

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07558

研究課題名(和文) 野生イネにおける新規雑種黄化遺伝子の同定および分布 豪州の野生イネの起源に迫る

研究課題名(英文) Identification and distribution of novel hybrid chlorosis genes in wild rice lead to the origin of wild rice in Australia

研究代表者

一谷 勝之 (Ichitani, Katsuyuki)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：10305162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：オーストラリアには、栽培イネ*Oryza sativa*と同じAAゲノムをもつ野生イネが2種分布している。一つは*O. sativa*の祖先野生種である*O. rufipogon*でもう一つは*O. meridionalis*である。インド原産の*O. rufipogon*系統W0106とオーストラリアの野生イネを交配すると雑種第一代は黄化症状を呈する。この原因遺伝子は第7染色体上に相反で密接に連鎖する優性補足遺伝子であることを見出した。黄化原因遺伝子近傍にはオーストラリアとニューギニアの*O. rufipogon*と*O. meridionalis*が共有し、他の種には見られないDNA多型を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核ゲノム全体の分析では *O. rufipogon* と *O. meridionalis* は AA ゲノム *Oryza* 種の中で最も遠縁と見なされている。しかし、葉緑体ゲノム分析ではオーストラリアの *O. rufipogon* 系統は、アジアの *O. rufipogon* よりもむしろ *O. meridionalis* に近い。このことは、オーストラリアの *O. rufipogon* と *O. meridionalis* は過去に交雑し、その後、introgressionによって核ゲノムが大きく異なったことを意味する。本研究では核ゲノム中にintrogressionの証拠を見出し、野生イネの種分化に関する新たな知見を加えた。

研究成果の概要(英文)：Asian rice species *Oryza sativa* carry AA genome. In Australia, two wild rice species with AA genome are inhabited. One is *O. rufipogon*, the ancestor of Asian rice, and the other is *O. meridionalis*. The hybrids between W0106, one *O. rufipogon* accession from India, and *O. rufipogon* and *O. meridionalis* accessions in Australia show chlorosis phenomenon. This hybrid chlorosis phenomenon is caused by two dominant complementary genes, which are closely linked in repulsion phase on chromosome 7. DNA sequences unique to *O. rufipogon* and *O. meridionalis* accessions in Australia and New Guinea were found in the chromosomal region proximate to the hybrid chlorosis causal genes.

研究分野：植物育種学

キーワード：雑種黄化 種分化 生殖隔離

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究の研究代表者 一谷, 研究分担者 久保山はこれまで雑種第一代で発現する雑種弱勢現象の遺伝学的解析に携わってきた。雑種弱勢は交雑育種の障害となる一方で, 種分化の原動力の一つであるため, 昔から育種学者, 遺伝学者, 進化学者の関心を引いてきた。申請者らは, 雨宮・明峰(1963)が報告したイネ雑種弱勢遺伝子 *HWC1*, *HWC2* の染色体上の連鎖分析を行うとともに (Ichitani *et al.* 2007, Kuboyama *et al.* 2009), 第4染色体の弱勢原因遺伝子 *Hwc2-1* 遺伝子の分布とハプロタイプ分析を行い, *HWC2* 周辺の連鎖ブロックの存在を明らかにした (Ichitani *et al.* 2016)。また, Oka (1957)が世界で初めて発見したイネの雑種弱勢現象を支配する遺伝子 *HWA1*, *HWA2* の染色体上の座乗位置を明らかにした (Ichitani *et al.* 2011)。一方で, 2009年から研究分担者の石川が代表を務めるオーストラリアの野生イネの研究プロジェクトに参加し, 毎年, 現地調査を行うとともに, 申請者が勤務する鹿児島島の温暖な気候を利用し, 生育期間が長い野生イネの栽培ならびに交雑を行い, 雑種第一代の花粉稔性を調査した (Sotowa *et al.* 2013)。その際にインド原産の *O. rufipogon* 系統 W0106 とオーストラリアの *O. rufipogon* 系統 W2109, *O. meridionalis* 系統 W1297 との雑種第一代の葉の先端が黄化する現象に気づいた。その後の調査で, 分析した交配組合せ間では, 分類上の種とは関係なく W0106 とオーストラリアの野生イネ間の雑種でのみ生じることを明らかにした(表1. 未発表データ)。本研究対象の雑種黄化は, 弱勢というほど生育は弱々しくはなく, 自殖種子を得ることは容易であるが, 光合成が抑制されて生育に影響を与えるという点で同じ文脈で捉えることができよう。

