

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03744

研究課題名(和文)ゲノムシャッフリングに基づく循環選抜育種に用いる優性の雄性不稔イネの解析

研究課題名(英文) Analysis of dominant genic male-sterile rice for realizing a recurrent selection based on the genome shuffling

研究代表者

鳥山 欽哉 (Toriyama, Kinya)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：20183882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：優性の核コード雄性不稔性は、自殖性植物のイネを効率的に他殖させ、変異の幅を拡大する際に有効であると期待される。我々は、イネ品種Lebedに台中65号を連続戻し交雑する過程において、優性遺伝子支配と考えられる雄性不稔系統(LTMS系統)を得、その遺伝子のマップベースクローニングを行った。その結果、候補遺伝子を同定することができた。LTMS系統と「コシヒカリ」「ひとめぼれ」の交雑実験の結果、LTMSが持つ優性の雄性不稔性をジャポニカイネに移入できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究をイネの品種改良に応用すると、自殖性作物のイネを効率的に他殖させ、ゲノムシャッフリングを行うことができる。トウモロコシなどの多殖性作物の育種法である循環選抜育種をジャポニカイネに応用できることになり、遺伝的多様性の大きい様々な優れたイネの品種改良を行うことが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Dominant male sterility is a powerful tool to apply outcross-based breeding system to autogamous crops such as rice. We previously obtained male sterile plants in an indica rice cultivar Lebed backcrossed with a japonica Taichung 65 (T65) and found the heterozygous Lebed allele of the male sterility gene, named LEBED-TAICHUNG 65 MALE STERILITY (LTMS), acts as dominant sporophytic pollen killer. We carried out map-based cloning of the LTMS gene and identified a candidate gene for LTMS. The LTMS gene was demonstrated to be the Lebed allele of the LTMS acting as dominant male sterility allele in a nuclear background of japonica rice, thus would be useful for recurrent selection breeding of japonica rice.

研究分野：植物分子遺伝育種学

キーワード：育種学 遺伝学 ゲノム イネ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

トウモロコシ等の他殖性作物は、その育種の過程において循環選抜が取り入れられ、ヘテロ接合体の相同染色体間の頻繁な遺伝的組換えに伴うゲノムシャッフリングが変異の幅を大きくし、育種の効果を高めている。一方、イネ等の自殖性植物の品種育成過程では、選抜の初期段階から自殖を繰り返す、固定度の高い系統が選抜されることから、高頻度に遺伝的組換えが起こりうるのは交雑から数代に限られ、これが自殖性植物育種の一つの限界になっていると考えられている。自殖性植物を効率的に他殖させ、ゲノムシャッフリングによる循環選抜を実現するには、優性の核コード雄性不稔性(Dominant genic male-sterility)を用いることが効果的であるとされてきた(図1)。形質転換技術を用いた効率的なゲノムシャッフリング法は特許出願がなされている(田中淳一、WO 2009133718 A1「遺伝子操作手法により作出される優性の雄性不稔性を用いる自殖性植物におけるゲノムシャッフリング法および同方法に基づく循環選抜育種システム」出願日 2009年2月9日)。実際にイネの優性の雄性不稔遺伝子を利用した循環選抜育種によって複数のストレス耐性を付与したという報告がなされている(Pang et al. 2017)。一方で優性の雄性不稔遺伝子をクローニングしたという報告はまだない。

