

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25304021

研究課題名(和文) ゲノム分化した野生イネの地理的分布ならびに生態調査に関する研究

研究課題名(英文) Geographical and ecological study of wild rice diverged genomes

## 研究代表者

石川 隆二 (ISHIKAWA, RYUJI)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：90202978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：栽培イネの遺伝資源である野生イネ、特に同じゲノムを有するAAゲノム種の多様性評価を行うとともに、現地での生態的特徴を明らかにすることで遺伝資源として栽培イネ改良に資する成果を蓄積した。アジア種である野生イネが最も高い多様性を示すこと、アメリカ種は進化の特殊性から母系においてアジア種と同様な高い多様性を示した。タイの野生イネは1集団でもアジア全域に匹敵する多様性を示し、ベトナムでは隣国と異なる雄性不稔型の栄養繁殖優占の野生イネが生息することがわかった。オーストラリアは極めて特殊であり、新種とみられる種の特徴付けを行った。

研究成果の概要(英文)：Wild rice is regarded as valuable resources to improve cultivated rice. We identified that Asian species maintains high polymorphism. However, American species also maintains high diversity in maternal lineages. It is due to its evolutionary process. In Thai, even one population keeps enough diversity as Asian core collection. In contrast, Vietnamese wild rice did not show high polymorphism but unique high male sterility due to its mitochondrial genome. Australian populations are composed from distinct species. One of the species could be novel type, reflected by genome sequence and also morphological characteristics.

研究分野：作物育種学

キーワード：野生イネの多様性 オーストラリア 種分化 進化

### 1. 研究開始当初の背景

栽培種はAAゲノムに含まれ、野生種としてアジアに3種、アフリカに3種、南アメリカに1種、そしてオセアニアに1種が知られる。アジア圏の開発により最大の変異を内在する野生イネ生息環境は急速に悪化し、雑草化といわれる栽培イネとの交雑が生じて遺伝資源の枯渇が進みつつある。栽培種にはアジアに生息する *O. rufipogon* の一部の変異のみが持ち込まれたに過ぎない。オーストラリアには、アジアの多年生 *O. rufipogon*、ならびに固有種として一年生 *O. meridionalis* が生息するとされていた。海外学術研究 (H21-H23) の結果、*O. meridionalis* から系統分化した新種の多年生イネが見出された。新種である多年生イネはオーストラリア固有種に共通する核・細胞質ゲノムを有している。これは独自に一年生から収斂進化したものとみなされる。この新種はイネの進化、栽培イネの遺伝資源として非常に重要な発見となる。

オーストラリアの野生イネは2タイプの多年生ならびに一年生のすべてがアジアとは異なるゲノムを示したため、アジアから特殊な母集団が移住したと推定される。葉緑体全ゲノム解析も同様の結果を示した (Waters ら 2012)。では、本当にアジアにはみられないのだろうかという疑問が提示される。ベトナムにおいても mtDNA に orf153 を含む欠失など複数の変異が検出された。同ゲノムはエネルギー生産に関し、F1 品種の採種事業に直結する雄性不稔現象を支配しているため、アジアからオセアニア地域にみられる野生イネ mtDNA ゲノムの進化と多様性評価は今後の重要な資源確保につながるだろう。また、種間、種内変異にみられるゲノム多様性を理解することは今後の次世代ゲノム解析の手法開発にも重要な意義を持つであろう。

### 2. 研究の目的

アジア起源のイネ野生種はオーストラリアに移動して固有種 *O. meridionalis* を形成し、二次的に移動したアジア種 *O. rufipogon* とともに生息するとされていた。我々が行った海外学術調査では上記2種以外に新種の生息が明らかとなった。その新種登録標本確保と未踏破地域の調査を行うことを目的の1つとする。さらに、野生種を比較した解析から、ベトナム・オーストラリアそれぞれに他アジア地域とは異なる特殊なゲノム変異がみられた。現地研究機関との連携をすすめて、特殊な野生イネの地理的分布を明らかにしイネ属の進化を明らかにすることが本研究の目的である。

