

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07252

研究課題名(和文) 相同染色体近傍領域間相互作用によるイネ雑種弱勢の原因遺伝子単離と解析

研究課題名(英文) Molecular cloning and characterization of complementary causal genes of hybrid weakness of rice located in a homologous chromosomal region

研究代表者

久保山 勉 (Kuboyama, Tsutomu)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：10260506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：岡らによって報告されたイネ雑種弱勢は第11染色体のほぼ相同な領域に座乗するHwa1-1とHwa2-1によって生じる。本課題はこれらの遺伝子の単離を目的として実施された。長鎖の配列を出力する次世代シーケンサーを用いた塩基配列解読結果を高密度連鎖解析によって絞り込まれた位置情報に基づき解析し、HWA1領域の配列の連なり(contig)を構築することができた。Hwa1-1領域は、日本晴と比較して20kbpの欠失が認められた。HWA2については1つのcontigにまとめることができず、3つのcontigに分かれた。Hwa2-1の領域は日本晴のゲノム配列とは構造が大きく異なっていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Oka reported that epistatic interaction between Hwa1-1 and Hwa2-1 cause a hybrid weakness of rice and we have shown that these causal genes located on the almost the same region of chromosome 11. This research project aimed at molecular cloning of Hwa1-1 and Hwa2-1. DNA sequence of the donor plants of these two genes were analyzed by PacBio DNA sequencers. DNA sequences of DNA markers used in fine mapping of these two causal genes were used as queries of homology search against DNA sequences derived from the donor plants using software BLAST (NCBI). As a result, a contig of Hwa1-1 was constructed and it had 20 kbp deletion in comparison with the Nipponbare genome sequence. On the other hand, the chromosomal structure of Hwa2-1 region had large difference with that of Nipponbare homologous region, and we could not construct a contig covering the Hwa2-1 interval.

研究分野：植物育種学

キーワード：雑種弱勢 Oryza sativa イネ 生殖隔離 遺伝子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

雑種弱勢は、生殖隔離の1つであり、正常な系統間の雑種第一代における弱々しい生育と定義され、表現型によっては、雑種致死や雑種ネクロシスと呼ばれることもある。雑種弱勢は交雑育種の障害となる一方で、種分化の原動力の一つであるため、昔から育種学者、遺伝学者、進化学者の関心を引いてきた¹⁾。雑種弱勢は適応度を下げたため、単一の遺伝子が原因である場合を説明することが難しい。そのため、「1組の生殖隔離遺伝子は、当初別々の集団で淘汰を受けない中立な遺伝子として生じる」という Dobzhansky・Mullerモデル(1939～1942) (以降 DMモデルと略す) によって生殖隔離原因遺伝子の出現が説明されている(図1)。この現象を説明する遺伝子は多くの植物で報告があり、多くは2つの遺伝子座であるが、中には1遺伝子座によって雑種弱勢が生じるという報告もある。DMモデルによって2遺伝子座であれば淘汰を受けない中立な遺伝子として生殖隔離遺伝子が出現することを説明できるが、1遺伝子座の場合は対立遺伝子間で相互作用が生じる場合でのみ説明が可能となる。イネの日印交雑における雑種不稔は北村、池橋、荒木によって提唱された1遺伝子座モデルと岡らによって提唱された2遺伝子座モデルの間で論争があった^{2、3、4)}。池橋らによって1遺伝子座とされていた雑種不

稔遺伝子S5については近年、密接に連鎖した3つの遺伝子のKiller-Protector相互作用によることが明らかにされ⁵⁾、染色体のミクロなレベルでは雑種不稔原因遺伝子の成立はDMモデルで説明できることが示された。一方、シロイヌナズナの二量体以上で働く膜貫通型リン酸化酵素(RLK)遺伝子のOAKは雑種における発現パターンの変化と細胞外ドメインの構造の違いのために雑種で葉の形成に異常を起こす⁶⁾。インディカ品種間で、HWA1とHWA2の2つの遺伝子座によって説明される雑種弱勢はイネで最初に報告された雑種弱勢である⁷⁾。申請者らの連鎖解析の結果、これら2つの遺伝子座はどちらも第11染色体長腕に位置し⁸⁾、日本晴の塩基配列上で240kb以内に位置することが明らかになった⁹⁾。そのため、HWA1、HWA2による雑種弱勢はこれまであまり例が多くない1遺伝子座の対立遺伝子間の相互作用によって生じている可能性がある。そのため、HWA1とHWA2を研究することによってDMモデルで説明されてこなかった、1遺伝子座の対立遺伝子間相互作用によって生じる生殖隔離の例を分子レベルで解明できるかもしれない。しかし、HWA1とHWA2の存在する領域を日本晴のアノテーションデータベース

