

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580009
 研究課題名（和文） 温度感応により引き起こされるイネ雄性不稔の分子基盤
 研究課題名（英文） Molecular Mechanisms for Rice Male Sterility under High Temperature Conditions
 研究代表者
 川岸 万紀子（KAWAGISHI MAKIKO）
 農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所・稲遺伝子技術研究チーム・主任研究員
 研究者番号：50355707

研究成果の概要：

小孢子期の高温により著しく発現量の低下する遺伝子群の発現抑制解析の結果、CYP703 遺伝子が正常な稔実には必須であることが明らかとなった。この遺伝子の発現の組織特異性と高温応答性を確認し、現在その制御領域を解析している。また、温度感受性雄性不稔系統 PL12 に関しては、制限温度下では小孢子期前期頃に形態の異常が観察された。原因遺伝子の単離を目指してマッピングを行い、約 360kb の領域にまで候補が絞られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：不稔，環境応答，遺伝子発現制御，イネ，花粉

1. 研究開始当初の背景

作物の結実には、それぞれの作物に適した気候条件が必要であるが、気温や雨量などが至適条件からはずれ、収量や品質が低下することがよく報告されている。植物の生活環の中でも、生殖期は環境条件に最も敏感であり、不良環境下では不稔が引き起こされる。作物の稔実率を低下させる多様な気象要因のなかでも、高温ストレスに関しては、温暖化の進行に伴って被害の拡大が懸念されている。本研究では、イネの高温不稔に着目し、温度の感知から最終的に不稔となるまでの

過程において、どのような分子制御機構が働いているのかを明らかにすることを目的とする。

イネの雄性不稔については古くから解析されてきている。特に冷害については詳細な解析が行われており、穂ばらみ期に低温にあたると、タペートが肥大し、花粉の発達不良、葯の不裂開が起こって不稔となる。イネの高温障害については未解明の点が多いが、主に開花期、次いで穂ばらみ期の高温が稔実率の低下を引き起こすことが知られている（Satake & Yoshida, *Japan Jour. Crop*

Sci.17:6-17, 1978)。高温の影響を受けやすい生育時期や器官などに冷温障害の場合との共通性がみられ(西山, 日作紀 52: 108-117, 1983)、高温に対する応答の研究から、生殖反応における環境応答の基本メカニズムの解明へとつながることが期待される。

2. 研究の目的

(1) 高温によるタペートの変化の解析

これまでの解析から、四分子期から小胞子期の初め頃にあたる時期のイネに、2日間の高温処理(昼 39°C/夜 30°C)を施すと、その後常温に戻しても不稔となることがわかっている。高温処理開始2日後の葯において、同時期の無処理サンプルに比して発現量が著しく低下する一群の遺伝子を見いだした。これらのなかで、発現量の変動パターンが特徴的な遺伝子について調べたところ、タペート組織に強く発現する性質があることがわかった。これらのことから、「高温によりタペート組織の崩壊が早まり、未成熟段階でのタペート組織の崩壊が花粉稔性の低下を引き起こす」という仮説を立てた。タペート組織の観察とタペート特異的遺伝子のノックダウン解析を行うことにより、この仮説を検証し、不稔の分子機構に迫る。

(2) 温度感受性雄性不稔系統の解析

育種的利用の観点から、各地で多種類のイネ雄性不稔系統が育成されてきている。本研究で解析する温度感受性雄性不稔系統(以下 PL12 と略記)は、申請者の所属する研究所で育成されたもので、日中の最高気温が 25°C の条件では正常に結実するが、31°C 以上では花粉が形成されず不稔となる。PL12 は、原品種にガンマ線を照射して得られた集団より選抜された変異体で、その遺伝様式から劣性の単因子により支配されていると考えられている。また、高温に感受性となる時期は、出穂前 20 日前後の数日間であり、それ以外の時期の高温は影響しないことがわかっている(Yamaguchi Y. et al., *Breeding Science*, 1997)。この感応期は、穎花原基分化期から花粉母細胞分化期に相当し、この時期に機能すべき遺伝子が高温にさらされることによって機能を失い、それが花粉の消失につながるものと考えられる。この変異体の表現型を詳しく解析するとともに、原因遺伝子の特定を目指し、稔実花粉の発達機構の解明につなげたい。

3. 研究の方法

(1) 高温によるタペート組織の変化に関する解析

高温処理2日後のイネの葯における遺伝

子発現量の変動解析より、タペート組織特異的と考えられる一群の遺伝子の発現量が著しく低下していることがすでにわかっている。そこで、タペート組織が通常より早く消失しているのかどうかを明らかにするため、高温処理直前、1日後、2日後、というように経時的に葯の組織切片を作製し、顕微鏡観察を行う。また、2日間の高温処理の直後には形態的な変化が認められないが、最終的には不稔となることから、高温にさらされたことによる影響が、時間の経過にともなって、どのように顕在化してゆくのかを知るために、高温処理後の花粉や葯壁細胞などの形態も観察する。

次に、タペート組織の崩壊の鍵となる遺伝子を探索するため、高温処理開始2日後に発現量が著しく低下する遺伝子について、個々の遺伝子ノックダウン解析を行い、高温処理と同様の不稔が引き起こされるかを解析する。1つの遺伝子の発現量が低下した形質転換体において、稔実性が正常なら、その遺伝子の発現量の低下と不稔性との間に直接の因果関係がないと考えられる。逆に、ある特定の遺伝子の発現量を低下させると不稔になるという場合には、その遺伝子が、高温処理による不稔において中心的な役割を果たしている可能性が考えられる。

作出したタペート特異的遺伝子のノックダウン系統の中に、不稔となるものがある場合には、まず、その形質転換体において、高温処理の場合と同じように、タペート組織の変化やタペート特異的遺伝子群の発現量の変動がみられるかどうかを調べる。また、その遺伝子の発現量の低下が不稔を引き起こすことから、正常な稔実に重要な役割を果たす遺伝子であると考えられるので、その遺伝子の機能特性を解析するとともに、通常の状態での発現特性を調べる。さらに、類似遺伝子や相互作用する遺伝子などについても探索する。

2日間の高温処理のうちに、何らかの回復不能のダメージを受け、それが最終的に不稔となってあらわれると考えられるが、高温処理直後には、葯や花粉の形態的な変化は見られない。そこで、高温処理から開花時期までの間に、花粉や葯壁細胞などがどのように変化してゆくのかについての解析を行う。高温処理後の葯より、経時的に RNA を調製するとともに、組織切片の顕微鏡観察を行い、遺伝子発現パターンと葯や花粉の形態的变化の関係を調べ、不稔性の指標となる変化を、遺伝子レベルと組織形態のレベルで特定する。

(2) 温度感受性雄性不稔系統の解析

温度感受性雄性不稔系統 PL12 の表現型を詳しく解析する。感応期である出穂前 20 日

頃から開花期に至るまでの期間、許容温度と制限温度とで栽培した変異体より葯の組織切片を作製し、比較解析する。どの時期のどの組織に変化が観察されるかを調査する。

また、原因遺伝子を特定するため、マッピングを行う。PL12 と交配する品種の条件として、多型が検出されやすいこととともに、日印交雑による不稔の影響ができるだけ小さいこと、を考慮して、インド型品種 Dular を選定した。平成 18 年度に、PL12 と Dular の交配を行って、F1 種子を得ている。PL12 の原因遺伝子は、7 番染色体上にあると推定されているので、それをまず確認し、F2 集団をできるだけ大きく展開して、候補領域を狭めることを目標とする。

4. 研究成果

(1) 高温によるタペート組織の変化

① タペートの崩壊時期

高温により著しく発現量の低下する遺伝子群がマイクロアレイ解析の結果から同定されたが、それらの多くがタペートに強く発現する性質をもつことから、高温により、タペートが通常より早く崩壊する可能性が考えられた。そこで、高温処理後の葯の組織切片を用いて、タペート組織の観察を行うとともに、既知のタペート特異的遺伝子について、高温による発現変動を個別に解析した。

図 1 に一例を示すが、調べた 3 つの遺伝子はいずれも高温には応答せず、無処理の場合と同等の発現を示した。このことから、すべてのタペート特異的遺伝子が高温処理により低下するわけではなく、一部の遺伝子が特異的な制御を受けていると考えられ、タペート組織そのものが早期に崩壊するのではないと考えられた。組織切片の顕微鏡観察においても、タペート組織の早期崩壊を示唆するデータは得られなかった。以上の結果をまとめて、小孢子期の高温処理は、タペート組織の崩壊時期には影響を与えないものと考えられた。

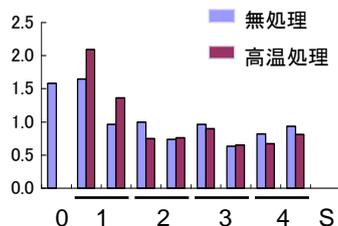


図 1. 既知のタペート特異的遺伝子の高温応答性の例
0: 高温処理直前の葯. 1-4: 高温処理

日数後の葯と対応する無処理葯. S: 高温処理 4 日後の幼植物体と対応する無処理幼植物体.

それぞれ独立に高温処理した植物を用い、2 回の反復実験を行った。各遺伝子について、第 1 回の実験での 2 日後の無処理の葯での mRNA レベルを 1 とした相対値で表す。

③ ノックダウン解析

高温により著しく発現量の低下する遺伝子群について、個々にノックダウン解析を行った。これまでに調べた 5 つの遺伝子のうち、CYP703 をコードする遺伝子については、発現抑制により、花粉の発達が阻害され不稔となることがわかった。発現抑制系統の葯の組織切片の顕微鏡像を図 2 に示す。

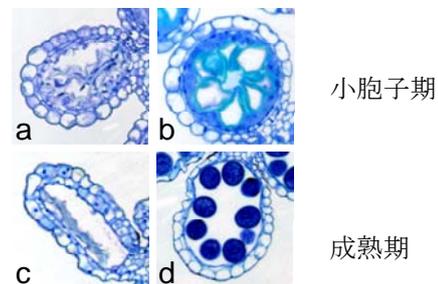


図 2. CYP703 発現抑制系統の表現型
a, c; CYP703 発現抑制系統
b, d; 野生型

CYP703 遺伝子の高温に対する応答性を確認したところ、無処理の場合には 0 日から 2 日後くらいまでの発現が見られるところ、高温処理 1 日以内に検出限界程度まで発現が低下することがわかった (図 3)。また、CYP703 遺伝子の発現の組織特異性を調べたところ、未成熟の葯に特異的に発現することが示された (図 4)。これらの発現様式は、マイクロアレイの結果から同定された一群の遺伝子と同様であった。

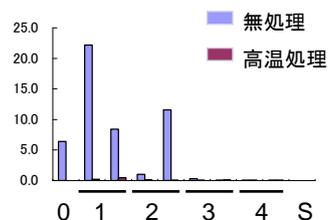


図 3. CYP703 遺伝子の高温応答性
図 1 と同様

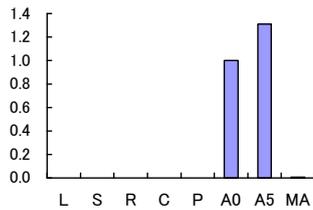


図4. *CYP703* 遺伝子の発現の組織特異性
L, 葉; S, 幼植物体; R, 根; C, カルス; P, 雌蕊; A0, 葉耳間長 0cm の時期の葯; A5, 葉耳間長 5cm の時期の葯; MA, 成熟期の葯. A0 における mRNA レベルを 1 とした相対値で表す。

CYP703 遺伝子は、シロイヌナズナにおいては、花粉の表層構造を構築するのに必要なスポロポレニンの合成に関与することが示されており、イネでも同様の機能を担う可能性がある。今後は、高温により、花粉の構造がどのように変化するのかに着目しながら、*CYP703* 遺伝子と関連遺伝子の高温不稔における役割を解析してゆく予定である。なかでも、*CYP703* 遺伝子の発現特性を規定する制御領域の解析から、高温応答における転写制御のしくみを明らかにしたい。

(2) 温度感受性雄性不稔系統

① 制限温度下での葯と花粉の形態

温度感受性雄性不稔系統 PL12 を許容温度 (27°C) と制限温度 (33°C) で育成し、葯の発達過程のどの段階で形態異常が観察されるかを調べた。その結果、減数分裂

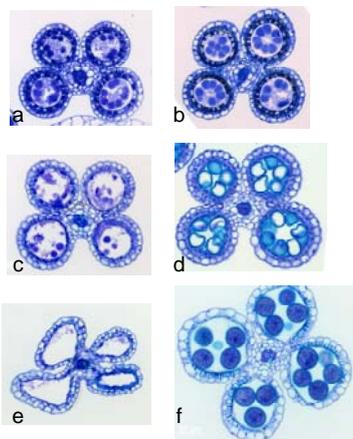


図5. PL12 の葯の形態
a, c, e; 制限温度 (33°C)

b, d, f; 許容温度 (28°C)

a, b; 小孢子期初期

c, d; 小孢子期後期

e, f; 成熟期

前、減数分裂期、減数分裂後の四分子の時期までは、許容温度下と制限温度下との条件の違いによる形態の差異は見つからなかった。しかし制限温度下では、図5に示すように、小孢子期以降に小孢子的形態に異常が認められ、本来液胞化が起こるべき時期には小孢子的形がくずれて崩壊しはじめる様子が観察された。成熟期にあたる時期には、葯のなかに花粉粒のようなものが全くない「カラ」の状態になった。今後は、小孢子前期に小孢子的球状の形態が崩れる過程を、細胞壁の構造や細胞内構造などに着目しながら詳しく観察する予定である。

② 原因遺伝子のマッピング

PL12 とインド型品種 *Dular* との交配より得られた F2 の 1500 個体を調査した。現在までの結果をまとめて図6に示しているが、第7番染色体の約 360kb の領域に原因となる変異があると推定された。この領域内には、多数の ORF が予測されており、原因遺伝子の特定のために、現在もさらにマッピングを進めている。

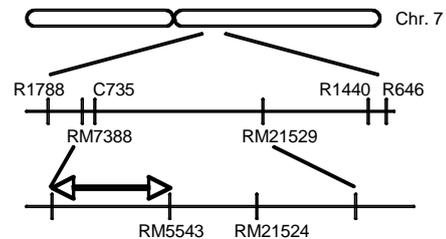


図6. PL12 の原因遺伝子のマッピング
矢印で示した部分が候補領域

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 Suwabe, K., Suzuki, G., Takahashi, H., Shiono, K., Endo, M., Yano, K., Fujita, M., Masuko, H., Saito, H., Fujioka, T.,

Kaneko, F., Kazama, T., Mizuta, Y., Kawagishi-Kobayashi, M., Tsutsumi, N., Kurata, N., Nakazono, M. and Watanabe, M. (2008) Separated transcriptomes of male gametophyte and tapetum in rice: validity of a laser microdissection (LM) microarray. *Plant Cell Physiol.* 49: 1407-1416. (Refereed)

- ② Oshino, T., Abiko, M., Saito, R., Ichiishi, E., Endo, M., Kawagishi-Kobayashi, M. and Higashitani, A. (2007) Premature progression of anther early developmental programs accompanied by comprehensive alterations in transcription during high-temperature injury in barley plants. *Mol. Genet. Genom.* 278: 31-42. (Refereed)

[学会発表] (計 6件)

- ① Kaneko, F., Suwabe, K., Yano, K., Fujioka, T., Park, J.-I., Kikuchi, S., Hamada, K., Endo, M., Nagano, K., Nagamura, Y., Kawagishi-Kobayashi, M., Suzuki, G., and Watanabe, M. Morphological and gene expression analysis of rice anther development under low temperature condition, *Plant and Animal Genome 2009*, San Diego, USA, January, 10-14, 2009.
- ② 川岸万紀子, 遠藤誠, 佐藤繭子, 豊岡公德, 大島正弘, 東谷篤志, 渡辺正夫: 高温によるイネ雄性不稔における遺伝子発現制御. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008年12月9日-12日.
- ③ 川岸万紀子: イネの高温不稔における遺伝子発現制御. 2008年国立遺伝学研究所研究集会, 三島, 2008年11月5日-6日.
- ④ 金子英未, 諏訪部圭太, 矢野健太郎, 藤岡智明, Park Jong-In, 菊地俊介, 濱田和輝, 遠藤誠, 永野邦明, 長村吉晃, 川岸万紀子, 鈴木剛, 渡辺正夫: 低温ストレスに対するイネ雄性生殖器官の形態および遺伝子発現プロファイル. 日本育種学会第114回講演会, 彦根, 2008年10月11日-12日.
- ⑤ 川岸万紀子, 遠藤誠, 土屋亨, 大島正

弘, 東谷篤志, 渡辺正夫: 高温により誘導されるイネ雄性不稔における遺伝子発現制御. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007年12月11日-15日.

- ⑥ Endo, M., Tsuchiya, T., Higashitani, A., Watanabe, M. and Kawagishi-Kobayashi, M. Alterations in gene expression in rice anther under high temperature stress conditions. The 5th International Symposium of Rice Functional Genomics, Tsukuba, Japan, October, 15-17, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川岸 万紀子 (KAWAGISHI MAKIKO)
農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所・稲遺伝子技術研究チーム・主任研究員

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

東谷 篤志 (HIGASHITANI ATSUSHI)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授

渡辺 正夫 (WATANABE MASAO)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授