

Genetic analysis of cold tolerance at the booting stage of rice in Hokkaido

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 齋藤, 浩二 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001330

北海道におけるイネ穂ばらみ期
耐冷性の遺伝解析
斎藤 浩二

目次

- [I. 緒論](#)
- [II. 穂ばらみ期耐冷性の研究](#)
 - [1. 冷害危険期の研究](#)
 - [2. 低温障害の発生機作](#)
 - [3. 穂ばらみ期耐冷性の機作](#)
 - [4. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の研究](#)
 - [5. 穂ばらみ期耐冷性の遺伝資源](#)
- [III. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座乗領域の同定](#)
 - [1. 中間母本農8号のグラフィカルジェノタイプ分析](#)
 - [2. 導入染色体領域と耐冷性の関連](#)
- [IV. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座のマッピングと機能の推定](#)
 - [1. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の区間マッピング](#)
 - [2. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の精密マッピングと物理地図](#)
 - [3. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子の機能の推定](#)
- [V. 総合考察](#)
 - [1. 耐冷性遺伝子の集積](#)
 - [2. 耐冷性遺伝資源の再評価](#)
 - [3. 穂ばらみ期耐冷性の遺伝的メカニズムの解明](#)
 - [4. 北海道における今後の穂ばらみ期耐冷性育種](#)
- [謝辞・引用文献](#)
- [摘要](#)
 - [1. 中母農8のグラフィカルジェノタイプ](#)
 - [2. 導入染色体領域と耐冷性の関連](#)
 - [3. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の区間マッピング](#)
 - [4. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の精密マッピングと物理地図](#)
 - [5. 耐冷性遺伝子の機能](#)
- [Summary](#)

[次へ進む](#)

北海道におけるイネ穂ばらみ期
耐冷性の遺伝解析
斎藤 浩二

I. 緒論

熱帯・亜熱帯地域に起源を持つイネは低温による障害を起こしやすく、世界的にみると発芽障害、苗の生育遅延、苗の退色、本田移植後の枯死、分けつ抑制、分けつ期の生育抑制、分けつ期における葉の退色、出穂遅延、穂の出すくみ、穂先の退化、不稔、登熟期の葉の退色、登熟不良、冷えいもちなど様々な低温障害が発生している (Kaneda・Beachell 1974)。稲作地域としては北方に位置する日本でも様々な低温障害が発生するが、特に経済的損失を伴う低温障害は冷害と呼ばれ、北日本における稲作に大きな影響を及ぼしてきた。北海道では過去121年間で31回の冷害に見舞われており、平均すると4年に1回の割合で冷害が発生している。近年はイネの収量も向上し、冷害年でもある程度の収量を確保できているが、1993年の大冷害時のように一步誤ると深刻なコメ不足に陥る危険がある。そのため、冷害研究は現在でも北海道の稲作研究における最重要課題である。

冷害は低温の襲来時期や被害の種類によって二つに大別される。一つは栄養生長期の低温による生育遅延によって最終的には登熟不良となる遅延型冷害であり、もう一つは生殖生長期の低温によって受精障害が発生し不稔となる障害型冷害である。東北・北海道では生殖生長期に当たる7月下旬から8月上旬にかけてオホーツク高気圧の停滞による異常低温が発生しやすく、この時期の低温による受精障害はその後の天候回復でも復帰しないことから、障害型冷害が最も深刻な問題になっている。生殖生長期の中でも特に低温に弱いのが穂ばらみ期と開花期であり、低温発生時期によって穂ばらみ期冷害と開花期冷害に分類される。穂ばらみ期は花粉母細胞が小胞子を経て成熟花粉となる時期に相当する。この時期の低温によって分化小胞子数の減少や小胞子の退化が起こり、成熟花粉の数が減少して不稔を発生する。開花期の低温では開穎、受粉および花粉の発芽が影響を受けることによって不稔が発生する。

障害型冷害の克服には穂ばらみ期耐冷性品種の育成が大きな役割を果たしてきた。開花期耐冷性に比べて穂ばらみ期耐冷性の育種が進んだ背景には、冷水灌漑による穂ばらみ期耐冷性の検定法が早期に確立したことがある。冷水によって稔実が低下することは古くから知られており、稔実性に関して冷温抵抗性と冷水抵抗性に平行関係があることも認められていたことから、耐冷性検定に冷水を活用しうることが示されていた (福地1931)。鳥山 (1962) は幼穂形成期から出穂完了まで冷水深水灌漑を行う中期冷水灌漑法を確立した。この方法は、現在、耐冷性育種において一般的に用いられている。耐冷性検定法が確立したことにより数多くの耐冷性品種が育成され、また、穂ばらみ期耐冷性に関する遺伝学的研究も進んだ。しかし、穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の正確な座乗位置や遺伝効果については現在でも十分に解明されていない。

穂ばらみ期耐冷性を含めて、農業形質には量的形質が多い。形質発現が量的になる要因としては一つの形質に複数の遺伝子座が関与することと、遺伝子型に対応した表現型が環境条件により量的に増減することがある。これらの理由により量的形質では遺伝子型と表現型を明確に対応づけることができず、遺伝子座の位置や遺伝効果を推測することは困難だった。近年、イネにおいても制限酵素断片長多型 (RFLP) 連鎖地図が構築された (McCouchら1988, Saitoら1991, Kurataら1994, Harushimaら1998)。RFLPマーカーの開発により遺伝マーカーの数が飛躍的に増大した。そのため、1個の分離集団について染色体全域についての遺伝解析を行うこと

が可能となり、量的形質に関与する遺伝子座を解析することが可能となった（Patersonら 1988）。

そこで本研究では、RFLPマーカー等のDNAマーカーを用いて北海道品種の穂ばらみ期耐冷性に関する遺伝解析を行い、穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の同定を試みた。第II章では穂ばらみ期冷害について冷害発生の生理細胞学的研究と耐冷性の遺伝育種学的研究を中心に概括した。第III章ではインドネシア原産の熱帯ジャポニカ品種Silewah由来の穂ばらみ期耐冷性遺伝子を持つ水稻中間母本農8号について穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の座乗染色体領域を同定した。第IV章では穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の精密マッピングを行い、穂ばらみ期耐冷性遺伝子の機能を推定した。最後に、第V章ではDNAマーカーによる穂ばらみ期耐冷性の遺伝解析を耐冷性品種の育成につなげるために今後残された問題点を整理した。本研究の一部は既に報告（Saitoら 1995, 2001, 2003, 2004）しており、本論文はそれらを取りまとめたものである。

[次へ進む](#) [目次に戻る](#)

II. 穂ばらみ期耐冷性の研究

1. 冷害危険期の研究

イネの冷害は古くからの問題であり、江戸時代から様々な記録が残されているが、科学的な冷害研究が始まったのは1930年代であるとされている。それ以前は冷害に関する作物学的な研究が少なく、冷害危険期は漠然と開花期であると考えられていた。しかし、1931年から1935年にかけて連続して冷害が発生し、冷害の作物学的研究が始まると、天候回復後に出穂したイネでも品種によっては不稔を発生していたことがわかり、開花期以前の低温が不稔につながっていると考えられるようになった（福地1931）。酒井（1937）は低温障害に関する細胞組織学的な研究を行い、低温によって花粉母細胞の減数分裂に異常を生ずることを示した。続いて、寺尾ら（1940）は17℃、6日間の低温処理実験から低温感受性が最も高いのは減数分裂期であること、また、幼穂分化開始期と開花期の低温も不稔を発生させることを示した。これらの研究を通じて、障害型冷害の最大危険期は減数分裂期であると考えられるようになった。

酒井（1943）は1941年の冷害によって生じた低温障害を細胞組織学的に調べ、花粉母細胞の異常の他にタペート細胞の異常発達（タペート肥大）を発見した。その後、タペート肥大が低温処理によって実験的に発生させられることを示し、さらに、タペート肥大の発生率に品種間差があることやタペート肥大の発生率と穂ばらみ期耐冷性が相関することを明らかにした（酒井1949）。しかし、タペート肥大の発生は減数分裂が完了した後の四分子期から小孢子前期であり（酒井1949）、低温感受性期は厳密には減数分裂期よりも後である可能性が示された。Satake・Hayase（1970）は人工気象室で均一に育てたイネの主稈のみを用いること、葉耳間長によって選ばれた生育のそろった穂を選ぶこと、さらに穂上の穎花を位置別に調査することによって、低温感受性期を厳密に調査し、最大の低温感受性期は四分子期から小孢子前期（佐竹らはこの時期を小孢子初期と名付けた）であることを明らかにした。小孢子初期は出穂の10～12日前に相当し、この時期の低温に対する耐冷性が穂ばらみ期耐冷性と呼ばれる。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

II. 穂ばらみ期耐冷性の研究

2. 低温障害の発生機作

酒井（1943）は低温によって花粉母細胞の減数分裂異常やタペート肥大が起こることを示し、これが、冷害の原因であるとした。しかし、同時に胚のう母細胞の異常も観察しており、不稔の発生が雄性器官の障害のみによるのか、雄性器官と雌性器官の障害によるのかは確定していなかった。Hayaseら（1969）は穂ばらみ期に低温処理を施した材料に健全な花粉を受粉すると稔実が回復することを示し、穂ばらみ期冷害が主に雄性器官の障害によることを明らかにした。

村上ら（1958）は不稔発生の生理的機作を明らかにするために、低温による葯の組織化学的異常を調べ、内被、タペート層および篩部組織で異常が顕著であり、花粉母細胞、花粉、葯壁組織および柔組織では異常は比較的少ないことを示した。このことから、花粉母細胞や小孢子への養分供給が滞ることによって不稔が発生すると示唆された。低温処理による生化学的な反応としては無機リンの減少と非還元糖の増加（Ito 1978）、デンプンの蓄積（Satake 1976）、酸性フォスファターゼ活性の低下（Nishiyama 1978）などが観察されている。これらの異常はすべて糖代謝に関連している。糖代謝の異常が浸透圧の変化を通じてタペート肥大を引き起こしている可能性が示唆されている。また、Kawaguchiら（1996）はアラビノガラクトタンパク質の糖鎖部分と似た構造を持つ四糖類が低温処理によって小孢子初期特異的に蓄積すること、低温感受性の突然変異系統では四糖類の蓄積量が少ないことを明らかにした。四糖類に対する抗体を用いた実験から、この糖鎖を持つアラビノガラクトタンパク質はタペート細胞の表面に存在することが示唆された。一連の研究は低温障害の一次的生理反応が小孢子を取り囲む周辺組織で起こっていることを強く示唆している。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

北海道におけるイネ穂ばらみ期 耐冷性の遺伝解析

II. 穂ばらみ期耐冷性の研究

3. 穂ばらみ期耐冷性の機作

低温障害に関する細胞組織学的研究や生理生化学的研究は数多く行われたが、穂ばらみ期耐冷性獲得の機作についてはほとんど解明されていない。Satake・Shibata（1992）は小胞子の分化から受精に至るまでの発育段階を小胞子分化、花粉の成熟、柱頭への受粉、花粉管の発芽・受精の4段階に分け、それぞれの要素である分化小胞子数、発育花粉歩合、受粉歩合および柱頭上花粉の受精率について品種間比較を行って、稔実率に対する寄与率を評価した。その結果、染分、赤毛、キタアケ、道北糯18号、中母42号、はやゆき等は分化小胞子数の寄与率が大きく、染分、ハマアサヒ、キタアケ、トドロキワセ、はやゆき、コチミノリ等は発育花粉歩合の寄与率が大きく、そらち、中母42号、はやゆき、キタアケ等は受粉歩合の寄与率が大きかった。この結果は耐冷性獲得機構が品種によって異なることを示唆している。

受精に関係する4要素のうち分化小胞子数は通常栽培条件下での1葯当たりの花粉数に相当する。自然受粉で受精率が90%以上になるための花粉数の限界値は1葯当たり640個と見積もられており（Nishiyama 1983）、1葯当たりの花粉数と葯長には強い相関関係があることから（Oka・Morishima 1967、鈴木1981）、葯長は穂ばらみ期耐冷性にとって重要な要素の一つであると考えられた。実際に耐冷性品種は葯が長いことが示され（鈴木1981、丹野ら1999）、また、鈴木（1982）は分離集団において葯長と穂ばらみ期耐冷性に相関があることを示した。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

北海道におけるイネ穂ばらみ期 耐冷性の遺伝解析

II. 穂ばらみ期耐冷性の研究

4. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の研究

穂ばらみ期耐冷性の遺伝解析を行うためには耐冷性検定法の確立が必要不可欠である。酒井・島崎（1948）は農林9号（耐冷性強）と農林20号（耐冷性弱）のF₁, F₂を用い、タペート肥大の発生率から耐冷性を評価することにより、耐冷性は優性であることと2対の重複同義遺伝子に支配されることを示した。この研究は穂ばらみ期耐冷性に関する最初の遺伝解析として知られるが、タペート肥大の発生率を用いる耐冷性検定法は、その煩雑さから一般には活用されなかった。その後、耐冷性検定法として中期冷水灌漑法が確立し（鳥山1962）、穂ばらみ期耐冷性の遺伝学的研究に用いられるようになった。

鳥山・蓬原（1960）は東北地方の耐冷性在来品種である染分と青森5号の交雑後代を用いて穂ばらみ期耐冷性の統計遺伝学的解析を行い、穂ばらみ期耐冷性の遺伝力は極めて高く、また、耐冷性の有効因子数は7個以上であることを示した。さらに、耐冷性有効因子と標識遺伝子との連鎖関係に関する結果と併せ、耐冷性は5～7対の相加効果を持つ優性遺伝子に支配されると結論づけている。Sawada（1978）は同様の方法により、農林9号の耐冷性に関する有効因子数は5個内外で、因子間に連鎖関係が無いことを示した。この結果は上記のタペート肥大発生率を指標とした場合の因子数よりも多かった。この違いは穂ばらみ期耐冷性の獲得にタペート肥大抵抗性以外の要素が含まれていることによると考えられる。西村（1995）は耐冷性の異なる北海道イネ品種7品種の総当たり交雑による耐冷性の遺伝分析を行った。これらの品種間では耐冷性の違いは2つの遺伝子座によって支配されていた。耐冷性極強のはやゆきは2個の耐冷性遺伝子を持ち、そのうちの1つは優性、もう1つは不完全優性だった。耐冷性強～中品種のそらち、はやこがね、イシカリ、ユーカラは不完全優性の耐冷性遺伝子1個を持ち、耐冷性やや弱～弱品種の農林20号、豊光はこれらの耐冷性遺伝子を持たないことが示された。品種間のわずかな耐冷性の違いには微働遺伝子も関与していると推測されたが、穂ばらみ期耐冷性が比較的少数の主働遺伝子で説明可能であると考えられた。

耐冷性育種においては、耐冷性そのものだけでなく、草型や出穂期等、他の形質の改善も必要であることから、耐冷性遺伝子の座乗染色体を明らかにすることはその他の形質との連鎖関係を知る上で重要である。染分の穂ばらみ期耐冷性は第1染色体の*d2*、第3染色体の*bc*、第4染色体の*Pr*、第5染色体の*gh*および*nl*と連鎖関係があり、第1染色体の*A*および*Rd*、第2染色体の*bl*、第6染色体の*C*、第7染色体の*g*および*Rc*とは連鎖関係が無かった（鳥山・蓬原1960, Futsuhara・Toriyama 1966）。北海道品種についても耐冷性の異なる品種および標識遺伝子系統間の交雑による遺伝分析が行われ、第1, 2, 3, 4, 6, 7染色体の標識遺伝子に耐冷性との連鎖が認められた（Takahashiら1973, Sawada 1978）。耐冷性との連鎖関係が見られた標識遺伝子は交雑組合せによって異なっていたことから、耐冷性遺伝子は品種によってかなり異なっていると考えられた。また、特に第3染色体の*bc*と第4染色体の*Pr*で強い連鎖関係が見られた。

一連の遺伝学的研究から穂ばらみ期耐冷性の遺伝に関しては、以下のような共通認識が形成された。

1. 穂ばらみ期耐冷性はポリジーンに支配される形質である。
2. 比較的少数の優性主働遺伝子が存在する。
3. 遺伝力が高く，適切な耐冷性選抜を行えば耐冷性育種は可能である。

この共通認識を基礎として耐冷性育種が進められ，現在では耐冷性の強い実用品種が育成されている（新橋ら2003）。しかし，穂ばらみ期耐冷性は量的形質であるために詳細な遺伝解析は困難であり，耐冷性遺伝子座の正確な座乗位置や遺伝効果はわかっていない。今後，耐冷性育種を効率的に進めるためには，耐冷性遺伝子座に関するより精密な遺伝分析を行う必要がある。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

北海道におけるイネ穂ばらみ期 耐冷性の遺伝解析

II. 穂ばらみ期耐冷性の研究

5. 穂ばらみ期耐冷性の遺伝資源

穂ばらみ期耐冷性に関して単独で十分な効果を持つ耐冷性遺伝子は見つかっていない。そのため、これまでの耐冷性育種は耐冷性遺伝子の集積によって行われてきた。東北地方における水稻品種の主要な耐冷性遺伝子供給源は愛国と神力の2品種であると推測されている（佐々木・松永1985）。愛国系の耐冷性品種にコシヒカリがある。北海道の本格的な稲作は赤毛から始まった。系譜的考察から北海道品種の耐冷性は赤毛系の耐冷性に愛国系の耐冷性が集積された結果であると考えられている（西村1991）。このように現在国内で利用されている耐冷性遺伝資源の種類はあまり多くないと考えられている。

耐冷性に関する遺伝的多様性の低さは、今後、耐冷性向上の限界につながるおそれがあることから、外国稲の中に耐冷性遺伝資源を探索する試みがなされた。国際イネ研究所（IRRI）では保有する17,689点の遺伝資源について様々な耐冷性評価が行われ、Padi Sasahal（マレーシア原産）、Lambayque 1（ペルー原産）、Mitak（インドネシア原産）、Padi Labou Alumbis（マレーシア原産）、Jumali（ネパール原産）、Pratao（ブラジル原産）、C21（フィリピン原産）、Leng Kwang（中国原産）、Silewah（インドネシア原産）、Thangone（ラオス原産）、Dourado Agullia（ブラジル原産）が耐冷性品種として選抜された（IRRI 1977）。Satake・Toriyama（1979）はこれらの穂ばらみ期耐冷性について北海道における再評価を行い、北海道の耐冷性品種を上回る穂ばらみ期耐冷性を示す品種を見出した。北海道農業試験場（現北海道農業研究センター）ではこれらの品種から穂ばらみ期耐冷性を導入する試みを行い、Silewahより中間母本農8号を（安部ら1989）、Padi Labou Alumbisより中間母本農11号を、Lambayque 1より北海PL5を、Mitakより北海PL6を、Thangoneよりキタカオリをそれぞれ育成した。耐冷性遺伝資源の探索は日中共同研究の一環として中国・雲南省の遺伝資源についても行われ、麗江新団黒谷や昆明小白谷などの品種が見出されて、耐冷性遺伝子を導入する試みが行われている（伊勢ら1999）。

外国稲から耐冷性遺伝子を導入すると、日本国内での実用品種にとっては劣悪な形質も同時に導入されてしまうことが多い。そのため、外国の耐冷性遺伝資源を耐冷性実用品種の育成に利用するのは現実には非常に困難であり、未だに外国稲由来の耐冷性遺伝子を導入した中間母本から実用品種が育成された例は無い。今後、このような耐冷性遺伝資源を利用していくためには、耐冷性遺伝子座についての詳細な情報を得る必要がある。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

北海道におけるイネ穂ばらみ期 耐冷性の遺伝解析

III. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座乗領域の同定

1. 中間母本農8号のグラフィカルジェノタイプ分析

制限酵素断片長多型 (RFLP) マーカーの開発によって、遺伝解析が困難だった量的形質遺伝子座 (QTL) もより高い精度で分析できるようになると考えられた (Patersonら1988)。そこで本研究では、Saitoら (1991) が開発したRFLPマーカーを用いて、マーカー周辺の染色体領域がどちらの交配親に由来するかを全染色体について調べるグラフィカルジェノタイプ分析を行い、穂ばらみ期耐冷性遺伝子が座乗する染色体領域の同定を試みることにした。

RFLPは制限酵素が認識する塩基配列の置換および2つの制限酵素切断部位間で起こる挿入／欠失による多型である。そのため、品種が遺伝的に遠縁であるほどRFLPの検出率は高く、RFLP連鎖地図の構築はインディカ・ジャポニカ間の交雑によって行われた (McCouchら1988, Saitoら1991)。インディカは通常ジャポニカよりも耐冷性が弱い。しかし、インディカは出穂期が北海道の品種とは大きく異なるため、インディカ・ジャポニカ間の交雑集団では北海道における穂ばらみ期耐冷性を正確に評価することは困難であると考えられた。そこで、次に、耐冷性の強い外国稲の利用を検討した。1982年から1997年にかけて日中共同研究の一環として中国・雲南省の遺伝資源に関する調査が行われ、多くの耐冷性品種が選抜された。しかし、選抜された耐冷性品種はエステラーゼアイソザイムの分析結果からいずれも日本品種と遺伝的に近く、RFLPの検出率は低いと推測された (長峰, 私信)。また、雲南省の耐冷性品種を北日本で栽培すると通常気象条件下でも20~30%の不稔を生じたことから (堀末ら1988)、北海道における穂ばらみ期耐冷性の遺伝分析には不相当と思われる。これらの問題点を克服し得る研究材料として北海道農業試験場 (現北海道農業研究センター) で育成された水稻中間母本農8号 (以後、中母農8とする) の利用を検討した。

中母農8はインドネシア原産の耐冷性品種Silewahに北海道の育成系統である北海241号を連続戻し交配することによって育成した高度耐冷性中間母本である。Silewahはスマトラ島北部高地 (標高約1,300m) で栽培されていた品種で、国際イネ研究所および北海道農業試験場の評価により強い穂ばらみ期耐冷性を持つことが示されている (Satake・Toriyama 1979)。中母農8の穂ばらみ期耐冷性は北海241号よりも明らかに強いことから、中母農8はSilewahに由来する耐冷性遺伝子を保有しているものと考えられる。中母農8の耐冷性は優性であり、耐冷性遺伝子の数は石毛 (1979) の最尤法によって2個と推定されている (安部ら1989)。中母農8が比較的単純な戻し交雑育種法によって育成されたことと、その穂ばらみ期耐冷性が少数の遺伝子に支配されていると考えられたことから、RFLPマーカーを用いてSilewahから中母農8に導入された染色体領域を特定すれば、耐冷性遺伝子座乗候補領域を特定できると考え、実験を行った。

1) 材料

穂ばらみ期耐冷性に対する細胞質の影響を調べるために中母農8ときらら397のF₁雑種を用いた。きらら397は障害型耐冷性やや強の良食味品種である (佐々木ら1990)。

RFLP分析にはSilewah, 北海241号, 中母農8を用いた。Silewahは強い耐冷性を持つ熱帯ジャポニカ品種であり、温帯ジャポニカ品種との交雑親和性は高いが、極晩生、極長稈で脱粒しやす

い。一方、北海241号は早生、強稈、良質、多収、耐冷性やや強の育成系統である。中母農8はSilewahに北海241号を連続戻し交配して育成したBC₃F₆系統から得られた穂ばらみ期耐冷性極強の中間母本である。戻し交配の過程では、ビニールハウスで生育促進したイネを6月下旬の自然冷温にさらして障害不稔を誘発することにより、耐冷性個体が選抜された。BC₃F₁世代で草型・粒形・熟期・脱粒性がほぼ改善され、しかも耐冷性が強い個体が選抜され、系統育種法により耐冷性を重視しながら諸特性の選抜を継続して固定が行われた。中母農8の出穂性、草型、脱粒性などはほぼ改善されているが、北海241号と比べると出穂は約10日遅れ、稈長も約20cm長い(安部ら1989)。

耐冷性遺伝子座乗候補領域を絞り込むために中母農8の姉妹系統である北海PL4についてもRFLP分析を行った。北海PL4は中母農8と同じ育成系譜を持つ耐冷性極強の育成系統である。しかし、厳密には中母農8に比べて耐冷性がわずかに劣る(西村、私信)。

2) 方法

(1) 耐冷性検定

耐冷性検定は北海道農業研究センターの精密検定圃場における中期冷水灌漑法(鳥山1962)によって行った。幼穂形成開始期から出穂が完了するまで19°Cの冷水を約20cmの深さで灌漑した。登熟完了後、全籾数に対する稔実種子の割合を調べて穂ばらみ期耐冷性を評価した。

(2) DNA抽出

全DNAの抽出はCTAB法(Murray・Thompson 1980)の変法により行った。液体窒素中で粉末にしたイネ葉(1g)に、55°Cに加温した1×CTAB溶液(1%セチルトリメチルアンモニウムブロマイド(CTAB), 0.05Mトリス-塩酸, pH8.0, 10mMエチレンジアミン4酢酸

(EDTA), 0.7M塩化ナトリウム) 1mlおよび2×CTAB溶液1mlを加え、55°Cで30分加温した後、クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)混液を等量添加し、静かに転倒混和して抽出を行った。遠心(1500g, 15分, 室温)した後上層を取り、1/10量の10%CTAB溶液(10%CTAB, 0.7M塩化ナトリウム)を加えてクロロホルム/イソアミルアルコール混液による再抽出を行った。遠心(1500g, 15分, 室温)後、上層を取り、等量の沈殿用CTAB溶液

(1%CTAB, 0.05Mトリス-塩酸, pH8.0, 10mM EDTA)溶液を加えて混和し、室温に30分間静置してDNAを沈殿させた。遠心(1000g, 1分, 室温)して沈殿を回収し、3mlの高塩濃度TE溶液(1M塩化ナトリウム, 10mMトリス-塩酸, pH8.0, 1mM EDTA)に溶解した。等量のイソプロパノールを加えてDNAを沈殿させた後に、沈殿を70%エタノールで脱塩し、真空乾燥して1/10TE溶液(1mMトリス-塩酸, pH8.0, 0.1mM EDTA)に溶解して実験に供試した。

(3) RFLP分析

全DNA 2 µgを制限酵素(*Bgl* II, *Bam* HI, *Eco* RV, *Hind* III, *Apal*, *Dra* I, *Eco* RI, *Kpn* I)で消化し、0.8%のアガロースゲルで電気泳動した。泳動後のアガロースゲルを酸溶液(0.5N塩酸)中で7分、アルカリ溶液(0.5N水酸化ナトリウム, 1.5N塩化ナトリウム)中で15分間2回、さらに中和溶液(0.5Mトリス-塩酸, pH7.0, 1.5M塩化ナトリウム)中で30分間振とうした後、ゲル中のDNA断片は20×SSC溶液(3M塩化ナトリウム, 0.3Mクエン酸)を用いてキャピラリー法によりナイロンメンブレン(Hybond N+, アマシャムバイオサイエンス社)に転写した。

RFLPマーカーの標識はECLダイレクトラベリング検出システム(アマシャムバイオサイエンス社)を用いて行った。42°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った後にメンブレンを42°Cの洗浄用溶液(0.5×SSC, 6M尿素, 0.4%硫酸ドデシルナトリウム(SDS))で20分間2回洗浄し、2×SSCですすいだ後にECL検出試薬にメンブレンを浸してX線フィルムに露光した。

3) 結果

中母農8はSilewahを雌性親、北海241号を花粉親とするF₁個体に北海241号を連続戻し交配して育成した系統である。そのため、中母農8の細胞質遺伝因子はSilewah由来となっている。そこで、まず、細胞質の遺伝子が穂ばらみ期耐冷性に関与しているかどうかを調べるために、きらら397、中母農8、きらら397／中母農8のF₁雑種および中母農8／きらら397のF₁雑種各5個体を用いて穂ばらみ期耐冷性を比較した(第1表)。中母農8型の細胞質を持つFF₁雑種の稔実率はきらら397型の細胞質を持つFF₁雑種の稔実率よりも若干高かったが、その差は有意ではなかった(P=0.0801)。また、両FF₁雑種の稔実率は中母農8をやや上回っていたが、F₁雑種と中母農8の差も有意ではなかった(P=0.0741)。以上の結果および安部ら(1989)による遺伝解析の結果から、中母農8の穂ばらみ期耐冷性は主に優性の核遺伝子に支配されていると考えられた。

中母農8の遺伝子型を全染色体領域について調べるために、RFLP連鎖地図(Saitoら1991)上のRFLPマーカーについてSilewah、北海241号、中母農8のRFLPパターンを調べた。240個のRFLPマーカーのうち102個はSilewahと北海241号の間で多型を示したが、残りの138個では多型は認められなかった。多型検出率は第8、12染色体で高く、第1、2、6、10染色体では低かった(第2表)。このことは熱帯ジャポニカ品種であるSilewahが温帯ジャポニカに近い染色体領域とインディカに近い染色体領域を有していることを示唆していた。多型が検出されたRFLPマーカーには北海241号と中母農8が同じパターンを示しSilewahのみが異なるパターンを示すものと、Silewahと中母農8が同じパターンを示し北海241号のみが異なるパターンを示すものがあった(第1図)。北海241号と中母農8が同じパターンを示すRFLPマーカーには全染色体に分布する90個のRFLPマーカーが含まれていた。これらのRFLPマーカーが座乗する染色体領域については、中母農8の染色体は北海241号由来になっていると考えられる。一方、Silewahと中母農8が同じパターンを示すRFLPマーカーは12個あり、第1染色体に2個(XNpb346, XNpb368)、第3染色体に3個(XNpb100, XNpb279, XNpb345)、第4染色体に5個(XNpb102, XNpb177, XNpb235, XNpb264, XNpb267)、第7染色体に1個(XNpb379)、第8染色体に1個(XNpb278)座乗していた。これらのRFLPマーカーが座乗する染色体領域について、中母農8の染色体はSilewah由来になっていると考えられた。ただし、第7染色体のRFLPマーカーXNpb379で認められた多型は後述の分離集団を用いた分析で第4染色体のRFLPマーカーと連鎖することが確認された。XNpb379はサザンハイブリダイゼーションで2本のバンドが検出されることから、XNpb379と相同性のある塩基配列が第4染色体と第7染色体にあり、本実験では第4染色体の多型を検出したと考えられる。以上の結果を基に中母農8のグラフィカルジェノタイプを推定した(第2図)。Silewahから中母農8に導入された染色体領域は第1、3、4および8染色体に存在することがわかった。

Silewah由来染色体領域中のRFLPマーカーについて中母農8の姉妹系統である北海PL4のRFLP分析を行った。その結果、第1染色体と第4染色体のRFLPマーカーは北海PL4でもSilewah型のパターンを示したが、第3染色体と第8染色体のRFLPマーカーは北海241号型のパターンを示した。したがって、中母農8と北海PL4に共通するSilewah由来領域は第1染色体と第4染色体にあることが明らかになった。

4) 考察

育成系譜より中母農8はSilewah由来の細胞質遺伝因子を持つと推測された。また、穂ばらみ期耐冷性には“不稔”という現象が関わるため、細胞質雄性不稔との類似性も考慮する必要があると考えられた。そこで、正逆交雑のF₁個体を用いて、細胞質と穂ばらみ期耐冷性の関連を検討

したが、中母農8の細胞質は穂ばらみ期耐冷性に対して大きな効果を持たないことが明らかになった。Sawada (1978) は同様の方法により、はやゆきや農林9号が持つ耐冷性には細胞質は関与しないことを示している。また、低温処理による葯の不裂開と雄性不稔イネにおける葯の不裂開は異なることを解剖学的に観察している。ミトコンドリアDNAのRFLP分析ではインディカ・ジャポニカ間の多型は認められているが、温帯ジャポニカと熱帯ジャポニカの間では多型は認められていない(河内ら1997)。以上の結果から、穂ばらみ期耐冷性に細胞質の遺伝因子が関与する可能性は低いと考えられる。

中母農8は第1, 3, 4および8染色体に耐冷性遺伝子源であるSilewahから導入された染色体領域を持つことが示された。Silewahに由来する穂ばらみ期耐冷性遺伝子はこれらの領域内に座乗する可能性が高いと考えられる。中母農8の姉妹系統である北海PL4は第3染色体と第8染色体のSilewah由来領域を持たなかった。このことは穂ばらみ期耐冷性に大きな効果を持つ遺伝子は第1または第4染色体に座乗する可能性が高いことを示唆しているが、北海PL4の耐冷性は中母農8にわずかに劣るとされていることから、この違いが第3染色体または第8染色体の違いによるものである可能性もあり、耐冷性に関与する染色体領域を特定するためには分離集団を用いた遺伝分析が必要である。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

北海道におけるイネ穂ばらみ期 耐冷性の遺伝解析

III. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座乗領域の同定

2. 導入染色体領域と耐冷性の関連

中母農8のグラフィカルジェノタイプ分析を行った結果、第1, 3, 4および8染色体にSilewahから中母農8へ導入された染色体領域が存在することが明らかになった。これらの領域は耐冷性遺伝子座乗領域の有力な候補であると考えられるが、グラフィカルジェノタイプ分析ではRFLPマーカーの多型を検出できないために由来を特定することができなかった染色体領域も第6染色体や第10染色体などに残された(第2図)。これらの由来不明領域に穂ばらみ期耐冷性遺伝子座が存在する可能性も残されているが、有効なマーカーが存在しない状態では、そのことを調べるのは困難である。一方、既に特定されたSilewah由来領域については分離集団におけるマーカー遺伝子型と穂ばらみ期耐冷性の分析から、穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の有無を解明できると考えられる。そこで、本研究では分離集団を用いて耐冷性遺伝子座乗染色体領域の特定を試みた。

1) 材料

Silewahから中母農8へ導入された染色体領域と穂ばらみ期耐冷性の関連を調べるために、きらら397と中母農8のF₁雑種へきらら397を戻し交配して得た戻し交雑自殖系統および北海241号に中母農8を交配し、単粒系統法によって養成したF₉系統を用いた。

2) 方法

(1) マーカー分析

きらら397と中母農8の戻し交雑自殖系統による遺伝分析にはRFLPマーカーを用いた。RFLP分析は前述と同様に行った。

北海241号と中母農8のF₉系統による遺伝分析にはマイクロサテライトマーカー (Temnykhら 2000, 2001) を用いた。分析に用いるDNA溶液は前述のCTAB法によって調製した。マイクロサテライトマーカー増幅のためのpolymerase chain reaction (PCR) 反応溶液組成はプライマー各0.2 μM, dNTP各100 μM, 塩化カリウム50mM, トリス-塩酸 (pH8.3) 10mM, 塩化マグネシウム1.5mM, ゼラチン0.001%, 鋳型DNA 1 ng/μl, AmpliTaqGold DNAポリメラーゼ (アプライドバイオシステムズ社) 0.02U/μlとした。PCRはアプライドバイオシステムズ社のPCR2400, PCR9600またはPCR9700を用いて行い、94°Cで4分間変性した後に94°C 1分, 55°C 1分, 72°C 2分を45サイクル繰り返し、72°Cで7分間伸長反応を行った。反応液5 μlを4%のNuSieve 3:1アガロース (Camblex社) ゲル中で電気泳動し、臭化エチジウム染色後、結果の観察を行った。

(2) 1993年自然冷害時の調査

中母農8ときらら397のBC₁F₄集団は1993年に一般圃場において自然冷害に遭遇した。このうち43個体から成葉を採取し、前述と同様の方法でDNA抽出とRFLP分析を行った。また、穂を採取し、稔実率を調査した。

(3) 耐冷性検定

耐冷性検定は前述と同様に行った。穂ばらみ期耐冷性とマーカーの関連の有無はt検定法によって評価した。各系統をマーカーの遺伝子型によって分類し、遺伝子型間で平均稔実率を比較した。コンピューターソフトウェアStatView 5.0 (SAS Institute) を用いて平均稔実率の差に関するt値および有意度を求めた。

3) 結果

導入染色体領域と穂ばらみ期耐冷性の関連を調べるために中母農8にきらら397を戻し交配して得た戻し交雑後代系統について穂ばらみ期耐冷性とRFLPマーカーの遺伝子型を調べた。まず、1993年の冷夏によって被害を受けたBC₁F₄個体43個体について成葉と穂を採種し、RFLPマーカーの遺伝子型と稔実率を調べたところ、第3染色体と第4染色体のRFLPマーカーについては中母農8型の平均稔実率がきらら397型の平均稔実率よりも高かったのに対し、第8染色体のRFLPマーカーでは両遺伝子型の稔実率に差がなかった(第3表)。第1染色体のRFLPマーカーについては中母農8ときらら397の間で多型を示さなかったため、調べることができなかった。この結果は第3染色体と第4染色体の導入領域が穂ばらみ期耐冷性と関連している可能性を示していたが、その関連の程度は第4染色体のXNpb102を除くと有意ではなかった。

そこで、導入染色体領域と穂ばらみ期耐冷性の関連をより正確に評価するために、翌1994年、きらら397と中母農8のBC₁F₅系統92系統を用い、精密検定圃場における中期冷水灌漑法によって耐冷性検定を行った。各系統について3株より15穂を採種して稔実率を調べた。きらら397の稔実率は26.8%、中母農8の稔実率は82.4%で、BC₁F₅系統の稔実率は親品種の間に連続的に分布していた(第3図)。また、両親を大きく超越する系統も認められなかった。第4表にRFLPマーカーの遺伝子型別平均稔実率を示す。第3染色体のRFLPマーカーXNpb100についてきらら397型の平均稔実率が49.7%だったのに対し、中母農8型の平均稔実率は56.8%で、きらら397型の系統に比べ有意(P=0.0185)に高かった。第4染色体のRFLPマーカーXNpb264についてもきらら397型の平均稔実率が49.8%だったのに対し、中母農8型の平均稔実率が58.3%で、中母農8型の平均稔実率が有意(P=0.0135)に高かった。一方、第8染色体のRFLPマーカーについてはきらら397型と中母農8型の平均稔実率に違いがなかった。以上の結果は、自然冷害時の結果と一致しており、第3染色体と第4染色体の導入領域が穂ばらみ期耐冷性と関連していることが明らかになった。

きらら397と中母農8の交雑組み合わせでは第1染色体の導入領域について耐冷性との関連を調べることができなかった。また、多型を検出できない領域が多く残されており、このような領域に耐冷性遺伝子が座乗している可能性も否定できない。そこで、第3、第4染色体以外に耐冷性遺伝子座が存在するかどうかを調べるために、新たにマイクロサテライトマーカーを用い、北海241号と中母農8の交雑組み合わせで耐冷性遺伝子座の探索を行った。

まず、503個のマイクロサテライトマーカーについて北海241号と中母農8の間で多型を示すマーカーを探索し、6個のマーカーを見出した。これらは第1、3、4染色体に座乗していた(第4図)。第3染色体と第4染色体のマイクロサテライトマーカーは既に見出されているRFLPマーカーと同じ領域にマップされていた。第1染色体のマイクロサテライトマーカーはRFLPマーカーが見出された領域と異なる位置にマップされていた。このことは第1染色体に複数の導入領域が存在することを示唆する。そこで第1染色体のRFLPマーカーがマップされている領域の塩基配列情報を基にマイクロサテライトマーカーの作出を試みたが、北海241号と中母農8の間で多型を示すマイクロサテライトマーカーは見つからなかった。XNpb346とXNpb368のサ

ザンハイブリダイゼーションパターンは多数のマイナーバンドを生じるパターンであり、連鎖地図構築時に何らかの誤差が生じた可能性もある。第1染色体のSilewah由来領域については今後詳細な検討を加える必要がある。

各マイクロサテライトマーカーと穂ばらみ期耐冷性の関連を調べるために北海241号×中母農8のF₉系統についてマーカー遺伝子型の分析と耐冷性検定を行った。精密検定圃場に各系統につき5個体を播種して耐冷性検定を行った。中母農8の稔実率は34.0%、北海241号の稔実率は9.9%だった。第5表にマイクロサテライトマーカー遺伝子型毎の平均稔実率を示す。第1染色体のマイクロサテライトマーカーRM283について北海241号型の系統の平均稔実率が16.6%だったのに対し中母農8型の系統の平均稔実率は25.1%で、その差は有意 ($P=0.0129$) だった。第3染色体のマイクロサテライトマーカーについては北海241号型の系統と中母農8型の系統に差がなかった。第4染色体のマイクロサテライトマーカーでは北海241号型と中母農8型の平均稔実率に大きな差が認められ、その差は高い水準で有意 ($P<0.0001$) だった。以上の結果は第1染色体と第4染色体に耐冷性遺伝子座が存在することを示している。また、第1染色体のマーカーRM283における両遺伝子型間の平均稔実率の差が8.5%、第4染色体のマーカーRM317における両遺伝子型間の平均稔実率の差が17.7%で、その合計は26.2%となり、両親の平均稔実率の差(24.1%)とほぼ同じであった。さらに、第1染色体と第4染色体の耐冷性遺伝子の効果は相加的で、両方の耐冷性遺伝子を持たない系統の耐冷性は北海241号とほぼ同じであり、両方の耐冷性遺伝子を持つ系統の耐冷性は中母農8とほぼ同じだった(第6表)。このことは第1染色体と第4染色体以外に大きな効果を持つ耐冷性遺伝子座が存在する可能性は低いことを示している。平均稔実率の差は第4染色体のマーカーで大きかったことから、中母農8の耐冷性に関する主働遺伝子は第4染色体に座乗すると考えられた。

第1染色体のマイクロサテライトマーカーを用いて中母農8ときらら397の多型検出を試みたが、両品種間ではRFLPマーカーと同様に多型は認められなかった。そのため、中母農8ときらら397の分離集団では第1染色体の耐冷性遺伝子座を確認することはできなかった。

4) 考察

中母農8は第1, 3, 4および8染色体にSilewah由来の領域を持っており、きらら397と中母農8の分離集団では第3染色体と第4染色体のマーカーで、北海241号と中母農8の分離集団では第1染色体と第4染色体のマーカーで穂ばらみ期耐冷性との関連が認められた。第3染色体の導入領域については、2つの分離集団で異なる結果が得られた。中母農8の姉妹系統に北海PL4がある。北海PL4は第4染色体の導入領域については中母農8と同じだが、第3染色体の導入領域は持っていない。中母農8と北海PL4の耐冷性はほぼ同等であるものの、厳密には北海PL4の耐冷性が若干劣るとされている。したがって、第3染色体の耐冷性遺伝子座については北海241号、きらら397、中母農8の3品種間で遺伝子型が異なっており、中母農8ときらら397の組み合わせで耐冷性遺伝子の効果がより強く出たものと考えられる。第1染色体の導入領域についてはRFLPマーカー、マイクロサテライトマーカー共に中母農8ときらら397の間で多型を示さなかった。この結果は第1染色体の導入領域がSilewah特有のものではない可能性を示しており、きらら397が既に中母農8と同じ耐冷性遺伝子を第1染色体に持っている可能性もある。第4染色体の導入領域は両方の分離集団で穂ばらみ期耐冷性と比較的強い関連を示した。この結果はSilewahに由来する穂ばらみ期耐冷性遺伝子のうち最も効果の大きい耐冷性遺伝子が第4染色体に座乗していることを示している。

安部ら(1989)は農林20号と中母農8のF₂集団を用いた統計遺伝学的手法で、中母農8の耐冷性遺伝子座を2個と推測している。本研究でもきらら397と中母農8の交雑組合せで第3染色

体と第4染色体，北海241号と中母農8の交雑組合せで第1染色体と第4染色体に耐冷性遺伝子座を検出した。また，農林20号と中母農8のF₁雑種の穂ばらみ期耐冷性は中母農8と同等であり（安部ら1989），本研究でもきらら397と中母農8のF₁雑種の穂ばらみ期耐冷性は中母農8並であることが確認された。これらの結果は，中母農8の穂ばらみ期耐冷性が比較的少数の優性遺伝子に支配されていることを示している。したがって，今後，中母農8について新たな耐冷性遺伝子座が見つかる可能性は低いと考えられる。

北海道農業試験場（現北海道農業研究センター）では中母農8の他にもマレーシア原産のPadi Labou Alumbisから中間母本農11号を，ペルー原産のLambayque 1から北海PL5を，インドネシア原産のMitakから北海PL6を，ラオス原産のThangoneからキタカオリを戻し交雑育種法によって育成している。これらはいずれも耐冷性が強く外国稲由来の耐冷性遺伝子を持つと考えられている。このうち，北海PL5は第4，10および11染色体に耐冷性遺伝子を持つことが示されている（加藤ら1997）。また，北海PL6とキタカオリも第4染色体長腕末端部分に外国稲由来領域を持っている（著者ら，未発表）。Futsuhara・Toriyama（1966）は染分と青森5号の分離集団において穂ばらみ期耐冷性が第4染色体の標識遺伝子Prと連鎖することを示した。Takahashiら（1973）も標識遺伝子系統A-58と豊光の交雑組合せにおいて穂ばらみ期耐冷性がPrと連鎖することを示している。PrはIgおよびPhと連鎖し（Kinoshita 1987），IgとPhはRFLP連鎖地図上では第4染色体長腕末端部に位置づけられている（Saitoら1991）。したがって，これらの耐冷性遺伝子座も第4染色体長腕に座乗する可能性が高い。今後はそれぞれの品種について耐冷性遺伝子座の詳細な遺伝解析を行うことにより，耐冷性遺伝子の異同を検討する必要がある。

日本の耐冷性品種における耐冷性遺伝子供給源は愛国と神力の2品種であると推測され（佐々木・松永1985），特に愛国由来の耐冷性遺伝子が幅広く利用されている。その代表的な品種がコシヒカリである。Takeuchiら（2001）はコシヒカリの穂ばらみ期耐冷性に関するQTL解析を行い，第1，7および11染色体に耐冷性のQTLを検出した。したがって，中母農8が第4染色体に持つ穂ばらみ期耐冷性遺伝子はコシヒカリの耐冷性遺伝子とは異なる可能性が高く，この耐冷性遺伝子を集積することによって，より高度な耐冷性を実現できる可能性がある。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

北海道におけるイネ穂ばらみ期 耐冷性の遺伝解析

IV. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座のマッピングと機能の推定

1. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の区間マッピング

RFLPマーカーによるグラフィカルジェノタイプ分析と遺伝解析の結果、中母農8は第1, 3, 4および8染色体にSilewahより導入された染色体領域を持っており、そのうち、第1, 3および4染色体の導入領域について耐冷性との関連が示された。このうち、第4染色体の導入領域が最も強く耐冷性と関連していた。しかし、第4染色体の導入領域は20 cM以上あり、この中のどの部分に耐冷性遺伝子が座乗するかはわかっていない。そこで、本研究では第4染色体の耐冷性遺伝子座乗位置の絞り込みを試みた。そのために、まず、イネゲノム研究プログラム (RGP, 農業生物資源研究所/農林水産先端技術研究所) によって開発されたRFLPマーカー (Kurataら1994, Harushimaら1998) から本研究に利用可能なRFLPマーカーを選び、さらにrandom amplified polymorphic DNA (RAPD) 法 (Williamsら1990) によって新たなマーカーを開発した。これらのマーカーを用いて穂ばらみ期耐冷性遺伝子座がどのマーカー間に座乗しているかを調べるために区間マッピングをおこなった。

1) 材料

きらら397/中母農8//きらら397のBC₁F₅系統の中から強い耐冷性を示した1系統を選び、マーカー選抜によって第4染色体の導入領域を維持しつつ、きらら397による戻し交配を3回行った。最終的に第4染色体の導入領域がヘテロ型で第3染色体の導入領域を持たない個体を選抜し、その自殖後代117個体 (以後この分離集団をBT4とする) を用いて耐冷性遺伝子座の区間マッピングを行った。また、BT4の中から第4染色体導入領域内で組換えを起こしている個体12個体を選抜し、その自殖後代からマーカーを用いた固定個体の選抜を行って、組換え固定系統を育成した。

2) 方法

(1) RAPD分析

RAPD分析にはオペロン社のランダムオリゴヌクレオチド800種を利用した。PCR反応溶液組成はランダムオリゴヌクレオチド0.2 μM, dNTP各100 μM, 塩化カリウム50mM, トリシュー塩酸 (pH8.3) 10mM, 塩化マグネシウム1.5mM, ゼラチン0.001%, 鋳型DNA 1 ng/μl, AmpliTaq DNAポリメラーゼ (アプライドバイオシステムズ社) 0.02 U/μlとした。PCRはアプライドバイオシステムズ社のPCR2400, PCR9600またはPCR9700を用いて行い、94°Cで4分間変性した後に94°C 1分, 36°C 1分, 72°C 2分を45サイクル繰り返し、72°Cで7分間伸長反応を行った。反応液10 μlを1.2%のアガロースゲル中で電気泳動し、臭化エチジウム染色後、結果の観察を行った。多型が検出されたRAPDについてはTAクローニングキット (インビトロジェン社) を用いてクローニングし、DNAシーケンサー370Aまたはジェネティックアナライザー310 (アプライドバイオシステムズ社) を用いてダイターミネーター法により末端の塩基配列を解読した。この塩基配列情報を基に約20merの特異的プライマーを合成し、sequence characterized amplified region (SCAR) マーカーを作成した。

(2) 耐冷性検定

耐冷性検定は精密検定圃場および人工気象室で行った。精密検定圃場における耐冷性検定は前述と同様に行った。人工気象室の気温は昼25℃、夜19℃に設定し、光は自然光を用いた。人工気象室における耐冷性検定では冷水処理期間、冷水温度は精密検定圃場と同様であるが、水深は約24cmとした。

(3) マーカー分析

分離集団におけるRFLP分析は前述と同様に行った。SCARマーカーのPCR反応は前述のマイクロサテライトマーカーと同様に行い、1.2%のアガロースゲルで電気泳動した。

