

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292008

研究課題名(和文) イネの花器官サイズの制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on the regulatory mechanisms of floral organ size determination in rice.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネの花器官サイズ制御の分子機構を明らかにするため、花器官の【数】は変化せずに【サイズ】のみが野生型の半分以下に縮小するminiature floral organs (mif) 変異体および、雄蕊の中でも葯が特異的に短縮するshort anther変異体(san)の解析を行った。花メリステム(FM)が巨大化するfon1変異体とmifの二重変異体では花器官は小型化したままであったため、FMサイズと花器官サイズの制御は独立したものであることが明らかとなった。また、MIFはクロマチンリモデラー様タンパク質、SANはアダプター様タンパク質をコードしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the molecular mechanism underlying the regulation of floral organ (FO) size in rice, we analyzed two mutants; 1) miniature floral organs (mif) in which the NUMBER of FOs are not altered, but the SIZE of FOs are reduced to less than half of wild type, 2) short anther (san) in which the stamens (especially the anthers) are specifically shortened. Double mutants between mif and fon1 in which the floral meristem (FM) are enlarged showed small FOs, indicating regulatory mechanisms between FM size and FO size are independent. We also identified that the MIF gene encodes a member of chromatin remodeler-like proteins, and SAN encodes an adapter-like protein.

研究分野：農学

キーワード：イネ 発生・分化 花器官 サイズ制御 変異体 メリステム MIF遺伝子 SAN遺伝子

1. 研究開始当初の背景

作物の花器官のサイズは収量に結びつく重要な要素である。たとえばイネにおいては、内外穎や雌蕊のサイズは種子サイズに直接結びつき、雄蕊のサイズはストレス条件下での稔実率に影響すると考えられる。しかし、作物のみならず植物の花器官サイズの制御機構については未だその詳細は明らかでない。

モデル植物のシロイヌナズナでは、*aintegumenta (ant)*, *kluh (klu)*, *big brother (bb)*などをはじめ、複数の花器官サイズの変異体が知られており、細胞増殖の促進やその終止時期、細胞伸長、などの基本マシナリーが花器官のサイズ決定に関与することは明らかにされているが、未だ変異体の数が少なく、これら遺伝子を制御する遺伝的ネットワークの全貌は解明されていない¹。一方、イネにおいてはこれらの遺伝子に対応する変異体が知られておらず、花器官サイズに着目した報告はほとんどなく、今後の研究によるブレイクスルーが期待できる。

花器官の基部-先端部方向の伸長が抑制される変異体の多くはジベレリン等の植物ホルモンの異常に起因するが、花器官だけでなく、栄養成長期や穂においても基部-先端部方向の伸長が抑制されるいわゆる矮性変異体であり、花器官固有のサイズ制御ではない。

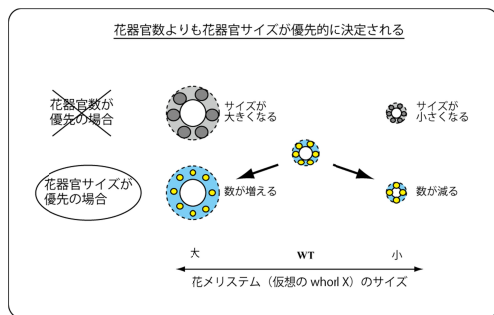


図1. 花器官サイズ、花器官数と花メリステムサイズとの関係

植物の花器官形成においては、花メリステム (floral meristem; FM) 上の whorl と呼ばれるリング状の仮想の場に MADS ボックス型転写因子のようなホメオティック遺伝子が特異的に発現し、花器官のアイデンティティを確立し、生長してゆく。このため、向-背軸方向に花器官サイズを大きくするためには、whorl の大きさを規定する FM の大型化が必要と考えられるが、FM が大型化する *fon1* 変異体では花器官の数は増えるものの、サイズは増大しない²。逆に、FM が小型化する *lonely guy (log)* 変異体では

花器官数が激減するが、著しいサイズの縮小は観察されていない³。このことは、花器官サイズは FM サイズとは独立の制御機構によって、花器官数よりも優先的に決められていることを示唆しているが、その詳細は明らかでない (図1)。

