

イネにおける染色体断片置換系統群(CSSL)および戻し交配後代を用いた
有用表現形質に関する量的形質遺伝子座(QTL)解析

神戸 崇

目次

略号	1
緒言	3
第1章 CSSLおよび後代集団を用いた生育および草型に関する QTL 解析	7
第1節 CSSLにおけるANOVAを用いた生育および草型形質に関する QTL 領域の特定 ..	11
第2節 目標とするCSSLに対するコシヒカリ戻し交配後代を用いた QTL 解析	31
考察	39
第2章 作物生理学的有用表現形質に関する QTL の探索	43
第1節 コシヒカリ/Kasalath 交配由来 CSSL における RuBisCO および NSC に関する QTL 解析	46
第2節 ササニシキ/ハバタキ交配由来 CSSL における RuBisCO および NSC に関する QTL 解析	57
考察	69
第3章 遺伝資源としてCSSLを用いたQTLの応用可能性	77
第1節 食味形質に関する QTL の応用可能性	79
第2節 バイオマス関連形質に関する QTL の応用可能性	83
考察	88
総合考察	91
摘要	96
謝辞	98
引用文献	100

略号

AB-QTL: Advanced backcross-quantitative trait locus

ANOVA: Analysis of variance

BIL: Backcross inbred line

CHL: Chlorophyll content

Chr: Chromosome

CL: Culm length

CSSL: Chromosome segment substitution line

DH: Doubled haploid

DNA: Deoxyribonucleic acid

DTH: Days to heading

DWFL: Dry weight of flag leaf

FLA: Flag leaf area

F₂: Second filial generation

GDD: Growing degree days

IL: Introgression line

MAS: Marker aided selection

NIL: Near isogenic line

PH: Plant height

PN: Panicle number per plant

QTL: Quantitative trait locus

RIL: Recombinant inbred line

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

RuBisCO: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase

SLW: Specific leaf weight

SNP: Single nucleotide polymorphisms

SPAD: Soil plant analysis development

SSR: Simple sequence repeat

SSSL: Single segment substitution line

TSR: Total solar radiation

緒言

作物は、人類との関わりの過程で多様な特性を備えた品種に分化し、1950年代からはじまった半矮性遺伝子を導入した耐肥性品種の育成および普及は、世界の作物生産量の飛躍的な増大をもたらした(中世古, 1999; 三本, 2008)。他方、出穂期や収量性といった農業上重要な形質の多くは、一般に多数の遺伝子が関与する量的形質遺伝子座(QTL)によって支配されている(矢野, 2001; 大杉, 2002)。近年、QTL解析手法の向上、マーカー利用選抜(MAS)技術の進展等により、種々の有用形質関連QTLが発見され、また、新たなQTL解析用集団が数多くの作物において育成されてきた(Paran and Zamir, 2003; Tanksley and Nelson, 1996; Tanksley et al., 1996; Tuberosa and Salvi, 2004; Wang, 2005; Yano, 2001b)。殊に、微小な染色体断片を部分的に置換したQTL解析集団の作出と、単純反復配列(SSR, マイクロサテライト)多型等を利用した共優性のDNAマーカーを用いた高精細な連鎖地図の作成は、エピスタシス等の複雑な遺伝子間交互作用の影響を低減させ、表現型および遺伝子型の変異に基づくQTL領域の特定を、多くの作物において簡便且つ容易為らしめている(Tanksley and Nelson, 1996; Ramsey et al., 1996; 鶴飼, 2000)。例えば、Tuinstra et al. (1997)は、ソルガムにおいて遺伝的背景の影響が少ない準同質遺伝子系統(NIL)を用い、子実重に関するQTLと連鎖する特定のマーカー遺伝子型が表現型と密接に関連することを示し、NILを使ったQTL解析の有効性を実証した。Fridman et al. (2002)やLiu et al. (2003)は、トマトにおいて対照品種と野生型遺伝子移入系統(ILs)を供試し、1本の染色体上における一部の領域における遺伝子型と表現型の変異に着目して、糖度計値やカロテン量に関するQTL推定存在領域を特定した。Bouchez et al. (2002)は、トウモロコシにおいて165の組み換え近交系(RIL)とともに、後代BC₃S₁を用いANOVAに基づいた推定を行い、絹糸抽出期および収穫期の子実水分量といった単純な形質に関するQTL領域について両集団の結果がよく一致することを認めた。Huang et al. (2003, 2004)は、コムギにおいて、BC₂F₂およびBC₂F₃集団を用いてANOVAに基づいた高次戻し交配QTL解析(AB-QTL解析)により、草丈、m²当たり穂数や収量に関するQTLを特定した。

Pillen et al. (2003) は、オオムギにおいて、45 の SSR マーカー遺伝子型に指標された 136 の BC_2F_2 集団を用い、収量など 86 の AB-QTL 領域を特定した。

一方、わが国を中心としたイネ研究において、NIL および、更に連続戻し交配によって遺伝的背景を揃えた染色体断片置換系統(CSSL)は、当初遺伝構成の単純さに着目され、他の分離集団と連鎖地図を用いた従来の QTL 解析の結果を補完ないし実証することに主に用いられてきた(Yamamoto et al., 1998, 2000; Lin et al. 2000; Miura et al., 2001; Ma et al., 2002; Takeuchi et al., 2007)。イネにおける従来の QTL 解析に抛らない、CSSL の表現型解析のみによる QTL 領域の特定は、Kubo et al. (2002) による、ほぼ全染色体に亘って染色体断片が置換された CSSL を用いた報告によって、先鞭が付けられた。また、中華人民共和国において、CSSL は殆ど同義的に単断片置換系統(SSSL)と称され数多く育成されており(劉等, 2003; 何等, 2005)、劉等(2004)は、親品種と SSSL との間の t 検定によって、17 の形質に関する 57 の QTLs を特定した。このように、イネにおいても分離集団でない CSSL がそれ単体で QTL マッピング集団として利用することが可能であること、およびその有効性が鑑みられるに至り(Yano 2001a, Paran and Zamir 2003)、独立行政法人農業生物資源研究所において、日本型品種コシヒカリの遺伝的背景に、インド型品種 Kasalath の染色体部分断片を置換した 39 の CSSL が作出された(矢野ら, 2001; Ebitani et al. 2005)。本系統群は、置換染色体断片を系統間で重複させることにより、39 系統で全ゲノム横断的な解析が可能である(矢野ら, 2001)。また、Kasalath 染色体断片は、殆ど 1 染色体の 1 箇所にもみ置換・移入されている。従って、コシヒカリと比較した CSSL の表現型の差異は、単純に Kasalath 染色体断片即ち QTL の作用によるものと見做すことが出来る。本系統群を供試して、Ebitani et al. (2005)は、CSSL とコシヒカリとの平均値の差の t 検定により、広範な染色体領域において出穂期に関する QTL の存在を推定し、また、Ishikawa et al. (2005)は、コシヒカリを対照とした Dunnett 検定および同一染色体上に Kasalath 染色体断片置換箇所が隣接するいくつかの CSSL の結果に鑑みて、玄米へのカドミウム蓄積に関する QTL 領域を特定した。

CSSL の検出力は F_2 やエピスタシスを維持した RIL といった従来の QTL マッピング集団より高いものの、

検出された QTL の精細さは置換された染色体断片の大きさや系統群の置換染色体断片の重複の様相に依存し、一般的に劣るとされる (Ebitani et al., 2005). このような比較的長大な QTL 領域については、例えば、イネにおける 2 組の往復置換 CSSL 系統群 (Kubo et al., 2002; 内村ら, 2003) や、トウモロコシにおける CSSL に戻し交配した後代集団 (Bouchez et al., 2002) などを用いてより精緻に解析する必要がある。Ebitani et al. (2005) は、CSSL の難点である QTL の長大さは、CSSL を親とした戻し交配後代を用いた QTL 解析によって克服されるべきであると推奨している。CSSL に戻し交配した後代集団を用いた QTL 解析は、CSSL における表現型解析の結果の検証が可能だけでなく、QTL 上の対立遺伝子の効果を推定することが可能になり、重要な意味を持つと考えられる。例えば育種上では、QTL の相加効果が主に着目され、固定不能な優性効果しか持たない QTL にはあまり利用価値を認めない。また、コシヒカリ/Kasalath 39CSSL において Kasalath 置換染色体部位が殆ど 1 染色体の 1 箇所のみ置換・移入されていることは、比較的簡単且つ速やかにマーカー連鎖地図の作成が可能である (Ebitani et al., 2005).

これまで数多くの QTL 解析に関する報告があるが、殆どは単年度のみの試験結果に基づいており、特定した QTL 領域についての追加的検証などを伴わないものが多い (呉・羅, 1996; Ishimaru et al., 2001a; Yamamoto et al., 2001; 汪等, 2003; Cui et al., 2004; Dong et al., 2005). 一部の例外を除き、ファインマップングや遺伝子単離に向けて複数の実験で一貫して検出される QTL の例はあまり多くない (Wissuwa et al., 1998; 2002; Wissuwa and Ae, 2001). 実際の育種に向けて信頼性の高い QTL を得るには、異なる環境下で全く同じ遺伝的材料を用いて広範に表現型を測定する必要がある (Paran and Zamir, 2003).

作物学的に重要な、光合成速度、RuBisCO 含量や NSC 含量といった生理形質は、多くは日変化を伴い、QTL 解析には大量な集団に対して同時に迅速な測定や採集を行う必要があり、解析が困難か、多大な労力と時間を要するものが多い。GRAMENE データベースでは、これまで行われた多くの QTL 情報が参照できるが、目下のところ収量および構成要素に関する QTL や、品質でも遺伝的安定性の高い外

観品質のような形質に関する QTL については数多く報告されているが、作物生理に関する QTL についての研究は少ない(Buckler et al., 2006; Jaiswal et al., 2006; Cold Spring Harbor Laboratory and Cornell University, 2007). CSSL は、BIL や NIL 等と比較して、比較的少ない系統数(本研究では 39)で遺伝解析が行える上、出穂期に変異を伴うため(矢野ら, 2001.; Ebitani et al., 2005), 出穂期に着目した形質に限れば同日に出穂期を迎え同時に測定および採集すべき系統数および個体数はより少なくなる。また、CSSL を用いて特定される QTL 領域は比較的大きくなるものの、CSSL に反復親を戻し交配して育成した後代分離集団を用いた QTL 解析を行えば、詳細な QTL 領域の特定が可能であり、その際に行うマーカー解析も、CSSL に移入された供与親由来の染色体領域についてのみ行えばよく、12 本の染色体全体に亘って行う必要はない。これらのことから、イネにおいて作物学的に重要な出穂期頃の草型や生理形質に関する QTL を、CSSL を用いれば比較的簡明に解析できることが期待される。

以上に鑑み、本研究は 3 章から構成され、CSSL を圃場において複数環境下で栽培し、その結果を基にして、戻し交配後代 F_2 集団を育成して詳細な QTL 解析を行い、QTL 上の対立遺伝子の表現型効果を推定し、信頼性の高い QTL を得ることを主な目的とした。端緒として、第 1 章ではコシヒカリ/Kasalath 交配由来 39CSSL を供試して収量やバイオマス生産に関する基本的な要素である、生育や草型に関する QTL について解析を行った。次に第 2 章では同系統群を用いて作物生理学的に重要な形質であるリブローズ-1,5-ニリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)および非構造的炭水化物(NSC)に関する QTL の特定を行った。さらに、ササニシキ/ハバタキ交配由来 39CSSL を供試し、多収品種/ハバタキに由来する有望 QTL の遺伝的効果の特定を行った。最後に、第 3 章ではコシヒカリ/Kasalath 交配由来 39CSSL を遺伝資源とした食味計値およびバイオマスに関する QTL の応用可能性について検討した。

第1章 CSSL および後代集団を用いた生育および草型に関する QTL 解析

近年多くの新しい QTL マッピング集団が開発され、多くの有用 QTL が特定されている (Tanksley and Nelson, 1996; Paran and Zamir, 2003). 特に CSSL を用いた QTL 解析では、日印交雑時に共同して不稔を起こす遺伝子群 (National Bioresource Project and National Institute of Genetics, 2000; Kubo and Yoshimura, 1999, 2005; Kurata and Yamazaki, 2006) の影響や、品質に大きな影響を及ぼす Wx 遺伝子座の影響などを容易に排して表現型を評価することが可能で、複雑な遺伝子間の交互作用を軽減させ、CSSL と反復親との間の表現型および遺伝子型の差異に基づいて、簡便且つ一般的に高いとされる検出力を以って QTL 領域を特定することが可能である (Tanksley and Nelson, 1996; Yamamoto et al., 2000; Kubo et al., 2002; Ebitani et al., 2005; Ishikawa et al., 2005). これまでのところ、CSSL は F_2 や RIL のような主なマッピング集団における一般的な QTL 解析の結果を補完することに用いられてきた (Yamamoto et al., 2000; Takeuchi et al., 2007) が、CSSL に反復親を戻し交配した後代検定においては、CSSL の難点である比較的長大な QTL 領域が狭められ、CSSL を用いた QTL 解析の結果を検証するだけでなく、QTL 上の相加効果、優性効果といった対立遺伝子効果や QTL の寄与率を推定することが可能になる (Fig. 1-1, イネゲノムリソースセンター, 2003a; Ebitani et al., 2005). また、CSSL の使用は、後代検定において特定の目標 QTL 領域のみを対象とする連鎖地図の迅速な構築に有利である (Ebitani et al., 2005).

作物において、最終生産物は全生育期間の光合成作用と呼吸作用の収支決算量として得られるものであるため、太陽光の利用効率を高め、作物収量の向上を図ることが品種改良の基本的な目標となる (窪田, 1999). イネの収量向上に向けた草型改良の方向性については、様々な議論がある. 短稈性や低い草丈は、倒伏耐性による収量の安定確保と密接に関連する重要な目標の1つである (Ashraf et al., 1994; 柏木ら, 2007). 他方、長稈性は倒伏易性と呼吸の増大では不利であるが、草冠における CO_2 の拡散や光利用効率の面では有利になる場合がある (林, 1972; Ashraf et al., 1994). また、生育に

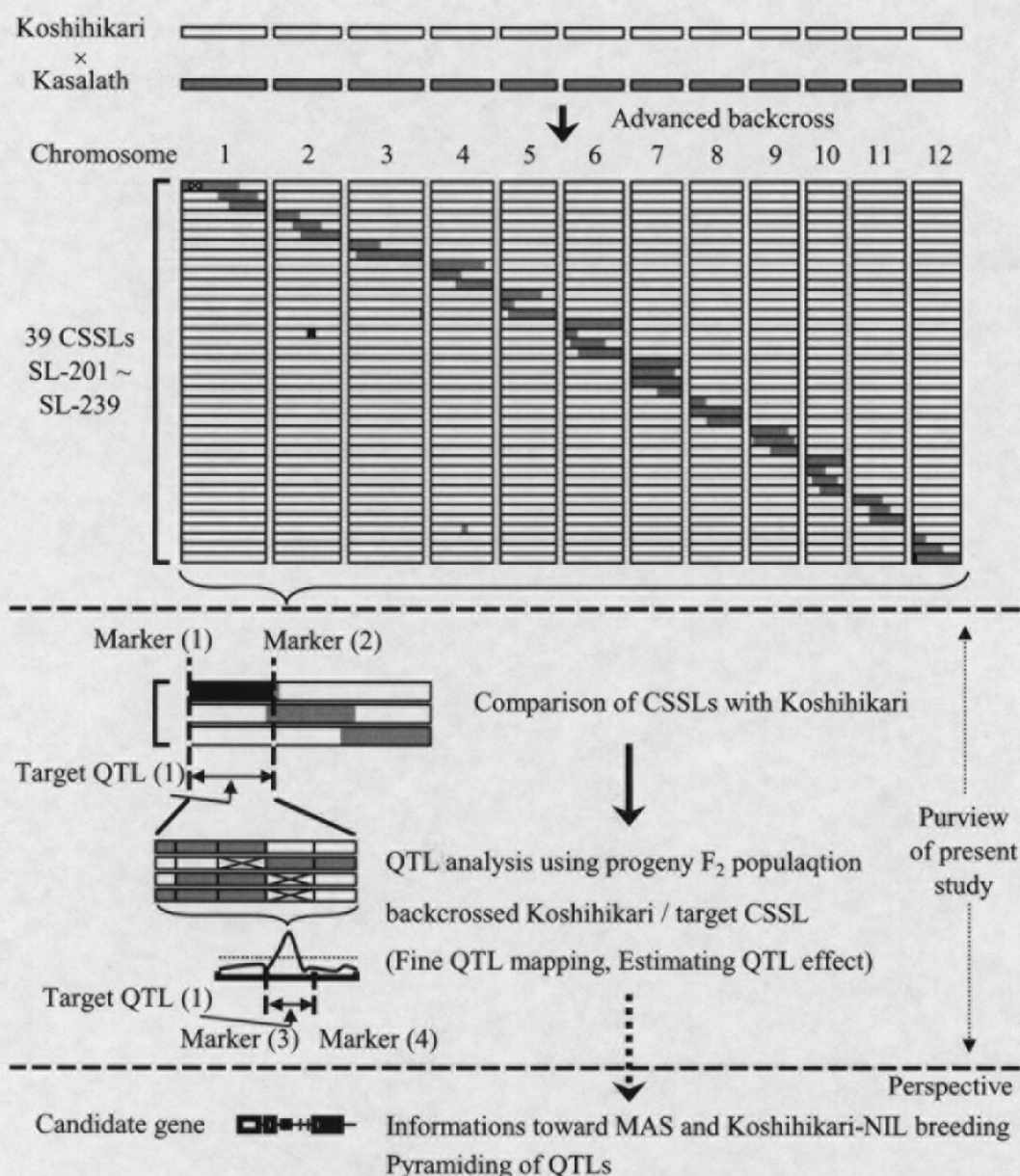


Fig. 1-1. Conceptual diagram of QTL analysis using CSSLs population and backcross progeny F_2 population derived from Koshihikari / target CSSL in the present study. Twelve chromosomes are layout horizontally and parents or each CSSLs are distributed vertically. White, gray and crossed region indicate Koshihikari homozygous, Kasalath homozygous and heterozygous in the graphical genotypes, respectively. Graphical genotype of 39 CSSLs population is cited from Rice Genome Resource Center (2003).

伴って群落の葉面積指数が高まるとともに草型も変化し、全生育期間を通して生産効率が高い受光態勢を維持することが望ましい(窪田, 1999). いくつかの理想的なイネ生産のための成長モデルにおいては、必要な穂数(茎数)の安定的な確保が、最も基本的な前提条件となる(稲葉, 1991; Matsushima, 1995). 出穂期以降の止葉葉面積の拡大は、登熟期間中の炭水化物供給源を改良し、収量向上に繋がる可能性がある(Kobayashi et al., 2003; Yue et al., 2006). 作物生産において、比葉重の低下即ち葉身の薄さの役割について、いくつかの議論がある。薄い葉身は、成熟したイネ株において透過光を増加させ、受光効率の向上に貢献する可能性がある(村田・長田, 1959). 窪田・植田(1977)は、光合成速度と比葉面積との相関関係を示し、薄い葉身が光合成速度の向上に寄与することを示唆した。Takano and Tsunoda (1971)は、イネ属において植物体が低い窒素供給下や弱光下で栽培される場合、厚く高い窒素含量を持つ葉身は、薄く大きな葉身と比較して必ずしも好適でないことを示唆した。イネ(特に日本型品種)では、強光下では葉が厚いほど純同化率が高いが、一方で光強度の減少に伴う純同化率の減少もまたより大きくなることが両者の相関を調べた結果から明らかにされている(林, 1972). これら稈長、穂数、葉身の形質のような草型に関する QTL および QTL 上の対立遺伝子効果は、作物学的には収量向上へ向けて様々に応用することが可能であると考えられる。

これまで多くの研究者が、稈長、草丈、穂数、クロロフィル含量、比葉重等の草型改良に向けた農学的形質に関する QTL について報告している(呉・羅, 1996; Ishimaru et al., 2001a; Yamamoto et al., 2001; 汪等, 2003; Cui et al, 2004; Dong et al., 2005). 例えば、Ishimaru et al. (2001a)は日本晴/Kasalath 交配由来 BILs を用いて幾つかの農学的形質に関するイネの遺伝機能地図を構築し、草丈に関する 9 箇所の QTL、株当たり穂数に関する 3 箇所の QTL、クロロフィル含量に関する 10 箇所の QTL、葉面積に関する 5 箇所の QTL および比葉重に関する 2 箇所の QTL を特定した。また、Yamamoto et al. (2001)はコシヒカリ/Kasalath 交配由来 BILs を用い、稈長に関する 6 箇所の QTL を第 1、第 3、第 6 および第 12 染色体上に特定した。これまでの大部分の QTL は、継続した研究を伴わない単環境下で検出されたものである(Yamamoto et al., 2000; Li et al., 2003a; Wan et al. 2005). ファインマッピングや遺

伝子単離など、より詳細な方向に向けて、一貫して報告される QTL の例は稀である (Wissuwa et al., 1998; 2002; Wissuwa and Ae, 2001)。育種に向けて信頼性の高い QTL を得るには、多くの表現型について同じ遺伝的資源を異なる環境下で広範に解析する必要がある (Paran and Zamir, 2003)。

本章では、イネにおいて基本的な生育および草型形質がバイオマス、或いは収量に寄与する重要な要素であることに着目し、CSSLを用いてイネにおける草型形質改良に資する再現性の高い有用 QTL の特定を試みた。この目的を達するため、コシヒカリ/Kasalath 交配に由来する CSSL を用いて多年度試験を行い、更に特定した QTL の精査および QTL 上の対立遺伝子効果の推定を行うため、QTL を保持していた目的 CSSL にコシヒカリを戻し交配して作出した後代 F_2 集団を用いて QTL 解析を行った (Fig.1-1)。

第1節 CSSLにおけるANOVAを用いた生育および草型形質に関するQTL領域の特定

本節では、CSSLにおける生育および草型に関するQTLについて解析した。3年間圃場においてCSSLを栽培し、生育期間の気象パラメータ、草丈の推移、分げつ数の推移、出穂期における稈長、穂数、止葉葉身のクロロフィル含量および比葉重を調査した。

材料および方法

気象パラメータ

平均気温(°C)および全天日射量(MJ m⁻²)は、東京大学大学院農学生命科学研究科附属農場(西東京市、北緯35° 44′, 東経139° 32′, 海拔58m)において自動測定された。平年値(気温は練馬観測所における1979～2000年までの平均、全天日射量は大手町観測所における1972～2000年までの平均)は気象庁ホームページデータ(気象庁, 2002)から引用した。各CSSLおよびコシヒカリの移植日から出穂日まで、10°Cを基準とした積算成長度日(GDD, または有効積算温度, $\sum T_{10}$, ((最高気温 - 最低気温) / 2) - 基準温度 10°C の積算)および総全天日射量(TSR)を算出した

CSSLにおける表現型解析

コシヒカリ/Kasalath交配由来39CSSL(SL-201～SL-239, Fig. 1-1)は、2001年に農業生物資源研究所イネゲノムリソースセンターにおいて130のRFLPマーカーを用いて作出された(イネゲノムリソースセンター, 2003a; Ebitani et al., 2005)。2002～2004年に東京大学大学院農学生命科学研究科附属農場水田において、CSSLおよび親品種であるコシヒカリを慣行栽培した(但し、SL-209およびSL-238は2003年より配布され、2002年においては使用できなかった)。温室内において、2002年4月19日、2003年4月25日、2004年4月27日に播種した。4葉齢苗を1株1個体、30×30cm(11.1株 m⁻²)間隔で、2002年5月21日、

2003年5月27日, 2004年5月25日に本田移植した. 基肥として複合燐加安(N: P_2O_5 : K_2O = 12: 16: 18%) 50 g m^{-2} を代かき前に施用した. 39CSSLおよび両親品種を 65.8 m^2 に1条ずつ, 2反復栽培した.

移植時に苗丈を測定した後, 多くのCSSLで概ね分けつ盛期および最高分けつ期に相当する時期に2回(2002年6月20日および7月23日, 2003年6月26日および7月17日, 2004年6月27日および7月17日)草丈および茎数を調査した. 各CSSLおよびコシヒカリの出穂期(株の全茎数の50%出穂を以って出穂期とした)において, 草丈, 稈長, 株当たり穂数, SPAD値(葉緑素計SPAD-502, ミノルタ, 東京), 葉位および葉身形質を測定した($n = 5$). クロロフィル含量は, 3年間で無作為に採集した188の葉身試料におけるSmith-Benitez法(1955)によるクロロフィル含量とSPAD値との間の回帰式によって算出した(クロロフィル含量(g m^{-2}) = $0.011107 \times \text{SPAD値}$, $R^2 = 0.989$, $P < 0.001$). 止葉葉身において, 中肋を避け, リーフパンチ($\phi = 6\text{ mm}$)を用いて6枚のリーフディスク($n = 3$)を採集し, 80°C で3日間乾燥後比葉重を測定した.

CSSLを用いた草丈及び茎数の増加パターンに関するQTLの特定

移植から出穂期までの4時期, 3年間の草丈, 茎数の推移について, 10°C を基準とした各生育時期のGDDを共変量とした一般線形モデル(SPSS 15.0J, SPSS Japan, 東京)において, コシヒカリと回帰直線の平行性検定を行い, 平行性を示さなかったCSSL, および平行性を示し且つ共分散分析の結果有意な遺伝子型の効果を示したCSSLに移入された染色体断片をもとに生育に関するQTL領域を特定した.

CSSLを用いた草型形質に関するQTLの特定

出穂期における草型形質について, 一元配置分散分析-多重比較検定(コシヒカリを対照としたDunnett検定)により, コシヒカリと各CSSLとの間の平均の差を検定した. コシヒカリとの間で5%水準以上の有意差を示したCSSLにおいて, 移入された染色体断片をQTL領域とした. 同時に, 隣接した移入染色体断片を持つCSSLが異なる傾向を示した場合, QTL領域をより狭く特定した. 草型形質QTLの検出に関係したCSSLについて, DTH, GDD, TSRによる影響を調べるため, 相関分析を行った.

結果

気象パラメータ

気象データは3年間で著しい相違を示していた(Fig. 1-2). 2003年の7月から8月までの平均気温および総全天日射量は、2002および2004年の値より低かった。また、平年値と比較しても著しく低く、2003年が日射量不足を伴う典型的な冷夏であったことを示していた。

出穂日の変異

Table 1-1 に各 CSSL およびコシヒカリにおける年次ごとの移植から出穂までの日数および当日までの GDD($^{\circ}\text{C day}^{-1}$)をそれぞれ示した。2003 年は、冷夏の影響で出穂までの日数はすべての CSSL において長くなっていた。SL-208は最も出穂までの日数がかかり、コシヒカリと比較して出穂日は23~31日も遅かった。

出穂期までの草丈の増加パターンにおけるコシヒカリおよび CSSL 間の差異および QTL 領域

3年間の4つの生育時期を込みにして、各生育時期の GDD を共変量とした草丈(cm)について CSSL とコシヒカリとの間で一般線形モデルを利用して回帰直線の平行性を検定した。F 値が低ければ、CSSL の草丈がコシヒカリと平行に推移したことを示し、F 値が高ければ、コシヒカリと比較して草丈の成長パターンが異なることを示す。また、コシヒカリと平行性を示した CSSL のうち、共分散分析において遺伝子型の主効果が有意なものについても評価した。第1染色体に Kasalath 染色体断片が移入された3つの CSSL とともにコシヒカリとの間で草丈と GDD の回帰に関する有意な平行性の相違が認められた(Fig. 1-3)。これら3つの CSSL が保持する Kasalath 染色体断片の部分に、草丈の増加パターンに関する QTL 領域の存在がそれぞれ示唆された。同様の推定により、第9染色体を除くすべての染色体上に草丈増加パターンに関連する QTL を特定した。

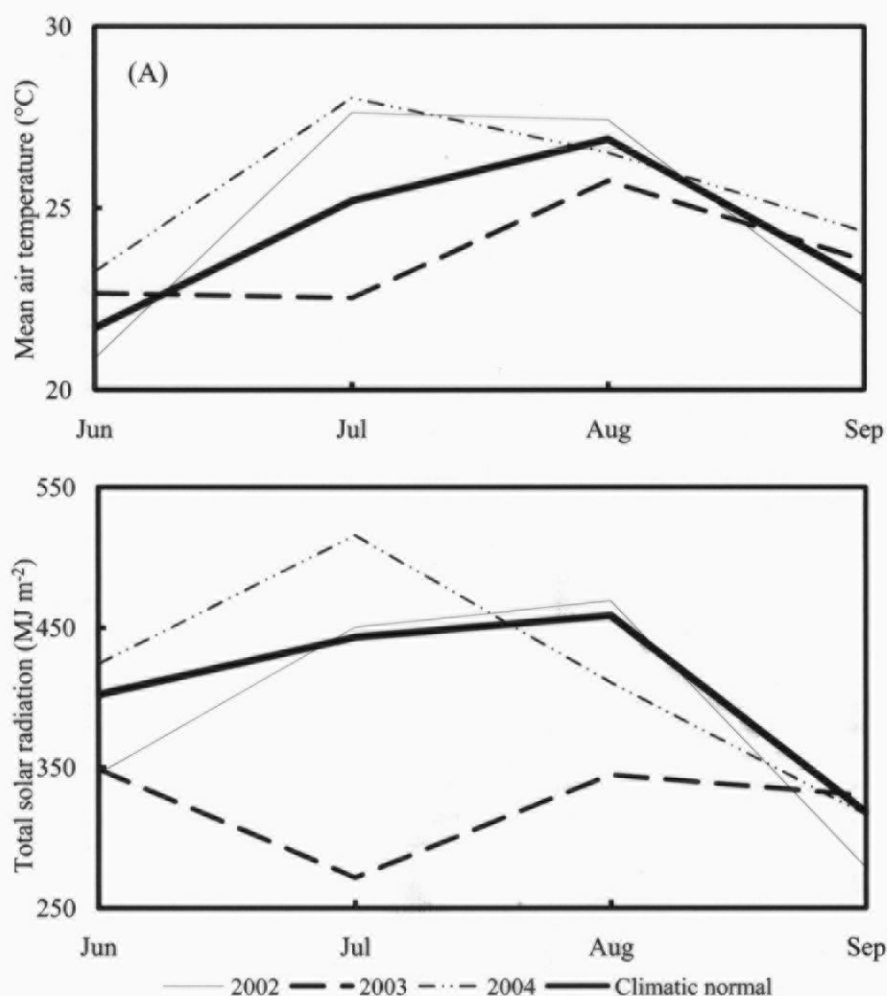


Fig. 1-2. Changes of meteorological parameters (mean air temperature (A) and total solar radiation (B)) during cultivation period at UT Farm (Nishitokyo) in 3 years with climatic normal. Thin right, heavy broken, thin chain double-dashed and heavy right line indicate meteorological parameters in 2002, 2003, 2004 and climatic normal, respectively. Climatic normal values were cited from the data of Japan Meteorological Agency database at Nerima (mean air temperature) and Tokyo (Otemachi) (total solar radiation) observation site.

Table 1-1. Days from transplanting to heading and growing degree days from transplanting to heading (GDD, °C day⁻¹) in each CSSLs and Koshihikari in three years. Bars indicate lack data.

Chr.	Trait	Days from transplanting to heading			GDD (°C day ⁻¹) from transplanting to heading		
		2002	2003	2004	2002	2003	2004
1	SL-201	77	83	73	1120.4	1121.4	1186.2
	SL-202	77	83	73	1120.4	1121.4	1186.2
	SL-203	79	85	75	1161.9	1147.7	1223.9
2	SL-204	80	86	78	1182.2	1165.2	1281.4
	SL-205	77	83	73	1120.4	1121.4	1186.2
	SL-206	82	87	77	1224.2	1183.9	1262.5
3	SL-207	91	94	87	1378.2	1312.8	1442.6
	SL-208	111	109	107	1706.3	1563.3	1747.9
4	SL-209	-	84	74	-	1133.6	1205.0
	SL-210	81	87	78	1203.3	1183.9	1281.4
	SL-211	82	84	74	1224.2	1133.6	1205.0
5	SL-212	78	83	73	1140.8	1121.4	1186.2
	SL-213	78	85	75	1140.8	1147.7	1223.9
	SL-214	78	85	75	1140.8	1147.7	1223.9
6	SL-215	72	74	68	1024.6	999.0	1092.3
	SL-216	77	85	75	1120.4	1147.7	1223.9
	SL-217	72	75	68	1024.6	1018.5	1092.3
	SL-218	72	77	68	1024.6	1054.2	1092.3
7	SL-219	91	93	87	1378.2	1294.2	1442.6
	SL-220	86	93	82	1300.3	1294.2	1353.3
	SL-221	91	93	87	1378.2	1294.2	1442.6
	SL-222	80	85	78	1182.2	1147.7	1281.4
	SL-223	91	95	87	1378.2	1327.5	1442.6
8	SL-224	89	94	85	1347.0	1312.8	1402.6
	SL-225	77	83	73	1120.4	1121.4	1186.2
9	SL-226	79	86	76	1161.9	1165.2	1243.0
	SL-227	80	87	78	1182.2	1183.9	1281.4
	SL-228	79	86	77	1161.9	1165.2	1262.5
10	SL-229	81	88	78	1203.3	1204.0	1281.4
	SL-230	82	88	79	1224.2	1204.0	1299.9
	SL-231	82	88	79	1224.2	1204.0	1299.9
	SL-232	81	87	77	1203.3	1183.9	1262.5
11	SL-233	78	84	74	1140.8	1133.6	1205.0
	SL-234	79	86	76	1161.9	1165.2	1243.0
	SL-235	77	83	73	1120.4	1121.4	1186.2
12	SL-236	81	89	79	1203.3	1224.9	1299.9
	SL-237	80	87	77	1182.2	1183.9	1262.5
	SL-238	-	86	76	-	1165.2	1243.0
	SL-239	86	89	79	1300.3	1224.9	1299.9
Koshihikari		80	86	76	1182.2	1165.2	1243.0

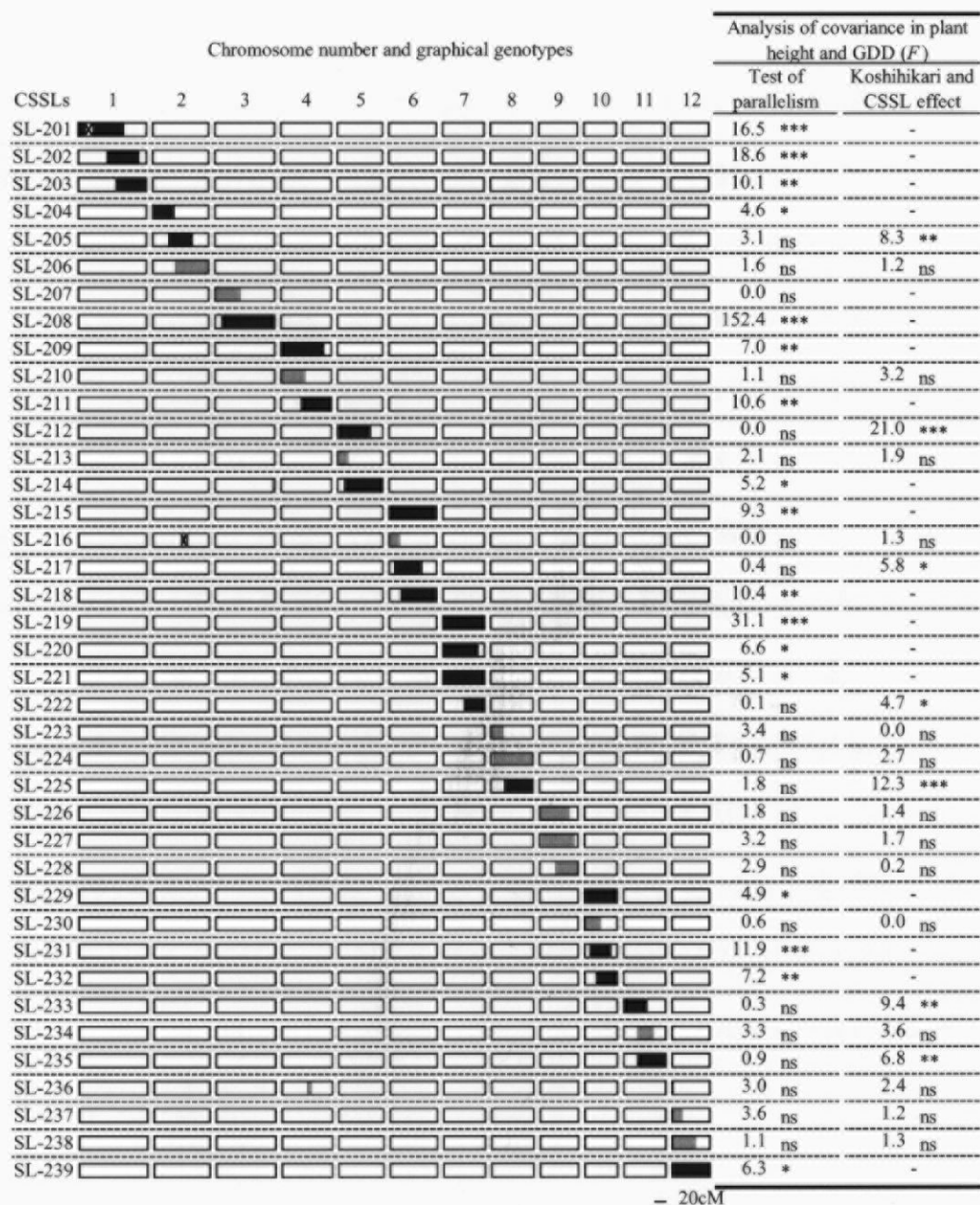


Fig. 1-3. Graphical genotypes, test of parallelism and analysis of covariance in plant height and GDD (F) on plant height in 39 Koshihikari / Kasalath CSSLs. Twelve chromosomes are layout horizontally and each CSSLs are distributed vertically. White, gray and crossed region indicate Koshihikari homozygous, Kasalath homozygous and heterozygous in the graphical genotypes, respectively. Black regions indicate putative QTL regions for growth pattern of plant height.

それぞれの増加パターンについて詳細にみても、第 1 染色体に関して、SL-201, SL-202 および SL-203 では、コシヒカリと比較して草丈は高く推移していた (Fig. 1-4)。第 2 染色体に関して、SL-204 では草丈の回帰直線はコシヒカリと平行性を示さず出穂期頃はコシヒカリより低かった。SL-205 では、コシヒカリよりやや草丈が高く推移した。第 3 染色体に関して、コシヒカリと SL-208 の間で出穂期頃の草丈自体はほぼ同様に見られるが、平行性検定の F 値は CSSL の中で最も大きかった。このことはコシヒカリと比較して到穂日数が長いことが大きく影響していると考えられた。第 4 染色体に関して、SL-209 および SL-211 では、分けつ盛期以降の草丈はコシヒカリと比較して低く推移した。第 5 染色体に関して、SL-212 ではコシヒカリと比較して回帰直線は平行に僅かに高く推移したが、SL-214 では分けつ期以降低く推移した。第 6 染色体に関して、SL-215 および SL-218 では草丈はコシヒカリより高く推移していた。SL-217 では、最高分けつ期頃までは草丈はコシヒカリよりもやや高く推移していたが、それ以降出穂期において草丈はコシヒカリよりも低くなっていた。SL-217 の到穂日数は厳然と 3 年間ともに、8~11 日コシヒカリより早かった。第 7 染色体に関して、SL-219, SL-220, SL-221 の 3 つの CSSL ともに、分けつ盛期から最高分けつ期にかけて生育中期の草丈がコシヒカリよりも低く推移する傾向が認められた。SL-222 ではコシヒカリとの平行性が認められ、草丈は微増していた。第 8 染色体に関して、SL-225 において生育期間を通じて草丈がややコシヒカリよりも高くなる傾向が示された。第 10 染色体に関して、SL-229, SL-231 および SL-232 において、最高分けつ期以降の草丈はコシヒカリより低く推移した。第 12 染色体に関して、SL-239 では、分けつ盛期頃から最高分けつ期頃までコシヒカリより草丈は低く推移し、出穂期頃コシヒカリより高くなっていた。

出穂期までの茎数の増加パターンにおけるコシヒカリおよび CSSL 間の差異および QTL 領域

茎数の増加パターンについても、草丈と同様に推定した。茎数の増加パターンについては、第 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10 染色体に Kasalath 染色体断片が移入された 11 の CSSL において、コシヒカリとの間で有意な変異が認められた (Fig. 1-5)。

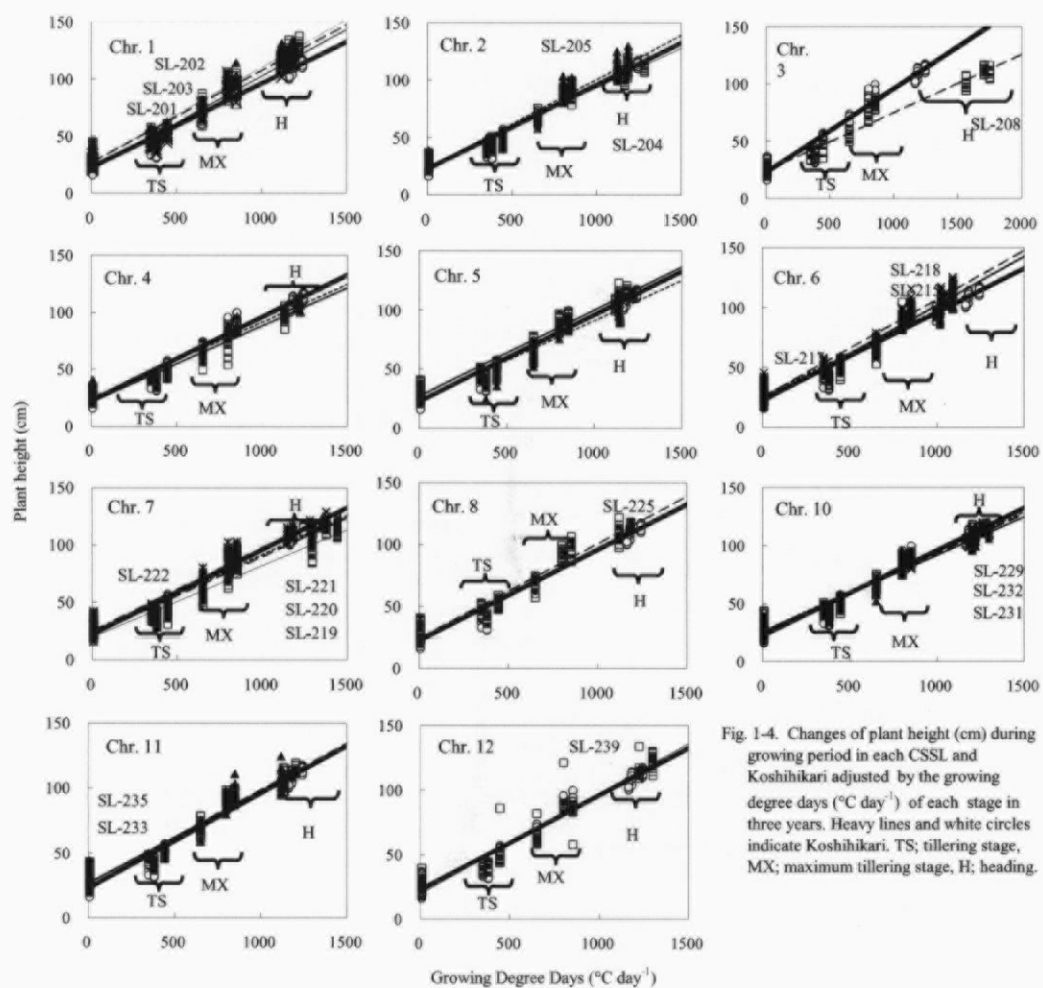


Fig. 1-4. Changes of plant height (cm) during growing period in each CSSL and Koshihikari adjusted by the growing degree days ($^{\circ}\text{C day}^{-1}$) of each stage in three years. Heavy lines and white circles indicate Koshihikari. TS; tillering stage, MX; maximum tillering stage, H; heading.

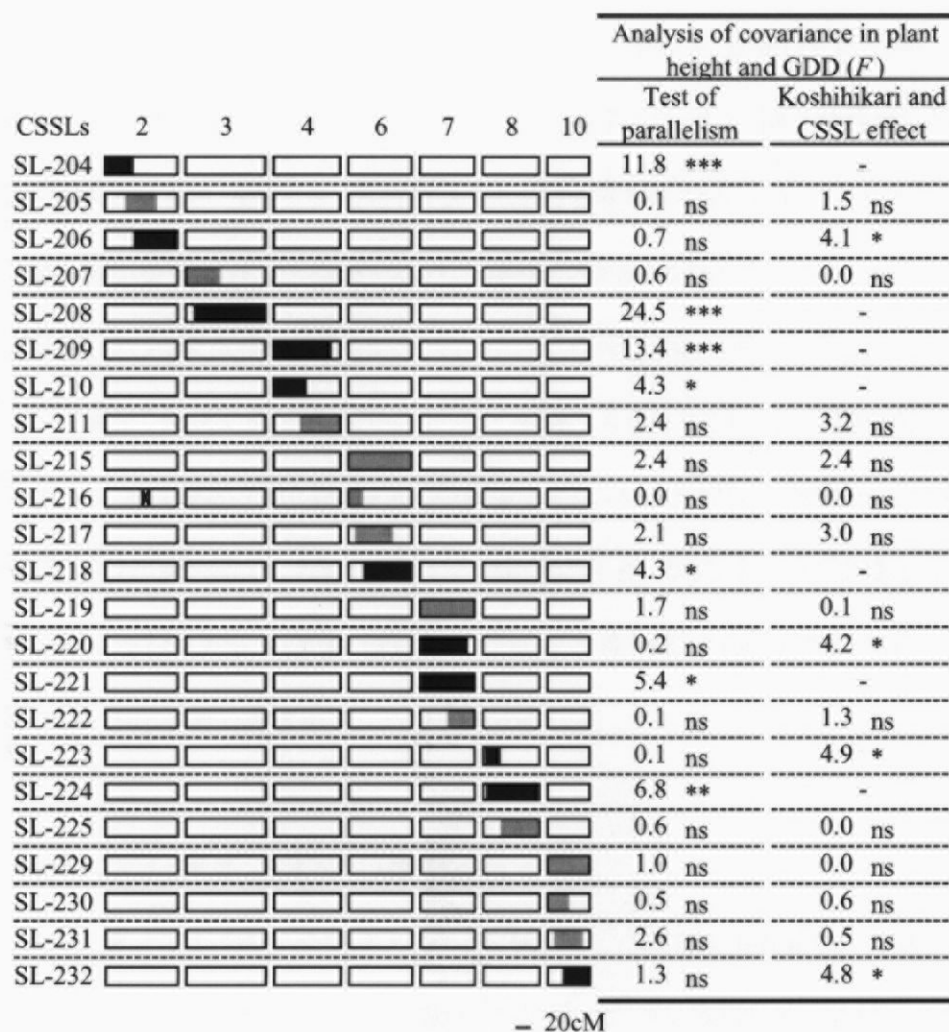


Fig. 1-5. Graphical genotypes, test of parallelism and analysis of covariance in tiller number and GDD (*F*) on plant height in 39 Koshihikari / Kasalath CSSLs. Chromosomes are layout horizontally and each CSSLs are distributed vertically. White, gray and crossed region indicate Koshihikari homozygous, Kasalath homozygous and heterozygous in the graphical genotypes, respectively. Black regions indicate putative QTL regions for growth pattern of tiller number.

茎数の増加パターンを詳細に見てみると、第 2 染色体に関する SL-204 および SL-206, 第 4 染色体に関する SL-209 および SL-210, 第 7 染色体に関する SL-220, 第 8 染色体に関する SL-223, 第 10 染色体に関する SL-232 では、茎数はコシヒカリより高く推移した (Fig. 1-6). 第 3 染色体に関して、SL-208 では出穂期の茎数はコシヒカリと同程度であったものの、到穂日数の延長によって CSSL の中で最も平行性検定の F 値が高かった。第 6 染色体に関する SL-218, 第 7 染色体に関する SL-221, 第 8 染色体に関する SL-224 では、茎数の GDD に対する回帰がともにコシヒカリと平行性を示さず、最高分けつ期以降出穂期にかけての茎数がコシヒカリより低く推移する傾向を示した。

出穂期における草型形質に関するコシヒカリおよび CSSL の表現型の差異

出穂期までの草丈及び茎数の増加パターンに関する QTL に続いて、作物生産上重要な出穂期における QTL について解析するため、同時期の草型形質について表現型を分析した。3 か年中 2003 年において、低温および日照の減少により、コシヒカリの出穂期の稈長、草丈、穂数の値は最も低かった (Table 1-2)。各形質における CSSL の値は、概ねコシヒカリの平均値を越えた広範な変異を示していた。2004 年における CSSL の比葉重の最大値は、コシヒカリより低かった。

出穂期における稈長、草丈および穂数に関する QTL

第 1, 第 2 および第 3 染色体上に稈長に関する 3 つの QTL を特定した (Fig. 1-7)。第 1 染色体に Kasalath 染色体断片が移入された CSSL において、SL-202 および SL-203 は、コシヒカリよりも稈長が 5.2 ~ 20.0% 高く、各年ともコシヒカリと有意な差を示した。このことから、QTL $qCL-1$ はこれら 2 つの系統が共有する染色体領域である C1370 ~ C742 間に位置づけられた SL-202 および SL-203 については、草丈の増加パターンも生育期間を通じてコシヒカリより高く推移していた。同様に、 $qCL-2$ (第 2 染色体 C747 ~ C1470) および $qCL-3$ (第 3 染色体 C515 ~ S1513) を特定した。

草丈に関する QTL $qPH-3$ (C515 ~ S1513) は、SL-207 の変異により第 3 染色体上の $qCL-3$ と同じ位置に特定された (Fig. 1-8)。また、 $qPH-8$ (C390 ~ C1121) を第 8 染色体上に特定した。いくつかの

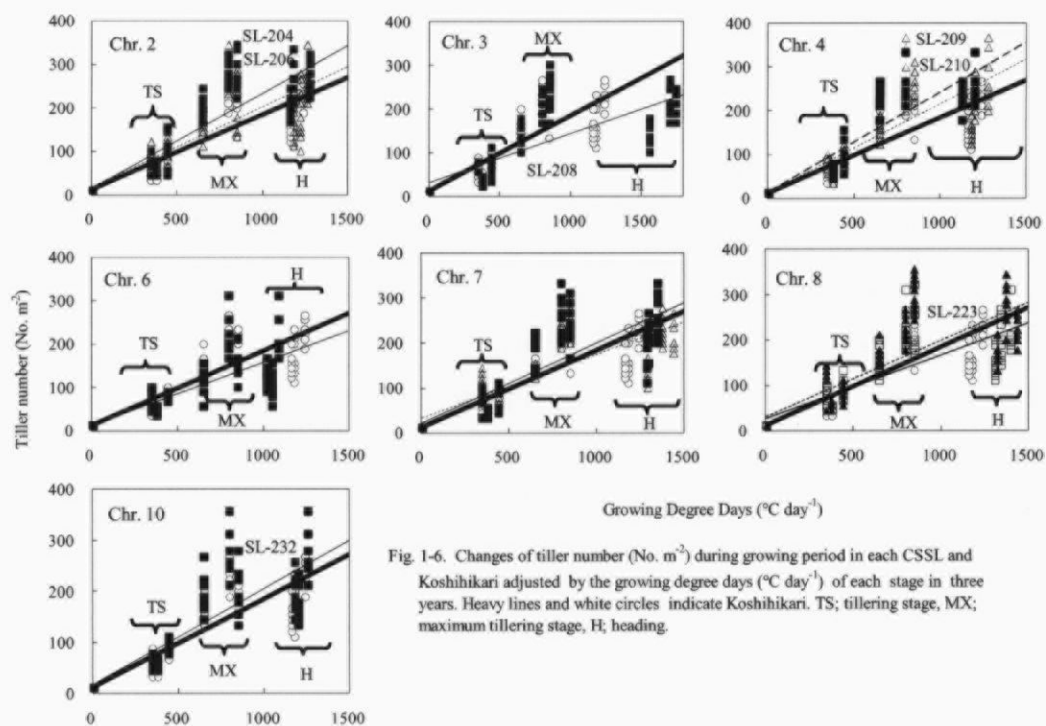


Fig. 1-6. Changes of tiller number (No. m⁻²) during growing period in each CSSL and Koshihikari adjusted by the growing degree days (°C day⁻¹) of each stage in three years. Heavy lines and white circles indicate Koshihikari. TS; tillering stage, MX; maximum tillering stage, H; heading.

Table 1-2. Mean values for the traits of the Koshihikari and the range of CSSLs in 3 years.

Trait	Koshihikari mean \pm SD			Range of CSSLs		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
CL (cm)	81.3 \pm 5.1	73.8 \pm 3.1	85.3 \pm 2.3	71.7 ~ 98.3	65.3 ~ 83.7	70.5 ~ 96.9
PH (cm)	109.7 \pm 3.1	103.2 \pm 2.6	114.2 \pm 2.7	103.7 ~ 129.7	92.3 ~ 120.7	102.8 ~ 129.2
PN (No. m ⁻²)	185.4 \pm 45.6	151.0 \pm 22.9	229.8 \pm 24.0	114.3 ~ 276.4	106.6 ~ 232.0	192.0 ~ 305.3
CHL (g m ⁻²)	0.45 \pm 0.03	0.38 \pm 0.01	0.39 \pm 0.01	0.33 ~ 0.50	0.35 ~ 0.51	0.32 ~ 0.44
SLW (g m ⁻²)	63.6 \pm 3.5	53.5 \pm 2.7	64.0 \pm 7.1	46.3 ~ 70.6	47.9 ~ 60.4	47.1 ~ 63.4

CL; culm length, PH; plant height, PN; panicle number, CHL; chlorophyll content, SLW; specific leaf weight.

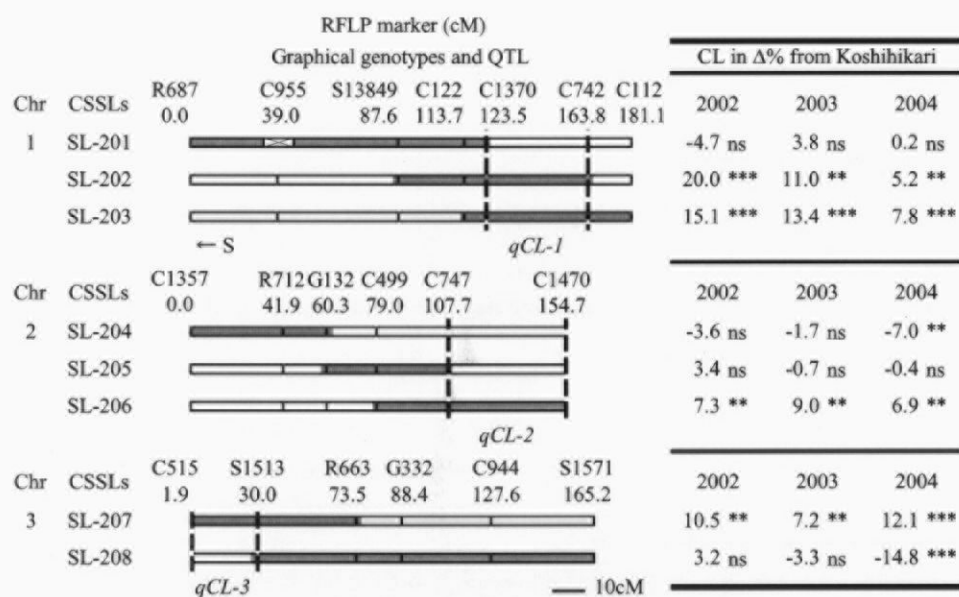


Fig. 1-7. The putative QTLs for culm length (CL) and graphical genotype and phenotypic variation (trait in Δ% from Koshihikari) of each CSSL in each year. Chr; chromosome number. White, gray and crossed region in graphical genotype indicate Koshihikari homozygous, Kasalath homozygous and heterozygous, respectively. ← S; side of short arm. ns, *, ** and ***; not significant, significant at 5%, 1% and 0.1% levels, respectively.

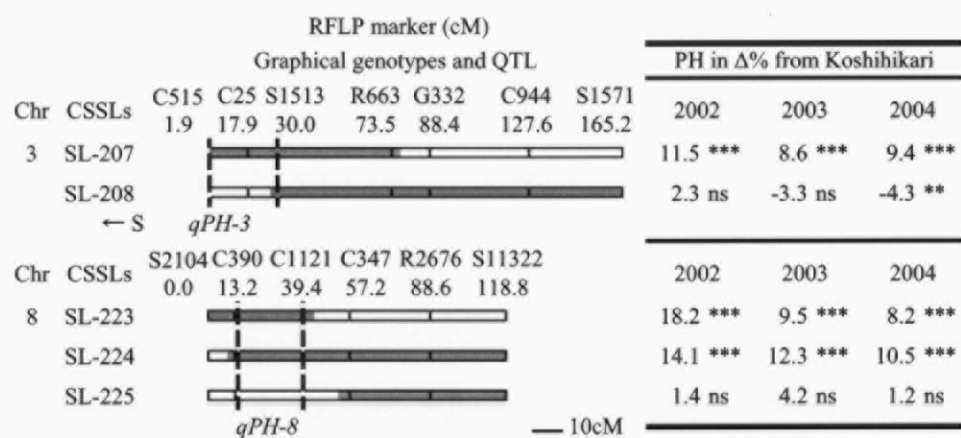


Fig. 1-8. The putative QTLs for plant height (PH) and graphical genotype and phenotypic variation of each CSSL in each year. See the details in Fig. 1-7.

CSSL が稈長および草丈においてコシヒカリより低い値を示したが、3 年間を通じて一貫してコシヒカリより有意に低い値を示した CSSL は認められなかった。

穂数に関する QTL は、第 2 染色体 C1357～G132 間に *qPN-2* のみを特定した (Fig. 1-9)。SL-204 において、茎数の増加パターンに関する QTL 領域と一致した。

稈長、草丈、穂数と到穂日数に関する相関分析

コシヒカリと比較して、SL-207, SL-208, SL-223 および SL-224 の DTH は長く、移植日から出穂日までの GDD, TSR もそれ伴って高かった (Fig. 1-10)。SL-205, SL-225 では、コシヒカリより DTH が短かった。これらの傾向は 3 年間とも同様であった。

染色体ごとの比較群において、到穂日数に関する相関分析を行ったところ、第 8 染色体の CSSL およびコシヒカリにおいて、草丈と DTH, GDD, TSR との間で 3 年間とも有意な正の相関関係が示された (Table 1-3)。しかしながら、第 1 染色体に関する CSSL において稈長と DTH や気象データとの間で有意な相関関係は認められなかった。また、第 2 および第 3 染色体に関する CSSL においては、草丈や稈長と単年度では DTH や気象データと有意な相関関係を示したものもあったが、3 年間とも一貫して有意な関係性を示した CSSL および形質は認められなかった。

出穂期における止葉葉身のクロロフィル含量および比葉重に関する QTL

2002 年の SL-209 のデータを欠く (材料および方法を参照) もの、SL-211 は 3 年間とも一貫してコシヒカリと比較して有意なクロロフィル含量の増加を示し、他方 SL-210 ではクロロフィル含量はコシヒカリと比較して減少する傾向を示していたことから、クロロフィル含量に関する QTL *qCHL-4* を第 4 染色体 C513～C1016 間に特定した (Fig. 1-11)。

比葉重に関する QTL *qSLW-7* を第 7 染色体 R1357～C596 間に特定した (Fig. 1-12)。

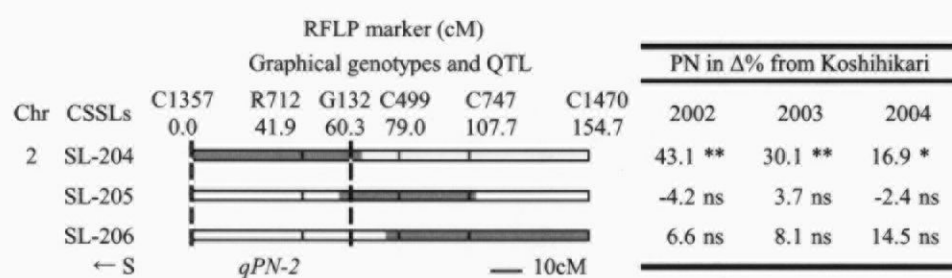


Fig. 1-9. The putative QTL for panicle number (PN) and graphical genotype and phenotypic variation of each CSSLin each year. See the details in Fig. 1-7.

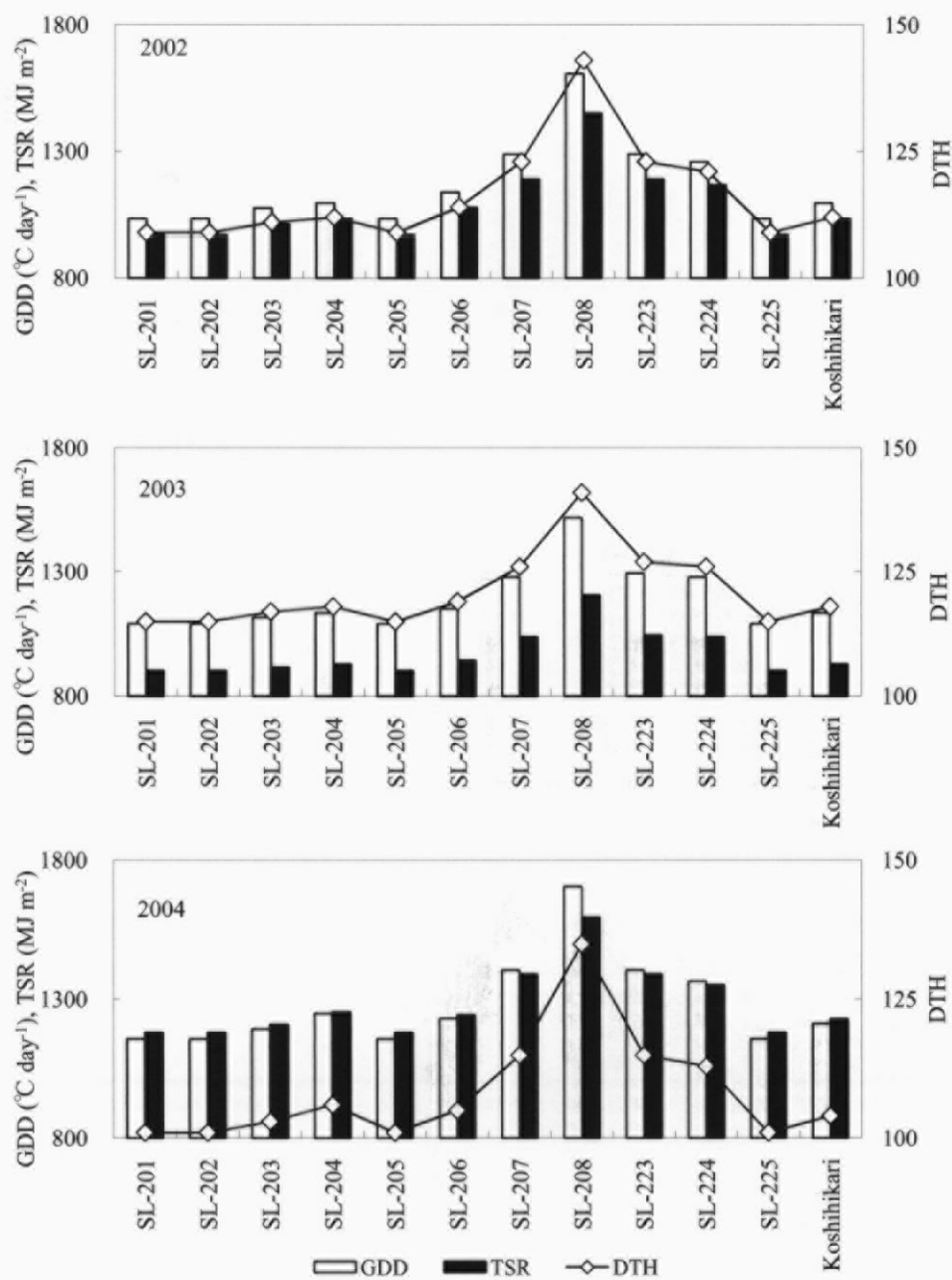


Fig. 1-10. Days to heading (DTH), growing degree days (GDD) ($^{\circ}\text{C day}^{-1}$), and total solar radiation (TSR) (MJ m^{-2}) from transplanting to heading in Koshihikari and CSSLs concerning CL, PH and CL. White lozenge and line plot, white block and black block indicate DTH, GDD and TSR, respectively.

Table 1-3. Correlation coefficient between trait for CL, PH and PN and days to heading (DTH), growing degree days (GDD) ($^{\circ}\text{C day}^{-1}$) and total solar radiation (TSR) (MJ m^{-2}) among comparison group of QTL analysis.

Chr	Comparison group of QTL analysis for CL, PH and PN using CSSLs	Trait	Year	Correlation coefficient between a trait and an aspect of vegetative period					
				DTH		GDD		TSR	
1	SL-201, SL-202, SL-203, Koshihikari	CL	2002	-0.12	ns	-0.12	ns	-0.12	ns
			2003	-0.19	ns	-0.22	ns	-0.28	ns
			2004	-0.04	ns	-0.05	ns	-0.08	ns
2	SL-204, SL-205, SL-206, Koshihikari	CL	2002	0.10	ns	0.10	ns	0.10	ns
			2003	0.33	*	0.36	*	0.40	*
			2004	-0.13	ns	-0.13	ns	-0.10	ns
		PN	2002	0.17	ns	0.17	ns	0.17	ns
			2003	0.16	ns	0.14	ns	0.12	ns
			2004	0.47	*	0.47	*	0.46	*
3	SL-207, SL-208, Koshikikari	CL	2002	0.07	ns	0.09	ns	0.08	ns
			2003	-0.35	ns	-0.33	ns	-0.31	ns
			2004	-0.65	***	-0.62	***	-0.57	***
		PH	2002	0.02	ns	0.03	ns	0.03	ns
			2003	-0.36	ns	-0.33	ns	-0.31	ns
			2004	-0.42	*	-0.38	*	-0.33	ns
8	SL-223, SL-224, SL-225, Koshihikari	PH	2002	0.84	***	0.83	***	0.82	***
			2003	0.63	***	0.65	***	0.66	***
			2004	0.82	***	0.82	***	0.81	***

Values are Pearson's product moment correlation coefficient. ns, *, ** and ***, not significant, significant correlation at 5%, 1% and 0.1% levels (two-tailed test) , respectively.

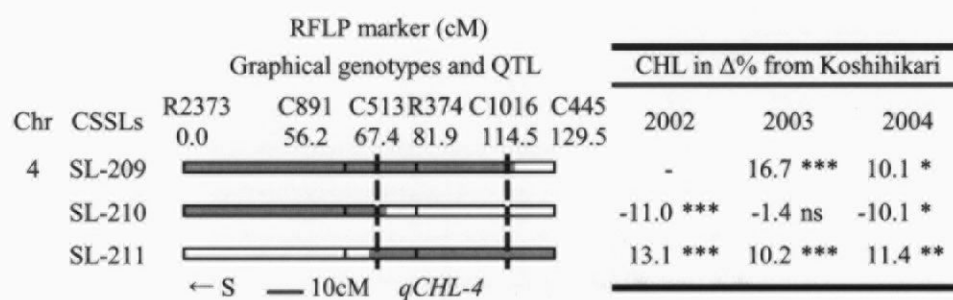


Fig. 1-11. The putative QTL for chlorophyll content (CHL) and graphical genotype and phenotypic variation of each CSSL in each year. See the details in Fig. 1-7.

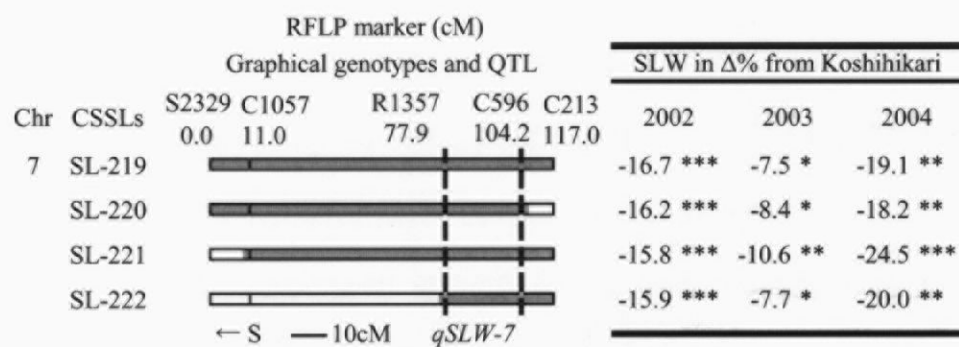


Fig. 1-12. The putative QTL for specific leaf weight (SLW) and graphical genotype and phenotypic variation of each CSSL in each year. See the details in Fig. 1-7.

第2節 目標とするCSSLに対するコシヒカリ戻し交配後代を用いたQTL解析

第1節ではCSSLとコシヒカリとの比較から、大まかなQTLを特定したが、本節ではQTLを保持していたCSSLにコシヒカリを戻し交配して作出した後代F₂集団を用いて更に詳細なQTL位置特定と、QTL上の対立遺伝子効果の推定を行った。

材料および方法

後代F₂集団を用いたQTLマッピング

第2染色体上において穂数に関するQTLを保持していたSL-204、第4染色体上においてクロロフィル含量に関するQTLを保持していたSL-209および第7染色体上において比葉重に関するQTLを保持していたSL-222、これら3つの有用QTLを保持していたCSSLにコシヒカリを花粉親としてそれぞれ戻し交配を行った。F₁を自殖させて得た各200の後代F₂個体の種子を2005年4月28日温室内で播種し、5月23日に東京大学大学院農学生命科学研究科附属農場水田へ移植(30×30cm, 11.1株m⁻²)し、各着目形質について調査した。SL-222の後代F₂集団では、比葉重に関するQTLについてより精査するために、出穂期の止葉葉面積(AAM-6, 林電工, 東京)を測定した。QTLの検出には、QTL解析ソフト QTL Cartographer 2.5 (Wang et al., 2006)を用い、LOD値2.5以上を検出閾値とした。葉身関連形質について、統計ソフトSPSS 14.0J (SPSS Japan, 東京)を用いて相関および偏相関分析を行った。

DNAマーカー解析

粗DNAサンプルは、移植後分げつ期初期に、高次分げつにおける未展開の葉を採集し、アルカリ抽出法(Wang et al., 1993)により抽出した。マーカーにはデータベース(Sakata et al., 2000; Buckler et al., 2006; Jaiswal et al., 2006; Cold Spring Harbor Laboratory and Cornell University, 2007; Rice Genome

Research Program, 2007)に基づき, 目標QTL上の4ないし5のSSR マーカー (McCouch et al., 2002) を用い, 300倍に希釈したDNAサンプルに, Smart Taq DNA ポリメラーゼ (SP-1000, 日本ジエネティクス, 東京), 0.1%ゼラチン, BPB dye, 30%グリセリン, 蒸留水およびSSRマーカーを添加し合計20 μ lにした. PCR はサーモサイクラー (GeneAmp 9700, Applied Biosystems Japan Ltd., 東京)を用い, 初期変性95°C10分間, PCR反応94°C1分間, 55°C1分間72°C2分間35サイクル, 最終伸長反応72°C7分間の条件で行った. PCR産物は3%アガロースゲルおよび0.5%TBE溶液を用い150Vで2時間泳動した. QTLの命名規準はMcCouch et al. (1997)に従った.

結果

後代 F₂ 集団を用いた QTL 解析

CSSL における解析で特定した、作物学的見地から草型改良において有用と判断した QTL (*qPN-2*, *qCHL-4* および *qSLW-7*) について精査するため、QTL を保持する目標 CSSL (SL-204, SL-209 および SL-222) にコシヒカリを戻し交配して作出した後代 F₂ 集団を用いて QTL 解析を行った。

その結果、Table 1-4 に示すようにいくつかの QTL を特定した。まず、出穂期の穂数に関する QTL *qPN-2* を第 2 染色体 RM3865～RM6378 間に特定した。この領域は CSSL において特定した範囲内であった (Fig. 1-13)。一方、遺伝的効果は低かった (LOD 値 = 2.7, R²% = 8.6)。

出穂期の止葉葉身におけるクロロフィル含量に関する 2 つの QTL (*qCHL-4-1* および *qCHL-4-2*) を第 4 染色体上に特定した。これらの QTL では、相加効果のみをもつ仮説が採択された。第 4 染色体 RM349 近傍に特定された QTL *qCHL-4-2* は、高い LOD 値 (13.5) および R²% 値 (28.6) を示した。

出穂期の止葉の比葉重に関する QTL *qSLW-7* を、第 7 染色体 RM2752～RM234 間に特定した。加えて、止葉の乾物重に関する 2 つの QTL (*qDWFL-7-1* および *qDWFL-2*) および止葉の葉面積に関する 2 つの QTL (*qFLA-7-1* and *qFLA-2*) をそれぞれの近傍の部位に特定した。*qFLA-7-1* の LOD 値および R²% 値 (7.5 および 20.4) は、*qSLW-7* のそれら (4.1 および 14.9) よりも高かった。*qSLW-7* において Kasalath 対立遺伝子による相加効果は負の値を示した。他方、止葉の乾物重および葉面積に関する 2 つの QTL 上の Kasalath 対立遺伝子は正の相加効果を示していた。

止葉葉身形質間の相関および偏相関分析

後代 F₂ 集団において、比葉重に加え止葉の乾物重および葉面積を測定したが、それらについても QTL が検出された。これら 3 つの QTL の関連を明らかにするために相関および偏相関分析を行った (Table 1-5)。3 つの葉形質はそれぞれ 0.1% 水準で有意な正の相関関係を示していた。止葉の乾物重の影響を

Table 1-4. QTL analysis for the traits using progeny F₂ population derived from Koshihikari / the target CSSL holding QTL for PN (No. m⁻²) on chromosome 2, CHL (g m⁻²) on chromosome 4 and SLW (g m⁻²) on chromosome 7.

Chr	Trait	Progeny QTL	Marker interval	Map location (cM)	LOD	Effects on the phenotype			
						<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d</i> / <i>a</i>	<i>R</i> ² %
2	PN (No. m ⁻²)	<i>qPN-2</i>	RM3865 ~ RM6378	21.9	2.7	22.9	-	-	8.6
4	CHL (g m ⁻²)	<i>qCHL-4-1</i>	RM241 ~ RM255	96.5	5.9	0.02	-	-	17.1
		<i>qCHL-4-2</i>	RM255 ~ RM349	110.7	13.5	0.02	-	-	28.6
7	SLW (g m ⁻²)	<i>qSLW-7</i>	RM2752 ~ RM234	83.9	4.1	-0.6	-1.6	2.4	14.9
	DWFL (mg)	<i>qDWFL-7-1</i>	RM2752 ~ RM234	85.9	4.0	25.6	-48.6	-1.9	12.7
		<i>qDWFL-7-2</i>	RM234 ~ RM429	96.9	3.4	20.0	-43.7	-2.2	8.3
	FLA (cm ²)	<i>qFLA-7-1</i>	RM2752 ~ RM234	87.9	7.5	6.1	-7.9	-1.3	20.4
		<i>qFLA-7-2</i>	RM234 ~ RM429	97.9	7.5	4.6	-9.0	-2.0	17.4

Chr; chromosome number, DWFL; dry weight of flag leaf, FLA; flag leaf area, *a*; additive effect of Kasalath allele on each traits, *d*; dominant effect of the Kasalath allele, *d* / *a*; degree of dominance, -; the hypothesis of *d* = 0 was adopted, *R*²%; percentage of phenotypic variance explained by each QTL.

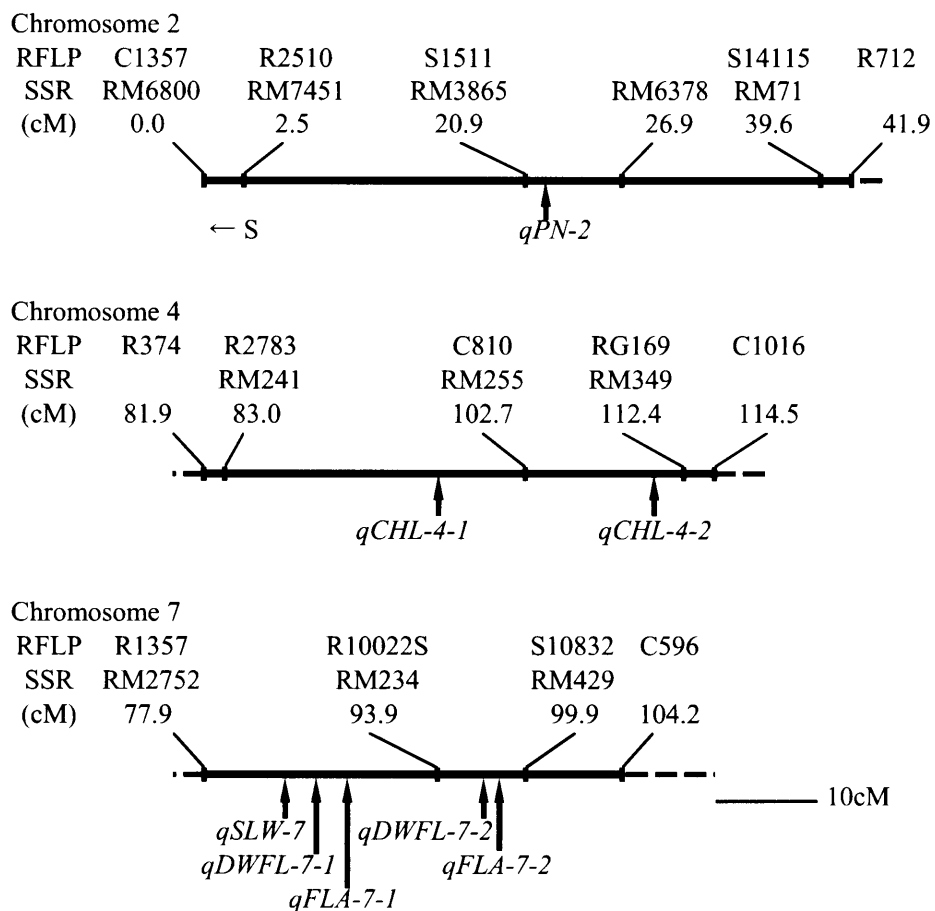


Fig. 1-13. Mapping progeny QTLs for panicle number, chlorophyll content, specific leaf weight, dry weight of flag leaf and flag leaf area in the enlargement of chromosome region containing QTL in CSSLs. Arrows indicate the position of QTL. Alternative SSR markers of RFLP in the present study are also shown.

Table 1-5. Correlation and partial correlation analysis for three traits of flag leaf among the progeny F₂ population derived from Koshihikari / SL-222 cross.

Source	Traits	SLW	DWFL
Pearson's product moment correlation coefficient	DWFL	0.63 ***	-
	FLA	0.25 ***	0.90 ***
Partial correlation coefficient	DWFL	0.97 ***	-
	FLA	-0.95 ***	0.99 ***

DWFL; dry weight of flag leaf, FLA; flag leaf area, SLW; specific leaf weight, ***; significant correlation (two-tailed test) at 0.1% level.

制御した偏相関分析の結果は、止葉の比葉重の低下が止葉葉面積の増加を導くことを示唆していた ($r = -0.95$, $P < 0.001$). 単相関では正の相関関係に見える止葉の比葉重と葉面積をプロットした散布図について、止葉の乾物重の水準に基づいて (<200 , $200 \sim 300$, $300 < \text{mg}$) 3 つに分けてみると、右肩下がりの回帰を示し、典型的な偽相関の特徴を示していた (Fig. 1-14).

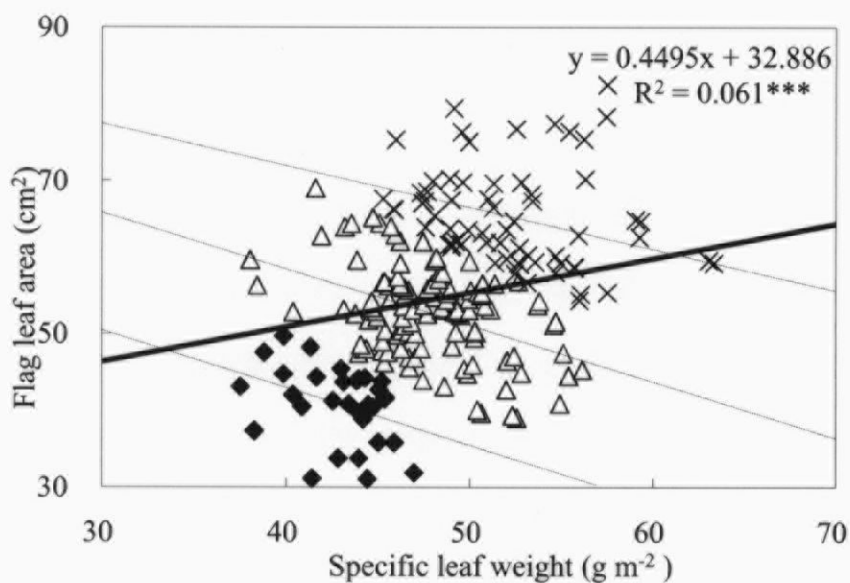


Fig. 1-14. Spurious correlation of specific leaf weight and flag leaf area from a view point of 3 classes of dry weight of flag leaf. Each plots show a value of each progeny F_2 individual. Black lozenges, white triangles and cross marks indicate the class of dry weight of flag leaf $200 <$, $200 \sim 300$ and <300 (mg), respectively. Heavy line and dotted lines indicate regression line of whole population and each 3 classes of dry weight of flag leaf, respectively. *** shows significant correlation (two-tailed test) at 0.1% level.

考察

これまで多くの CSSL 集団は、親品種との比較に基づいた大まかな QTL の推定 (Kubo et al., 2002; Ebitani et al., 2005; Ishikawa et al., 2005) ないし、他のマッピング集団の結果の検証に用いられてきた (Yamamoto et al., 2000; Takeuchi et al., 2007). 本研究では、CSSL および戻し交配後代 F_2 集団を用い、Dunnett 検定を統計手法として、有用且つ信頼性の高い草型関連 QTL を特定した。

結果より、草丈の増加パターンに関する QTL 領域および茎数の増加パターンに関する QTL 領域を多数特定した。これらについては、量的形質の範疇に含まれるか議論の余地はあるが、変異の原因は Kasalath の染色体断片の移入に他ならず、同様の染色体置換部分を共有する CSSL で、似たような増加パターンを示すものも認められた。これまで QTL 解析では、ある時点の表現型の結果に基づくものが大半であり、生育時期の進展に伴う変化について扱ったものは少ない (Takai et al., 2005). Berke et al. (1992) は、コムギにおいて染色体添加系統を用いて環境回帰法における回帰直線の有意な差から QTL を特定した。鶴飼 (2002) はこれを面白い例として特筆している。本研究における手法もこれに準ずるものである。

Nakagawa et al. (2005) は、日本晴/Kasalath 交配由来 BIL において、日々の温度と光周性を取り入れたモデルを用いて、開花期 QTL の温度および光周性について定量化し、作物学的モデルのパラメーターが遺伝的要因に基づくものであることを強く示唆した。一方、本研究では単純な平行性検定および共分散分析によって、増加パターンの遺伝解析が可能であることを示した。また、出穂期における稈長、草丈、穂数、クロロフィル含量および比葉重といった草型形質に関する 8 つの QTL を CSSL を用いて特定した (Fig. 1-7, 1-8, 1-9, 1-11, 1-12). 加えて、戻し交配後代 F_2 集団を用いた QTL 解析で、穂数、クロロフィル含量および比葉重の QTL 上の対立遺伝子効果を推定した。穂数に関する後代 QTL ($qPN-2$) およびクロロフィル含量に関する後代 QTL ($qCHL-4-1$ および $qCHL-4-2$) 上の対立遺伝子は相加効果のみを示した。一方、他の葉身に関する QTL は超優性および超劣性を示した。以上より、QTL 上の対立遺伝子効

果を正確に見積もるには、更に多くの DNA マーカーを増やした詳細な解析が必要であるが、戻し交配後代 F_2 集団を用いた QTL 解析では、QTL 領域をより狭めると同時に、QTL 上の対立遺伝子効果を推定することが可能であると考えられた。本研究で得られた稈長に関する QTL $qCL-1$ (Fig. 1-7) については、同様の QTL 領域上で Kasalath 対立遺伝子効果により稈長が増加したとするこれまでの報告と一致しており (Ishimaru et al., 2001a; Yamamoto et al., 2001), この領域における Kasalath 対立遺伝子効果が、交配組み合わせ、世代、環境条件を問わず、高い汎用性と安定性を持つことを示唆していた。また、他の稈長に関する QTL ($qCL-2$ および $qCL-3$) や草丈に関する QTL ($qPH-3$ および $qPH-8$) についても、類似する結果が、Tesnai 2/CB 交配由来 F_2 および F_3 集団 (Zhuang et al., 1997), 日本晴/Kasalath 交配由来 BC_1F_7 集団 (Ishimaru et al., 2001a) および IR64 / Azucena 交配由来倍加半数体 (Li et al., 2003a) を用いた QTL 解析において報告されている。これらの QTL は、草型および受光特性を変化させ、強稈性との組み合わせによりバイオマス改良に資する可能性を示唆していた。

本研究において特定された穂数に関する QTL $qPN-2$ については、Ishimaru ら (2001a) の報告とは異なっていた。彼らは、第 4、第 7 および第 8 染色体上に穂数に関する QTL を特定し、第 2 染色体上には特定していなかった (Ishimaru et al., 2001a)。このことは、ただ 1 箇所の染色体断片のみを置換した CSSL を用いたことにより、遺伝子間の交互作用によって従来検出できなかった QTL を引き出し得た可能性が示唆された。しかしながら、Ishimaru et al. (2001a) の報告は、栽植密度等の栽培条件が不明であるため、直接比較することが出来ないと判断された。他方、茎数の増加パターンでは、第 4、第 7 および第 8 染色体に関する CSSL においてコシヒカリより高く推移する傾向を示したのも認められた。必要な穂数の安定的確保は、理想的なイネ生産の理論のための最も基本的な前提条件の 1 つである (Inaba, 1991; Matsushima, 1995)。従って、CSSL および後代 F_2 集団で一貫して検出された QTL $qPN-2$ は、穂数の増加に有用であると考えられた。

育種を通した止葉葉身形質の改良は、イネの増産に資する可能性がある (鮫島・玖村, 1971; Evans and Terashima, 1987; Kobayashi et al., 2003)。QTL 上の Kasalath 対立遺伝子の効果によりクロロフィル含

量増加に資する可能性がある *qCHL-4* は、既報における QTL、即ち、呉・羅 (1996) の報告による IR42 / Palawan 交配由来 F_2 における RG143 ~ RG329 間に検出された QTL および 汪等 (2003) の報告による Acc8558 / H359 交配由来 RIL における R896 ~ P19/M76-2 間に検出された QTL と類似していた。 *qCHL-4* の近傍には、インド型対立遺伝子によりクロロフィル含量が減少する効果を伴う QTL が検出されているが、 *qCHL-4* とは重複しなかった (Ishimaru et al., 2001a)。 SL-210 のクロロフィル含量はコシヒカリより少ない値を示していたので、 Ishimaru et al. (2001a) の検出した QTL は SL-210 の持つ Kasalath 染色体領域に含まれると推察された (Fig. 1-11)。 Dong et al. (2005) は、宮崎県で Koshihikari / Kasalath 交配由来 RIL 集団を用い、密植条件 (10 × 15 cm) 下で最高分けつ期のクロロフィル含量に関する 3 つの QTL を特定した。しかしながら、それらは本研究において出穂期に検出した QTL とは異なっていた。この差異は、主に測定した時期 (最高分けつ期か出穂期) の差異によるものと考えられた。既報および本研究の結果から判断すると、検出された *qCHL-4* は草型改良上有望な対象と考えられた。

CSSL において、比葉重に関する QTL *qSLW-7* は、3 年間を通じて一貫して検出された。後代 F_2 検定において、 *qFLA-7-1* および *qDWFL-7-1* は *qSLW-7* の近傍に検出された。比葉重は、イネにおける葉面積拡大の主要な指標である。同様なマーカー区間に検出されながら、 *qSLW-7* は、 *qFLA-7-1* と正反対の相加効果を示した。この結果も、比葉重の減少が葉面積の増加を導くことを示していた (Table 1-4)。偏相関分析および参照される散布図は、止葉葉身の乾物重の強い影響下における、比葉重および葉面積と間の擬相関を明確に示していた (Table 1-5, Fig. 1-14)。相関分析の結果に鑑みると、3 つの QTL は互いに関係性があり、これらの QTL の 1 つが他の 2 つの QTL に強く影響を及ぼしている可能性が示唆されたが、更に詳細な分析が必要であると考えられた。Ishimaru et al. (2001a) は、イネにおいて初めて比葉面積 (比葉重の逆概念) に関する QTL を第 3 および第 11 染色体上に特定した。彼らは同時に葉面積についても測定したが、それらの相関関係については言及していなかった。 *qFLA-7-1* は超劣性を示したが、誤差を考慮すれば、相加的である可能性は否定できず、実際の育種に利用できると考察された。

本研究の結果は、CSSL と戻し交配後代 F_2 集団を組み合わせた QTL 解析が、例えば *qPN-2* のよう

な F_2 や RIL といった従来の主なマッピング集団で検出できなかった微小な効果を持つ QTL の検出において、極めて重要であることを明らかにした。このように、ただ 1 箇所 QTL 領域のみを置換した、CSSL のような強力な遺伝解析ツールを使用することにより、大きな効果を持つ QTL だけでなく比較的小さい QTL においても、QTL をメンデル遺伝へ移行させることが可能であると考えられた (Paran and Zamir, 2003)。

また、本研究で得られた目的 QTL を保持する CSSL は、コシヒカリとの戻し交配親候補として直接利用できる。コシヒカリ-NIL の育成など、将来の新品種育成への応用が期待できる。加えて、BIL や NIL 等と比較して、比較的少ない系統数 (本研究では 39) で遺伝解析が行える CSSL は、光合成速度、RuBisCO 含量や NSC 含量といった解析に多大な労力と時間を要する作物生理学的に重要な形質に関する遺伝解析を促進すると考えられる。

第2章 作物生理学的有用表現形質に関する QTL の探索

シンク、ソース機能およびそれらの関係性は、禾穀類においてバイオマスおよび収量生産に決定的な影響を及ぼす生理学的要素である。これを炭素および炭水化物代謝の観点から見ると、イネ (*Oryza sativa* L.) 葉におけるソース機能は、炭素固定、ショ糖合成および師部へのショ糖のローディングを含む。他方、イネの穂におけるシンク機能は師部から胚乳へのショ糖のアンローディングおよび胚乳におけるデンプン合成を含む。加えて、稈および葉鞘は出穂期前には一時的な炭素貯蔵器官(シンク)としての役割を果たし、出穂後にはソースとして機能する(Ohnishi, 2005)。

単位葉面積あたりの見かけの光合成速度(LPS)は、イネの成長速度や収量と密接に関係し、開花期以降の止葉のLPSと子実収量とが正の相関関係を持つことが報告されており、LPSの種間差および品種間差についてはこれまで数多く研究されてきた(Ishii, 1995)。近年のイネ品種のほとんどは、高いLPSを示す傾向にあると考えられており(Ishii, 1995)、多収品種が高いLPSを有することを示す報告も見られる(Jiang et al., 1988; Nakazawa et al., 1990; 徐ら, 1997)。これらLPSの品種間差は、リブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO, EC 4.1.1.39)の活性と密接に関連し、また、成熟葉においてRuBisCO活性は主にRuBisCOタンパク量に大きく依存している(Makino et al., 1984; Ishii, 1995)。これらのことから、RuBisCO含量は成熟葉におけるソース機能の1つの重要な指標として扱われてきた。

活力ある穎花生産および登熟には、稈および葉鞘からの非構造的炭水化物(NSC)の転流が大きく影響し、その寄与は胚乳における総炭水化物量の10~40%にも及ぶとされている(翁ら, 1982; 角ら, 1996; 山口ら, 2006)。出穂後14日間における子実重量増加には、葉鞘に蓄積されたNSCの利用効率が大きく影響する(梶木, 1994; Watanabe et al., 1997)。特に、第3葉鞘(止葉から数えて2葉下の葉鞘)は他の葉鞘よりも多くのデンプンを蓄積し(Hirose et al., 1999)、第3葉鞘におけるNSCは収量性の異なる品種間でかなりの差異を示す(He et al., 2005)。加えて、出穂後のNSC供給は白未熟粒、特に乳白粒の発生割合等の玄米品質に密接に関係すると報告されている(小谷・黒田, 2006; Nakagawa et al., 2006;

山口ら, 2006).

シンク, ソース機能に関する研究を通して, 分子機構および遺伝学的基礎を詳らかにし, 新たな育種目標を発見することは極めて重要である(Ohnishi, 2005). イネにおいて, 微小な染色体断片を置換したCSSLを用いたQTL解析の有用性は, これまで広く実証されている(Kubo et al., 2002; Ebitani et al., 2005; Ishikawa et al., 2005). コシヒカリの遺伝的背景に基本的にKasalathの染色体断片が1箇所のみ置換された39コシヒカリ/Kasalath交配由来CSSLは, 高い検出力を有し, エピスタシス効果を低減している. 更に, CSSLを用いたQTL解析およびQTLを保持していたCSSLにコシヒカリを戻し交配して作出した戻し交配後代を用いた後代検定を組み合わせることが, QTLの詳細な位置特定およびQTL上の対立遺伝子効果を推定するために推奨されており(Ebitani et al., 2005), 第1章においてその有効性が実証された.

これまで, RuBisCO (Ishimaru et al., 2001a) およびNSC (Nagata et al., 2002a, b)に関するQTLについて, エピスタシス等の複雑な遺伝的交互作用を含む分離集団を用いた報告はある. しかしながら, それらの知見は, NILなどの有用系統育成に向けて直接QTL情報を実用化するには不十分である. CSSLにおいて検出されたQTLは, NIL育成をより迅速にすることが可能であり(安東, 2005), 新品種育成にも応用できる.

また, これまでのところ, 半矮性インド型品種はイネの収量ポテンシャル向上に遺伝資源として重要な役割を果たしてきている(Nagata, 2006). ハバタキは, 短稈性および強稈性を有し, 超多収を目的としてわが国で育成された代表的なインド型品種である(小林ら, 1990). Hasegawa (2003)の報告によれば, ハバタキは, 大きなシンクサイズを持ち, 供試した14品種の中で最も1穂穎花数($>150 \text{ panicle}^{-1}$)および m^2 あたり穎花数($>40000 \text{ m}^{-2}$)が多く, 極めて高い収量性を示した. 更に, 子実生産に重要な乳熟期頃の止葉葉身の高い光合成速度および緑葉の維持程度の高いことが報告されている(Wang et al., 2004; 浅沼ら, 2008). ハバタキは, 半矮性穂重型品種である密陽42号/密陽25号交配に由来し, これはわが国において主要な超多収品種であるタカナリの姉妹品種である(小林, 1990; 長田, 1997). このような観点

から、収量性向上に密接に関連する多くの形質に関する遺伝的機構を解明することを期待して、新たに多収性インド型品種ハバタキを供与親として、ササニシキを反復親として連続戻し交配により、ササニシキ/ハバタキ39CSSLが育成された(Ando et al., 2008; イネゲノムリソースセンター, 2003a).

本章では、コシヒカリ/Kasalath交配由来39CSSLおよびササニシキ/ハバタキ交配由来39CSSLを用いてQTL解析を多年度に亘って行い、QTLを保持していた目的CSSLに反復親を戻し交配して作出した後代集団を用いたQTL解析を組み合わせ、エピスタシスなどの遺伝的交互作用の少ない条件で、出穂期における止葉葉身のRuBisCO含量および第3葉鞘におけるNSC含量といった、作物生理学的に重要視されているソースシンク機能に関するQTLを特定することを目的とした。

第1節 コシヒカリ/Kasalath 交配由来 CSSL における RuBisCO および NSC に関する QTL

第1節では、第1章において用いた解析手法を応用し、コシヒカリ/Kasalath 交配由来 39CSSL および戻し交配 F_2 後代を用いて、作物生理学的に重要な形質である RuBisCO および NSC に関する QTL の特定を試みた。

材料および方法

CSSLにおける表現型分析

第1章同様、コシヒカリ/Kasalath交配由来39CSSL(イネゲノムリソースセンター, 2003a; Ebitani et al., 2005)およびコシヒカリを2002～2004年に東京大学大学院農学生命科学研究科附属農場水田において、慣行栽培した。CSSLおよびコシヒカリの出穂期において、止葉葉身および第3葉鞘を採集し、液体窒素で固定後測定まで -80°C で保存した($n=3$)。

CSSLとコシヒカリとの平均の差は、SPSS 15.0J (SPSS Japan Inc.,東京)を用い、一元配置分散分析-多重比較検定(コシヒカリを対照としたDunnnett検定)により検定した。CSSLとコシヒカリとの間で複数年5%水準の有意差が検出された場合、そのCSSLがもつKasalath染色体断片をQTL領域として特定した。

後代 F_2 集団を用いたQTL解析

第10染色体において、RuBisCO含量およびNSC濃度に関するQTLを保持していたSL-231に、コシヒカリを花粉親として戻し交配を行い、 F_1 を温室内で自殖させ、440個体の F_2 後代を育成した。2005年4月28日温室内へ播種し、5月23日に東京大学大学院農学生命科学研究科附属農場水田へ移植($30 \times 30\text{cm}$, 11.1株m^{-2})し、止葉葉身および第3葉鞘を上述のCSSLにおける表現型分析と同様にサン

プリングした。登熟期間中の形質の変化を調べるため、440個体のうち220個体を出穂期に、残りを出穂14日後にサンプリングした。主茎の止葉葉身の形質についてさらに詳細に調査するために、葉長、葉幅、葉面積(葉面積計AAM-6,林電工, 東京)および葉身乾物重を測定し、比葉重を計算した。QTLの検出には、QTL解析ソフトQTL Cartographer 2.5 (Wang et al., 2006)を用い、LOD値2.5以上を検出閾値とした。葉身関連形質について、統計ソフトSPSS 15.0J(SPSS Japan, 東京)を用いて相関分析を行った。