(4) QTL解析

マーカー間の遺伝距離の計算および区間マッピングにはコンピューターソフトウェアMAPL97 (Ukaiら1991, Hayashi・Ukai 1994) を用いた。

(5) YACライブラリーのスクリーニング

酵母人工染色体 (YAC) ライブラリーの高密度フィルターは農業生物資源研究所／農林水産先端技術研究所より分譲いただいた。マーカーの標識およびハイブリダイゼーションにはECLダイレクトラベリング検出システム (アマシャムバイオサイエンス社) を用いた。

3) 結果

(1) 新しいマーカーの開発

第4染色体の導入領域にはRFLPマーカーが5個しか存在せず、また、その分布も偏っている。そこで、まず、RGPで開発されたRFLPマーカーの中から第4染色体長腕末端部分のRFLPマーカー14個について調べたところ、5個のRFLPマーカー (R738, R740, R1427, R2737, C1016) で北海241号およびきらら397と中母農8の間の多型が検出できた。

次にマーカーを増やすためにランダムオリゴヌクレオチドを用いてRAPDマーカーの探索を試みた。800個のランダムオリゴヌクレオチドを用いてSilewah, 北海241号, 中母農8の3品種からDNAの増幅をおこなったところ、1756種類のDNA断片が増幅された。これらのDNA断片からSilewahと中母農8に共通で北海241号のみ異なるDNA断片を2度の反復実験により選抜した結果、22種類のプライマーにより増幅される31本のDNA断片が得られた。さらに、きらら397と中母農8のBC₁F₅系統を用いて第3, 第4染色体に位置づけられるものを選抜した結果、3種類のランダムプライマーにより増幅される3本のDNA断片が第4染色体に座乗していた (第5図)。しかし、第3染色体に位置づけられるものはなかった。これらのDNA断片をクローニングし、末端の塩基配列を基に約20merの特異的プライマーを合成して再度PCRを行ったところ、アニーリング温度55℃で特異的DNA断片を増幅する3種類のSCARマーカーが得られた (第6図)。このうちの2種類 (SCAB11, SCAM20) は品種により異なるサイズのDNA断片が増幅される共優性マーカーだったため、この2つを区間マッピングに用いた。

(2) 耐冷性遺伝子座の区間マッピング

耐冷性遺伝子が座乗している第4染色体長腕に関する分離集団BT4の117個体について精密検定圃場における耐冷性検定とマーカー遺伝子型の解析を行い、耐冷性遺伝子座の区間マッピングをおこなった。第7図aに第4染色体のSilewah由来領域における耐冷性の対数尤度 (LOD) スコアを示す。LODスコアはSilewah由来領域の中央から動原体側で比較的高く、最大のLODスコアはR2737とXNpb102の間で認められた。したがって、耐冷性遺伝子はこの領域に座乗している可能性が最も高いと考えられる。

耐冷性遺伝子座をより精密にマッピングするために、分離集団の中からR738とR1427の間で組換えを起こしている個体を選抜した結果、12個体が得られた。この後代からマーカー選抜によって組換え固定系統を育成した。第7図bに組み換え固定系統の遺伝子型を示す。BT4-9-7, BT4-76-2, BT4-2-4, BT4-112-1は組換え点よりも動原体側が中母農8型, テロメア側がきらら397型だった。BT4-9-7はR738-R2737間で, BT4-76-2はR2737-XNpb102/SCAM20間で, BT4-2-4はXNpb102/SCAM20-SCAB11間で, BT4-112-1はC1016-R1427間で組換えを起こしていた。一方, BT4-11-8, BT4-74-8, BT4-70-1, BT4-49-15, BT4-12-3, BT4-24-6, BT4-10-6, BT4-50-1は組換え点よりも動原体側がきらら397型で, テロメア側が中母農8型だった。BT4-11-8はR1427-C1016間で, BT4-74-8はR740-XNpb267/XNpb177間で, BT4-70-1はXNpb235/XNpb264-SCAB11間で, BT4-49-15はSCAB11-XNpb102/SCAM20間で, BT4-12-3とBT4-24-6はXNpb102/SCAM20-R2737間で, BT4-10-6とBT4-50-1はR2737-R738間で組換えを起こしていた。これらの組み換え固定系統について精密検定圃場と人工気象室における耐冷性検定を行った(第7表, 第7図b)。BT4-9-7の耐冷性はきらら397と同レベルだったが, BT4-76-2, BT4-2-4, BT4-112-1の耐冷性はきらら397を上回っていた。この結果は耐冷性遺伝子座がR738とXNpb102/SCAM20の間に存在することを示しており, LODスコアのピークがR2737とXNpb102/SCAM20の間にあったことと一致した。以上の結果から, 耐冷性遺伝子はR2737とXNpb102/SCAM20の間に座乗していると考えられる。一方, BT4-11-8, BT4-74-8の耐冷性はきらら397と同レベルだった。このことは耐冷性遺伝子座がR740よりもテロメア側には存在しないことを示しており, 区間マッピングの結果と一致した。しかし, BT4-70-1, BT4-49-15, BT4-12-3, BT4-24-6, BT4-10-6, BT4-50-1の耐冷性はきらら397を上回っていた。BT4-74-8とBT4-70-1の遺伝子型はR740とSCAB11の間でしか変わらないことから, R740とSCAB11の間にも耐冷性遺伝子座が存在する可能性が高い。この領域ではLOD曲線が平らになっており, この部分にもう一つのLODピークが存在すると考えられる。LOD曲線にはC1016付近にも小さなピークが存在したが, BT4-74-8の耐冷性がきらら397並だったことから, この領域に耐冷性遺伝子座が存在する可能性は低いと考えられる。

以上の結果から, 第4染色体長腕のSilewah由来領域には少なくとも2つの耐冷性遺伝子座が存在することが明らかになった。以後, R740-SCAB11間の耐冷性遺伝子座を*Ctb1* (Cold tolerance at the booting stage 1), XNpb102/SCAM20-R2737間の耐冷性遺伝子座を*Ctb2*とする(第7図c)。BT4-112-1, BT4-10-6, BT4-50-1はマーカーの遺伝子型から*Ctb1*と*Ctb2*の両方を持つと推測される。しかし, それらの耐冷性はBT4-76-2やBT4-70-1のような一方の耐冷性遺伝子しか持たない系統の耐冷性と比べて明瞭に高いものではなかった。

(3) 耐冷性遺伝子座間の遺伝距離

本研究で使用されたRFLPマーカーはRGPによるRFLP連鎖地図にマップされているが(Kurataら1994, Harushimaら1998), 本研究で新たに開発されたSCARマーカーであるSCAB11とSCAM20はRFLP連鎖地図にはマップされていない。また, 本研究で遺伝解析に用いた分離集団におけるマーカー間の遺伝距離はRGPのものと大きく食い違っている。この違いは特に*Ctb1*領域周辺で大きく, 例えばXNpb235-XNpb267間の遺伝距離は本研究では0.4cMだったのに対し, RGPによるRFLP連鎖地図では2.8cMとなっている(第8図)。そのため, *Ctb1*と*Ctb2*の遺伝距離を正確に把握することができない。

そこで, まず, SCARマーカーをKoikeら(1997)によるYACクローン物理地図に位置付け, この情報を基にRGPによるRFLP連鎖地図上でのSCARマーカーの位置を調べた。YACライブラリー高密度フィルターにRFLPマーカーとSCARマーカーのDNA断片をハイブリダイゼーションし, 陽性クローンの選抜を行った。各マーカーとYACクローンの対応を第8図に示す。SCAM20は

Y1676と対応した。Y1676はRFLPマーカーとの対応付けからRFLP連鎖地図の102.0–102.6 cMへマップされている。また、Y1676の動原体側にあるYACクローンY2217に対してはXNpb102はハイブリダイズしたがSCAM20はハイブリダイズしなかった。したがって、SCAM20はXNpb102のテロメア側に座乗することがわかった。SCAB11はY1955と対応した。Y1955は107.6–108.1cMの位置にマップされている。RFLPマーカーおよびSCARマーカーのRFLP連鎖地図上の位置を第8表に示す。Ctb1はSCAB11とR740の間にあることからRFLP連鎖地図上では107.6cMから113.4cMに亘る5.8cMの領域に座乗することが明らかになった。また、Ctb2はR2737とXNpb102の間に存在することから96.2cMから102.0cMに亘る5.8cMの領域に座乗することが明らかになった。Ctb1とCtb2の遺伝距離は最大で113.4cMから96.2 cMを引いた17.2 cM、最小で107.6 cMから102.0 cMを引いた5.6 cMとなることが明らかになった。

4) 考察

中母農8が第4染色体長腕に持つSilewah由来領域について、穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の区間マッピングを行った結果、この領域内には2つの耐冷性遺伝子座Ctb1とCtb2が存在することがわかった。しかし、両方の耐冷性遺伝子を持つ組換え固定系統の耐冷性が一方の耐冷性遺伝子しか持たない組換え固定系統の耐冷性とほぼ同等で、相加的な効果は認められなかった。この理由として(1) 両耐冷性遺伝子は重複的に働く、(2) 両耐冷性遺伝子座の間に耐冷性を弱くする遺伝子が存在する、の2つの可能性が考えられる。重複的作用の可能性については本章の第3節で検討することとし、ここでは、耐冷性を低くする遺伝子の存在について考察する。

冷水深水灌漑による耐冷性検定では出穂の遅い品種・系統ほど耐冷性が低く評価されやすいと考えられている。これは出穂が遅いことにより、結果的に低温処理期間が長くなることによる。第7図bに組換え固定系統の到穂日数を示した。Ctb1とCtb2の両方を持つBT4-112-1、BT4-10-6、BT4-50-1では出穂がやや遅れている。そのために、これらの系統では耐冷性が過小評価されてしまった可能性がある。BT4-49-15の到穂日数はBT4-70-1の到穂日数よりやや長く、BT4-112-1の到穂日数はBT4-2-4の到穂日数よりもやや長くなっている。各系統の遺伝子型を比較すると、2つの耐冷性遺伝子座の間に、出穂に関係する遺伝子座が存在すると考えられる。この遺伝子が耐冷性の評価に影響を及ぼした可能性は否定できない。

北海道では夏が短く稲作期間が限られている。特に冷害年には出穂が遅れるため、晩生の品種は耐冷性が強くても十分な登熟期間を確保できない。そのため、出穂性は北海道において非常に重要な形質である。中母農8の出穂性はやや晩生(安部ら1989)であり、中母農8の耐冷性遺伝子を活用する場合には、出穂性に関する中母農8の遺伝子を取り除く必要がある。中母農8を育種に利用した例として、耐冷性中間母本の中母59があるが(上原ら1993)、出穂日がやや遅いなどの不良形質が残っているために、実用品種の開発には至っていない。このことは中母農8の耐冷性を導入することは容易であるが、同時に中母農8の不良形質も導入されやすいことを示している。本研究で第4染色体長腕には耐冷性遺伝子座が2つあることが示された。これらの遺伝子座の間に晩生の遺伝子等、北海道の水稻実用品種として好ましくない形質の遺伝子がある場合、通常の育種法ではこれらの不良形質を取り除くことは困難である。このような精密な育種操作を行うにはマーカー選抜を育種システムに組み込む必要がある。

第4染色体のSilewah由来領域における組換え頻度はRFLP連鎖地図を構築した日本晴/KasalathのF₂集団に比べてBT4で低下していた。組換え頻度の歪みはCtb1が座乗するXNpb102からR740の間で特に大きかった(第8図)。このような組換え頻度の歪みにはDNA塩基配列間の相同性が関係しており、相同性の高い領域では低い領域に比べて組換え頻度が高くなるとされている(Silver・Artzt 1981)。実際にDNAの相同性が低いと考えられる種間交雑集団(Bonierbale

ら1988, Patersonら1988, Causseら1994) や部分的に相同性の低い領域を生じる戻し交雑後代集団 (Alpert・Tanksley 1996, Monforte・Tanksley 2000) で組換え頻度の低下が認められている。XNpb102とR740の間で認められた組換え頻度の低下は, この領域におけるきらら397と中母農8の塩基配列の相同性が他の領域に比べて低いことを示していると考えられる。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

農業・生物系特定産業技術研究機構 北海道農業研究センター

北海道におけるイネ穂ばらみ期 耐冷性の遺伝解析

IV. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座のマッピングと機能の推定

2. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の精密マッピングと物理地図

中母農8が第4染色体長腕に持つSilewah由来領域には少なくとも2つの耐冷性遺伝子座が存在するが、耐冷性遺伝子座の周辺には北海道の実用品種として好ましくない形質の遺伝子が座乗している可能性があり、Silewah由来の耐冷性遺伝子を実用品種の育成に活用していくためには、耐冷性遺伝子座をより精密にマッピングする必要がある。また、これらの遺伝子による耐冷性獲得機構を明らかにするためには耐冷性遺伝子を単離し、その生化学的な特性を明らかにする必要がある。本研究では、以上のような研究の第一歩として耐冷性遺伝子座*Ctb1*の物理地図を製作した。

1) 材料

耐冷性遺伝子座*Ctb1*について精密マッピングを行うために、中母農8へきらら397を戻し交配して展開した分離集団BT4の中から第4染色体のSilewah由来領域についてヘテロ型の個体を選び、その後代から*Ctb1*領域における組換え個体を選抜した。選抜には*Ctb1*領域の両端に座乗する2つのマーカーOSR15とSCAM20を用いた(第9図a)。OSR15はAkagiら(1996)によるマイクロサテライトマーカーである。

2) 方法

(1) マーカー分析

OSR15とSCAM20の間での組換え個体の大規模スクリーニングに用いた鋳型DNA溶液の調製は、Klimyukら(1993)の方法に従って行った。第3～第4葉期の幼苗より約5mmの葉片を切り取り、幅約1mmのスライスにしてマイクロチューブへ入れた。0.25N水酸化ナトリウムを40 μ l加え、沸騰水中で30秒間加熱処理した。0.25N塩酸40 μ lと緩衝溶液(0.5Mトリス-塩酸, pH8.0, 0.25%(v/v) Igepal-CA630 (シグマアルドリッチ社)) 20 μ lを加えて中和した後、沸騰水中で2分間加熱処理した。原法では葉片の一部を鋳型DNAとして用いているが、抽出液からもDNA増幅を行えることが確認できたため、本研究では抽出液を鋳型DNA溶液として用いた。PCR反応は10 μ l中で行い、反応液組成はプライマー各0.2 μ M, dNTP各100 μ M, 塩化カリウム50mM, トリス-塩酸(pH8.3) 10mM, 塩化マグネシウム1.5 mM, ゼラチン0.001%, Igepal-CA630 0.05%, AmpliTaqGold DNAポリメラーゼ(アプライドバイオシステムズ社) 0.02 U/ μ l, 鋳型DNA溶液1 μ lとした。PCRおよび電気泳動は前述と同様に行った。

RFLPマーカー、マイクロサテライトマーカー、SCARマーカーの分析は前述と同様に行った。

(2) 耐冷性検定

耐冷性検定は人工気象室において前述と同様に行った。系統間の耐冷性の差に関する分散分析にはコンピューターソフトウェアStatView 5.0 (SAS Institute) を用いた。

3) 結果

(1) 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の精密マッピング

分離集団1,255個体についてOSR15とSCAM20の組換え個体を選抜した結果、117個の組換え個

体を得た。組換え個体はOSR15とSCAM20の遺伝子型によって、OSR15が中母農8型でSCAM20がヘテロ型の個体(R1)、OSR15がヘテロ型でSCAM20がきらら397型の個体(R2)、OSR15がきらら397型でSCAM20がヘテロ型の個体(R3)、OSR15がヘテロ型でSCAM20が中母農8型の個体(R4)、OSR15が中母農8型でSCAM20がきらら397型の個体(R5)、OSR15がきらら397型でSCAM20が中母農8型の個体(R6)の計6グループに分類された(第9図b)。組換え個体の数はR1が28個体、R2が26個体、R3が32個体、R4が29個体、R5が1個体、R6が1個体だった。R5とR6についてはOSR15とSCAM20の間で二重交叉が起こったと考えられる。Ctb2を持たない組換え固定系統を育成するためにR1とR2の個体の自殖後代を展開し、R1の後代からはSCAM20がきらら397型の個体を、R2の後代からはOSR15が中母農8型の個体を選抜して系統化した。54個体の組換え個体のうち49個体について組換え固定系統を得ることができた。残りの5個体については冬期間の生育不良等により系統化を行うことができなかった。

育成した組換え固定系統についてCtb1領域のマーカーR740、XNpb267、XNpb264、SCAB11の遺伝子型を調べ、その結果を基に組換え固定系統を全てのマーカーがきらら397型の系統(NS)、R740のみ中母農8号型の系統(NA)、R740とXNpb267が中母農8型の系統(NB)、R740からXNpb264までが中母農8型の系統(NC)、全てのマーカーが中母農8型の系統(NT)の5グループに分類した(第9図c)。NSには2系統、NAには10系統、NBには6系統、NCには9系統、NTには22系統が含まれていた。NSの系統はCtb1領域がきらら397型、NTの系統はCtb1領域が中母農8型になっていた。その他の系統はCtb1領域内で組換えを起こしており、NAはR740とXNpb267の間、NBはXNpb267とXNpb264の間、NCはXNpb264とSCAB11の間に組換え点があった。

Ctb1の精密マッピングを行うためにNA、NB、NCの25系統について耐冷性の評価を行った。また、NSの2系統とNTの2系統を対照に用いた。これらの系統は組換え点よりも動原体側がきらら397型になっており、もう一つの耐冷性遺伝子Ctb2を持たないと考えられるが、二重交叉によってCtb2領域が中母農8型になっている可能性もわずかながら残されている。そこで全ての系統についてCtb2領域近傍にあるマイクロサテライトマーカーRM317の遺伝子型を調べた。その結果、NCに含まれる2つの系統でRM317がヘテロ型または中母農8型になった。これらの系統はCtb2を持つ可能性が高いため、その後の解析から除外した。対照を含む残りの27系統ではRM317はきらら397型だった。

各系統の耐冷性を遺伝子型別にまとめた結果を第9図cに示す。中母農8の稔実率は88.9%、きらら397の稔実率は41.5%だった。Ctb1を持たない対照であるNSの稔実率は40.7%できらら397とほぼ同じだった。NA、NBの稔実率とNSの稔実率に有意な差はなかった。これに対し、NCの稔実率はNSの稔実率よりも有意に高く($P=0.0080$)、NTの稔実率に近かった。これらの結果から、Ctb1座はNB系統の組換え点とNC系統の組換え点の間、つまりXNpb264の周辺に座乗すると考えられた。

(2) 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の物理地図

イネの物理地図に関してはイネゲノム全塩基配列プロジェクト(IRGSP, <http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/>)によって大腸菌人工染色体(BAC)クローンまたはP1ファージ由来人工染色体(PAC)クローンの整列化と塩基配列の解読が進められている。第4染色体に関しては中国の研究グループが分担し、BACクローンを用いて塩基配列の解読を行っている(Zhaoら2002)。そこで、これらの情報を活用してCtb1の物理地図上へのマッピングを試みた。

マーカーの塩基配列情報を基にDNAデータベースに対してBLAST検索による相同性検索を行い、対応するBACクローンの塩基配列を得た。さらにBACクローンの末端塩基配列を用いて相同

性検索を行うことによって隣接するBACクローンを探索し、BACコンティグを作成した。その結果、*Ctb1*領域を含むSCAB11とR1427の間でBACコンティグを作成することができた(第10図)。SCAB11とR1427の間隔は約3,000 kbだった。この物理地図にRGPによる遺伝地図および本研究で用いた分離集団BT4における遺伝地図を対応させると、いずれの場合においてもSCAB11からR740にかけては物理距離に比べて遺伝距離が短く、C1016からR1427にかけては物理距離に比べて遺伝距離が長かった(第10図)。このことはSCAB11からR740にかけての領域で組換えが起こりにくいことを示し、この領域で親品種間の塩基配列の変異が多いことを示唆している。

*Ctb1*が座乗している可能性が高いSCAB11とXNpb264の間は2つのBACクローン(OSJNBa0058K23, OSJNBa0093O08)でカバーされており、両マーカー間の距離は196 kbだった(第11図a)。BACクローンの塩基配列情報を基にプライマーを設計しsimple sequence length polymorphism (SSLP) マーカーを探索した結果BAC1, BAC22, BAC9, PNK2, BAC29, BAC28の6個のSSLPマーカーを得ることができた。これらのマーカーを用いてNCに属する組換え固定系統の遺伝子型を調べた結果、一つの系統BT4-12-110-7はBAC22とBAC28についてヘテロ型であり、固定されていないことがわかった(第11図b)。そこでBT4-12-110-7の後代よりBAC1からSCAB11の間で遺伝子型が異なる2つの系統BT4-12-110-7KとBT4-12-110-7Pを選抜した。両系統はBAC1からSCAB11の間で遺伝子型が異なっている準同質遺伝子系統である(第11図b)。この2つの系統について耐冷性検定を行った結果、BT4-12-110-7Kの耐冷性が*Ctb1*を持たない対照(Control-S)の耐冷性と同等だったのに対し、BT4-12-110-7Pの耐冷性は*Ctb1*を持つ対照(Control-T)の耐冷性とほぼ同等だった。BT4-12-110-7KとBT4-12-110-7Pの耐冷性の差は有意($P=0.0031$)だった。この結果は*Ctb1*がBAC1とSCAB11の間に座乗していることを示している。

*Ctb1*領域をさらに狭めるために、これまでの1,255個体に加えて753個体の集団から*Ctb1*領域における組換え個体を選抜し、組換え固定系統を育成した。これによりBAC1とSCAB11の間で組換えを起こしている組換え固定系統をさらに4系統得た。合計10個の系統についてそれぞれの遺伝子型をSSLPマーカーで調べ、遺伝子型毎にNC1, NC2, NC3の3つのグループに分類した(第11図c)。NC1に属する系統(BT4-18-170-2, BT4-29-279-6, BT4-12-195-1, BT4-27-355-3)はBAC1とBAC22の間で組換えを起こしていた。NC2に属する系統(BT4-27-486-2)はBAC9とPNK2の間で組換えを起こしていた。NC3に属する系統(BT4-8-104-2, BT4-8-123-6, BT4-22-250-5, BT4-23-580-9, BT4-26-349-8)はPNK2とBAC29の間で組換えを起こしていた。第9表および第11図cに各組換え固定系統の耐冷性を示す。BAC9とPNK2の間で組換えを起こしているBT4-27-486-2の耐冷性は*Ctb1*を持たない対照(Control-S)よりも有意に高く、NC3に属する系統の耐冷性はいずれもControl-Sに比べて有意に高かった。このことは*Ctb1*がBAC1とPNK2の間に座乗することを示している。NC1に属する系統の中ではBT4-18-170-2とBT4-29-279-6の耐冷性がControl-Sと同等だったのに対し、BT4-27-355-3の耐冷性はControl-Sよりも有意に高かった。この違いは各系統の組換え点の違いによるものと考えられるので、*Ctb1*はBAC1とBAC22の間に座乗すると考えられる。BAC1とBAC22の物理距離は塩基配列の解読情報から約56 kbと推測される。

4) 考察

イネのゲノムサイズはハプロイド当たり 4.3×10^8 bpと見積もられている(Arumuganathan・Earle 1991)。イネのRFLP連鎖地図は全長が1521.6cMだったことから(Harushimaら 1998)、1cM当たりの物理距離は約280kbとなる。しかし、遺伝距離と物理距離の比は染色体領域によって大きく異なり、動原体近傍では1cM当たりの遺伝距離が1,000kb以上になる

(Nakamuraら1997)。このような領域では組換え頻度が低下するために遺伝学的研究や育種操作が困難となる。SCAB11とR1427の物理距離は約3,000kbだった。両マーカーの遺伝距離はRGPによる連鎖地図では15.7cM, 本研究で用いた分離集団では7.7cMだった。したがって, 1cM当たりの物理距離はそれぞれ191kbおよび390kbとなり, 物理距離と遺伝距離の比はほぼ平均的だった。このことは, 第4染色体長腕末端部分に組換え頻度に関する大きな歪みは存在しないことを示している。また, 局所的に見ても組換え頻度が最も歪んでいたのはR740とXNpb267の間であり, Ctb1が座乗すると考えられるXNpb264とSCAB11の間では組換え頻度の歪みは大きくなかった(第10図)。したがって, Ctb1領域における今後の遺伝学的研究や精密な育種操作を行う上で, 組換え頻度の問題は大きな支障とはならないと予想される。

