

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580004

研究課題名(和文) イネ雑種弱勢原因遺伝子HWC1とHWC2の分子相互作用による免疫応答誘導の解明

研究課題名(英文) Study of an interaction between HWC1 and HWC2 which induce immune response in a hybrid weakness of rice

研究代表者

久保山 勉 (Kuboyama, Tsutomu)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：10260506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：温帯ジャポニカ品種とペルーの品種Jamaicaの間で見られるイネ雑種弱勢は2つの原因遺伝子HWC1とHWC2の相互作用によって生じる。本研究課題の研究によってHWC1はホモ複合体を形成して転写調節の抑制因子として機能しており、雑種弱勢の原因となるアミノ酸置換はHWC1ホモ複合体形成の親和力を弱め、HWC1の抑制機能を阻害していることを示唆する結果が得られた。この結果からHWC1の抑制機能の欠損が雑種弱勢の引き金となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Interaction between HWC1 and HWC2 causes a hybrid weakness which is observed in the cross between a Peruvian rice cultivar "Jamaica" and most of temperate-japonica rice cultivars. In this study, we showed that a nucleotide substitution in HWC1 causing an amino-acid substitution and the hybrid weakness reduce the affinity between HWC1 gene products and induce loss of function that repress a CaMV 35S promoter driven reporter gene.

研究分野：植物育種学

キーワード：雑種弱勢 生殖隔離 遠縁交雑

1. 研究開始当初の背景

- (1) 正常な両親間から得られた雑種が成育不良を生じる現象は雑種致死や雑種弱勢として知られており、複数の遺伝子座のエピスタシスによって生じる。これらの遺伝子の出現は「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)によって説明されている。Xiphophorus 属の魚類やシロウジョウバエ、シロイヌナズナにおいては原因遺伝子が単離されており、中でもキロシロウジョウバエとオナジシロウジョウバエの間における、*Lhr* と *Hmr* については両方の遺伝子産物が直接結合することが示され、DM モデルが分子レベルで確認されている。植物においてはシロイヌナズナで NB-LRR 遺伝子が雑種ネクロシスの原因遺伝子として単離され、植物における雑種致死の多くは植物の免疫応答反応が原因で生じているのではないかというモデルが提唱された。しかし片方の原因遺伝子が不明であるなど弱勢を生じるメカニズムについての詳細は明らかになっていなかった。
- (2) イネでは温帯 *japonica* とペルーの品種 *Jamaica* の間で雑種弱勢が生じる。これは雑種弱勢原因遺伝子 *HWC1* と *HWC2* の相互作用によることが知られており、私達はポジショナルクローニングクローニングによりこれらの原因遺伝子の単離を行った。その結果、*HWC1* はシロイヌナズナ *LEUNIG* やキンギョソウ *STYLOSA* などと同祖的な WD40 ドメインを持つタンパク質をコードしており、コリプレッサーとして知られる *Groucho/Tip1* 遺伝子ファミリーに属する。*Jamaica* の *HWC1* 対立遺伝子 *Hwc1-1* は WD40 ドメインにアミノ酸置換を生じる 1 塩基置換を持ち、この変異が *HWC1* における弱勢誘導の原因であった。一方、*HWC2* は病害抵抗性遺伝子の 1 タイプとして知られている NB-LRR 遺伝子をコードしていた。*HWC2* が NB-LRR 遺伝子であったことから、*HWC1* と *HWC2* が相互作用し、過敏反応と同様の反応が生じ、その結果として雑種弱勢が生じていると考えられ、発現解析、細胞死の検出、酸化ストレスの検出、ファイトアレキシンの検出、病原菌接種試験の結果はこの考えを支持するものであった。
- (3) *HWC1* と *HWC2* の相互作用を明らかにするため酵母ツーハイブリッド法を試みたが 2 つのタンパク質が直接結合するという証拠は得られなかった。一方、35S プロモーターに連結した *Jamaica* と日本晴の *HWC1* 対立遺伝子 cDNA それぞれを蛍光タンパク質 *mVenus* と共に一過性発現し、蛍光を指標として免疫応答によ

て生じる細胞死の検出を試みた。ところが、予想に反し弱勢を起こさない日本晴対立遺伝子の方で蛍光を発する細胞数が著しく減少した。そのため、正常な植物では *HWC1* が *HWC2* の発現を抑制しているが、機能欠損型の *HWC1* の存在により正常な *HWC1* の働きも阻害され、*HWC2* の発現を抑制できなくなり過敏反応が起こり、雑種弱勢が生じているという *HWC1* による *HWC2* 抑制モデルが考案された。

2. 研究の目的

- (1) 本研究課題はイネ雑種弱勢原因遺伝子 *HWC1* と *HWC2* の相互作用の実体を明らかにすることによって NB-LRR を通したイネの免疫発現機構の一端を明らかにし、抵抗性育種や遠縁交雑の不親和性打破に役立てることを目的として行われた。
- (2) また、その目的を達成するために *HWC1* の一過性発現、酵母ツーハイブリッド法による *HWC1* と *HWC2* と相互作用する因子の探索、TILLING 法による *HWC1* 突然変異体の探索、放射線によって誘発された雑種弱勢緩和変異体原因遺伝子の調査などを行った。

3. 研究の方法

- (1) *HWC1* の一過性発現
カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター (p35S) の下流に *HWC1* 各対立遺伝子の全長を導入したプラスミドを作成し、p35S に連結した *mVenus* (*35S::mVenus*) あるいはユビキチンプロモーター (pUbi) と連結した蛍光タンパク質遺伝子 *GFP* (*pUbi::GFP*) を混合後、パーティクルガンを用いてイネ幼苗の葉身に打ち込み、蛍光を発する細胞数を蛍光顕微鏡下で計測した。
- (2) 酵母ツーハイブリッド法
pGBKT7 および pGADT7 にそれぞれ *Jamaica* の *Hwc1-1* cDNA、日本晴の *hwc1-2* cDNA、*Hwc2-1* cDNA をクローニングした。各プラスミドを Y2HGold 酵母株、Y187 酵母株に形質転換し、接合した。pGBKT7 と pGADT7 のプラスミドを共に含む酵母を D00/X/A 検定培地で培養し *HWC1* 各対立遺伝子間の相互作用強度をガラクトシダーゼアッセイにより検定した。基質には CPRG を用いた。また、*HWC1* や *HWC2* と相互作用する因子の選抜には Mate & Plate" Library System によって日本晴の根から作製された cDNA ライブラリーを用いた。
- (3) TILLING 法
HWC1 遺伝子領域を増幅する 2 つのプライマー対を用い、Suzuki ら (2008) の方法に従い変異原処理した日本晴と金南風の集団 (NBRP 提供) に対して選抜を行

った。

- (4) 雑種弱勢抑制変異体原因遺伝子の解析
日本晴と Jamaica 交配した後、線照射した。受精卵照射によって得られた雑種弱勢抑制変異体に対して雑種弱勢の原因遺伝子を持たない Kasalath を交配して得られた F₁ 種子を栽培し、表現型の観察と遺伝子型の決定を行い、*Hwc1-1* と *Hwc2-1* を持つにもかかわらず生育する緩和型の表現型を示す個体を選抜し、原因遺伝子の連鎖解析を試みた。
- (5) *Hwc1-1* の準同質遺伝子系統の作出
Hwc2-1 のトランスポゾン挿入突然変異体を Jamaica に対して連続戻し交雑し系統の育成を行った。

