

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07603

研究課題名(和文) 殺花粉作用を誘発する孢子体因子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a sporophytic gene related to pollen killing

研究代表者

久保 貴彦 (Kubo, Takahiko)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00370148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、栽培イネ亜種間交雑(*Oryza sativa* ssp. *japonica* × *indica*)で見出された花粉キラー遺伝子座S35とその相互作用遺伝子INKの分子基盤の解明を目的として、INK遺伝子のポジョナルクローニングを進めた。結果として、INKには少なくとも2つ以上の遺伝因子が関わる可能性が示され、そのうちのひとつの候補遺伝子としてORF1を同定した。また、栽培品種と野生種における不稔誘導型アリルInk-iの遺伝子分布を調査した結果、不稔誘導型アリルInk-iは祖先野生種*O. rufipogon*に起源することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作物の品種改良は主に、異なる品種間あるいは種・亜種間の交雑に派生する優良個体の選定、によって進められている。このような種・亜種間交雑では、花粉キラーと呼ばれる遺伝子が片親に由来する優良遺伝子の正常な伝達を阻害し、優良個体が得られにくくなることがある。本成果は、花粉キラーの分子的要因と遺伝子分布を明らかにするものであり、これによって、遺伝子伝達阻害の解消と作物品種改良の効率化につながる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the molecular basis of pollen killer system involving a pollen killer S35 and an interacting partner gene INK found in a subspecific cross of cultivated rice (*Oryza sativa* ssp. *japonica* × *indica*). Positional cloning of this gene was carried out in this study. INK was found to be composed of at least two or more chromosomal subregions, and a candidate gene ORF1 was identified. In addition, investigation of the gene distribution of Ink-i in cultivars and ancestral wild species, Ink-i was shown to be originated from the ancestral wild species *O. rufipogon*.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：花粉キラー 遺伝子 孢子体因子 *Oryza sativa indica japonica*

1. 研究開始当初の背景

配偶子キラーは、ヘテロ接合体においてこの因子を持たない配偶子を選択的に殺し、自身のアリルを優先的に後代に伝える「利己的遺伝子」である。このような配偶子アリルの選択性は動植物で共通して観られ、植物では雌雄両配偶子で同時に起きる配偶子キラー、雌性配偶子のみ作用するエッグキラー、雄性配偶子のみ花粉キラーの3タイプが知られる。花粉キラー遺伝子座は染色体上に多数同定されているが、その制御メカニズムに関わる分子生物学的知見は極めて少ない。従来より花粉キラーは、「1遺伝子座におけるアリル間相互作用による」と考えられており、花粉キラー遺伝子座のみに着目した遺伝学的解析が続けられてきた。一方、研究代表者らは、花粉キラー単独ではなく、別の孢子体因子との相互作用によって花粉キラーの活性が誘発されることを複数のケースにおいて示してきた(Kubo *et al.* 2011, 2016)。花粉キラーシステムの全容解明には、このような孢子体因子の相互作用を含めた解析が必須であると考えられた。研究代表者らが同定した遺伝子座のうち、花粉キラー遺伝子座 S35 とその活性化に必要な孢子体遺伝子座 *INK* (Kubo *et al.* 2008, 2016) については、その原因遺伝子などの詳細はわかっておらず、ハイブリッドライス開発等での応用面における需要も高いことから、本現象の機構の解明が必要である。

2. 研究の目的

植物の配偶子キラーに関する分子的知見は非常に少ない。栽培イネ亜種間交雑 (*Oryza sativa* ssp. *japonica* × *indica*) で見出された花粉キラー S35 座は、孢子体因子 *Ink* との相互作用によって、花粉不稔を引き起こすことがわかっている。本研究では、この孢子体因子 *INK* の原因遺伝子の探索を進め、*INK*-S35 による殺花粉システムの分子基盤を解明することを目的とする。また、花粉キラー S35 と孢子体因子 *INK* の成立過程に関する手がかりを得るために、まずは試験的に少数の栽培品種と近縁野生種を対象として両遺伝子の分布調査を実施する。

3. 研究の方法

孢子体因子 *INK* と花粉キラー S35 のポジショナルクローニングを進めるために、栽培イネ品種「あそみのり」(*japonica*) と「IR24」(*indica*) の交雑後代に「あそみのり」を戻し交雑した近似同質遺伝子系統 NIL を育成し、これを原因遺伝子周辺の遺伝的組換え個体のスクリーニングに供試した。S35 座の候補遺伝子の絞り込みも同交雑集団を用いた。さらに S35 座の3種アリル(キラー、致死、中立アリル)の DNA 配列を解読分析し、遺伝子構造や配列的特徴に基づいて最有力候補遺伝子の絞り込みを進めた。S35 による花粉不稔は、*indica* の遺伝的背景では回復することから、*indica* 由来の稔性回復因子(第3因子)の存在が示唆されていた。初期戻し交雑世代(BC_1F_2)を用いた遺伝解析による第3因子の探索を行った。

また、S35 と *INK* 遺伝子の起源を探る目的で、栽培種および近縁野生種における遺伝子分布の調査を行った。材料には、S35 および *INK* 遺伝子領域を栽培品種・野生種系統由来の染色体に置換した既存の CSSL に加えて、新しく育成した戻し交雑集団を用いた。これらの花粉表現型の評価を行うことで、栽培種・野生種における両遺伝子のアリル多様性とその分布の調査を実施した。

4. 研究成果

(1) 原因遺伝子のポジショナルクローニング：イネの花粉キラーの分子・生理機構を明らかにすることを目標として、まず花粉キラーに相互作用する胞子体因子 *INK* の同定を進めた。あそみのりと IR24 の戻し交雑集団を用いてファインマッピングを行ったところ、原因遺伝子は隣接する 2 つ以上の領域にあることが示唆された。あそみのりと IR24 の間でアミノ酸変異を示した候補遺伝子のひとつ ORF1 で相補性試験を行った結果、一定の弱い相補的効果を示したが、元の表現型に相当するレベルの相補性を示さないことがわかった。他方、*S35* 座は、染色体 1 短腕末端の 122 kb の領域に座乗することがわかっていたため、この 122 kb 領域の内部に新たに DNA マーカーを作成し絞り込みを進めた。本領域内には IR24 に約 20 kb の欠失があったため組換え個体が得られにくいと推測していたが、その予想どおり新たな組換え個体は得られなかった。そのため、*S35* 座の 3 種アレル（キラー、致死、中立アレル）の DNA/タンパク質の配列を比較し、16 遺伝子の中から変異の高い 5 つの有力な候補遺伝子を選定した。

(2) 第 3 関与因子の探索：花粉キラー *S35* に対する稔性回復因子（*indica* 由来）の存在が示唆されているため、回復因子を探索する目的で同交雑組み合わせに由来する初期世代 BC₁F₂ 集団から稔性を回復する 3 個体を選抜した。これら 3 個体の染色体構成から、染色体 1, 2, 5, 10 に回復因子が存在する可能性が示唆された。本初期世代集団の遺伝的解析を通して、他の花粉キラー遺伝子 *S25* との遺伝的関係性（*S25* は *INK*-*S35* 系とは独立であること）と各遺伝子の雑種

第 1 代世代における表現型への効果を明らかにすることができた（Kubo *et al.* 2017）。

(3) *S35* と *INK* 遺伝子の種内分布

indica 3 品種（Kasalath, DV85, Nona Bokra）と野生種 4 系統（W1943, W2051, W0610, W1625）に由来する *INK* 断片と *S35-ir* (*indica* allele) をヘテロ型にもつ NIL 系統を育成し、各 NIL の表現型に基づく *INK* の遺伝子分布を調査した（図 1）。結

果として、*S35* 活性を促す対立遺伝子 *Ink-i* 型は野生種 *O. rufipogon* の一部の系統に存在すること、そして、さらに追加試験を要するものも含めて多くは花粉不稔性を誘導しない *ink-j* 型であることがわかった。以上のことから、*indica* にみられた *Ink-i* は野生種 *O. rufipogon* に起源するものの、種内ではマイナーアレルである可能性が考えられた。また *S35* については、供試した中に *S35* による不稔性を明確に示す系統は認められなかった。したがって、*S35-i* アレルの特有の変異が栽培種 *indica* において生じた可能性と、あるいは野生種内では *Ink-i* 同様にマイナーアレルである可能性が示唆された。供試系統数が少ないことから、今後は、さらに系統数を増やした遺伝子分布の調査が必要である。今後の供試数の拡充により、本成果は交雑育種やハイブリッド品種育成において両親組合せを効率的に選定するための有益な情報を提供しうる。

< 引用文献 >

Kubo T., Yoshimura A., and Kurata N. Genetic characterization and fine-mapping of *S25*, a hybrid male sterility gene, on rice chromosome 12. *Genes & Genetics Systems* 92: 205-212 (2017)

Kubo T., Yoshimura A., and Kurata N. Pollen killer gene *S35* function requires interaction with an activator that maps close to *S24*, another pollen killer gene in rice. *G3 (Bethesda)* 6: 1459-1468 (2016)

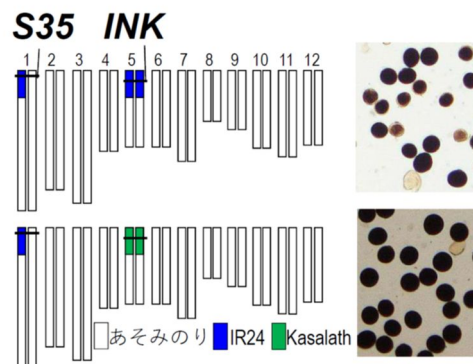


図1. *aus*品種 Kasalath の *INK* アレルの評価
グラフ遺伝子型（左）と花粉表現型（右）

Kubo T., Yoshimura A., and Kurata N. Hybrid male sterility in rice is due to epistatic interactions with a pollen killer locus. *Genetics* 189: 1083-1092 (2011)

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

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kubo T., Yoshimura A., and Kurata N.	4. 巻 92
2. 論文標題 Genetic characterization and fine mapping of S25, a hybrid male sterility gene, on rice chromosome 12.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes & Genetic systems	6. 最初と最後の頁 205-212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.17-00012	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Rahma S.N.A.F, Kumamaru T., and Kubo T.
2. 発表標題 Fine-mapping of INK gene responsible for hybrid male sterility in rice.
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kubo T., Yoshimura A., and Kurata N.
2. 発表標題 Dissecting genetic networks underlying F1 hybrid sterility and hybrid breakdown in rice.
3. 学会等名 Plant Genome Evolution（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------