海外研究機関との連携においては、オ

ーストラリアにおける政府との連携研究所であるクイーンズランド大学 QAFFIC (州の政策的提携農業食品研究所) とのイネ遺伝資源の調査を進めている。申請者は同研究所長であるヘンリー教授、ならびにクイーンズランド州ハーバリウムとの共同生態調査を行ってきた (Henry et al. 2011, Waters et al. 2012)。地元研究機関のサポートによる生態調査は順調に進められており、2012年度も二国間共同研究にて進展した。オセアニアとアジアの遺伝資源の比較からベトナムにおいても特殊なゲノムが見いだされた。同系統はベトナム・クーロンデルタ稲研究所 (CLRRI) との共同調査で見出したものである。これら多型は未だ明らかにされていないゲノム変異が自然集団に存在していることを示している。CLRRI 以外にも隣国カンボジアでは農業および灌漑研究所 (CARDI) ならびに王立プノンペン農科大学のメン・サロム副学長との調査を行ってきた経緯があり、今後も順調に進められる背景がある。

### 3. 研究の方法

オーストラリアにおける新種生息地域の特定を行うために、新種が見出されたクイーンズランド州との連携のもとに未踏破地域 (クイーンズランド州西部、ノーザンテリトリー準州、西オーストラリア州) の調査を行う。新種の生態・異種の混在集団での遺伝的階層性もあるため、これまで開発した分子マーカーを利用して、自然集団におけるゲノム動態を把握する。

調査項目：アジアの野生種の一部とオーストラリア種の特殊なゲノムの地理的分布調査として、一年生、多年生集団の遺伝的多様性の保有程度の比較、茎の伸長程度・種子生産性 (生産粒数や種子大きさ) を計測することで適応戦略を検証して遺伝子型・ゲノム型と対応させる。

1) アジア全域の AA ゲノム野生種の多用性の全体像の把握とともに、各地域に自生する野生イネとの遺伝的多様性程度を比較し地域特殊性について検証する。

2) ベトナムではオーストラリア野生イネゲノムと比較対照とした多年生系統に特殊な欠失があり、orf153 の欠失を含む再編成が認められていた。そのため、ミトコンドリアゲノム構造を明らかにするとともに現地生態として稔性や繁殖形式にどのような表現型を示すかについて、ゲノム解析とともに現地調査を行う。カンボジアの野生イネとの比較をすすめることでメコンデルタからオーストラリアにかけての野生イネの地理的分布と変異についての比較データを得る。

3) タイにおいては、内陸部の野生イネ

の自生地保全の実態調査を進めるとともに、コアコレクションと自然状態の野生イネ集団の多様性程度を分子マーカーにより詳細に検証する。そのため、細胞質ゲノムの多様性ならびに核の遺伝的多様性についてゲノムデータをもとに比較解析を行う。

4) オーストラリアの野生イネについては、アジア型とみられていた *O. rufipogon* については細胞質がオーストラリア固有種である *O. meridionalis* と同じクラスターに分類され、アジア型とは異なる。その特殊な *O. rufipogon* の生態を明らかにする。Jpn2 型とした新たな種候補についてはその特性解析を進め、新たな遺伝資源としての活用方法を探る。

#### 4. 研究成果

1) アジア全域の AA ゲノム種の特異性を評価し、それらとの採取材料の比較を効率的に行うため、タイの多年生野生イネ系統、*O. glumaepatula* の 2 系統から全ゲノムデータを NGS により入手し、葉緑体ゲノムの INDEL マーカーを開発した。その結果、種内にもみられる多様性を含め、AA ゲノム種の多様性程度を評価することができた。核の評価を SSR で行うとともにその組み合わせパターンから、*O. glumaepatula* にみられる高い多様性は、アフリカ種である 2 種の祖先集団から母系を共有する集団がもとになり、1 つの遺伝子交換可能な集団として種分化したことが明らかとなった。さらに、アジアの *O. rufipogon* の高い多様性を検出して比較できた。オセアニア野生イネの特殊性も検出され、これまで先に我々が検出した特殊な種分化を裏付けることができた。

2) ベトナムの野生イネについてはカンボジアと比較して極めて対照的であることが明らかとなった(図 1)。RM3180 でみられたようにホモ型である遺伝子座が多く、集団間においても差がなかった。AL606650 などヘテロ型で固定している集団が多く、ホモ型個体が交雑後栄養繁殖で増殖している特徴がみられた。