花器官サイズの制御機構を理解するためには、花器官サイズの変化した変異体を用いた分子遺伝学的研究によって、その制御因子を同定し、機能と遺伝的ネットワークを明らかにすることが有効である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、花器官サイズの変化した変異体群の解析により、花器官サイズ制御の構成要素を明らかにするとともに、原因遺伝子を同定する。具体的には、担当者らが新たに発見した変異体を中心として、花器官の形成過程を詳細に観察することにより、異常の原因となるステップを明らかにする。目標としては、内生花器官である鱗被、雄蕊、雌蕊のサイズが縮小する *miniature floral organs (mif)* と、内外穎を含む穎花全体が縮小する *tiny grain (tig)*、葯が短縮化する *short anther (san)* などの変異体について、FM サイズとの関係を中心に、異常の原因ステップを明らかにする (図2)。

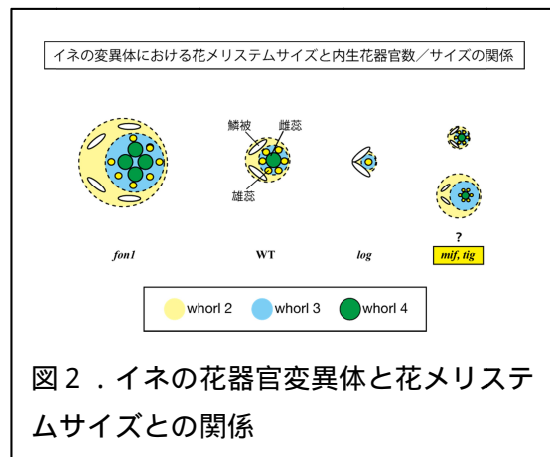


図2. イネの花器官変異体と花メリステムサイズとの関係

- ・ 上記変異体と *fon1* などの花器官数変異体との間で二重変異体を作成し、原因遺伝子間の遺伝的相互作用を明らかにする。
- ・ 上記変異体の原因遺伝子のマッピング・同定を行う。研究期間内に2遺伝子を単離し、その機能と作用機作を明らかにする。

上記の *fon1*² や *log*³、担当者らの同定した *mif*⁴ 等の変異体では FM や特定の whorl のサイズの変化により、花器官数は増減するが、花器官サイズには劇的な変化が観察されない。このことは、花器官サイズは固有の制御機構によって決定されていることを示唆す

るが、花器官サイズを制御する因子に関しては変異体の報告がほとんどなかった。本研究で対象とする花器官サイズの変異体を用いることによって、これまでは不可能であったさまざまな実験が可能となる。「*mif* と *fon1* との二重変異体ではコンパクトな花器官が多数形成されるのだろうか?」「*log* では花器官数が減少するのに、なぜ *mif* では減少しないのか?」など、疑問はつきない。分子遺伝学的な解析によって、花器官サイズの決定に関わる新規形態形成因子の作用機構が明らかにされるであろう。さらに、得られた知見を応用することによって、収量性や環境ストレス耐性の向上、新規な粒形をもつ品種の開発などの効果が期待される。

3. 研究の方法

- (1) 花器官サイズに異常を生じる新規変異体 *mif*、*tig*、*san* などの花器官形成過程を詳細に観察することにより、生長プログラムのどのステップに異常を生じたのかを解析する。
- (2) 上記の変異体と *fon1* などの間で二重変異体を作成し、原因遺伝子間の遺伝的相互作用を明らかにする。
- (3) 上記変異体の原因遺伝子を同定し、発現パターンやタンパク機能、過剰発現体を解析する。具体的には、インド型イネ「Kasalath」との F2 集団を用いたマップベースクローニングを基本とし、SSR などの PCR マーカーを用いてファインマッピングを行う。このような定法のマップベースクローニングが困難である場合には、次世代シーケンス(NGS)解析を行い、検出した変異の中から、分離集団において各個体の表現型と遺伝子型が完全に一致するものを同定する。変異の確認のために、CRISPR-Cas9 を用いて候補遺伝子にフレームシフト変異を導入し、表現型の確認を行う。

これらの解析を通じて、花器官サイズの制御に関わる新規因子の機能を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) *mif* 変異体の解析と原因遺伝子のクローニング
mif 変異体では、外穎・内穎のサイズは正常であるが、鱗被、雄蕊、雌蕊(内部花器官)が極端に小型化していた。また、雄蕊様の鱗被、細胞塊を伴う半透明の葯、雌蕊の増加など、アイデンティティや FM の有限性の異常を示した。
まず、集中的なファインマッピングをめざし、インド型イネ「Kasalath」との交配集団を数多く作成した。*mif* は日本型イネを遺伝的背景とする雌性、雄性ともに不稔の変異体であるため、*+mif* の個体に由来する分離世代から、表現型が正常のものを 4 個体選び、種子親とした。

これら 4 個体の中には、少なくとも 1 個体以上のヘテロ個体が含まれるものと期待し、Kasalath(花粉親)との交配を行い、15 種類の F2 集団を作成した。これらの F2 集団を圃場で展開し、*MIF* 遺伝子のマップベースクローニングを開始した。2 年にわたって栽培を行ったが、F2 では *mif* の表現型を示す個体が全く現れなかった。このことの原因として、交配に用いた 4 個体がいずれも野生型ホモであった、Kasalath ゲノムとの何らかの相互作用がある、などの可能性が考えられた。

作成した集団を用いてのマップベースクローニングは困難であると判断し、日本型イネ背景の *mif* 分離集団を用い、NGS 解析によって候補領域を探索した。探索に当たっては、ヘテロブロックマッピング法(遺伝研・佐藤豊博士ら、未発表)を用いた。自殖を重ねて得た M5 世代の *+mif* 個体に由来する後代から、変異型 5 個体、表現型が正常のもの 15 個体の合計 20 個体から抽出した DNA を等量ずつ混合し、バルクとした。このバルク DNA を用いて NGS 解析を行った結果、第 7 染色体上にヘテロ型を示す染色体領域(ヘテロブロック)を見出した。*mif* に関する分離世代のバルク DNA を用いているため、原因遺伝子の周辺領域はヘテロ型で維持され、それ以外の領域の大部分はホモ型を示すはずなので、上記の領域を候補領域と考えた。同領域には、複数の変異が検出されたが、そのうち、クロマチンリモデラー類似遺伝子中の変異が分離世代における各個体の表現型と完全に一致したため、これが有力な候補遺伝子と推測された。さらに、CRISPR-Cas9 によって同遺伝子の破壊系統を作出したところ、*mif* と同様に内部花器官が小型化したため、この遺伝子が原因遺伝子であると結論づけた。

これらの結果は、外部花器官形成時と内部花器官形成時との間に、クロマチンなどのダイナミックな変化を伴う遺伝子発現の制御機構が存在し、*mif* 変異体ではこれが攪乱していることを示唆しており、非常に興味深い。

一方、FM サイズの大型化する *fon1* との二重変異体では、雄蕊のサイズは小型化したままであったため、*MIF* による内部花器官のサイズ制御は FM サイズ制御とは独立のものであると考えられた。

(2) *tig* 変異体の解析

tig 変異体では、*mif* とは異なり、外穎、内穎をも含む小穂を構成する各器官のサイズが野生型の約半分に縮小するにもかかわらず、草丈はやや減少するにとどまるため、生殖器官特異的なサイズ制御機構の変異体と期待した。また、雄蕊数が

やや減少する一方、雌蕊数の増加が見られた。

しかし、マッピング用に Kasalath との交配を行ったが、種子は全く得られず、*tig* 自身も完全不稔であった。さらに、*tig* の親および兄弟個体に由来する 200 以上の分離個体を観察したにも関わらず、同変異は再現されなかった。これらのことから、*tig* は、半数体個体であった、遺伝的キメラであった、などの可能性が示唆された。以上の結果から、*tig* の解析は中止した。

(3) *san* 変異体の解析と原因遺伝子のクローニング

san は、雄蕊、特に葯の長さが野生型の半分程度に短くなる変異体であり、器官特異的かつ基部・先端軸特異的なサイズ制御機構の解明が期待された。当初、*san* の遺伝的背景は日本型イネであると想定し、Kasalath との F2 集団を用いたマッピングを進めたが、解析の結果、*san* のゲノムはインド型に近い特徴を示したため、解析は難航した。しかし、多数のマーカーを用い、原因遺伝子のマッピングを進め、最終的に第 5 染色体短腕上の機能未知遺伝子中に表現型と完全連鎖する変異を見出した。この遺伝子はアミノ酸配列の特徴から、タンパク質間相互作用に関与するものと推測された。今後、CRISPR-Cas9 によって同遺伝子の破壊系統を作出し、確認を行う。

また、変異個体の詳細な解析により、*san* では開穎が起きないことが明らかになった。葯だけではなく、鱗被のサイズや形態にも変異が生じている可能性が示唆され、興味深い。

<引用文献>

- (1) Delgado-Benarroch L. et al. (2009) *Plant Signal. Behav.* **4**: 814-7.
- (2) Suzaki T. et al. (2004) *Development* **131**: 5649-57.
- (3) Kurakawa T. et al. (2007) *Nature* **445**: 652-5.
- (4) Ohmori S. et al. (2009) *Plant Cell* **21**: 3008-25.

