

機関番号：63801

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18075009

研究課題名（和文） イネ生殖過程におけるゲノム障壁遺伝子の単離と機能解析

研究課題名（英文） Isolation and characterization of genome barrier genes in rice

研究代表者

倉田 のり (KURATA NORI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：90178088

研究成果の概要（和文）：

イネ亜種間（ジャポニカ，インディカ間）交雑後代の生殖的隔離に関わる相互作用因子4組合せの単離と機能解析を進めた。4組合せの生殖隔離因子は、他家不和合、花粉発芽不全、雌性不稔、雌雄両性不稔など各々特有の表現型を示すことがわかった。花粉発芽不全については、2つの重複遺伝子 *DPL1/DPL2* に起因することを明らかにした。この重複遺伝子は単子葉・双子葉に関わらず高等植物に保存されており、多くのモデル植物種においても重複して存在することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We performed isolation and functional analyses of four paired genes that interact with each other to cause reproductive barriers in inter-subspecific crosses between *japonica* and *indica*. These reproductive barrier genes showed various phenotypes including fertilization incompatibility, pollen germination defect, female sterility, and gamete sterility. We cloned a pair of duplicate genes, called *DPL1* and *DPL2*, which cause the pollen germination defect. It was revealed that *DPL1* and *DPL2* are well conserved in dicot as well as monocot model plants, and many plant species have a duplicated gene copies on their nuclear genome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	21,900,000	0	21,900,000
2007年度	22,000,000	0	22,000,000
2008年度	21,500,000	0	21,500,000
2009年度	20,200,000	0	20,200,000
2010年度	17,500,000	0	17,500,000
総計	103,100,000	0	103,100,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム障壁、イネ、生殖的隔離

1. 研究開始当初の背景

イネの遠縁品種間交雑では、生殖隔離機構が働くため雑種不稔や分離歪みによる遺伝子選択が頻りに観察される。これらは育種の効率を妨げる要因となるとともに、種分化を知る上で重要な指標となる現象である。イネの生殖的隔離に関わる遺伝子は、長い研究の

歴史の中で40を超える遺伝子座が特定され、染色体上の座乗位置が明らかにされてきた。しかしながら、これらの遺伝子を単離した報告はなく、生殖隔離を引き起こす分子機構は解明されていない。また、既に同定されたものの多くは単一因子であり、両親に由来すると考えられる生殖的隔離遺伝子の性質を考

えると、相互作用因子を同時に解析しメカニズムの全体像を理解することが望ましい。このような遺伝子間相互作用の包括的な解析は、隔離機構の根本的な解決に近づくだけでなく、生殖発生を規定する遺伝子ネットワークの解明にもつながることが期待される。近年、*japonica* と *indica* のそれぞれのゲノムシーケンスが解読されたことにより、ポジショナルクローニング法による遺伝子単離解析は他のモデル動物と同様に格段と進めやすくなった。ハエやマウスなど動物では、既にいくつかの隔離遺伝子が単離されていることから、植物と動物における生殖隔離メカニズムの共通点や相違点、進化のメカニズムなどが明らかになることが期待される。

2. 研究の目的

本研究課題では、生殖的隔離に関わる相互作用因子を同定し、その分子機序を解明することを目的とする。そのために、これまでに検出したイネ亜種間 (*japonica* と *indica*) 交雑後代に見られる4対の生殖的隔離障壁因子の単離と機能解析を行う。これまで遺伝的に検出した4対の相互作用遺伝子について、それらの「ゲノム障壁」としての作用機序、生殖過程での本来の役割などの解明を行う。加えて、生殖細胞系列の初期過程に必須な遺伝子群の機能を、細胞分子生物学、遺伝学および発現遺伝子の網羅的解析などの手法により解析し、きわめて情報の少ないこの過程に関する遺伝的プログラムの解明を目指す。これらの研究を通じて、生殖過程の中で、ゲノム間の遺伝子変異により生じる障壁の構造、機能、進化の実態を明らかにし、植物進化や多様性との関連について解析することを目指す。本研究および領域全体の研究成果によって、新たにゲノム生殖生物学、生殖進化学の分野を拓き、これまでにない新しいゲノムの組み合わせをもつ生物種を創り出す基盤となることを目指す。

