

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0280

研究課題名（和文）種子脱粒性の喪失によるイネ栽培化過程の実験的検証（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Evaluation of the process of rice domestication based on loss of seed shattering (Fostering Joint International Research)

研究代表者

石川 亮 (Ishikawa, Ryo)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70467687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：イネの栽培化で選抜の対象となった種子脱粒性の喪失に焦点をあて、関与した新規遺伝子変異を同定し、それらの起源や伝播の流れを明らかにすることでイネの栽培化過程を植物遺伝学と植物考古学の両面から考察することを目的とした。その結果、ジャポニカとインディカ栽培イネを用いて種子脱粒性の喪失に関与した遺伝子座を複数同定することができた。これらの遺伝子座は共通するものと異なるものがあることから、種子脱粒性の喪失の過程が栽培イネ間で異なる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の主食である栽培イネ *Oryza sativa* はアジアの野生イネ *O. rufipogon* から栽培化されたことが知られている。種子が脱粒しない性質は栽培化の初期に選ばれた形質の一つであることから、その過程を知ることは我々の祖先がどのようにイネを栽培化し、食料を増産することで人類の発展の基盤としてきたかを解明することにつながる。同時に、イネの種子脱粒性は現在でも収量構成要素の一つであり、改良によって増産も期待できる。本研究で同定された種子脱粒性遺伝子座は、イネの栽培化過程の解明と今後の品種改良の両面に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Asian cultivated rice, *Oryza sativa* is known to be domesticated from its wild form *O. rufipogon*. A loss of seed shattering is one of the most obvious phenotypic changes selected for during rice domestication. The process and chronology of rice domestication are not known very well, because the present rice plant materials are not capable for evaluation of these questions. In this study, the novel loci involved in a loss of seed shattering have been identified and their roles on rice domestication has been discussed by views of plant genetics and plant archaeology.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：栽培イネ 野生イネ 栽培化 脱粒性

1. 研究開始当初の背景

作物の栽培化とは、野生植物が人間の選抜を受けて人間の都合の良い性質を備えあわせた栽培植物になる過程、つまり人類の手により新たな植物種が生み出される過程のことをいう。作物の栽培化とともに人類の生活の基盤は農耕に移行し、高度な文明を発展させるきっかけになった。そのため栽培化過程解明は、農学、進化学、遺伝学、歴史学、考古学、文化人類学など広い学問分野からのアプローチによって、人間と植物の相互作用を通じてそれぞれの本質を究明する研究である。中でも、主要作物である栽培イネ (*Oryza sativa*) は世界人口の3分の1以上の主食となっており、栽培、収穫、調理方法はそれぞれの国の文化や風習と関連している。イネの栽培化においては、芒(のげ)、種子脱粒性、株ならびに穂の開帳性の喪失、種子重量の増加など農業に有用な変異を持った植物が偶発的に選抜され、その繰り返しと近代育種による優良形質の連続的な選抜によって現在の栽培イネに至っている。しかし、その過程については(1)有力な記録がないこと、(2)栽培化途中の植物が現存しないことから、詳細が分かっていない。一方、イネの栽培化の起源地の解明、イネ栽培種内で大別されるインディカやジャポニカの起源や伝播については現存する栽培イネと野生イネのゲノム情報を用いた集団遺伝学的解析が複数行われているが、解析手法や供試材料の違いによって得られる結果が異なり、複数の学説が生じている。

2. 研究の目的

多くの作物において、種子脱粒性の喪失は栽培化初期に選抜対象となった重要な形質である。イネにおいては、種子基部の離層形成に異常の生じた変異体が非脱粒性をもたらすことで栽培化されるようになったと考えられ、脱粒性を支配する2つの主要遺伝子座が知られている。ひとつは、インディカ-ジャポニカ間の自然変異として同定された *qSH1* (Konishi et al. 2006) であり、もうひとつはインディカ-野生イネ間で同定された *sh4* (Li et al. 2006) である。*sh4* における変異は、全ての栽培イネにおいて保存されていることから脱粒性の喪失に重要な役割を果たしたと考えられている。研究代表者のこれまでの研究から、上記2つの遺伝子座以外にイネの種子脱粒性に関わる重要な遺伝子座として *qSH3* を同定し、*qSH3* と *sh4* 座に生じた変異が重なることによって脱粒性の喪失が引き起こされた可能性を報告した (Inoue et al. 2015)。

栽培イネの種子脱粒性喪失に関与した遺伝子座がこれまでに複数判明している。本研究では、それらだけでは十分ではないことから、他の遺伝子変異の関与の可能性を明らかにすることを目的とした。またそれらの変異がどのような過程で選ばれイネの栽培化に寄与したかを明らかにすることは、栽培イネの成立過程を明らかにする上で非常に重要な情報となる。そこで、本研究では英国 Dorian Fuller 教授の植物考古学研究グループとの共同研究によって、東南アジア各地の水田遺跡から得られたイネ遺物における種子離層面の観察ならびに、それらの DNA の抽出を行い、当時のイネの脱粒性遺伝子座の遺伝子型を明らかにすることでイネの栽培化過程をより詳細に議論するための基礎的データを獲得することを目的とした。また、将来の発展的共同研究を行うために、栽培イネと野生イネにおける栽培化関連遺伝子座のゲノム情報を効率的に評価するため、次世代シーケンサーを用いた解析システムの構築についても目的とした。

3. 研究の方法

(1) イネの種子脱粒性喪失に関与した遺伝子座の探索

ジャポニカ栽培イネ「日本晴」の非脱粒性に関与する遺伝子座の同定

栽培イネ「日本晴」は稔実種子が全く脱粒しない難脱粒性を示すが、この難脱粒性には、*qSH1* (Konishi et al. 2006)、*sh4* (Li et al. 2006)、*qSH3* (Htun et al. 2014) の関与がこれまでに報告されていた。そこで、これら3遺伝子座を日本晴の染色体断片で有する野生イネを作出したところ、なお脱粒強度の低下が認められた (図 1A)。また種子基部における離層の縦断切片からも部分的に離層形成が生じていた (図 1B)。そこで、日本晴とイントログレッション系統 IL (*qSH1+qSH3+sh4*) を交雑し、F₂ 分離集団を用いて次世代シーケンサーを用いた QTL-seq 解析を実施した。

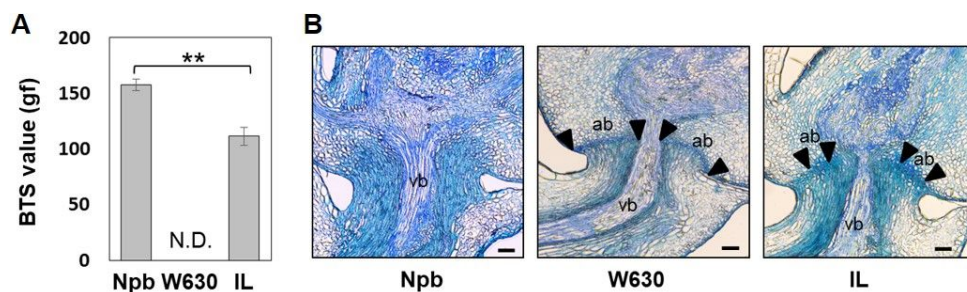


図1. ジャポニカ栽培イネ日本晴と野生イネ遺伝背景で既知種子脱粒性遺伝子座 (*qSH1*, *sh4*, *qSH3*) に日本晴の染色体断片を持つ染色体断片導入系統の種子脱粒程度と離層形態の比較。ジャポニカ栽培イネ(日本晴: Npb)、野生イネ (*Oryza rufipogon* W630)、イントログレッション系統(Introgression Line: IL) における(A)種子引張り強度の比較、(B) 種子基部における離層の縦断切片 vb: 維管束、ab: 離層(矢尻が両端を示す) スケールバー: 50 μ m

インディカ栽培イネ「カサラス」の非脱粒性に関する遺伝子座の同定

栽培イネ「カサラス」は稔実種子が脱粒しやすい易脱粒性を示す(図2)。カサラスの非脱粒性に関する *sh4* 遺伝子座を日本晴の染色体断片で有する野生イネ *O. rufipogon* W630 を作出したところ、まだ強い脱粒性と完全な離層を形成していることから、カサラスと IL(*sh4*) を交雑し、得られた F₁ をさらにカサラスで戻し交雑した系統(BC₁F₂)を用いて次世代シーケンサーを用いた QTL-seq 解析を実施した。