耐冷性に関するゲノム研究成果の活用法の1つに, 耐冷性育種に対するマーカー選抜法の導入がある。育種現場でマーカー選抜を行うためには, 大量の遺伝材料について効率的にマーカー遺伝子型の同定を行う必要がある。本研究で組換え個体の大規模スクリーニングに用いた手法は, 最も手間のかかる葉の粉碎処理が要らず, 5分程度で鋳型DNA溶液を調製できる非常に簡便な方法である。高価な試薬も必要とせず, 調製したサンプルは4℃で1ヶ月程度保存でき, 幼苗でマーカー遺伝子型を判定できるなど利点も多い。今後はこのようなマーカー選抜手法をどのように育種現場に導入するかが課題となる。例えば, 幼苗で判定できる利点を生かして, 田植え前にマーカー選抜を行い, 面積の限られている耐冷性検定圃場を有効に活用することも考えられる。耐冷性検定を行えない冬期間はマーカー選抜を行い, 夏期間は通常の育種選抜を行うという組合せも考えられる。簡便になったとはいえ, マーカー選抜は手間のかかる作業である。マーカー選抜を事業化し, 適切に育種事業へ組み込むことが, ゲノム研究の成果を育種事業に活用する上で必要である。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

北海道におけるイネ穂ばらみ期 耐冷性の遺伝解析

IV. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座のマッピングと機能の推定

3. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子の機能の推定

穂ばらみ期の低温が不稔を発生する機構については古くから細胞形態学的、生理学的および生化学的な研究が行われてきた。これに対し、耐冷性品種の耐冷性獲得機構についてはあまり研究されていない。これは穂ばらみ期耐冷性については耐冷性検定法が早くから確立し、耐冷性獲得機構を特に意識しなくても耐冷性選抜を行ってきたことによると考えられる。しかし、現在、北海道のイネ品種が持つ耐冷性は非常に高いレベルにあり（新橋ら2003）、今後、この耐冷性をさらに高めていくためには耐冷性獲得機構に関する理解が必要である。

葯長には品種間差があり、葯の長い品種に穂ばらみ期耐冷性の強い品種が多いことは古くから知られている（橋本1961）。長い葯には充実花粉がより多く含まれるため、低温で充実花粉数が減っても受粉に必要な花粉数を維持できると考えられる。そこで、本研究では中母農8が第4染色体長腕に持つ耐冷性遺伝子と葯長の関係について調べた。また、耐冷性遺伝子座の物理地図を基に耐冷性候補遺伝子の絞り込みを行った。

1) 材料

実験材料には中母農8、北海241号、きらら397、中母農8と北海241号のF₇系統および前述の耐冷性遺伝子座の区間マッピングに用いた中母農8・きらら397間の組換え固定系統を用いた。

2) 方法

(1) 葯長の測定

先端部で開花が始まった穂の中央部より未開花の穎花を採取し、葯を取り出した。葯長の測定はマイクロメーターを用いて行った。中母農8と北海241号のF₇系統は温室内で育成し、各系統について2個の穎花から6個の葯を採取し、直ちに葯長を測定した。耐冷性遺伝子座の区間マッピングに用いた組換え固定系統については屋外で栽培し、各系統につき40個の穎花から80個の葯を採取し、直ちに葯長を測定した。

(2) 遺伝子予測

遺伝子予測にはRice Genome Automated Annotation System(RiceGAAS, <http://RiceGAAS.dna.affrc.go.jp/>)を用いた。このシステムには遺伝子予測プログラム(GENSCAN, RiceHMM, FGENESH, MZEF)、スプライス部位予測プログラム(SplicePredictor)、相同性検索プログラム(Blast, HMMER, ProfileScan, MOTIF)、tRNA遺伝子予測プログラム(tRNAscan-SE)、反復DNA分析プログラム(RepeatMasker, Printrepeats)、シグナル検索プログラム(Signal Scan)、タンパク質局在部位予測プログラム(PSORT)および膜タンパク質分析プログラム(SOSUI)が組み込まれている(Sakataら2002)。

RiceGAASによって予測された遺伝子のうち、発現遺伝子情報(EST)データベース内に99%以上の相同性を持つESTが存在する遺伝子を耐冷性候補遺伝子とした。

3) 結果

(1) 穂ばらみ期耐冷性遺伝子と葯長

中母農8と北海241号の葯長を比較したところ、中母農8の葯長が2.85mmだったのに対し、北海241号の葯長は2.13mmで、中母農8の葯長が有意に長かった。中母農8・北海241号間のF₇系統における葯長の頻度分布を第12図に示す。F₇系統群における葯長は連続的に分布していた。このことは葯長に複数の遺伝子座が関与していることを示唆している。また、各系統について第3染色体のRFLPマーカー(XNpb345)及び第4染色体のRFLPマーカー(R2737)の遺伝子型を決定し、マーカー遺伝子型と葯長の関連を調べた。第10表にその結果を示す。XNpb345について北海241号型の系統の平均葯長が2.42mmだったのに対し、中母農8型の系統の平均葯長は2.51mmで、その差は5%水準で有意だった。また、R2737について北海241号型の系統の平均葯長は2.38mmだったのに対し、中母農8型の系統の平均葯長は2.55mmで、その差は0.01%水準で有意だった。両マーカー共に葯長との関連が示されたが、特に第4染色体のRFLPマーカーが葯長と高い有意水準での関連を示したことは、第4染色体のSilewah導入領域に葯長と強く関連する遺伝子座が存在することを示唆している。

第4染色体のSilewah由来領域には2つの耐冷性遺伝子座が存在する。これらの遺伝子座が葯長と関係するかどうかを調べるために、耐冷性遺伝子座の区間マッピングに用いた組換え固定系統の葯長を比較した(第13図)。中母農8の葯長が2.36mmだったのに対し、きらら397の葯長は1.82mmだった。Ctb1とCtb2を持たない組換え固定系統であるBT4-9-7およびBT4-74-8の葯長はきらら397と同レベルだった。Ctb1を持つ組換え固定系統BT4-70-1の葯長は2.03mmでBT4-74-8に比べ有意に長かった($P < 0.0001$)。Ctb2を持つ組換え固定系統BT4-76-2の葯長も2.06mmでBT4-9-7に比べ有意に長かった($P < 0.0001$)。以上の結果はCtb1とCtb2による耐冷性獲得機構に葯長が関与している可能性を示唆している。

(2) 耐冷性候補遺伝子の同定

Ctb1が座乗する約56kbの領域について日本晴の塩基配列情報を基に遺伝子予測を行ったところ、9個のオープンリーディングフレーム(ORF)の存在が予測された。このうちの2個は長さが比較的短く(261bpおよび624bp)、またESTデータベースにも含まれていないことから、機能する遺伝子をコードしている可能性は少ないと考えられる。残りの7個はESTデータベースに含まれていたことから、イネ組織内で実際に機能している可能性が高い(第11図a, 第11表)。ORF1にコードされるタンパク質はBLASTPによるプロテインデータベース検索でいずれのタンパク質にもヒットしなかった。ORF2はKelchリピートを持つF-boxタンパク質をコードしていた。この構造はタンパク質間相互作用に関連していると報告されている(Kurodaら2002)。ORF3はBrassicaの自家不和合性遺伝子座レセプターキナーゼと弱い相同性(期待値 2×10^{-69})を持つSer/Thrプロテインキナーゼをコードしていた。ORF4にコードされているアミノ酸配列はプロテインデータベースにヒットしなかったが、ovarian tumor(OTU)様のシステインプロテアーゼドメインを持っていた。ORF5は耐病性に関わるPtoキナーゼと相同性(期待値 1×10^{-97})のあるタンパク質をコードしていた。ORF6はF-boxドメインとWD40リピートを持っていた。この構造もORF2と同様にタンパク質間相互作用と関連している(Kurodaら2002)。ORF7はBcl2-associated athanogene(BAG)ドメインを持っていた。このドメインは分子シャペロンの調節因子に含まれていることが報告されている(Bariknarovaら2002)。

4) 考察

穂ばらみ期冷害は低温下で花粉の分化・発育が抑制されることによって起こる。葯の長い品種

は花粉生産能力が高く、低温下でも受粉に必要な花粉を生産できると考えられ、実際に葯の長い品種は穂ばらみ期耐冷性が強い傾向にあるとされてきた（橋本1961, 鈴木1981, 丹野ら1999）。また、このことを利用して葯長から早期に不稔の発生を予測する技術も開発されている（田中1998）。本研究で、中母農8が第4染色体に持つ2つの耐冷性遺伝子も葯長と関係する可能性のあることが示された。少なくとも北海道のイネ品種においては葯長は穂ばらみ期耐冷性獲得機構の重要な要素であると考えられる。

組換え固定系統の耐冷性の比較では、*Ctb1*と*Ctb2*に相加的な相互作用は認められなかった。その理由の一つとして、両耐冷性遺伝子の機能が重複している可能性がある。本研究で、*Ctb1*と*Ctb2*は共に葯長と関係している可能性のあることが示された。この結果は、両耐冷性遺伝子が重複的に働くとする仮説と矛盾しない。今後は、この問題を解決するために、両耐冷性遺伝子と葯長の関係について生化学的な分析を行う必要がある。

Satoら（1994）は早生性遺伝子Ef-1が多面発現的に葯を短くすることを示している。早生性は稲作期間の短い北海道では必須な形質であり、出穂性と葯長に関する多面発現の有無は、耐冷性と早生性を両立させる上で重要である。組換え固定系統BT4-70-1の出穂日はBT4-74-8の出穂日とほぼ同じであることから（[第7図](#)）, *Ctb1*は出穂日に影響を及ぼさないと考えられる。しかし、組換え固定系統BT4-76-2の出穂日はBT4-9-7の出穂日より約4日遅く、*Ctb2*と出穂性との関係を否定できなかった。将来、*Ctb2*を耐冷性育種に活用する場合には、この点について詳細に検討する必要がある。

タンパク質のリン酸化は様々なストレスに対する植物細胞内のシグナル伝達に重要な役割を果たしている。興味深いことに、*Ctb1*領域には2つのタンパク質リン酸化酵素がコードされていた。そのうちの一つであるORF3はアブラナの自家不和合性遺伝子座（*S*-locus）にあるタンパク質リン酸化酵素とアミノ酸配列における相同性を示した。*S*-locus関連タンパク質リン酸化酵素と相同性を示す遺伝子はトウモロコシ（Walker・Zhang 1990）や自家和合性であるシロイヌナズナ（Walker 1993, Dwyerら1994）でも見つかり、植物に普遍的に存在する。主に栄養生長器官で発現している遺伝子もあることから、これらの遺伝子は植物の発生分化において様々な役割を果たしていると考えられる。ORF3と相同なESTも栄養生長器官で発現している。このことはORF3も受粉に関わる現象ではなく、植物の発生等に関わっている可能性が高いことを示唆している。ORF5にコードされるタンパク質リン酸化酵素は病害抵抗性遺伝子である*Pto*と相同性を示した。しかし、Li・Gray（1997）はタバコの受粉に関連するタンパク質リン酸化酵素が*Pto*と相同性を示すことを報告しており、ORF5が病害抵抗性以外の機能を持つ可能性も否定できない。

ORF2とORF6はF-boxタンパク質をコードしていた。F-boxタンパク質は細胞周期、概日リズム、花芽分化やホルモン応答など様々な細胞内反応に重要な役割を果たしているユビキチン-プロテアソーム経路に関与している（Kurodaら2002）。Kurodaら（2002）はシロイヌナズナのゲノム中に568個のF-box遺伝子を見つけた。個々のF-boxタンパク質はユビキチンと結合させて分解するタンパク質の認識部位を持ち（Pattonら1998）、オーキシン応答（Rueggerら1998）、ジャスモン酸シグナル伝達（Xieら1998）、ジベレリンによる成長促進（Dillら2004, Fuら2004）など細胞内の様々な反応に関与している。F-box配列の後には通常leucine-richリピート、WD40リピート、Kelchリピートなどタンパク質間相互作用に関係する配列が続いている。ORF2はKelchリピートを、ORF6はWD40リピートを持ち、この部分がタンパク質の機能を決定していると考えられる。

ORF7によってコードされるタンパク質はBAGドメインを含んでいた。BAGドメインは分子シャペロンであるHsp70やHsc70のATPアーゼドメインに結合する（Sondermannら2001）。興味深いことにORF7はN末端にユビキチンドメインを持っていた。Ludersら（2000）はユビキチ

ンドメインを持つBAGタンパク質であるBAG-1がHsp/Hscシャペロンとプロテアソームを結合させる役割を持つことを報告している。BAG-1は哺乳類では様々なタンパク質と反応して成長を制御していることが報告されている（Townsendら2003）。しかし、植物ではBAGドメインとユビキチンドメインを持つタンパク質の機能は知られていない。

ORF4はイネ、コムギ、オオムギおよびトウモロコシのESTと相同性を示した。いずれも単子葉植物であることから、ORF4は単子葉植物に特異的な遺伝子である可能性もある。ORF4はOTUドメインを持っていた。OTUドメインの機能は未知であるが、このドメインを持つCezanneというタンパク質は脱ユビキチン化に関係していることが報告されている（Evansら2003）。

ORF1と相同性を示したESTはカルスで発現していた。ORF1の機能は未知であるが、分化した器官で発現しているESTと相同性を示さないため、ORF1は分化した器官では発現していない可能性もある。

本研究で、耐冷性遺伝子*Ctb1*は薬長に関係している可能性の高いことが示された。また、*Ctb1*の候補遺伝子として7個の遺伝子が同定された。7個のうち5個の遺伝子はシグナル伝達経路やユビキチン-プロテアソーム経路に関係している可能性がある。これらの経路は成育や発生・分化に関わる様々な反応に関与しており、タンパク質の機能から耐冷性遺伝子を特定するのは困難である。今後はこれらの遺伝子について発現解析や遺伝子導入実験を行って、耐冷性遺伝子を特定する必要がある。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

北海道におけるイネ穂ばらみ期 耐冷性の遺伝解析

V. 総合考察

水稻の穂ばらみ期耐冷性は北海道における最重要形質でありながら、量的形質であるために十分な遺伝解析が行われていなかった。本研究ではDNAマーカーを用いることにより、中母農8の耐冷性に関する詳細な遺伝解析を行った。また、その過程を通じて、耐冷性遺伝子座と連鎖するDNAマーカーが得られ、耐冷性遺伝子の機能に関する考察も行った。この間にDNAマーカーによる農業形質の遺伝解析が一般的となり、他の耐冷性品種についても遺伝解析が行われるようになった。既にイネゲノムの塩基配列情報のほとんどが解読され、ゲノム研究そのものが飛躍的に効率化している。耐冷性育種および耐冷性研究もこれらの研究成果を踏まえて、大きく進展することが期待される。

1. 耐冷性遺伝子の集積

北海道では1993年の大冷害に続き、2003年にも冷害が発生した。冷害対策の柱は耐冷性品種の作付けと栽培管理であるが、栽培管理には多大な労力がかかるため、今後はより耐冷性の強い品種を開発する必要がある。

北海道農業試験場（現北海道農業研究センター）では、耐冷性を飛躍的に向上させるためには、これまで国内で利用されていなかった耐冷性遺伝資源を活用する必要があると考え、東南アジアや南米原産のイネ品種から耐冷性遺伝子を導入した中間母本農8号、中間母本農11号、北海PL5、北海PL6およびキタカオリを育成した。本研究によって中母農8の耐冷性遺伝子座は第1、3および4染色体にあり、特に第4染色体の耐冷性遺伝子は強い効果を持つことが示された。中母農11については第8、11および12染色体に耐冷性親品種から導入された染色体領域があり（斎藤ら1993）、第8染色体の導入領域に耐冷性との関連が認められた（小松ら1999a）。北海PL5の耐冷性遺伝子座は第4、10および11染色体にあり、第4染色体については中母農8と同じ領域に耐冷性遺伝子座が座乗している（加藤ら1997）。第11染色体の耐冷性遺伝子座については精密マッピングが行われ（小松ら1999b）、耐冷性遺伝子座領域にタンパク質リン酸化酵素遺伝子のクラスターが見出された（加藤ら2003）。北海PL6とキタカオリの耐冷性遺伝子座はまだ解明されていないが、中母農8や北海PL5と同じ第4染色体長腕末端部分に耐冷性親品種由来の染色体領域を持つことがわかっている（著者ら、未発表）。それぞれ異なる原産地の耐冷性遺伝資源から耐冷性遺伝子を導入しているが、中母農11を除く全品種に第4染色体が関与しており、耐冷性遺伝資源の多様性は予想より低い可能性がある。

清水ら（2002）は中母農8、中母農11および北海PL5について交配実験を行い、耐冷性集積の可能性を調べた。中母農8と中母農11、中母農11と北海PL5の組合せではF₁の耐冷性は両親を上回り、F₂集団の中に耐冷性で両親を上回る個体が出現した。しかし、中母農8と北海PL5の組合せではF₁、F₂の耐冷性は両親と同程度だった。北海PL5は第4染色体に中母農8と同じ耐冷性遺伝子座を持つ可能性がある他に、第11染色体にも中母農8と異なる耐冷性遺伝子座がある。両品種間で耐冷性集積効果が認められなかったことは、第4染色体と第11染色体の耐冷性遺伝子の作用が重複的である可能性を示唆している。中母農11は第8染色体に耐冷性遺伝子座があり、中母

農8や北海PL5とは異なる耐冷性遺伝子を持つと考えられたが、耐冷性集積実験からも中母農11は他の2品種と異なる耐冷性遺伝子を持つことが示された。また、これら3品種と北海道の耐冷性品種「ほしのゆめ」の交配実験も行われた。全ての組合せでF₁の耐冷性は両親を上回り、F₂集団の中にも耐冷性で両親を上回る個体が出現した。したがって、中母農8、中母農11および北海PL5の3品種は、ほしのゆめの耐冷性を向上させるのに有効な耐冷性遺伝子を持つことが示された。

本研究で中母農8の耐冷性に関する遺伝解析が行われ、耐冷性と連鎖するDNAマーカーも得られた。中母農11と北海PL5についても既に耐冷性と連鎖するDNAマーカーが得られている（小松ら1999a, 1999b）。これらのマーカーを利用することにより、耐冷性遺伝子の集積をより効率的に行えると考えられる。

中母農8は青森県の耐冷性中間母本である中母35と交配され、耐冷性極強の中母59が育成されている。中母59は1993年の冷害時にも高い稔実性を示したほどの耐冷性を持つが、品質や穂発芽性などに欠点があり、出穂もやや遅い（上原ら1993）。一方、中母農11は北海道品種と交配され、北海PL9が育成されている。北海PL9は耐冷性が強いだけでなく、タンパク質含量が低いことから、低タンパク米としての利用が期待されている（安東ら2002）。しかし、玄米の外観品質が劣り、稈長もやや長いなどの欠点を持つ。これらの結果は、耐冷性と共に不良形質も導入されやすいことを示している。本研究で、中母農8は第4染色体長腕に2つの連鎖する耐冷性遺伝子座を持つことが示された。さらに、両耐冷性遺伝子座の間には出穂性に関係する遺伝子座が存在する可能性も示されており、従来の育種手法では中母農8の不良形質を取り除くのは困難と考えられる。穂ばらみ期耐冷性のような複雑な生理形質では、一見、主働遺伝子が存在すると思われるような場合でも、微働遺伝子が狭い染色体領域に集合している可能性もあり（Kloth 1995）、耐冷性の導入と不良形質の除去を同時に進めていくためには、中母農8以外の耐冷性品種についても耐冷性の詳細な遺伝解析を行い、マーカー選抜によって精密な育種操作を行えるようにする必要がある。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

北海道におけるイネ穂ばらみ期 耐冷性の遺伝解析

V. 総合考察

2. 耐冷性遺伝資源の再評価

北海道農業試験場（現北海道農業研究センター）では国際イネ研究所によって探索された外国の耐冷性遺伝資源から耐冷性遺伝子を導入し、耐冷性育種系統を育成した（Satake・Toriyama 1979）。しかし、育成された耐冷性育種系統の多くで第4染色体長腕の耐冷性遺伝子座が関与しており、東北地方の耐冷性在来品種である染分も同じ領域に耐冷性遺伝子座を持つことから（Futsuhara・Toriyama 1966）、これらの耐冷性は全て同じ耐冷性遺伝子による可能性がある。このことは、第4染色体の耐冷性遺伝子が多様な遺伝資源に分布している可能性を示唆している。

Takeuchiら（2001）は愛国系の耐冷性遺伝子を持つとされるコシヒカリについて耐冷性のQTL解析を行い、耐冷性遺伝子座は第1、7および11染色体にあり、特に第7染色体の耐冷性遺伝子は大きな効果を持つことを示した。北海道の耐冷性酒米品種である初雫の耐冷性遺伝子座も第7染色体にあることが示されている（黒木ら2002）。Daiら（2004）は中国・雲南省の耐冷性品種である昆明小白谷の耐冷性に関するQTL解析を行い、第3、6および7染色体に耐冷性遺伝子座を見出した。そのうち、最も効果の大きい耐冷性遺伝子は第7染色体に座乗していた。これら3品種はいずれも第7染色体に耐冷性遺伝子を持ち、染色体上の座乗領域も類似していることから、同じ耐冷性遺伝子座が関与している可能性が高いと考えられる。

DNAマーカーが開発され、様々な耐冷性品種について耐冷性の遺伝解析が行われるようになった結果として、多様な遺伝資源に共通の耐冷性遺伝子座が関与している可能性が示されたことは非常に興味深い。今後は、それぞれの耐冷性遺伝子座について精密マッピングを行い、また、交配実験も行うことによって、本当に同じ耐冷性遺伝子座が関与しているかどうかを確認していく必要があるが、様々な耐冷性遺伝資源に関する耐冷性の遺伝解析が進めば、耐冷性遺伝資源を共通の耐冷性遺伝子を持つ複数のグループに分類できる可能性がある。

穂ばらみ期耐冷性は環境の影響を受けやすい形質である。そのため、栽培適地以外では耐冷性を十分に発揮できないことが多い。例えば、日本の耐冷性品種は中国の雲南省における耐冷性検定では弱く評価される傾向があり、逆に、雲南省の品種は北日本では通常の気象条件下でも不稔を発生する（堀末ら1988）。したがって、世界各地から集められた遺伝資源について、その穂ばらみ期耐冷性を正しく評価することは非常に困難である。これまでの遺伝学的研究によって耐冷性遺伝資源は共通の耐冷性遺伝子を持つ複数のグループに分類できる可能性が出てきた。これらのグループに共通のマーカーが見出されれば、このマーカーを用いることによって、これまで正しく評価されていなかった未知の耐冷性遺伝資源を発見できる可能性がある。耐冷性育種においては耐冷性の導入と共に不良形質の除去が重要である。利用できる耐冷性遺伝資源が充実すれば、不良形質がなるべく少ない耐冷性遺伝資源を選択でき、耐冷性育種の効率化が期待される。

穂ばらみ期耐冷性と葯長に相関があることは古くから知られている（橋本1961、鈴木1981、丹野ら1999、刈屋1994）。本研究でも中母農8の耐冷性遺伝子は葯長と関係している可能性が示された。花粉の分化発育過程における低温抵抗性が同程度であれば、花粉生産能力が高いほど穂ばらみ期耐冷性が強いことになる。このことは、葯長を指標とすることにより、これまで耐冷性

遺伝資源として利用されなかった遺伝資源を耐冷性育種に活用できる可能性を示している。多年生の野生イネは長い蒴を持っている（Oka・Morishima 1967）。野生イネの生息地が温暖な地域であることを考えると野生イネの穂ばらみ期耐冷性が強いとは考えられないが、蒴が長いという性質だけを導入すれば、耐冷性向上につながる可能性がある。Xiongら（1999）は野生イネである*Oryza rufipogon*の蒴長に関するQTL解析を行い、第1, 2, 3, 5, 6, 8および9染色体に蒴長のQTLを見出した。残念ながら、いずれのQTLも寄与率が小さく、蒴長は多数の微働遺伝子に支配されていると考えられた。そのため、野生イネの蒴長に関する遺伝子を北海道品種へ導入するのは容易ではない。しかし、今後、蒴長に関する遺伝資源の評価や遺伝分析が進めば、蒴長に関する遺伝子を効率的に導入でき、耐冷性向上に利用できると考えられる。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

V. 総合考察

3. 穂ばらみ期耐冷性の遺伝的メカニズムの解明

穂ばらみ期耐冷性は量的形質である。量的形質では表現型は計数値で表され、分離集団における表現型は連続的に分離する。表現型が連続的分離を示す理由には、(1) 複数の遺伝子座が関与すること、(2) 表現型が環境の影響を受けて変動しやすいこと、の2つが考えられる。RFLP連鎖地図が構築されたことにより、量的形質に関与する個々の遺伝子座をマッピングすることができるようになった(Patersonら1988)。戻し交配によって個々の遺伝子座を分解すれば、それぞれの遺伝子座をより正確にマッピングできることも示されたが、各遺伝子座毎の分離集団でも表現型の分離は連続的だった(Patersonら1990, Yamamotoら1998)。このことは個々の量的形質遺伝子の発現においても環境による変動が存在することを示している。本研究でも戻し交配によって穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の分解を試みたが、その表現型における環境変動を取り除くことはできなかった。

