

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580012

研究課題名(和文) イネの開穎機構を制御する遺伝的プログラムの解明

研究課題名(英文) Studies on the genetic mechanism regulating flower opening in rice

研究代表者

吉田 均 (Yoshida, Hitoshi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所稲研究領域・主任研究員

研究者番号：30355565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：イネの開穎は、内・外穎の鉤合の解除、鱗被の膨潤、花糸の伸長、葯の開裂、柱頭の展開といった一連の運動によって構成される。本研究では、変異体を用いて開穎制御の遺伝的メカニズムを解析した。新たに同定した8系統の開花性変異体のうち1系統は、鱗被のアイデンティティを決定するSPW1の新規アレルであった。一方、鱗被形成に関与しないH193mt変異体の原因遺伝子の候補領域を第1染色体上の250kbに絞り込んだ。また、円粒形で鱗被の小さい変異体が開花性となることを明らかにした。さらに、MADS32遺伝子が内外穎の鉤合部を構築する新たな開穎装置形成遺伝子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Flower opening of rice is achieved by a series of well-organized events, that is, unlocking of lemma and palea, swelling of lodicule, elongation of stamen filaments, anther dehiscence and stigma opening. In this study, we analyzed genetic mechanism that regulates the flower opening of rice using cleistogamous mutants. From EMS-mutagenized populations, we identified 8 cleistogamous mutants. One of these mutants was a novel allele of the SPW1 gene that specifies lodicule identity. Another mutation, H193mt, is not related to lodicule development, and the causal gene was mapped to a 250kb region on chromosome 1. We also revealed that short-grain mutants with extremely round-shaped grains and small lodicules were cleistogamous. Furthermore, we identified MADS32 as a novel gene involved in development of flower-opening machinery of rice.

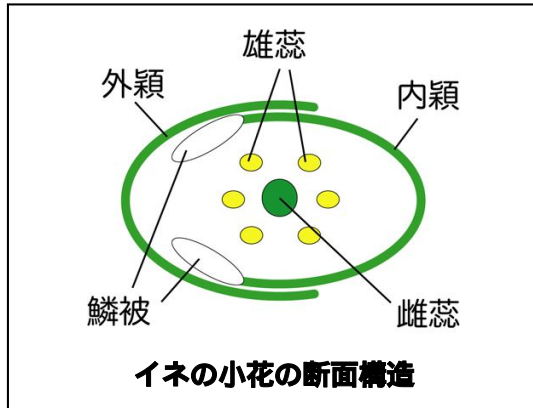
研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：閉花受粉性 イネ 開花 花器官 鱗被 変異体 内穎 外穎

1. 研究開始当初の背景

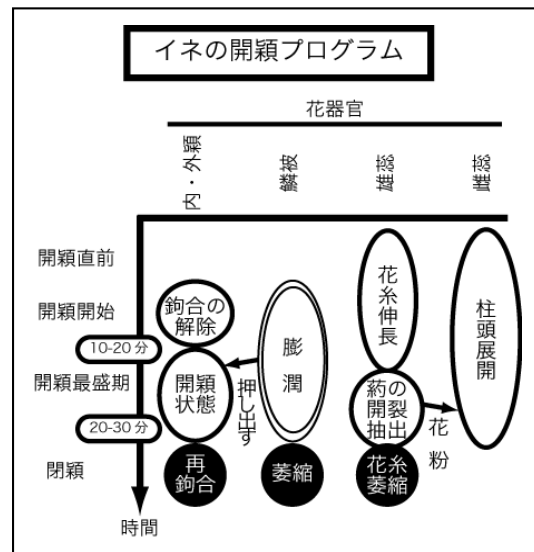
栽培イネ品種の多くにおいては、開花直前に葯が開裂して花粉が柱頭に降りかかるため自家受粉が基本であるが、開花時に雄蕊を花の外に抽出して花粉を放出するため、通常1%以下の低い割合で自然交雑する。このような性質は、ハイブリッド育種の効率や遺伝子組換えイネの花粉飛散防止技術の安定性などに大きな影響を与える重要な要素の一つである。



イネの開花においては、開穎から閉穎までのわずか1~2.5時間ほどの間に下記の諸段階が進行する。

- 1) 開花に先立って雄蕊の花糸が伸び始めるとともに、直立していた柱頭が左右に開き始める。
- 2) 鱗被が膨潤するとともに、開花前には固く閉じていた内・外穎の鈎合部が解除され、鱗被が外穎を押し出す。このため、内・外穎の先端が25~30°の角度まで開く。これが開穎最盛期で、開穎が始まってからわずか10~20分後のことである。
- 3) 花糸がさらに伸長し、内・外穎の先端部に到達していた葯が開穎部から抽出する。抽出直前に葯壁が破れて、多くの花粉が自花の柱頭に降り注ぐ。
- 4) 花糸はさらに伸長を続け、長さ6~8mmに達し、穎外に出た葯は空中に花粉をまき散らす。放出された花粉は風で運ばれて、自花や他花の雌蕊に達する。
- 5) 開穎最盛期の20~30分後には、花糸は通水機能を失い、萎縮する。同様に鱗被が萎縮するため、外穎がもとの位置に戻り、閉穎が完了する。一度閉じた穎は二度と開かない。

こうしたステップは高度に統御され、整然と進行していくが、中でも、鱗被の膨潤は開穎を引き起こす最大の推進力である。鱗被は外穎の内側に位置し、双子葉植物の花弁に相当する花器官である。内部に発達した維管束群と膨張可能な柔細胞を併せ持つ鱗被は、開花時に流入する水分によって体積を増加させ、外穎を外へ押し出す。鱗被に関する変異体や組換え体が閉花性となることはすでにいくつか報告されているが、鱗被以外の開穎制御因子についてはほとんど報告がない。開穎の制御機構を包括的に理解するために



は、開穎に異常を示す変異体を用いた解析によって、開穎装置の構築・制御にかかわる因子を明らかにすることが有効である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、開穎しない変異体、すなわち閉花性変異体群の解析により、開穎プログラムの構成要素を明らかにするとともに、原因遺伝子を同定する。

閉花受粉性変異体 *spw1-cl5* では、鱗被が穎状器官へと転換して膨潤能を失うため、開穎しない。また、*mfo1* 変異体では、鱗被を含む内部花器官の形態異常に加え、内穎が外穎化するため、内・外穎の鈎合部が形成されない。このように、開穎装置の構築因子に関する変異体はいくつか知られているものの、その全貌は未だ明らかでなく、さらには開穎運動を統御する因子に関しては変異体の報告がない。

一方では、これまで未知の開穎制御因子の変異により、鱗被の形態異常が観察されないにもかかわらず閉花性となる新規変異体群の存在が予想される。

これらの変異体の解析によって、開穎に関わる花器官の新規形態形成因子、水分子や糖の輸送、あるいは細胞伸長などに関わる開穎運動制御因子、あるいは環境条件と開穎運動を結びつける因子など、新たな因子の意義が明らかにされる。得られた知見を応用することによって、ハイブリッド育種の効率化や閉花受粉性の安定化などの効果が期待される。特に、閉花受粉性については、*spw1-cl5* のような鱗被の形態変化とは異なる要因による閉花受粉性変異体及び変異遺伝子が同定されるため、安定的な遺伝子組換えイネの交雑防止技術の確立が期待される

3. 研究の方法

(1) 新規閉花性変異体を探索し、その花の形態変化を詳細に観察することにより、開穎プログラムのどのステップに異常を生じたものかを解析する。

(2) 上記の変異体と *spw1-cl1* との二重変異体を作成し、原因遺伝子間の遺伝的相互作用を明らかにする。

(3) 上記変異体の原因遺伝子のマッピング・同定を行う。

これらの解析を通じて、開穎に関わる構造の形成や開穎運動の制御に関わる因子を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 開穎機構に関連する新たな変異体の探索

spw1-cl1 は鱗被のアイデンティティ喪失により、開穎できなくなった変異体（閉花性変異体）であるが、*spw1-cl1* とは異なるメカニズムによる変異体の取得を目的としてスクリーニングを行った。化学変異原である EMS により変異体集団を作成し、新たな閉花性変異体候補 29 系統を見出した。さらにこれらの変異体の閉花性を再評価し、8 系統を新規閉花性変異体として同定した。

一方、*spw1-cl1* を EMS 処理して得た M2 世代を圃場で栽培し、*spw1-cl1* の表現型を抑制あるいは亢進する変異体（サプレッサーまたはエンハンサー）のスクリーニングを行い、候補系統を得た。これらの候補系統は、開穎制御機構の研究材料としてだけでなく、安定的な閉花受粉性系統としての実用も期待される。

(2) *spw1-cl1* の同定とその分子機構

上記の変異体のうち 1 系統では *spw1-cl1* と同様に鱗被の伸長が観察され、閉花受粉性を示した。解析の結果、同変異体は *spw1* の新規ミスセンスアレルであることが明らかとなったので、既報のアレルを *spw1-cl1*、新規アレルを *spw1-cl2* と呼ぶことにした。酵母ツーハイブリッドアッセイを行ったところ、*cls1* 型 SPW1 タンパクがパートナータンパク質である MADS2 と結合できないのに対し、*cls2* 型 SPW1 は正常に MADS2 と結合した。しかし、*cls2* 型 SPW1 と MADS2 とのヘテロ二量体は、標的 DNA 配列 (CARG ボックス) への結合能が低く、このことが閉花性の原因と考えられた。

(3) 新規閉花受粉性変異体の作用機作の解析

残り 7 系統の閉花性変異体では鱗被のアイデンティティは変化していなかった。また、正常な鱗被はオーキシン処理によって膨潤するが、*spw1-cl1* や *spw1-cl2* では膨潤しない。これに対し、上記 7 系統の変異体では、鱗被の膨潤も観察されたため、鱗被形成以外のステップにおける異常によって閉花性となったものと考えられた。

(4) H193mt および短粒型閉花性変異体群の解

析

新規変異体のうち、「北陸 193 号」由来の閉花性変異体（略称：H193mt）の原因遺伝子のマッピングを進め、第 1 染色体上の 250kb に候補領域を狭めた。今後、遺伝子の単離を進め、未知の開穎機構を明らかにしたい。

H193mt はやや短粒の性質を示すため、既知の短粒型変異体「関東 PL14」との対立性検定を行った。H193mt/関東 PL14 の F1 は開花性となり、両変異体の原因遺伝子は異なると考えられた。

H193mt および関東 PL14 が閉花性を示したことから、さまざまな短粒変異体を網羅的に栽培し、短粒性 = 閉花性となるかどうかを検証した。その結果、円粒形で鱗被の小さい一部の短粒変異体だけが閉花性を示し、粒形と閉花性との間に厳密な因果関係があることが示された。H193mt はこのカテゴリーには含まれず、既知の短粒型閉花性変異体とは異なるものと考えられた。今後さらに H193mt の原因遺伝子の単離を進める。

また、「たちすがた」由来の新規閉花性変異体 TMT-C27 の原因遺伝子についてもマッピングを進め、第 9 染色体上に候補領域を見出した。同遺伝子についても単離を進め、開穎制御機構の理解を深めたい。

(5) イネの開穎装置形成における *MADS32* の機能

MADS ボックス型転写因子をコードする *MADS32* 遺伝子は花器官形成時期に発現するため、RNAi によって発現を抑制し、開穎装置形成における機能を探った。*MADS32* の発現抑制体では、内穎が横方向に拡大して外穎との鉤合部が消失するとともに、鱗被の伸長および増加、花柱の増加などが観察された。

MADS32 発現抑制体の表現型は *mfo1* や *lhs1* などの変異体と部分的に類似していたため、*MADS32* の発現抑制力セットを *mfo1* や *lhs1* の弱いアレルに導入したところ、穎状器官の増加、鱗被の穎化などが促進された。また、レポーター遺伝子解析を行ったところ、*MADS32* 遺伝子は内穎が外穎と鉤合する領域（内穎周縁部）で発現していた。

以上の結果から、*MADS32* は *MFO1* や *LHS1* と協調して内外穎の鉤合部を構築する新たな開穎装置形成遺伝子であることが明らかとなった。

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 7 件)

Kobayashi K., Yasuno N., Sato Y., Yoda M., Yamazaki R., Kimizu M., Yoshida H., Nagamura Y. and Kyojuka J. Inflorescence Meristem Identity in Rice Is Specified by Overlapping Functions of Three *AP1/FUL*-Like MADS

Box Genes and *PAP2*, a *SEPALLATA* MADS Box Gene. *Plant Cell* (2012) 24(5), 1848-1859、査読有
DOI: 10.1105/tpc.112.097105

Ohmori S., Tabuchi H., Yatou O. and Yoshida H. Agronomic traits and gene containment capability of cleistogamous rice lines with the *superwoman1-cleistogamy* mutation. *Breeding Science* (2012) 62(2), 124-132、査読有
DOI: 10.1270/jsbbs.62.124

Yoshida H. Is the lodicule a petal: Molecular evidence? *Plant Science* (2012): 184,121-128、査読有
DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.12.016

Tabuchi H., Zhang Y., Hattori S., Omae M., Shimizu-Sato S., Oikawa T., Qian Q., Nishimura M., Kitano H., Xie H., Fang X., Yoshida H., Kyozuka J., Chen F. and Sato Y. *LAX PANICLE2* of rice encodes a novel nuclear protein and regulates the formation of axillary meristems. *Plant Cell* (2011) 23(9), 3276-3287、査読有
DOI: 10.1105/tpc.111.088765

Yoshida H. and Nagato Y. Flower development in rice. *Journal of Experimental Botany* (2011) 62(14), 4719-4730、査読有
DOI: 10.1093/jxb/err272

[学会発表](計16件)

大森伸之介、大東健太郎、岩崎巨典、佐藤弘一、岡本和之、山崎周一郎、高橋利和、望月篤、藤代淳、野村研、上野直也、細井淳、新井利直、中澤伸夫、矢ヶ崎和弘、鈴木亨、佐藤秀人、加藤満、水上優子、吉田朋史、山川智大、松井崇晃、蛭谷武志、小林大樹、笹倉康弘、田野井真、矢頭治、吉田均、各地で栽培した *spw1-clis* 変異を持つ閉花受粉性イネ系統の開花率と開花/閉花予測地図の試作、日本作物学会 2014.03.29-30 千葉市

Ohmori S., Tabuchi H., Yatou O., Hayashi T., Yamaguchi T., Koike S., Kuroki M., Shimizu H., Ikegaya T. and Yoshida H. Transgene containment using rice cleistogamous mutation. MARCO-FFTC Joint International Workshop 2013 Benefits and Risks of Genetically Modified Food Crops in Asia, 2013.10.9-10, Tsukuba

大森伸之介、吉田均、閉花受粉性イネの開花と利用 ～イネ閉花受粉性突然変異 *superwoman1-cleistogamy* を中心に～、平成 25 年度中央農研シンポジウム「穂・穎花(えいか)を改良するイネのデザイン育種にむけて」2013.11.13 東京都

吉田均、三浦孝太郎、岩崎行玄、北野英己、イネの穎花の形態と閉花性の関係、日本育種学会 2013.3.21-22 仙台市

吉田均、大森伸之介、矢頭治、イネの閉花受粉性の分子機構、日本育種学会 2013.10.12-13 鹿児島市

大森伸之介、秋山高、田淵宏朗、吉田均、閉花受粉性イネ準同質遺伝子系統の特性解析、日本育種学会 2013.3.27-28 東京

大森伸之介、佐藤弘一、岡本和之、山崎周一郎、高橋利和、望月篤、野村研、上野直也、細井淳、新井利直、鈴木亨、佐藤秀人、加藤満、水上優子、山川智大、松井崇晃、蛭谷武志、小林大樹、田野井真、矢頭治、吉田均、東北・関東・東海・北陸の各地で栽培した *spw1-clis* 変異を持つ閉花受粉性イネ系統の開花率、日本作物学会 2012.9.10-11 仙台市

姚善国、木水真由美、大森伸之介、吉田均、Bクラス遺伝子の改変によるイネの閉花化、日本育種学会 2012.9.14-15 京都市

Ohmori S., Kuroki M., Koike S., Hayashi T., Yamaguchi T., Yatou O. and Yoshida H. Characterization of two novel rice cleistogamous mutants. The Monsoon Asia Agro-Environmental Research Consortium Symposium 2012 Workshop 2: Biosafety and issues facing the development of Genetically Modified Crops in Monsoon Asia :Current status and Future aspects 2012.9.25-27, Tsukuba

Yoshida H., Ohmori S., Tabuchi H. and Yatou O. A rice cleistogamous mutant *spw1-clis1*: a practical tool for transgene containment. The Monsoon Asia Agro-Environmental Research Consortium Symposium 2012 Workshop 2: Biosafety and issues facing the development of Genetically Modified Crops in Monsoon Asia :Current status and Future aspects 2012.9.25-27, Tsukuba

Yoshida H., Yao S.-G., Kuroki M., Lombardo F., Kimizu M., Ohmori S., Hayashi T., Koike S. and Yatou O.
Fine-tuning the phenotype; alteration of lodicule morphology by manipulating B-class genes in rice. JAPAN-CHINA Joint Meeting on Rice Developmental Biology 2013.3.8-10, Beppu

大森伸之介、黒木慎、小池説夫、林高見、山口知哉、矢頭治、吉田均、北陸 193号由来の新規閉花受粉性突然変異体の解析、日本育種学会 2012.03.30 宇都宮市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 均 (YOSHIDA, Hitoshi)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所・稲研究領域・主任研究員
研究者番号：3 0 3 5 5 5 6 5

(2) 研究分担者

大森 伸之介 (OHMORI, Shinnosuke)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター・作物開発研究領域・研究員
研究者番号：5 0 3 9 1 4 3 8

矢頭 治 (YATOU, Osamu)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター・作物開発研究領域・研究領域長
研究者番号：5 0 3 5 5 5 7 5