

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25年 5月16日現在

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22380001
 研究課題名（和文）イネ属ゲノムに取り込まれたウイルス配列の機能探索
 ～イネツングロ病に着目して～
 研究課題名（英文）Functional analysis on endogenous pararetrovirus in rice genome
 -relationship with rice tungro disease-
 研究代表者
 貴島 祐治（KISHIMA YUJI）
 北海道大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号：60192556

研究成果の概要（和文）：イネゲノムに見いだされる内在性 RTBV ウイルス配列（ERTBV 配列）を日本型日本晴系統やインド型 93-11 系統で特定し、それらの挿入機構やツングロ病との耐性機構について解析した。ERTBV はゲノムの中の AT が連続している領域に挿入する傾向が高く、AT 連続配列は外来から DNA 断片を取り込む可能性が強く示唆された。また、アフリカイネ系統の WK18 と日本型台中 65 の交雑後代で、イネ染色体 5 番に RTBV 抵抗性を示す遺伝子領域 qTDR5 を見いだした。qTDR5 の中には ERTBV が 1 箇所含まれている。

研究成果の概要（英文）：We have addressed two questions as to endogenous RTBV; the insertion mechanism of ERTBV into rice genome and the relationship between ERTBV and RTBV resistance. ERTBVs are preferentially present in AT-rich repeats in rice genome, and we described that AT-rich repeats have integrated chromosomal and episomal DNAs, which would have been suspended in the nucleus. We also identified a tolerance allele against RTBV, qTDR5, located on chromosome 5 by the genetic analyses using the progenies between an African rice strain *Oryza glaberrima* WK18 and a japonica rice strain Taichung 65. The region in qTDR5 contains an ERTBV sequence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：植物育種学

科研費の分科・細目：生産環境農学・遺伝育種科学

キーワード：イネ、ゲノム科学、耐病性

1. 研究開始当初の背景

東南アジア一帯で猛威を振るうイネツングロ病は Rice Tungro Bacilliform Virus (RTBV) を病原とする。イネ（ジャポニカやインディカ）および近縁種のゲノム中には、この RTBV に相同性を有する断片 (ERTBV) が複数存在する。興味を引く点は、ERTBV

のコピー数とツングロ病罹病性の間に負の相関が見いだされたことである。ERTBV のコピー数の少ないイネ近縁種ではツングロ病に対して著しい罹病性を呈する。

RTBV はヨコバエを介してイネに感染し病害を生じる 2 本鎖 DNA ウイルスである。RTBV は東南アジアでイネに対して猛威を

振るい、当地のイネ栽培に深刻な打撃を与えている。当研究グループは以前 RTBV と相同性を有する断片 ERTBV をイネのモチ遺伝子座近傍で見出した。ハイブリダイゼーション実験から ERTBV はアジアに分布するイネ植物種を中心に検出され、アフリカや南米種のイネ属植物では検出されなかった。ERTBV を殆ど保持しないイネ近縁種は、RTBV の媒介昆虫が存在しないアフリカや南米原産のものである。既報によると、アジア稲では RTBV の感染により成長が抑えられ、葉が退色し、褐変化するが、枯死することはない。しかし、アフリカ稲では RTBV の感染により 4 週間 で全身に壊死が起こる。RTBV に対する抵抗性の程度は、ERTBV 断片のコピー数に応じて上がるため、ツングロ病を発症させる RTBV と内在するウイルス断片の間に相互作用があると考えられる。

2. 研究の目的

当研究グループは、ERTBV がどのようにイネゲノムに挿入して広がってきたのか、またツングロ病とどのような関連性があるのかを本研究の目的として、以下に示す 2 つの課題を設定した。

(1) 「ERTBV のイネゲノムへの挿入機構」

DNA ウイルス断片のゲノムへの挿入が見いだされた植物種の中で、イネはゲノム全域の配列が公開されており、染色体上の数多くの ERTBV 断片の構造を詳細に解析できる。

(2) 「ERTBV のツングロ病抵抗性機構との関連性」

ERTBV が RTBV に感染した宿主に対して適応的に機能するか否かを調べる必要がある。本研究では、現存するウイルス、RTBV に対して抵抗性の異なるジャポニカとグラベリマの種間雑種の分離後代を用いて解析する。

3. 研究の方法

(1) 「ERTBV のイネゲノムへの挿入機構」に関する解析

(a) ERTBV 各断片の配列を比較し、ERTBV の挿入がイネの種分化過程のどの時期に起こったのかを予測する。(b) 殆どの ERTBV 配列の両端には TATA の simple sequence repeat が配置されており、本研究ではこの TATA 配列が ERTBV の挿入の際、ゲノムのターゲット配列になった可能性を検証する。(c) インフルエンザウイルスなどに見られるように ERTBV が組換えによって進化してきたとすると、ERTBV 配列内の部位ごとの組換えの有無を調べることで、イネゲノムの挿入に関与した領域や取り込まれやすいウイルスタイプの特定につながる。(d) ERTBV がゲノムに固定された点を活かして、保存性の

高い部位と低い部位についてウイルスとして存在していた過去の機能的な重みづけをおこなう。

(2) 「ERTBV のツングロ病抵抗性機構との関連性」に関する解析

(a) ジャポニカである日本晴のゲノムには約 70 余りの ERTBV 断片が座乗するが、グラベリマのゲノムにはない。2 種間の雑種分離後代を RTBV に感染させ、ツングロ病の抵抗性程度を検定する。(b) ERTBV 断片 (日本晴にのみ由来する) を DNA マーカーとして抵抗性の遺伝的な評価をおこなう。(c) 機能解析の一つの手段として、各 ERTBV 断片特異的な検出が可能なマイクロアレイやマイクロアレイを取り入れ、発現レベルと ERTBV マップを対応させる。(d) ジャポニカとグラベリマの種間雑種においてツングロ病の病徴から ERTBV 断片の影響力を評価する。(e) メチル化した ERTBV 断片が感染した RTBV に対して相互作用をするのか否かも併せて解析する。

最終的には ERTBV 断片のイネゲノムにおける適応的な役割の有無が明らかになるとともに、ツングロ病の抵抗性程度を左右するメカニズムへの基礎的知見を得ることが期待できる。

4. 研究成果

(1) 「ERTBV のイネゲノムへの挿入機構」

本課題についてはイネゲノム (*O. sativa* 日本晴) の ERTBV 配列を 88 箇所 で特定し、これらの中でジャポニカおよびインディカ系統で共通に検出された ERTBV 断片について、由来のはっきりしている世界の栽培イネ 65 系統とルフィポーゴン (野生イネ) 25 系統を用いて、ERTBV 各断片の存否を明らかにし、イネ系統の分布と ERTBV 断片を対応させた。その結果、ERTBV は 4 つに大きく分かれ、明確に異なるウイルス系統樹を持つことを示した。各 ERTBV 断片の系統関係とイネの由来から ERTBV の起源は、中国南部のイネ系統から由来した可能性が高く、一部インディカでは東南アジアからの野生イネと強く関連した。また、最も古い ERTBV のタイプはアフリカ起源の *Oryza* 種から見いだされたものと似通っていたことから、このタイプはアフリカ起源であると予想できた。イネゲノム (*O. sativa* 日本晴) の ERTBV 配列を特徴化し、ゲノムへの存在様式を調べる過程で、ERTBV はゲノムの中の AT が連続している領域に挿入する傾向が高いことを突き止めた。ERTBV が存在している AT 連続配列をより詳細に調べた結果、AT 連続配列は ERTBV の他にも様々な配列を取り込んでいることが判明し、その中にはイネゲノ

ムに存在しない配列も含んでいたことから、AT 連続配列は外来から由来した核に浮遊する DNA 断片を無作為に取り込む性質を持つ可能性が強く示唆された (図 1)。この結果は原著論文として *The Plant Journal* 誌に掲載された。

