

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292004

研究課題名(和文)栽培イネ誕生のきっかけとなった形質に関する遺伝子群の解明

研究課題名(英文)Clarification of genes related to key traits in the early stage of rice domestication

研究代表者

石井 尊生 (Ishii, Takashige)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：20260648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：栽培イネ誕生のきっかけになったのは、種子の落ちにくさと繁殖様式を自殖に導く閉じた穂の形だと考えられる。そこでまず、穂の開閉の原因遺伝子であるOsLG1遺伝子の発現調節領域ならびに補足的な第5染色体上の遺伝子座の領域推定を行った。次に、落ちにくさに関与した芒の長さならびに受精様式に関わる花器官の形質がどのような遺伝制御によるものなのかを明らかにした。その結果、イネの栽培化は3形質に関する多くの遺伝子座が関与して進んだことが確認された。

研究成果の概要(英文)：A closed panicle is one of the key traits in the early stage of rice domestication. This trait is considered to lead significant reduction in seed shedding and outcrossing rate. Here, we first fine-mapped chromosomal regions responsible for the panicle shape, i.e., OsLG1 regulatory region and minor locus on chromosome 5. Seed awning and floral morphology are co-related to the seed shedding and pollination behavior, respectively. Genetic controls of these traits were also investigated. The above results confirmed that many loci of these traits were involved in rice domestication.

研究分野：植物育種学

キーワード：イネ 栽培化 野生イネ

1. 研究開始当初の背景

イネ(*Oryza sativa*)は世界の人々を支える主要作物の1つである。熱帯・温帯地方で広く栽培されているイネは約1万年前にアジアの野生種である *O. rufipogon* より栽培化されたといわれている。考古学的な研究によると、中国揚子江流域の遺跡から出土したイネの遺物が一番古いものであるとされている。また、ゲノムの塩基配列情報に基づく研究では、中国南部の珠江流域付近で栽培化が始まったのではないかと推定されている。この約1万年にわたる栽培化の期間は、栽培イネに様々な形態変化をもたらした。これらの違いは、まさに栽培化の過程で人類が淘汰・選抜を行ってきた結果生じたものであり、栽培化関連形質であるといえる。これらのうち、栽培化初期に大きな影響を与えたのは、種子の脱粒性程度の変化である。野生種が持っている種子の脱粒性が失われれば、成熟種子が穂に残り、種子採集効率が格段に上がると考えられるからである。なお、これまでに種子脱粒性を引き起こす遺伝子として、種子の基部の離層形成に関与する *qSH1* および *sh4* 座の遺伝子が同定されている。

我々は栽培化の検証のために、これらの遺伝子座における栽培種由来の種子の非脱粒性を促す対立遺伝子を野生種の遺伝的背景に導入した系統を育成し、種子脱粒程度を観察したが、変化はみられなかった。このことは、野生種の遺伝的背景には種子脱粒に関して小さい効果を持つ遺伝子が多数存在し、たとえ種子脱粒性に大きな効果を持つ野生種の遺伝子が機能を失ったとしても種子脱粒性に全く影響がないことを示している。そこで、我々は成熟種子を落ちにくくする形質として穂の形態に注目した。野生イネは栽培イネとは異なり、開いた形の穂を持っているので、まず閉じた穂を持つ野生イネ遺伝的背景の系統を栽培イネとの戻し交配により作出し、圃場にてどのような現象が付随して起こるのが観察・調査した。その結果、この系統では成熟種子が一時的に落ちにくくなること、またそれによって種子が採集しやすくなることがわかった。さらにこの穂の形態変化は、開花時に外からの花粉がかかりにくい構造を引き起こし、受精が自分の花粉による生殖様式(自殖)に導かれることが明らかになった。これらの現象は、一つの穂の中において下位の種子(穎花)の芒が上位の種子(穎花)を覆うために生じていた。なお、この穂の開閉に関与する原因遺伝子は、高密度連鎖分析と相補性試験により、第4染色体上に座乗する *OsLG1* であることが明らかになった。また、原因遺伝子周辺の塩基配列解析から、野生イネに生じた閉じた穂形態は栽培化の過程で強い人為選抜をうけた形質であることが示唆された。