(RAP-DB)で見ると雑種弱勢原因遺伝子の染色体領域によく見られるレトロトランスポゾンなどの繰り返し配列やNB-LRR型の病害抵抗性遺伝子などが含まれていた。一般的にこのような領域は、品種間で染色体構造が大きく異なっており、組換えの抑制が生じるため、連鎖解析により遺伝子の位置のみによって遺伝子を特定することが困難であると予想された。

また、申請者らは生物研ジーンバンクの世界イネコアコレクション(WRC)における両遺伝子の分布を調査し、Hwa1-1をもつ品種の原産国はインド、ネパール、ブータン、ミャンマー、中国、フィリピン、インドネシア、

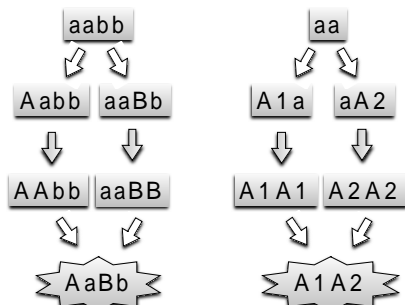


図1. Dobzhansky-Mullerモデル(左)と1遺伝子座モデル(右) 大文字は雑種弱勢の原因となる対立遺伝子

アメリカであって日本型品種とインド型品種、中間型品種が存在したことを報告した¹⁰⁾。弱勢遺伝子の有無は検定系統との雑種第一代における葉の黄化、少分げつ、短稈などから判断したが、弱勢程度には大きな品種間差異が認められた。

引用文献

- 1) Bomblies & Weigel (2007) *Nature Reviews Genetics* 8: 382-
- 2) 北村英一(1962) 稲遠縁品種間雑種の不稔性に関する遺伝学的研究.中国農試報告 A8:141-
- 3) 池橋宏(1985) 農業および園芸 60:(9)109-104.
- 4) 岡彦一(1962)育種学 最近の進歩 4:34-
- 5) Yang *et al.* (2012) *Science* 337: 1336-
- 6) Smith *et al.* (2011) *PLoS Genet.* 7(7): e1002164
- 7) Oka H.I. (1957) *Jpn. J. Genet.* 32: 83-
- 8) Ichitani *et al.* (2011) *Rice* 4: 29-
- 9) 一谷ら (2013) 日本育種学会第 123 回講演会
- 10) 一谷ら (2015) 日本育種学会第 127 回講演会

2. 研究の目的

本研究は、イネ雑種弱勢原因遺伝子 *HWA1*、*HWA2* の高密度連鎖解析を実施し、両遺伝子の染色体上の位置を絞り込むとともに、絞り込まれた領域の塩基配列を決定し、*HWA1*、*HWA2* の同定と機能解明を目標に実施された。また、これら二つの雑種弱勢原因遺伝子の原因となる構造の違いを解明し、雑種弱勢を進化の流れの中で理解がすることを目的に実施された。さらに、二つの雑種弱勢原因遺伝子が染色体上のほぼ同一の位置に存在することから、これらの遺伝子が一遺伝子座における対立遺伝子の関係なのかそれとも異なる遺伝子座の遺伝子なのかについても着目して研究を行った。また、*Hwa1-1* を持つ品種によって弱勢の表現型に差異が認められたが、その原因が *Hwa1-1* を持つ品種に存在する弱勢緩和遺伝子によるものか、検定系統と WRC 系統間の組み合わせによる雑種強勢が原因なのかを明らかにすることにも取り組んだ。

3. 研究の方法

Hwa1-1 を持つ A.D.T.14 と *Hwa2-1* を持つ P.T.D.7 は独立行政法人農業生物資源研究所から分譲を受けた。

連鎖解析については T65 背景の準同質遺伝子系統 T65(*Hwa1-1*) および T65(*Hwa2-1*) を作成途中で自殖させ、連鎖する DNA マーカーに基づき *Hwa2-1* ホモ接合型と *Hwa1-1* ホモ接合型を交配したところ、葉の黄化を示す点で弱勢が発現することが確認できるが、他の同じような雑種弱勢を引き起こす交配組合せと比較して明らかに生育がよく、自殖種子を多数得られる個体を見出した。この現象は反復親の T65、一回親の A.D.T.14、P.T.B.7 の遺伝子の組合せによって起こったと考えられる。両遺伝子の連鎖分析が同時に行え、かつ遺伝子型判別のための検定交配が不要であることから、この個体の自殖後代を展開することで両遺伝子の高密度連鎖解析を行った。分析途中で、*Hwa2-1 Hwa2-1 Hwa1-1 hwa1-2* 型と推定される個体が見出されたため、その自殖後代の生育調査を行った。材料は鹿児島大学農学部附属圃場に栽植し、到穂日数(10月30日まで)、葉鞘長、分げつ数、黄化症状を調査した。また、雑種弱勢の表現型が品種間で異なる原因を調査する実験においても P.T.B.7 と

