

新農業展開ゲノムプロジェクト: 重要形質領域(プロジェクト研究成果シリーズ511)

誌名	重要形質領域
ISSN	
著者名	
発行元	農林水産省農林水産技術会議事務局
巻/号	511号
巻号補足	
掲載ページ	p. 1-259
発行年月	2014年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



新農業展開ゲノムプロジェクト －重要形質領域－

Genomics for Agricultural Innovation

農林水産技術会議事務局

農林水産省

新農業展開ゲノムプロジェクト －重要形質領域－

Genomics for Agricultural Innovation

2014年3月

序 文

研究成果シリーズは、農林水産省農林水産技術会議が研究機関に委託して推進した研究の成果を、総合的かつ体系的にとりまとめ、研究機関及び行政機関等に報告することにより、今後の研究及び行政の効率的な推進に資することを目的として刊行するものである。

この第 511 集「新農業展開ゲノムプロジェクト—イネの質的形質遺伝子の単離と機能解明及び遺伝子ネットワークの解明（重要形質領域）—」は、農林水産省農林水産技術会議の委託プロジェクト研究として、2008 年度から 2012 年度までの 5 年間にわたり、独立行政法人農業生物資源研究所及び国立大学法人名古屋大学を中心に実施した研究成果をとりまとめたものである。

農業上重要な遺伝子の解明、画期的作物の開発等のためのゲノム研究基盤の確立を図ることを目的として、農林水産省は 1998 年に国際コンソーシアムを立ち上げてイネの全ゲノム塩基配列の解読に着手し、2004 年に完全解読を達成した。その後も、病虫害抵抗性、収量性、環境ストレス耐性等に関する遺伝子約 100 個を単離し機能を解明して特許化を行うなど、我が国はイネゲノム情報を活用した研究分野において世界をリードしてきた。

このような状況の中で、本研究ではイネの突然変異体等を利用して、収量性、低コスト化、環境修復、病害抵抗性、出穂期、高温登熟耐性等に関わる 52 個のイネの重要農業形質遺伝子の単離及び機能解明を実施した。

本研究の成果は、新品種開発を飛躍的に効率化する DNA マーカー育種へ活用できると期待されることから、農作物の品種改良等を行っている研究機関の関係者が今後の研究計画を、農作物の生産振興に係る行政機関の関係者の方々等が今後の施策を考える上で有用であると考えている。

最後に、本研究を担当し、推進された方々の労に対し、深く感謝の意を表する。

2014 年 3 月

農林水産省農林水産技術会議事務局長

雨宮 宏司

目 次

第1編 イネの成長・代謝遺伝子ネットワークの解明

研究の要約	1
-------	---

第1章 出穂期の遺伝子ネットワーク解明

1 栽培環境に応答するイネ出穂期制御遺伝子ネットワークの解明 (GPN0001)	14
--	----

第2章 形態制御の遺伝子ネットワーク解明

1 複雑形態制御ネットワークの解明 (GPN0002)	22
-----------------------------	----

第3章 葉緑体分化の遺伝子ネットワーク解明

1 イネの光シグナルによる葉緑体発達・草型ネットワークの解明 (GPN0003)	27
2 転写因子 GLK を介した葉緑体発達のネットワークの解明 (GPN0004)	35

第4章 光信号伝達系の遺伝子ネットワーク解明

1 イネの伸長を制御する光受容体フィトクロムの信号伝達経路に関わる新規遺伝子の単離・解析ネットワークの解明 (GPN0005)	49
---	----

第5章 光合成の遺伝子ネットワーク解明

1 イネ葉緑体内のレドックス状態と炭素代謝の最適化 (GPN0006)	52
2 光合成炭酸固定酵素 Rubisco 量の適量化 (GPN0007)	56
3 光エネルギー利用効率の最適化：イネの戦略 (GPN0008)	62

第2編 イネと微生物の遺伝子ネットワークの解明

研究の要約	69
-------	----

第1章 イネと微生物の遺伝子ネットワークの解明

1 イネ・菌根菌共生系の感染応答過程を制御する遺伝子ネットワークの解明 (PMI0001)	80
2 エンドファイト - イネの共生相互作用の解明 (PMI0002)	82
3 イネにおける菌根共生品種間差とその分子的基盤 (PMI0003)	85
4 イネー細菌エンドファイト相互作用に働くイネ遺伝子の同定と機能解明 (PMI0004)	88

第2章 イネと病原微生物の遺伝子ネットワークの解明

1 病害抵抗性関連遺伝子の単離と遺伝子間ネットワークの解明 (PMI0005)	92
2 いもち病菌感染初期の菌糸伸長を抑制するイネ圃場抵抗性遺伝子の単離と機能解明 (PMI0006)	97
3 耐病性シグナル伝達に関わるタンパク質複合体の機能解明 (PMI0007)	99
4 イネの誘導抵抗性におけるシグナル・ネットワーク解明 (PMI0008)	104
5 感染初期におけるイネといもち病菌相互作用の解明 (PMI0009)	108
6 いもち病菌エフェクタータンパク質によるイネ耐病性発現調節機構の解明 (PMI0010)	110

第3編 イネの質的形質遺伝子の単離と機能解明

研究の要約	113
-------	-----

第1章 おもな個別研究課題の成果

1 穂や草型など収量の決定に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究	
(1) イネ穂の形と粒数に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0001)	130
(2) イネの種子形に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0002)	134
(3) イネの耐倒伏性に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0003)	140
2 酸化還元ストレス、カドミウム、栄養不足等の環境ストレス耐性に 係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究	
(1) ホウ素・ヒ素およびカドミウムの輸送機構の解明 (IPG0005)	147
(2) イネのケイ酸輸送とアルミニウム耐性に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0006)	149
(3) 地力窒素と土壌固定リンの吸収能力に優れたイネの選抜と育種 (IPG0007)	156
(4) 低アンモニウムイオン吸収利用能力に関わる遺伝子の単離と窒素利用機構の解析 (IPG0008)	167
(5) 穂発芽耐性遺伝子の単離と機能解析 (IPG0010)	170
(6) イネの耐湿性に寄与する遺伝子の同定と機能解析 (IPG0012)	173
3 イネ種子の登熟や高温下での品質に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究	
(1) イネ胚乳の初期発生とゲノムインプリンティングの解析 (IPG0017)	184
(2) 開花期低温ストレス耐性関連遺伝子の単離と機能解析 (IPG0019)	187
(3) 登熟期高温で発生する乳白粒を低減する遺伝子の単離・解析 (IPG0020)	190
(4) 高温登熟性優良品種の遺伝子発現特性解析と高温耐性関連遺伝子の単離・解析 (IPG0021)	195

第2章 各個別研究課題の概要

1 穂や草型など収量の決定に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究	
(1) イネの直立葉形質に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0004)	201
2 酸化還元ストレス、カドミウム、栄養不足等の環境ストレス耐性に係わ る主要な質的形質遺伝子に関する研究	205
(1) 放射性核種を用いたカドミウム及びミネラル養分のイメージング・ トレーサー解析 (IPG0009)	205
(2) 種子の休眠性と乾燥耐性に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0011)	213
(3) イネの細胞死関連遺伝子の単離と機能解析 (IPG0013)	220
(4) イネの酸化ストレス応答の分子基盤研究 (IPG0014)	223
3 イネ種子の登熟や高温下での品質に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究	228
(1) イネの花粉不稔突然変異体の解析 (IPG0015)	228
(2) イネ生殖細胞分化関連遺伝子の単離と機能解析 (IPG0016)	230
(3) 開花期高温ストレス耐性関連遺伝子の単離・解析 (IPG0018)	240
(4) 胚乳の特性を決める転写制御因子の単離と機能解明 (IPG0022)	243
(5) 胚乳貯蔵物質の合成・蓄積を制御するシャペロンタンパク質の解析 (IPG0023)	251

第 1 編 研 究 の 要 約

I 研究年次・予算区分

研究年次：2008 年度～2012 年度

予算区分：農林水産省農林水産技術会議 新農業
展開ゲノムプロジェクト

II 主任研究者

主 査：(独) 農業生物資源研究所

理事長

石毛 光雄

副主査：(独) 農業生物資源研究所

理事

佐々木卓治 (2008 ～ 2010 年度)

廣近 洋彦 (2011 ～ 2012 年度)

推進リーダー：

(独) 農業生物資源研究所

植物科学研究領域

植物生産生理機能研究ユニット

上級研究員

井澤 毅

III 研究担当機関

独立行政法人農業生物資源研究所

IV 研究目的

イネの成長・代謝遺伝子ネットワークの解明

イネの収量増加を目指して、以下の4つのネットワーク解析を行う。

1 栽培環境に応答するイネ出穂期制御遺伝子ネットワーク

このネットワーク解析では、この10年間のイネゲノム解析研究で同定された出穂制御に使われた主な有用遺伝子（アリル）の相互作用等を解析し、イネ出穂期制御ネットワークの更なる理解を進める。その成果を基に、短日植物のイネに、長日条件での花芽誘導能力や初期成育での開花抑制能を付与することで、これまでの品種より栽培適応力の広い系統の作出を目指す。

2 光による成長制御プログラムネットワーク

このネットワーク解析では、光受容システム解明

として、光（質と量）の変化による葉緑体の発達や老化のメカニズムをネットワークとして解明を行う。例えば、葉の老化を抑えて光合成能を長く維持できれば、バイオマスの増加につながる可能性がある。また、光信号によるラミナジョイントの開度の制御に関しても、収量増加を目指して、その分子メカニズムのネットワーク解明を行う。

3 不良環境適応光合成ネットワーク

このネットワーク解析では、低温および貧栄養といった不良環境下での光ストレスの下での光合成能維持を目指して、光合成系全体での不良環境への適応戦略の分子ネットワークを解明する。また、温暖化の原因とされている高CO₂濃度環境下での炭酸固定能の最適化を図る。

4 複雑形態制御ネットワーク

このネットワーク解析では、イネの収量増加への貢献が期待できるが、ネットワーク形成が複雑で、単独での応用利用が考えにくい重要遺伝子に関して、その遺伝子間相互作用を含めたネットワークを解明する。そして、イネ科穀物の形態制御の基盤となるメカニズムを明らかにし、将来の応用研究展開の基盤となる知見を提供する。

V 研究方法

1 栽培環境に応答するイネ出穂期制御遺伝子ネットワーク

イネ育種では、早咲きで光周性のない系統を選抜することで、北海道等の栽培が可能になった。この10年間のイネゲノム解析の成果で、イネ育種上の主な出穂制御有用遺伝子（アリル）が同定され、マーカー育種が積極的に他のプロジェクトで進められている。しかし、これまでの育種過程は、光周性を失うことで、栽培地域の適応力の低さにつながっている。そこで、これまでになかった応用展開を目指して、出穂期制御のネットワーク解析研究をすすめる。そこで、光による開花抑制（Hd1 遺伝子周辺）や開花促進（Ehd1 遺伝子周辺）および概日時計の関与（OsGI 遺伝子周辺）の遺伝子ネットワークの解

明を行う（生物研・井澤毅）。また、日本稲間の出穂制御因子を単離解析することで、ネットワークの更なる理解を進める（生物研・矢野昌裕）。加えて、短日植物のイネに、ネットワーク解明からの知見を利用した長日誘導能力の付与や初期成育での開花抑制能を付与し、より栽培適応力の広い系統の作出を将来の目標として研究を進める。

2 光による成長制御プログラムネットワーク

出穂期を迎える頃のイネは、光が最もあたる最上位の葉から下位の葉までの間に大きな光強度の勾配が出来ており、葉への窒素分配、すなわち葉緑体の量もほぼこれに沿ったものとなっている。そこで、光（質と量）の変化による葉緑体の発達や老化のメカニズムを明らかにすることによってその応用につなげる。例えば、葉の老化を抑えて光合成能を長く維持できれば、バイオマスの増加につながる可能性がある。これまでに単離されたイネ光受容体突然変異体の解析から、葉緑体の分化や分解にフィトクロムシグナルが関与していることが明らかになっているが、そのメカニズムは不明である。そのため、本ネットワーク解析では、これまでに同定されたフィトクロムシグナル因子（生物研・高野 誠）や光による転写促進を起す葉緑体分化因子のひとつである OsGLK 遺伝子周辺（生物研・市川裕章）のネットワーク解析から、バイオマスや収量の向上を目指して、葉緑体の分化・維持の調節メカニズムの解明を行う。また、収量へ直結するイネ受光体制に深く関わる光信号によるラミナジョイントの開度の制御に関してその分子メカニズムの解明を進める（生物研・高野誠、九大 松下智直）。

3 不良環境適応光合成ネットワーク

光合成改変による物質生産向上の試みは古くから農学の主要テーマのひとつである。しかしながら、最近の分子生物学的手法を取り入れた研究によ

り、光合成系は複数の反応群による相互制御バランスにより成立していて、単一の反応あるいは単一成分の改変でシステム全体を改良するのは困難であることが明らかにされてきた。光合成能の改変に直結する自然変異がイネで同定できない事実もそのことを強く裏付けている。そこで、本研究では、光合成系を大きなネットワークとして捉え、栄養、温度、および光等の環境変化に応答して植物が光合成系を最適化するメカニズムを解析し、光合成系全体での不良環境への適応戦略の改良の方向性を明らかにする。具体的には、RbcS サブユニットの分子種別の遺伝子破壊系統の解析から高 CO₂ 環境への炭酸固定能の最適化を図る（東北大 牧野周）。また、低温および貧栄養への適応強化を目指して、葉緑体型 PEPC・NADP リンゴ酸脱水素酵素によるレドックス調節（生物研 宮尾光恵）と全容が明らかになりつつあるサイクリック電子伝達経路を中心としたイネの光合成調節機構の解明（京大 鹿内利治・遠藤剛）を行い、光合成全体のシステム制御を明らかにする。

4 複雑形態制御ネットワーク

本ネットワーク解析では、イネの収量増加に直結する草型や穂サイズの向上に貢献可能な遺伝子の中で、ネットワーク形成が複雑で、単独での応用利用が考えにくいケースに関して、その遺伝子間相互作用を解明する。具体的には、めしべ形成と中肋（葉の真ん中にある支持器官）形成の両方に必須である DL 遺伝子の周辺のネットワークを解明し、育種に使える遺伝学的手法で、それぞれの器官を独立に制御する可能性を模索する（東大・平野博之）。また、草型を含む植物の形態形成の土台となる頂端分裂組織の維持機構について、まだ未同定の鍵となる幹細胞形成因子等を同定し、その機構を構成する遺伝的ネットワークの解明を目指す（東大・平野博之）。

研究計画表（研究室別年次計画）

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	08	09	10	11	12	機関	研究室
1 イネの成長・代謝遺伝子ネットワークの解明							
(1) 出穂期の遺伝子ネットワーク解明							
1) 栽培環境に応答するイネ出穂期制御遺伝子ネットワークの解明 (GPN0001)	←				→	農業生物資源研究所	植物科学研究領域 植物生産生理機能研究ユニット
(2) 形態制御の遺伝子ネットワーク解明							
1) 複雑形態制御ネットワークの解明 (GPN0002)	←				→	東京大学	大学院理学系研究科 生物科学専攻 進化遺伝学研究室
(3) 葉緑体分化の遺伝子ネットワーク解明							
1) イネの光シグナルによる葉緑体発達・草型のネットワークの解明 (GPN0003)	←				→	農業生物資源研究所	植物科学研究領域 植物生産生理機能研究ユニット
2) 転写因子 GLK を介した葉緑体発達のネットワークの解明 (GPN0004)	←				→	農業生物資源研究所	植物科学研究領域 植物生産生理機能研究ユニット
(4) 光信号伝達系の遺伝子ネットワーク解明							
1) イネの伸長を制御する光受容体フィトクロムの信号伝達経路に関わる新規遺伝子の単離・解析ネットワークの解明 (GPN0005)	←				→	九州大学	農学研究院 SSP 研究室
(5) 光合成の遺伝子ネットワーク解明							
1) イネ葉緑体内のレドックス状態と炭素代謝の最適化 (GPN0006)	←				→	農業生物資源研究所	植物科学研究領域 植物生産生理機能研究ユニット
2) 光合成炭酸固定酵素 Rubisco 量の適量化 (GPN0007)	←				→	東北大学	大学院農学研究科 植物栄養生理学分野
3) 光エネルギー利用効率の最適化：イネの戦略 (GPN0008)	←				→	京都大学	理学研究科 植物学教室

注) 文中の図、表、写真に付した番号は、上記研究課題番号とその中の一連番号を組合せて表示してある。
(例：1—(1)—1)の課題の1番目の図の場合は、図 111-1 と表示)

VI 研究結果

イネの成長・代謝遺伝子ネットワークの解明

小課題「栽培環境に応答するイネ出穂期制御遺伝子ネットワークの解明」では、

1 これまで、イネ開花抑制因子 Ghd7 が開花促進因子 Ehd1 の転写を抑制することが明らかになっていたが、Ehd1 遺伝子のプロモーター上で、抑制に必要な領域をレポーター解析や ChIP 解析で明らかにした。

2 Ghd7 抑制因子を過剰発現し、花芽形成を起こせないイネ系統（花が咲かないイネ系統）に、市販されている安全で安価な化学物質処理で Hd3a プロリゲン遺伝子の転写が誘導できるようにした人工 Hd3a 遺伝子を導入し、それにより、化学物質散布で花芽形成を誘導できるイネ系統を作成した。これにより、任意の時期に花芽形成を誘導できるイネ系統が作成できた。

3 第8染色体の出穂期関連遺伝子 Hd18 の候補領域を 25.6Kbp に絞り込み、その原因遺伝子がシロイヌナズナの Flowering locus D (FLD) のオーソログであることを明らかにした。この遺伝子について、ゲノム相補および RNAi による形質転換体を作成した。Hd18 は開花促進遺伝子 Ehd1 の上流で働き、Ehd1、RFT1 および Hd3a の発現を調節することで、出穂期を変化させていることが判明した。

小課題「イネの光シグナルによる葉緑体発達・草型のネットワークの解明」では、

葉緑体発達の光シグナルネットワークの解明では、イネの SPA3 と COP1 の解析を進め、これらが、光受容体 phyA や phyC と相互作用しながら、葉緑体の過剰な発達を抑制することで正常な葉緑体発達を導いている可能性を示した。草型制御の光シグナルネットワークの解明では、イネを疎植で植えた時に多分げつ化させることができる遺伝子を明らかにし、その遺伝子を持つ系統が、疎植においては既存品種より農業生産性が高まっていることを示した。

小課題「転写因子 GLK を介した葉緑体発達のネットワークの解明」では、

イネの青色光受容体クリプトクロム CRY1a/b の発現抑制によって葉緑体分化の鍵因子 GLK1 の転写及びタンパク量が低下したことから、GLK1 による葉緑体発達には CRY1 を介した制御系が重要性である。GLK により発現が上昇する GIC1～3 はイ

ネにカロテノイド高蓄積を引き起こす。GIC1 は核に局在し、転写活性化能を示した。GIC1/3-OX は色素体のチラコイド膜タンパク質遺伝子群の発現を誘導することを見出した。細胞増殖能の高い GLK-OX イネにサイトカイン IL-10 のキメラ遺伝子を導入し、培養液中への IL-10 分泌系を開発した。市販の金粒子よりもさらに小型のナノ金粒子を使ったタバコ葉緑体形質転換系を確立した。イネへの適用が期待できる。

小課題「イネ葉緑体内のレドックス状態と炭素代謝の最適化」では、

1 イネ属特有の代謝関連酵素、葉緑体型 PEPC は、アンモニアが主要窒素源である水田のような湛水環境に適応するための酵素で、根から吸収したアンモニアの同化に重要な役割を担っている。イネ緑葉における葉緑体型 PEPC の機能の解析を行い、本酵素が光呼吸にともなう窒素同化のための有機酸供給系として機能すること、また、葉緑体内に蓄積した還元力を細胞質に排出し、光合成系を光阻害から守る役割を担っていることを明らかにした。

2 イネのもつ5種類の植物型 PEPC すべての酵素特性を決定した。アンモニア同化、初期アミノ酸合成の産物であるグルタミン酸 (Glu) とアスパラギン酸 (Asp) は PEPC のフィードバック阻害剤であるが、細胞質型 PEPC と異なり、葉緑体型 PEPC はこれら阻害剤に対する感受性が低く、活性阻害を受けにくいことを明らかにした。また、PEPC タンパク質の N 末端領域が Asp と Glu に対する感受性を調節する機能をもつ可能性が示された。

小課題「光エネルギー利用効率の最適化：イネの戦略」では、

1「日本晴」の光合成電子伝達効率の周日測定を断続的に行った。その結果、(1) 午前中に比べ、午後に電子伝達収率が低下する現象が、特に登熟期に顕著に見られること、(2) 成長が盛んな初夏と登熟をむかえる秋期では、光エネルギーの利用効率が異なること等を見出した。また光化学系2の熱放散にかかわる PsbS 抑制株は弱光下で電子伝達活性の向上、強光下で光阻害を受けやすいという長所と短所を合わせ持つことを示した。

3 圃場のイネが、成長期では光律速、登熟期では光過剰の状況にあり、その過程で光エネルギーを安全に捨てることの意義を明らかにした。サイクリッ

ク電子伝達と ATPase の協調によりチラコイドルーメンの酸性化が維持され、光化学系の光障害が回避されていることを明らかにした。またシロイヌナズナ同様、イネにおいてヒメツリガネゴケの Flv が、光合成始動時に過剰な還元力の受け皿になる可能性を示唆した。

小課題「イネの伸長を制御する光受容体フィトクロムの信号伝達経路に関わる新奇遺伝子の単離・解析」では、

フィトクロム B による選択的スプライシング制御の標的遺伝子の 1 つ、グリセリン酸キナーゼ遺伝子を詳細に解析した結果、フィトクロム B のシグナルにより、グリセリン酸キナーゼの細胞内局在が光依存的に変化すること、そしてその結果、光呼吸 C2 回路がフィトクロム B によって制御される可能性が示唆された。また、イネにおけるフィトクロムの選択的スプライシング制御の標的遺伝子を網羅的に同定するために、次世代シーケンサーにより mRNA-seq 解析を行った。

小課題「光合成炭酸固定酵素 Rubisco 量の適量化」では、

北方冷涼下および高 CO₂ 環境での CO₂ 固定酵素 Rubisco 量の適量化を図り、イネの光合成機能の向上を目的とした。Rubisco 過剰生産イネは、低温と低 CO₂ 環境下でバイオマス増産と吸収窒素の増加が認められた。Rubisco の核遺伝子 *RBCS* の 4 分子種別個別発現抑制系統はすべて、高 CO₂ 環境での光合成の窒素利用効率がすべて上がった。

小課題「複雑形態制御ネットワークの解明」では、中肋は葉の中央部に存在する強い構造で、イネの葉の直立性に大きな影響を与える。葉は直立するほど、光を効率的に受けやすく、栽培面積も少なくてすむ。本研究では、中肋形成の鍵となる *DL* 遺伝子を中心とする複雑な遺伝子ネットワークの解明を行うとともに、*DL* 遺伝子の機能を増強し、葉の直立性の強いイネを作出することを試みた。また、植物の形態形成に非常に重要である幹細胞の恒常性を維持する遺伝子の機能を解明した。

VII 今後の課題

本研究はタイトルに「遺伝子ネットワークの解明」とあるように、応用的な展開はイメージしているものの基礎研究に終始している小課題が目立つ

た。今後、この分野の研究は、Analysis 研究から、Synthesis 研究にシフトし、研究予算を社会に還元するための研究に発展させていく必要がある。その中で、人為的に開花期を制御する技術の開発は、作物の概念を変える可能性のある応用が見込める成果であり、GMO 技術の日本社会への浸透を図る努力とともに推進していく価値があると考ええる。

VIII 研究発表

原著論文

- 1) T. Suzuki, A. Yoshida, H. Y. Hirano. (2008). Functional diversification of CLAVATA3-related CLE proteins in meristem maintenance in rice. *Plant Cell* 20 (8), 2049-2058.
- 2) L. Peng, H. Shimizu, T. Shikanai. (2008). The chloroplast NAD (P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in Arabidopsis. *J Biol Chem* 283 (50), 34873-34879.
- 3) K. Okuda, Y. Habata, Y. Kobayashi, T. Shikanai. (2008). Amino acid sequence variations in Nicotiana CRR4 orthologs determine the species-specific efficiency of RNA editing in plastids. *Nucleic Acids Res* 36 (19), 6155-6164.
- 4) K. Matsubara, U. Yamanouchi, Z. X. Wang, Y. Minobe, T. Izawa, M. Yano. (2008) Ehd2, a Rice Ortholog of the Maize INDETERMINATE1 Gene, Promotes Flowering by Up-Regulating Ehd1. *Plant Physiol* 148 (3), 1425-1435.
- 5) M. Riemann, M. Riemann, M. Takano. (2008). Rice JASMONATE RESISTANT 1 is involved in phytochrome and jasmonate signalling. *Plant Cell Environ* 31 (6), 783-792.
- 6) Y. Taniguchi, H. Ohkawa, C. Masumoto, T. Fukuda, T. Tamai, K. Lee, S. Sudoh, H. Tsuchida, H. Sasaki, H. Fukayama, M. Miyao. (2008). Overproduction of C4 photosynthetic enzymes in transgenic rice plants : an approach to introduce the C4-like photosynthetic pathway into rice. *J Exp Bot* 59 (7), 1799-1809.
- 7) Y. Ohmori, M. Abiko, A. Horibata, H. Y. Hirano. (2008). A transposon, Ping, is integrated into intron 4 of the DROOPING LEAF gene of rice, weakly reducing its expression and causing

- a mild drooping leaf phenotype. *Plant Cell Physiol* 49 (8), 1176-1184.
- 8) K. Matsubara, I. Kono, K. Hori, Y. Nonoue, N. Ono, A. Shomura, T. Mizubayashi, S. Yamamoto, U. Yamanouchi, K. Shirasawa, T. Nishio, M. Yano. (2008). Novel QTLs for photoperiodic flowering revealed by using reciprocal backcross inbred lines from crosses between japonica rice cultivars. *Theor Appl Genet* 117 (6), 935-945.
 - 9) Y. Nonoue, K. Fujino, Y. Hirayama, U. Yamanouchi, S. Y. Lin, M. Yano. (2008) Detection of quantitative trait loci controlling extremely early heading in rice. *Theor Appl Genet* 116 (5), 715-722.
 - 10) 竹内善信, 加藤浩, 根本博, 太田久稔, 佐藤宏之, 平山正賢, 平林秀介, 出田収, 青木法明, 坂井真, 蛭谷武志, 田口文緒, 山本敏央, 矢野昌裕, 井辺時雄, 安東郁男. (2008) コシヒカリと同質の遺伝的背景を持つ極早生の水稲品種「コシヒカリ関東 HD1 号」の育成. *作物研究所報告* 9, 1-25.
 - 11) T. Fujioka, F. Kaneko, T. Kazama, K. Suwabe, G. Suzuki, A. Makino, T. Mae, M. Endo, M. Kawagishi-Kobayashi, M. Watanabe. (2008). Identification of small RNAs in late developmental stage of rice anthers. *Genes Genet Syst* 83 (3), 281-284.
 - 12) M. Abiko, Y. Ohmori, H. Y. Hirano. (2008). Genome-wide expression profiling and identification of genes under the control of the DROOPING LEAF gene during midrib development in rice. *Genes Genet Syst* 83 (3), 237-244.
 - 13) Y. Suzuki, T. Mae, A. Makino. (2008). RNA extraction from various recalcitrant plant tissues with a cethyltrimethylammonium bromide-containing buffer followed by an acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform treatment. *Biosci Biotechnol Biochem* 72 (7), 1951-1953.
 - 14) K. Imai, Y. Suzuki, T. Mae, A. Makino. (2008). Changes in the synthesis of rubisco in rice leaves in relation to senescence and N influx. *Ann Bot* 101 (1), 135-144.
 - 15) L. Peng, Y. Fukao, M. Fujiwara, T. Takami, T. Shikanai. (2009). Efficient operation of NAD (P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in Arabidopsis. *Plant Cell* 21 (11), 3623-3640.
 - 16) K. Okuda, A. L. Chateigner-Boutin, T. Nakamura, E. Delannoy, M. Sugita, F. Myouga, R. Motohashi, K. Shinozaki, I. Small, T. Shikanai. (2009). Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in Arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell* 21 (1), 146-156.
 - 17) K. Hammani, K. Okuda, S. K. Tanz, A. L. Chateigner-Boutin, T. Shikanai, I. Small. (2009). A study of new Arabidopsis chloroplast RNA editing mutants reveals general features of editing factors and their target sites. *Plant Cell* 21 (11), 3686-3699.
 - 18) A. Yoshida, T. Suzaki, W. Tanaka, H.-Y. Hirano. (2009). The homeotic gene LONG STERILE LEMMA (G1) specifies sterile lemma identity in the rice spikelet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (47), 20103-20108.
 - 19) M. Takano, N. Inagaki, X. Xie, S. Kiyota, A. Baba-Kasai, T. Tanabata, T. Shinomura. (2009). Phytochromes are the sole photoreceptors for perceiving red/far-red light in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (34), 14705-14710.
 - 20) T. Suzaki, M. Ohneda, T. Toriba, A. Yoshida, H. Y. Hirano. (2009). FON2 SPARE1 redundantly regulates floral meristem maintenance with FLORAL ORGAN NUMBER2 in rice. *PLoS Genet* 5 (10), e1000693.
 - 21) A. Takabayashi, N. Ishikawa, T. Obayashi, S. Ishida, J. Obokata, T. Endo, F. Sato. (2009). Three novel subunits of Arabidopsis chloroplastic NAD (P)H dehydrogenase identified by bioinformatic and reverse genetic approaches. *Plant J* 57 (2), 207-219.
 - 22) S. Wada, H. Ishida, M. Izumi, K. Yoshimoto, Y. Ohsumi, T. Mae, A. Makino. (2009). Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant*

- Physiol 149 (2), 885-893.
- 23) Y. Suzuki, T. Miyamoto, R. Yoshizawa, T. Mae, A. Makino. (2009). Rubisco content and photosynthesis of leaves at different positions in transgenic rice with an overexpression of RBCS. *Plant Cell Environ* 32 (4), 417-427.
 - 24) H. Nakamura, M. Muramatsu, M. Hakata, O. Ueno, Y. Nagamura, H. Hirochika, M. Takano, H. Ichikawa. (2009). Ectopic Overexpression of The Transcription Factor OsGLK1 Induces Chloroplast Development in Non-Green Rice Cells. *Plant Cell Physiol* 50 (11), 1933-1949.
 - 25) Y. Suzuki, K. Nakabayashi, R. Yoshizawa, T. Mae, A. Makino. (2009). Differences in expression of the RBCS multigene family and rubisco protein content in various rice plant tissues at different growth stages. *Plant Cell Physiol* 50 (10), 1851-1855.
 - 26) M. Ishikawa, Y. Ohmori, W. Tanaka, C. Hirabayashi, K. Murai, Y. Ogihara, T. Yamaguchi, H. Y. Hirano. (2009). The spatial expression patterns of DROOPING LEAF orthologs suggest a conserved function in grasses. *Genes Genet Syst* 84 (2), 137-146.
 - 27) T. Nagai, A. Makino. (2009). Differences between rice and wheat in temperature responses of photosynthesis and plant growth. *Plant Cell Physiol* 50 (4), 744-755.
 - 28) S. Ishida, A. Takabayashi, N. Ishikawa, Y. Hano, T. Endo, F. Sato. (2009). [A novel nuclear-encoded protein, NDH-dependent cyclic electron flow 5, is essential for the accumulation of chloroplast NAD (P)H dehydrogenase complexes. *Plant Cell Physiol* 50 (2), 383-393.
 - 29) K. Kanno, T. Mae, A. Makino. (2009). High night temperature stimulates photosynthesis, biomass production and growth during the vegetative stage of rice plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 55 (1), 124-131.
 - 30) M. Riemann, D. Bouyer, A. Hisada, A. Muller, O. Yatou, E. W. Weiler, M. Takano, M. Furuya, P. Nick. (2009). Phytochrome A requires jasmonate for photodestruction. *Planta* 229 (5), 1035-1045.
 - 31) H. Fukayama, T. Fukuda, C. Masumoto, Y. Taniguchi, H. Sakai, W. Cheng, T. Hasegawa, M. Miyao. (2009). Rice plant response to long term CO₂ enrichment : Gene expression profiling. *Plant Sci* 177 (3), 203-210.
 - 32) K. Jumtee, A. Okazawa, K. Harada, E. Fukusaki, M. Takano, A. Kobayashi. (2009). Comprehensive metabolite profiling of phyA phyB phyC triple mutants to reveal their associated metabolic phenotype in rice leaves. *J Biosci Bioeng* 108 (2), 151-159.
 - 33) R. Ishikawa, T. Shinomura, M. Takano, K. Shimamoto. (2009). Phytochrome dependent quantitative control of Hd3a transcription is the basis of the night break effect in rice flowering. *Genes Genet Syst* 84 (2), 179-184.
 - 34) H. Yamasaki, M. Hayashi, M. Fukazawa, Y. Kobayashi, T. Shikanai. (2009). SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* 21 (1), 347-361.
 - 35) H. Itoh, Y. Nonoue, M. Yano, T. Izawa. (2010). A pair of floral regulators sets critical day length for Hd3a florigen expression in rice. *Nat Genet* 42 (7), 635-638.
 - 36) T. Toriba, T. Suzaki, T. Yamaguchi, Y. Ohmori, H. Tsukaya, H. Y. Hirano. (2010). Distinct regulation of adaxial-abaxial polarity in anther patterning in rice. *Plant Cell* 22 (5), 1452-1462.
 - 37) C. Masumoto, S. Miyazawa, H. Ohkawa, T. Fukuda, Y. Taniguchi, S. Murayama, M. Kusano, K. Saito, H. Fukayama, M. Miyao. (2010). Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (11), 5226-5231.
 - 38) Y. Okegawa, Y. Kobayashi, T. Shikanai. (2010). Physiological links among alternative electron transport pathways that reduce and oxidize plastoquinone in Arabidopsis. *Plant J* 63 (3), 458-468.
 - 39) K. Okuda, K. Hammani, S. K. Tanz, L. Peng, Y.

- Fukao, F. Myouga, R. Motohashi, K. Shinozaki, I. Small, T. Shikanai. (2010). The pentatricopeptide repeat protein OTP82 is required for RNA editing of plastid *ndhB* and *ndhG* transcripts. *Plant J* 61 (2), 339-349.
- 40) L. Peng, W. Cai, T. Shikanai. (2010). Chloroplast stromal proteins, CRR6 and CRR7, are required for assembly of the NAD (P)H dehydrogenase subcomplex A in *Arabidopsis*. *Plant J* 63 (2), 203-211.
- 41) E. Ogiso, Y. Takahashi, T. Sasaki, M. Yano, T. Izawa. (2010). The role of casein kinase II in flowering time regulation has diversified during evolution. *Plant Physiol* 152 (2), 808-820.
- 42) M. Izumi, S. Wada, A. Makino, H. Ishida. (2010). The autophagic degradation of chloroplasts via rubisco-containing bodies is specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 154 (3), 1196-1209.
- 43) Y. Suzuki, T. Kihara-Doi, T. Kawazu, C. Miyake, A. Makino. (2010). Differences in Rubisco content and its synthesis in leaves at different positions in *Eucalyptus globulus* seedlings. *Plant Cell Environ* 33 (8), 1314-1323.
- 44) T. Takami, M. Shibata, Y. Kobayashi, T. Shikanai. (2010). De novo biosynthesis of fatty acids plays critical roles in the response of the photosynthetic machinery to low temperature in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 51 (8), 1265-1275.
- 45) Kanno K, Makino A. (2010). Increased grain yield and biomass allocation in rice under cool night temperature. *Soil Sci. Plant Nutr.* 56 (3), 412-417.
- 46) A. Yoshida, H.-Y. Hirano. (2010). Mapping of the ABERRANT SPIKELET 1 (ASP1) gene in rice. *Rice Genet. Newsl.* 25, 12-13.
- 47) W. Tanaka, A. Ohtsubo, Y. Ohmori, H.-Y. Hirano. (2010). Identification of the conserved region in intron 1 of the DROOPING LEAF genes among the species in the grass family. *Rice Genet. Newsl.* 25, 78-79.
- 48) R. Nakano, H. Ishida, M. Kobayashi, A. Makino, T. Mae. (2010). Biochemical changes associated with in vivo RbcL fragmentation by reactive oxygen species under chilling-light conditions. *Plant Biol (Stuttg)* 12 (1), 35-45.
- 49) Irving LJ, Suzuki Y, Ishida H, Makino A. (2010). Protein turnover in grass leaves. *Adv. Bot. Res.* 54, 139-182.
- 50) N. Endo-Higashi, T. Izawa. (2011). Flowering time genes Heading date 1 and Early heading date 1 together control panicle development in rice. *Plant Cell Physiol.* 52 (6), 1083-1094.
- 51) L. Peng, Y. Fukao, F. Myouga, R. Motohashi, K. Shinozaki, T. Shikanai. (2011). A chaperonin subunit with unique structures is essential for folding of a specific substrate. *PLoS Biol* 9 (4), e1001040.
- 52) N. Tanaka, H. Itoh, N. Sentoku, M. Kojima, H. Sakakibara, T. Izawa, J. Itoh, Y. Nagato. (2011). The COP1 ortholog PPS regulates the juvenile-adult and vegetative-reproductive phase changes in rice. *Plant Cell.* 23 (6), 2143-2154.
- 53) T. Izawa, M. Mihara, Y. Suzuki, M. Gupta, H. Itoh, A. J. Nagano, R. Motoyama, Y. Sawada, M. Yano, M. Y. Hirai, A. Makino, Y. Nagamura. (2011). Os-GIGANTEA confers robust diurnal rhythms on the global transcriptome of rice in the field. *Plant Cell.* 23 (5), 1741-1755.
- 54) H. Yamamoto, L. Peng, Y. Fukao, T. Shikanai. (2011). An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 23 (4), 1480-1493.
- 55) W. Yamori, N. Sakata, Y. Suzuki, T. Shikanai, A. Makino. (2011). Cyclic electron flow around photosystem I via chloroplast NAD (P)H dehydrogenase (NDH) complex performs a significant physiological role during photosynthesis and plant growth at low temperature in rice. *Plant J* 68 (6), 966-976.
- 56) W. Cai, K. Okuda, L. Peng, T. Shikanai. (2011). PROTON GRADIENT REGULATION 3 recognizes multiple targets with limited similarity and mediates translation and RNA stabilization in plastids. *Plant J* 67 (2), 318-327.

- 57) K. Matsubara, U. Yamanouchi, Y. Nonoue, K. Sugimoto, Z. X. Wang, Y. Minobe, M. Yano. (2011). Ehd3, encoding a plant homeodomain finger-containing protein, is a critical promoter of rice flowering. *Plant J* 66 (4), 603-612.
- 58) Y. Ohmori, T. Toriba, H. Nakamura, H. Ichikawa, H. Y. Hirano. (2011). Temporal and spatial regulation of DROOPING LEAF gene expression that promotes midrib formation in rice. *Plant J* 65 (1), 77-86.
- 59) Y. Oka, S. G. Kong, T. Matsushita. (2011). A Non-Covalently Attached Chromophore can Mediate Phytochrome B Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 52 (12), 2088-2102.
- 60) A. Osugi, H. Itoh, K. Ikeda-Kawakatsu, M. Takano, T. Izawa. (2011). Molecular dissection of the roles of phytochrome in photoperiodic flowering in rice. *Plant Physiol* 157 (3), 1128-1137.
- 61) L. Peng, T. Shikanai. (2011). Supercomplex formation with photosystem I is required for the stabilization of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in Arabidopsis. *Plant Physiol* 155 (4), 1629-1639.
- 62) W. Yamori, S. Takahashi, A. Makino, G. D. Price, M. R. Badger, S. von Caemmerer. (2011). The roles of ATP synthase and the cytochrome b6/f complexes in limiting chloroplast electron transport and determining photosynthetic capacity. *Plant Physiol* 155 (2), 956-962.
- 63) A. Makino. (2011). Photosynthesis, grain yield, and nitrogen utilization in rice and wheat. *Plant Physiol* 155 (1), 125-129.
- 64) R. Saito, H. Yamamoto, A. Makino, T. Sugimoto, C. Miyake. (2011). Methylglyoxal functions as Hill oxidant and stimulates the photoreduction of O₂ at photosystem I: a symptom of plant diabetes. *Plant Cell Environ* 34 (9), 1454-1464.
- 65) W. Yamori, T. Nagai, A. Makino. (2011). The rate-limiting step for CO₂ assimilation at different temperatures is influenced by the leaf nitrogen content in several C₃ crop species. *Plant Cell Environ* 34 (5), 764-777.
- 66) S. Ishida, K. Morita, M. Kishine, A. Takabayashi, R. Murakami, S. Takeda, K. Shimamoto, F. Sato, T. Endo. (2011). Allocation of absorbed light energy in PSII to thermal dissipations in the presence or absence of PsbS subunits of rice. *Plant Cell. Physiol* 52 (10), 1822-1831.
- 67) T. Shibaya, Y. Nonoue, N. Ono, U. Yamanouchi, K. Hori, M. Yano. (2011). Genetic interactions involved in the inhibition of heading by heading date QTL, Hd2 in rice under long-day conditions. *Theor Appl Genet* 123 (7), 1133-1143.
- 68) K. Ebana, T. Shibaya, J. Wu, K. Matsubara, H. Kanamori, H. Yamane, U. Yamanouchi, T. Mizubayashi, I. Kono, A. Shomura, S. Ito, T. Ando, K. Hori, T. Matsumoto, M. Yano. (2011). Uncovering of major genetic factors generating naturally occurring variation in heading date among Asian rice cultivars. *Theor Appl Genet* 122 (6), 1199-1210.
- 69) Kubo S, Masumura T, Saito Y, Fukayama H, Suzuki Y, Sugimoto T, Makino A, Amako K, Miyake C. (2011). Cyclic electron flow around PSI functions in the photoinhibited rice leaves. *Soil Sci. Plant Nutr.* 57 (1), 105-113.
- 70) H. Itoh, T. Izawa. (2011) A study of phytohormone biosynthetic gene expression using a circadian clock-related mutant in rice. *Plant Signal Behav* 6 (12), 1932-1936
- 71) T. Toriba, Y. Ohmori, H. Y. Hirano. (2011). Common and distinct mechanisms underlying the establishment of adaxial and abaxial polarity in stamen and leaf development. *Plant Signal Behav* 6 (3), 430-433.
- 72) Seneweera S, Makino A, Hirotsu N, Norton R, Suzuki Y. (2011). New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO₂: The role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in rice leaves. *Environ Exp Bot.* 71 (2), 128-136.
- 73) A. J. Nagano, Y. Sato, M. Mihara, B. A.

- Antonio, R. Motoyama, H. Itoh, Y. Nagamura, T. Izawa. (2012). Deciphering and Prediction of Transcriptome Dynamics under Fluctuating Field Conditions. *Cell* 151 (6), 1358-1369.
- 74) W. Tanaka, T. Toriba, Y. Ohmori, A. Yoshida, A. Kawai, T. Mayama-Tsuchida, H. Ichikawa, N. Mitsuda, M. Ohme-Takagi, H. Y. Hirano. (2012). The YABBY gene TONGARI-BOUSHII is involved in lateral organ development and maintenance of meristem organization in the rice spikelet. *Plant Cell* 24 (1), 80-95.
- 75) L. Peng, Y. Fukao, M. Fujiwara, T. Shikanai. (2012). Multistep Assembly of Chloroplast NADH Dehydrogenase-Like Subcomplex A Requires Several Nucleus-Encoded Proteins, Including CRR41 and CRR42, in Arabidopsis. *Plant Cell* 24 (1), 202-214.
- 76) M. Ueda, T. Kuniyoshi, H. Yamamoto, K. Sugimoto, K. Ishizaki, T. Kohchi, Y. Nishimura, T. Shikanai. (2012). Composition and physiological function of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Marchantia polymorpha*. *Plant J* 72 (4), 683-693.
- 77) W. Yamori, C. Masumoto, H. Fukayama, A. Makino. (2012). Rubisco activase is a key regulator of non steady-state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. *Plant J* 71 (6), 871-880.
- 78) H. Shikata, M. Shibata, T. Ushijima, M. Nakashima, S. G. Kong, K. Matsuoka, C. Lin, T. Matsushita. (2012). The RS domain of Arabidopsis splicing factor RRC1 is required for phytochrome B signal transduction. *Plant J* 70 (5), 727-738.
- 79) A. Yoshida, Y. Ohmori, H. Kitano, F. Taguchi-Shiobara, H. Y. Hirano. (2012). Aberrant spikelet and panicle1, encoding a TOPLESS-related transcriptional co-repressor, is involved in the regulation of meristem fate in rice. *Plant J* 70(2), 327-339.
- 80) K. Ikeda-Kawakatsu, M. Maekawa, T. Izawa, J. I. Itoh, Y. Nagato. (2012). ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 2/RFL, the rice ortholog of Arabidopsis LEAFY, suppresses the transition from inflorescence meristem to floral meristem through interaction with APO1. *Plant J* 69 (1), 168-180.
- 81) Y. Suzuki, A. Makino. (2012). Availability of Rubisco small subunit up-regulates the transcript levels of large subunit for stoichiometric assembly of its holoenzyme in rice. *Plant Physiol* 160 (1), 533-540.
- 82) H. Matsumura, E. Mizohata, H. Ishida, A. Kogami, T. Ueno, A. Makino, T. Inoue, A. Yokota, T. Mae, Y. Kai. (2012). Crystal structure of rice Rubisco and implications for activation induced by positive effectors NADPH and 6-phosphogluconate. *J Mol Biol* 422 (1), 75-86.
- 83) Y. Suzuki, T. Fujimori, K. Kanno, A. Sasaki, Y. Ohashi, A. Makino. (2012). Metabolome analysis of photosynthesis and the related primary metabolites in the leaves of transgenic rice plants with increased or decreased Rubisco content. *Plant Cell. Environ* 35 (8), 1369-1379.
- 84) S. Ogawa, Y. Suzuki, R. Yoshizawa, K. Kanno, A. Makino. (2012). Effect of individual suppression of RBCS multigene family on Rubisco contents in rice leaves. *Plant Cell Environ* 35 (3), 546-553.
- 85) M. Izumi, H. Tsunoda, Y. Suzuki, A. Makino, H. Ishida. (2012). RBCS1A and RBCS3B, two major members within the Arabidopsis RBCS multigene family, function to yield sufficient Rubisco content for leaf photosynthetic capacity. *J Exp Bot* 63 (5), 2159-2170.
- 86) Y. Nishikawa, H. Yamamoto, Y. Okegawa, S. Wada, N. Sato, Y. Taira, K. Sugimoto, A. Makino, T. Shikanai. (2012). PGR5-Dependent Cyclic Electron Transport Around PSI Contributes to the Redox Homeostasis in Chloroplasts Rather Than CO₂ Fixation and Biomass Production in Rice. *Plant Cell Physiol* 53 (12), 2117-2126.
- 87) F. Hirose, N. Inagaki, A. Hanada, S. Yamaguchi, Y. Kamiya, A. Miyao, H. Hirochika, M. Takano. (2012). Cryptochrome and phytochrome

- cooperatively but independently reduce active gibberellin content in rice seedlings under light irradiation. *Plant Cell Physiol* 53 (9), 1570-1582.
- 88) H. Saito, E. Ogiso-Tanaka, Y. Okumoto, Y. Yoshitake, H. Izumi, T. Yokoo, K. Matsubara, K. Hori, M. Yano, H. Inoue, T. Tanisaka. (2012). *Ef7* encodes an ELF3-like protein and promotes rice flowering by negatively regulating the floral repressor gene *Ghd7* under both short- and long-day conditions. *Plant Cell Physiol* 53 (4), 717-728.
- 89) K. Matsubara, E. Ogiso-Tanaka, K. Hori, K. Ebana, T. Ando, M. Yano. (2012). Natural variation in *Hd17*, a homolog of *Arabidopsis* ELF3 that is involved in rice photoperiodic flowering. *Plant Cell Physiol* 53 (4), 709-716.
- 90) K. Fujino, U. Yamanouchi, M. Yano. (2013). Roles of the *Hd5* gene controlling heading date for adaptation to the northern limits of rice cultivation. *Theor Appl Genet*, 126 (3) : 611-618.
- 91) Takagi D, Yamamoto H, Sugimoto T, Amako K, Makino A, Miyake C. (2012). O₂ supports 3-phosphoglycerate-dependent O₂ evolution in chloroplasts from spinach leaves. *Soil Sci. Plant Nutr.* 58 (4), 462-468.
- 92) H. Shikata, M. Nakashima, K. Matsuoka, T. Matsushita. (2012). Deletion of the RS domain of RRC1 impairs phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 7 (8), 933-936.
- 93) W. Tanaka, T. Toriba, Y. Ohomori, H. Y. Hirano. (2012). Formation of two florets within a single spikelet in the rice *tongari-boushil* mutant. *Plant Signal Behav* 7 (7), 793-795.
- 94) Tomonao Matsushita. (2012). A versatile method to prevent transcriptional gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* 5, 515-519.
- 95) M. Hakata, M. Kuroda, A. Ohsumi, T. Hirose, H. Nakamura, M. Muramatsu, H. Ichikawa, H. Yamakawa. (2012). Overexpression of a Rice TIFY Gene Increases Grain Size through Enhanced Accumulation of Carbohydrates in the Stem. *Biosci Biotechnol Biochem* 76 (11), 2129-2134.
- 96) A. Einali, M. Shariati, F. Sato, T. Endo. (2013). Cyclic electron transport around photosystem I and its relationship to non-photochemical quenching in the unicellular green alga *Dunaliella salina* under nitrogen deficiency. *J Plant Res* 126 (1), 179-186.

総 説

- 97) Takeshi Izawa (2008). Photoperiodic flowering in rice. *Rice Biology in the Genomics Era - Biotechnology in Agriculture and Forestry* 62 : 163-176.
- 98) 松下智直 (2008). 植物の光情報受容体フィトクロムの細胞内シグナル伝達機構. *光合成研究* 18 (1) : 16-23.
- 99) 井澤 毅 (2009). シロイヌナズナには存在しないイネに独特な光周性花芽誘導分子機構. *植物の生長調節* 44 (2) : 118-127.
- 100) 稲垣言要 (2009). イネ. *低温科学* 67 : 43-52.
- 101) 井澤 毅 (2010). 一日に 30 分の日の長さの違いを認識できるイネの出穂期制御の潜在能力. *米麦改良* (2010 SEP) : 2-10.
- 102) 稲垣言要, 廣瀬文昭 (2010). モデル植物を通してみる光環境応答について. *月刊ディスプレイ* 16 (11) : 50-56.
- 103) Ishida H, Suzuki Y, Makino A (2010). Rubisco turnover and photosynthesis in a leaf. *Nitrogen Assimilation in Plants Chapter 19* : 277-285.
- 104) Mae T, Makino A (2010). Nitrogen utilization, growth and yield in rice plants.. *Nitrogen Assimilation in Plants Chapter 17* : 243-253.
- 105) 伊藤博紀, 井澤毅 (2011). 光応答と開花制御: 日の長さの変化を認識して花を咲かせるメカニズム. *細胞工学* 30 (2) : 161-166.
- 106) M. Miyao, C. Masumoto, S. Miyazawa, H. Fukayama (2011). Lessons from engineering a single-cell C4 photosynthetic pathway into rice. *J Exp Bot* 62 (9) : 3021-3029.
- 107) K. Ifuku, T. Endo, T. Shikanai, E. M. Aro (2011). Structure of the chloroplast NADH

dehydrogenase-like complex : nomenclature for nuclear-encoded subunits. Plant Cell Physiol 52 (9) : 1560-1568.

108) 伊藤博紀, 井澤 毅 (2011) 光応答と開花制御—日の長さの変化を認識して花を咲かせるメカニズム—. 細胞工学 2月号 30 (2) : 118-120.

109) L. Peng, H. Yamamoto, T. Shikanai (2011). Structure and biogenesis of the chloroplast NAD (P)H dehydrogenase complex. Biochim Biophys Acta 1807 (8) : 945-953.

110) T. Izawa (2012). Physiological significance of the plant circadian clock in natural field conditions. Plant Cell Environ 35 (10) : 1729-1741.

その他の出版物

111) 西村尚子 (2008). 3章 花成のしくみから学ぶイネの秘密. 植物まるかじり叢書3 花はなぜ咲くの? : 30-44.

112) 平野博之 (2008). 花の形づくり. 花はなぜ咲くの? : 45-59.

113) 井澤 毅 (2009). イネにとっての短日光周性花芽形成. 光周性の分子生物学 : 77-87.

114) 海老原史樹 (2009). 光周性の分子生物学 : 全199ページ.

115) A. Tanaka, A. Makino (2009). Photosynthetic research in plant science. Plant Cell. Physiol 50 (4) : 681-683.

116) 中村英光, 村松昌幸, 市川裕章 (2010). 葉緑体分化の鍵転写因子 GLK の発見 たった1つの転写因子の過剰発現がイネのカルスを黄白色から緑色に変える. 化学と生物 48 (6) : 370-372.

117) 井澤 毅 (2011). 農業生産と体内時計の切っても切れない深い関係. 体内時計の科学と産業応用 : 125-133.

受賞

118) 吉田明希子, 寿崎拓哉, 平野博之 (2008). イネの小穂器官のアイデンティティを決定する新規遺伝子の解析. 日本遺伝学会第80回大会 Best Paper 賞

119) 大森良弘, 平野博之 (2009). イネの葉における DROOPING LEAF (DL) 遺伝子の発現レベル

と中肋の大きさとの関係. 日本育種学会第116回講演会 優秀発表賞

120) 田中若奈, 安彦真文, 平野博之 (2009). イネにおける心皮の発生を制御する遺伝子の網羅的解析. 日本育種学会第115回講演会 優秀発表賞

121) 鳥羽 大陽, 大森 良弘, 平野 博之 (2010). イネにおける芒の形成を制御する遺伝子の解析. 日本育種学会第118回講演会優秀発表賞

122) 石川元一, 大森良弘, 田中若奈, 平林千鶴, 村井耕二, 荻原保成, 山口貴大, 平野博之 (2010). The spatial expression patterns of DROOPING LEAF orthologs suggest a conserved function in grasses.. GGS prize 2010 (Genes and Genetic Systems 誌論文賞)

123) 松下智直 (2010). 植物の光情報受容体フィトクロムによる信号伝達機構の研究. 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞

124) 松下智直 (2012). 植物の光情報受容体フィトクロムによる細胞内シグナル伝達機構の解析. 日本光生物学協会奨励賞

IX 特許取得・申請

1) 「植物の生長を制御する遺伝子 Hd16 およびその利用」(特願 2009-103758) 矢野昌裕、堀清純、松原一樹、山内歌子

X 研究担当者

1 出穂期の遺伝子ネットワーク解明

独立行政法人農業生物資源研究所
井澤 毅*

2 形態制御の遺伝子ネットワーク解明

国立大学法人東京大学
平野 博之*

3 葉緑体分化の遺伝子ネットワーク解明

独立行政法人農業生物資源研究所
稲垣 言要*, 市川 裕章*

4 光信号伝達系の遺伝子ネットワーク解明

国立大学法人九州大学
松下 智直*

5 光合成の遺伝子ネットワーク解明

独立行政法人農業生物資源研究所

徳富（宮尾）光恵*

国立大学法人東北大学

牧野 周*

国立大学法人京都大学

鹿内 利治*

X I 取りまとめ責任者あとがき

小課題が8個で、年間のプロジェクト予算が1億円前後での、5年間の成果としては、論文の質・量

ともに、文科省等の他の関連プロジェクトと比しても、十分誇れる成果が出たと自負しているが、応用展開という観点から見れば、もう少し成果が出てほしかったというのが本音である。しかしながら、これには、GMO 技術が日本国内で受け入れられるかどうか、また、関係省庁からのサポートが得られるかどうかのポイントとなり、研究者の基礎志向マインドの変える必要性とともに、今後、変えていく必要があると実感している。

（推進リーダー：井澤 毅）

第 1 編 イネの成長・代謝ネットワークの解明

第 1 章 出穂期の遺伝子ネットワーク解明

1 栽培環境に応答するイネ出穂期制御遺伝子ネットワークの解明 (GPN0001)

ア 研究目的

近代のイネ交配育種の成果の一つに、早咲きで光周性のない系統を選抜することで、北海道等の早く寒くなる地域での栽培が可能になったという歴史的な事実がある。また、この数年のイネゲノム研究の成果により、イネの主な出穂制御（花芽形成時期制御）関連遺伝子がいくつも単離され、それに伴い、育種で利用された有用アリル（変異）も同定され、その知見を利用したマーカー育種が積極的に進められている。しかしながら、上記に述べたように、これまでの育種は、光周性反応という本来植物に栽培域の適応力を与える性質を失うことで栽培域の北上を可能にしている、個々の品種の栽培域の適応力を下げた形での品種改良が行われたともいえる。その結果、本来短日植物であるはずのイネが、夏至のころに花芽形成を始めるという不自然な作期でのイネ栽培が日本では当たり前になっている。そこで、本課題では、これまでの交配育種では行われてこなかった遺伝子資源の応用展開を目指し、イネ出穂期制御の遺伝子ネットワーク解析研究を進める。具体的には、光による開花抑制（Hd1（長日条件）や Ghd7 遺伝子周辺）や開花促進（Hd1（短日条件）や Ehd1 遺伝子周辺）および概日時計の関与（OsGI や OsLHY 遺伝子周辺）の遺伝子ネットワークの解明を行う。また、アジア栽培品種に内在する出穂期の変異を決定している QTL のうち、効果の大きな遺伝子座はほぼ解析が進んでいると考えられるが、対立遺伝子の作用の違いが小さな QTL については、その実態は明らかとなっていない。出穂期調節を細やかに行うためには、効果の小さな QTL の理解は不可欠である。

イ 研究方法

（ア）突然変異系統や準同質置換系統を利用し、光環境に対する開花遺伝子の発現解析

イネ概日時計突然変異体やイネ光受容体突然変異

体や Ghd7 開花抑制遺伝子の準同質置換系統を利用し、様々な光環境でイネの出穂期制御遺伝子の遺伝子発現を解析、その遺伝子ネットワークの解明を進めた。

（イ）開花期制御技術の開発

イネ出穂期制御（花芽形成時期制御）関連遺伝子と病害抵抗性誘導剤（プラントアクチベーター）を用いた転写誘導系を利用して、人工的に出穂期制御可能なイネ植物を作製するために以下の研究を行った。

a Ghd7 遺伝子と Hd3a 遺伝子の作用を形質転換イネで確認

Ghd7 遺伝子が過剰発現する様に作成した人工遺伝子と各種プロモーターに結合し制御様式で発現する Hd3a 遺伝子を作成し、共導入形質転換体を作成し、出穂期への影響を調べた。

b 圃場で、農薬散布で遺伝子発現が誘導される遺伝子の探索

圃場栽培しているイネに、プラントアクティベータータイプの農薬を散布、その処理の有無後、経時的にイネの葉をサンプリングし、特定の農薬散布で発現するイネ遺伝子をマイクロアレイ解析で探索した。

c 開花期制御イネの作成と解析

上記の誘導が確認できた遺伝子から 12 個の遺伝子のプロモーター領域を単離し、Hd3acDNA と結合し、Ghd7cDNA を過剰発現する系統と共導入した形質転換イネを多数作成し、農薬散布の出穂期への影響を確認した。

（ウ）日本稲出穂期 QTL の同定と開花遺伝子単離

日印交雑より DNA 多型が少ない日本稲間の交配後代で QTL 解析を行うために、次世代シーケンサーを利用したコシヒカリのゲノム配列情報と既知の日本晴の配列情報等から、GoldenGate 法でゲノムワイドな多型解析を効率的に行い、作成した日本晴 / コシヒカリの CSSL 系統等の解析から、新規出穂期 QTL, Hd16, Hd17, Hd18 を同定し、その後、

その QTL だけがメンデル遺伝で分離する集団を用い、高精度マッピングを行い、候補領域を含むはやまざりやコシヒカリ BAC クローンを選抜し、ゲノム塩基配列を解析するとともに、比較品種の該当配列と比較し、候補遺伝子を限定した。候補遺伝子について、ゲノム断片を利用した形質転換体あるいは RNAi による機能抑制形質転換体を作成し、その表現型を調査した。候補領域の準同質遺伝子系統を利用し、イネの出穂期制御ネットワークを構成する遺伝子の転写レベルをこれまでの結果と比較し、ネットワーク上での新規出穂期（開花期）遺伝子の役割を明らかにした。

ウ 研究結果

(ア) イネ出穂期遺伝子ネットワークの解明

5 年間の研究期間で、各種イネ出穂期関連の突然変異体や準同質置換系統を栽培し、各種光条件・日長条件で栽培し、若い栽培時期のイネ本葉の開花関連遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法やマイクロアレイ解析で、解析を進めた。その結果、多くの知見が得られ、イネの出穂期制御遺伝子ネットワークの概要が明らかになった（図 111-1）。

また、その解析の中から、イネの Hd3a フロリゲン遺伝子が 30 分の日長の変化で、その発現がオン・オフというトグルスイッチのような変化を起こす機構が、太陽光内の青色光成分を青色光受容体を介して、光信号として伝達され、その信号が概日時計の Gate 作用を受け、日々、朝に強く Ehd1 花芽形成促進遺伝子を転写誘導することを明らかにした。そして、その Ehd1 促進作用が、太陽光内の赤色光成分がフィトクロム光受容体（phyA, B, C）を介し

て伝達される光信号が、日長により変化する概日時計の Gate 作用を受け、日長によって変わる花芽形成抑制を受けることで、Ehd1 の下流の Hd3a フロリゲン遺伝子の発現が正確に転写制御を受けるといふ、イネの限界日長認識のコアとなる分子機構を明らかにした。

(イ) イネ開花期（出穂期）制御イネの開発

まず、Ghd7 開花抑制因子を過剰発現する形質転換イネ系統を作成し、出穂期を調査したところ、何年たっても花芽形成を起こさない系統がある頻度で得られた。そこで、Ghd7 開花抑制遺伝子の過剰発現かつ Hd3a フロリゲン遺伝子を適度に発現する系統を作成したところ、Ghd7 が過剰発現にもかかわらず、Hd3a 遺伝子の発現量に応じて、出穂する系統が得られた。つまり、Hd3a 遺伝子の遺伝子産物の働きは Ghd7 タンパク質によって阻害されないことを確認した。

次に、圃場で栽培するイネにプロベナゾール等の抵抗性誘導剤を散布した時に葉で発現する遺伝子を探索した。その中で、RiceXpro 等のデータベースからの知見でフィルターを掛け、12 個の遺伝子のプロモーターを Hd3a 遺伝子の上流に結合し、Ghd7 の過剰発現遺伝子と同時に導入した。その結果、導入したコンストラクトの中から、一個のコンストラクトで、薬剤散布時にのみ花芽形成を起こす系統を得ることができた。この系統は、イネの分けつ個体を利用した複数回の連続誘導実験でも、再現性がよく、薬剤散布時のみだけ、花芽形成を誘導できた（図 111-2）。

(ウ) 日本稲出穂期 QTL の Hd16, Hd17, Hd18 出穂期遺伝子単離

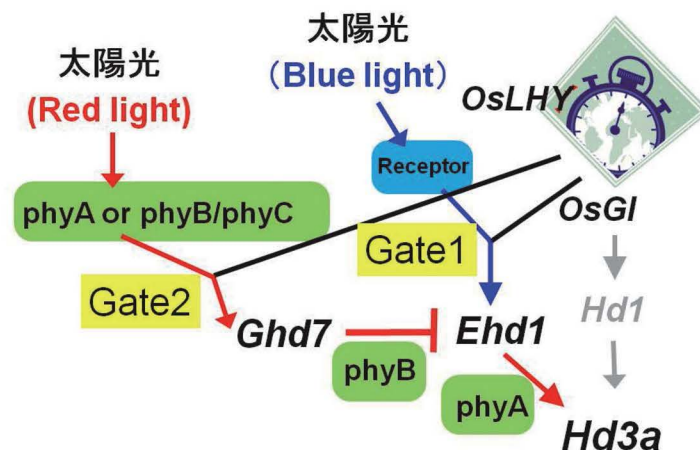


図 111-1 イネの出穂期を制御する主たる遺伝子の遺伝子ネットワーク

Hd16 の単離と機能解析に関しては、遺伝子近傍の一塩基多型 (SNP) のマーカー化を進めて Hd16 の候補領域を第 3 染色体長腕の約 29.4kb に絞り込んだ (図 111-3A)。日本晴とコシヒカリの塩基配列比較により、Casein kinase I (CK1) 様遺伝子のコード領域にアミノ酸置換を生じる一塩基変異が見出され (図 111-3B)、この候補遺伝子の日本晴ゲノム断片を導入した T2 世代の形質転換体は、短日 (10hL/14hD) 条件下で出穂が促進し、長日 (14.5hL/9.5hD) 条件下で出穂が遅延した (図 111-3C)。Hd16 と他の出穂期遺伝子の置換系統群について出穂調査を行い、Hd1、Ghd7、Hd2 および DTH8 が機能欠損型の背景では Hd16 のアレル間の効果の差が小さくなり、これらの遺伝子の間に遺伝的な相互作用が存在すると考えられた。日本晴の背景にコシヒカリの Hd16 領域を置換した準同質遺伝子系統 NIL-Hd16 では、日本晴と比較して、長日条件下で Ehd1、Hd3a および RFT1 の発現が増加していた。日本晴型の Hd16 遺伝子由来の組換えタンパク質は Ghd7 組換えタンパク質の *in vitro* リン酸化活性を示し、コシヒカリ型の組換えタンパク質は

in vitro リン酸化活性を示さなかった。以上の結果から、Hd16 は長日条件下での出穂抑制遺伝子である Ghd7 タンパク質のリン酸化を介して、出穂期を調節している遺伝子であることが明らかとなった。

Hd17 の単離と機能解析に関して、詳細な連鎖解析の結果、Hd17 は第 6 染色体短腕の末端に近い約 43.2kb にマッピングされ、コシヒカリの対立遺伝子が約 5 日晩生にする効果をもっていることが明らかとなった (図 111-4 A)。候補ゲノム領域にはシロイヌナズナの概日時計に関与する遺伝子 ELF3 様の遺伝子が存在し、日本晴とコシヒカリの両遺伝子の配列比較により、この候補遺伝子にはアミノ酸置換を生じる一塩基置換が生じていた (図 111-4B)。さらに日本晴への形質転換によって、コシヒカリの晩成化作用が確認でき (図 111-4C)、Hd17 はシロイヌナズナの ELF3 のオルソログであることが明らかとなった。日本晴の背景にコシヒカリの Hd17 領域を置換した準同質遺伝子系統 NIL-Hd17 を選抜し、概日時計および出穂期関連遺伝子の転写レベルを調査した。その結果、OsLHY、OsPRR1 および OsGI においては日本晴と NIL-Hd17 の間に発現レベル

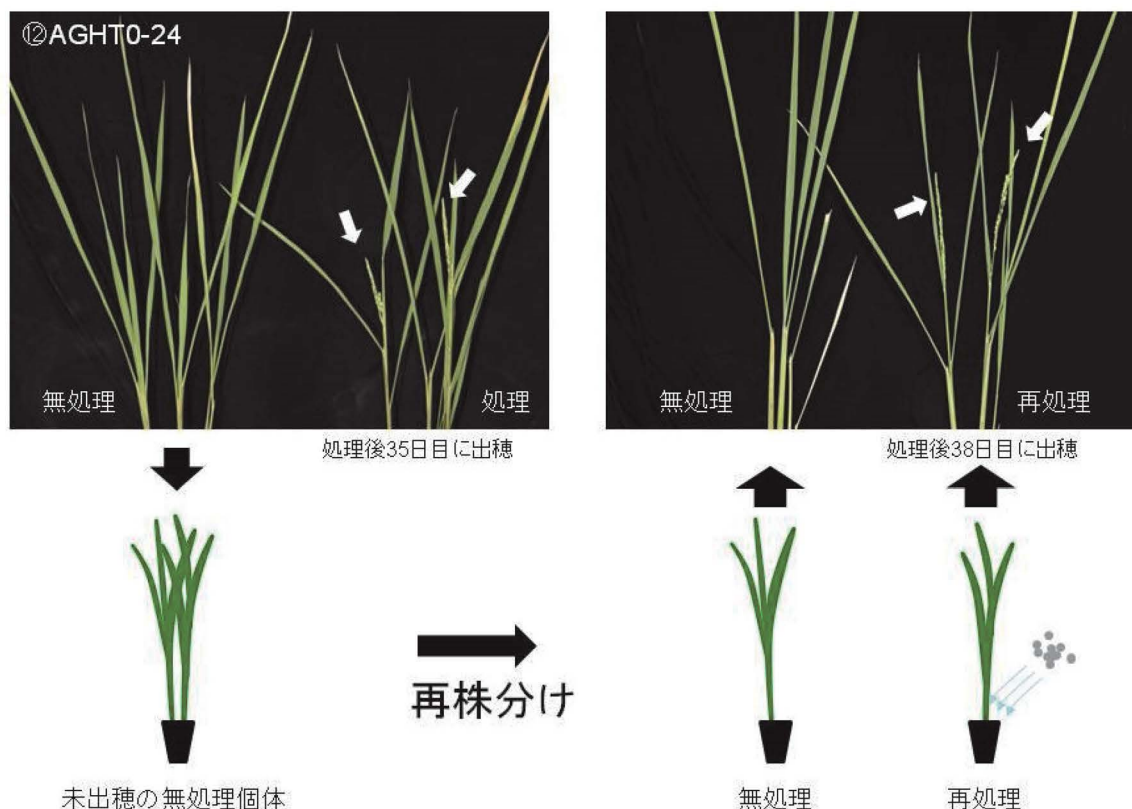


図 111-2 (左上写真) AGHT0_24 系統を分けつ茎を利用して、2 本に株分けし、一報の個体のみ、薬剤処理したところ、処理後 35 日に出穂した。(右上写真) その後、無処理個体を、再度、2 本に株分けし、一方の個体を薬剤処理したところ、その個体のみ、処理後 38 日に出穂した。

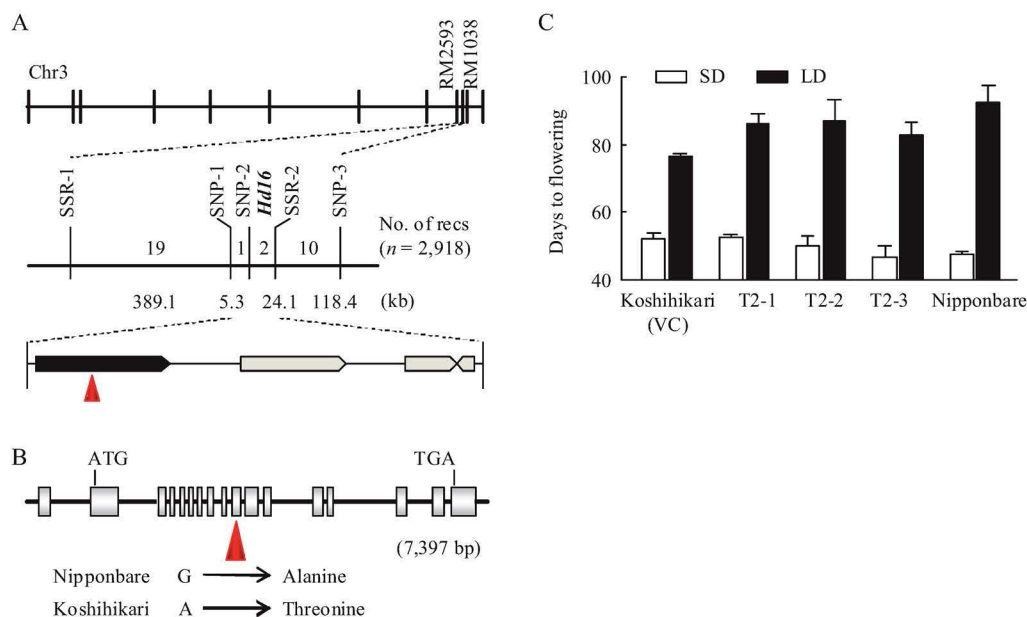


図 111-3 出穂期関連 QTL, Hd16 のマップベーススクローニング

(A) Hd16 の候補ゲノム領域の絞り込み。(B) 日本晴とコシヒカリ間の塩基配列変異。(C) 形質転換 T2 世代の到穂日数。SD：短日（10 時間明）、LD：長日（14.5 時間明）。

の差は見られなかったが、Ghd7 のレベルが NIL-Hd17 において増加するとともにその下流の Ehd1, Hd3a および RFT1 の発現が低下していた。以上の結果から、Hd17 は Ghd7 の発現調節を介して、出穂期の変化を引き起こす遺伝子であることが明らかとなった。現時点では、機能欠損型の Hd17 変異が存在しないことから、日本晴とコシヒカリのどちらの対立遺伝子がより機能をもっているのかが判断できない。

Hd18 に関しては、コシヒカリの遺伝的背景で第 8 染色体短腕だけがはやまさりの染色体断片を持つ置換系統の出穂期は長日条件において約 4 日異なり、その置換断片のゲノム位置から DTH8 遺伝子の短腕末端側に晩生にする新規遺伝子の存在が示唆された。そこで、この領域が分離する 1621 個体を用いた大規模連鎖解析により、Hd18 の候補ゲノム領域を約 25.6Kbp に絞り込んだ（図 111-5）。候補領域内のコシヒカリ / はやまさり間の塩基配列を比較すると、塩基の違いは 4 箇所の SNP のみであった。そのなかで、アミノ酸の非同義置換を生じる SNP は 1 つであり、シロイヌナズナの開花関連遺伝子 FLD のイネオーソログのオキシデースドメイン内に生じていた。はやまさりの Hd18 領域を置換したコシヒカリ背景の準同質遺伝子系統 NIL-Hd18 では、コシヒカリと比較して短日条件と長日条件の

両方で Ehd1、Hd3a および RFT1 の発現が低下していた。

工 考 察

（ア）イネ出穂期関連遺伝子ネットワークの重要部分が解明できた。

分子生物学的には、解析が進んでいる長日植物より、イネの様な短日植物の方が、日長の変化に敏感であることが以前から知られていたが、本研究の遺伝子ネットワーク解析から、Hd3a といったフロリゲン遺伝子の転写が、赤色光に対する遺伝子発現と、青色光に対する遺伝子発現と、概日時計による遺伝子発現の複雑な相互作用から成り立っていることを含めた出穂期制御遺伝子ネットワークの全貌を明らかにできたことは、イネの研究にとどまらずに、植物科学、および、作物科学において、大きな成果と考えられる。特に、赤色光信号伝達系が、イネが置かれた時刻に応じて開花抑制を担い、朝の太陽光の中で、青色成分が開花促進に働くことを見つけた知見は、今後の応用研究を考えても大きな意義がある。

（イ）人為的開花期を制御できるイネを作成できた。

上記のネットワーク解明での知見の比較的単純な利用として、イネの開花期を農業処理により誘導できる系を開発したことは、このシステムを導入した

対象品種の遺伝背景を最大限効率的に使った最適栽培を可能にするという意味で大きな成果と言える。

(ウ) 日本稲品種間のゲノム多型を利用して、遺伝子単離が可能になった。

これまで、日本のイネ品種に見出される出穂期の微妙な違いの原因となっていた作用の弱い QTL は、高精度マッピングに必要な DNA 多型が少ない日本稲間では、難しかったが、次世代シーケンサ解析からの DNA 多型データを、GoldenGate システムという高効率多型解析装置と組み合わせて単離できた意義は大きい。今後、同定された遺伝子のマーカー情報は日本におけるイネの育種に大きな貢献をするポテンシャルを持っていると考えられる。

オ 今後の課題

(ア) 赤色応答や青色応答のシス配列やトランス因子の探索

遺伝子ネットワークの重要部分は解明できたが、Ghd7 遺伝子が赤色光応答するシス配列やトランス因子の同定、Ehd1 遺伝子が青色光で誘導を受けるときに働くシス配列やトランス因子の探索が次の課題となる。

(イ) 開花期制技術のさらなる展開と収量性や収穫物の品質への効果の検証

本研究課題の後半の成果として、プラントアクチベーター処理により開花期を制御できる系統が作出でき、開花期制御系の骨格が完成した。また、開花誘導が確認できた系統の後代を展開し、導入形質の安定性の確認や固定系統を得ることも推し進めている。しかし一方で、現時点では、遺伝子^⑫プロモーターの組織特異性の解析や作製した形質転換系統における植物体の形態、収量、バイオマス等の評価が十分でない。また、これまでは閉鎖系温室や人工気象室等の屋内環境での結果だが、実験環境下では優れた成績を示す系統でも、実際環境で同一の挙動を示すとは限らないので、野外での実施例が今後必要となってくる。加えて、野外環境でのスケールメリットを生かした大規模展開スクリーニングを施行し、より優秀な系統の選抜が今後必要となると考えられる。また、本システムをより有効なものにする為に、イネ品種だけでなく、他イネ科植物等への適用も検討していくことが必要である。

(ウ) 開花期制技術のさらなる展開と収量性や収

穫物の品質への効果の検証

本研究で同定された Hd16、Hd17 等の日本稲間の出穂期を制御する QTL は、その育種利用を積極的に進める対応が求められる。

力 要 約

(ア) イネ出穂期の遺伝子ネットワークの解明

イネ出穂期の遺伝子ネットワークの大筋を解明した。その中で、Itoh et al. (2010) は、Nature Genetics に発表され、概日時計と光信号伝達系を複雑に組み合わせた非常に正確な日長認識分子機構をイネという作物がもっていることを明らかにした。また、圃場における遺伝子発現に注目し、RTR0004 や RTR0002 といった小課題と連携を取りながら、Izawa et al. (2011) や Nagano et al. (2012) といった論文を発表し、複雑に変化する自然環境で、圃場での葉の遺伝子発現を扱える手法を開発した。今後の応用展開が期待される。

(イ) 人為的な出穂期を制御できる形質転換体イネの作出

出穂期は日長といった環境の影響を受けるとはいえ、品種と作期（栽培地）が規定されれば、おのずと、ほぼ確定し、栽培状況に応じて、変えることもできないし、栽培地でベストな時期に出穂する品種を選ぶことも簡単ではない。そこで、上記の本課題で明らかにした知見をフルに活用することで、同じ遺伝背景で、人為的に任意な時期に出穂期を調節可能な遺伝子組み換えイネ系統を作出する技術を開発した。これにより、栽培地・作期に応じて、ベストな条件での出穂期制御を可能にすることができる。今後、実用化には、実際の圃場等での誘導条件の検討や収量性への影響を精査した上での実用的な技術への改良が必要となる。

(ウ) 日本稲間出穂期 QTL の単離と利用

出穂期を微調整するためには、2～5 日程度の小さな変異を作り出す遺伝子の探索が重要である。本研究においては、出穂期関連遺伝子、Hd2、Hd16、Hd17 および Hd18 の単離に取り組んだ。Hd16 は Casein Kinase I をコードし、コシヒカリの対立遺伝子はコード領域に塩基置換が生じ、それによってアミノ酸置換が生じることで、機能が低下していることを明らかにした。Hd16 は、Hd1、Hd5、Ghd7、Hd2 との間に遺伝的な相互作用があり、Hd16 は

Ghd7 をリン酸化することによって Ghd7 の機能を強化し、その結果として、長日条件下において晩生化に作用することが判明した。Hd17 は、シロイヌナズナの開花関連遺伝子 ELF3 のオルソログであることが判明した。Hd17 は Ghd7 の発現を増加させることによって下流の遺伝子 Ehd1 ならびに Hd3a あるいは RFT1 の発現を調節し、出穂期を変化させることを明らかにした。Hd18 については、候補遺伝子をシロイヌナズナの開花関連遺伝子 FLD のオルソログであることを突き止め、Hd18 が Ehd1 の上流に位置し、Hd3a および RFT1 の転写を調節することで出穂期を変化させることが明らかとなった。Hd2 については、従来からその候補遺伝子として概日時計に関与する OsPRR37 であることが示唆されてきたが、本研究において、形質転換実験による機能相補実験に成功した。以上のように、出穂期の微調節に利用できる新たな遺伝子の単離に成功した。今後は、これらの QTL の対立遺伝子型を国内あるいは海外の品種で詳細に調べることによって、特定の品種の出穂期を自由に改変できるシステム構築に貢献できると考えられる。

キ 引用文献

- 1) H. Itoh, Y. Nonoue, M. Yano, T. Izawa. (2010). A pair of floral regulators sets critical day length for Hd3a florigen expression in rice. *Nat Genet* 42 (7), 635-638.
- 2) A. J. Nagano, Y. Sato, M. Mihara, B. A. Antonio, R. Motoyama, H. Itoh, Y. Nagamura, T. Izawa. (2012). Deciphering and Prediction of Transcriptome Dynamics under Fluctuating Field Conditions. *Cell* 151 (6), 1358-1369.
- 3) N. Tanaka, H. Itoh, N. Sentoku, M. Kojima, H. Sakakibara, T. Izawa, J. Itoh, Y. Nagato. (2011). The COP1 ortholog PPS regulates the juvenile-adult and vegetative-reproductive phase changes in rice. *Plant Cell* 23 (6), 2143-2154.
- 4) T. Izawa, M. Mihara, Y. Suzuki, M. Gupta, H. Itoh, A. J. Nagano, R. Motoyama, Y. Sawada, M. Yano, M. Y. Hirai, A. Makino, Y. Nagamura. (2011). Os-GIGANTEA confers robust diurnal rhythms on the global transcriptome of rice in the field. *Plant Cell* 23 (5), 1741-1755.
- 5) K. Ikeda-Kawakatsu, M. Maekawa, T. Izawa, J. I. Itoh, Y. Nagato. (2012). ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 2/RFL, the rice ortholog of Arabidopsis LEAFY, suppresses the transition from inflorescence meristem to floral meristem through interaction with APO1. *Plant J* 69 (1), 168-180.
- 6) K. Matsubara, U. Yamanouchi, Y. Nonoue, K. Sugimoto, Z. X. Wang, Y. Minobe, M. Yano. (2011). Ehd3, encoding a plant homeodomain finger-containing protein, is a critical promoter of rice flowering. *Plant J* 66 (4), 603-612.
- 7) A. Osugi, H. Itoh, K. Ikeda-Kawakatsu, M. Takano, T. Izawa. (2011). Molecular dissection of the roles of phytochrome in photoperiodic flowering in rice. *Plant Physiol* 157 (3), 1128-1137.
- 8) K. Matsubara, U. Yamanouchi, Z. X. Wang, Y. Minobe, T. Izawa, M. Yano. (2008). Ehd2, a Rice Ortholog of the Maize INDETERMINATE1 Gene, Promotes Flowering by Up-Regulating Ehd1. *Plant Physiol* 148 (3), 1425-1435.
- 9) E. Ogiso, Y. Takahashi, T. Sasaki, M. Yano, T. Izawa. (2010). The role of casein kinase II in flowering time regulation has diversified during evolution. *Plant Physiol* 152 (2), 808-820.
- 10) H. Saito, E. Ogiso-Tanaka, Y. Okumoto, Y. Yoshitake, H. Izumi, T. Yokoo, K. Matsubara, K. Hori, M. Yano, H. Inoue, T. Tanisaka. (2012). Ef7 encodes an ELF3-like protein and promotes rice flowering by negatively regulating the floral repressor gene Ghd7 under both short- and long-day conditions. *Plant Cell Physiol* 53 (4), 717-728.
- 11) K. Matsubara, E. Ogiso-Tanaka, K. Hori, K. Ebana, T. Ando, M. Yano. (2012). Natural variation in Hd17, a homolog of Arabidopsis ELF3 that is involved in rice photoperiodic flowering. *Plant Cell Physiol* 53 (4), 709-716.
- 12) N. Endo-Higashi, T. Izawa. (2011). Flowering time genes Heading date 1 and Early heading date 1 together control panicle development in rice. *Plant Cell Physiol* 52 (6), 1083-1094.

- 13) T. Shibaya, Y. Nonoue, N. Ono, U. Yamanouchi, K. Hori, M. Yano. (2011). Genetic interactions involved in the inhibition of heading by heading date QTL, Hd2 in rice under long-day conditions. *Theor Appl Genet* 123 (7), 1133-1143.
 - 14) K. Ebana, T. Shibaya, J. Wu, K. Matsubara, H. Kanamori, H. Yamane, U. Yamanouchi, T. Mizubayashi, I. Kono, A. Shomura, S. Ito, T. Ando, K. Hori, T. Matsumoto, M. Yano. (2011). Uncovering of major genetic factors generating naturally occurring variation in heading date among Asian rice cultivars. *Theor Appl Genet* 122 (6), 1199-1210.
 - 15) K. Matsubara, I. Kono, K. Hori, Y. Nonoue, N. Ono, A. Shomura, T. Mizubayashi, S. Yamamoto, U. Yamanouchi, K. Shirasawa, T. Nishio, M. Yano. (2008). Novel QTLs for photoperiodic flowering revealed by using reciprocal backcross inbred lines from crosses between japonica rice cultivars. *Theor Appl Genet* 117 (6), 935-945.
 - 16) Y. Nonoue, K. Fujino, Y. Hirayama, U. Yamanouchi, S. Y. Lin, M. Yano. (2008). Detection of quantitative trait loci controlling extremely early heading in rice. *Theor Appl Genet* 116 (5), 715-722.
 - 17) K. Fujino, U. Yamanouchi, M. Yano. (2012). Roles of the Hd5 gene controlling heading date for adaptation to the northern limits of rice cultivation. *Theor Appl Genet*, 126(3) : 611-618.
 - 18) H. Itoh, T. Izawa. (2011). A study of phytohormone biosynthetic gene expression using a circadian clock-related mutant in rice. *Plant Signal Behav* 6 (12), 1932-1936.
- 研究担当者（井澤毅*、矢野昌裕、伊藤博紀、山内歌子、堀清純）

第2章 形態制御の遺伝子ネットワーク解明

1 複雑形態制御ネットワークの解明 (GPN0002)

ア 研究目的

作物の形態は、重要な農業形質と密接に関連しており、栽培化や品種改良の過程において、作物の形態は大きく変化している。本研究では、形態改変によってイネの収量を増加することを将来の目標として、イネの葉の中肋形成や幹細胞の維持を制御する複雑な遺伝的ネットワークを解明し、その成果をイネの分子育種に応用するための基盤的研究を行うことを目的としている。具体的には、イネの葉において、中肋形成の遺伝子ネットワークと頂端分裂組織における幹細胞の増殖を制御する遺伝子ネットワークを明らかにする。

イ 研究方法

(ア) 中肋形成の鍵遺伝子 *DROOPING LEAF* (*DL*) の発現制御機構の解析

DL 遺伝子の 5' 上流域、第 1 および第 2 インترونなどを、GUS レポーター遺伝子に連結し、形質転換体を作製した。葉の発生初期や花期間形成時における GUS 活性を組織染色法によって検出した。

(イ) *DL* 遺伝子を利用したイネの葉の直立性促進技術の開発

強い転写活性を示すウイルス由来の VP16 タンパク質の転写活性部位と *DL* タンパク質との融合タンパク質を生産するキメラ遺伝子を作製し、これを *DL* 遺伝子の DG1 制御領域を用いて発現させるコンストラクトを作製した。これを、野生型イネに導入し、形質転換体を作製し、その表現型を解析するとともに種子収量を調査した。

(ウ) *DL* 遺伝子の下流因子および *DL* タンパク質と物理的相互作用する因子の探索

イネの 44k アレイを用いてマイクロアレイ解析を行い、完全な *DL* 機能を喪失している *dl-sup1* 変異体と野生型との発現プロファイルの比較を行った。ターゲット RNA としては、葉原基を含む茎頂全体から抽出したものと、中肋予定領域を Laser Microdissection (LMD) 法により切り出した組織か

ら抽出したものの、2 種類を用いた。酵母 2 ハイブリッド系を用いて、*DL* タンパク質と物理的に相互作用する因子のスクリーニングを行った。

(エ) 幹細胞の増殖を制御する遺伝子ネットワーク

QTL 解析により、*fon2* 変異を抑圧する遺伝子領域を絞りこんだ後に、分子生物学的手法により、この抑圧遺伝子 (*FOS1*) を同定するとともに、発生生物学的な解析により *FOS1* の機能を解析した。さらに、野生イネや栽培イネコレクションの多数のイネの *FOS1* の塩基配列を決定し、イネの進化と *FOS1* 内の変異を調べた。トランスに作用する DEX 誘導系コンストラクトを作製し、これを利用した *FCPI* の茎頂分裂組織における機能を解析した。さらに、*FCPI* によって発現抑制を受けている遺伝子の中から、幹細胞の正の制御因子の探索を行い、その機能を解析した。

ウ 研究結果

(ア) 中肋形成の鍵遺伝子 *DROOPING LEAF* (*DL*) の発現制御機構の解析

DL 遺伝子は、将来中肋が形成される葉原基の中央部分で発現しており、その機能が完全に喪失すると、中肋が全く形成されず、垂れ葉となる¹⁾。*DL* 遺伝子が葉の発生初期から中肋予定領域で発現するための発現制御領域同定を行った。その結果、中肋予定領域の発現には第 2 インترون内にある E2 因子が、葉原基初期での発現には同じく第 2 インترونの E3 因子が必須であることが明らかとなった²⁾。また、第 1 インترونには発現量を制御するシス因子が、5' 上流域には維管束などでの異所的発現を抑えるシス因子が存在することが判明した (図 121-1)。5' 上流域 (約 7.4 kb)、第 1 インترون、第 2 インترونを併せた領域 (DG1) を用いると、in situ hybridization により見いだされる *DL* の時間的空間的発現パターンをほぼ忠実に再現することができた。*DL* は、葉原基に加えて、花の発生時に心皮原基で特異的に発現する。しかし、忠実な発現を反映する DG1 領域を用いても、心皮における GUS の発

現は全く認められなかった²⁾。

さらに、コムギ、オオムギ、トウモロコシなどの *DL* 遺伝子オースログを単離し、その空間的発現パターンを解析した。その結果、これらの遺伝子は、葉の中肋予定領域および心皮原基で特異的に発現していることが判明し、イネの *DL* と非常によく似た発現パターンを示すことから、これらの *DL* オースログの機能はイネ科内で保存されていることが示唆された³⁾。

(イ) *DL* 遺伝子を利用したイネの葉の直立性促進技術の開発

DL タンパク質を機能増強した *DL-VP16* 融合遺伝子を、DG1 の制御下で発現させるコンストラクトを作製し、形質転換体を作出した。この形質転換体は、通常中肋が形成されない葉の先端領域まで中肋が形成され、中肋構造が全体的に大きくなるとともに、葉が強く直立するようになった²⁾ (図 121-2)。しかし、花には全く異常は現れず、種子稔性が低下することはなかった。この DG1 : *DL-VP16* 形質転換体を海外の実験圃場で栽培し、密植および通常の栽培条件下で収量調査を行った。初年度は、DG1 : *DL-VP16* 形質転換体が野生型 (ベクターコントロール) と較べて、密植条件下で種子稔性が低下しないこと、収量が高いことが示された。しかし、2 年目に同様の解析を行ったが、野生型との有意な差は認められなかった。

(ウ) *DL* 遺伝子の下流因子および *DL* タンパク質と物理的相互作用する因子の探索

マイクロアレイ法により、*DL* によって発現が制御される下流因子の探索を行った。茎頂部分全体から抽出した RNA と中肋形成の予定領域を LMD 法により切り出した組織から抽出した RNA の 2 通りターゲットを用いて、野生型と *dl-sup1* 変異体とを比較した。LMD 法では、*dl-sup1* 変異体より野生型において発現が高いものとして、表 121-1 に示したような遺伝子が見いだされた。このうち、いくつかの遺伝子について空間的発現パターンを調べた。*DL* と物理的に相互作用するタンパク質の探索を行った。しかしながら、*DL* と強く相互作用しているタンパク質を見出すことはできなかった。

(エ) 幹細胞の増殖を制御する遺伝子ネットワーク

花分裂組織における幹細胞の制御には、*FLORAL ORGAN NUMBER1 (FON1)* と *FON2* 遺伝子が重要な働きをしていることが示されている^{4, 5)}。*fon2* 変異を抑圧する遺伝子の解析から、CLE ペプチドをコードする *FON2 SPARE1 (FOS1)* 遺伝子が、花分裂組織に加え、茎頂分裂組織や根端分裂組織の幹細胞アイデンティティと増殖に関与していることを明らかにした⁶⁾。また、ジャポニカイネは、*FOS1* 遺伝子に変異があり、その機能が大幅に低下していること、さらに、この変異はジャポニカが栽培化されるごく初期に起こったことを見いだした。茎頂分裂組織では *FON2-LIKE CLE PROTEIN1 (FCP1)* が負の制御因子として関与していることが示唆されている⁷⁾。誘導的発現抑制および誘導的過剰発現系を

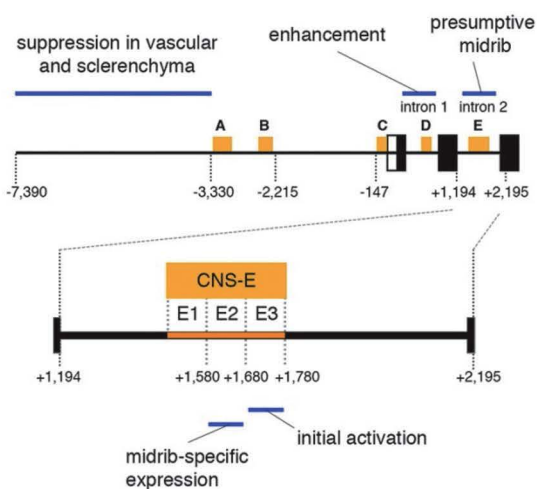


図 121-1 *DL* 遺伝子の発現制御領域



図 121-2 改変 *DL* 遺伝子による葉の直立性の促進
ベクターコントロール (左)、DG1 : *DL-VP16* 形質転換体 (中、右)。

表 121-1 *dl-sup1* の中肋予定領域で発現低下している遺伝子数

カテゴリー	スポット数	遺伝子数
1 転写制御	49	34
2 Cyclin関連	3	2
3 植物ホルモン	9	7
4 ペプチドホルモン	6	3
5 細胞壁関連	5	2
6 ペプチダーゼ	6	5
7 プロテイン カイネース	11	10
8 酵素	50	35
9 トランスポーター	14	8
10 DUF	12	11
11 Hypothetical proteins	23	19
12 トランスポゾン	5	4
13 その他	49	35
合計	242	175

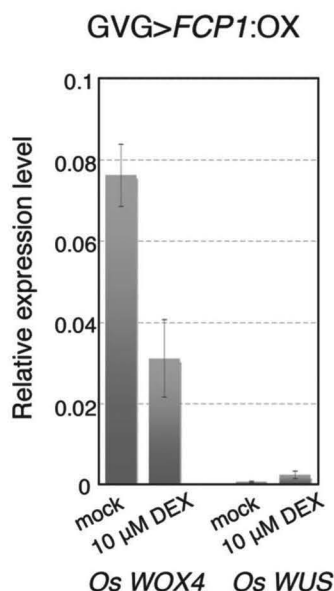


図 121-3 *FCPI* による *WOX4* の発現抑制

開発し、*FCPI* が茎頂分裂組織の幹細胞を負に制御することを明瞭に示すとともに、正の制御因子として *WUSCHEL-LIKE HOMEODOMAIN 4* (*WOX4*) が重要な働きをしていることを明らかにした⁸⁾。さらに、*WOX4* の発現が *FCPI* によって、負に制御されていることも明らかとなった (図 121-3)。

工 考 察

(ア) 中肋形成の鍵遺伝子 *DROOPING LEAF* (*DL*) の発現制御機構の解析

DL 遺伝子が葉の発生初期に葉原基の中央部分で特異的に発現するためには、5'上流域だけでなく、

第1および第2イントロンが必要であり、このうちどれが欠けても転写産物の発現パターンを反映した発現は示さない。したがって、*DL* の時間的・空間的発現の制御機構は非常に複雑であると考えられる。一方、葉の発生過程で忠実な発現を反映する DG1 領域を用いても、心皮における *GUS* の発現は全く認められなかった。したがって、心皮における発現には、5'上流域の非常に遠い領域あるいは、3'下流域に、特異的発現を制御するシス因子が存在すると思われる。

(イ) *DL* 遺伝子を利用したイネの葉の直立性促進技術の開発

DL タンパク質に強い転写活性部位を付加することにより、転写因子としての *DL* タンパク質の機能が增強すること、中肋形成が促進され、葉がより直立することが判明した。したがって、*DL* 遺伝子の改変を通して、葉を直立させ、蜜植条件下でも収量の低下しないイネを作出することが可能であると考えられる。2年目の収量調査のときに、*DL-VP16* 形質転換体と野生型の収量に有意差がなかったのは、DG1: *DL-VP16* 形質転換体で葉の直立性が低下していたことが原因であると考えられる。これは、エピジェネティックな影響により、外来遺伝子の発現が低下している可能性が考えられる。これらの点は、今後の検討課題である。

(ウ) *DL* の下流因子および *DL* とのタンパク質間相互作用因子の探索

茎頂全体から抽出した RNA を用いたマイクロアレイ解析からは、*DL* 遺伝子の下流で発現する主要因子を同定することはできなかったが、これは、*DL* の発現領域と発現時期が日所に限定されているためだと考えられる。そこで、LMD 法により、中肋予定領域の組織から RNA を抽出して、マイクロアレイ解析を行った。

(エ) 幹細胞の増殖を制御する遺伝子ネットワーク

イネにおいては、CLE ペプチドをコードする3つの遺伝子 (*FON2*, *FOS1*, *FCPI*) が幹細胞の増殖を負に制御しており、花、花序、茎頂の各分裂組織のタイプにより、機能分担していると考えられる。これは、シロイヌナズナにおいては、*CLAVATA3* 遺伝子が単独で全ての地上部の頂端分裂組織を負に制御していることと対照的である。また、幹細胞増

殖の製の制御因子としては、イネでは *WOX4* 遺伝子が重要な働きをしている。一方、シロイヌナズナでは、この役割は *WUSCHEL* 遺伝子が担っており、*WOX4* はメリステムでは全く発現が見られず、維管束幹細胞の促進に関与しており、種間における *WOX4* の機能分化は興味深い。

オ 今後の課題

(ア) 中肋形成の鍵遺伝子 *DROOPING LEAF* (*DL*) の発現制御機構の解析

これまで解析してきた *DL* の発現制御領域には、心皮での発現に関わる因子は含まれていない、したがって、*DL* の発現制御を深く理解するためには、心皮原基での発現を誘導するシス領域・因子も同定する必要がある。

(イ) *DL* 遺伝子を利用したイネの葉の直立性促進技術の開発

DG1:*DL-VPI6* 形質転換体を継代して栽培すると、その発現が低下するようである。今後は、この外来遺伝子の発現低下をまねかないようにするなどの工夫が必要である。たとえば、DNA メチル化などによりこの外来遺伝子の発現が低下するのであれば、発現パターンに影響しないように、メチル化されやすい配列を改変することなどが考えられる。

(ウ) *DL* 遺伝子の下流因子および *DL* タンパク質と物理的相互作用する因子の探索

LMD 法により切り出された中肋予定領域の組織から抽出した RNA を用いたマイクロアレイ解析の結果を参照に、*DL* によって発現制御を受け、中肋形成に関わる因子を同定していく必要がある。

(エ) 幹細胞の増殖を制御する遺伝子ネットワーク

幹細胞制御のネットワークをさらに理解するためには、FON2 の受容体である FON1 にくわえて、FOS1 や FCP1 の受容体も同定していくことが必須である。さらに、これら、3 つの因子が関与するシグナル伝達経路間のクロストークや統合経路などの解明も大きな課題である。

カ 要 約

(ア) 中肋形成の鍵遺伝子 *DROOPING LEAF* (*DL*) の発現制御機構の解析

DL 遺伝子の発現制御領域を解析し、葉原基初期

に中肋予定領域で特異的に発現するためには、第 2 イントロン内にある 200bp の領域が非常に重要であることを明らかにした。

(イ) *DL* 遺伝子を利用したイネの葉の直立性促進技術の開発 *DL* 遺伝子の中肋特異的な発現に関わる領域と *DL* タンパク質の転写因子としての機能増強とを組み合わせ、中肋構造を増強し葉を直立させる技術を開発した。

(ウ) *DL* 遺伝子の下流因子および *DL* タンパク質と物理的相互作用する因子の探索

トランスクリプトーム解析により、*DL* 遺伝子によって発現が制御される一軍の遺伝子を見いだした。

(エ) 幹細胞の増殖を制御する遺伝子ネットワーク

茎頂分裂組織や花分裂組織において、幹細胞のアイデンティティと増殖を制御する 3 つの遺伝子を見出し、その機能解析を行った。

キ 引用文献

- 1) Yamaguchi, T., Nagasawa, N., Kawasaki, S., Matsuoka, M., Nagato, Y., and Hirano, H.-Y. (2004). The *YABBY* gene *DROOPING LEAF* regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. *Plant Cell*. 16 : 500-509.
- 2) Ohmori, Y., Toriba, T., Nakamura, H., Ichikawa, H., and Hirano, H.-Y. (2011). Temporal and spatial regulation of *DROOPING LEAF* gene expression that promotes midrib formation in rice. *Plant J.* 65 : 77-86.
- 3) Ishikawa, M., Ohmori, Y., Tanaka, W., Hirabayashi, C., Murai, K., Ogihara, Y., Yamaguchi, T., and Hirano, H.-Y. (2009). The spatial expression patterns of *DROOPING LEAF* orthologs suggest a conserved function in grasses. *Genes Genet. Syst.* 84 : 137-146.
- 4) Suzaki, T., Toriba, T., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Kitano, H., and Hirano, H.-Y. (2006). Conservation and diversification of meristem maintenance mechanism in *Oryza sativa* : function of the *FLORAL ORGAN NUMBER2* gene *Plant Cell Physiol.* 47 : 1591-1602.

- 5) Suzaki, T., Sato, M., Ashikari, M., Miyoshi, M., Nagato, Y., and Hirano, H.-Y. (2004). The gene *FLORAL ORGAN NUMBER1* regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to *Arabidopsis* CLAVATA1. *Development*. 131 : 5649-5657.
- 6) Suzaki, T., Ohneda, M., Toriba, T., Yoshida, A., and Hirano, H.-Y. (2009). *FON2 SPARE1* redundantly regulates floral meristem maintenance with *FLORAL ORGAN NUMBER2* in rice. *PLoS Genet*. 5 : 1-9.
- 7) Suzaki, T., Yoshida, A., and Hirano, H.-Y. (2008). Functional diversification of CLAVATA3-related CLE proteins in meristem maintenance in rice. *Plant Cell*. 20 : 2049-2058.
- 8) Ohmori, Y., Tanaka, W., Kojima, M., Sakakibara, H., and Hirano, H.Y. (2013). *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4* is involved in meristem maintenance and is negatively regulated by the CLE gene *FCP1* in rice. *Plant Cell*. 25 : 229-241.

研究担当者（平野博之*）

第3章 葉緑体分化の遺伝子ネットワーク解明

1 イネの光シグナルによる葉緑体発達・草型のネットワークの解明 (GPN0003)

ア 研究目的

光合成は植物の最も基本的な生理機能であり、農作物においては収量性の根幹をなす。光は、気候、気象、緯度、日周や季節変動などの地球物理的な偏りに加え、栽植密度など周囲の環境で大きく変動する。その中で光合成を最適化するために、植物は様々な制御機構を備えている。また、農作物においては、営農に有利で高収量を与える形質を持った個体が人為的に選抜されてきており、これにより農作物特有の制御機構を具備するに至っているものも多いと考えられる。その分子機構を解明することは、光合成能力の改善、生産性向上の技術を構築する上で重要である。本研究ではイネを用い、この作物の光シグナル伝達のネットワークが、葉緑体をいかに発達させて光合成器官を築いているのか、あるいは、どのような草型を与え、効率的に光を得ようとしているのかを解析する。このために、私たちがすでに単離してきた各種の光受容体の変異株や、新たに単離した抑制変異株、染色体置換系統群、新たに作製した制御因子候補の過剰発現株を有効に活用した解析を進め、これにより光シグナルによる葉緑体発達や草型制御のネットワークの一端を解明し、生産性の向上につながる技術革新の種となる知的基盤の構築に資する知見を得ることを目指す。

イ 研究方法

(ア) 葉緑体発達の光シグナルネットワークの解明

a *phyB* 変異株が示す薄緑葉表現型の生化学的、分子生物学的解析

(a) 暗所芽生えへの赤色光照射緑化実験

① 植物の栽培

殺菌したイネ種子を 0.4% (w/v) 寒天培地上に播種し、暗所 28℃ で 8 日間栽培した。8 日目に $15\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の赤色光を照射し、0、3、6、9、12、24 時間後にイネの地上部のサンプリングを行った。

② クロロフィル量の定量

イネ地上部を液体窒素で凍結して機械的に磨砕後、80% (v/v) アセトンで光合成色素を抽出した。抽出した色素液の吸光度を測定し、分子吸光計数からクロロフィル量を定量した。

③ 転写産物量の定量

イネ地上部を液体窒素で凍結して機械的に磨砕後、植物 RNA 単離キットにより全 RNA を単離した。逆転写酵素によって cDNA を調製し、この cDNA を鋳型に PCR 反応によって転写産物の量を調べた。定量的測定にはリアルタイム PCR 測定装置を用いた。

④ クロロフィル合成中間産物*1の定量

イネ地上部を液体窒素で凍結して機械的に磨砕後、80% (v/v) アセトンで光合成色素を抽出した。C9 逆相カラムを接続した高速液体クロマトグラフに抽出液をかけ、クロロフィル合成中間産物を分離し、蛍光検出器で各産物を検出して定量した。

b *phyB* サプレッサー*2の単離と解析

(a) *phyB* サプレッサーの単離

イネ *phyB-3* 種子に変異原として γ 線を照射し、その種子を栽培して M2 種子を得た。その M2 種子を赤色光下で 14 日間栽培した。通常、*phyB-3* 変異株は薄緑葉を示すが、M2 個体のごく一部に濃緑色を示す個体が得られた。これら濃緑色個体をサプレッサー候補として栽培して種を採り、次世代を同様に赤色光下で育てて濃緑色表現型を安定的に示した個体を *phyB* サプレッサーとして単離した。

(b) *phyB* サプレッサーの原因変異の同定

phyB サプレッサーは遺伝的には農林 8 号背景で

*1：本研究におけるクロロフィル合成中間産物とは、アミノレブリン酸、プロトポルフィリン IX、マグネシウムプロトポルフィリン IX、マグネシウムプロトポルフィリン IX モノメチルエステルの 4 分子を指す。

*2：*phyB* サプレッサーとは、本研究では、*phyB* 変異株が示す薄緑葉表現型が、新たに導入された変異によって抑圧され、濃緑色の葉を示すようになった変異株のことを指す。

ある。これを日本晴背景の *phyB-1* と交配させ F2 種子を単離する。この F2 種子を赤色光下で栽培し、濃緑色を示す個体を選抜し、そこから gDNA を単離して、日本稲間の一塩基多型 (SNP) を検出することができる SNP タイピングアレイ解析装置にかけ、その結果から原因変異の座乗染色体を調査した。座乗位置のさらなる絞り込みは遺伝学的方法により行い、変異の最終確認は gDNA の塩基配列解析によって行われた。

(c) *phyB* サプレッサーの解析

① 相補実験

pbs-19 にはイネ *SPA3* 遺伝子を含む gDNA 断片を、pbs-25 にはイネ *COP1* 遺伝子の cDNA を導入する相補実験を行い、原因変異であるかを検討した。

② 局在部位解析

イネの SPA3 ならびに COP1 を GFP 融合タンパク質として発現させるベクター系を構築し、イネ幼葉鞘細胞にパーティクルガンで導入して蛍光顕微鏡で細胞内局在部位を観察した。

③ 相互作用解析

イネの SPA3 が、イネのフィトクロムタンパク質や COP1 と直接相互作用できるかを検討するために、大腸菌で発現させたタンパク質を用いた共沈実験を行った。

(イ) 草型制御の光シグナルネットワークの解明

a ジベレリンの光制御を介した葉鞘伸長制御機構の解析

(a) ジベレリンレベルの定量

イネ地上部を液体窒素で凍結して機械的に磨砕後、ジベレリンを抽出し、液体クロマトグラフ接続四重極飛行時間型質量分析計によって、ジベレリン分子種を分離して定量した。

(b) 転写産物量の定量

イネ地上部を液体窒素で凍結して機械的に磨砕後、植物 RNA 単離キットにより全 RNA を単離した。逆転写酵素により cDNA を調製し、この cDNA を鋳型に PCR 反応によって転写産物量を調べた。

(c) クリプトクロム欠損系統の構築

クリプトクロム変異株をレトロトランスポゾン *Tos17* 挿入変異ライブラリーから選抜した。また、クリプトクロム遺伝子に関して RNA 干渉 (RNAi) 効果を活用してクリプトクロム分子種のノックダウ

ンを行った。

b 青色光による葉位角の調節機構の解析

(a) 葉身角度の定量

殺菌したイネ種子を 0.4% (w/v) 寒天培地上に播種し、 $10\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の青色光下 8 日間栽培した。イネ幼苗のスキャン画像を取り込み、画像解析ソフトを用いて第 2 葉身の角度を測定した。

(b) 遺伝学的染色体領域の絞り込み

台中 65 号で戻し交配を行い、後代について表現型解析と遺伝解析を行って該当する形質を与える染色体領域の絞り込みを行った。

c 疎植多分げつ系統の解析

(a) 栽培方法と分げつ数の測定

つくば市の農業生物資源研究所圃場において、株間 18 cm、36 cm、54 cm の正条植え 3 条件で栽培を行い、分げつ数の推移と穂数を測定した。

(b) 遺伝学的染色体領域の絞り込み

コシヒカリで戻し交配を行い、後代について表現型解析と遺伝解析を行って該当する形質を与える染色体領域の絞り込みを行った。

(c) 農業形質の測定

つくば市の農業生物資源研究所圃場において、株間 54 cm の疎植栽培を行い、各種農業形質を測定した。

ウ 研究結果

(ア) 葉緑体発達の光シグナルネットワークの解明

我々は、イネに存在する 3 分子種のフィトクロム (*phyA*、*phyB*、*phyC*) の全てについて変異株を単離している (Takano et al.)^{1,2)}。この内 *phyB* 変異株を赤色光下で発芽させると、葉の色が濃緑色になることができず、これは光合成の主要色素であるクロロフィルの含量が低いことが原因であることが示された (図 131-1)。

フィトクロムは植物の赤色光受容体であることから、イネにおいては *phyB* が受容した赤色光情報の伝達がクロロフィル含量を増加させ、光合成器官である葉緑体を完全に発達させるのに必要であることを示す。我々は、*phyB* 変異株が示す薄緑葉表現型の生化学的、分子生物学的解析を通じて、*phyB* 変異株においてどのような機作でクロロフィル合成と葉緑体発達が抑えられているのかを追及するととも

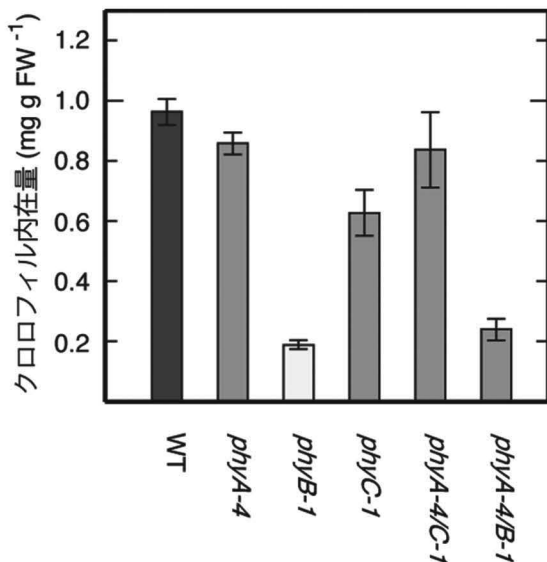


図 131-1 各種フィトクロム変異株のクロロフィル内在量
各種フィトクロム変異株を赤色光下栽培した時のクロロフィル内在量

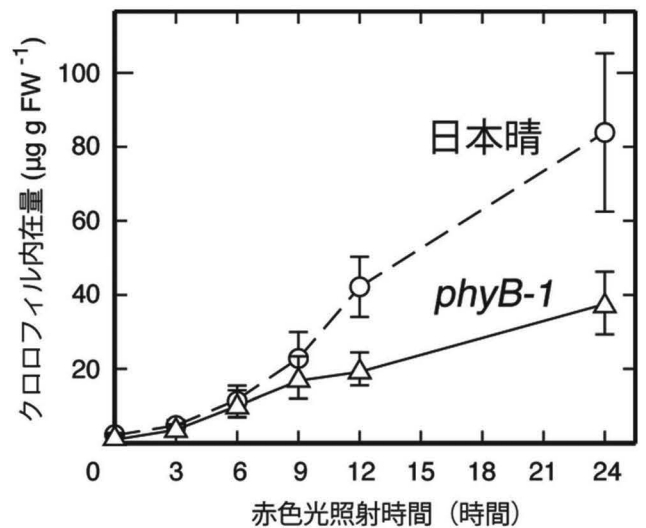


図 131-2 赤色光照射緑化実験におけるクロロフィル内在量の推移
赤色光照射時間に応じたクロロフィル内在量の推移を示す。

に、*phyB* 変異株の表現型から復帰させる新たな変異を持つ変異株（以後、この変異株を *phyB* サプレッサーと呼ぶ）の単離と解析を通じて、*phyB* 情報伝達経路下流に位置する鍵因子の単離を目指した。

phyB 変異株の薄緑葉表現型を解析するにあたって、まず、イネの暗所芽生えに赤色光を照射する緑化実験系を構築した。この系では、暗所で8日間栽培したイネ黄化芽生えに赤色光を0、3、6、9、12、24時間照射した後にサンプリングを行い、クロロフィル量、クロロフィル合成に関わる遺伝子の転写産物量、クロロフィル合成中間産物量の定量を行った。その結果、イネ野生株（日本晴）では照射開始から6時間かけて徐々にクロロフィル蓄積が進み、その後、急速にクロロフィル量が増加するのに対して、*phyB* 変異株では、6時間目までの緩やかなクロロフィル合成は野生株同様であったものの、その後のクロロフィル合成は穏やかなままで、9時間目以降のクロロフィル量は、有意に野生株の値を下回った（図 131-2）。

この赤色光照射初期に見られた現象が薄緑葉表現型の原因と考え、この時間帯におけるクロロフィル合成に関わる遺伝子の転写産物量を定量した。その結果、ごく一部の転写産物をのぞいて野生株と *phyB* 変異株の間で差が見いだされず、ごく一部の遺伝子の転写制御がクロロフィル合成の

律速となっている可能性が示された。その例外とは、マグネシウムキラターゼHサブユニット遺伝子（*ChlH*）、マグネシウムキラターゼの活性化因子遺伝子（*GUN4*）、マグネシウムプロトポルフィリンIXメチルトランスフェラーゼ遺伝子（*ChlM*）の3転写産物で、これらの転写産物は、照射開始3時間目までは野生株同様の増加を示したが、それ以降、*phyB* 変異株では転写産物の増加が抑制され、有意に発現量が少なく推移した（図 131-3）。

このことは、これらの転写産物に関わる酵素（マグネシウムキラターゼならびにマグネシウムプロトポルフィリンIXメチルトランスフェラーゼ）の発現が低下し、これによりこれら酵素反応が野生株より低下している可能性が示唆された。それを確認するため、クロロフィル合成中間産物の内在量の定量を行ったところ、マグネシウムキラターゼならびにマグネシウムプロトポルフィリンIXメチルトランスフェラーゼの産物（マグネシウムプロトポルフィリンIXとマグネシウムプロトポルフィリンIXモノメチルエステル）の量が照射開始6時間目以降 *phyB* 変異株で野生株より有意に低い値を示すことがわかった（図 131-4）。

この際、マグネシウムキラターゼの基質であるプロトポルフィリンIXは野生株、*phyB* 変異株間で有意差はないので、少なくともマグネシウムキラター

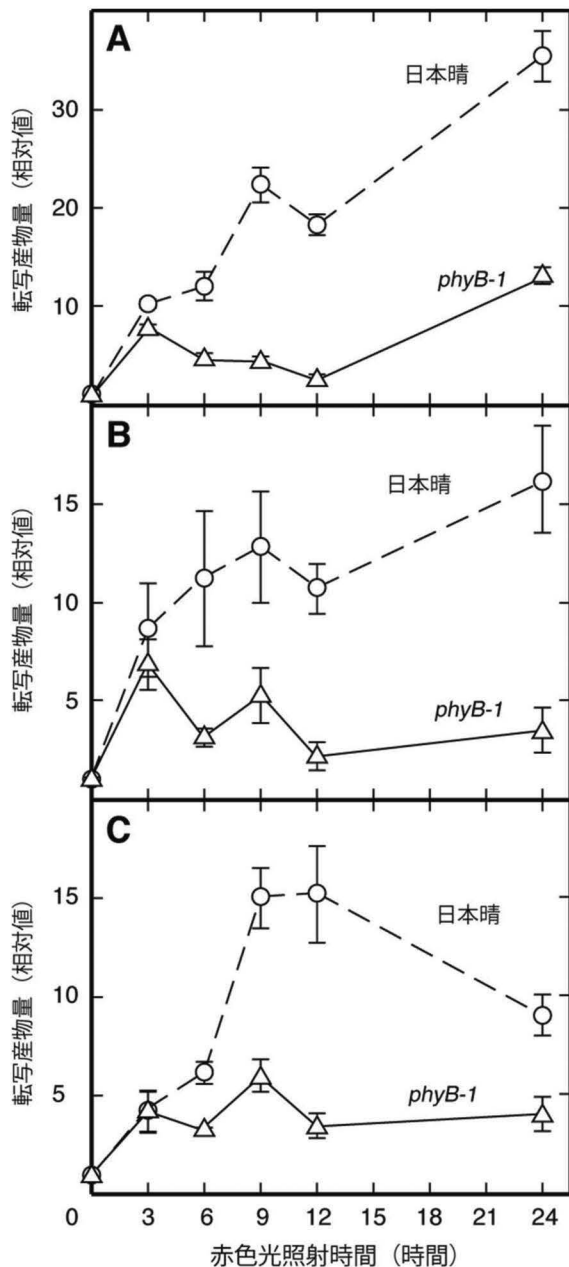


図 131-3 赤色光照射緑化実験における転写産物量の推移

- A) マグネシウムキラターゼ H サブユニット遺伝子 (*ChlH*) 転写産物量
 B) マグネシウムキラターゼ活性化因子遺伝子 (*GUN4*) 転写産物量
 C) マグネシウムプロトポルフィリン IX メチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*ChlM*) 転写産物量

ゼの活性が *phyB* 変異株で低下していることが示された。照射開始 9 時間目に入ると、アミノレブリン酸合成ならびにプロトポルフィリン IX 含量が低下し、クロロフィル合成経路の前半部分の活性が低下し始めることも示された (図 131-4)。

phyB-3 変異株種子に γ 線を照射して得た M2 種子

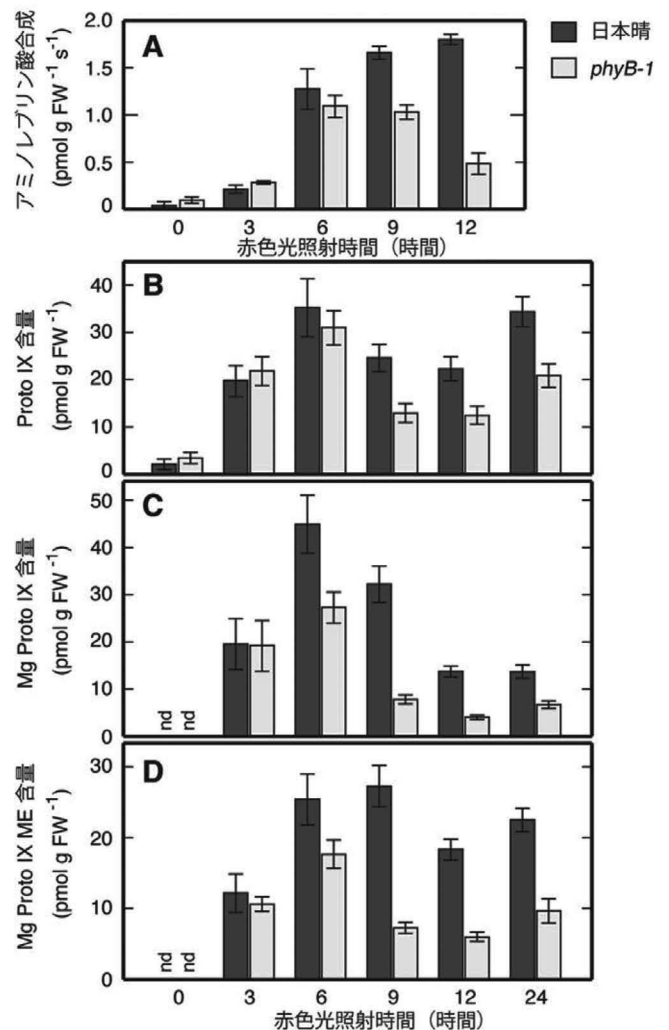


図 131-4 赤色光照射緑化実験におけるクロロフィル合成中間産物量の推移

- A) アミノレブリン酸合成量
 B) プロトポルフィリン IX (Proto IX) 含量
 C) マグネシウムプロトポルフィリン IX (Mg Proto IX) 含量
 D) マグネシウムプロトポルフィリン IX モノメチルエステル (Mg Proto IX ME) 含量

を赤色光下で発芽させると、大多数の幼苗は薄緑葉表現型を示したが、ごく一部で薄緑葉表現型を示さず、濃緑色となった個体が単離された (図 131-5)。

これをサプレッサー候補として単離して採種し、次世代で表現型の再現性などの確認を行った。その結果、サプレッサー変異株を 4 系統 (pbs-4、pbs-17、pbs-19、pbs-25) 単離することができた。このサプレッサー 4 系統は、それぞれ異なったクロロフィルレベルの復帰表現型を示し、変異が草型に与える影響、変異が暗所芽生えの形態に与える影響、変異が出穂期に与える影響などが、それぞれに異なり、これらの結果から 4 系統は独立の変異に由

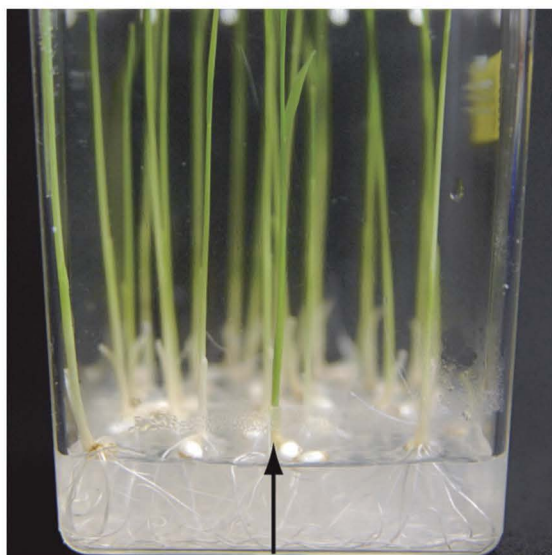


図 131-5 *phyB* サプレッサー候補

来すると考えられた。変異の同定を遺伝学的手法で進めた結果、pbs-19 は第 1 染色体上に、pbs-25 は第 2 染色体上に原因変異が座乗することが明らかになった。その後の詳細な変異座乗位置の解析の結果、pbs-19 はシロイヌナズナの *Suppressor of phyA-105 3 (SPA3)* (Laubinger and Hoecker)³⁾ のイネオルソログ遺伝子上に、pbs-25 はシロイヌナズナの *Constitutively photomorphogenic 1 (COP1)* (Deng et al.)⁴⁾ のイネオルソログ遺伝子上に変異が発見された。この変異が原因であることを検証するための相補実験として、pbs-19 にはイネ *SPA3* 遺伝子を含む gDNA 断片を、pbs-25 にはイネ *COP1* 遺伝子の cDNA を導入した所、サプレッサー表現型が失われたので、両変異が原因変異であることが確認できた。pbs-4 と pbs-17 の変異の座乗位置は明らかに出来なかったが、この変異の表現型発現には *phyB* 機能が必須であることが示された。

イネの *SPA3* ならびに *COP1* タンパク質は核に局在できることが示された (図 131-6)。

一方、イネのフィトクロムは光照射下で核内に移行することが知られている (Kircher et al.)⁵⁾。加えて、イネの *SPA3* はイネのフィトクロムや *COP1* と物理的に相互作用できることが共沈実験により明らかになった (図 131-7)。

シロイヌナズナにおいては *SPA3* ならびに *COP1* は、光情報伝達を抑制する機能を持っていることが報告されているので (Osterlund et al.)⁶⁾、これらを考慮すると、イネの *SPA3* ならびに *COP1* は、

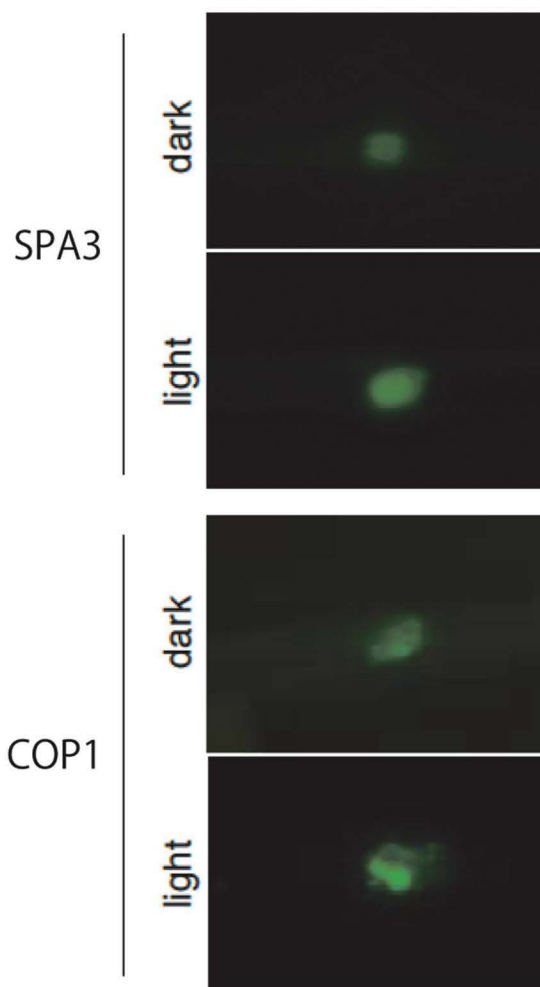


図 131-6 イネ *SPA3* と *COP1* の局在部位解析
上から *SPA3*、*COP1* と GFP との融合タンパク質の暗所あるいは明所における局在部位を示す。

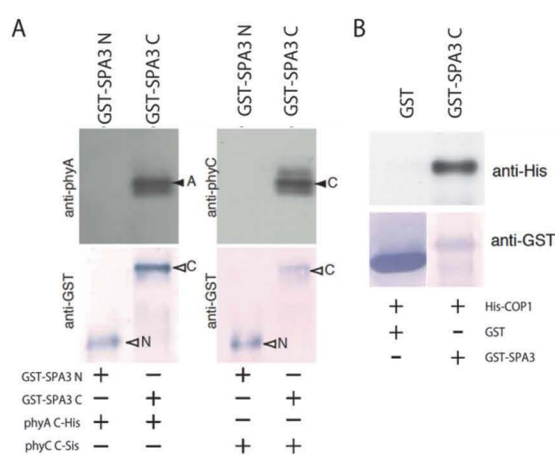


図 131-7 イネ *SPA3* と *COP1* のタンパク質間相互作用解析

A) *SPA3* とフィトクロム間の相互作用解析のための共沈実験

B) *SPA3* と *COP1* 間の相互作用解析のための共沈実験

光照射下の核内でフィトクロムと相互作用し、この相互作用を介してフィトクロムの情報伝達を抑制することによって機能していることが想定された。

(イ) 草型制御の光シグナルネットワークの解明

植物にとって光は光合成のエネルギー源であり、どのような体制で受容するかは、植物の生存に極めて重要な因子となっている。イネの体制は草型とも呼ばれ、草丈、葉身長、葉鞘長、分げつ数、葉身の傾斜角などの素因子で規定されている。本研究においては、葉の展開高度を規定する「葉鞘長」、植物体の横への発達を規定する「分げつ数」、個葉の光受容体制を規定する「葉身の傾斜角」の制御機構について解析を行った。

葉鞘長は、葉身を展開させる高さを規定する重要な因子であり、その長さは光条件による強い制御を受けていることが知られる。本研究では、新たに構築したイネクリプトクロム欠損系統群と既に単離されているイネフィトクロム変異株群を活用し、これらの光受容体がどのように葉鞘長を制御しているのかの検討を行った (Hirose et al.)⁷⁻⁸⁾。葉鞘長の伸長制御には植物ホルモンのジベレリンの関与が考えられたので、まず光照射によりジベレリンの内在量にどのような変化が表れるのかを見た。その結果、光照射によって、活性型ジベレリン GA_1 とその直前の生合成前駆物質である GA_{20} の内在量が低下することが示された (図 131-8)。

活性型ジベレリンの内在量は、その生合成と不活性化のバランスによって規定されていると考えられる。そこで、生合成酵素 GA_{3ox} と GA_{20ox} 、不活性化酵素 GA_{2ox} それぞれの遺伝子について光照射前後での転写産物量を比較した。その結果、 GA_{20ox} の一部の分子種 (GA_{20ox2} 、 GA_{20ox4}) の転写産物量が低下し、 GA_{2ox} の一部の分子種 (GA_{2ox4} 、 GA_{2ox5} 、 GA_{2ox6} 、 GA_{2ox7}) の発現が上昇していることが明らかになった。イネクリプトクロム欠損系統群とイネフィトクロム変異株群を活用して、これらの光制御に関わる光受容体の同定を試みたところ、生合成酵素遺伝子群は主にフィトクロムの下流情報伝達経路によって、不活性化酵素遺伝子群は主にクリプトクロムの下流情報伝達経路によって発現制御を受けていることが明らかになった (図 131-9)。

これら二つの光受容体下流情報伝達経路によって、独立に、協調的にジベレリンの内在量が制御さ

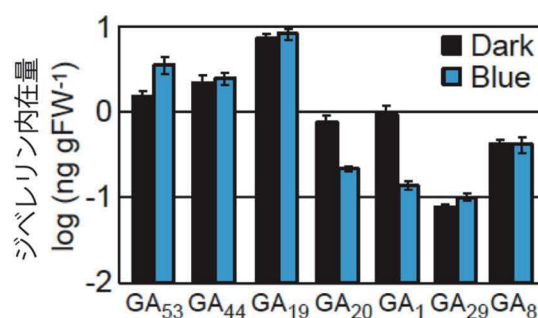
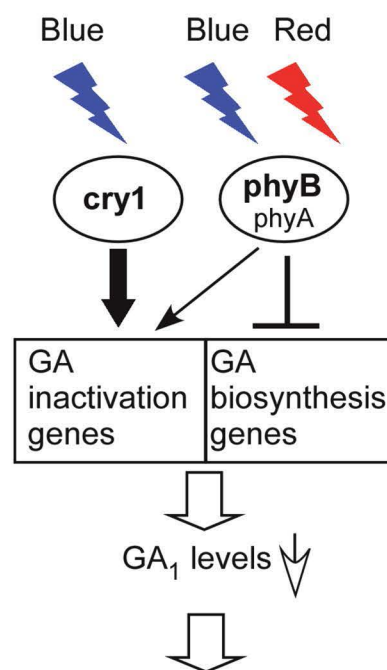


図 131-8 青色光照射前後のジベレリン内在量の変化
 黒) 暗所におけるジベレリン内在量
 青) 青色光照射下におけるジベレリン内在量



Suppression of leaf sheath elongation

図 131-9 活性型ジベレリン量の制御モデル

クリプトクロムは光照射下で不活性化酵素をフィトクロムは主に生合成酵素を制御することで活性型ジベレリンのレベルを低下させ、これが葉鞘の伸長を抑制するというモデル。

れていることが今回の研究で示された (Hirose et al.)⁷⁻⁸⁾。

葉身の傾斜角度も受光能力に大きな影響を与える。葉が密に茂っている時は、葉を直立させた方が受光体制としては優れているが、葉が疎となっている時には、葉を傾斜させ、光源に対して垂直に近い角度で受光する方が体制としては優れる。このように、環境条件によって葉の角度を変えることは、受光には有利に働くと考えられるので、そのような能力がイネに存在しないか、その能力を活用すること

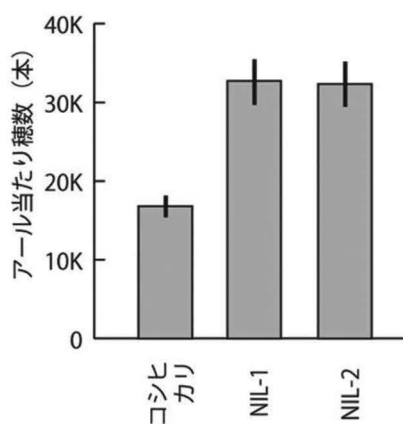


図 131-10 アール当たり穂数

コシヒカリと準同質遺伝子系統 (NIL) 2 系統における疎植 (54cm 間隔) で栽培した際の 1 アール当たりの穂数。

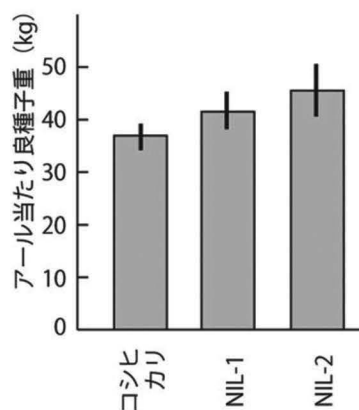


図 131-11 アール当たり良種子重

コシヒカリと準同質遺伝子系統 (NIL) 2 系統における疎植 (54cm 間隔) で栽培した際の 1 アール当たりの採取できた良種子重。

ができないか、それらの可能性を検討する研究を行った。我々は、台中 65 号 /*Oryza glumaepatula* 染色体断片導入系統群を用い、これらの系統群を青色光下で 8 日間栽培し、その葉の傾斜角度を指標に各系統の表現型を比較した。青色光は一般に葉を傾ける働きがあり、ほとんどの系統はコントロールの台中 65 号同様 45 度程度まで葉を傾けた。しかし、1 系統だけは、葉を 90 度近くまで傾け、光条件による葉身傾斜の制御機構の解析材料として適切であることから、その系統を選んで解析を続けた。その系統を遺伝解析した結果、第 4 染色体にこの形質を付与する領域が存在することが明らかになった。本研究では、その染色体領域を 80kbp の範囲内にまで狭めることができたが、この形質を付与する具体的な遺伝子は同定できなかった。

分げつとは、枝に相当する器官で、生殖成長期には穂を付ける単位となっていることから、農業的にきわめて重要な器官として認識されている。分げつは、環境に応じて増減し、特に栽植密度には敏感に反応することが知られている。本研究では、コシヒカリ /*Oryza rufipogon* の染色体断片導入系統群を用いて、これらの系統群を疎密条件で栽培し、分げつ出現数をコントロールであるコシヒカリと比較した。その結果、系統群の中に、密植ではコシヒカリと同程度の分げつ数しか示さないが、疎植条件で栽培すると 1.8 倍まで分げつを増やす系統が存在することが明らかとなった。増えた分げつは、ほぼ全て穂を付けたことから、穂数もコントロールのコシヒカリの 1.8 倍に増えた (図 131-10)。

一般に疎植条件では穂数を大きく増やさないと面積当たりの収量を維持できない。疎植条件でコシヒカリより大きく穂数を増やすこの系統ならば、面積当たりの収量が十分維持できる穂数となるため、この系統を疎植多分げつ系統と呼び、詳細な解析を行った。まず、この形質を付与する染色体領域の絞り込みを行うために戻し交配とその後代の表現型解析と遺伝解析を行った。その結果、第 7 染色体の短腕上に疎植多分げつの形質を付与する領域が存在することが明らかになった。染色体領域の絞り込みによって得られた準同質遺伝子系統を用いた疎植栽培実験によって、疎植条件下ではコシヒカリの 1.2 倍の面積当たりの収量が得られることが示された (図 131-11)。

工 考 察

(ア) 葉緑体発達の光シグナルネットワークの解明

phyB 変異株の薄緑葉表現型は、赤色光情報を *phyB* が受容できず、下流に伝達されないために生じているが、その表現型は、赤色光照射後数時間以内に誘導されており、その誘導にはマグネシウムキラーゼの活性低下が第 1 の引き金となっていることが示された。しかし、マグネシウムキラーゼの活性低下は、光傷害の原因となり得るプロトポルフィリン IX などの蓄積を生じる可能性が高い、それを回避するために、引き続いてクロロフィル合成経路の上流の活性低下が誘導されていることがクロロフィル合成中間体の定量結果によって明らかに

なった。

phyB サプレッサーとして単離された4系統の内 *pbs-19* と *pbs-25* の原因変異は *SPA3* と *COP1* のイネオルソログであることが明らかとなった。これらの因子は、イネの *phyA* や *phyC* と物理的に相互作用可能であることに加え、赤色光照射下ではともに核内に局在していることから、この直接相互作用を介して *phyA* や *phyC* が受容した赤色光の情報の下流への伝達を抑制しているものと考えられた。サプレッサー変異株では、*SPA3* や *COP1* に変異が導入されることにより、この抑制が外れ、赤色光に過敏に反応してクロロフィルの内在量が高められ *phyB* 変異株が通常示す薄緑葉表現型を見かけ上抑制したものと考えられる。

phyB サプレッサーとして単離された残りの2系統、*pbs-4* と *pbs-17* は、遺伝学的な解析から、表現型発現に活性型の *phyB* を必要とする事が示された。このことは、これら二つの変異株が真のサプレッサー変異株であることを示唆する。

(イ) 草型制御の光シグナルネットワークの解明

本研究では、活性型ジベレリンの生合成酵素遺伝子と不活性化酵素遺伝子の光による発現制御と、それに伴うジベレリンの内在量を解析した。その結果、ジベレリンの生合成酵素遺伝子は主にフィトクロムの下流情報伝達経路によって光発現制御を受けていることを、不活性化酵素遺伝子は主にクリプトクロムの下流情報伝達経路によって光発現制御を受けていることが示された。シロイヌナズナでは、これらの二群の酵素の発現制御は両方ともクリプトクロム情報伝達経路下流で行われていると考えられている (Zhao et al.)⁹⁾。イネでは、これら二群の酵素の発現制御が二つの光受容体下流情報伝達経路によって、独立に、しかし協調的に行われていることは興味深い。このように独立の系で活性型ジベレリンのレベルが制御されている系は、情報伝達の堅牢性が高いと推定され、イネにおいてこの応答系が生理的に重要であることを示唆するものと考えられる (Hirose et al.)^{7,8)}。

一般に疎植栽培は育苗コストを低下させるが、コシヒカリなどの栽培品種では、ある一定限度以上の疎植は面積当たりの収量を維持できなくし、農業上の疎植の限界が存在する。しかし、今回見いだした疎植条件でコシヒカリより大きく穂数を増やす系統

ならば、コシヒカリ以上に疎植しても面積当たりの収量を維持できるので、育苗コストをより低下させる遺伝子資源となりうる。今回のようにさらに農業コストを低下させることができる遺伝子資源が *Oryza rufipogon* のような野生イネに埋蔵されていることを本研究で証明しており、本研究手法の有効性が示された。

オ 今後の課題

(ア) 葉緑体発達の光シグナルネットワークの解明

phyB サプレッサーとして単離された *pbs-4* と *pbs-17* は、真のサプレッサー変異株である可能性が高く、その原因変異の座乗位置の特定は、*phyB* 情報伝達経路の解明にきわめて重要であるが、本研究において同定することができなかった。今後、手法等を変えるなどして原因変異の座乗遺伝子を特定する必要がある。

(イ) 草型制御の光シグナルネットワークの解明

第7染色体の短腕上に疎植多分げつの形質を付与する領域が存在するが、その原因となる遺伝子について厳密な同定がなされていない。また、その形質は粗放的な農法において極めて有効な遺伝資源と考えられるが、染色体領域の絞り込みが不十分である。今後、準同質遺伝子系統を構築し、原因遺伝子について厳密に証明するとともに、実際の農業への適用を意識した応用研究が必要である。

カ 要 約

(ア) 葉緑体発達の光シグナルネットワークの解明

本研究では、*phyB* 変異株が示す薄緑葉形質を指標に生化学的、分子生物学的解析を行うとともに、*phyB* サプレッサーという新たな変異株を単離し、これらを活用して葉緑体発達における *phyB* の役割を明らかにすることを試みた。その結果、*COP1* や *SPA3* という既知の光形態形成関連遺伝子がフィトクロム情報伝達経路において葉緑体発達にも重要な作用を持っていることを示した。また、クロロフィル合成の鍵酵素とされるマグネシウムキラターゼに関連する遺伝子の発現が *phyB* により直接的に制御されている証拠を得るなど、*phyB* 情報伝達経路による葉緑体発達制御の一端を解明した。

(イ) 草型制御の光シグナルネットワークの解明

本研究では、草丈、分げつ数（穂数）、葉身傾斜角度の光制御機構について解析を進め、草丈制御については植物ホルモンのジベレリンが重要な役割を果たし、さらにその制御には、植物の光受容体フィトクロムとクリプトクロムが独立に、しかし協調的に働いていることを示した。一方、分げつ数（穂数）制御では、野生イネの第7染色体上には、疎植で多分げつ化させる能力を持つ遺伝子が存在し、この遺伝子を活用すれば大きく疎植しても面積当たりの収量を落とさないという、低コスト農法に寄与する系統を構築できる可能性を示すなど、草型の制御機構について、いくつかの成果をあげた。

キ 引用文献

- 1) Takano, M. et al. (2005). Distinct and cooperative functions of phytochrome A, B, and C in the control of deetiolation and flowering in rice. *The Plant Cell*. 17 : 3311-3325.
- 2) Takano, M. et al. (2009). Phytochromes are the sole photoreceptors for perceiving red/far-red light in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106 : 14705-14710.
- 3) Laubinger, S. and Hoecker, U. (2003). The SPA1-like proteins SPA3 and SPA4 repress photomorphogenesis in the light. *The Plant Journal*. 35 : 378-385.
- 4) Deng, X.-W. et al. (1991). *copl* : a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes & Development*. 5 : 1172-1182.
- 5) Kircher, S. et al. (1999). Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptor phytochromes A and B. *The Plant Cell*. 11 : 1445-1456.
- 6) Osterlund, M.T. et al. (1999). The role of COP1 in repression of *Arabidopsis* photomorphogenic development. *Trends in Cell Biology*. 9 : 113-118.
- 7) Hirose, F. et al. (2012). Cryptochrome and phytochrome cooperatively but independently reduce active gibberellin content in rice seedlings under light irradiation. *Plant and Cell Physiology*. 53 : 1570 : 1582.
- 8) Hirose, F. et al. (2013). Differences and similarities in the photoregulation of gibberellin metabolism between rice and dicots. *Plant Signaling & Behavior*. 8 : e23424.
- 9) Zhao et al. (2007). A study of gibberellin homeostasis and cryptochrome-mediated blue light inhibition of hypocotyl elongation. *Plant Physiology*. 145 : 106-118.

研究担当者（高野誠、稲垣言要*）

2 転写因子 GLK を介した葉緑体発達のネットワークの解明（GPN0004）

ア 研究目的

植物の光合成や各種代謝産物の生合成を司る葉緑体の発達には、光シグナリング系および Golden2 様（Golden2-like : GLK）転写因子の働きが重要な役割を果たすことが知られている（Waters & Langdale¹⁾）。本研究では、イネ由来の GLK（OsGLK1 と OsGLK2）等の転写因子の機能に焦点を当てつつ、光照射によるイネ葉緑体発達の分子機構ならびに植物ホルモンによる葉緑体発達の促進や抑制の機構を解明する。また、これらの基礎的知見を元に、葉緑体分化の人為的制御を目指す他、葉緑体の異所的分化の促進をイネ等の作物の生産力の向上につなげる糸口を見出すことを目的に研究を進める。

イ 研究方法

（ア）各種 *OsGLK* キメラ遺伝子過剰発現イネの観察と解析

構成的過剰発現を示すトウモロコシ *Ubi1* 遺伝子のプロモーター（*PZmUbi1*）の制御下にある *OsGLK1* cDNA 過剰発現（*OsGLK1-OX*）イネ系統の他、*OsGLK1* アンチセンス（*OsGLK1-AS*）イネ系統、*OsGLK2-OX* イネ系統、*OsGLK2-AS* イネ系統、*OsGLK1* キメラリプレッサー発現（*OsGLK1-CR*）イネ系統（品種：日本晴）を作出し、ポット栽培の実施により後代種子を取得した。各後代系統からハイグロマイシン耐性を有する形質転換個体を鉢上げして栽培した。その過程で形態や生育状況の観察、クロロフィル含量の定量、ガス交換法による光合成活性の測定を行った。

(イ) 地上部維管束特異的発現プロモーターの制御下にある *OsGLK1* 形質転換イネの作出と表現型観察

地上部維管束特異的発現を司るイネ *74m* 遺伝子プロモーター (*P74m*) の 33 下流に *OsGLK1* cDNA を接続した融合遺伝子コンストラクトを、アグロバクテリウム経由でイネに導入した。各形質転換イネ系統 (T0 世代) を培土に移植して栽培し、後代 (T1) を採種した。

P74m::OsGLK1 イネ系統 (T1) および野生型の種子を、栄養無添加の 0.5% 寒天で無菌発芽した幼苗を合成粒状培土 (ボンソル 2 号、住友化学) に移植し、ガラス温室で生育させた。各系統の出穂直後に、化学肥料 (1.8 g/ポット) の添加 (追肥) 区と無追肥区の 2 種類を設けて栽培を継続した。出穂から約 2 か月後、各区に属する個体の草丈、葉および穂の重量、分けつ数を計測し、野生型 (日本晴) および *OsGLK1* 過剰発現 (*OsGLK1-OX*) イネ系統のデータと比較した。

(ウ) *OsGLK2-OX* イネ緑色カルスのトランスクリプトーム解析

OsGLK2-OX イネ緑色カルスと野生型イネカルスから全 RNA 画分を抽出し、イネ 44k オリゴマイクロアレイを用いて包括的遺伝子発現解析を実施した。

(エ) *GLK* 遺伝子発現の光誘導性解析

OsGLK1 および *OsGLK2* 遺伝子発現の光誘導特性を比較解析するため、暗所で 3 日間 発芽・生育させた野生型イネ幼苗に各 10 $\text{lmol/m}^2/\text{sec}$ の赤色光または青色光を照射した。イネ幼苗から経時的に抽出した全 RNA 画分を試料として半定量的 RT-PCR を行い、泳動像を数値化した。

(オ) クリプトクロム発現抑制 (*cry*) イネ幼苗のクロロフィル量の測定

イネには *OsCRY1a*、*OsCRY1b*、*OsCRY2* の 3 種類の青色光受容体クリプトクロムをコードする遺伝子が存在する (Hirose ら²⁾)。野生型 (日本晴)、2 系統の *Oscry1a*-RNAi (*Oscry1a-R*) イネ、3 系統の *Oscry1b* 変異イネ、2 系統の *Oscry2*-RNAi (*Oscry2-R*) イネ、さらに 3 系統の *Oscry1a-R Oscry1b-1* 二重抑制イネの滅菌種子を栄養塩なしの 0.5% (w/v) 寒天に播種し、青色光 ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の連続照射下で発芽、生育させた。8 日後、各幼苗の葉身および葉鞘の中央部から 10 x 2 mm の切片を採種し、

(Porra ら³⁾) の方法に従ってクロロフィル量を測定した。

(カ) *OsGLK1-OX* 緑色培養細胞を用いたタンパク質分泌実験

培養液中に有用タンパク質を分泌させる目的で、イネ *a* アミラーゼ *3D* 遺伝子由来のプロモーター (P)、シグナルペプチド (SP) のコード領域、さらにターミネーター (T) をコードする DNA 断片 (*OsAmy3D P::SP::T*) を組込んだ植物形質転換用バイナリーベクターを構築した。このベクターの *OsAmy3D P::SP* と *T* の間に、*sGFP* レポーター遺伝子断片 (静岡県立大 丹羽 康夫博士より入手)、またはヒト由来インターロイキン 10 (IL-10) をコードする cDNA と His タグのコード配列を融合した DNA 断片 (農業生物資源研究所 高岩 文雄博士より入手) を組み込んだ。構築された *sGFP* および IL-10 分泌型バイナリーベクターは、除草剤耐性を付与する変異型アセト乳酸合成酵素遺伝子 (*mALS*) を選抜マーカーとして持ち合わせていることから、アグロバクテリウム経由で *OsGLK1-OX* イネ (すでにハイグロマイシン耐性を有す) に導入し、除草剤耐性の形質転換イネ系統を作出した。得られた *OsAmy3D P::SP::sGFP::T* 導入 *OsGLK1-OX* イネ系統は N6 基本培地に 2 mg/L 2,4-D および 3% ショ糖を加えた液体培地 (N6DSuc) に入れ、白色光連続照射下で振とう培養を行った。8 日後、この培地をショ糖無添加液体培地 (N6D) に置き換えて遮光下で培養し、経時的に 100 L ずつ採取した培養液の蛍光強度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

一方、*OsAmy3D P::SP::IL-10::His-tag::T* イネ系統の培養細胞は、N6DSuc 液体培地に入れ、白色光連続照射下で振とう培養を行った。8 日後、この培地を N6D 液体培地に置き換え、遮光下で 7 日間振とう培養した。各培養液を採取し、濃縮等の操作は経ずに、培養液中のタンパク質を SDS-PAGE で分離し、ナイロンメンブレンに転写後、抗 His タグ抗体を用いたウェスタン解析により、IL-10::His 融合タンパク質を検出した。

(キ) 微小金粒子を用いた葉緑体の形質転換

粒径が 0.08 μm (0.082 0 0.017 μm)、0.1 μm (0.11 0 0.02 μm)、0.2 μm (0.22 0 0.033 μm) および 0.3 μm (0.32 0 0.045 μm) の 4 種類の微小金粒子、さらにコントロールとして市販の 0.6 μm の金粒子

(Bio-Rad 社) を、タバコ葉緑体の形質転換に供した。葉緑体形質転換ベクター pNtag (Okuzaki ら⁴⁾) は、タバコ葉緑体 DNA との相同組換えに必要な相同配列として *trnI-trnA* を含む約 3.5 kb の DNA 断片を有し、*trnI* と *trnA* の間にスペクチノマイシン (Sp) 耐性遺伝子 *aadA* とレポーター遺伝子 *GFP* の発現カセットを挿入した構造になっている。

各プレートに 50 枚 (5 mm 角) のタバコ葉片を並べ、パーティクルデリバリー装置 (PDS-1000/He system, Bio-Rad) を用いて、1,100 psi のヘリウムガス圧で pNtag を塗布した上記金粒子を葉片めがけて打ち込み、Sp 選抜により葉緑体形質転換体を得た。なお、1 プレートへの遺伝子導入実験は 4 回または 6 回反復した。

ウ 研究結果

(ア) *OsGLK1* および *OsGLK2* cDNAs の構成的過剰発現ならびに維管束組織特異的発現

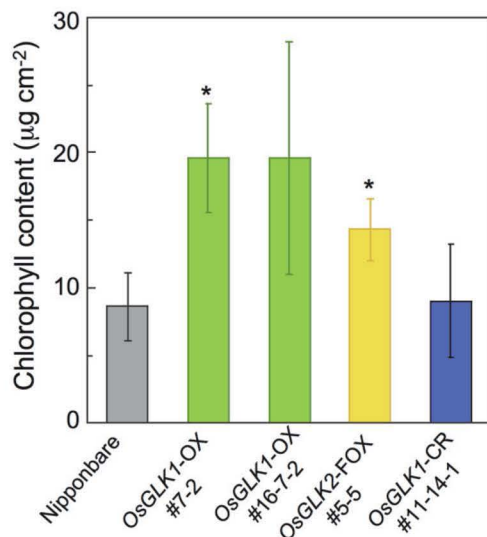


図 132-1 キメラ *GLK* cDNA 導入イネ葉身のクロロフィル含量

隔離温室にて栽培した各イネ系統 (播種後 151 日経過) の止葉から 1 つ下の葉身 (1 cm²) を採取し、抽出されたクロロフィル量を測定した。

Error bars: ± SE、*: p < 0.05

の効果

形質転換植物育成用の隔離温室にて約 5 か月間、各種 *GLK* キメラ cDNA 導入イネを栽培し、展開した葉身のクロロフィル量を比較した。その結果、*GLK1* あるいは *GLK2* cDNA 過剰発現イネは、野生型よりも有意に多くのクロロフィルを蓄積していたが、*GLK1-CR* イネは野生型と同等であった (図 132-1)。成熟した野生型葉身では *GLK* 遺伝子発現が低下するが、*PZmUbi1* の制御下にある *GLK* は発現が低下することなく機能することから、このような差異が生じたものと考えられる。

さらに温室で施肥を制限しながら栽培した各種 *GLK* 形質転換イネの光合成活性を測定した結果、*OsGLK1-OX* および *OsGLK2-OX* イネで野生型よりもわずかに高活性を示したが、有意差とまでは言えない程度の差異だった。また、*GLK1-CR* イネの活性も野生型と同等であった (図 132-2)。

OsGLK1-OX イネでは、少なくとも幼苗期の

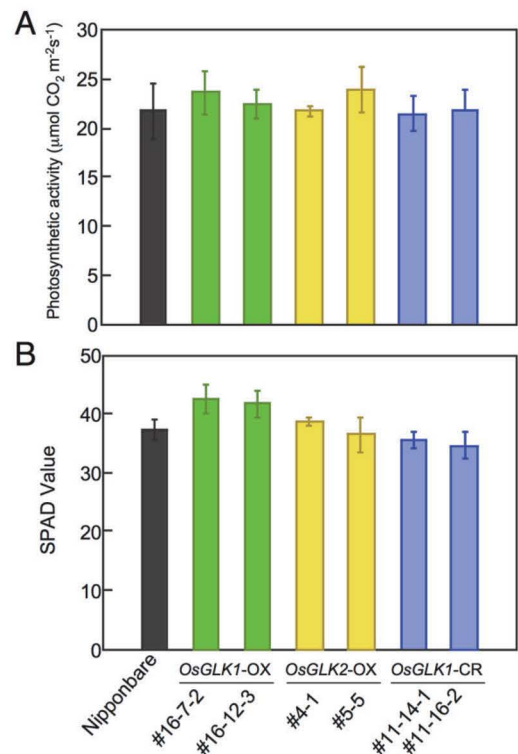


図 132-2 各種 *GLK* 形質転換イネの光合成活性

発芽 10 日目のイネを土に移植: 無肥料培土 1 リットルあたり 1.5 mL の 8-8-8 化成肥料を添加。

A) 発芽後、約 7.5 週間経過時点でガス交換法により、各個体の最上位最大展開葉の光合成活性をガス交換法により測定した (CO₂: 370 ppm、白色光: 1,200 μmol m⁻² s⁻¹)。

B) 同時に、クロロフィル含量の指標となる SPAD 値も測定した。

維管束の葉緑体が異所的に分化することに加え (Nakamura ら⁵⁾, 中村ら⁶⁾), 栄養生長期後半 (図 132-3) および生殖生長期にある稈基部の葉鞘の緑化が長期間維持されるという特徴を有していた。その反面、*OsGLK1*-OX イネは枯れ上がりの遅れゆえか、出穂遅延、種子の小型化や稈実率の低下を招いた。

地上部の維管束で特異的な発現を示す機能未知遺伝子 *74m* のプロモーターの制御下に *OsGLK1* cDNA を配置したキメラ遺伝子を導入した (*P74m::OsGLK1*) イネ系統の T1 個体をガラス温室で生育させ、野生型および比較的顕著な表現型を示す *OsGLK1*-OX イネ系統との間で生育の違いを比較した。まず、*OsGLK1*-OX イネに出穂の遅延が見られたが、*P74m::OsGLK1* イネは野生型とほぼ同時期に出穂した。出穂後、各系統を追肥区と無追肥区に分け、さらに約 2 か月間栽培を継続し、各個体の地上部を穂と葉に分けて乾燥重量を計測した。

まず無施肥区では、*P74m::OsGLK1* イネは *OsGLK1*-OX イネと同程度の重さで、野生型よりも高い値を示した (図 132-4)。*OsGLK1*-OX イネは稈実率が低く、種子が小型であるため、穂重は低い値であった。一方、*P74m::OsGLK1* イネの穂重は、*OsGLK1*-OX イネよりも有意に高かったが、野生型のそれを下回る傾向が見られた (図 132-4)。以上の結果から、*P74m::OsGLK1* イネは *OsGLK1*-OX

イネの短所を解消しつつ、バイオマスの増加に貢献可能なことが示唆された。*P74m::OsGLK1* イネが低穂重を示した要因として、肥料不足の可能性が考えられた。そこで、追肥区のイネの生育特性を比較した。その結果、無施肥区と同様、*P74m::OsGLK1* イネの葉の重量は野生型に比べて高い値を示した (図 132-4)。さらに、穂重でも野生型と同等、あるいはそれ以上の系統があったことから、追肥は *P74m::OsGLK1* イネの穂重増に効果的であった。一方、*OsGLK1*-OX イネでは追肥の有無に関わらず、穂重は低い値を示した (図 132-4)。

これらの結果から、地上部維管束特異的な *OsGLK1* 遺伝子の発現をイネに付加することは、イネのバイオマス増大につながるものと期待される。

(イ) 光質等の環境要因による *OsGLK1* と *OsGLK2* の遺伝子発現や機能の制御

OsGLK1 および *OsGLK2* 遺伝子の発現部位を把握するため、両遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 解析を行った結果、*OsGLK1* 転写産物は展開した葉身の葉肉細胞 (図 132-5_A)、栄養成長期および生殖成長期の茎頂付近の幼葉身、幼穂、開花前の葯、開花前後の穎花 (外穎と内穎の内側) において比較的明瞭に観察された。一方、*OsGLK2* 転写産物は、*OsGLK1* と同様、特に展開葉身 (図 132-5_C) と穎花で観察されたが、幼葉身での発現レベルは比較的低レベルで、葯での発現は検出されな

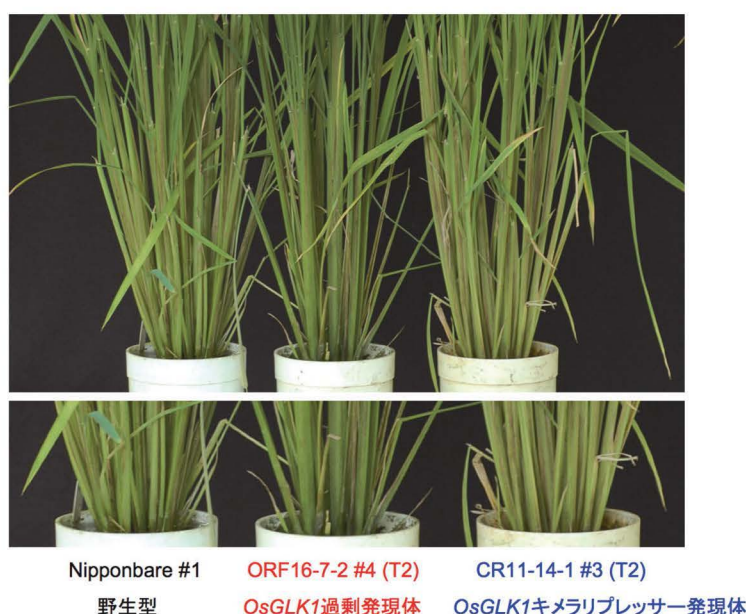


図 132-3 *OsGLK1*-OX イネの稈基部では葉鞘の緑化促進状態が長期間維持された幼苗を土に移植して 69 日後に写真撮影した。

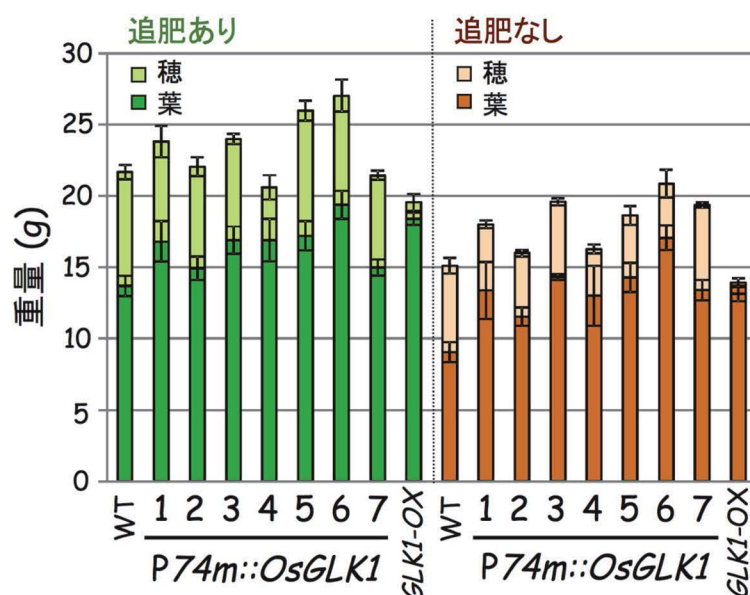


図 132-4 P74m::OsGLK1 形質転換イネ系統の穂重と葉の重さ
ガラス温室にて自然日長で生育させた P74m::OsGLK1 形質転換イネ、野生型 (WT) および OsGLK1-OX イネの穂と葉の乾燥重量を測定した。

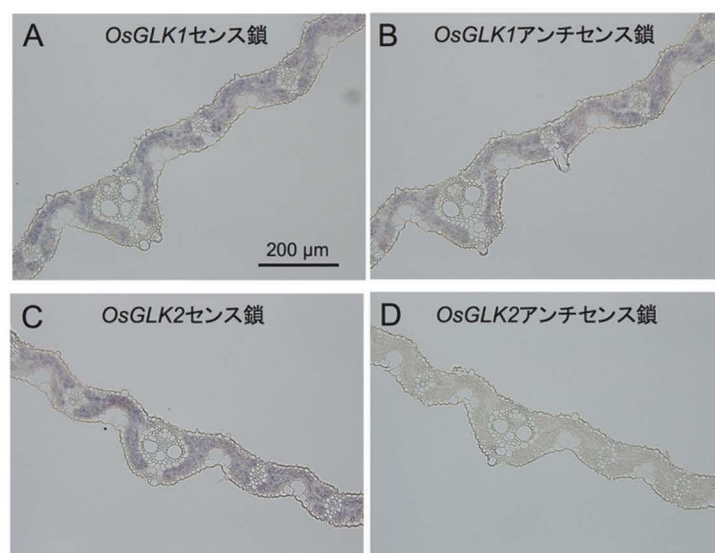


図 132-5 イネ葉身における OsGLK1/2 遺伝子の発現特性

かった。興味深いことに、葉身や穎花では *OsGLK1* アンチセンス転写産物が検出されたが (図 132-5_B)、*OsGLK2* アンチセンス鎖は検出限界以下であった (図 132-5_D)。*OsGLK1* アンチセンス鎖はセンス鎖が検出されている組織にのみ存在し、未熟な組織よりも成熟した組織においてより顕著に検出される傾向が見られた。なお、*OsGLK1* アンチセンス鎖の存在は、青色光および赤色光を照射したイネ幼苗から単離した全 RNA 標品の半定量的 RT-PCR 解析からも裏付けられている。

OsGLK1 および *OsGLK2* のセンスおよびアンチ

センス RNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション解析により、水田圃場で 45 日間栽培したイネの完全展開葉 (横断切片) に存在する *OsGLK1/2* 転写産物を検出した。各パネルには検出対象の RNA 鎖を記載した。

野生型 (日本晴)、*OsGLK1*-OX 系統、*OsGLK1*-AS 系統、*OsGLK1*-CR 系統を、赤色光および青色光を連続照射しながら 7 日間生育させ、各イネ幼苗のクロロフィル量を調べたところ、赤色光と青色光とも同様の傾向が見られ、第二葉身と第二葉鞘の何れにおいても、野生型、*OsGLK1*-OX イネ系統 およ

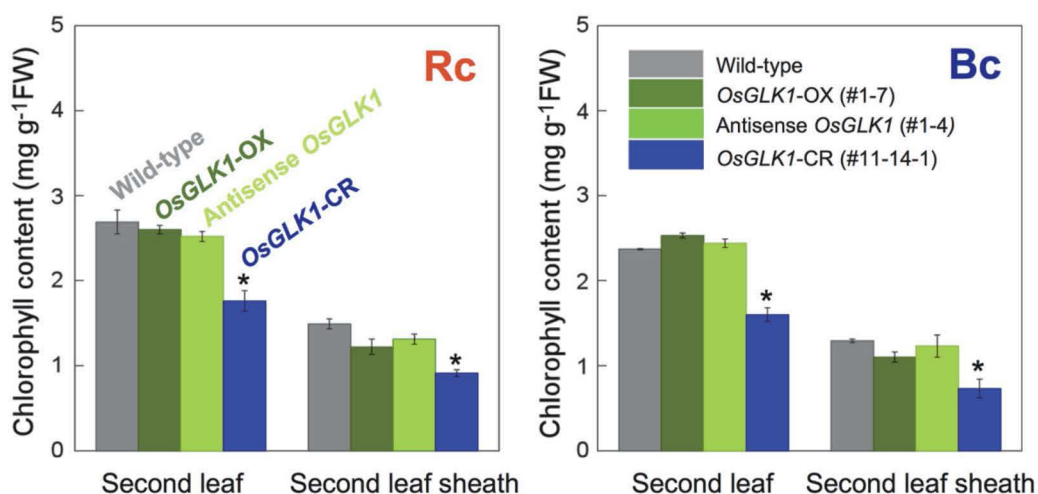


図 132-6 単色光連続照射下で7日間生育させたイネ幼苗の第二葉身および第二葉鞘のクロロフィル量
 Rc：赤色光連続照射 ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)、Bc：青色光連続照射 ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)
 Error bars: $\pm$ SE、*: $p < 0.01$

び *OsGLK1*-AS 系統の三者の含量に有意な差異は見られなかった。一方、*OsGLK1*-CR 系統は赤色光と青色光の何れの照射下でも、他の三者に比して有意にクロロフィル量が低下していた (図 132-6)。以上より、*OsGLK1* と *OsGLK2* は部分的に重複した機能を有すること、また2種の *GLK* 遺伝子の発現は光照射あるいは生育過程で、野生型でも誘導されることから、*OsGLK1* の過剰発現やアンチセンス発現は、イネ幼苗の緑化に顕著な表現型を与えないことが判明した。しかし、キメラリプレッサー系を適用して双方の *GLK* 機能を抑制すると、クロロフィルの蓄積が阻害されることが明らかになった。

OsGLK1 と *OsGLK2* 遺伝子は共に葉緑体分化を正に制御する。自身の発現制御に関する知見を得るため、赤色光および青色光を照射した日本晴幼苗における *GLK1* と *GLK2* の発現を調べたところ、前者の転写は赤色光と青色光の双方で顕著な発現誘導を受けたが、*GLK2* の発現誘導は穏やかでおよそ2倍程度であった (図 132-7)。

青色光下で生育したクリプトクロム (*CRY*) 遺伝子の発現抑制イネ系統の葉鞘および葉身のクロロフィル量を測定したところ、特に *OsCRY1* の二重抑制系統 (*Oscry1a-R Oscry1b-1*) の葉鞘のクロロフィル量は野生型 (日本晴) に比べて顕著に減少していた (図 132-8)。一方、*OsCRY1a*、*OsCRY1b* および *OsCRY2* の発現を単独で抑制した場合は野生型と同等レベルのクロロフィルが蓄積していた (図 132-8)。

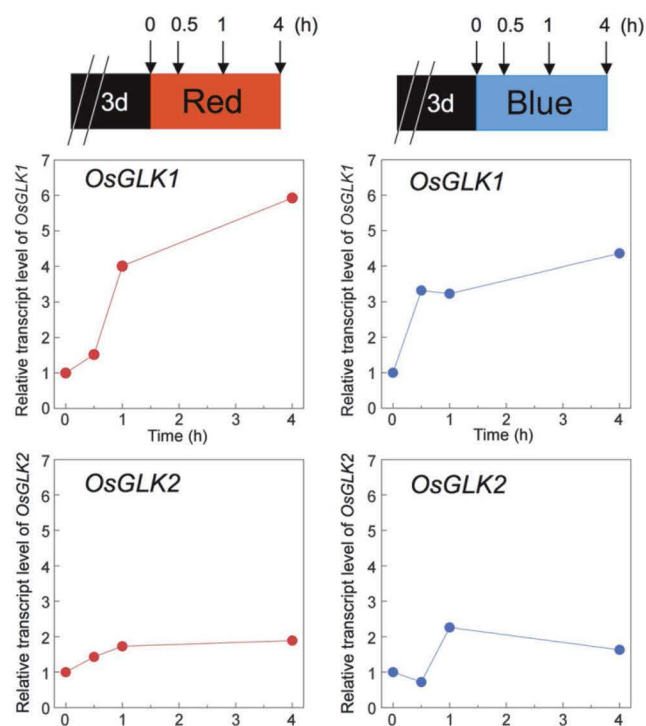


図 132-7 単色光照射 ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) による *OsGLK1* および *OsGLK2* 遺伝子の発現誘導

これらイネ系統を自然光照射の隔離温室で約2か月間栽培し、葉身と葉鞘のクロロフィル含量を比較したところ、*Oscry1a-R Oscry1b-1* 二重抑制イネでは特に葉鞘の含量が大きく低下していた (図 132-9)。

また、*OsGLK1* の転写は青色光照射によって増大するが、それは *CRY1a* と *1b* によって正に制御されていた。一方、*OsGLK2* の発現は光による影響を受けず、発現量の目立った変動は検出されなかった。

光形態形成の負の制御因子で E3 ユビキチンリ

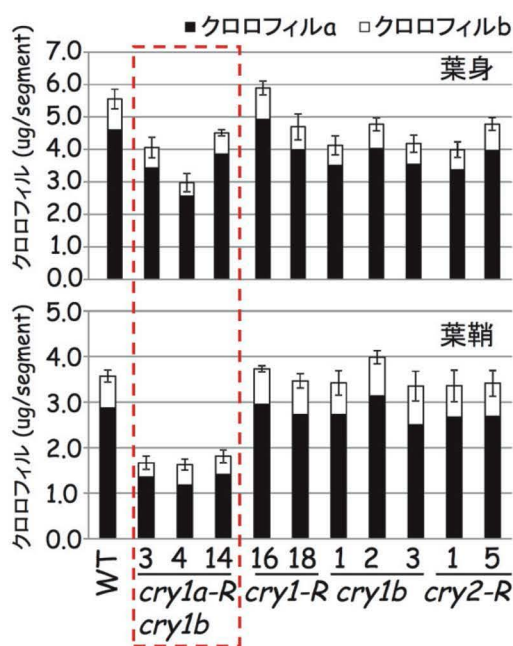


図 132-8 クリプトクロム発現抑制イネ幼苗のクロロフィル含量

青色光連続照射下 ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で8日間生育させたイネ芽生えの葉身および葉鞘の各切片 ($10 \times 2 \text{ mm}$) からクロロフィルを抽出した。各系統のクロロフィル量の計測は5検体ずつ実施した。

ガーゼをコードする OsCOP1 は OsCRY1b と相互作用することが知られている (Zhang ら⁷⁾)。本研究では、明所から暗所に移したイネ培養細胞ではプロテアソーム系を介して GLK1 タンパク質が迅速に分解すること、さらに酵母 two-hybrid 系の適用により、GLK1 タンパク質が OsCOP1 と相互作用することを見出した (農業生物資源研究所 稲垣 言要博士ら [課題番号 GPN0003] との共同研究)。次に、上記 *Oscry1a-R Oscry1b-1* 幼苗の葉鞘での GLK1 タンパク質量を調べた。青色光下で生育した日本晴の葉鞘では GLK1 タンパク質が安定に存在していたが、*cry1* 二重抑制イネ系統では顕著に減少していた。

以上の知見から、OsGLK1 の発現と機能は、CRY1a と CRY1b、および COP1 によって転写およびポスト翻訳レベルで制御されつつ、緑化を促進すると考えられる。

(ウ) 植物ホルモンを介した OsGLK1 の遺伝子発現や機能の制御

野生型イネカルスにおける *OsGLK1* 遺伝子の発現は 2,4-D により強く阻害されたが、低オーキシンかつ高サイトカイニンの培地、あるいは植物ホルモンを含まない培地では、発現阻害が解除された (図

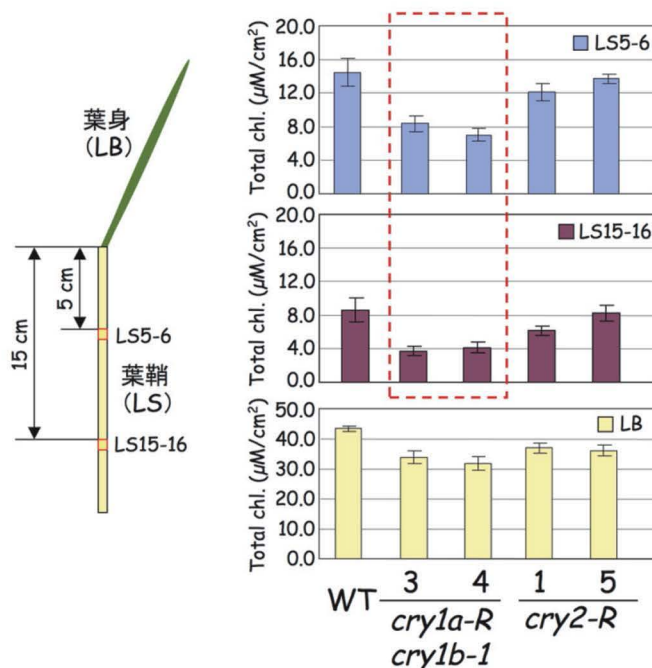


図 132-9 クリプトクロム (*cry*) 発現抑制イネ (播種 2 か月後) のクロロフィル含量

132-10_B)。OsGLK2 でも同様の傾向が見られたが、その発現誘導は *OsGLK1* に比べて低レベルであった。またこれら遺伝子の発現上昇と緑化誘導には相関関係が見られた (図 132-10_A, B)。以上より、2つの *GLK* 遺伝子の転写は、高濃度のオーキシンによって強く抑制される一方、オーキシンの除去あるいはオーキシンに対するサイトカイニンの濃度の増大によって発現が回復し、葉緑体の発達を促していると考えられた。

OsGLK1-OX イネ緑色カルスの内生ホルモン量は、黄白色の野生型イネカルスに比べ、活性型および配糖体型サイトカイニンの内生量が増大し、ABA 量は逆に減少していた [理化学研究所 榊原 均博士ら (課題番号 NVR0004) との共同研究]。

サイトカイニンシグナル伝達因子の一群であるタイプ A レスポンスレギュレーター (ARR) は、シロイヌナズナのサイトカイニン情報伝達系の負の制御因子と考えられている。イネの ARR ファミリーの一員である OsRR5 は 2,4-D によって発現誘導を受け、イネカルスの緑化を阻害した。また酵母 two-hybrid 法の適用により、OsRR5 は OsGLK1 と相互作用し得ることを明らかにした。

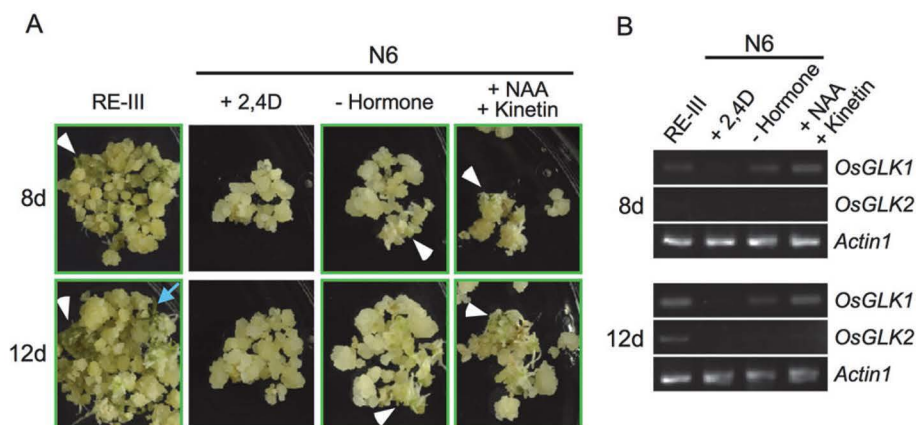


図 132-10 種々のホルモン存在下でのイネカルの緑化と *GLK* 遺伝子の発現
 A) 日本晴種子を N6D 培地に播種し 28℃ で 2 週間培養後、カルスを各種培地に移し、28℃ で培養した。写真のカルスはすべて同じ種子由来のカルス。
 Arrow heads: 緑化したカルス、Arrow: 再分化してきたシュート
 B) A と同じ条件で培養したカルスから全 RNA を抽出し、RT-PCR (28 サイクル) を行った。
 植物ホルモン濃度 2,4-D: 2 mg/L、NAA: 0.02 mg/L、Kinetin: 2 mg/L

(エ) *OsGLK1/2* によって発現が正に制御される遺伝子の機能解析

OsGLK1 と *OsGLK2* は重複した機能を持つことが判明しつつあるが、この重複性が遺伝子発現レベルでも当てはまるか否かを、*OsGLK2-OX* イネ緑色カルスを発現マイクロアレイ解析に供することで検証した。その結果、*OsGLK2-OX* カルスでは野生型カルスに比して 116 種類の遺伝子の発現が有意 (3 倍以上) に上昇しており、うち 85.3% にあたる 99 遺伝子が *OsGLK1-OX* イネカルスで発現上昇していた遺伝子群と共通であった (図 132-11_A)。これら 99 遺伝子のうち 48 種類 (48.5%) が葉緑体機能、すなわち光化学系 I や II、炭素同化、クロロフィル合成、電子伝達に関するものであった (図 132-11_B)。この知見は、*GLK1* と *GLK2* が葉緑体機能に関わる共通の遺伝子群の発現を制御することを示唆する。

上記の *OsGLK1/2* の過剰発現によって発現上昇が起こる 8 種類のイネ推定転写因子のうち、光信号伝達への関与が知られる CCT ドメインを有する CONSTANS 様ファミリーに属す 5 種類に着目して機能解析を行った。5 種類の転写因子を *GLK-Induced CCT domain-containing protein 1* ~ 5 (*GIC1* ~ 5) と名付け、うち 3 種類の cDNA (*GIC1* / -2 / -3) のイネでの過剰発現やキメラリプレッサー発現が、各形質転換系統の培養細胞等にカロテ

ノイドの高蓄積を引き起こすことを見出した [産業技術総合研究所 高木 優博士、光田 展隆博士ら (課題番号 AMR0004)、農業生物資源研究所 市川ら (AMR0001)、花き研究所 大宮 あけみ博士らとの共同研究]。

野生型イネ (日本晴) における 5 種の *GIC* 遺伝子の組織特異的発現特性は、いずれも葉や桿で発現が高く、根やカルスでの発現は極めて低レベルで、*OsGLK1* や *OsGLK2* の発現パターンとよく似ていた (図 132-12)。また、*GIC1* 転写産物は選択的スプライシングを受けること (Splicing variants の存在) が判明した。

GFP との融合タンパク質の細胞内局在性観察により、*GIC1* および *GIC2* はいずれも核に存在することを見出した。*GIC1* が転写因子として機能するか否かを探るため、転写活性化能または転写抑制能の有無を、ルシフェラーゼを用いた一過的アッセイ系により調べたところ、*GIC1* は転写活性化能を有するとの知見を得た。

(オ) *OsGLK1-OX* イネ緑色培養細胞を用いた有用タンパク質生産系

OsGLK1 cDNA 過剰発現イネ緑色培養細胞は、グラナ構造を持つ葉緑体が存在し、光合成能を有するのみならず、光独立栄養性も獲得している (Nakamura ら ⁵⁾、中村ら ⁶⁾)。また、*OsGLK-OX* 液体培養細胞は、明条件下ではショ糖濃度に関わらず、

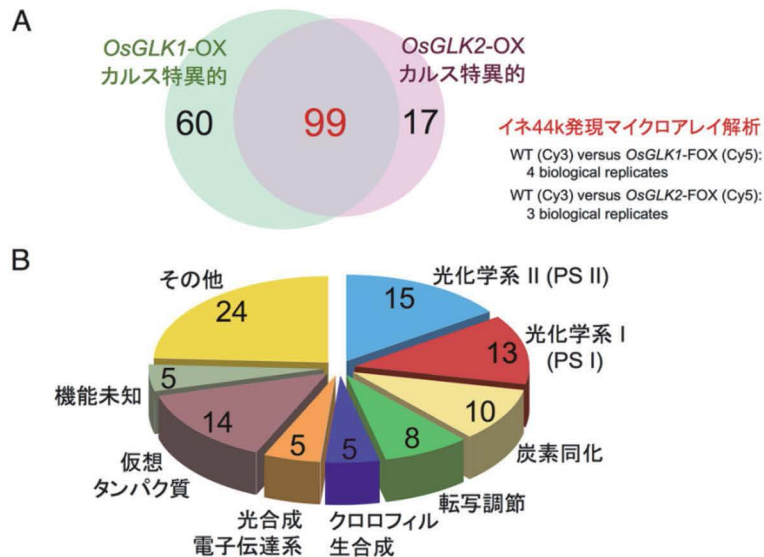


図 132-11 *OsGLK1*-OX および *OsGLK2*-OX イネ緑色カルスで共通に発現上昇する遺伝子群
野生型カルスの遺伝子発現値に対して 3 倍以上の発現上昇を示した遺伝子群を選択して比較した。

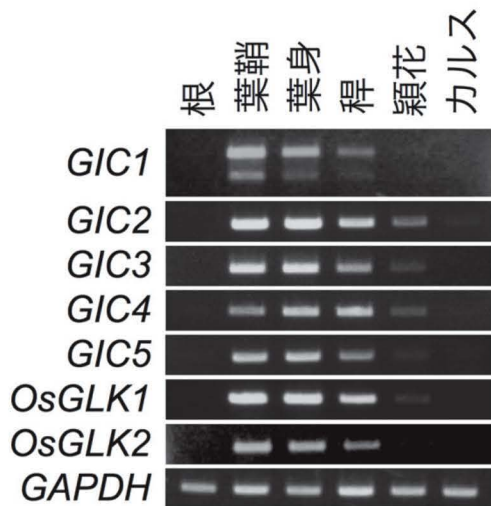


図 132-12 野生型イネにおける *GIC* および *GLK* 遺伝子発現の組織特異性
GAPDH は構成的発現パターンを示す遺伝子として使用。

野生型よりも旺盛な細胞増殖能を示した (図 132-13)。

そこで、アミラーゼ 3D 遺伝子のプロモーターとシグナルペプチド (*OsAmy3D P::SP*) の下流に *sGFP* レポーター遺伝子、インターロイキン 10 (*IL-10*) 等の有用タンパク質の cDNA をつないだ細胞外分泌型融合遺伝子を、野生型イネ培養細胞や *OsGLK1*-OX イネ緑色培養細胞に導入し、各種形質転換体を得た。

まず、*OsAmy3D P::SP::sGFP::T* を導入した

OsGLK1-OX イネ系統の緑色培養細胞は、供試した 3 系統とも遮光下でのシヨ糖飢餓によって液体培地への GFP 分泌量を増加させ、うち 2 系統ではシヨ糖飢餓状態が長くなるにつれ、分泌された総 GFP 量も上昇した (図 132-14)。同様に、*OsAmy3D P::SP::IL-10::His-tag::T* 導入 *OsGLK1*-OX イネ培養細胞を、遮光下でシヨ糖飢餓状態にしたところ、その液体培地中に IL-10 に相当するタンパク質が分泌されていることが判明した。

(カ) 微小金粒子を用いた葉緑体の形質転換

イネ等の葉緑体形質転換効率の向上のため、従来使用されている金粒子 (0.6 μm) よりも微小なサイズの高粒子が葉緑体形質転換に適用可能であることを、モデル植物のタバコを材料として検討した。

葉緑体形質転換ベクター pNtag を塗布した 0.6 μm の金粒子をタバコ葉片に打ち込んだところ、Sp 耐性と GFP 活性を示す再分化個体を得られ、PCR 分析またはサザン解析の結果、それらは葉緑体形質転換体であることが判明した (図 132-15)。その出現頻度はプレートあたり平均 4.8 ± 1.9 個体であった (図 132-16)。次に、0.08 μm 、0.1 μm 、0.2 μm 、および 0.3 μm の 4 種類の微小金粒子を用いた形質転換実験では、それぞれシャーレあたり平均 6.0 ± 3.5 、 7.3 ± 4.0 、 7.3 ± 4.3 および 9.3 ± 4.6 個体の葉緑体形質転換タバコが得られた (図 132-15、16)。何れの微小金粒子を用いた場合も、獲得した形質転

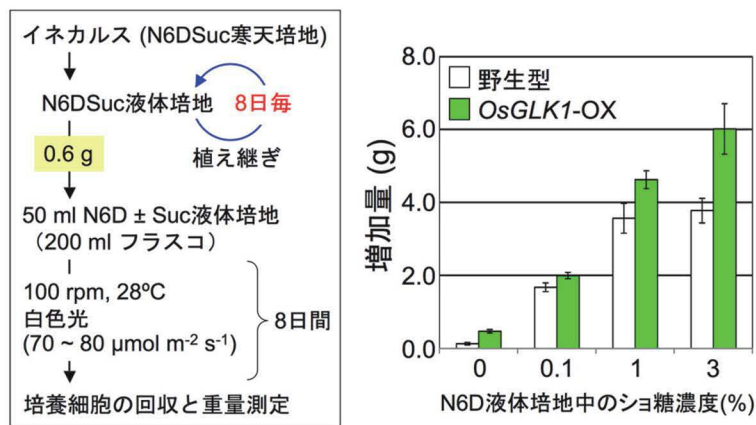


図 132-13 *OsGLK1*-OX イネ培養細胞は光独立栄養性を示し、野生型培養細胞よりも旺盛に増殖する

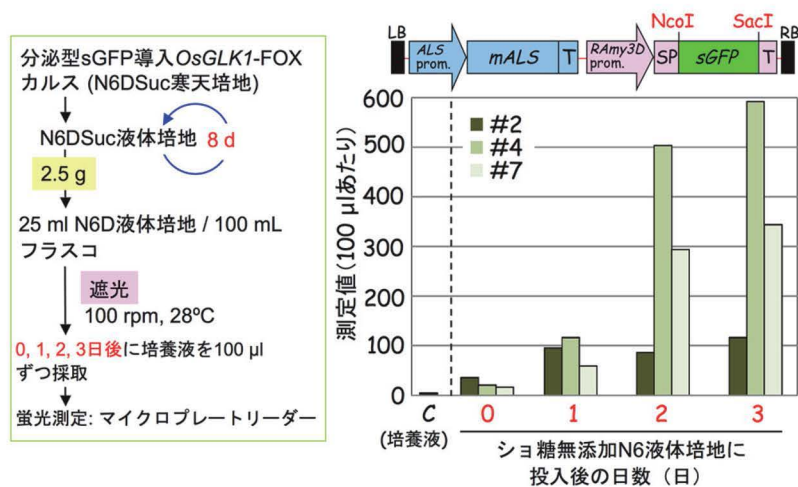


図 132-14 シヨ糖飢餓によって培養液中に分泌された GFP の定量

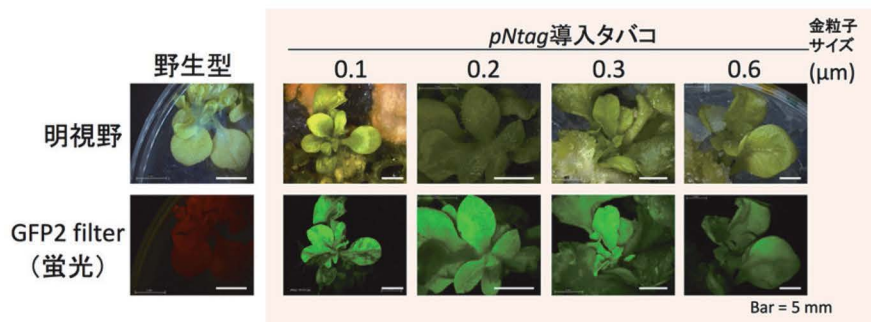
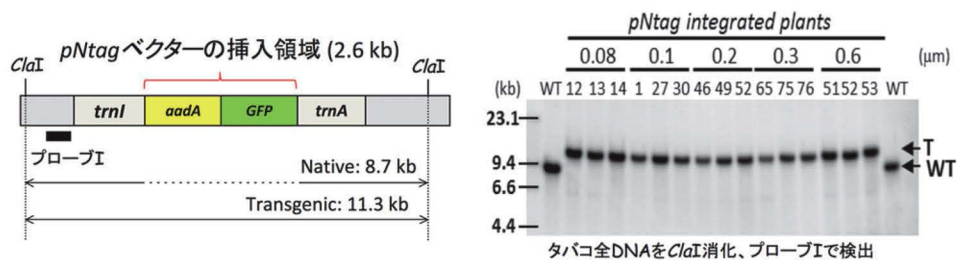


図 132-15 微小金粒子を用いた葉緑体形質転換タバコの作出

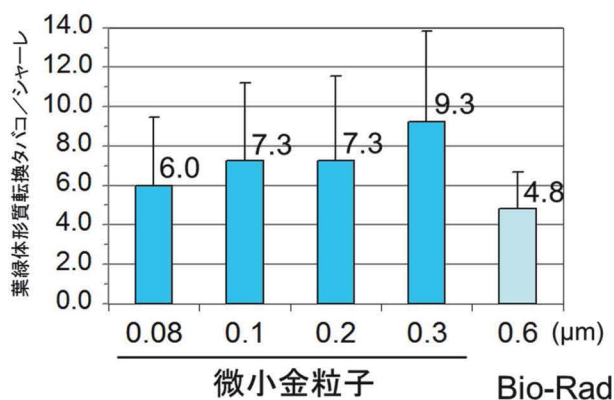


図 132-16 微小金粒子を用いて作出した葉緑体形質転換タバコの出現頻度

換体数の平均値が 0.6 μm の金粒子のそれを上回った。この差異は統計学的に有意とまでは言えないものの、0.08 ~ 0.3 μm の微小金粒子は葉緑体形質転換タバコの獲得効率の向上に寄与した (Okuzaki ら⁸⁾)。

エ 考 察

(ア) *OsGLK1* および *OsGLK2* cDNAs の構成的過剰発現ならびに維管束組織特異的発現の効果

葉緑体分化の正の制御因子 GLK の過剰発現の効果は葉身等の光合成能の向上と直結はしなかったものの、*GLK* 過剰発現 (OX) イネの展開葉身、および稈基部の葉鞘といった部位でクロロフィル量の増加、すなわちイネの枯れ上がりが抑制され、分げつの緑化が長く維持される現象が認められた。一方で、*OsGLK*-OX イネは出穂の遅延、種子の小型化や稔性低下といったマイナス面を示したこと、*GLK* 過剰発現をそのまま分子育種に結び付けるには難があると推察した。

一方、イネの地上部維管束で特異的な発現を示す遺伝子 *74m* のプロモーターに *OsGLK1* cDNA を接続したキメラ遺伝子 (*P74m::OsGLK1*) 導入イネ系統は、出穂は野生型並みで、*OsGLK1*-OX イネよりも半月ほど早かった。また、出穂時の追肥の有無に関わらず、葉の乾燥重は野生型よりも重く、追肥を施すことで穂重は野生型並みかそれ以上になったことから、地上部維管束特異的に *OsGLK1* 遺伝子を発現させることで、過剰発現系で生じる短所を克服し、イネのバイオマスの増大に寄与すると期待される。

(イ) 光質等の環境要因による *OsGLK1* と *OsGLK2* の遺伝子発現や機能の制御

OsGLK1 と *OsGLK2* は共に過剰発現によってイネの培養細胞を緑化する機能を有する点、後述の通り、それぞれの過剰発現によって発現が誘導される遺伝子にも共通のものが多く見出される点、発現部位が共に緑色組織である点などから、両者は機能的に共通性が高いと考えられる。しかし、*OsGLK1* は赤色光と青色光の照射により、明確に転写が誘導されたが、*OsGLK2* では光による発現誘導性は顕著ではなかった。また、*OsGLK1* のアンチセンス転写産物が検出された一方、*OsGLK2* アンチセンス転写産物は検出されないなど、その発現制御には異なる点が多く見出された。従って、植物の生育環境に応じ、両者の転写産物やタンパク質の量は、異なる機構で適切に制御されていると考えられる。

Oscryla-R Oscrylb-1 系統では、葉身のクロロフィル量が野生型に比べて減少していたが、葉鞘のクロロフィルはさらに顕著に減少していた。このことから、クロロフィル生合成に及ぼすクリプトクロムシグナリングの効果 (制御) は、葉身よりも葉鞘で影響が大きいことが示唆された。また、*OsCRY1a* および *1b* は共にイネのクロロフィル蓄積を正に制御する性質を持つことが判明した。イネの *CRY1a* と *CRY1b* は各 C 末端領域を介して *COP1* と直接相互作用し得ることが知られている (Zhang ら⁷⁾)。さらに、シロイヌナズナではクリプトクロムシグナリング系で働く *HY5* 等の転写因子の分解に *COP1* が関与していることが報告されている (Liu ら⁹⁾)。一方、我々は *GLK1* が *COP1* と相互作用することを以前に見出していることから、クリプトクロムが *COP1* を介して *GLK1* タンパク質の安定性に関与することで緑化を制御していると考えられた。

以上より、クリプトクロムは転写レベルだけでなく、タンパク質レベルでも *GLK1* を制御していることが示唆された。

(ウ) *OsGLK1*-OX イネ緑色培養細胞を用いた有用タンパク質生産系

サイトカインの一種であるヒト IL-10 をイネ胚乳に蓄積させる系は、プリベンテック社と農業生物資源研との共同開発による成功例がある。本研究では、同様の有用タンパク質を培養細胞系で効率的に培養液に分泌させる実験系の確立を目指している。イネ

培養細胞系はタバコの系に比べて培地中に分泌されるプロテアーゼの活性が非常に低いことが知られていること (Shin ら¹⁰⁾)、*OsGLK1*-OX イネ緑色培養細胞は野生型イネ培養細胞よりも増殖能が高いことから、*OsGLK1*-OX 培養細胞は有用タンパク質の分泌生産に適した実験材料の一つと考え、研究を進めた。

(エ) 微小金粒子を用いた葉緑体の形質転換

タバコ葉緑体の形質転換に用いた微小金粒子は、従来用いられてきた 0.6 μm の金粒子と少なくとも同等以上のレベルで、効率的な葉緑体形質転換を可能にすることが明らかになった。そのため、比較的小型 (約 1.5 μm) のプロプラスチドを有するイネ培養細胞を材料とした実験系では、0.6 μm の市販金粒子と比べ、微小金粒子の使用がより有利であると期待される。

オ 今後の課題

(ア) 地上部維管束特異的発現プロモーター *P74m::OsGLK1* 導入イネ系統の T2 世代を用いた栽培試験を研究期間内に終わられなかった。従って 2013 年度も試験を継続して実施することで、T1 世代で行った試験の結果 (図 132-4) が T2 世代でも再現されるか否かを見極めたい。それにより、*P74m::OsGLK1* 形質転換イネが窒素源等の肥料の有効利用やバイオマスの増産という視点で利用価値があるかどうかを、今後さらに検討する必要がある。

(イ) *OsGLK1* 発現の光環境や植物ホルモンによる制御機構の解析を、転写、転写後調節 (アンチセンス鎖の出現)、ポスト翻訳 (タンパク質の安定性) といった視点で進めてきたが、全体像の解明にはまだまだ道半ばの状態にあると感じる。これまでに得た成果を整理し直し、その一部を原著論文にまとめつつ、植物の生命 (生産) 活動に必須の葉緑体の構築の分子機構に迫る努力を継続する必要がある。

(ウ) *OsGLK1/2* によって発現が正に制御される遺伝子として、5 種の CONSTANS 様ファミリーの転写因子 GIC の機能解析に注目している。本研究期間の後半にこれら因子の分子特性の理解、およびその利用に係る研究について精力的に進めたが、未完成な状態である。今後も機能解析十分な検討を継続し、特許出願や原著論文の投稿に向けて努力して参りたい。

(エ) *OsGLK1*-OX 培養細胞による有用タンパク質分泌系がおおむね確立されたと判断出来た時点で、胚乳蓄積系との間で抽出されるタンパク質の量と質 (生物学的活性)、タンパク質の精製にかかる時間やコスト等を比較することで、我々のタンパク質生産系の良し悪しを判断する必要がある。

(オ) 発達した葉緑体を有する *OsGLK1*-OX イネ緑色培養細胞に対し、微小金粒子を介した遺伝子導入法の適用により、イネ葉緑体への遺伝子導入効率を向上させることができれば、イネの生産力向上を目的とした葉緑体機能の改変を行うための有用基盤技術になると期待される。

力 要 約

(ア) イネに存在する 2 種の Golden2-like (GLK) 転写因子 *OsGLK1/2* は、それら遺伝子が発現した細胞で葉緑体の分化を誘導する。オーキシンは *OsGLK1/2* 遺伝子の転写を強く抑制し、葉緑体の分化を阻害した。一方、サイトカイニンを追加することで *OsGLK1/2* の転写が活性化され、緑化が誘導された。赤色光と青色光は *OsGLK2* の転写をわずかに誘導するに過ぎなかったが、*OsGLK1* の転写を顕著に誘導したことから、後者の転写は赤色光受容体フィトクローム (PHY) と青色光受容体クリプトクロム (CRY) の制御下にあることが示唆された。イネには 3 種類の CRY (*OsCRY1a*、*OsCRY1b*、*OsCRY2*) があり、*OsCRY1a/1b* の 2 種の遺伝子発現を同時に抑制すると *OsGLK1* の発現レベルは顕著に低下したことから、青色光による *OsGLK1* の発現は *OsCRY1a* と *OsCRY1b* が関与することを見出した。

(イ) *OsGLK1* 転写産物の蓄積が進むにつれ、そのアンチセンス差が出現した。このような現象は *OsGLK2* では見られなかった。また、GLK1 タンパク質は、光形態形成の抑制因子で E3 ユビキチンリガーゼとして機能する COP1 と相互作用し、暗所でプロテアソーム系を介して積極的に分解された。これらの知見は、*OsGLK1* の転写産物やタンパク質の量が、植物の光環境や細胞のホルモン濃度によって多段階で巧みに調節されていることを示す。

(ウ) *OsGLK1/2* 過剰発現条件下で共通して発現が上昇した 8 種類の転写因子のうち、5 種類が CONSTANS 様ファミリーに属することを見出し、

GIC1～5と名付けた。これらのうち3種にはカロテノイドを高蓄積する機能があるなど、興味深い知見を得た。

(エ) イネでの *OsGLK1* 過剰発現の効果は光合成能の向上と直結はしなかったものの、*GLK* 過剰発現 (OX) イネの展開葉身、および稈基部の葉鞘といった部位でクロロフィル量の増加、すなわちイネの枯れ上がりが抑制され、分けつの緑化が長期間維持された。一方で、*OsGLK-OX* イネには出穂の遅延、種子の小型化や稈性低下といったマイナス面が見られ、*GLK* の過剰発現をそのまま育種に結び付けることには無理があると考えられた。そこで、イネの地上部維管束で特異的な発現を示す遺伝子 *74m* のプロモーターに *OsGLK1* cDNA を接続したキメラ遺伝子 (*P74m::OsGLK1*) をイネに導入した。*P74m::OsGLK1* イネの出穂は野生型並みで、*OsGLK1-ox* イネよりも半月ほど早かった。また、出穂時の追肥の有無に関わらず、葉の重量は野生型よりも高く、追肥を施すことで穂重は野生型と同等以上になったことから、地上部維管束特異的な *OsGLK1* 発現系は、同過剰発現系で生じる短所を克服し、イネのバイオマス増への寄与が期待された。

(オ) *OsGLK1-OX* イネ緑色培養細胞は光独立栄養性を示し、黄白色の野生型イネ培養よりも旺盛に増殖した。そこで、*OsGLK1-OX* イネ培養細胞を有用タンパク質の生産工場ととらえ、糖飢餓で発現が誘導され、シグナルペプチドによって培地中にタンパク質を分泌可能なイネアミラーゼ *3D* 遺伝子のプロモーター+シグナルペプチド配列に GFP レポーターやインターロイキン 10 (IL-10) をコードする遺伝子を融合し、*OsGLK1-OX* イネに導入した。得られた形質転換イネ培養細胞を糖飢餓状態にさらしたところ、液体培地に GFP や IL-10 が分泌されていることが判明した。

(カ) 汎用されている金粒子 (0.6 μm) よりも微小なサイズ of 金粒子が葉緑体形質転換に適用可能であるかを、タバコを材料に試験したところ、平均サイズが 0.08、0.1、0.2 および 0.3 μm の4種類の微小金粒子を用いた実験区では、市販金粒子 (0.6 μm) 区に比べ、平均獲得形質転換体数が向上した。0.08～0.3 μm の微小金粒子はより小型の色素体を有するイネの実験系にも効果を発揮することが期待される。

キ 引用文献

- 1) Waters, M.T. and Langdale, J.A. (2009). The making of a chloroplast. *EMBO J.* 28 : 2861-2873.
- 2) Hirose, F., Shinomura, T., Tanabata, T., Shimada, H. and Takano, M. (2006). Involvement of rice cryptochromes in de-etiolation responses and flowering. *Plant Cell Physiol.* 47 : 915-925.
- 3) Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents : Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 975 : 384-394.
- 4) Okuzaki, A. and Tabei, Y. (2012). Improvement of the plastid transformation protocol by modifying tissue treatment at pre- and post-bombardment in tobacco. *Plant Biotechnol.* 29 : 307-310.
- 5) Nakamura H, Muramatsu M, Hakata M, Ueno O, Nagamura Y, Hirochika H, Takano M, Ichikawa H. (2009). Ectopic overexpression of the transcription factor *OsGLK1* induces chloroplast development in non-green rice cells. *Plant Cell Physiol.* 50 : 1933-1949.
- 6) 中村英光・村松昌幸・市川裕章 (2010). 葉緑体分化の鍵転写因子 *GLK* の発見 たった1つの転写因子の過剰発現がイネのカルスを黄白色から緑色に変える. *化学と生物*. 48 : 370-372.
- 7) Zhang, Y.C., Gong, S.F., Li, Q.H., Sang, Y. and Yang, H.Q. (2006). Functional and signaling mechanism analysis of rice *CRYPTOCHROME 1*. *Plant J.* 46 : 971-983.
- 8) Okuzaki, A., Kida, S., Watanabe, J., Hirasawa, I. and Tabei, Y. (2013). Efficient plastid transformation in tobacco using small gold particles (0.07-0.3 μm). *Plant Biotechnol.* 30 : 65-72.
- 9) Liu, B., Zuo Z., Liu, H., Liu, X. and Lin, C. (2011). *Arabidopsis* cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes Dev.* 25 : 1029-1034.

10) Shin, Y.J., Hong, S.Y. Kwon, T.H., Jang, Y.S. and Yang, M.S. (2003). High level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell

suspension culture. Biotechnol. Bioeng. 82 : 778-783.

研究担当者（市川裕章*）

第4章 光信号伝達系の遺伝子ネットワーク解明

1 イネの伸長を制御する光受容体フィトクロムの信号伝達経路に関わる新規遺伝子の単離・解析ネットワークの解明 (GPN0005)

ア 研究目的

フィトクロムは植物の主要な光受容体であり、発芽、芽生えの緑化、避陰反応、頂芽優勢、花成など、多岐に渡る生理現象を制御し、その多くが農作物の収量増加に向けた形質改善の重要なターゲットとなり得る。本研究では、フィトクロムの制御下にある様々な重要形質を自由に改変する技術開発の基礎を築くことを目的として、イネに存在する3つのフィトクロム分子種、フィトクロムA～Cのなかでも、最も主要な働きを担うフィトクロムBについて、シロイヌナズナを用いた解析からの知見を活かし、イネにおけるそのシグナル伝達機構を解明することで、イネにおいてフィトクロムBの制御下にある新たな有用形質や有用遺伝子を同定することを目指す。具体的には、イネにおいてフィトクロムによる選択的スプライシング制御が存在することを確認し、その標的遺伝子を同定することを目的とする。

イ 研究方法

(ア) TILLING法を用いた逆遺伝学的解析

TILLING法とは、1～数bpの塩基置換もしくは欠損による変異体を、逆遺伝学的にPCRベースで容易に単離する手法である。シロイヌナズナの研究で同定された遺伝子の情報を利用して、そのイネオーソログの点変異体を、TILLING法を用いて、MNU変異原処理系統プールの中から単離した。

(イ) 次世代シーケンサーを用いたmRNA-seqによるフィトクロムBの選択的スプライシング制御の標的遺伝子の網羅的解析

次世代シーケンサーIllumina Genome Analyzer IIを用いてmRNA-seq解析を行い、フィトクロムBのシグナルによって選択的スプライシングパターンの変化する遺伝子を、シロイヌナズナにおいて網羅的に解析した。

(ウ) フィトクロムBの選択的スプライシング制

御のイネにおける標的遺伝子の解析

シロイヌナズナにおいて同定されたフィトクロムBによる選択的スプライシング制御の標的遺伝子について、そのイネオーソログ遺伝子が、イネにおいても同様にフィトクロムBによる選択的スプライシング制御を受けるか否かを、RT-PCR解析により調べた。

ウ 研究結果

(ア) TILLING法を用いた逆遺伝学的解析

シロイヌナズナを用いた変異体スクリーニングによる順遺伝学的解析により、フィトクロムB経路特異的にはたらくポジティブレギュレーターとして、選択的スプライシングに働く新奇SR蛋白質、RRC1を同定した¹⁾。そのイネオーソログであるOsRRC1の変異体イネを、様々な栽培品種背景で作製されたMNU変異原処理系統のプールから、TILLING法により逆遺伝学的に多系統単離した。その結果、「金南風」背景のM2約400系統からは、V551I、D555N、S598FおよびR650Kのアミノ酸置換をそれぞれ起こすミスセンス変異系統が4系統、「台中65号」背景のM2約400系統からは、P151L、V284I、V432I、E585K、S589N、G590DおよびG648Sのアミノ酸置換を引き起こすミスセンス変異系統が7系統、「日本晴」背景のM1約1900系統からは、G24D、E98K、E126K、A304V、A455V、G487D、A516T、V551I、G605R、S708FおよびD796Nのアミノ酸置換を引き起こすミスセンス変異系統が11系統、合計で22系統のミスセンス変異体が得られた。また、「日本晴」背景のM1系統からは、R787が終止コドンとなるナンセンス変異系統が1系統得られた。

そしてこれらの光応答表現型を観察したところ、22系統のミスセンス変異体はいずれも表現型を示さなかった。一方、1系統のナンセンス変異体は、基本的に幼苗の段階で生育が止まってしまうという、顕著な発生異常を示した。また、OsRRC1に関するT-DNAノックアウトイネ系統を韓国から取り寄せ、解析したが、そのホモ系統は致死であり、ま

たヘテロ系統は表現型を示さないことが判明した。

さらに、OsRRC1 のナンセンス変異体において、スプライシング異常のマーカー遺伝子である複数のイネ SR 蛋白質遺伝子の選択的スプライシングパターンを調べたところ、いずれの遺伝子についても野生株と比べてパターンの異常が観察された。

(イ) 次世代シーケンサーを用いた mRNA-seq によるフィトクロム B の選択的スプライシング制御の標的遺伝子の網羅的解析

シロイヌナズナを用いて RRC1 の解析を進めた結果、フィトクロム B が RRC1 を介して選択的スプライシング制御に働くことを示唆するデータが得られた¹⁾。そこで、その可能性を調べるために、次世代シーケンサーを用いて mRNA-seq 解析を行った。その結果、シロイヌナズナにおいてフィトクロム B が、転写制御とは異なる標的遺伝子に対して、赤色光依存的に選択的スプライシング制御に働くことが明らかになった。さらに、フィトクロムによる選択的スプライシングの制御様式を解析するために、フィトクロム A とフィトクロム B の一重変異体と二重変異体を用いて、まず、黄化芽生えを連続赤色光条件に移した後の、標的遺伝子のスプライシングパターン変化を経時的に追った。その結果、フィトクロム A とフィトクロム B が重複して選択的スプライシング制御に働くこと、また連続赤色光の照射時間の経過に伴い標的遺伝子のスプライシングパターンの変化量も増加していくことなどが明らかとなった。さらに、様々な光強度の連続赤色光条件において同様の実験を行った結果、赤色光の照射量に応じて、標的遺伝子のスプライシングパターンの変化量がフィトクロム依存的に増加することが確かめられた。

(ウ) フィトクロム B の選択的スプライシング制御のイネにおける標的遺伝子の解析

シロイヌナズナにおいて同定されたフィトクロム B による選択的スプライシング制御の標的遺伝子の幾つかについて、そのイネオーソログがイネにおいて同様の制御を受けるかどうか、RT-PCR 解析によって調べた。しかしその結果、いずれもイネではフィトクロムによる選択的スプライシング制御を受けていないことが明らかとなった。

エ 考 察

(ア) TILLING 法を用いた逆遺伝学的解析

シロイヌナズナにおいても、RRC1 の機能を完全に失ったノックアウト系統は基本的に雌性配偶体性致死を示し、まれに生じるホモ個体も顕著な発生異常を示すことが分かっている。したがって、今回、OsRRC1 のナンセンス変異イネ系統や T-DNA ノックアウトイネ系統で観察された顕著な発生異常や致死表現型は、OsRRC1 がイネにおいても通常の発生に不可欠であることを示し、シロイヌナズナの RRC1 と同様の機能を担うことを示唆するものだと考えられる。また、ナンセンス変異イネ系統におけるマーカー遺伝子のスプライシング異常は、OsRRC1 がイネにおいてもスプライシング制御に関わることを示すものである。

(イ) 次世代シーケンサーを用いた mRNA-seq によるフィトクロム B の選択的スプライシング制御の標的遺伝子の網羅的解析

これまで、強光ストレスにより選択的スプライシングパターンが変化するという報告はあったが、フィトクロム B の光シグナルにより選択的スプライシングが制御されるという報告は無く、本研究により、フィトクロムの光シグナル伝達における全く新奇な制御機構が、世界に先駆けて明らかにされた。

(ウ) フィトクロム B の選択的スプライシング制御のイネにおける標的遺伝子の解析

フィトクロムは調べられている限り全ての高等植物に存在し、そのシグナル伝達機構は種を超えて高度に保存されていると考えられるため、イネにおいてもフィトクロムによる選択的スプライシング制御は存在するものと考えられる。イネにおいて RRC1 のオーソログである OsRRC1 が RRC1 と同様の機能を担うことが示されたことは、上記の内容を支持するものである。したがって本研究の結果は、イネにおけるフィトクロムの選択的スプライシング制御の標的遺伝子が、シロイヌナズナにおけるそれとは大きく異なることを示唆する。

オ 今後の課題

(ア) TILLING 法を用いた逆遺伝学的解析

シロイヌナズナでは、RRC1 蛋白質の C 末端に存在する RS ドメインが欠損することにより、フィトクロム B 経路特異的な光応答異常が引き起こされ

ることが示されている²⁾。本研究では、自前で立ち上げた TILLING の系で OsRRC1 に関して数多くの点変異体を単離することに成功し、しかもその中の 1 系統は、ちょうど RS ドメインに相当する C 末端部分が欠損すると考えられるナンセンス変異体であったが、その系統において光応答特異的な異常は観察されなかった。今後その点を検証するために、相同組換えによる遺伝子ターゲティング技術を用いて、RS ドメインを欠損した変異型 OsRRC1 を発現する遺伝子を、イネ野生株に knock-in した形質転換イネ系統を作製し、光応答を解析する必要があるだろう。

(イ) 次世代シーケンサーを用いた mRNA-seq によるフィトクロム B の選択的スプライシング制御の標的遺伝子の網羅的解析

本研究により、フィトクロムが RRC1 を介して赤色光依存的に選択的スプライシング制御を行うことは示されたが、どのような分子機構により、フィトクロムシグナルが RRC1 に入力されるのか、また、フィトクロムはなぜ転写制御に加えて選択的スプライシング制御を行うのか、その生理学的意義については、現時点で不明である。今後はこれら 2 点の解明が待たれる。

(ウ) フィトクロム B の選択的スプライシング制御のイネにおける標的遺伝子の解析

イネにおけるフィトクロム B の選択的スプライシング制御の標的遺伝子は、シロイヌナズナとのアナロジーからは同定できないことが強く示唆されたため、今後は、イネのサンプルを用いて mRNA-seq を行うことで、イネにおけるフィトクロム B の選択的スプライシング制御の標的遺伝子を網羅的に解析する必要があると考えられる。そして、これらのデータを解析し、フィトクロム B による選択的スプライシング制御が、シロイヌナズナだけではなくイネにおいても保存された現象であることを確かめた上で、シロイヌナズナでの標的遺伝子と比較することで、フィトクロム B による選択的スプライシング制御に関する、高等植物に普遍的な共通原理を抽出できるのではないかと考えられる。同時に、

両種それぞれに特有の標的遺伝子群を同定・解析することにより、単子葉植物と双子葉植物における光応答の違いの一端を、これまでに無い全く新たな切り口により明らかにできるのではないかと考えられる。

カ 要 約

(ア) TILLING 法を用いた逆遺伝学的解析

Cell 酵素の精製も含め、自前で立ち上げた TILLING の系を用いて、RRC1 のイネオーソログである OsRRC1 の点変異体を、多数単離することに成功した。そして、それらを用いた解析を行った結果、イネにおいて OsRRC1 が、シロイヌナズナの RRC1 と同様の働きを担っていることが示唆された。

(イ) 次世代シーケンサーを用いた mRNA-seq によるフィトクロム B の選択的スプライシング制御の標的遺伝子の網羅的解析

世界で初めて、フィトクロムによる選択的スプライシング制御を発見した。

(ウ) フィトクロム B の選択的スプライシング制御のイネにおける標的遺伝子の解析

植物種によって、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の標的遺伝子が異なることを明らかにした。

キ 引用文献

- 1) Shikata, H., Shibata, M., Ushijima, T., Nakashima, M., Kong, S.G., Matsuoka, K., Lin, C. and Matsushita, T. (2012). The RS domain of Arabidopsis splicing factor RRC1 is required for phytochrome B signal transduction. *Plant J.* 70 : 727-738.
- 2) Shikata, H., Nakashima, M., Matsuoka, K. and Matsushita, T. (2012). Deletion of the RS domain of RRC1 impairs phytochrome B signaling in Arabidopsis. *Plant Signal Behav.* 7 : 933-936.

研究担当者 (松下智直*)

第5章 光合成の遺伝子ネットワーク解明

1 イネ葉緑体内のレドックス状態と炭素代謝の最適化 (GPN0006)

ア 研究目的

至適生育条件下においても、光合成は常に最大効率で行われるのではなく、細胞内の代謝バランスに応じて光合成効率は変動する。葉緑体内においても、光合成炭酸固定と光呼吸、窒素同化は互いに拮抗的な関係にあり、これらの反応バランスによって炭酸固定効率は変動する。本研究では、光合成の制御要因のひとつである葉緑体ストロマのレドックス状態の調節機構を明らかにするとともに、還元力排出能を増強することにより、レドックス状態と光合成を含む炭素代謝を最適化する方策を探る。葉緑体からの還元力の排出に関与すると予想されるイネ特有の酵素、葉緑体型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC; Osppc4) に着目して解析を行う。

イ 研究方法

(ア) 材料

イネ (日本晴) を材料として用いた。土耕栽培の場合は、無肥料培土に元肥として化成肥料 ($N:P_2O_5:K_2O = 1:1:1$) を添加し、1/5000a ワグネルポットで、湛水条件、ガラス温室で育成した。水耕栽培の場合は、硝安を窒素源として発芽芽生えを水耕栽培し、第4葉展開時にアンモニア (NH_4Cl)

あるいは硝酸 (KNO_3) を窒素源として含む水耕液に移植し、ガラス温室で育成した。

(イ) メタボローム解析

液体窒素で凍結した葉身サンプルよりクロロホルム・メタノール水溶液 ($CHCl_3:MeOH:H_2O = 2:6:2, v/v/v$) で代謝中間体を抽出し、GC-TOF/MS (ガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析計) で代謝物を網羅的に解析した。

(ウ) 光合成特性の解析

ポータブル光合成蒸散測定装置 (LI-6400, Li-Cor) を用いたガス交換法により炭酸固定特性を、変調型クロロフィル蛍光測定装置 (PAM2100, Walz) により葉身のクロロフィル蛍光を測定した。

ウ 研究結果

(ア) イネ属特有の酵素、葉緑体型 PEPC¹⁾

PEPC は、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) と炭酸水素イオン (HCO_3^-) からオキサロ酢酸 (OAA) と無機リン酸 (Pi) を生成する反応を触媒する酵素で、細菌、緑藻、高等植物に広く存在する。植物では C_4 光合成と CAM 型光合成の初期炭酸固定酵素としての機能がよく知られているが、PEPC はほぼすべての植物細胞に存在し、TCA 回路に基質を補充する機能 (アナプレロティック機能) を担っている。PEPC は長らく細胞質局在性とされていたが、イネは、細胞質型に加え、葉緑体に局在する PEPC (Osppc4) をもつことを見いだした (図 151-1)。本酵素は緑葉・葉肉細胞で高発現しており、イネ緑葉の全 PEPC 活性の約 1/3 が葉緑体型である。これまでのところ、活性型酵素をコードする葉緑体型 PEPC 遺伝子の存在が確認できたのは、栽培イネ、野生イネを含むイネ属のみである。

Osppc4 発現抑制イネは、アンモニア (NH_4^+) を窒素源として育成すると顕著な生育阻害を示すが、窒素源が硝酸 (NO_3^-) の場合、生育阻害は認められなかった (図 151-2)。イネ属の植物は水田のような湛水環境に適応していること、湛水環境では土壌中の無機窒素がアンモニアに還元されることから、葉緑体型 PEPC はアンモニアを主要窒素源とする生

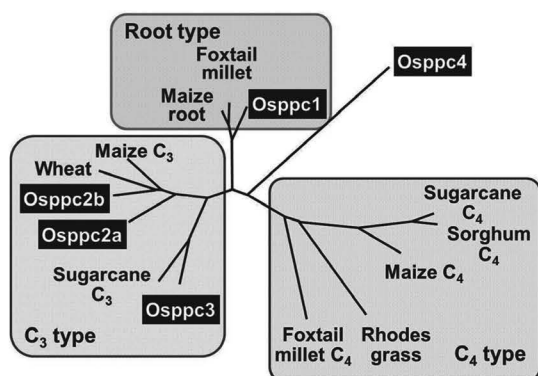


図 151-1 イネ科植物の植物型 PEPC の系統図

既知の植物型 PEPC はすべて細胞質型であり、 C_3 型、 C_4 型、根型に大別される。イネの葉緑体型 PEPC (Osppc4) はこれらのグループには属さない。Osppc1、2a、2b、3 はイネの細胞質型 PEPC。

育環境に適応するための酵素であることが明らかにされた。

(イ) イネ緑葉のアムモニア同化における Osppc4 の役割¹⁾

アムモニアを窒素源として水耕栽培したイネ葉身のメタボローム解析を行った[理研PSC・メタボローム解析研究チーム（現、理研CSRS・統合メタボロミクス研究グループ）との共同研究；図151-3]。

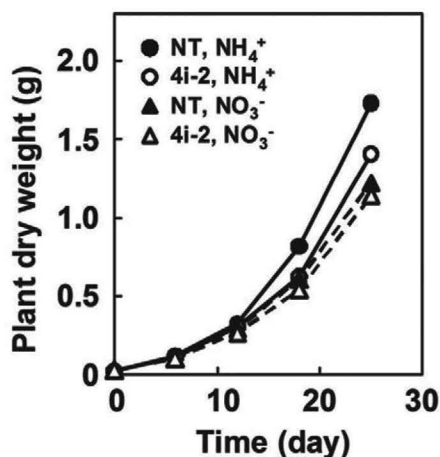


図 151-2 生育に対する Osppc4 発現抑制の効果
非形質転換イネ (NT) と Osppc4 発現抑制イネ (4i-2) を、アムモニアあるいは硝酸を窒素源として水耕栽培した。横軸は窒素処理開始後の日数を、縦軸は植物体の乾物重を示す。

Osppc4 の発現抑制で、リンゴ酸 (malate) からイソクエン酸 (isocitrate) にいたる一連の有機酸含量が低下し、2-オキソグルタル酸 (2-OG) の供給経路が選択的に抑制されること、その結果、2-OG を基質として利用する窒素同化系酵素 GOGAT (グルタミン酸合成酵素) の反応が抑制されることがわかった。また、光呼吸経路の中間体 (glycerate, Gly, Ser) も発現抑制で増大することがわかった。

一般的に、窒素同化・アミノ酸合成の炭素骨格として使われる有機酸は、光合成産物から解糖系と TCA 回路を経て合成されるとされており、細胞質局在性の PEPC が重要な役割を担うと考えられている。Osppc4 発現抑制イネの解析から、解糖系に加え、イネは Osppc4 が関与する独自の炭素骨格供給系をもつこと (図 151-4)、この経路がアムモニアを主要窒素源とする生育環境では主要な炭素骨格供給系として機能することが明らかにされた。これはまた、植物の一次代謝の多様性を示す初めての知見でもある。

リコンビナントタンパク質の酵素特性を調べ、窒素同化とアミノ酸合成が活発な場所で Osppc4 が機能しうるのか検討した。Osppc4 は、基質であるホスホエノールピルビン酸 (PEP) に対する親和性と拮抗阻害剤であるリンゴ酸 (malate) に対する感受

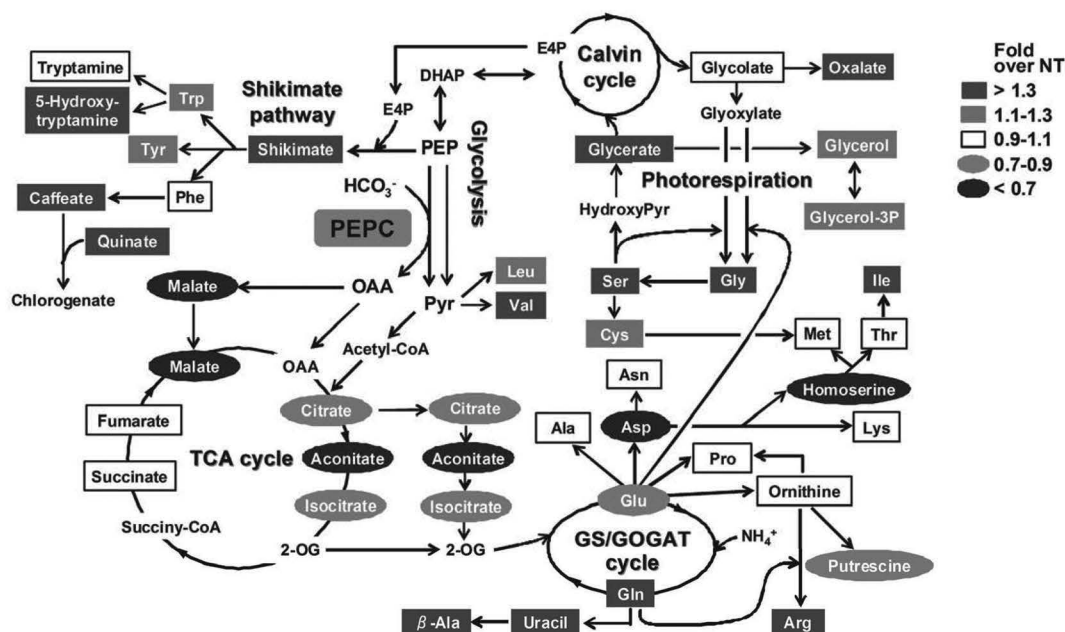


図 151-3 葉身の代謝に対する Osppc4 発現抑制の効果

1 mM NH₄⁺ で水耕栽培したイネの最上位最大展開葉 (第 10 葉) 葉身を正午に採取し、GC-TOF/MS で代謝中間体を網羅的に解析した。枠内は同定・定量できた中間体、四角で囲ったものは発現抑制で増加した中間体、楕円で囲ったものは発現抑制で減少した中間体を示す。

性が低いという C₄ 型 PEPC に似た特徴を示す（表 151-5）。窒素同化とアミノ酸合成の初期産物であるグルタミン酸（Glu）とアスパラギン酸（Asp）は PEPC の一般的な阻害剤であるが、イネの細胞質型 PEPC（Osppc1 と Osppc2a；それぞれ、根と葉身の主要 PEPC）に比べ、Osppc4 は Glu と Asp に対する感受性がかなり低いこと、すなわち、Glu と Asp で阻害されにくいことがわかった。この結果は、Osppc4 は窒素同化・アミノ酸合成が活発な環境、具体的には、GS/GOGAT が活発にアンモニアを同化している葉緑体内で機能しうること示している。

（ウ）光合成における Osppc4 の機能

a 光合成・光呼吸における機能の解析

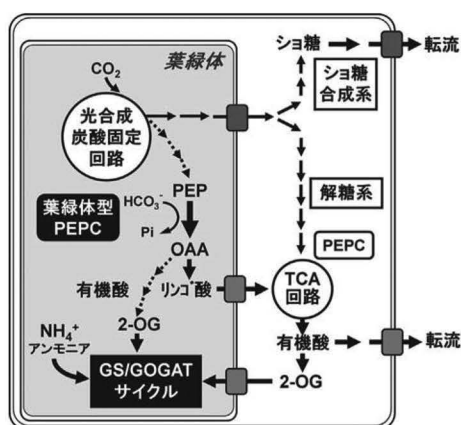


図 151-4 イネ緑葉・葉肉細胞の一次代謝経路

GS/GOGAT サイクル、窒素同化系；GS，グルタミン合成酵素；GOGAT，グルタミン酸合成酵素；OAA，オキサロ酢酸；2-OG，2-オキシグルタル酸；PEP，ホスホエノールピルビン酸；Pi，リン酸。

Osppc4 の発現を抑制しても、光合成速度（炭酸固定速度）はまったく変化しなかった。すなわち、非形質転換イネと発現抑制イネとで、最大光合成速度、光合成の CO₂ 濃度依存性および光強度依存性に差異は認められなかった。また、光呼吸が抑制される低酸素条件（2% O₂）でも光合成の CO₂ 濃度依存性は変わらなかった。このことは、光呼吸速度（CO₂ 放出速度）にほとんど差がないことを示している。

光呼吸は、光合成初期炭酸固定酵素 Rubisco が酸素と反応して生成した 2-ホスホグリコール酸を代謝する経路である。葉緑体内の窒素同化系（GS/GOGAT サイクル）も本経路に含まれ、ミトコンドリア内で生成したアンモニアを葉緑体内で同化する。Osppc4 を経由して合成される有機酸が光呼吸にとまなう窒素同化に利用されるのか検討した。

イネ葉身を異なる CO₂ 濃度で処理するシステムを作製し、葉身に通気する CO₂ 濃度を変え、光呼吸速度を変えたとき、アンモニア同化とアミノ酸合成がどのように変化するか調べた。炭酸固定速度は、すべての CO₂ 濃度（190, 370, 760 ppm）で、非形質転換イネと Osppc4 発現抑制イネとで差は認められなかった。蒸散速度にも差は認められず、Osppc4 の発現を抑制しても CO₂ 濃度に対する気孔の応答はほとんど変わらないことがわかった。PEPC の反応産物であるオキサロ酢酸は緑葉では速やかにリンゴ酸に変換される。葉身のリンゴ酸含量は、光呼吸がほとんど抑制される高 CO₂ 濃度（760 ppm）では差は認められなかったが、光呼吸が促進される低

表 151-5 イネ PEPC リコンビナントタンパク質の酵素特性

Protein	$V_{\max}$ (unit mg ⁻¹)		K_m (PEP) (mM)		I_{50} (malate) at pH 7.3 (mM)	Inhibition / activation at pH 7.3 (fold)		
	pH 7.3	pH 8.0	pH 7.3	pH 8.0		Asp	Glu	Glu6P
Osppc1	32.1	36.9	0.13	0.04	0.01	0.11	0.08	1.0
Osppc2a	16.9	21.0	0.16	0.04	0.06	0.07	0.07	2.51
Osppc4	18.0	19.1	2.00	1.03	0.7	0.86	0.71	1.17
Maize root type*	21.8	28.3	0.05	0.04	0.24	----	----	1.08
Maize C ₄ type*	18.2	23.0	1.48	0.59	0.82	----	----	2.44

全コード領域を含む細胞質型 PEPC（Osppc1, Osppc2a）リコンビナントタンパク質、トランジットペプチド領域を除いた葉緑体型 PEPC（Osppc4）リコンビナントタンパク質を作製し、PEPC 活性を測定した。拮抗阻害剤リンゴ酸に対する I_{50} および各種代謝エフェクターの効果は、それぞれの K_m (PEP) 値の 2 倍の PEP 濃度で測定した。アスパラギン酸（Asp）、グルタミン酸（Glu）、グルコース 6-リン酸（Glu6P）濃度はそれぞれ、5, 5, 10 mM。

* Dong et al. (1998) Plant Cell Physiol. 39 : 865-873.

CO₂ 濃度 (190 ppm) では発現抑制で大きく低下した。同様に、葉身からのアンモニア揮散速度も低 CO₂ 濃度で大きく異なり、発現抑制で増大した。これらの結果は、Osppc4 の発現を抑制すると光呼吸経路で生成したアンモニアが同化されず気孔から放出されること、すなわち、Osppc4 が光呼吸にともなう窒素同化においても有機酸供給系として機能することを示している。この結果はまた、Osppc4 が光合成、光呼吸が活発な光照射下で機能することを示している。

b 葉緑体の還元力排出系としての機能

窒素同化のための有機酸供給以外の Osppc4 の機能として、葉緑体の還元力排出系としての役割が考えられる。すなわち、GS/GOGAT サイクルの基質はアンモニアであり、窒素源として硝酸を利用するためにはまず硝酸をアンモニアに還元する必要がある。この還元には 8 電子等量 (葉緑体内で 6 電子等量) の還元力が必要である。アンモニアが窒素源であれば還元力は消費されないが、葉緑体内に還元力が貯まりやすくなる。葉緑体が過還元になると光合成が阻害されることから (光合成の強光阻害)、葉緑体は還元力をリンゴ酸として積極的に排出するシステム (リンゴ酸バルブ) を有している。葉緑体内に PEPC があれば、過剰な還元力を効率的に排出できると予想される (図 151-4 参照)。クロロフィル蛍光解析により、予想通り、Osppc4 の発現を抑制すると葉緑体に還元力が貯まりやすことが明らかにされた。

(エ) Osppc4 の過剰発現

イネ・アクチンプロモーターあるいはイネ *Cab* プロモーターに *Osppc4* cDNA を連結したキメラ遺伝子を導入し、Osppc4 を過剰発現させた (それぞれ、アクチン系統、*Cab* 系統)。葉身での Osppc4 発現が高い系統が数多く得られ (図 151-6)、葉身の PEPC 活性は最大約 30 倍 (Osppc4 活性は最大約 100 倍) に達した。

ホモ系統の選抜を兼ね、T1 世代 (ヘテロ + ホモ組換え体) を用い生育を比較したところ、アクチン系統、*Cab* 系統ともに、高窒素条件で分げつが増えることがわかった。3 種類の窒素施肥量でアクチン系統の生育を比較したところ、低窒素条件、中窒素条件では生育 (地上部乾物重) は非形質転換イネとほぼ同じだったが、高窒素条件ではすべての系統で

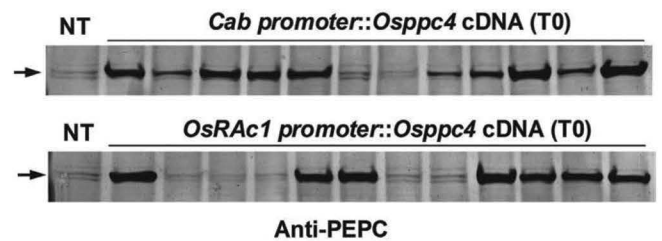


図 151-6 Osppc4 過剰発現イネ (形質転換当代; T0) 葉身のウェスタンブロット解析
矢印は Osppc4 バンドの位置を示す。

生育が促進された。PEPC 産物から合成されるリンゴ酸含量は生育促進にともなってむしろ減少したことから、高窒素条件では、過剰発現させた Osppc4 の働きで合成された有機酸が速やかに生育に使われることがわかった。

工 考 察

葉緑体型 PEPC は、アンモニアを主要窒素源とする環境に適応するための酵素であり、窒素同化・アミノ酸合成のための有機酸 (炭素骨格) 供給系として機能することが明らかにされた。発現抑制で窒素同化が抑制されることから、本酵素が炭素同化と窒素同化を結ぶ鍵酵素であるものと考えられる。また、当初の予想通り、本酵素が葉緑体の還元力の過剰蓄積を抑えることがわかり、葉緑体のレドックス制御に重要な役割を担うことが明らかにされた。また、光呼吸にともなう窒素同化においても、葉緑体型 PEPC が有機酸供給系として機能することも確認できた。

予備的実験結果であるが、葉緑体型 PEPC を過剰発現させるとイネの生育が促進されることがわかった。高窒素条件で生育促進が見られたことから、過剰発現で有機酸 (炭素化合物) の供給が増え、その結果窒素同化が促進されたと考えられる。過剰発現イネの解析により、葉緑体型 PEPC の機能の理解がさらに深まるものと期待される。

オ 今後の課題

本研究では、葉緑体内に PEPC があるメリットを十分に理解するには至らなかった。葉緑体型 PEPC をもつイネ属は好アンモニア性であり、硝酸に比べアンモニア吸収能が高く、アンモニア存在下で旺盛な生育を示す。本研究ではイネを用いて解析

したが、葉緑体型 PEPC の生理的意義の解明には、好硝酸性作物との比較解析が必要である。また、発現量は低いものの、葉緑体型 PEPC は根でも発現している（全 PEPC 活性の 10% 程度）。根における本酵素の機能も今後の課題である。

一般的に、作物の生産性は炭素同化と窒素同化のバランスで決まり、いずれか一方を促進させても、生産性は改良されないと考えられている。本研究で、葉緑体型 PEPC がイネの炭素同化と窒素同化を結ぶ鍵酵素であることが示された。本酵素の過剰発現あるいは改変で炭素同化と窒素同化のバランス（C/N バランス）を人為的に変えることにより、イネの生育を促進させるとともに、窒素利用効率も高められるものと期待される。今後は、葉緑体型 PEPC を用いた生産性改良技術の開発を行う予定である。

カ 要 約

（ア）イネ属特有の酵素、葉緑体型 PEPC は、アンモニアが主要窒素源である水田のような湛水環境に適応するための酵素であることがわかった。

（イ）窒素同化・アミノ酸合成の炭素骨格として使われる有機酸は、光合成産物から解糖系と TCA 回路を経て合成されるとされており、細胞質局在性の PEPC が重要な役割を担うと考えられている。イネは、解糖系に加え、葉緑体型 PEPC 関与する独自の炭素骨格供給系をもつこと、この経路がアンモニアを主要窒素源とする生育環境で主要な炭素骨格供給系として機能することが明らかにされた。

（ウ）葉緑体型 PEPC は葉緑体の還元力の過剰蓄積を抑えることがわかり、葉緑体のレドックス制御に重要な役割を担うことが明らかにされた。

（エ）葉緑体型 PEPC の過剰発現で、イネの生育が促進される可能性が示された。

キ 引用文献

- 1) Masumoto, C., Miyazawa, S.-I., Ohkawa, H., Fukuda, T., Taniguchi, Y., Murayama, S., Saito, K., Kusano, M., Fukayama, H. and Miyao, M. (2010). Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107 : 5226-5231.

研究担当者（徳富光恵（宮尾光恵）*、村松昌幸）

2 光合成炭酸固定酵素 Rubisco 量の適量化 (GPN0007)

ア 研究目的

今日までのイネの生産性の向上は、おもに土壤改良や圃場整備等の環境改善、肥料・農薬の開発に伴う栽培技術の進歩、また、作物自身への環境ストレスや病害虫に対する抵抗性の付加、さらには草型の改良などによりなされてきた。しかし、個葉の光合成能力そのものの改善は試みられてはいない。今後、さらに生産性の向上を計るためには、個葉のポテンシャルとしての光合成能力の改善が重要である。しかしながら、高等植物では光合成能力の改善に成功した例はなく、いまだ具体的な方向性も示されていない。

他方、現在の作物の生産は、窒素の施肥に大きく依存している背景がある。とりわけ、作物生産の向上に大きく貢献した草型の改良にその本質をみることができる。この草型の改良は、受光体制の改善による最適葉面積指数の向上に成功した育種であった点が評価されがちだが、窒素の多量施肥を可能にした点も見逃せない。すなわち、それは、葉の窒素含量の増加を可能とし、窒素含量の増加によって光合成能力を増大にさせ、生産の向上に成功をおさめた点である。葉の窒素含量は光合成能力と高い相関関係にあり、全葉身窒素含量の 80% までが葉緑体構成窒素に由来する (Makino and Osmond¹⁾)。その意味において、草型の改良による育種は単位土地面積あたりの光合成能力の向上により成功した育種であると言える。しかし、窒素の多量施肥は、数多くの問題を生んだ。窒素施肥のためのコストの増大はもちろん、地下水の汚染や生態系への影響など、環境への問題は深刻である。

もしポテンシャルとしての個葉光合成能力そのものの改善に成功したならば、それは光合成の窒素利用効率を高めることにつながるので、窒素の施肥に依存しない新しい方向での作物生産の維持と向上に結びつく。同一施肥量で個葉光合成の向上がイネの収量増につながった事例としては、(独)東北農業センターと(独)農業環境研究所が行った開放系圃場による野外高 CO₂ 実験 (FACE, free air CO₂ enrichment、約 200 から 250 ppmv の CO₂ 添

加処理を行った)のすぐれた研究成果がある。その結果によると、イネ品種の違いに関係なく FACE 区では5から20%の収量増の効果があることが報告された (Hasegawa et al. ²⁾)。収量増の要因は高 CO₂ による光合成速度の増進効果で、200 から 250 ppmv の高 CO₂ 処理は 30 から 50% の光合成速度の増加につながり、結果として栄養生長期の乾物重増加とそれに伴う茎数増加が増収に直接結びついたことが証明された。

個葉の光合成能力は集光系、電子伝達系、炭酸固定系およびショ糖・デンプン合成系の4つの要因のバランスによって決まり、とくに炭酸固定系の CO₂ 固定酵素 Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, EC 4.1.1.39) に多量の窒素が投資されている。Rubisco タンパクの構成窒素量は全葉身窒素含量の 25 から 30% に相当する (Makino et al. ³⁾)。最近の研究成果により、イネの光合成機能のこれら4つの因子の機能バランスはアジアモンスーンの高湿潤気候に適応していることがわかってきた。しかし、人類の活動激化に伴う地球規模での大気 CO₂ 分圧の急上昇や品種改良によるイネの栽培地の北上は、イネの光合成機能の面において、必ずしも適したものではなくなっている。例えば、Rubisco 機能に的を絞ると、高 CO₂ 環境では光合成全体のバランスにおいて Rubisco 活性が過剰となり (Nakano et al. ⁴⁾)、北方環境 (生理的な低温下) では Rubisco 活性が大きく不足する (Makino and Sage ⁵⁾)。そこで、本研究課題では、想定される近未来環境や北方環境での光合成機能に寄与するイネの Rubisco 量の最適化を試み、葉身の光合成速度に対する窒素利用効率を向上させることで、それら想定された環境下で高い光合成能を発揮するイネを作製することを目的とした。

イ 研究方法

(ア) Rubisco 過剰生産イネの作製と光合成およびバイオマス解析

Rubisco の小サブユニット遺伝子 *RBCS* (核コード) をセンス方向で導入し、Rubisco 量を増やしたイネ形質転換体を作製。栽培の窒素供給量を変えて、低温環境 (19/16°C : day/night)、低 CO₂ 分圧 (28 Pa)、および高 CO₂ 分圧 (120 Pa) で栽培し、バイオマス生産の評価を行い、窒素吸収量を調べた。ま

た、それら各種環境で育てた変異体の Rubisco の過剰生産効果を調べた。Rubisco 過剰生産イネでは、Rubisco の生体内で部分的な不活性化が見られたので、電子伝達系の律速要因であるシトクロム *b6f* の過剰生産を試みるべく、その複合体の一つである核コードサブユニット、リスケ FeS タンパク質の遺伝子 *PETC* の変異体を作製し、光合成解析を行った。あわせて、Rubisco activase の変異体も入手して、その光合成特性も調べた。

(イ) *RBCS* 遺伝子族の機能解析と分子種別 *RBCS* 発現抑制イネの作製と光合成解析

イネの核ゲノム上に5種ある *RBCS* 遺伝子の器官別・生育ステージ別発現量の変動を追って、幼植物から出穂期まで調べた。第12染色体に存在する4種、*RBCS2* から *RBCS5* までの3'末端の非翻訳領域の配列を用いて分子種別の RNAi 形質転換体の作製を試みた。

得られたすべての分子種別発現抑制体から、明確な Rubisco 量の低下がみられた RNAi 系統を選抜し、それらの変異体の Rubisco 量と個葉光合成の解析を行った。さらに、それら各種分子種別発現抑制体の2分子種の発現抑制体と3分子種の発現抑制体を作製した。

(ウ) 北方冷涼環境適応型 Rubisco への改変

北方の冷涼環境適応型 Rubisco (比活性の高い Rubisco) の Rubisco 大サブユニット遺伝子 *RbcL* (葉緑体コード) としてポプラ由来の *RbcL* をモデル植物 (タバコ) への葉緑体形質転換を行った。ホスト植物には、*RbcL* 欠損タバコを用いた。合わせて、ユウカリ、イネ、コムギなどの *RbcL* 導入を行った。また、*RBCS* (Rubisco 小サブユニットタンパク質) に関しては、コムギ *RBCS* のイネへの導入を行い、これら得られた形質転換植物について、Rubisco の酵素活性解析を行った。

ウ 研究結果

本研究課題では、北方冷涼下および高 CO₂ 環境での炭酸固定酵素 Rubisco 量の適量化を図り、イネの光合成機能の向上を目的とした。

まず、Rubisco タンパク質の量的な調節機構を明らかにすべく、核にコードされる *RBCS* の5分子種の器官別、生育ステージ別の mRNA 発現パターンを比較した (図 152-1)。葉身においては、第12染

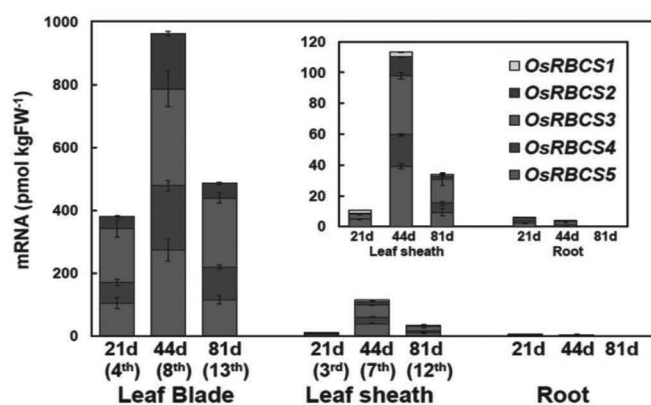


図 152-1 生育ステージ・器官別 OsRBCS multigene family の発現

数字は発芽後日数。カッコ内数字は分析に供した最上位の展開中の葉の葉位。右上図は葉鞘と根の拡大図。

染色体にコードされる *RBCS2* から *RBCS5* の 4 分子種が、ほぼ均等に植物の一生を通して、多量に発現されていることがわかり、第 2 染色体にコードされる *RBCS1* の発現はほとんど認められなかった。また、栄養成長期に特に強く発現し、Rubisco のタンパク量と高い相関が見られた (Suzuki et al. ⁶⁾)。

そこで、Rubisco タンパク質の増強に関しては、第 12 染色体にコードされる任意の *RBCS* オープンプロモーターと cDNA (ともに *RBCS2* を使用) の導入による過剰発現体作製を試みた。一方、Rubisco タンパク質の抑制体の作製に関しては、さまざまな量的な抑制体の作製をすることを目的に第 12 染色体にコードされる 4 分子種 *RBCS* の分子種別の RNAi 体を作製した。第 12 染色体に座乗する *RBCS* の翻訳領域の配列は非常にホモロジーが高いので、相同性のない 3' 末端の非翻訳領域の配列を用いて、分子種別の RNAi 体の作製を行った。過剰発現と発現抑制のどちらの試みも、葉緑体にコードされる *RbcL* 遺伝子の改変を試みることなく、Rubisco 量を増減させた変異体の作製に成功した。

RBCS 過剰発現による Rubisco 量増強イネでは、20 から 30% の Rubisco 量が増えた系統が得られた (Suzuki et al. ⁷⁾)。それらの系統は、予想通り、低温 (19/16°C : day/night) と低 CO₂ 環境 (28 Pa) 下でバイオマス生産が増産されることがわかった。図 152-2 に約 63 日栽培した個体レベルでのバイオマス生産の結果を示した。標準栽培条件 (40 Pa CO₂) 下でも、Rubisco 過剰生産イネのバイオマス

の向上が若干認められ、その効果は、低温条件さらには低 CO₂ 条件で促進されていた。このことは、Rubisco 量の増強が、冷涼な環境でのバイオマス確保に有力な手段であり、北方適応型高バイオマスイネの一つのモデルになることを強く示す、と同時に、Rubisco の律速性の高まる環境上限では Rubisco タンパク質の増強はバイオマス増産に効果があることを示した。一方、Rubisco が光合成の律速要因とはならない高 CO₂ 条件ではバイオマス増産の効果はなかった。この期間の窒素吸収量についても調べたところ、結果は概ね図 152-2 で示したバイオマス量と同じ結果を示した。このことは、Rubisco が過剰生産されることで、植物の窒素要求量も増えていることを意味した。

Rubisco の増強は一部に Rubisco 活性の不活性化を伴ったが (Suzuki et al. ⁷⁾)、Rubisco の活性化酵素 Rubisco activase の過剰生産は光合成の光誘導速度を高めることがわかった (Yamori et al. ⁸⁾)。さらに、核コード *RBCS* の過剰発現のみによる Rubisco タンパク質量増強のメカニズムに関して、翻訳レベルを含め、明らかとした (Suzuki and Makino ^{9, 10)})。

葉身では、第 12 染色体に座乗する 4 種 (*RBCS2* から *RBCS5*) が発現し、第 2 染色体の *RBCS1* はほとんど発現していなかった (上述)。そして、全 *RBCS* mRNA の発現量、葉緑体コードの *RbcL* mRNA の発現量および Rubisco タンパク質量との間には非常に高い正の相関関係があった (Suzuki et al. ⁶⁾)。そこで、*RBCS2* から *RBCS5* の分子種別の個別 RNAi 体を作製したところ、4 分子種のすべての RNAi 体において発現抑制を行った分子種の *RBCS* mRNA の発現低下と Rubisco タンパク質量の減少が認められた (Ogawa et al. ¹¹⁾)。このことは、複数種存在する *RBCS* の一つの分子種のノックアウトが他の分子種の発現や翻訳レベルでは相補されないことを意味した。

これら *RBCS* の 4 分子種別発現抑制系統において、高 CO₂ 環境 (100 Pa) 適応型の選抜にも成功した。一分子種の発現を抑制した RNAi イネの個葉においては、低 CO₂ と高 CO₂ 下の光合成の窒素利用効率は互いにトレードオフの関係にあることが明確となり、Rubisco 量の少ない個体ほど高 CO₂ での光合成の窒素利用効率が高いことがわかった。現在は、それらの発現抑制体を互いに交配し、2 分子種

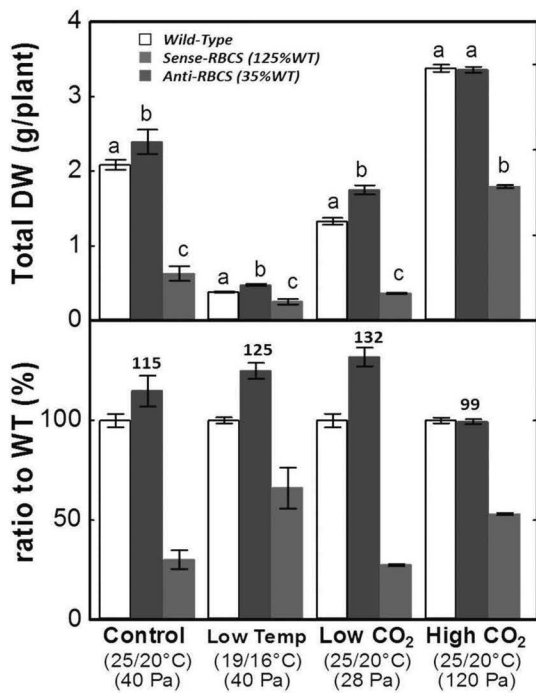


図 152-2 63日間、低温環境(19/16°C)、低CO₂環境(28 Pa CO₂)、および高CO₂環境(120 Pa CO₂)で生育させたRubisco過剰発現体(*Sense-RBCS*、中央カラム)と発現抑制体(*Anti-RBCS*、右カラム)イネの個体乾物量。

標準栽培は25/20°C & 40 Pa CO₂。データは平均値。±標準誤差(n = 6)。同一アルファベット内ではTurkey-Kramer検定で有意差なし。

の発現抑制体の6種の組合せ系統と3分子種の発現抑制体の2種の組合せ系統を作製している。なお、Rubisco過剰生産イネに関しては、戻し交配を繰り返し、純化した世代が得られたので、隔離圃場での野外実験に供すべく、現在は、生物多様性評価書作成のための実験を進めている。また、*RBCS*-RNAi体についても高CO₂環境(100 Pa)適応選抜系統に関しては、戻し交配を続け、現在、純化世代を育成中である。

また、北方の冷涼環境適応型Rubisco(比活性の高いRubisco)種の*RbcL*遺伝子の導入も試みた。*RbcL*遺伝子は葉緑体にコードされ、イネではまだ葉緑体の形質転換法が確立していないので、葉緑体形質転換のモデル植物であるタバコ葉緑体への導入をまず試みた。双子葉植物であるポプラ*RbcL*遺伝子の導入には成功し、独立栄養で成長するポプラ*RbcL*遺伝子を有するhybrid Rubiscoを持つ葉緑体形質転換体タバコを作製に成功し、その光合

成特性を調べた。イネ*RbcL*遺伝子の導入にも成功しmRNAの発現は確認できたが、残念ながらイネ*RbcL*タンパク質の翻訳はされなかった。現在は、イネの葉緑体形質転換法について検討を行っている。

工 考 察

イネは元来、アジア熱帯モンスーン気候の低CO₂環境(産業革命以前は地球上のCO₂濃度は280ppmで安定していた)に適応した光合成機能を有しており、栽培地域の北上や人類の活動激化に伴う大気中のCO₂濃度の上昇は、いくつかの面で光合成機能の環境不適応を生じている。そこで、まず、イネの光合成機能の特徴を冬作物であるコムギと比較解析し(Nagai and Makino¹²⁾)、北方冷涼環境下でのRubiscoの最適化の参考とした。イネRubiscoがCO₂に対する親和性が高く比活性が低いこと、逆にコムギRubiscoはCO₂に対する親和性は低いものの比活性が高いなど、それぞれの種起源の気候に適応した性質を持っていることが明らかになった(Makino¹³⁾)。

次に、Rubisco、*RBCS*遺伝子5分子種のmRNA発現パターンの比較では、葉身において、アミノ酸配列に変異のなかった第12染色体コードの4分子種が、均等に発現されていた(Suzuki et al.⁶⁾)。このことは、葉身に多量に存在するRubiscoタンパクは、4分子種*RBCS*遺伝子のフル発現によって支えられている可能性が考えられ、1分子種のRNAi発現抑制体でRubiscoタンパク質量の減少が認められた。また、他の分子種が相補できないことも明らかになった。

分子種*RBCS2*のオウンプロモーター制御による*RBCS2*導入による過剰発現によって20から30%のRubisco量が増えた系統が得られた。また、ここでも1分子種の過剰発現は他の分子種の発現に影響を与えず、*RBCS*の分子種は互いに相補しないことが明らかになった。Rubisco過剰生産イネでは、バイオマスの向上が若干認められ、その効果は、低温条件さらには低CO₂条件で促進された。このことは、Rubisco量の増強が、冷涼環境でのバイオマス確保に有力な手段であり、北方適応型高バイオマスイネの一つのモデルになることを強く示すとともに、Rubiscoの律速性の高まる環境上限ではRubiscoタ

ンパク質の増強はバイオマス増産に効果があることを示した。この期間の窒素吸収量も同じ結果を示した。このことは、Rubisco が過剰生産によって、植物の窒素要求量も増えていることを意味した。

Rubisco の増強は一部に Rubisco 活性の不活性化を伴った (Suzuki et al. ⁷⁾)。Rubisco の活性化酵素 Rubisco activase の過剰生産は、Rubisco の活性化には影響を与えず (Yamori et al. ⁸⁾)、Rubisco の活性化率低下は電子伝達系からの制御である可能性が考えられた (Yamori et al. ¹⁴⁾, Nishikawa et al. ¹⁵⁾)。しかしながら、Rubisco activase の過剰生産は Rubisco 量を減少させる傾向にもあり (Yamori et al. ⁸⁾)、Rubisco 過剰生産イネでの Rubisco activase 量を調べる必要がある。

RBCS4 分子種の個別発現抑制系統における光合成解析では、低 CO₂ と高 CO₂ 下の光合成の窒素利用効率に、互いにトレードオフの関係にあることが明確となった。このことは、Rubisco のわずかな量的な減少は、現在の CO₂ 分圧下の環境に対しては不利であるが、将来予想される高 CO₂ 環境においては有利な改変であることを示唆した。また、1 分子種による発現抑制体では、Rubisco 量の少ない個体ほど高 CO₂ での光合成の窒素利用効率が高いことが示された。今後は 2 重変異体や 3 重変異体での同様の解析が必要となる。

葉緑体コードである *RbcL* 遺伝子の導入も試みた。イネではまだ葉緑体の形質転換法が確立していないので、モデル植物であるタバコ葉緑体への導入をまず試みた。双子葉植物であるポプラやユーカリの *RbcL* 遺伝子の導入では、hybrid Rubisco を持つ形質転換体タバコを作製に成功した。しかしながら、イネやコムギの *RbcL* 遺伝子の導入はでき mRNA の発現は確認できたが、イネとコムギの *RbcL* タンパク質は検出されなかった。単子葉類と双子葉類の違いによるものかも知れない。

オ 今後の課題

(ア) *RBCS* 過剰発現イネで、Rubisco 量が実際に増加した個体では、必ず部分的な Rubisco の不活性化を伴っていた。その問題を解消できれば、さらなる光合成やバイオマス生産向上が期待される。Rubisco 増強イネにおける Rubisco の部分的な不活性化は、RuBP 再生産にかかわる他の光合成の律速

要因とのアンバランスのため生じるものであると考えられるため、今後は、RuBP 再生産にかかわる候補の増強が必要であり、現在は Rubisco activase の増強、電子伝達系シトクロム b6f 複合体の増強、およびカルビン回路酵素 SBPase と Transketolase の増強に着手している。Rubisco 増強イネとのそれらの変異体の交配育種を考えている。

(イ) 高 CO₂ 環境適応型として選抜された *RBCS4* と *RBCS5* の RNAi の 2 系統について、Wild-type のバッククロスを進め、純化進行中である。これらの高 CO₂ 環境でのバイオマス生産や収量向上について検討したい。また、必要に応じて、上記 RuBP 再生産増強イネとの交配育種も考えている。

(ウ) 北方の冷涼環境適応型 Rubisco (比活性の高い Rubisco) のイネへの完全導入を考えている。核コード *RBCS*-RNAi 体の交配により 4 分子種すべての発現を抑制した変異体に、冷涼環境適応型 Rubisco (比活性の高い Rubisco) の *RBCS* 遺伝子を導入して救済し、*RBCL* 遺伝子を葉緑体形質転換によって導入させた変異体と組み合わせる案を考えている。現在、コムギの *RBCS* の導入置換体イネ作製をめざして進めている。最大の問題点はイネの葉緑体形質転換技術の確立である。

力 要 約

本研究課題では、北方冷涼下および高 CO₂ 環境での CO₂ 固定酵素 Rubisco 量の適量化を図り、イネの光合成機能の向上を目的とした。

まず、Rubisco タンパク質の量的な調節機構を明かにすべく、核にコードされる *RBCS*、5 分子種の mRNA 発現を詳細に調べたところ、葉身においては、第 12 染色体にコードされる 4 分子種をほぼ均等に植物の一生を通して発現されていた。また、各葉位の出葉展開期に多量に発現していることがわかり、Rubisco タンパク量とは非常に高い相関が見られた。

そこで、Rubisco タンパク質の増強を計るために、第 12 染色体にコードされる *RBCS* オウンプロモーターと cDNA (ともに *OsRBCS2* を使用) の導入による過剰発現体作製を試みた。一方、Rubisco 発現抑制体の作製に関しては、さまざまな量的な抑制体の作製をすることを目的に第 12 染色体にコードされる 4 分子種 *RBCS* の 3' 末端の非翻訳領域の配列を

用いて分子種別の RNAi 体を作製した。どちらの試みも、葉緑体にコードされる *RbcL* 遺伝子の改変を試みることなく、Rubisco 量を増減させた変異体の作製に成功した。

RBCS 過剰発現による Rubisco 量増強イネでは、低温と低 CO₂ 環境下でバイオマス生産が増産されることがわかった。Rubisco の増強は一部に Rubisco 活性の不活性化を伴ったが、その要因を解明することはできなかった。一方、Rubisco の *RBCS* の 4 分子種別発現抑制系統から高 CO₂ 環境 (100 Pa) 適応型の選抜にも成功した。一分子種の発現を抑制したイネ個葉においては、低 CO₂ と高 CO₂ 下の光合成の窒素利用効率は互いにトレードオフの関係にあることが明確となり、Rubisco 量の少ない個体ほど高 CO₂ での光合成の窒素利用効率が高いことがわかった。

北方の冷涼環境適応型 Rubisco (比活性の高い Rubisco) 種の *RbcL* 遺伝子の導入も試みた。*RbcL* 遺伝子は葉緑体にコードされ、イネではまだ葉緑体の形質転換法が確立していないので、葉緑体形質転換のモデル植物であるタバコ葉緑体への導入をまず試みた。双子葉植物であるポプラ *RbcL* 遺伝子の導入には成功し、独立栄養で成長するポプラ *RbcL* 遺伝子を有する hybrid Rubisco を持つ葉緑体形質転換体タバコを作製に成功し、その光合成特性を調べた。イネ *RbcL* 遺伝子の導入にも成功し mRNA の発現は確認できたが、残念ながらイネ *RbcL* タンパク質の翻訳はされなかった。イネの葉緑体形質転換法については、研究期間内には成功しなかった。

キ 引用文献

- 1) Makino A and Osmond B (1991). Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiol.* 96 : 355-362.
- 2) Hasegawa T, Sakai H, Tokida T, Nakamura H, Zhu C, Usui Y, Yoshimoto M, Fukuoka M, Wakatsuki H, Katayanagi N, Matsunami T, Kaneta Y, Sato T, Takakai F, Sameshima R, Okada M, Mae T and Makino A (2013). Rice cultivar responses to elevated CO₂ at two free-air CO₂ enrichment (FACE) sites in Japan. *Func. Plant Biol.* 40 : 148-159.
- 3) Makino A, Sakashita H, Hidema J, Mae T, Ojima K and Osmond B (1992). Distinctive responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and carbonic anhydrase in wheat leaves to nitrogen nutrition and their possible relationships to CO₂ transfer resistance. *Plant Physiol.* 100 : 1737-1743.
- 4) Nakano H, Makino A and Mae T (1997). The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationship between photosynthetic capacity and nitrogen content in rice leaves. *Plant Physiol.* 115 : 191-198.
- 5) Makino A and Sage RF (2007). Temperature response of photosynthesis in transgenic rice transformed with “sense” or “anti-sense” *rbcS*. *Plant Cell Physiol.* 48 : 1472-1483.
- 6) Suzuki Y, Nakabayashi K, Yoshizawa R, Mae T and Makino A (2009). Differences in expression of the *RBCS* multigene family and Rubisco protein content in various rice plant tissues at different growth stages. *Plant Cell Physiol.* 50 : 1851-1855.
- 7) Suzuki Y, Miyamoto, T, Yoshizawa R, Mae, T and Makino A (2009). Rubisco content and photosynthesis at different positions in transgenic rice with an overexpression of *RBCS*. *Plant Cell Environ.* 32 : 417-427.
- 8) Yamori W, Matsumoto C, Fukayama H and Makino A (2012). Rubisco activase is a key regulator of non steady-state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. *Plant J.* 71 : 871-880.
- 9) Suzuki Y and Makino A (2012). Availability of Rubisco small subunit up-regulates the transcript levels of large subunit for stoichiometric assembly of its holoenzyme in rice. *Plant Physiol.* 160 : 533-540.
- 10) Suzuki Y and Makino A (2013). Translational down-regulation of RBCL is operative in the coordinated expression of Rubisco genes in senescent leaves in rice. *J Exp. Bot.* 64 : 1145-1152.

- 11) Ogawa S, Suzuki Y, Yoshizawa R, Kanno K and Makino A (2012). Effect of individual suppression of *RBCS* multigene family on Rubisco contents in rice leaves. *Plant Cell Environ.* 35, 546-553.
- 12) Nagai T and Makino A (2009). Differences between rice and wheat in temperature responses of photosynthesis and plant growth. *Plant Cell Physiol.* 50 : 744-755.
- 13) Makino A (2011). Photosynthesis, grain yield and N utilization in rice and wheat. *Plant Physiol.* 155 : 125-129.
- 14) Yamori W, Sakata N, Suzuki Y, Shikanai T and Makino A (2011). Cyclic electron flow around photosystem I via chloroplast NAD (P)H dehydrogenase (NDH) complex performs a significant physiological role during photosynthesis and plant growth under low temperature in rice. *Plant J.* 68 : 966-976.
- 15) Nishikawa Y, Yamamoto H, Okegawa Y, Wada S, Sato N, Taira Y, Sugimoto K, Makino A and Shikanai T (2012) : PGR 5-dependent cyclic electron transport around PSI contributes to the redox homeostasis in chloroplasts rather than CO₂ fixation and biomass production in rice *Plant Cell Physiol.* 53 : 2117-2126.

研究担当者（牧野 周*、鈴木 雄二）

3 光エネルギー利用効率の最適化：イネの戦略 (GPN0008)

ア 研究目的

光は光合成に必須であるが、過剰な光エネルギーの受容は活性酸素の生成を介し、光合成装置を破壊する。この光傷害を回避するため、植物は光合成での光利用効率を調整している。しかし過度の光合成の制御は、弱光下での光合成を下げることになる。複雑なのは、光強度は、秒～分のオーダーで大きく変動し、また同一個体内でも葉の位置により、光の過剰と不足が同時におきることである。光合成の基本装置は長い進化の末に獲得されたものであり、作物の光合成効率を上げることは不可能ではないが、難しい問題であろう。しかし、光合成調節のメカニ

ズムは種によって違いが見られ、改変により変動する光環境下で光合成効率を高いまま維持する技術の開発は現実的な課題である。本研究では、圃場でのイネの光環境適応戦略を明らかにするとともに、それを強化する遺伝子の探索と光ストレスに強い光合成装置のモデル化を目的とした。

イ 研究方法

（ア）圃場で生育するイネの光合成解析

Monitoring-PAM システムを用いて、京都大学の実験圃場で生育するイネの光合成の周日変動、季節変動を測定した。

（イ）イネにおける PGR5 タンパク質依存サイクリック電子伝達の機能解析

日本晴を用いてイネ *PGR5* 遺伝子のノックダウン株を作製した。ウェスタン解析で PGR5 タンパク質の蓄積量の低下した 3 ラインを選抜した。クロロフィル蛍光解析、P700 解析、ECS 解析は Dual-PAM システムを用いて行なった。二酸化炭素固定速度は LI-6400 を用いて測定した。

（ウ）Flv の光合成に対する影響の評価

ヒメツリガネゴケ *FlvA*、*FlvB* 遺伝子をクローン化し、35S プロモーターの支配下で発現するコンストラクトを作製した。この遺伝子をシロイヌナズナ *pgr5* 変異株及び野生株に導入し、抗体により Flv を高蓄積するラインを選抜した。クロロフィル蛍光解析は Mini-PAM システムを用いて行なった。

（エ）Flv によるイネ光環境ストレス耐性強化

ヒメツリガネゴケ *FlvA*、*FlvB* 遺伝子をクローン化し、ユビキチンおよび *petC* プロモーターの支配下で発現するコンストラクトを作製した。この遺伝子をイネ野生株（日本晴）に導入し、抗体により Flv を高蓄積するラインを選抜した。クロロフィル蛍光解析は Mini-PAM システムを用いて行った。

ウ 研究結果

（ア）圃場で生育するイネの光合成解析

圃場で生育するイネ野生株について、光化学系 II の光阻害を周日測定した。その結果、比較的光を好むとされるイネにおいても、日中に 10-13% の最大量子収率の低下が観察された。同様に電子伝達速度を測定すると、午後に顕著な電子伝達速度の低下が見られた（図 153-1）。これは、いわゆる「光合成の

昼寝現象」を電子伝達速度で捉えたものである。電子伝達速度の低下は、光傷害の進行より遅れてみられ、昼寝現象は光傷害により直接もたらされるのではなく、光化学系Ⅱの下流の電子伝達律速に起因することが明らかになった。また光利用の季節変動を調べると、光の照射角度の高い生育期には垂直葉での受光量は低い、登熟期では高くなり光阻害も顕著になることが明らかになった。

熱散逸はクロロフィルの励起エネルギーを熱に換えて捨てるメカニズムであり、クロロフィル蛍光解析で NPQ の qE 成分として測定される。qE はチラコイドルーメンの酸性化をモニターして誘導される。その際、pH の感受に関わるのが、PsbS タンパク質である。イネ *PsbS* 遺伝子のノックダウン株は、qE 誘導能を欠く (1)。この植物を特定網室で栽培し、圃場に近い条件で、光エネルギーの利用を調べた (図 153-2)。その結果、晴天時には、ノックダウン株では光傷害により失われるエネルギーが増加するが、曇天時には、逆に電子伝達に利用される光エネルギーは増えた。野外の環境では qE の必要性に疑問の余地はないが、qE 誘導には最大光合成活性維持とのトレードオフが存在することが明らかになった。

(イ) イネにおける PGR5 タンパク質依存サイクリック電子伝達の機能解析

サイクリック電子伝達は光化学系Ⅰのみで駆動され、酸素発生、NADPH の生成無しに、 ΔpH を形成する (2)。 ΔpH は ATP の合成だけではなく、qE の誘導にも必要である。したがってサイクリッ

ク電子伝達は、光合成の光環境適応の鍵を握る。本プロジェクトでは、PGR5 タンパク質の欠損によって生じる光傷害を軽減する遺伝子の探索とその遺伝子を用いたイネの改変を目標とした。そこでまず、イネにおける PGR5 欠損の影響を詳細に解析した。

イネ *PGR5* 遺伝子ノックダウン株は、グロースチャンバーでの総バイオマス量に若干の減少が見られた (図 153-3)。シロイヌナズナ *pgr5* 変異株同様に NPQ の誘導に大きな減少が見られた。被子植物においては、NPQ の大部分は qE 成分から成る。また光化学系Ⅰの反応中心である P700 が光照射下で強く還元した (図 153-4)。このことは、サイクリック電子伝達の欠損により ATP が二酸化炭素固定を律速することで、ストロマに NADPH が高蓄積し、光化学系Ⅰからの電子受容能力が低下していることを示している。

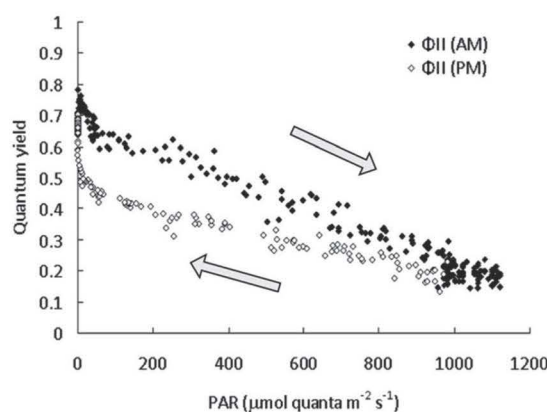


図 153-1 晴天時における光化学系Ⅱ量子収率の午前 / 午後の比較

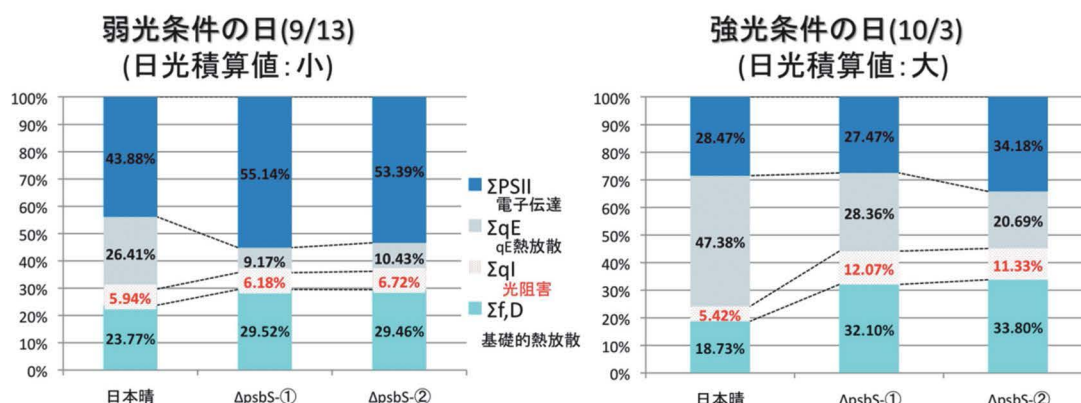


図 153-2 曇天時 (9/13) と晴天時 (10/3) の光利用効率の比較

野生株と PsbS ノックダウン株 ($\Delta psbS$) について周日測定を行なった積算値の分配比を示す。ΣPSII、電子伝達に利用。ΣqE、qE 成分として散逸。ΣqI、光阻害で失った。ΣfD、その他。

さらにイネ *PGR5* ノックダウン株の二酸化炭素固定速度を測定した。すべての二酸化炭素濃度において若干の固定速度の低下が見られ、このことは穏やかな総バイオマス量の低下と矛盾しない。イネの *PGR5* ノックダウン株の表現型の原因をさらに調べるため、ECS シグナルの測定を行なった。Electrochromic shift (ECS) は、proton motif force (*pmf*; ΔpH と膜電位の総和) 形成によるカロチノイドの吸収変化をモニターするものであり、サイクリック電子伝達の直接の産物である *pmf* を反映する。イネの *PGR5* ノックダウン株では、特に強光領域で *pmf* の低下が顕著であった。一方、 gH^+ は



野生株 *PGR5*ノックダウンイネ

図 153-3 グロースチャンバーで生育させた *PGR5* ノックダウンイネ
わずかであるが統計的に有為なバイオマスの減少を示す。

明所から暗所に移した際の ECS 解消のキネティクスから求められ、主に ATPase による *pmf* の解消を反映する。イネの *PGR5* ノックダウン株では、 gH^+ の上昇が観察された (図 153-5) (3)。

(ウ) Flv による光環境ストレス耐性強化

Flavodiiron protein (Flv) はシアノバクテリアで見つかり、光化学系 II の光傷害回避にはたらくものと、NADPH による酸素の二電子還元を触媒するものとが考えられている。Flv はヒメツリガネゴケでは保存されているが、シロイヌナズナやイネなどの被子植物には存在しない。ヒメツリガネゴケ *Flv* 遺伝子のシロイヌナズナ *pgr5* 変異株への導入は、変異株の表現型を劇的に軽減した。したがって、*Flv* 遺伝子は、本プロジェクトで我々が求めているものであった。

シロイヌナズナ *pgr5* 変異株は、イネの *PGR5* ノックダウン株同様、NPQ の減少と P700 の還元を示す (4)。また光化学系 II での電子伝達速度 (ETR) の減少においては、イネより強い表現型が見られた。いずれの表現型においても *Flv* 遺伝子の導入により、大幅な表現型の改善が見られた (図 153-6)。

Flv 遺伝子の導入は、シロイヌナズナ *pgr5* 変異株の表現型を軽減した。それでは、シロイヌナズナ野生株の光合成のどのような影響を与えるだろうか？このことを明らかにする為に、*Flv* 遺伝子をシロイヌナズナ野生株に導入した。*Flv* タンパク質蓄積シ

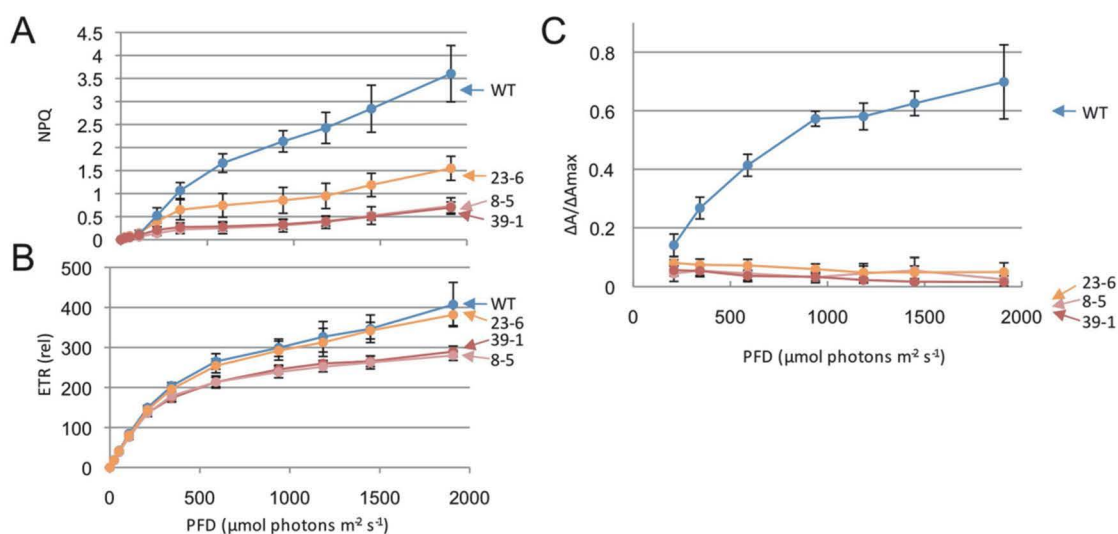


図 153-4 イネ *PGR5* ノックダウン株の電子伝達解析

- A) NPQ の光強度依存性
 - B) 光化学系 II での電子伝達速度 (ETR) の光強度依存性
 - C) P700 酸化の度合い ($\Delta A / \Delta A_{\text{max}}$) の光強度依存性
- 8-5、23-6、39-1 はイネ *PGR5* ノックダウン株。23-6 は微量の *PGR5* を蓄積する。

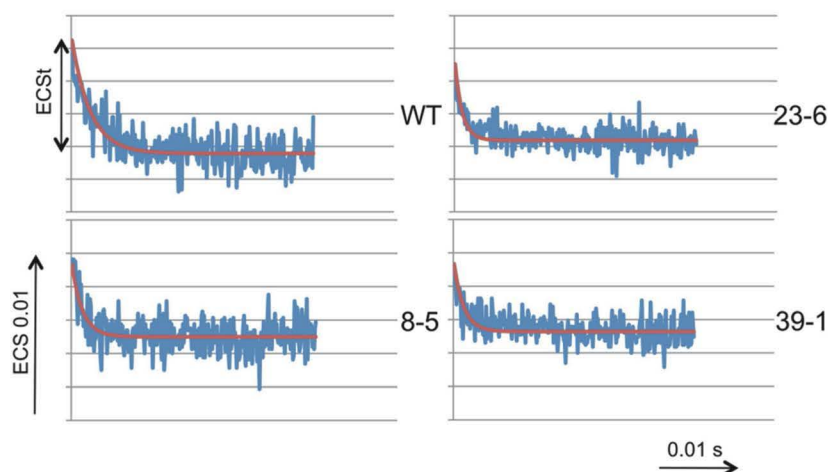


図 153-5 イネ *PGR5* ノックダウン株で見られる gH^+ の増加
500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の光照射下で暗黒パルスを与え、ECS の解消をモニターした。
イネ *PGR5* ノックダウン株 (8-5、23-6、39-1) では、解消が速い。ECSt は、*pmf* に相当する。

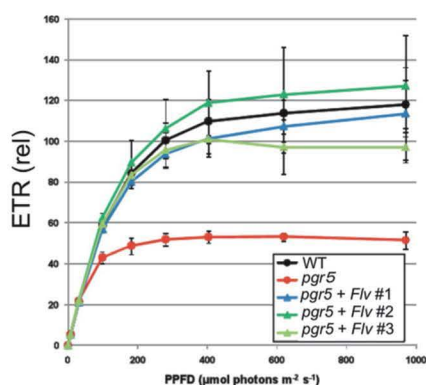


図 153-6 *Flv* を導入した *pgr5* に見られる電子伝達異常の緩和
ETR の光強度依存性を評価。*Flv* の導入により *pgr5* の ETR が野生株レベルまで回復

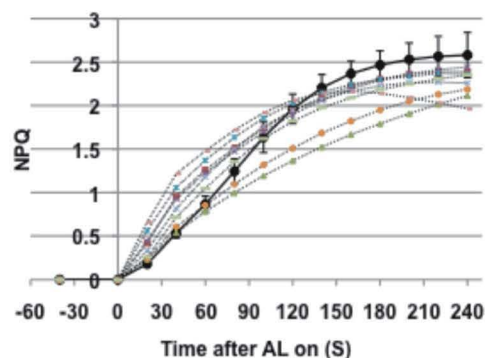


図 153-7 *Flv* 導入イネに見られた速い NPQ の誘導
暗所馴化した植物に光照射し、NPQ 誘導の経時変化を見た。実線がイネ野生株。点線が *Flv* 導入イネ。照射後 90 秒程度までは *Flv* 導入イネの NPQ が高く、*Flv* が電子シンクとなっていることを示している。

ロイヌナズナでは、定常状態の光合成に影響は見られなかった。*Flv* はおそらく NADPH を基質とするが、二酸化炭素固定とは大きく競合しないことが明らかになった。一方、*Flv* 蓄積シロイヌナズナは、光照射直後に高い電子伝達速度を示した。光合成が立ち上がる際には、カルビンサイクルの活性化に時間を要し、還元力が過剰となる。このとき、*Flv* が NADPH を酸化して電子の受容体を供給していると考えられる。

(エ) *Flv* によるイネ光環境ストレス耐性強化

Flv 遺伝子の導入がイネの光合成に与える影響を調べる目的で、同遺伝子をイネ野生株に導入した。シロイヌナズナの野生株同様に定常状態の光合成に

影響は見られなかった。しかしながら、光合成の誘導時に、光化学系 II の電子伝達速度の増加と速い NPQ 誘導を観察した (図 153-7)。

工 考 察

(ア) 圃場で生育するイネの光合成解析

圃場はイネにとってある程度望ましい生育環境であるが、それでも光傷害が観察された。実際多くの光エネルギーは熱 (*qE* 成分) として捨てられ、光合成に利用されない。この傾向は、垂直葉に対して照射量が増大する登熟期に顕著になる。光傷害は、弱光下で光合成の低下を直接引き起こすので、光傷害の緩和により、圃場で生育するイネの光合成速度

を増加させる可能性が示唆された。垂直葉での葉面積あたりの受光量が生育期に低いのは不思議に思えるが、群落での生育を考えたとき、亜飽和光を広い葉面積で受けるイネの戦略と考えられる。光合成の昼寝現象の原因を特定することはできなかったが、この現象が電子伝達速度の低下を伴うことを明確に示すことができたことは、今後の研究に重要な情報となる。

NPQは変動する光環境下で光傷害の回避に必須である。しかしながら、曇天下では、むしろ光利用効率を低下させてしまうことが明らかになった。したがって、NPQのサイズは、光環境ストレスの強さと最大光合成活性の間のトレードオフにより最適化される必要があるだろう。

(イ) イネにおけるPGR5タンパク質依存サイクリック電子伝達の機能解析

我々はすでに、シロイヌナズナにおいてPGR5タンパク質に依存するサイクリック電子伝達の生理機能を明らかにしている。しかしながら、シロイヌナズナは必ずしも光合成の生理学解析に適した植物ではなく、イネを材料として、さらなる重要な知見を得た。イネのPGR5ノックダウン株では電子伝達速度と二酸化炭素固定に対する影響はわずかであった。このことは、イネにおいてwater waterサイクルなど別のalternative electron transportの活性が高いことが考えられる。しかしながら、NPQやP700の酸化には強い表現型が観察され、PGR5依存のサイクリック電子伝達が、光合成より葉緑体内のレドックスバランスの維持に重要なことが示唆された。PGR5ノックダウン株では、*pmf*の減少とともに、 gH^+ としてモニターできるプロトンの流出速度の増大が観察された。このことは、サイクリック電子伝達の欠損にともなうATP不足の補正を示している可能性があるが、今後の解析が必要である。ATPaseの活性化は ΔpH の解消を伴い、葉緑体内レドックスバランスの崩壊を引き起こすのかもしれない。

(ウ) Flvによる光環境ストレス耐性強化

Flvは、NADPHから電子を受け取り酸素を水まで還元する。したがって、一種のwater waterサイクルを触媒するが、活性酸素を作ることはない。Flvの導入が、シロイヌナズナ*pgr5*変異株の表現型を劇的に軽減したことから、Flvへの電子伝達速

度がPGR5依存サイクリック電子伝達に匹敵するものであると考えられる。FlvはNADPHを基質とする反応を触媒するが、野生株で定常状態での光合成の低下はみられなかった。そのため、野生株においてカルビンサイクルと競合する可能性は低いと考えられる。このことは、Flvの育種利用を考えると重要である。

シロイヌナズナ野生株へのFlv遺伝子の導入は、光合成の始動時に電子伝達速度を増加させる働きがあった。このことは、カルビンサイクルがNADPHを消費しきれない際に、FlvがNADPHを酸化し、電子シンクとして機能しうることを示唆している。このような状況は、光合成の始動時のみならず、弱光から強光への光強度の急激な変動によっても起こりうる。光強度の変動は植物には大きなストレスになるが、野外では頻繁に起きる。Flvの導入が野外環境での植物のストレス緩和に機能しうる可能性を示唆している。

Flvの導入はストロマに還元力が過剰蓄積する状況(*pgr5*変異株背景および光合成始動時)に大きな機能を果たす。それではなぜ被子植物はFlvを進化の過程で失ったのであろう？被子植物ではPGR5依存のサイクリック電子伝達が大きな機能を果たす(3、4)。また陸上植物の進化の過程で植物はもう一つのサイクリック電子伝達装置であるNDHの構造と機能を大きく変えた(5、6)。どちらのサイクリック電子伝達もフェレドキシンから電子を受け取る(7)。被子植物は葉緑体レドックス調節のより効率的な装置として2つのサイクリック電子伝達系を進化させ、その過程でFlvを失ったことになる。リニア電子伝達を含め電子分配の制御をフェレドキシンに集中させることが重要だったのかもしれない(図153-8)。フェレドキシンからの電子分配に強い制御をかけることにより、弱光下で無駄にNADPHを失う危険を避けることができる。しかしながら、Flvが還元力が過剰な際にもみ働くように制御できれば、有力なストレス緩和装置に成り得るであろう。

(エ) Flvによるイネ光環境ストレス耐性強化

イネ野生株へのFlvの導入により、本質的にシロイヌナズナ野生株への導入の場合と同様の表現型が観察された。しかし表現型は、イネでは比較的弱いものであった。このことは、前述のように、イネが本来高いwater waterサイクル活性を有する為か

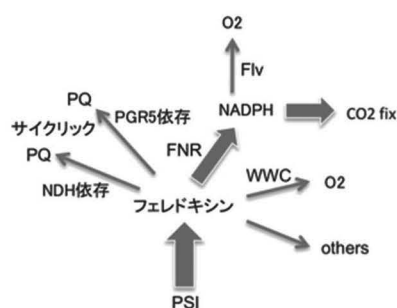


図 153-8 光化学系 I 以降の電子分配

フェレドキシンから受け取った電子は FNR を介して NADP^+ の還元に使われる（主に CO_2 固定に使われる）他、2つのサイクリック電子伝達経路、酸素還元（water water cycle）、窒素固定等にも使われる。Flv は NADPH から電子を受け取ると考えられ、二酸化炭素固定と競合する危険性がある。

もしれない。本研究で観察された表現型が、いかにイネの光環境ストレス耐性強化に寄与するかは、今後の研究が必要である。

オ 今後の課題

（ア）圃場で生育するイネの光合成解析

光合成の昼寝現象の原因を明らかにするには、光化学系 II 以外に、光化学系 I や二酸化炭素の固定など、光合成を複数の点でモニターする必要がある。しかしながら、野外の測定には限界がある。実験室で昼寝現象を再現するか、あるいは野外でのメタボローム解析など異なる技術を組み合わせる必要がある。また本プロジェクトでは、葉緑体での還元力の過剰蓄積に焦点を絞り、Flv の貢献を明らかにした。このタイプの光傷害がどの程度圃場のイネの光合成を下げているのか、解析が必要である。

（イ）イネにおける PGR5 タンパク質依存サイクリック電子伝達の機能解析

イネ、シロイヌナズナに共通して PGR5 欠損による表現型解析の残された問題は、 gH^+ の増加の理由である。これは ATPase の活性化なのか、あるいは光傷害の一種で不可逆的なプロトン漏れであるのか？前者であれば、そのメカニズムはいかなるものなのか？十分なサイクリック電子伝達活性が保証されていれば、ATPase のさらなる活性化は光合成活性を上げる要因に成りうる。今後の極めて重要な研究課題である。

（ウ）Flv による光環境ストレス耐性強化

Flv によりシロイヌナズナ *pgr5* の劇的な表現型の回復が明らかになった。このメカニズムとして、NADPH による酸素の二電子還元が考えられる。残された課題は、この電子伝達の直接的な証明であり、非放射性同位体酸素を用いた酸素還元速度の直接測定が有効である。

（エ）Flv によるイネ光環境ストレス耐性強化

野生型での Flv の効果は、シロイヌナズナほど顕著ではないが、イネでも見られた。変動する光環境での光合成について実験室での詳細な解析が必要である。最終的には、野外での表現型の評価が必須であろう。

カ 要約

（ア）圃場で生育するイネの光合成解析

圃場のイネの光合成、光傷害の進行を周日、季節変動レベルでモニターする系を確立した。

（イ）イネにおける PGR5 タンパク質依存サイクリック電子伝達の機能解析

イネにおいて PGR5 タンパク質依存のサイクリック電子伝達は、葉緑体レドックス恒常性維持に重要な働きを果たしていることを明らかにした。その制御には、チラコイド膜を介したプロトン移動の制御が絡んでいる。

（ウ）Flv による光環境ストレス耐性強化

シロイヌナズナ *pgr5* 変異株背景で、Flv の大きな貢献を示した。また Flv が野生株背景で、光合成始動時に大きな電子シンクになることを明らかにした。

（エ）Flv によるイネ光環境ストレス耐性強化

シロイヌナズナほど顕著ではないが、イネ野生株においても Flv が光合成始動時に電子シンクと成ることを明らかにした。

キ 引用文献

- 1) Ishida, S., Morita, K., Kishine, M., Takabayashi, A., Murakami, R., Takeda, S., Shimamoto, K., Sato, F. and Endo, T. (2011). Allocation of absorbed light energy in PSII to thermal dissipations in the presence or absence of PsbS subunits of rice. *Plant Cell Physiol.* 52, 1822-1831.
- 2) Shikanai, T. (2007). Cyclic electron transport around photosystem I; genetic approaches. *Annu.*

Rev. Plant Biol. 58 : 199-217.

- 3) Nishikawa, Y., Yamamoto, H., Okegawa, Y., Wada, S., Sato, N., Taira, Y., Sugimoto, K., Makino, A. and Shikanai, T. (2012). PGR5-dependent cyclic electron transport around PSI contributes to the redox homeostasis in chloroplasts rather than CO₂ fixation and biomass production in rice. *Plant Cell Physiol.* 53 : 2117-2126.
- 4) Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K., Endo, T., Tasaka, M. and Shikanai, T. (2004). Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature.* 429 : 579-582.
- 5) Peng, L., Fukao, Y., Fujiwara, M., Takami, T. and Shikanai, T. (2009). Efficient operation of NAD (P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in Arabidopsis. *Plant Cell.* 21 : 3623-3640.
- 6) Ueda, M., Kuniyoshi, T., Yamamoto, Y., Sugimoto, K., Ishizaki, K., Kohchi, T., Nishimura, Y. and Shikanai, T. (2012) Composition and physiological function of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Marchantia polymorpha*. *Plant J.* 72 : 683-693.
- 7) Yamamoto, H., Peng, L., Fukao, Y. and Shikanai, T. (2011). An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin-binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in Arabidopsis. *Plant Cell.* 23 : 1480-1493.

研究担当者（鹿内利治*、遠藤剛）

第 2 編 研 究 の 要 約

I 研究年次・予算区分

研究年次：2008 年度～2012 年度

予算区分：農林水産省農林水産技術会議 新農業
展開ゲノムプロジェクト

II 主任研究者

主 査：(独) 農業生物資源研究所

理事長

石毛 光雄

副主査：(独) 農業生物資源研究所

理事

佐々木卓治 (2008 ～ 2010 年度)

廣近 洋彦 (2011 ～ 2012 年度)

推進リーダー：(独) 農業生物資源研究所

耐病性作物研究開発ユニット

上級研究員

南 栄一

III 研究担当機関

独立行政法人 農業生物資源研究所

(委託先) 国立大学法人 東北大学

(委託先) 国立大学法人 名古屋大学

(委託先) 学校法人 東京農業大学

(委託先) 国立大学法人 三重大学

(委託先) 国立大学法人 奈良先端科学技術大学
院大学

(委託先) 財団法人 岩手生物工学研究センター

IV 研究目的

1 イネと微生物の遺伝子ネットワークの解明

菌根共生過程全般における CSP の関与を解明するとともにマメ科植物において存在が予想されている菌根共生特異的経路の分子の実体を解明する。また、CSP とは独立または上位で菌根共生を支配する新規遺伝子の単離を試み菌根共生における養分効率利用に関わるイネ遺伝子ネットワークを解明する。CSP により着生・増殖が制御されるエンドファイト等を単離することにより、エンドファイト共生における CSP の関与を明らかにする。また、イネに成長促進等の有用形質を付与するエンドファイト

についてその定着・増殖に関わる遺伝子をイネとエンドファイト両方で単離・同定し、エンドファイトの働きによる養分効率利用に関わるイネ遺伝子ネットワークの全体像を、エンドファイトの知見とあわせて解明する。

2 イネと病原微生物の遺伝子ネットワークの解明

イネいもち病菌による MAMPs 提示回避機構の解析、いもち病菌エフェクターがイネの抵抗性を抑制する機構の解析を実施し、これらのいもち病菌の感染戦略に応答するイネの遺伝子ネットワークをイネいもち病菌の視点も加味して明らかにする。圃場抵抗性遺伝子の性状と作用機構の解析、誘導抵抗性の中核を担う転写因子の機能発現機構の解析、エンドファイト共生による誘導抵抗性機構の解析、いもち病菌の MAMPs のシグナル伝達機構を通じて非特異的ないもち病抵抗性に関わる遺伝子ネットワークを解明する。遺伝学的手法による耐病性関連遺伝子群の同定と機能解析、シグナル伝達因子を足がかりとした耐病性に関わるタンパク質複合体の生化学、細胞学的解析により真性抵抗性遺伝子の起動から抵抗性発動に至る経路の全体像を解明する。

V 研究方法

1 イネと微生物の遺伝子ネットワークの解明

マメ科植物で菌根共生と根粒共生の両方に関わる遺伝子のイネオルソログ候補について、対応するマメ変異系統での相補試験を行う。菌根共生の効率を上位で支配する遺伝子の同定をめざしてイネコアコレクション等における菌根共生の品種間差異の検出法を検討する。イネ根圏エンドファイトの群集構造解析を行い、エンドファイト共生に関わるイネ遺伝子の同定をめざすとともに、栽培条件等によってポピュレーションが変化するエンドファイトの同定を行う。農業上有用なエンドファイトについて植物体着生後の形質発現機構を分子生物学的に明らかにする。

2 イネと病原微生物の遺伝子ネットワークの解明

ミュータントパネル等を利用した逆遺伝学的手法によりいもち病抵抗性に関わる新規遺伝子を単離・同定する。いもち病圃場抵抗性遺伝子の作用機構を明らかにして実用化の可能性を検討する。低分子量Gタンパク質をコアとするイネの抵抗性シグナル伝達機構をタンパク質間相互作用やタンパク質活性化の

可視化技術の開発等により明らかにする。イネの誘導抵抗性の中核因子の作用機構を明らかにし、実用面でのさらなる性能向上への適用を検討する。いもち病菌の初期感染過程における細胞表層の変化や遺伝子発現の解析から、イネの抵抗性回避に関わるいもち病菌の戦略を通じてイネの防御機構の欠陥を明らかにし、新規抵抗性付与戦略の基盤的知識を得る。

研究計画表（研究室別年次計画）

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	08	09	10	11	12	機関	研究室
2 イネと微生物の遺伝子ネットワークの解明							
(1) イネと微生物の遺伝子ネットワークの解明							
1) イネ・菌根菌共生系の感染応答過程を制御する遺伝子ネットワークの解明 (PMI0001)	←				→	農業生物資源研究所	植物共生機構研究ユニット
2) エンドファイトイネの共生相互作用の解明 (PMI0002)	←				→	東北大学	生命科学研究科・地圏共生遺伝生体分野
3) イネにおける菌根共生品種間差とその分子的基盤 (PMI0003)	←				→	名古屋大学	生命農学研究科・作物科学研究分野
4) イネー細菌エンドファイト相互作用に働くイネ遺伝子の同定と機能解明 (PMI0004)	←				→	東京農業大学	生物応用化学科・生物制御化学
2 イネと病原微生物の遺伝子ネットワークの解明							
1) 病害抵抗性関連遺伝子の単離と遺伝子間ネットワークの解明 (PMI0005)	←				→	農業生物資源研究所	耐病性作物研究開発ユニット
2) いもち病菌感染初期の菌糸伸長を抑制するイネ圃場抵抗性遺伝子の単離と機能解明 (PMI0006)	←				→	三重大学	生命科学研究支援センター・植物機能ゲノミクス部門

3) 耐病性シグナル伝達に関わるタンパク質複合体の機能解明 (PMI0007)	←					奈良先端科学技術大学院大学	バイオサイエンス研究科・植物分子遺伝学講座
4) イネの誘導抵抗性におけるシグナルネットワーク解明 (PMI0008)	←					農業生物資源研究所	耐病性作物研究開発ユニット
5) 感染初期におけるイネといもち病菌相互作用の解明 (PMI0009)	←					農業生物資源研究所	植物・微生物間相互作用研究ユニット
6) いもち病菌エフェクタータンパク質によるイネ耐病性発現調節機構の解明 (PMI0010)	←					岩手生物工学研究センター	生命科学研究部・遺伝学ゲノム学研究分野

注) 文中の図、表、写真に付した番号は、上記研究課題番号とその中の一連番号を組合せて表示してある。
(例: 2—(1)—1) の課題の 1 番目の図の場合は、図 211-1 と表示)

VI 研究結果

1 イネと微生物の遺伝子ネットワークの解明

マメ科の菌根共生および根粒共生に必須な CSP 遺伝子群のイネオルソログ候補がモデルマメ科であるミヤコグサの変異体においても機能すること、イネの菌根着生およびそれによる生育効果に品種間差異が認められること、イネ CSP 経路がイネ根エンドファイトの群集構造制御に深くかかわる可能性等が示された。また栽培条件に対応するイネ根圏のエンドファイト群集構造変化をメタゲノム手法で解析し、水田からのメタン産生制御等に関わるエンドファイトの同定に向けての重要な知見を得ることができた。

2 イネと病原微生物の遺伝子ネットワークの解明

イネいもち病抵抗性に関わる遺伝子単離・同定を既知の鍵因子を手掛かりとして展開し、OsPtila、OsRac1、OsWRKY45 を中心とする遺伝子ネットワークの解明を推進し、当該分野において新しい知見をもたらすとともに、強力な抵抗性付与能力を持つ遺伝子を多数同定した。また、イネといもち病菌の相互作用を菌側からの視点で解析することによってイネの防御システムの弱点を明らかにするという新しいアプローチも試み、いもち病菌がイネ侵入時に

イネが分解できない α -1,3-グルカンで表層を被覆し、イネのキチナーゼや β グルカナーゼによる攻撃を回避することを見出した。これらの成果は、微生物の力を利用した作物の成長促進や病害防除、またバイオテクノロジーによる強力かつ安定した耐病性付与戦略の基盤的知見をもたらすものと期待される。

VII 今後の課題

イネと土壤微生物との相互作用研究は本研究において本格的に分子のアプローチが始まったものであり、微生物との共生的相互作用に関わるイネ遺伝子の利用技術の開発や、新たに見出された農業上有用な可能性がある微生物の生態学的特性の解析などは引き続き研究を続行する必要がある。また、イネいもち病の研究から得られた、抵抗性に関わるイネの遺伝子ネットワーク解明からは複数の抵抗性付与遺伝子が同定されたが、今後はそれらを遺伝子組換え技術等を利用した抵抗性育種にどのように応用していくかについての検討が必要である。

VIII 研究発表

原著論文

- 1) Y. Kobayashi, I. Kobayashi. Microwounding is a pivotal factor for the induction of actin-dependent penetration resistance against fungal

- attack. *Planta*, (2013). 237 (5), 1187-1198.
- 2) Ryohei Terauchi, Akira Abe, Hiroki Takagi, Kentaro Yoshida, Shunichi Kosugi, Satoshi Natsume, Hiroki Yaegashi, Hiroyuki Kanzaki, Hideo Matsumura, Chikako Mitsuoka, Hiroe Utsushi, Muluneh Tamiru. Whole genome sequencing and future breeding of rice. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 21 (1), S10-S14 (2012).
- 3) MJ. Wamaitha, R. Yamamoto, HL. Wong, T. Kawasaki, Y. Kawano, K. Shimamoto. OsRap2.6 transcription factor contributes to rice innate immunity through its interaction with Receptor for Activated Kinase-C 1 (RACK1). *Rice*. 5, 35 (2012).
- 4) C. J. Jiang, M. Shimono, S. Sugano, M. Kojima, X. Liu, H. Inoue, H. Sakakibara, H. Takatsuji. Cytokinins act synergistically with salicylic acid to activate defense gene expression in rice. *Mol Plant Microbe Interact*. 26 (3), 287-296 (2013).
- 5) T. Sisaphaithong, D. Kondo, H. Matsunaga, Y. Kobae, S. Hata. Expression of plant genes for arbuscular mycorrhiza-inducible phosphate transporters and fungal vesicle formation in sorghum, barley, and wheat roots. *Biosci Biotechnol Biochem* 76 (12), 2364-2367 (2012).
- 6) A. Matsushita, H. Inoue, S. Goto, A. Nakayama, S. Sugano, N. Hayashi, H. Takatsuji. The nuclear ubiquitin proteasome degradation affects WRKY45 function in the rice defense program. *Plant J* , 73, 302-313 (2012).
- 7) J. R. Undan, M. Tamiru, A. Abe, K. Yoshida, S. Kosugi, H. Takagi, H. Kanzaki, H. Saitoh, R. Fekih, S. Sharma, J. Undan, M. Yano, R. Terauchi. Mutation in OsLMS, a gene encoding a protein with two double-stranded RNA binding motifs, causes lesion mimic phenotype and early senescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Genes Genet Syst* 87 (3), 169-179 (2012).
- 8) T. Fujikawa, A. Sakaguchi, Y. Nishizawa, Y. Kouzai, E. Minami, S. Yano, H. Koga, T. Meshi, M. Nishimura. Surface alpha-1,3-Glucan Facilitates Fungal Stealth Infection by Interfering with Innate Immunity in Plants. *PLoS Pathog* 8 (8), e1002882 (2012).
- 9) H. Kanzaki, K. Yoshida, H. Saitoh, K. Fujisaki, A. Hirabuchi, L. Alaux, E. Fournier, D. Tharreau, R. Terauchi. Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions. *Plant J* , in press (2012).
- 10) T. Okubo, S. Ikeda, A. Yamashita, K. Terasawa, K. Minamisawa. Pyrosequence read length of 16S rRNA gene affects phylogenetic assignment of plant-associated bacteria. *Microbes Environ* 27 (2), 204-208 (2012).
- 11) H. Saitoh, S. Fujisawa, C. Mitsuoka, A. Ito, A. Hirabuchi, K. Ikeda, H. Irieda, K. Yoshino, K. Yoshida, H. Matsumura, Y. Tosa, J. Win, S. Kamoun, Y. Takano, R. Terauchi. Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. *PLoS Pathog* 8 (5), e1002711 (2012).
- 12) S. Takahashi, S. Kimura, H. Kaya, A. Iizuka, H. L. Wong, K. Shimamoto, K. Kuchitsu. Reactive oxygen species production and activation mechanism of the rice NADPH oxidase OsRbohB. *J Biochem* 152 (1), 37-43 (2012).
- 13) T. Okubo, T. Tsukui, H. Maita, S. Okamoto, K. Oshima, T. Fujisawa, A. Saito, H. Futamata, R. Hattori, Y. Shimomura, S. Haruta, S. Morimoto, Y. Wang, Y. Sakai, M. Hattori, S. Aizawa, K. V. Nagashima, S. Masuda, T. Hattori, A. Yamashita, Z. Bao, M. Hayatsu, H. Kajiya-Kanegae, I. Yoshinaga, K. Sakamoto, K. Toyota, M. Nakao, M. Kohara, M. Anda, R. Niwa, P. Jung-Hwan, R. Sameshima-Saito, S. Tokuda, S. Yamamoto, T. Yokoyama, T. Akutsu, Y. Nakamura, Y. Nakahira-Yanaka, Y. Takada Hoshino, H. Hirakawa, H. Mitsui, K. Terasawa, M. Itakura, S. Sato, W. Ikeda-Ohtsubo, N. Sakakura, E. Kaminuma, K. Minamisawa. Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. S23321 : insights into symbiosis evolution in soil oligotrophs. *Microbes Environ* 27 (3), 306-315

- (2012).
- 14) S. H. Kim, T. Oikawa, J. Kyojuka, H. L. Wong, K. Umemura, M. Kishi-Kaboshi, A. Takahashi, Y. Kawano, T. Kawasaki, K. Shimamoto. The bHLH Rac Immunity1 (RAI1) Is Activated by OsRac1 via OsMAPK3 and OsMAPK6 in Rice Immunity. *Plant Cell Physiol* 53 (4), 740-754 (2012).
 - 15) N. Takeda, T. Maekawa, M. Hayashi. Nuclear-localized and deregulated calcium- and calmodulin-dependent protein kinase activates rhizobial and mycorrhizal responses in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 24 (2), 810-822 (2012).
 - 16) A. Abe, S. Kosugi, K. Yoshida, S. Natsume, H. Takagi, H. Kanzaki, H. Matsumura, C. Mitsuoka, M. Tamiru, H. Innan, L. Cano, S. Kamoun, R. Terauchi. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat Biotechnol* 30 (2), 174-178 (2012).
 - 17) M. Shimono, H. Koga, A. Akagi, N. Hayashi, S. Goto, M. Sawada, T. Kurihara, A. Matsushita, S. Sugano, C. J. Jiang, H. Kaku, H. Inoue, H. Takatsuji. Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterial disease resistance. *Mol Plant Pathol* 13 (1), 83-94 (2012).
 - 18) Katsumi Yazawa, Chang-Jie Jiang, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Hiroshi Takatsuji. Reduction of abscisic acid levels or inhibition of abscisic acid signaling in rice during the early phase of *Magnaporthe grisea* infection decreases its susceptibility to the fungus. *Physiol Mol Plant Pathol* 78, 1-7 (2012).
 - 19) J. Hirayama, S. Eda, H. Mitsui, K. Minamisawa. Nitrate-dependent N₂O emission from intact soybean nodules via denitrification by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *Appl Environ Microbiol* 77 (24), 8787-8790 (2011).
 - 20) S. Ikeda, T. Okubo, N. Takeda, M. Banba, K. Sasaki, H. Imaizumi-Anraku, S. Fujihara, Y. Ohwaki, K. Ohshima, Y. Fukuta, S. Eda, H. Mitsui, M. Hattori, T. Sato, T. Shinano, K. Minamisawa. The genotype of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene (CCaMK) determines bacterial community diversity in rice roots under paddy and upland field conditions. *Appl Environ Microbiol* 77 (13), 4399-4405 (2011).
 - 21) M. Anda, S. Ikeda, S. Eda, T. Okubo, S. Sato, S. Tabata, H. Mitsui, K. Minamisawa. Isolation and genetic characterization of *Aurantimonas* and *Methylobacterium* strains from stems of hypernodulated soybeans. *Microbes Environ* 26 (2), 172-180 (2011).
 - 22) Y. Okuyama, H. Kanzaki, A. Abe, K. Yoshida, M. Tamiru, H. Saitoh, T. Fujibe, H. Matsumura, M. Shenton, D. C. Galam, J. Undan, A. Ito, T. Sone, R. Terauchi. A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice Pia-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *Plant J* 66 (3), 467-479 (2011).
 - 23) S. Ikeda, M. Anda, S. Inaba, S. Eda, S. Sato, K. Sasaki, S. Tabata, H. Mitsui, T. Sato, T. Shinano, K. Minamisawa. Autoregulation of nodulation interferes with impacts of nitrogen fertilization levels on the leaf-associated bacterial community in soybeans. *Appl Environ Microbiol* 77 (6), 1973-1980 (2011).
 - 24) Letian Chen, Ko Shimamoto. Emerging roles of molecular chaperones in plant innate immunity. *J. Gen. Plant Pathol.* 77 (1), 409-17 (2011).
 - 25) H. Matsui, A. Miyao, A. Takahashi, H. Hirochika. Pdk1 kinase regulates basal disease resistance through the OsOx1l-OsPtila phosphorylation cascade in rice. *Plant Cell Physiol* 51 (12), 2082-2091 (2010).
 - 26) C. J. Jiang, M. Shimono, S. Sugano, M. Kojima, K. Yazawa, R. Yoshida, H. Inoue, N. Hayashi, H. Sakakibara, H. Takatsuji. Abscisic Acid Interacts Antagonistically with Salicylic Acid Signaling Pathway in Rice-Magnaporthe grisea Interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 23(6), 791-798 (2010).
 - 27) S. Masuda, S. Eda, C. Sugawara, H. Mitsui, K. Minamisawa. The cbbL gene is required for thiosulfate-dependent autotrophic growth of *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbes Environ.* 25, 220-223 (2010).
 - 28) T. Isawa, M. Yasuda, H. Awazaki, K.

- Minamisawa, S. Shinozaki, H. Nakshita. *Azospirillum* sp. strain B510 enhances rice growth and yield. *Microbes Environ.* 25, 58-56 (2010).
- 29) K. Sasaki, S. Ikeda, S. Eda, H. Mitsui, E. Hanzawa, C. Kisara, Y. Kazawa, A. Kushida, T. Shinano, K. Minamisawa, T. Sato. Impacts of plant genotype and nitrogen level on rice growth response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510 under paddy field conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 56(4), 636-644 (2010).
- 30) S. Ikeda, T. Kaneko, T. Okubo, L. E. Rallos, S. Eda, H. Mitsui, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, K. Minamisawa. Development of a bacterial cell enrichment method and its application to the community analysis in soybean stems. *Microb Ecol* 58 (4), 703-714 (2009)
- 31) T. Fujikawa, Y. Kuga, S. Yano, A. Yoshimi, T. Tachiki, K. Abe, M. Nishimura. Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Mol Microbiol* 73 (4), 553-570 (2009).
- 32) C. J. Jiang, M. Shimono, S. Maeda, H. Inoue, M. Mori, M. Hasegawa, S. Sugano, H. Takatsuji. Suppression of the rice fatty-acid desaturase gene *OsSSI2* enhances resistance to blast and leaf blight diseases in rice. *Mol Plant Microbe Interact* 22 (7), 820-829 (2009).
- 33) M. Fujiwara, S. Hamada, M. Hiratsuka, Y. Fukao, T. Kawasaki, K. Shimamoto. Proteome analysis of detergent-resistant membranes (DRMs) associated with *OsRac1*-mediated innate immunity in rice. *Plant Cell Physiol* 50(7), 1191-1200 (2009).
- 34) K. Yoshida, H. Saitoh, S. Fujisawa, H. Kanzaki, H. Matsumura, K. Yoshida, Y. Tosa, I. Chuma, Y. Takano, J. Win, S. Kamoun, R. Terauchi. Association Genetics Reveals Three Novel Avirulence Genes from the Rice Blast Fungal Pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* 21 (5), 1573-1591 (2009).
- 35) S. A. Hogenhout, R. A. L. Van der Hoorn, R. Terauchi, S. Kamoun. Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Mol Plant Microbe Interact* 22(2), 115-122(2009).
- 36) A. Krishnan, E. Guiderdoni, G. An, Y. I. Hsing, C. D. Han, M. C. Lee, S. M. Yu, N. Upadhyaya, S. Ramachandran, Q. Zhang, V. Sundaresan, H. Hirochika, H. Leung, A. Pereira. Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses. *Plant Physiol* 149 (1), 165-170 (2009).
- 37) Y. Takahashi, T. Berberich, H. Kanzaki, H. Matsumura, H. Saitoh, T. Kusano, R. Terauchi. Serine Palmitoyltransferase, the First Step Enzyme in Sphingolipid Biosynthesis, Is Involved in Nonhost Resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 22 (1), 31-38 (2009).
- 38) M. Yoshii, T. Shimizu, M. Yamazaki, T. Higashi, A. Miyao, H. Hirochika, T. Omura. Disruption of a novel gene for a NAC-domain protein in rice confers resistance to Rice dwarf virus. *Plant J* 57 (4), 615-625 (2009).
- 39) T. Ohkubo, S. Ikeda, T. Kaneko, S. Eda, H. Mitsui, S. Sato, S. Tabata, K. Minamisawa. Nodulation-dependent communities of culturable bacteria endophytes from stems of field-grown soybeans. *Microbes Environ* 24 (3), 253-258 (2009).
- 40) C. Gutjahr, M. Banba, V. Croset, K. An, A. Miyao, G. An, H. Hirochika, H. Imaizumi-Anraku, U. Paszkowski. Arbuscular mycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *Plant Cell* 20 (11), 2989-3005 (2008).
- 41) M. Banba, C. Gutjahr, A. Miyao, H. Hirochika, U. Paszkowski, H. Kouchi, H. Imaizumi-Anraku. Divergence of evolutionary ways among common sym genes : *CASTOR* and *CCaMK* show functional conservation between two symbiosis systems and constitute the root of a common signaling pathway. *Plant Cell Physiol* 49 (11), 1659-1671 (2008).
- 42) T. Oda, H. Hashimoto, N. Kuwabara, K. Hayashi, C. Kojima, T. Kawasaki, K. Shimamoto, M. Sato, T. Shimizu. Crystallographic characterization of the N-terminal domain of a

- plant NADPH oxidase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64 (Pt 9), 867-869 (2008).
- 43) A. Nakashima, L. Chen, N. P. Thao, M. Fujiwara, H. L. Wong, M. Kuwano, K. Umemura, K. Shirasu, T. Kawasaki, K. Shimamoto. RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell* 20(8), 2265-2279 (2008).
 - 44) H. Kanzaki, H. Saitoh, Y. Takahashi, T. Berberich, A. Ito, S. Kamoun, R. Terauchi. NbLRK1, a lectin-like receptor kinase protein of *Nicotiana benthamiana*, interacts with *Phytophthora infestans* INF1 elicitor and mediates INF1-induced cell death. *Planta* 228 (6), 977-987 (2008).
 - 45) S. Ikeda, L. E. Rallos, T. Okubo, S. Eda, S. Inaba, H. Mitsui, K. Minamisawa. Microbial community analysis of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes. *Appl Environ Microbiol* 74 (18), 5704-5709 (2008).
 - 46) S. Masuda, S. Eda, S. Ikeda, H. Mitsui, K. Minamisawa. Thiosulfate-dependent chemolithoautotrophic growth of *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl Environ Microbiol* 76 (8), 2402-2409 (2010).
 - 47) M. Yasuda, T. Isawa, S. Shinozaki, K. Minamisawa, H. Nakashita. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. *Biosci Biotechnol Biochem* 73 (12), 2595-2599 (2009).
 - 48) A. Takahashi, N. Hayashi, A. Miyao, H. Hirochika. Unique features of the rice blast resistance *Pish* locus revealed by large scale retrotransposon-tagging. *BMC Plant Biol* 10, 175 (2010).
 - 49) L. Chen, S. Hamada, M. Fujiwara, T. Zhu, N. P. Thao, H. L. Wong, P. Krishna, T. Ueda, H. Kaku, N. Shibuya, T. Kawasaki, K. Shimamoto. The Hop/Stil-Hsp90 chaperone complex facilitates the maturation and transport of a PAMP receptor in rice innate immunity. *Cell Host Microbe* 7 (3), 185-196 (2010).
 - 50) Y. Kawano, A. Akamatsu, K. Hayashi, Y. Housen, J. Okuda, A. Yao, A. Nakashima, H. Takahashi, H. Yoshida, H. L. Wong, T. Kawasaki, K. Shimamoto. Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease resistance protein Pit plays a critical role in rice innate immunity. *Cell Host Microbe* 7 (5), 362-375 (2010).
 - 51) K. Yokota, M. Hayashi. Function and evolution of nodulation genes in legumes. *Cell Mol Life Sci* 68 (8), 1341-1351 (2011).
 - 52) T. Kaneko, K. Minamisawa, T. Isawa, H. Nakatsukasa, H. Mitsui, Y. Kawaharada, Y. Nakamura, A. Watanabe, K. Kawashima, A. Ono, Y. Shimizu, C. Takahashi, C. Minami, T. Fujishiro, M. Kohara, M. Katoh, N. Nakazaki, S. Nakayama, M. Yamada, S. Tabata, S. Sato. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. *DNA Res* 17 (1), 37-50 (2010).
 - 53) S. Ikeda, T. Okubo, T. Kaneko, S. Inaba, T. Maekawa, S. Eda, S. Sato, S. Tabata, H. Mitsui, K. Minamisawa. Community shifts of soybean stem-associated bacteria responding to different nodulation phenotypes and N levels. *Isme J* 4 (3), 315-326 (2010).
 - 54) T. Oda, H. Hashimoto, N. Kuwabara, S. Akashi, K. Hayashi, C. Kojima, H. L. Wong, T. Kawasaki, K. Shimamoto, M. Sato, T. Shimizu. Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *J Biol Chem* 285 (2), 1435-1445 (2010).
 - 55) T. Fujiwara, S. Maisonneuve, M. Isshiki, M. Mizutani, L. Chen, H. L. Wong, T. Kawasaki, K. Shimamoto. Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *J Biol Chem* 285 (15), 11308-11313 (2010).
 - 56) R. Terauchi, K. Yoshida. Towards population genomics of effector-effector target interactions. *New Phytol* 187 (4), 929-939 (2010).
 - 57) H. Kouchi, H. Imaizumi-Anraku, M. Hayashi, T. Hakoyama, T. Nakagawa, Y. Umehara, N. Suganuma, M. Kawaguchi. How many peas in a

- pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant Cell Physiol* 51 (9), 1381-1397 (2010).
- 58) K. Yokota, T. Soyano, H. Kouchi, M. Hayashi. Function of GRAS proteins in root nodule symbiosis is retained in homologs of a non-legume, rice. *Plant Cell Physiol* 51 (9), 1436-1442 (2010).
- 59) Y. Kobae, S. Hata. Dynamics of periarbuscular membranes visualized with a fluorescent phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal roots of rice. *Plant Cell Physiol* 51 (3), 341-353 (2010).
- 60) S. Ikeda, T. Okubo, M. Anda, H. Nakashita, M. Yasuda, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, S. Eda, A. Momiyama, K. Terasawa, H. Mitsui, K. Minamisawa. Community- and genome-based views of plant-associated bacteria : plant-bacterial interactions in soybean and rice. *Plant Cell Physiol* 51 (9), 1398-1410 (2010).
- 61) L. Chen, K. Shiotani, T. Togashi, D. Miki, M. Aoyama, H. L. Wong, T. Kawasaki, K. Shimamoto. Analysis of the Rac/Rop small GTPase family in rice : expression, subcellular localization and role in disease resistance. *Plant Cell Physiol* 51 (4), 585-595 (2010).
- 62) H. Matsui, M. Yamazaki, M. Kishi-Kaboshi, A. Takahashi, H. Hirochika. AGC kinase OsOx1 positively regulates basal resistance through suppression of OsPtila-mediated negative regulation. *Plant Cell Physiol* 51 (10), 1731-1744 (2010).
- 63) M. Kishi-Kaboshi, K. Okada, L. Kurimoto, S. Murakami, T. Umezawa, N. Shibuya, H. Yamane, A. Miyao, H. Takatsuji, A. Takahashi, H. Hirochika. A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. *Plant J* 63 (4), 599-612 (2010).
- 64) M. Yoshii, M. Yamazaki, R. Rakwal, M. Kishi-Kaboshi, A. Miyao, H. Hirochika. The NAC transcription factor RIM1 of rice is a new regulator of jasmonate signaling. *Plant J* 61 (5), 804-815 (2010).
- 65) T. Hayashi, M. Banba, Y. Shimoda, H. Kouchi, M. Hayashi, H. Imaizumi-Anraku. A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant J* 63 (1), 141-154 (2010).
- 66) S. Sugano, C. J. Jiang, S. Miyazawa, C. Masumoto, K. Yazawa, N. Hayashi, M. Shimono, A. Nakayama, M. Miyao, H. Takatsuji. Role of OsNPR1 in rice defense program as revealed by genome-wide expression analysis. *Plant Mol Biol* 74 (6), 549-562 (2010).
- 67) M. Kishi-Kaboshi, A. Takahashi, H. Hirochika. MAMP-responsive MAPK cascades regulate phytoalexin biosynthesis. *Plant Signal Behav* 5 (12), 1653-1656 (2010).
- 68) Okubo, T, Fukushima, S., Itakura, M., Oshima, K., Longtonglang, A., Teaumroong, N., Mitsui, H., Hattori, M., Hattori, R., Hattori, T., and Minamisawa, K. Soil oligotrophic bacterium *Agromonas oligotrophica* (*Bradyrhizobium oligotrophicum*) is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica* as suggested by genome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (8), 2542-2551 (2013).
- 69) Tsukui, T., S. Eda, T. Kaneko, S. Sato, S. Okazaki, K. Kakizaki-Chiba, M. Itakura, H. Mitsui, A. Yamashita, K. Terasawa, and K. Minamisawa. The type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 mediates symbiotic incompatibility with Rj2 soybean. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1048-1051 (2012).
- 70) Okubo, T., S. Fukushima, and K. Minamisawa. Evolution of *Bradyrhizobium*-*Aeschynomene* mutualism : Living testimony of the ancient world or highly evolved state? *Plant Cell Physiol.* 53 (12), 2000-2007 (2012).
- 71) Y. Kawano, L. Chen, K. Shimamoto. The Function of Rac Small GTPase and Associated Proteins in Rice Innate Immunity. *Rice.* 3, 112-121 (2010).

総 説

- 1) 高辻博志, 霜野真幸, 菅野正治, 姜昌杰, 中山明, 林長生 (2008). イネの誘導抵抗性に関わる分子機構の解明とその利用 植物感染生理談話会論文集 44 1-10.
- 2) Y. Takahashi, T. Berberich, H. Kanzaki, H. Matsumura, H. Saitoh, T. Kusano, R. Terauchi (2009). Unraveling the roles of sphingolipids in plant innate immunity. *Plant Signal Behav.* 4 (6) 536-538.
- 3) 高辻博志 (2008). 誘導抵抗性に関わる転写因子 WRKY45 の発見とその利用 プレインテクノニュース 125 1-7
- 4) 高辻博志 (2008). イネの誘導抵抗性に関わる転写因子 WRKY45 の発見とその利用 植物防疫 62 (7) 29-32
- 5) Y. Fu, T. Kawasaki, K. Shimamoto, Z. Yin (2008). ROP/RAC GTPases *Ann. Plant Reviews* 33 64-99.
- 6) 高辻博志 (2008). イネの誘導抵抗性に主要な役割を果たす転写因子 WRKY45 化学と生物 46 (5) 300-301.
- 7) 西村麻里江, 藤川貴史, 吉見啓, 阿部敬悦 (2009). 糸状菌における細胞壁構築シグナル化学と生物 47 (12) 871-877.
- 8) 高辻博志 (2009). イネの誘導抵抗性の分子機構—サリチル酸シグナル伝達経路の解明とその利用に向けて— 日本農薬学会誌 34 (4) 330-334.
- 9) 西村麻里江, 藤川貴史 (2010). 病原性カビの「ステルス戦略」—植物の免疫システムからの回避と感染 ニューカントリー 675 76-77.
- 10) 藤川貴史, 西村麻里江 (2010). 植物の免疫システムをかいぐる, 病原性カビの「ステルス戦略」植物防疫 64 (11) 34-38.
- 11) 藤川貴史, 西村麻里江 (2010). いもち病菌の植物感染過程におけるステルス戦略—細胞壁 α -1, 3-グルカンの新たな役割— バイオサイエンスとインダストリー 68 109-112
- 12) H. Takatsuji, C.-J. Jiang, S. Sugano T. (2010). Salicylic Acid Signaling Pathway in Rice and the Potential Applications of Its Regulators *JARQ* 44 (3) 217-223.
- 13) Y. Kawano, L. Chen, K. Shimamoto (2010). The Function of Rac Small GTPase and Associated Proteins in Rice Innate Immunity *Rice* 3 (2-3) 112-121.
- 14) S. Hata, Y. Kobae, M. Banba (2010). Interactions between plants and arbuscular mycorrhizal fungi *Int Rev Cell Mol Biol* 281 1-48.
- 15) M. Kawaguchi, K. Minamisawa (2010). Plant-microbe communications for symbiosis *Plant Cell Physiol* 51 (9) 1377-1380.
- 16) S. Ikeda, T. Okubo, M. Anda, H. Nakashita, M. Yasuda, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, S. Eda, A. Momiyama, K. Terasawa, H. Mitsui, K. Minamisawa (2010). Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: plant-bacterial interactions in soybean and rice *Plant Cell Physiol* 51 (9) 1398-1410.
- 17) R. Terauchi, K. Yoshida, H. Saitoh, H. Kanzaki, Y. Okuyama, K. Fujisaki, K. Miya, A. Abe, M. Tamiru, Y. Tosa (2011). Studying genome-wide DNA polymorphisms to understand Magnaporthe-rice interactions *Australasian Plant Pathol* 40 (4) 328-334.
- 18) L. Chen, K. Shimamoto (2011). Emerging roles of molecular chaperones in plant innate immunity *J. Gen. Plant Pathol.* 77 (1) 1-9.
- 19) S. Ishii, S. Ikeda, K. Minamisawa, K. Senoo (2011). Nitrogen cycling in rice paddy environments: past achievements and future challenges *Microbes Environ* 26 (4) 282-292.
- 20) 西村麻里江 (2012). 宿主免疫を回避する病原性糸状菌のステルス戦略 感染生理談話会論文集 47 87-94.

その他の出版物

- 1) 高辻博志 (2008). 誘導抵抗性に関わる転写因子 WRKY45 の発見とその利用 *STAFF Nesletter* 19 (5) 7.
- 2) 高辻博志 (2008). 複数の病害に対する極めて強い抵抗性を与えるイネの遺伝子 WRKY45 の発見とその利用 農林水産技術研究ジャーナル 31 (3) 8-10.
- 3) 西村麻里江 (2010). 植物の免疫システムをかいぐる, 病原性カビの「ステルス戦略」 農林水産

IX 特許取得・申請

- 1) 「植物に対する微生物の感染を防止又は抑制する方法及び微生物感染抵抗性植物」(特願 2009-062350)
西村麻里江、南栄一、光原一郎、西澤洋子、藤川貴史
- 2) 「病害ストレス及び病害抵抗性誘導剤に対する応答性を示す核酸構築物」(特願 2011-097346)
姜 昌杰、高辻 博志、藤岡 智則、角 康一郎、清水 力
- 3) 「農業形質を最適化した複合病害抵抗性単子葉植物」(特願 2011-052531)
高辻 博志・後藤 新悟

X 研究担当者

- 1—1 イネ・菌根菌共生系の感染応答過程を制御する遺伝子ネットワークの解明
独立行政法人農業生物資源研究所
今泉温子*、林誠、下田宜司
- 1—2 エンドファイト・イネの共生相互作用の解明
国立大学法人東北大学
南澤究*、佐藤雅志
- 1—3 イネにおける菌根共生品種間差とその分子的基盤
国立大学法人名古屋大学
畑信吾*
- 1—4 イネー細菌エンドファイト相互作用に働くイネ遺伝子の同定と機能解明
学校法人東京農業大学
仲下英雄*
- 2—1 病害抵抗性関連遺伝子の単離と遺伝子間ネットワークの解明
独立行政法人農業生物資源研究所
高橋章*
- 2—2 いもち病菌感染初期の菌糸伸長を抑制するイネ圃場抵抗性遺伝子の単離と機能解明
国立大学法人三重大学
小林一成*
- 2—3 耐病性シグナル伝達に関わるタンパク質複合体の機能解明

国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学
島本功、河野洋治

- 2—4 イネの誘導抵抗性におけるシグナル・ネットワーク解明
独立行政法人農業生物資源研究所
高辻博志*
- 2—5 感染初期におけるイネといもち病菌相互作用の解明
独立行政法人農業生物資源研究所
西村麻里江*
- 2—6 いもち病菌エフェクタータンパク質によるイネ耐病性発現調節機構の解明
財団法人岩手生物工学研究センター
寺内良平*

(*執筆者)

XI 取りまとめ責任者あとがき

作物は野外での栽培環境下において様々な微生物と相互作用している。作物の生育に影響するものはそのうちごく限られた種類と考えられるが、それでもなおその全貌の解明にはほど遠い状況にある。そういう背景のもと、イネをモデルとしてそれと共生的または病理的に相互作用する微生物に対する応答に関わるネットワーク解明をめざす本中課題が5年前に立ち上げられたことは、わが国における当該分野の研究の歴史の中で画期的なことであった。本中課題では共生微生物として菌根共生が、さらにその一般系としてエンドファイト共生が取り上げられた。菌根共生はイネでも観察され、それに関わる遺伝子群がイネでも保存されていることを手掛かりに、それらの遺伝子が他の根圏エンドファイト共生にも重要であることを強く示唆する結果や、マメ科植物における共生窒素固定においても機能を補完する能力をもつという結果を得た。またこれらとは別に農業上有用なエンドファイトの単離に向けた手法が整備され、それを用いて有用微生物候補の同定に向けた手掛かりを得ることができた点は特筆すべき成果である。一方病理的相互作用の実験系として用いたイネいもち病とイネとの相互作用研究においては、局所的な抵抗性、全身的な抵抗性に関わるネットワークの解明が進捗し、これら両者をつなぐ因子が同定されるとともに、その過程で強い抵抗性を付与できる遺伝子の単離・同定に成功してきた。さら

には病原菌側からのアプローチによってイネがもつ生体防御システムの欠点を明らかにするとともにその補完方法についても重要な示唆を得ることができた。これらの知見はいもち病防除のみならず、ごま葉枯病、白葉枯病など様々な病害に対する抵抗性を付与する上で重要な基礎的知見を与えるものである。またこの5年間で得られた知見は世界的なレベ

ルの学術雑誌に数多く掲載され、当該分野における我が国の研究レベルのさらなる向上にも大きく貢献したことも併せて申し述べたい。最後にこの5年間の課題担当者各位の多大なるご努力と本中課題へのご貢献に深甚の謝意を表する。

(推進リーダー：南 栄一)

第2編 イネと微生物の遺伝子ネットワークの解明

第1章 イネと微生物の遺伝子ネットワークの解明

1 イネ・菌根菌共生系の感染応答過程を制御する遺伝子ネットワークの解明 (PMIO001)

ア 研究目的

菌根菌は植物との共生によって植物の生育を促進し、農業上の有効利用が見込まれる。アーバスキュラー菌根共生を制御する宿主遺伝子研究は、マメ科植物において、根粒菌・菌根菌の感染受容化を制御する共通シグナル伝達経路 (CSP) の機能解析を基盤として発展してきたが、CSP 下流の菌根共生遺伝子研究は、菌根共生変異体の単離など順遺伝学的アプローチの困難さ故、進んでいない。

そこで、逆遺伝学的アプローチにより、新奇菌根共生遺伝子を同定することで、菌根共生遺伝子ネットワークの全貌を明らかにする。さらに、ミヤコグサ共生遺伝子のイネオルソログ遺伝子の根粒共生制御能の解析から、イネへの根粒共生能付与において、利用可能なイネオルソログ遺伝子を明らかにする。さらに、ミヤコグサ根粒共生特異的遺伝子をイネに導入することで、イネにおける根粒共生遺伝子ネットワークの構築を目指す。

イ 研究方法

(ア) ミヤコグサ共生遺伝子のイネオルソログ遺伝子の Tos17 挿入系統の菌根共生能を評価解析し、菌根共生を直接制御するイネオルソログ遺伝子を明らかにする。さらに、イネオルソログ遺伝子によるミヤコグサ共生変異体の相補機能解析から、共生遺伝子のミヤコグサ・イネ間の機能的保存関係を明らかにする。

(イ) 共生制御の中核因子である CCaMK (カルシウム・カルモデュリン依存型キナーゼ) について、複数種の機能獲得型 CCaMK を構築し、共生成立過程における CCaMK の機能を明らかにするとともに、共生マーカー遺伝子の発現誘導能の評価解析を行う。

(ウ) 共生マーカー遺伝子の発現誘導能を示す機能獲得型 CCaMK をデキサメタゾン (DEX) 依存的に発現させることにより、CCaMK 下流で菌根共

生制御に関与する新奇因子候補を選抜する。

ウ 研究結果

(ア) ミヤコグサ共生遺伝子 CASTOR、POLLUX、CCaMK、CYCLOPS のイネオルソログ遺伝子が菌根共生を制御していることを明らかにした (Banba ら¹⁾、Gutjahr ら²⁾、Yano ら³⁾)。さらに、上記の4遺伝子に加え、NSP1、NPS2 のイネオルソログ遺伝子が、ミヤコグサ遺伝子と同様に、ミヤコグサの根粒共生過程を制御しうることを明らかにした (Yokota ら⁴⁾、図 211-1)。

矢印で示したイネ遺伝子はミヤコグサ CCaMK1-314^{T265D}:NLS (黒棒グラフ) が最も変異体の根粒共生不全表現型を相補する。強い誘導活性を示した。

(イ) 機能獲得型 CCaMK^{T265D} を用いた解析から、根粒菌感染受容過程を制御する遺伝子経路を明らかにした。この中で、根粒菌の感染シグナル分子 Nod factors の受容体である NFR1、NFR5、及び、CCaMK の下流因子である NSP1、NSP2、NIN が根粒菌感染に必須であることを示した (Hayashi ら⁵⁾)。さらに、核局在シグナル (NLS) を付加した、機能獲得型 CCaMK1-314^{T265D}:NLS が共生マーカー遺伝子の強い発現誘導能を示すことを明らかにした

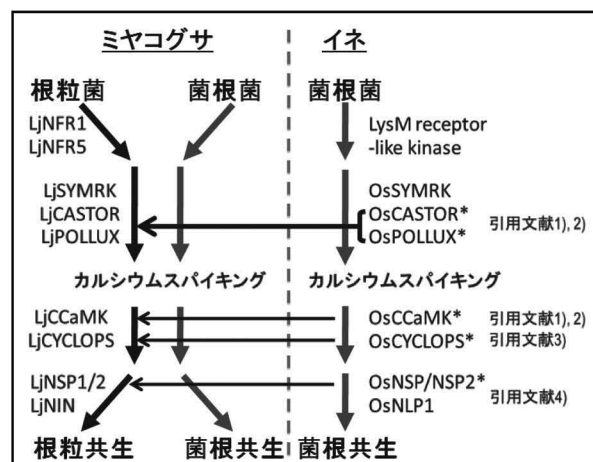


図 211-1 イネ・ミヤコグサ遺伝子オルソログ間の機能的代替性

(Takeda ら⁶⁾、図 211-2)。

(ウ) DEX 処理による機能獲得型 CCaMK1-314^{T265D} の発現系により、CCaMK 下流で菌根共生成立過程に発現誘導される 24 個の遺伝子を選抜した。

エ 考 察

(ア) イネ・ミヤコグサ間で、機能的に保存されている共生遺伝子として、CASTOR、POLLUX、CCaMK、CYCLOPS、NSP1、NSP2 を明らかにし、イネへの根粒共生能力の付与において、これらのイネオルソログ遺伝子を分子基盤として利用しうる戦略を示した。

(イ) CCaMK^{T265D} の解析から、共生菌感染受容過程における CCaMK の中枢的機能を明らかにするとともに、根粒菌感染過程への NFR1、NFR5、NSP1、NSP2 及び NIN の必須性を示した。(ア) の機能代替性の解析結果と合わせ、イネへの根粒共生能力付与には、NFR1、NFR5 及び NIN 遺伝子のイネへの導入が必要であることを示した。

(ウ) 菌根菌感染は同調的に進行せず、感染最初期を制御する遺伝子の動態解析はこれまで困難であった。DEX 依存的な CCaMK1-314^{T265D} : NLS 発現系により、菌根菌非感染条件下で発現誘導された 24 個の遺伝子は、菌根菌感染過程においてもその発現が誘導され、DEX-CCaMK1-314^{T265D} : NLS 誘導系の有効性を示す結果を得た。

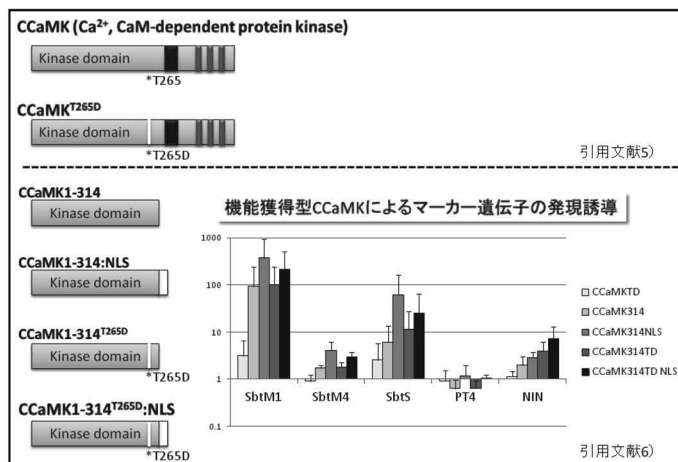


図 211-2 機能獲得型 CCaMK の共生マーカー遺伝子の発現誘導能

オ 今後の課題

(ア) DEX 誘導による機能獲得型 CCaMK 発現系より同定した 24 の遺伝子について、菌根共生成立過程への関与を明らかにする。

(イ) 本研究課題の成果をもとに、ミヤコグサ共生遺伝子との機能代替性を示したイネ遺伝子を分子基盤として、ミヤコグサの根粒共生特異的遺伝子をイネ導入していくことにより、イネへの根粒共生能力の付与を目標とした研究を継続する。

カ 要 約

(ア) ミヤコグサ共生遺伝子のイネオルソログ遺伝子の機能解析から、CASTOR、POLLUX、CCaMK、CYCLOPS がイネ・菌根共生を制御していることを解明した。さらに、これら 4 遺伝子に加え、NSP1 及び NSP2 のイネオルソログ遺伝子が、ミヤコグサの根粒共生を制御しうることを明らかにした。

(イ) 共生菌感染受容過程の中枢因子である CCaMK について、その機能獲得型 CCaMK^{T265D} を用いた解析から、根粒菌感染過程における NFR1、NFR5、NSP1、NSP2 及び NIN 遺伝子の必須性を明らかにした。さらに、菌根菌感染非依存的に菌根共生マーカー遺伝子を誘導しうる機能獲得型 CCaMK1-314^{T265D} : NLS を構築し、DEX 依存的発現系により、24 個の新奇菌根共生関連遺伝子を選抜した。

キ 引用文献

- 1) Banba M, Gutjahr C, Miyao A, Hirochika H, Paszkowski U, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H. Divergence of evolutionary ways among common *sym* genes: CASTOR and CCaMK show functional conservation between two symbiosis systems and constitute the root of a common signaling pathway. *Plant Cell Physiol.* 49: 1659-1671 (2008).
- 2) Gutjahr C, Banba M, Croset V, An K, Miyao A, An G, Hirochika H, Imaizumi-Anraku H, Paszkowski U. Arbuscular mycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *Plant Cell* 20: 2989-3005 (2008).

