

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450034

研究課題名(和文) イネ花粉の発達過程における転写制御と高温障害による不稔のメカニズム

研究課題名(英文) Transcriptional regulation on rice pollen development and molecular mechanisms of male sterility under high temperature conditions

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 遺伝子利用基盤研究領域・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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：イネより単離した新規転写因子遺伝子について、シロイヌナズナのMYB80と比較すると、MYBドメインとMYB80に特有な領域を含む保存領域のアミノ酸配列では、88%と非常に高い相同性を示した。CRISPR/Cas9システムにより、遺伝子欠損系統を作出したところ、開花期の葯が小さく扁平で内部に花粉粒のない状態となり、この遺伝子が正常な花粉の形成に必須の役割を担っていることが示された。このイネMYB80様遺伝子は、小孢子期の葯に特異的な発現を示し、高温不稔を誘導する条件下で発現が著しく抑制された。その動態はすでに同定されている高温応答性遺伝子群と類似しており、現在その制御様式の解析を進めている。

研究成果の概要(英文)： We identified a new MYB-related transcription factor from rice. This transcription factor showed 88% identity with Arabidopsis MYB80 in the region containing a MYB domain and the conserved sequence among MYB80s. Disruption of this rice transcription factor gene using a CRISPR/Cas9 system resulted in male sterility with no pollen grains in small flat anthers at flowering stage. These results suggested that the rice transcription factor played an essential role in pollen development similarly to the Arabidopsis MYB80. This rice MYB80-like gene was expressed specifically in the immature anther at the microspore stage and down-regulated under high temperature stress conditions. Expression patterns of the rice MYB80-like gene were quite similar to those of the anther-specific high temperature-repressed genes that we identified previously. Analyses of regulatory mechanisms of these genes are now ongoing.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 イネ 花粉 雄性不稔 高温障害 ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

作物の稔実率を低下させる多様な気象要因のなかでも、高温ストレスについては、温暖化の進行に伴って被害の拡大が懸念される。イネに関しては、古くから低温による障害(冷害)が大きな問題であったが、近年はイネの栽培期間の気温の上昇により、高温障害が問題となってきている。例をあげると、2007年8月の気温が平年に比べて非常に高く、関東地域で最高気温が40℃を越える日が2日続いた。このとき、水稻の稔実率の低下が観察され、開花期とともに出穂前の高温にも影響を受けた可能性が指摘された。今後も高温化傾向が続くと予想されることから、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、不稔発生機構の分子レベルでの解明が求められている。

これまでにポット栽培したイネを高温条件(昼39℃/夜30℃)のチャンバー内に一定期間おくことにより再現よく不稔を誘導する実験系を確立しており、小孢子期の2日間の高温処理が不稔を引き起こすのに十分であることを示している。また、高温により一群のタペート特異的遺伝子が発現抑制されること、柱頭上での花粉の発芽が低下することを明らかにした(Endo *et al. Plant Cell Physiol.*, 2009)。タペートは葯壁の最内層の組織で、花粉に酵素や構成成分などを供給する役割を担っていると考えられており、その役割を果たしたのちに細胞死を起こして消失する。これまでの研究結果を総合すると、限られた時期にのみ存在して機能するタペート組織において、高温ストレスによる遺伝子発現制御の乱れが花粉稔性の低下の鍵となっていると予想される。本研究では、高温によるタペートの機能不全から花粉特性の変化に至る過程の分子制御を明らかにすることを旨とする。

タペートで働く転写制御因子については、シロイヌナズナでは、これまでに DYT1 (Zhang *et al. Development*, 2006), TDF1 (Zhu *et al. Plant J.*, 2008), AMS (Sorensen *et al. Plant J.*, 2003), MYB80 (Higginson *et al. Plant J.*, 2003), MS1 (Ito *et al. Plant Cell*, 2007) などが報告されており、いずれもその機能欠損により不稔となることが知られている。このうち MYB80 は、タペートの発達と細胞死による崩壊、花粉成分の供給などに重要な役割を果たすと考えられている (Phan *et al. Plant Cell*, 2011) が、イネではまだクローニングされていない。そこでまず MYB80 の同定を行い、その機能解析を通じて成熟花粉の形成における MYB80 の役割を明らかにするとともに、高温不稔との関係を調査する。MYB80 に着目する理由として、高温処理の時期(小孢子期)と発現時期が重なること、タペートの崩壊の制御と花粉表層のエキシン構造の形成に必要であると考えられていること、があげられる(図2参照)。加えて、すでに同