ところで、*OsLG1* 遺伝子は野生イネと栽培イネともに正常なものを持っており、穂の開閉は *OsLG1* 遺伝子の発現量によって調節さ

れている。しかし、その発現調節の原因となった突然変異の同定や穂の開閉に関与する他の遺伝子との関係など、まだまだ不明な点は多い。また、穂の開閉と種子の落ちにくさ・受精様式の変化に直接働きかけるのは芒と花器官である。そのため、栽培化が始まってから、イネがどのように変化したのかを知るためには、これらの形質がどのような遺伝子によって制御され、それらがどのように関与しているのか明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

多くの栽培化関連形質や遺伝子がこれまでに研究されてきたが、それらの評価は栽培種の遺伝的背景で行われたものばかりである。そのため、これら遺伝子座において、栽培化の過程で出現した栽培種の対立遺伝子が野生種の形質変化にどの程度貢献してきたのかは一概には判断できない。実際には、栽培化は野生種を対象に行われてきたものである。それゆえ、栽培化関連遺伝子を検証するためには、野生種の遺伝的背景で行う必要があると考えられる。そこで本研究では、まず栽培種と野生種を交雑し、さらに両者でそれぞれ戻し交雑を行なった栽培種と野生種の遺伝的背景を持つ分離集団を作成した。そして、栽培イネ誕生のきっかけとなったと考えられる穂の開閉に関する遺伝子の調節機構の解明ならびに穂の開閉に物理的に関与する種子の芒と受精に関する花器官の影響について、新たに検証することを計画した。そして最終的には、これらの遺伝子間ならびに形質間の相互作用を評価するとともに、イネの栽培化初期の実態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、3つの器官(穂・芒・花器)に関して、野生種と栽培種の遺伝的背景を持つ分離集団を用いて、形質調査ならびに遺伝子解析を行うことを予定した。そして、以下の4つの研究項目をたてた。なお、植物材料は、これまで我々が研究を進めてきた野生イネ系統の *O. rufipogon* W630(ミャンマー原産)、日本型栽培品種である *O. sativa* Japonica Nipponbare およびそれらの交雑系統を用いた。

1. 穂の開閉の原因遺伝子である *OsLG1* 遺伝子の発現調節機構の解明

野生種と栽培種の穂の形態の違いは、穂を構成する枝梗の開き具合によるものである。これまでに我々は、この穂の開閉に関与するのは第4染色体長腕末端部に座乗する *OsLG1* 遺伝子であることを明らかにした。ただし、*OsLG1* 遺伝子は野生イネと栽培イネともに正常なものを持っており、穂の開閉は *OsLG1* 遺伝子の発現量によって調節されていた。そこで、*OsLG1* 遺伝子の9.3 kbpの発現調

節候補領域内のどの変異が栽培化の過程で栽培イネの発現を抑制するに至ったのかは不明である。そこで、原因変異を同定するため、野生種の遺伝的背景におけるこの領域の準同質系統と野生種を交雑した分離集団の数千個体から、組みかえ個体を選抜する。これらの個体は組みかえ部分がヘテロであるので、次年度の自殖個体による後代検定に基づき、ファインマッピングを行う。さらに、複数の後代系統を用いて、枝梗基部の組織観察と *OsLG1* 遺伝子の発現解析を行う。

2. 穂の開閉に関する *OsLG1* 遺伝子以外の新たな遺伝子の同定

以前、野生種 (*O. rufipogon* W630) を栽培種 (*O. sativa* Nipponbare) で戻し交雑した自殖系統を用いて、穂の開閉についての QTL 解析を行ったところ、その表現型のばらつきの 80.1% が *OsLG1* の遺伝子型で説明されることがわかった。この結果は、穂の開閉はほぼ 1 つの遺伝子に制御されていることを示すとともに、一部 *OsLG1* 遺伝子では説明できない現象があることを示している。そこで解析に用いた自殖系統を調べたところ、数系統が野生種の *OsLG1* 遺伝子を持たないのに、若干開き気味の穂形態を示していた。そこで、穂の開閉に関する新たな遺伝子を同定するため、これらの系統と栽培種を交雑して得られる分離集団を用いて QTL 解析を行う。効果の大きい遺伝子座が検出される場合は、さらにファインマッピングに進み、少数の候補遺伝子の絞り込みを行う。