表1. オーストラリア野生イネと様々なAAゲノム *Oryza* 系統の雑種第一代のふるまい

系統名	花粉親 種名	原産国	卵親					
			台中65号	W0106	W0120	W1297	W1299	
			種名	<i>O. sativa</i>	<i>O. rufipogon</i>	<i>O. rufipogon</i>	<i>O. meridionalis</i>	<i>O. meridionalis</i>
			原産国	台湾	インド	インド	オーストラリア	オーストラリア
Jpn1	<i>O. rufipogon</i>	オーストラリア	正常	黄化	正常	正常	正常	正常
Jpn2	<i>O. meridionalis</i>	オーストラリア	正常	黄化	正常	正常	正常	正常
W1297	<i>O. meridionalis</i>	オーストラリア	正常	黄化	正常	正常	正常	正常
W2109	<i>O. rufipogon</i>	オーストラリア	正常	黄化	正常	正常	正常	正常
W1230	<i>O. rufipogon</i>	ニューギニア	正常	正常	正常	正常	正常	正常
W0106	<i>O. rufipogon</i>	インド	正常		未調査	未調査	未調査	未調査

コムギおよびその近縁野生種間で雑種黄化現象が見出され, その原因遺伝子の分布はコムギの起源の研究に大いに貢献した (Tunewaki and Hamada 1968, Tsunewaki and Nakai 1973)。イネにおける雑種黄化現象はこれまで雑種第二代で発現する 2 劣性遺伝子に支配されているものしか知られていない (Ichitani *et al.* 2012)。したがって本申請の対象遺伝子は未同定の遺伝子である。

Zhang *et al.* (2014)は, *O. nivara*, *O. glaberrima*, *O. barthii*, *O. glumaepatula*, *O. meridionalis* の 5 種の AA ゲノム *Oryza* 種それぞれ 1 系統のゲノム解読の結果を発表している。これによると, *O. meridionalis* は他の 4 種ならびに *O. sativa* (品種 日本晴) とは核ゲノム全体レベルの解析でも主要遺伝子の塩基配列による解析でも明らかにかき離れており, 最も早く他の種から分岐したことが強く示唆される。一方, Sotowa *et al.* (2013)はオーストラリアの *O. rufipogon* と *O. meridionalis* との間で葉緑体 DNA を共有していることを報告している。本申請の分析対象である雑種黄化遺伝子の分布は, 両種間で核ゲノムの一部も共有していることを示唆する。*O. meridionalis* のゲノム情報は, Zhang *et al.* (2014)の分析した IRRI の系統 105298 と The *Oryza* Map Alignment Project (OMAP) による 国立遺伝学研究所の系統 W2112 が NCBI 上で公開されている。ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) の *Oryza* Genome では, W0106 を含む 11 の *O. rufipogon* 系統を 10x ~ 20x の深さで読んでいる。また, W0106 は幼苗由来の cDNA の塩基配列データも公表されている (Yang *et al.* 2011)。オーストラリア原産の *O. rufipogon* 系統の核ゲノムの高精度のアセンブリーデータは, 申請者の知る限り, NCBI にも NBRP にも公表されていない。

2. 研究の目的

本研究では, 連鎖分析に適した分離集団を育成して, W0106, W2109 のもつ雑種黄化遺伝子の染色体上の座乗位置を明らかにする。さらに分離集団の規模を大きくして, 遺伝子の座乗位置をできるだけ絞り込む。次いで周辺の DNA マーカーの情報, 検定交雑によって両遺伝子の分布を明らかにする。W2109 の核ゲノム情報はまだ取得されていない。本課題では, W2109 の次世代シーケンサーによる解析を外部委託する。*O. meridionalis* の核ゲノム情報はギャップが多いが, 次世代シーケンサーで解読され, 公開されている。遠い過去にイントログレッションが生じていたら, 雑種黄化遺伝子周辺には W2109 に *O. meridionalis* 的な DNA 塩基配列, または *O. meridionalis* に *O. rufipogon* (W2109) 的な DNA 塩基配列が見出されるはずである。また, 雑種黄化現象を形態学, 分子生物学的に解析し, 原因遺伝子の絞り込みの一助とする。

3. 研究の方法

(1) 雑種黄化遺伝子の連鎖分析：雑種黄化の原因遺伝子の染色体上の座乗領域をできるだけ絞り込む。野生イネならびに野生イネ間の雑種後代では晩生、脱粒性易など遺伝子分析の障害となる個体が多数出現する。それを避けるため、W0106 に栽培イネ品種台中 65 号(T65)を戻し交雑した BC₁F₁ 世代と オーストラリアの野生イネとして W0106 と同じ *O. rufipogon* に属する W2109 に T65 を戻し交雑した BC₁F₁ 世代の間で交雑した[(T65 × W0106) × T65] × [(T65 × W2109) × T65] の集団 (BC₁F₁ に相当する。以下、本稿では、この世代を便宜的に BC₁F₁ と表記し、戻し交雑を進めた世代を BC₂F₁, BC₃F₁・・・と表記する)に黄化を示す個体が分離したので、黄化個体の自殖後代 BC₁F₂ 世代を展開し、黄化に関する連鎖分析を行った。雑種黄化現象は W0106 と W2109 がそれぞれ一つずつ持つ優性遺伝子による補足作用によって引き起こされると仮定した。

(2) 検定交配による黄化原因遺伝子の分布調査：W0106, W1297, W2019 を検定系統として、アジアの *O. rufipogon* 10 系統、オーストラリアの *O. rufipogon* 2 系統、ニューギニアの *O. rufipogon* 3 系統、オーストラリアの *O. meridionalis* 20 系統と交雑し、雑種第一代を栽培し、目視で黄化の有無を判別した。

(3) 雑種黄化遺伝子周辺の DNA 多型解析：*O. meridionalis* W2112 のゲノム情報と公開されている *O. sativa* 品種、*O. rufipogon* 他 AA ゲノム野生イネ系統の公開ゲノム情報を比較し、*O. meridionalis* 特異的な配列を見出し、その領域を挟むようにプライマーを設計して PCR し、制限酵素処理ならびにポリアクリルアミドゲル電気泳動によって DNA 多型を検出した。供試系統は (2)と同じである。

(4) 雑種黄化発現に関する遺伝子発現解析：戻し交雑を進め、ゲノムの 7/8 以上が栽培イネ台中 65 号に置き換わり、かつ黄化が分離した BC₂F₁ 系統の黄化個体、正常個体それぞれ 2 個体の止め葉 50mg から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社)を用いて RNA を抽出し、Novaseq6000 により RNAseq を行った。

(5) オーストラリアの *O. rufipogon* W2109 系統のゲノム解析：W2109 の成葉 2 g から CTAB 法により高品質の DNA を抽出し、Pacbio Sequel と Novaseq6000 により全ゲノム解析を行った。また、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社)を用いて葉、根それぞれ 100mg から RNA 抽出を行い、Novaseq6000 により RNAseq 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 雑種黄化遺伝子の連鎖分析

BC₁F₂ 世代を展開し、黄化に関する連鎖分析を行った結果、第 7 染色体の DNA マーカー RM500 がヘテロ接合の個体に黄化個体が明らかに多く見出されることが発見された。また、BC₁F₁ 世代の黄化個体に T65 を戻し交雑して得られた BC₂F₁ 世代では、黄化個体が観察されなかった。以上の結果は、W0106 と W2109 がもつ黄化原因遺伝子はいずれも RM500 の近傍に座乗すること、黄化原因遺伝子の座乗位置はかなり近接していることを示している。DNA マーカーと供試個体を増やし、分析を進めた結果、黄化遺伝子は両方とも第 7 染色体上の RM500(16Mb)と 20Mb に設計した DNA マーカーの間に位置することが判明した。

(2) 検定交配による黄化原因遺伝子の分布調査

W0106 との雑種が黄化を示す系統はアジアの *O. rufipogon* ではなく、オセアニアの *O. rufipogon*, *O. meridionalis* で高い頻度を示した (表 2)。W1297 との雑種が黄化を示す系統はインド原産の *O. rufipogon* W0106 と W0107 だけであった。W2109 との雑種が黄化を示す系統はインド原産の *O. rufipogon* W0106, W0107, W1681 と *O. meridionalis* の 1 系統 W1635 であった。以上の結果は、W0106 と同じ雑種黄化遺伝子をもつ野生イネが他にも存在すること、W2109, W1297 と同じ雑種黄化遺伝子をもつ野生イネはオセアニアに幅広く分布していることを示している。また、W2109 と W1635 の雑種第一代は雑種黄化とともに極端な少分げつを伴うため、別の現象の可能性がある。

(3) 雑種黄化遺伝子周辺の DNA 多型解析

17Mb 付近にオーストラリア、ニューギニアの *O. rufipogon* と *O. meridionalis* が共有し、他の種には見られない DNA 多型を見出した。葉緑体 DNA 多型や雑種黄化遺伝子の分布から推察されるのと同様に、オーストラリア、ニューギニアの *O. rufipogon* と *O. meridionalis* は過去に交雑し、その後、introgression によって核ゲノムが大きく異なると考えられた。

(4) 雑種黄化発現に関する遺伝子発現解析

黄化個体で特異的に発現が高まる 20 遺伝子，黄化個体で特異的に発現が低くなる 14 遺伝子を見出した。34 遺伝子中の 11 遺伝子が第 7 染色体上の遺伝子であったことから，連鎖分析や多型分析の結果と符合した。

(5) オーストラリアの *O. rufipogon* W2109 系統のゲノム解析

W2109 のゲノム解析を行ったところ，雑種黄化遺伝子が座乗している第 7 染色体は 1 本のアセンブリーとなったが，参照配列である日本晴ゲノムとの相同性が低いために，上手く繋がらない染色体が多かった。また，根と葉から RNA を抽出し，次世代シーケンサーで解読し，ゲノム配列との関係を見た。その結果，4 万以上の遺伝子数を予測した。

表2. 野生イネ系統間交配組合せによる雑種黄化現象の出現頻度

交配 組合せ	交配 組合せ数	黄化を示した	
		交配組合せ数	頻度
W0106 × アジアの <i>O. rufipogon</i> 系統 オーストラリアの <i>O. rufipogon</i> 系統 ニューギニアの <i>O. rufipogon</i> 系統 オーストラリアの <i>O. meridionalis</i> 系統	7	0	0.00
	2	2	1.00
	3	2	0.67
	8	7	0.88
W1297 × アジアの <i>O. rufipogon</i> 系統 オーストラリアの <i>O. rufipogon</i> 系統 ニューギニアの <i>O. rufipogon</i> 系統 オーストラリアの <i>O. meridionalis</i> 系統	4	2	0.50
	2	0	0.00
	2	0	0.00
	16	0	0.00
W2109 × アジアの <i>O. rufipogon</i> 系統 オーストラリアの <i>O. rufipogon</i> 系統 ニューギニアの <i>O. rufipogon</i> 系統 オーストラリアの <i>O. meridionalis</i> 系統	9	3	0.33
	1	0	0.00
	2	0	0.00
	15	1	0.07

謝辞

本研究で用いた野生イネ(W 系統)は、国立遺伝学研究所植物遺伝研究室および日本医療研究開発構ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) より分譲を受けました。

<引用文献>

雨宮昭・明峰英夫(1963) イネの胚培養に関する研究 3, イネの致死補足遺伝子に関する遺伝生化学的研究. 農技研報 D10: 139-226

Ichitani K, K Namigoshi, M.Sato, S Taura, M Aoki, Y Matsumoto, T Saitou, W Marubashi, T Kuboyama (2007) Fine mapping and allelic dosage effect of *Hwc1*, a complementary hybrid weakness gene in rice. Theor. Appl. Genet. 114: 1407-1415

Ichitani K, S Taura, T Tezuka, Y Okiyama, T. Kuboyama (2011) Chromosomal location of *HWA1* and *HWA2*, complementary hybrid weakness genes in rice. Rice 4: 29-38

Ichitani K, Y Takemoto, K Iiyama, S Taura, M Sato (2012) Chromosomal location of *HCA1* and *HCA2*, hybrid chlorosis genes in rice. International Journal of Plant Genomics Article ID 649081: 1-8

Ichitani K, S Taura, M Sato, T Kuboyama (2016) Distribution of *Hwc2-1*, a causal gene of a hybrid weakness, in the World Rice Core collection and the Japanese Rice mini Core collection: its implications for varietal differentiation and artificial selection. Breeding Science 66: 776-789