定している高温応答性遺伝子群のなかには、MYB 結合配列をもつものがあり、MYB80 の制御を受ける可能性が考えられる。

2. 研究の目的

これまでの研究から、高温不稔の発生機序に関して、図1のようなモデルが考えられる。本研究では、タペートでの遺伝子発現制御(図1のグレーの部分)を中心に、花粉の発達過程の阻害要因を解析し、高温ストレスと不稔との間をつなぐ分子メカニズムを明らかにすることを旨とする。

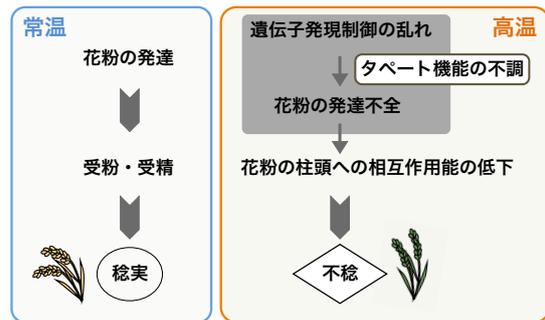


図1. 高温不稔が起こるしくみのモデル

具体的には、

- (1) タペートで働く転写因子 MYB80 の機能解析
- (2) 高温に応答する遺伝子発現制御
- (3) 高温が花粉特性に与える影響

の3つの観点からの解析を通じて、高温による生殖反応の阻害要因を分子制御の視点で明らかにすることを旨とする。

イネの MYB80 候補遺伝子に関して、イネゲノム上に類似の MYB 関連遺伝子が複数あるため、どれが MYB80 のオーソログかは未同定である。そこで本研究では、遺伝子の過剰発現やノックダウンを行うとともに、生化学的解析も行い、機能的に MYB80 を同定する。さらに、ノックダウンなどで発現が影響を受ける下流の遺伝子群の解析から、花粉発達過程での位置づけを明らかにする

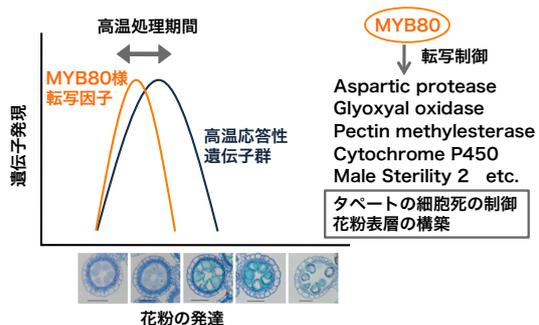


図2. MYB80 様遺伝子の発現様式と予想される機能

3. 研究の方法

本研究では、(1) イネの MYB80 の単離とその特性、(2) 高温条件下での MYB80 と関連遺伝子群の挙動、(3) 高温障害による花粉特性の変化、の3点についての解析を行う。

(1) イネの MYB80 様遺伝子の単離と特性解析

イネのゲノム配列情報をもとにシロイヌナズナの MYB80 遺伝子に類似性を示す cDNA を単離する。イネの MYB80 候補遺伝子について、過剰発現や発現抑制を行い、その表現型を解析してシロイヌナズナ MYB80 と相同の機能をもつ遺伝子を特定する。

(2) 高温条件下での MYB80 と関連遺伝子の発現特性の解析

イネの各器官や様々な発達ステージの葯から RNA を調整し、MYB80 の発現レベルを解析する。また、これまでの研究で確立された条件で高温処理を行って、MYB80 や関連する遺伝子の高温条件下での発現動態を解析する。

(3) 高温障害による花粉特性の変化

高温処理後に常温で開花期まで栽培したイネを材料として、花粉特性を無処理の場合と比較解析し、形態、柱頭への接着、発芽能、構成成分などの特性の変化から、花粉稔性の低下の要因を明らかにする。MYB80 欠損による不稔と高温障害による不稔とにおいて、タペートの消長や花粉の特性を比較解析して、共通する生殖反応の阻害要因をとらえ、タペートでの遺伝子発現と花粉稔性の因果関係を考察する。

