

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05981

研究課題名(和文) イネ交雑育種の遺伝変異拡大に直結する減数分裂時の乗換頻度改変

研究課題名(英文) Modification of meiotic recombination frequency to enlarge genetic diversity in the cross breeding of rice

研究代表者

奥本 裕 (OKUMOTO, YUTAKA)

摂南大学・農学部・教授

研究者番号：90152438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：台中65号に導入された2つの異なるモチ突然変異アレルに関してヘテロ個体(モチヘテロ個体)に重イオンビーム照射を行い、M1個体別M2系統においてウルチ粒分離頻度が高い個体の自殖次代に分離するモチヘテロ個体の花粉分析を行った。この結果、無処理のモチヘテロ個体に対して乗換頻度が最大で5倍となる系統が見出された。また、モチヘテロ個体の減数分裂期に塩ストレス処理を施すと乗換頻度が最大で3倍程度上昇したことから、減数分裂期の穎花で発現変化する遺伝子を特定したが、in situで発現部位を調査した結果、約ではなく顕特異的に発現する遺伝子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モチ突然変異アレルに関してヘテロ個体(以後、モチヘテロ個体)に重イオンビーム照射を行い、M1個体別M2系統においてウルチ粒分離頻度が高い個体の自殖次代に分離するモチヘテロ個体の花粉分析を行った。この結果、無処理のモチヘテロ個体に対して乗換頻度が最大で5倍となる系統が見出された。この変異系統は乗換頻度の遺伝的制御機構解明の素材として有用であるとともに、イネの交雑育種において交雑後代における遺伝的多様性を大きく広げ有用遺伝子の効率的な組合せ作出に寄与できる。

研究成果の概要(英文)：Rice plants heterozygous for two different wx mutant allele (wx hetero plants) were irradiated with ion-beam and M2 wx plants with high segregation ratio of non-glutinous grains were selected. Among selfed progeny of selected M2 plants, we found a mutant line with high segregation ratio of non-waxy pollen grain derived from intragenic recombination between different wx mutant allele.

Previously, we found that segregation ratio of non-glutinous pollen grain due to intragenic recombination increased under salt-stress condition. We identified the specific genes under salt stress condition by conducting RNA-seq analysis with rice flowers at pollen meiosis stage. Following in situ analysis clarified that expression of identified genes were rice glume tissue specific and they are not expressed in anther.

研究分野：植物育種学

キーワード：イネ 減数分裂 乗換頻度 花粉分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

交雑育種は減数分裂時に対合する相同染色体の姉妹染色分体間の乗換を活用した実用的かつ極めて有効な育種法であり、交雑後代の集団には両親由来の異なる対立遺伝子の組合せが生じて多様な表現型の分離が期待できる(Huang et al., 2012; Salome et al., 2012)。減数分裂時の乗換は遺伝的多様性を創り出す精緻な生物学的プロセスであり、栽培化の過程においても交雑とそれに続く減数分裂時の乗換えが栽培イネ集団内に脱粒性、色、分げつ、粒径などの表現型の変化を付与する上で重要な役割を果たしたとされる(Huang et al., 2012)。減数分裂時乗換頻度の大幅な上昇を可能にする制御系を明らかにできれば、交雑育種効率ならびに表現型の原因となる DNA 多型の検出効率の向上が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 交雑育種効率の向上

作物における交雑育種の目的は、両親の特性に関する多様な遺伝的組合せを創出して目的に叶う遺伝子型を選び出すことにある。交雑育種は減数分裂時の姉妹染色分体間の乗換を利用する実用的かつ極めて有効な育種法であり、交雑後代の集団は両親由来の異なる対立遺伝子をもつことにより多様な表現型が分離する。減数分裂時の乗換は遺伝的多様性を創り出す精緻な生物学的プロセスであり、栽培化の過程において、交雑とそれに続く減数分裂時の乗換えは栽培イネ集団内に脱粒性、色、分げつ、粒径などの表現型の変化を付与する上で重要な役割を果たしたとされる(Huang et al., 2012)。したがって、減数分裂時の乗換頻度が高くなれば、近接する遺伝子座間でも組換える確率が高くなり、交雑後代でより多様な遺伝子の組合せの分離が期待される。さらに、交雑後代の規模を縮小しても希望する遺伝子の組合せが生じる確率を下げるリスクが軽減されるため、交雑育種の効率の向上が期待できる。

