

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26292002
研究課題名(和文)世界のイネコアコレクションからハイブリッドライス育種重要形質の分子遺伝学的抽出

研究課題名(英文)Molecular genetic extraction of traits important for hybrid rice production among world rice core collection

研究代表者
鳥山 欽哉 (TORIYAMA, Kinya)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20183882
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：ハイブリッドライス育種に重要な形質の分子基盤を構築するため、農業生物資源遺伝子バンクNIASコアコレクション世界のイネ69品種を材料とし、イネ品種「台中65号」の連続戻し交雑を行うことにより、細胞質雄性不稔性を示す系統と関連する遺伝子を明らかにした。柱頭露出性を調査し、柱頭露出率の高い系統を明らかにした。高い柱頭露出率に寄与するQTLを第4染色体と第8染色体に検出した。これらの情報は、ハイブリッドライス育種の実用化に有用である。

研究成果の概要(英文)：To establish molecular basis of important traits for the production of hybrid rice, we employed 69 accessions of the world rice core collection provided by the National Institute of Agrobiological Sciences Genebank. After successive backcross of a cultivar Taichung 65, we found accessions inducing cytoplasmic male sterility (CMS) and CMS-associated genes. We also investigated stigma exertion rate, and found accessions showing high stigma exertion rate and QTLs responsible for this trait. These information will be useful for the production of hybrid rice.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：育種学 遺伝学 遺伝子 ゲノム 植物

1. 研究開始当初の背景

ハイブリッドライスは15%から20%の収量増が期待され、中国では17百万ヘクタールで栽培され、イネ栽培面積の57.6%を占めている(Barclay 2010 *Rice Today* 9: 32-35)。さらに、東南アジア各国や米国でも栽培され、世界全体でのハイブリッド作付け率は13%となっている(IRRI 2009 報告に基づく推定値)。2008年にはIRRIを中心としてハイブリッドライス開発コンソーシアム(Hybrid Rice Development Consortium; HRDC)が設立され、ハイブリッドライスの開発支援や種子生産研究への協力を行っている。世界的にはハイブリッドライスの需要が高まっており、この分野の研究が重要になってきている。

イネのハイブリッドライスの育種には細胞質雄性不稔系統が使われるが、全体の95%がWA型細胞質雄性不稔性(WA-CMS)を利用している(Barclay 2007, *Rice Today* 6: 22-25)。世界のイネ全栽培面積の1割が単一の細胞質に依存していることになる。トウモロコシのハイブリッド育種では、1960年代に、T型細胞質雄性不稔を用いたF₁採種が行われていたが、T型特異的な「ごま葉枯病菌」の新しいT型レースが出現したことにより1970年代に大被害を受けて壊滅している。このような病害虫に対する遺伝的脆弱性の克服にはCMS細胞質の多様化が必要である。また、F₁種子の採種効率を上げるため、母親は柱頭露出性が大きく他殖しやすい系統、父親は葯が大きく花粉量が多い系統の育成が望まれている。

我々は4種類の細胞質雄性不稔系統LD-CMS, CW-CMS, RT98-CMS, RT102-CMSについてミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定し、CMS原因遺伝子候補を明らかにした。3種類の稔性回復遺伝子(BT-CMS/*Rf1*, LD-CMS/*Rf2*, CW-CMS/*Rf17*)をクローニングした。また、東北大学オリジナルの系統CW-CMSを用いることにより、これまで作出不可能であったIR24等のインディカのCMS系統の作出が可能となることを示した。このように、CMS系統の多様化に貢献してきた。

2. 研究の目的

農業生物資源ジーンバンク NIAS コアコレクション世界のイネ 69 品種を材料とし、ハイブリッドライスを育種するための重要形質として、細胞質雄性不稔性のミトコンドリアを保有するかの調査、および、柱頭露出性等の花器形質について調査する。それらの形質に関わる遺伝子を分子遺伝学的に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞質雄性不稔性のミトコンドリアの調査

