF研, 現・農研機構作物研, 現・理研, 現・静岡大, 現・国際農研, 現・山形大, 現・農研機構野茶研, 現・東京農工大, 現・遺伝研	2016	2		

(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	Tsukuba Global Science Week 2015(Toward construction of a high-density mutant library in soybean)	2015	9	28			農業生物資源研究所	
2	スーパーサイエンスハイスクール(埼玉県立熊谷高校)作物研見学時の講義(小麦の穂発芽耐性強化のためのアプローチ:基礎から応用・実用、そして品種へ)	2015	11	27			作物研究所	
3	平成27年度日本水稲品質・食味研究会第7回講演会 シンポジウム(イネゲノム解析による外觀品質, 食味研究の現状と課題)	2015	11	14			福井県農業試験場	
4	次世代作物開発研究センター主催シンポジウム「競争力の高い水稲品種開発に向けたDNAマーカー技術の活用と連携」	2017	6	28	東京大学弥生講堂	200	農研機構 次世代作物開発研究センター	

(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」								