RuBisCO含量の測定

採集した主茎の止葉葉身の中肋を除いた部分を直径6mmのリーフパンチで切り取った葉片6枚(合計1.7 cm²)を、石英砂および抽出バッファー(0.05 M Tris-HCl, 0.01 M MgCl₂, 0.0005 M EDTA-2Na, 5 M DTT, 0.2% (w/v) PVPP および 0.1% (w/v) Triton X-100 を含み, pH7.9 に調整)とともに乳鉢上で磨砕した。磨砕物を一様に混合した後、19,000 × g で 20 分間遠心し、上澄みを 0.625 M Tris-HCl (pH 6.8), 2.0% (w/v) SDS, 10% (v/v) グリセリン, 0.02% (w/v) BPB および 5.0% (v/v) 2-メルカプトエタノールと混合し、100°Cで 3 分間処理した。水稻品種日本晴の止葉葉身から同様に抽出したサンプルを、牛血清アルブミン量との比較からタンパク濃度を測定し、標準試料とした。標準試料と、出穂期、出穂後14 日後の試料について、12.5%SDS-PAGE(ラビダス・二連ミニスラブ電気泳動装置 AE-6500W 型, アトー, 東京)を行い、RubisCO タンパクを分離した(Makino et al 1986)。RubisCO タンパクを流したゲルをCBB 染色液(0.1% (w/v) CBB, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) 酢酸)で染色し、その後、CBB 脱色液(25%(v/v)メタノール, 7.5%(v/v)酢酸)で脱色した。CBB 染色処理後のゲル画像をデンストグラフ(デンストグラフシリーズ No.2 Ver.1.0, アトー, 東京)に取り込み、RuBisCO タンパクの染色具合を画像解析(アトー二次元パターン解析プログラム, アトー, 東京)して、出穂期と出穂14 日後の試料を標準試料と比較することにより濃度を測定した。

NSC濃度の測定

80°Cで3日間乾燥後、第3葉鞘の乾物重(DWLS)を測定した。ジルコニアビーズを用い、多検体細胞破碎機(MB455U, 安井器械, 大阪)により粉碎した。粉碎した試料 100mg 程度を、予め乾燥重量を測定したガラス試験管(W_0)に投入し、合計重量(W_1)を測定した。試験管に蒸留水 4.5ml を加え、100°Cで4時間熱水抽出した。終了後、2分間超音波処理し、40 units (1.23mg) 1,4- α -D-グルカンゲルコヒドラーゼ(アミログルコシダーゼ, EC 3.2.1.3)および酢酸バッファー(pH4.6)を加え、振とう機で 60°C 2時間インキュベートした(Sasaki et al. 2005)。終了後、2000rpm で 10 分間遠心し、アスピレータで上澄みを捨てた。再度蒸留水を加え、遠心、上澄みを捨てる処理を2回繰り返した。80°Cで3日間試験管ごと乾燥し、重量(W_2)を測定した。 $(W_1 - W_2) / (W_1 - W_0) \times 100$ より、NSC濃度を百分率で求めた。また、NSC濃度にDWLSを乗じ、NSC含量を求めた。

DNAマーカー解析

第1章同様、DNAはアルカリ抽出法により、分げつ期初期の葉身から抽出した(Wang et al., 1993)。データベースに基づき(Sakata et al., 2000; Buckler et al., 2006; Jaiswal et al., 2006; Cold Spring Harbor Laboratory and Cornell University, 2007; Rice Genome Research Program, 2007)、6つの代替SSRマーカーによる目標QTL領域における連鎖地図を作成した(McCouch et al., 2002)。PCRはサーモサイクラー(GeneAmp 9700, Applied Biosystems Japan Ltd., 東京)により、Smart Taq DNAポリメラーゼ(SP-1000, 日本ジェネティクス, 東京)を用いて行った。

結果

CSSL における表現型変異および 3 年間の F 検定

コシヒカリ/Kasalath 交配由来 CSSL の RuBisCO 含量および NSC 濃度は, 2002~2004 年の各年とも広範な変異を示した (Table 2-1). 2004 年の RuBisCO 含量および NSC 濃度の変異幅は, 3 年間で最も狭かった. 3 年間の年次間変動について F 検定 したところ, RuBisCO 含量および NSC 濃度ともに 0.1%水準で有意な年次間効果が認められ, 大きな年次変動の存在が示唆された. NSC 濃度と比較して RuBisCO 含量の方が, F 値は高かった.

CSSL における RuBisCO 含量および NSC 濃度に関する QTL 領域の特定

第 10 染色体に Kasalath 染色体断片が置換された 4 つの CSSL とコシヒカリとの各年次における表現型値の差異から RuBisCO 含量および NSC 濃度に関する QTL 領域を特定した (Fig. 2-1). 他の CSSL において, RuBisCO 含量, NSC 濃度ともに複数年に亘ってコシヒカリとの有意な差異を示したものは認められなかった. 第 10 染色体全体を Kasalath ホモ型に置換した SL-229 の RuBisCO 含量は, 2003 年においてコシヒカリと比較して有意に高かった. また, NSC 濃度も 2003 年および 2004 年の複数年に亘って, コシヒカリと比較して有意に高かった. 他方, 第 10 染色体の長腕末端側を Kasalath ホモ型に置換した SL-232 では, RuBisCO 含量, NSC 濃度ともに 3 年間ともコシヒカリと比較して有意な差は認められなかった. SL-230 において, RuBisCO 含量は 2003 年にコシヒカリと比較して有意な増加を示したが, NSC 濃度については 3 年間ともコシヒカリとの有意な差は認められなかった. SL-231 において, RuBisCO 含量は 2003 年および 2004 年の 2 年間に亘ってコシヒカリと比較して有意な増加が認められ, NSC 濃度については 3 年間ともコシヒカリと比較して有意な増加が認められた. SL-229, SL-230 および SL-231 の変異から, RuBisCO 含量に関する QTL 領域は R2447~C1286 間 (29.8~41.8 cM) に特定された. NSC 濃度に関する QTL 領域は, SL-229 および SL-231 の変異から, R2447~R716 間 (29.8~68.4 cM) に

Table 2-1. Mean values of the investigated traits in Koshihikari and range of CSSL each year and *F* test of the values in CSSLs in three years.

Trait	Year	Koshihikari mean \pm SD	Range of CSSLs
RuBisCO content on the flag leaf at heading (g m ⁻²)	2002	1.4 \pm 0.7	1.2 - 3.2
	2003	1.4 \pm 0.3	1.3 - 4.3
	2004	1.9 \pm 0.2	1.4 - 3.2
	Year <i>F</i>		19.0 ***
NSC concentration on the third leaf sheath at heading (%)	2002	18.1 \pm 4.4	10.7 - 50.2
	2003	11.4 \pm 4.4	11.0 - 48.1
	2004	21.5 \pm 1.8	20.5 - 34.5
	Year <i>F</i>		8.3 ***

*** indicates significant at 0.1% level.

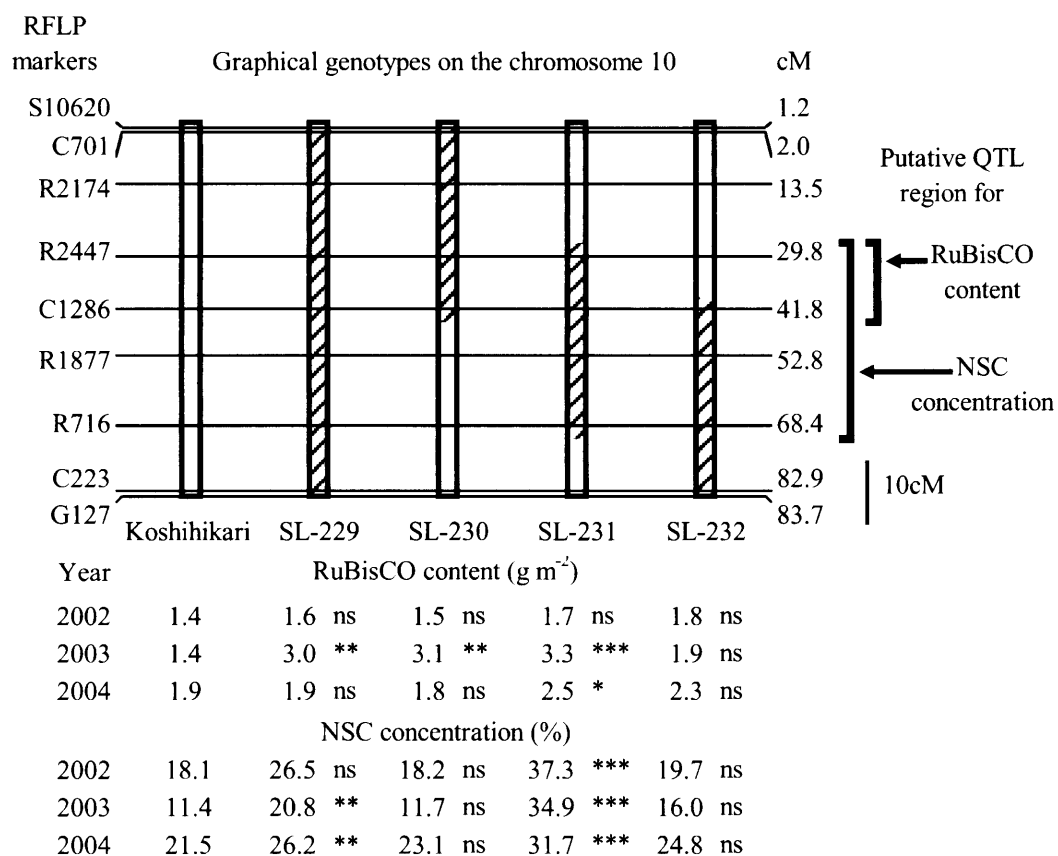


Fig. 2-1. Mapping putative QTL for RuBisCO content (g m^{-2}) and NSC concentration (%) by comparing Koshihikari with 4 CSSLs on chromosome 10 in each year. Open and hatched regions in graphical genotype indicate Koshihikari homozygous and Kasalath homozygous, respectively. Mean values are shown. ns, *, ** and *** show no significant difference and significant difference from Koshihikari at 5, 1 and 0.1%

特定された。以上の結果から、RuBisCO 含量および NSC 濃度に関する QTL 領域を保持する SL-231 を後代 F₂ 親とした。

後代 F₂ 集団における QTL 解析

第 10 染色体上において、更に詳細な QTL 解析を行い、より狭い領域に QTL を特定するため、SL-231 にコシヒカリを戻し交配して F₂ 集団を作出した。出穂期の止葉葉身における RuBisCO 含量に関する後代 QTL *qRCH-10* は、RM5708 近傍に特定され、高い LOD 値(6.0)および R²%値(33.0)を示した (Table 2-2, Fig. 2-2)。出穂期の第 3 葉鞘における NSC 濃度に関する QTL として、*qRCH-10* と同じマーカー区間である RM8201～RM5708 間において *qNSCLSH-10-1*、RM5708～RM5304 間において *qNSCLSH-10-2* の 2 つが検出された。加えて、出穂 14 日後の RuBisCO 含量に関する 2 つの QTL *qRCAH-10-1* および *qRCAH-10-2* が、出穂期に検出された RuBisCO 含量に関する QTL *qRCH-10* とは異なる位置に検出された。これらの QTL において、LOD 値はそれぞれ 2.9 および 3.2、R² %値は 9.6 および 8.3 であった。出穂 14 日後の NSC 濃度に関する QTL は検出されなかった。優性度について、*qRCH-10*(-0.04)、*qNSCLSH-10-1*(0.19) および *qRCAH-10-1*(-0.46) はほとんど相加的であるとみなされた。他方、*qNSCLSH-10-2*(0.70) および *qRCAH-10-2*(-1.37) では、対立遺伝子効果は優性および劣性であった。

形質間の相関分析

Table 2-3 は、出穂期および出穂 14 日後において測定された、RuBisCO 含量および NSC 濃度に関連する形質(葉長、葉幅、葉面積、比葉重、葉鞘乾物重、NSC 含量)についての相関について示した表である。これらすべての関連形質について QTL の LOD 値は閾値の 2.5 未満であった。出穂期の RuBisCO 含量と他の 7 形質との間の相関係数は低かった。また、出穂 14 日後における RuBisCO 含量と葉鞘に関する 3 形質(葉鞘乾物重、NSC 濃度および NSC 含量)との間の相関係数も極めて低かった。

Table 2-2. QTL analysis of the RuBisCO content at heading, NSC concentration in the third leaf sheath at heading and RuBisCO content at 14 DAH in progeny F₂ population derived from SL-231 / Koshihikari cross on chromosome 10.

Trait	QTL	Marker interval	Map location (cM)	LOD	Effects on the phenotype			
					<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d / a</i>	<i>R</i> ² %
RuBisCO content on the flag leaf at heading (g m ⁻²)	<i>qRCH-10</i>	RM8201 - RM5708	30.1	6.0	0.60	-0.03	-0.04	33.0
NSC concentration on third leaf sheath at heading (%)	<i>qNSCLSH-10-1</i>	RM8201 - RM5708	27.1	2.8	0.94	0.18	0.19	6.1
	<i>qNSCLSH-10-2</i>	RM5708 - RM5304	35.2	2.7	0.87	0.61	0.70	7.0
RuBisCO content at 14 DAH (g m ⁻²)	<i>qRCAH-10-1</i>	RM258 - RM7020	50.3	2.9	0.24	-0.11	-0.46	9.6
	<i>qRCAH-10-2</i>	RM7020 - RM8202	60.5	3.2	0.20	-0.27	-1.37	8.3

a ; additive effect of Kasalath allele on each traits, *d* ; dominant effect of the Kasalath allele, *d / a* ; degree of dominance. *R*²%; percentage of phenotypic variance explained by each QTL.

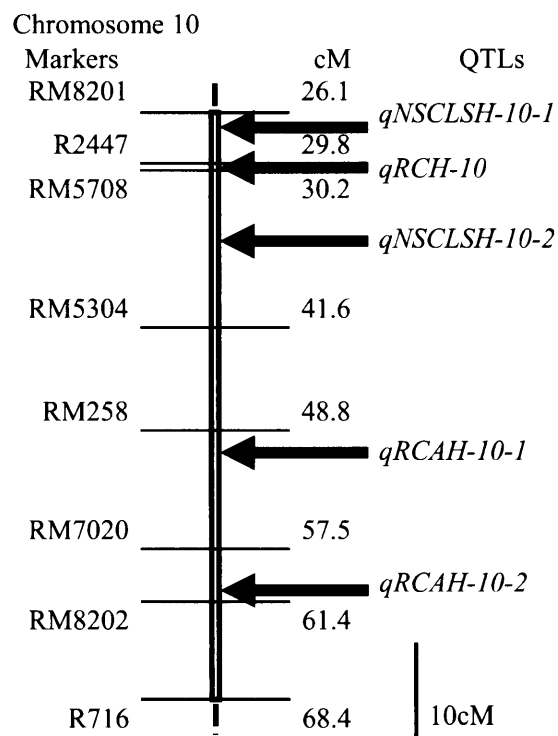


Fig. 2-2. Mapping progeny QTLs for RuBisCO cont at heading, NSC concentration on third leaf sheath at heading and RuBisCO content at 14 DAH in the enlargement of chromosome region containing QTL in SL-231. Allows indicate the position of QTL.

Table 2-3. Pearson's product moment correlation coefficient of traits investigated at heading and 14 days after heading among pre F₂ population derived from SL-231 / Koshihikari cross on chromosome 10.

Growing period	Trait	RC	FLL	FLW	FLA	SLW	DWLS	NSC%
Heading	FLL	0.25 ***						
	FLW	0.10 ns	0.50 ***					
	FLA	0.21 *	0.96 ***	0.62 ***				
	SLW	0.12 ns	0.12 ns	0.09 ns	0.12 ns			
	DWLS	0.02 ns	0.34 ***	0.43 ***	0.39 ***	0.22 ***		
	NSC %	0.07 ns	0.33 ***	0.13 ns	0.31 ***	-0.17 *	0.35 ***	
	NSCC	0.05 ns	0.41 ***	0.37 ***	0.43 ***	0.08 ns	0.89 ***	0.73 ***
14DAH	DWLS	-0.14 *	-	-	-	-		
	NSC %	0.05 ns	-	-	-	-	0.00 ns	
	NSCC	-0.01 ns	-	-	-	-	0.47 ***	0.88 ***

RC; RuBisCO content, FLL; flag leaf length; FLW; flag leaf width, FLA; flag leaf area, SLW; specific leaf weight on the flag leaf, DWLS; dry weight of the third leaf sheath, NSC%; NSC concentration of third leaf sheath, NSCC; NSC content of the third leaf sheath. ns, * and *** indicate no significant, significant correlation (two-tailed test) at 5 and 0.1% levels, respectively.

本研究における後代 F_2 集団においては、比葉重は RuBisCO 含量や、NSC 濃度にほとんど影響しなかった。出穂期、出穂 14 日後ともに、NSC 濃度は NSC 含量と高い正の相関関係 ($r = 0.73$ および 0.88 , $P < 0.001$) を示した。

第2節 ササニシキ/ハバタキ交配由来 CSSL における RuBisCO および NSC に関する QTL

本節では、第1節において用いた解析手法を応用し、ササニシキ/ハバタキ交配由来 39CSSL および戻し交配 F_2 後代を用いて、インド型多収品種であるハバタキに由来する対立遺伝子効果を伴う RuBisCO および NSC に関する QTL の特定を試みた。

材料および方法

CSSL を用いた表現型分析

2005 年に、39 系統(SL-401～SL-439)からなるササニシキ/ハバタキ CSSL 集団(Ando et al., 2008; イネゲノムリソースセンター, 2003a)および両親品種を供試して、3 試験研究機関((独)農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター大仙研究センター(秋田県大仙市, 北緯 $39^{\circ} 29'$, 東経 $140^{\circ} 29'$, 海拔 28m), 同作物研究所谷和原水田圃場(茨城県つくばみらい市, 北緯 $36^{\circ} 0'$, 東経 $140^{\circ} 1'$, 海拔 12m)および東京農工大学農学部付属広域都市圏フィールドサイエンス教育研究センターFM 本町(東京都府中市, 北緯 $35^{\circ} 39'$, 東経 $139^{\circ} 28'$, 海拔 48m))において慣行栽培により試験を行った。

苗は各試験場の水田へ(1 株 1 個体, 30×15 cm (22.2 株 m^{-2})間隔で、大仙市では 5 月 11 日、つくばみらい市では 5 月 13 日、府中市では 5 月 26 日に移植した。硫安および複合化成肥料により 5 g N m^{-2} , 5 ないし 6 g P m^{-2} および 5 ないし 6 g K m^{-2} を基肥として施用した。試験区は 39CSSL およびササニシキを含む、完全配置 3 反復で行った。

各 CSSL およびササニシキの出穂期において、主茎の止葉葉身を採集し、液体窒素で急速凍結後 $-80^{\circ}C$ で保存し、その他主茎部分については採集後、 $80^{\circ}C$ で 3 日間乾燥した($n = 3$)。成熟期には登熟歩合を調査した。

CSSL を用いた QTL の特定

二元配置(CSSL の遺伝子型および栽培地点)分散分析および多重比較検定(ササニシキを対照とした Dunnett 検定)により, 各形質の CSSL およびササニシキとの間の平均の差を検定した. ササニシキと比較して 5%水準で有意な差を示した CSSL のハバタキ染色体置換部位を QTL と見なした. 更に, ササニシキと比較していかなる有意差も認められなかった CSSL のハバタキ染色体置換部位を除外し, QTL 領域をより狭く特定した.

後代 F₂ 集団を用いた QTL 解析

第 5 染色体上に RuBisCO 含量および NSC 濃度に関する QTL を保持していた CSSL, SL-417 を後代 F₂ 集団の親とした. 187 のササニシキ/SL-417 戻し交配後代 F₂ 集団は農林水産先端技術産業振興センターより譲与された. 2006 年 4 月 27 日に温室内で播種し, 5 月 18 日に東京農工大学 FM 本町水田に移植し, QTL 解析のため形質を調査した.