NIAS コアコレクション世界のイネ 69 品種に「台中 65 号」の戻し交雑を行い、細胞質置換系統を作出し、CMS の形質が現れるかを

調査した。CMS 系統が得られた場合、ミトコンドリア遺伝子の解析を行い、CMS 原因遺伝子候補を探索した。

(2) 柱頭露出性等の花器形質

柱頭露出性(stigma exertion)は開花時に柱頭が穎花の外部に露出し、閉穎後もそのままとどまる形質である。開花時に外部からの花粉を受け取る機会が増えるのみならず、閉穎後も6日間受粉可能であるという報告(Yan et al. 2009 *Mol Breed* 24: 277-292)もあり、開花日・開花時刻が異なるために利用できなかった品種を花粉親として利用できる。異なる両親の間で種子を採らなければならないF₁ハイブリッドの採種効率向上に繋がる有用形質である。

本研究では、栽培品種由来の柱頭露出性に関する遺伝子を明らかにして育種に利用することを目的とし、NIAS コアコレクション世界のイネ 69 品種を用いて、柱頭露出性の高い品種を探索した。次に、台中 65 号と交配したF₂世代を用いて、柱頭露出性のQTL解析を行った。

4. 研究成果

(1) 新規細胞質雄性不稔系統作出の試み

我々は以前、細胞質雄性不稔性を示すLD-CMSとCW-CMSに特異的な構造を検出する6個のプライマーペアと3種類の遺伝子を検出するプライマーペアを用いてPCR増幅の有無をWRCについて調査し、AからLの12種類のミトコンドリアハプロタイプに分類した(Fujii et al. *BMC Genomics* 2010, 11:209)。

本研究では、BT-CMSの原因遺伝子とされる*orf79*を保持しないWRCの中で、異なるミトコンドリアハプロタイプを示すWRCを選抜し、戻し交雑の世代が進んだ9品種由来の系統についての詳細に稔性調査を行った(表1)。WRC07(DAVAO 1), WRC20(TADUKAN), WRC23(LEBED), WRC27(NEPAL 8), WRC36(RATUL), WRC45(MA SHO), WRC48(KHAU MAC KHO), WRC49(PADI PERAK), WRC62(CHIN GALAY), 戻し交雑親台中65号(T65)、各世代8個体程度栽培した。既報のCMS原因遺伝子の検出には、BT型*orf79*, CW型*orf307*, RT98型*orf113*, RT102型*orf352*, WA型*orf352*を特異的に増幅させることができるプライマーペアを用いた。

ミトコンドリアハプロタイプが日本晴と同じA型を示すWRC45, WRC48, WRC49にT65を戻し交雑したところ、BC₄F₁またはBC₅F₁世代において、雄性不稔個体は得られなかった。*orf288*が無い点のみ異なるB型に属するWRC07でも雄性不稔個体は得られなかった。ハプロタイプE型のWRC20、G型のWRC27、I型のWRC36では、BC₄F₁個体とBC₅F₁個体が全て不稔であったため、細胞質雄性不稔性を示すと考えられた。これらの品種では既報のCMS原因遺伝子が検出されないため、新規の細胞質雄性不稔性である可能性が高い。ハプロタイプF型はCWに特徴的な構造を検出す

るプライマーで増幅されるハプロタイプである。F型に属する WRC62 は WA-CMS の原因遺伝子である *orf352* を保有し、BC₃F₁ 個体がすべて不稔性を示したため、*orf352* による細胞質雄性不稔性であると考えられた。

ハプロタイプ F 型の WRC23 は *orf352* などの既報の CMS 原因遺伝子が検出できない。BC₄F₁ の不稔系統に T65 を戻し交雑したところ、次世代に不稔性と可稔性が分離して出現したため、CMS ではなく、核遺伝子支配のドミナントな雄性不稔性の可能性が考えられた。ドミナントな雄性不稔性は、イネなどの自殖性植物においてゲノムシャッフリングを伴う循環選抜育種に利用できるため、利用価値が高いと期待された。

表 1 戻し交雑世代における種子稔性の分離

	原産国	品種	ミトコンドリアハプロタイプ	既報の CMS 原因遺伝子の有無	2014年		2015年		2016年
					世代	種子稔性*	世代	種子稔性*	世代、種子稔性(N)
WRC07	フィリピン	DAVAO 1	B	無	BC4F2	5FF	ND	ND	ND
WRC20	フィリピン	TADUKAN	E	無	BC5F1	4S, 2CS	BC6F1	7CS, 1S	BC7F1 (CMS系統): 0%
WRC23	フィリピン	LEBED	F	無	BC4F1	4FF, 2CS	BC5F1	2FF, 2F, 1S, 5CS	BC5F1: 1FF, 2F, 1PS, 1S, 3CS BC6F1: 3FF, 2CS
WRC27	ネパール	NEPAL B	G	無	BC5F1	1S, 4CS	BC6F1	7CS	BC7F1 (CMS系統): 0%
WRC36	インド	RATUL	I	無	BC5F1	8CS	BC6F1	8CS	BC7F1 (CMS系統): 0%
WRC41	スリランカ	KALUHEENATI	J	<i>orf79</i>	BC5F1	2F, 1PF, 1PS, 2S	BC6F1	3PS	BC7F1 (CMS系統): 14% BC5F3 (回復系統): 85%
WRC45	ミャンマー	MA SHO	A	無	BC5F1	7FF	ND	ND	ND
WRC48	ベトナム	KHAU MAC KHO	A	無	BC4F1	7FF	ND	ND	ND
WRC49	インドネシア	PADI PERAK	A	無	BC4F1	7FF	ND	ND	ND
WRC62	ミャンマー	CHIN GALAY	F	<i>orf352</i>	ND	ND	BC3F1	7CS	ND

* FF, 100-80%; F, 75-70%; PF, 69-30%; PS, 23-10%; S, 9-1%; CS, 0%; 数値は個体数

(2) ミトコンドリア遺伝子の解析

WRC20, WRC27, WRC36 の戻し交雑後代は、新規の細胞質雄性不稔性を示すと考えられたので、ミトコンドリア遺伝子を調査した。その結果、新規の *orf* (*orf312* と命名) を保持することを明らかにした。ORF312 の C 末端側半分は WA-CMS の原因因子とされる ORF352 と 97% の相同性を示した。新規 *orf312* が WRC20, WRC27, WRC36 に由来する CMS 原因遺伝子と考えられた。

(3) 稔性回復遺伝子の解析

WRC41 はハプロタイプ J 型に属しているが、BT 型 CMS の CMS 原因遺伝子と同じ *orf79* を保持していた。ただし、*atp6-orf79* の遺伝子間の配列は LD 型 CMS と同様に 4 塩基の挿入が見られた。WRC41 に T65 を戻し交雑して得られた CMS 系統では、ミトコンドリアに ORF79 が蓄積したが、WRC41 に由来する稔性回復系統では、*orf79* RNA の分解による転写後制御

が見られることを明らかにした。稔性回復遺伝子のマッピングを進めたところ、第 2 染色体の 877 kb (日本晴相当) の領域に絞り込んだ。この領域には *Rf2* が座乗しているが、*Rf2* の塩基配列が非機能型を示したため、*Rf2* とは異なる新規の稔性回復遺伝子が存在する可能性が示唆された。

(4) 柱頭露出性の解析

世界のイネ・コアコレクションの中の 30 品種をポットに植え、開花から約 10 日目の穂を採取し、柱頭露出率=(柱頭露出した穎花数/開花した穎花数)×100 (%) を評価したところ、柱頭露出率が高い品種 (50% 以上) として *indica* 品種の WRC05 (Naba)、WRC28 (Jarjan)、WRC31 (Shoni)、WRC62 (Kemasin)、WRC64 (Padi kuning)、WRC97 (Chin galay)、*tropical japonica* 品種の WRC45 (Ma sho) を選抜した。*japonica* 品種は、ほとんど柱頭露出性がみられず、コシヒカリの柱頭露出率は 3.9% だった (図 1、表 1)。



図 1 世界のイネ・コアコレクションに含まれる 28 品種の柱頭露出の様子

柱頭露出率が高い品種の Ma sho (68.1%) に柱頭露出率が低い品種の台中 65 号 (4.6%) を交雑し、F₁ を得た。F₁ の自殖により得た F₂ の開花後 10 日の穂を材料に、柱頭露出率を形質として QTL 解析を行った。