- 3) Yano K, Yoshida S, Müller J, Singh S, Banba M, Vickers K, Markmann K, White C, Schuller B, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Murooka Y, Perry J, Wang T, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Parniske M. CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 : 20540-20545 (2008).
- 4) Yokota K, Soyano T, Kouchi H, Hayashi M. Function of GRAS proteins in root nodule symbiosis is retained in homologs of a non-legume, rice. *Plant Cell Physiol.* 51 : 1436-1442 (2010).
- 5) Hayashi T, Banba M, Shimoda Y, Kouchi H, Hayashi M, Imaizumi-Anraku H. A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant J.* 63 : 141-154 (2010).
- 6) Takeda N, Maekawa T, Hayashi M. Nuclear localized and deregulated calcium and calmodulin-dependent protein kinase activates rhizobial and mycorrhizal responses in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 24 : 810-822 (2012).

研究担当者（今泉（安楽）温子*、下田宜司）

2 エンドファイト-イネの共生相互作用の解明 (PM10002)

ア 研究目的

近年、根粒菌・菌根菌などの微生物共生の受容の植物側の分子遺伝学研究が進展し、Common Symbiosis Pathway (CSP) 信号伝達系などの微生物共生における役割が解明されつつある。陸上植物は進化の途上で多様なエンドファイトや根圏微生物を宿し、その一部は生育促進・窒素固定などの有用形質を植物に付与してきた。本研究では、微生物群集構造を捉えられる環境微生物学の新手法を切り口として、イネ遺伝子とエンドファイト等の微生物の相互作用を包括的に解明することを目的とする。特に根粒共生系を有しているマメ科と有していないイネ科の相違点と共通点を明らかにする。また、既に圃場レベルで増収効果のあるイネエンドファイトについて、イネの成長や形態変化を指標としてその相互作用メカニズムを微生物とイネの両面から研

究し、接種効果の学術的な基盤を明らかにする。

イ 研究方法

(ア) 微生物との相互作用に関与するイネ遺伝子の解析

a CSP 変異体の微生物群集構造解析

CSP 遺伝子の Ca オシレーションデコーダーである *OsCCaMK* のイネ変異体集団を水田と畑で栽培し、イネ根に共生している細菌群集構造について 16SrRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリー法で解析を行った。

b 異なる窒素レベルにおける CSP 変異体の生育特性と微生物群集構造変化

慣行施肥区と窒素 無施肥区の圃場に日本晴およびその *OsCCaMK* 変異体 NE1115 を水稻条件で栽培し、イネ根の共生細菌の群集構造解析を行った。

c 鍵となるイネ根共生微生物の分離

窒素無施肥区のイネ根に特異的に増加している細菌の分離を選択培地等で行い、分離菌の系統解析とイネ根メタゲノム解析から示唆された機能の特性解析を行った。

d 日本晴および CSP 変異体のメタンフラックスへの影響解析

慣行施肥区と窒素無施肥区の圃場に日本晴および NE1115 を水稻条件で栽培し、メタンフラックス等の解析を行い、さらにイネ根のエンドファイトなどの共生細菌の群集構造解析を行った。

(イ) *Azospirillum* sp. B510 株のイネ生育促進機構の解明

a B510 株圃場接種イネの微生物群集構造解析

圃場レベルで分けつ数が増加し接種効果が見られたイネ植物体のエンドファイトなどの細菌群集構造解析を 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしてその微生物群集構造変化の解析を行った。

b B510 株接種効果の QTL 解析

B510 接種による成長や形態変化を指標として QTL 解析系統および染色体置換系統 (CSSL) を用いて QTL 解析を行った。

ウ 研究結果

(ア) 微生物との相互作用に関与するイネ遺伝子の解析

a CSP 変異体の微生物群集構造解析

イネ発現データベースで CSP 遺伝子 *OsCCaMK* (AK070533) の解析を行ったところ、栄養成長期および生殖成長期のイネ根のみで恒常的に高い発現が観察された。そこで、*OsCCaMK* のイネ変異体集団を水田と畑で栽培し、イネ根に共生している細菌群集構造を 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリー法で解析を行った。*OsCCaMK* 劣勢ホモの水稲および陸稲の根で、*Alphaproteobacteria* の存在比が優勢ホモに比較していずれも有意に低下していた。一方、水稲根において *Actinobacteria* および *Firmicutes* の存在比が *OsCCaMK* 劣勢ホモで上昇していた (Ikeda et al.)¹⁾。

b 異なる窒素レベルにおける CSP 変異体の生育特性と微生物群集構造変化

共生細菌群集構造解析より、*OsCCaMK* は菌根菌の受容のみではなく、*Alphaproteobacteria* の *Rhizobiales* 目細菌の受容にも関与していることが示唆された。一方、窒素無施肥圃場のイネ根では、特定の OTU (Operational Taxonomic Unit) に属する細菌の存在で顕著な変化が見られた。

さらに、5 年間窒素施肥のみ行っていない水田圃場 (低窒素区) と慣行施肥水田圃場 (慣行区) のイネ根共生細菌の群集構造解析およびメタゲノム解析により、生物地球化学的な物質変換とイネとの相互作用に関連する機能遺伝子群と系統の比較を行った (Sasaki et al.²⁾, Ikeda et al.³⁾)。低窒素区のイネ根では、*Alphaproteobacteria* に属する細菌、*Betaproteobacteria* に属する細菌の増加が観察された。

これらの事実から、低窒素環境では *OsCCaMK* 変異によるイネ根の細菌群集に対する親和性が変化し、その結果として生育が変化する可能性が高いと推定した。そこで、慣行区と低窒素区の日本晴と NE1115 の生育調査を行った。移植後 53 日目と 84 日目の結果では、低窒素区の *OsCCaMK* 変異体の NE1115 の草丈と分けつ数ともに日本晴より統計的に有意な減少が観察された。一方、慣行施肥区ではそのような生育指標の低下は見られなかった。

c 鍵となるイネ根共生微生物の分離

共生細菌群集構造解析より、低窒素区のイネ根では、細菌群集構造 (Sasaki et al.)⁴⁾ や *Alphaproteobacteria* および *Betaproteobacteria* に属する特定の OTU に属する細菌の相対存在量の顕著な変化が見られた。これらの細菌が窒素・メタン代

謝、植物ホルモンなどの機能を保持している鍵微生物である可能性が期待された。そこで、これらの細菌の分離を試み、当該細菌の分離に成功した。

d 日本晴および CSP 変異体のメタンフラックスへの影響解析

日本晴および NE1115 を低窒素条件の水田圃場で栽培したところ、日本晴に比較して NE1115 の方がメタンフラックスが高く推移した。水田条件におけるメタンは、土壌中のメタン生成古細菌が発生したメタンが水稲根から侵入し、イネの通気組織を経由して大気中に放出される。その過程で、イネ根と共生しているメタン酸化細菌によりその一部が二酸化炭素に酸化される。そこで、イネの通気組織を調べたところ、日本晴と NE1115 で相違は見られなかった。一方、メタン代謝機能遺伝子のコピー数が NE1115 で有意に減少した。

(イ) *Azospirillum* sp. B510 株のイネ生育促進機構の解明

a B510 株圃場接種イネの微生物群集構造解析
圃場レベルで B510 株接種により分けつ数が増加した移植 2 か月目のイネ植物体の細菌群集構造を 16S rRNA 遺伝子の配列比較解析で行った。その結果、*Azospirillum* sp. B510 は接種区においても検出されなかった。B510 株接種区および無接種区において細菌群集構造全体では相違は認められなかったが、植物共生が知られている *Aurantimonas* 属細菌などのマイナーな微生物の相対存在量の変化が認められた。イネへの接種効果が見られた際に B510 が検出されないため、イネ植物体シグナル系やマイナーな微生物を介する間接的な接種効果の可能性が考えられる。

b B510 株接種効果の QTL 解析

寒天培地に水耕液を添加した生育条件下では、日本晴では *Azospirillum* sp. B510 株接種によって種子根長が極端に短くなることが分かった。一方、インド型イネのカサラスでは接種による種子根長への抑制効果が小さく、接種応答反応が日本晴やコシヒカリと異なると推察された。これらの観察結果に基づき、QTL 解析集団を評価した結果、B510 接種の効果を表している RRL に関わる QTL が、ある染色体の長腕上に検出された。QTL を含む染色体置換系統に接種試験したところ、種子根長の抑制程度がカサラスと同等であった。これらの結果から、この

染色体領域に *Azospirillum* sp. B510 接種応答に関わる QTL が存在することが確認された。染色体部分置換系統の B510 株接種圃場評価を行ったところ、草丈および分げつ数は有意に増加した。

エ 考察

低窒素環境において *OsCCaMK* 変異体のメタンフラックスが、日本晴と比較して有意に高いことが明らかとなり、イネ根に共生しているメタン酸化細菌や根圏土壤中のメタン酸化細菌のレベルや機能性に起因している可能性が示唆された。さらに、低窒素条件の日本晴イネ根で優占化する細菌の分離に成功した。B510 接種イネ根の形態変化を起こす QTL の解析も F2 集団からこの領域で組換えが認められた植物体を約 300 の選抜は完了しているので、早急な絞り込みが期待される。

5 年間全体の研究成果より、*OsCCaMK* などの CSP 系は栄養レベル（特に窒素レベル）が低い時に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、イネ根共生微生物およびその群集構造に与える影響やその仕組みについては単純には説明できない結果が得られている。鍵となる細菌のイネ生育促進効果、メタン代謝関連微生物の挙動を、適切な実験系で詳細に調べる必要がある。また、微生物コンソーシアムとしての挙動や機能性が隠れている可能性もある。

現在のところ最も効果のある B510 株は、圃場レベルでは 2 か月経ると残存しておらず、幼苗時のプライミング効果の可能性がある。一方、上記の鍵細菌は、圃場レベルのイネ根に高いレベル生息していた。したがって、これらの微生物共生を促進する環境条件をさらに明らかにし、イネ遺伝型や環境条件を整えるなど微生物接種以外の方法で、それらの有効菌候補を増やし、機能を発現させる方法が今後追求すべき一つの方角性と考えられる。

オ 今後の課題

イネ *OsCCaMK* の機能やその微生物共生に果たす役割について、窒素レベルが重要な要因であることが明らかとなった。しかし、最終的な鍵細菌の分離株の接種実験には至っていない。*OsCCaMK* 遺伝子はミヤコグサにおいて防御応答関連遺伝子を誘導することが知られており、窒素条件や分離菌株によ

る緻密な接種実験により、*OsCCaMK* の微生物感染に関して複雑なレスポンスの解明が進むことが期待される。

カ 要約

(ア) 微生物との相互作用に關与するイネ遺伝子の解析

OsCCaMK 劣勢ホモのイネ根で、*Alphaproteobacteria* の存在比が優勢ホモに比較していずれも有意に低下していた。一方、水稻根において *Actinobacteria* および *Firmicutes* の存在比が *OsCCaMK* 劣勢ホモで上昇していた。低窒素区のイネ根では、特定の細菌の相対存在量の増加が観察され、窒素・メタン代謝、植物ホルモ攪乱などの機能を保持している鍵微生物の出現が示唆された。したがって、低窒素環境では *OsCCaMK* によるイネ根の細菌群集に対する親和性が変化し、変化した共生微生物相によりイネの生育が変化する可能性が高い。

(イ) *Azospirillum* sp. B510 株のイネ生育促進機構の解明

B510 株接種および無接種区において大きな細菌群集構造の相違は認められなかったが、植物共生が知られている *Aurantimonas* 属細菌などのマイナーな微生物の相対存在量の変化が認められた。イネ接種効果が見られた際に B510 が検出されなかったので、イネ植物体シグナル系やマイナーな微生物を介する間接的接種効果が考えられる。日本晴とカサラスの QTL 解析集団を評価した結果、B510 接種の効果を表している RRL に関わる QTL が検出された。QTL を含む染色体置換系統の B510 株接種圃場評価により、草丈および分げつ数を有意に増加させていることが明らかとなった。

キ 引用文献

- 1) Ikeda S., T. Okubo, N. Takeda, M. Banba, K. Sasaki, H. Imaizumi-Anraku, S. Fujihara, Y. Ohwaki, K. Ohshima, Y. Fukuta, S. Eda, H. Mitsui, M. Hattori, T. Sato, T. Shinano, and K. Minamisawa. (2011). *OsCCaMK* genotype determines bacterial communities in rice roots under paddy and upland field conditions. Appl. Environ. Microbiol. 77 : 4399-4405.

- 2) Sasaki, K., Ikeda, S., Okubo, T., Kisaram C., Sato, T. and Minamisawa K. (2013). Effects of plant genotype and nitrogen level on bacterial communities in rice shoot and root. *Microbes Environ.* 28 (3), 391-395.
- 3) Ikeda, S., T. Okubo, M. Anda, H. Nakashita, M. Yasuda, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, S. Eda, A. Momiyama, K. Terasawa, H. Mitsui, and K. Minamisawa. (2010). Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: Plant-bacterial interactions in soybean and rice. *Plant Cell Physiol.* 51: 1398-1410.
- 4) Sasaki, K., Ikeda, S., Eda, S., Mitsui, H., Hanzawa, E., Kisara, C., Kushida, A., Shinano, T., Minamisawa, K., and Sato, T. (2010). Impacts of plant genotype and nitrogen level on rice growth response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510 under paddy field conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* 56: 636-644.

研究担当者 (南澤 究*, 佐藤雅志)

3 イネにおける菌根共生品種間差とその分子基盤 (PM10003)

ア 研究目的

本研究は、分子レベルの解析リソースが整ったイネにおける菌根共生能の品種間差を手がかりとして、共生に重要な量的形質遺伝子座 (QTL) 解析もしくは QTL クローニングをめざすものである。そのため、まず苗段階における菌根菌による生育促進

の系統間差を調べ、次いで圃場におけるモミ収量に及ぼす菌根菌の効果を調査した。

イ 研究方法

(ア) 苗の生育実験

世界のイネコアコレクションの種子を発芽させ、鹿沼土：赤玉土：クレハ園芸培土 (7:2:1) に 0.1 mM リン酸を含む 1/2 ホーグランド培地をしみこませた土壌に移植し、育苗用セルトレイを用いて全土壌の 3% (w/w) の菌根菌資材 (*Glomus mosseae*) 接種あるいは非接種のもとに、屋外ガラス温室もしくは室内栽培棚において 4 週間栽培した。

(イ) 圃場試験

イネ (*Oryza sativa*) ジャポニカ系統 Nipponbare、Koshihikari ならびにインディカ型系統 #34 の種子を発芽させ、上記と同様に室内で 4 週間、前栽培した。2011 年度と 2012 年度において、名大東山キャンパス内の圃場 (5 m × 5 m) を耕耘し、元肥 (N, 55 g; P, 43 g; K, 38 g) を施して 4 本の畝を作り、雑草よけのマルチをかけて上記の苗を 2 条に移植した。自然日長、自然温度下で収穫まで育て、1 反復あたり 5 個体を 3 反復調査した。

ウ 研究結果

(ア) 苗の生育実験

苗段階においては、屋外ガラス温室においても室内栽培棚においても再現性がよく、インディカ型系統 #34 が最も著しく生育促進され、逆にジャポニカ型系統 Nipponbare は殆ど生育に影響を受けず、Koshihikari はその中間的な応答を示した (図 213-1)。

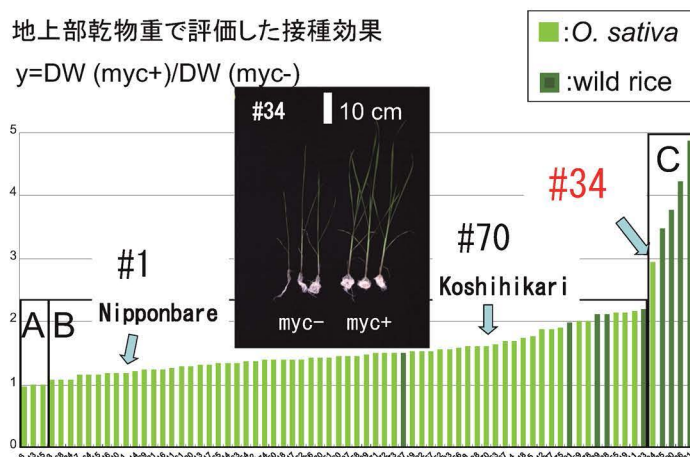


図 213-1 世界のイネコアコレクションの菌根菌による生育促進

Component of rice productivity under field experiment in 2011

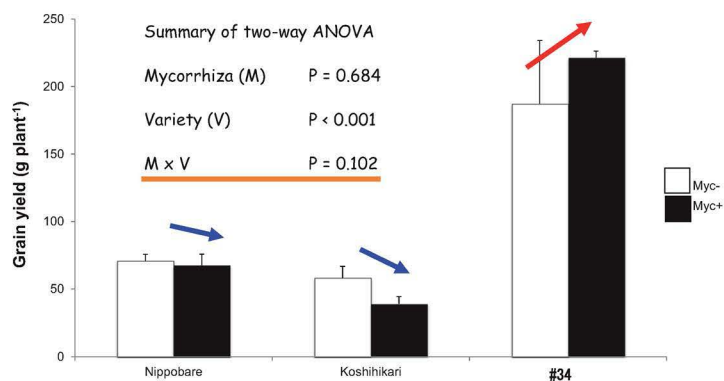


図 213-2 圃場試験の結果 [2011 収穫時] Two-way ANOVA test

表 213-1 菌根菌感染率 [2011 収穫時] (平均 ± SD ; Myc + は接種個体、Myc - は非接種対照)

系統	(%)				全感染率 (%)
	処理	菌糸	樹枝状体	嚢状体	
Nipponbare	Myc -	43.1 ± 8.5	3.4 ± 3.1	0.7 ± 1.2	46.8 ± 7.9
	Myc +	58.0 ± 5.3	1.3 ± 1.2	6.0 ± 5.3	64.6 ± 0.7
Koshihikari	Myc -	48.0 ± 2.0	2.7 ± 1.6	0.7 ± 1.2	51.4 ± 3.0
	Myc +	59.3 ± 3.1	2.0 ± 0.1	3.3 ± 2.3	64.0 ± 1.2
#34	Myc -	66.7 ± 6.1	4.7 ± 4.6	2.7 ± 1.2	73.3 ± 2.1
	Myc +	76.7 ± 7.0	1.3 ± 1.6	0	78.0 ± 6.0

(イ) 圃場試験

2011 年度においては、インディカ型系統 #34 の収量が菌根菌前接種により上昇したのに対し、2つのジャポニカ型系統は共に菌根菌により収量が低下した (図 213-2)。ただし、この試験においては、非接種対照にも土着の菌根菌が相当感染していた (表 213-1)。そこで、2012 年度においては圃場の条件を変更し、土着の菌根菌が感染していないことを確認したうえ (図 213-3)、収量に及ぼす菌根菌前接種の効果を調べた。株あたりの穂数を比較したところ、インディカ型系統 #34 は菌根菌により穂数が増加したが、2つのジャポニカ型系統は共に殆ど変化を示さなかった (図 213-4)。

エ 考察

(ア) 苗の生育実験

菌根菌に対する生育応答は植物によって異なることが知られており、たとえば同じくイネ科に属する作物でも、ソルガムは著しい生育促進を示す一方、ムギ類は生育抑圧を受けた (Sisaphaithong ら¹⁾)。本研究により、同一種のイネ (*Oryza sativa*) においても系統ごとに菌根菌に対する応答が異なることが明らかになった。

(イ) 圃場試験

2011 年度においては、非接種対照においても有意な菌根菌感染が見られた。これは、苗を圃場に移植したのちに土着の菌根菌が感染したためであると思われた。それでも系統間でモミ収量の変化に違いが見られたのは、前接種した菌根菌 (*G. mosseae*) のプライオリティー効果 (Verbruggen ら²⁾) があったためかもしれない。2012 年度においては、この問題をクリアした結果、やはりインディカ型系統

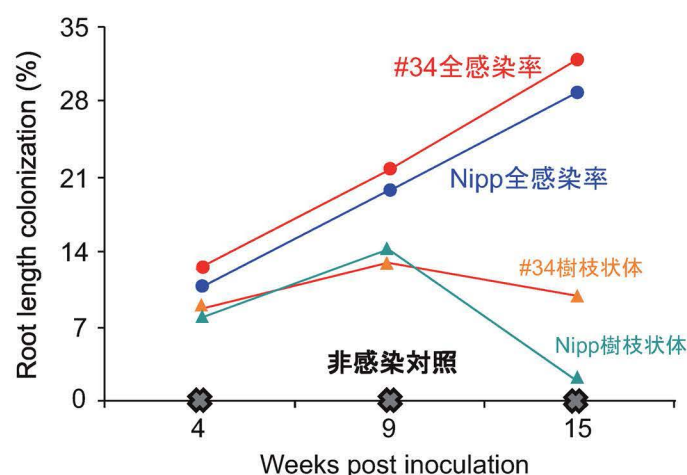


図 213-3 菌根菌感染率 [2012 圃場試験]

系統	処理	草丈 (cm)	穂数/株
Nippon bare	Myc -	82.3 ± 3.7	9.2 ± 2.0
	Myc +	92.1 ± 3.6	10.3 ± 2.8
Koshihi kari	Myc -	84.6 ± 2.2	6.3 ± 1.4
	Myc +	77.4 ± 10.7	6.8 ± 0.8
#34	Myc -	149.1 ± 3.9	29.5 ± 6.0
	Myc +	156.7 ± 4.4	37.9 ± 6.7

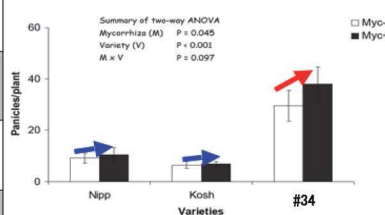


図 213-4 株あたりの穂数 [2012 収穫時] (平均 + SD ; Myc + は接種個体、Myc - は非接種対照)

#34 のみが菌根菌前接種によって収量が増加すると見込まれた。これらの知見は、菌根菌前接種により収量増加に貢献する QTL 解析に道を拓くものと考えられる。

オ 今後の課題

本研究では、苗の段階においても圃場で収穫まで育てても、インディカ型系統 #34 が菌根菌に対して良好な応答を示した。しかし今のところ、これは偶然の結果かも知れないという可能性を完全には排除できない。実際、たとえば Koshihikari においては、苗と圃場とでは異なる応答を示した。そのため、今後は調査対象系統をさらに広げたい、特に圃場における試験結果の再現性を確かめる必要があると思われる。

力 要 約

イネにおける種々の系統を用い、苗の段階および圃場で収穫まで育てた段階において、菌根菌による生育促進系統間差を確認した。

キ 引用文献

- 1) Shisaphaithong T., Kondo D., Matsunaga H., Kobae Y., and Hata S. (2012). Expression of Plant Genes for Arbuscular Mycorrhiza-Inducible Phosphate Transporters and Fungal Vesicle Formation in Sorghum, Barley and Wheat Roots. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76 (12) : 2364-2367.
- 2) Verbruggen E., van der Heijden M.G.A., Rillig M.C., and Kiers E.T. (2013). Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils : factors determining inoculation success. New Phytol. 197

(4) : 1104-1109.

研究担当者 (畑 信吾 *)

4 イネ—細菌エンドファイト相互作用に働くイネ遺伝子の同定と機能解明 (PMI0004)

ア 研究目的

イネは、病原菌以外にも様々な微生物と相互作用しているが、体内に共生する細菌エンドファイトの中にはイネに病虫害抵抗性や生育促進などの有用形質を付与するものがある。これら生物間相互作用による有用形質の利用技術開発は、減農薬による環境保全及びコメの高付加価値化、寒冷地での栽培期間の短縮や収量増加、省力化による低コスト化に寄与しう。本研究では細菌エンドファイト共生関係の利用技術への分子基盤構築を目指し、細菌エンドファイト *Azospirillum* sp. B510 株の共生によりイネに付与される病虫害抵抗性や生育促進について、それらの形質の誘導に働くイネ—細菌エンドファイト相互作用ネットワークを分子レベルで明らかにする。さらに、これらの遺伝子について、欠失変異体及び形質転換体を用いて細菌エンドファイト共生関係及び有用形質発現の解析を通して、イネ—細菌エンドファイト相互作用における遺伝子ネットワークの分子機構の解明と応用利用を図る。

イ 研究方法

(ア) 細菌エンドファイトとの相互作用ネットワークに関わるシグナルの解析

根粒菌、菌根菌等の共生微生物と植物の相互作用に共通と考えられているシグナル伝達経路 CSP 経路が細菌エンドファイトとの相互作用に関与するかを解明するために、関連遺伝子の発現誘導解析およびシグナル欠損イネを用いた解析を行う。

(イ) 相互作用ネットワークに関わる細菌エンドファイト遺伝子の解析

Azospirillum 変異株ライブラリーを作製し、イネに対する有用形質誘導能を欠失した変異株を探索し、その原因遺伝子の単離を行う。

(ウ) 相互作用ネットワークに関わるイネ遺伝子の解析

Azospirillum 変異株と野生株をイネに定着させた際のイネ遺伝子の発現をマイクロアレイを用いて解

析することにより、*Azospirillum* 変異株の原因遺伝子とイネ遺伝子を含む相互作用ネットワークを明らかにする。

ウ 研究結果

(ア) 細菌エンドファイトとの相互作用ネットワークに関わるシグナルの解析

Azospirillum sp.B510 株との相互作用機構を解析するために、まず、有用形質である病害抵抗性および生育促進作用の検定系の構築を行った。病害抵抗性についてはイネいもち病を用いた誘導抵抗性検定系が適用できることを明らかにし、生育促進については、ポット栽培で3葉期のイネに B510 株を処理することにより、湛水状態の有無にかかわらず、第5葉、第6葉に有意な生育促進が見られる実験系を確立した (Yasuda¹⁾、Isawa²⁾、Ikeda³⁾)。この生育促進効果は日本晴の他にカサラス、コシヒカリ、ナナツボシ等の複数のイネ品種で見られ、栄養成長期では地上部のバイオマスが増大することを明らかにした (図 214-1)。これらの検定系を用いて CSP 経路について解析を行ったが、*Azospirillum* sp.B510 株の定着によりイネに有用形質が誘導される条件において、CSP 経路に関わる OsCASTOR1、OsPOLLUX1、OsCCaMK の発現には変動が認められなかった。CSP 経路の OsPOLLUX 遺伝子を欠損した TOS17 株について、*Azospirillum* sp. B510 株の定着による有用形質誘導効果を検討した結果、本遺伝子の欠失による影響は認められず、*Azospirillum* sp.B510 株とイネの相互作用には CSP 経路は関与しない可能性が示唆された (図 214-2)。

(イ) 相互作用ネットワークに関わる細菌エンドファイト遺伝子の解析

トランスポゾン Tn5 に由来するミニトランスポ

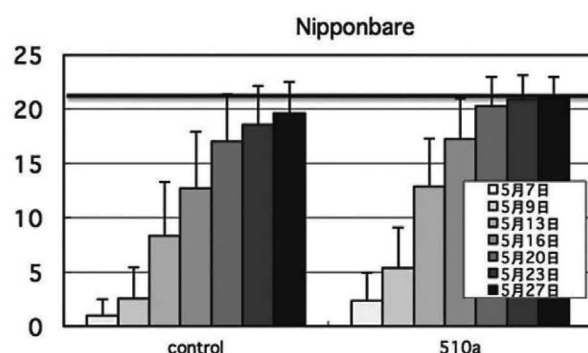


図 214-1 第5葉長の変化

ゾン pCAM120 を用いて *Azospirillum* sp.B510 株の変異株ライブラリー (2400 株) の作製を行った。並行して化学変異原であるニトロソグアニジン (NTG) 処理による変異株の作製も進めたが、イネへの定着性を確実にすることも念頭にいたため、約 200 コロニーの変異株を無菌栽培のイネ幼苗に感染させた後に地上部に定着した *Azospirillum* sp.B510 変異株 1 株を取得する方法によって、最終的にイネへの定着能を確認した計 600 株の変異株ライブラ

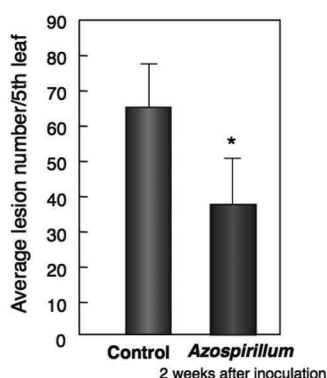


図 214-2 OsPollux 変異体でのイネいもち病抵抗性誘導

リーを作製した。これらの変異株ライブラリーから、NTG 処理株 5 株、トランスポゾン挿入株 8 株のイネへの有用形質誘導能欠失変異株を見出した (図 214-3)。トランスポゾン挿入株 7 株についてトランスポゾン挿入位置を決定した (図 214-4)。

(ウ) 相互作用ネットワークに関わるイネ遺伝子の解析

Azospirillum sp.B510 株の野生株及び 2 種の変異株 (CRP/FNR transcriptional regulator および hypothetical protein) それぞれを 3 葉期イネ幼苗に接種し、葉鞘部分から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行った。その結果、*Azospirillum* の定着や有用形質誘導シグナルに関与する可能性がある遺伝子が、野生株でのみ誘導される遺伝子として見出された (表 214-1)。ここには、エチレン生合成遺伝子 ACC oxidase、エチレン応答性遺伝子 ERF が含まれていたことから、エチレンシグナルの関与が推定された。そこで、エチレンシグナルの重要因子である EIN2 の関与を解析するために、RNAi 法により EIN2 の発現を抑制した形質転換体 EIN2kd 株を作成した。形質転換体 EIN2kd 株に *Azospirillum*

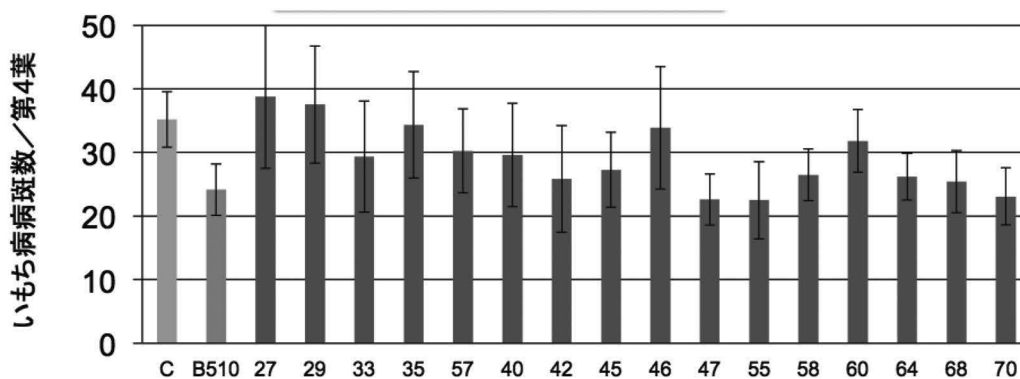


図 214-3 有用形質誘導能を欠失した *Azospirillum* sp.B510 変異体の探索

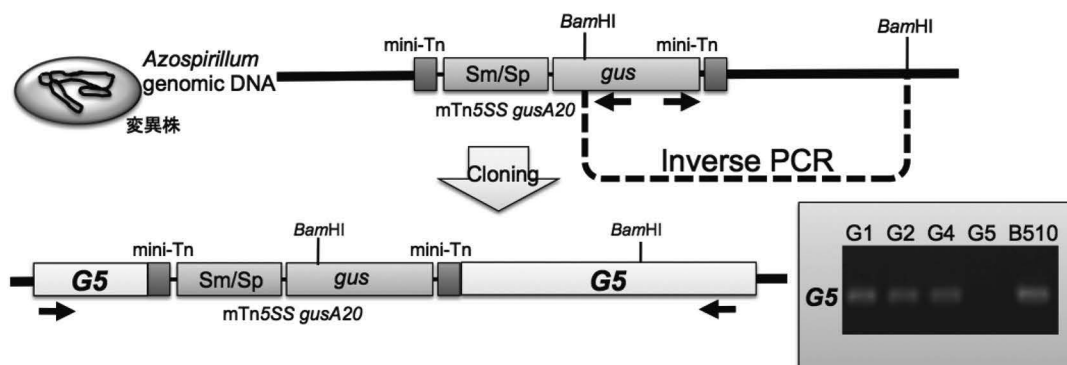


図 214-4 トランスポゾン挿入位置の決定

表 214-1 Azospirillum 野生株で誘導される遺伝子

Probe Name	野生菌株 変異菌株			
	B510 vs. C	H5 vs. C	G2 vs. C	
is01g0580500	2.3	1.4	1.2	1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase.
is02g0654700	2.5	1.2	-1.3	Ethylene-responsive element binding protein (ERF).
is12g0138000	4.3	1.4	-1.1	Calcium-binding EF-hand domain containing protein.
is11g0141400	2.3	1.3	1.1	Calcium-binding EF-hand domain containing protein.
is03g0319300	2.1	1.1	-1.0	Calmodulin TaCaM1-1 (Calmodulin TaCaM1-2)
is01g0783700	3.2	1.2	1.4	EF-hand Ca ²⁺ -binding protein GCD1.
is03g0689400	2.0	1.1	1.1	Disease resistance protein family protein.
is07g0132500	2.2	1.1	-2.1	Lectin-like receptor kinase 7.2.
is03g0183800	2.1	1.3	1.1	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase 1.
is04g0218400	2.2	1.4	-1.0	ERD3 protein.
is11g0440200	2.3	-1.0	1.2	Nod factor binding lectin-nucleotide phosphohydrolase.
is09g0455300	2.0	-1.3	-1.3	Symbiotic ammonium transporter.
is08g0498400	2.0	1.3	-1.0	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (EC 2.1.1.104)(CCoAOMT).
is01g0863300	2.6	-1.6	-1.6	Myb, DNA-binding domain containing protein.
is06g0112700	2.0	1.3	1.2	Myb, DNA-binding domain containing protein.

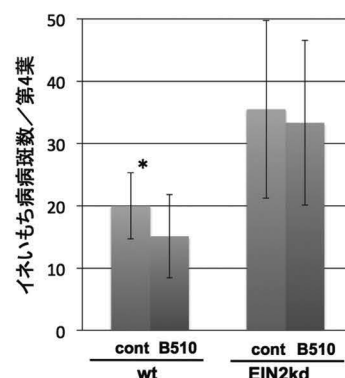


図 214-5 EIN2kd で病害抵抗性誘導

sp.B510 株を感染させたところ、有用形質は誘導されず、Azospirillum sp.B510 株による有用形質付与には EIN2 を介したエチレンシグナルが重要であることが示された (図 214-5)。

工 考 察

細菌エンドファイトによるイネへの有用形質付与は圃場試験から示唆されていたが、実験室での検定系を構築することにより、細菌エンドファイトとの相互作用の意義を確認することができたと共に、分子メカニズムの研究を展開することができた。根粒菌や菌根菌との相互作用に働く CSP 経路が関与しないことが示されたことから、細菌エンドファイトと植物の相互作用にはこれまで知られていない新しいメカニズムが機能している可能性が考えられた。この相互作用により誘導される有用形質は強くはないが、細菌エンドファイトの変異株を探索して解析に用いることにより、イネ側の生理的变化についても分子レベルで解析することが可能になり、その結果、細菌エンドファイト側の因子とイネ側の因子を結びつけることができ、この相互作用における遺伝子ネットワークの一端を解明できた。イネ側の因子であるエチレンについては、今後は他の抵抗性シグナルとの関連からも詳細な解析が可能であるが、細菌エンドファイト側の因子については、細菌エンドファイトにおける機能を解明することにより、相互作用における役割も明らかにすることができると考えられる。

オ 今後の課題

細菌エンドファイトとの相互作用はイネの生長とストレス応答の活性化に影響を及ぼしていることが

分子レベルで明らかとなった。本課題では、それらの形質を正に制御する細菌エンドファイトを選んで研究を行ってきたが、細菌エンドファイトとの相互作用研究は新しい研究分野であるため、特に微生物側について、実験的手法が未成熟な状況であり、研究展開の加速化が困難な状況にある。また、実際には植物体内には様々な微生物がいることから、植物に負の影響を与える相互作用関係も存在すると考えられ、本課題で用いたモデル系だけでは細菌エンドファイトとの相互作用の解明と実用化研究には十分とは言えない。イネに与える形質は、基礎・応用の両面で重要であることから、微生物側の研究者との連携を含めて精力的な研究を行うべきと思われる。

力 要 約

細菌エンドファイト Azospirillum sp. B510 株が定着することによりイネに付与される病虫害抵抗性や生育促進について、遺伝子発現および変異株解析を行った結果、菌根菌との共生に働くシグナルである CSP 経路は関与していないことが示された。有用形質の誘導を欠失した Azospirillum sp. B510 変異株を探索して、その原因遺伝子を明らかにした。これらの変異株と野生株をイネに処理した際のイネの遺伝子発現を解析することによりエチレンシグナルの関与を見出し、エチレンシグナルの重要因子 EIN2 の発現抑制株を用いた解析によってエチレンシグナルの関与を確認した。以上の結果から、特定された細菌エンドファイト遺伝子とイネ側のエチレンシグナルを含む遺伝子からなる遺伝子ネットワークが、有用形質付与に関わる相互作用に重要であることを明らかにした。

キ 引用文献

- 1) Yasuda, M., Isawa, T., Shinozaki, S., Minamisawa, K. and Nakashita, H. (2009). Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510 on disease resistance in rice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 73 : 2595-2599.
- 2) Isawa, T., Yasuda, M., Awazaki, H., Minamisawa, K., Shinozaki, S. and Nakashita, H. (2010). *Azospirillum* sp. strain B510 enhances rice growth and yield. *Microbes and Environments*. 25 : 58-61.
- 3) Ikeda S, Okubo T, Anda M, Nakashita H, Yasuda M, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Eda S, Momiyama A, Terasawa K, Mitsui H, Minamisawa K. (2010). Community- and genome-based views of plant-associated bacteria : plant-bacterial interactions in soybean and rice. *Plant Cell Physiol*. 51 : 1398-1410.

研究担当者（仲下英雄*、島周平）

第2章 イネと病原微生物の遺伝子ネットワークの解明

1 病害抵抗性関連遺伝子の単離と遺伝子間ネットワークの解明 (PMI0005)

ア 研究目的

植物の病害抵抗性応答において、抵抗性遺伝子 (*R* 遺伝子) によって誘導される真性抵抗性は圃場抵抗性に比べ非常に強力であり、作物への *R* 遺伝子による抵抗性の付与は有効な手段の一つである。これまでイネにおいて、*R* 遺伝子を育種的に導入する試みがなされてきたが、その特異性の高さから長期的かつ広範な病害抵抗性の付与には至っていない。このため *R* 遺伝子の導入にのみ依存した抵抗性の付与ではなく、植物の持つ潜在的な抵抗性の発動機構やその制御シグナルネットワークを包括的に理解し、それを応用し利用することによる抵抗性の付与が有効と考えられる。しかしながら、病害抵抗性応答の誘起に至るシグナル伝達経路はほとんど解明されておらず、遺伝学的な解析もほとんど行われていない。そこで、本研究では大規模なイネミュータントリソースを利用し、イネ耐病性変異体の解析により耐病性に関わる新規遺伝子を単離するとともに、同定したシグナル因子との相互作用を分子遺伝学的手法を取り入れつつ解析し、抵抗性の起動から応答反応の発動に至るシグナル伝達経路を解明する。

イ 研究方法

(ア) *OsPtila* を介した病害抵抗性を負に制御するシグナルネットワーク

a *OsOx1* の発現解析では約 1.8kb のプロモーターと *GUS* 遺伝子を連結したコンストラクトを導入した形質転換体を作製し、いもち病菌感染 7 日後に *GUS* 遺伝子発現を解析した。タンパク質リン酸化の検出は、phos-tag アクリルアミドゲル、あるいは組み換えタンパク質を用いた *in vitro* kinase assay により行った。

b *OsPtila* の細胞内局在は培養細胞を用いた細胞分画法、および GFP 融合タンパク質によるイネプロトプラストへのエレクトロポレーション法により行った。*OsPtila* 複合体形成の解析は、Native PAGE およびゲル濾過法により行なった。

c 培養細胞は、N6D 液体培地で継代した野生型日本晴種子、*osptila* 変異型ホモ種子由来カルスを用いた。エリシター処理は、キチンエリシターを最終濃度 10uM になるように、Mock 処理は等量の純水を加えた。処理後経時的に培養液をサンプリングし、活性酸素種の生成ならびに pH を解析した。

(イ) 病害抵抗性における MAPK の機能とその制御下にある防御反応に至るネットワークの解析

a 活性型 *OsMKK4* (*OsMKK4^{DD}*) および MYB の発現誘導は、DEX 誘導が可能なベクターを用いて導入した日本晴種子由来カルスおよび植物体を用い、最終濃度 10uM になるように DEX 処理を行った。コントロール処理はエタノールを使用した。植物体への DEX 処理は最終濃度 10uM になるように灌水処理した。

b 恒常的活性型 *OsMKK4^{DD}* によるリグニン蓄積の測定は、DEX 処理あるいはエタノール処理 2 日後に thioglycolic acid (TGA) 法により行った。

c 網羅的な遺伝子発現解析は 44Kx4 イネオリゴマイクロアレイを用いた。共発現解析は RiceXPro のデータベースを用いた。

(ウ) 新規シグナル因子の単離

a 変異体の遺伝解析ではコシヒカリと交配して得た F2 後代を用いて、タイピングアレイにより染色体領域を絞り込んだ後、その領域をカサラスに置換した日本晴 / カサラス染色体置換系統を交配親に使用し、得られた F2、F3 個体を用いた。

ウ 研究結果

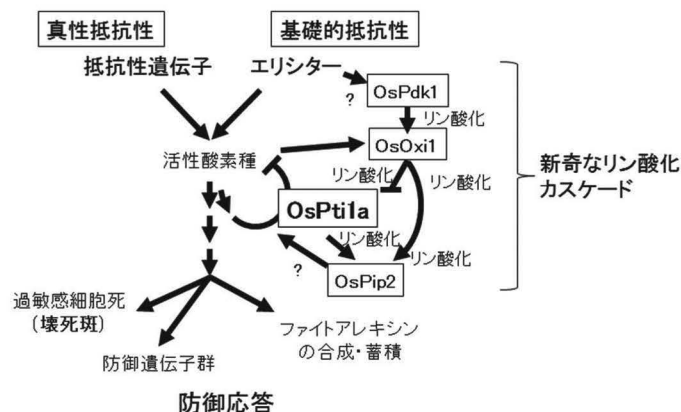
イネの持つ抵抗性発動およびその制御シグナルネットワークの理解のため、負の制御因子 *OsPtila* (ア) および正の制御因子 MAPK (イ) を中心としたシグナルネットワークを解析し、また新規シグナル因子の単離 (ウ) を進めた。

(ア) *OsPtila* を介した病害抵抗性を負に制御するシグナルネットワーク

OsPtila は抵抗性反応の負の制御因子として単離された (1)。そこで、*OsPtila* による病害抵抗性シグナルの制御機構を明らかとするため、*OsPtila*

の相互作用因子として同定していた Pip2 (OsPtila interacting protein 2)、OsOx11 (AGC キナーゼ)、さらに OsOx11 の上流キナーゼの OsPdk1 の解析を進めた。

OsPtila は細胞膜上に局在していることを示した。さらに、OsPtila は複合体を形成しており、細胞膜への局在ならびに複合体形成には、N 末端の脂質修飾が必須であった。細胞膜に局在できない変異型 OsPtila では、抵抗性シグナルの制御機能が消失したことから、OsPtila は細胞膜上で複合体を形成し病害抵抗性シグナルを制御していると推測された。また、*osptila* 変異体の培養細胞にエリシター処理すると、初期反応は野生型と比べ差異は認められないが、反応の減衰すなわち定常状態への復帰が変異体では遅延することが明らかとなった。この結果は、OsPtila はエリシターにより誘導される初期応答の起動には関わらず、それらの反応の減衰を制御していることを示している（図 221-1）。



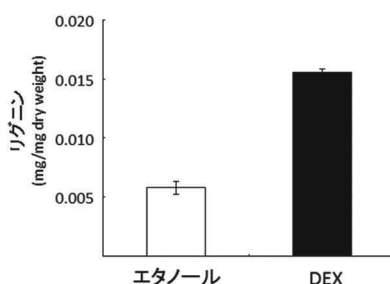


図 221-2 MKK4^{DD} の誘導によるリグニンの蓄積

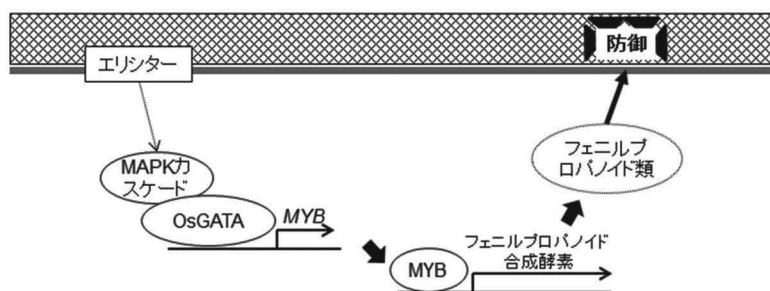


図 221-3 MAPK カスケードによる病害抵抗性発動制御モデル

とを明らかとした。さらに、OsMKK4-OsMPK3/OsMPK6 カスケードにより誘導される防御反応として、新たにリグニンの蓄積が誘導されることも見出した (図 221-2)。一方、この MAPK カスケードの活性化に伴う活性酸素の生成は検出されず、シロイヌナズナ、タバコにおける相同遺伝子による MAPK カスケードとは機能分化していることが確認された (4)。OsMKK4 を一過的に発現する形質転換体では抵抗性が増加するが、著しい生育阻害 (葉鞘、葉身の生育停止) が見られた。これは、OsMKK4 による OsMPK3/OsMPK6 の活性化が、多岐に渡る防御応答反応を誘導することにより生育に必要な代謝経路が抑制される、あるいは防御応答反応以外の生育制御に関与するためと推測された。そこで、MAPK カスケードに制御される防御応答反応に関わる転写因子を特定し、その発動によるイネへの抵抗性付与を目指した。ジテルペノイドファイトアレキシン合成を制御する既知の転写因子 OsTGAP1 は、OsMKK4 による発現誘導も、MAPK によるリン酸化も受けないことから、OsMKK4 によるジテルペノイドファイトアレキシン合成には異なる転写因子が関わりと予想された (5)。一方、リグニンを含むフェニルプロパノイド合成に関しては、OsMKK4 により制御される転

写因子の中から、フェニルプロパノイド合成酵素遺伝子と共発現する *MYB* 遺伝子を特定した。フェニルプロパノイド類の蓄積は病害応答反応時に多くの植物で見られる現象であるが、その誘導による異なる病原体に対する抵抗性付与はこれまでに報告がなく、今後の発展が期待される。さらに、MAPK カスケードと *MYB* 遺伝子の転写誘導をつなぐ転写因子として、*OsGATA* 遺伝子も見出した。OsGATA はこれらの *MYB* 遺伝子のプロモーターを活性化し、さらにこの活性は OsMKK4, OsMPK6 により亢進されることを見出した。以上の解析から、病原体シグナルによって起動する MAPK カスケードと、「OsGATA-OsMYB-フェニルプロパノイド合成系遺伝子のシグナルカスケード」がつながるシグナル経路を明らかにすることが出来た (図 221-3)。

(ウ) 新規シグナル因子の単離

真性抵抗性の誘導シグナルにおける新規なシグナル因子の同定を目的として、レトロトランスポゾン *Tos17* 挿入系統を材料に、日本晴の持つ 2 種類のいもち病 *R* 遺伝子 *Pish* および *Pil9* のシグナル伝達に変異を生じたと考えられる *ttn* (tissue-culture triggered mutation) 変異体の選抜を行った。*Pish* および *Pil9* による抵抗性に影響がみられる変異系統を、それぞれ 14 系統 / 2 系統単離同定すること

に成功した (6)。これらの変異系統は、*Tos17* の挿入と表現型に連鎖が見られなかったため、マップベースクローニングによる原因遺伝子の同定を目指した。得られた *ttn* 変異体系統群のうち表現型の強い 2 系統 (*ttn2*, *ttn12*) について領域の絞り込みを進めた。*Ttn2* 遺伝子は約 460kb の領域にまで絞り込まれ、F3 解析を進めている。また、*Ttn12* 遺伝子は約 34kb の範囲に絞り込まれ、この領域に予測された 2 つの遺伝子のうち、その一つに変異が生じていることが確認された。また、*ttn12* とは独立の変異を持つ *ttn17* 変異体が *ttn12* と同一遺伝子座に変異を生じていることが確認され、*ttn17* においても *ttn12* と同一遺伝子内に独立の欠損変異が生じていたことから、この遺伝子が *Ttn12/17* (*t*) と考えられた。現在 T1 植物での解析を進めると共に、*Ttn12* 遺伝子領域を含むゲノム断片を用いた相補試験を行う準備を進めている。

エ 考察

(ア) OsPtila を介した病害抵抗性を負に制御するシグナルネットワーク

これまでの変異体ならびに形質転換体を用いた遺伝解析から、OsPtila はイネにおいて真性抵抗性だけでなく基礎的抵抗性の発動を負に制御する因子であり、その機能欠損変異により一連の病害抵抗性応答が誘導され、抵抗性が増強されることを見いだししている。しかしながら、*osptila* 変異体は抵抗性の獲得の代償として、抵抗性反応の過剰な発動による生育阻害を引き起こすことから、病害抵抗性シグナルの誘導には適切な制御が必須であり、OsPtila は病害抵抗性を負に制御する重要な機能を担っていると言える。

OsPtila を制御すると考えられる上流のプロテインキナーゼ OsOxi1 と OsPdk1 は、ともに過剰発現により親和性病原菌に対して抵抗性が増強されることから (2, 3)、OsPtila を抑制することにより抵抗性反応を正に制御している因子と考えられる。本解析から、これらのキナーゼを活性化するシグナルが異なることが明らかとなった。このことは、抵抗性反応を誘導するシグナルの時間的・空間的な制御を反映していると考えられた。

これまで遺伝学的に OsPtila が抵抗性の負の制御因子であることは明らかにされていたが、細胞

内での機能や役割については不明であった。今回、OsPtila は細胞膜で複合体を形成し病害抵抗性シグナルを制御していることが示唆され、さらに生化学的な解析から、抵抗性の初期応答反応の減衰を制御していることが明らかにされた。今後 OsPtila の相互作用因子の探索、解析が進むことにより抵抗性シグナルの制御機構が明らかとなると期待される。

(イ) 病害抵抗性における MAPK の機能とその制御下にある防御反応に至るネットワークの解析

病害抵抗性の発動を制御するシグナルにおいて、MAPK カスケードが重要な機能を果たしていることはイネに限らず様々な植物で報告されている。しかしながら、MAPK カスケードは様々なストレスに対する応答のみならず、生長・発達をも制御することから、MAPK カスケードの制御による耐病性増強は困難であると予想された。一方、実際の防御反応に関わる二次代謝産物は植物種により様々であり、イネにおいてこれらの二次代謝産物合成に関わるシグナル系はほとんど明らかにされていなかった。我々は、OsMKK4-OsMPK3/OsMPK6 により制御され、リグニンを含むフェニルプロパノイド合成を制御する MYB 型転写因子を同定し、さらにその発現制御を MAPK 直下で担う GATA 型転写因子を同定することに成功した。今後、これらのシグナル系を詳細に解析することにより、フェニルプロパノイド類の防御反応への寄与を解明し、耐病性の付与へつなげていけると期待される。

(ウ) 新規シグナル因子の単離

Pish 依存的な抵抗性を喪失した 14 系統では、これまでに我々が単離した *Pish* 遺伝子について配列解析を行い、*Pish* 遺伝子内に変異が生じていないことを確認しているため、*R* 遺伝子以外の因子に変異が生じていることが期待される。一方、*Pi19* による抵抗性を喪失した 2 系統では、*Pi19* の発動に必要な特異的因子、あるいは *Pi19* そのものに変異を生じている可能性が考えられる。

オ 今後の課題

(ア) OsPtila を介した病害抵抗性を負に制御するシグナルネットワーク

OsPtila は、細胞膜上で複合体を形成し病害抵抗性シグナルを制御していると推測されるため、OsPtila を含む細胞膜複合体の単離とその構成因子

の解析を進める必要がある。これらの相互作用因子の解析により、OsPtila の細胞内機能を明らかに出来ると考えられる。また、OsPtila によるエリシター初期応答への関与について、分子レベルで明らかにし、病害抵抗性反応を負に制御するメカニズムを解明することにより、病害抵抗性の付与だけでなく、抵抗性反応の過剰な発動を抑制するシステムの開発も進められると期待される。

(イ) 病害抵抗性における MAPK の機能とその制御下にある防御反応に至るネットワークの解析

MAPK の下流でリグニン合成を制御する転写因子として同定された MYB 型転写因子の病害抵抗性への関与について詳細に解析し、リグニンを含むフェニルプロパノイド類合成が、イネの抵抗性に寄与するか明らかにする必要がある。

(ウ) 新規シグナル因子の単離

マッピングを進めた変異体の原因遺伝子の単離および相補試験による確認を進め、新規な因子が単離された場合、その機能について詳細に解析を行う必要がある。

力 要 約

(ア) OsPtila を介した病害抵抗性を負に制御するシグナルネットワーク

病害抵抗性を負に制御する OsPtila の相互作用因子 *OsOx1* および *OsPdk1* を活性化するシグナルが異なっていることを明らかとし、2つの新奇なリン酸化カスケードの存在を示唆した。また、OsPtila の機能には N 末端修飾を介した細胞膜上での複合体の形成が必須であることが示された。さらに、OsPtila の機能として抵抗性初期応答の減衰を制御していることが示唆された。

(イ) 病害抵抗性における MAPK の機能とその制御下にある防御反応に至るネットワークの解析

イネの OsMKK4-OsMPK3/OsMPK6 からなる MAPK カスケードが病原体侵入シグナルを感知し、抵抗性反応として知られる細胞死の誘導、およびフェニルプロパノイド類とジテルペノイド類という多種類の二次代謝産物合成を制御することを明らかにした。さらに、MAPK カスケードからフェニルプロパノイド類合成に至るシグナル経路を明らかとした。

(ウ) 新規シグナル因子の単離

真性抵抗性のシグナル伝達に変異を生じたと考えられる変異体の原因遺伝子の同定を目指した。2系統について領域の絞り込みを進め、そのうち1系統について候補遺伝子の単離に成功した。

キ 引用文献

- 1) Takahashi, A., Agrawal, G. K., Yamazaki, M., Onosato, K., Miyao, A., Kawasaki, T., Shimamoto, K., Hirochika, H. (2007). Rice Ptila negatively regulates *RARI*-dependent defense responses. *Plant Cell*. 19 : 2940-2951.
- 2) Matsui, H., Yamazaki, M., Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Hirochika, H. (2010). AGC kinase OsOx1 positively regulates basal resistance through suppression of OsPtila-mediated negative regulation. *Plant Cell Physiol*. 51 (10) : 1731-1744.
- 3) Matsui, H., Miyao, A., Takahashi, A., Hirochika, H. (2010). Pdk1 kinase regulates basal disease resistance through the OsOx1-OsPtila phosphorylation cascade in rice. *Plant Cell Physiol*. 51 : 2082-2091.
- 4) Kishi-Kaboshi, M., Okada, K., Kurimoto, L., Murakami, S., Umezawa, T., Shibuya, N., Yamane, H., Miyao, A., Takatsuji, H., Takahashi, A., Hirochika, H. (2010). A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. *Plant J*. 63 (4) : 599-612.
- 5) Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Hirochika, H. (2010). MAMP-responsive MAPK cascades regulate phytoalexin biosynthesis. *Plant Signal. Behav*. 5 : 1653-1656.
- 6) Takahashi, A., Hayashi, N., Miyao, A., Hirochika, H. (2010). Unique features of the rice blast resistance *Pish* locus revealed by large scale retrotransposon-tagging *BMC Plant Biol*. 10 : 175.

