

## 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 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21780008

研究課題名（和文） イネの胚のう形成後期に機能する遺伝子群の同定

研究課題名（英文）

Identification of genes relating to late megagametogenesis in rice

研究代表者

久保 貴彦 (KUBO TAKAHIKO)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：00370148

研究成果の概要（和文）：高等植物の雌性配偶子発生については、どのような分子が、またどのような分子ネットワークが関わるかほとんどわかっていない。本研究では、イネの雌性配偶子形成に関わる遺伝子群の同定を目的として、雌性不稔系統(NIL-S)に由来する雌ずい組織のトランスクリプトームおよびプロテオーム解析を進めた。解析結果として、正常系統との比較によって、雌性発生に関わると考えられる転写遺伝子群とその他遺伝子群 214 個を同定した。

研究成果の概要（英文）：Little is known about molecules, and the molecular networks involved in megagametogenesis of higher plants. In order to identify genes involved in rice megagametogenesis, transcriptome and proteome analyses of female sterile lines were carried out in this study. Comparison analyses of sterile and normal ovules revealed 214 genes that should be involved in rice megagametogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：胚のう、イネ、生殖的隔離

## 1. 研究開始当初の背景

イネの雑種不稔の報告は数多くあり、一部については原因遺伝子の単離が試みられている。雑種不稔の内訳をみると多くは花粉不稔(30例以上)であり、これに対して雌性不稔の報告は遺伝子座にして6-7座程度と少ない。そのうち3つは申請者が同定した遺伝子座である。これまでにイネで単離同定が完了

したのは雑種不稔遺伝子 S5 (PNAS 105: 11436-11441, 2008)のみである。S5遺伝子は1座のアレル間で働く遺伝子として報告されており、異なる遺伝子ローカス間で相互作用(エピスタシス)を示す雑種不稔遺伝子は未だ単離同定されていない。生殖隔離機構としてエピスタシスが重要であることは古くから様々な生物種で示唆されてきたが、分子機構

を具体的に明らかにした研究報告は植物ではみあたらない。

高等植物では、突然変異系統などの解析を通して生殖細胞の発生研究が進められてきた。花粉と比べ、雌性配偶子は子房中に内包され観察や分析に煩雑性を伴うため、発生生理に関わる研究は比較的立ち遅れている。生殖細胞の初期発生ステージ(減数分裂期まで)の分子については、イネでも報告されているものの(Plant Cell 19:2583-2594, 2007)、減数分裂後の胚のう形成に関わる分子基盤については知見が乏しい。以上のように「雑種不稔の分子遺伝学」と「生殖発生学」の両分野において、雌性生殖研究には課題が多く残されている。

イネのマイクロアレイやプロテオーム解析は、葉や穂など広い組織分類での発現プロファイルが得られているものの、子房/胚珠限定的な解析はなされていない。またマイクロアレイやプロテオーム解析は、日本晴など特定品種をターゲットにしており、不稔個体と正常個体との発現比較を行った研究はこれまでに例がない。

申請者は、あそみのり (*japonica*) とIR24 (*indica*) の交雑後代(日印交雑と呼ぶ)において、雌性不稔を引き起す3つの補足遺伝子座を染色体上に位置づけている(TAG 110:346-355, 2005)。この3遺伝子は雌性特異的で、雄性側には影響を与えない。異常発生の時期は減数分裂後の胚のう細胞1核期以降であることがわかっている。日印雑種の雌性不稔の報告としては、染色体6 (TAG 102: 1243-1251, 2001)や染色体5 (Euphytica 151:331-337, 2007) などがあるが、いずれも異常の発現ステージと形態は本研究対象の表現型と非常に酷似している。すなわち日印交雑にみられる胚のう致死は、胚のう細胞1核期以降における形成異常が多いといえる。

したがって、特に胚のう発生後期の分子機構に着目し解明することは、日印交雑の雑種不稔機構を理解する上で極めて重要度が高い。

## 2. 研究の目的

高等植物において雌性配偶子の発生に関わる研究は古くから進められてきたが、関与遺伝子や、その遺伝子ネットワークの構造については依然としてほとんどわかっていない。申請者らが見出したイネの雌性不稔は、減数分裂後の胚のう細胞1核期以降に発生異常が生じ、そのまま胚のうが退化するため不稔となることがわかっている。本研究では、1-2核期の胚のうに着目し、分裂ステージの進行に関わる遺伝子群の同定と機能の解明を目的として雌しべのトランスクリプトーム/プロテオーム解析を進めた。先行している原因遺伝子の単離解析では、原因遺伝子そのものの同定は可能であるが、周辺のネットワークを構成する他の分子まで幅広く捉える事は難しく、本研究計画によって、胚のう形成に関わる遺伝子群、特に細胞分裂関連因子を同定し、その分子メカニズムの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

