



Title	イネ
Author(s)	稲垣, 言要
Citation	低温科学, 67, 43-52 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39091
Type	bulletin (article)
Note	1章 植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養 8
File Information	67-009.pdf



[Instructions for use](#)

8. イネ

稲垣 言要¹⁾

本章では、ポストゲノム時代に向けて整備されたイネの突然変異系統や遺伝解析用の種子系統について、その概要と入手法を中心に紹介する。後半は、筆者の研究室で行っているイネ栽培法を実例として示す。

Bio-resources in Rice Research Area and Tips for Cultivation of Rice

Noritoshi Inagaki

In 2004, International Rice Genome Sequencing Consortium finished to determine whole rice genome sequence, which means the beginning of a new era for rice functional genomics. In this issue, I'd like to introduce several bio-resources that will certainly contribute to the post genome era, namely core collections, introgression lines and mutant lines of rice.

8.1 はじめに

イネ属 (*Oryza* 属) は 22 種 (種として独立して記載すべきか議論のある種も含む) から構成され、その中で栽培種は、アジア原産で世界的に栽培されている *O. sativa* と西アフリカ原産でその地域でのみ栽培されている *O. glaberrima* の 2 種だけで、それ以外は野生イネにあたる¹⁾。本章では、*O. sativa*、特にジャポニカ、水稻の話が中心となるが、可能な限り野生イネなど多様なイネのリソースについても紹介したいと思っている。

2004 年に国際コンソーシアムによってイネ (日本晴) の全ゲノム配列が決定され²⁾、これによりイネは、3 大穀物 (イネ、コムギ、トウモロコシ) としての地位に加え、モデル植物としての地位を確立する地歩をつかんだと言える。この流れに呼応するように、ゲノム配列を活用するための解析ツールが次々と構築され、それを活用した成果が徐々に生み出されている。本章の前半では、これらの解析ツールの内、特に種子の形で配布されているリソースについてその概要と入手法について述べる。

8.2 種子の保管・分譲機関

研究用のイネ種子の保管と管理、分譲を業務として行っている日本の主要な公共機関としては、農業生物資源研究所に設置されている農業生物資源遺伝バンク

(ジーンバンク http://www.gene.affrc.go.jp/index_j.php) とイネゲノムリソースセンター (リソースセンター <http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/jp/>)、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) のイネ部門をあげることが出来る。

農業生物資源研究所のジーンバンクは、植物・動物・微生物資源の探索収集を行い、特性を評価し、さらには増殖して配布までを行う組織として 1985 年に設立された。現在、イネ類に関しては 4 万 4 千件を越える遺伝資源を登録、保管しており、このような大量の種子を確実に管理するために、機械化された種子管理システムを導入している (図 1)。リソースセンターは、*Tos17* 突然変異系統、イネ遺伝解析材料 (BILs, DHLs, CSSLs 系統、詳細については後述)、イネ完全長 cDNA クローンの管理と配布を行っている。ともに農業研究を行う独立行政法人内に設置された拠点であることから、栽培イネをベースにしたコレクションが充実しており、農業研究に資するリソースが供給できる体制となっている。

一方 NBRP は、これまで国立遺伝学研究所や理化学研究所、あるいは各大学の研究室において個々に収集保存されていたバイオリソースをデータベース化し、各研究者に提供できる体制を確立することを目的に 2002 年から始まったプロジェクトで、その全体像については、ホームページ (<http://www.nbrp.jp/>) から見る事ができる。イネ部門は、遺伝学研究所 系統生物研究センターを中核に運営されており、イネの統合データベース Oryzabase (<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp>) が、系統検索や分譲依頼ページ

1) 独立行政法人 農業生物資源研究所 植物科学研究領域 光環境応答研究ユニット

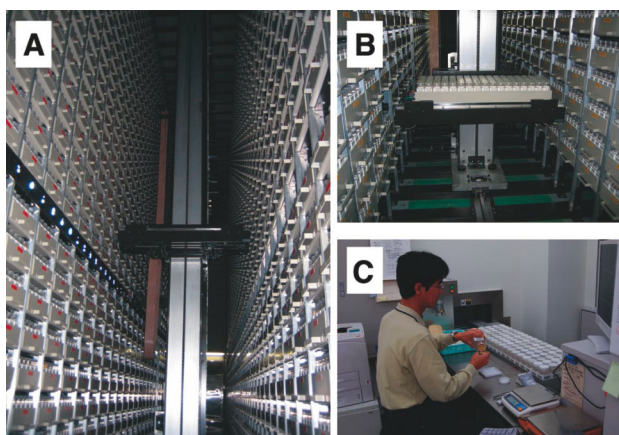


図1：農業生物資源ジーンバンクの種子管理システム。A：全自動リフトが設置された種子庫内の様子。庫内は氷点下1°C、湿度30%に保たれている。B：リフトが種子ケースを引き出しているところ。C：種子の出庫作業。全ての操作は管理端末から行える。ケースには5×17個の種子ボトルが収納されており、その全てがバーコードで管理されている。（写真提供：農業生物資源研究所 ジーンバンク 知花高志氏）

への入口となっている。参画している研究機関がこれまでに収集してきた遺伝資源がコレクションの核となっているので、保管機関ごとに特色のある多様な遺伝資源の供給が可能となっている。

8.3 イネ研究の解析ツールとして整備された種子系統

この節では、コアコレクションや遺伝解析用の種子系統、イネ突然変異系統など、新しい研究ツールとして注目されている研究材料について紹介し、その入手方法について述べる。

8.3.1 コアコレクション

イネと一言で言っても、その栽培（生息）地域は熱帯から温帯にまで広がっており、耐乾性の強い陸稲もあれば、洪水になっても生き残る浮きイネもある。栽培イネを全滅させるような病原菌に対して抵抗性を示すイネも存在する。この驚異的とも言える能力は遺伝子に書き込まれているのだが、このような遺伝子の多くは、近代育種の過程で失われていったものが多いと推定され、現在栽培されている品種の中に見出すのは難しい。逆の言い方をすると、野生イネや在来栽培種（古い時代に栽培されていた品種）には、近代品種が失った農業形質を向上させる遺伝子が数多く埋もれていることを示している。さて、これを探索することを考えた場合、一体どの品種から解析を始めればいいのか？ また、どの程度の品種数を解析した段階で結論を得ればいいのか？ など、一

般の研究者では判断が難しい問題に直面する。そこで、バイオリソースの保管機関では、このようなニーズに応えるべく、全コレクションから多様性を失わないように注意しながら品種の絞り込みを行って「核となる品種のセット」を作り上げた。これがコアコレクションで、様々な機関で構築され、配布されているものもある³⁾。

まずはNBRPイネ部門で作られている、野生イネのコアコレクションについて紹介する。このコレクションは、野生イネ18種と、ゲノム構成AA, BB, CC, BBCC, CCDD, EE, FF, GG, HHJJの9型の全てを含み、典型的で生息域が広い品種で構成するというコンセプトで作られた。このコレクションには、研究の目的やスケールに合わせて3つのランクが用意されている。ランク1は44の代表的アクセッションからなり、ランク2は64の代表的なアクセッションを含んでいる。加えて、さらに多くのアクセッションを調査する必要がある研究者のために、169のアクセッションからなるランク3も整えられた。これらの中から、自らの研究目的や規模に合わせて取り寄せを行えば良い。Oryzabase (<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp>) から分譲依頼が行える。

一方、農業生物資源研究所は、栽培イネに特化したコアコレクションを構築している。このコレクションは、代表的な品種や系統のセットであればよいというコアコレクションの考えをさらに拡張し、DNAマーカーを用いた多型解析によって、客観的に多様性を評価しながら選抜したもので、その結果、ジーンバンクが保有するコレクション全体の遺伝的多様性と同一レベルの多様性を維持したコアコレクションが構築された³⁾。現在、農業生物資源研究所からは、69品種で構成される世界のイネ品種⁴⁾と50品種で構成される日本在来イネ品種⁵⁾の2つのコアコレクションが配布されている。分譲依頼の手続きは農業生物資源研究所のジーンバンクのホームページで確認して欲しい。

8.3.2 遺伝解析用材料

イネを栽培化し、育種している過程は強い選択圧にさらされており、その結果、脱粒性が失われ、生産性が向上し、洗練された草型や食味を獲得することができた。その一方で、数多くの有用な遺伝子が失われていったことは前節でも述べた。これらの失われた重要遺伝子を座乗位置まで含めて再発見するために、野生種と栽培種、あるいは、古い栽培品種と新しい栽培品種、インディカとジャポニカを交配して得られたイントログレーション系統 (introgression lines) と呼ばれる研究材料が最近注目されている。さらに、これらの系統は、ゲノム育種(テ-

ラーメイド育種)の遺伝資源としても大きく期待されている⁶⁻⁸⁾。

まずは、図2Aを用いて、この節で用いる専門用語の解説から試みたい。イネを交配すると、F1個体は両親から遺伝子を半分ずつ引き継ぐ。その自殖後代であるF2は、確率的には両親から50%ずつ遺伝情報を引き継ぐが、遺伝子座一つ一つを見てみると、花粉親由来の座もあれば、ヘテロの座、母親由来の座もある。そのF2種子について単粒系統法で自殖を繰り返させると、花粉親由来の染色体部分と母親由来の染色体部分がモザイク状になった系統群ができあがる。これをRILs(Recombinant Inbred Lines:組換え自殖固定系統群)と呼ぶ。一方、F1を戻し交雑すると、戻し交雑に使った親(反復親)に由来する遺伝子座が増える。こうしてできたBC1F1やBC2F1について単粒系統法で自殖させると、RILsに比べて反復親由来の染色体部分が多い系統ができあがる。これをBILs(Backcross Inbred Lines:戻し交雑自殖系統群)と呼ぶ。次にDHLs(Doubled-Haploid Lines:半数体倍加系統群)のメリットを紹介しよう。単粒系統法による自殖でRILsもBILsも大部分がホモの領域となっているが、それでもヘテロの領域を完全には除去しきれない。時に、その残ったヘテロ領域が解析に支障を与えることもある。DHLsは、F1個体の花から薬を取り出して培養するとともに染色体を倍加させて作りあげる。初期の世代からヘテロ領域がないため、ヘテロに由来する問題が生じない。しかし、薬培養から再分化にかけて技術的に難しいステップがあるので、作られる事例は少ない。最後に、染色体断片置換系統群CSSLs(Chromosome Segment Substitution Lines)を説明する。この系統群は、遺伝子マーカーを用いてどの染色体部分が供与親(P2)のゲノム由来かをモニターしながら戻し交雑を続け、染色体の一領域だけが供与親(P2)由来で、残り全ての遺伝背景が反復親(P1)に戻ったものを集積し、それで全ゲノム領域をカバーするように組み合わせたものである(図2B)。その構築には膨大な時間とエネルギーが必要であるが、染色体の入れ替え構造が単純なために、遺伝子探索には非常に有効な研究資源となっている。実際、イネで作られたイントログレーション系統は、出穂期を決める遺伝子¹⁰⁾や脱粒性遺伝子¹¹⁾の同定に大きく貢献した。さらに、コシヒカリ/Kasalath(反復親:コシヒカリ)のCSSLsからは、出穂期を調節したコシヒカリ系品種が迅速に育成されている¹²⁾。このように、イントログレーション系統は、基礎研究から育種研究までの広い範囲で活用できる重要な素材となっている。

農業生物資源研究所のリソースセンター (<http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/jp/>)では、栽培品種間の交配で作られた置換系統群(表1)を分譲している。

また、NBRPイネ部門では、九州大学が中心となって、日印の栽培品種間でRILsを4系統、CSSLsを2系統構築している。加えて、オリザ属内の異種交配(*O. sativa* × *O. glumaepatula*, *O. sativa* × *O. glaberrima*, *O. sativa* × *O. meridionalis*)で構築されたCSSLsやRILsも作り上げており、分譲を受けられる。野生イネのコアコレクション同様、Oryzabaseから分譲依頼が行える。

