

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23780006

研究課題名(和文) イネの脱粒性における離層の形成と崩壊の分子機構の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism about separation layer formation and degradation in seed shattering of rice.

研究代表者

小西 左江子(杉田左江子)(Konishi-Sugita, Saeko)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：10574634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究期間内に、最新の手法であるレーザーマイクロダイセクション法を用いた離層特異的な組織由来サンプルのマイクロアレイ解析の結果から見いだした、新規脱粒性遺伝子OSH15およびOSH15の生物学的作用に関して、下流の候補遺伝子について、発現解析、過剰発現体の作出、遺伝子破壊系統等を用いた経時的な形態観察を行い、生物学的役割を明らかにし、脱粒性における離層の形成および崩壊の分子機構におけるOSH15遺伝子の貢献を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The rice seed shattering gene, qSH1 encodes a BEL-type homeobox gene and is required for the formation of separation layer in rice. Histological analysis revealed that the separation layer forms with one periclinal cell division at the base of rice grains around 2 weeks before heading and then lignin disposition starts at the base expect the separation layer cells around 1 week before heading. These observations strongly suggest that the seed shattering of rice has two main processes; one process is separation layer formation and the other is separation layer degradation. To elucidate the molecular process in seed shattering in rice, we carried out some systematic microarray analysis using laser capture micro-dissection (LM-microarray) of the separation layer cells.

研究分野：分子育種学

キーワード：脱粒性

1. 研究開始当初の背景

- (1) 脱粒性とは、穂から種子が脱粒する性質であり、自然界では、種子の拡散による繁殖戦略として重要な性質であるが、作物として考えた場合、強い脱粒性は、収穫量の減少につながる。そのため、栽培化の過程で、古代人によって最初の選抜の対象となった農業形質であると考えられてきた。また、脱粒性は、脱穀技術との関連が深いことから、今日でも重要な農業形質の1つである。
- (2) これまでに、イネの農業形質と関わりのある栽培化遺伝子の単離および置換系統の作出においては、申請者は、イネの脱粒性を制御する遺伝子として、栽培ジャポニカイネ品種「日本晴」と栽培インディカイネ品種「カサラス」の品種間差を利用した交雑後代を用いた QTL(Quantitative Trait Loci:量的遺伝子座)解析から、脱粒性に関与する QTL を明らかにしている。また、QTL の中で作用力が最も大きかった第一染色体長腕上に座乗する *qSH1* 遺伝子をマップベースクロニング法により単離、同定し、単離した *qSH1* 遺伝子が、種子の基部の離層形成に必須であることを明らかにしている。このケースにおける脱粒性の原因となる変異は、遺伝子転写開始点上流の約 12kb の位置に生じる SNP(1塩基多型)による組織特異的な遺伝子発現の変化で決定されるということを明らかにし、古代人が転写制御に影響を与える SNP を選抜していたことを示唆する結果を発表している(Konishi *et al.*, Science, 2006)。また、同時期に、アメリカのグループによって、野生イネ由来の別の脱粒性に関与する別の遺伝子、*sh4* が単離・同定されている(Li *et al.*,2006)。しかし

ながら、種子の脱粒性を可能にする離層形成およびその後の離層崩壊の分子機構に関しては、ほとんど理解が進んでいない。その他の農業形質に關与する栽培化関連遺伝子として、半矮性遺伝子 *sd1*(Sasaki *et al.*,2002)や、種子数に關与する *Gn1a* 遺伝子(Ashikari *et al.*, 2005)、種子サイズに關与する遺伝子としては、申請者らによって *qSW5*(Shomura *et al.*,2008)が、また、中国のグループによって、*GW2*(Song *et al.*,2007)が報告されている。これらの知見をもとに、申請者らによって、栽培イネコレクション品種群を用いたアソシエーション解析から、イネの栽培化過程が推定され、脱粒性遺伝子 *qSH1* の SNP の変異は、温帯ジャポニカ種の脱粒性の喪失の原因であり、考古学的な知見と合わせて考えると、約 3000 年前から 1 万年前に中国で生じた変異であること、さらに、脱粒性遺伝子 *qSH1* および種子のサイズを制御する遺伝子 *qSW5* を含む 5 つの栽培化遺伝子を用いたイネ遺伝資源の解析から、ジャポニカイネの栽培化過程の推測も行っている (Konishi *et al.*,2006, Shomura *et al.*,2008, Konishi *et al.*,2008)が、不明な点もまだ残っている。