3. 芒の長さを支配する遺伝子の同定

野生種の芒の長さを支配する遺伝子については、2013 年に中国のグループが第 4 染色体上に *An-1* を同定した。また、2016 年に日本のグループが第 8 染色体上に *RAE2* を同定した。我々も以前、野生種を栽培種で戻し交雑した自殖系統を用いて、芒の長さに関する QTL 解析を行ったが、強い効果を持つ QTL (寄与率 58.4%) が第 8 染色体上に、やや弱い効果の QTL (寄与率 11.8%) が第 4 染色体上に検出された。そこで、これらの遺伝子座が報告された *An-1* と *RAE2* と同座であるか、マーカーを増やしたファインマッピングおよび塩基配列の比較により検証する。

また、栽培化の過程で出現した芒の長さを抑えるこれら第 4 および第 8 染色体上の栽培種の対立遺伝子の効果を検証するため、野生イネの遺伝的背景にそれぞれを組み合わせた遺伝子型をもつ植物を育成し、2 つの対立遺伝子間の相互作用を調べる。

4. 花器官の形質を支配する遺伝子の同定

野生種の穂が閉じた形に変化すると、開花時に花粉がかかりにくい構造を引き起こす。そのため、イネの栽培化の初期段階において、受精が自分の花粉による生殖様式に導かれることが示唆された。しかし、栽培種はその後、葯の長さ、花糸の長さ、雌蕊の長さを変

化させて、芒が無い状態でも自殖できる花構造を持つようになった。そこで、これらの花器構造がどのような遺伝子座にコントロールされているのかを調べるために、野生種 (*O. rufipogon* W630) を栽培種 (*O. sativa* Nipponbare) で戻し交雑した自殖系統ならびに栽培種を野生種で戻し交雑した自殖系統を用いて、様々な花器形態 (葯長、花糸長、柱頭長、花柱長、外穎長、外穎幅、内穎長、内穎幅) についての QTL 解析を行った。

4. 研究成果

1. 穂の開閉の原因遺伝子である *OsLG1* 遺伝子の発現調節機構の解明

OsLG1 遺伝子の発現調節領域における原因変異を同定するため、野生イネの遺伝的背景において、当該領域を野生イネと栽培イネのヘテロ型に持つ植物由来の数千個体から、組みかえを起こした個体を複数選抜した。その後自殖により、組み換え染色体をホモ型に持つ個体を生育させ、穂形態を観察することによりファインマッピングを行なった、その結果、候補領域は 6.8 kb に限定された。

さらに、これらの系統を用いて、出穂後の一次枝梗の基部の *OsLG1* の発現を両親と比較したところ、候補領域の野生イネの染色体断片に *OsLG1* 遺伝子の発現調節領域が含まれることが示唆された。

2. 穂の開閉に関する *OsLG1* 遺伝子以外の新たな遺伝子の同定

まず、*OsLG1* 遺伝子を持たない栽培イネ遺伝的背景の戻し交雑自殖系統 (BC2F8 世代) と栽培イネを交雑し、BC3F2 集団を育成した。これらを圃場に展開し、穂の開閉に関する QTL 解析を行った。なお、穂の開閉には中間型も見られたため、形質評価は開、中間型、閉の 3 段階で行ったところ、第 5 染色体上に効果の大きい QTL が検出された。

次に、野生イネの遺伝的背景において、推定した QTL 領域をヘテロ型に持つ個体を自殖し、後代から当該領域内で組み換えを起こした 18 個体を選抜した。その後、それぞれの植物の後代検定によりファインマッピングを行ったところ、QTL は第 5 染色体上の約 43 kb に存在することが示唆された。

3. 芒の長さを支配する遺伝子の同定

栽培イネの遺伝的背景を持つ戻し交雑自殖系統を用いて、芒の長さに関する QTL 解析を行ったところ、第 4 および第 8 染色体上の 2 カ所に QTL が検出された。マーカーを追加し、さらに領域を絞ったところ、最近報告された芒の遺伝子座 *An-1* および *RAE2* のそれぞれの近傍であることがわかった。両遺伝子座における栽培イネの機能喪失突然変異は同定されているため、W630 と Nipponbare 間でこれら遺伝子座の塩基配列を比較したところ、W630 は機能型を Nipponbare は機能喪失型を持っていたので、第 4 および第 8 染色体上の