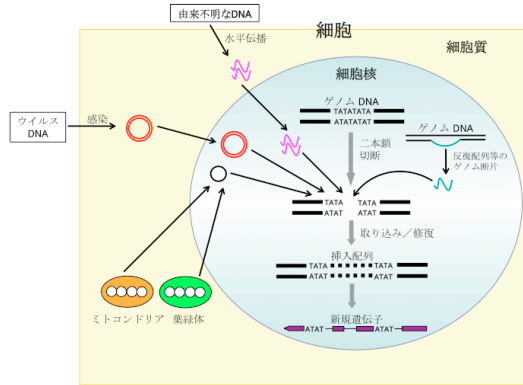


図 1 植物ゲノムの AT 繰り返し配列を利用した種々の DNA 断片の取り込み機構

(2) 「ERTBV のツングロ病抵抗性機構との関連性」

台中 65 系統で調査するために必要なマーカーをジャポニカ日本晴ゲノムで特定した ERTBV の 88 サイトを参考に作成した。九州大学と共同でアフリカ稲 (*O. glaberrima*) WK18 系統と台中 65 系統の間で 3 回戻し交配自殖系統 BC₃F₂ 集団を作成し、これらの系統をフィリピン国際イネ研究所 (IRRI) Choi 博士のもとで RTBV 感染実験に使った。BC₃F₂ 集団への RTBV 感染実験の結果、染色体 5 番に WK18 系統の断片では感受性で台中 65 の断片では抵抗性を示す領域が見いだされ、この染色体領域を qTDR5 と名付けた。この中には ERTBV が 1 つ存在していた。さらに qTDR5 のヘテロ接合体を自殖させ、qTDR5 が WK18 型と台中 65 型に分離した後代集団に再び RTBV を感染させると、抵抗性と感受性が qTDR5 の台中 65 型 WK18 型との違いで分かれることを確認した (図 2、図 3)。したがって、台中 65 系統の持つツングロ病 (RTBV) に対する抵抗性の遺伝因子は、qTDR5 に起因することを明らかにした。

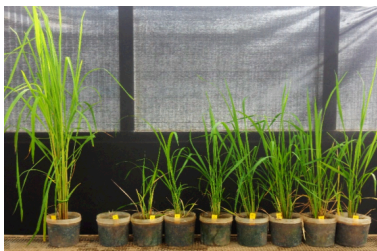


図 2 台中 65 型 qTDR5 によって生じた RTBV 耐病性



図 3 W18 型 qTDR5 によって生じた RTBV 耐病性

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)

① 石黒聖也, 佐藤裕, 貴島祐治: イネゲノムの反復配列に基づく低温鈍感力の解析. *日本草学会誌* 59: 60-63, 2013. 査読無

② 小柳香奈子, 劉瑞芳, 陳孫祿, 水野美登利, 貴島祐治: イネのゲノム中の AT 反復配列は種々の DNA を取り込む進化の原動力. *日本草学会誌* 59: 55-59, 2013. 査読無

③ T. Uchiyama, S. Hiura, I. Ebinuma, M. Senda, T. Mikami, C. Martin and Y. Kishima. A pair of transposons coordinately suppresses gene expression, independent of pathways mediated by siRNA in *Antirrhinum*. *New Phytologist* 197: 431-440, 2013. 査読有

④ R. Liu, K.O. Koyanagi, S. Chen and Y. Kishima. Evolutionary force of AT-rich repeats to trap genomic and episomal DNAs in the rice genome: lessons from endogenous pararetrovirus. *The Plant Journal* 72: 817-828, 2012. 査読有

⑤ S. Kato, K. Kitazaki, A. Wakatsuki, Y. Kishima and T. Mikami. An apple *atp9* pseudogene is maintained at high copy number in 'Golden Delicious' -type mitochondria but is present substoichiometrically in 'Delicious' -type mitochondria. *Scientia Horticulturae* 134: 237-240, 2012. 査読有

⑥ A. Wakatsuki, K. Kitazaki, S. Kato, Y. Kishima and T. Mikami. An intact mitochondrial *cox1* gene and a pseudogene with different genomic configurations are present in apple cultivars 'Golden Delicious' and 'Delicious': Evolutionary

aspects. *Scientia Horticulturae* 130: 49-53, 2011. 査読有

⑦ K. Fujino, SN. Hashida, T. Ogawa, T. Natsume, T. Uchiyama, T. Mikami and Y. Kishima. Temperature controls nuclear import of *Tam3* transposase in *Antirrhinum*. *The Plant Journal* 65: 146-155, 2011. 査読有

⑧ 貴島祐治、堀田夕夏、石黒聖也、山村和照、塙章、内藤聡、佐野芳雄 トランスポゾン を指標にしたコシヒカリ品種内の遺伝的差異 育種学研究 12: 81-86, 2010. 査読有

[学会発表] (計9件)

① 貴島祐治 ゲノムにウイルス断片を持つイネ系統のウイルス抵抗性 日本育種学会 2012 年秋季大会ワークショップ 京都産業大学 (2012.9.14)

② Yuya Ota, Kei Ogasawara and Yuji Kishima The comparative analyses on the seed performances in the rice hybrids with different combinations. XVth Meeting of the EUCARPIA Sction –Biometrics in Plant Breeding- Stuttgart-Hohenheim Germany (2012. 9. 5-7)

③ Seiya Ishiguro, Kei Ogasawara, Yutaka Sato and Yuji Kishima Evaluation of Genome-wide expression against the coolstress at the rice booting stage. XVth Meeting of the EUCARPIA Sction –Biometrics in Plant Breeding- Stuttgart-Hohenheim Germany (2012. 9. 5-7)

④ 貴島祐治 イネゲノムの反復配列に基づく低温鈍感力の解析 日本草地学会北海道大会 企画シンポジウム2 酪農学園大学 北海道江別市 (2012. 9. 5-7)

⑤ 貴島祐治、石黒聖也、太田雄也、佐藤裕イネゲノム反復配列の発現パターンから見た雄性生殖器官の特徴化 第83回日本遺伝学会シンポジウム 京都大学農学部 京都市 (2011. 9. 20)

⑥ Seiya Ishiguro, Yutaka Sato and Yuji Kishima Transcriptions of repeat sequences at boot stage in rice anther and its expression changes induced by low-temperature. 9th International Plant Cold Hardiness Seminar, Abbey of Neumunster, Luxembourg, (2011. 7. 17-22)

⑦ Kaien Fujino, Takashi Ogawa, Tomoko Natsume and Yuji Kishima Temperature-dependent nuclear import of *Tam3* transposase in *Antirrhinum*. 9th International Plant Cold Hardiness Seminar, Abbey of Neumunster, Luxembourg, Luxembourg (2011. 7. 17-22)

⑧ Yuji Kishima Genomic properties of endogenous rice tungro bacilliform virus sequences in the rice genomes. IRRISpecial Seminer, International Rice Research Institute, Philippines, (2011. 3. 1)

⑨ Ruifang Liu, Kanako O. Koyanagi and Yuji Kishima The structural properties of endogenous rice tungro bacilliform virus sequences in the rice genome. 3rd International Rice Congress, National Convention Center, Hanoi, Vietnam (2010. 11. 8-12)

[図書] (計2件)

貴島祐治 第2章 1. 遺伝子と形質発現 4. 生殖様式と近交弱性 「植物育種学第4版」吉村淳、西尾剛編 文永堂出版 2012 33ページ

貴島祐治 第5章トランスポゾンタギング 「植物の分子育種学」鈴木正彦編 講談社 2011 7ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/rfoa/abs/abs1-2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

貴島 祐治 (KISHIMA YUJI)

研究者番号 : 60192556

北海道大学・大学院農学研究院・教授

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

小柳 香奈子 (KOYANAGI O. KANAKO)

研究者番号 : 20362840

北海道大学・大学院情報科学研究科・准教授

安井 秀 (YASUI HIDESHI)

研究者番号 : 70220142

九州大学・大学院農学研究院・准教授