

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05594

研究課題名(和文) 野生種を活用したイネの新規種子脱粒性遺伝子座の同定と収量性改善への展開

研究課題名(英文) Detection of novel loci involved in reduced seed-shattering behaviour in cultivated rice and their application for increasing yield

研究代表者

石川 亮 (Ryo, Ishikawa)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70467687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イネは栽培化において種子脱粒性が抑制されたが、関与した遺伝子の全容は詳しくわかっていなかった。本研究では、野生イネ*Oryza rufipogon*を活用し、ジャポニカ・インディカ・AUSの栽培イネの非脱粒性に関与する新規遺伝子座を遺伝学的に同定することを目的とした。ジャポニカイネ日本晴を用いた解析からはqCSS3遺伝子座(QTL for the Control of Seed Shattering in rice on chromosome 3)を、またインディカイネIR36を用いた解析からqCSS2とqCSS7遺伝子座を、AUS栽培イネカサラスを用いた解析からは新たに3つの遺伝子座を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

栽培イネが持つ非脱粒性に関与した遺伝子座は、2006年に報告されたsh4とqSH1が知られていたが、他の遺伝子座は報告されていなかった。これまでの研究において、既知の脱粒性遺伝子座を栽培イネの染色体断片で置換した野生イネを交雑によって作出し、これと栽培イネを再び交雑することで、既知の遺伝子座が遺伝的に固定した分離集団を作成した。本研究ではこれらの遺伝解析を進め新規の脱粒性遺伝子座の同定とそれらの効果検証に成功した。これら新規遺伝子座の原因変異の同定はイネの栽培化過程の解明に役立つ。また、栽培イネの脱粒程度を遺伝学的に調節する育種にも応用できる可能性が考えられ、イネの収量性の向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：During rice domestication, seed-shattering behaviour was suppressed, but the loci involved in shattering loss were not fully identified. The objective of this study was to genetically identify novel loci involved in non-seed shattering behaviour of cultivated rice, *Oryza sativa*, using wild rice *O. rufipogon*. We identified qCSS3 (QTL for the Control of Seed Shattering in rice on chromosome 3) using japonica rice Nipponbare and qCSS2/qCSS7 using indica rice IR36. In addition, three novel loci were also identified using AUS type cultivated rice Kasalath.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：seed shattering domestication *Oryza sativa* *Oryza rufipogon*

1. 研究開始当初の背景

世界人口の約半数近くの人々が主食としてるイネのうち、熱帯アジアで広く栽培されるインディカイネは、収穫・運搬時に脱粒しやすく、収量ロスが生じている。また、水田に落下した種子が発芽し、次期作品種と自然交雑した場合には、自家採種している農家が雑種種子を栽培するリスクとなる。このため、脱粒し難く改変することで、収量性の向上と品種の安定性をイネの生産現場にもたらすことができる。しかし、生産地それぞれの収穫・脱穀方法にも対応させる必要があることから、インディカイネに比べて種子が殆ど脱粒しないジャポニカイネが持つ難脱粒性の導入は必ずしも適していない。様々な栽培イネが持つ非脱粒性に関わる自然変異を適切に組み合わせ、脱粒強度の調節を可能にすることが望ましいが、種子脱粒性の喪失に関与する主要な遺伝子座の変異以外はあまり解明されておらず、脱粒程度を人為的に制御することは難しい状況である。

栽培イネの種子脱粒性喪失は、完全脱粒性を持つ祖先野生イネ(*Oryza rufipogon*)から栽培化される過程で種子基部に形成される離層形成に異常が生じた植物が選抜されたことによる。栽培イネの非脱粒性に関わる遺伝子として、全ての栽培イネで変異型が保存されている *sh4* (Li et al. 2006) と、ジャポニカ栽培イネのみに変異型が見られる *qSH1* (Konishi et al. 2006) が報告されている。研究代表者は、両変異が関わった脱粒性の喪失程度を明らかにするため、栽培イネ(日本晴, Npb)の *qSH1* と *sh4* 対立遺伝子を戻し交雑によって野生イネ(*O. rufipogon* W630)の遺伝背景に導入した Introgression Line (IL) [*IL(qSH1-Npb)* と *IL(sh4-Npb)*] を作出した。これらは共に完全な離層を形成し、両方を導入した *IL(qSH1-Npb, sh4-Npb)* でさえも、なお強い脱粒性が見られた。野生イネで *qSH1* と *sh4* を変異型に置換しても脱粒性を完全に喪失しないことから、野生イネには脱粒性を強く促進する他の因子が存在する可能性が考えられた。そこで、*IL(qSH1-Npb, sh4-Npb)* と日本晴との交雑由来の F_2 分離集団を用いて QTL(量的形質遺伝子座)解析を行い、新規脱粒性遺伝子座の *qSH3* を同定した。また、*qSH3* の原因変異は遺伝子内の 1 塩基置換(SNP)であること、野生イネでは *qSH3* と *sh4* 座の単独変異では脱粒性に変化が生じないが両者の変異が重複することで、脱粒性の低下につながる離層形成の障害が維管束周囲で生じることが判明した。しかしながら、これまでに同定された種子脱粒性遺伝子座の変異だけでは、現在の栽培イネが持つ非脱粒性を説明できないことから、他の変異が関与している可能性が考えられた。

同定された *qSH3* の原因変異について栽培イネの 3 亜種の代表品種としてジャポニカ(日本晴)、インディカ(IR36)、AUS(カサラス)を調査したところ、ジャポニカ・インディカは、変異型であるが、インド・バングラデシュで多く栽培される AUS は変異を持たないことが判明した。そこで、日本晴由来の変異型 *qSH1*、*qSH3*、*sh4* 対立遺伝子を野生イネに導入し、上記の栽培イネ 3 種の脱粒性遺伝子座の変異組成を野生イネの遺伝背景で再現した *IL(qSH1-Npb, qSH3-Npb, sh4-Npb)*、*IL(qSH3-Npb, sh4-Npb)*、*IL(sh4-Npb)* を作出した。しかし、3 系統はいずれも対応する栽培イネ 3 品種よりも強い脱粒性を示した。以上の解析から、3 つの栽培イネには既知の *sh4*、*qSH1*、*qSH3* 以外にもジャポニカ、インディカ、AUS に特異的に脱粒性を低下させる新規遺伝子座の変異が存在する可能性が見出された。

2. 研究の目的

本研究では、栽培イネの収量性改善のために種子脱粒性に関与する遺伝子座の自然変異を遺伝学的に同定し、それらの作用を解明することを目的とした。これら各栽培イネの非脱粒性に関わる新規遺伝子座を探索するため、作出した交雑分離集団を用いて、(1)原因遺伝子座の同定、(2)交雑後代を用いた遺伝子座効果の検証、(3)原因変異の同定に向けた高精度連鎖解析を行う。また、同定した変異を交雑と DNA マーカー選抜によって野生イネ(*O. rufipogon* W630)の遺伝背景に集積し、それらの種子脱粒に要する強度と収量性を調べることで各遺伝子座の効果と相互作用を明らかにする。さらに東南アジアのイネ研究者と連携し、将来の脱粒強度の調節に向けた研究基盤を構築することを長期目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下の 3 つの課題を設定し栽培イネの脱粒性低下に関与した新規遺伝子座の推定と効果検証を進めた。

課題 1 ジャポニカイネを用いた新規脱粒性遺伝子座の同定

日本晴(Npb)と *IL(qSH1-Npb, qSH3-Npb, sh4-Npb)* の F_2 分離集団を用いた QTL-seq 解析から、新規遺伝子座はイネ第 3 染色体の長腕側の RM1002 と RM6080 の間に推定された。この領域をヘテロで持つ系統の後代検定によって遺伝子座効果を検証したところ、野生イネ由来の染色体断片をホモに持つ系統では脱粒強度が顕著に低下していた。そこで、当該領域がヘテロ接合であった系統の自殖種子から領域内で組換えを持つ個体の大規模選抜を実施した。選抜個体の自殖種子を回収し、後代検定を実施することで原因変異遺伝子が座乗する染色体領域を同定した。

課題2 インディカイネを用いた新規脱粒性遺伝子座の同定

IR36 と IL(*qSH3*-Npb, *sh4*-Npb)の F₂ 集団では脱粒性と非脱粒性に分離がみられた。しかしながら、出穂などの脱粒性以外の形質にも分離がみられたことから、遺伝背景を近似させるために IR36 で戻し交雑を行った BC₁F₁ 集団を作成し、これらのうち最も低い引張り強度を示した系統を選抜し、さらにそれを自殖させた BC₁F₂ 集団を作成した。これらの引張り強度の形質データを用いて、QTL-seq 法による関与遺伝子座の推定を行い、遺伝子座効果の検証と既知遺伝子座との相互作用を明らかにした。

課題3 AUS 栽培イネを用いた新規脱粒性遺伝子の同定

インドやバングラデッシュで多く栽培される AUS 栽培イネは *qSH3* 遺伝子座を野生イネと同様の機能型対立遺伝子で持つことから、非脱粒性に関与した遺伝子座は *sh4* 座以外にも存在する可能性が示唆されていた。そこで、AUS 栽培イネの代表品種として扱われているカサラスと IL(*sh4*-Npb)の交雑に由来し、カサラスで再度戻し交雑を行った BC₁F₂ 集団を用いた QTL-seq 解析を課題2と同様に進めた。

4. 研究成果

課題1 ジャポニカイネを用いた新規脱粒性遺伝子座の同定

日本晴(ジャポニカイネ)の非脱粒性に関与した遺伝子座 *qCSS3* (QTL for the Control of Seed Shattering in rice on chromosome 3) については、本研究開始前に推定した候補領域 RM1002 と RM6080 間のさらなる限定を進めた。候補領域において染色体の組換えを持つ複数個体を選抜し、それらの後代を用いた連鎖解析により原因遺伝子座は RM5639 と RM1284 間に座乗する可能性を見出した。続いて、この領域において組換えを持つ個体の大規模スクリーニングを行い、高密度連鎖解析を行った。その結果、*qCSS3* はイネ第3染色体の

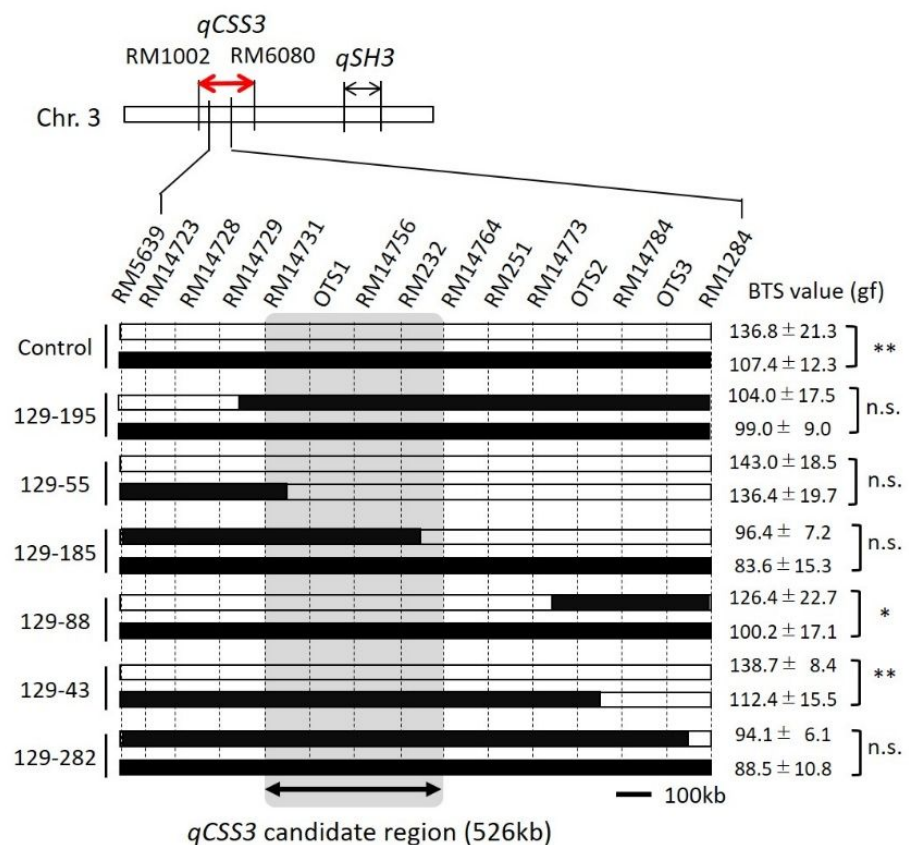


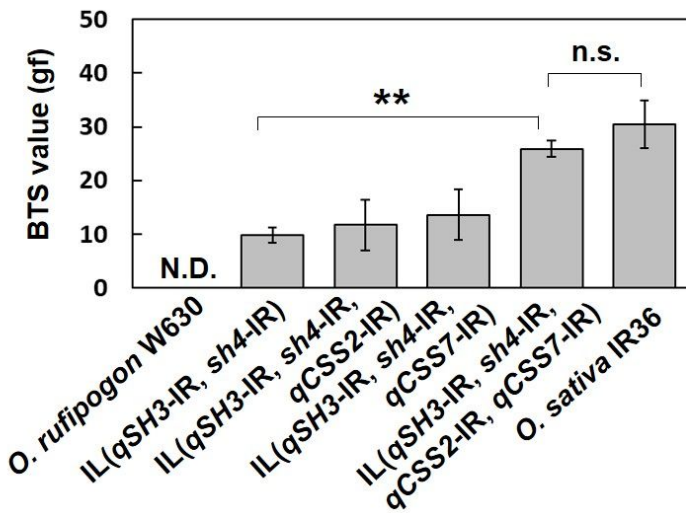
図1. 高密度連鎖解析による *qCSS3* 遺伝子座の座乗染色体領域の同定

RM14731 と RM1284 の約 526kb の領域に座乗することが判明した(図1; Tsujimura et al. 2019)。なお、この領域には日本晴のゲノムデータベースによる遺伝子情報から、約 100 の遺伝子が座乗している。そのため、さらなる連鎖解析を行うために分離集団の作出と候補領域内における組換え個体の選抜を進めた。

課題2 インディカイネを用いた新規脱粒性遺伝子座の同定

インディカ栽培イネ IR36 と IL(*qSH3*-Npb, *sh4*-Npb)の交雑に由来する BC₁F₂ 集団を用いた QTL-seq 解析によって、新たに2番染色体の *qCSS2*、7番染色体の *qCSS7* が推定された (QTL for the Control of Seed Shattering in rice on chromosomes 2 and 7)。分離集団を用いた後代検定から、両遺伝子座の脱粒性における効果を確認することができた。さらに、野生イネ *O. rufipogon* W630 の遺伝的背景において *qSH3* と *sh4* 座を IR36(IR)の染色体断片でホモ接合に持ち、*qCSS2* と *qCSS7* について IR36 の染色体断片で順に集積させた IL(*qSH3*-IR, *sh4*-IR)、IL(*qSH3*-IR, *sh4*-IR, *qCSS2*-IR)、IL(*qSH3*-IR, *sh4*-IR, *qCSS7*-IR)、IL(*qSH3*-IR, *sh4*-IR, *qCSS2*-IR, *qCSS7*-IR)を作成した。これらの脱粒程度を評価したところ、*qCSS2* と *qCSS7* 座の IR36 のホモ接合の蓄積数が増加すればするほど、それに比例して引張り強度が上昇す

ることが明らかになった。また引張り強度の測定結果の傾向と一致して離層形成も段階的に抑制されていることを明らかにした(図2)。さらに、IL(*qSH3-IR*, *sh4-IR*, *qCSS2-IR*, *qCSS7-IR*)と IR36 の引張り強度には有意差が検出されなかったことから、IR36 の非脱粒性は既知の *qSH3* と *sh4* 座に加えて、*qCSS2* と *qCSS7* 座における変異の蓄積によって説明できる可能性



が示唆された。また、野生イネ遺伝背景において *qCSS2* と *qCSS7* 座の単独変異の効果を検証するために IL(*qCSS2-IR*) と IL(*qCSS7-IR*) を作出したところ、どちらも離層の形成が阻害されなかったことから、野生イネ背景において IR36 が持つ *qCSS2* と *qCSS7* の対立遺伝子は脱粒性に影響を与えない可能性が考えられた。以上の結果から、*qCSS2* と *qCSS7* は集積効果によって種子脱粒性の低下に働き、インディカイネ特異的に関与する可能性が示唆された。

図2. 野生イネ *Oryza rufipogon* W630 遺伝背景における *qCSS2* と *qCSS7* の遺伝子座効果の検証

課題3 AUS栽培イネを用いた新規脱粒性遺伝子の同定

カサラスの非脱粒性関与する遺伝子座として、イネの第3、4、12染色体に候補領域が検出された。しかしながら、QTL-seq解析によって検出された領域は広くにわたっていたことから、新たに正逆の戻し交雑を行った BC₁F₂ 集団(野生イネ遺伝背景)の解析を行った。その結果、カサラスを反復親とした BC₁F₂ 分離集団を用いた QTL-seq 解析によって検出された領域とほぼ同じ領域に QTL が検出された。以上の結果から、これら3つの遺伝子座は AUS 栽培イネの非脱粒性に関与した可能性が確認されたことから、それぞれの遺伝子座効果を検証するための分離集団の作出を進めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsujimura Yuki, Sugiyama Shohei, Otsuka Kotaro, Htun Than Myint, Numaguchi Koji, Castillo Cristina, Akagi Takashi, Ishii Takashige, Ishikawa Ryo	4. 巻 132
2. 論文標題 Detection of a novel locus involved in non-seed-shattering behaviour of Japonica rice cultivar, <i>Oryzasativa</i> 'Nipponbare'	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Theoretical and Applied Genetics	6. 最初と最後の頁 2615 ~ 2623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00122-019-03376-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nasuda Shuhei, Sato Yutaka, Hisano Hiroshi, Sato Kazuhiro, Komatsuda Takao, Ishikawa Ryo, Hashiguchi Masatsugu, Suzuki Akihiro, Hoshikawa Ken, Ito Emi	4. 巻 21
2. 論文標題 Perspectives on the use of bioresources in breeding sciences: Lessons from successful studies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breeding Research	6. 最初と最後の頁 81 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbr.21.W06	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa Ryo, Castillo Cristina C., Fuller Dorian Q.	4. 巻 12
2. 論文標題 Genetic evaluation of domestication-related traits in rice: implications for the archaeobotany of rice origins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archaeological and Anthropological Sciences	6. 最初と最後の頁 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12520-020-01112-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishikawa Ryo, Castillo Cristina Cobo, Htun Than Myint, Numaguchi Koji, Inoue Kazuya, Oka Yumi, Ogasawara Miki, Sugiyama Shohei, Takama Natsumi, Orn Chhourn, Inoue Chizuru, Nonomura Ken-Ichi, Allaby Robin, Fuller Dorian Q., Ishii Takashige	4. 巻 119
2. 論文標題 A stepwise route to domesticate rice by controlling seed shattering and panicle shape	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2121692119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2121692119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山昇平、辻村雄紀、大塚宏太郎、Than Myint Htun、石井尊生、石川亮
2. 発表標題 ジャポニカ型栽培イネ（日本晴）の非脱粒性に関する新規遺伝子座の離層形成への効果
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉山昇平、辻村雄紀、井上千鶴、Than Myint Htun、沼口孝司、石井尊生、石川亮
2. 発表標題 インディカ型栽培イネIR36の非脱粒性に関する新規遺伝子座の推定
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Ishikawa
2. 発表標題 Identifying scratches on chromosomes: an approach to understand the process of rice domestication based on loss of seed shattering
3. 学会等名 第70回染色体学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 作田幹樹、杉山昇平、辻村雄紀、Than Myint Htun、井上千鶴、沼口孝司、石井尊生、石川亮
2. 発表標題 インディカイネ IR36 の非脱粒性に関する新規遺伝子座の検証
3. 学会等名 日本育種学会第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川亮、Castillo Cristina Cobo、Than Myint Htun、沼口孝司、井上一哉、岡佑美、小笠原実希、杉山昇平、高間菜摘、Orn Chhourn、井上千鶴、野々村賢一、Allaby Robin、Fuller Dorian、石井尊生
2. 発表標題 イネ栽培化における種子脱粒性喪失過程の実験検証
3. 学会等名 日本育種学会第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沼口孝司、Than Myint Htun、岡佑美、小笠原実希、杉山昇平、高間菜摘、Orn Chhourn、井上千鶴、石井尊生、石川亮
2. 発表標題 イネの種子脱粒性喪失に関連した qSH3遺伝子座における変異の役割と多様性
3. 学会等名 日本育種学会第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 狩野舞、辻村雄紀、石井尊生、石川亮
2. 発表標題 ジャボニカイネ朝日の非脱粒性の遺伝学的解剖
3. 学会等名 日本育種学会第143回講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	University Collage London	Warwick university		
カンボジア	Cambodian Agri. Res. and Dev. Inst.			
ミャンマー	Yezin Agricultural University			