3. 研究の方法

同定済みの4組の相互作用因子は、ラフマッピングにより染色体上のおよその位置が特定できており、この情報をもとにポジショナルクローニングによる候補遺伝子特定を進める。候補遺伝子は、相補性検定により原因遺伝子であることを確認する。単離した原因遺伝子のタンパクについて、機能解析を行い、生殖的隔離を示す機構を明らかにする。各遺伝子について、近似同質遺伝子系統 (NIL) を作成し顕微鏡による組織観察や交配実験、分離調査などの遺伝分析を通じて、生殖隔離現象の組織学的、生理学的要因を解明する。

4. 研究成果

3種類の栽培イネ亜種間交雑 (日本晴 x Kasalath, 日本晴 x Kinangdang puti, AsominorixIR24) に見出された4組の遺伝子ペアを対象として、遺伝子単離とその機能解析を進めた。遺伝解析や形態・組織観察から、これら4組の遺伝子ペアが引き起こす生殖異常は、他家不和合性、花粉発芽不全、雌性不稔、雌雄両性不稔と特有の表現型であることがわかり、イネの生殖隔離機構が多様で、種々の生殖過程で発生することを明らかにした。4組の遺伝子単離を進めた結果、そのうち3組については相補性検定まで実施し、1組2遺伝子と1遺伝子については単離を終えた。また、単離を終えた遺伝子については、進化解析や機能解析も進めた。以下に個々の遺伝子ペアについての結果を述べる。

(1) 他家不和合性

日本晴とKasalathの交雑後代F₂に見出された染色体3と6の相互作用は、NILの解析から雌性親で働くPOCと花粉側で働くPOIとによることがわかった。ポジショナルクローニングにより、雌性因子POC遺伝子の候補としてRNAサイレンシングに関わるPAZ-domainタンパクを、またその相互作用因子であるPOIについては、His-kinaseタンパクをコードする遺伝子を候補遺伝子として特定し相補性検定を行った。

(2) 花粉発芽不全

第1と第6染色体の分離歪みを引き起こす原因遺伝子 (*DPL1* と *DPL2*) に関するNILを作成し、形態的・遺伝的特性の解析を進めた。これらの観察から、分離の歪みは雄性因子によることをつきとめた。さらに、それぞれ約5000個体を用いたポジショナルクローニングを行い、両遺伝子 *DPL1* と *DPL2* が機能未知の重複遺伝子であることを明らかにした。*DPL1/2* は開花期の成熟花粉においてmRNA・タンパクともに強い発現を示し、NILで花粉管発芽・伸張の異常が観察されたことから、*DPL1/2* は花粉管機能を制御する遺伝子であることがわかった (図1)。*DPL* 遺伝子は単子葉・双子葉植物において広く保存されており、双子葉植物のいくつかのモデル種においても、重複して存在することを明らかにした。*DPL1* の変異アレルは、起源種 *O. rufipogon* で発生し、他方、*DPL2* 変異アレルは *japonica* 分化後に生じたことが判明した。また、*DPL* 遺伝子のハプロタイプ分布について明らかにした。

(3) 雌性不稔

亜種間交雑にみられる雌性配偶子致死は染色体8、9と12に座乗する遺伝子座によることがわかっている。このうち、染色体12については候補遺伝子を同定し相補性を確認した。

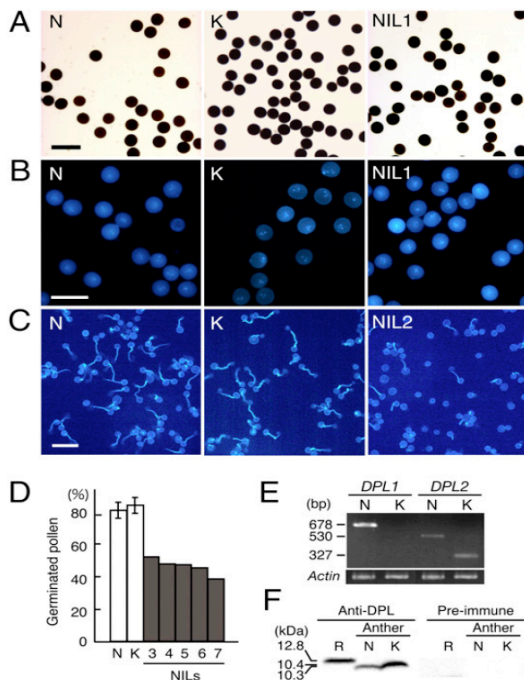


図1. **A-D**:正常な花粉 (N と K) と雑種の花粉 (NIL). **E,F**: 成熟花粉における DPL1/DPL2 の mRNA(**E**)およびタンパク (**F**)の発現

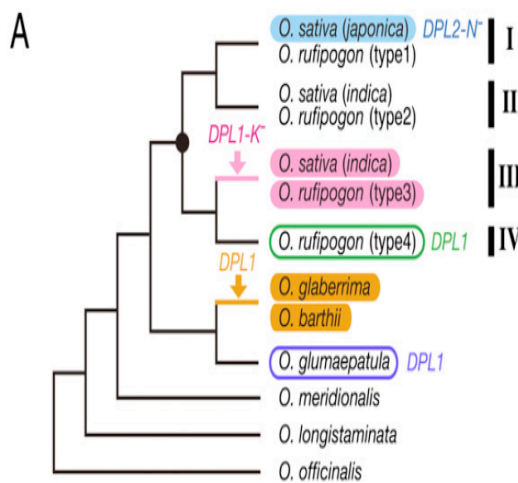


図2. イネ属における DPL 遺伝子の進化

同定した原因遺伝子は、機能未知とされる多重遺伝子族のひとつであった。その *indica* アレルには、フレーム内にストップコドン変異がみられるため、コードされるタンパクは機能を欠失し、雌性不稔を誘発することが予想された。この遺伝子は、栽培イネの起源種 *O. rufipogon* の数系統においても観察されたことから、変異型の発生時期は栽培化以前であることが推定された。残りの2遺伝子については、可能性の高い遺伝子候補を特定した。また、組織学的観察により、雌性致死が減数

分裂後の発生異常によることを明らかにした。

(4) 雌雄両性不稔

日本晴と Kinangdang puti 間で見出された第1染色体末端で大きな分離歪みを引き起す生殖隔離遺伝子について、ポジショナルクローニングを進めた結果、関与領域を 83kb に特定した。この領域内に両品種のゲノム DNA 配列に大きな構造差があることがわかり、このゲノム構造変異が雑種不稔の原因であることを明らかにした。また、分離集団に観察された大きな分離の歪みは、両配偶子の不稔に起因することがわかった。

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 28 件)

(1) Ito, Y., Kurata, N. (8 番目), 他 6 名 (2011) Fatty acid elongase is required for shoot development in rice. *Plant J.* 66:680-688, 査読有

(2) Ishikawa, R., Kurata, N. (5 番目), 他 4 名 (2011) Rice interspecies hybrids show precocious or delayed developmental transitions in the endosperm without change to the rate of syncytial nuclear division. *Plant J.* 65:798-806, 査読有

(3) Nonomura, K., Kurata, N. (10 番目), 他 8 名 (2011) A novel RNA-recognition-motif protein is required for premeiotic G1/S-phase transition in rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS. Genet.* 7:e1001265, 査読有

(4) Ohnishi, T., Kurata, N. (9 番目), 他 8 名 (2011) Distinct gene expression profiles in egg and synergid cells of rice as revealed by cell type-specific microarrays. *Plant Physiol.* 155:881-891, 査読有

(5) Yamaki, S., Nagato, Y., Kurata, N., Nonomura, K. (2011) Ovule is a lateral organ finally differentiated from the terminating floral meristem in rice. *Dev. Biol.* 351:208-216, 査読有

(6) Mizuta, Y., Harushima, Y., Kurata, N. (2010) Rice pollen hybrid incompatibility caused by reciprocal gene loss of

duplicated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:20417-20422, 査読有

(7) Fujita, M., Kubo, T., Kurata, N. (17 番目), 他 16 名 (2010) Rice expression atlas in reproductive development. *Plant Cell Physiol.* 51:2060-2081, 査読有.

(8) Horiuchi, Y., Kurata, N. (7 番目), 他 5 名 (2010) A simple optimization can improve the performance of single feature polymorphism detection by Affymetrix expression arrays. *BMC Genomics* 11:315, 査読有

(9) Kubo, T., Yamagata, Y., Eguchi, M., Yoshimura, A. (2008) A novel epistatic interaction at two loci causing hybrid male sterility in an inter-subspecific cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Genes Genet. Syst.* 83:443-453, 査読有

(10) Suzuki, T., Kurata, N. (8 番目), 他 6 名 (2008) MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice. *Mol. Genet. Genomics* 279:213-223, 査読有

(11) Hobo, T., Kurata, N. (20 番目), 他 20 名 (2008) Various spatiotemporal expression profiles of anther-expressed genes in rice. *Plant Cell Physiol.* 49:1417-1428, 査読有

(12) Suwabe, K., Kurata, N. (16 番目), 他 16 名 (2008) Separated transcriptomes of male gametophyte and tapetum in rice: validity of a laser microdissection (LM) microarray. *Plant Cell Physiol.* 49:1407-1416, 査読有

(13) Nonomura, K., Kurata, N. (7 番目), 他 5 名 (2007) A germcell-specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression fo premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *Plant Cell* 19: 2583 - 2594, 査読有

(14) Ammiraju, J.S., Kurata, N. (16 番目), 他 25 名 (2006) The *Oryza* bacterial artificial chromosome library resource: construction and analysis of 12 deep-coverage large-insert BAC libraries that represent the 10 genome types of the

genus *Oryza*. *Genome Res.* 16:140-147, 査読有

(15) Kawakatsu, T., Kurata, N. (4 番目), 他 5 名 (2006) PLASTOCHRON2 regulates leaf initiation and maturation in rice. *Plant Cell* 18:612-625, 査読有

(16) Nonomura, K., Kurata, N. (5 番目), 他 3 名 (2006) PAIR2 is essential for homologous is chromosome synapsis in rice meiosis in rice meiosis I. *J. Cell Sci.* 119:217-225, 査読有

[学会発表] (計 8 5 件)

(1) Kurata, N., Various Reproductive Barriers in the Hybrids and Its Relation to Evolution. 8th International Symposium on Rice Functional Genomics, 2010 年 10 月 20 日, Dall' Onder Grande Hotel, Brazil.

(2) 水多陽子、イネ亜種間交雑で生殖的隔離を引き起こす重複遺伝子 DPL1,2 の解析、日本遺伝学会第 82 回大会、2010 年 9 月 20 日、北海道大学高等教育機能開発総合センター

(3) 水多陽子、イネ亜種間交雑で生殖的隔離を引き起こす DOPPELGANSER(DPL)1 および DPL2 遺伝子の解析、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 20 日、熊本大学

(4) Kurata, N., Geome barriers in the reproductive process of rice. International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction: from pollination to fertiltzation, 2010 年 3 月 12 日, 奈良県新公会堂

(5) Mizuta Y., Analysis of pair of genes, DOPPELGANGER (DPL) 1 and DPL2 responsible for reproductive isolation between two rice subspecies. International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction: from pollination to fertiltzation, 2010 年 3 月 11 日, 奈良県新公会堂

(6) Kurata, N., Genome evolution and reproductive barriers in rice. 6th International Rice Genetics symposium, 2009 年 11 月 17 日, Manila Hotel (Philippines)

(7) 春島嘉章、F2 集団を使った配偶体または接合体内の 2 遺伝子座間の相互作用による生

殖的隔離の検出、日本育種学会第 116 回講演会、2009 年 2 月 26 日、北海道大学

(8) 倉田のり、野生イネ種間、種内変異とゲノム機能分化、日本遺伝学会第 81 回大会、2009 年 9 月 17 日、信州大学

(9) 水多陽子、イネ亜種間交雑において生殖的隔離を引き起こす相互作用遺伝子座 DOPPELGANGER1 と 2 の単離・解析、日本遺伝学会第 81 回大会、2009 年 9 月 17 日、信州大学

(10) 久保貴彦、イネ亜種間交雑で分離の歪みを示すゲノム領域の検出、日本育種学会第 115 回講演会、2009 年 3 月 27 日-28 日、つくば国際会議場

(11) 新濱充、日本晴と Kinandang puti との交雑で見られる生殖隔離遺伝子座のマッピング、日本育種学会第 115 回講演会、2009 年 3 月 27 日-28 日、つくば国際会議場

(12) 水多陽子、イネ亜種間交雑で生殖的隔離障壁となる重複遺伝子の解析、日本育種学会第 114 回講演会、2008 年 10 月 11 日-12 日、滋賀県立大学

(13) 倉田のり、 Identification of a Reproductive Barrier Working in the Process of Pollen Competition in Rice. XX International Congress of Genetics、2008 年 7 月 12 日-17 日、Berlin.

(14) 水多陽子、 Positional Cloning of a Pair of Interactive Genes Causing Reproductive Barrier in the Hybrid Pollen of Rice. XX International Congress of Genetics、2008 年 7 月 12 日-17 日、Berlin.

(15) 春島嘉章、 Detection of Pairs of Interactive Reproductive Barriers in Rice Genome. XX International Congress of Genetics. XX International Congress of Genetics、2008 年 7 月 12 日-17 日、Berlin.

(16) 春島嘉章、栽培イネの第 3 染色体の雄性配偶体型生殖的隔離障壁と相互作用する第 6 染色体の雌性親遺伝子のポジショナルクローニング、日本育種学会第 112 回講演会、2007 年 9 月 22 日、山形大学

(17) 春島嘉章、イネ F2 集団における生殖的隔離障害の相互作用の検出、日本遺伝学会第 79 回大会、2007 年 9 月 21 日、岡山大学

(18) 久保貴彦、イネの交雑後代に見出され

た F2 雄性不稔の遺伝機構、日本遺伝学会第 79 回大会、2007 年 9 月 20 日、岡山大学

(19) 水多陽子、イネ雑種花粉で相互作用する 2 遺伝子座に起因する生殖的隔離、日本遺伝学会第 79 回大会、2007 年 9 月 20 日、岡山大学

〔図書〕(計 5 件)

倉田のり、春島嘉章 秀潤社「イネゲノムと生殖的隔離」細胞工学別冊“植物の進化”特集号 (2007) 97-101.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 のり (KURATA NORI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：90178088

(2) 研究分担者

久保 貴彦 (KUBO TAKAHIKO)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：00370148

(H20→H22)

野々村 賢一 (NONOMURA KEN-ICHI)

国立遺伝学研究所・実験圃場・准教授

研究者番号：10291890

(H18→H19)

寺田 理枝 (TERADA RIE)

名城大学・農学部・教授

研究者番号：30137799

(H21.10→H22.3)