4. 研究成果

(1) イネの MYB80 様遺伝子の単離と特性解析

イネのゲノム上に MYB 関連転写因子遺伝子は多数見つかるが、シロイヌナズナの MYB80 に最も配列が似ているのは、Os04g0470600 である。この遺伝子に対応する cDNA は単離されておらず、遺伝子構造が予測されているだけの状態であった。この遺伝子の cDNA を単離し、イントロン-エクソンの構造を決定した。この遺伝子とシロイヌナズナの MYB80 との推定アミノ酸配列を比較すると、MYB ドメインを含む保存領域では 88% の高い相同性を示し、イネの MYB80 の有力な候補であると考えられた。一方、保存領域以外のアミノ酸には類似性はほとんど認められなかったため、生物種によって異なる働きがある可能性も考えられた。さらにこの遺伝子とは別に、タペートの存在する時期の葯に特異的な発現を示す MYB 様転写因子遺伝子が少なくとも 3

つ見つかる。これらはいずれも完全長の cDNA が報告されておらず、独自に cDNA クローニングを進めている。

イネの各器官や様々な発達段階にある葯から調製した RNA を用いて、単離した MYB80 様遺伝子の発現レベルをリアルタイム PCR 法により解析した。図 3 は、単離した遺伝子のイネの各組織器官における相対的な mRNA レベルを表している。横軸の Anther 0.8, Anther 1.5 は長さがそれぞれ 0.8mm, 1.5mm の葯を意味する (他も同様)。図 3 に示すように、葉や根などの器官では mRNA が検出されず、調べた範囲では、長さが 0.8mm と 1.0mm の時期の葯に検出された。これは葯の発達過程で小孢子期を中心とする時期に相当し、タペート組織に主に発現するというシロイヌナズナの MYB80 の特性に相当する結果であった。

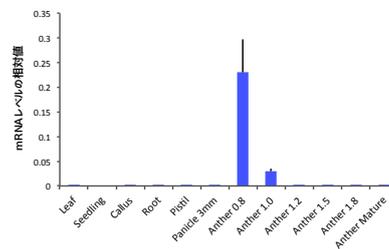


図 3. 単離したイネ MYB80 様遺伝子の発現特性

単離した MYB80 様遺伝子の機能を解析する目的で、CRISPR/Cas9 システムを用いて、遺伝子を欠損させその影響を調べた。その結果の例を図 4 に示す。タンパク質のコード領域の内部でコドンの読み枠がずれるような変異が導入された変異系統 (図 4 の右側。独立の 3 系統に由来する穎花) は、開花期の葯が野生型 (図 4 の左端) に比較して小さく扁平で、内部に花粉粒のない状態となり、雄性不稔の表現型を示した。

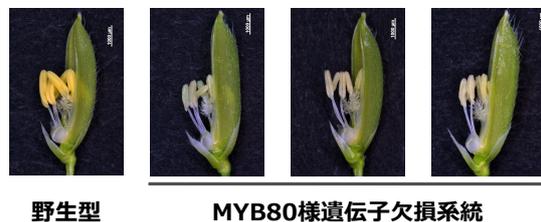


図 4. MYB80 様遺伝子欠損系統の穎花の形態

変異系統の形態の変化は葯に特異的であり、葉の形態や全体の草姿などには変化が見られず、葯以外の花器官、穎や雌蕊などにも形態的な変化は認められなかった。また、MYB ドメインと MYB80 に特有な領域の計 3 カ所に変異を導入したが、いずれも同様の結果となった。このことは、イネから単離した遺伝子

がシロイヌナズナの MYB80 と同様に、正常な花粉の形成に必須の役割を担っていることを示している。今後、これらの変異系統を詳細に観察し、花粉形成のどの過程で異常が生じているのかを解析する予定である。また、遺伝子の欠損では完全に不稔になるので、ノックダウン系統や過剰発現系統を作出し、遺伝子発現レベルの増減がどのような影響を及ぼすかを解析しているところである。