(2) 高解像度マッピングの実用化

近年の DNA 解析技術の進歩と統計的手法開発により、ゲノム中から表現型変異の原因となる染色体領域を特定する手法が大きく改良された。QTL 解析では、表現型に関する分離集団と分子マーカーを利用した遺伝子地図を利用して原因遺伝子の染色体上の位置と効果を特定することができる。また、GWAS を利用すれば、特定の交配組合せに頼ることなく作物集団内に連鎖不平衡によって保持されているハプロタイプブロックを利用して原因遺伝子と関連するハプロタイプブロックを特定することが可能になった。また、ゲノミックセレクションでは SNP の遺伝子型値を推定し、目的とする表現型に最適な遺伝子型を選び出す手法も実用化されてきている。これら表現型と遺伝子型との連関を調査する技術の基盤は分子マーカーと原因遺伝子との連鎖である。連鎖価が小さいほど特定の DNA 配列と表現型との連関をより正確に決定することができる。しかし、比較的少数(平均マーカー間距離が数 cM)の分子マーカー密度で行った QTL 解析で判明した染色体領域には多数の候補遺伝子が座乗するのが普通である。また、数万個の SNPs マーカーを利用した GWAS でも、自殖性作物の多くではハプロタイプブロックが長いいため、候補領域を絞り込めても原因遺伝子を特定するのは容易ではない。She & Jarosz (2017)は、減数分裂時の乗換頻度が、他の生物に比べて顕著に高い酵母を利用して、単位塩基対レベルでの解像度を実現して表現型変異の原因 DNA 塩基を解析した結果を報告している。報告によれば、近接する複数の塩基置換が同じ表現型の変異に関与している場合や特定の非同義置換によるアミノ酸変異がタンパク質の機能に及ぼす効果、あるいは遺伝子の転写レベルに影響する同義置換などが新たに判明した。このことから、自殖性作物において減数分裂時の乗換頻度を制御する機構を明らかにして、染色体の物理距離当たりの乗換頻度を従来の数倍にできれば、酵母の例が示すように表現型変異に寄与する DNA 配列レベルの変異を特定して遺伝子の機能解析をする効率は飛躍的に向上する。

3. 研究の方法

花粉分析法による遺伝子座内組換価の観察

減数分裂時の乗換頻度は観察できる遺伝子座間の組換頻度から間接的に調査する。一般に、組換頻度の観察には一定以上の大きさ分離集団を用いて全個体の遺伝子型調査が必要となる。多数の個体の表現型値もしくは分子マーカー間の組換価の観察には多大な労力を必要とする。本研究では個体のかわりに花粉の表現型を利用して組換頻度を観察することで効率的に組換頻度を観察し、乗換頻度に影響する要因の解析を可能にする。この花粉分析法では、アミロース合成にかかわる Wx 遺伝子内組換頻度を調査する(Inukai et al., 2000)。野生型 Wx 対立遺伝子をもつ花粉はウルチ型を示し、花粉内のデンプン(アミロース)を I2KI 溶液で染色するとヨウ素デンプン反応により青紫色を呈する。これに対して機能欠失型 wx 対立遺伝子をもつ花粉は、花粉内のデンプンがアミロースを含まないためヨウ素デンプン反応による呈色が見られない。

T65wx および 73wx1 は wx 対立遺伝子内の異なる部位に変異を有している（下図）。T65wx × 73wx1 の F1 個体に着生する穎花の花粉を観察すると、機能を回復した Wx 対立遺伝子が分離してウルチ型花粉が低頻度で認められる。したがって、ウルチ型花粉の出現頻度を調査すれば半数体レベルで組換え頻度が求められる。この時、顕微鏡視野内の復帰型花粉の数は肉眼でカウントし、視野内の全花粉数は画像解析ソフト（Image J）でカウントすることにより、1つの穎花で5,000個以上の花粉観察が可能となり通常は極めて低い頻度で観察される遺伝子座内組換え頻度の推定に必要なサンプル数を容易に確保できる。

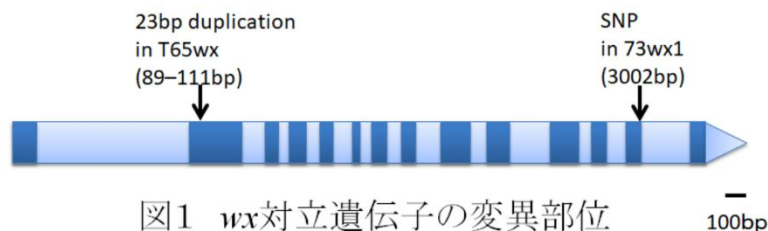


図1 wx対立遺伝子の変異部位

実験1 減数分裂時のストレス処理を利用した候補遺伝子のスクリーニング

予備実験の結果、T65wx × 73wx1 の交雑 F1 に対して減数分裂時に塩処理（250mM・NaCl 液、12時間）を行うと、塩処理区では 0.109 cM/kb（無処理区平均の 2.2 倍）まで上昇した。そこで、減数分裂時の穂に塩ストレス処理をして、ストレス条件下の葯内で特異的に発現が変化する遺伝子を RNA-seq で網羅的に調査した。ストレス条件下で特異的に発現変化した遺伝子の中から、NAC-domain をもつ 2 遺伝子を選んで in situ により発現部位を観察した。

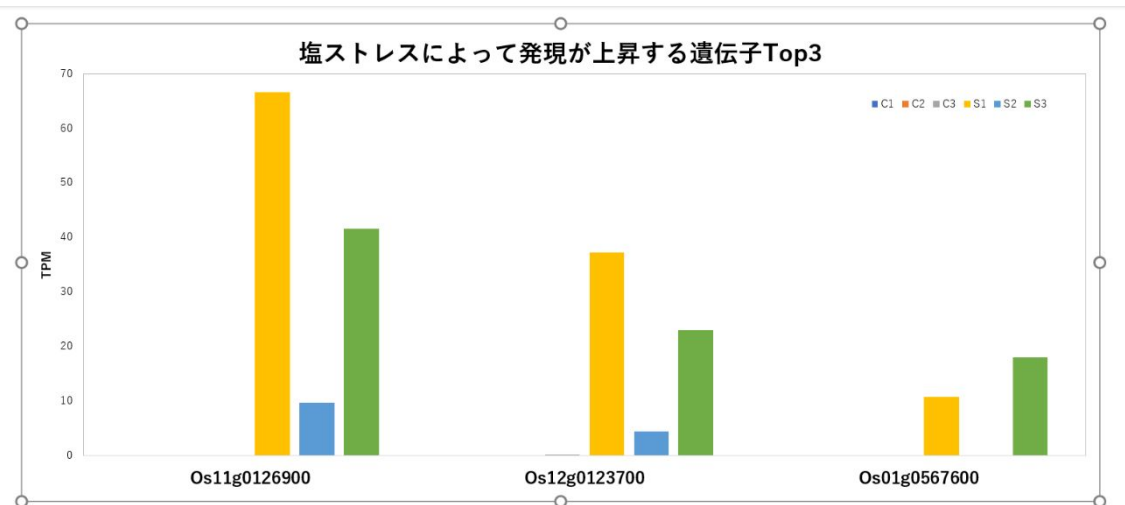
実験2 組換え頻度上昇に寄与する変異体のスクリーニング

T65wx × 73wx1 の交雑 F1 個体の着生した F2 種子（1200 粒）にプロトンのイオンビーム照射を行った。照射線量は 200Gy と 300Gy とした。M1 個体栽培時には、幼苗から 2 つの wx 対立遺伝子に関してヘテロの個体 PCR で選抜して圃場に移植した。稔実が良い M1 個体から個別別に採種して M1 個体別 M2 系統を育成した。M2 系統の全個体から各 5 穂ずつサンプリングしたものをバルクで精米し米穀を目視で観察する。遺伝子座内組換えで生じるウルチ型花粉と受粉した粒はキセニアによりウルチ性胚乳となるが、T65wx × 73wx1 の交雑 F1 個体で観察されるウルチ粒の出現頻度は 2 粒 / 800 粒程度であったことから、ウルチ粒が 5 粒以上観察される M2 個体を変異系統候補と見做して選抜した。選抜した M2 個体の自殖次代を M2 個体別 M3 系統として栽培し、再び wx 対立遺伝子に関してヘテロ個体に着生する穎花を用いて花粉分析を行った

4. 研究成果

実験1 水耕栽培した T65wx × 73wx1 の F1 個体の減数分裂期に塩ストレス処理（250mM・NaCl 液、6 時間）を行うと同時に幼穂をサンプリングした。サンプリングした幼穂の一部は、葯の顕微鏡観察を行ってサンプリング時の葯の発育ステージを確認した。サンプリングした幼穂から抽出した RNA に関しては減数分裂期特異的に発現している遺伝子をマーカーにして減数分裂期の葯のサンプルを特定し、その葯から抽出した RNA を RNAseq 解析に用いた。

RNAseq 解析の結果、塩ストレス処理で発現量が上昇した 1627 遺伝子と低下した 1116 遺伝子は 6 クラスターを形成した。発現上昇したクラスターには膜貫通型のトランスポーターや花粉関連遺伝子群が含まれていた。発現低下したクラスターには DNA 切断修復やクロマチン関連の遺伝子群が含まれていた。減数分裂期の乗換への関与が判明している 6 遺伝子に関して塩ストレス処理による発現変化を確認した結果、大部分が塩ストレス処理下で発現低下する遺伝子であった。塩ストレス処理による発現上昇が顕著であった 3 遺伝子のうち、NAC-ドメインを有する Os11g0126900 および Os12g0123700 の発現部位を in situ で確認した結果、いずれも穎花では発現していたが葯や花粉での発現は認められなかった。

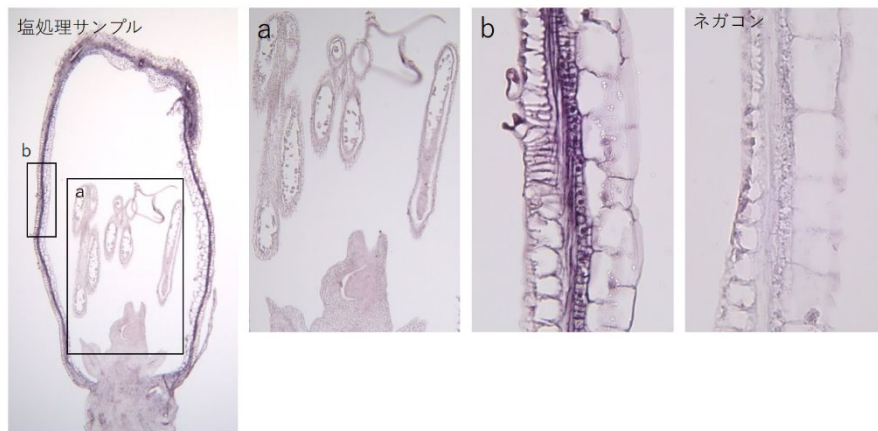


Os11g0126900: NAC-domain protein, Drought tolerance

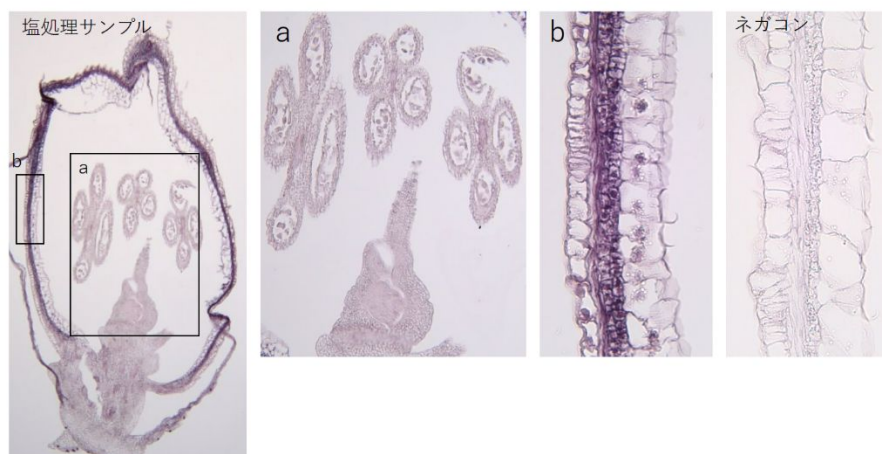
Os12g0123700: NAC domain containing transcription factor, Abiotic and biotic stress response

Os01g0567600: Similar to Monosaccharide transporter 3

Os11g0126900の発現パターン (in situ)



Os12g0123700の発現パターン (in situ)



これらの点を踏まえて、塩ストレス処理をした葯で発現する遺伝子と穎花特異的に発現する遺伝子とを識別するため、サンプリングした穎花を、葯を含まない先端部と葯を含む基部に分けてRNA解析を実施した。この結果、葯を含まない先端部では、塩ストレス処理で発現量が上昇した2283遺伝子と低下した1390遺伝子を同定した。また、葯でのみ発現量が変化したと考えられる遺伝子は上昇する1476遺伝子と低下する1085遺伝子であった

これらの点を踏まえて、塩ストレス処理をした葯で発現する遺伝子と穎花特異的に発現する遺伝子とを識別するため、サンプリングした穎花を、葯を含まない先端部と葯を含む基部に分けて RNA 解析を実施した。この結果、葯を含まない先端部では、塩ストレス処理で発現量が上昇した 2283 遺伝子と低下した 1390 遺伝子を同定した。また、葯でのみ発現量が変化したと考えられる遺伝子は上昇する 1476 遺伝子と低下する 1085 遺伝子であった。これらの遺伝子群について GO エンリッチメント解析を行ったところ、発現量が低下した遺伝子群で減数分裂期間関連遺伝子が多く観察された（下図）。

GO:BP		stats		
Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$	≤ 16
protein-DNA complex assembly	GO:0065004	4.478×10^{-11}		
meiotic cell cycle	GO:0051321	4.831×10^{-11}		
meiotic cell cycle process	GO:1903046	1.137×10^{-10}		
meiotic nuclear division	GO:0140013	6.526×10^{-8}		
meiosis II	GO:0007135	4.888×10^{-6}		
meiosis II cell cycle process	GO:0061983	4.888×10^{-6}		
male meiosis II	GO:0007142	2.324×10^{-5}		
DNA recombination	GO:0006310	5.985×10^{-4}		
male meiotic nuclear division	GO:0007140	8.032×10^{-4}		
double-strand break repair via homologous recombination	GO:0000724	1.786×10^{-2}		
recombinational repair	GO:0000725	3.440×10^{-2}		

図 葯で発現量が低下した 1085 遺伝子についての g:Profiler を用いた GO エンリッチメント解析における減数分裂過程の Padj 値

実験 2

組換え頻度に関する突然変異誘発を試みるため重イオンビーム（プロトン）を wx 座に関してヘテロ個体が分離している T65wx × 73wx1 の F2 種子に 200Gy および 300Gy の線量で約 1000 粒ずつ照射した。照射当代の個体を水田に移植後、全個体から DNA サンプルを採取して Wx 座に関してヘテロ個体を特定した。M1 個体において、200Gy に比べて 300Gy 照射区の種子稔性が著しく低下したことから、200Gy 照射区のヘテロ個体を次年度の材料とした。M1 個体において、モチ遺伝子ヘテロが確認された個体別に 400 系統を栽培した。各系統から採種した 20 個体～30 個体から 500 粒程度採種して脱穀し視認でウルチ粒の頻度を確認した。T65wx × 73wx1 の F1 個体の遺伝子内組換えで生じるウルチ粒は 0～1 粒程度であったので、4 粒 / 500 粒程度以上のウルチ粒の分離が観察された個体を組換えに関する突然変異個体とした結果、13 個体の M2 個体を変異候補として選抜できた。これら 13 個体の自殖次代に分離するモチ遺伝子座ヘテロ個体の花粉分析の結果、T65wx × 73wx1 の F1 個体に比べて 4 倍程度ウルチ花粉分離頻度が上昇しており、組換え頻度に関する突然変異である可能性がある。

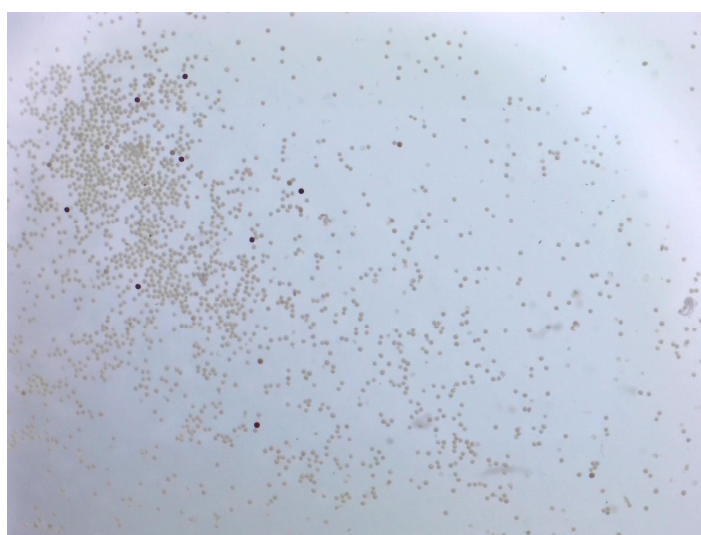


図 ヨードヨードカリで染色した花粉
1740 粒の花粉粒中青紫に着色している 9 粒が確認できる
T65wx × 73wx1 の F1 個体では 1 / 3000 粒程度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	吉川 貴徳 (YOSHIKAWA TAKANORI) (00721606)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	牛島 智一 (USHIJIMA TOMOKAZU) (50815058)	摂南大学・農学部・講師 (34428)	

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