

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24248002

研究課題名(和文) イネ属AAゲノム種の種分化におけるF1花粉不稔遺伝子の進化的役割

研究課題名(英文) Evolutionary function of F1 pollen sterility on AA genome divergence on genus *Oryza*

研究代表者

吉村 淳 (Yoshimura, Atsushi)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：00182816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*Oryza*属AAゲノム種、特に*O. sativa*/*O. glumaepatula*間のF1花粉不稔遺伝子に関する分子機構の解明を行った。S22AとS22Bは機能未知ドメインを保有する多重遺伝子族のメンバーであり、多重遺伝子族の特定のクレードに属することを明らかにした。アフリカ原産の野生種*O. barthii*および南アメリカ大陸原産野生種*O. glumaepatula*の遺伝子プールにおけるS22Bの原因変異の系統地理学的起源を明らかにした。またRNAポリメラーゼ遺伝子の重複と機能欠損が*O. sativa*/*O. nivara*間のF1花粉不稔の原因になったことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Molecular genetic mechanism of F1 pollen sterility in hybrids among AA genome species of genus *Oryza*, especially between *Oryza sativa* and *O. glumaepatula*, were elucidated in this study. By map-based cloning approach, we revealed that S22A and S22B are the members of multigene family carrying domain unknown function, which is specifically found in Poaceae, and phylogeographical origin of causal mutation of S22B in *O. barthii* and *O. glumaepatula* gene pools. We also revealed that gene duplication and loss-of-function of RNA polymerase III gene caused F1 pollen sterility in *O. sativa* and *O. nivara* hybrids, suggesting that an essential gene for life cycle like house-keeping gene is possible to be a cause of reproductive isolation.

研究分野：植物育種学

キーワード：生殖的隔離 雑種不稔 イネ 種分化 AAゲノム種

1. 研究開始当初の背景

種間雑種後代には、しばしば不稔や致死などの接合後生殖的隔離が観察される。生殖的隔離の進化メカニズムを明らかにすることで、進化生物学的には、種分化に及ぼす生殖的隔離の役割の理解に迫るとともに、育種学的には種間交雑由来の遺伝資源について計画的な活用が期待される。

イネ属 AA ゲノム種において、F₁花粉不稔は主要な生殖的隔離の要因である。南アメリカ野生種 *Oryza glumaepatula* はアフリカ大陸からの移入種であり、異所的種分化により成立したとされる。申請者は、*O. glumaepatula* は *O. barthii*/*glaberrima*、*O. longistaminata* (以下、アフリカ種と記載)と共通する F₁花粉不稔遺伝子(S 遺伝子)を持ち、これらの原因変異は *O. glumaepatula* とアフリカ種に共通の祖先集団に起源し、この祖先集団のジーンプールから派生して現在の対立遺伝子の分布が確立されたと考えている。

2. 研究の目的

本研究では、*O. sativa*/*O. glumaepatula* の雑種間にて現在までに同定された S 遺伝子座の遺伝子単離と分子的基盤の解明を行い、原因変異の特定と系統地理学的起源の解明を行う。対立遺伝子の多様性解析を行い、対立遺伝子間の機能的な差異について検討する。さらに、原因遺伝子近傍のゲノム領域の配列解析により、集団遺伝学的効果を推定して、イネ属 AA ゲノム種における S 遺伝子座の進化について理解を深めることを目的として行った。

研究当初は *O. glumaepatula* に特化して研究を進めたが、*O. rufipogon* との交雑後代に見られた重複遺伝子座による F₁花粉不稔の単離も進めることを研究の目的に加えた。

3. 研究の方法

日本型イネ遺伝的背景を持つ S22A および S23 の近似同質遺伝子系統(NIL)を用いて高精度連鎖解析と BAC クローン解読、*Agrobacterium* 形質転換法による相補性検定を行った。同様に *O. nivara* との後代に見られた F₁花粉不稔遺伝子座 DGS1/DGS2 についても単離および機能解析を行った。AA ゲノム種の原因遺伝子の同定と機能的差異を明らかにするため、国立遺伝学研究所にて維持されている *O. barthii* および *O. glumaepatula* コアコレクションの計 12 系統に関する染色体断片導入系統群(IL)の作出を進め、S 遺伝子座領域を包含する NIL の作出を行った。

4. 研究成果

<遺伝子単離と機能解析>

S22A の単離

染色体 2 短腕末端に座乗する S22A を高精度連鎖解析により日本晴ゲノム上約 151.4 kbp の領域に絞り込んだ。*O. glumaepatula* 大腸菌人工染色体(BAC)ライブラリーより候補領域を含む二つの BAC クローンについて概要配

列を解読したところ、候補領域にはゲノム再編成がみられ、これ以上の連鎖解析による絞り込みは困難であると考えられた。候補領域には遺伝子単離済みの S22B と類似した配列が三つ認められたため、それぞれについて相補性検定を行ったところ、S22B と類似のイネ科特有に見られる機能未知ドメイン(DUF)をコードする遺伝子が原因遺伝子であることが明らかとなった。

