

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850003

研究課題名(和文) イネの雑種不稔遺伝子S1がヘテロ個体特異的に不稔を誘導する機構の解明

研究課題名(英文) Genetic studies on the S1 gene, which induces sterility in heterozygotes in rice

研究代表者

小出 陽平 (Koide, Yohei)

京都大学・白眉センター・助教

研究者番号：70712008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：イネの種間雑種で見いだされた顕著な雑種強勢を利用するためには、障壁となる雑種不稔の誘導機構の解明が必要である。アジア栽培イネ*O. sativa*とアフリカ栽培イネ*O. glaberrima*の種間交雑で種子不稔を引き起こす遺伝的要因の一つとして、第6染色体上に存在するS1領域が知られている。本研究ではこれまでに得られている雑種不稔の変異体を利用し、S1の原因遺伝子の解析を行った。まず、RNA-seqにより、変異周辺の遺伝子構造を明らかにし、候補遺伝子を特定した。次に形質転換により候補遺伝子を導入し、雑種不稔性が相補できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To utilize the inter-specific hybrid vigor, it is necessary to understand the genetic mechanisms inducing hybrid sterility, which is a major obstacle for using hybrids in rice. Previous studies showed that the S1 chromosomal region causes seed sterility in hybrids between African rice species, *O. glaberrima* and Asian rice species, *O. sativa*. In this study, I used a mutant for hybrid sterility induced by the S1 chromosomal region. By using RNA-seq analysis, I identified one candidate gene carrying the mutation. I revealed that hybrid sterility phenotype is complemented by transformation of the candidate gene into the mutant.

研究分野：農学

キーワード：イネ 雑種不稔 アフリカイネ

## 1. 研究開始当初の背景

将来予想されている食糧問題に対応するため、開発途上国において作物を安定的に生産する技術の開発が必要である。開発途上国において安定的に高生産性を示すイネを開発するために、アジアの栽培イネ *Oryza sativa* とゲノムを同じくするアフリカの栽培イネ *O. glaberrima* を用いた研究が行なわれている。その過程で、*O. sativa* 種内の雑種に比べ旺盛な生育性を示す、*O. sativa* と *O. glaberrima* の種間雑種が存在することが見出された。

通常、作物がバイオマスを増加させるためには長い生育期間を必要とするが、今回、研究代表者が見出した種間雑種は生育に必要な期間が短く、なおかつ両親や *O. sativa* 種内の雑種を上回るバイオマスを持っていた。加えて、研究代表者はこの種間雑種の親である *O. glaberrima* がリン酸欠乏やいもち病に対し、高度な耐性を持つことを明らかにした (Koide et al., 2013 Plant Breeding)。したがって、この種間雑種は農業不適地において作物生産を安定させるために必要な高生産性と高度ストレス耐性を兼ね備えている。すなわち、現在までに実用化されていない種間雑種を利用することで、農業不適地の多い開発途上国におけるイネの収量安定性を飛躍的に増加させることができる。

しかしながら、これまでにイネの種間雑種を作物として利用した例は全くない。その理由として、種間雑種は旺盛な生育を示す一方でほとんどの種子が不稔となることが挙げられる。したがって優れた特徴を兼ね備えた種間雑種を利用するためには雑種不稔性を克服することが不可欠である。

*O. sativa* と *O. glaberrima* の雑種不稔性については、複数の遺伝子が関与することが明らかとなっている (Doi et al. (2008) Current Opinion in Plant Biology, Heuer and Miezian (2003) Theoretical and Applied Genetics)。中でもイネ第 6 染色体上に存在する *S1* 領域が雑種不稔の主要な原因であることが明らかになっている (Sano (1990) Genetics, Koide et al. (2008) New Phytologist)。*O. glaberrima* に由来する *S1* 領域は *O. sativa* が持つ *S1a* 領域とのヘテロ接合の状態では特異的に作用し、花粉および種子の退化を引き起こす (右上図参照)。

そこで、研究代表者は *S1* 領域が引き起こす雑種不稔性をモデルケースとし、イネの種間雑種不稔の誘導機構を明らかにするために、研究材料の整備等を行ってきた。

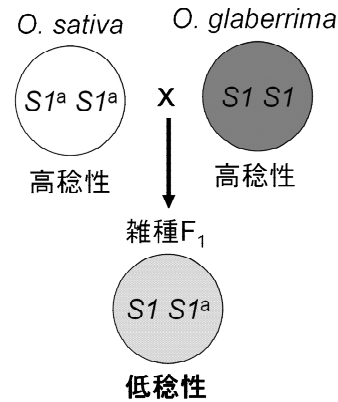


図 *S1* 遺伝子による雑種不稔モデル。  
 (花粉および種子の退化)

研究代表者は研究開始当初までに *S1* 領域をヘテロで持つ個体 (約 2000 個体) に対し重イオンビーム処理炭素イオン照射 (150Gy LET30) を行い、ヘテロ接合の状態では種子不稔を示さない突然変異体を得た。この突然変異体は *S1* または *S1a* の原因遺伝子が欠損している、または、*S1* の作用を抑制する変異を持つと考えられる。そこで、この個体の後代においてイネ第 6 染色体の塩基配列を解読したところ、*O. glaberrima* に由来する *S1* 領域に欠失が生じていた。したがって、この突然変異体を利用することで、*S1* の原因遺伝子を明らかにすることができると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、雑種不稔を引き起こさない突然変異体を用いて *S1* の原因遺伝子を明らかにすることを目的とする。そのために、次世代シーケンスを利用して、突然変異体を持つ欠失近傍の遺伝子構造の解析を行う。並行して、形質転換による候補遺伝子の導入を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 突然変異体を持つ欠失近傍の遺伝子構造の解析

これまでの研究から突然変異体は *O. glaberrima* に由来する第 6 染色体上の *S1* 領域内に欠失を持つことが明らかとなっている。これまでにイネの遺伝子構造はアジア栽培イネ *O. sativa* の 1 系統である日本晴 Nipponbare をリファレンスとし、解析が行なわれている。一方、アフリカ栽培イネ *O. glaberrima* と *O. sativa* の塩基配列の比較が

ら、両種間で多数の塩基多型が存在することが明らかとなっている。したがって、アジアイネのリファレンスゲノムを用いて解析を行うことは困難であると考えられる。そこで、当該領域の *O. glaberrima* ゲノム情報を整備し、この情報を基にトランスクリプトーム解析により、当該領域における遺伝子構造を明らかにする。

トランスクリプトーム解析には穂ばらみ期から開花直前の葯をサンプリングし、抽出した RNA を用いる。これは、雑種個体で花粉の退化が見られることから、雑種不稔の原因遺伝子は少なくとも開花前の葯において発現していると考えられるためである。トランスクリプトーム解析は北海道システムサイエンス社に依頼し、次世代シーケンサー HiSeq2000 を用いて 100bp のペアエンドの配列を解読する。得られたデータは国立遺伝学研究所の DDBJ Read Annotation Pipeline を利用し、配列解析ソフトウェア Tophat2 により、ゲノム配列上にマップする。さらに、解析ソフト Cufflinks を用いて、ゲノム上にマップされたリード数から、*O. glaberrima* の遺伝子コード領域を推定する。

## (2) 形質転換による候補遺伝子の導入

(1) で得られた情報に基づいて、突然変異体で欠失が生じている遺伝子の野生型を Gateway クローニングシステムを用いてクローニングする。エンターベクターに導入した遺伝子をバイナリーベクターに乗せ換え、アグロバクテリウムへの形質転換を行う。形質転換アグロバクテリウムを用い、*O. sativa* の 1 系統である Nipponbare に導入する。導入した組換え体を育成し、種子稔性および花粉稔性を調査する。

## 4. 研究成果

### (1) 突然変異体が持つ欠失近傍の遺伝子構造の解析

トランスクリプトーム解析に先立ち、*O. glaberrima* の *S1* 領域のゲノム構造を明らかにした。その結果、*O. glaberrima* の *S1* 領域には *O. sativa* が保持しない約 16.7kb および 7.6kb の 2 つの挿入があることが明らかとなった。

次に開花前の葯から得られた RNA を用いて RNA-Seq 解析を行った。得られたリードの 5' および 3' の塩基をクオリティー値 (QV < 19) により選別し、クオリティー値の高い塩基のみを解析に利用した。また、リード内にクオリティー値の低い塩基 (QV < 14) が含まれている場合、該当するリードを取り除いた。上記のフィルタリングの結果、約  $23 \times 10^6$

個のリードを得た。これらのリードを塩基配列解析ソフトウェア Tophat2 を用いて、*O. glaberrima* の *S1* 領域にマップした。さらに、解析ソフトウェア Cufflinks を用いて、*O. glaberrima* の *S1* 領域内の遺伝子構造を明らかにした。その結果、*S1* 領域には 10 個の ORF が存在することが明らかとなった (下図参照)。

以前までの研究で明らかとなっていた雑種不稔を生じない変異体が保持する欠失の位置を調べたところ、10 個の ORF のうちの 1 つの ORF 上に位置し、突然変異体では欠失によりフレームシフトが引き起こされていることが明らかとなった。このことから、この遺伝子が *S1* による雑種不稔の原因であると考えられた。

さらに候補遺伝子の発現解析を行い、この遺伝子は少なくとも *S1* ホモ接合体、ヘテロ接合体の両方の葯で発現していることが明らかとなった。

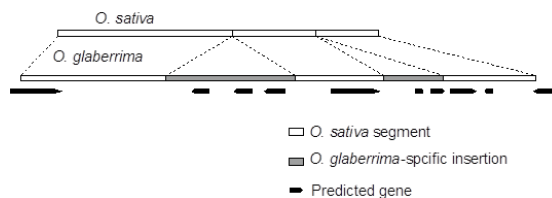


図 S1 領域の遺伝子構造

### (2) 形質転換による候補遺伝子の導入

(1) の解析により明らかになった *S1* の候補遺伝子を形質転換により *O. sativa* の 1 系統である Nipponbare に導入した。候補遺伝子が雑種不稔に関与するのであれば、*O. glaberrima* に由来する野生型 ORF を導入した個体において不稔が生じると考えられる。そこで、Gateway クローニングシステムを用い野生型 ORF を導入した 6 つの独立な形質転換個体を作出した。これら形質転換個体の表現型を見たところ、コントロール個体に比べ、顕著な花粉稔性および種子稔性の低下は認められなかった (次頁図参照)。このことは導入した候補遺伝子単体では雑種不稔が誘導されず、雑種不稔の誘導にはさらに他の因子が必要であることを示唆している。

そこで候補遺伝子を突然変異体に導入し、さらに交配により雑種を作出したところ、雑種不稔が誘導されることが明らかとなった。このことから、当該候補遺伝子の導入により

突然変異体の表現型を相補できることが示された。以上のことから *S1* 領域に存在する雑種不稔誘導に必要な1つの遺伝子を明らかにすることができた。

(1) 研究代表者  
 小出 陽平 (KOIDE YOHEI)  
 京都大学・白眉センター・特定助教  
 研究者番号：70712008

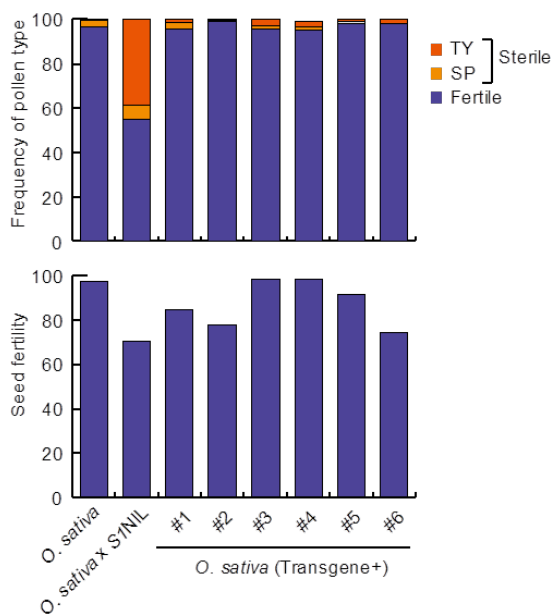


図 形質転換体の稔性調査

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Yohei Koide, Why so selfish? - transmission ratio distortion systems observed in rice hybrids, 2015年5月28日-29日 Establishing Next-Generation Genetics, Nara, Japan

小出陽平・築山拓司・寺石政義・奥本裕・阿部知子 「重イオンビーム照射によるイネ生殖隔離障壁打破への取り組み」理研シンポジウム『変異創成によるグリーンイノベーションの未来-花・食・エネルギー』招待講演 2016年1月21日 理化学研究所 和光市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織