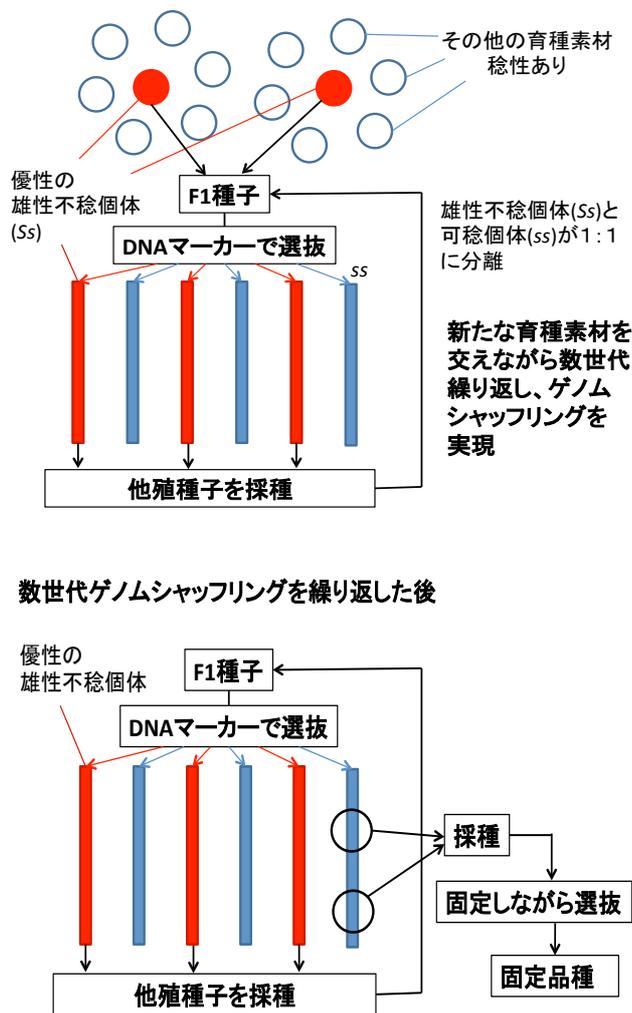


図1 優性の核コード雄性不稔性を用いた循環選抜

我々は 基盤研究(B)「世界のイネコアコレクションからハイブリッドライス育種重要形質の分子遺伝学的抽出」(平成26から28年度)において、NIAS コアコレクション世界のイネ(WRC)69品種に「台中65号(T65)」の連続戻し交雑を行い、細胞質雄性不稔系統が得られるかを調査した。その過程で、フィリピンの品種 Lebed × T65 のBC4F1とBC5F1世代の種子稔性の分離様式の解析から、LebedにT65を戻し交雑することで得られた系統の雄性不稔性は、核に存在する優性の雄性不稔遺伝子によるものであると考えられた。優性の雄性不稔遺伝子をクローニングできればイネに循環選抜育種を適用して品種改良を行うことが可能になると期待されていた。

## 2. 研究の目的

インディカイネ品種 Lebed にジャポニカイネ品種台中 65 号 (T65) を戻し交雑することで雄性不稔系統が得られ、Lebed×T65 backcrossed Male Sterile Line (LTMS 系統) と名付けた。優性に働く核コードの雄性不稔性によるものであると考えられた。本研究では、(1) 雄性不稔遺伝子のクローニング、(2) 原品種 Lebed が持つと予測される雄性不稔抑制遺伝子のクローニング、さらに、(3) 循環選抜育種の実証試験を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

イネ品種 Lebed に台中 65 号(T65)を戻し交雑することで得られた系統の雄性不稔性は、核に存在する優性の雄性不稔遺伝子 (*Sterility: S*) によるものであると考えられた。さらに雄性不稔遺伝子を抑制する雄性不稔抑制遺伝子 (*Epistasis: E* と命名) の存在が示唆されている。イネ品種 Lebed と T65 の戻し交雑後代を用いて、以下の解析を行う。

- (1) 雄性不稔遺伝子 (*Sterility: S*) の解析 : Lebed に由来する優性の雄性不稔遺伝子のマッピングの結果、存在領域を第 10 染色体の 3,773 kbp の間に絞り込んでいた。S 遺伝子のファインマッピングを行い、候補領域を絞り込む。候補遺伝子の塩基配列と発現解析より、候補遺伝子を絞り込む。候補遺伝子のゲノム含むゲノム断片を T65 に導入して相補性試験を行う。
- (2) 雄性不稔抑制遺伝子 (*Epistasis: E*) の解析 : Lebed に T65 を戻し交雑して得られた原因遺伝子ヘテロかつ可稔系統に T65 を戻し交雑して得られた個体を抑制遺伝子のマッピングに用いた。また抑制遺伝子マッピングのために、遺伝的背景がコシヒカリであり 第 6 染色体の一部にカサラスの断片を持つ KKCSSL216、KKCSSL217、KKCSSL218 も用いた
- (3) 循環選抜育種の実証試験 : Lebed に由来する雄性不稔遺伝子が他の品種でも優性に機能することを確かめながら、循環選抜育種に用いる育種素材を育成するため、様々なイネ品種 (コシヒカリなどの日本の主要品種および海外の品種を花粉親として、Lebed×T65 雄性不稔系統に交雑し、後代の稔性を調査する。