QTL 解析の結果、Ma sho の柱頭露出率に寄与する QTL が第 4 染色体と第 8 染色体に推定された (図 2)。柱頭露出率を高める遺伝子として第 3 染色体に *GRAIN SIZE 3 (GS3)* が報告されている (図 3)。本研究で発見した柱頭露出率を高める Ma sho の QTL は、既報の柱頭露出率を高める *GS3* と異なる領域であるため、ピラミッティングによる柱頭露出率の

向上に有用であると期待される。

表 2 柱頭露出率

ID	品種名	柱頭露出率 (%)		柱頭の色	原産地	Indica/Japonica
		25年度*	26年度			
WRC 03	BEI KHE	42	—	黒	カンボジア	Indica
WRC 05	NABA	62	50	白	インド	Indica
WRC 06	PULUK ARANG	34	—	—	インドネシア	Indica
WRC 07	DAVO 1	15	—	—	フィリピン	Indica
WRC 12	DAHONGGU	—	18	—	中華人民共和国	Indica
WRC 13	ASU	9	—	—	ブータン	Indica
WRC 14	IR 58	48	—	—	フィリピン	Indica
WRC 15	CO 13	—	—	—	インド	Indica
WRC 17	KEIBOBA	28	36	黒	中華人民共和国	Indica
WRC 20	TADUKAN	33	—	—	フィリピン	Indica
WRC 21	SHWE NANG GYI	47	—	紫	ミャンマー (ビルマ)	Indica
WRC 23	LEBED	24	45	白/黒	フィリピン	—
WRC 24	PINULUPOT 1	19	—	黒	フィリピン	—
WRC 25	MUHA	39	—	白	インド	Indica
WRC 27	NEPAL 8	—	8	紫	ネパール	Indica
WRC 28	JARJAN	58	—	白	ブータン	Indica
WRC 30	ANJANA DHAN	24	—	—	ネパール	Indica
WRC 31	SHONJ	—	50	—	バングラデシュ	Indica
WRC 32	TUPA 121-3	43	—	白	バングラデシュ	Indica
WRC 34	ARC 7291	8	—	—	インド	Indica
WRC 36	RATUL	—	3	白	インド	Indica
WRC 38	ARC 11094	19	—	—	インド	Indica
WRC 39	BADARI DHAN	5	—	白	ネパール	Indica
WRC 41	KALUHEENATI	—	—	紫	スリランカ	Indica
WRC 45	MA SHO	61	68	白	ミャンマー (ビルマ)	Tropical Japonica
WRC 48	KHAU MAC KHO	6	—	白	ベトナム	Tropical Japonica
WRC 49	PADI PERAK	24	—	—	インドネシア	Tropical Japonica
WRC 62	KEMASIN	—	67	黒	マレーシア	Indica
WRC 64	PADI KUNING	55	58	黒	インドネシア	Indica
WRC 67	PHULBA	27	—	—	インド	Japonica
WRC 97	CHIN GALAY	—	65	白	ミャンマー (ビルマ)	Indica
WRC 99	HONG CHEUH ZAI	42	30	黒	中華人民共和国	Indica

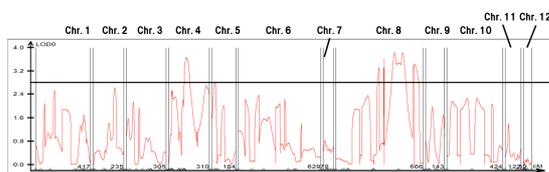


図 2 柱頭露出率の QTL 解析

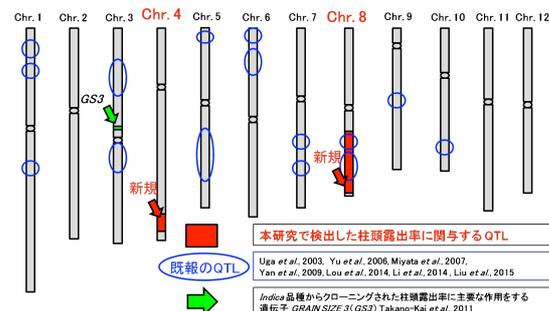


図 3 検出した QTL と既報の柱頭露出率を高めるとされる QTL の比較

(5) 将来展望

本研究により、細胞質雄性不稔性の新たな遺伝子源が明らかになった。また、NIAS コアコレクションの柱頭露出性についてデータベースが構築できた。これらの情報は、ハイブリッドライス育種の実用化に有用である。日本オリジナルの CMS 系統の育種素材を提供し、これによって、国内種苗産業の国際競争力の強化、また、将来的な国産米の生産性と輸出力の向上のための基盤構築につなげることができ、波及効果が大きい。

核を「台中 65 号」で統一し、様々な細胞質を持った細胞質置換系統シリーズが得られた。これらの系統はイネコミュニティで共有できる。異なる細胞質が CMS 形質以外に与える影響について研究するための材料を提供する。ミトコンドリアから核へのレトロ

グレードシグナルを解析するための素材を提供する点で学術的にも深い意義を有する。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Igarashi K, Kazama T, Toriyama K (2016) A gene encoding pentatricopeptide repeat protein partially restores fertility in RT98-type cytoplasmic male sterile rice. *Plant Cell Physiol* 57:2187-2193 (査読有) doi:10.1093/pcp/pcw13

(2) Kazama T, Toriyama K (2016) Whole mitochondrial genome sequencing and re-examination of a cytoplasmic male sterility-associated gene in Boro-Taichung-type cytoplasmic male sterile rice. *PLOS ONE* 11, e0159379 pp. 1-13 (査読有) . doi: 10.1371/journal.pone.0159379

(3) Kazama T, Itabashi E, Fujii S, Nakamura T, Toriyama K (2016) Mitochondrial ORF79 levels determine pollen abortion in cytoplasmic male sterile rice. *Plant J.* 85:707-716. (査読有) doi: 10.1111/tpj.13135.

(4) Kazama T, Toriyama K (2014) A fertility restorer gene *Rf4* widely used for hybrid rice breeding encodes a pentatricopeptide repeat protein. *Rice* 2014, 7:28: 1-5 (査読有) doi:10.1186/s12284-014-0028-z

(5) Fujii S, Kazama T, Ito Y, Kojima S, Toriyama K (2014) A candidate factor that interact with RF2, a restorer of fertility of Lead rice-type cytoplasmic male sterility in rice. *Rice* 7:21: p.1-4 (査読有) Doi:10.1186/s12284-014-0021-6

[学会発表] (計 14 件)

(1) 志田 伶那・長恵 理子・風間 智彦・鳥山 欽哉
CMS 原因遺伝子 *orf79* を保有する 4 種類のイネにおける稔性回復機構の解析
第 11 回東北育種研究集会
2016 年 11 月 12 日
山形大学農学部 (山形県鶴岡市)

(2) 村上 哲也・Dini Astika Sari・五十嵐 圭介・風間 智彦・鳥山 欽哉
世界のイネ・コアコレクションに由来する新規細胞質雄性不稔系統の育成
日本育種学会第 130 回講演会

2016年9月24日
鳥取大学（鳥取県鳥取市）

(3) 志田怜那・長恵理子・風間智彦・鳥山欽哉

orf79 を保有す様々なイネにおける *orf79* 発現制御の比較解析

日本育種学会第130回講演会

2016年9月24日

鳥取大学（鳥取県鳥取市）

(4) 風間智彦・鳥山欽哉

Boro 型細胞質雄性不稔性イネのミトコンドリアゲノムの解読

日本育種学会第130回講演会

2016年9月24日

鳥取大学（鳥取県鳥取市）

(5) Toriyama, K.

Arms race between mitochondria and nuclei exemplified by cytoplasmic male sterility in rice. Lorentz center workshop "Innate immunity of Crop, Livestock and Fishes -Dawn of Agricultural Immunology- "

September 19-23, 2016

Leiden (Netherlands)

(招待)

(6) Kazama, T.

Genetic analysis of fertility restorer locus on chromosome 10 derived from a wild rice.

