

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850010

研究課題名(和文) 水稻胚乳における核内倍加の変動と組織発達の関連性の解明

研究課題名(英文) Progress of endoreduplication in the developing endosperm of rice (*Oryza sativa*)

研究代表者

小林 英和 (KOBAYASHI, Hidekazu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・西日本農業研究センター・水田作研究領域・主任研究員

研究者番号：60360450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：核内倍加とは有糸分裂を伴わずに核DNAが複製され、核内DNA量が増加する現象である。本研究では、核内倍加が水稻胚乳組織の発達に及ぼす影響を明らかにするため、(1)水稻胚乳における核内倍加の時間的・空間的進行、(2)核内倍加の遺伝的差異、(3)栽培・環境条件による核内倍加の変動について検討した。核内倍加は胚乳の中心部と周縁部に比べてその中間部で核内倍加が進行しており、核内倍加が進行している細胞は大きさが大きかった。また、核内倍加の進行には品種間差があり、異なる品種における核内倍加と細胞の大きさの間に有意な相関が認められた。加えて、核内倍加は登熟期の高温によって抑制される傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：Endoreduplication is the phenomenon by which the DNA content of the nucleus is increased by successive rounds of chromosomal DNA replication, without subsequent mitosis. In the present study, I examined the progress of endoreduplication in the developing endosperm of various cultivars of rice (*Oryza sativa*), under different growth conditions. Within the same cultivar, ploidy (the copy number of chromosomes) was higher in the intermediate region of the endosperm than in the central and peripheral regions, and proportional relationships between ploidy and cell size were found. Significant differences in endoreduplication were found among the cultivars, and correlations between mean ploidy and cell size of the cultivars were found. The progress of endoreduplication was affected by growth conditions; high temperature reduced both endoreduplication and seed weight in Hinohikari. These results demonstrate that endoreduplication plays an important role in the development of rice endosperm.

研究分野：作物学

キーワード：水稻 胚乳 核内倍加 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

核内倍加とは有糸分裂を伴わずに核 DNA が複製される現象であり、核内倍加が n 回行われた核は通常の核の 2^n 倍の DNA 量を有することになる。植物においては、表皮細胞や胚乳細胞などで核内倍加が行われており、一般的に核内倍加が生じた細胞は大型化する傾向が認められている。核内倍加の生理学的な意義については、いまだ明確となっていないが、「鋳型となる核 DNA の増加による細胞活動の活性化」、「葉緑体など DNA を持つ細胞内小器官の増加に対応した核 DNA の増量」、「細胞分裂において必要となる細胞骨格の再配置等の省略による組織成長速度の向上」などの効果が推察されている。

研究代表者は、これまでイネ科植物を対象に、胚乳組織におけるプログラム細胞死の進行過程やトライコーム(葉表面の毛状突起)の発達に及ぼす植物ホルモン処理の影響を検討してきた。その過程で、植物ホルモン処理によりコムギのトライコームが大型化する現象を発見し、その際トライコームの核において核内倍加が生じていることを明らかにした。このことから、表皮細胞と同様に核内倍加が行われている胚乳細胞においても、核内倍加の変動が細胞の大きさなどに影響を与え、ひいては穎果の大きさや貯蔵物質の蓄積程度といった農業形質にも影響を及ぼしているのではないかと思いついた。そこで、過去の文献を調査したところ、核内倍加の制御に關与する遺伝子を改変した水稻では、胚乳の発達が損なわれることが報告されていた(Su'udi et al., 2012)。しかしながら、これまでに実施されてきた核内倍加の研究は、核内倍加機構そのものの解明を目的としたものが中心であり、品種や環境条件による核内倍加の変動と胚乳組織の形状・構造の変動との関連性を検討した研究は、トウモロコシに関するものが数件報告されているのみであり(Bringezu et al., 2011 など)、研究代表者の知る限り他のイネ科作物においては報告されていない。胚乳組織の形状・構造は、収量に加えてテクスチャー(噛み心地)などの食感・食味にも影響を与える可能性が考えられることから、その変動要因の解明は、農業利用上も大きな意義があるものと期待される。

2. 研究の目的

水稻胚乳組織における核内倍加の変動と組織発達に及ぼす核内倍加の影響を明らかにする。具体的には、

- (1) 水稻胚乳における核内倍加の進行過程
- (2) 核内倍加の遺伝的差異
- (3) 栽培・環境条件による核内倍加の変動を調査し、胚乳組織の形状・大きさ等と比較することで、核内倍加が胚乳組織の発達に及ぼす影響を解明する。

3. 研究の方法

(1) 水稻胚乳における核内倍加の進行過程の検討

日本型水稻品種「キヌヒカリ」を、近畿中国四国農業研究センターの試験圃場で栽培した。施肥量は基肥として、窒素・リン酸・カリウムそれぞれ 4kg/10a とし、穂肥として出穂 2 週間前に窒素 2kg/10a を硫酸で施用した。サンプリング対象とした穎果は、強勢穎果である各穂の上位 1・2 番目の 1 次枝梗に着粒した穎果のうち、先端から 4、5、6 番目のものを用いた。それぞれ穎果について開花日を調査し、開花後 5~10 日後にかけて、定期的にサンプリングを行った。1 回のサンプリングでは、10 個体から穂を 1 本ずつ採集した。サンプリングした穂のうち、5 本からはフローサイトメーター用に 2 粒ずつ採集し、-80 で冷凍保存した。また、別の 5 本から 2 粒ずつ採集し、1mM MgCl₂ 含有のファーマー液(95%エタノール:酢酸=3:1)で約 1 時間固定後、1mM MgCl₂ 含有の 70%エタノールで -4 で保存した。それぞれの穂から残った穎果を 1 粒ずつ採集し、60 °C で 3 日間乾燥させ、乾燥重を測定した。

フローサイトメーターによる解析は、Galbraith et al. (1983)の手法を用いて行った。冷凍した穎果を抽出液(45mM MgCl₂, 30mM クエン酸ナトリウム, 20mM MOPS, 1mg/ml Triton X-100)中で解凍し、メスを用いて 2 分 30 秒間細断し、70 μ m のナイロンメッシュでろ過した。懸濁液によう化プロピジウムを 30 μ M になるように加え、フローサイトメーター(guava easyCyte 6-2L, Merck Millipore 製)を用いて解析した。解析は、穎果サンプルでは 10000 events、止葉では 5000 events とした。

穎果切片の作成は、既報に従い実施した(Kobayashi et al. 2013)。70%エタノールで保存した穎果をポリエチレングリコール(PEG)で包埋し、放冷し固まった PEG ブロックからマイクロトームを用いて 10 μ m の切片を作成した。切片は、リン酸緩衝液で PEG を除いた後、VECTASHIELD mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Inc. 製)で封入した後、WU フィルター(励起波長 330-385 nm, 吸収波長 420 nm-)を装着した蛍光顕微鏡(IX71, Olympus 製)で観察し、CCD camera (VB-7000, Keyence 製)で撮影した。

核内倍加の測定は、Trichome の核内倍加で用いられる手法(Kobayashi et al. 2012)を改変して行った。蛍光観察により得られた画像を、Adobe Photoshop Elements 12 (Adobe Systems 製)を用いてグレースケールに変換し、Image J 1.44p (National Institutes of Health 製)を用いて解析した。輪郭のはっきりとした核について、その外周部を手動で囲み、その面積と Integrated density を求めた。得られた Integrated density を用いてヒストグラムを作成し、核相を検討した。また、各核相の細胞 30 個(24C の細胞は、測定

できるすべて細胞)を対象に、ImageJを用いて細胞の断面積を測定した

(2) 核内倍加の遺伝的差異の解明

日本型水稲5品種(あきたこまち、キヌヒカリ、コシヒカリ、日本晴、ササニシキ)およびインド型水稲5品種(ハバタキ、北陸193号、IR64、カサラス、タカナリ)を(1)と同様の方法で栽培し、サンプルを収集した。本研究では、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡観察を加えて、成熟粒を対象に、その中央横断面の切片を作成し、胚乳細胞の大きさを調査した。

(3) 栽培・環境条件による核内倍加の変動

水稲品種「ヒノヒカリ」「にこまる」を屋外でポット栽培(1/5000aポットに16個体を円形に配置、分けつ切除)し、出穂期に自然光型ファイトトロンに入れ、適温処理(明期25.5 / 暗期23.7)および高温処理(明期30.5 / 暗期28.9)を実施した。調査の対象は、4・5・6番目の1次枝梗の先端から4・5・6番目の1次穎果とし、(1)と同様に核内倍加を調査した。

4. 研究成果

(1) 水稲胚乳における核内倍加の進行過程の検討

開花後5日目の胚乳組織においては、3Cの割合が59.4%、6Cの割合が34.2%と大部分を占め、12C以上の核は6.4%に過ぎなかった。その後、核内倍加が進行して12C以上の核が増加し、8DAFでは、3Cが43.2%、6Cが31.4%、12Cが21.0%、24Cが4.0%に達した。その後10DAFまでは組成は大きく変わらなかった。また、これらの組成をもとに、胚乳組織全体の核相を計算すると、5DAFでは4.8Cであったものが、8DAFには6.9Cまで増加し、その後は横ばいとなった。

8DAFのサンプルを蛍光色素DAPIで染色し、蛍光顕微鏡観察を行った。水稲胚乳組織では細胞によって核の大きさの違いが大きく、非常に大きな核も確認された(図1a)。それぞれの核の蛍光強度を調査しヒストグラムを作成すると、3~4個のピークに分かれることが明らかとなった。このヒストグラムにより判断された核相を蛍光顕微鏡画像に記載すると、図1bのようになり、水稲胚乳組織では、最外層の細胞は3Cであり、そこから中心に向かってつれて核相が高い細胞が分布するようになるが、中心部では再び核相の低い細胞が存在することが示された。

核内倍加と細胞の大きさの関係について検討するため、核相の異なる細胞間で細胞の断面積を比較したところ、核相が高い細胞ほど、細胞の大きさも有意に大きいことが示された。

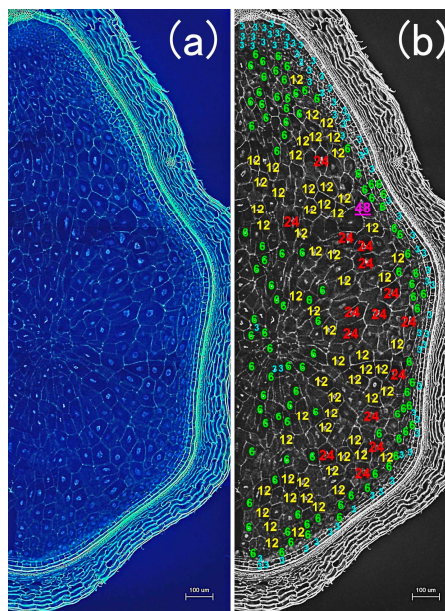


図1. Ploidyの異なる細胞の分布

(2) 核内倍加の遺伝的差異の解明

穎果の成長段階をそろえるため、乾燥重が各品種の成熟粒の25%前後となる日で採集したサンプルで比較すると、ploidyに品種間差が認められ、タカナリが最も高く、あきたこまちが最もploidyが低かった(図2a)。また、成熟粒の胚乳細胞の大きさも、タカナリが最大、あきたこまちが最小であり(図2b)、各品種のploidyと成熟粒の細胞の大きさの間には有意な正の相関($r=0.7765$, $p<0.01$)が認められた。