(2) 高温条件下での MYB80 と関連遺伝子の発現特性の解析

単離した MYB80 様遺伝子が、高温条件下でどのような発現動態を示すかを調べた。図 5 は、この MYB80 様転写因子遺伝子の高温に反応した発現量の変化を表している。高温処理（昼 39℃/夜 30℃）の期間を 1 日間から 4 日間とし、それぞれの日数の高温処理後に葯から調製した RNA を用いて MYB80 様転写因子遺伝子の発現レベルを相対値で表した。図では独立の 2 回の実験結果を示している。MYB80 様転写因子遺伝子の高温応答性に関して、高温処理期間の初期に発現量が著しく低下することがわかった。

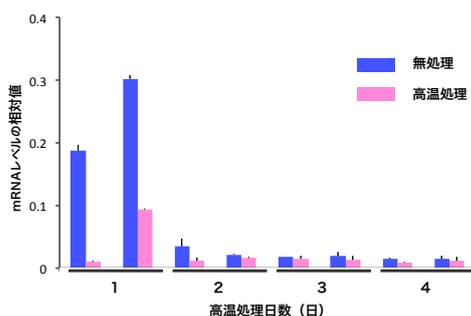


図 5. イネ MYB80 様遺伝子の高温応答性

この結果は、これまでの研究ですでに同定している高温応答性遺伝子群の発現変動パターンとよく似ている。MYB80 様遺伝子自身の発現レベルが高温に反応して抑制されることから、MYB80 様転写因子により発現制御される下流の遺伝子も高温に反応した変動パターンを示すと考えられ、高温応答性遺伝子群の中に MYB80 の制御を受ける遺伝子が含まれている可能性がある。今後、これらの高温応答性遺伝子群の制御領域を解析して行く予定である。現在、高温応答性遺伝子のひとつである CYP703 遺伝子について、MYB80 の制御を受けるかどうか解析を進めている。また、MYB80 と同様の時期にタペートで働くことされる転写因子 TDR は高温応答性のパターンが異なり、タペート内の遺伝子発現が同調しているわけでないと考えられる。今後は MYB80 と他の転写因子との関係を解析する必要がある。

(3) 高温障害による花粉特性の変化

前項と同様に、2 日間の高温処理の後、常温で開花期まで栽培したイネを材料として、花粉の特性の解析を行う。高温処理による花粉粒の減少は観察されていないが、径の小さな花粉粒の割合が増えることがわかった。予備的な解析では、花粉内部のデンプンの蓄積に異常や不足があるのではないかという結果が得られており、今後詳細な解析により確認する必要がある。イネ花粉の培地上での発芽試験は、従来から発芽率が安定せず、高温処理の有無による違いを検定することが困難であった。培地条件や試料の準備、手技等を改善し、無処理の場合の発芽効率を改善することができた。これまでの結果では、高温処理後の花粉に関して、葯から培地上への花粉の飛散量が低下し、発芽率も低下するという傾向が認められた。今後、解析の精度を上げて、高温により影響される特質を絞りこむことを計画している。

以上の結果を総合して、本研究ではイネより MYB80 様遺伝子を単離し、それがシロイヌナズナの MYB80 と同様に、小孢子期の葯に特異的に発現し、正常な花粉の形成に必須の転写因子をコードする遺伝子であることを示した。また、高温で誘導される雄性不稔に関して、今回単離した MYB80 様遺伝子が高温に反応して発現抑制され、高温応答性遺伝子の一部を制御する可能性が示唆された。現在、MYB 結合配列をもつ高温応答性遺伝子について、MYB80 の制御を受けるかどうか調べている。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 川岸 万紀子、東谷 篤志 イネの高温不稔における花粉の特性と遺伝子発現制御
日本作物学会第 243 回講演会 2017.3.29
東京大学(東京都・文京区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川岸 万紀子 (KAWAGIAHI-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 遺伝子利用基盤研究領域・上級研究員
研究者番号：50355707

(2) 研究分担者

吉田 均 (YOSHIDA, Hitoshi)

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 遺伝子利用基盤研究領域・ユニット長
研究者番号：30355565

(3)研究分担者

大島 正弘 (OHSIMA, Masahiro)

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 遺伝子
利用基盤研究領域・領域長

研究者番号：20355572