4. 研究成果

- (1) 本研究課題ではまず、申請時に立てられた通常は *HWC1* による *HWC2* の発現抑制モデルについて検討するために両遺伝子の発現解析を行った。その結果、雑種弱勢の程度と *HWC2* の発現量には関係がないこと、*HWC1* の発現量は多く、*Actin1* に匹敵する発現量なのに対して、*HWC2* は 20 分の 1 程度と低い発現量であることなどが明らかとなった。この結果、*HWC1* の転写調節の標的は *HWC2* ではなく、作業仮説は正しくないことが明らかとなった。また、予想とは異なり、雑種弱勢個体では *HWC1* の発現量が両親の 2 倍程度と多くなっていた。
- (2) 次に、本研究課題を申請する際に明らかになった p35S に連結した *HWC1* の日本晴対立遺伝子が共に一過性発現した 35S:: *mVenus* の蛍光を発する細胞数の顕著な減少をもたらす現象についてさらに詳細な検討を行った。*Hwc2-1* を持つ日本晴において *HWC1* の日本晴対立遺伝子を発現した際には蛍光を発する細胞数の減少が見られたが、Jamaica 対立遺伝子では蛍光細胞数の減少が見られず、両者を共に発現させた場合にも減少は見られなくなった(図 1)。*HWC1* が共抑制因子の遺伝子ファミリーに属していることを考慮すると、*HWC1* の日本晴対立遺伝子は正常な抑制機能を持つが、Jamaica 対立遺伝子ではその機能が失われており、さらに、機能を欠損した Jamaica 対立遺伝子が日本晴対立遺伝子に対して優性的に働き、両者が共に発現する場合は抑制機能が失われるのだと考えられた。これは、*Hwc1-1* が雑種弱勢を生じる雑種第一代で優性遺伝子として振る舞うことと一致する結果であった。一方、ユビキチンプロモーターに蛍光タンパク質を連結した *pUbi::GFP* を用いて同様の実験を行ったところ、*HWC1* の対立遺伝子による蛍光細胞数に差は見られず、*HWC1* による蛍光細胞数の減少も顕著ではなかった。このことは *HWC1* による遺

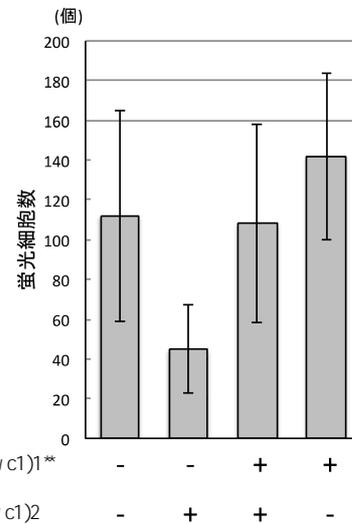


図1 パーティクルガンを用いた日本晴葉身における *mVenus* と *HWC1* の 35S プロモーターによる一過性発現

伝子の発現抑制には選択性があることを示すと考えられた。*HWC1* の日本晴対立遺伝子と Jamaica 対立遺伝子には雑種弱勢の原因となる 1 塩基の非同義置換しか差がなく、この塩基置換による 1 アミノ酸置換によって機能的な差が生じ、*HWC1* の抑制機能低下によって標的となる遺伝子が正常に抑制されずに雑種弱勢が生じていると考えられる。しかし、Jamaica は雑種弱勢原因対立遺伝子 *Hwc1-1* を持つにもかかわらず弱勢を発症しない。これには、*Hwc2-1* の存在が関与している可能性が考えられる。そこで、*Hwc2-1* を持たない Jamaica、*HWC2* トランスポゾン挿入変異系統 NC1670、染色体置換系統 SL6-3 等を用いて日本晴と同様の *HWC1* 一過性発現実験を行った。その結果、*HWC1* の日本晴対立遺伝子を発現させると *Hwc2-1* の有無に関係無く蛍光細胞数が少なくなった。一方、Jamaica 対立遺伝子を発現させた場合、日本晴対立遺伝子ほどではないが蛍光細胞数が少ない傾向がみられた。しかし、十分な数の実験を行うことができず統計的な裏付けを得ることが出来なかった。今後、*Hwc2-1* がある場合とない場合で Jamaica の *HWC1* 対立遺伝子の機能に変化が生じるかどうかを明らかにして行く必要があると思われる。

- (3) *HWC1* の一過性発現実験で機能欠損した Jamaica 対立遺伝子が日本晴対立遺伝子の抑制機能を阻害する結果が得られたことから、*HWC1* の遺伝子産物間に相互作用があり、ホモ複合体を形成している可能性が推定された。そこで酵母ツーハイブリッド法によって *HWC1* タンパク質間相互作用の検出を試みた。その結果、*HWC1* タンパク質間には強くはないが親和性が存在すること、その親和性は日本晴対立遺伝子間では比較的強いこと、Jamaica 対立遺伝子を含む組合せでは弱