Kuboyama T, T Saito, T Matsumoto, J Wu, H Kanamori, S Taura, M Sato, W Marubashi, K Ichitani (2009) Fine Mapping of *HWC2*, a complementary hybrid weakness gene, and haplotype analysis around the locus in rice. Rice 2 :93-103

Oka HI (1957) Phylogenetic differentiation of cultivated rice. XV. Complementary lethal genes in rice. Jpn J Genet 32: 83-87

Sotowa M, K Ootsuka, Y Kobayashi, Y Hao, K Tanaka, K Ichitani, JM Flowers, MD Purugganan, I Nakamura, YI Sato, T Sato, D Crayn, B Simon, DLE Waters, RJ Henry, R Ishikawa (2013) Molecular relationships between Australian annual wild rice, *Oryza meridionalis*, and two related perennial forms. *Rice* 6:1-18

Tsunewaki K and J Hamada (1968) A new type of hybrid chlorosis found in tetraploid wheats. *Jap Jour Genet* 43: 279–288

Tsunewaki K and Y Nakai (1973) Consideration on the origin and speciation of four groups of wheat from the distribution of necrosis and chlorosis genes. *Proceedings of the Fourth International Wheat Genetics Symposium*: 123–129

Yang CC 他 5 名(2012) Independent domestication of Asian rice followed by gene flow from *japonica* to *indica*. *Mol Biol Evol* 29:1471-1479

Zhang QJ 他 21 名(2014) Rapid diversification of five *Oryza* AA genomes associated with rice adaptation. *PNAS* 111: E4954–E4962, doi: 10.1073/pnas.1418307111

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 手塚孝弘, 一谷勝之, 松本雄一, 何海, 木下哲, 宅見薫雄, 久保山勉	4. 巻 21
2. 論文標題 植物の生殖隔離機構解明に向けて -多様性と統一性-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 育種学研究	6. 最初と最後の頁 75-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1270/jsbbr.21.W05	査読の有無 無
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 一谷勝之, 保木良太, 市川真, 田浦悟, 久保山勉, 石川隆二	4. 巻 21巻別1
2. 論文標題 野生イネ間の雑種第一代で見られる黄化現象の原因遺伝子の分布	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 育種学研究	6. 最初と最後の頁 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 保木良太, 植村真郷, 池本悠一郎, 田浦悟, 一谷勝之	4. 巻 20巻別1
2. 論文標題 アジアとオーストラリアの野生イネ間の雑種第一代で見出されて雑種黄化現遺伝子の連鎖分析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 育種学研究	6. 最初と最後の頁 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 一谷勝之
2. 発表標題 オセアニアの野生イネに関する研究の状況
3. 学会等名 2019年度国立遺伝学研究所研究会「Oryza属ゲノム情報を活用した遺伝的多様性研究の推進」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山勇希
2. 発表標題 オセアニアの野生イネの生殖成長期の系統間差異
3. 学会等名 202019年度国立遺伝学研究所研究会「Oryza属ゲノム情報を活用した遺伝的多様性研究の推進」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊元大希
2. 発表標題 Oryza sativaとO. meridionalis間の交雑後代で観察された種子発達異常による分離の歪み
3. 学会等名 202019年度国立遺伝学研究所研究会「Oryza属ゲノム情報を活用した遺伝的多様性研究の推進」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保木良太, 植村真郷, 池本悠一郎, 田浦悟, 一谷勝之
2. 発表標題 アジアとオーストラリアの野生イネ間の雑種第一代で見出された雑種黄化現遺伝子の連鎖分析
3. 学会等名 日本育種学会第133回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 一谷勝之, 保木良太, 市川真, 田浦悟, 久保山勉, 石川隆二
2. 発表標題 野生イネ間の雑種第一代で見られる黄化現象の原因遺伝子の分布
3. 学会等名 日本育種学会第135回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一谷勝之, 久保山勉, 手塚孝弘
2. 発表標題 イネ雑種弱勢の遺伝と病徴
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018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
研究分担者	久保山 勉 (Kuboyama Tsutomu) (10260506)	茨城大学・農学部・教授 (12101)	
研究分担者	石川 隆二 (Ishikawa Ryuji) (90202978)	弘前大学・農学生命科学部・教授 (11101)	
研究協力者	豊元 大希 (Toyomoto Daiki)		
研究協力者	萩山 勇希 (Hagiyama Yuuki)		