

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05576

研究課題名(和文) 非適応ハプロタイプブロックによるイネ生殖細胞の崩壊と生殖的隔離

研究課題名(英文) Abortion of germ cells and reproductive barriers due to maladaptive haplotype block in rice

研究代表者

山形 悦透 (Yamagata, Yoshiyuki)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00600446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生殖的隔離は種の同一性を維持する障壁として働く。栽培イネ *Oryza sativa* と *O. glaberrima* の種間雑種において、S18遺伝子はヘテロ接合体における生殖細胞の形態異常、強度の花粉不稔および分離歪みを引き起こす。本研究ではS18非適応ハプロタイプはS18AとS18Bの二遺伝子座による遺伝子複合 (gene complex) からなり、両領域がヘテロ接合型の時にタペート崩壊の遅延と不完全な消失が起こることで高不稔となることを明らかにした。またその原因となる塩基置換を順遺伝学的に同定し、AAゲノム種における多様性解析からS18は *O. barthii* に起源することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病虫害、温暖化や豪雨などの気候変動などの影響に対して堅牢な作物を開発するため、古くから野生種との交雑が行われてきた。しかし、種間交雑における雑種致死や不稔により野生種の持つ有用な性質を栽培種に取り込むことがしばしば困難とある。本研究ではイネ科作物において広く見いだされるタンパク質のアミノ酸置換が雑種不稔を引き起こすことを明らかにした。最近ではゲノム編集による塩基置換が可能な状況となっており、ゲノム編集技術等を活用することで、生殖的隔離の打破や制御を可能にし、育種への活用につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Reproductive isolation acts as a barrier to maintaining species identity. In interspecific hybrids of cultivated rice *Oryza sativa* and *O. glaberrima*, S18 gene causes abnormal germ cell morphology, high pollen sterility and segregation distortion in heterozygotes. In this study, we found that the S18 non-adaptive haplotype is composed of a gene complex consisting of two loci, S18B and S18T, and that both regions induce high sterile on heterozygotes due to delayed and incomplete degradation of tapetal cells. We have also identified the nucleotide substitutions responsible for the high sterility by forward genetics, and diversity analysis in AA genome species revealed that S18 originated from *O. barthii*.

研究分野：遺伝育種学分野

キーワード：雑種不稔 生殖的隔離 減数分裂 イネ ハプロタイプ

1. 研究開始当初の背景

動植物の雑種において、雑種致死、雑種弱勢、雑種不稔は接合後生殖的隔離と呼ばれる。生殖的隔離は種の同一性を維持する障壁として働くとともに、種(集団)の分化を非可逆にする要因の一つである。生殖的隔離の遺伝的基盤および進化を説明するため、Bateson-Dobzhansky-Muller (BDM)モデルと呼ばれる二遺伝子座相互作用モデルが報告されてきた。一方、単一のメンデル遺伝子座に見えるが、詳細な遺伝解析の結果、連鎖する複数の遺伝子が構成するハプロタイプの組み合わせによっておこるケースがショウジョウバエ、マウスおよびイネ(Killer-Protector システム)にて知られている。

アジア原産の栽培イネ品種台中 65 号 (T65, *O. sativa* L. ssp. *japonica*)とアフリカ原産の栽培イネ *O. glaberrima* (Acc. IRGC104038)の種間雑種 F₁ は花粉完全不稔をしめす。これまで同定された雑種花粉不稔遺伝子のうち、染色体 10 に座乗する *S18* はヘテロ接合体(*S18-sat* / *S18-gla*)において強度の花粉不稔(5~20%稔性)の胞子体的な不稔を引き起こす(図 1)。さらに自殖後代において *sativa* アレル増加型の分離歪みを引き起こし、配偶体的な不稔も引き起こす。一方、*sativa* および *glaberrima* ホモ接合体の花粉稔性は正常に回復する。*S18* の原因遺伝子はこれまで報告されていない。栽培イネの亜種間交雑では、ハプロタイプブロックの構成因子をガンマ線や CRISPR/Cas9 にて破壊した系統は雑種不稔を示さないことが知られている。単離した遺伝子の欠損系統を作出することは、雑種不稔打破系統の確立のため、重要である。*S18* ヘテロ接合体は、減数分裂において核分裂は正常だが、細胞質の不等分裂をしめす。これまでマウス、ショウジョウバエ、イネなどの様々な生物において雑種不稔研究が行われてきたが、このようなケースは報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では *S18* の分子遺伝学的な基盤を解明し、*S18* 非適応ハプロタイプの分子の実体およびその進化経路を明らかにし、雑種不稔を打破する高親和性系統確立への理論的基礎の構築を目指した。そこで以下の3点に関する研究を行った。

(研究 1) *S18A* と *S18B* の相補性検定による遺伝子単離

(研究 2) *S18A* および *S18B* の欠損変異体の作出と雑種不稔打破の検証

(研究 3) 減数分裂細胞における *S18A* と *S18B* の機能解析

3. 研究の方法

(研究 1) *S18A* と *S18B* の相補性検定による遺伝子単離を行うため、日本晴 BAC クローンに由来するゲノム断片を、*S18* ヘテロ接合体および *S18-gla* ホモ接合体へ形質転換し、T₀ 個体の花粉稔性を評価した。自殖後代 T₁ 世代において *S18* 座の近傍マーカーおよび導入遺伝子の分離解析により、相補性の追認を行う。

(研究 2) 研究 1 において単離した遺伝子について、*S18A* および *S18B* の欠損変異体を作出するため、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により日本型イネ T65 を受容植物とする T₀ 植物遺伝体を作成し、突然変異が導入されている系統を選抜した。

(研究 3) ヘテロ接合体(不稔個体)の減数分裂期に見られる不等細胞質分裂を詳細に観察するため、T65 およびヘテロ接合体の減数分裂細胞における原因タンパク質の蛍光免疫染色を行い、減数分裂期における発生過程および分子局在を詳細に観察した。

4. 研究成果

(研究 1)

日本型栽培イネ台中 65 号(T65)と *O. glaberrima* (Acc. IRGC104038)の雑種後代に由来する *S18* 準同質遺伝子系統 (*S18 NIL*)を用いた遺伝解析の結果、*S18* は 9.5 kb の *S18A* 領域と 26.2 kb の *S18B* 領域の少なくとも二つの領域に分割でき、*S18* ハプロタイプは *S18A* と *S18B* の二遺伝子座による遺伝子複合 (gene complex)からなり、両領域がヘテロ接合型の時に高不稔となることを明らかにした (表 1)。両領域間には相互作用が存在することがわかった。候補領域には機能未知の遺伝子が予測されており、新規の非適応ハプロタイプブロックであると考えられ、*S18* 非適応ハプロタイプと命名した。

高精度連鎖解析の結果に基づき、相補性検定を行った。得られた形質転換体 T₀ および T₁ の解析から、*S22A* および *S22B* の原因遺伝子を単離することができた (未発表)。発現解析を行ったところ、*S22A* および *S22B* の転写産物量は花粉稔性と相関していなかったことから、半不稔の原因は転写産物量ではなく、CDS 領域の DNA 多型に由来すると考えられた。

表1. *S18*領域の遺伝子型と花粉稔性

遺伝子型 ¹		花粉稔性 ²
<i>S18A</i>	<i>S18B</i>	
TT	TT	N
TG	TT	PS
GG	TT	N
TT	TG	N
TG	TG	HS
GG	TG	N
TT	GG	N
TG	GG	-
GG	GG	N

¹ TおよびGはT65および*O. glaberrima* アレルを示す。

² Nは正常、PSは部分不稔、HSは高不稔を示す。

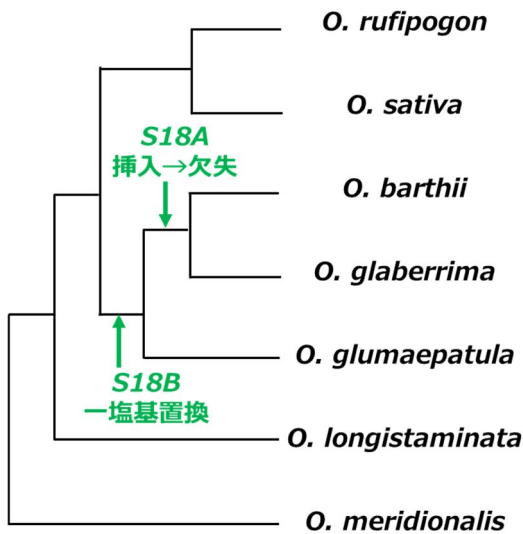


図1. AAゲノム種の分化におけるS18原因変異の起源

高精度連鎖解析によって得られた組換え個体の解析から、S22Aの原因変異は挿入欠失変異、S22Bの原因変異は一塩基置換であると推定された(図1)。公共データベースに存在するAAゲノム野生種由来のショートリードデータを用いて原因変異の有無を調査したところ、これらの原因変異は*O. glaberrima* およびその祖先野生種である*O. barthii*の祖先集団において起源したと考えられた。T65 遺伝的背景に*O. rufipogon* (Yamagata *et al.* 2019), *O. longistaminata* (Acc. W1508)の導入系統群を作成し (Ogami *et al.* 2019, Thein *et al.* 2019)、S18 領域の染色体断片導入系統の花粉稔性を調査したが、花粉不稔を引き起こさなかったことから、S18はアフリカの一年生野生種および栽培種に存在する生殖的隔離として働くことが示唆された。

(研究2)

CRISPR/Cas9による欠損型ホモ接合体を作成・評価したが花粉不稔を引き起こさなかったことから、花粉形成に必須の遺伝子ではない、あるいは機能的に重複する経路が雄性配偶子形成の遺伝子群には存在することが示唆された。これらの欠損変異体に*S18-gla* NILを交雑し、表現型を観察したところ、花粉不稔が観察された。この結果からS18が担う胞子体的な遺伝的効果は対立遺伝子そのものの機能というよりは、対立遺伝子間相互作用が重要であると推察された。

(研究3)

花粉形成過程を樹脂切片を用いた形態観察したところ、ヘテロ接合体ではタペート崩壊の遅延と不完全な消失が起こることで、胞子体的な高不稔を引き起こすことが明らかとなった(図2)。また電子顕微鏡観察により、花粉外壁のエキシン構造に異常が起こることが分かった。またS18ヘテロ接合体における減数分裂にて不均等な細胞質分離が起こっていた。不稔個体ではタペートのプログラム細胞死の調節を担い、生殖細胞の発達に必須の機能を持つ転写因子群(*TIP2*, *TDR*, *UDT1*, *EAT1*)の発現が変化していることからS18AおよびS18Bのいずれかはこれら転写因子群の上流で働く胞子体世代での機能を有すると考えられた。

蛍光免疫染色による顕微鏡観察により、S18Bは減数分裂前の生殖細胞においては核に局在し、減数分裂後は細胞板の形成部位に相当する隔膜形成体に局在し、微小管と相互作用する可能性が示唆された(未発表)。

上記の解析では胞子体的な要因に関するエビデンスが蓄積していたが、S18ヘテロ接合体の後代においてみられる分離ゆがみ、すなわち配偶体の遺伝子型依存的な不稔(配偶体型不稔)の原因についてはほとんど明らかにされなかった。しかしながら減数分裂期および、減数分裂以降の雄性配偶子形成時期の幅広い時期及び組織にて機能する遺伝子であることが示唆された

(副次的な成果について)

本研究ではイネ属AAゲノム種の遺伝的分化および接合後生殖的隔離の遺伝学的な要因の一つとしてS18の原因遺伝子の単離に取り組んだが、*O. glaberrima* および *O. glumaepatula* にて見いだされているF₁花粉不稔遺伝子としてS22B遺伝子の単離を進めた(Sakata *et al.* 2021)とともに、イネ属の光環境適応の分化に関する研究を進めた (Kihara *et al.* 2020)。