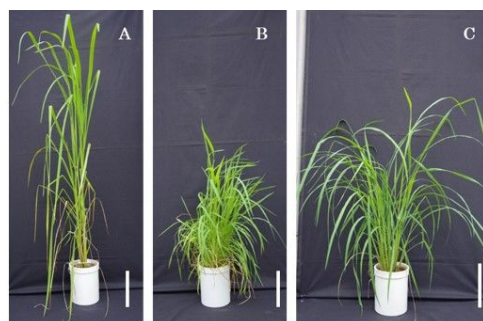


図2. インディカ栽培イネカサラスと野生イネ遺伝背景で *sh4* に日本晴の染色体断片を持つ染色体断片導入系統

(A) インディカ栽培イネ(カサラス)、(B) 野生イネ (*Oryza rufipogon* W630) イントログレッション系統 Introgression Line: IL (*sh4*)、(C) それらの雑種 F₁ 植物 スケールバー: 20cm

(2) イネ遺物における離層面の形態比較と遺物からの DNA 抽出方法の検討

共同研究先において、これまでに水田遺跡などから回収されたイネ遺物サンプルを用いて、離層における脱粒痕跡の比較を行う。また、DNA 抽出方法を確立し、種子脱粒性に関する遺伝子座の遺伝子型を判別することで、当時の栽培イネにおける遺伝子型の組み合わせを推定する。

(3) イネ栽培化における変異伝播の評価

種子脱粒性喪失に関連した遺伝子座をはじめ、これまでに同定されている栽培化関連遺伝子における変異を識別し、またゲノムレベルでの多様性の変化を効率的に比較するため、ターゲットキャプチャー法(MyBaits)によるカスタムアレイの作出を行う。

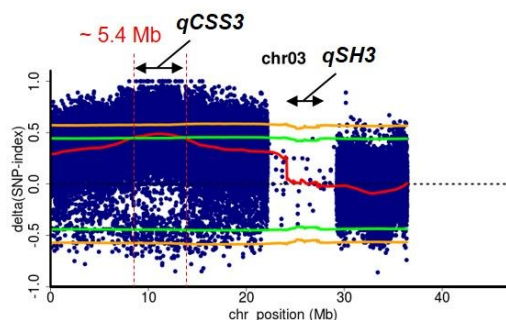


図3. ジャポニカ栽培イネ日本晴の非脱粒性に関する新規遺伝子座 *qCSS3* の同定

4. 研究成果

(1) イネの栽培化関連形質の原因変異の探索

ジャポニカ栽培イネ「日本晴」の非脱粒性に関する遺伝子座の同定

F₂ 分離集団では脱粒程度の連続的な分布が見られた。脱粒程度値の上位・下位のそれぞれ 10 個体程度を用いて QTL-seq 解析を実施し、イネの脱粒性の低下を引き起こし、栽培化に関わったと考えられる遺伝子座を第 3 染色体上に同定し、*qCSS3* (QTL for control of seed shattering on chromosome 3) と命名した(図 3)。

インディカ栽培イネ「カサラス」の非脱粒性に関する遺伝子座の同定

戻し交雑を行った系統の次代分離集団から既知の *sh4* 座以外にも複数の遺伝子座が存在する可能性が明らかとなった。これらのうち、既知の遺伝子座の近くに同定されたものについては、座乗領域の限定や原因変異の同定によって既知の脱粒性遺伝子の変異と同じ対立遺伝子であるかを検証する必要がある。

このように種子脱粒性の喪失に関連した遺伝子座の一部がイネの品種間で異なる可能性が示唆されたことから、イネの栽培化が複数の場所で独立して引き起こされた可能性が考えられた。また、*proto-indica* 仮説(ジャポニカイネで選択された栽培化に関わる変異が、栽培化の初期段階のインディカイネに流入した仮説)の可能性についても考古学的知見との比較を進め、栽培化の対象となった形質について総説を執筆した。