出穂期の止葉葉身の形態についてさらに詳細に調査し, 葉長 (FLL), 葉幅 (FLW), 葉面積計 (AAM-6, 林電工, 東京) による止葉葉面積 (FLA) および比葉重 (SLW) を調査した. QTL 解析は解析ソフトウェア QTL Cartographer 2.5 (Wang et al., 2006) を用い, LOD 値 2.5 以上を検出閾値とした. 後代 F₂ 集団において, 止葉葉身に関する形質について相関および偏相関分析を行った. QTL 命名基準は McCouch et al. (1997) に準拠した.

QTL-NIL の育成と表現型分析

後代 F₂ および F₃ 自殖個体から SSR マーカーを用いて選抜した, 後代 F₄ である QTL-NIL (*qRCH-5*) を育成した. 2007 年 4 月 27 日に温室内で播種し, 5 月 22 日に東京大学大学院農学生命科学研究科附属農場水田に移植した (30 × 30 cm, 11.1 株 m⁻²). 基肥として複合燐加安 (N: P₂O₅: K₂O = 12: 16: 18%) 50 g

m⁻²を代かき前に施用した。QTL-NILおよびササニシキは境界株を含む2反復7.8 m²の区画に3条植えた。それぞれの出穂期において、QTL-NIL (n = 15 × 2 反復) およびササニシキ(n = 4 × 2反復)の止葉葉身を採集し、RuBisCO含量の測定に供した。

RuBisCO 含量の測定

RuBisCO 含量の測定は、第1節における方法と同様の方法で行った。葉身サンプルは、各試験研究機関の栽培地から冷凍状態で輸送し、東京大学大学院農学生命科学研究科において測定した。

NSC 濃度の測定

NSC 濃度は、第1節同様 Sasaki et al. (2005)に準じた重量法により測定した。2005 年におけるCSSL 集団については出穂期の主茎ないし大分げつの稈および葉鞘全体について測定した。また、2006 年における後代 F₂ 集団については、出穂期および出穂 14 日後の第3 葉鞘について、NSC 濃度、乾物重、NSC 含量を測定した。

DNA マーカー解析

後代 F₂ 集団において、DNA はアルカリ抽出法により、分げつ期初期の葉身から抽出した(Wang et al., 1993)。連鎖地図に基づき(イネゲノムリソースセンター, 2003a)、SSR マーカーを用いて CSSL で特定した目標 QTL 領域における QTL 解析を行った。いくつかの判別困難 SSR マーカーについては代替させた(Sakata et al., 2000; McCouch et al., 2002; Buckler et al., 2006; Jaiswal et al., 2006; Cold Spring Harbor Laboratory and Cornell University, 2007; Rice Genome Research Program, 2007)。PCR はサーモサイクラー (GeneAmp 9700, Applied Biosystems Japan Ltd., 東京)により、Smart Taq DNA ポリメラーゼ (SP-1000, 日本ジェネティクス, 東京)を用いて行った。

結果

ササニシキ、ハバタキの表現型変異、CSSL の変異幅および 3 試験地点の F 検定

ササニシキの RuBisCO 含量, NSC 濃度, NSC 含量および登熟歩合は, 3 地点ともハバタキより低かった (Table 2-4). CSSL における表現型は, 3 地点とも広範な変異を示した. NSC 濃度を除いた 3 つの形質では, いくつかの CSSL の平均値はハバタキを上回っていた. 試験地点の効果の有意性について F 検定したところ, NSC 含量では有意な主効果が認められなかった. 一方, 他の形質では 0.1%水準で有意な主効果が認められ, 栽培地点間で大きな変異があることが示された.

置換染色体部位が近似する CSSL 数系統を用いた QTL 領域の特定

第 5 および第 6 染色体上において, ハバタキ染色体断片置換領域が隣接する 7 つの CSSL (SL-415 ~ SL-421) を比較群として, ササニシキとの間で二元配置分散分析および多重比較検定を行った (Fig. 2-3). すべての形質について, 遺伝子型 \times 試験地点間の有意な交互作用は認められず, 多重比較検定の前提条件が示された. SL-417 において, RuBisCO 含量, NSC 濃度, NSC 含量および登熟歩合はササニシキと比較して 5%水準以上で有意に増加していた. SL-417 は, 第 5 染色体中央部および第 6 染色体の短腕側にハバタキからの染色体断片置換領域を有していた. SL-416 では, NSC 濃度のみがササニシキと比較して有意に増加していた. 他方, SL-415, SL-418, SL-419, SL-420 および SL-421 において 4 つの形質ともササニシキとの間に有意な差は認められなかった. 従って, 第 5 染色体上において SL-417 が保持していたハバタキ染色体断片領域 (RM2185 ~ RM7452 間, 70.5 ~ 100.4cM) を QTL 領域と見なすことの合理性が示された.

Sasanishiki / SL-417 交配由来戻し交配後代 F_2 集団における更なる QTL 解析

CSSL を用いて検出された第 5 染色体上の QTL についてさらに詳細な位置特定をするため, 農林水

Table 2-4. Mean value for the investigated traits of the parent cultivars, range of CSSLs and *F* test at three locations.

Source	Location	Trait			
		RuBisCO content on the flag leaf at heading (g m ⁻²)	NSC concentration on the whole stem at heading (%)	NSC content on the whole stem at heading (mg)	Percentage of ripened grain (%)
Sasanishiki mean	Fuchu	1.68 ± 0.04	34.3 ± 0.9	202.8 ± 7.0	82.4 ± 3.3
	Tsukubamirai	2.21 ± 0.29	39.0 ± 3.0	189.0 ± 12.6	81.8 ± 9.1
	Daisen	1.57 ± 0.09	37.2 ± 1.4	196.2 ± 19.1	83.5 ± 4.8
Habataki mean	Fuchu	2.95 ± 0.08	43.1 ± 1.3	249.6 ± 8.5	90.1 ± 2.5
	Tsukubamirai	2.84 ± 0.32	45.6 ± 1.1	237.7 ± 16.2	91.4 ± 6.1
	Daisen	2.30 ± 0.33	47.5 ± 1.4	310.3 ± 29.2	88.8 ± 2.6
Range of CSSLs	Fuchu	1.24 - 2.67	30.3 - 41.5	134.2 - 289.6	79.9 - 94.9
	Tsukubamirai	1.30 - 3.29	32.4 - 44.6	146.2 - 289.6	62.5 - 91.1
	Daisen	0.71 - 3.10	32.2 - 45.8	150.9 - 306.2	80.3 - 94.4
<i>F</i> value	Generalize	22.6 ***	62.0 ***	2.1 ns	29.2 ***

Dextral values of parents mean indicate standard deviations. ns and *** indicate no significant and significant at 0.1% level on the *F* test at three locations.

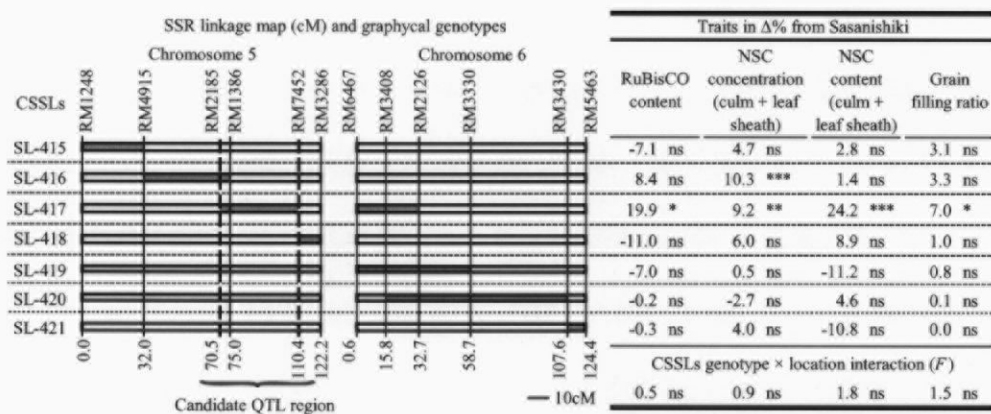


Fig. 2-3 The candidate QTL region for RC, whole NSC% and NSCC at heading, its graphycal genotypes on the chromosome 5 and chromosome 6 and phenotypic variation of each Sasanishiki / Habataki CSSLs from Sasanishiki mean value. White and gray region in graphycal genotype indicate Sasanishiki homozygous and Habataki homozygous, respectively. n.s., *, ** and ***; no significant, significant at 5, 1 and 0.1% level, different from Sasanishiki based on the two-way ANOVA with Dunnett's pairwise multiple comparison test using Sasanishiki as the control, respectively. Values in CSSLs genotype × location interaction (F) are *F* value based on two-way ANOVA, ns shows no significant interaction exist. SSR linkage map was constituted by RGRG (<http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/ineSHCSSL39.html>).

産先端技術研究センターより譲与された Sasanishiki / SL-417 交配由来戻し交配後代 F_2 集団を用いて QTL 解析を行った。

出穂期において止葉葉身の RuBisCO 含量に関する後代 QTL $qRCH-5$ が RM3476～RM7452 間に特定され、また、同じ位置に第 3 葉鞘の NSC 含量に関する QTL $qNSCCH-5-2$ が特定された (Table 2-5, Fig. 2-4)。NSC 含量に関するもう 1 つの QTL $qNSCCH-5-1$ は、RM1386～RM5642 間に特定された。また、出穂期の止葉比葉重に関する 3 つの QTL が特定された。出穂期において、NSC 濃度に関する QTL は検出されなかった。

出穂 14 日後において、NSC 濃度に関する QTL は、第 5 染色体上に 2 箇所、第 6 染色体上に 1 箇所特定された。出穂 14 日後における NSC 含量に関する QTL と NSC 濃度に関する QTL の位置は、完全に同じマーカー区間であった。第 6 染色体上において特定された QTL のハバタキ対立遺伝子による相加効果は負の方向性を示していた。加えて、出穂期から出穂 14 日後の間の NSC 含量の変化量 ($\Delta\%$) を算出 ($(\text{出穂 14 日後の NSC 含量} - \text{出穂期の NSC 含量}) / (\text{出穂期の NSC 含量} + \text{出穂 14 日後の NSC 含量}) \times 100$) し、QTL ($qNSCCDP-5$) を特定した。QTL 上の対立遺伝子効果の優性度について、 $qRCH-5$ (0.03)、 $qNSCCH-5-2$ (-0.10)、 $qNSCCAH-5-1$ (-0.25) および $qNSCCAH-5-2$ (0.29) は、ほぼ相加的と考えられた (Kenney-Hunt et al., 2006)。QTL の寄与率は、 $qNSCCAH-5-1$ (48.7) が最も高く、次いで $qNSCCH-5-1$ (37.6) であり、これらはともに RM1386～RM5642 間に位置していた。

相関および偏相関分析

Table 2-6 に、出穂期および出穂 14 日後の 187 の戻し交配後代における 11 形質間の相関および偏相関行列を示した。RuBisCO 含量は相関および偏相関ともに他の形質と極めて低い相関係数を示した。この後代 F_2 集団において、止葉の比葉重は葉面積との関係性は低かった。出穂期および出穂 14 日後の NSC 含量は、第 3 葉鞘の乾物重と NSC 濃度とも、それぞれ密接な相関関係および偏相関関係を

Table 2-5. Results of QTL analysis for further traits using 187 progeny F₂ population derived from SL-417 / Sasanishiki cross.

Growth stage	Trait	Chr.	Name of QTL	Marker interval	Map location (cM)	LOD	Effects on the phenotype			
							<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d</i> / <i>a</i>	<i>R</i> ² %
Heading	RuBisCO content on the flag leaf (g m ⁻²)	5	<i>qRCH-5</i>	RM3476 - RM7452	109.0	2.5	0.5	0.0	0.03	13.4
	Specific leaf weight on the flag leaf (g m ⁻²)	5	<i>qSLW-5-1</i>	RM2185 - RM1386	73.5	6.3	3.8	-2.3	-0.61	26.8
			<i>qSLW-5-2</i>	RM1386 - RM5642	80.5	4.8	3.6	-1.7	-0.47	23.8
			<i>qSLW-5-3</i>	RM3476 - RM7452	107.0	3.5	2.0	-2.0	-1.00	18.4
	NSC content on the third leaf sheath (mg)	5	<i>qNSCCH-5-1</i>	RM1386 - RM5642	88.5	2.6	3.7	44.0	11.8	37.6
<i>qNSCCH-5-2</i>			RM3476 - RM7452	109.0	2.8	31.5	-3.2	-0.10	13.2	
14 DAH	NSC concentration on the third leaf sheath (%)	5	<i>qNSCPAH-5-1</i>	RM1386 - RM5642	84.5	3.4	0.7	1.6	2.48	18.8
		<i>qNSCPAH-5-2</i>	RM5642 - RM3476	99.5	9.1	1.2	1.1	0.94	22.4	
	<i>qNSCPAH-6</i>	RM3408 - RM19609	28.8	10.0	-1.6	2.2	-1.34	21.3		
	NSC content on the third leaf sheath (mg)	5	<i>qNSCCAH-5-1</i>	RM1386 - RM5642	81.5	14.0	15.7	-3.8	-0.25	48.7
		<i>qNSCCAH-5-2</i>	RM5642 - RM3476	97.0	13.3	9.0	2.6	0.29	35.0	
	<i>qNSCCAH-6</i>	RM3408 - RM19609	30.3	8.5	-4.2	6.5	-1.56	16.6		
Heading - 14 DAH	NSC content in Δ%	5	<i>qNSCCDP-5</i>	RM5642 - RM3476	95.5	3.5	-6.1	-14.5	2.37	22.0

Chr.; chromosome number, *a*; additive effect of Habataki allele on each traits, *d*; dominant effect of the Habataki allele, *d* / *a*; degree of dominance, *R*²%; percentage of phenotypic variance explained by each QTL, DAH; d after heading.

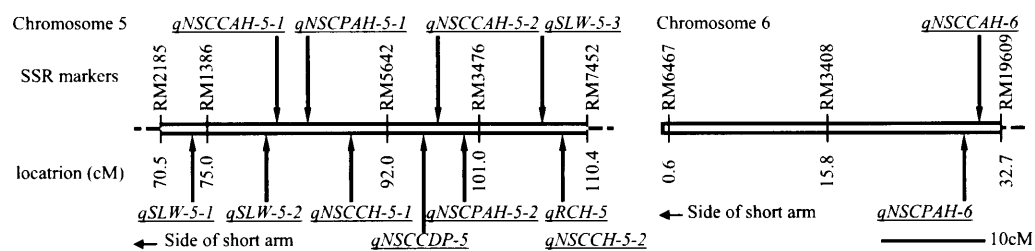


Fig. 2-4. Mapping progeny QTLs for further traits in the enlargement of the chromosome region substituted Habataki allele in SL-417. Large arrows indicate the position of progeny QTL. Alternative SSR markers in the present study are also shown. Small arrows indicate side of short arm.

Table 2-6. Correlation and partial correlation matrices of 11 traits investigated at heading and 14DAH among 187 progeny BC₁F₂ population.

Source	Stage / Trait	Heading								14DAH	
		RC	FLL	FLW	FLA	SLW	DWLS	NSC%	NSCC	DWLS	NSC%
Pearson's product moment correlation coefficient	Heading	FLL	0.06 ns	-							
		FLW	0.01 ns	0.48 ***	-						
		FLA	0.08 ns	0.97 ***	0.58 ***	-					
		SLW	0.21 **	0.31 ***	0.10 ns	0.32 ***	-				
		DWLS	0.16 *	0.67 ***	0.52 ***	0.74 ***	0.43 ***	-			
		NSC %	0.14 ns	0.09 ns	0.03 ns	0.08 ns	0.17 *	0.31 ***	-		
	14DAH	NSCC	0.18 *	0.53 ***	0.38 ***	0.57 ***	0.40 ***	0.88 ***	0.70 ***	-	
		DWLS	0.07 ns	0.06 ns	0.00 ns	0.02 ns	0.12 ns	0.05 ns	-0.03 ns	0.01 ns	-
		NSC %	-0.05 ns	0.06 ns	-0.08 ns	0.02 ns	0.03 ns	0.11 ns	0.07 ns	0.12 ns	0.52 ***
		NSCC	0.03 ns	0.07 ns	-0.03 ns	0.02 ns	0.08 ns	0.08 ns	0.00 ns	0.05 ns	0.93 ***
Partial correlation coefficient	Heading	FLL	-0.06 ns	-							
		FLW	-0.08 ns	-0.31 ***	-						
		FLA	0.05 ns	0.95 ***	0.38 ***	-					
		SLW	0.13 ns	0.05 ns	-0.13 ns	-0.03 ns	-				
		DWLS	0.00 ns	-0.13 ns	0.06 ns	0.21 **	0.05 ns	-			
		NSC %	0.01 ns	-0.03 ns	0.01 ns	0.05 ns	-0.03 ns	-0.91 ***	-		
	14DAH	NSCC	0.02 ns	0.07 ns	-0.02 ns	-0.11 ns	0.03 ns	0.96 ***	0.96 ***	-	
		DWLS	0.02 ns	0.03 ns	-0.01 ns	-0.03 ns	0.17 *	0.07 ns	0.06 ns	-0.07 ns	-
		NSC %	-0.03 ns	0.04 ns	-0.06 ns	-0.04 ns	0.13 ns	0.04 ns	0.03 ns	-0.03 ns	-0.95 ***
		NSCC	0.00 ns	-0.01 ns	0.03 ns	0.02 ns	-0.15 *	-0.05 ns	-0.05 ns	0.05 ns	0.99 ***

ns, *, ** and *** indicate non significant, significant correlation (two-tailed test) at 5, 1 and 0.1% levels, respectively.

示した。他方、一見単純な正の相関関係に見える第3葉鞘の乾物重とNSC濃度との関係（出穂期、0.31 および出穂14日後0.52）は、偏相関では排他的な関係性を示していた（出穂期、-0.91 および出穂14日後、-0.95）。出穂期におけるNSC含量と他の葉身形質との有意な相関関係は、偏相関でみた場合はすべて有意性が喪失された。

QTL-NIL(*qRCH-5*)の育成と出穂期における止葉葉身のRuBisCO含量増加に向けたQTLの検証

第5染色体RM4752周辺がハバタキホモ型になっているQTL-NIL(*qRCH-5*)を選抜した(Fig. 2-5)。
第6染色体RM3408周辺のハバタキホモ型領域は、取り除くことが困難であった。結果として、QTL-NILにおいて、出穂期の止葉葉身のRuBisCO含量はササニシキと比較して0.1%水準で有意に増加(+26.4%)した。

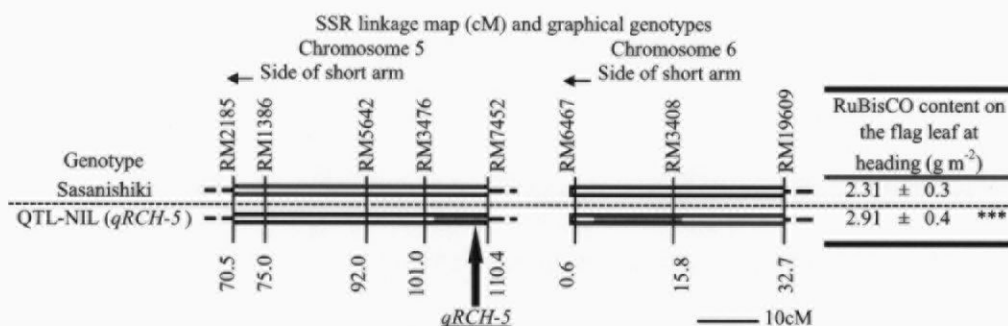


Fig. 2-5. Graphical genotypes of progeny F_4 of QTL-NIL (*qRCH-5*) for RuBisCO content derived from SL-417 / Sasanishiki cross and phenotypic difference from Sasanishiki. Gray white region indicate Habataki homozygous and Sasanishiki homozygous, respectively. The large arrow indicates the position of the QTL for RuBisCO content on the flag leaf at heading (*qRCH-5*). Small arrows indicate side of short arm. *** shows significant difference from Sasanishiki at 0.1% level (Independent, two-tailed, Student's *t*-test).