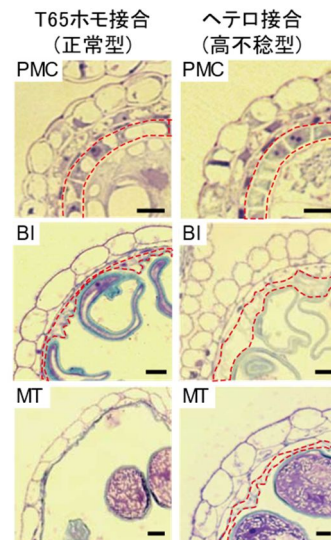


図2. 減数分裂以降の花粉形成過程の観察. 花粉母細胞(PMC), 二細胞期(BI)および成熟期(MT). 赤の点線はタペート組織を表す.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kihara, M., T. Ushijima, Y. Yamagata, Y. Tsuruda, T. Higa, T. Abiko, T. Kubo, M. Wada, N. Suetsugu, and E. Gotoh.	4. 巻 133
2. 論文標題 Light-induced chloroplast movements in <i>Oryza</i> species.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Plant Res.	6. 最初と最後の頁 525-535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-020-01189-w	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 Sakata, M., N. Takano-Kai, Y. Miyazaki, H. Kanamori, J. Wu, T. Matsumoto, K. Doi, H. Yasui, A. Yoshimura, and Y. Yamagata	4. 巻 11
2. 論文標題 Domain unknown function DUF1668-containing genes in multiple lineages are responsible for F1 pollen sterility in rice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 632420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.632420	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 5.Munguambe, N.E., S. Inoue, Z. Demeter, Y. Yamagata, H. Yasui, S.H. Zheng, D. Fujita	4. 巻 12
2. 論文標題 Substitution mapping of a locus responsible for hybrid breakdown in populations derived from interspecific introgression line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 633247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.633247	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 Ogami, T., H. Yasui, A. Yoshimura, Y. Yamagata.	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of anther length QTL and construction of chromosome segment substitution lines of <i>Oryza longistaminata</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants8100388	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 Yamagata, Y., K. T. Win, Y. Miyazaki, C. Ogata, H. Yasui, A. Yoshimura	4. 巻 69
2. 論文標題 Development of introgression lines of AA genome <i>Oryza</i> species, <i>O. glaberrima</i> , <i>O. rufipogon</i> , and <i>O. nivara</i> , in the genetic background of <i>O. sativa</i> L. cv. Taichung 65	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breed. Sci.	6. 最初と最後の頁 359-363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.19002	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 Thein, H. W., Y. Yamagata, T. V. Mai, H. Yasui	4. 巻 69
2. 論文標題 Four resistance alleles derived from <i>Oryza longistaminata</i> (A. Chev. & Roehrich) against green rice leafhopper, <i>Nephotettix cincticeps</i> (Uhler) identified using novel introgression lines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breed. Sci.	6. 最初と最後の頁 573-584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.19060	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 窪田 隆一, 阪田 光和, 村上 亮, 宮崎 雄大, 安井 秀, 吉村 淳, 山形 悦透
2. 発表標題 F1花粉不稔遺伝子座S21における <i>Oryza sativa</i> , <i>O. nivara</i> および <i>O. meridionalis</i> の対立遺伝子組み合わせによって分離歪みの方向が変化する
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 藤原 渉, 井上 惇之, 安井 秀, 山形 悦透
2. 発表標題 <i>Oryza sativa</i> L.と <i>O. glaberrima</i> Steud.間種間雑種後代のF1花粉不稔に関する遺伝子座S18の遺伝解析
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 藤原渉、井上惇之、久保貴彦、安井秀、吉村淳、山形悦透
2. 発表標題 Oryza sativa L.とO. glaberrima Steud.間種間交雑に由来するF1花粉不稔遺伝子座S18の近同質遺伝子系統におけるタベート崩壊の異常
3. 学会等名 日本育種学会第十四回九州育種談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 渉、安井 秀、山形悦透
2. 発表標題 Oryza sativa L.とO. glaberrima Steud.間の種間交雑に由来する雑種不稔系統における花粉発達過程の異常
3. 学会等名 日本育種学会第13回九州育種談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅原 彩、安井 秀、山形悦透
2. 発表標題 アフリカおよびアメリカ原産イネ野生種に由来するNAM集団を用いたF1花粉不稔遺伝子座の探索
3. 学会等名 日本育種学会第13回九州育種談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山形悦透、安井 秀
2. 発表標題 イネ野生種由来イントログレッション系統群を用いた遺伝子の探索と利用
3. 学会等名 日本育種学会第13回九州育種談話会
4. 発表年 2018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
---------	---------