穂ばらみ期耐冷性では受粉という偶然が作用する過程が入るため、仮に生育条件が均一であったとしても、表現型にはある程度の分散が生じると考えられる。本研究で穂ばらみ期耐冷性遺伝子と葯長の関係が示された。葯長による評価には受粉における偶然性は作用しない。しかし、組換え固定系統の葯長を調査した結果、葯長自体の環境分散も大きいことがわかった。このことは穂ばらみ期耐冷性の発現が様々な要素によって影響を受けやすいことを示唆している。そのような環境変動には検出限界以下の微働遺伝子が多数関わっていると思われるが、微働遺伝子の同定を遺伝学的手法で行うのは困難である。

本研究で耐冷性遺伝子座領域に7個の耐冷性候補遺伝子を同定した。そのうちの5個はシグナル伝達経路またはユビキチン-プロテアソーム経路に関係している可能性が示された。いずれの経路も細胞内における複雑な遺伝子間調節に関わっていることから、穂ばらみ期耐冷性の発現には多数の遺伝子が複雑に関わっている可能性がある。穂ばらみ期耐冷性の発現における環境変動は、このような遺伝子間の複雑な調節によって起こると考えることもできる。今後は、まず、主働遺伝子を単離し、この主働遺伝子と相互作用を示す遺伝子を同定していく必要がある。このような研究を通じて、穂ばらみ期耐冷性の遺伝的メカニズムを解明すれば、例えば、DNAチップ(Lemieuxら1998)の様な技術を用いて穂ばらみ期耐冷性に関わる遺伝子群の発現を網羅的に調べることで、穂ばらみ期耐冷性を正確に判定できるかもしれない。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

V. 総合考察

4. 北海道における今後の穂ばらみ期耐冷性育種

中母農8の穂ばらみ期耐冷性に関する遺伝解析を行った結果、2つの連鎖する耐冷性遺伝子座が存在するなど、耐冷性の遺伝が予想以上に複雑であることが示された。今後の耐冷性育種においては、このように連鎖した耐冷性遺伝子座間の不良形質も極力取り除くなど、高度な育種操作を行う必要がある。そのためには、耐冷性とより密接に連鎖するマーカーを開発すると共に、本研究で用いた組換え個体の大規模スクリーニング法のような簡便なマーカー選抜手法を確立することによって、大規模な分離集団から必要な組換え個体を確実に選抜し、耐冷性遺伝子のみを高度に組み合わせる精密な育種手法を確立する必要がある。

穂ばらみ期耐冷性には低温に対する生理的な抵抗性だけでなく葯長のような形態的な形質も影響する。出穂性も穂ばらみ期耐冷性に影響を及ぼす要因の一つである。このように穂ばらみ期耐冷性には非常に複雑な要因が関与している。従来 of 育種では多大な育種的努力によってこれらの要因を組み合わせることにより、耐冷性品種を育成してきた。今後は、これらの要因に関する遺伝解析やマーカー開発を進める必要もある。

イネのゲノム研究は急速に進展しており、耐冷性に関与する形質のゲノム研究も加速度的に進むものと考えられる。これらの研究成果を蓄積し、穂ばらみ期耐冷性に関わる要因の遺伝様式を解明することにより、また、マーカー選抜を利用することによって、北海道における穂ばらみ期耐冷性育種をより効率的に行えるようになると期待される。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

北海道におけるイネ穂ばらみ期
耐冷性の遺伝解析

謝辞

本論文を取りまとめるにあたり、北海道大学大学院農学研究科教授佐野芳雄博士にご指導とご校閲をいただいた。記して感謝する。また、ご校閲の労をお取りいただいた同教授喜多村啓介博士、同教授内藤哲博士に謹んで感謝する。さらに元北海道農業試験場地域基盤研究部長坂斉博士、同作物開発部長斎藤滋博士、同作物開発部長番場宏治博士、農業生物資源研究所ジーンバンク長奥野員敏博士には終始ご指導と激励をいただいた。ここに記して感謝する。

本研究は1990年～2003年に北海道農業研究センター（旧北海道農業試験場）において行った。地域基盤研究部上席研究官加藤明博士には本研究のご指導をいただき、実験遂行の機会を与えられるとともに、そのためのご配慮や本稿のご校閲をいただいた。吉田均氏、船附稚子氏には同じ研究室のメンバーとして多大なるご協力をいただいた。稲育種研究室に所属した荒木均博士、三浦清之博士、永野邦明博士、黒木慎氏には実験材料の育成や耐冷性の検定にご協力をいただいた。特に三浦清之博士には研究方針とその実行についてご指導とご協力をいただいた。ウイルス病研究室の早野由里子博士にはマーカー解析その他について多くの示唆とご協力をいただいた。九州農業研究センターの斎藤彰博士にはRFLPマーカーを用いた研究のきっかけを与えていただいた。これら皆様に感謝する。

本論文をとりまとめるにあたり北海道農業研究センター地域基盤研究部長佐藤裕博士、同育種工学研究室長入来規雄博士および育種工学研究室の職員の方々には多大なるご協力をいただいた。ここに記して感謝する。

引用文献

- 安部信行, 小高真一, 鳥山国土, 小林正男 (1989) : 高度障害型耐冷性「水稻中間母本農8号」の育成とその特性. 北農試研報 152, 9-17.
- Akagi H., Yokozeki Y., Inagaki A. and Fujimura T. (1996): Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 93, 1071-1077.
- Alpert K.B. and Tanksley S.D. (1996): High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing *fw2.2*: A major fruit weight quantitative trait locus in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15503-15507.
- 安東郁男, 清水博之, 黒木慎, 柳原哲司 (2002) : 低タンパク含量イネ系統の特性. 育種学研究 4(別2), 153.
- Arumuganathan I. and Earle E.D. (1991): Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Reporter* 9, 208-218.
- Bariknarova K., Takayama S., Homma S., Baker K., Cabezas E., Hoyt D.W., Li Z., Satterthwait A.C. and Ely K.R. (2002): BAG4/SODD protein contains a short BAG domain. *J. Biol. Chem.* 277, 31172-31178.
- Bonierbale M.W., Plaisted R.L. and Tanksley S.D. (1988): RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120, 1095-1103.

- Causse M.A., Fulton T.M., Cho Y.G., Ahn S.N., Chunwongse J., Wu K., Xiao J., Yu Z., Ronald P.C., Harrington S.E., Second G., McCouch S.R. and Tanksley S.D. (1994): Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138, 1251-1274.
- Dai L., Lin X., Ye C., Ise K., Saito K., Kato A., Xu F., Yu T. and Zhang D. (2004): Identification of quantitative trait loci controlling cold tolerance at the reproductive stage in Yunnan landrace of rice, Kunmingxiaobaigu. *Breed. Sci.* 54, 253-258.
- Dill A., Thomas S.G., Hu J., Steber C.M. and Sun T.-p. (2004): The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* 16, 1392-1405.
- Dwyer K.G., Kandasamy M.K., Mahosky D.I., Acciai J., Kudish B.I., Miller J.E., Nasrallah M.E. and Nasrallah J.B. (1994): A superfamily of S locus-related sequences in Arabidopsis: diverse structures and expression patterns. *Plant Cell* 6, 1829-1843.
- Evans P.C., Smith T.C., Lai M.J., Williams M.G., Burke D.F., Heyninck K., Kreike M.M., Beyaert R., Blundell T.L. and Kilshew P.J. (2003): A novel type of deubiquitinating enzyme. *J. Biol. Chem.* 278, 23180-23186.
- Fu X., Richards D.E., Fleck B., Xie D., Burton N. and Harberd N.P. (2004): The Arabidopsis mutant *sleepy1^{gar2-1}* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* 16, 1406-1418.
- 福地喬 (1931) : 水稻の稔実性に関する低温抵抗性と冷水抵抗性との関係. *日作紀* 3, 3-9.
- Futsuhara Y. and Toriyama K. (1966): Genetic studies on cool tolerance in rice. III. Linkage relations between genes controlling cool tolerance and marker genes of NAGAO and TAKAHASHI. *Jpn. J. Breed.* 16, 231-242.
- Harushima Y., Yano M., Shomura A., Sato M., Shimano T., Kuboki Y., Yamamoto T., Lin S.Y., Antonio B.A., Parco A., Kajiya H., Huang N., Yamamoto K., Nagamura Y., Kurata N, Khush G.S. and Sasaki T. (1998): A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F₂ population. *Genetics* 148, 479-494.
- 橋本鋼二 (1961) : 水稻品種の葯の大きさについて. *日育・日作北海道談話会報* 2, 11.
- Hayase H., Satake T., Nishiyama I. and Ito N. (1969): Male sterility caused by cooling treatment at the meiotic stage in rice plants. II. The most sensitive stage to cooling and the fertilizing ability of pistils. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* 38, 706-711.
- Hayashi T. and Ukai Y. (1994): Detection of additive and dominance effects of QTLs in interval mapping of F₂ RFLP data. *Theor. Appl. Genet.* 87, 1021-1027.
- 堀末登, 国広泰史, 東正昭, 小山田善三, 王懷義, 熊建華, 張思竹, 李智勇, 王永華 (1988) : 日中品種の耐冷性と標準品種の選定. *International symposium on rice breeding through the utilization of unexploited genetic resources. Tropical Agriculture Research Series No. 21*, 76-92.
- IRRI (1977): Screening for cold tolerance. *IRRI annual report for 1977*, 142.
- 伊勢一男, 孫有泉, 劉吉新 (1999) : 中国雲南省における稲遺伝資源と水稻育種の日中共同研究. *育種学研究* 1, 9-13.
- 石毛光雄 (1979) : 最尤法による遺伝子数の推定. *農林研究計算センター報告 A15*, 231-237.

- Ito N. (1978): Male sterility cause by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. XVI. Changes in carbohydrates, nitrogenous and phosphorous compounds in rice anthers after cooling treatment. *Jpn. J. Crop Sci.* 47, 318-323.
- Kaneda C. and Beachell H.M. (1974): Response of indica-japonica rice hybrids to low temperatures. *SABRAO J.* 6, 17-32.
- 刈屋国男 (1994) : イネ花粉と耐冷性に関する諸問題. 農業および園芸 69, 53-59.
- 加藤明, 木内均, 斎藤浩二 (1997) : 水稻耐冷性系統北海PL5の耐冷性に関与する遺伝子座の解明. 育種 47(別2), 114.
- 加藤明, 小松利光, 斎藤浩二 (2003) : 水稻耐冷性育種母本北海PL5の耐冷性遺伝子座の解析. 育種学研究 5(別1), 97.
- Kawaguchi K., Shibuya N. and Ishii T. (1996): A novel tetrasaccharide, with a structure similar to the terminal sequence of an arabinogalactan-protein, accumulates in rice anthers in a stage-specific manner. *Plant J.* 9, 777-785.
- 河内義景, 阿部利徳, 笹原健夫 (1997) : イネ栽培品種におけるミトコンドリアDNAのRFLP. 育種 47(別2), 189.
- Kikuchi S., Satoh K., Nagata T., Kawagashira N., Doi K., Kishimoto N., Yazaki J., Ishikawa M., Yamada H., Ooka H., Hotta I., Kojima K., Namiki T., Ohneda E., Yahagi W., Suzuki K., Li C.J., Ohtsuki K., Shishiki T., Otomo Y., Murakami K., Iida Y., Sugano S., Fujimura T., Suzuki Y., Tsunoda Y., Kurosaki T., Kodama T., Masuda H., Kobayashi M., Xie Q., Lu M., Narikawa R., Sugiyama A., Mizuno K., Yokomizo S., Niikura J., Ikeda R., Ishibiki J., Kawamata M., Yoshimura A., Miura J., Kusumegi T., Oka M., Ryu R., Ueda M., Matsubara K., Kawai J., Carninci P., Adachi J., Aizawa K., Arakawa T., Fukuda S., Hara A., Hashizume W., Hayatsu N., Imotani K., Ishii Y., Itoh M., Kagawa I., Kondo S., Konno H., Miyazaki A., Osato N., Ota Y., Saito R., Sasaki D., Sato K., Shibata K., Shinagawa A., Shiraki T., Yoshino M. and Hayashizaki Y. (2003): Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from *japonica* rice. *Science* 301, 376-378.
- Kinoshita T. (1987): Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. *Rice Genet. Newsl.* 4, 3-37.
- Klimyuk V.I., Carroll B.J., Thomas C.M. and Jones J.D.G. (1993): Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. *Plant J.* 3, 493-494.
- Kloth R.H. (1995): Quantitative trait loci affecting cotton fiber are linked to the *t1* locus in upland cotton. *Theor. Appl. Genet.* 91, 762-768.
- Koike K., Yoshino K., Sue N., Umehara Y., Ashikawa I., Kurata N. and Sasaki T. (1997): Physical mapping of rice chromosome 4 and 7 using YAC clones. *DNA Res.* 4, 27-33.
- 小松利光, 斎藤浩二, 佐野芳雄, 加藤明 (1999a) : 水稻中間母本農11号の穂ばらみ期耐冷性遺伝子座と連鎖したRFLPマーカーの同定. 日育・日作北海道談話会報 40, 25-26.
- 小松利光, 佐野芳雄, 加藤明 (1999b) : 耐冷性育種母本北海PL5の耐冷性遺伝子座の精密マッピング. 日育・日作北海道談話会報40, 23-24.
- Kurata N., Nagamura Y., Yamamoto K., Harushima Y., Sue N., Wu J., Antonio B.A., Shomura A., Shimizu T., Lin S.Y., Inoue T., Fukuda A., Shimao Y., Kuboki Y., Toyama T., Miyamoto Y., Kirihara T., Hayasaka K., Miyano A., Monna L., Zhong H.S., Tamura Y., Wang Z.X., Momma T., Umehara Y., Yano M., Sasaki T. and Minobe Y. (1994): A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genet.* 8, 365-

- Kuroda H., Takahashi N., Shimada H., Seki M., Shinozaki K. and Matsui M. (2002): Classification and expression analysis of *Arabidopsis* F-box-containing protein genes. *Plant Cell Physiol.* 43, 1073-1085.
- 黒木慎, 安東郁男, 清水博之, 斎藤浩二 (2002) : 水稻品種「初雫」の穂ばらみ期耐冷性の連鎖分析. *育種学研究* 4(別2), 366.
- Lemieux B., Aharon A. and Schena M. (1998): Overview of DNA chip technology. *Mol. Breed.* 4, 277-278.
- Li H.Y. and Gray J.E. (1997): Pollination-enhanced expression of a receptor-like protein kinase related gene in tobacco styles. *Plant Mol. Biol.* 33, 653-665.
- Lu..ders J., Demand J. and Ho..hfeld J. (2000): The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J. Biol. Chem.* 275, 4613-4617.
- McCouch S.R., Kochert G., Yu Z.H., Wang Z.Y., Khush G.S., Coffman W.R. and Tanksley S.D. (1988): Molecular mapping of rice chromosome. *Theor. Appl. Genet.* 76, 815-829.
- Monforte A.J. and Tanksley S.D. (2000): Fine mapping of a quantitative trait locus (QTL) from *Lycopersicon hirsutum* chromosome 1 affecting fruit characteristics and agronomic traits: breaking linkage among QTLs affecting different traits and dissection of heterosis for yield. *Theor. Appl. Genet.* 100, 471-479.
- 村上寛一, 川口数美, 水島宇三郎 (1958) : 低温下での稲の葯の組織化学的異常とその品種間差異について. *育種* 8, 119-127.
- Murray M.G. and Thompson W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325.
- 永野邦明, 伊藤純雄, 村松謙生, 今野一男, 駒田充生, 高橋賢司, 斎藤滋 (1994) : 北海道における平成5年冷害の解析—水稻・飼料作物編 II. 水稻 2. 冷害の実態と解析. *北海道農業試験場研究資料* 51, 14-37.
- Nakamura S., Asakawa S., Ohmido N., Fukui K., Shimizu N. and Kawasaki S. (1997): Construction of an 800-kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene *Pi-ta²* using a highly representative rice BAC library. *Mol. Gen. Genet.* 254, 611-620.
- 西村実 (1991) : 北海道水稻品種の障害型耐冷性に関する系譜的考察. *日育・日作北海道談話会報* 31, 30.
- 西村実 (1995) : 北海道イネ品種の穂ばらみ期耐冷性の遺伝. *育種* 45, 479-485.
- Nishiyama I. (1978): Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. XVIII. Some enzyme activities in anthers during and after the cooling. *Jpn. J. Crop Sci.* 47, 551-556.
- Nishiyama I. (1983): Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. XXVI. The number of ripened pollen grains and the difference in susceptibility to coolness among spikelets on the panicle. *Jpn. J. Crop Sci.* 52, 307-313.
- Oka H. and Morishima H. (1967): Variations in the breeding systems of a wild rice, *Oryza perennis*. *Evolution* 21, 249-258.
- Paterson A.H., Lander E.S., Hewitt J.D., Paterson S., Lincoln S.E. and Tanksley S.D. (1988): Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map

of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335, 721-726.

- Paterson A.H., DeVerna J.W., Lanini B. and Tanksley S.D. (1990): Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. *Genetics* 124, 735-742.
- Patton E.E., Willems A.R. and Tyers M. (1998): Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet.* 14, 236-248.
- Ruegger M., Dewey E., Gray W.M., Hobbie L., Tumer J. and Estelle M. (1998): The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes Dev.* 12, 198-207.
- Saito A., Yano M., Kishimoto N., Nakagahara M., Yoshimura A., Saito K., Kuhara S., Kawase M., Nagamine T., Yoshimura S., Ideta O., Ohsawa R., Hayano Y., Iwata N. and Sugiura M. (1991): Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice. *Jpn. J. Breed.* 41, 665-670.
- 斎藤浩二, 早野由里子, 加藤明 (1993) : P.L.A.由来障害型耐冷性遺伝子を持つ水稻中間母本農11号のグラフィカルジェノタイプ分析. 育種 43(別2), 93.
- Saito K., Miura K., Nagano K., Hayano-Saito Y., Saito A., Araki H. and Kato A. (1995): Chromosomal location of quantitative trait loci for cool tolerance at the booting stage in rice variety 'Norin-PL8'. *Breed. Sci.* 45, 337-340.
- Saito K., Miura K., Nagano K., Hayano-Saito Y., Araki H. and Kato A. (2001): Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 of rice and their association with anther length. *Theor. Appl. Genet.* 103, 862-868.
- Saito K., Miura K., Hayano-Saito Y. and Kato A. (2003): Analysis of quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage of rice. *Japan Agric. Res. Quart.* 37, 1-5.
- Saito K., Hayano-Saito Y., Maruyama-Funatsuki W., Sato Y. and Kato A. (2004): Physical mapping and putative candidate gene identification of a quantitative trait locus *Ctb1* for cold tolerance at the booting stage of rice. *Theor. Appl. Genet.* 109, 515-522.
- 酒井寛一 (1937) : 低温による稲の小孢子形成細胞分裂の阻害. 日作紀 9, 207-212.
- 酒井寛一 (1943) : 昭和16年の冷害に於ける北海道水稻の不稔発生機構に関する細胞組織学的調査. 北農試研報 40, 1-17.
- 酒井寛一, 島崎佳郎 (1948) : イネの“タペート肥大”の遺伝. 寒地農学 2, 93-95.
- 酒井寛一 (1949) : 冷害におけるイネ不稔性の細胞組織学的並に育種学的研究特に低温によるタペート肥大に関する実験的研究. 北農試研報 43, 1-46.
- Sakata K., Nagamura Y., Numa H., Antonio B.A., Nagasaki H., Itonuma A., Watanabe W., Shimizu Y., Horiuchi I., Matsumoto T., Sasaki T. and Higo K. (2002): RiceGAAS: an automated annotation system and database for rice genome sequence. *Nucleic Acids. Res.* 30, 98-102.
- 佐々木武彦, 松永和久 (1985) : イネ耐冷性品種の系譜的考察. 日作東北支部報 28, 57-58.
- 佐々木多喜雄, 佐々木一男, 柳川忠男, 沼尾吉則, 相川宗巖 (1990) : 水稻品種「きらら397」の育成について. 道立農業試験場集報 60, 1-18.
- Satake T. and Hayase M. (1970): Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. V. Estimation of pollen developmental stage and the most sensitive stage to coolness. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* 39, 468-473.

- Satake T. (1976): Determination of the most sensitive stage to sterile-type cool injury in rice plants. Res. Bull. Hokkaido Natl. Agr. Exp. Stn. 113, 1-43.
- Satake T. and Toriyama K. (1979): Two extremely cool-tolerant varieties. Intern. Rice Res. Newsl. 4(2), 9-10.
- Satake T. and Shibata M. (1992): Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. XXXI. Four components participating in fertilization. Jpn. J. Crop Sci. 61, 454-462.
- Sato S., Tamaki A. and Shinjo C. (1994): Genetic relation between an earliness gene *Ef-1* and anther length in rice, *Oryza sativa* L. Breed. Sci. 44, 127-132.
- Sawada S. (1978): Study of sterile-type cool injury in rice plants with special reference to the mechanism and inheritance of sterility. Bull. Obihiro Univ. 10, 837-883.
- 清水博之, 黒木慎, 安東郁男 (2002) : 水稲耐冷性中間母本「水稲中間母本農8号」, 「水稲中間母本農11号」および「北海PL5」の耐冷性集積の可能性. 日育・日作北海道談話会報 43, 27-28.
- 新橋登, 前田博, 國廣泰史, 丹野久, 田縁勝洋, 木内均, 平山裕治, 菅原圭一, 菊地治己, 佐々木一男, 吉田昌幸 (2003) : 水稲新品種「ほしのゆめ」の育成. 北海道立農試集報 84, 1-12.
- Silver L.M. and Artzt K. (1981): Recombination suppression of mouse *t*-haplotypes due to chromatin mismatching. Nature 290, 68-70.
- Sondermann H., Scheufler C., Schneider C., Ho..hfeld H., Hartl F.-U. and Moarefi I. (2001): Functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. Science 291, 1553-1557.
- 鈴木正一 (1981) : イネにおける障害型耐冷性と花器形質との関係. I. 葯長および柱頭長の品種間差違と栽植密度の影響. 育雑 31, 57-64.
- 鈴木正一 (1982) : イネにおける障害型耐冷性と花器形質との関係. II. 分離世代における花器形質と障害型耐冷性との関係. 育雑 32, 9-16.
- Takahashi M., Kinoshita T. and Takeda K. (1973): Character expression of some major genes in rice and their agronomic application. -Genetical studies on rice plant, LVI-. J. Facul. Agr., Hokkaido Univ. 57, 275-292.
- Takeuchi Y., Hayasaka H., Chiba B., Tanaka I., Shimano T., Yamagishi M., Nagano K., Sasaki T. and Yano M. (2001): Mapping quantitative trait loci controlling cool-temperature tolerance at booting stage in temperate *Japonica* rice. Breed. Sci. 51, 191-197.
- 田中英彦 (1998) : 水稲の不稔歩合を出穂期に葯長から予測する方法. 北農 65, 384-386.
- 丹野久, 熊建華, 戴陸園, 葉昌榮 (1999) : 中国雲南省における水稲耐冷性品種の特性について. 日作紀 68, 508-514.
- Temnykh S., William D.P., Nicola A., Cartinhour S., Hauck N., Lipovich L., Cho Y.G., Ishii T. and McCouch S.R. (2000): Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 100, 697-712.
- Temnykh S., DeClerck G., Kukashova A., Lipovich L., Cartinhour S. and McCouch S.R. (2001): Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. Genome Res. 11, 1441-1452.
- 寺尾博, 大谷義雄, 白木実, 山崎正枝 (1940) : 水稲冷害の生理学的研究. II. 幼穂發育上

の各期に於ける低温障害. 日作紀 12, 175-195.