K. S. U. International symposium 'Frontiers in plant mitochondrial genome research' July 7, 2016

京都産業大学（京都府京都市）

(招待)

(7) 川出駿・鳥山欽哉

イネ品種「Ma sho」の柱頭露出率に関するQTLの解析

日本育種学会第129回講演会

2016年3月21日・22日

横浜市立大学（神奈川県横浜市）

(8) 鳥山欽哉

イネの花粉発育不全に見られるミトコンドリアと宿主のせめぎあい

第38回日本分子生物学会年会ワークショップ

2015年12月4日

神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

(招待)

(9) 川出駿・鳥山欽哉

閉穎後の露出柱頭における稔実率の調査

第10回東北育種研究集会

2015年11月14日

東北大学大学院農学研究科（宮城県仙台市）

(10) 村上哲也・風間智彦・鳥山欽哉

世界のイネコアコレクションに由来する新規細胞質雄性不稔系統作出の試み

第10回東北育種研究集会

2015年11月14日

東北大学大学院農学研究科（宮城県仙台市）

(11) 志田怜那・風間智彦・鳥山欽哉

スリランカ在来品種 KALUHEENATI に由来する細胞質雄性不稔性とその稔性回復遺伝子の研究

第10回東北育種研究集会

2015年11月14日

東北大学大学院農学研究科（宮城県仙台市）

(12) 川出駿・鳥山欽哉・風間智彦

世界のイネ・コアコレクションにおける柱頭露出率の評価

日本育種学会第128回講演会

2015年9月11日・12日

新潟大学（新潟県新潟市）

(13) Kazama, T., Igarashi, K., Okazaki, M., Toriyama, K.

Mitochondrial genotype determines fate of pollen development in cytoplasmic male sterile rice. 9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology

May 17-22, 2015

Wroclaw (Poland)

(招待)

(14) 川出駿・鳥山欽哉

世界のイネ・コアコレクション(WRC)における柱頭露出性

第9回東北育種研究集会

2014年11月15日

岩手大学農学部（岩手県盛岡市）

〔その他〕（計12件）

受賞

(1) 風間智彦

細胞質雄性不稔イネの稔性回復メカニズムの分子遺伝学的解析

日本育種学会奨励賞

名古屋大学（愛知県名古屋市）

2017年3月29日

(2) 川出駿・鳥山欽哉

イネ品種「Ma sho」の柱頭露出率に関するQTLの解析

第129回講演会日本育種学会優秀発表賞

横浜市立大学（神奈川県横浜市）

2016年6月19日

アウトリーチ活動

(3) 鳥山欽哉

遺伝子組み換え作物のリスクとベネフィット

みやぎ県民大学 大学開放講座

2016年8月26日

東北大学農学部（宮城県仙台市）

(4) 風間智彦・鳥山欽哉

東北大学農学部オープンキャンパスにおける研究紹介

2016年7月27日・28日

東北大学農学部（宮城県仙台市）

(5) 風間智彦

研究室紹介

福島県立磐城高等学校 SSH 総合の時間

2016年4月21日

東北大学農学部（宮城県仙台市）

(6) 風間智彦

植物ミトコンドリアが引き起こす花粉不稔とその利用

東京大学公開セミナー

2015年10月30日

東京大学（東京都文京区）

(7) 風間智彦・鳥山欽哉

東北大学農学部オープンキャンパスにおける研究紹介と模擬講義

2015年7月29日・30日

東北大学農学部（宮城県仙台市）

(8) 風間智彦

研究室紹介

福島県立磐城高等学校 SSH 総合の時間

2015年4月23日

東北大学農学部（宮城県仙台市）

(9) 鳥山欽哉

花粉の不思議と環境適応植物工学

出前講義

2015年2月7日

山形県立山形西高等学校（山形県山形市）

(10) 鳥山欽哉

施設・研究の紹介

加美農業高等学校・韓国水原農生命科学高等学校の大学訪問

2014年9月4日

東北大学農学部（宮城県仙台市）

(11) 風間智彦・鳥山欽哉

東北大学農学部オープンキャンパスにおける研究紹介と模擬講義

2014年7月30日・31日

東北大学農学部（宮城県仙台市）

ホームページ等

(12) 伊藤幸博・風間智彦・鳥山欽哉

インターネット上での研究成果の継続的な発信「環境適応生物工学研究室 お知らせと更新情報」

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bioadp/PukiWiki/index.php?FrontPage>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥山 欽哉 (TORIYAMA, KINYA)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20183882

(2) 連携研究者

風間 智彦 (KAZAMA, TOMOHIKO)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30431464