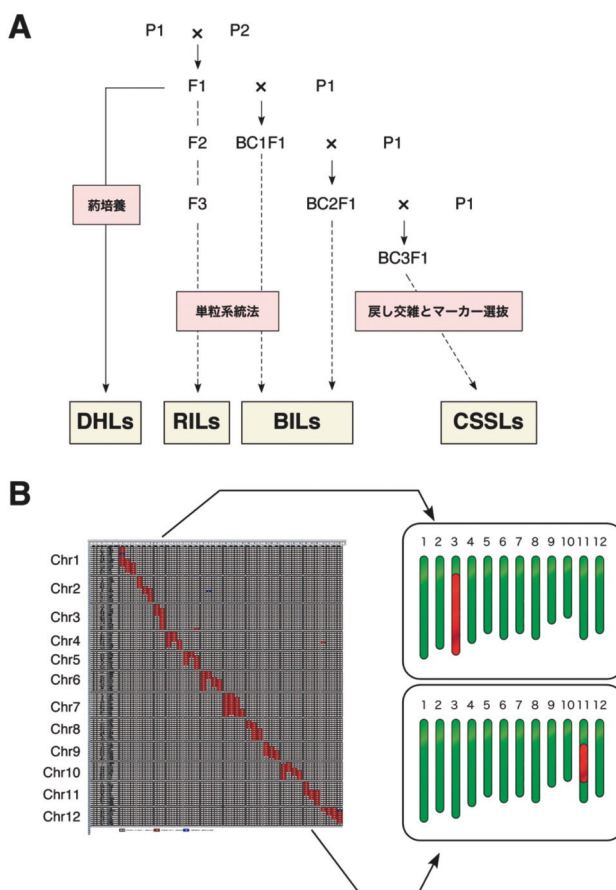


図2: イントログレーションラインの概念. 論文⁹⁾の図4を改変. A: DHLs(半数体倍加系統群), RILs(組換え自殖固定系統群), BILs(戻し交雑自殖系統群), CSSLs(染色体断片置換系統群)構築の概念を模式的に示す. B: CSSLs(染色体断片置換系統群)の概念を模式的に示す. 左の図の縦軸は染色体が1番(Chr1)から12番(Chr12)までを模式的に表し、横軸はCSSLsの各系統を示す. DNAマーカーによる解析を行い、各系統の染色体の構成を調査し、各系統における染色体の由来をプロットした. 白は反復親由来の領域を、赤は供与親由来の領域を示し、青はヘテロ領域を示す. 右は、各CSSL系統の染色体構成のイメージ. 緑色は反復親由来の領域、赤色は供与親由来の領域を示す。

表 1：農業生物資源研究所のリソースセンターから配布される置換系統群⁷⁾

交配組み合わせ	集団	繰り返し親	系統数
日本晴/Kasalath	BILs	日本晴	98 系統
日本晴/Kasalath	CSSLs	日本晴	54 系統
コシヒカリ/Kasalath	BILs	コシヒカリ	182 系統
コシヒカリ/Kasalath	CSSLs	コシヒカリ	39 系統
コシヒカリ/NonaBokra	CSSLs	コシヒカリ	44 系統
ササニシキ/ハバタキ	BILs	ササニシキ	85 系統
ササニシキ/ハバタキ	CSSLs	ササニシキ	39 系統
アキヒカリ/コシヒカリ	DHLs		212 系統
日本晴/コシヒカリ//コシヒカリ	BILs	コシヒカリ	127 系統
日本晴/コシヒカリ//日本晴	BILs	日本晴	79 系統

8.3.3 イネ突然変異系統

8.3.3.1 変異イネ

NBRP イネ部門には、分譲可能な突然変異系統が 8192 ライン登録されている。これらのラインは、アルキル化剤の一つ、メチルニトロソウレア (N-methyl-N-nitrosourea: MNU) を受精直後の花に処理することによって誘導された突然変異体で、水稻の品種「金南風」及び「台中 65 号」を用いて作られた¹³⁾。これらは、九州大学遺伝子資源開発研究センターにおいて作出されたもので、各系統の形質は調査されており、表現型から検索して絞り込むことが出来る。アルキル化剤による変異誘発のため、変異の中心は 1 塩基置換で¹³⁾、loss-of-function だけでなく gain-of-function 変異が得られることも期待される。近年、1 塩基多型を検出できる TILLING (Targeting Induced Local Lesion IN Genomes) 法¹⁴⁾が開発されているので、これを活用することによって、map-based cloning などの遺伝学的解析を踏まずに変異遺伝子を同定できる可能性も出てきた。分譲依頼は、<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/nbrpStrains/kyushuGrc.jsp> からオンラインで行える。分譲依頼後、九州大学と申請者が所属する機関とで MTA (Material Transfer Agreement 分譲同意書) を交わすことになり、その後、種子を受領することになる。

8.3.3.2 ノックアウトライン

数多くの研究者が、T-DNA や *Ac/Ds* などのトランスポゾンやレトロトランスポゾン *Tos17* をゲノム上に転移させることで挿入変異を導入した系統群を整え、それらは分譲されており、有効な研究資源となっている。特に、個々の系統におけるトランスポゾンなどの挿入位置は inverse PCR 法や tail PCR 法などによって決められ、それが挿入部位の隣接配列 (FST=fanking sequence tag) としてデータベース登録されるようになった。その配列情報は、既に Rice Annotation Project

Database: RAP-DB (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) や Rice Functional Genomics Express Database: RiceGE (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE>) などの統合データベースにおいて、ゲノム配列に対応付けられており、ゲノム上のどこにタグの挿入されたラインが存在するかを簡単に検索できるようになっている。まずは、これらのデータベースを入り口として、研究対象の遺伝子が破壊されたラインの有無を調査すると良い。

ここでは、イネ本来が持つレトロトランスポゾン *Tos17* による挿入変異系統である農業生物資源研究所のミュータントパネルを紹介する。この系統群はイネ内在性の転移因子を活用しているために遺伝子組換えに関する制約を一切受けないメリットがある。遺伝子組換え生物の取り扱い設備が限られている研究機関にとっては有効な研究資源になるだろう。後半には、韓国の POS-TECH (Pohang University of Science and Technology) から分譲されている T-DNA の挿入変異系統の取り寄せについて述べる。

8.3.3.2.1 レトロトランスポゾン *Tos17* ミュータントパネル

イネの内在性レトロトランスポゾン *Tos17* の転移を培養によって活性化させ¹⁵⁾、ゲノムあたり平均 8 コピーまで増幅させた後に再分化して作成された「日本晴」遺伝子破壊系統を総称してミュータントパネルと呼ぶ。これまでにおよそ 5 万系統の変異株が作出され、これによってイネ遺伝子の 50% が破壊された変異系統のプールができたと推定されている。*Tos17* 挿入隣接配列は、24000 件読まれてデータベース化されているので、目的遺伝子近傍への *Tos17* の挿入の有無が即座に解析できるようになった¹⁶⁾。また、例えば目的遺伝子近傍に *Tos17* 挿入配列が見いだされなくとも、変異株から単離した DNA を三次元的に混合したスクリーニング用 DNA の分与を受け、それを鋳型として目的遺伝子 primer と

Tos17 primer の組み合わせで PCR 増幅すれば挿入変異株が見つかる可能性も残されている。変異系統の検索、各系統の表現型確認、種子分譲依頼が、*Tos17* ミュータントパネルデータベース (<http://tos.nias.affrc.go.jp/~miyao/pub/tos17/>) から可能となっている。なお、各ラインの種子がどの研究者に分譲されたかについてはホームページ上で公開されるシステムになっている。

リソースセンターから送られてくる種子は 20 粒程度なので、世代促進して採種する必要がある。これらの種子は再分化当代なので、変異がホモ、ヘテロ、なしのものが 1:2:1 の比で分離する。それぞれの個体の一部から DNA を抽出し、サザン解析等で目的の変異がホモかヘテロかを確認しながら世代促進する。致死性や不稔を与える変異の場合、変異をヘテロの状態で維持しなければならないので、ヘテロラインも処分せずに温存しておくことをお勧めする。

このラインを用いる上での注意点は、目的の遺伝子に *Tos17* が挿入されている以外にも複数カ所に *Tos17* が挿入されていることを認識しておくことであり、その影響を注意深く除去しなければならない。このためには、別の挿入変異株を探して共通の表現型を示すことを確認するか、戻し交雑して *Tos17* 挿入部位を目的遺伝子のものに減らしてから確認するなどの努力が必要である。

8.3.3.2.2 T-DNA タギングライン

韓国の POSTECH (浦項工科大学, Pohang University of Science and Technology) の Gynheung An 教授は、ジャポニカ品種、Dongjin と Hwayoung を用いて T-DNA の挿入ライブラリーを作り上げた¹⁷⁻²⁰。T-DNA の挿入部位の隣接塩基配列が網羅的に読まれており、FST としてデータベース登録されている。このライブラリー作成に用いられたベクターは 4 種類で、その特徴を表 2 に示す。エンハンサー配列を持つベクター (pGA2715 and pGA2772) で作出されたライン^{17,20} では、T-DNA の挿入によって遺伝子破壊が引き起こされるだけでなく、T-DNA 挿入部位近傍の遺伝子に activation tagging の効果が現れる可能性もあるので注意が必要である。

これらの系統は遺伝子組換えイネであることから、受け入れを考えるならば、まずは遺伝子組換え実験計画書を作成し、所属機関から実験の許可を得るなど周到な準備が必要である。また、これらの種子の輸入は、遺伝子組換え生物の搬入に当たるので、そのための手続きも完了させなければならない。

遺伝子組換え実験が許可されたならば、具体的な入手手続きに進む。手順は、POSTECH RISD (Rice T-DAN

Insertion Sequence Database, <http://www.postech.ac.kr/life/pfg/risd/index.html>) に記載されている。具体的には、POSTECH に分与依頼の電子メール (sookan@postech.ac.kr) を出し、MTA フォームをホームページからダウンロードして 2 部作成し、両方を An 教授に送付する。この 2 部のうち 1 部については、An 教授がサインしたものが、種子と一緒に返送されてくるので請求者側の資料として保管しておく。

MTA フォームの送付先:

Gynheung An

Department of Life Science

Pohang University of Science and Technology

Pohang, 790-784, Republic of Korea.

通常は、検疫手続きが完了したイネが国際郵便で届く。(郵便開封前に検疫手続きがなされているかを確認しよう。検疫手続きがなされていない場合、絶対に開封せずに、所属機関の遺伝子組換え実験安全担当者に連絡して指示を受ける。その後、最寄りの植物防疫所に持参して、検疫手続きを完了させることになる。各自の研究機関と植物防疫所との間の往復も、遺伝子組換え生物の搬出と搬入に当たることに注意してほしい。これを防ぐためにも、種子を送る封筒には「Rice Seeds」など、植物種子が在中されていることを明記してもらうようにリクエストしておこう。)

送られてきた種子は 20 粒程度であり、実験に入る前に一世代増殖ステップを取り、実験によってはホモラインを確立する必要がある。なお、Dongjin と Hwayoung は、日本でも問題なく育ち採種できている。

2007 年 4 月に分譲を受けた時のやり取りでは、POSTECH RISD で管理されているイネ種子のうち 20% 程度に、データベース登録された位置に T-DNA が挿入されていない系統が混在していることが書かれていた。このため、世代促進中にイネ個体より DNA を単離し、T-DNA がデータベース通りに挿入されているかを検証しておく必要もある。なお、POSTECH においても再配列解析が進められているので、このような T-DNA の非挿入ラインの数は、今後減っていくと思われる。

表 2: POSTECH の T-DNA 挿入系統に使われているベクター¹⁷⁻²⁰

VECTOR	用途・特徴
pGA2707	promoter trapping
pGA2715	activation tagging/ promoter trapping
pGA2717	bidirectional gene trapping
pGA2772	activation tagging vector

8.3.3.2.3 それ以外のタギングライン

POSTECH 以外にも数多くの研究機関がタギングラインを作成している。今回は、それらのホームページを紹介するにとどめる。

Oryza Tag Line (T-DNA, <http://urgi.versailles.inra.fr/OryzaTagLine/>)

Rice Mutant Database (T-DNA, <http://rmd.ncpgr.cn/>)

Shanghai T-DNA Insertion Population (T-DNA, <http://ship.plantsignal.cn/index.do>)

Zhejiang University (T-DNA, <http://www.genomics.zju.edu.cn/ricetdna.html>)

University of California Davis, Sundaresan Lab. (*En/Spm*, *Ac-Ds*, http://www.plb.ucdavis.edu/Labs/sundar/Rice_Genomics.htm)

Taiwan Rice Insertional Mutants Database (T-DNA, <http://trim.sinica.edu.tw/>)

