

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19688002

研究課題名(和文)

イネ雑種崩壊メカニズムの解明

研究課題名(英文)

Genetic analysis of hybrid breakdown in rice

研究代表者：

芦苺 基行 (MotoyukiASHIKARI)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：80324383

研究成果の概要(和文)：

生殖隔離は種分化において重要な役割を果たす。本研究では、日本型イネ品種コシヒカリとインド型イネ品種ハバタキの雑種後代を用いて、生殖隔離の一種である雑種崩壊について解析を行った。遺伝学的解析から、この雑種崩壊は、ハバタキ由来の hbd2 とコシヒカリ由来の hbd3 との相互作用によって引き起こされることが明らかとなった。また、連鎖解析を行ったところ、hbd2 は第 2 染色体の 100cM に、hbd3 は第 3 染色体の 60cM に座乗していた。さらに、ポジショナル・クローニングによる遺伝子単離を進めた結果、hbd2 は Casein Kinase I (CKI1) をコードすることが明らかとなった。形質転換体を用いた解析により、hbd2-CKI1 は 1 アミノ酸置換による機能獲得型変異を引き起こしていることが明らかとなった。また hbd3 については、植物において免疫反応に関わる NBS-LRR 遺伝子のクラスター領域に座乗することが明らかとなった。そこで、免疫反応のマーカー遺伝子の発現解析を行ったところ、この雑種崩壊で見られる弱勢表現型は自己免疫反応によって引き起こされていることが明らかとなった。本研究の結果は、植物における生殖隔離の分子および進化的機構に新たな知見を加えることとなった。

研究成果の概要(英文)：

Reproductive barriers are important for the maintenance of species identity. We discovered a reproductive barrier via hybrid breakdown among the progeny of a cross between the japonica rice cultivar Koshihikari and the indica rice cultivar Habataki. Genetic analysis indicated that the hybrid breakdown is regulated by the interaction of two recessive genes: hbd2 in Habataki and hbd3 in Koshihikari. Linkage mapping showed that hbd2 is located near the 100 cM region of chromosome 2 in Habataki, whereas hbd3 is located near the 60 cM region of chromosome 11 in Koshihikari. Fine mapping of hbd2 resulted in the identification of the causal gene as casein kinase I (CKI1). Further analysis revealed that hbd2-CKI1 allele gains its deleterious function that causes the weakness phenotype by a change of one amino acid. As for the other gene, hbd3 was mapped to the NBS-LRR gene cluster region. It is the most common class of R-gene that triggers the immune signal in response to pathogen attack. Expression analysis of pathogen response marker genes suggested that weakness phenotype in this hybrid breakdown can be attributed to an autoimmune response. This finding provides a new insight in understanding the molecular and evolutionary mechanisms establishing reproductive barriers in plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：イネ、生殖的隔離

1. 研究開始当初の背景

種間で雑種が形成された以降に見られる生殖隔離を接合後隔離といい、F1において致死や発育不全が生じる「雑種弱勢」や F2 以降に致死や発育不全が生じる「雑種崩壊」が代表的な接合後隔離の例である。雑種弱勢や雑種崩壊は動物、植物の両方において頻繁に見られる現象であるが、どのような遺伝子がどのような仕組みで関わっているのかなど、そのメカニズムに関する知見は乏しい。現在、接合後隔離は2つ以上の遺伝子間での相互作用によってもたらされると考えられている (Orr et al. 2000. BioEssays)。その相互作用については、重複した遺伝子の相補的な欠失 (Scannell et al. 2006. Nature)、もしくは本来相互作用するタンパク質同士の不適合 (Kondrashov et al. 2002. PNAS) の2つの仮説が存在する。しかし、実際に接合後隔離の原因となる遺伝子が単離された報告は当時、ショウジョウバエもしくはプラティという熱帯魚における4例しかなく (Wittbrodt et al. 1989. Nature, Ting et al. 1998. Science, Presgraves et al. 2003. Nature, Barbash et al. 2003. PNAS)、そのいずれもが相互作用する一方の遺伝子を単離したのみで、相互作用する別の遺伝子も単離されたという報告はなかった。よって接合後隔離における上記のいずれの仮説も、実証されておらず、また植物においては、接合後隔離を引き起こす遺伝子の単離や機能解析の報告は本課題申請時には未だなかった。

2. 研究の目的

作物の育種を行う上で、多様な遺伝資源を

交配親に用いることは品種育成の可能性を大きく広げるものである。例えば特殊な地理的環境に適応した多様な遺伝資源を利用できれば、耐ストレス性、耐乾性、耐塩性、耐病性などの従来品種が持ち得ない特性を品種育成に利用できるかもしれない。しかしながら、逆にこれらの特性を保持していることが期待される遠縁のものを交配親に用いると、その後代で花粉不稔・雑種弱勢・雑種崩壊などの種の隔離現象が現れ、品種育成の可能性を小さくするといった矛盾が生じる。現在では、分子生物学的な手法を用いた形質転換作物の育成が可能になってはいるが、食糧として直接経口摂取されること、また環境問題を考えた場合、できる限り多様な遺伝資源を利用した従来の交配・選抜育種が望ましい。種の隔離現象が明らかになれば、多様な遺伝資源を育種に利用する可能性をもたらす。そこで、本申請課題では、イネにおいて種隔離のうち特に雑種崩壊の分子レベルで解明することを研究目的としている。

3. 研究の方法

(1) 準同質遺伝子系統(NIL)の作出

日本型イネ品種コシヒカリとインド型イネ品種ハバタキを親系統として用い、BC₄F₂世代からマーカー選抜法を用いて作出した。遺伝子型決定には、AcycloPrime-FP SNP Detection System (PerkinElmer, Wellesley, MA, USA) を用いた。

(2) 候補領域の配列決定

コシヒカリゲノムの配列決定には Illumina Genome Analyzer system (Illumina, San

Diego, CA, USA)を用いた。ハバタキ候補領域の配列決定にはBACクローン、HAB027I16(hbd2)、HAB024P12、Haba40C09およびHAB046J05(hbd3)を用いた。

(3) 過剰発現体の作成

コシヒカリおよびハバタキ型CKI1のコード配列をイネActinプロモーターの下流につないだコンストラクトをNishimuraら

(Nishimura et al. 2005, PNAS)の方法を用いて、コシヒカリに導入した。

4. 研究成果

日本型イネ品種コシヒカリとインド型イネ品種ハバタキの雑種後代で、F₂以降の世代において分けつ数が少ない弱勢個体が発現することにより、雑種崩壊が発生する。この雑種崩壊について遺伝学的な解析を行ったところ、第2染色体に座乗する *hybrid breakdown2* (*hbd2*)という遺伝子がハバタキ型ホモ、第11染色体に座乗する *hbd3*という遺伝子がコシヒカリ型ホモとなった個体が弱勢表現型を示すことが明らかとなった。さらに *hbd2* および *hbd3* それぞれについて準同質遺伝子系統 (NIL) を作成することで、今回発見された雑種崩壊がこの2遺伝子のみによって生じることを証明した (Yamamoto et al. 2007, Theor. Appl. Genet.)。さらに、*hbd2* について分離集団約13,000個体を用いてポジショナルクローニングを行った結果、*hbd2* 候補領域を約18kbpに絞り込むことに成功した。この領域内には1つの遺伝子が座乗しており、その遺伝子はCasein Kinase I をコードしていた。さらに、この領域についてコシヒカリ-ハバタキ間のゲノム配列を比較したところ、Variable domain と呼ばれる領域に1アミノ酸置換が見られたため、この変異が雑種崩壊の原因であると考えられた。ハバタキ型の *Casein Kinase I* が機能喪失型の

アリルである可能性を検討するため、コシヒカリの遺伝的背景における *Casein Kinase I* のアンチセンス系統を作成した。これらの系統は *Casein Kinase I* の転写量が減少していたにも関わらず、弱勢のような異常な表現型を示さなかった。このことから、今回の弱勢表現型が *Casein Kinase I* の機能喪失によって引き起こされている可能性は低いと考えられた。次にコシヒカリの遺伝的背景にコシヒカリ型 *Casein Kinase I* およびハバタキ型 *Casein Kinase I* の過剰発現体を作成したところ、コシヒカリ型 *Casein Kinase I* の過剰発現体では表現型の異常は見られなかったものの、ハバタキ型 *Casein Kinase I* の過剰発現体は NIL-*hbd2* で見られたような弱勢表現型を示した。以上の結果から、ハバタキ型 *Casein Kinase* でみられる1アミノ酸置換が雑種崩壊の原因であると結論した。

同様に *hbd3* についても、分離集団約7,000個体を用いてポジショナル・クローニングを行った結果、候補領域は約170 kbとなった。これ以上の組換え個体が得られなかったため、この領域をカバーするハバタキのBACクローン3つについてシーケンスを行った結果、ハバタキにおける候補領域は約130 kbであり、日本晴配列との相同性はほとんど見られなかった。両候補領域について遺伝子予測プログラムによる解析を行ったところ、植物において免疫反応の誘導に関わるNBS-LRR遺伝子がクラスターを形成していることが明らかとなった。そこで、いくつかの免疫反応マーカー遺伝子について発現解析を行ったところ、弱勢表現型を示すNILおよび*hbd2*-CKI1過剰発現体では、これらの遺伝子の発現上昇が見られたことから、自己免疫反応が引き起こされていることが明らかとなった (Yamamoto et al. 2011, Mol. Genet. Genomics)。本研究結果により、植物の雑種弱勢が免疫反応に関わる遺伝子の進化に由来する可能性を示すことができた。

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)

〔雑誌論文〕(計2件)

1) Yamamoto E, Takashi T, Morinaka Y, Lin SY, Wu JZ, Matsumoto T, Kitano H, Matsuoka M, Ashikari M. Gain of deleterious function causes an autoimmune response and Bateson-Dobzhansky-Muller incompatibility in rice. *Molecular Genetics and Genomics*. 2010. 283: 305-315

2) Yamamoto, E., Takashi, T., Morinaka, Y., Lin, S., Kitano, H., Matsuoka, M. and Ashikari, M.

Interaction of two recessive genes, *hbd2* and *hbd3*, induces hybrid breakdown in rice.

Theoretical and applied genetics. 2007, 115: 187-194.

〔学会発表〕(計2件)

1) 山本英司, 高師知紀, 森中洋一, 林少揚, 吳健忠, 松本隆, 北野英己, 松岡信, 芦荻基行、イネにおける自己免疫応答と生殖的隔離、イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2010 平成22年7月12日、名古屋大学野依記念学術交流館

2) 山本英司、イネにおける接合後隔離機構、特定領域研究「植物ゲノム障壁」若手ワークショップ、平成22年7月12日、名古屋大学野依記念学術交流館

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：イネの弱性判定方法
発明者：高師知紀、林少揚、森中洋一、芦荻基行、山本英司
権利者：国立大学法人名古屋大学、本田技研工業株式会社
種類：特願
番号：2010-127255号
出願年月日：2010年6月2日
国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦荻基行 (Motoyuki ASHIKARI)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：80324383

(2) 研究分担者

なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：