2. 研究の目的

これまでの経時的な形態観察により、イネの脱粒性は、離層形成の分化のステージと離層の崩壊のステージの 2 つの段階に大別してとらえることができる。そこで、本研究では、研究期間内に、最新の手法であるレーザーマイクロダイセクション法を用いた離層特異的な組織由来サンプルのマイクロアレイ解析の結果から見いだした、新規脱粒性遺伝子 *OSH15* および *OSH15* の

生物学的作用に関して、下流の候補遺伝子について、発現解析、過剰発現体の作出、遺伝子破壊系統等を用いた経時的な形態観察を行い、生物学的役割を明らかにし、脱粒性における離層の形成および崩壊の分子機構における *OSH15* 遺伝子の貢献を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究目的を達成するために、レーザーマイクロダイセクション(LM)法を用いて、イネの種子基部の離層特異的なサンプルを用いた LM マイクロアレイ解析の結果から見いだした、新規の脱粒性遺伝子 *OSH15* および *OSH15* の下流の候補遺伝子についての詳細な解析を進める。具体的には、過剰発現体の作出、組織特異的な発現解析、*qSH1* と *OSH15* の遺伝学的な材料を用いた経時的な形態観察、さらに、遺伝子破壊系統の利用等を行い、脱粒性に関する遺伝子の離層の形成および崩壊における役割を明らかにする。

(1) *qSH1* と *OSH15* の遺伝学的な材料を用いた経時的な形態観察

申請者がこれまでに作出した、脱粒性遺伝子 *qSH1* と *OSH15* を両方ともに機能型に固定した実験材料 NIL(*qSH1*)*OSH15* と *qSH1* は機能型で *OSH15* が機能欠損型に固定した実験材料 NIL(*qSH1*)*osh15* を用いて、経時的な離層部位のフロログルシノール染色やトルイジンブルー染色、UV 照射による蛍光顕微鏡観察といった詳細な形態観察を行い、*qSH1* および *OSH15* の離層形成、崩壊への影響を調べた。さらに、透過型電子顕微鏡による観察を行い、離層の形成・崩壊過程の分子レベルでの解剖を進めた。

(2) 候補遺伝子の組織特異的な発現解析による機能証明

離層特異的な LM マイクロアレイで見出した、リグニンの生合成に関する酵素遺伝子 *PAL*、*CCR*、*Laccase*、*peroxidase* や、イネ *XND1* 相同遺伝子といった *qSH1* および *OSH15* の下流で働く候補遺伝子および *qSH1*、*OSH15* をプローブに用いて、NIL(*qSH1*)*OSH15* や NIL(*qSH1*)*osh15*、日本晴、遺伝子破壊系統に対して、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた発現解析を行い、各候補遺伝子の生長ステージや組織特異的な発現様式を解明し、離層の形成、崩壊における役割を調べた。

4. 研究成果

(1) *qSH1* と *OSH15* の遺伝学的な材料を用いた経時的な形態観察

申請者がこれまでに作出した、脱粒性遺伝子 *qSH1* と *OSH15* を両方ともに機能型に固定した実験材料 NIL(*qSH1*)*OSH15* と *qSH1* は機能型で *OSH15* が機能欠損型に固定した実験材料 NIL(*qSH1*)*osh15* を用いて、経時的な離層部位のフロログルシノール染色やトルイジンブルー染色、UV 照射による蛍光顕微鏡観察といった詳細な形態観察を行い、*qSH1* および *OSH15* の離層形成、崩壊への影響を調べた。さらに、透過型電子顕微鏡による観察を行い、離層の形成・崩壊過程の分子レベルでの解剖を進めた。

その結果、離層の形成は、出穂約 16 日前から開始していることが明らかとなり、離層の形成には、*qSH1* 遺伝子

が関与していることが示唆された。また、離層の崩壊は、出穂数日前から開始していることが明らかとなり、離層の崩壊には、*OSH15* 遺伝子が関与していることが示唆された(図 1)。

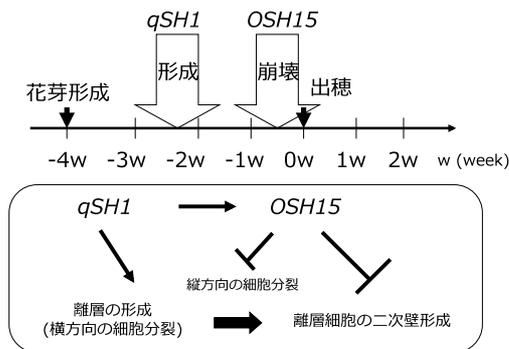


図 1. イネ脱粒性における離層の形成と崩壊のモデル

(2) 候補遺伝子の組織特異的な発現解析による機能証明

離層特異的な LM マイクロアレイで見出した、リグニンの生合成に関与する酵素遺伝子 *PAL*、*CCR*、*Laccase*、*peroxidase* や、イネ *XND1* 相同遺伝子といった *qSH1* および *OSH15* の下流で働く候補遺伝子および *qSH1*、*OSH15* をプローブに用いて、*NIL(qSH1)OSH15* や *NIL(qSH1)osh15*、日本晴、遺伝子破壊系統に対して、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた発現解析を行い、各候補遺伝子の生長ステージや組織特異的な発現様式を解明し、離層の形成、崩壊における役割を調べた。

その結果、離層で発現しているリグニン生合成系の遺伝子の一つである *CCR* は、*NIL(qSH1)* の離層では発現が抑制されていたが、*NILd6* の離層では、強い発現が見られた。このことから、*OSH15* が、離層で *CCR* の発現を抑制していると考えられる。

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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

常松浩史、安東郁男ら(24人中16番目)、いもち病抵抗性遺伝子 *Pi9* を導入したコシヒカリ準同質遺伝子系統「コシヒカリ関東 BL1 号」の育成、作物研究所研究報告 第 15 号 (平成 27 年 3 月)、査読なし

Maiko Akasaka, Saeko Konishi, Takeshi Izawa and Jun Ushiki

Histological and genetic characteristics associated with the seed-shattering habit of weedy rice (*Oryza sativa* L.) from Okayama, Japan, *Breeding Science*, 61, p168-173, (2011)、査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

杉田(小西) 左江子、西原 知里、千崎 雄佑、松島 淳、桧垣 匠、朽名 夏磨
イネコアコレクションを用いた画像処理による葉形質の特徴抽出、日本育種学会第 126 回講演会要旨集、p128、2015 年 3 月、会場名：玉川大学(東京都町田市)

Konishi-Sugita, S., Lin, S.Y., Ebana, K., Fukuta, Y., Sasaki, T., Yano, M. and Izawa, T. The molecular process of rice domestication. *Phytogene Symposium VII*, 2014 年 9 月, 会場名：Kagawa International Conference Hall. (香川県高松市)

Konishi-Sugita, S., Lin, S.Y., Ebana, K., Fukuta, Y., Sasaki, T., Yano, M. and Izawa, T. Cloning of a rice seed shattering QTL, *qSH1* and identification of the SNP selected during rice domestication. *Phytogene Symposium VII*, 2014 年 9

月, 会場名 : Kagawa International Conference Hall. (香川県高松市)

Senzaki, Y., and Sugita-Konishi, S.
Analysis of genetic interaction among seed shattering genes in rice, Phytogene Symposium VI, 9, 2013年10月, 会場名 : Kagawa International Conference Hall. (香川県高松市)

Sugita-Konishi, S., Takahashi, H., Hirose, S., Sato, Y., Nakazono, M., Takaiwa, F. and Izawa, T. *OSH15* homeobox gene acts as a degradation switch of separation layer cells in seed shattering of rice, Phytogene Symposium VI, 8, 2013年10月, 会場名 : Kagawa International Conference Hall. (香川県高松市)

〔図書〕(計 1件)

進化学事典, 執筆分担, 日本進化学会編, 第25章の2, 作物の栽培化, 821-824, 2012, 共立出版.

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

取得状況(計 1件)

名称 : *sh4* 遺伝子を含む、植物体の穀粒サイズを増大させた植物体
発明者 : 井澤 毅、杉田 左江子
権利者 : 農業生物資源研究所
種類 :
番号 : 特許第 5610440 号
出願年月日 : 平成 21 年 5 月 29 日
取得年月日 : 平成 26 年 9 月 12 日
国内外の別 : 国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
小西(杉田) 左江子
(Konishi-Sugita, Saeko)
香川大学農学部・准教授
研究者番号 : 10574634