

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 03 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21405016

研究課題名（和文）オセアニア地区におけるイネ科ならびに根栽類遺伝資源評価

研究課題名（英文） Evaluation of genetic resources belonging to rice and root crops in Oceania

研究代表者

石川 隆二（ISHIKAWA RYUJI）

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：90202978

研究成果の概要（和文）：

研究当初は、栽培イネの祖先種である *O. rufipogon* がアジアからオセアニアまで広域に分布し、オセアニア固有種の *O. meridionalis* がアジアにはみられないという種の局在が知られていた。オーストラリア固有種である *meridionalis* ならびにアジアと同じとされていた多年生種の特徴を明らかにするためには生態情報が重要になるため、現地集団の情報を GPS ならびに季節を変えた生態型の情報を収集、さらに反復採取により季節の異なる集団の動向を明らかにすることにした。アジアの対照系統との交雑をすすめ、生殖隔離の発達状況を明らかにした。遺伝的分化は分子マーカーを開発して集団遺伝学を行うとともに、全ゲノム解析を行った。その結果、アジアと異なる多年生種が一年生である *O. meridionalis* と類似の多年生とともに分化したことが明らかとなった。多年生集団は常時水のある環境において生息しており、一年生のみが乾季乾燥する領域に生息していることがわかった。Jpn1 型はアジアに見られないため、拡散した後死滅した集団であると考えられる。したがって、オーストラリアの野生イネは育種的に利用していない未知の有用遺伝資源である。

研究成果の概要（英文）：

Asian *Oryza rufipogon* is a progenitor of cultivated rice, *O. sativa*. Distribution of the wild type is known to spread from Asia to Australia. On the other hand, Australian endemic species has been known as annual *O. meridionalis*. However, in this project, we define that Asian like perennial, *meridionalis* like perennial, and conventional annual species. The former two species are distinct from not only Asian species but also Australian species. All passport data are accompanied with GPS, ecological data, and molecular data, which enable researchers to visit repeatedly. Using whole genome analysis, we have identified two unique plastid genomes. Perennial and annual populations shared both plastid genomes. However, genetically, they have been differentiated and not exchanged genetic materials with each other. Hybrid analysis revealed that Australian perennial sharing higher similarity with *O. meridionalis* for nuclear and plastid genomes could not generate higher fertility with any other species. Probably the perennial population belongs to a new species. They are regarded to be valuable resources

for rice breeding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

オーストラリアの野生種には, AA ゲノム種の *O. rufipogon* と *O. meridionalis*, CC ゲノム種の *O. officinalis*, EE ゲノム種の *O. australiensis* が生息している. このうち AA ゲノムの多様性についての詳細な多様性解析はなされていない.

研究当初は, 栽培イネの祖先種である *O. rufipogon* がアジアからオセアニアまで広域に分布し, オセアニア固有種の *O. meridionalis* がアジアにはみられないという種の局在が知られていた. そこで, オーストラリアにおける *rufipogon* 種の特徴を明らかにしてアジア野生資源の純粋な比較対照とした. また, オーストラリア固有種は生活史特性としては一年生のみであり, 多年生種はいないとされ, 現地で見られる多年生は全てアジアの *O. rufipogon* と同であるとされていた.

2. 研究の目的

本研究では, 日本ですすめるイネバイオリソームの多様性データを生かしつつ, オーストラリア・ハーバリウムとの共同調査で入手さ

れる野生イネサンプルならびに根栽類の遺伝資源の収集および評価を行うこととした. 多年生 *rufipogon* 系統はアジアに起源した集団と同じものがオーストラリアに拡散したものとされており, イネ属遺伝資源の評価のために栽培種と交雑をしていない純粋な遺伝資源としての評価を行うことを主目的とした.

3. 研究の方法

オーストラリア固有種である *meridionalis* ならびにアジアと同じとされていた多年生種のサンプリングを行った. 生態情報が重要になるため, 現地集団の情報を GPS ならびに季節を変えた生態型の情報を収集, さらに反復採取により季節の異なる集団の動向を明らかにすることにした. 形態情報は電子顕微鏡により, 籾表面の微細構造を主に調査, 生活史特性としての多年生習性は現地調査ならびに茎からの再生実験を行った. 核ゲノムデータを解析するために, SSR マーカーによる集団構造解析をすすめた. 細胞質は, 特定

系統の要録体全ゲノムを調査し、広範な集団解析にはマーカーを開発して利用した。集団の種としての位置づけを明らかにするために、アジアの対照系統との交雑をすすめて、生殖隔離の発達状況を明らかにした。遺伝的分化は上記集団遺伝学を行うとともに、全ゲノム解析を行うこととして、データ解析では、ニューヨーク大学のマイケルブルガナン教授との打ち合わせにより、ゲノム情報の解析をすすめた。

4. 研究成果

近年、我々の研究室を中心とした海外学術調査隊の結果から多年生とされる *O. rufipogon* にはアジア型 *rufipogon* と *meridionalis* 型 (r 型, m 型) の遺伝的に異なる 2 タイプが存在し、クイーンズランド州ハーバリウム、サザンクロス大学、ならびにクイーンズランド大学との共同研究により、それらの葉緑体に *meridionalis* と異なるタイプを見出した (Water et al. 2012)。

多年生イネの葉緑体を他の集団と詳細に比較するために、クイーンズランド州マリバにおける P26, 川でつながっている P26PL ならびに近傍の P27 サイトからサンプルを採取し、葉緑体多様性と遺伝的分化について調査した。P26PL は m 型多年生集団, P27 は *O. meridionalis* である。また、オーストラリアにおける AA ゲノム種の葉緑体多型の全体像をみるための対照として、これまで多年生のうち、アジア型核—*meridionalis* 型葉緑体の Jpn1, *meridionalis* 型核—*meridionalis* 型葉緑体の Jpn2 ならびに Jpn3 を供試した。葉緑体の rpoC2 内部の SNP は、CAPS により検定した。この CAPS は日本晴, アジア型野生種, ならびに *meridionalis* が共通であり、オーストラリアの多年生 (P26 集団の 1 個体) から抽出した DNA においてのみ SNP が認められ

た。

葉緑体の多様性では、いずれの集団においても 2 種類の葉緑体を保有しており、同一細胞質起源を有することが明らかとなった。核の情報としては 10 座の SSR 遺伝子型から集団間におけるヘテロ型頻度 (Ho) ならびに多様性程度 (He) について調査した。これまでの報告で知られているように多年生集団が他殖をしやすい傾向にあり、かつ多様性に富む結果であった。一年生ならびに *meridionalis* 型の多年生はいずれも他殖をしないことが明らかであった。しかし、一年生種は多様性が高いことから、自殖をしながらも多様性を維持していること、大きな集団もしくは複数の集団なら一年生においても高い多様性を得られることがわかった。この結果は遺伝資源収集の効率化に役立つ共に、生態型の進化の様相について重要な知見となった。

集団間の遺伝子流動をみるため 10 座の SSR 多型調査を行った。その結果、一年生と多年生間では遺伝的に離れており遺伝子流動は認められなかった。このように古い葉緑体ゲノムを共有する別種の多年生と一年生が認められたことから、これらは新規遺伝資源として有用であることがわかった。

アジア型多年生, *meridionalis* 類似多年生, ならびに一年生 *meridionalis* の形態的, 分子的な観点から評価をするために種子形態, 芒の鋸歯密度を形態形質として調査し, 97 座の SSR マーカーを用いて遺伝的距離を算出した, 芒の鋸歯について単位面積あたり (200 μ m 四方, 0.04mm²) 鋸歯密度に違いが見られた。アジア型は密度が低い傾向があり, オーストラリア固有種では鋸歯密度が高い傾向があった。アジア型の多年生系統はアジア種と同じ低密度, *meridionalis* 型多年生は鋸歯密度が高い *O. meridionalis* 型に属した。

97 座 SSR マーカー遺伝子型による遺伝的距離からは、供試系統は 3 つのクレード、*O. rufipogon*, *O. meridionalis* そして *O. rufipogon*-*O. meridionalis* 間に位置する Jpn 1 クレードとなった。これは後で記述する WGS においても同様な結果が得られた。交雑稔性は、アジア型多年生 Jpn1 がアジア種とのみ高い稔性を示した。*Meridionalis* 型の多年生は、アジアの野生種ともオーストラリアの野生種である *meridionalis* とも低稔性を示したことから生物種として独立していることが明らかとなった。

以上の結果から、*meridionalis* 型の祖先系統がオーストラリア大陸に拡散した後に一年生・多年生に分化し、後に r 型多年生系統がオーストラリアに二次的に拡散した。そして、それぞれが独立して生息することがわかった。Jpn1 型はアジアに見られないため、拡散した後に死滅した集団であると考えられる。

以上の結果から、本研究は新たな種を同定するとともに、*Oryza* 属の進化を明らかにするために重要な知見を得た。また、これらの新規遺伝資源は栽培種に有用な遺伝子を供給するために交雑後代を利用することができる。

研究者交流と若手研究者の育成については、2010 年度に Henry 教授が日本に来日し入念な打ち合わせを行った。大学院生、学部学生も調査ならびに研究に参加して十分な成果をあげている。相互の研究者同士も連絡を密にして、共同論文作成に参加した。よって、十分な成果を得ている。

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 8 件)

- ①Waters, D. L. E., C.J. Nock, R. Ishikawa, N. Rice, and R.J. Henry (2011) Chloroplast genome sequence confirms distinctness of Australian and Asian wild rice. *Ecology and Evolution* 2:211-217.
- ②Henry, R.J., N. Rice, D. L. E. Waters, S. Kasem, R. Ishikawa, Y. Hao, S. Dillon, D. Crayn, R. Wing and D. Vaughan. Australian *Oryza*: Utility and Conservation. *Rice*. (2010) Volume 3, Number 4, Pages 235-241
- ③Takahashi, H., T. Sato, Y-I. Sato, I. Nakamura. 2009. Genome-type-specific variation of the 19th intron sequence within the RNA polymerase I largest subunit gene in the genus *Oryza*. *Plant Syst. Evol.* **282**: 21-29.
- ④Yamauchi, T., Y. Jozuka-Hisamori, S. Fukuda-Tanaka, R. Terada, I. Nakamura and S. Iida. 2009. Homologous recombination-mediated knock-in targeting of the *MET1a* gene for a maintenance DNA methyltransferase reproducibly reveals dosage-dependent spatiotemporal gene expression in rice. *Plant J.* **60**: 386-396.
- ⑤ Hasthanasombut, S., V. Ntui, K. Supaibulwatana, M. Mii and I. Nakamura 2010. Expression of Indica rice *OsBADHI* gene under salinity stress in transgenic tobacco. *Plant Biotech. Rep.* **4**: 75-83.
- ⑥Hasthanasombut, S., K. Supaibulwatana, M. Mii and I. Nakamura 2010. Genetic

manipulation of Japonica rice using the *OsBADHI* gene from Indica rice to improve salinity tolerance. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 104: 79-89.

⑦ Hosoya, L.A. The ‘Routine-scape’ of Broad Spectrum Farming Society, 1st International Landscape Archaeology Conference LAC2010 (Leiden, Holland), 2010

⑧ Hosoya, L.A. Broad Spectrum Farming Society: Reconstruction of uses of wild food plants by East Asian early farmers from an ethnoarchaeological viewpoint, Cambridge University George Pitt-Rivers Laboratory Lunch Time Talk (Cambridge, England), 2009

⑨ Hosoya, L.A. What did Agriculture Bring to the Life?: The ‘routine-scape’ and social structurarisation in the formation of agricultural society, Centre of Excellence in Cultural Theory II Conference (Tarin, Estonia), 2009

[学会発表] (計 17 件)

① 大塚健太・小林雄・外和昌大・田中克典, 吉田健太郎, 夏目俊, 小杉俊一, 寺内良平・一谷勝之・中村郁郎・佐藤洋一郎・佐藤雅志・石川隆二 形態, SSR, ならびに WGS によるオーストラリアの野生イネ系統分化程度の評価. 第 121 回日本育種学会 (宇都宮大学), 2012.

② 外和昌大・小林雄・田中克典・一谷勝之・中村郁郎・佐藤洋一郎・佐藤雅志・石川隆二

オーストラリアの多年生野生イネ葉緑体多型評価と自然集団の多様性. 第 121 回日本育種学会 (宇都宮大学), 2012.

③ 小林 雄・田中克典・一谷勝之・中村郁郎・佐藤洋一郎・佐藤雅志・石川隆二: オーストラリアにおける多年生イネの集団構造. 第 119 回日本育種学会 (横浜市立大学), 2011.

④ 石川隆二・田中克典・一谷勝之・中村郁郎・佐藤洋一郎・佐藤雅志: オーストラリアにおけるイネ属種間雑種 日本遺伝学会第 83 回大会(京都), 2011.

⑤ Ishikawa, R.: Evaluation of wild rice resources in Asia and Oceania by “de novo” collection -migration of wild rice before domestication. 「東アジア植物遺伝資源シンポジウム」(岡山大学), 2011.

⑥ Kobayashi, Y. and R. Ishikawa: Evolutionary relation between Asian and Oceanian wild rices. 日本学術振興会 アジア研究教育拠点事業 「東アジア植物遺伝資源シンポジウム」(岡山大学), 2011.

⑦ Ishikawa, R. Evaluation and Utilization of Core collection and “de novo” collection. International Symposium on Wild Rice 2009. (Bangkok, Thailand), 2009.

⑧ 石川隆二・本多剛志・ハオ イン・田中克典・一谷勝之・中村郁郎・佐藤雅志・佐藤洋二. *Oryza* 属におけるオセアニア型とアジア型 *rufipogon* の系統分化 第 117 回日本育種学会. (京都大学) 2010

⑨ ハオ イン・小林雄・一谷勝之・田中克典・

中村郁郎・佐藤雅志・佐藤洋一郎・石川隆二.
アジアならびにオセアニア地区における *O.
rufipogon* の遺伝的分化. 第118回日本育種学
会 (秋田県立大学), 2010

⑩中村郁郎・高橋弘子・加藤さやか・田中
克典・佐藤洋一郎 2010. 日本型イネの核ゲ
ノムに記録された葉緑体 DNA の進化. 育研
12 別 1: 95.

⑪ハオ イン・石井尊生・石川隆二 (弘大農
生, 神大院農) 野生イネ AA ゲノム種におけ
る細胞質多様性程度の比較 日本育種学会
第116回講演会. 2009年9月25日. 北海道
大学.

⑫ Ishikawa, R. Utilization of Core
collection as Japanese National
bio-resources and complement with "de
novo" collection. IRRI, International Rice
Genetics Symposium. (Manila, Philipines),
2009

⑬Makabe, S., H. Takahashi, M. Akimoto,
H. Urairong, R. Ishikawa, T. Sato, Y-I.
Sato and I. Nakamura 2009. BKK strain:
natural triploid wild rice found in
Bangkok, Thailand, Wild Rice 2009.

⑭ Takahashi, H., Y-I. Sato and I.
Nakamura 2009. Evolutionary analysis of
two plastid DNA sequences in *Oryza* AA
genome species. Wild Rice 2009.

⑮Sjahril, R., M. Riadi, M. D. Rahim, H.
Takahashi, T. Sato and I. Nakamura 2009.
Oryza officinalis accessions found in
South Sulawesi of Indonesia. Wild Rice

2009.

⑯Nakamura, I., H. Takahashi, S. Kato, K.
Tanaka and Y-I. Sato 2009. Nuclear copies
of plastid DNA in the japonica rice
genome record dynamic speciation of
Asian AA genome species. Wild Rice 2009.

⑰真壁壮・高橋弘子・中村郁郎 2009. イネ
属 AA ゲノム種における *PolAI* 遺伝子の分子
進化. 育研 11 別 1: 72.

[図書] (計 2 件)

①Hosoya, L.A., Y.-I. Sato & D. Fuller
(eds.) *The Archaeobotany of Early Rice
Agriculture in Asia, Archaeological and
Anthropological Sciences Vol. 2 No. 2*, 2010

②細谷 葵 (分担執筆) 『ユーラシア農耕史
4 さまざまな栽培植物と農耕文化』(臨川
書店) 第3章「焼畑の生業サイクルと根栽類
の貯蔵システムーパプアニューギニアの事
例にみる「農耕社会」の多様性ー」,
pp.185-228, 2009

[その他]
ホームページ等
<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/1/plantbrd/genetics.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 隆二 (Ryuji Ishikawa)
弘前大学・農学生命科学部・教授
研究者番号: 90202978

(2) 研究分担者

佐藤 洋一郎 (Yo-Ichiro Sato)
総合地球環境学研究所・研究部・教授
研究者番号: 20145113

佐藤 雅志 (Tadashi Sato)
東北大学大学院・生命科学研究所・准教

研究者番号：40134043

中村 郁郎 (Ikuo Nakamura)
千葉大学大学院・園芸学研究科・准教授
研究者番号：50207867

一谷 勝之 (Katsuyuki Ichitani)
鹿児島大学・農学部・准教授
農学部・准教授
研究者番号：10305162

田中 克典 (Katsunori Tanaka)
弘前大学・人文学部・特任助教
研究者番号：450213

Peter Matthews
国立歴史民俗博物館・准教授
研究者番号：70281590

細谷 葵 (Aoi Hosoya)
総合地球環境学研究所・研究部・プロジェクト研究員
研究者番号：6430391324