## 4. 研究成果

(1) 雄性不稔遺伝子 (*Sterility: S*) の解析 : フィリピンのインディカ品種 Lebed にジャポニカ品種「台中 65 号 (T65)」を連続戻し交雑する過程で、雄性不稔系統が得られた。戻し交雑の第 4 世代 (BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub>) では不稔性の個体と可稔性の個体に分離した (図 2)。ここで得られた雄性不稔系統を Lebed×T65 backcrossed Male Sterile line (LTMS 系統) とした。

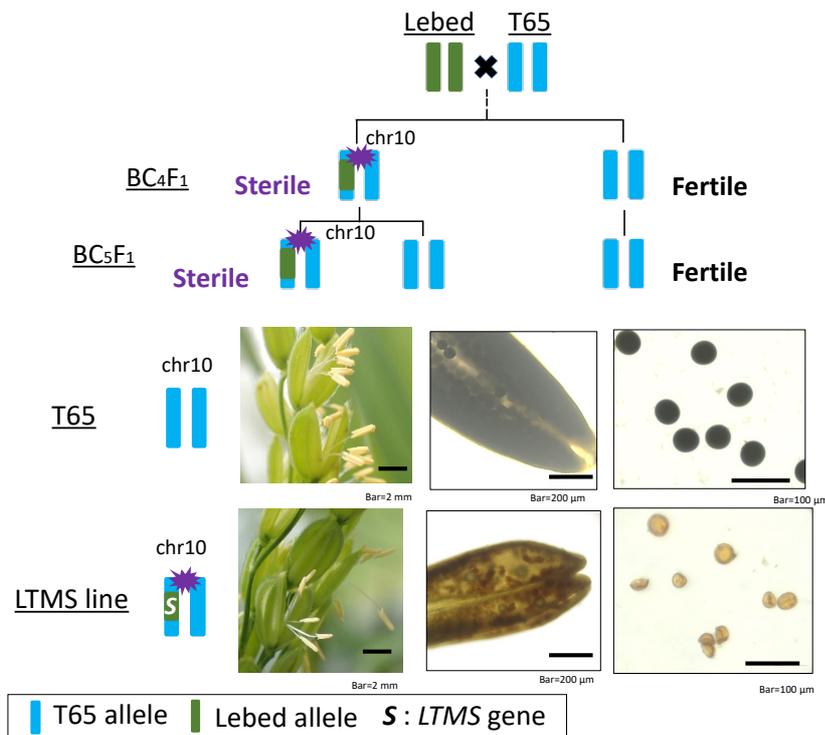


図 2 LTMS 系統の育成経過 (上) および 葯と花粉の形態 (下)

LTMS 系統に T65 を戻し交雑して得られた集団を用いて、雄性不稔遺伝子のマッピングを行った。その結果、第 10 染色体の一部の領域が Lebed と T65 のヘテロ型の時に雄性不稔となることがわかった (Murakami et al. 2018)。LTMS 系統の葯は細く裂開しない (図 2)。開花期の花粉はいびつで澱粉は蓄積しない (図 2)。

LTMS 系統に T65 を戻し交雑して得られた 919 個体から候補領域内で組換えが起きている個体を 12 個体選抜し稔性を調査した。その結果、原因候補領域を日本晴相当で 120 kb に絞り込んだ。Lebed の全ゲノムシーケンシングの結果、候補領域内には日本晴と同様に 9 個の遺伝子がアノテーションされていた (The MSU Rice Genome Annotation Project: MSU)。Lebed の全ゲノムシーケンシングには理化学研究所の支援を受けた。

LTMS 系統の花粉発達の異常は減数分裂期の直後から現れるため、減数分裂期の葯を含む穎花における発現を RT-PCR で調査した。その結果 4 個の遺伝子 (A、B、C、D) で発現が確認できた。また、系統間での発現量の差は検出できなかった。さらに発現が確認できた 4 個の遺伝子について Lebed の cDNA の塩基配列を決定した。

遺伝子 A の CDS には 1 塩基の置換が 2 ヶ所存在し、アミノ酸配列も 2 ヶ所置換されていた。アミノ酸配列から Cysteine proteinase をコードしていることが予測されたが、活性に重要と予測されたアミノ酸には置換が起きていなかった。

遺伝子 B の CDS には Lebed に 81 bp の挿入が 1 ヶ所、3 bp の挿入が 1 ヶ所、1 塩基の置換が 1 ヶ所存在した。また MSU のデータベースとはスプライシングのパターンが異なっており、予想されていたフレームでは終止コドンが多く存在した。異なるフレームを調査したところ、予想されていた開始コドンから 7 bp 上流に存在する開始コドンから終止コドンまで、台中 65 号で 115 アミノ酸、Lebed で 143 アミノ酸をコードするフレームが予想された。また、アミノ酸配列からコードしているタンパク質の機能は予測されなかった。遺伝子 B のアミノ酸配列に核移行シグナルが予測されたため、Lebed と T65 それぞれの cDNA を GFP を含むベクターにライゲーションさせ、パーティクルガンでタマネギ表皮細胞に打ち込んだ。その結果 GFP が核に局在することが観察でき、遺伝子 B のタンパク質は核に局在することがわかった。遺伝子 B は核において他のタンパク質と相互作用している可能性が考えられた。

遺伝子 C の CDS には 1 塩基の置換が 2 ヶ所存在し、アミノ酸配列は 1 ヶ所置換されていた。アミノ酸配列から Glutathione S-transferase をコードしていることが予測されたがモチーフの一部しか含まれていなかった。

遺伝子 D は CDS が台中 65 号と Lebed の間で 100% 一致していた。

以上のことより、遺伝子 A、遺伝子 B、遺伝子 C が有力な原因候補遺伝子だと考えられた。

相補性試験を行うため、それぞれの遺伝子に対応する Lebed のゲノム DNA を鋳型として PCR を行いクローニングした。プライマーは 3 個の候補遺伝子の CDS とその上流 1 kb、下流 1 kb をそれぞれ特異的に増幅させるもので、かつ 5' 末端に制限酵素認識配列をそれぞれ付加したものをを用いた。バイナリーベクター pZH2B に挿入して、アグロバクテリウム法により、台中 65 号、および、日本晴に遺伝子導入した。日本晴の形質転換は理化学研究所の支援を受けた。台中 65 号の形質転換植物は十分な数が得られなかったが、日本晴の形質転換植物は 2021 年 3 月から開花し始めた。花粉をヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色して観察したところ、花粉染色率の平均は、遺伝子 A 導入個体が 17%、遺伝子 B 導入個体が 8%、遺伝子 C 導入個体が 27%、ベクターのみ導入した個体が 55% であった。全体的に不稔の花粉が多く、個体によるばらつきが大きかったため、再現性を確認する必要がある。今後、結実率も調査する必要がある。LTMS 系統と同様の表現型を与える遺伝子を同定できれば、それが、LTMS の原因遺伝子であり、「優性の雄性不稔遺伝子」と結論することができる。

(2) 雄性不稔抑制遺伝子 (*Epistasis: E*) の解析：花粉をヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色し観察した。その結果 LTMS 系統は花粉にデンプンの蓄積がない一方で抑制遺伝子を持つと思われる可稔個体では花粉にデンプンの蓄積がみられた。次に BC4F1、BC5F1 の抑制遺伝子マッピング集団について、稔性と遺伝子型の偏りがみられた第 1、6、12 染色体の DNA マーカーを用いてジェノタイプングを行った。その結果、第 6 染色体の DNA マーカーにおいて稔実率が高い個体でヘテロ、稔実率が低い個体で T65 ホモである傾向がみられたため、抑制遺伝子は第 6 染色体に存在すると考えられた。

また、LTMS 系統にカサラスを交配したところその後代が可稔になったことから (表 1)、カサラスは Lebed と同様の抑制遺伝子を持つことが示唆された。そこで、カサラスとコシヒカリの染色体断片置換系統である KKCSSL216、KKCSSL217、KKCSSL218 を LTMS 系統に交配し、その後代の稔性を調査した。その結果、KKCSSL216 を交配して得た後代のみ可稔となった (表 1)。このことから KKCSSL216 におけるカサラス由来の領域が抑制遺伝子の候補領域と考えられた。抑制遺伝子についてさらにマッピングを進めた結果、第 6 染色体の 4.2 Mb (日本晴相当) の領域に存在することが示唆された。

表1 LTMSに交雑したF1の結実率 (%)

花粉親	S領域の遺伝子型	
	Lebedヘテロ	ジャポニカホモ
コシヒカリ	7.8	
ひとめぼれ	9.4	98.2
熱研2号	37.4	86.7
Kasalath	94.5	
Nepal 8	69.8	
KKCSSL216	92.1	
KKCSSL217	4.1	
KKCSSL218	2.6	

(3)循環選抜育種の実証試験: 「Lebed由来の優性の雄性不稔系統」にイネ品種「コシヒカリ」「ひとめぼれ」「熱研2号」を交雑したF1 (S領域ヘテロ) でも雄性不稔性を示すことを明らかにした (表1)。一方、インディカ品種「Kasalath」「Nepal 8」を交雑した場合は稔性が回復した (表1)。これより、「Lebed由来の優性の雄性不稔系統」はジャポニカ品種の循環選抜には利用できることが明らかとなった。一方で、インディカ品種には利用できないという問題点が明らかとなった。

この問題を解決するため、細胞質雄性不稔系統 (CMS 系統) の利用についても検討した。その結果、CW-CMS 系統を用いるとジャポニカ品種のみならず、インディカ品種を CMS 化できる可能性が高いことを明らかにした (Toriyama et al. 2019)。「優性の核コード雄性不稔系統」に加え、独自に開発した「ミトコンドリアコード雄性不稔系統」を加え、両者を比較検討しながら循環選抜育種基盤を開発することが有用と考えられた。

<引用文献>

Murakami T, Kazama T, Toriyama K (2018) Genetic analysis of male sterility obtained from a rice cultivar Lebed backcrossed with Taichung 65. *Rice* 11: 30

Pang Y, Chen K, Wang X, Xu J, Ali J, Li Z (2017) Recurrent selection breeding by dominant male sterility for multiple abiotic stresses tolerant rice cultivars. *Euphytica* 213: 268

Toriyama K, Kazama T, Sato T, Fukuta Y, Oka M (2019) Development of cytoplasmic male sterile lines and restorer lines of various elite Indica Group rice cultivars using CW-CMS/*Rf17* system. *RICE* 12: 73