考察

本章では, CSSL 集団における多年度試験と, 戻し交配後代 F_2 集団を用い, RuBisCO 含量および NSC 濃度に関する信頼性の高い QTL を特定した. 本章第 1 節の結果より, 第 10 染色体上に Kasalath 染色体断片が移入された 4 つの CSSL とコシヒカリとの比較から RuBisCO 含量および NSC 濃度に関する QTL 領域を特定し (Fig. 2-1), それら QTL を保持していた SL-231 を戻し交配後代 F_2 集団の親として用い, 5 つの QTL を特定した (Fig. 2-1, Table 2-2). 測定誤差を考慮した Kenney-Hunt et al. (2006) の定義に従えば, *qRCH-10*, *qNSCLSH-10-1* および *qRCAH-10-1* における Kasalath 対立遺伝子効果は概ね相加的であると判断された. このため, これらの QTL における対立遺伝子効果は, 実際の育種においてソース機能向上に有用であると考えられた.

本研究で特定された, 第 10 染色体上において Kasalath 対立遺伝子効果による出穂期の RuBisCO 含量増加を伴う QTL *qRCH-10* は, これまでの日本晴/Kasalath 交配由来 BIL を用いた報告においては検出されていなかった (Ishimaru et al., 2001a). Ishimaru et al. (2001a) は, 出穂 5 日後および 25 日後の RuBisCO タンパクに関する QTL を第 1, 第 5, 第 8, 第 9 および 第 12 染色体上に検出した. CSSL 集団は他の QTL 解析集団よりも高い検出力を有することから (Ebitani et al., 2005), 本研究において検出された第 10 染色体上の *qRCH-10* は複雑な遺伝的交互作用の中から顕在化したと考えられた.

高等植物における RuBisCO は葉緑体ゲノムにコードされる大サブユニット (*rbcL*) および核ゲノムにコードされる小サブユニット (*rbcS*) 2 つのサブユニットから構成される (Spreitzer, 1999). 本研究における RuBisCO 含量は大サブユニットを測定したものであるため, 検出された RuBisCO 含量に関する QTL は葉緑体でコードされた *rbcL* 遺伝子の発現ないしは葉緑体での大サブユニットタンパクの蓄積にかかわる核ゲノム因子であると考えられた. Ishimaru et al. (2001a) は, RuBisCO 大サブユニット, 可溶性タンパクまたは葉身の総窒素含量に関する QTL は, *rbcS* などのような構造遺伝子に直接関係しない可能性を示唆した. 一方, 転写レベルにおいては *rbcS* が直接 *rbcL* の発現を制御するという仮説も提唱されている

(Rodermeier et al., 1996; Ishimaru et al., 2001a). しかしながら, Wostrikoff and Stern (2007)は, タバコにおいて大サブユニットの翻訳が, 翻訳後のタンパク質の膜透過における最終的なフォールディングや集合(アセンブリ)パートナーの存在によって活性化されず, むしろ翻訳の自己調節を受けることを示し, RuBisCO大サブユニットの翻訳は小サブユニットの利用できる割合に依存しない可能性を示した. 第10染色体において $qRCH-10$ の領域は $rbcS$ 遺伝子とは重複しなかった(National Bioresource Project and National Institute of Genetics, 2000; Buckler et al., 2006; Kurata and Yamazaki, 2006; Cold Spring Harbor Laboratory and Cornell University, 2007). 従って, 第10染色体におけるQTL上の遺伝子は, シグマ因子のように, 核ゲノムと葉緑体遺伝子発現とを結び付ける機能をもつ可能性が示唆された(Shirano et al., 2000).

低窒素条件で栽培したイネにおける光合成速度は主にRuBisCOタンパクの量に制限される(Makino et al., 1984; Ishii, 1995; Nurul Amin et al., 2002). イネにおいて, 最大光合成速度とRuBisCO含量との間の線形回帰は, 異なる窒素施肥水準および品種において, RuBisCO含量が $2.0 \sim 3.0 \text{ g m}^{-2}$ 以下の場合において観察されている(内田ら, 1980; Makino et al., 1994; Fukayama et al., 1996; Nurul Amin et al., 2002). また, RuBisCO含量が 4 g m^{-2} を超えると, 光合成速度との間の関係は増加が直線的でなくなる(Makino et al., 1994). 本研究においては, 窒素施肥水準 6 g N m^{-2} において, コシヒカリのRuBisCO含量は $1.4 \sim 2.2 \text{ g m}^{-2}$ 程度に分布していた. このため, 本研究で検出されたRuBisCO含量に関するQTLは, 環境保全型農業に繋がる可能性のある低窒素条件下で光合成速度を高めることに役立つものと考えられた.

本研究においてRuBisCO含量に関するQTLは出穂期だけでなく, 出穂14日後においても検出された. 出穂14日後のRuBisCO含量に関するQTL $qRCAH-10-1$ および $qRCAH-10-2$ は, 出穂期のRuBisCO含量に関するQTL $qRCH-10$ とは異なる領域に特定された. 特に, $qRCAH-10-2$ では, Kasalath対立遺伝子効果は優性度-1を下回る超劣性を示していた (Table 2-2, $d/a = -1.37$). これらのQTLの遺伝的効果は $qRCH-10$ よりも低かった. これらのQTL(RM258~RM7020およびRM7020~RM8202,

17.8～20.0 Mbps)は、珍汕97/武育粳2号交配由来倍加半数体を用いて検出された、出穂30日後における止葉葉身のstay-green性(相対的な出穂期以降の緑葉維持程度)に関する2遺伝子座間の相加エピスタシスQTL *rrgf10* (RM304～RM147, 18.4～20.7 Mbps)と染色体上の位置がほぼ一致した (Jiang et al., 2004). *rrgf10* において、インド型品種珍汕97による相加エピスタシス効果は、負の値を示していた。一方で、寄与率は2.03%しかなかった。

葉身の老化遅延、緑葉維持は条件によってはイネの多収に有用であるとみなされる (Jiang et al., 2004). 特に、出穂後14日間のソース能(個葉の光合成速度やRuBisCO含量)の維持の重要性が指摘されており、近年の品種の大部分は出穂14日後でも高いソース能を保持している(大杉, 2003). また、登熟期における同化産物供給は、登熟歩合に大きな影響を与える(翁ら, 1982; 楠谷, 1988). このため、今回同定された *qRCAH-10-1* および *qRCAH-10-2* のうち、*qRCAH-10-1* においてさらに詳細な対立遺伝子の由来を調査することで、葉身の老化遅延に寄与する情報としての利用が可能と考えられた。

出穂期におけるNSC濃度に関するQTL (*qNSCLSH-10-1* および *qNSCLSH-10-2*)は、*qRCH-10* の近傍に新たに特定された。Nagata et al. (2002b)は、ササニシキ/ハバタキ交配由来BIL集団を用い、稈および葉鞘のNSC濃度に関するQTLを第5および第11染色体上に特定したが、第10染色体においては検出されなかった。出穂期における稈および葉鞘のNSCは、ショ糖の輸送を含むデンプンおよび糖代謝のバランスによって制御されていると考えられる。第10染色体RM8201～RM5708間(13.5～14.2 Mbps)において検出された *qNSCLSH-10-1* は、いくつかのショ糖トランスポータ遺伝子の位置する領域に近接していた (National Bioresource Project and National Institute of Genetics, 2000; Aoki et al., 2003; Buckler et al., 2006; Kurata and Yamazaki, 2006; Cold Spring Harbor Laboratory and Cornell University, 2007). *qNSCLSH-10-1* がショ糖トランスポータ遺伝子そのものである可能性はあるが、さらに詳細なQTLのマッピングと関係性の解明が必要である。ササニシキ/ハバタキCSSL集団を用いた本研究では、RM8201～R716の間に於いて出穂14日後におけるNSC濃度に関するQTLは検出されなかった。この形質に関するQTLは存在しないか、または異なる染色体を含む他の領域に存在する可能性も考え

られる。

一般的に、QTLは関連する形質に多面発現的な反応をする。Nagata (2006)は、NSCに関するQTLにおいていくつかの多面発現効果を示唆した。本研究において、*qNSCLSH-10-1*、*qNSCLSH-10-2* および *qRCH-10* は近接する染色体領域に特定されたが、NSC濃度とRuBisCO含量との間有意な相関関係は認められなかった (Fig. 2-2, Table 2-3)。これらのソースおよび一時シンク機能に関するQTLについて、更なる遺伝的解析が必要であるが、実際の育種においてそれぞれの効果が相殺されることなく利用できる可能性が示唆された。

本章第1節の結果は、Ebitani et al. (2005)や本研究第1章において実証されたように、CSSL集団およびエピスタシス効果を小さく、あるいは、排除した後代F₂集団を用いたQTL解析の組み合わせの重要性を改めて示した。また、F₂やBILと比較してより少ない集団数(本研究においては39系統)で済むため、CSSLによるQTL解析は、RuBisCO含量やNSC濃度といった測定に多くの努力と時間を必要とする作物生理的な形質の遺伝分析を行うのに有用であることが示された。

第2節においても、CSSLおよび戻し交配後代によるQTL解析の組み合わせについて、いくつかの報告と同様に有用性が認められた (Bouchez et al., 2002; Wissuwa et al., 2002; Ando et al., 2008)。本節では、Ando et al. (2008)と同じ集団、手法を用いた。Ando et al. (2008)は、本手法における主たる意義を、複雑な形質に関する遺伝解析および染色体領域に特定された有用QTLを持つQTL-NILの開発を容易にすることにあるとした。

本研究では、ササニシキと7つのCSSLとの比較から、第5染色体上にRuBisCO含量およびNSC濃度等に関するQTL領域を特定した (Fig. 2-3)。更に詳細なQTL解析は、QTL領域におけるハバタキ染色体断片を保持していたSL-417にササニシキを戻し交配して作出した後代F₂集団を用いて行った (Fig. 2-4, Table 2-5)。結果として、RuBisCO含量およびNSC濃度等に関する10のQTLを特定し、4つの重要なQTL上の相加効果を検出した (*qRCH-5*、*qNSCCH-5-2*、*qNSCCAH-5-1* および *qNSCCAH-5-2*)。第5および第6染色体間のエピスタシス効果をQTL Network 2.0 (Yang et al., 2008)を用いて調査したが、

有意な効果は検出されなかった(データ省略)ことから、これらのQTL上における対立遺伝子効果は実際の育種への応用が可能と考えられた。本研究では実際に、直接後代 F_4 であるQTL-NIL(*qRCH-5*)を育成し、ササニシキと比較して出穂期のRuBisCO含量の+26.4%もの増加を実証した。

第2節で第5染色体上 RM3476~RM7452 間 (23.8~26.9 Mbps)に特定された出穂期におけるRuBisCO 含量に関する QTL *qRCH-5*は、これまでに行われた日本晴/Kasalath 交配由来 BIL 集団を用いて出穂5日後のRuBisCO 含量($g\ m^{-2}$)について解析した結果とは異なっていた(Ishimaru et al., 2001b)。彼らは、第5染色体上においては短腕側 C597~R1838 間 (0.2~3.3Mbps)において、全葉身窒素に対するRuBisCO タンパクの割合(%)に関する QTL を特定したが、RuBisCO 含量($g\ m^{-2}$)に関する QTL は第5染色体上には検出されなかった(Ishimaru et al., 2001b)。しかしながら、彼らの解析は12本の染色体上に245のRFLPマーカーを用い(本研究ではすべて共優性のSSRマーカーを第10染色体上に使用)、QTLのLOD値も低く(1.41~3.3, 多くは(10のQTLにおいて)2.0程度。本研究ではLOD値の閾値は2.5以上とした)、単点分析と一般線形モデルに基づいていた(本研究では複合区間マッピング法)。こうした実験方法の違いのためにIshimaru et al. (2001b)はRuBisCOに関するQTLを検出できなかったと考えられる。

現在情報のある第5染色体上のRuBisCOに関する遺伝子について、RuBisCO大サブユニットの候補遺伝子(P0636F09.13)は21.0 Mbpsに位置し、また、RuBisCO大サブユニットバインディングタンパクに似た前駆体タンパクを発現する遺伝子(AT5G56500)は22.9Mbpsに位置し、本研究におけるRuBisCO含量に関するQTLの位置とは異なっていた(National Bioresource Project and National Institute of Genetics, 2000; Buckler et al., 2006; Jaiswal et al., 2006; Kurata and Yamazaki, 2006; Cold Spring Harbor Laboratory and Cornell University, 2007)。これらの結果は、本研究で特定されたQTLの新奇性を強調するものである。更に重要な点は、RuBisCO含量が他のいかなる葉身形質とも重要な相関および偏相関関係を示さなかったという事実から、葉面積あたりのRuBisCO含量の増加が、単純に葉が厚くなった結果ではなく、RuBisCOタンパク量自体がQTLの効果によって増加していた可能性が示された点

にある (Table 2-6). 本研究では, 基肥 5 g N m^{-2} 施肥条件下でササニシキの RuBisCO 含量は $1.6 \sim 2.9 \text{ g m}^{-2}$ 程度であった. これらのことから, 第1節で特定された *qRCH-10*と同様に, 本節で特定された *qRCH-5*も低窒素条件下において光合成速度を増加させるのに役立つ可能性があることが示された.

RuBisCO 含量, NSC 濃度に関する QTL について, 第1節における 39 コシヒカリ/Kasalath 交配由来 CSSL においては第10染色体上に特定され, 第2節における 39 ササニシキ/ハバタキ交配由来 CSSL においては第5染色体上に特定され, それぞれ異なっていた. 本章で用いた2つの CSSL 集団は, 正逆交配したもう1組の往復 CSSL 集団 (Kubo et al., 2002) がないため, 反復親であるコシヒカリまたはササニシキの対立遺伝子効果に由来する QTL については, CSSL 集団を用いた比較の段階では全く検出できず, 供与親である Kasalath または ハバタキの対立遺伝子効果に由来する QTL のみが検出出来る. QTL は, イネの QTL が トウモロコシ や ソルガム と 相同する など 進化における同祖性が見出せる一方で, 環境条件の相違や, 交配親が異なれば検出される QTL が異なることが有り得る (鶴飼, 2000). 本研究における2組の CSSL 間における QTL の相違は, Nagata et al. (2002b) による報告と本研究の結果との一致を鑑みると, 同じインド型でも, 早生種 (aus, 秋米) で長稈, 脱粒性を残す Kasalath と, 多収型改良品種であるハバタキの間のゲノム構成の差異が影響していると考えられた.

後代 F_2 集団において検出された出穂期の第3葉鞘の NSC 含量に関する QTL *qNSCCH-5-1* (RM1386~RM5642, 20.0~22.2 Mbps) および *qNSCCH-5-2* (RM3476~RM7452, 23.8~26.9 Mbps) は, 2つの領域にそれぞれ特定された (Table 2-5, Fig. 2-4). *qNSCCH-5-1* は出穂期に検出された QTL の間で最も高い $R^2\%$ 値 (37.6%) を示した. *qNSCCH-5-2* は, RuBisCO に関する QTL *qRCH-5* と完全に位置が重複した. 興味深いことに, これら2つの QTL は, これまでの報告でササニシキ/ハバタキ BIL において検出された NSC 含量および個体全体の稈および葉鞘の総 NSC 量に関する QTL (20.1 および 26.0 Mbps, Buckler et al., 2006; Jaiswal et al., 2006; Cold Spring Harbor Laboratory and Cornell University, 2007) とよく似た領域に位置していた (Nagata et al., 2002b). これらの QTL 領域においては, 登熟歩合 (Xiao et al., 1996; He et al., 1999), 整粒歩合 (Septiningsih et al., 2003) および

収量(Li et al., 1997; Zhuang et al., 1997; MacMillan et al., 2006)など多くの QTL が報告されている。さらに重要なことに、本研究で検出された第 5 染色体上の QTL *qNSCCH-5-1* は、登熟歩合に関連する QTL *rg5*(R2558~R372 間, 13.0~18.0Mbps)と近接していた(Ishimaru et al., 2005)。また、日本晴の遺伝的背景において、*rg5*上に Kasalath 対立遺伝子を保持する NIL*rg5* は、実際に日本晴よりも群落の炭水化物含量が高かった (Ishimaru et al., 2005)。これらの事実は、この QTL 領域について今後遺伝的解析および実際の育種において利用する上で高い潜在的可能性があることを示している。興味深いことに、QTL *qNSCCH-5-2* の領域は、26.3Mbps (National Bioresource Project and National Institute of Genetics, 2000; Dian et al., 2005; Buckler et al., 2006; Jaiswal et al., 2006; Kurata and Yamazaki, 2006; Cold Spring Harbor Laboratory and Cornell University, 2007)に位置する starch synthase IV 遺伝子 (*OsSSIV-2*, AY373258)を含んでいた。*OsSSIV-2*は主にイネの葉身で発現するが、その他貯蔵器官および非貯蔵器官においても発現している (Dian et al., 2005)。Hirose et al. (1999) は、イネの葉鞘のソースからシンクへの移行において、第 6 染色体上に位置する可溶性デンプン合成酵素前駆体 cDNA, D16202 (Baba et al., 1993)を用いて mRNA レベルを調べ、可溶性デンプン合成酵素を含むデンプン合成に関わる ADP グルコースピロホスホリラーゼやブランチングエンザイムなどの mRNA レベルと第 3 葉鞘におけるデンプン蓄積および減少時期が一致することを確認した。

第2節において、出穂14日後におけるNSC濃度および含量に関する6つのQTLが特定された (Table 2-5, Fig. 2-4)。戻し交配後代F₂集団における第3葉鞘のNSC濃度および含量の平均値は、出穂期から出穂14日後にかけて大きく低下した (35.8%から20.8%, 80.7mgから46.4mgにそれぞれ低下)。出穂期および出穂14日後において、NSCに関する形質間に有意な相関および偏相関関係は認められなかった (Table 2-6)。また、NSCの濃度および含量に関するQTLについて、出穂期と出穂14日後の2つの時期の交互作用をQTL Network 2.0 (Yang et al., 2008)によって推定してみたが、有意なQTL × 生育時期間の交互作用は認められなかった (データ省略)。一方で、出穂期と出穂14日後のNSC含量の変化量 (Δ%) に関するQTLが検出された。これらのことは、この集団において出穂期におけるNSCに関するQTLと出穂14日後に

おけるQTLの性質が全く異なることを示唆していた。また、出穂14日後において第6染色体上に検出されたNSC濃度および含量に関するQTLにおけるハバタキ対立遺伝子効果はともに負の方向性を示していた。出穂14日後における第6染色体上のNSC濃度および含量に関するQTL領域は、CSSLにおいてSL-417だけでなくSL-419およびSL-420も保持していたが、ササニシキと比較して有意なNSC濃度および含量、登熟歩合の増加は認められなかった。また、出穂期と出穂14日後のNSC含量の変化量($\Delta\%$)に関するQTLは第5染色体に検出されたことから、これら第6染色体上のQTLが直ちに蓄積されたNSCのアンローディングおよび利用において有効に働いているとは考えにくい。

QTLの多面発現は、一般的によく似た形質において相関関係をもたらすが、出穂期のRuBisCO含量およびNSC含量に関する2つのQTL、*qRCH-5*および*qNSCCH-5-2*は、同じマーカー区間に検出されながら両形質間に有意な相関および偏相関関係は認められなかった(Fig. 2-4, Table 2-5, 2-6)。単相関では、NSC濃度と葉鞘乾物重の間では低い正の相関が認められた。しかしながら、偏相関分析の結果からは、NSC濃度と葉鞘乾物重の間で相反する関係性が示唆された(Table 2-6)。本研究では葉鞘乾物重に関するQTLは検出されなかった。これらの形質に関するQTLにおける独立した関係はQTLを育種に結びつける上で望ましいものであると考えられた。