S22A と S22B の遺伝子重複と分化の進化的な起源を調査するため、単子葉植物における DUF ドメインのアミノ酸配列の最尤系統樹を作成した。その結果、バナナ、パイナップルなどでは本 DUF ドメインを保有するタンパク質はコードされていない。一方で、イネ科においてはコピー数が急速に増大し、それぞれの種において多様性が高いことが明らかとなった。S22A メンバー内の遺伝子重複はイネ属の祖先集団、S22A と S22B の遺伝子重複はイネ科の祖先集団において起こったと推察された。F₁花粉不稔遺伝子に進化しやすい機能・構造的特徴を潜在的に保有する遺伝子であることが示唆された。S22A と S22B はともに *O. sativa* アリルを保有する花粉粒が稔性を保有するが、S22A と S22B は互いに相補できないため、重複遺伝子ではあるが機能的に分化していると考えられた。

S22A と S22B はともに *O. glumaepatula* アリルを持つ花粉粒が選択的に不稔になるが、不稔因子(あるいは致死因子)が相反状態になる F₁ 個体とその交雑 F₂ の実験結果から、雄性配偶体の致死因子が相反で連鎖する場合に、強い生殖的隔離を引き起こす新たな遺伝モデルを提唱した (Sakata *et al.* 2014)。

重複遺伝子座 DGS1/DGS2 の単離

DGS1 と DGS2 を単離した結果、RNA ポリメラーゼ III サブユニット C4 (RPC4) をコードする重複遺伝子座であり、機能喪失型重複遺伝子 DGS1-*niv*^o と DGS2-T65^o を保有する花粉粒が不稔となる配偶体型花粉不稔であった (Nguyen *et al.* *in press*)。表現型異常が起こる雄性配偶体の遺伝子型は同一だが、DGS1 ヘテロ接合体は花粉発芽異常、DGS2 ヘテロ接合体は花粉発育異常により不稔となり、不稔個体の遺伝子型によって表現型異常が起こる生育ステージが異なっていた。これは、配偶子形成における RNA ポリメラーゼは減数分裂細胞に由来する転写産物と配偶体発生時に転写される産物の二種があるが、不稔個体の遺伝子型によって RPC4 転写産物の枯渇のタイミングが原因であることが示唆された。RPC4 等の恒常性維持に必須のハウスキーピング遺伝子においても、遺伝子重複の機能喪失プロセスは生殖的隔離障壁の形成に有効な機構であることが示された。

<S22B 座の多様性解析と原因変異の特定>

T65 遺伝的背景を保有する AA ゲノム種 (*O. glaberrima*, *O. rufipogon*, *O. meridionalis*,

O. sativa Indica)に由来する *S22B* の近似同質遺伝子系統(NIL)について *S22B* ハプロタイプと表現型の関連を解析した。その結果 *S22B* の原因変異と考えられる一塩基置換(SNP)を複数個に絞り込んだ。さらに、国立遺伝学研究所にて整備されている *O. barthii* および *O. glumaepatula* コアコレクションにおける *S22B* 座コード領域の配列多様性を解析したところ、原因変異と考えられる SNP を同定した。当該 SNP は *O. sativa* 遺伝子プールには存在しないが、*O. barthii*/*O. glumaepatula* において固有な分布を示した。*S22B* による生殖的隔離は *O. barthii* と *O. glumaepatula* の共通祖先において起源したと考えられた。

<*S23* 遺伝子座の分化>

O. sativa /*O. glumaepatula* の交雑後代において染色体 7 長腕末端に *S23* が同定されている。高精度連鎖解析により日本晴ゲノム上約 23.9 kbp の領域に絞り込み、*O. sativa*, *O. glaberrima*, *O. glumaepatula*, *O. rufipogon*, *O. meridionalis*, *indica* のゲノム構造の解析を行ったところ、候補領域を 4 つに絞り込むことができた。*O. sativa* 由来のゲノム断片のクローニングし、相補性検定を進めている。

<アフリカ/南アメリカ遺伝子プールにおける *S* 遺伝子の多様性解析>

遺伝研野生イネコアコレクション(Rank1、Rank2)の *O. barthii* と *O. glumaepatula* の計 12 アクセッションについて BC₃F₁ 集団を育成した。4 集団について全ゲノム領域の遺伝子型調査を行い、全ゲノム領域を網羅するイントログレーションライン(IL)の候補個体群を選抜した。*O. barthii*, *O. glaberrima*, *O. glumaepatula* における既報の *S* 遺伝子座について NIL を確立し、配列/相関解析に着手できる植物材料を作成しつつある。雑種不稔遺伝子について集団遺伝学的手法により解析を行うには、集団の構造化、複雑な遺伝的支配などが存在するため、従来の GWAS 解析では遺伝子発見やアリルマイニング等を進めることが非常に困難である。これまで確立した *O. glaberrima*, *O. glumaepatula*, *O. meridionalis* の ILs を含め、これらの材料群は *S* 遺伝子座の原因変異の特定に有用であり、多様な生殖的隔離の遺伝的組み合わせを遺伝子集積によりをデザインできる遺伝資源を確立できた。

<副次的な成果>

AA ゲノム種間に存在する生殖的隔離と野生種と栽培種間の隔離(栽培化)の関連について調査を行った。アジア栽培イネとアフリカ栽培イネは栽培化に伴い独立に *SH3* 座における難脱粒性対立遺伝子を獲得したことを明らかにしたが、両ジーンプール間には種特異的な分布を示していた。この結果は、AA ゲノム種間の生殖的隔離により、難脱粒性対立

遺伝子の遺伝子流動がアジア栽培イネとアフリカ栽培イネの両種間において妨げられたことが示唆された (Win et al. 2017)。

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 3 件)

Sakata, M., Y. Yamagata, K. Doi, A. Yoshimura (2014) Two linked genes on rice chromosome 2 for F₁ pollen sterility in a hybrid between *Oryza sativa* and *O. glumaepatula*. *Breed. Sci.* 64: 309-320.

Win, K. T., Y. Yamagata, K. Doi, K. Uyama, Y. Nagai, Y. Toda, T. Kani, M. Ashikari, H. Yasui, A. Yoshimura (2017) A single base change explains the independent origin of and selection for the nonshattering gene in African rice domestication. *New Phytologist* 213: 1925-1935.

Nguyen, G. N., Y. Yamagata, Y. Shigematsu, M. Watanabe, Y. Miyazaki, K. Doi, K. Tashiro, S. Kuhara, H. Kanamori, J. Wu, T. Matsumoto, H. Yasui, A. Yoshimura (2017) Duplication and loss of function of genes encoding RNA polymerase III 4 subunit C4 causes hybrid incompatibility in rice. *Gene Genomes Genetics* (in press).

[学会発表](計 8 件)

山形悦透・安井 秀・吉村 淳 (2016) 日本型栽培イネ台中 65 号と南アメリカ原産野生イネ *O. glumaepatula* 間交雑に見られる F₁ 花粉不稔遺伝子座 *S22A* の原因遺伝子の特定. 日本育種学会第 131 回講演会. 名古屋大学 (2017 年 3 月 28-30 日)

Giao Ngoc Nguyen・山形悦透・重松 佑布子・渡邊 美弥子・宮崎 雄太・土井一行・伊藤 友子・金森 裕之・呉 健忠・松本 隆・吉村 淳 (2015) *Oryza sativa* と *O. rufipogon* 交雑後代にて見出された F₁ 花粉不稔の原因となる重複遺伝子座 *DGS1* と *DGS2* の単離、日本育種学会第 127 回講演会. 玉川大学(2015 年 3 月 21-22 日)

山形悦透・河村享政・安井 秀・吉村 淳 (2014) イネ実験系統群の作出と利用に関する取り組み. 第 125 回日本森林学会大会. 埼玉県大宮市ソニックシティ (2014 年 3 月 29 日)

山形悦透・阪田光和・土井一行・吉村 淳 (2014) 相反関係にある二つの花粉不稔遺伝子が引き起こす生殖的隔離の遺伝学モデル、日本育種学会第 125 回講演会. 東北大学 (2014 年 3 月 22 日)

Win, K.T., C. Ogata, Y. Yamagata, H. Yasui, A. Yoshimura (2013) QTL analysis of pollen sterility using two BC₁F₁ populations derived from backcrossing with both parents, *Oryza sativa* L. and *O. glaberrima* Steud. 7th International Rice Genetics Symposium. Dusit Thani Hotel, Manila, Philippines (2013年11月5-8日)

Yamagata, Y., K. T. Win, N. N. Giao, M. Sakata, N. Takano-Kai, A. Yoshimura (2013) F₁ pollen sterility found in hybrid progeny between cultivated and wild species of the AA genome species in rice. 7th International Rice Genetics Symposium. Dusit Thani Hotel, Manila, Philippines (2013年11月5-8日)

Sakata, M., Y. Yamagata, Sobrizal, K. Doi, A. Yoshimura (2013) Two linked genes on rice chromosome 2 independently induce F₁ pollen sterility in a hybrid between *Oryza sativa* and *O. glumaepatula*. 7th International Rice Genetics Symposium. Dusit Thani Hotel, Manila, Philippines (2013年11月5-8日)

山形悦透・吉村 淳 (2013) *Oryza glaberrima* Steud. との種間交雑における花粉不稔を緩和する日本型イネの作出. 日本育種学会第124回講演会. 鹿児島大学 (2013年10月12-13日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 淳 (YOSHIMURA Atsushi)
九州大学大学院・農学研究院・教授
研究者番号：00182816

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

山形 悦透 (YOSHIYUKI Yamagata)
九州大学大学院・農学研究院・学術研究員
研究者番号：00600446

(4) 研究協力者

()