

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82112
研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）
研究期間：2010～2014
課題番号：22125006
研究課題名（和文）イネの栽培化過程におけるゲノムアダプテーション

研究課題名（英文）Genome adaptation during rice domestication

研究代表者
井澤 毅（Izawa, Takeshi）

独立行政法人農業生物資源研究所・植物科学研究領域・上級研究員

研究者番号：10263443
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 89,900,000円

研究成果の概要（和文）：紫黒米の起源となるKala4遺伝子の誕生過程を知るために、高精度マッピングとゲノム断片の単離により、原因変異を明らかにした。プロモーター領域の重複に加えて、同じ染色体の83kbp上流から11.0kbpのゲノム断片の挿入を確認した。また、形質転換実験により、この重複と挿入が黒米化の原因変異であることが明らかにした。
加えて、アジアで栽培されている多くのイネ在来系統でのKala4遺伝子の状態を解析し、黒米化を起こすKala4遺伝子の変異は、熱帯ジャポニカと呼ばれるイネ亜種で起こり、その変異がイントログレッションによって、アジア各地域に伝搬した様子をゲノム変化から明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The birth and spread of novel agronomical traits during crop domestication are complex events in plant evolution. Wild rice (*Oryza rufipogon*) has red grains due to accumulation of pro-anthocyanidins meanwhile most rice (*Oryza sativa*) varieties have white grains with a genetic defect allele in *Rc bHLH* gene. Some rice varieties that have black grains due to accumulation of anthocyanins are sporadically distributed in Asia although the birth and local spread of black rice remains unknown. Here, we show that the ectopic expression of another bHLH gene, *Kala4*, due to rearrangement of its promoter region is the origin of the black rice trait. The birth of black rice would have occurred in a subspecies *Tropical Japonica* and the causal alleles of *Kala4* have spread to another subspecies *Indica*. Small sizes of genomic fragments of *Tropical Japonica* origins in some *Indica* varieties indicated that refined introgression occurred by natural crossbreeding during local spread of this trait.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：イネ 栽培化 紫黒イネ イントログレッション ゲノム

1. 研究開始当初の背景

日本人の主食であるコメを育ませるイネ (*Oryza sativa*) という植物は、古代の人間が、栽培に適する性質をもつ個体を人為選抜して、生まれた新しい植物種であり、その選抜過程を「栽培化」と呼ぶ。現存する一番の近縁野生種は *Oryza rufipogon* で、ゲノム解析から、*Oryza rufipogon* の一部で、現在、中国の珠江に自生する一群が、栽培イネ (*Oryza sativa*) と近いゲノムを持っていることがあきらかになっている。

2. 研究の目的

野生稲 *Oryza rufipogon* は、すべて、果皮にタンニンの蓄積し、その形質は、赤米と呼ばれている。栽培化の過程で、タンニンの合成に働く転写因子が変異し、白米を古代人が選抜し、栽培イネ品種内に広げたと考えられており、その遺伝子、および、その変異が同定されている。一方、イネ品種の一部には、果皮にアントシアニンをためる品種が存在するが、このアントシアニン蓄積の起源は、これまで明らかになっていない。我々は、栽培化の過程で産まれたと考えられるこのアントシアニンを蓄積するアレルの起源を求め、遺伝子単離を進めている。これまで成果から、このアントシアニン蓄積を起こした変異が、LINE と呼ばれるトランスポゾンの挿入と関係があること、また、当該トランスポゾンの挿入を持つ系統の中にも、アントシアニンを蓄積する系統とそうでない系統があり、DNA メチレーション等のエピアレルの人為選抜の可能性を見出している。そこで、アントシアニンを蓄積する系統の原因遺伝子として転写制御因子を同定し、その黒米化変異がどのように品種内に伝搬していったのかをさぐり、イネの栽培化過程で実際に起こったゲノムアダプテーションでの変

異の挙動を明らかにしようと考えている。

3. 研究の方法

これまでに、白米イネ品種コシヒカリと黒米イネ品種紅血糯を交配し、さらに、コシヒカリを3回、戻し交配し、コシヒカリの遺伝背景を持つ黒米準同質置換系統 KK01 を得、果皮のトランスクリプトーム解析を行い、黒米形質の発生・進化に重要な役割を果たした遺伝子が、染色体4番に座乗し、転写因子的な挙動をし、かつ、候補となる bHLH 遺伝子を特定した。また、この遺伝子が原因であることを確認するための高精度マッピングを行い、候補領域を 5kb 程度に絞り込んだところ、上記の候補遺伝子のプロモーター領域と第一エクソン、第一イントロンを含む領域となった。しかしながら、コシヒカリゲノム配列と紅血糯ゲノム配列で、明確な塩基上の多型が存在しなかった。そこで、当該ゲノム領域の DNA メチレーション状態をモニターするために、タイリングアレイによる CGH 解析または、Bisulfate 法で確認したところ、紅血糯で DNA メチレーション状態が高いことを示す結果を得た。この結果より、この遺伝子、Kala4 は、エピアレルである可能性が強く示唆された。しかしながら、その後の抑制変異体の単離・解析や候補領域のゲノム断片のクローニング等を経て、Kala4 遺伝子の発現は、表現型と強い相関のある DNA メチレーション等のエピアレルの影響ではなく、Kala4 領域のプロモーター領域の重複と離れたゲノム断片の挿入による異所発現が原因であることを証明した。加えて、イネ品種間での原因変異の伝搬等に関して、解析し、この変異が栽培化初期に熱帯ジャポニカ系統に起こり、それが自然交配とその後の選抜によるイントログレションにより、他