- 鳥山国土, 蓬原雄三 (1960) : 水稲における耐冷性の遺伝と選抜に関する研究. I. 耐冷性の遺伝分析. 育雑 10, 143-152.
- 鳥山国土 (1962) : 水稲品種の耐冷性検定方法並びに耐冷性の遺伝に関する研究. 青森農試研報 7, 109-153.
- Townsend P.A., Cutress R.I., Sharp A., Brimmell M. and Packham G. (2003): BAG-1: a multifunctional regulator of cell growth and survival. *Biochim. Biophys. Acta* 1603, 83-98.
- 上原泰樹, 諏訪充, 横山裕正, 川村陽一, 舘山元春 (1993) : 耐冷性中間母本系統「中母59」の特性. 東北農業研究 46, 3-4.
- Ukai Y., Ohsawa R. and Saito A. (1991): MAPL: a package of microcomputer programs for RFLP linkage mapping. *Rice Genet. Newsl.* 8, 155-158.
- Walker J.C. and Zhang R. (1990): Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature* 345, 743-746.
- Walker J.C. (1993): Receptor-like protein kinase genes of *Arabidopsis*. *Plant J.* 3, 451-456.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
- Xie D.X., Feys B.F., James S., Nieto-Rostro M. and Turner J.G. (1998): COI1: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280, 1091-1094.
- Xiong L.Z., Liu K.D., Dai X.K., Xu C.G. and Zhang Q. (1999): Identification of genetic factors controlling domestication-related traits of rice using an F₂ population of a cross between *Oryza sativa* and *O. rufipogon*. *Theor. Appl. Genet.* 98, 243-251.
- Yamamoto T., Kuboki Y., Lin S.Y., Sasaki T. and Yano M. (1998): Fine mapping of quantitative trait loci *Hd-1*, *Hd-2* and *Hd-3*, controlling heading date of rice, as single Mendelian factors. *Theor. Appl. Genet.* 97, 37-44.
- Zhao Q., Zhang Y., Cheng Z., Chen M., Wang S., Feng Q., Huang Y., Li Y., Tang Y., Zhou B., Chen Z., Yu S., Zhu J., Hu X., Mu J., Ying K., Hao P., Zhang L., Lu Y., Zhang L.S., Liu Y., Yu Z., Fan D., Weng Q., Chen L., Lu T., Liu X., Jia P., Sun T., Wu Y., Zhang Y., Lu Y., Li C., Wang R., Lei H., Li T., Hu H., Wu M., Zhang R., Guan J., Zhu J., Fu G., Gu M., Hong G., Xue Y., Wing R., Jiang J. and Han B. (2002): A fine physical map of the rice chromosome 4. *Genome Res.* 12, 817-823.

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

北海道におけるイネ穂ばらみ期 耐冷性の遺伝解析

摘要

イネは穂ばらみ期に低温に遭遇すると、小孢子の発育が阻害を受け、不稔を発生する。冷夏に見舞われやすい北海道では、穂ばらみ期耐冷性は重要な育種目標の一つである。北海道農業試験場（現北海道農業研究センター）では、北海道へ外国稲の耐冷性を導入するために、インドネシア原産の熱帯ジャポニカ品種であるSilewahへ北海道の育種系統である北海241号を連続戻し交配し、中間母本農8号を育成した。本研究ではDNAマーカーを用いることによって中母農8の穂ばらみ期耐冷性に関する量的形質遺伝子座（QTL）の遺伝解析を試みた。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

北海道におけるイネ穂ばらみ期 耐冷性の遺伝解析

摘要

1. 中母農8のグラフィカルジェノタイプ

中母農8はSilewahを雌性親とし北海241号を花粉親とする連続戻し交配によって育成された。そのため、中母農8の細胞質はSilewahに由来している。細胞質と耐冷性との関連を調べるために、正逆交雑のF1個体について穂ばらみ期耐冷性を比較したが、交雑間での耐冷性の差は小さかった。したがって、細胞質は穂ばらみ期耐冷性に関わっていないと考えられる。

中母農8のグラフィカルジェノタイプを明らかにするために、Silewah、北海241号および中母農8について制限酵素断片長多型（RFLP）パターンを調べた。240個のRFLPマーカーのうち102個のマーカーで多型が検出された。多型のパターンはSilewahと中母農8が同じパターンを示すものと北海241号と中母農8が同じパターンを示すものの2つに分類された。前者のパターンは11個のマーカーで認められ、それらは第1、3、4および8染色体に座乗していた。この結果はこれらの染色体の一部がSilewahから中母農8へ導入されたことを示している。

北海PL4は中母農8の姉妹系統である。北海PL4も耐冷性系統ではあるが、その耐冷性は中母農8にわずかながら劣るとされている。北海PL4のRFLPパターンを調べた結果、北海PL4では第1および4染色体の導入領域は中母農8と同様にSilewah由来だったが、第3および8染色体の導入領域は北海241号由来となっていた。このことから中母農8の主要な耐冷性遺伝子座は第1または4染色体に座乗する可能性が高いと考えられた。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

摘要

2. 導入染色体領域と耐冷性の関連

1993年に北海道は記録的な冷夏に見舞われた。この年に育種圃場において、きらら397／中母農8／／きらら397のBC₁F₄集団が栽培されていた。そこで43個体について稔実率と導入領域のRFLPマーカーの遺伝子型を調査した。その結果、第3染色体と第4染色体の導入領域は耐冷性と関連していることが示された。第8染色体の導入領域は耐冷性とは関連していなかった。第1染色体についてはRFLPマーカーが中母農8ときらら397の間で多型を示さなかったために評価を行うことができなかった。

この結果を確認するためにきらら397／中母農8／／きらら397のBC₁F₅系統92系統について耐冷性検定とRFLP遺伝子型の調査を行った。耐冷性検定は中期冷水灌漑法によって行い、稔実率で耐冷性を評価した。第3染色体と第4染色体のマーカーについては、中母農8型の系統の平均稔実率がきらら397型の系統の平均稔実率よりも有意に高かった。一方、第8染色体のマーカーについては中母農8型の系統ときらら397型の系統の平均稔実率に差がなかった。これらの結果から、第3および4染色体の導入領域が耐冷性と関連していることがわかった。

導入染色体領域と穂ばらみ期耐冷性の関連は北海241号と中母農8のF₉系統でも調べられた。503個のマイクロサテライトマーカーについて北海241号と中母農8のパターンを比較したところ、第1、3および4染色体上の6個のマーカーで多型が検出された。第1染色体のマーカーについて中母農8型の系統の平均稔実率は北海241号型の系統の平均稔実率よりも8.5%高かった。第4染色体のマーカーについて中母農8型の系統の平均稔実率は北海241号型の系統の平均稔実率に比べて17.7%高かった。しかし、第3染色体のマーカーについては中母農8型の系統と北海241号型の系統で平均稔実率に差がなかった。したがって、北海241号と中母農8の分離集団では第1染色体と第4染色体の導入領域が耐冷性と関連していた。

以上の結果から第1、3および4染色体の導入染色体領域が耐冷性と関連することがわかった。特に第4染色体の導入領域は穂ばらみ期耐冷性に対する効果が大きかった。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

摘要

3. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の区間マッピング

第4染色体長腕の穂ばらみ期耐冷性に関するQTLを詳細にマッピングするために、中母農8へきらら397を連続戻し交配して得た分離集団で耐冷性の区間マッピングを行った結果、対数尤度（LOD）スコアは導入領域の中央部から動原体側で比較的高かった。最大のLODスコアはRFLPマーカーR2737とXNpb102の間で認められたことから、耐冷性のQTLはR2737とXNpb102の間に座乗する確率が最も高いと考えられた。

この分離集団より耐冷性遺伝子座領域での組換え個体を選抜し、その後代から組換え固定系統を育成した。そのうちのひとつBT4-9-7の遺伝子型はR738について中母農8型でR2737についてきらら397型であり、その耐冷性はきらら397と同等だった。これに対し、R738とR2737について中母農8型でXNpb102についてきらら397型となっていたBT4-76-2の耐冷性はきらら397よりも高かった。この結果はR738とXNpb102の間に耐冷性のQTLが存在することを示しており、最大のLODスコアがR2737とXNpb102の間で認められたことと一致した。R740について中母農8型でXNpb267についてきらら397型だったBT4-74-8の耐冷性はきらら397と同等だった。したがって、R740よりもテロメア側には耐冷性のQTLは存在しないと考えられる。しかし、BT4-70-1の耐冷性はBT4-74-8やきらら397よりも高かった。BT4-70-1とBT4-74-8の遺伝子型はSCAB11とR740の間でしか違わなかった。また、LOD曲線はこの領域で平らになっており、この部分に隠れたLODピークが存在すると推測された。以上の結果から、R740とSCAB11の間にも耐冷性のQTLが存在すると考えられた。

第4染色体長腕には2つのQTLが存在していた。そこで、R740-SCAB11間のQTLをCtb1、R2737-XNpb102間のQTLをCtb2と名付けた。両方の耐冷性遺伝子を持つ組換え固定系統の耐冷性と一方の耐冷性遺伝子しか持たない組換え固定系統の耐冷性に大きな差はなかった。このことは2つの耐冷性遺伝子の相互作用が相加的でないことを示している。Ctb1とCtb2の遺伝距離は最小で5.6 cM、最大で17.2 cMだった。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

摘要

4. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子座の精密マッピングと物理地図

*Ctb1*座の精密マッピングを行うために1,255個体の分離集団より*Ctb1*座の両側に位置するマーカー間での組換え個体の選抜を行い、組換え固定系統49系統を育成した。このうちの27系統について耐冷性検定およびマーカー遺伝子型の調査を行い、耐冷性に関与する染色体領域を調べた結果、*Ctb1*座はXNpb264近傍にあると考えられた。

XNpb264とSCAB11の間は2つの大腸菌人工染色体（BAC）クローンでカバーされていた。そこで、BACクローンの塩基配列情報を基にsimple sequence length polymorphism（SSLP）マーカーBAC1、BAC22、BAC9、PNK2、BAC29およびBAC28を作成した。これらのマーカーによる調査の結果、組換え固定系統BT4-12-110-7はBAC1とSCAB11の間のマーカーに関してヘテロ型であることが判明した。そこで*Ctb1*座がBAC1とSCAB11の間にあるかどうかを調べるために、この系統の後代より2つの準同質遺伝子系統BT4-12-110-7KとBT4-12-110-7Pを育成した。両系統はBAC1とSCAB11の間のマーカーに対して、それぞれきらら397型および中母農8型となっている。BT4-12-110-7Pの耐冷性はBT4-12-110-7Kに比べて有意に高かったことから、*Ctb1*はBAC1とSCAB11の間に座乗すると考えられた。

*Ctb1*領域を狭めるために、さらに753個体の分離集団について組換え個体の選抜を行い、組換え固定系統4系統を育成した。この4系統を加えた計10系統についてSSLPマーカー遺伝子型の分析を行った。このうちの1系統はBAC9について中母農8型、PNK2についてはきらら397型であり、その耐冷性は*Ctb1*を持たない対照系統よりも有意に高かった。このことは*Ctb1*がBAC1とPNK2の間に座乗することを示している。また、BAC1が中母農8型でBAC22がきらら397型の系統の中で2系統は耐冷性が低かったのに対し、1系統は耐冷性が有意に高かった。以上の結果から*Ctb1*はBAC1とBAC22の間に座乗すると考えられた。BAC1とBAC22の物理距離は56 kbだった。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

摘要

5. 耐冷性遺伝子の機能

葯長はその中に含まれる花粉の量と相関することから、耐冷性に影響を与える要素の一つと考えられている。また、中母農8の葯長は2.85mmで、北海241号の葯よりも0.72mm長かった。そこで、両品種のF7系統について葯長を調査したところ、葯長は両親間で連続的に分離していた。さらに、第4染色体の導入領域は葯長と有意に関連していた。そこで、第4染色体長腕に座乗する耐冷性のQTLと葯長の関係を調べるために、区間マッピングに用いた組換え固定系統の葯長を測定した。Ctb1またはCtb2を持つ系統の葯は両耐冷性遺伝子を持たない系統の葯よりも長かったことから、Ctb1とCtb2は共に葯長と関係している可能性が示された。

56 kbのCtb1領域には7個のオープンリーディングフレーム（ORF）があり、そのうちの2個はシグナル伝達経路に関係するタンパク質リン酸化酵素をコードしていた。他の2つはF-boxを持っていた。F-boxはユビキチン-プロテアソーム経路に関係している。もう一つのORFはBAGドメインとユビキチンドメインを持ち、Hsc/Hspシャペロンとユビキチン-プロテアソームを結合させる機能を持つと考えられる。残りの2つについては機能は不明だった。7個のORFのうち5個はシグナル伝達経路またはユビキチン-プロテアソーム経路に関係していた。両経路とも植物の生育や分化における様々な生化学反応に関わることから、どのORFが耐冷性や葯長に影響するかを特定することは困難である。Ctb1遺伝子を特定するためには、今後、これらの遺伝子について発現様式の解明や形質転換実験を行う必要がある。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

Summary

Spikelet fertility of rice decreases if rice plants are exposed to low temperature at the booting stage, due to the failure of microspore development under low temperature conditions. Cold tolerance at the booting stage is one of the most important objectives in breeding programs in Hokkaido. In order to incorporate cold tolerance of foreign rice varieties into Hokkaido, Silewah, which is a tropical *japonica* variety from Indonesia, was backcrossed to a breeding line, Hokkai241, and a cold-tolerant variety, Norin-PL8, was developed. However, the chromosomal locations of the cold tolerance genes of Norin-PL8 had not been determined. In the present study, I analyzed the quantitative trait loci (QTLs) for cold tolerance of Norin-PL8 using DNA markers.

I. Identification of chromosomal segments associated with cold tolerance at the booting stage

1. Graphical genotype analysis of Norin-PL8

Norin-PL8 was developed by the cross Silewah//Hokkai241. Therefore, the cytoplasm of Norin-PL8 is derived from Silewah. I examined the cold tolerance of F₁ plants of reciprocal crosses. There was no difference between the crosses, indicating that the cytoplasm is not associated with cold tolerance.

In order to analyze the genotype of Norin-PL8, I examined the restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of Silewah, Hokkai241 and Norin-PL8. Out of the 240 RFLP markers used, 102 markers gave polymorphic bands. All of the polymorphic patterns could be divided into two groups, those monomorphic between Silewah and Norin-PL8 and those monomorphic between Hokkai241 and Norin-PL8. The former patterns were detected by 11 markers (two markers on chromosome 1, three markers on chromosome 3, five markers on chromosome 4 and one marker on chromosome 8). The results indicate that the segments on chromosomes 1, 3, 4 and 8 were introgressed from Silewah into Norin-PL8.

HokkaiPL4 is a sister line of Norin-PL8. Although HokkaiPL4 is also cold-tolerant, it is a little inferior to Norin-PL8. I examined the RFLP patterns of HokkaiPL4 and found that the segments on chromosomes 1 and 4 were introgressed from Silewah into HokkaiPL4 but that the segments on chromosomes 3 and 8 were not. The results suggest that the main cold tolerance gene is located on chromosome 1 or 4.

2. Association between introgression and cold tolerance

BC₁F₄ plants of the cross Kirara397/Norin-PL8//Kirara397 were grown in a paddy field in 1993, a year in which there was a very cool summer. I examined the spikelet fertility and genotypes of RFLP markers for 43 BC₁F₄ plants. The results indicated that the introgressions on chromosomes 3 and 4 were associated with cold tolerance. The introgression on chromosome 8 was not associated with cold tolerance. I could not examine the association

between the introgression on chromosome 1 and cold tolerance because the RFLP markers on chromosome 1 were monomorphic between Kirara397 and Norin-PL8.

In order to verify the results, 92 BC₁F₅ lines of the cross Kirara397/Norin-PL8//Kirara397 were tested for cold tolerance and RFLP genotypes. Cold tolerance was evaluated on the basis of spikelet fertility of rice plants irrigated with deep water controlled at 19°C. For the markers on chromosomes 3 and 4, the mean spikelet fertility of the lines with the Norin-PL8 allele was significantly higher than that of the lines with the Kirara397 allele. On the other hand, for the marker on chromosome 8, the mean spikelet fertility of the lines with the Norin-PL8 allele was equivalent to that of the lines with the Kirara397 allele. The results indicated that the introgressions on chromosomes 3 and 4 were associated with cold tolerance.

The association between introgressions and cold tolerance was examined also in F₉ lines between Hokkai241 and Norin-PL8. Out of 503 microsatellite markers used, 6 markers on chromosomes 1, 3 and 4 were polymorphic between Hokkai241 and Norin-PL8. For the markers on chromosomes 1 and 4, the mean spikelet fertilities of the lines with the Norin-PL8 allele were higher than that of the lines with the Hokkai241 allele by 8.5% and 17.7%, respectively. On the other hand, for the marker on chromosome 3, the mean spikelet fertility of the lines with the Norin-PL8 allele was equivalent to that of the lines with the Hokkai241 allele. Therefore, the introgressions on chromosomes 1 and 4 were associated with cold tolerance in the population between Hokkai241 and Norin-PL8.

The results showed that introgressions on chromosomes 1, 3 and 4 were associated with cold tolerance and that the introgression on chromosome 4 had the largest effect on cold tolerance.

II. Map position and function of the cold tolerance gene

1. Interval mapping of the cold tolerance gene

In order to determine the precise map position of the QTL for cold tolerance on chromosome 4, I developed advanced backcross progenies by using Kirara397 as a recurrent parent and conducted interval mapping. Log-likelihood (LOD) scores were relatively high from the center to the proximal end of the introgression and a maximum LOD score was observed between the RFLP markers R2737 and *XNpb102*, indicating that the QTL is most likely positioned between R2737 and *XNpb102*.

I developed a set of recombinant inbred lines (RILs) from the recombinants in the segregating population and compared their cold tolerance. BT4-9-7 had the Norin-PL8 allele for R738 and had the Kirara397 allele for the other markers, and its cold tolerance was equivalent to that of Kirara397. Cold tolerance of BT4-76-2, which had the Norin-PL8 allele for R738 and R2737, was higher than that of Kirara397. This result suggests the presence of the QTL between R738 and *XNpb102*, coinciding with the LOD peak observed in the interval mapping. Cold tolerance of BT4-74-8, which had the Norin-PL8 allele for R740 and the Kirara397 allele for *XNpb267*, was equivalent to that of Kirara397, indicating that there is no QTL from R740 to the distal end. However, cold tolerance of BT4-70-1 was higher than that of BT4-74-8 and Kirara397. The genotype for the region from R740 to SCAB11 is different between BT4-70-1 and BT4-74-8. The LOD curve is even in this region, suggesting the presence of a hidden LOD peak. These results indicate the presence of another QTL between

R740 and SCAB11.

I found that there are two QTLs for cold tolerance in the long arm of chromosome 4 and designated the distal one and proximal one as *Ctb1* and *Ctb2*, respectively. Cold tolerance of the RILs that harbor both QTLs was indistinguishable from that of the RILs that harbor either QTL, suggesting that the interaction of *Ctb1* and *Ctb2* is not additive. Minimum and maximum genetic distances between *Ctb1* and *Ctb2* were 5.6 cM and 17.2 cM, respectively.

2. Fine physical mapping of the cold tolerance gene

For the fine mapping of *Ctb1*, 1,255 individuals of the segregating population were screened for recombination between the *Ctb1* flanking markers and 49 RILs were developed. I selected 2 RILs that had the Kirara397 allele for the *Ctb1* region (NS), 10 RILs that had the Norin-PL8 allele for R740 and the Kirara397 allele for *XNpb267* (NA), 6 RILs that had the Norin-PL8 allele for *XNpb267* and the Kirara397 allele for *XNpb264* (NB), 7 RILs that had the Norin-PL8 allele for *XNpb264* and the Kirara397 allele for SCAB11 (NC) and 2 RILs that had the Norin-PL8 allele for the *Ctb1* region (NT). NS and NT were used as cold-sensitive and cold-tolerant controls, respectively. The spikelet fertility of NC was higher than that of NS, NA and NB and equivalent to that of NT, suggesting that *Ctb1* is located around *XNpb264*.

I found that two bacterial artificial chromosome (BAC) clones cover the region between *XNpb264* and SCAB11. Based on the DNA sequences of the BAC clones, I developed simple sequence length polymorphism (SSLP) markers: BAC1, BAC22, BAC9, PNK2, BAC29 and BAC28. I found that one of the NC RILs, BT4-12-110-7, was heterozygous for the region between BAC1 and SCAB11. In order to test whether *Ctb1* is located between BAC1 and SCAB11, I developed near-isogenic lines, BT4-12-110-7K and BT4-12-110-7P, that had the Kirara397 allele and the Norin-PL8 allele, respectively, for the markers between BAC1 and SCAB11. Cold tolerance of BT4-12-110-7P was significantly higher than that of BT4-12-110-7K, indicating that *Ctb1* is located between BAC1 and SCAB11.

To narrow down the *Ctb1* region, I increased the number of RILs by screening 753 individuals of the segregating population and developed four more RILs. I genotyped the ten RILs using the SSLP markers. Cold tolerance of BT4-27-486-2, which had the Norin-PL8 allele for BAC9 and the Kirara397 allele for PNK2, was significantly higher than that of the cold-sensitive control, indicating that *Ctb1* is located between BAC1 and PNK2. Cold tolerance of BT4-18-170-2 and BT4-29-279-6 were equivalent to that of the cold-sensitive control, while the cold tolerance of BT4-27-355-3 was significantly higher than that of the cold-sensitive control. BT4-18-170-2, BT4-29-279-6 and BT4-27-355-3 had the Norin-PL8 allele for BAC1 and the Kirara397 allele for BAC22. The results indicate that *Ctb1* is located between BAC1 and BAC22. The physical distance between BAC1 and BAC22 is 56 kb.

3. Function of the cold tolerance gene

Anther length is one of the factors involved in cold tolerance because anther length is correlated with amount of pollen. The anther lengths of Norin-PL8 and Hokkai241 were 2.85 mm and 2.13 mm, respectively, and the anther length of F₇ lines between Hokkai241 and Norin-PL8 were continuously distributed between those of the parents. The introgression on chromosome 4 was significantly associated with anther length in the F₇ population. In order

to examine the association between QTLs for cold tolerance and anther length, I measured the lengths of 80 anthers from each RIL used for the interval mapping. The RILs harboring *Ctb1* and/or *Ctb2* produced larger anthers than did the RILs without *Ctb1* and *Ctb2*. This result suggests that both *Ctb1* and *Ctb2* express cold tolerance by producing a large anther.

I found seven open reading frames (ORFs) in the 56-kb *Ctb1* region. Two ORFs coded for receptor-like protein kinases that play an important role in plant signal transduction. Two ORFs had F-box motifs. The F-box is involved in the ubiquitin-proteasome pathway. One ORF contained a BAG domain and a ubiquitin domain, suggesting that it plays a role in the physical linkage between the Hsp/Hsc chaperon system and the ubiquitin-proteasome. Functions of the remaining two ORFs are unknown. Of the seven ORFs identified in the *Ctb1* region, five ORFs appeared to be associated with a signal transduction pathway or a ubiquitin-proteasome pathway. Since both pathways function in various aspects of growth and development, it is difficult to speculate about the ORF responsible for cold tolerance or anther length. Expression analyses and transformation experiments of the candidate genes are necessary for identification of the *Ctb1* gene.

[前に戻る](#) [目次に戻る](#)

第1表 きらら397, 中母農8およびF₁雑種の冷水処理後の稔実率.

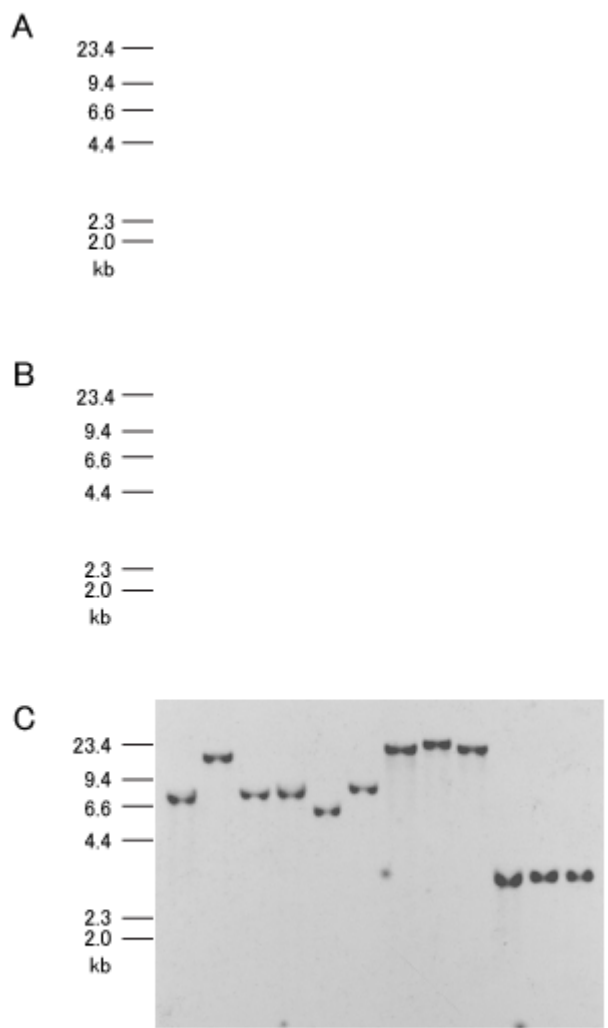
品種・交配組み合わせ		稔実率(%) ± 標準偏差
親品種	きらら397	12.7 ± 4.9
	中母農8	53.5 ± 9.6
F ₁ 雑種	きらら397/中母農8	58.3 ± 8.7
	中母農8/きらら397	67.4 ± 5.3

第2表 各染色体ごとのRFLPマーカ―数と多型性マーカ―数.

染色体	マーカ―数	多型性マーカ―数*	多型性マーカ―割合
1	32	7	21.9%
2	31	6	19.4%
3	35	20	57.1%
4	25	12	48.0%
5	17	10	58.8%
6	21	6	28.6%
7	14	7	50.0%
8	11	9	81.8%
9	18	6	33.3%
10	4	1	25.0%
11	22	11	50.0%
12	10	7	70.0%
計	240	102	42.5%

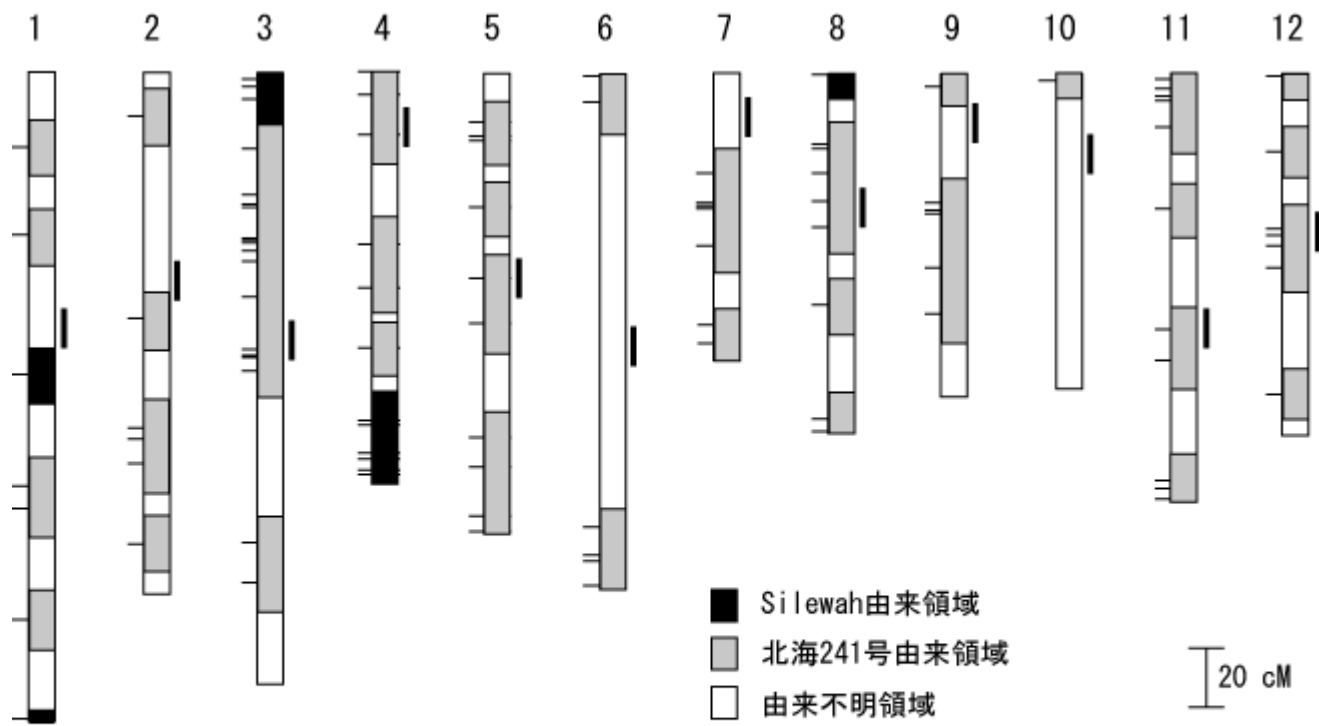
*Silewahと北海241号で多型を示したRFLPマーカ―.

*Bgl*II *Bam*HI *Eco*RV *Hind*III
S H P S H P S H P S H P



第1図 RFLPパターンの例

240個のRFLPマーカーはSilewah(S), 北海241号(H), 中母農8(P)のRFLPパターンにより多型を示さない(A), 北海241号と中母農8が同じでSilewahのみが異なるパターンを示す(B), Silewahと中母農8が同じで北海241号のみが異なるパターンを示す(C)の3種類に分類された。



第2図 中母農8のグラフィカルジェノタイプ

黒色の領域はSilewahから中母農8へ導入された領域を示す。灰色の領域は北海241号に由来する領域を、白抜きの領域は多型性マーカーが存在しないために由来を特定できなかった領域を示す。横棒は多型性マーカーの位置を示す。縦棒は動原体の位置を示す。

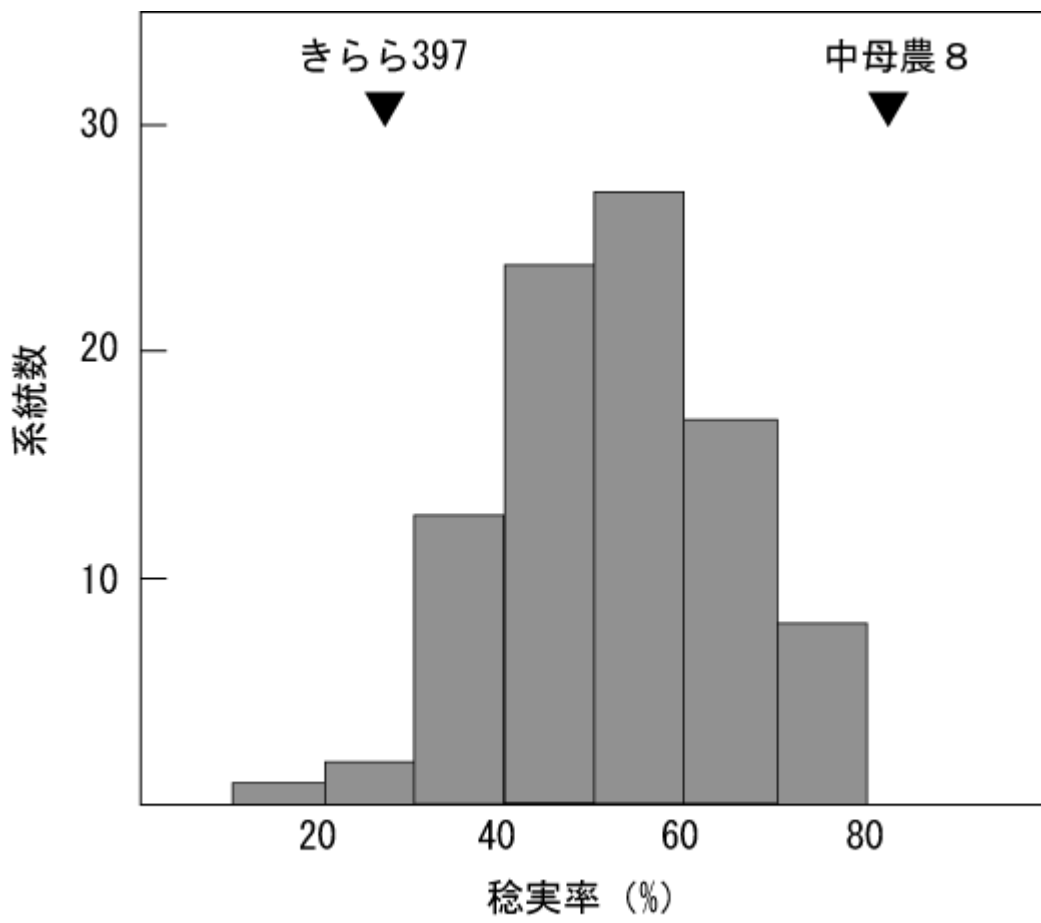
第3表 導入染色体領域のRFLPマーカー遺伝子型別に見た1993年における自然冷害条件下でのきらら397／中母農8／／きらら397のBC₁F₄個体の平均稔実率.

染色体	マーカー	平均稔実率 (%)		<i>t</i> 値	<i>P</i>
		きらら 397 型	中母農8型		
3	<i>XNpb100</i>	55.5 [16]	63.8 [17]	1.630	0.1133
	<i>XNpb345</i>	56.8 [17]	63.8 [17]	1.369	0.1805
4	<i>XNpb102</i>	54.8 [26]	66.1 [11]	2.269	0.0295
	<i>XNpb235</i>	56.5 [29]	66.8 [8]	1.775	0.0846
	<i>XNpb264</i>	56.5 [29]	66.8 [8]	1.775	0.0846
	<i>XNpb267</i>	56.5 [29]	66.8 [8]	1.775	0.0846
	<i>XNpb177</i>	56.5 [29]	66.8 [8]	1.775	0.0846
8	<i>XNpb278</i>	60.3 [21]	60.0 [17]	0.056	0.9559

[]: 個体数

きらら397型と中母農8型の差を*t*検定法により評価した.

1993年におけるきらら397の稔実率は51%, 中母農8の稔実率は出穂遅れにより調査不能だった(永野ら1994).



第3図 きらら397と中母農8のBC₁F₅系統群における精密検定圃場での稔実率の頻度分布

第4表 導入染色体領域のRFLPマーカー遺伝子型別に見た精密検定圃場でのきらら397／中母農8／／きらら397のBC₁F₅系統の平均稔実率.

染色体	マーカー	平均稔実率(%)		t値	P
		きらら397型	中母農8型		
3	<i>XNpb100</i>	49.7 [48]	56.8 [30]	2.407	0.0185
	<i>XNpb345</i>	49.8 [47]	56.8 [30]	2.339	0.0220
4	<i>XNpb102</i>	50.5 [53]	58.5 [20]	2.487	0.0152
	<i>XNpb235</i>	49.9 [67]	58.3 [16]	2.510	0.0141
	<i>XNpb264</i>	49.8 [66]	58.3 [16]	2.527	0.0135
	<i>XNpb267</i>	49.9 [67]	58.3 [16]	2.510	0.0141
	<i>XNpb177</i>	49.9 [67]	58.3 [16]	2.510	0.0141
8	<i>XNpb278</i>	53.0 [39]	52.8 [36]	0.077	0.9391

[]:系統数

きらら397型と中母農8型の差をt検定法により評価した.

きらら397の稔実率は26.8%, 中母農8の稔実率は82.4%だった.

第5表 導入染色体領域のマイクロサテライトマーカー遺伝子型別に見た精密検定圃場での北海241号／中母農8のF₉系統の平均稔実率.

染色体	マーカー	平均稔実率(%)		<i>t</i> 値	<i>P</i>
		北海 241 号型	中母農8型		
1	RM1	17.4 [35]	23.5 [30]	1.835	0.0712
	RM283	16.6 [36]	25.1 [28]	2.561	0.0129
3	RM569	20.3 [30]	20.1 [35]	0.052	0.9583
4	RM241	13.8 [34]	26.7 [30]	4.293	<0.0001
	RM317	10.4 [29]	28.1 [35]	6.690	<0.0001
	RM348	10.1 [25]	26.5 [39]	5.704	<0.0001

[]:系統数

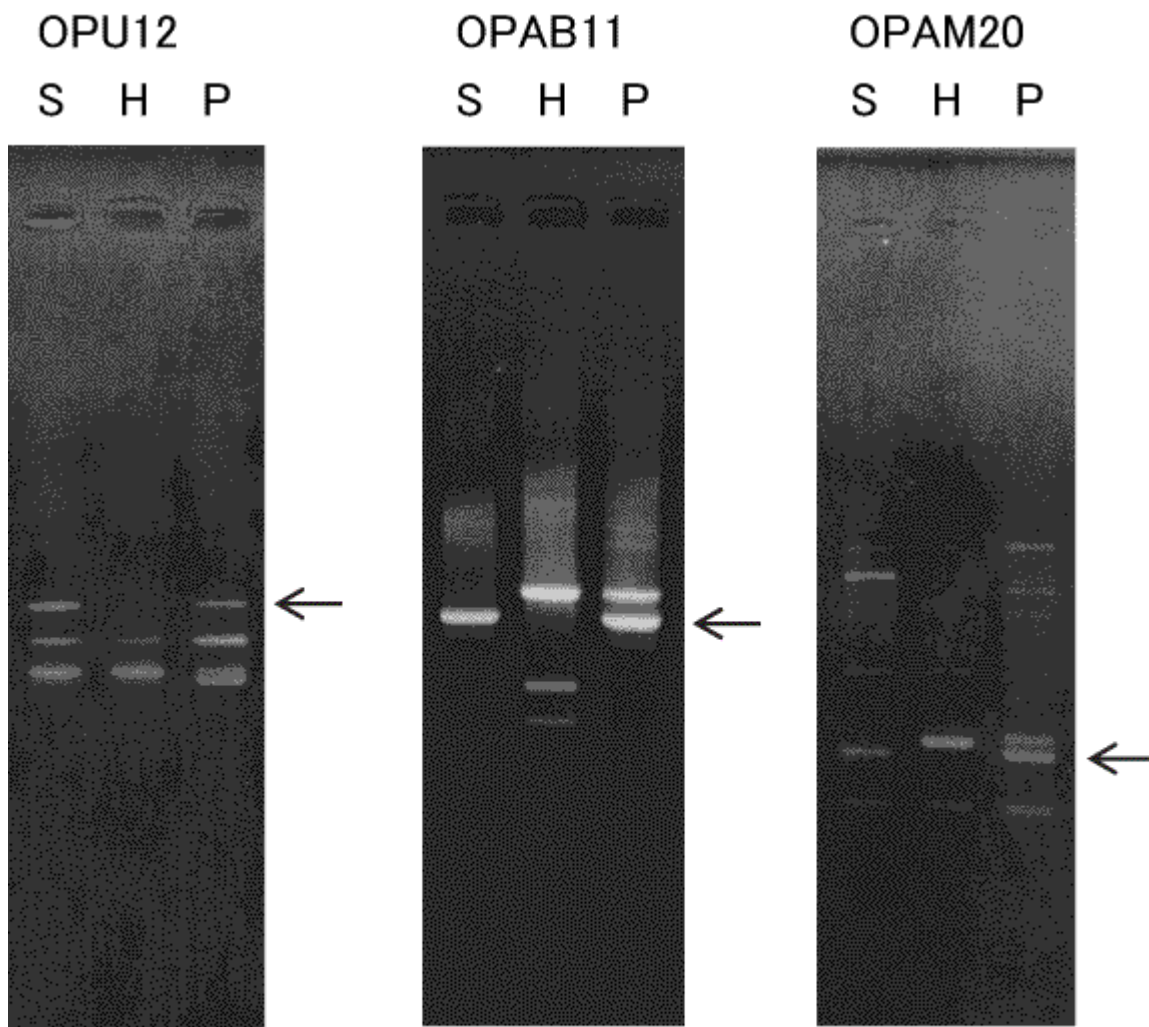
北海241号型と中母農8型の差を*t*検定法により評価した.

北海241号の稔実率は9.9%, 中母農8の稔実率は34.0%だった.

第6表 第1染色体のマーカーRM283と第4染色体のマーカーRM317の遺伝子型組合せ別に見た精密検定圃場での北海241号／中母農8のF₉系統の平均稔実率.

RM283 の遺伝子型	RM317 の遺伝子型	
	北海 241 号型	中母農 8 型
北海 241 号型	8.1%	24.1%
中母農 8 型	13.7%	33.6%

北海241号の稔実率は9.9%, 中母農8の稔実率は34.0%だった.



第5図 第4染色体長腕に座乗するRAPD

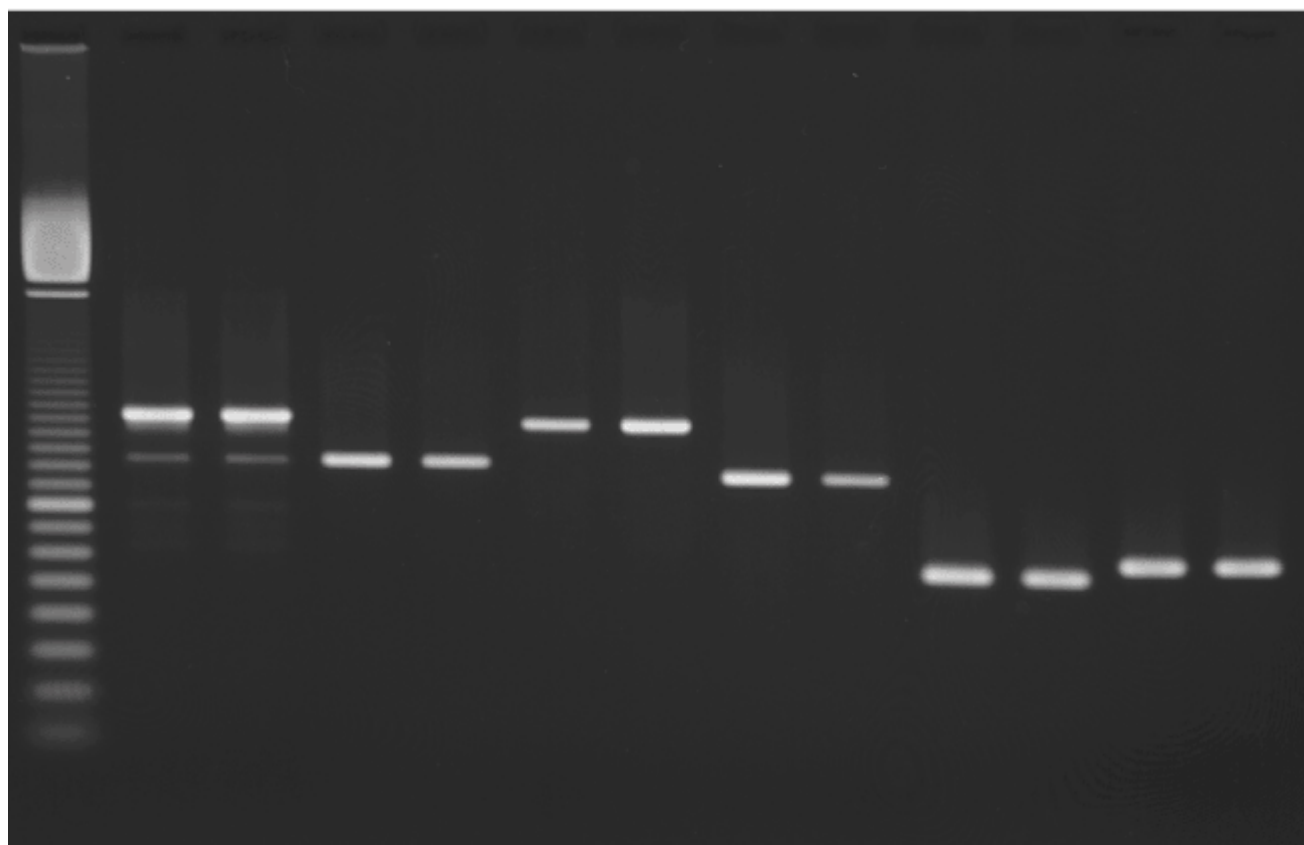
第4染色体のRAPDは3種のオリゴヌクレオチド(OPU12, OPAB11, OPAM20)により増幅された。SはSilewah, Hは北海241号, Pは中母農8を示す。Silewahと中母農8に特異的なDNA断片(矢印)をクローニングし, 末端の塩基配列を決定して, 特異的プライマーを合成した。

SCU12

SCAB11

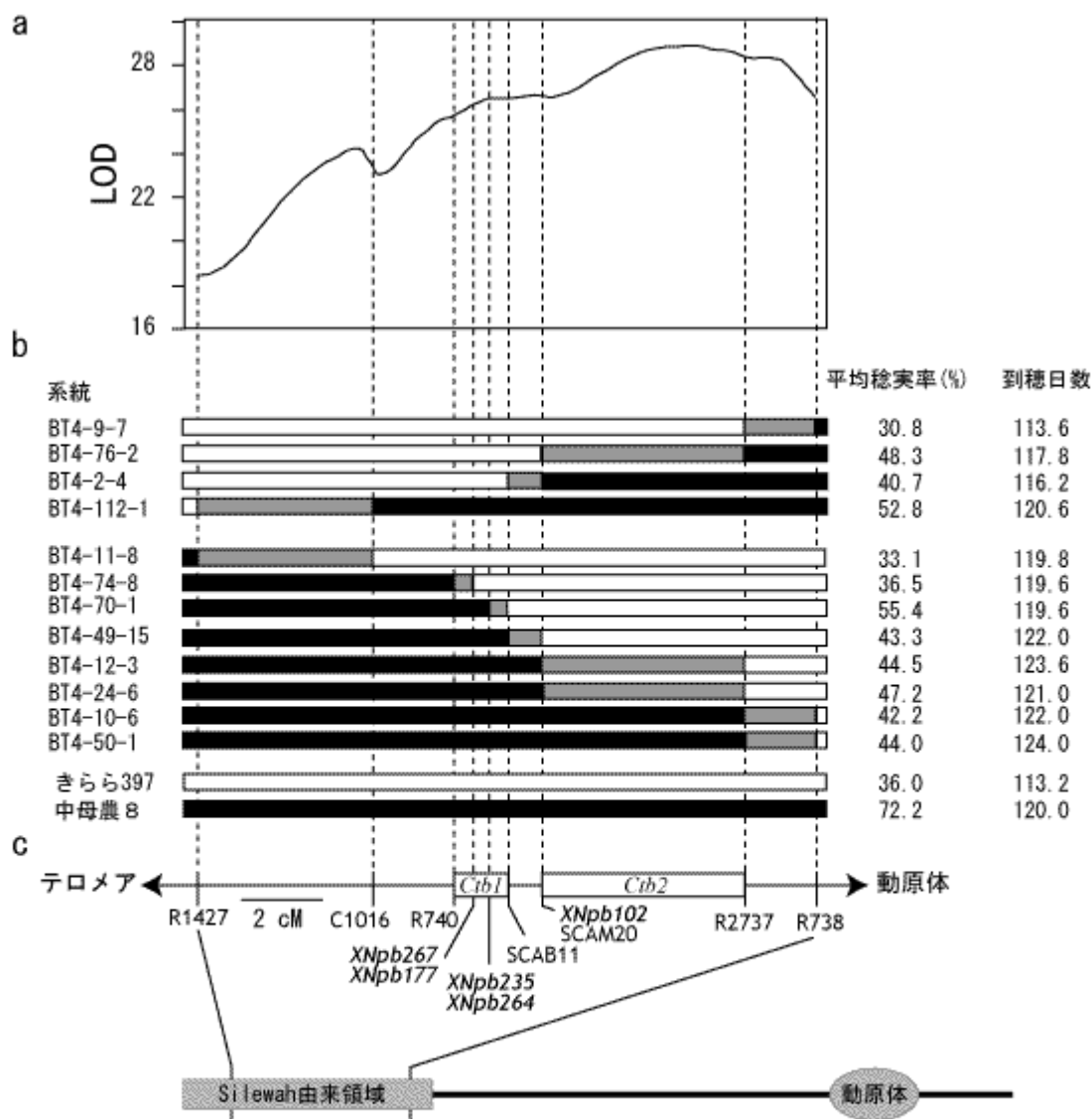
SCAM20

M S P H K S P H K S P H K



第6図 第4染色体のSCARマーカー

SCARマーカー(SCU12, SCAB11, SCAM20)によるSilewah(S), 中母農8(P), 北海241号(H)およびきらら397(K)の増幅DNA。Mは100 bpラダー。

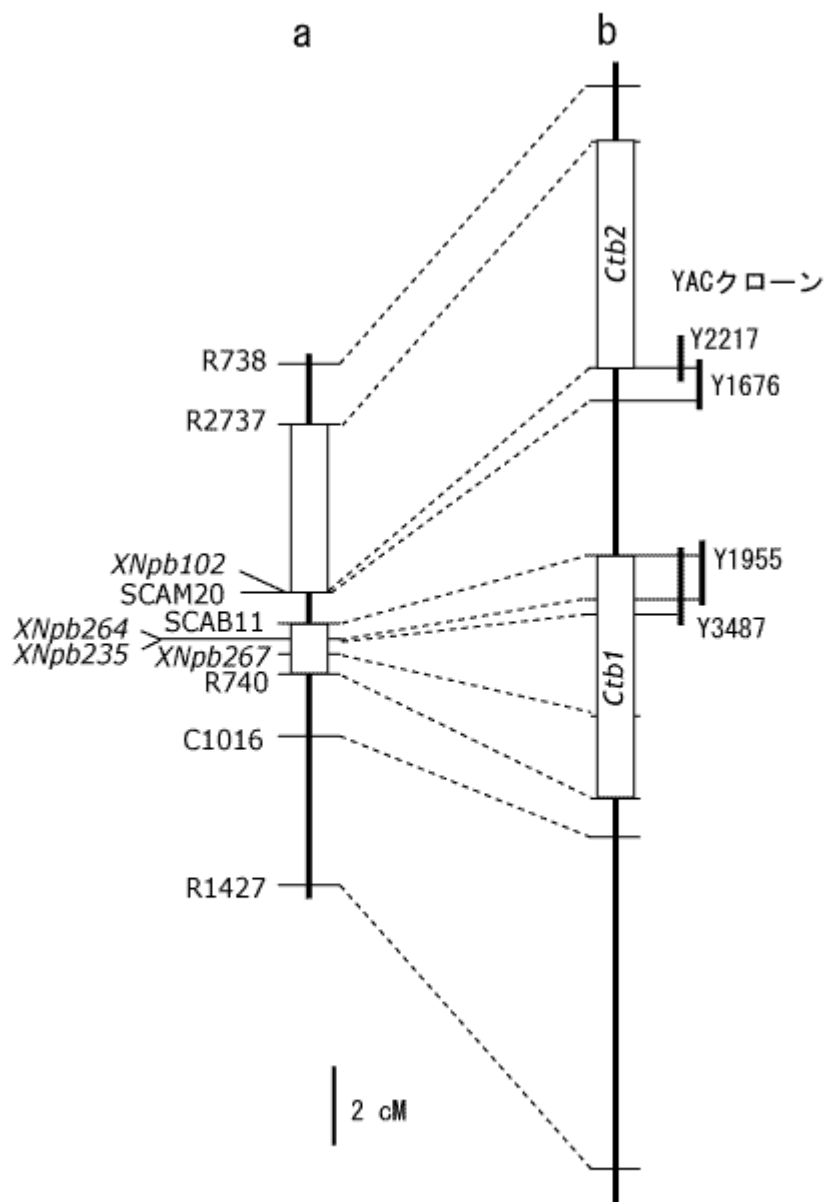


第7図 第4染色体のSilewah由来領域におけるLOD曲線(a)、組換え固定系統の遺伝子型と耐冷性(b)およびマーカーの遺伝地図(c)

組換え固定系統の遺伝子型は黒色部が中母農8型、白抜き部がきらら397型、灰色部が組換えが起こっている領域を示す。各系統の耐冷性を冷水深水処理後の稔実率で評価した。到穂日数の調査は野外で通常に栽培した材料について行った。

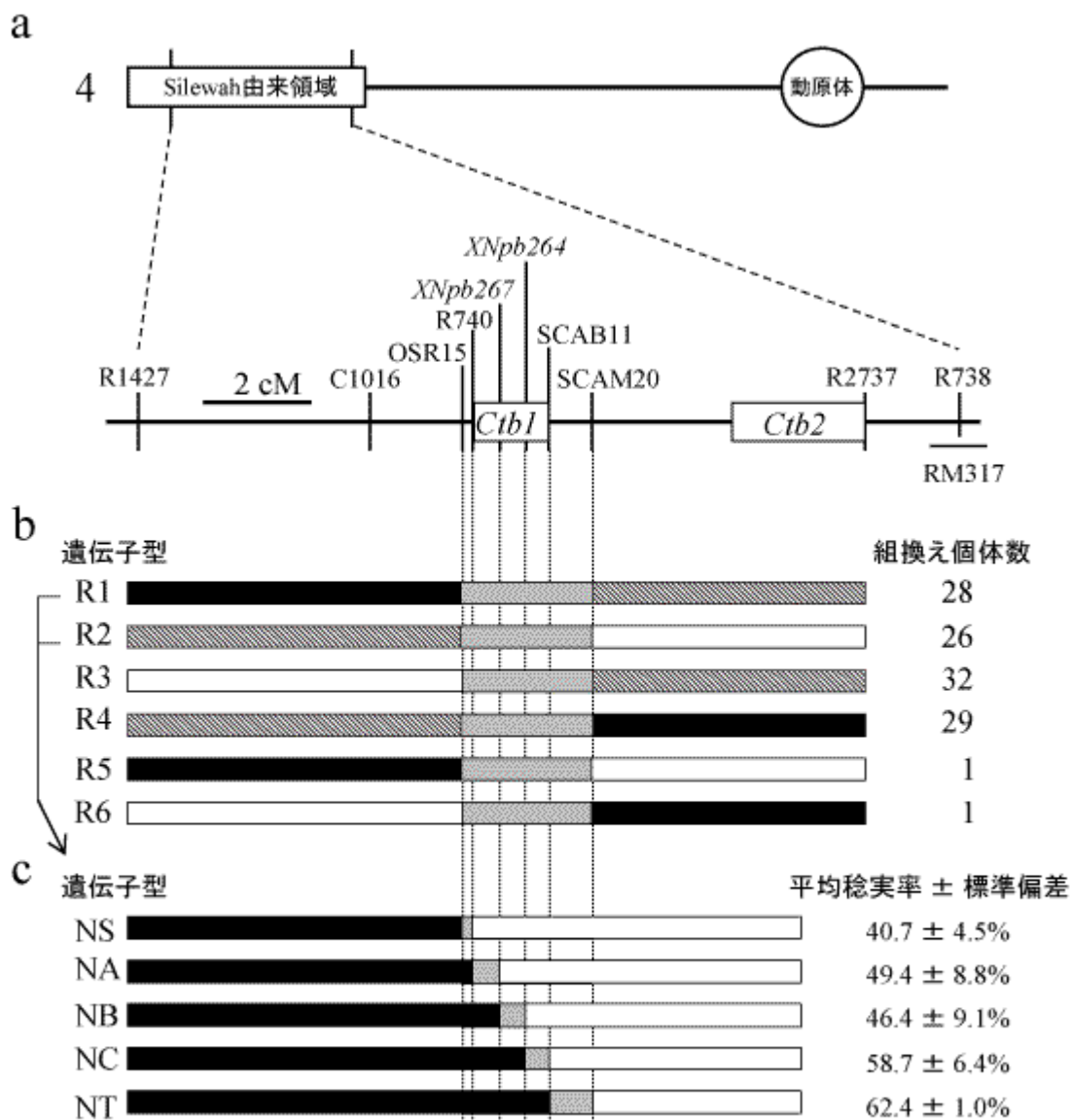
第7表 組み換え固定系統の冷水深水処理後の稔実率.

系統・ 品種名	稔実率(%) ± 標準偏差		
	精密検定圃場	人工気象室	平均
BT4-9-7	13.7 ± 3.8	47.8 ± 15.0	30.8
BT4-76-2	26.3 ± 7.1	70.3 ± 7.6	48.3
BT4-2-4	23.0 ± 10.6	58.4 ± 10.0	40.7
BT4-112-1	26.4 ± 13.2	79.1 ± 4.7	52.8
BT4-11-8	10.9 ± 6.0	55.3 ± 10.4	33.1
BT4-74-8	16.4 ± 6.6	56.7 ± 7.1	36.5
BT4-70-1	32.5 ± 4.9	78.3 ± 5.5	55.4
BT4-49-15	20.3 ± 5.3	66.3 ± 11.8	43.3
BT4-12-3	14.2 ± 9.0	74.7 ± 13.8	44.5
BT4-24-6	25.9 ± 4.1	68.6 ± 7.8	47.2
BT4-10-6	22.2 ± 9.0	62.2 ± 11.1	42.2
BT4-50-1	20.9 ± 6.8	67.0 ± 20.9	44.0
きらら397	12.8 ± 4.9	59.3 ± 7.7	36.0
中母農8	53.0 ± 9.6	91.3 ± 7.6	72.2



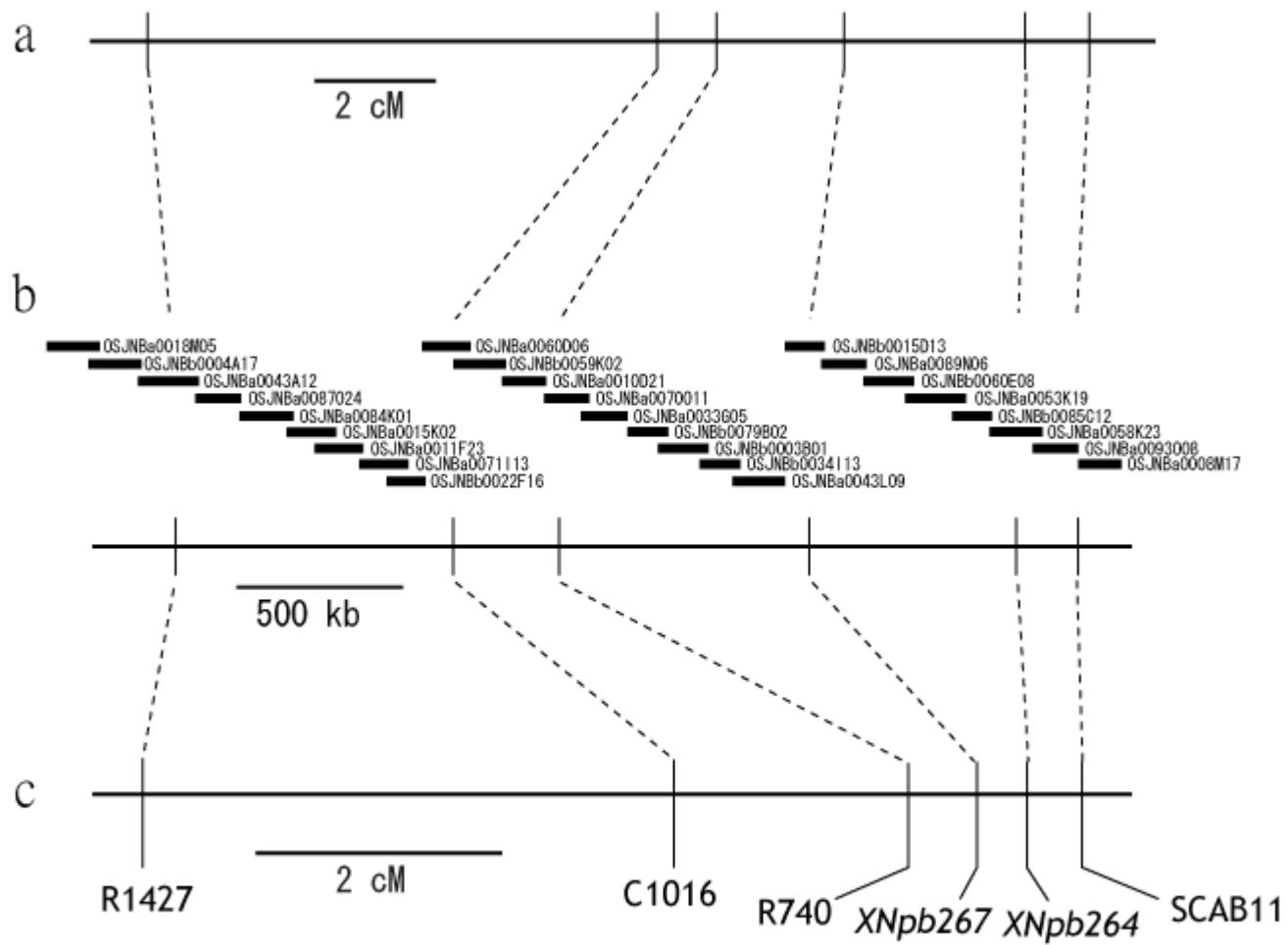
第8図 マーカー間の遺伝距離

aは本研究における遺伝距離を示し、bはRGPによるRFLP連鎖地図上での遺伝距離を示す。



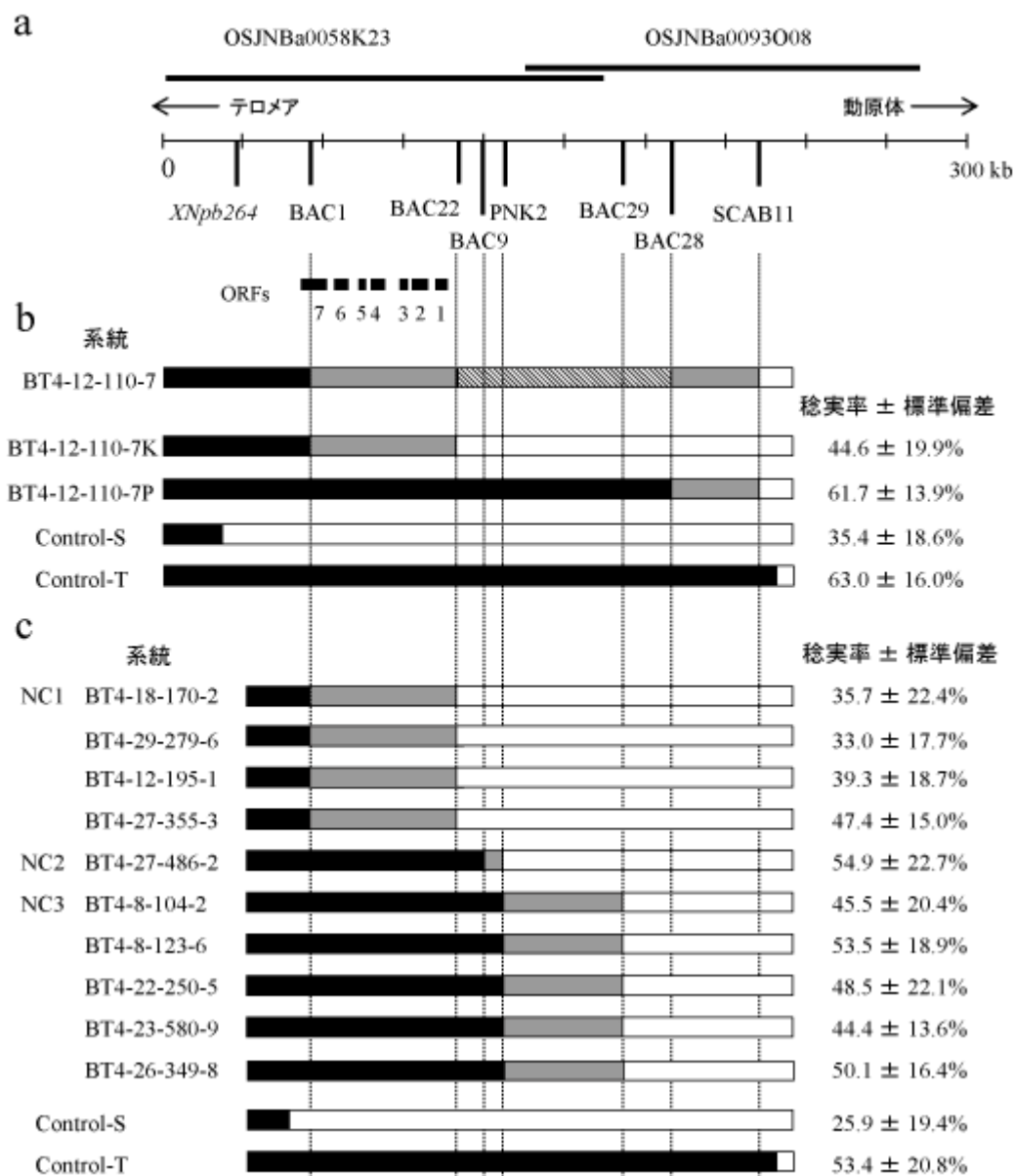
第9図 *Ctb1* 領域(a)における組換え個体の選抜(b)と組換え固定系統の遺伝子型(c)

黒色部は中母農8型、白抜き部はきらら397型、斜線部はヘテロ型、灰色部は組換えが起こっている領域を示す。NS (2系統)、NA(10系統)、NB(6系統)、NC(7系統)、NT(2系統)の耐冷性を冷水深水処理後の稔実率で評価した。



第10図 *Ctb1*座近傍における遺伝地図と物理地図の対応

aはRGPによる遺伝地図, bはBACコンティグによる物理地図, cは本研究における遺伝地図を示す。

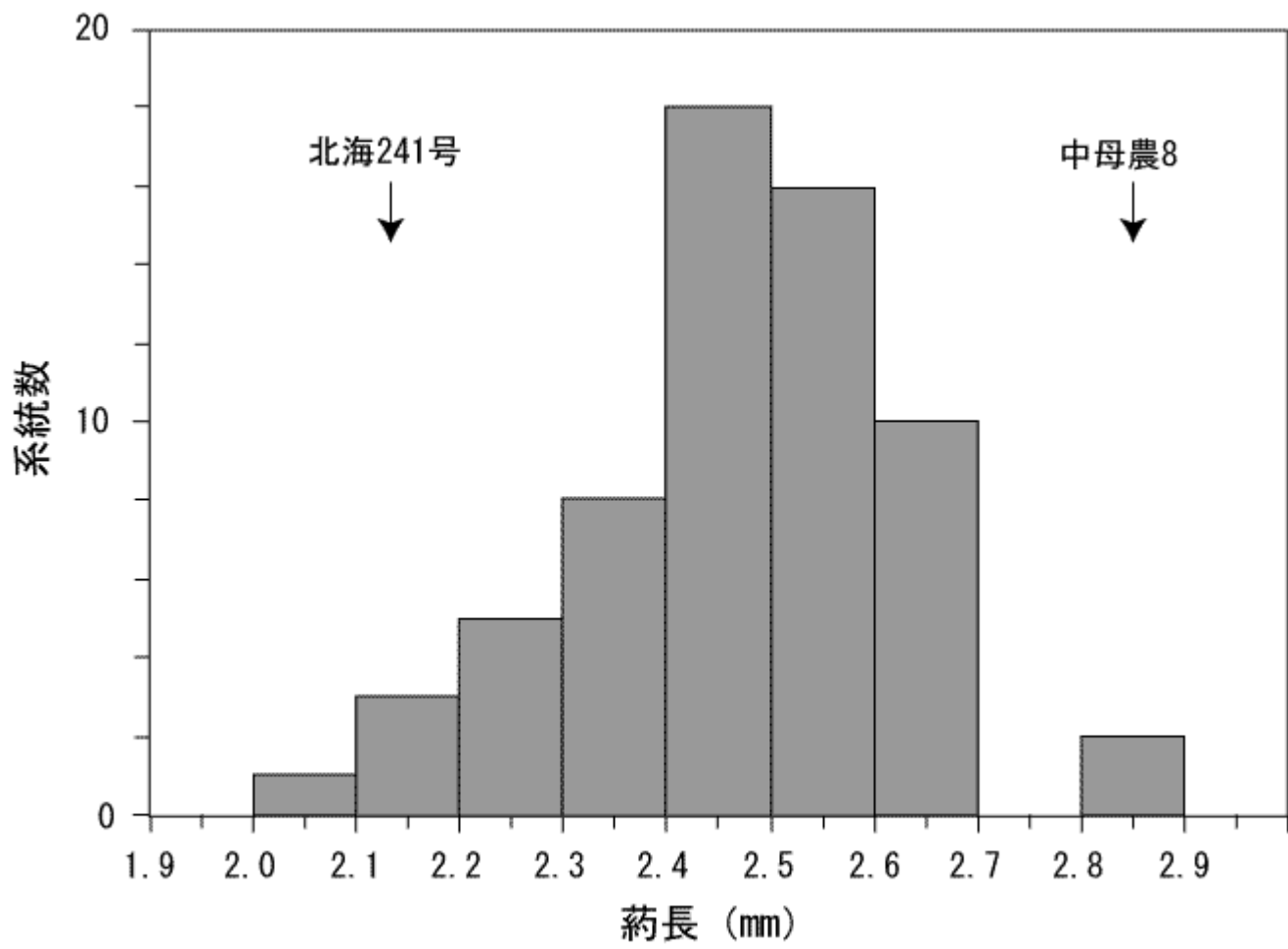


第11図 *Ctb1*領域のマーカー(a), 準同質遺伝子系統の遺伝子型(b)および組換え固定系統の遺伝子型(c)
 黒色部は中母農8型, 白抜き部はきさら397型, 斜線部はヘテロ型, 灰色部は組換えが起こっている領域を示す。

第9表 BAC1とSCAB11の間で組換えを起こしている組換え固定系統の耐冷性.

系統	遺伝子型	稔実率 (%) ± 標準偏差	Control-S との差	
			<i>t</i>	<i>P</i>
BT4-18-170-2	NC1	35.7 ± 22.4	1.479	0.1475
BT4-29-279-6	NC1	33.0 ± 17.7	1.211	0.2334
BT4-12-195-1	NC1	39.3 ± 18.7	2.227	0.0320
BT4-27-355-3	NC1	47.4 ± 15.0	3.919	0.0004
BT4-27-486-2	NC2	54.9 ± 22.7	4.342	0.0001
BT4-8-104-2	NC3	45.5 ± 20.4	3.114	0.0035
BT4-8-123-6	NC3	53.5 ± 18.9	4.554	<0.0001
BT4-22-250-5	NC3	48.5 ± 22.1	3.441	0.0014
BT4-23-580-9	NC3	44.4 ± 13.6	2.686	0.0120
BT4-26-349-8	NC3	50.1 ± 16.4	4.263	0.0001
Control-S		25.9 ± 19.4		
Control-T		53.4 ± 20.8		

Control-S は *Ctb1* を持たない対照系統, Control-T は *Ctb1* を持つ対照系統. 耐冷性は冷水深水処理後の稔実率で評価した. 各組換え固定系統と Control-S の稔実率の差を *t* 検定法で評価した.



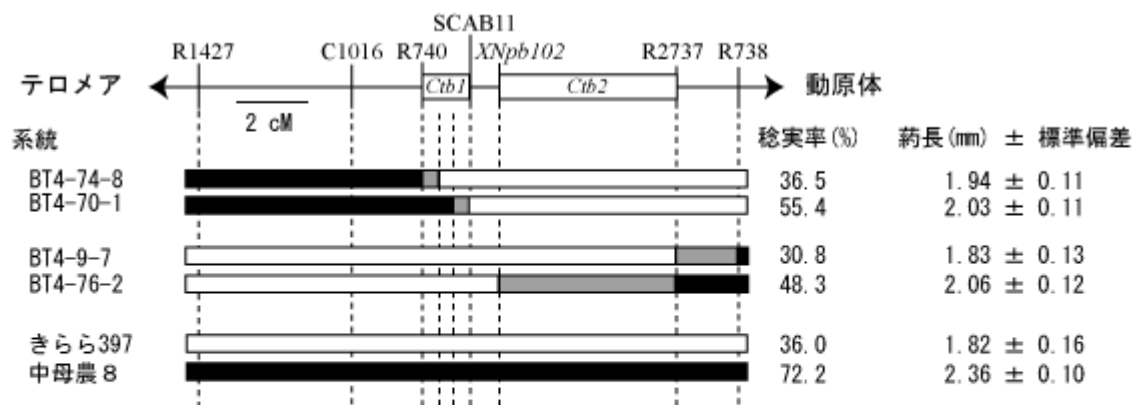
第12図 北海241号と中母農8のF₇系統における葯長の頻度分布

第10表 第3染色体および第4染色体のRFLPマーカー遺伝子型別に見た葎長.

染色体	RFLP マーカー	平均葎長 (mm)		<i>t</i> 値	<i>P</i>
		北海 241 号型	中母農8型		
3	<i>XNpb345</i>	2.42 [22]	2.51 [33]	2.048	0.0455
4	R2737	2.38 [26]	2.55 [27]	4.257	<0.0001

[]: 系統数

北海241号型と中母農8型の差を*t*検定法により評価した.



第13図 組換え固定系統の遺伝子型と葯長

黒色部は中母農8型、白抜き部はきらら397型、灰色部は組換えが起こっている領域を示す。各系統の耐冷性は冷水深水処理後の稔実率で評価した。BT4-74-8とBT4-9-7はマーカー遺伝子型から*Cib1*および*Cib2*を持たないと考えられる。BT4-70-1はマーカー遺伝子型と稔実率から*Cib1*を持つと考えられる。BT4-76-2はマーカー遺伝子型と稔実率から*Cib2*を持つと考えられる。葯長の測定は野外で通常に栽培した材料について行った。

第11表 *Ctbl*領域内の耐冷性候補遺伝子.

ORF	タンパク質	イネ EST	EST の由来	
			品種	組織
1	仮想タンパク質	AK063487*	日本晴	低温処理カルス
2	Kelchリポートを持つF-boxタンパク質	AK065137*	日本晴	茎葉
		AK061943*	日本晴	茎葉
		CB673687	日本晴	<i>M. grisea</i> 感染葉
		CB673686	日本晴	<i>M. grisea</i> 感染葉
3	Ser/Thr プロテインキナーゼ	AK099667*	日本晴	茎葉
		AK066337*	日本晴	茎葉
		CB648387	日本晴	<i>M. grisea</i> 感染葉
4	OTUドメインを持つ仮想タンパク質	AK066247*	日本晴	茎葉
		CB657467	日本晴	<i>M. grisea</i> 感染葉
		CB657468	日本晴	<i>M. grisea</i> 感染葉
		AU030332	日本晴	幼葉
		AU030331	日本晴	幼葉
5	リセプター様プロテインキナーゼ	AK065956*	日本晴	茎葉
		AK069252*	日本晴	穎花
		CB650844	日本晴	<i>M. grisea</i> 感染葉
6	WD40を持つF-boxタンパク質	CB622818	IR36	葉
		CB622819	IR36	葉
		CB669292	日本晴	<i>M. grisea</i> 感染葉
		BI305332	Nagina 22	乾燥処理根
		CB669293	日本晴	<i>M. grisea</i> 感染葉
7	BAGドメインを持つタンパク質	AU183232	日本晴	幼葉
		AU183229	日本晴	幼葉
		AU101420	日本晴	3 cm 以下の幼穂

* イネ完全長cDNA (Kikuchi *et al.* 2003).