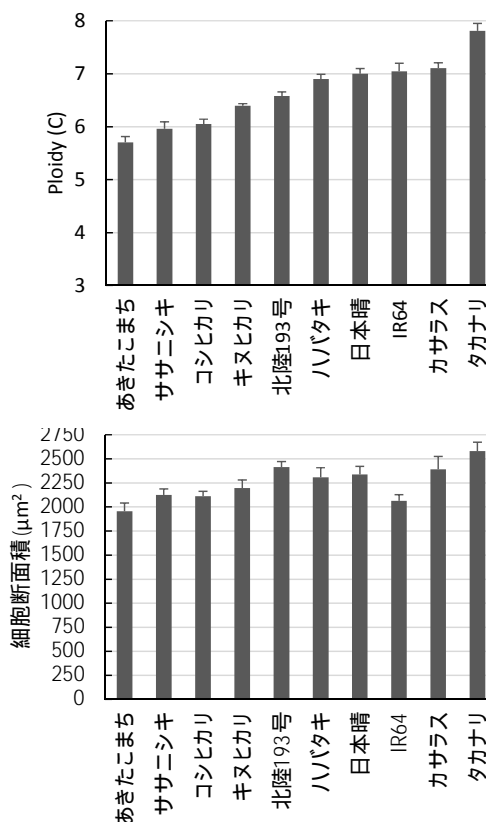


図2. Ploidy(a)、細胞サイズ(b)の品種間差

(3)栽培・環境条件による核内倍加の変動性
核内倍加が生じている胚乳細胞の割合は、適温条件では開花後 10 日目を除いて「ヒノヒカリ」と「にこまる」で有意差が認められなかったが、高温条件では調査した全ての日において、「ヒノヒカリ」で有意に低くなった(図3)。また、Ploidy(核DNAのコピー数)の平均値に関しても、適温条件では有意差が認められなかったが、高温条件においては、「ヒノヒカリ」のほうが「にこまる」よりも有意に Ploidy の平均値が低かった。また、成熟粒の粒重は、適温条件では有意差が認められず(ヒノヒカリ：23.2mg、にこまる：23.7mg)、高温条件ではヒノヒカリが 5%水準で有意に低かった(ヒノヒカリ：22.4mg、にこまる：23.4mg)。これらのことから、水稻胚乳組織における核内倍加の進行は温度条件の影響を受けるが、その感受性には品種間差があり、高温耐性の弱いヒノヒカリにおいては、高温により核内倍加の進行が抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、核内倍加は水稻の胚乳細胞の大きさに関与していると考えられ、その進行程度は胚乳発達にも影響を及ぼす可能性が示唆された。水稻胚乳組織におけるこのような知見はこれまで明らかになっておらず、水稻の生産性や品質の向上にもつながる可能性があるかと推察される。

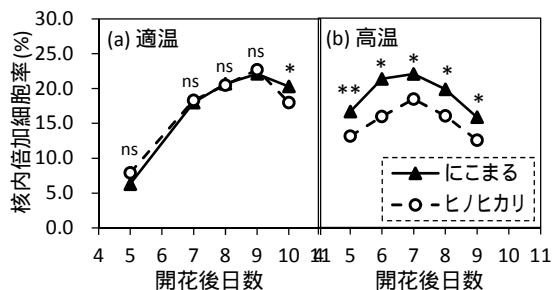


図3. 異なる気温条件下での核内倍加の進行

<引用文献>

Bringezu et al. (2011) *Planta* 235: 387-397
Galbraith et al. (1983) *Science* 220: 1049-1051
Kobayashi et al. (2012) *Plant Growth Regul* 67: 19-25
Kobayashi et al. (2013) *Planta* 237: 1393-1400
Su'udi et al. (2012) *Euphytica* 182: 353-376

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2件)

小林英和、水稻胚乳におけるデンブ貯蔵細胞の大きさの分布、平成 28 年度日本作物学会中国支部大会、2016 年 7 月 28~29 日、島根大学(島根県松江市) 発表確定

小林英和、登熟期の気温が水稻胚乳組織の核内倍加に及ぼす影響、日本作物学会第 241 回講演会、2016 年 3 月 28 日、茨城大学(茨城県水戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 英和 (KOBAYASHI, Hidekazu)
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 西日本農業研究センター 水田作研究領域 主任研究員
研究者番号：60360450