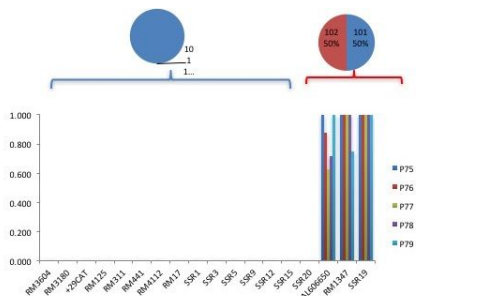


図 1. ベトナムの野生イネの遺伝的多様性。

カンボジアの集団はホモ型に固定しているものの、集団間での多様性がみられた。メコン河沿いにおいても、カンボジアでは一年生、ベトナムでは多年生が優占しており、遺伝的な特徴も異なることが明らかとなった。

ベトナムのミトコンドリアの再編成については、一部 ORF 領域を欠失させるものであることがわかった。さらに、ORF153 欠失系統は高い栄養繁殖性を示し、カナル沿いに同一遺伝子型が繁殖していた。タイ・カンボジアで見られるような開花同調性がなく、種子が少なく、花粉稔性も図 2 にみられるように 1 つの穂においても充実度が異なっていた。これは種子繁殖よりも栄養繁殖を優先させており、ミトコンドリアの大規模な再編成がこの表現型に関与していることが強く示唆された。

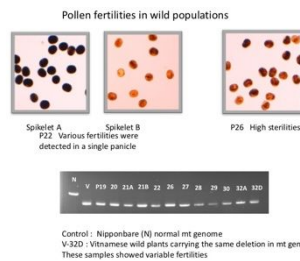


図 2. 雄性不稔系統と ORF153 の欠失。

3) タイにおける自生地保全区の遺伝的解析をすすめ、ナショナルバイオリソースにおけるアジア広域から収集した AA ゲノム野生種 32 系統と比較しても、どの集団も異なる多様性を示したことが特徴であった。

プラチンプリの多年生野生集団に焦点をあわせ、詳細な構造解析を行った結果、栄養繁殖以外に他殖と種子繁殖による高いヘテロ性を集団内に有していることがわかった。

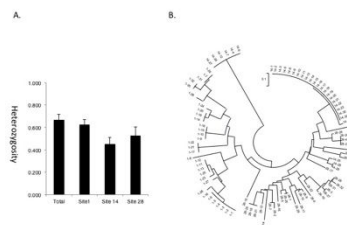


図 3. タイ自生地保全区の多様性。(A) ナショナルバイオリソースに (NBR) に比較しても高い多様性を示した。(B) プラチンプリ集団において、3 箇所の 2x2m 区画からの 32 個体、計 96 個体は同一個体を含む高い栄養繁殖性を示した個体が生息する分集団もあったものの、高い多様

性をそれぞれが示した。

4) オーストラリアの野生イネのうち、*O. rufipogon* の特殊性を形態的な識別、生殖隔離程度を指標として確認するとともに、オーストラリアの野生イネゲノム情報から、SINE 挿入を抽出しマーカーとして開発した。これらのツールをもとに現地調査とともにゲノム分化程度を再評価した。生態調査からは、西オーストラリアにおける野生イネの生息地を確認し、現存していることを明らかにした。しかし、時期が遅すぎた為、乾期に枯死した個体のみを観察した。この点は、時期の検討とともに雨季における行路の安全性を含めて再検討したうえ調査にかかることを計画する必要性が考えられた。さらに、現地政府機関との調整から、採取に係わる義務についての確認を詳細に行う必要性も検討することになっている。

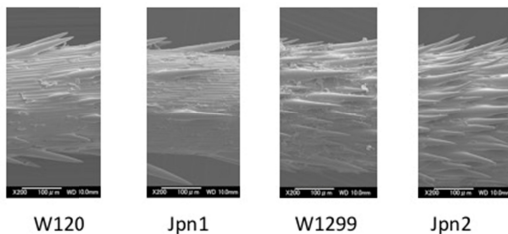


図4. 芒の鋸歯にみられる種の特徴。オーストラリアの *O. rufipogon* である Jpn1 は葉緑体/ミトコンドリアが *O. meridionalis* 型であるものの、外部形態などは *O. rufipogon* と同じ密度の低い鋸歯を示した。

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 6 件)

1) Muto, C., R. Ishikawa, K.M. Olsen, K. Kawano, C. Bounphanousay, T. Matoh, Y-I. Sato (2016) The origin and diversification of *wx* allele of glutinous indica rice landraces through the traditional slash and burn system in northern Laos. *Breed. Sci.* Accepted.