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Suketomo C, Kazama T, Toriyama K	4. 巻 37
2. 論文標題 Fertility restoration of Chinese wild rice-type cytoplasmic male sterile rice by CRISPR/Cas9-mediated genome editing of nuclear-encoded RETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 285-292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.20.0326b	査読の有無 有
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 Toriyama Kinya, Kazama Tomohiko, Sato Tadashi, Fukuta Yoshimichi, Oka Masaaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of cytoplasmic male sterile lines and restorer lines of various elite Indica Group rice cultivars using CW-CMS/Rf17 system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rice	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12284-019-0332-8	査読の有無 有
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 Murakami Tetsuya, Kazama Tomohiko, Toriyama Kinya	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic analysis of male sterility obtained from a rice cultivar Lebed backcrossed with Taichung 65	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rice	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12284-018-0222-5	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Takatsuka A, Kazama T, Arimura S, Toriyama K
2. 発表標題 MitoTALEN-mediated mitochondrial gene-knockout revealed a cytoplasmic male sterility-causative gene in <i>Oryza sativa</i> cv. Tadukan.
3. 学会等名 KEYSTONE SYMPOSIA, Plant Genome Engineering: From Lab to Field(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高塚歩, 風間智彦, 有村慎一, 鳥山欽哉
2. 発表標題 mitoTALENを用いた遺伝子破壊によるイネTA型CMS原因遺伝子の同定
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田悠生, 市田裕之, 風間智彦, 阿部知子, 鳥山欽哉
2. 発表標題 イネ品種 Lebed に台中 65 号を戻し交雑して得られた雄性不稔系統における原因候補遺伝子の機能推定
3. 学会等名 第15回東北育種研究集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高塚歩, 風間智彦, 有村慎一, 鳥山欽哉
2. 発表標題 イネ Tadukan 型細胞質雄性不稔性のミトコンドリア原因遺伝子 orf312 の同定
3. 学会等名 第15回東北育種研究集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高塚歩, 鳥山欽哉, 風間智彦
2. 発表標題 インディカイネ品種Tadukanの細胞質に由来する雄性不稔性原因候補遺伝子の探索
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田悠生, 市田裕之, 風間智彦, 阿部知子, 鳥山欽哉
2. 発表標題 インディカイネ品種 Lebed に由来する雄性不稔遺伝子とその抑制遺伝子の解析
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田悠生, 風間智彦, 鳥山欽哉
2. 発表標題 イネ品種 Lebed に台中 65 号を戻し交雑して得られた雄性不稔系統における原因候補遺伝子の解析
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 助友千尋, 風間智彦, 鳥山欽哉
2. 発表標題 核コードRETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY 遺伝子のゲノム編集によるCW 型細胞質雄性不稔イネの稔性回復
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高塚歩, 風間智彦, 鳥山欽哉
2. 発表標題 Tadukan型細胞質雄性不稔性イネの稔性回復様式とミトコンドリア遺伝子の解析
3. 学会等名 第14回東北育種研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kinya Toriyama, Tomohiko Kazama
2. 発表標題 Arms race between mitochondria and nuclei revealed by cytoplasmic male sterility/fertility restoration systems in rice
3. 学会等名 The 17Th International Symposium on Rice Functional Genomics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chihiro Suketomo, Tomohiko Kazama, Kinya Toriyama
2. 発表標題 Fertility restoration of CW-type cytoplasmic male sterile rice by CRISPR/Cas9- mediated genome editing of nuclear-encoded RETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY
3. 学会等名 The 17Th International Symposium on Rice Functional Genomics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上哲也, 風間智彦, 烏山欽哉
2. 発表標題 イネ品種LEBEDに台中65号を連続戻し交雑することで得られた雄性不稔系統における原因遺伝子のマッピング
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 Murakami T, Kazama T, Toriyama K
2. 発表標題 Dominant male sterility originated from an indica cultivar Lebed
3. 学会等名 International Hybrid Rice Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toriyama K, Kazama T, Fukuta Y, Oka M
2. 発表標題 Development of cytoplasmic male sterile lines of elite Indica Group rice cultivars using CW-CMS/Rf17 system.
3. 学会等名 International Hybrid Rice Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上哲也・風間智彦・鳥山欽哉
2. 発表標題 イネ品種LEBEDに台中65号を連続戻し交雑することで得られた雄性不稔系統の遺伝学的解析
3. 学会等名 日本育種学会第132回講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>環境適応生物工学研究室HP「お知らせ」  <a href="https://www.agri.tohoku.ac.jp/bioadp/PukiWiki/index.php?FrontPage">https://www.agri.tohoku.ac.jp/bioadp/PukiWiki/index.php?FrontPage</a></p>
---

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
研究協力者	風間 智彦  (Kazama Tomohiko)  (30431464)	九州大学・農学研究院・准教授    (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------