

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23日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 ～ 2012

課題番号：21380007

研究課題名（和文）葉老化制御によるイネ収量性の遺伝的制御と分子メカニズム

研究課題名（英文）Molecular genetic improvement of rice productivity by regulation of leaf senescence.

研究代表者

草場 信（KUSABA MAKOTO）

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20370653

研究成果の概要（和文）：

本課題では老化誘導時も葉の緑色が保たれるイネ stay-green 突然変異体 *nyc3*、*nyc4*、*fsg1* の原因遺伝子のマップベースクロニング法による単離を試みた。その結果、*NYC3* は新奇の α/β hydrolase-fold family protein をコードしており、クロロフィル代謝に関わる酵素であると考えられることがわかった。また *NYC4* はシロイヌナズナ *THYLAKOID FORMATION1* に対応する遺伝子をコードしており、光化学系 II の分解に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また *FSG1* に関しては 200kb まで候補領域を狭めることに成功したが、遺伝子単離には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we tried to isolate rice stay-green genes *NYC3*, *NYC4* and *FSG1*. *NYC3* encoded a novel α/β hydrolase-fold family protein, which is thought to be an enzyme metabolizing chlorophyll. *NYC4* was an ortholog of *THYLAKOID FORMATION1* in *Arabidopsis thaliana*. Our analysis suggests that *NYC4* plays an important role in degradation of photosystem II subunits. In addition, we successfully delimited the candidate region of *FSG1* within 200kb.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：植物分子遺伝学・育種学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：stay-green、葉老化制御、イネ

1. 研究開始当初の背景

老化処理時も葉の緑色が保たれる stay-green 突然変異はイネ収量性向上に寄与できる可能性が考えられる。しかし、イネにおいては stay-green 突然変異体の原因遺伝子単離の報告は少なく、stay-green 遺伝子

の単離・機能解析を通してその分子機構を明らかにしていく必要があった。

2. 研究の目的

Stay-green 突然変異体原因遺伝子の単離・機能解析を行うことで、stay-green 現象

の分子メカニズムを明らかにするとともに、イネの収量性向上への応用を試みる。

3. 研究の方法

老化誘導条件下において *stay-green* 表現型を示すイネ突然変異体を単離し、マップベースクローニング法により、その原因遺伝子を単離する。さらにその遺伝子機能解析等を通して、*stay-green* の分子機構を明らかにするとともにステイグリーン形質のイネ収量性向上への効果を検討する。

4. 研究成果

まず、イネ *stay-green* 突然変異体 *nyc3* と *nyc4* の原因遺伝子をマップベースクローニング法により単離することを目指した。

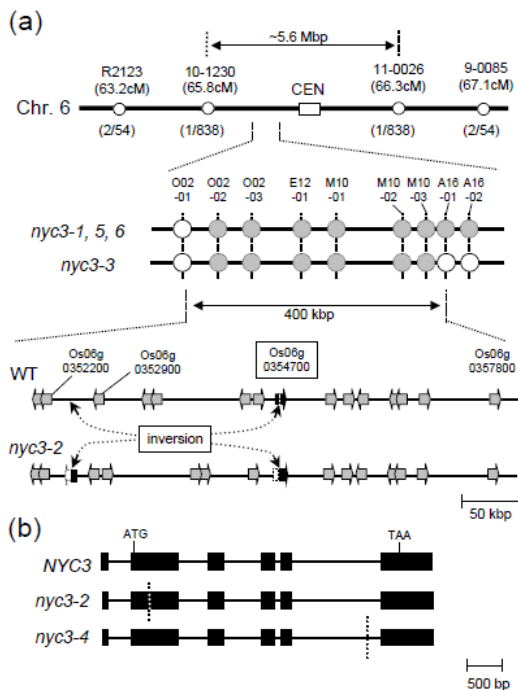


図 1. NYC3 のマップベースクローニング

NYC3 の単離のために、*nyc3* とカサラスの F_2 集団を用いて、ラフマッピングを行ったところ、*NYC3* は第 6 染色体の動原体付近に存在することが明らかになった (図 1a)。動原体付近は非常に遺伝的組換えが起きにくいので、通常のマップベースクローニング法の適用は難しいと判断された。我々は放射線が巨大欠失を頻繁に引き起こすが、巨大欠失は生存に必須な遺伝子の欠失を伴うことが多いので、後代に引き継がれにくいことを報告している (Naito et al., 2005)。一方、動原体付近は遺伝子密度が極めて低いため、このような巨大欠失も後代に伝達される、つまり *nyc3* は巨大欠失により引き起こされている可能性が考えられた。そこで、この領域に複数の DNA マーカーを設定し、放射線により

引き起こされた多くの *nyc3* の対立遺伝子について欠失領域を調査したところ、*nyc3-3* で最小の欠失 (約 400kb) が見つかった (図 1a)。さらにこの領域上の遺伝子を詳細に調査したところ、*nyc3-2* では Os06g0354700 遺伝子上で逆位が、*nyc3-4* では転座が生じていることが判明した。これらのことから *NYC3* は Os06g0354700 遺伝子であると判断した。このことは Os06g0354700 遺伝子のゲノムクローンを *nyc3* に形質転換することによって証明された。

Os06g0354700 遺伝子は新奇の α/β hydrolase-fold family protein をコードする。HPLC の解析によって *nyc3* の老化葉において pheophytin (図 2 中の Py) が蓄積していることが明らかになった。これは pheophytin が *NYC3* の基質である可能性を示すが、実際、シロイヌナズナの *NYC3* オーソログである PPH は pheophytin を分解するクロロフィル分解経路の酵素のひとつであることが示されている (Schelbert et al., 2009)。

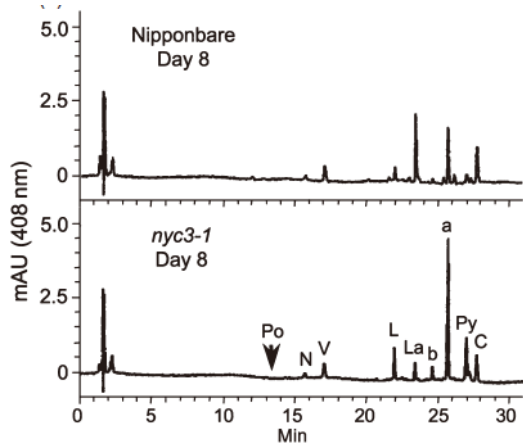


図 2. *nyc3* 老化葉に含まれる光合成色素

NYC4 の単離にあたっては同様にカサラスとの F_2 集団を用いてラフマッピングを行った。その結果、*nyc4* の表現型を示す個体は第 3 染色体と第 7 染色体の両方が日本型多型を示すことが明らかになった (図 3a)。*nyc4* の稔実率は野生型と大きく変わらないのに対し、*nyc4* と野生型の F_1 は稔性が大きく減少したことも考え合わせると、*nyc4* は相互転座により引き起こされた突然変異である可能性が考えられた。そこでマイクロアレイにより *nyc4* で発現が大きく減少している遺伝子の探索を行った。その結果、第 7 染色体の Os07g0558500 遺伝子の発現が極めて低いことがわかった (図 3b)。inverse PCR による解析により *nyc4* で引き起こされている相互転座は第 3 染色体の Os03g0260100 遺伝子との間でおきていることが明らかになった。Os07g0558500 遺伝子を形質転換することに

より *nyc4* の表現型は回復したことから、*NYC4* は Os07g0558500 遺伝子であることが明らかになった (図 3d)。

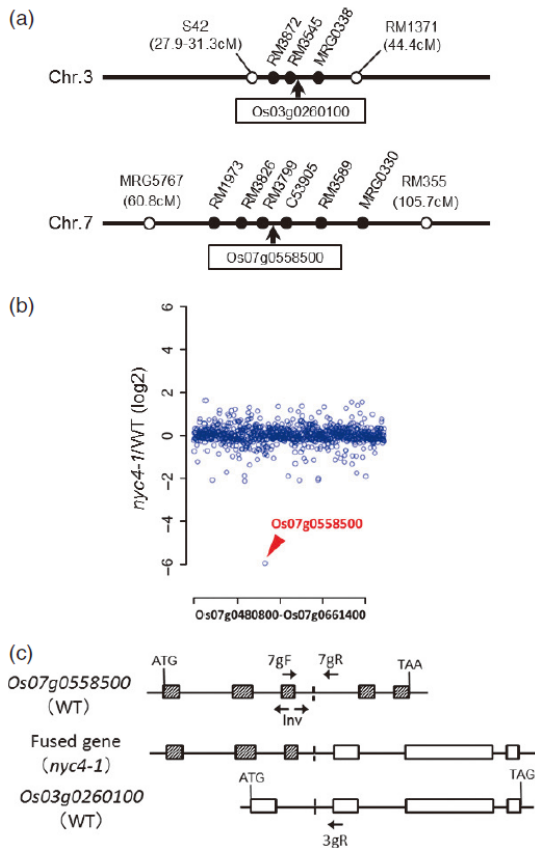


図 3. NYC4 のマップベースクローニング

NYC4 はシロイヌナズナの *THYLAKOID FORMATION1 (THF1)* のオーソログをコードしていたが、これまで *THF1* が老化時のクロロフィル・クロロフィル結合タンパク質の分解に関与しているという報告はない。

nyc4 老化葉における光合成タンパク質の消長を調べたところ、光化学系 II サブユニット、特に D1 および D2 の分解が強く抑制されていることがわかった。したがって、*NYC4* は老化時の光化学系 II サブユニットの安定性を制御する因子であると考えられた。

これらの研究によりクロロフィル・光合成タンパク質の分解制御に関する新知見が得られた。また、両遺伝子の単離法は有用でユニークなものであり、成果はともに Plant J 誌に掲載されるなど、国際的に高い評価を得た。

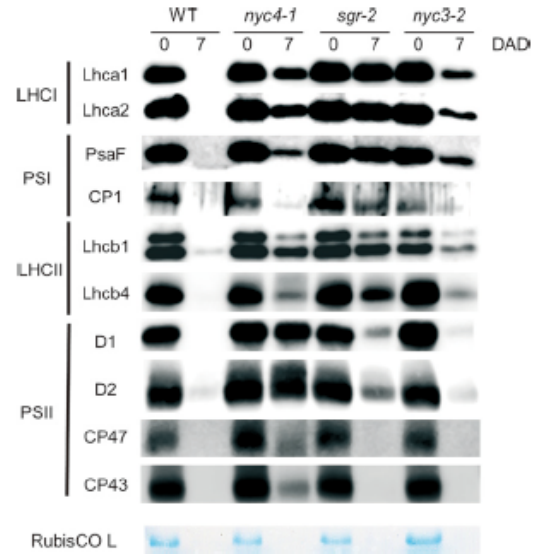


図 4. *nyc4* 老化葉における光合成タンパク質の消長

さらに stay-green 突然変異体 *fsg1* のマップベースクローニングを試みた。高精度マッピングにより *FSG1* は第 7 染色体上の 200kb の領域内に存在することが明らかになったが、遺伝子単離には至らなかった。イネにおいて収量性の重要な要因であるシンクサイズが大きいモミロマンとの戻し交雑も進めたが、原因遺伝子が単離できていないことなどから、シンクサイズが十分大きいステイグリーン系を得るには至らなかった。今後原因遺伝子が単離され、*fsg1* の収量性に対する遺伝学的検証、遺伝子機能解明がなされることが期待される。

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)

1. Yamatani, H., Sato Y., Masuda, Y., Kato, Y., Morita, R., Fukunaga K., Nagamura, Y., Nishimura, M., Sakamoto, W., Tanaka, A. and Kusaba, M. *NYC4*, the rice ortholog of Arabidopsis *THF1*, is involved in the degradation of chlorophyll-protein complexes during leaf senescence. *Plant J.* 74, 2013, 652-662 (査読有)

2. Morita, R., Sato, Y., Masuda, Y., Nishimura, M., and Kusaba, M. Defect in NON YELLOW COLORING 3, an α/β hydrolase-fold family protein, causes a stay green phenotype during leaf senescence in rice. **Plant J.** 59, 2009, 940-952 (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

山谷浩史・佐藤豊・増田優・森田竜平・西村実・草場信 イネ stay-green 遺伝子 *NYC4* の単離と機能解析 第 121 回日本育種学会
2012. 3. 30 宇都宮大学

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

草場 信 (KUSABA MAKOTO)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20370653

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：