トランスクリプトーム解析：植物材料には、日本型品種あそみのりとインド型品種 IR24 の交配に由来する雌性不稔固定系統を用いた。この雌性不稔は、減数分裂後1核期の雌性配偶子退化によることがわかっていたので、1核期に相当する発生ステージの雌しべを実体顕微鏡下で摘出し、解析サンプルとした。あそみのりと不稔系統から回収した各25本程度の雌しべ組織を1サンプルとして Total RNA を抽出し(x3 反復)、Agilent 44-K アレイにより各系統の遺伝子発現を調べた。系統間で2倍以上の発現差を示す遺伝子を *t*

検定 ( $P < 0.001$ ) により抽出した。

プロテオーム解析：サンプルの回収は、トランスクリプトームと同様に進めた。凍結保存した雌しべを、タンパク溶解液中 (HEPES buffer) にて破碎/溶解し、等電点泳動サンプルとした。1次元泳動、2次元泳動を経て、分離したゲルの銀染色を行い、泳動パターンをイメージスキャナーで取り込んだ上で比較解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) トランスクリプトーム解析

雌性不稔系統と正常系統のそれぞれの胚のう組織から抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析によりイネ約 4 万遺伝子の発現を調べた。両系統間の比較において、雌性不稔系統で発現量低下がみられた遺伝子は 169 個 (216 プローブ)、発現量が上昇した遺伝子は 45 個 (65 プローブ) あった。GO 解析の結果から、発現低下遺伝子群には転写制御に関わる遺伝子が比較的多く含まれることが明らかとなり (図 1、molecular function)、その中には、複数の Zn-finger protein や Myb domain protein などが観察された。

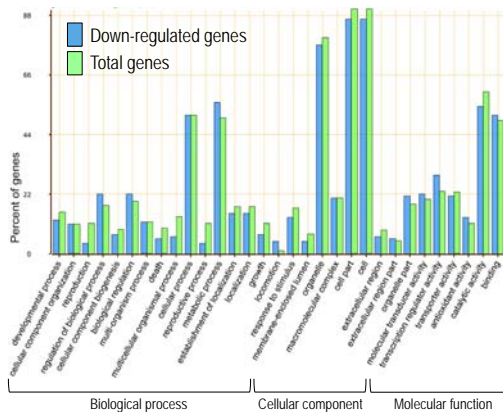


図 1. 雌性不稔系統で発現低下を示す遺伝子群とイネ全遺伝子の GO 分類

発現低下遺伝子群の中には、雌性配偶子発生過程の 4 分子期〜1核期のステージにおいて、発現上昇する遺伝子 (169 遺伝子中 29 遺伝子) が含まれており (図 2)、それらのステ

ージは表現型 (雌性退化の時期) と一致することから、このような遺伝子群は雌性配偶子発生に関わる可能性が特に高いと考えられた。

これまでに得られた雌性不稔系統で有意差を示す発現遺伝子群や、雌性配偶子の発生過程でダイナミックな変動を示す遺伝子群の情報は、今後、雌性発生の機構解明を進める上で基礎データとして有効であろうと考えられた。

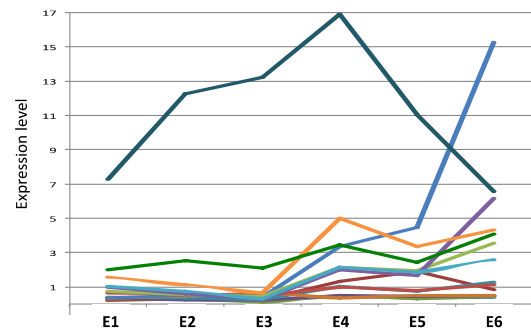


図 2. 発現低下遺伝子の雌性発生過程における発現変動パターン  
E1: Early meiosis, E2: Late meiosis, E3: Tetrad, E4: Mononuclear, E5: Binuclear-<sup>premature</sup>, E6: Mature embryo sac.

##### (2) プロテオーム解析

2DE解析を行う上でサンプル溶液の質は非常に重要であるため、先ずタンパク溶液の調整方法と最適条件の検討を行った。これにより、抽出バッファの組成と方法やサンプル当たりに必要な組織量 (200本相当/サンプル) などの諸条件を決定した。この実験条件をもとに雌性不稔型と正常個体の雌ずいタンパク溶液の 2DE 像の比較を行い、シグナル量や泳動度位置に変化のある特異的なタンパクスポットを探した。個々の実験では、泳動差違を示すタンパクスポット 2-3 を確認できたが、プロテインシーケンスへと進めることが可能な再現性の高いスポットは得られなかった。この再現性の問題を踏まえて、さらに電子顕微鏡における異常部位の特定を進めた。この組織的観察の結果、胚のう細胞の退化部位が、胚のう細胞内の局所的な要因によることが推察された。本研究の計画当初は、遺伝学的解析結果で示された胚のう細胞と周辺細胞 (珠心細胞) との相互作用の重要性に基づいて、周辺細胞を含めた雌しべ組織全体での解析が好ましいと判断した。しかしながら、発生

異常が胚のう細胞限定的であることから周辺細胞持ち込みによるタンパク溶液の希釈によって、十分な差違を検出できなかった可能性が考えられた。発生過程中的胚のう細胞1細胞を単独で取り出すことは現在の技術では不可能と思われるが、Laser-microdissectionでターゲットである胚のう細胞以外の持ち込みを減らすことや、微量タンパクから2DE解析を進める系の検討などが今後の課題となる。

#### 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3件)

- ① Kubo T, Yoshimura A, Kurata N. (2011) Hybrid male sterility in rice is due to epistatic interactions with a pollen killer locus. *Genetics* 189: 1083-1092. (査読あり)
- ② Fujita, M., Horiuchi, Y., Ueda, Y., Mizuta, Y., Kubo, T., et al. (2010) Rice expression atlas in reproductive development. *Plant Cell Physiol* 51: 2060-2081. (査読あり)
- ③ Win, K.T., Kubo, T., Miyazaki, Y., Doi, K., Yamagata, Y. and Yoshimura, A. (2009) Identification of two loci causing F1 pollen sterility in inter- and intraspecific crosses of rice. *Breeding Science* 59: 411-418. (査読あり)

[学会発表] (計7件)

- ① 久保貴彦、藤田雅丈、倉田のり：イネ雌性不稔に関わる遺伝子発現プロファイリング、第121回日本育種学会講演会、宇都宮 2012年3月28-30日
- ② 久保貴彦、藤田雅丈、高橋宏和、中園幹生、堤伸浩、倉田のり：イネ雌性配偶子形成過程のトランスクリプトーム解析、第120回日本育種学会講演会、福井、2011年9月22-24日
- ③ 久保貴彦、倉田のり：イネPollen killerを制御するエピスタシスの解析、第119回日本育種学会講演会、横浜、2011年3月29-30日
- ④ Nori Kurata, Yoko Mizuta, Takahiko Kubo, Yoshiaki Harushima: Genome evolution and

reproductive barriers in rice. 6th International Rice Genetics Symposium, マニラ、フィリピン、2009年11月16-19日

- ⑤ 久保貴彦：イネ生殖細胞の発生に関わる遺伝子群の解析、国立遺伝学研究所研究集会、三島、2009年10月30-31日
- ⑥ 倉田のり、久保貴彦、水多陽子、新濱充、藤田雅丈、大柳一、望月孝子、春島嘉章：Genetic and genomic analysis of factors consisting of reproductive barriers in rice. 第32回年会日本分子生物学会年会ワークショップ、横浜、2009年12月9-12日
- ⑦ 藤田雅丈、堀内陽子、上田弥生、水多陽子、久保 貴彦、矢野健太郎、山木辰一郎、津田勝利、新濱充、加藤大貴、菊地俊介、濱田和輝、望月孝子、堤伸浩、倉田のり：イネ全生殖過程における遺伝子発現解析を用いた多様な因子の捕捉。第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9-12日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

久保 貴彦 (KUBO TAKAHIKO)  
国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教  
研究者番号：00370148

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし