

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450012

研究課題名(和文)花粉キラーを制御する分子ネットワークの解明

研究課題名(英文)Studies on molecular network underlying pollen killer system

研究代表者

久保 貴彦(Kubo, Takahiko)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00370148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：雑種不稔の要因である花粉キラーの分子機構はほとんど知られていない。栽培イネ *indica* と *japonica* の交雑では、花粉キラー S24 と相互作用因子 EFS が同定されている。本研究では、分子機構の解明を目的として、それらの遺伝子単離を進めた。結果として、EFS は 35-kb の領域に特定された。EFS の候補 ORF を含むゲノム領域をクローニングし、花粉不稔個体に導入したが、明確な相補的效果は認められなかった。一方、S24 の遺伝的解剖を進めた結果、S24 近傍に新規遺伝子 INK を同定し、INK は S24 には影響を与えないが、別の花粉キラー S35 を活性化して花粉不稔を誘発することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms underlying pollen killer system remain largely unknown. A pollen killer gene, S24, and its partner gene EFS have been found in an inter-subspecific cross of *Oryza sativa* ssp. *indica* and *japonica*. To understand molecular mechanism of the pollen killer system by S24-EFS genes, genetic dissection and molecular cloning of these genes were conducted. The location of the EFS locus was narrowed down within 35-kb region. Transformation of the genomic DNA fragment carrying the primary candidate ORF was performed, but there was no significant effect on pollen sterility due to S24. The S24 regions were further characterized and genetically dissected. As a result, a novel gene (INK) close to the S24 locus was identified. Our results showed that INK causes the pollen sterility by interacting with another pollen killer S35 but is independent of both the EFS and S24 genes.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：花粉キラー 雑種不稔 イネ 遺伝子単離

## 1. 研究開始当初の背景

植物では、数多くの配偶子キラー遺伝子(*S*遺伝子)が染色体上に同定されてきたが、その多くは遺伝学的解析にとどまっている。近年報告されたイネの *S5* 遺伝子 (Chen *et al.* 2008)、*Sa* 遺伝子(Long *et al.* 2008)の単離同定は、植物では最初の報告であったが、生理的原因については今後の課題となっている。配偶子キラーは、Rick (1966)の遺伝モデル「1遺伝子座におけるアレル間相互作用」で説明され、多くの研究者がこれを支持してきた。これに対し、研究代表者らは新しい遺伝モデル「Epistasis-based Allelic interaction (EBA)」を発表した(Kubo *et al.* 2011)。EBA モデルでは、1遺伝子座単独ではなく、接合体因子との相互作用によって *S* 遺伝子の活性が誘発される、つまりエピスタシスとアレル間の複合的な相互作用によることを示した。*S* 遺伝子が遺伝的背景の影響を受けることは過去に一部の報告で示唆されていたが (Loegering and Sears 1963、Sano *et al.* 1994)、その実体は捉えられていない。既報の遺伝子についても相互作用因子が未同定である可能性は極めて高く、そうした場合、発生メカニズムの全容説明は難しいと考えられる。このように配偶子キラーの遺伝子ネットワークを捉え、個々の遺伝子とそれらの分子的关系を解析した研究は植物では例がない。研究代表者らは、栽培イネ垂種間交雑 (*Oryza sativa* ssp. *japonica* × *indica*) において花粉キラー *S24* を同定し (Kubo *et al.* 2000, 2008, 2011) 次の事を明らかにしている。1) *S24* ヘテロ接合体で *S24-j* (*japonica*) 型花粉の致死を誘導し、自殖後代で分離の歪みをもたらす。ヘテロ接合体特異的作用であり、両ホモ接合では形態的異常は示さない。2) *S24* は、接合体因子 *efs-j* ホモ型(*japonica* ホモ型) においてのみ花粉不稔を引き起こす。優性アレル *Efs-i* (*indica*) は花粉不稔を回復させる。3) *EFS* は、染色体 2 長腕の 817 kb の領域に位置付けた。4) 別の花粉キラー *S35* を同定しており、遺伝解析の結果から、遺伝的パスウェイ *efs* → *S24* → *S35* を仮定している。これら花粉キラーと相互作用因子の原因分子と、その分子メカニズムについては明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

植物の配偶子キラーに関する分子的知見は非常に少ない。上述のとおり、これまでに栽培イネ垂種間交雑 (*Oryza sativa* ssp. *japonica* × *indica*) において花粉キラー *S24* 座を同定し、これが接合体因子 *efs-j* との相互作用によって、花粉不稔を引き起こすことを見いだしている。本研究では、相互作用するこれら 2 つの遺伝子 *S24* と *EFS* の単離同定を同時に進め、その分子機序に迫ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) *EFS* 遺伝子の高密度連鎖解析

*S24* の相互作用因子 *EFS* のポジショナルクローニングを進めるために、日本晴 × 93-11 に日本晴を戻し交雑した近似同質遺伝子系統 NIL の自殖後代を育成し、*EFS* 周辺の組換え体スクリーニングに供試した。

### (2) *EFS* 遺伝子の相補性検定

*EFS* の候補遺伝子を含むゲノム断片 (*indica* 品種 93-11 由来) をバイナリーベクター pPZP2H-lac にクローニングし、アグロバクテリウム法により、*S24* ヘテロ型 (*S24-i/S24-j*) の花粉不稔個体への形質転換を行い、花粉稔性の評価により相補性の有無を確認した。

### (3) *S24* 遺伝子の相補性検定

*S24* 遺伝子の候補原因遺伝子 ANK3 を含む 93-11 ゲノム DNA 断片をクローニングし、これを日本晴に導入して、形質転換体の花粉稔性を調査した。

## 4. 研究成果

### (1) *EFS* のファインマッピング

これまでに、花粉キラー遺伝子 *S24* の相互作用因子 *EFS* は、染色体 2 長腕の 817 kb の領域に位置付けられている。遺伝子単離のためにさらに高密度連鎖解析を進めた。日本晴 (*japonica*) × 93-11 (*indica*) の交配に由来する戻し交雑集団約 3,400 個体を用いて、*EFS* 座を約 35-kb の領域に特定することができた。この領域に対応する 93-11 アリルは未知 DNA 配列を含んでいたため、93-11 由来の BAC クローンを基に DNA 配列を解読し、ゲノムアノテーションを行った。

### (2) *EFS* 遺伝子の相補性検定

*EFS* 候補領域約 35-kb のゲノムアノテーションに基づき、候補 ORF を含む 93-11 由来

のゲノム断片 14-kb をクローニングした。このゲノム断片による不稔性の回復を期待し、S24 ヘテロ不稔個体への形質転換を進めたが、コントロールと比較して有意な稔性回復は確認できなかった。

### (3) S24 遺伝子の相補性検定

S24 遺伝子の候補遺伝子として、ANK3 (アンキリントンパク質遺伝子) を特定している。ANK3 を含む 93-11 ゲノム断片をクローニングし、ANK3 の 93-11 アリルを日本型品種あそみのりに導入した数十個体の形質転換体を得た (ASO-S24OE)。遺伝子導入により正常個体が花粉不稔を発現することを期待したが、形質転換体当代 T0 世代での有意な不稔性誘発は認められなかった。次に半不稔への遺伝子導入を行った。すなわち、ANK3 の 93-11 アリル導入による花粉不稔回復を試験した。そのために、先に得た ASO-S24OE 個体と S24 ヘテロ型不稔個体との交配を実施し、その交配個体の自殖後代 F2 世代において、花粉稔性の評価を行った。得られた F2 系統の一部において、花粉稔性が部分的に回復する個体の分離が認められた。さらにこれらの個体の自殖後代 F3 では S24 領域の分離の歪みが回復しており、この結果は、花粉稔性の回復の結果を支持するものであった。本解析については、新たに供試系統数を増やして解析を継続している。

### (4) S24 領域の遺伝学的解剖

S24 遺伝子の解析を進めていく中で、S24 座に複数の関与遺伝子が存在する可能性を疑い始めた。そこで、S24 座周辺の異なる領域をカバーする 3 種類の NIL を作成し、これらの詳細な表現型解析を進めた。まず、1 つ目の S24 遺伝子座を含む置換領域が最小 (< 181-kb 長) となる近似同質遺伝子系統 S24ILH は、これまでの S24 の表現型より若干稔性が低下する傾向を見出した。次に、2 つ目の S24 短腕末端側を含む NIL には特に顕著な表現型の変化を見出せなかった。3 つ目の S24 長腕側の領域には、S24 には影響を与えないが、染色体 1 に座乗する別の花粉キラー S35 と相互作用する効果を持つことを明らかにした。この S24 と密接に連鎖する新規遺伝子 *INK* (*incentive for killing pollen*) の位置を特定し、この成果を論文報告した (Kubo et al. 2016)。以上の結果により、S24 領域は花粉不稔に関わる複雑な遺伝子構成を有することが判明した。

### (5) 細胞学的要因の解析

組織的要因を探る目的で、花粉不稔個体に由来する小孢子形成の時系列観察を行なった。減数分裂後の様々な発生段階における小孢子核の形態や小孢子壁の観察を実施したが、特に目立った異常は認められなかった。一方で、TEM 観察によって、細胞内小器官に異常らしき形態が認められた。これについてはさらに詳細な観察を継続して進めている。

## 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 2 件)

Kubo T., Yoshimura A., and Kurata N. (2016) Pollen killer gene *S35* function requires interaction with an activator that maps close to *S24*, another pollen killer gene in rice. *G3 (Bethesda)* 6: 1459–1468 (査読あり)

Kubo T., Genetic mechanisms of postzygotic RI: an epistatic network in rice. *Breeding Science* 63: 359–366 (2013) (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

Kubo T., Genetic network of hybrid sterility in an *indica-japonica* cross, Workshop on the Nature of Reproductive Barriers in Rice” Kunming, China, 2016 年 9 月 1~2 日  
久保貴彦、吉村 淳、倉田のり、イネ花粉キラーの遺伝的機構、日本育種学会第 11 回九州育種談話会、福岡、2016 年 12 月 9 日  
久保貴彦、吉村 淳、倉田のり、イネ Pollen killer *S35* の活性化に関わる新規遺伝子座の解析、日本育種学会第 130 回講演会、鳥取、2016 年 9 月 25 日

Kubo T., Yoshimura A., and Kurata N. Epistatic networks underlying rice pollen killer system. 13<sup>th</sup> International Symposium on Rice Functional Genomics, Wuhan, China, 2015 年 9 月 21~24 日

久保貴彦、吉村 淳、倉田のり：イネ雑種不稔遺伝子 *S35* と *EF5* の遺伝的関係について日本育種学会第 125 回講演会、仙台、2014 年 3 月 22 日

[図書](計 1 件)

久保貴彦、倉田のり、株式会社エヌ・テ

イー・エス、生物の科学 遺伝 「栽培  
イネの起源に迫る」、2013、pp414-417

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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

<https://shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保 貴彦 (KUBO TAKAHIKO)  
九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：00370148

研究者番号：

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )