

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780003

研究課題名（和文） イネ胚乳初期発生の細胞化と生殖隔離における *OsMADS87* 遺伝子の機能解析研究課題名（英文） Analysis of *OsMADS87* in the control of cellularization and reproductive barrier in the endosperm obtained from rice interspecific crosses

研究代表者

石川 亮 (RYO ISHIKAWA)

神戸大学大学院・農学研究科・助教

研究者番号：70467687

研究成果の概要（和文）：

栽培イネと野生イネを用いた種間交雑では、いくつかの組み合わせで胚乳発生に異常が生じる。これらの雑種胚乳の解析から同定されたシロイヌナズナ *PHERES1* と相同性の高い *OsMADS87* について定量 PCR により詳細に調べた。その結果、胚乳発生が抑制される交雑組み合わせでは発現が低く、胚乳発生が促進された交雑組み合わせでは高くなっており、細胞化のタイミングと発現量に相関がみられた。*OsMADS87* 遺伝子を過剰発現・機能抑制する形質転換体を作成し胚乳発生について観察したが、顕著な影響は見られなかった。*OsMADS87* 遺伝子には複数のファミリー遺伝子が存在することから、これらが協調して胚乳発生を制御している可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Endosperm often exhibits developmental defects when interspecific or interploidy crosses are conducted. Analysis of transcriptome using RNA from hybrid endosperm identified deregulation of rice homologs of *Arabidopsis PHERES1* gene family. In the detailed analysis of *OsMADS87* expression, it was found that *OsMADS87* expression levels were correlated with the timing of cellularization. These results suggest that possible involvement of regulatory systems of *PHERES1* gene family in post-zygotic barrier of early endosperm development. Analysis of transgenic plants with overexpression or RNAi constructs were also carried out, however, not significant effect was observed in their endosperm development. It might be possible that several *OsMADS87* family genes are also involved in the control of early endosperm development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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：栽培イネ・野生イネ・胚乳・生殖隔離

1. 研究開始当初の背景

胚乳は可食部であり、品質・重量を制御する育種学的研究は古くから行われている。胚乳では、種間・倍数体間交雑において受精後

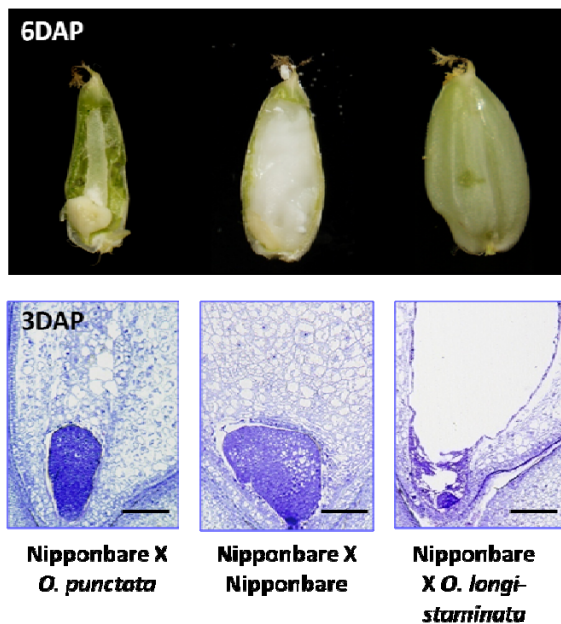
まもなく異常が観察されることが多く、胚乳初期発生が生殖隔離の対象や、種子形成において重要な役割を果たしていることは古くから指摘されていた。しかしながら、胚乳初

期発生における分子レベルの解析はほとんど行われていなかった。

栽培イネ (*O. sativa*; 日本晴) を母親、野生イネ (*O. punctata*) を父親として交雑すると胚乳発生が抑制された種子を形成する (図1)。一方、栽培イネ (*O. sativa*; 日本晴) を母親、野生イネ *O. longistaminata* を父親として交雑すると胚乳が過剰増殖した発生異常が生じる (図1)。このような胚乳発生異常の種子は自然界において発芽が阻害されることから、生殖隔離機構として働いていることが考えられる。この原因として、ゲノムインプリンティングの制御機構が関与していることが近年議論されていた。

課題開始前の実験から、日本晴自殖胚乳と *O. longistaminata* との雑種胚乳を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、雑種胚乳で強く発現誘導を受ける因子の中に、Type I MADS-box である *OsMADS87* が同定された。*OsMADS87* はこれまでにシロイヌナズナで同定された *PHERES1* と同じクレードに分類される (Arora et al., 2007, BMC Genomics)。 *PHERES1* は、ポリコム複合体構成因子の変異体 (*mea*, *fis2*, *fie*) で発現が上昇し、胚乳発生を促進する因子として同定されている (Köhler et al., 2003 Gens&Dev.)。しかしながら、*PHERES1* と細胞化の関連性については一切明らかになっていなかった。

図1. イネ種間交雑における胚乳発生



上段：受精後6日目(6DAP)における種子画像。Nipponbare x *O. punctata*, Nipponbare x Nipponbare は横断面。*O. sativa* x *O. longistaminata* の種子内部は細胞化しておらず、胚乳発生が促進されている。

下段：受精後3日目における樹脂切片の画像 Bars=100 μ m Nipponbare x *O. punctata* では細胞化が早くみられ、Nipponbare x *O.*

longistaminata では細胞化が見られていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、細胞化を介した胚乳初期発生の制御に *OsMADS87* が関与していることを検証し、*OsMADS87* の詳細な発現解析から、細胞化を基点とした胚乳初期発生、種子形態との関連を明らかにすることを目的とした。また、過剰発現・機能抑制形質転換体を用いて、*OsMADS87* 遺伝子の機能解析を行い、胚乳に見られる生殖隔離機構との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *OsMADS87* 遺伝子の詳細な発現解析

イネ種間交雑における *OsMADS87* 遺伝子の発現パターンを詳細に解析するために、受精後1, 2, 3, 5, 7日目に胚乳を回収しRT-PCRを行った。また、リアルタイムPCRを用いて、*OsMADS87* 遺伝子の発現を定量した。受精後1, 2日目は胚乳が小さく回収できないため、子房の中央部を選択的にまとめて回収した。

(2) *OsMADS87* 遺伝子の過剰発現・機能抑制形質転換体の作出

OsMADS87 遺伝子の胚乳における機能を解析するためにMaize UBQプロモーターによる過剰発現、RNAiによる機能抑制形質転換体を作成した。また胚乳特異的に *OsMADS87* の機能抑制が生じるように胚乳特異的な発現が見られる *OsFIE1* 遺伝子のプロモーターを用いて形質転換体を作成した。

4. 研究成果

(1) *OsMADS87* 遺伝子の詳細な発現解析

受精後の胚乳を回収し、RNA抽出を行った。*O. sativa* Nipponbare 間の自殖種子では、*OsMADS87* 遺伝子は受精後2日目に強く発現していたが、細胞化が生じた3日目以降はその発現は見られなかった。一方、細胞化が早く見られたNipponbareと *O. punctata* との交雑種子では *OsMADS87* の発現は比較的強く抑えられており、また細胞化の遅れたNipponbareと *O. longistaminata* との交雑種子では逆に *OsMADS87* 遺伝子の発現が強く誘導されていた。これらの結果から、種間交雑において見られた胚乳の細胞化のタイミングの違いと *OsMADS87* 遺伝子の発現量に相関がみられた (図2)。

これら *OsMADS87* 遺伝子の生育ステージ別の詳細な発現データに加えて、共焦点顕微鏡を用いた解析から種間交雑時に見られる胚乳発生異常には細胞分裂の異常が関与していないことを明らかにした。以上の結果を合わせて、論文にまとめた。

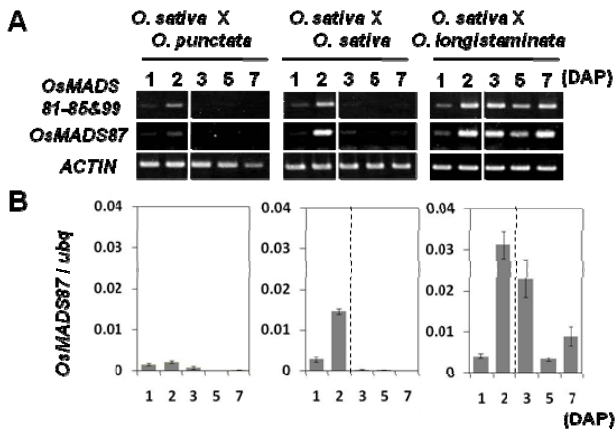


図2. *OsMADS87* 遺伝子、およびそのファミリー遺伝子 (*OsMADS81-85, 99*) の発現解析

A: RT-PCR, B: リアルタイム PCR

(2) *OsMADS87* 遺伝子の過剰発現・機能抑制形質転換体の解析

作出した *OsMADS87* 遺伝子を強制発現・機能抑制させる形質転換体を用いて、胚乳発生への影響について調査を行ったが、胚乳は正常であり顕著な影響は見られなかった。*OsMADS87* 遺伝子についてはゲノム中に複数のファミリー遺伝子が存在することから、これらファミリー遺伝子との作用について精査を行う必要がある。

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7件)

- 1, Ryo Ishikawa, Tomoko Shinomura, Makoto Takano and Ko Shimamoto
Phytochrome dependent quantitative control of *Hd3a* transcription is the basis of the night break effect in rice flowering
Genes & Genetic Systems 84: 179-184 (2009) 査読有
- 2, Takashi Hiraoka, Nobuyuki Ikeda, Ryo Ishikawa and Takashige Ishii
Evaluation of genetic diversity among rice local varieties in Vietnam
Journal of Crop Research 54: 125-130 (2009) 査読有
- 3, Ryo Ishikawa and Tetsu Kinoshita
Epigenetic Programming: The Challenge to Species Hybridization
Molecular Plant 2: 589-599 (2009) 査読有
- 4, Ryo Ishikawa, Pham Thien Thanh, Naoto

Nimura, Than Myint Htun, Masanori Yamasaki, Takashige Ishii

Allelic interaction at seed-shattering loci in the genetic backgrounds of wild and cultivated rice species

Genes & Genetic Systems 85: 265-271 (2010) 査読有

- 5, Pham Thien Thanh, Phuong Dang Thai Phan, Ryo Ishikawa, Takashige Ishii
QTL analysis for flowering time using backcross population between *Oryza sativa* Nipponbare and *O. rufipogon*
Genes & Genetic Systems 85: 273-279 (2010) 査読有

- 6, 藤本龍, 石川亮
エピジェネティクスが制御する植物の形質
育種学研究 12: 123-131 (2010) 査読有

- 7, Pham Thien Thanh, Phuong Dang Thai Phan, Naoki Mori, Ryo Ishikawa and Takashige Ishii
Development of backcross recombinant inbred lines between *Oryza sativa* Nipponbare and *O. rufipogon* and QTL detection on drought tolerance and submergence avoidance
Breeding Science 61: 76-79 (2011) 査読有

- 8, Ryo Ishikawa, Takayuki Ohnishi, Yuki Kinoshita, Mitsugu Eiguchi, Nori Kurata, Tetsu Kinoshita
Rice interspecies hybrids show precocious or delayed developmental transitions in the endosperm without change to the rate of syncytial nuclear division.
The Plant Journal 65: 798-806 (2011) 査読有

[学会発表] (計13件)

- 1, Pham Thien Thanh, Ryo Ishikawa, Naoki Mori, Takashige Ishii
QTL analysis for useful agronomic characters using backcross inbred lines between *Oryza rufipogon* and *O. sativa* Japonica Nipponbare
6th International Conference of Rice Genetics 2009年11月15-19日, Manila Hotel, Philippine
- 2, Ryo Ishikawa, Takayuki Ohnishi, Yuki Kinoshita, Mitsugu Eiguchi, Nori Kurata and Tetsu Kinoshita

- Epigenetic Control of Species Hybridization in Plant Endosperm
6th International Conference of Rice Genetics 2009年11月15-19日, Manila Hotel, Philippine
- 3, Pham Thien Thanh, Phan Dang Thai Phuong, Ryo Ishikawa and Takashige Ishii
QTL analysis for spikelet opening time using backcross inbred lines between *Oryza sativa* Nipponbare and *O. rufipogon*
日本育種学会 2010年3月26-27日 京都大学
- 4, Phan Dang Thai Phuong, Hiroki Kageyama, Ryo Ishikawa and Takashige Ishii
Estimation of outcrossing rate of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, under field condition
日本育種学会 2010年3月26-27日 京都大学
- 5, 木下哲, 大西孝幸, 石川亮, 木下由紀, 永口貢, 倉田のり
高等植物胚乳における種の障壁成立のルールとメカニズム
日本遺伝学会第82回大会ワークショップ 2010年9月20-23日 札幌市
- 6, 大西孝幸・石川亮・山川博幹・木下哲
イネの biotoron breeding system; 年6度の戻し交配を可能にする栽培法
日本育種学会 2010年9月24-25日 秋田県立大学
- 7, 石川亮
野生イネと私:野生種を用いた新たな発見とその育種利用に向けて
「育種学と農学のこれからを考える20若手の会主催・研究集会」
日本育種学会 2010年9月24-25日 秋田県立大学
- 8, 原睦美, 加藤大和, 佐藤豊, 北野英己, 長戸康郎, 石川亮, 木下哲, 武田真, 服部束穂
イネ SNF2 ヘリカーゼ様タンパク質をコードする *ENDOSPERMLESS1 (ENL1)* の欠損は胚乳核の分裂異常を示す
日本分子生物学会 2010年12月7-10日 神戸ポートアイランド
- 9, 大西孝幸, 石川亮, 木下由紀, 永口貢, 倉田のり, 木下哲
イネ属種間交雑における胚乳発生異常と *OsMADS87* インプリント遺伝子の制御異常
- 日本分子生物学会 2010年12月7-10日 神戸ポートアイランド
- 10, 石川亮, Than Myint Htun, 山崎将紀, Pham Thien Thanh, 石井尊生
野生イネの遺伝的背景における栽培イネの非脱粒性遺伝子の効果
第52回 日本植物生理学会 2011年3月20-22日 東北大学
- 11, 石川亮, 青木麻由美, 黒谷賢一, 横井修司, 篠村知子, 高野誠, 島本功
フィトクロムによる *Hd1* を介したフロリゲン遺伝子 *Hd3a* の転写制御と日長認識機構
日本育種学会第119回講演会 2011年3月29-30日 横浜市立大学
- 12, 大塚光晴, 石川亮, 石井尊生
野生イネ (*Oryza rufipogon*) の種子有芒性の評価および遺伝子マッピング
日本育種学会第119回講演会 2011年3月29-30日 横浜市立大学
- 13, 山本知佳, 岩崎友哉, 石川亮, 石井尊生
栽培イネ *Oryza sativa* Nipponbare を野生イネ *O. rufipogon* W630 で戻し交雑した自殖系統群を用いた植物と種子の形態形質に関する QTL 解析
日本育種学会第119回講演会 2011年3月29-30日 横浜市立大学
- [その他]
ホームページ等
<http://www.ans.kobe-u.ac.jp/kenkyuuka08/sigen/shokubutuikussyu.html>
6. 研究組織
研究代表者
石川 亮 (RYO ISHIKAWA)
神戸大学大学院・農学研究科・助教
研究者番号: 70467687