の亜種系統に広がったことを示す結果を得、現在、論文化を進めている。

4. 研究成果

Kala4 遺伝子の高精度マッピングとゲノム断片の単離により、黒米の Kala4 とコシヒカリの Kala4 のゲノム構造の違いを明らかにした。プロモーター領域の重複に加えて、同じ染色体の 83kbp 上流から 11.0kbp のゲノム断片の挿入が確認できた。また、そのゲノム断片を Kala4 cDNA に結合し、Kala4 が不在イネ系統に形質転換したところ、黒米由来の上流領域のみ黒米に変化した。これにより、この重複と挿入が黒米化の原因変異であることが明らかになった。また、アジアで栽培されている多くのイネ在来系統での Kala4 遺伝子の状態を解析したところ、黒米化を起こす Kala4 遺伝子の変異は、熱帯ジャポニカと呼ばれるイネ亜種で起こり、その変異がイントログレッションによって、アジア各地域に伝搬した様子をゲノム変化から明らかにした。

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)

原著論文

1. Oikawa T, Maeda H, Oguchi T, Yamaguchi T, Tanabe N, Ebana K, Yano M, Ebitani T, and Izawa T* (2015) The birth of a black rice gene and its local spread by introgression *The Plant Cell* in revision
2. Matsuzaki J, Kawahara Y, Izawa T* (2015) Punctual transcriptional regulation by the rice circadian clock under fluctuating field conditions *The Plant Cell* 27:633-648 doi:

10.1105/tpc.114.135582.

3. Nagano AJ, Sato Y, Mihara M, Antonio BA, Motoyama R, Itoh H, Nagamura Y*, Izawa T*. (2012) Deciphering and prediction of transcriptome dynamics under fluctuating field conditions. ***Cell*** 151(6):1358-1369. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.048.
4. Itoh H and Izawa T* (2011) A study of phytohormone biosynthetic gene expression using a circadian clock-related mutant in rice ***Plant Signaling & Behavior*** 6: 1-5.
5. Osugi A, Itoh H, Ikeda-Kawakatsu K, Takano M, Izawa T* (2011) Molecular dissection of the roles of phytochrome in photoperiodic flowering in rice ***Plant Physiol.*** 157:1128-1137. doi: 10.1104/pp.111.181792.
6. Izawa T*, Mihara M, Suzuki Y, Gupta M, Itoh H, Nagano AJ, Motoyama R, Sawada Y, Yano M, Hirai MY, Makino A, Nagamura Y. (2011) *Os-GIGANTEA* confers robust diurnal rhythms on the global transcriptome of rice in the field. ***Plant Cell*** 23:1741-1755. doi: 10.1105/tpc.111.083238.
7. Endo-Higashi N, Izawa T*. (2011) The Flowering-time genes *Heading date 1* and *Early heading date 1* together control panicle development in rice. ***Plant Cell Physiol.*** 56:1083-1094. doi: 10.1093/pcp/pcr059.
8. Itoh H, Nonoue Y, Yano M, Izawa T*. (2010) A pair of floral regulators sets critical day length

for *Hd3a* florigen expression in rice. **Nat Genet.** 42:635-638. doi: 10.1038/ng.606.

9. Ogiso E, Takahashi Y, Sasaki T, Yano M, Izawa T*. (2010) The role of casein kinase II in flowering time regulation has diversified during evolution. **Plant Physiol.** 152:808-820. doi: 10.1104/pp.109.148908.
10. Mihara M, Itoh T, Izawa T*. (2010) SALAD database: a motif-based database of protein annotations for plant comparative genomics. **Nucleic Acids Res.** 38(Database issue):D835-842. doi: 10.1093/nar/gkp831.

総説

1. Izawa T*. (2015) Deciphering and prediction of plant dynamics under field conditions. *Curr Opin Plant Biol.* 2015 Apr;24:87-92. doi: 10.1016/j.pbi.2015.02.003.
2. Osugi A, Izawa T* (2014) Critical gates in day-length recognition to control the photoperiodic flowering **Advances in Bot. Res.** 72:103-130
3. Itoh H, Izawa T* (2013) The coincidence of critical day length recognition for florigen gene expression and floral transition under long-day conditions in rice. **Mol Plant.** 6:635-649. doi: 10.1093/mp/sst022.
4. Izawa T* (2012) Physiological significance of the plant circadian clock in natural field conditions. **Plant, Cell and Environ.**35(10): 1729-1741. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02555.x.

5. 井澤 毅* (2014) 絶対的・光周性花成と条件的・光周性花成 —短日植物イネを例に— **植物の生長調節** 49: 41-48.
6. 伊藤博紀, 井澤 毅* (2011) 光応答と開花制御：日の長さの変化を認識して花を咲かせるメカニズム **細胞工学** 30:161-166.

国内外の会議等での主な招待講演(研究代表者、研究分担者)

1. Izawa T Punctual transcriptional regulation by the plant circadian clocks under fluctuating field conditions XII France-Japan Workshop on Plant Science 2014 - Plant Responses to Environment - H26 Oct 28th
2. Izawa T Punctual transcriptional regulation of circadian clocks under fluctuating field conditions Cold Spring Harbor Symposium in Asia 2014:Genome Assisted Biology of Crops and Model Plant Systems H26 Apr 23th
3. Izawa T Time-keeping in rice under fluctuating field conditions Gordon Research Conference 2013: Chronobiology H25 July 17th

国民と科学・技術対話について

学生(あるいは一般)向け講演(研究代表者)

1. 井澤 毅 舞岡から発信する生命科学入門講座 DNA の変化から見たイネが来た道 参加者 約50名 木原生研 H26 July 19th

[雑誌論文](計 16 件)
[学会発表](計 3 件)
[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)
取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

井澤 毅

研究者番号：10263443

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし