

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580015

研究課題名(和文) イネ胚乳シンシチウム形成と細胞化機構からみた受精直後の冷温・高温感受性

研究課題名(英文) The effect of exposure to high or low temperature during early phases of rice endosperm development

研究代表者

斎藤 靖史 (Saitoh, Yasushi)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：70287100

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)：本研究では、まず、環境温度条件におけるイネ子房伸長とシンシチウム形成・細胞化の制御の解析を行い、冷温が細胞化を阻害すること、細胞化後の高温が胚乳細胞形成を促進させることを明らかとした。次に、イネ穎花特異的に発現するF-boxタンパク質相互作用因子の検索を行い、2種類の穎花特異的発現を示す2種類のF-box遺伝子の相互作用因子の同定に成功した。最後に、イネ種子形成初期で特異的に発現する新たな遺伝子の検索を行い、胚乳特異的発現を示す新規subtilisin-like protease遺伝子2種を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：We first tested the effect of exposure to low temperature during early phases of rice endosperm development, then, revealed that low temperature inhibits the transition from syncytial phase to cellularization. Next, we found that high temperature facilitates formation of cellularized endosperm cells. We also performed expression and functional analyses of rice caryopsis specific genes and identified interacting proteins that bind caryopsis specific F-box proteins. Finally, we identified novel subtilisin-like protease genes that specifically expressed during early phases of rice endosperm development.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：胚乳 イネ 登熟 シンシチウム 細胞化 冷温感受性 高温感受性

1. 研究開始当初の背景

イネの胚乳発達は温度による影響を受けやすい。冷温では胚乳発達初期の胚乳核増殖が遅れ、特に出穂後3日頃が冷温感受性である。一方、高温では、速度は向上するが、種子の品質が低下する。よってイネ胚乳発達初期機構の解明は寒冷による生産減、温暖化による品質低下問題解決の為に重要である。

イネ胚乳核は細胞質分裂を伴わない増殖を続けシンシチウムを形成する。出穂後3日頃、胚乳核増殖が一時的に停止し、胚乳核間に細胞壁が合成され細胞化する。その後、細胞分裂を再開し胚乳内部が充足される。

イネの高温登熟障害については、胚乳発達後期のデンプン蓄積過程での研究が進んでいる。しかしながら、デンプン蓄積過程以前の初期胚乳形成時における冷温や高温が籾の発育停止を引き起こすことも古くから知られている。また、低日射などの条件はデンプン蓄積期以前の胚乳初期発達時期において多くの白未熟粒を発生させることがわかってきた。よってこれらの諸問題の解決には、デンプン蓄積時期での研究だけではなく、胚乳発達初期の分子機構の解明が必要である。

我々は細胞増殖のブレーキの役割を果たすCDKインヒビターの1種 *Orysa;KRP3* が出穂後2日のイネ胚乳で特異的に発現し、細胞化後にその発現が消失することを発見した。またこれと同様の発現パターンを示す *F-box* 遺伝子と細胞化後の時期に発現する *F-box* 遺伝子の同定にも成功している。これらの発現変化のパターンは冷温高感受性の時期と一致しているので、これらの遺伝子を手がかりに、胚乳形成初期細胞化の分子機構とその温度感受性の解明を思い立った。

2. 研究の目的

本研究では、イネ胚乳発達初期、特にシンシチウム形成期と細胞化の時期における胚乳発達の分子機構とこの時期における環境条件の与える影響について明らかにするこ

とを目的とする。具体的には、シンシチウム形成、細胞化の冷温・高温などの感受性の解明と、胚乳特異的発現を示す遺伝子の検索とそれらの機能解明である。

本研究は、不良米発生原因として多くの研究成果が得られているデンプン蓄積過程の研究とは異なり、胚乳形成初期の分子機構に注目しているところに特色・独創性がある。

本研究により、イネ胚乳のシンシチウム形成・細胞化の分子機構とその温度感受性機構が解明された後には、その知見を利用して新たな栽培法あるいは温度処理法の開発へ応用できる可能性があり、冷害や温暖化による収量低下や品質低下の回避が可能となり社会に貢献できることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 環境温度条件におけるイネ子房伸長とシンシチウム形成・細胞化の制御の解析

開花後1日おきに、温度を変化させた人工気象器にイネを移した。温度処理後、穎花から子房を取り出し、そのサイズを計測するとともに、組織切片を作成してトルイジンブルー染色を行うことにより、細胞レベルでの形態変化についての解析を行った。

(2) イネ穎花特異的に発現する *F-box* タンパク質相互作用因子の検索

我々が同定した種子特異的発現を示す *F-box* タンパク質が実際にタンパク質分解に関与するのかを調べるためにまず、これらの *F-box* タンパク質が *SKP* タンパク質と相互作用するか、これらの *F-box* タンパク質がどのターゲットの分解に関わっているかについて酵母ツーバイブリット解析を行った。

(3) イネ種子形成初期で特異的に発現する新たな遺伝子の検索

マイクロアレイデータベースを利用してイネ種子での発現特異性の高い遺伝子を検索し、RT-PCR法を用いて、開花後のどのタイミングで発現変動するかについて調べた。さらに、*in situ hybridization* 法によって種子の

どの部位で発現するのかについて調べた。

4. 研究成果

(1) 環境温度条件におけるイネ子房伸長とシンシチウム形成・細胞化の制御の解析

イネ品種“どんぴしゃり”を用いて開花日の夕刻と開花後1日目から冷温処理をした子房の発達過程を調べた結果、子房の伸長が著しく阻害され2 mm弱から3 mmで子房の縦伸長が止まっており、開花後7～8日後までは目立った伸長は見られなかった。

開花後1日目に冷温処理後、5日経過したサンプルの組織切片を観察した結果、シンシチウムを形成している様子が確認された。

また、開花後2日目と3日目に冷温処理した子房の発達過程も調べた結果、開花後0～1日目に冷温処理をした子房と比べて、伸長阻害が緩和されており、野外で育てたイネよりは生育が遅れているが伸長が進んでいた。開花2日目に冷温処理をして3～5日経過したサンプルの組織切片を観察すると、シンシチウムが形成されていた。開花後1日目に冷温処理をするとシンシチウム形成の時期で生長が停止し、開花後2日目に冷温処理をするとシンシチウム形成の期間が延長されることから、胚乳発達初期の細胞化の時期が冷温感受性である可能性が考えられた。

開花3日目に冷温処理をして5日経過したサンプルの組織切片を観察したところ、細胞化が進んでおり、胚乳細胞が中心部まで充足されていた。冷温処理を開始した開花後3日目は細胞化が起こっている時期であるので、冷温にさらされてもそれ以降の胚乳細胞形成まで生長が進んだと考え、やはり胚乳発達初期の細胞化の時期が冷温感受性であると考えられる。しかし子房サイズは小さいので、細胞化へ移行しても冷温の影響は少なからず受けていると考えられる。

一方で耐冷性の品種として知られる“はやゆき”を用いて、開花日の夕刻から冷温処理をし、子房伸長の様子を観察する実験も行った。

その結果、野外で育てたものに比べて子房の伸長速度の低下は見られたものの、子房の伸長が止まることはなく、開花後7日目には子房サイズが野外で育てたサンプルのサイズとほぼ同等のものとなった。これらの事から、“はやゆき”においても受精後の子房伸長の冷温による阻害は見られるものの、その効果は“どんぴしゃり”よりも少なく開花後8日には回復するものと考えられた。

開花後4日目頃の一過的な高温は、胴割れ米の発生確率が増加することが報告されており、開花後4日目頃の高温は、子房の発達に影響を与える可能性が考えられた。

そこで、開花後4～6日目から温度処理を行い、温度処理後の子房を10組織ずつ縦と横の長さを計測し、平均値を求め、標準区と高温処理区の子房サイズの推移を比較した。

開花後4日目から温度処理を開始した標準区の子房の横のサイズの平均値は、温度処理後24時間後で1.33 mm、48時間後で1.31 mm、72時間後で1.88 mmであった。一方で、高温処理区の子房の横のサイズの平均値は温度処理後24時間後で1.44 mm、48時間後で2.00 mm、72時間後で2.50 mmであった。

標準区の子房の横サイズは処理後24時間後と48時間後ではほとんど差はなく、処理後72時間後の子房サイズは、処理後48時間と比較して0.57 mm横幅が増していた。一方で、高温処理区の子房の横サイズは、処理後48時間後では、処理後24時間後と比較して0.56 mm増加し、さらに処理後72時間後では、処理後48時間と比較して0.50 mm横幅が増加していた。開花後5日目、開花後6日目から高温処理を開始した子房は縦伸長、横伸長とも標準区と差がなかった。そのことから、開花後4日目から高温処理を開始すると、子房の横伸長が早まることがわかった。

開花後4日目から高温処理後の子房6組織分の横断面を観察し、胚乳細胞の子房内への充足の有無を調べた。その結果、高温処理

区の処理後24時間～72時間後の胚乳細胞は、調べた6組織全てが充足十分で、充足不十分は0組織であった。一方、標準区の処理後24時間の胚乳細胞は、充足十分な組織が0組織、不十分な組織が6組織で、処理後48時間後の胚乳細胞は、充足十分な組織が2組織、不十分な組織は4組織で、処理後72時間後の胚乳細胞は充足十分な組織が6組織、充足不十分な組織が0組織であった。

高温処理区では温度処理24時間後以降6組織全ての子房で胚乳細胞が充足していることが観察されたのに対し、標準区では温度処理後24時間後では、子房内に胚乳細胞が充足した子房が観察されず、処理後48時間経過しても、子房内に胚乳細胞が充足していないものが半数以上観察された。子房組織切片を作製し、胚乳細胞の形態観察を行った結果、高温処理区の温度処理24時間後の胚乳細胞は標準区と比較して、細胞のサイズが大きく、明瞭な細胞壁が観察された。温度処理後48時間後の高温処理区の胚乳細胞では、明瞭な細胞壁が観察されたのに対し、標準区では、高温処理区と比較し、細胞壁が薄く、細胞の仕切りが不明瞭であった。高温処理後72時間が経過すると、標準区の胚乳細胞でも細胞壁がはっきりと観察され、高温処理区の胚乳と比較して胚乳細胞のサイズ、細胞壁に差はなかった。開花後4日目頃に高温処理を行うと、標準区と比較して胚乳細胞の細胞壁が明瞭になるのが早いことから、開花後4日目頃の高温は細胞壁の合成速度が早まると考えられた。以上から、開花後4日目の子房は高温感受性であると考えられた。

(2) イネ胚乳シンチウム特異的に発現するF-boxタンパク質相互作用因子の検索

ESOFB1、ESOFB2がF-boxタンパク質としての機能を有しているかを調べるために、イネのskp1様タンパク質であるOSKとの相互作用を調べた。イネで28種類存在するOSK

の中からまず7種類のOSKを選定し、相互作用の有無を調べることにした。

ESOFB1は、OSK5、OSK9と、ESOFB2は、OSK5、OSK9、OSK16と相互作用した。よって、ESOFB1、ESOFB2は特定のOSKのみと相互作用し、さらに、F-boxタンパク質間においても相互作用するOSKに選択性があることがわかった。ESOFB1、ESOFB2のアミノ酸配列のN末端領域には、F-boxタンパク質が共通に持つとされているF-boxドメインを持っている。このドメインの機能解析のため、ESOFB1のN末端領域を欠損させてF-boxドメインを除いたもの(ESOFB1-dC、ESOFB1-C、ESOFB1-CT)と、ESOFB1のC末端領域を欠損させ、F-boxドメインを保持するもの(ESOFB1-N、ESOFB1-FB)を作製し、これらを用いて同様のアッセイを行い、OSKとの相互作用解析を行った。

その結果、F-boxドメインを保持するESOFB1-NとESOFB1-FBのみが、OSK5とOSK9と相互作用することがわかった。よって、ESOFB1のF-boxドメインがOSK5、OSK9との相互作用に必要であると考えられた。

ESOFB1がF-boxタンパク質として機能する可能性を考えると次に疑問となるのはそのターゲットである。今回、発現の時期及び組織の同一な遺伝子が相互作用を示すかどうかのアッセイを行った。

ESOFB1は開花後2日目頃の種子で発現している事が報告されており、ESOFB1と同様の開花後2日目頃の種子で発現しているOrysa;KRP3とが相互作用する可能性を考え、ESOFB1とOrysa;KRP3との相互作用を調べた。Orysa;KRP3はイネで7種類存在するkip-related protein (KRP)の1つで、これらは、動物細胞で発見されたサイクリン依存性キナーゼ阻害因子(Cyclin-dependent kinase Inhibitor, CKI)相同遺伝子である。

解析の結果、ESOFB1全長とOrysa;KRP3との組み合わせでは相互作用は見られなか

った。しかし、ESOFB1のN末端領域を欠損させたESOFB1-CTとOrysa;KRP3との組み合わせで相互作用が見られた。よって、ESOFB1のC末端領域がOrysa;KRP3と相互作用することがわかった。

ESOFB2は開花後3～5日目頃の種子で発現していることが報告されている。そこで、ESOFB2と発現時期が同様の5種のイネKRPとの相互作用解析を行った。

その結果、ESOFB2は、どのイネKRPとの組み合わせにおいても相互作用が見られなかった。しかし、ESOFB2のN末端領域を欠損させたESOFB2-C2はOrysa;KRP4との組み合わせで相互作用がみられた。このことから、ESOFB2タンパク質のC末端領域はOrysa;KRP4との相互作用すると考えられた。

今回の実験では、ESOFB1、ESOFB2の全長とイネCKIで相互作用を示すものがなかったが、一般的に、KRPはリン酸化を受けるとF-boxタンパク質との結合が可能となることが知られている。そのため、酵母細胞中では胚乳で行われるOrysa;KRP3やOrysa;KRP4リン酸化が正常に行われず、完全長ESOFB1、ESOFB2とCKIとの結合がみられないが、欠変異体ではそのような制御が起こらず、結合活性を検出できた可能性が考えられる。

(3) イネ種子形成初期で特異的に発現する新たな遺伝子の検索

開花後1～7日の穎花での発現特異性の高い遺伝子としてsubtilisin-like protease遺伝子が2種見つかった。subtilisin-like proteaseはその名前のおり、*Bacillus subtilis*菌から見つけられたプロテアーゼのアミノ酸配列に相同性を示すタンパク質で、これらは広く生物界に存在し、動物のsubtilisin-like proteaseは発生生物学や内分泌学の分野において注目されている。植物においても膨大な数のsubtilisin-like protease遺伝子がゲノムにコードされていることが知られている。イネゲノ

ムには63種類のsubtilisin-like protease遺伝子がコードされており、OsSub1~OsSub63と呼ばれている。そのうちの2種OsSub53とOsSub63が今回穎花特異的発現を示すことが判明したものである。

OsSub53およびOsSub63遺伝子の穎花内での発現部位を同定するために、*in situ*ハイブリダイゼーション解析を行ったところ、ともに胚乳特異的に発現していた。

RNAレベルで発現が確認されたOsSub53とOsSub63が実際にタンパク質として発現しているかどうかについて調べるためこれらのタンパク質に対する抗体を作製し、ウェスタンブロットによる解析を行った。その結果、すくなくともOsSub53については、その発現が確認された。開花後の時期を追って解析したところ、OsSub53タンパク質は開花後5～7日においてそのバンドが検出され、特に開花後6日でのタンパク質蓄積量が多いことがわかった。またこのバンドから推定される分子量はcDNA配列から推定される分子量とほぼ同じであることから、OsSub53タンパク質はある種のsubtilisin-like proteaseで見られる自己分解を少なくともこの時期には引き起こさない可能生が考えられた。subtilisin-like proteaseのあるものはプログラム細胞死に関わるcaspaseのような機能をもつこともあり、また、イネ胚乳発達過程においてもプログラム細胞死に関する報告もあることから、今後、これらの機能の解明が期待される。

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)

[学会発表] (計 14 件)

- ① 東海林愛美、佐藤大地、堤賢一、斎藤靖史、イネ胚乳形成初期におけるsubtilisin様プロテアーゼの発現・機能解析、日本作物学会第237回講演会、2014.3.29-30、千葉大学(千葉県)

- ② 杉山輝樹、原通子、藤原奈津美、水谷征法、堤賢一、斎藤靖史、開花後3日ころから胚乳で発現するイネF- boxタンパク質ESOFB2の発現機能解析、日本作物学会第237回講演会、2014.3.29-30、千葉大学（千葉県）
- ③ 原通子、杉山輝樹、藤原奈津美、水谷征法、堤賢一、斎藤靖史、イネ胚乳形成初期で発現するF- boxタンパク質ESOFB1の発現機能解析、日本作物学会第237回講演会、2014.3.29-30、千葉大学（千葉県）
- ④ 東海林愛美、佐藤大地、堤賢一、斎藤靖史、イネ胚乳形成初期におけるOsSub53タンパク質の発現解析、第34回種子生理生化学研究会年会、2013.12.06-07、箱根高原ホテル（神奈川県）
- ⑤ 東海林愛美、佐藤大地、藤原奈津美、堤賢一、斎藤靖史、イネ胚乳形成初期に発現するsubtilisin-like proteaseの局在部位の解析、日本作物学会第235回講演会、2013.3.28、明治大学（神奈川県）
- ⑥ 藤原奈津美、堤賢一、斎藤靖史、イネ胚乳発達初期における温度感受性、日本作物学会第235回講演会、2013.3.28、明治大学（神奈川県）
- ⑦ 藤原奈津美、堤賢一、斎藤靖史、イネ胚乳発達初期で発現するF- boxタンパク質の細胞内局在・相互作用因子の解析、日本育種学会第123回講演会、2013.3.28、東京農業大学（東京都）
- ⑧ 藤原奈津美、佐藤大地、堤賢一、斎藤靖史、受精後のイネ子房と胚乳発達初期の温度感受性、第33回種子生理生化学研究会年会、2012.11.10、鶴岡愉海亭みやじま（山形県）
- ⑨ 佐藤大地、藤原奈津美、堤賢一、斎藤靖史、イネ胚乳発達初期におけるサティライシンプロテアーゼ様遺伝子の解析、第7回東北育種研究集会講演会、2012.8.20、秋田県立大学（秋田県）
- ⑩ 藤原奈津美、佐藤大地、水谷征法、佐々木優、堤賢一、斎藤靖史、イネ胚乳形成初期におけるESOFB2の発現機能解析、第233回日本作物学会講演会、2012.3.29-30、東京農工大学（東京都）
- ⑪ 斎藤靖史、佐藤大地、藤原奈津美、堤賢一、イネ胚乳形成初期におけるsubtilisin-like protease遺伝子の発現解析、第233回日本作物学会講演会、2012.3.29-30、東京農工大学（東京都）
- ⑫ 佐藤大地、藤原奈津美、劉泓鑠、堤賢一、斎藤靖史、受精後のイネ子房伸長と胚乳形成初期におけるシンシチウム形成、細胞化の温度感受性、第32回種子生理生化学研究会、2011.11.11-12、鬼怒川温泉緑水（栃木県）
- ⑬ 藤原奈津美、水谷征法、佐藤大地、堤賢一、斎藤靖史、イネ種子形成初期で発現するF- box遺伝子群の解析、第32回種子生理生化学研究会、2011.11.11-12、鬼怒川温泉緑水（栃木県）
- ⑭ 藤原奈津美、劉泓鑠、佐藤大地、堤賢一、斎藤靖史、イネ胚乳形成初期のシンシチウム形成・細胞化機構の温度感受性、第232回日本作物学会講演会、2011.9.1-2、山口大学（山口県）

6. 研究組織

(1)研究代表者

斎藤 靖史 (SAITOH, Yasushi)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：70287100