くることが明らかとなった(図2)。この結果をこれまでに判明していることと総合して考えると、雑種弱勢の原因となるアミノ酸置換が HWC1 のホモ多量体形成における親和性を低下させ、この親和性の低下が HWC1 タンパク質の機能に影響し、免疫反応の誘導や雑種弱勢を引き起こしているものと思われる。

- (4) 本研究課題では酵母ツーハイブリッド法を用いて日本晴の根に由来する cDNA ライブラリーから HWC1 タンパク質や HWC2 タンパク質と相互作用する因子の探索を行った。その結果、HWC1 と相互作用する遺伝子の候補を 17 個、HWC2 と相互作用する遺伝子の候補を 6 個検出することができた。今後はこれらの遺伝子産物が実際に HWC1, HWC2 と相互作用するかを検証するとともにこれらのなかから雑種弱勢の発症に関係する遺伝子を探索する必要がある。
- (5) 本研究課題の研究進展によって HWC1 の機能の変化が雑種弱勢が生じる上で本質的に重要であると推定された。そのため、HWC1 突然変異体を複数得て HWC1 の生物学的な機能を明らかにすることを目標として Tilling 法による突然変異体の選抜を行った。その結果、3712 個体中、26 個体で塩基配列に変異が検出された。そのうち 19 個体はイントロンに生じた変異で、エキソンの変異は 7 個であった。選抜において用いた配列のエキソン部分が 785bp、イントロン部分が 1205bp であることを考えるとエキソン内の変異がイントロン内の変異に比べて少なくなっていた。得られた変異体の

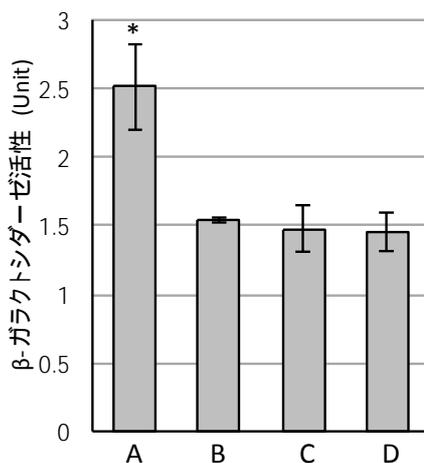


図2. β-ガラクトシダーゼアッセイによる HWC1 対立遺伝子産物間親和性の測定

- A: pGADT7-HWC1-2 と pGBKT7-HWC1-2
 B: pGADT7-HWC1-1 と pGBKT7-HWC1-1
 C: pGADT7-HWC1-1 と pGBKT7-HWC1-2
 D: pGADT7-HWC1-2 と pGBKT7-HWC1-1

アスタリスクは他に比べ有意に差があったことを示す ($p < 0.05$)。

多くは表現型が現れなかった。フレームシフトを起こした系統ではアルビノが出現したが、すぐに枯死し、変異を生じた対立遺伝子とアルビノとの関係を明らかにすることはできなかった。538 番目のアラニンがトレオニンへ変化した変異系統は草丈の低下や稔性、開花期の遅れなどが分離して現れたがこれらの表現型が HWC1 の変異によるものかどうかは現在実施している変異との連鎖解析によって明らかになるとと思われる。

