

# イネ種間雑種における生殖障壁の打破とそのメカニズムの解明

小出陽平（北海道大学農学研究院）

ykoide@abs.agr.hokudai.ac.jp

交雑育種は、系統間に蓄積する遺伝変異を利用し、人類にとって有用な変異が集積した個体を作成することと捉えられる。しかしながら、一般的に、系統間の縁が遠くなり遺伝変異が蓄積すればするほど、蓄積した遺伝変異の間で有害な相互作用が生じ、交雑後の個体発生や雑種の正常な発育が妨げられる。このような現象は生物の生殖障壁として知られている。本研究では、イネの主要な生殖障壁である雑種不稔性に着目し、雑種不稔遺伝子の破壊による生殖障壁の打破と、関与遺伝子の機能の解析を行った。

## はじめに

交雑育種に利用可能な遺伝資源に関わる重要な概念として、作物の「ジーンプール」が提唱されている<sup>1)</sup>。この概念では、交雑による遺伝子交換の難易の観点から、作物の近縁種を第一次、第二次、第三次ジーンプールに分類する。交雑が最も容易な作物の第一次ジーンプール内には、作物種とその野生祖先種が含まれ、作物の栽培化および品種改良が主に第一次ジーンプール内の遺伝子交換で達成されたことを表している。一方、第二次ジーンプール及び第三次ジーンプールに含まれる植物種は、第一次ジーンプール内の作物との交雑において、様々な異常を示し、遺伝子の交換が容易ではない。しかしながら、近年のゲノム解読技術の進歩により、第二次、第三次ジーンプールに存在する植物種が、作物種が持たない膨大な遺伝変異を保持していることが明らかになっている。このような人類にとって未利用の遺伝変異を利用可能にすることは、交雑育種の可能性を拡大するうえで重要であると考えられる。

## イネのジーンプールを規定する雑種不稔

作物種とその近縁種間の交雑では、交雑不和合性、雑種致死、雑種不稔といった様々な異常が生じることがある。正常な雑種形成を妨げるこれら一連の現象は生物の生殖障壁として知られており、この生殖障壁が作物のジーンプールを規定する機構であると考えられる。イネの場合、生殖障壁に関する研究が盛んに行われており、雑種は正常に発育するものの、雑種の花粉や種子が稔らない現象（雑種不稔性）に関する遺伝子座が多数報告されている<sup>2)</sup>。このことから、雑種不稔性はイネの主要な生殖障壁の一つであると考えられる。これまでに、イネの第一次ジーンプール内の交雑で生じる雑種不稔性に関する遺伝子が複数単離同定されている<sup>3,4)</sup>。一方、第二次、第三次ジーンプールに存在する近縁種との雑種において、不稔性に関わる遺伝子が明らかになった例は数例しかない<sup>5)</sup>。そこで、本研究では、アジア栽培イネとは異なるジーンプールに属するアフリカ栽培イネを用いて、種間雑種不稔性の打破および遺伝子の機能解析に取り組んだ。

## イネの種間雑種不稔遺伝子 *S1*

アフリカ栽培イネ (*Oryza glaberrima*) はアフリカで独自に栽培化された種であり、アジア栽

培イネ (*O. sativa*) とは別のジーンプールに属している<sup>1)</sup> (図1)。近年、アフリカ栽培イネの持つ有用遺伝子を探索する試みが精力的になされており、アフリカ栽培イネはアジア栽培イネにはない、生物学的・非生物学的ストレス耐性を持つことが明らかになった<sup>6)</sup>。

しかしながら、アフリカ栽培イネとアジア栽培イネの種間雑種は種子および花粉が不稔となるため、アフリカ栽培イネが持つ有用遺伝子を利用することは容易ではない。この種間雑種不稔性を支配する遺伝子座を明らかにするために、Sano<sup>7)</sup> は極度の不稔となる種間雑種に対し正常な花粉を交配し、低頻度で得られる稔実種子を用いることで主要な雑種不稔遺伝子 *SI* 座に関する準同質遺伝子系統 (NIL) を作出した。NIL を用いた解析の結果、*SI* 座にはアフリカ栽培イネに由来する対立遺伝子 *SI<sup>b</sup>* とアジア栽培イネに由来する対立遺伝子 *SI<sup>a</sup>* が存在し、ヘテロ接合となった場合に *SI<sup>b</sup>* を持つ対立遺伝子が特異的に致死となることがわかった<sup>8)</sup> (図2、引用論文では *SI<sup>b</sup>* および *SI<sup>a</sup>* はそれぞれ *SI<sup>b</sup>*、*SI<sup>a</sup>* と表記されているが、後の研究と表記を統一するためにここでは *SI<sup>b</sup>* および *SI<sup>a</sup>* を用いる)。

これら結果を受けて、演者らはアフリカ栽培イネおよびアジア栽培イネにおける *SI* 座の対立遺伝子の分布を検定交配によって調査した<sup>9)</sup>。その結果、*SI<sup>b</sup>* 対立遺伝子と *SI<sup>a</sup>* 対立遺伝子はそれぞれアフリカイネジーンプールとアジアイネジーンプールに分布しているということが明らかになった。また、連鎖解析を行ったところ、*SI* 座はイネの第6染色体短腕に座することが明らかになった。

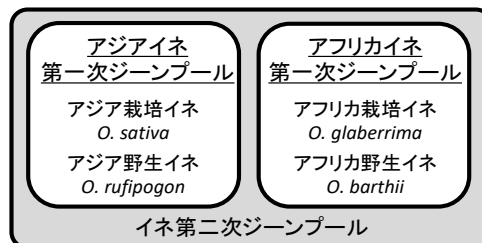


図1. イネのジーンプール (Harlan and deWet 1971を改変) 第一次ジーンプール内では遺伝子の交換が容易だが、ジーンプール間の遺伝子の交換は困難である。

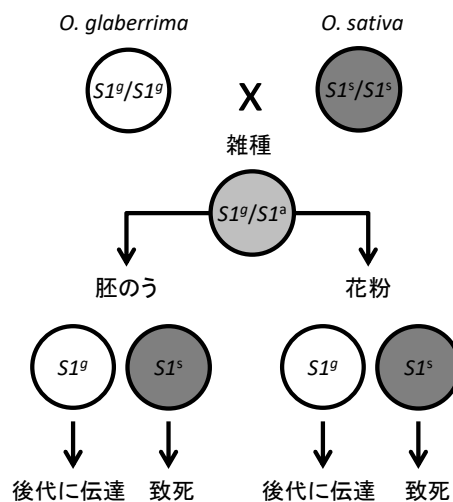


図2 *SI* 遺伝子座による雑種不稔の遺伝モデル

### 雑種不稔克服のヒント — 中立的な対立遺伝子

どのようにすれば *SI* による雑種不稔性を克服することができるだろうか。このヒントはアジア栽培イネ種内の交配組み合わせで見いだされた他の雑種不稔遺伝子 *S5* の研究に存在していた。*S5* 遺伝子座には日本型イネが持つ *S5-j* 対立遺伝子とインド型イネが持つ *S5-i* 対立遺伝子が存在し、*S5-j/S5-i* ヘテロ接合の状態では種子が不稔となる。*S5* 座の場合、これら対立遺伝子の他に *S5-n* という対立遺伝子を持つ品種が存在する。*S5-n* 対立遺伝子は *S5-j* と *S5-i* のどちらとの雑種においても不稔性を生じない、いわば中立的な挙動を示す。近年の研究の結果、*S5-n* は自然突然変異により *S5* 座に存在する遺伝子の機能が欠損したものであるということが示されていた<sup>3)</sup>。そこで、演者らは、*SI* 遺伝子座について人為的に突然変異処理を行うことで、機能を欠損させた中立的な対立遺伝子を得ることができるのではないかとこの着想を得て、研究を進めることにした。

## 人為突然変異による中立対立遺伝子の創出

突然変異処理を行うために、 $SI^s$ を持つアジア栽培イネと  $SI^s$ を持つNILを交配し、ヘテロ接合となる種子を大量に用意した。この種子に対し、理化学研究所仁科加速器センターの重イオンビーム照射を用い突然変異処理を行った。照射後の種子を圃場で栽培し、突然変異個体のスクリーニングを行った。その結果、約2500個体の穂の中で、1本だけ種子稔性が高い穂を得ることができた。この穂に実った種子を用い、解析を進めたところ、この突然変異体は  $SI^s$ を持つアジア栽培イネと  $SI^s$ を持つNILの双方とのヘテロ接合において不稔を示さない、中立的な対立遺伝子であることが明らかになった。そこで、この対立遺伝子を  $SI^{mut}$ と命名した<sup>10)</sup>。

$SI^{mut}$ を持つ突然変異体のゲノム配列を解読したところ、 $SI^{mut}$ は第6染色体短腕に座するペプチダーゼ様ドメイン保持タンパクをコードする遺伝子 ( $SSP$  遺伝子) に5bpの欠失が存在することが明らかになった。興味深いことに、 $SSP$  遺伝子はアフリカ栽培イネが特異的に持つ7kb以上の挿入上にあり、アジア栽培イネには相同遺伝子が存在しない。次に  $SSP$  遺伝子内の5bpの欠失が  $SI^{mut}$ の原因であることを確かめるために、アジア栽培イネに機能型の  $SSP$  遺伝子を導入し、 $SI^{mut}$ を持つ突然変異体と交配することで、相補性試験を行った。その結果、形質転換体と突然変異体の雑種では雑種不稔の表現型が生じることが明らかとなり、 $SSP$  遺伝子内の5bpの欠失が  $SI^{mut}$ の原因であることがわかった。この  $SSP$  遺伝子は減数分裂後の雌性配偶体周辺で発現しており、この発現様式は配偶子致死をもたらすという  $SSP$  遺伝子が関与する表現型と矛盾しない。これらのことから、 $SSP$  遺伝子は雑種不稔の誘導に必要な因子であるということが示唆される。一方、 $SSP$  遺伝子をアジア栽培イネに導入した個体では、種子稔性及び花粉稔性の低下が生じないということも明らかとなった。このことは、 $SI$  遺伝子座は複数の遺伝子からなる複合遺伝子座で、 $SSP$  遺伝子の他にも雑種不稔に関わる遺伝子が存在することを示している<sup>10)</sup>。

イネ属9種112系統を用い、 $SSP$  遺伝子の有無を調査したところ、 $SSP$  遺伝子はアフリカイネジーンプールの2種 (*O. glaberrima* と *O. barthii*) に広く分布していることが明らかとなった<sup>10)</sup>。また、この遺伝子はアジアイネジーンプールには存在しないことも示唆された。これらの結果は、 $SI^s$ 対立遺伝子と  $SI^s$ 対立遺伝子はそれぞれアフリカイネジーンプールとアジアイネジーンプールに分布するという以前に得られていた結果<sup>9)</sup>とよく合致する。現在、 $SSP$  遺伝子がどのようにアフリカイネジーンプール内で広まっていったのか調査中であり、今後、 $SI$  遺伝子をモデルとして、種間の生殖障壁成立過程を明らかにできると考えられる。

## おわりに

本研究では、イネの雑種不稔を生殖障壁のモデルケースとし、人為的な突然変異処理により関与する遺伝子を破壊し、雑種不稔を引き起こさない新たな対立遺伝子を創出することができることを示した。イネにおいて雑種不稔はジーンプールを規定するいわば、「種の壁」として働いているため、この結果は、種の壁を部分的に取り除くことに成功したといえる。しかしながら、アフリカ栽培イネとアジア栽培イネの間に存在する雑種不稔遺伝子座は他にも複数存在することが知られており、種の壁を完全に取り除くためには他の遺伝子も改変する必要がある。そのために、本研究で利用した順遺伝学的手法に加え、ゲノム編集のような逆遺伝学的手法なども取り入れ、他の生殖障壁を取り除くことで、将来的に交雑育種の可能性を広げたいと考えている。

## 謝辞

日本農学進歩賞の受賞にあたっては、北海道大学大学院農学研究院より推薦を頂きました。横田篤農学研究院長には深く感謝申し上げます。本研究を行うにあたり、北海道大学農学部佐野芳雄名誉教授には、研究の基盤形成や多くのご指導をいただきました。心からお礼申し上げます。本研究は、演者が、国際農林水産業研究センター、京都大学白眉センター、北海道大学農学研究院を転々としながら続けてきたものです。それぞれの所属先で親切に面倒を見ていただいた福田善通プロジェクトリーダー、奥本裕教授、貴島祐治教授をはじめ、本研究に関わっていただいた全ての方にお礼を申し上げます。最後に、現在も共に研究を行っている学生の皆さんに改めて感謝申し上げます。

- 1) Harlan J.R. and deWet J.M.J.: Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20: 509-517 (1971).
- 2) Koide Y., et al.: Genetics of speciation in rice. In: Hirano HY, Hirai A, Sano Y (eds) *Rice Biology in the Genomics Era*. Springer: Berlin, pp 247–259 (2008).
- 3) Long Y., et al.: Hybrid male sterility in rice controlled by interaction between divergent alleles of two adjacent genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:18871–18876 (2008).
- 4) Yang J., et al.: A killer-protector system regulates both hybrid sterility and segregation distortion in rice. *Science* 337: 1336–1340 (2012).
- 5) Yamagata Y., et al.: Mitochondrial gene in the nuclear genome induces reproductive barrier in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 1494–1499 (2010).
- 6) Li X.M., et al.: Natural alleles of a proteasome  $\alpha 2$  subunit gene contribute to thermotolerance and adaptation of African rice. *Nat Genet* 47: 827–833 (2015).
- 7) Sano Y., et al.: Genetic studies of speciation in cultivated rice, 1. Genic analysis for the F1 sterility between *O. sativa* L. and *O. glaberrima* Steud. *Jpn J Genet* 54: 121–132 (1979).
- 8) Sano Y.: The genic nature of gamete eliminator in rice. *Genetics* 125: 183–191 (1990).
- 9) Koide Y., et al.: Sex-independent transmission ratio distortion system responsible for reproductive barriers between Asian and African rice species. *New Phytol* 179: 888–900 (2008).
- 10) Koide Y., et al.: Lineage-specific gene acquisition or loss is involved in interspecific hybrid sterility in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: E1955–E1962 (2018).

## Analyzing and overcoming the reproductive barrier between interspecific crosses of rice

Yohei Koide (Research faculty of Agriculture, Hokkaido University)

ykoide@abs.agr.hokudai.ac.jp

The efficiency of breeding depends on the amount of genetic variations accumulated in a population. However, in general, severe abnormality occurs in/after the hybridization process when two individuals that are genetically diverged from each other are used as parents. Such abnormalities are regarded as the internal reproductive barrier, which maintains biological species and prevents the efficient utilization of relatives of crop in breeding. Therefore, overcoming the reproductive barrier has been a central issue in history of breeding study.

In rice, severe hybrid sterility has frequently been observed when a plant was crossed with the one from closely related species. These observations suggested that hybrid sterility is one of the main reproductive barriers in the genus rice. The African cultivated rice species, *Oryza glaberrima*, which is highly tolerant to biotic and abiotic stresses, is considered as valuable genetic resources for improving the Asian cultivated rice species (*O. sativa*). However, hybrids between these two species show severe pollen and seed sterility as observed in other diverged rice crosses. In 1970's, a locus for hybrid sterility (the *SI* locus) was reported [1]. The *O. glaberrima*-derived allele (denoted  $SI^S$ ) on the *SI* locus causes preferential abortion of gametes with its allelic alternative (denoted  $SI^s$ ) in  $SI^S/SI^s$  heterozygotes [2]. However, its genetic mechanisms were unknown.

Here, I used mutagenesis to disrupt the function of the *SI* gene and found a peptidase-coding gene is involved in this phenomenon [3]. A mutant was obtained by screening fertile hybrids after irradiation of heavy-ion beam. The mutant was considered to have a new allele,  $SI^{mut}$ , which does not confer sterility in the  $SI^{mut}/SI^S$  and  $SI^{mut}/SI^s$  hybrids. By genetic mapping and transformation experiments, I confirmed that the causal mutation of the  $SI^{mut}$  allele was a deletion in the peptidase-coding gene (denoted “*SSP*”) in the *SI* locus of *O. glaberrima*. I also analyzed the evolutionary pathways of *SSP* and found that the gene is present only in the African rice species and some other wild species, not in the Asian one. This signifies the gene was acquired or lost in certain evolutionary pathways to maintain species' boundaries. These studies demonstrated that artificial disruption of a gene for the reproductive barrier creates a “neutral” allele, which facilitates interspecific hybridization for breeding programs. Further research could help improve breeding programs and enhance rice yields to address food shortages in growing populations.

[1] Sano Y., et al.: Genetic studies of speciation in cultivated rice, 1. Genic analysis for the F1 sterility between *O. sativa* L. and *O. glaberrima* Steud. Jpn J Genet 54: 121–132 (1979).

[2] Koide Y., et al.: Sex-independent transmission ratio distortion system responsible for reproductive barriers between Asian and African rice species. New Phytol 179: 888–900 (2008).

[3] Koide Y., et al.: Lineage-specific gene acquisition or loss is involved in interspecific hybrid sterility in rice. Proc Natl Acad Sci USA 115: E1955–E1962 (2018).