

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640119

研究課題名(和文) 胚のRNAの消長に視点をおいたイネの種子寿命の解析

研究課題名(英文) The analysis of seed longevity in rice from the viewpoint of stability of RNA in the embryo.

研究代表者

金勝 一樹 (KANEKATSU, Motoki)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60177508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： 種子寿命は、種子の流通や遺伝資源の保持の観点からみて極めて重要な形質である。吸水前の種子中には発芽時のタンパク質合成に必要な全てのRNA(long-lived mRNA)がすでに揃っている。したがって、これらのRNAの安定性が種子寿命の維持に関わる可能性がある。本研究では、イネ種子を材料とした解析から、発芽に必要なRNAの転写は開花後15～20で完了していること、および種子保存中のこれらのRNAの安定性が種子寿命の保持に重要であることを明らかにした。さらに、染色体断片置換系統群を用いて種子寿命の制御に関わる遺伝子の探索を行った。また、種子寿命の長い有用な遺伝資源となり得る品種を複数見出した。

研究成果の概要(英文)：The seed longevity is an important character from the viewpoint of maintenance of the genetic resource and keeping of the seed vigor in the agricultural market. The mature dry seeds contain translatable mRNAs called long-lived mRNAs and protein synthesis during the initial phase of seed germination occurs from these mRNAs, without de novo transcription. This suggests that the stability of long-lived mRNAs may be important to maintain the seed longevity. It was found that i) the long-lived mRNAs required for germination predominantly accumulate in rice embryo between 10 and 20 days after flowering; and ii) the stability of the RNAs is involved in the regulation of longevity in rice seeds. In addition, the analysis about the genes responsible for controlling of seed longevity has been carried out using chromosome segment substitution lines. Moreover, excellent cultivars with long seed life could be found as a result of examination using seeds in the world core collection.

研究分野：植物育種学

キーワード：種子寿命 イネ RNA 染色体断片置換系統群

1. 研究開始当初の背景

作物の中にはタマネギのように種子の寿命が短いものがある。種子寿命は、種子の流通や遺伝資源の保持の観点からみて極めて重要な形質であるといえる。しかしながら種子の寿命を制御する機構については不明な点が多く残されている。

(1) 種子に存在する long-lived RNA :

完成したイネの種子をシクロヘキシミド (翻訳阻害剤) 存在下で吸水させても発芽は起こらないが、アクチノマイシン D で転写を完全に阻害しても十分に発芽が誘導されることを見出した (Plant Cell Physiol. 2012)。シロイヌナズナやトウモロコシの種子でもこの現象は報告されている。このことは、発芽誘導に必要なタンパク質合成は、種子中にすでに備わっている mRNA を用いて行われていることを示している。これらの RNA は種子形成時に転写され、発芽に至るまで長期間保持されているので long-lived RNA とも呼ばれている。したがってこの long-lived RNA の中に、発芽に必要な転写産物があることになる。逆に言うと、発芽誘導に不可欠な long-lived RNA が1つでも損なわれると、発芽能も消失すると考えられる。

(2) 貯蔵種子の RNA 量

エンドウでは、種子を長期間保存すると種子中の RNA 量が減少することが報告されている。そこで複数の品種のイネについて解析したところ、種子の胚の RNA 量が1年間の貯蔵期間で顕著に低下することを明らかにした。また、3年以上室温で放置して発芽能が消失した種子の中には、胚の RNA 量が50%以下になるものもあった。

以上のことから、種子における RNA の分解が種子の寿命に密接に関係しており、発芽に必要な不可欠な胚の long-lived RNA の安定性を制御できれば種子の寿命の延長につながる可能性がある。

2. 研究の目的

種子の寿命について胚の RNA の安定性に視点を置いた解析を行い、種子寿命を遺伝的に改良することを最終的な目標として、まずは発芽誘導に不可欠な long-lived RNA を特定するための実験を行った。さらにイネは遺伝解析用の優れた実験材料がそろっているので、それらを利用して種子寿命を制御する遺伝子の特定を試みた。また、有用な遺伝資源となり得る品種の探索も行った。

3. 研究の方法

発芽誘導に不可欠な long-lived RNA の特定については、トランスクリプトームおよびプロテオーム解析の手法を用いて行った。また、遺伝解析による種子寿命の制御に関わる遺伝子の特定については、染色体断片置換系統群 (CSSLs) を材料として解析を行った。さらに有用な遺伝資源となり得る品種の探索は、農業生物資源ジーンバンクで配布してい

る「世界のイネコアコレクション」の種子の寿命を評価することで行った。種子の発芽能を人為的に低下させる「加齢処理」は、種子を38℃で湿度80%の条件下に1~2ヶ月置くことで行った。

4. 研究成果

(1) 発芽誘導に不可欠な long-lived RNA の特定

① 発芽誘導に不可欠な long-lived RNA の転写が完了する時期の解析

種子形成期間中において、発芽に必須の long-lived RNA の転写が完了する時期を特定するために、開花後10から40日目 (DAF) のイネの種子から経時的に胚を分離し、転写阻害剤であるアクチノマイシン D (ActD) 存在下で吸水させ、発芽試験を行った。その結果、10DAF の胚は発芽能を有しているものの、転写を阻害すると発芽が著しく抑制された。これに対して20DAF以降の胚は ActD が存在していても高い発芽率を示した (図1)。したがって発芽に必須の long-lived RNA は10DAF から20DAF の間にその転写が完了することが明らかとなった。



図1 転写阻害剤(Act D)存在下で吸水させた時の種子形成期間中の種子から分離した胚の発芽 (品種: 日本晴)

② トランスクリプトームおよびプロテオーム解析による発芽に必須の long-lived RNA の特定

発芽誘導に必要な long-lived RNA が全て揃っている20DAFの胚と、まだ蓄積していない10DAFの胚の mRNA について、RNA-Seq 法で網羅的な解析を行った。その結果、10DAF から20DAFにかけて新たに転写された発芽に必須の long-lived RNA の候補として416種類の mRNA が特定された。このうち、発芽時に翻訳されることが確認できたものは、OsCML1, chaperone protein dnaJ, amidase family protein、DEAD-box ATP-dependent RNA helicase の4つであった。一方、転写阻害剤存在下で発芽させた胚についてプロテオーム解析をしたところ、転写が阻害された状態でも合成される139種類のタンパク質を同定

することができた。これらのタンパク質には、炭水化物の代謝、細胞骨格の形成、輸送、翻訳、および植物ホルモンの合成や応答等の発芽誘導とその後の胚の生長に重要な役割を果たすものが多く含まれていた。したがってこのような機能を持つタンパク質が、吸水直後に long-lived mRNA を用いて翻訳されていることが強く示唆され、種子発芽能を維持するうえでこれらの RNA の安定性が重要となることが考えられた。

(2) 遺伝解析による種子寿命の制御に関わる遺伝子の特定

①「日本晴」、「ササニシキ」、「ハバタキ」、「ひとめぼれ」の種子寿命と胚の RNA の安定性の解析

イネの種子寿命は、明らかな品種間差があり遺伝的に制御される形質である。またイネでは染色体断片置換系統群や戻し交雑自殖系統群が作成されており、種子寿命についてもこれらの系統群を用いて遺伝解析を行えることが期待できる。そこで、これらの系統群の親となる品種を中心にして、種子の寿命と胚の RNA の分解についての解析を行った。38°Cで湿度 80%の条件下で種子にストレスを与えて(加齢処理)発芽能の維持について評価した結果、「日本晴」、「ササニシキ」は著しく早く発芽能が消失したのに対し、「ハバタキ」「ひとめぼれ」は比較的寿命が長く維持されることが明らかとなった(図2)。

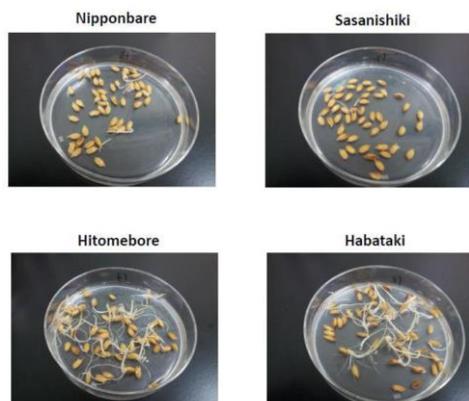


図2 36°C・湿度 80%で 8 週間貯蔵した種子の発芽

また、寿命の短い品種では、長いものと比較して胚の RNA が分解されやすい傾向が認められた。

②染色体断片置換系統群(CSSLs)を用いた種子寿命の遺伝的改良に関する解析

種子寿命の短い「ササニシキ」を遺伝的背景とし、その染色体を部分的に種子寿命の長い「ハバタキ」のものに置き換えた染色体断片置換系統群(CSSLs)が作成されており、利用可能である。そこでこれらの CSSLs の種子を用いて種子寿命の解析を行った。その結果、染色体の一部がハバタキ型に置換されるこ

とにより「ササニシキ」よりも有意に種子寿命が長くなる系統が複数あった。したがって置換された「ハバタキ」のこれらの染色体領域に種子寿命を制御する遺伝子が座乗していることが明らかになった。

(3) 世界のイネコアコレクションを用いた有用な遺伝資源の探索

農業生物資源ジーンバンクで配布されている世界のイネコアコレクションは、現在世界中で栽培されているイネが持つ遺伝子の多くの部分をカバーできる品種群である。これらのコレクションの 69 品種のうち、十分な量の種子を確保できる品種について加齢処理を行って種子寿命を評価した。その結果、ほとんどの種子の発芽能が消失する条件でも 70%以上の発芽率を維持する品種を複数見出した。これらの品種は、種子寿命を改良するための有用な遺伝資源になると期待できる。

以上の解析により、胚の RNA の安定性が種子寿命の維持に深く関与していることが示され、種子寿命を制御する遺伝子を特定できればこれらの遺伝子を用いて種子寿命の遺伝的改良も可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Sano, N., Ono, H., Murata, K., Yamada, T., Hirasawa, T., Kanekatsu, M. (2015) Accumulation of long-lived mRNAs associated with germination in embryos during seed development of rice. *J. Experimental Botany* 査読有 Vol. 66: 4035-4046
DOI: 10.1093/jxb/erv209

[学会発表] (計 5 件)

- ① 熊坂裕太郎、佐野直人、山田哲也、村田和優、金勝一樹
イネの胚に存在する RNA の安定性と種子の寿命
種子生理生化学研究会 2014 年 12 月 15 日 ほてる大橋(新潟県新潟市)
- ② 熊坂裕太郎、佐野直人、村田和優、山田哲也、金勝一樹
胚に含まれる RNA の分解に視点をおいたイネの種子寿命の解析
日本育種学会第 126 回講演会 2014 年 9 月 27 日 南九州大学(宮崎県都城市)
- ③ 佐野直人、竹林裕美子、中野弘史、山田哲也、金勝一樹
イネ種子の発芽初期において long-lived mRNA から翻訳される胚のタンパク質のショットガンプロテオーム解析
日本育種学会第 125 回講演会 2014 年 3 月 22 日 東北大学(宮城県仙台市)

- ④ 佐野直人、山田哲也、金勝一樹
イネ種子形成過程の胚における発芽に必要な long-lived mRNA の蓄積の解析
種子生理生化学研究会 2013 年 12 月 7 日
箱根高原ホテル (神奈川県足柄下郡)
- ⑤ 佐野直人、山田哲也、金勝一樹
イネ種子の発芽初期における long-lived mRNA を用いたタンパク質合成の解析
種子生理生化学研究会 2013 年 12 月 7 日
箱根高原ホテル (神奈川県足柄下郡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金勝 一樹 (KANEKATSU Motoki)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：60177508