(2) イネ遺物における離層面の形態比較と遺物からの DNA 抽出方法の検討

共同研究者らがこれまでに回収したイネ遺物サンプルを用いて電子顕微鏡による種子基部の離層面の観察を共同で進め、種子の離層面において遺伝子変異による離層形成阻害か未熟粒の収穫による離層断裂阻害の可能性を検討する必要があることが分かった。また、遺物サンプルからの核ゲノム DNA の抽出は困難を伴い、炭化種子と DNA との結合が強固である可能性が考えられた。そこで、DNA 断片と活性炭との吸着物から DNA を分離する実験手法の検討を Warwick 大学と共同で進めた。しかし、通電による分解を実施したが効率的な DNA 回収は困難であった。

(3) イネ栽培化における変異の伝播の評価

イネゲノムデータベース(IRGSP)から、コードされている遺伝子領域(非翻訳領域とイントロンを含む)を抽出し、特異的配列をターゲットとして相補的な RNA 配列を人為的に合成したカスタムアレイを作成した。試験的に東南アジア由来の在来イネ品種群から抽出した DNA を用いて、カスタムアレイによってターゲット配列を濃縮し、次世代シーケンサーにて配列の解読を進めたところ、ジャポニカ栽培イネ日本晴と遺伝的に近似している可能性があることが判明した。このカスタムアレイは、今後イネ遺物から DNA を効率的に回収可能となれば用いる計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishikawa Ryo, Nishimura Akinori, Htun Than Myint, Nishioka Ryo, Oka Yumi, Tsujimura Yuki, Inoue Chizuru, Ishii Takashige	4. 巻 145
2. 論文標題 Estimation of loci involved in non-shattering of seeds in early rice domestication	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genetica	6. 最初と最後の頁 201 ~ 207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10709-017-9958-x	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Tsujimura Yuki, Sugiyama Shohei, Otsuka Kotaro, Htun Than Myint, Numaguchi Koji, Castillo Cristina, Akagi Takashi, Ishii Takashige, Ishikawa Ryo	4. 巻 132
2. 論文標題 Detection of a novel locus involved in non-seed-shattering behaviour of Japonica rice cultivar, <i>Oryza sativa</i> 'Nipponbare'	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Theoretical and Applied Genetics	6. 最初と最後の頁 2615 ~ 2623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s00122-019-03376-3	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 4件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ryo Ishikawa, Yumi Oka, Yuki Tsujimura, Natsumi Takama, Chizuru Inoue, Than Myint Htun, and Takashige Ishii
2. 発表標題 Evaluation of seed-shattering behaviour in early rice domestication
3. 学会等名 8th World Archaeology Congress（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年～2018年

1. 発表者名 Ryo Ishikawa
2. 発表標題 Evaluation of the domestication-related traits in rice: plant genetics meets archaeobotany
3. 学会等名 アフロ・ユーラシアの考古植物学（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryo Ishikawa
2. 発表標題 Evaluation of the domestication-related traits in rice: plant genetics meets archaeobotany
3. 学会等名 International Workshop: Current Frontiers in the Archaeobotany of Rice (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryo Ishikawa
2. 発表標題 Identifying scratches on chromosomes: an approach to understand the process of rice domestication based on loss of seed shattering
3. 学会等名 染色体学会第70回年会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Takashige Ishii and Ryo ishikawa (分担執筆)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Nature Singapore Pte Ltd.	5. 総ページ数 558
3. 書名 Rice Genomics, Genetics and Breeding	

1. 著者名 石川亮、杉山昇平、辻村雄紀、沼口孝司、クリスティーナ・コボ・カスティヨ、石井尊生 (分担執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 クバプロ	5. 総ページ数 260
3. 書名 アフロ・ユーラシアの考古植物学	

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	フラー ドリアン (FULLER Dorian)	ユニバーシティ・カレッジ・ロンドン・考古学研究所・教授	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	アラビー ロビン (ALLABY Robin)	ウォーリック大学・生命科学部・教授	
その他の研究協力者	カスティーロ クリスティーナ (CASTILLO Cristina)	ユニバーシティ・カレッジ・ロンドン・考古学研究所・研究員	