

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658003

研究課題名(和文) イネの同質倍数体における遺伝子量補正に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of dosage compensation in rice autopolyploids

研究代表者

伊藤 純一 (ITO, Jun-ichi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：30345186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：イネの同質倍数体シリーズ(二倍体、三倍体、四倍体)をコルヒチン処理及び交雑により人工的に作出した。二倍体と四倍体における様々な表現型形質の比較によって、倍数化の効果を調査したところ、発育ステージによってその効果は異なることを示した。また四倍体では細胞分裂が減少し、いくつかのエピジェネティック関連遺伝子の発現量の増大が認められることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Autopolyploids series (diploid, triploid and tetraploid) in rice were artificially created by a colchicine treatment and a genetic crossing. Comparisons between diploid and tetraploid plants revealed that the effect of genome doubling on the rice morphology depends on the developmental stage and traits. It was also suggested the cell size and expression level of some epigenetic related genes in the tetraploids were increased.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：倍数体

1. 研究開始当初の背景

ゲノムや染色体の倍加とエピジェネティックな制御との関わりについては、動物における性染色体の遺伝子量補正、植物においてはコムギなどの異質倍数体のゲノム間相互作用の解析により、ゲノムのメチル化や、ヒストン修飾、小分子 RNA などに関与することが示唆されている。しかしながら、染色体の単純な倍加によってゲノムに何が起こるのか、そして多数の遺伝子発現の協調性にどのような変化が生じるのかという疑問には答えられていない。そして、なぜ一般にはゲノムの倍加によって個体サイズが大きくなるのかといった疑問にも答えられていない。このような疑問に答える為の最も有用な材料は、同質倍数体であると考えられることから、イネにおいて同質倍数体の解析を推進することとした。

2. 研究の目的

本研究ではイネの同質倍数体を人工的に作出し、純粋な倍数化(遺伝子コピー数、染色体数の増加)による表現形質とゲノムへの効果を、詳細な表現型解析と遺伝子発現解析によって明らかにするものである。ゲノムのサイズと表現型との対応関係を調査することによって、遺伝子コピー数に応じたエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) イネ同質倍数体の作成

イネ品種日本晴の幼苗にコルヒチン処理を行なった4倍体と思われる種子を発芽させ、染色体観察により倍数性を確認した後、二倍体との交配を行ない、三倍体の種子を得る。それらの個体はフローサイトメトリーで倍数性を定量化する。

(2) 同質倍数体の表現型観察

それぞれの倍数体において、発芽時から登熟期まで、様々な農業上重要な形態形質(葉長、葉の分化速度、分げつ数、出穂期、稈長、一次枝梗数、粒数、粒大など)を中心に調査を行い、二倍体、四倍体をそれぞれ比較することによって、倍数化によってどのような形質が、どのように変化しているのかを明らかにする。また、倍数化によって細胞のサイズが変化することも知られているので、葉における細胞数、細胞サイズなども調査する。

(3) 同質倍数体のマイクロアレイ解析

野生型(二倍体)、四倍体は、発育ステージを揃えた上で、栄養生長期においてマイクロアレイ用のサンプリングを行なう。RNAが抽出でき次第、2色法を用いたマイクロアレイ解析を行い、データを取得する。

二倍体と比較して遺伝子発現が増加、または減少しているものを抽出し、エピジェネティックに制御される遺伝子リストを取得する。

4. 研究成果

(1) イネ同質倍数体の作成

コルヒチン処理によって作出された四倍体と思われる個体が、実際に染色体が倍になっているかについて顕微鏡観察により確認を行った。その結果、二倍体に比べ染色体が倍程度に増えた細胞が確認できた。初年度は、四倍体を花粉親、二倍体を雌親にして交雑を行なった。その結果、子房の肥大は確認できたものの、正常な種子は発達せず、未熟胚培養においても個体は得られなかった。そこで次年度は四倍体を雌親、二倍体を花粉親にして交雑を行なったところ、胚乳が完全に発達した種子は得られなかったものの、未熟胚培養を行なうことによって三倍体と思われる個体を得た。その後、フローサイトメーターによりそれぞれの個体について倍数性を定量化したところ、確かに得られた個体は三倍体と四倍体であることが明らかとなった(図1)。

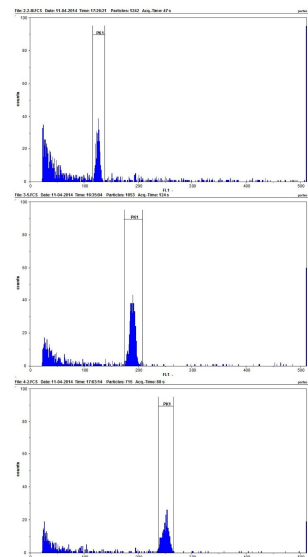


図1 フローサイトメトリーによる核の蛍光強度の頻度分布。上段：二倍体、中段：三倍体、下段：四倍体。

(2) 同質倍数体の表現型観察

表現型観察に用いる予定であった三倍体が初年度中に作成できなかった為、二倍体と四倍体の表現型解析を行なった。まず第1葉から第5葉の葉の長さについての調査を行った。第2葉長の平均ではやや二倍体の方が短い結果が得られたが、その他の葉位においても両者に有意な差は認められなかった(図2)。

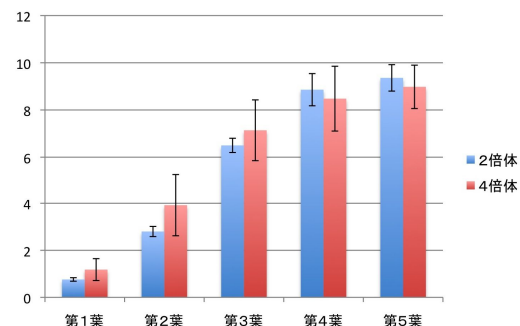


図2 二倍体と四倍体の葉長の比較

続いて、二倍体と四倍体における細胞サイズの比較を行った。その結果、単位長さあたりの細胞の数は、四倍体では二倍体に対して44%減少していた。つまり、染色体の倍化によって、一つの細胞のサイズが大きくなっていることが明らかとなった(図3)。

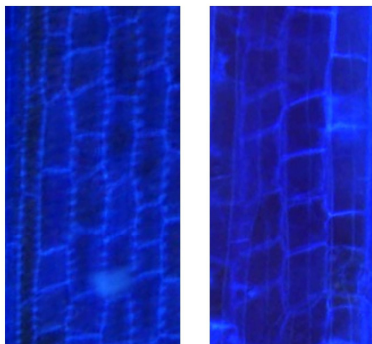


図3 二倍体と四倍体の細胞サイズの比較
左：二倍体、右：四倍体

この結果は倍数体では細胞のサイズが増加するとの従来の報告を支持するものである。また、四倍体における葉の分化速度も調査したが、二倍体とそれほど大きな差は見られなかった。

次に生殖成長における形質の調査を行った。節間の長さについては、第1節間から第5節間のすべてにおいて、四倍体の方が二倍体よりも短いという結果が得られ、特に第1節間ではその差が大きく、四倍体は二倍体に対して27%短くなっていた。続いて、粒数、1次枝穂数について調査した。その結果、いずれとも四倍体の方が二倍体よりも少なくなっており、粒数は67%、1次枝穂数は42%減少していた。一方で、穎花の大きさは、四倍体の方が二倍体よりも大きかった(図4)。



図4 二倍体と四倍体の穂と種子の形態。
左：二倍体、右：四倍体

これらのことからイネ四倍体では栄養成長の器官サイズは大きく変化せず、生殖成長ではむしろ節間が短縮すると共に穎花数が減少することが明らかとなった。一方で穎花のサイズは増加しており、生殖過程や器官に

よって倍数化による効果は異なることが明らかになった。

(3) 同質倍数体のマイクロアレイ解析と遺伝子の発現解析

マイクロアレイに用いる三倍体のサンプルが準備できなかったため、二倍体と四倍体のみにおいて、予備的なマイクロアレイ解析を行なった。両方で発現変動が認められる遺伝子はそれほど多くなかったが、細胞壁構築に関する遺伝子の発現が変動している傾向があった。これらの遺伝子と倍数化との関わりに関しては今後の課題である。

またこれまでの知見から、染色体数の変化はゲノムのメチル化や、ヒストン修飾などの変化を伴うことが示唆されている。そこでイネの四倍体においてエピジェネティックな変化がゲノムに生じているかを調査するため、エピジェネティックな変化の指標となる遺伝子の発現を調査した。現在までに、DNAメチル化に関する遺伝子、トランスポゾンの活性に関わる遺伝子において、四倍体の方が二倍体に対して発現量が高いことが明らかとなったが、今後の更なる解析が必要である。

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11件)

Yoshikawa T, Eiguchi M, Hibara KI, Ito JI, Nagato Y.(2013) Rice SLENDER LEAF 1 gene encodes cellulose synthase-like D4 and is specifically expressed in M-phase cells to regulate cell proliferation. *J Exp Bot.* 64: 2049-2061. 査読有.

Doi: 10.1093/jxb/ert060.

Itoh, JI., Hibara, K., Kojima, M., Sakakibara, H., and Y. Nagato. (2012) Rice DECUSSATE controls phyllotaxy by affecting the cytokinin signaling pathway. *Plant J.* 72, 869-881. 査読有.

Doi: 10.1111/j.1365-313x.2012.05123.x

Nosaka, M., Itoh, J.-I., Nagato, Y., Ono, A., Isiwata, A. and Sato, Y.(2012) Role of transposon-derived small RNAs in the interplay between genomes and parasitic DNA in rice. *Plos Genet* 8, e1002953. 査読有.

doi:10.1371/journal.pgen.1002953

Mimura M, Nagato Y, Itoh J.(2012) Rice PLASTOCHRON genes regulate leaf maturation downstream of the gibberellin signal transduction pathway. *Planta.* 235:1081-9. 査読有.

DOI 10.1007/s00425-012-1639-5

[学会発表](計3件)

三村真生、長戸康郎、伊藤純一 イネの葉間期制御に関わる遺伝子の遺伝的相互作用 日本育種学会 第125回講演会 東北大学

2014年3月21-22日

M.Mimura, Y. Nagato, J. Itoh. Rice PLASTOCHRON genes regulate organ size and act downstream of the gibberellin signaling pathway. 7th International Rice Genetics Symposium, Manila, Philippines, 2013/11/05-08

三村真生、Luo Le、経塚淳子、長戸康郎、伊藤純一 イネの葉間期制御における PLASTOCHRON 遺伝子と OsSPL 遺伝子との関係
日本育種学会第 123 回講演会 東京農業大学
2013年3月27-28日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 純一 (ITOH, Jun-ichi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：30345186

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：