

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02179

研究課題名（和文）イネの温度感受性雄性不稔の分子メカニズム

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of temperature-sensitive male sterility in rice

研究代表者

川岸 万紀子（KAWAGISHI-KOBAYASHI, Makiko）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：50355707

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：新規温度感受性雄性不稔遺伝子TMS2は被子植物に共通に存在し、普遍的な機能をもつと推定された。欠損による影響が高温条件下での花粉形成に特異的に表出することから、花粉形成に直接には関与せず、花粉形成に不可欠な他の因子の機能を高温下でサポートするというモデルが考えられた。高温で特異的な発現変化を示す遺伝子を検出するとともに、TMS2と相互作用するタンパク質を同定した。これらの因子の花粉形成における機能の解析を進め、花粉形成異常の鍵因子の特定を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規温度感受性雄性不稔遺伝子の特性や機能の一端を明らかにしたことは、高温が花粉の発達異常を引き起こすメカニズムの解明につながり、温暖化傾向の進行に伴い被害の深刻化が懸念される高温不稔への対策に貢献することが期待される。また、温度感受性雄性不稔遺伝子の欠損による温度感受性雄性不稔形質の付与は、イネ以外のさまざまな作物にも適用可能と考えられ、農作物のハイブリッド育種技術に与えるインパクトは非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：A novel temperature-sensitive male sterility gene TMS2 is commonly present in angiosperms and is presumed to have universal and significant functions. Since the effect of its deficiency is specifically expressed in pollen development under high temperature conditions, we proposed a model in which TMS2 is not directly involved in pollen development but supports functions of other factors essential for pollen development under high temperature conditions. We detected genes that show specific expression changes under high temperatures conditions and identified proteins that interact with TMS2. We will continue to analyze biological functions of these factors in pollen development to identify key factors for male sterility.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：イネ 雄性不稔 花粉形成 高温ストレス

1. 研究開始当初の背景

地球規模での温暖化傾向により農作物の稔実率の低下、「高温不稔」の被害が拡大している。イネの高温不稔においては、開花期とともに出穂前に高温に対する感受性期があり、高温ストレスにより花粉の発達に異常が起こることが知られている。特に関東以西の地域では7月～8月の高温による水稻の稔実率の低下が観察されている。今後の高温化傾向の進行予測から、出穂前に高温ストレスを受ける頻度も高まると考えられ、不稔発生機構の解明と被害軽減への方策が求められている。一方、イネの温度感受性雄性不稔系統「水稻中間母本農 12 号」(以下「PL12」と表記)は、通常の栽培温度条件(28°C)では正常に花粉が形成され結実するが、高温条件(33°C)では花粉形成異常が起こり不稔となる。葉などの栄養器官や雌蕊には目立った異常は認められず、高温条件特異的に花粉形成異常となるのが特徴である。この温度感受性雄性不稔系統は、花粉の発達過程における高温の影響を明らかにするために好適な研究材料となり、高温不稔の発生メカニズムの解明に寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

高温障害により作物の稔実率低下が頻発する状況に備え、高温不稔耐性品種の育種戦略の構築はきわめて重要である。その最終目標のもとに、イネより同定した新規温度感受性雄性不稔遺伝子 *TMS2* の特性や花粉の発達過程における機能の解析を通じて、高温による花粉形成障害を分子高次構造と分子間相互作用のレベルに分解して理解しようとするのが本研究のねらいである。

3. 研究の方法

イネより同定した新規温度感受性雄性不稔遺伝子 *TMS2* の遺伝子構造、発現特性等を分子生物学的手法により調べる。また、ゲノム編集により *TMS2* をノックアウトした系統について、さまざまな発達ステージの葯を形態学的に解析するとともに、RNA を調製して RNA-Seq 解析を行い、遺伝子発現の変化を検出する。シロイヌナズナについても相同遺伝子 *AtTMS2* のノックアウト系統の表現型をイネと比較しながら解析する。さらに、ノックアウト系統に *TMS2* の cDNA を導入して、表現型を解析し、花粉形成が回復するかどうか検証する。さらに、*TMS2* と相互作用する因子を探索するため、酵母の two-hybrid システムを用いてスクリーニングを行う。イネの葯より調製した RNA を用いて cDNA を合成し、two-hybrid システムで利用できるように cDNA ライブラリーを構築する。*TMS2* を bait として、cDNA ライブラリーを探索し、*TMS2* と結合するタンパク質を同定する。

4. 研究成果

(1) イネの温度感受性雄性不稔遺伝子 *TMS2* の特性

イネの温度感受性雄性不稔系統「PL12」に標準品種「日本晴」より単離したおよそ 6.3 kb のゲノム断片を導入すると、高温条件での花粉形成が回復することから、この導入断片が *TMS2* 遺伝子の発現に十分であることがわかった(図1)。さらに、上記のゲノム断片のうち上流側約 2 kb の断片に cDNA をつないで、同様に *tms2* 欠損系統に導入すると、高温条件での花粉形成が回復することから、この 2kb の領域に *TMS2* を発現させるのに十分なプロモータ機能が含まれることがわかり、*TMS2* 遺伝子のエクソン-イントロン構造も特定できた。また、*TMS2* の発現には特別な組織特異性や高温誘導性は観察されず、植物体の全体に恒常的に発現していると考えられた。

(2) 温度感受性雄性不稔遺伝子の植物種を超えた共通性

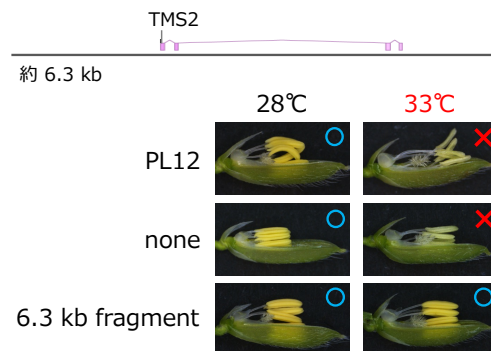


図1. イネの *TMS2* の遺伝子構造と機能
上： *TMS2* を含むゲノム領域の構造。ピンク色の四角はエクソンを表す。下：通常条件(28°C)と高温条件(33°C)での穎花の外観。PL12：温度感受性雄性不稔系統、none：PL12に空のベクターのみを導入、6.3kb：PL12にゲノム断片を導入。○は花粉が正常に形成されていることを、×は花粉形成異常を表す。

多様な植物種のゲノム配列情報の検索から、*TMS2* 遺伝子はイネだけでなく、広く被子植物に共通に存在すると考えられる。双子葉植物であるシロイヌナズナにおいても相同遺伝子 *AtTMS2* をゲノム編集により欠損させると、イネと同様に温度感受性雄性不稔の形質を示した。花の形態を標準エコタイプ「Columbia」と比較して観察したところ、*AtTMS2* の欠損系統では、高温栽培を開始して 2 日後に開花した花には特に影響が見られなかったが、5 日後、7 日後に開花した花では、おしべの形態形成に異常が認められた (図 2)。イネの場合と同様に花粉の発達過程において、高温の影響を大きく受ける時期があると考えられた。さらに、(1) で得られたイネの *TMS2* のプロモータを含む 2 kb のゲノム断片にシロイヌナズナの *AtTMS2* の cDNA をつないで、イネの *tms2* 欠損系統に導入したところ、高温での花粉形成が回復したことから、シロイヌナズナの遺伝子がイネの *TMS2* と同様の機能を発揮したと考えられた。この逆に、シロイヌナズナの *AtTMS2* プロモータを含むゲノム断片にイネの *TMS2* cDNA をつないで、シロイヌナズナの *attms2* 欠損系統に導入した場合も、同様に高温条件下での花粉形成が回復した。このことから、進化的にかけ離れた種であるイネとシロイヌナズナの *TMS2* が相互に入れ替え可能であり、*TMS2* が普遍的な機能をもつことが示唆された。

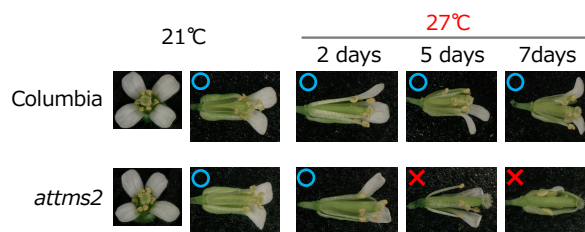


図 2. シロイヌナズナの遺伝子欠損系統の表現型
上：Columbia、下：遺伝子欠損系統。通常条件 (21°C) と高温条件 (27°C) とで栽培した。左端は上から見た花の形態、それ以外は横から見た花の形態。内部構造が見えるように一部の萼と花弁を除去している。○は花粉が正常に形成されており稔実することを、×は花粉形成異常により不稔となることを表す。

(3) *TMS2* と相互作用するタンパク質の探索

温度感受性雄性不稔遺伝子 *TMS2* の欠損系統では、通常の栽培条件では正常に花粉が形成されるが、高温条件下での花粉形成が異常となる。このことから、*TMS2* は、花粉形成に直接に機能するのではなく、花粉形成に必須の役割を果たす何らかの因子の機能を高温条件下でサポートすると考えられた。そこで、酵母の two-hybrid システムを利用して、*TMS2* と相互作用するタンパク質を探索した。シロイヌナズナ *AtTMS2* を bait としたスクリーニングから、複数の相互作用タンパク質の候補を同定した。そのうち 3 つのクローンについての結果を図 3 に示す。これらの遺伝子について *TMS2* との相互作用活性を確認するとともに、花粉形成への寄与を調べる目的で、イネの相同遺伝子を単離しノックアウトシステムを作出して、特性解析を進めている。また、イネの薬由来の cDNA ライブラリーを作製し、イネの *TMS2* を bait としたスクリーニングも併せて行い、クローンの単離を進めている。イネとシロイヌナズナのスクリーニングより得られたクローンを比較して、タンパク質構造の特徴や種を超えた共通性が見られるか検討を進めている。

さらに、高温条件下での *TMS2* の欠損による花粉形成異常の鍵となる遺伝子を同定する目的で、イネの *TMS2* 欠損系統の遺伝子発現を網羅的に解析し、薬の形態的変化の観察の情報ともあわせて、通常条件に比べて高温条件下で特異的な発現を示す遺伝子群を同定した。これらについても、遺伝子機能の解析を進めている。

以上より、新規温度感受性雄性不稔遺伝子 *TMS2* が植物種を超えて普遍的な役割をもつことが示唆されたが、栽培適温の異なる植物種での花粉形成制御において、どのようなしくみで *TMS2* が高温に応答して機能を発揮するのか、今後のさらなる解析が必要である。本研究で同定された *TMS2* に関与する候補遺伝子群についての機能解析を進め、高温条件下での花粉形成異常の鍵となる遺伝子の特定を目指す。

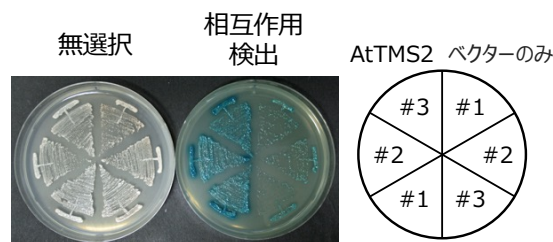


図 3. *AtTMS2* と相互作用する因子の同定
スクリーニングより得られたクローン #1、#2、#3 を、左半分では bait として *AtTMS2* を、右半分では空のベクターをとにもつ酵母株を培地上で培養した。無選択培地ではすべての株が生育するが、相互作用検出培地では、同定されたクローンが *AtTMS2* と相互作用する場合のみ生育し青色を呈する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Makiko Kawagishi-Kobayashi, Makoto Kashima, Atsushi Higashitani, Yuzuru Tozawa
2. 発表標題 Transcriptional Regulation in Rice Anther under High-Temperature-Induced Male Sterility Conditions.
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川岸万紀子、鹿島誠、東谷篤志
2. 発表標題 イネの高温不稔条件下での花粉形成過程における遺伝子発現制御
3. 学会等名 日本作物学会第255回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川岸万紀子、東谷篤志
2. 発表標題 イネの高温不稔条件下における花粉形成と遺伝子発現の変化
3. 学会等名 日本作物学会第253回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川岸万紀子、横井彩子、遠藤誠、布目司、加藤浩、戸澤譲
2. 発表標題 温度感受性雄性不稔因子の同定
3. 学会等名 日本育種学会第145回講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 戸澤 謙、高荷幸恵、手塚友規、須田啓、辻季美江、 横井彩子、 金子康子、 豊田正嗣、 川岸万紀子
2. 発表標題 温度感受性雄性不稔因子のタンパク質解析
3. 学会等名 日本育種学会第145回講演会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 温度感受性雄性不稔植物の製造方法	発明者 川岸万紀子、佐々木 健太郎、布目司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/012709	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関