T65(*Hwa2-1*) を *Hwa1-1* 遺伝子をもつ WRC 品種と交配し、 F_1 を両親品種・系統とともに水田で栽培し、出穂日、穂数、稈長、穂長、葉の黄化程度(SPAD値)を調査した。

A.D.T.14 から抽出された長鎖 DNA(40kbp<) 溶液を細いマイクロピペットチップに 50 回から 100 回出し入れすることで物理的に断片化し、CopyControl Fosmid Library Production Kit with pCC1FOS Vector のマニュアルに従ってフォルミドライブラリーを作成した。ライブラリーのスクリーニングは *HWA1* 領域の絞り込みに使われた DNA マーカーのプライマーを用い、ライブラリーを分割して培養することとコロニー PCR で選抜することを繰り返す。

返して *HWA1* 領域に存在するクローンの単離を実施した。

次に、次世代シーケンサーの中で出力される配列が長い PacBioRSII の 4 セルを用いて雑種弱勢原因対立遺伝子 *Hwa2-1* を持つ P.T.B.7 系統の全 DNA の塩基配列を解析した。DNA は CTAB 法を用いて抽出した。その際に、沈殿ではなく、綿状になった DNA のファイバーを巻き取って回収し、長鎖 DNA が多く回収されるようにした。さらに、*Hwa1-1* を持つ A.D.T.14 についても同様に DNA を抽出し、PacBio Sequel の 2 セルを用いて全 DNA の塩基配列を解析した。いずれにおいても相同性検索を実施するためのソフトウェア ncbi-blast-2.3.0+ (NCBI) で取り扱うことが出来るようにシーケンサーから得られた個々の配列 (リード) の集合をデータベース化し、相同性検索を行った。データベースは 1 つの上限が 1 Gb のため、解読された配列を 1 Gb 以下になるように小分けしてデータベースを構築した。P.T.B.7 では 5 つ、A.D.T.14 では 7 つのデータベースが作られ、検索時はそれぞれの品種のデータベースをまとめて検索を実施した。まず、*Hwa2-1* の存在する領域を絞り込むのに用いた 2 つの DNA マーカー KGC11M2 と KGC11M12 の日本晴を鋳型に増幅される配列を用いて P.T.B.7 に由来するデータベースについて相同性検索を行った。各 DNA マーカー増幅部位と 92% 程度の相同性を持つリードが検索によって得られた。得られたリードの全長を相同性検索することで、検索に用いたリードと重なりのある新たなリードが得られた。このような検索を繰り返してリードのつながり (contig) を伸長し DNA マーカー周辺の塩基配列の contig を作成した。次に A.D.T.14 のデータベースについても同様に *HWA1* を絞りこむ際に用いた DNA マーカーや領域内の推定遺伝子領域を用いて *HWA1* 領域のリードの検索を行った。

4. 研究成果

Hwa1-1 を持つ品種によって雑種弱勢の症状が異なる現象の解析

まず、雑種弱勢の症状が *Hwa1-1* を持つ品種間で異なる原因を調査したところ、P.T.B.7 と T65(*Hwa2-1*) のどちらを交配した場合でも、*Hwa1-1* 遺伝子をもつ WRC 系統との雑種は、同じような雑種弱勢発現の傾向が認められた。すなわち、*Hwa2-1* を持つ親の遺伝的背景ではなく、*Hwa1-1* を持つ WRC 系統に弱勢緩和遺伝子が存在するかどうか弱勢程度を左右するのだと考えられた。また、T65(*Hwa1-1*) と T65(*Hwa2-1*) の F₁、A.D.T.14 と P.T.B.7 の F₁ とともに弱勢の程度が著しいのに対して、弱勢の程度が弱い系統で *Hwa1-1* と *Hwa2-1* をヘテロ接合でもつ個体は、それ以外の遺伝子型の個体と比べて生育が劣るものの、T65(*Hwa1-1*) と T65(*Hwa2-1*) の F₁、A.D.T.14 と P.T.B.7 の F₁ と比べて、明らかに旺盛に生育し、多数の種子をつけた。この結果は 3 品種の遺伝子の組合せによっては弱勢の症状が緩和されることを意味していた。

HWA1 と *HWA2* の高密度連鎖解析

高密度連鎖解析については 16,128 個体から DNA マーカー RM27051 と KGC11M5 間の組換え体 114 個体を選抜し、その後 *HWA_25.54Mb* と *HWA_25.68Mb* (Pseudo-molecule 4) における位置に対応) を用いて組換え体 44 個体を選抜した。また、遺伝子型と表現型との比較により、*HWA1* は *HWA_25.54Mb* と *HWA_25.68Mb* との間に座乗し、*HWA2* は RM27051 と *HWA_25.68Mb* との間に座乗していることを明らかにした。*Hwa2-1 Hwa2-1 Hwa1-1 hwa1-2* 型と推定される個体の後代 57 個体を用いて *HWA_25.68Mb* での遺伝子型と生育調査の結果を比較したところ、P.T.B.7 ホモ型は正常な生育、ヘテロ型は弱勢症状、A.D.T.14 ホモ型は、激しい弱勢症状を示した。この結果によ

り*Hwa1-1*遺伝子は弱勢程度に対して量的効果を持つことが明らかになった。

次世代シーケンサーを用いた *HWA1*、*HWA2* の構造解析

まず、雑種弱勢原因対立遺伝子*Hwa1-1*を持つA.T.D.14系統のフォスミドライブラリーから*HWA1*領域のDNAマーカーを用いてPCR増幅するクローンの単離を目指した。その結果、1クローンを単離した。しかし、使ったDNAマーカーの多くはPCR増幅が十分でなく、クローンを含む培養液を識別することが困難であるなどの理由によりその他のクローンについては単離を行うことが出来なかった。

次に、PacBio RSIIの4セルを用いて雑種弱勢原因対立遺伝子*Hwa2-1*を持つP.T.B.7の全DNAを解析した。全DNAをシーケンス解析に用いたので葉緑体の影響が心配されたが、得られた配列に対して日本晴の塩基配列に基づくDNAマーカーKGC11M2とKGC11M12のPCR増幅領域を用いてBLAST検索すると平均して4から5個のリードを検出することができた。日本晴の配列を用いて検索した場合、配列の質(QR値)が高いリードだと配列は92%一致したが、PacBioのリードをqueryに用いると相同性が高い場合でも85%程度しか一致しなかった。トランスポゾンなどの配列が含まれる場合、相同性検索で選ばれたどのリードが本当に同じ染色体領域のものか判断するのが困難であったが、10kb程度の長さをqueryにして、全長にわたる配列の相同性を確認することで擬陽性を除き、より正しいcontigの形成を試みた。今回の実験の相同性検索で選ばれるリードは10kb以上であることが多く、中には20kbを越えるものも少なくなかった。それでも相同性のある配列が存在しない場合にはそれ以上contigを伸ばすことが出来ず、KGC11M2とKGC11M12の間は3つのcontigに分かれた。一部の領域では日本晴

の配列がP.T.B.7でみつからず、また、逆に、P.T.B.7から得られたリード配列の中には日本晴に存在しないものもあった。これらの結果は*Hwa2-1*の染色体領域と日本晴の該当する領域とは構造に大きな違いがあることを示唆するものであった。

一方、*Hwa1-1*を持つA.D.T.14についても全DNAを抽出し、PacBio Sequel システムの2セルによるシーケンス解析を委託した結果、88万リード、6Gbpの配列が得られた。これらの配列に対して、DNAマーカーの増幅産物の配列を用いて*Hwa2-1*の場合と同様BLASTによる相同性検索を行った。その結果、Ch11_25634511とCh11_25684812の間でcontigを作成することができた。この領域は日本晴と比較して20kbp程度短くなっていると考えられた。現在の配列は精度が悪くそのままでは遺伝子を予測できないので、今後は配列の精度を高めてこの領域に存在する遺伝子について明らかにし、雑種弱勢原因遺伝子の特定に結びつけたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 4件)

1. 久保山勉、二谷勝之、PacBioシーケンサーリードによるイネ雑種弱勢原因遺伝子*HWA1*領域contig作成の試み、日本育種学会、2018

2. 豊元大希、田浦悟、久保山勉、一谷勝之、イネ雑種弱勢原因遺伝子*HWA1*、*HWA2*の連鎖分析ならびに量的効果日本育種学会、2018

3. 鈴木大和、一谷勝之、渡部信義、久保山勉 PacBioシーケンサーリードによるイネ雑種弱勢原因遺伝子*HWA2* 領域contig作成の試み、日本育種学会、2017

4. 保木良太、植村真郷、田浦悟、久保山勉、二谷勝之、*Hwa1-1*と*Hwa2-1*の補足作用によって引き起こされる雑種弱勢現象の系統

間差異、日本育種学会、2017

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保山 勉 (KUBOYAMA, Tsutomu)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：10260506

(2) 研究分担者

一谷 勝之 (ICHITANI, Katsuyuki)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：10305162