QTL はこれらと同座であることが示された。

次に、栽培イネの遺伝的背景において、*An-1* および *RAE2* 座の様々な遺伝子型の組み合わせを持つ個体を幼苗期に選抜し、出穂期に芒の長さを比較した。その結果、第 8 染色体の野生イネの遺伝子は第 4 染色体のものよりも芒を長くする効果を持っていることが明らかになった。また、両遺伝子座の野生イネの対立遺伝子はほぼ相加的に働き、芒の長さは野生イネのほぼ 7 割近く回復することがわかった。

野生イネの遺伝的背景においても、栽培イネの対立遺伝子の効果を同様の方法で調査した。その結果、*An-1* 単独の機能喪失変異では芒の長さに変化が起らないこと、*RAE2* 単独でも 1 割ほどしか短くならなかった。さらに、両遺伝子座に栽培イネの対立遺伝子を持つものでも、芒の長さは 3 割程度しか短くならないことがわかった。

以上の結果より、野生イネの芒の長さには多くの遺伝子座が関与しており、栽培化の過程で芒が短くなるためには、まだ他の複数の遺伝子座が関与していることを示唆するものであった。

4. 花器官の形質を支配する遺伝子の同定

まず、野生イネの開花と生殖様式に関与する花器構造の観察を行い、開花時に伸長する花糸の長さの計測の手法を確立した。そして、それに基づき、栽培イネの遺伝的背景を持つ戻し交雑自殖系統 (BC2F8 世代) を用いて、葯長や花糸長をはじめとする花器形態についての QTL 解析を行った。その結果、10 形質に対して 26 カ所の QTL が検出された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Ishikawa R, Nishimura A, Htun TM, Nishioka R, Oka Y, Tsujimura Y, Inoue C, Ishii T (2017) Estimation of loci involved in non-shattering of seeds in early rice domestication. *Genetica* 145:201-207. (査読有)

DOI:10.1007/s10709-017-9958-x

Ishikawa R, Watabe T, Nishioka R, Thanh PT, Ishii T (2017) Identification of quantitative trait loci controlling floral morphology of rice using a backcross population between common cultivated rice, *Oryza sativa* and Asian wild rice, *O. rufipogon*. *American Journal of Plant Science* 8:734-744. (査読有)

DOI:10.4236/ajps.2017.84051

Ikemoto M, Otsuka M, Thanh PT, Phan PDT, Ishikawa R, Ishii T (2017) Gene interaction at seed-awning loci in the

genetic background of wild rice. *Genes and Genetic Systems* 92:21-26. (査読有)
<https://doi.org/10.1266/ggs.16-00058>

Nishioka R, Mikazuki H, Htun TM, Ishikawa R, Ishii T (2016) Genetic survey of genomic regions responsible for panicle spreading in wild rice, *Oryza rufipogon*. *Journal of Crop Research* 61:23-26. (査読有)

https://doi.org/10.18964/jcr.61.0_23
Ikemoto M, Ohyagi T, Thanh PT, Ishikawa R, Ishii T (2016) Evaluation of shooting and rooting ability from nodes and ratooning ability using backcross recombinant inbred lines between *Oryza rufipogon* and *O. sativa*. *Journal of Crop Research* 61:13-17. (査読有)

https://doi.org/10.18964/jcr.61.0_13
Inoue C, Htun TM, Inoue K, Ikeda K, Ishii T, Ishikawa R (2015) Inhibition of abscission layer formation by an interaction of two seed-shattering loci, *sh4* and *qSH3*, in rice. *Genes and Genetic Systems* 90:1-9. (査読有)

<https://doi.org/10.1266/ggs.90.1>

[学会発表] (計 17 件)

石川亮、渡部貴史、西岡諒、Thanh PT、石井尊生:栽培イネと野生イネの戻し交雑系統群を用いたイネの花器官を支配する遺伝子座の同定、日本育種学会第 131 回講演会、2017 年 3 月 29 日、名古屋大学 (愛知県)

池本麻衣、大塚光晴、石川亮、石井尊生:野生イネ (*Oryza rufipogon*) の遺伝的背景で芒を短くするためにはイネの栽培化における無芒性の検証にむけて、日本育種学会第 131 回講演会、2017 年 3 月 29 日、名古屋大学 (愛知県)

西岡諒、三日月裕美、田中裕、沼口孝司、石川亮、石井尊生:野生イネ *Oryza rufipogon* 由来の穂の開帳性に関する遺伝子座と関連遺伝子の発現について、日本育種学会第 130 回講演会、2016 年 9 月 25 日、鳥取大学 (鳥取県)

Nishioka R, Numaguchi K, Thanh PT, Ishikawa R, Ishii T. A closed panicle played an important role in rice domestication. 8th World Archaeology Congress. Sept. 1, 2016, Kyoto (Japan)
Ishikawa R, Oka Y, Tsujimura Y, Takama N, Inoue C, Htun TM, Ishii T. Evaluation of seed-shattering behaviour in early rice domestication. 8th World Archaeology Congress, Sept. 1, 2016, Kyoto (Japan)

石井尊生:熱帯アジアの野生イネ *Oryza rufipogon*、イネ属近縁野生種研究会、2016 年 7 月 22 日、国立遺伝学研究所 (静岡県)
西岡諒、三日月裕美、田中裕、沼口孝司、

石川亮、石井尊生：野生イネ *Oryza rufipogon* 由来の穂の開帳性を支配する遺伝子座の推定と効果の検証、イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ、2016年7月5日、名古屋大学（愛知県）

石井尊生：栽培イネの祖先となった野生イネとは、第6回北海道イネ研究会、2016年6月24日、北海道大学（北海道）

Ikemoto M, Otsuka M, Thanh PT, Ishikawa R, Ishii T. Allelic interaction at awing loci in the genetic backgrounds of wild and cultivated rice. PAG Asia 2016, June 7, 2016, Singapore (Singapore)

Tsujimura Y, Htun TM, Inoue C, Ishii T, Ishikawa R. Identification of quantitative trait loci controlling seed-shattering behaviour in rice. PAG Asia 2016, June 7, 2016, Singapore (Singapore)

西岡諒、三日月裕美、田中裕、沼口孝司、石川亮、石井尊生：野生イネ *Oryza rufipogon* と栽培イネ *O. sativa* の戻し交雑集団を用いた穂の開帳性に関する QTL 解析、日本育種学会第 129 回講演会、2016 年 3 月 22 日、横浜市立大学（神奈川県）

池本麻衣、大塚光晴、石川亮、石井尊生：野生イネおよび栽培イネの遺伝的背景における芒の長さを支配する遺伝子座の対立遺伝子間の相互作用、日本育種学会第 129 回講演会、2016 年 3 月 22 日、横浜市立大学（神奈川県）

岡佑美、井上千鶴、Htun TM、竹中祥亮、辻村雄紀、石井尊生、石川亮：インディカ型栽培イネ Kasalath の脱粒性喪失に関与した新規遺伝子座の探索、日本育種学会第 129 回講演会、2016 年 3 月 22 日、横浜市立大学（神奈川県）

井上千鶴、Htun TM、石井尊生、石川亮：野生イネ (*Oryza rufipogon*) の遺伝的背景における種子脱粒性と穂の開帳性の関係、日本育種学会第 128 回講演会、2015 年 9 月 12 日、新潟大学（新潟県）

西岡諒、三日月裕美、Htun TM、石川亮、石井尊生：野生イネ *Oryza rufipogon* 由来の穂の開帳性を支配する遺伝子座の推定、近畿作物・育種研究会 第 179 回例会、2015 年 5 月 30 日、橿原考古学研究所（奈良県）

池本麻衣、大八木徹弥、Thanh PT、石川亮、石井尊生：野生イネ *Oryza rufipogon* と栽培イネ *O. sativa* の戻し交雑自殖系統を用いた節からの出芽・出根能力およびひこばえの発生能力の評価、近畿作物・育種研究会 第 179 回例会、2015 年 5 月 30 日、橿原考古学研究所（奈良県）

Ishii T. A closed panicle regulated by *OsLG1* was a selected trait during rice domestication. Plant & Animal Genome XXIII, Jan. 13, 2015, San Diego (USA)

〔図書〕(計 1 件)

Ishii T, Ishikawa R. Springer Nature, Rice Genomics, Genetics and Breeding (Domestication loci controlling panicle shape, seed shattering and seed awning), 2018, 558 (207-221)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 尊生 (ISHII, Takashige)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：20260648

(2) 連携研究者

石川 亮 (ISHIKAWA, Ryo)
神戸大学・農学研究科・助教
研究者番号：70467687