CSIRO Plant Industry Internet (T-DNA, <http://pi.csiro.au/fgrttpub/>)

これらに加えて、FOX Hunting System (Full-length cDNA Over-expression gene hunting system イネ完全長 cDNA を網羅的にイネ内で過剰発現させるシステム) などのプロジェクトも進行中で、これらの遺伝子組換えイネ系統も共同研究をベースにすれば分譲を受けられる。また、近い将来には、このような開発中リソースも公開される時代が来ると予想され、ますますイネリソースが充実してくることが期待される。

8.3.3.2.4 その他の国からの輸入

植物防疫所のホームページ (<http://www.maff.go.jp/paps/index.html>) によると、イネ属 (*Oryza* 属) 種子の輸入は制限が多いことがわかる。籾殻が付いた状態で輸入できるのは、韓国、北朝鮮、台湾からだけである。

それ以外の国からの輸入は不可能なのだろうか。ホームページなどによると、以下の条件を満たすならば、上記3地域以外からでも輸入する道が残されていることが示されていた。①輸出国政府機関が発行した植物検疫証明書を取っていること、②その国から輸入しなければならない理由があること、③籾殻やわらの部分(輸入禁止品)、土が完全に除去された玄米であること、④健全な外見で、病気の痕跡や昆虫などの混入が見られないことである。この条件を満たした種子を国際郵便(小包郵便物、小形包装物)で送付してもらう。その際、外装には「植物在中」と明記してもらうことと、輸出国で所得した植物検疫証明書を外に貼付してもらうことが重要だ。これにより輸入時には植物検疫が行われ、この検査に合格す

れば輸入が認められる。このように条件は厳しいものの、しっかりと条件を満たせば輸入できるので、どうしても取り寄せることが必要な場合は、最寄りの植物防疫所にご相談のうえ、挑戦してみたいはいかがだろうか。

8.3.4 イネ種子の入手法のまとめ

ここで紹介したリソースは、長い年月をかけて世界中から収集されてきた品種群であったり、膨大な時間と労力を払って構築されてきた系統群である。分譲を受けた後は、取り交わした MTA や規則を遵守することはもちろんであるが、敬意を持って研究ツールとして有効活用したい。分譲システムの活用によって大きな成果が生み出されれば、リソースコミュニティの健全な発達にも資するので、分譲を受けるだけでなく、その恩返しとして、上手に使うことで大きな成果を上げていただければと思う。

これら以外にも、イネの特殊な系統を保有する研究室は数多く、共同研究をベースにすれば、それらのリソースの分譲を受けることも可能になるだろう。これらについては、個別に問い合わせをしていただきたい。

8.4 イネ栽培法

8.4.1 概論

研究機関・研究者ごとにイネの栽培方法には流儀があり、各研究者が自らの研究目的や研究環境に合わせて、いろいろと工夫しながら栽培を行っているのが実情である。ここではまず、筆者の研究室で日本晴や農林8号に適用している栽培法を紹介する。これ以外にも栽培法を記したプロトコルブック²¹⁾もあるし、いろいろなホームページに栽培のヒントは埋め込まれている。これらの資料も参考に取り組んでいただければと思う。あと、健全なイネを育成するためには、栽培の実務や原理を知っていたほうが良い。このための参考書として、農業高校向けの栽培の教科書²²⁾が向いているので、こちらも一読しておくことをお勧めする。野生イネは、栽培イネに比べて、その栽培には数多くの注意点がある。野生イネに挑戦する方は、遺伝学研究所の野生イネ栽培プロトコル (<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/nbrpStrains/nigProtocol.jsp>) も参考にさせていただきたい。

イネは亜熱帯原産の作物であり、育種によって生み出された新品種を活用することで栽培地域が段階的に北上し、現在は、その北限が北海道の北東端にまで達している²³⁾。しかしながらこのことは、地域ごとに栽培に適した品種が異なることも意味している。全ゲノム配列が決定

された日本晴は、北海道の屋外で採種まで栽培することは困難で、ガラス温室やグロースチャンバーなどの設備が必要となるだろう。研究場所や研究環境によっては、品種選定にも注意が必要である。

グロースチャンバーで栽培する際には、栄養生長を促進するために長日条件を与えることが多いが、限界日長（これ以上明期が長くなると、もはや出穂しなくなる明期の長さ）には注意したい。日本晴の場合、限界日長は15時間付近と思われ²⁴⁾、たとえば16時間明期を与え続けると出穂しなくなるので、採種を考える場合には明期の長さについても考慮が必要である。筆者は、14時間30分の明期（28°C）と9時間30分暗期（23°C）のサイクルを与えることが多く、この場合、日本晴で播種後90日目周辺に出穂する。一方、開花促進は、短日処理するのが最も容易で効果的である。8～10時間明期の処理を2週間与えれば、そのおよそ1ヶ月後には出穂がもたらされる。

8.4.2 育苗

[準備]

- ① 枠付きの育苗箱(図3 プラグトレイ、ピットトレイなどで代用可能)
- ② 育苗土(住友化学 合成粒状培土ボンソル2号など)
- ③ イネ種子
- ④ 次亜塩素酸溶液

[休眠打破]

1年以上乾燥状態で保存されていたイネ種子の休眠は打破されている。しかし、採種直後の新鮮な種子や野生イネの種子の場合は休眠が深く、打破する処理が必要となる。この場合、種子を40°Cで数日間、通風乾燥すればよい。野生イネの場合は、低めの温度（35°C以下）で通風乾燥しないと発芽率が低下すると指摘している文献²¹⁾もある。

[種子の選抜]

種子は、比重が大きく充実しているものほど発芽率が良く、その後の生育も良好である。生化学実験に用いる材料などを均一に育成したい時などは、塩水選と呼ばれる比重を基準にした選抜法で登熟不良の種子をあらかじめ除去しておくが良い。具体的には、水0.9lに塩化ナトリウム（食塩）240gを溶かして比重1.13g/mlの塩水を作り、この溶液に沈む種子だけを用いる。

[発芽処理]

2倍希釈した次亜塩素酸溶液に15分間浸し、弱く振盪しながら滅菌する。籾殻などには病原菌や害虫が混在し

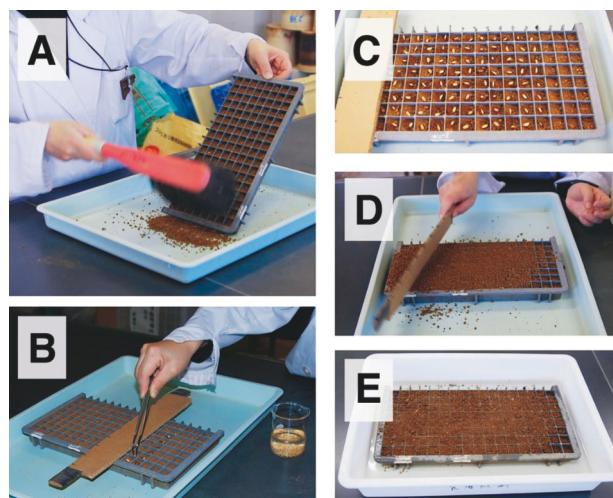


図3：枠付き育苗箱への播種 A：育苗箱に8割がた土を詰める方法。その後に播種し(B, C)覆土して(D)完成(E)。

ていることが多いため、この滅菌処理は確実にやりたい。種を水道水で洗ってから水中に沈め、28°Cに設定したインキュベーター内で2日間吸水させる。この水は毎日取り替えた方がよい。48時間後には、種子は鳩胸状態を示すようになる。

[播種と栽培]

私たちの研究室では、数多くの系統を一つの育苗箱に植えられるように、枠付きの育苗箱を使っている(図3)。プラグトレイ、ピットトレイという名で売られている農業資材の中には代用できるものがある。育苗箱に8割程度となるよう育苗土を詰めたものを用意する。育苗箱に8割がた育苗土を詰めるには、箱を傾けてブラシをかけると良い(図3A)。種子を1枠に1個ずつ投入し、作業後に覆土する。育苗箱をバットに置き、箱が半分程度沈むくらいまで水を満たす(図3E)。発芽してくるまでは、育苗箱を完全に水没させないように注意したい。28°Cに保ったグロースチャンバー、あるいは温室にて、2～3週間程度栽培する。茨城県つくば市において屋外でイネ栽培をさせる場合、この育苗作業は、遅くとも5月中旬までにスタートさせないと採種するのが厳しくなる。

8.4.3 プール栽培

ここでは、水田圃場を持たない研究者にも比較的容易にイネを栽培して採種することができる、屋外でのプール栽培法を紹介する。

[準備]

- ① 木枠(図4A 幅21cm厚さ2.5cmのラワン材をカットして枠としたもの。筆者の研究室では、125

cm×230 cmの木枠を使っていて、これに50個(5×10個)のポットを沈めて50個体のイネを育てる。この時の株間は25 cm程度である。これ以上ポットの個数を増やすと、株間が近くなりすぎて分げつ(枝分かれ)の発生が抑えられるなど生育にはマイナスの効果が出る(図4 E)。なお、このサイズのプールに水を満たすとおよそ600 lで、その重量は600 kgとなるので、設置場所には注意する。また、枠の4隅はしっかりと固定しておかないと、水の重さで壊れることがある。

- ② ビニールシート(厚さ0.4 mm くらいのビニールシート。サイズは木枠の大きさによる。木枠にかぶせて、ビニールの端を木枠の下にしっかりと押し込むこと。図4 B)
- ③ ポット(1/5000 アール ワグネルポット、あるいは、ポリエチレン製でバケツ型の3.5 lポリポット)
- ④ 育苗土(住友化学 合成粒状培土ボンソル2号など)

[移植と栽培]

前節の育苗法で2~3週間育てたイネを移植する。移植は、どうしても根を傷つけてしまうので、根が張り、吸水能力が回復するまでのイネは弱々しく、栽培には注意が必要である。通常の栽培イネでは、根が伸びて活着するためには日平均気温が12°Cを越えている必要がある。そこで、屋外で栽培する場合、移植は日平均気温が12°Cを越えてから行うこと。茨城県つくば市で栽培する場合は、4月中旬頃から移植が可能となる。また移植直後は、根の傷みからイネの吸水能力が低下しているので、数日間、プールの水位を高めにした方が良い。イネは活着すると葉や分げつを規則的に増やし、旺盛に育つ。

イネは生育ステージによって水の必要量が大きく異なる。イネの品種が一定で、生育が揃っていれば、栄養生長後期にはプールの水位を下げ、いわゆる中干しを行っても良い²²⁾。これにより土壤に酸素が供給され、土壤中の硫化水素や有機酸などの有害物質の含量が低下し、根が健全に保たれる。ただし、生殖生長期に入ると必要水量が増すので、その時期までにはプールの水位を上げ、渇水させないような注意が必要だ。生育ステージの揃っていないイネや、出穂期の異なるイネを同一プールで栽培する場合は、常時満水で栽培した方が問題は少ない。屋外で栽培すると、どうしても雑草が生えて来るので、大きくならない内に引き抜いて処分しよう。

[施肥]

ボンソル2号など、肥料を含んでいる育苗土を用いた

場合、移植直後は含有された肥料を使って育つ。移植後30日程度経過すると葉色が薄くなって来る。これは肥料不足の兆候なので、追肥を行う。私たちの研究室では、「888」とラベルされた粒状の化成肥料(肥料重量の8%が窒素、8%がリン、8%がカリウムであるように調整されている)をポット1個あたり6 ml与えている(ファルコンチューブを下から6 mlのところまでカットし、そのチューブですり切り1杯で6 mlとしており、5 gに相当する)。過剰な施肥は、病害虫の蔓延の原因となるので、葉色をよく確認してから施肥するかを決めている。葉色が濃緑色を保っている場合は追肥せず、しばらく様子を見た方が良い。移植70~80日目あたりに再度、同様の追肥を行う。

[病気と害虫、防鳥など]

種子膨潤時に次亜塩素酸により滅菌処理を確実にを行い、また、育苗土も市販の滅菌された物を使えば、初期生育における病害虫の発生は確実に防ぐことが出来る。しかしながら、長い栽培期間には病気や害虫が発生することもある。これを初期に発見し、確実に防除するためには専門的な知識が必要なので、近隣の農業研究者や農業従事者の方に支援を依頼できる体制があると心強い。あと、出穂するまでには防鳥網を張るなど、スズメの被害に対する対応が必要である。

[採種と保管]