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 3 件)

- (1) Lombardo F., Kuroki M., Yao S.-G., Shimizu H., Ikegaya T., Kimizu M., Ohmori S., Akiyama T., Hayashi T., Yamaguchi T., Koike S., Yatou O. and Yoshida H. (2017) The *superwoman1-cleistogamy2* mutant is a novel resource for gene containment

in rice. *Plant Biotechnol. J.* **15**: 97-106. 査読有

DOI: 10.1111/pbi.12594

- (2) Koike S., Yamaguchi T., Ohmori S., Hayashi T., Yatou O. and Yoshida H. (2015) Cleistogamy decreases the effect of high temperature stress at flowering in rice. *Plant Prod. Sci.* **18**: 111-7. 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/ppls/18/2/18_111/_pdf
- (3) Lombardo F. and Yoshida H. (2015) Interpreting lemma and palea homologies: a point of view from rice floral mutants. *Front. Plant Sci.* **6**: Article 61. 査読有
DOI: 10.3389/fpls.2015.00061

[学会発表](計 9 件)

- (1) 吉田均、松村葉子、森浩一、山本剛、中島敏彦、Lombardo Fabien、秋山高、川田元滋 イネの形態形成と耐病性に関わる *DDR1* 遺伝子 日本育種学会 2017.3.29-30 名古屋大学(愛知県・名古屋市)
- (2) 吉田均、Lombardo Fabien、秋山高、佐藤豊 Inner floral organ development is perturbed in the rice miniature floral organs mutant. 日本植物生理学会 2017.3.15-18 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)
- (3) 林高見、山口知哉、小池説夫、黒木慎、池ヶ谷智仁、清水博之、大森伸之介、福島陽、吉田均 温度勾配チャンバーを用いたイネ閉花受粉性突然変異体 *spw1-c/s* の温度反応性評価 日本育種学会 2016.3.21-22 横浜市立大学(神奈川県・横浜市)
- (4) 黒木慎、池ヶ谷智仁、清水博之、林高見、福島陽、山口知哉、大森伸之介、吉田均 イネ閉花受粉性突然変異体 *spw1-c/s2* の圃場条件における特性評価 日本育種学会 2016.3.21-22 横浜市立大学(神奈川県・横浜市)
- (5) 大森伸之介、吉田均 ガンマ線で誘発したイネ閉花受粉性変異体 H193mt における複雑なゲノム再編成 日本植物生理学会 2016.3.18-20 岩手大学(岩手県・盛岡市)
- (6) 大森伸之介、吉田均 2つの新規閉花受粉性イネ突然変異体の原因遺伝子のマッピング 日本育種学会 2015.3.21-22 東京農業大学(東京都・世田谷区)
- (7) Yoshida H. Fine-tuning the floral phenotypes in rice: narrow but deep gaps between mutations and agronomic traits. KAAB International Symposium 2014 2014.9.29 新潟大学(新潟県・新潟市)

- (8) 吉田均、黒木慎、姚善国、Lombardo Fabien、清水博之、池ヶ谷智仁、木水真由美、大森伸之介、秋山高、林高見、小池説夫、矢頭治 イネにおけるBクラス変異のもたらず閉花性と稔実率の trade-off 日本育種学会 2014.9.26-27 南九州大学(宮崎県・都城市)
- (9) 吉田均、黒木慎、姚善国、Lombardo Fabien、清水博之、池ヶ谷智仁、木水真由美、大森伸之介、秋山高、林高見、小池説夫、矢頭治 Bクラス変異のもたらず閉花性と稔実率の trade-off イネ 遺伝学・分子生物学ワークショップ 2014 2014.7.11-12 東京大学(東京都・文京区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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