- (6) これまでの研究によって日本晴と Jamaica の交配による受精卵に線を照射し、雑種弱勢が抑制された雑種弱勢緩和変異体 NJ-4 が得られている。NJ-4 からは自殖種子が得られ、その後代から弱勢個体が得られるため、2つの雑種弱勢原因遺伝子座のそれぞれの対立遺伝子 *Hwc1-1* と *Hwc2-1* には変異が生じていないと考えられた。そこで、本研究課題では弱勢を緩和する遺伝子の mapping を試み、NJ-4 の自殖後代と Kasalath との交雑を行った。その結果雑種弱勢個体と正常個体が分離した。しかし、2つの雑種弱勢原因遺伝子を持つ組合せで期待された緩和型の表現型を示す分離個体はなく、すべて通常の弱勢となる表現型を示した。そのため、当初予定していた期間に弱勢緩和の原因遺伝子の連鎖解析を終了することはできなかった。今後さらに、後代を検定交雑し、弱勢緩和遺伝子の実体を明らかにしたい。
- (7) *Hwc1-1* を持ち日本晴の遺伝的背景を持つ準同質遺伝子系統を作出するために、日本晴背景でトランスポゾン *Tos17* LTR の挿入により *Hwc2-1* に突然変異が生じている NC1670 系統をを反復親、Jamaica を一回親に用いて連続戻し交雑を実施した。育成過程の系統から得られた BC4F2 で遺伝子型と草丈、根長の関係を調査した。その結果播種後 30 日の草丈は *Hwc1-1* ホモ接合体で 22.1 ± 4.9 cm、ヘテロ接合体で 27.6 ± 1.7 cm、*hwc1-2* ホモ接合体で 28.66 ± 4.3 cm であった。分散分析の結果 *Hwc1-1* ホモ接合体の草丈は有意に低い結果となった。一方、播種後 163 日の草丈は *Hwc1-1* ホモ接合体で 87 ± 6 cm、ヘテロ接合体で 88 ± 10 cm、*hwc1-2* ホモ接合体 93.7 ± 7 cm となり、統計的な有意差が見られなくなった。そのため *Hwc1-1* の準同質遺伝子系統は正常な植物として栽培に用いることができると考えられた。
- (8) 現在市場に流通している栽培面積の多い主要な品種キヌヒカリ、きらら 397、あきたこまち、はえぬき、ひとめぼれ、コシヒカリ、ゆめぴりか、つや姫、ササニシキ、ミルククイーン、にこまる、ヒノヒカリについて雑種弱勢原因遺伝子 *Hwc2-1* の有無を *Hwc2-1* に特異的な

DNA マーカー-KGC4M29 を用いて調査した。その結果すべて *Hwc2-1* を保持していることが明らかとなった。このため、遺伝子拡散防止に *Hwc1-1* を用いることの有効性を確認することができた。

- (9) 以上のように本研究課題の実施によって温帯ジャポニカと Jamaica の間で見られる雑種弱勢原因遺伝子の分子レベルでの相互作用について有益な情報が得られた。特に *HWC1* がホモ多量体を形成することが抑制遺伝子としての機能に重要であること、また、*HWC1* の抑制機能の欠損が雑種弱勢の引き金となる可能性が示されたことは本研究課題の大きな成果であったと思われる。今後、*HWC1* と *HWC2* の関係が明らかとなり *HWC1* が免疫反応を通常どのように制御しているのかを解明できれば研究の波及効果は雑種弱勢だけでなく、植物の免疫反応全体に及ぶものと思われる。

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)

[学会発表](計 3 件)

沖山友哉, 一谷勝之, 渡部信義, 久保山勉 .
イネ雑種弱勢原因遺伝子 *Hwc1-1* の原因 SNP による *HWC1* タンパク質間親和性の低下. 日本育種学会第 127 回講演会 2015 年 3 月 22 日, 玉川大学, 東京都, 町田市

武田純子, 沖山友哉, 西村実, 一谷勝之, 渡部信義, 久保山勉 .
線受精卵照射によって得られた日本晴と Jamaica の雑種弱勢を緩和する変異体. 日本育種学会第 122 回講演会 2012 年 9 月 14 日, 京都産業大学, 京都府, 京都市

沖山友哉, 一谷勝之, 熊丸敏博, 渡部信義, 久保山勉 .
一過性発現系におけるイネ雑種弱勢原因遺伝子 *HWC1* の機能解析と TILLING 法を用いた *HWC1* 変異系統作出の試み. 日本育種学会第 122 回講演会, 2012 年 9 月 14 日, 京都産業大学, 京都府, 京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保山 勉 (KUBOYAMA TSUTOMU)
茨城大学・農学部・准教授
研究者番号：10260506

(2) 研究分担者

一谷 勝之 (ICHITANI KATSUYUKI)
鹿児島大学・農学部・准教授