一般的な栽培品種を6月に移植すると、8月には出穂が始まる。収穫は、出穂後40日から50日の間に行うのが良い。その頃には籾の色は黄色になり、種子は固く締まっている。それ以前では、未登熟で緑色の種子(青米)が多く、遅くなると、胚乳が割れたり茶褐色の種子が増加する。私たちの研究室では、刈り取った穂を1個体ごとに束ねて、ガラス温室(28~30°C)内に設置した金属網の上で1週間から10日かけて乾燥してから脱穀して保存している。100粒の重さ(百粒重)と得られた全種子の重さを測定することによって種子の概数が計算できる。種子は個体ごとに封筒に入れ、それをシリカゲルの入った密閉容器に収めて保存している。1年未満の短期保存の場合は室温でもよいが、長期保存を考えるならば10°C以下に設定された低温で保管することが望ましい。乾燥状態を保つために、毎年、保存容器のシリカゲルは交換すること。低湿度でかつ低温で保管することが出来れば、10年以上にわたって高い発芽率を保つことが示されている²⁵⁾。

最後に、野生イネの場合の注意点を述べる。野生イネ

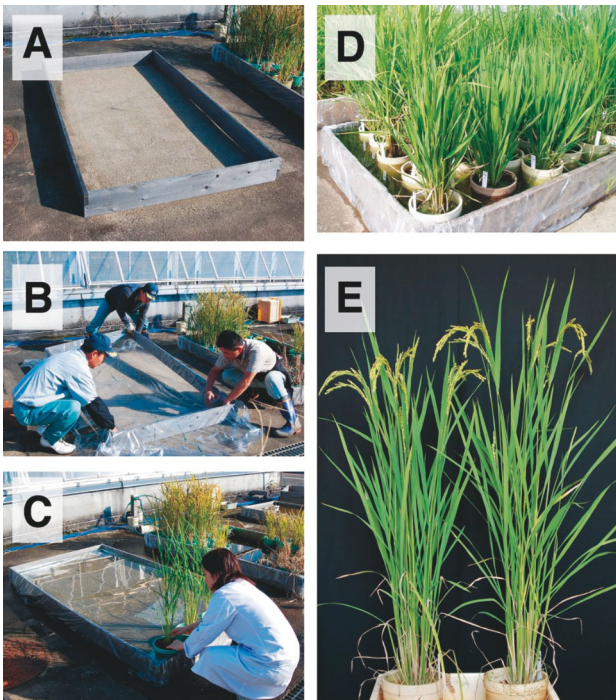


図4：プール育苗の手順 A：木枠を設置したところ。木枠にビニールを敷いて (B)，完成後に水を張って植物を設置する (C)。D：7月末に撮影したプールの様子。E：プールで育てたイネ（日本晴）の草姿。左が株間 25 cm（標準）で、右が株間 18 cm（密植状態）で育てたもの。分けつ（枝）の数は、標準が 21 本、密植が 15 本。標準個体からは 1355 粒採種できたが、密植個体からは 1085 粒しか取れなかった。株間 25 cm の方が、草姿が良く、多数の種子をつけることが明らかになった。

は他殖性が強く脱粒するものも多いので、穂が出てきたら袋掛けをすることが必要となる。この際、籾の表面にカビが生えやすくなるので、なるべく通気性の良い袋を選んだ方がよい。

8.4.4 無菌育苗

ここでは、イネを無菌的に発芽させ、幼苗を得る手法を説明する。種子の滅菌手順はカルスを誘導する時にも使うことができる。

[準備]

- ① 籾すり機 (図 5 AB 実験規模に合わせて用意する。ごく少数の種子を扱う場合は、手やピンセットで籾を剥がすこともできる。)
- ② プラントボックス (図 5 C マヨネーズ瓶などでも代用可能)。中に水寒天 (0.4% agar 50 ml) を入れ、オートクレーブ滅菌しておく。
- ③ イネ種子
- ④ 70%エタノール、次亜塩素酸溶液、滅菌水、ピンセット、滅菌済み濾紙

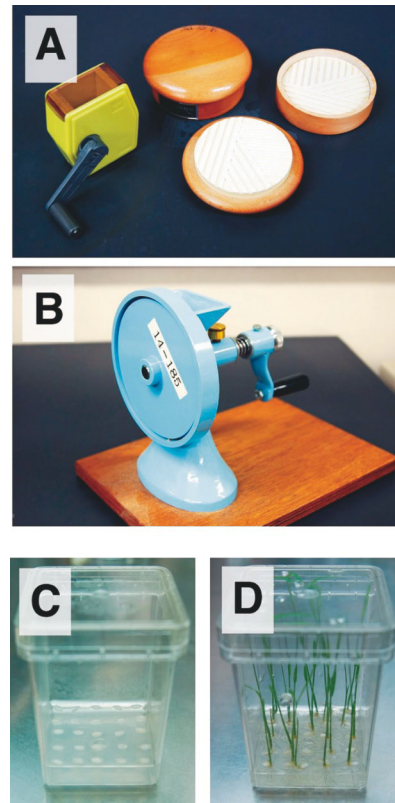


図5：無菌育苗の手順 A：1穂用籾すり機のいろいろ。右は、籾すり機を開いたところ。中に 100 粒程度の種子を入れて蓋をし、蓋を上から押さえつけながら回す。B：1株用籾すり機。1000～2000 粒の籾すりのための装置。上の皿に種子を投入しながら、ハンドルを回して籾すりを行う。C、D：無菌育苗の実例。Dは、プラントボックスに播種後 28°C 白色光下で 7 日間栽培した時の状態。

[発芽処理]

籾すり機でイネ種子から籾を除去する。種子を 70%エタノールに 1 分間浸した後、2 倍希釈した次亜塩素酸溶液に 15 分間 2 回浸漬して雑菌類を完全に死滅させる。滅菌処理が行き渡るように弱く攪拌しながら行った方がよい。クリーンベンチ内で滅菌水を用いて種子を洗浄し、種子の余分な水分を滅菌済み濾紙で吸い取った後に、プラントボックス内の水寒天培地上に置く (図 5 C)。0.4% agar は極めて柔らかいため、種子を埋め込まなくとも根は自然に培地中に入り込む (これよりも高濃度の水寒天培地や、ゲランガムなど固い培地を使う場合、種子を培地内にしっかりと埋め込まないと根は培地内に入り込まないので注意が必要である。)

[栽培]

28°C 白色光下など適当な条件で栽培する。筆者は、 γ 線で変異誘導した日本晴の M2 種子を上記の方法で発芽処理し、赤色光下 28°C で 7 日間栽培し、その時の幼葉鞘

(coleoptile) の長さの違いから *phyB* 変異株を単離することに成功した²⁶⁾。幼苗で表現型解析する場合,特に無菌的に解析をおこないたい時には良い実験系と考えている。なお,このように育てた個体も移植することができる。

8.5 おわりに

筆者は,11年前にイネとは無縁の研究室から農業生物資源研究所に移り,イネの研究を始めることになった。以後,自らの研究テーマの流れに従い,イネ幼苗を育て,そこからタンパク質を単離したり遺伝子を単離したり。時には変異株を単離し,その系統を維持し,その系統の解析のために圃場に出たり,ついには交配を行ったりと,少しずつイネの解析技術を体得して今日に至っている。これらの全ては,数多くの方々から手取り足取り教えていただいた技術であり,お名前が書ききれないのが残念だが,まずは,その方々に感謝の気持ちを伝えたい。

この章は,これまで得た知識を,私に教えてくれた先輩同様に上手く伝えたいと思う気持ちから書き始めた。しかしながら,書き進むにつれ,根っからのイネ研究者でなく,経験も豊富とは言えない立場であることを痛感し,不安を覚える毎日であった。もしこれをきっかけにイネ栽培に取り組まれる方がいるとするならば,私としてもコミュニケーションを取りながら,より良い栽培法を模索して行けたらと思っている。このためには,ご経験者のコメント,アドバイスも大切と感じていて,これらをいただくことができるならば,さらにうれしいと思っているしだいである。

参考文献

- 1) 森島啓子「ポピュラー・サイエンス 237 野生イネへの旅」,裳華房,2001,p.2.
- 2) International Rice Genome Sequencing Project, *Nature* **436** (2005) p.793.
- 3) 江花薫子,農業技術 **61** (2006) p.113.
- 4) Y. Kojima, K. Ebana, S. Fukuoka, T. Nagamine, & M. Kawase, *Breeding Sci.* **55** (2005) p.431.
- 5) K. Ebana, Y. Kojima, S. Fukuoka, T. Nagamine, & M. Kawase, *Breeding Sci.* **58** (2008) p.281.
- 6) 山本敏央,矢野昌裕,科学 **77** (2007) p.607.
- 7) 矢野昌裕,育種学研究 **9** (2007) p.135.
- 8) 服部洋子,芦荊基行,蛋白質 核酸 酵素 **53** (2008) p.1881.
- 9) 矢野昌裕「改訂3版 モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編」,秀潤社,2005,p.53.
- 10) M. Yano, S. Kojima, Y. Takahashi, H. Lin, & T. Sasaki, *Plant Physiol.* **127** (2001) p.1425.
- 11) S. Konishi, T. Izawa, S. Y. Lin, K. Ebana, Y. Fukuta, T. Sasaki, & M. Yano. *Science* **312** (2006) p.1392.
- 12) Y. Takeuchi, T. Ebitani, T. Yamamoto, H. Sato, H. Ohta, H. Hirabayashi, H. Kato, I. Ando, H. Nemoto, T. Imbe, & M. Yano, *Breeding Sci.* **56** (2006) p.405.
- 13) T. Suzuki, M. Eiguchi, T. Kumamaru, H. Satoh, H. Matsusaka, K. Moriguchi, Y. Nagato, & N. Kurata, *Mol. Gen. Genet.* **279** (2008) p.213.
- 14) A. J. Slade, S. I. Fuerstenberg, D. Loeffler, M. N. Steine, & D. Facciotti, *Nature Biotech.* **23** (2005) p.75.
- 15) H. Hirochika, K. Sugimoto, Y. Otsuki, H. Tsugawa, & M. Kanda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996) p.7783.
- 16) A. Miyao, K. Tanaka, K. Murata, H. Sawaki, S. Takeda, K. Abe, Y. Shinozuka, K. Onosato, & H. Hirochika, *Plant Cell* **15** (2003) p.1771.
- 17) D. H. Jeong, S. An, H. G. Kang, S. Moon, J. J. Han, S. Park, H. S. Lee, K. An, & G. An, *Plant Physiol.* **130** (2002) p.1636.
- 18) S. An, S. Park, D. H. Jeong, D. Y. Lee, H. G. Kang, J. H. Yu, J. Hu, S. R. Kim, Y. H. Kim, M. Lee, S. Han, S. J. Kim, J. Yang, E. Kim, S. J. Wi, H. S. Chung, J. P. Hong, V. Choe, H. K. Lee, J. H. Choi, J. Nam, S. R. Kim, P. B. Park, K. Y. Park, W. T. Kim, S. Choe, C. B. Lee, & G. An, *Plant Physiol.* **133** (2003) p.2040.
- 19) C. H. Ryu, J. H. You, H. G. Kang, J. Hur, Y. H. Kim, M. J. Han, K. An, B. C. Chung, C. H. Lee, & G. An, *Plant Mol. Biol.* **54** (2004) p.489.
- 20) D. H. Jeong, S. An, S. Park, H. G. Kang, G. G. Park, S. R. Kim, J. Sim, Y. O. Kim, M. K. Kim, S. R. Kim, J. Kim, M. Shin, M. Jung, & G. An, *Plant J.* **45** (2006) p.123.
- 21) 奥野員敏「改訂3版 モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編」,秀潤社,(2005) p.30.
- 22) 堀江武「農学基礎セミナー 新版 作物栽培の基礎」,農山漁村分科協会,(2004)
- 23) 蓬原雄三「UP BIOLOGY イネの育種学」,東京大学出版会,(1990) p.69.
- 24) K. Ikeda, *JARQ*, **18** (1985) p.164.
- 25) 椎名次男,江花薫子,坂口進,生物研究資料 **16**(2001) p.1.
- 26) M. Takano, N. Inagaki, X. Xie, N. Yuzurihara, F. Hihara, T. Ishizuka, M. Yano, M. Nishimura, A. Miyao, H. Hirochika, & T. Shinomura, *Plant Cell* **17** (2005) p.3311.