2) Hao, Y., M. Akimoto, R. Kaewcheenchai, M. Sotowa, T. Ishii, and R. Ishikawa (2015) Inconsistent diversities between nuclear and plastid genomes of AA genome species in the genus *Oryza*. *Genes & Genetic Systems* 2016 Mar 23;90(5):269-81. doi: 10.1266/ggs.14-00063. Epub 2015 Dec 18.

3) Inoue T., T. Yu, T. Oht, E. Hitomi, K. Ichitani, M. Kawase, S. Taketa, K. Fukunaga (2015) Multiple origins of the phenol reaction negative

phenotype in foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv., were caused by independent loss-of-function mutations of the polyphenoloxidase (Si7PP0) gene during domestication. *Molecular Genetics and Genomics* DOI 10.1007/s00438-015-1022-x

4) Brozynska M., E. Syafika, OA. Furtado, D. Crayn, B. Simon, R. Ishikawa, R.J. Henry (2014) Chloroplast Genome of Novel Rice Germplasm Identified in Northern Australia. *Tropical Plant Biol.* (2014) 7:111-120.

5) Sotowa, M., K. Ootsuka, Y. Kobayashi, Y. Hao, K. Tanaka, K. Ichitani, JM. Flowers, M D. Purugganan, I. Nakamura, Y-I. Sato, T. Sato, D. Crayn, B. Simon, D. LE. Waters, R. J. Henry and R. Ishikawa (2013) Molecular relationships between Australian annual wild rice, *Oryza meridionalis*, and two related perennial forms. *Rice* 2013, 6:26 doi:10.1186/1939-8433-6-26

6) Ashikawa, I. and R. Ishikawa (2013) A population genetics-based approach reveals candidate gene regions important in the determination of resistance specificity for the Pik family of rice blast resistance genes. *J Gen Plant Pathol J Gen Plant Pathol* 79:178-181. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1) 郝茵・秋本 正博・石川 隆二. 葉緑体からみた野生イネ *Oryza glumaepatula* の系統分化. 第 125 回日本育種学会(東北大学農) 2014 年 03 月 21 日 ~ 2013 年 03 月 22 日

2) 外和 昌大, 一谷 勝之, 石川 隆二. オーストラリア多年生野生イネの冠水ストレス適応戦略 第 125 回日本育種学会(東北大学農) 2014 年 03 月 21 日 ~ 2014 年 03 月 22 日

3) 田村 紀子, 斎藤 聖也, Ha Thi Thu Pham, Thi Lang Nguyen, Dinh Thi Lam, Buu Bui Chi, 石川隆二: NGS 情報を利用したベトナム野生イネ遺伝資源の評価. 日本育種学会第 127 回春季大会 3 月 22 日(玉川大学), 2015.

4) Tamura, N., R. Henry, and R. Ishikawa: Endemic *Oryza* species in Australia as breeding resources to improve grain size. *Tropical Agriculture conference 2015*, November 16-18 (Brisbane, Australia), 2015.

5) 田村 紀子, 斎藤 聖也, Ha Thi Thu Pham, Thi Lang Nguyen, Dinh Thi Lam, Buu Bui Chi, 石川隆二: NGS 情報を利用したベトナム野生イネ遺伝資源の評価.

日本育種学会第 127 回春季大会 3 月 22 日(玉川大学), 2015 .

〔図書〕(計 1 件)

Mutou, C., K. Tanaka, R. Ishikawa (2014) Chapter 2: DNA extraction from rice endosperm (Including a protocol for extraction of DNA from ancient Seed samples) RJ Henry and A Furtado (eds), Cereal Genomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology vol1099, pp. 7-15, Springer Science+Business Media, New York .

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/1/plantbrd/genetics.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石川 隆二 (ISHIKAWA, Ryuji)  
弘前大学・農学生命科学部・教授  
研究者番号：90202978

(2)研究分担者

佐藤洋一郎 (SATO, Yo-Ichiro) 大学共同利用機関法人 人間文化研究機構・理事  
研究者番号：20145113

中村郁郎 (NAKAMURA, Ikuo)

千葉大学大学院・園芸学研究科・教授  
研究者番号：50207867

一谷 勝之 (ICHITANI, Katsuyuki)

鹿児島大学・農学部・准教授  
研究者番号：10305162