研究担当者（高橋章*、加星光子、松井英譲、廣近洋彦）

2 いもち病菌感染初期の菌糸伸長を抑制するイネ圃場抵抗性遺伝子の単離と機能解明 (PMI0006)

ア 研究目的

近年のいもち病抵抗性育種では、抵抗性崩壊が起こりにくい圃場抵抗性遺伝子の重要性が増している。一般に1つの圃場抵抗性遺伝子による耐病性効果は大きくないが、植物に複数の遺伝子を導入することにより強力な耐病性を付与できると考えられている。したがって、多数の圃場抵抗性遺伝子を同定および単離することは今後のイネいもち病耐病性育種にとって極めて重要な意味を持つ。しかし、イネいもち病抵抗性遺伝子の探索では、作用の強い真正抵抗性遺伝子の陰に隠れ、単独では作用の小さい圃場抵抗性遺伝子の多くが見落とされてきたと考えられる。また、圃場抵抗性遺伝子の単離やその機能解明もほとんど進んでおらず、その分子基盤は全く明らかになっていない。最近我々は、ササニシキ／ハバタキ戻し交雑自殖系統群を用いた研究により、いもち病菌の感染菌糸伸長を抑制する未知の圃場抵抗性様遺伝子の存在をハバタキの第12染色体上に明らかにし、その候補遺伝子の座乗領域を特定することに成功した。

本研究では、ハバタキに見出された圃場抵抗性遺伝子を精密遺伝子連鎖地図を作成することにより単離することを目指した。さらに、リコンビナントタンパク質を用いた生化学的解析によって単離した遺伝子の機能を明らかにするとともに、いもち病抵抗性における圃場抵抗性遺伝子の有用性を実際の圃場において検証することを目的とした。

イ 研究方法

(ア) 供試植物および形質転換体の作製

本研究を通して、供試植物および形質転換親としてイネ品種日本晴を用いた。また、候補遺伝子のノックアウト変異体として、*Tos17* ミュータントパネルから探索された *osskl* を用いた。遺伝子を過剰発現する形質転換体は *Agrobacterium* 法によって作製し、形質転換には $p2k-1^+$ ベクター (Takahashi et al.)¹⁾ を用いた。

(イ) イネ葉鞘を用いたいもち病抵抗性の評価

イネのいもち病抵抗性を迅速に評価するため、葉鞘内腔に GFP 発現いもち病菌 (レース 137) を

接種し、接種 48 時間後の菌糸伸長を蛍光顕微鏡 (Axioskop2, Zeiss) を用いて観察し、デジタルカメラ (AxioCam HRc, Zeiss) により写真撮影した。デジタル写真をコンピュータ上で解析し、菌糸伸長量を測定した。

(ウ) 糖キナーゼ活性の測定

候補遺伝子がコードする酵素タンパク質の活性を測定するため、pCold ProS2 ベクターに cDNA を連結し、大腸菌 BL21 (DE3)pLys に形質転換し、リコンビナントタンパク質を作製した。作成したタンパク質の糖キナーゼ活性は、ADP-Glo kinase assay kit (プロメガ、USA) を用いて測定した。

(エ) 圃場におけるイネいもち病抵抗性の評価

圃場抵抗性遺伝子を有するイネのいもち病抵抗性の程度を検討するため、イネをいもち病多発圃場において栽培し、移植 3.5 か月後の止葉における病斑面積 (1 葉あたり相対値) および病斑数 (1 葉あたり病斑数) を測定した。

ウ 研究結果

(ア) 候補遺伝子 *OsSK1* 過剰発現形質転換体のいもち病抵抗性

ササニシキ／ハバタキ染色体部分置換系統である SL439 とササニシキとの戻し交雑系統の F3 および F4 約 2000 個体を用いたマッピングの結果、ハバタキに見出された圃場抵抗性候補遺伝子は糖キナーゼの一種をコードする *OsSK1* であることが明らかになった。さらに、国内外のイネ 55 品種において *OsSK1* の CDS 配列を検討した結果、祖先型 (コシヒカリ型) に比べ、382 番目のグリシンがアルギニンに変異した対立遺伝子 (ササニシキ型) および 445 番目のヒスチジンがグルタミンに変異した対立遺伝子 (ハバタキ型) の 3 型存在することが明らかになった。そこで、これらの対立遺伝子をイネで過剰発現させ、いもち病抵抗性が高まるか否かを検討した (図 222-1)。

この結果、ハバタキ型およびコシヒカリ型 *OsSK1* を過剰発現した形質転換体においてはいもち病菌の感染菌糸伸長が有意に抑制されたのに対して、ササニシキ型を過剰発現しても抑制は認められなかった。以上の結果から、382Gly が Arg に置換される変異によってササニシキの圃場抵抗性が低下していることが明らかになった。

(イ) OsSK1 タンパク質の酵素活性とノックアウト変異体のいもち病抵抗性

いもち病抵抗性とタンパク質の機能との相関を明らかにするため、OsSK1 タンパク質を大腸菌で合成してSK1 活性を測定した (図 222-2 A)。

この結果、予想外なことに、抵抗性を示すササニシキ型 OsSK1 の活性が最も高く、ハバタキ型およびコシヒカリ型の活性は弱いことが明らかになっ

た。この結果から、OsSK1 の酵素活性といもち病圃場抵抗性とは負に相関する可能性が示された。そこで、*Tos17* 挿入による *OsSK1* 遺伝子破壊株のいもち病抵抗性を調べた結果 (図 222-2 B)、いもち病菌の感染菌糸伸長が抑制され、抵抗性を示すことが明らかになった。さらに、ノックアウト変異体に野生型のササニシキ型 *OsSK1* を形質転換したところ、抵抗性は完全に消失した。

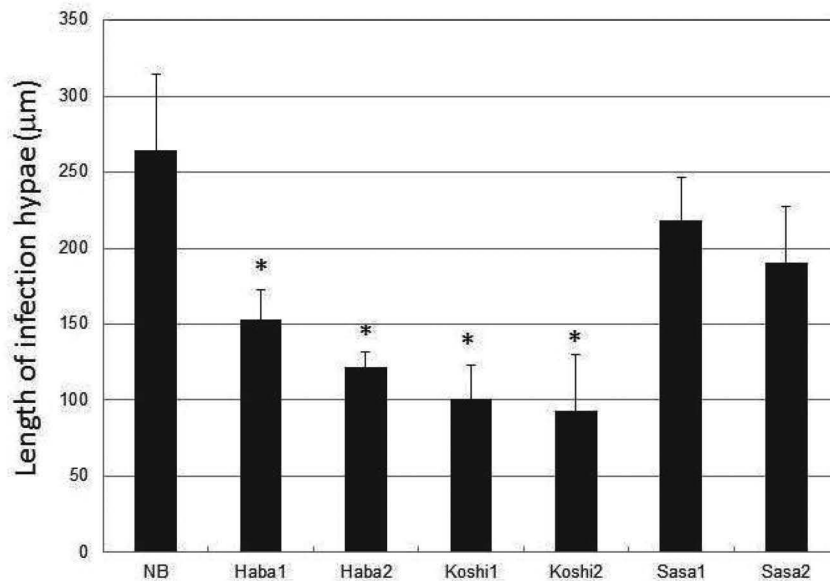


図 222-1 *OsSK1* の各対立遺伝子を過剰発現したイネ形質転換体におけるイネいもち病菌の感染菌糸伸長
Haba：ハバタキ型、Koshi：コシヒカリ型および Sasa：ササニシキ型 *OsSK1* 発現形質転換体。それぞれ 2 系統について結果を示した。*:t-検定により NB (日本晴) に対して有意差有り (P<0.05)。

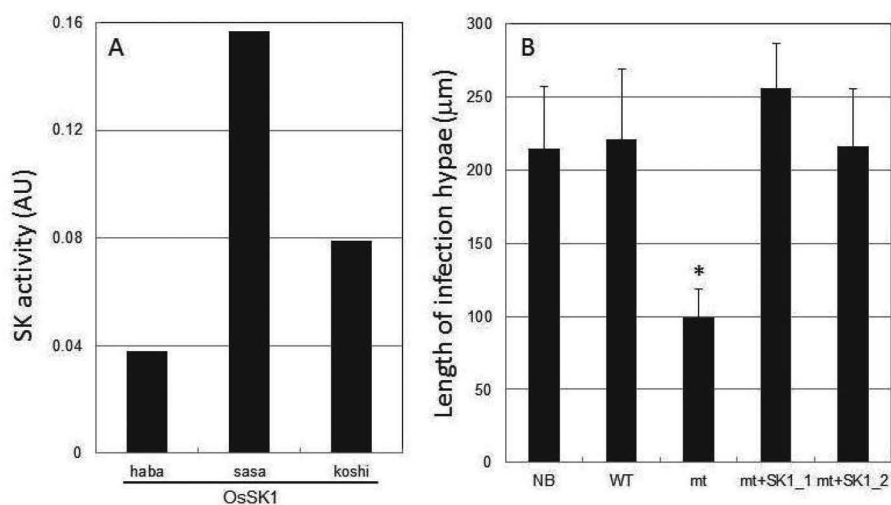


図 222-2 OsSK1 タンパク質の酵素活性とノックアウト変異体のいもち病抵抗性
A：SK 酵素活性、haba：ハバタキ型、sasa：ササニシキ型、koshi：コシヒカリ型
B：*OsSK1* ノックアウト変異体のいもち病抵抗性 WT：野生型ホモ、mt：変異型ホモ、mt+SK1 変異型ホモにササニシキ型 *OsSK1* を過剰発現した形質転換体 *：t-検定により NB (日本晴) に対して有意差有り (P<0.05)。

(ウ) 圃場における *OsSK1* ノックアウト変異体のいもち病抵抗性

OsSK1 ノックアウト変異体の圃場におけるいもち病抵抗性を検討するため、いもち病多発圃場での栽培試験を行った。この結果、野生型の日本晴に比べて *OsSK1* 変異体では病斑面積が69%、病斑数が52%抑制され、圃場においても有意ないもち病抵抗性が確認された。

工 考 察

(ア) 本研究の結果、ハバタキ由来のいもち病圃場抵抗性遺伝子は糖キナーゼをコードする *OsSK1* であることが明らかになった。これまでにイネの圃場抵抗性遺伝子として単離されたのは、*pi2l* (Fukuoka et al. 2009)²⁾ および *Pbl* (Hayashi et al. 2010)³⁾ のみであり、*OsSK1* の構造と推定される機能はこれらのいずれとも全く異なる新規の遺伝子であった。

(イ) *OsSK1* の酵素活性と抵抗性との相関を検討した結果、両者に負の相関が認められたことから、糖キナーゼ活性の低下によっていもち病圃場抵抗性が付与されると考えられた。この結果は *Tos17* 挿入ノックアウト変異体が抵抗性を示すことから支持された。

(ウ) 本研究で単離された遺伝子をノックアウトした変異体は圃場においても有意ないもち病抵抗性を示したことから、いもち病抵抗性育種への有用性が期待される。

オ 今後の課題

本研究の結果、ハバタキ由来の圃場抵抗性遺伝子は機能低下型の糖キナーゼであることが明らかになった。これまで糖キナーゼが病害抵抗性に関与することが明らかになった例は無く、この遺伝子が関与する未知の抵抗性機構の存在が推定される。今後は糖キナーゼの活性が低下することによりどのような機構でイネがいもち病抵抗性となるかを詳細に検討し、未知の抵抗性機構を明らかにする必要がある。

カ 要 約

ハバタキに見出された圃場抵抗性の原因遺伝子は糖キナーゼをコードする *OsSK1* であることが明らかになった。対立遺伝子由来のリコンビナントタン

パク質を用いた酵素活性の測定から、この遺伝子がコードする糖キナーゼ活性と圃場抵抗性が負に相関することが明らかになった。さらに、*Tos17* 挿入によるノックアウト変異体がいもち病抵抗性を示すこと、およびササニシキ型 *OsSK1* を形質転換したノックアウト変異体は抵抗性を示さなくなることから、原因遺伝子の産物である糖キナーゼの機能低下によりイネがいもち病圃場抵抗性を獲得することが明らかになった。さらに、ノックアウト変異体をいもち病多発圃場で栽培したところ、圃場においてもいもち病抵抗性を示したことからこの遺伝子は育種材料として有用であることが明確に示された。

キ 引用文献

- 1) Takahashi A. et al. (2003). Hyperphosphorylation of a mitochondrial protein, prohibitin, is induced by calyculin A in a rice lesion-mimic mutant *cdrl*. Plant Physiol. 132 : 1861-1869.
- 2) Fukuoka S. et al. (2009). Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. Science. 325 : 998-1001.
- 3) Hayashi N. et al. (2010). Durable panicle blast-resistance gene *Pbl* encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication. Plant J. 64 : 498-510.

研究担当者 (小林一成*)

3 耐病性シグナル伝達に関わるタンパク質複合体の機能解明 (PM10007)

ア 研究目的

作物の収量は糸状菌、細菌、ウイルスなどによる病害により大きな影響を受けている。ところが、病害の軽減のため、農薬の使用が現在は中心であり、将来は作物が本来持っている耐病性機能を強化してゆくことが期待されている。そのために本研究においては、現在までに分子レベルで明らかになっていない、耐病性シグナル伝達の分子機構を理解し、耐病性の付与に必要な遺伝子及びタンパク質を分子遺伝学やプロテオミクスの方法を利用して同定する。同定した遺伝子及びタンパク質間の相互作用を *in vitro* 及び *in vivo* でさまざまな方法を用いて解析し、

耐病性シグナル伝達における遺伝子（タンパク質）のネットワークを明らかにする。さらに、ネットワークの動態をイメージング等の新規な方法を用いて解析する。こうした研究により得られた情報を用い、作物の耐病性強化のための分子育種の戦略を構築する。以上の研究より既存の方法では得ることのできない優れた耐病性を持った作物の作出を図る。

イ 研究方法

（ア）R タンパク質の機能に関する新規な発見

タバコの葉を用いた過剰発現により、OsRac1 やいもち病抵抗性タンパク質 Pit の機能解析を行った。OsRac1 のドミナントネガティブ型の過剰発現イネや OsRac1 の RNAi イネを作出し、OsRac1 が Pit を介した耐病性経路に関与するか検討した。

（イ）OsRac1 と PAMP 受容体に関する新規な発見

これまでの知見から、PAMP を認識したレセプター型キナーゼが OsRac1 の活性化タンパク質である GEF をリン酸化して、OsRac1 を活性化することが示唆されている。OsRacGEF1 とさまざまなレセプター型キナーゼの相互作用と OsRac1 の活性化の分子機構を明らかにする。

（ウ）細胞膜貫通型免疫レセプターの成熟と細胞内輸送に関する新規な発見

各種の変異体や細胞内輸送の阻害剤を用いて、細胞膜貫通型免疫レセプターの成熟と細胞内輸送機構の解明を行った。

（エ）OsRac1 による防御関連遺伝子の制御機構の解明

basic helix-loop-helix 型転写因子である Rice immunity 1 (RIM1) のアクティベーションタグラインを用いて、耐病性への関与を検討した。PAL1 や OsWRKY19 等の防御関連遺伝子の転写調節に RIM1 が関与するか否かを遺伝子発現解析やゲルシフトアッセイを用いて検討した。MAPK3、MAPK6 による RIM1 の活性調節機構を検討した。

（オ）イネの免疫反応を制御する Defensome モデルの構築

Defensome 構成タンパク質の相互作用タンパク質を Affinity chromatography, 酵母 two hybrid 法、共免疫沈降、in vitro 結合実験を用いて同定する。

ウ 研究結果

（ア）R タンパク質の機能に関する新規な発見

抵抗性 (R) タンパク質は、病原体の侵入を感知する細胞内レセプターとして働き、植物の自然免疫において極めて重要な分子である。しかしながら、R タンパク質がどのようなシグナル分子を介して植物の免疫を誘導するかは不明であった。我々は、これまでに、低分子量 G タンパク質 OsRac1 がイネの免疫において、主要なスイッチタンパク質であることを明らかにしている (1, 2, 3)。イネのいもち病菌の R タンパク質 Pit が G タンパク質 OsRac1 に直接結合し、OsRac1 を活性化することを見出した (4)。また、Pit は、OsRac1 を活性化することにより、活性酸素や過敏感細胞死を制御して、いもち病に対する抵抗性を制御することを明らかにした (図 223-1)。

（イ）OsRac1 と PAMP 受容体に関する新規な発見

植物の細胞膜には病原菌の感染を認識するための多数の受容体型キナーゼが存在する。受容体型キナーゼである OsCERK1 と、真菌の細胞壁を構成するキチンと結合するタンパク質 OsCEBiP は、細胞膜において複合体を形成しキチンを認識する。しかしながら、認識した後細胞内において起こるシグナル伝達機構は明らかにされていない。我々は、イネにおいて、キチンにより細胞膜にて低分子量 G タンパク質である OsRac1 が非常にすばやく活性化されることを時空間的な解析から見い出した (5)。また、この OsRac1 の活性化は GEF である OsRacGEF1 によることを明らかにした。

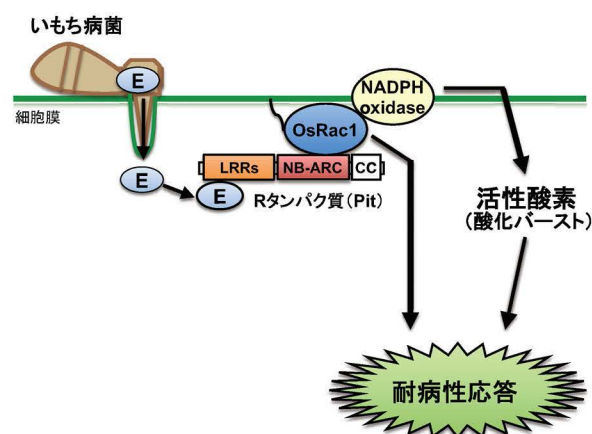


図 223-1 R タンパク質 (Pit) による OsRac1 の活性化

OsRacGEF1 は OsCERK1 の細胞内ドメインと相互作用しており、キチンの刺激に依存してその 549 番目のセリン残基がリン酸化された。OsRacGEF1 はこのリン酸化により活性化され、OsRac1 の活性化を促すことが明らかになった。さらに、OsCERK1 と OsRacGEF1 を含むタンパク質複合体が小胞体から細胞膜まで小胞輸送されていることが示され、細胞膜において OsRac1 をくわえた OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 複合体が形成されていることが示唆された (図 223-2)。

(ウ) 細胞膜貫通型免疫レセプターの成熟と細胞内輸送に関する新規な発見

これまでにイネの低分子量 GTP 結合タンパク質 OsRac1 がイネの自然免疫において重要な役割を果たすことを明らかにしている。我々は OsRac1 にコシャペロンの Hop/Sti1 が直接結合することを見出した (6)。さらに、抵抗性タンパク質の安定性に関するシャペロンタンパク質複合体の構成タンパク

質である Hsp90, SGT1, RAR1 と Hop/Sti1 が直接結合することも見出した。また、Hop/Sti1 の RNAi 植物体は、いもち病菌の増殖が増大し、耐病性に関する遺伝子の発現が減少する。反対に Hop/Sti1 過剰発現体は、いもち病に対して強くなることから、Hop/Sti1 を含むタンパク質複合体が、植物の免疫に関して重要な役割を果たしていることが明らかになった。Hop/Sti1 と Hsp90 がキチンレセプターである OsCERK1 に直接結合することを見出した。COPII 依存的な小胞体-ゴルジ間の輸送を制御する GTP 結合タンパク質である Sar1 の変異体や小胞輸送の阻害剤であるブレフェルディン A を用いた解析から、Hop/Sti1、Hsp90 と OsRac1 は、CERK1 と小胞体内で複合体を形成することが示唆された。さらに、OsCERK1 は、COPII 小胞を介してゴルジに輸送され、ゴルジから細胞膜に輸送されることを見出した (図 223-3)。

(エ) OsRac1 による防御関連遺伝子の制御機構

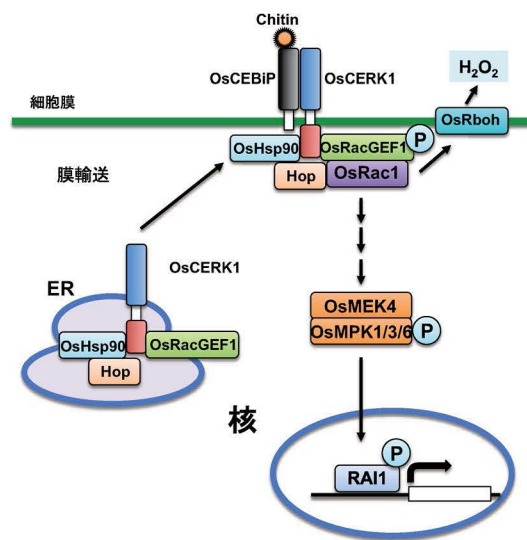


図 223-2 OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 モジュール
OsRac1 タンパク質を活性化し耐病性を誘導

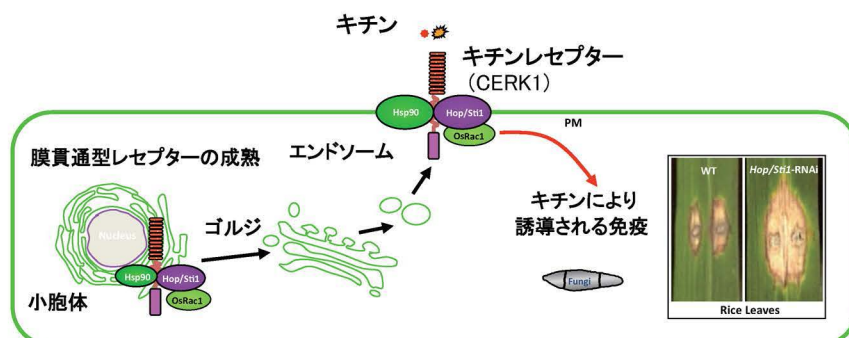


図 223-3 Hop/Sti1 シャペロン複合体がレセプターの成熟と細胞内輸送に重要

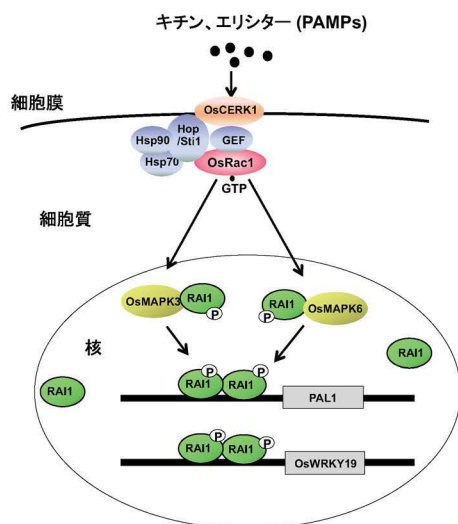


図 223-4 OsRac1 による防御関連遺伝子の制御機構

の解明

OsRac1 による防御関連遺伝子の制御機構を明らかにする目的で、恒常的活性型の OsRac1 により発現誘導がされる転写因子を検索したところ、basic helix-loop-helix 型転写因子である Rac Immunity1 (RAI1) を得た。RAI1 が耐病性に関与するか否かを感染実験により検討した。RAI1 のアクティベーションタグラインは、顕著に耐病性が向上しており、RAI1 が耐病性に関与する分子であることが明らかになった (7)。RAI1 により発現が調節される遺伝子をマイクロアレイを用いて単離を試み、PAL1 と OsWRKY19 を同定した。RAI1 のアクティベーションタグラインでは、PAL1 と OsWRKY19 の発現が上昇し、反対に、RAI1 RNAi 個体では発現が減少した。さらに、ゲルシフトアッセイにより、RAI1 が PAL1 と OsWRKY19 のプロモーター部位に直接結合することも見出した。以上の結果から、RAI1 は PAL1 と WRKY19 のプロモーター部位に直接結合して、それらの遺伝子発現調節をしていることが明らかになった。MAPK3 と MAPK6 による basic helix-loop-helix 型転写因子 SPEECHLESS のリン酸化が気孔形成に重要であることが知られている。SPEECHLESS と同様に、RAI1 が MAPK3 と MAPK6 に直接相互作用することを明らかにした。さらに、OsRac1 と MAPK3 及び MAPK6 も複合体を形成することを見出した。PAL1 と OsWRKY19 のプロモーターを用いたレポーターアッセイによ

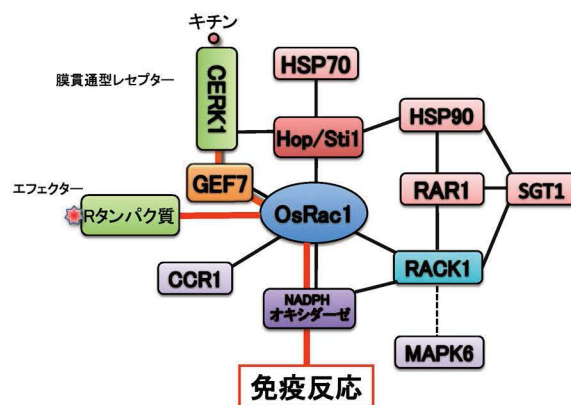


図 223-5 イネの免疫反応を制御する Defensome モデル

り、MAPK3 あるいは MAPK6 依存的に、PAL1 と OsWRKY19 の発現が誘導されることを明らかにした (図 223-4)。また、異なる転写因子 OsRap2.6 が同様のメカニズムで防御関連遺伝子を制御することも明らかにしている (8)。

(オ) イネの免疫反応を制御する Defensome モデルの構築

プロテオーム解析により、OsRac1 複合体 Defensome を構成する因子として、RAR1, Hsp90, RACK1, Hop/Sti1 を同定し、それらのタンパク質が耐病性において重要な役割を果たすことを明らかにした (6,9)。バイオイメージングを駆使した結果、OsRac1 が細胞膜貫通型レセプター (OsCERK1) や R タンパク質 (Pit) などの病原体レセプターと結合することを見出した (図 224-5)。さらに、Defensome は、細胞膜貫通型レセプター (OsCERK1) と R タンパク質 (Pit) では、異なるプールで免疫タンパク質複合体を作製することを見出した。

上記以外にも、トリプタミンが耐病性に関与すること (10) や OsRac1 ファミリーの局在解析 (11) などを行った。

工 考 察

(ア) R タンパク質の機能に関する新規な発見

Pit は、OsRac1 を活性化することにより、活性酸素や過敏細胞死を制御して、いもち病に対する

抵抗性を制御することを明らかにした。本研究成果は、世界に先駆けて R タンパク質による耐病性誘導の分子メカニズムを明らかにしたものである。

(イ) OsRac1 と PAMP 受容体に関する新規な発見

容体からの指令は、OsRacGEF1 を介して OsRac1 まで伝えられていることが明らかとなった。つまり、イネの細胞膜上では普段から OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 タンパク質が待機しており、病原菌を感知後、即座に OsRac1 タンパク質のスイッチを ON にすることができると考えられる。

(ウ) 細胞膜貫通型免疫レセプターの成熟と細胞内輸送に関する新規な発見

Hop/Stil がキチンレセプター OsCERK1 に直接結合し、ER から細胞膜への輸送あるいは、ER での成熟に関与することが示唆された。Hop/Stil が現在不明である植物の病原体レセプターの輸送機構や成熟機構の解明の分子基盤となる可能性が高い。

(エ) OsRac1 による防御関連遺伝子の制御機構の解明

OsRac1 は MAPK3 あるいは MAPK6 によるリン酸化を介して転写因子 RAI1 の活性を調節し、PAL1 と OsWRKY19 の発現を調節することが示唆された。

(オ) イネの免疫反応を制御する Defensome モデルの構築

生化学的な解析の結果、OsRac1 は自身の活性化に依存して高分子の複合体を形成することが明らかになった。この結果から、直接的に OsRac1 がタンパク質複合体を形成することが証明できた。本研究のスタート時点では、不明瞭であった OsRac1 を含むタンパク質複合体 Defensome の分子実体を明らかにしつつある。タンパク質複合体レベルで、植物免疫の解析を行った例は、ほとんどなく、重要な知見を得た。

オ 今後の課題

(ア) R タンパク質の機能に関する新規な発見

R タンパク質による OsRac1 の活性化機構やエフェクターの認識機構を解明する必要がある。また、R タンパク質の活性化機構を生化学的に解明する必要がある。

(イ) OsRac1 と PAMP 受容体に関する新規な発見

見

PAMP 受容体によるシグナル伝達経路の全貌をほぼ明らかにしており、今後の課題はない。

(ウ) 細胞膜貫通型免疫レセプターの成熟と細胞内輸送に関する新規な発見

細胞膜貫通型免疫レセプター OsCERK1 がゴルジから直接細胞膜へ輸送されるのか、それともエンドソーム等を介して細胞膜に輸送されるのかは不明であり、今後の課題である。

(エ) OsRac1 による防御関連遺伝子の制御機構の解明

OsRac1 による防御関連遺伝子の制御機構の全貌をほぼ明らかにしており、今後の課題はない。

(オ) イネの免疫反応を制御する Defensome モデルの構築

Defensome の全貌は、ほぼ明らかにしつつあるが、Defensome モデルで最も重要な論文がまだジャーナルに受理されていないので、論文を通さなければならない。

力 要 約

(ア) R タンパク質の機能に関する新規な発見

R タンパク質 Pit が免疫スイッチタンパク質 OsRac1 を介して耐病性を誘導する。

(イ) OsRac1 と PAMP 受容体に関する新規な発見

OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 モジュールが病原菌を感知後、OsRac1 を活性化し耐病性を誘導する。

(ウ) 細胞膜貫通型免疫レセプターの成熟と細胞内輸送に関する新規な発見

Hop/Stil がキチンレセプター OsCERK1 に直接結合し、ER から細胞膜への輸送あるいは、ER での成熟に関与する。

(エ) OsRac1 による防御関連遺伝子の制御機構の解明

OsRac1 は MAPK3 あるいは MAPK6 によるリン酸化を介して転写因子 RAI1 の活性を調節し、防御関連遺伝子を制御する。

(オ) イネの免疫反応を制御する Defensome モデルの構築

Defensome は、細胞膜貫通型レセプター (OsCERK1) と R タンパク質 (Pit) では、異なるプー

ルで免疫タンパク質複合体を形成する。

キ 引用文献

- 1) Chen, L., and Shimamoto, K. (2011). Emerging roles of molecular chaperones in plant innate immunity. J. Gen. Plant Pathol. 77 : 409-417.
- 2) Kawano, Y., Chen, L., and Shimamoto, K. (2010). The function of Rac small GTPase and associated proteins in rice innate immunity. Rice. 3 : 112-121.
- 3) Wong, H. L., and Shimamoto, K. (2009). Sending ROS on a bullet train. Science signaling 2 : pe60.
- 4) Kawano, Y., Akamatsu, A., Hayashi, K., Housen, Y., Okuda, J., Yao, A., Nakashima, A., Takahashi, H., Yoshida, H., Wong, H. L., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2010). Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease resistance protein Pit plays a critical role in rice innate immunity. Cell. Host Microbe 7 : 362-375.
- 5) Akamatsu, A., Wong, H., Fujiwara, M., Okuda, J., Nishide, K., Uno, K., Imai, K., Umemura, K., Kawasaki, T., Kawano, Y., and Shimamoto, K. (2013) An OsCEBiP/OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 module is an essential component of chitin-induced rice immunity. Cell Host Microbe. 13 (4), 465-476.
- 6) Chen, L., Hamada, S., Fujiwara, M., Zhu, T., Thao, N. P., Wong, H. L., Krishna, P., Ueda, T., Kaku, H., Shibuya, N., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2010). The Hop/Stil-Hsp90 chaperone complex facilitates the maturation and transport of a PAMP receptor in rice innate immunity. Cell Host Microbe. 7 : 185-196.
- 7) Kim, S. H., Oikawa, T., Kyojuka, J., Wong, H. L., Umemura, K., Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Kawano, Y., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2012). The bHLH Rac immunity1 (RAI1) is activated by OsRac1 via OsMAPK3 and OsMAPK6 in rice immunity. Plant Cell Physiol. 53 : 740-754.
- 8) Wamaitha, M., Yamamoto, R., Wong, H., Kawasaki, T., Kawano, Y., and Shimamoto, K. (2012). OsRap2.6 transcription factor contributes to rice innate immunity through its interaction with Receptor for Activated Kinase-C 1 (RACK1). Rice. 5 : 35.
- 9) Fujiwara, M., Hamada, S., Hiratsuka, M., Fukao, Y., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2009) Proteome analysis of detergent-resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1-mediated innate immunity in rice. Plant Cell Physiol. 50 : 1191-1200.
- 10) 1Fujiwara, T., Maisonneuve, S., Isshiki, M., Mizutani, M., Chen, L., Wong, H. L., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2010). Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. J Biol Chem. 285 : 11308-11313.
- 11) Chen, L., Shiotani, K., Togashi, T., Miki, D., Aoyama, M., Wong, H. L., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2010). Analysis of the Rac/Rop small GTPase family in rice : expression, subcellular localization and role in disease resistance. Plant Cell Physiol. 51 : 585-595.

研究担当者（島本 功*）

4 イネの誘導抵抗性におけるシグナル・ネットワーク解明 (PM10008)

ア 研究目的

イネのサリチル酸防御応答シグナル伝達経路中の転写因子 WRKY45 は、抵抗性誘導剤による誘導抵抗性において中心的な役割を果たし、*WRKY45* 過剰発現イネはいもち病、白葉枯病、ごま葉枯病に強い抵抗性を示す (1-3)。しかしながら、WRKY45 に制御されている抵抗性反応は不明であり、環境要因などにより誘導される抵抗性反応に起因する生育遅延が WRKY45 の実用化を妨げている。本研究は、WRKY45 に制御されている抵抗性反応および WRKY45 の活性発現制御機構を解明し、WRKY45 の実用化研究にフィードバックできる知見を得ることを目的とした。

イ 研究方法

(ア) いもち病菌の感染過程を解析するには、イネをシードリングケース中で6.5 葉期まで育成し、非切断葉鞘裏面接種法を用いてイネいもち病菌(レース007.0)の胞子懸濁液(2×10^5 /ml)を接種した。経時的にサンプリングして顕微鏡観察を行い、感染型を3型(A:付着器のみで侵入も宿主反応も見られない、B:被侵入表皮細胞が壊死し、侵入菌糸伸展停止、C:侵入菌糸が生きた宿主細胞内で伸展)に類別し、それぞれの感染型の出現率を調べた。また、過酸化水素の集積を調べるため、DAB染色(1mg/ml)をサンプリング前8時間暗所で行った。

(イ) 転写因子による標的プロモーターの活性化を解析するには、標的プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を接続したレポーター遺伝子およびエフェクター遺伝子(WRKY45およびWRKY62)をパーティクルガンでイネ葉鞘に共導入して一過的に遺伝子発現させ、プロモーターの活性化によるルシフェラーゼ活性を計測した。

(ウ) 遺伝子発現のBTH応答性発現が特定の転写因子に制御されているか否かを調べるには、各転写因子のノックダウンイネを用い、BTH等の処理後にqRT-PCRで発現解析した。BTH処理は、イネ実生に根から吸収させる方法で行った。また、DEX誘導性発現系で各転写因子を発現させる系を用い、遺伝子発現がその転写因子に依存しているか否かを調査した。

ウ 研究結果

(ア) *WRKY45* 過剰発現イネにおけるいもち病菌の葉鞘裏面接種後の顕微鏡観察から、WRKY45に制御されている抵抗性反応により、発芽したいもち病菌の95%以上がイネ細胞への侵入段階で阻止され、さらに過敏感細胞死をとまなう反応によって侵入した菌糸の進展が阻止されることがわかった。また、電子顕微鏡観察により、いもち病菌が*WRKY45* 過剰発現イネの細胞に侵入する時、イネの細胞壁内に活性酸素の発生が認められた(1)。

(イ) *WRKY45* をデキサメタゾン誘導的に発現させた結果、*WRKY45* の転写の自己制御および転写因子WRKY62, OsNAC4, OsHSF1の遺伝子の早期誘導が観察された。これらの結果から、*PR* 遺伝子やジテルペン型ファイトアレキシン(DP)合成およ

び細胞死に関わる遺伝子の転写が、転写因子のカスケードにより制御されていることがわかった。

(ウ) DP合成遺伝子群は、BTH処理のみでは転写誘導されず、BTH処理したイネにいもち病を接種した後にはじめて転写誘導されることから、DP合成遺伝子群はBTHによってサリチル酸経路を介してプライミングされることがわかった(図224-1)。また、*WRKY45*-kd イネではDP合成遺伝子群のプライミングは観察されず、*WRKY45*-ox イネでは、いもち病菌感染後の転写誘導が顕著に早まることから、DP合成遺伝子の発現のプライミングはWRKY45に依存していると考えられる。さらに、サリチル酸経路とサイトカニン経路との相乗作用がプライミングに関わっていることが示唆された(図224-1)(4)。

(エ) *WRKY62*-kd イネの解析により、DP合成遺伝子群の転写誘導にはWRKY62も関わっていることが明らかになった。また、*WRKY62*-kd イネはいもち病抵抗性が弱くなっていた。一方、*WRKY62*-ox イネは一定の条件下でいもち病抵抗性を示した。これらの結果は、WRKY62がいもち病抵抗性反応を正に制御していることを示しており、サリチル酸経路中の転写制御カスケード中の役割と矛盾しない。一方、WRKY62による抵抗性反応は環境の影響を受けて変化することがわかり、防御応答と環境応答との相互作用に関わるキー因子としての役割が示唆された(図224-1)。

(オ) WRKY45は、細胞核内のユビキチン-プロテアソーム系によって恒常的に分解されていることがわかった。これは病原体非存在下の不要な防御応答を抑制する仕組みと推測される。一方、サリチル酸経路の活性化時には、WRKY45のユビキチン-プロテアソーム分解によりWRKY45の転写活性が上昇することが示唆された。これらの結果からWRKY45は、ユビキチン-プロテアソームにより状況によって異なる二面的な制御を受けていることが明らかになった(5)。同様の二面的制御はシロイヌナズナのNPR1でも報告されている。イネのOsNPR1(6)はユビキチン-プロテアソーム分解を受けないことがわかり、イネとシロイヌナズナのサリチル酸経路の違いが明らかになった(図224-2)。

(カ) WRKY45はイネ細胞内で数カ所にリン酸化を受けていることがわかった。またMPK6は

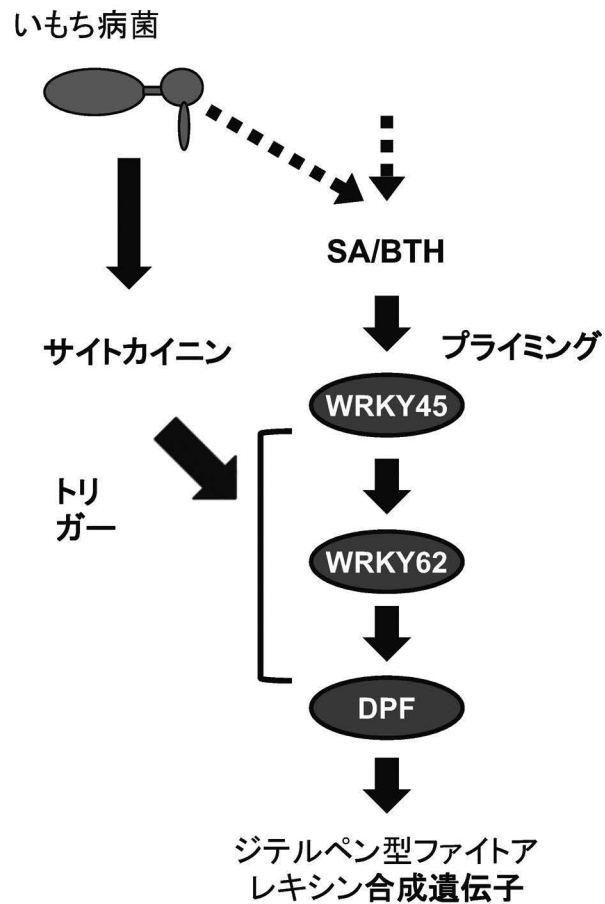


図 224-1 ジテルペン型ファイトアレキシン合成遺伝子の発現制御のモデル
SA 経路によるジテルペン型ファイトアレキシン合成遺伝子発現のプライミングには、WRKY45 → WRKY62 → DPF の転写制御カスケードが関与している。いもち病菌によるトリガーの過程にはサイトカイニン・シグナル伝達が関与している。

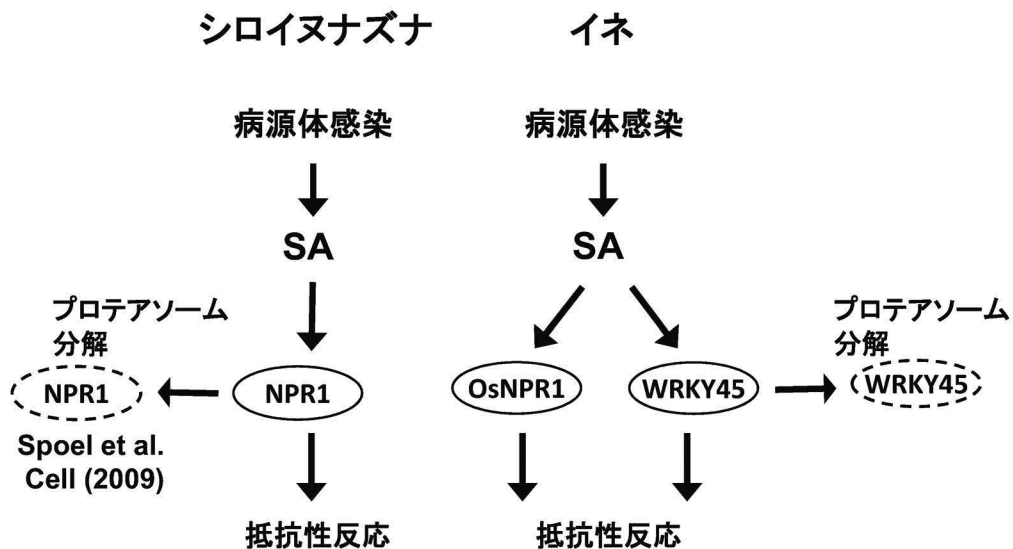


図 224-2 イネとシロイにナズナにおける防御応答制御因子のプロテアソーム分解制御。シロイヌナズナでは NPR1 が、イネでは WRKY45 がプロテアソーム分解を受け、これにより非感染時の防御応答の抑制および SA 経路活性化時の防御応答の促進という二面的な制御が行われている。

サリチル酸によって活性化する。WRKY45は、MKK10-1-MPK6 および MKK6 -MPK6 の組み合わせによって *in vitro* でリン酸化されることがわかった (7)。また、MKK10-1 および MKK6 の恒常的活性型を誘導的に発現させると、WRKY45 の自己制御によって *WRKY45* の転写量が増大した。これらの結果はサリチル酸経路特異的 MAPK カスケードによって WRKY45 のリン酸化が制御されていることを示唆している。

(キ) ABA がサリチル酸経路に対して抑制的に作用し、WRKY45 および OsNPR1 による病害抵抗性を抑制することを明らかにした (8, 9)。これにより、低温や乾燥によってサリチル酸経路による病害抵抗性が抑制されることが説明される。

(ク) CC-NB-LRR 型の穂いもち病抵抗性タンパク質 Pb1 は WRKY45 とタンパク質間相互作用することがわかった。また、Pb1 系統における *WRKY45* 抑制実験などから、Pb1 による病害抵抗性が WRKY45 に依存していることがわかった。

工 考 察

WRKY45 のプロテアソーム分解制御やプライミング効果の機構、サリチル酸経路に対する環境の影響など、WRKY45 の利用に際して問題となる生育・収量への悪影響との関わりが推測される重要な知見を得た。これらの知見は、サリチル酸経路やそれと相互作用する環境因子の作用を媒介するシグナル伝達の改変、WRKY45 のタンパク質の改変などを通じて、さらに高度なサリチル酸経路および WRKY45 の利用につながるものが期待される。

オ 今後の課題

WRKY45 の翻訳後制御やその制御に関わる因子を用いてさらに高度な複合病害抵抗性の改良を行うには、WRKY45 の活性制御に関わるアミノ酸の特定やシグナル伝達間の相互作用に関わる実行因子に関する知見が不足している。特に ABA がサリチル酸経路に対して抑制的に作用する際の作用点が同定できれば、その制御により冷害時のいもち病の抑制につながると期待される。

カ 要 約

(ア) WRKY45 は、侵入阻止および菌糸進展阻止

の2段階の抵抗性反応でイネいもち病菌に対する抵抗性を与えることがわかった。

(イ) WRKY45 は、WRKY62 や DPF を介してジテルペン型ファイトアレキシンを制御していることが明らかになった。

(ウ) WRKY45 は、プロテアソーム分解により、非感染時の防御応答の抑制と感染時の防御応答の促進の二面的制御を受けていることがわかった。

(エ) SA 経路に対し、ABA は抑制的に、サイトカイニン は促進的に、それぞれ作用して WRKY45 依存的病害抵抗性に影響することがわかり、WRKY45 による病害抵抗性に対する環境因子の影響との関連が推測された。

キ 引用文献

- 1) Shimono M, *et al.* (2012). Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterial disease resistance. *Mol Plant Pathol* .13 (1) : 83-94.
- 2) Takatsuji H, Jiang C-J, & Sugano S (2010). Salicylic acid signaling pathway in rice and the potential applications of its regulators. *JARQ* .44 (3) : 217-223.
- 3) Shimono M, *et al.* (2007) .Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *Plant Cell* .19 (6) : 2064-2076.
- 4) Jiang CJ, *et al.* (2013). Cytokinins act synergistically with salicylic Acid to activate defense gene expression in rice. *Mol Plant-Microbe Interact* .26 (3) : 287-296.
- 5) Matsushita A, *et al.* (2013). The nuclear ubiquitin proteasome degradation affects WRKY45 function in the rice defense program. *Plant J* .73 (2) : 302-313.
- 6) Sugano S, *et al.* (2010). Role of OsNPR1 in rice defense program as revealed by genome-wide expression analysis. *Plant Mol Biol* .74 (6) : 549-562.
- 7) Ueno Y, *et al.* (2013). MAP kinases phosphorylate rice WRKY45. *Plant Signaling & Behavior* : 8 (6), e24510 (2013).
- 8) Yazawa K, Jiang C-J, Kojima M, Sakakibara H, & Takatsuji H (2012). Reduction of abscisic acid levels or inhibition of abscisic acid signaling

in rice during the early phase of *Magnaporthe oryzae* infection decreases its susceptibility to the fungus. *Physiol Mol Plant Pathol* 78 : 1-7.

- 9) Jiang CJ, *et al.* (2010) Absciscic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice-*Magnaporthe grisea* interaction. *Mol Plant-Microbe Interact* 23 (6) : 791-798.

研究担当者（高辻 博志*、古賀 博則、菅野 正治、姜 昌杰、山崎 宗郎）

5 感染初期におけるイネといもち病菌相互作用の解明 (PM10009)

ア 研究目的

植物は病原菌の感染を認識すると生体防御反応を引き起こし、病原菌の感染を妨害する。動・植物における病原糸状菌（カビ）の初期認識には、グルカン、キチン、マンナンといった菌の細胞壁成分が病原体関連分子パターン（PAMPs）として関与することが知られており、それに対応して病原菌は宿主による認識を回避する方法を進化させてきた。例えば、炭そ病菌では感染時において、植物がきわめて鋭敏に認識・攻撃できる細胞壁のキチンを認識能力がより低いキトサンに変換することが知られている。いもち病菌は主にイネ科穀類に感染する病原糸状菌であり、イネに対してはキチンオリゴマーがエリシターとして作用することが知られているにもかかわらず、いもち病菌の感染時の細胞壁構成成分の動態に関する知見はほとんどない。提案者はこれまでにいもち病菌の感染時に、菌の細胞壁の構成がダイナミックに変化し、イネが認識できないようにしていることを示唆する結果を得てきている。そこで本研究では、いもち病菌細胞壁成分の機能について分子生物学、生化学、組織学手法を用いて解析を行うとともに、この現象をこれまでに明らかになっていないイネいもち病菌における植物の細胞壁認識の回避メカニズムととらえ、イネの耐病性遺伝子ネットワークにおける“抜け穴”を見出すという新規な視点で病害防除への応用を図る。

イ 研究方法

（ア）イネーいもち病菌相互作用における α -1,3-グルカンの感染時の機能

いもち病菌は感染時に特異的に細胞表層に α -1,3-グルカン*1を蓄積することを見出した。そこで、イネーいもち病菌相互作用における α -1,3-グルカンの感染時の機能について分子生物学、細胞化学、生化学手法により解析する。イネいもち病菌における α -1,3-グルカンの機能を解析すると共に、いもち病菌の α -1,3-グルカン生合成酵素遺伝子変異株を接種した感染時のイネ細胞における遺伝子発現や細胞状態の変化を解析する。また、菌の細胞壁から精製した α -1,3-グルカンを用いて、 α -1,3-グルカンのイネに対するエリシター活性を遺伝子発現などを指標に確認する。 α -1,3-グルカンが感染時のイネによる認識回避に関わっていることが明らかになれば、 α -1,3-グルカナーゼ導入イネの作出を行い、抵抗性付与に関わるかどうか確認を行う。

（イ）宿主植物の防御応答を制御する新規いもち病菌因子の解析

植物を認識したいもち病菌ではヘテロ3量体Gタンパク質が活性化されて感染器官の分化が誘導されることが知られている。ヘテロ3量体Gタンパク質が恒常的に活性化したいもち病菌変異株がイネやオオムギに防御応答を誘導したことから、ヘテロ3量体Gタンパク質シグナルにより宿主植物の防御応答に働きかけるいもち病菌因子の発現が制御されていることが推測される。そこで、マイクロアレイ解析によりこの因子の特定を行い、さらに遺伝子破壊などによりその機能の詳細な解析を行う。

ウ 研究結果

（ア）イネ病原性糸状菌における感染時特異的な α -1,3-グルカンによる表層への蓄積

イネいもち病菌、イネごま葉枯病菌、紋枯病菌は世界的に問題となっているイネ3大病害の原因菌である。イネごま葉枯病菌（子囊菌）と紋枯病菌（担子菌）はイネいもち病菌（子囊菌）と進化上非常に遠い関係にあり、この3菌の感染機構は全く異なっているにもかかわらず、イネいもち病菌と同様に感染時に α -1,3-グルカンで菌体を覆うことを見出した（藤川ら¹⁾、藤川ら²⁾）。

（イ） α -1,3-グルカンを利用したイネ防御応答の遅延

α -1,3-グルカンを欠損したイネいもち病菌は感染能を失った。また、この欠損株を接種したイネでは、

防御関連遺伝子の発現が菌の植物体内への侵入前に既に誘導されていた。この誘導のタイミングが野生型のいもち病菌を接種した場合より明らかに早かったことから、イネいもち病菌は α -1,3-グルカンを利用してイネの抵抗性応答を遅延させていることが明らかになった。

(ウ) イネ病原性糸状菌に共通の宿主自然免疫回避機構の解明

細菌由来の α -1,3-グルカン分解酵素を発現させたイネは、イネいもち病菌、イネごま葉枯病菌、紋枯病菌に同時に耐性を示した(図 225-1)。また、これらの病原性糸状菌を接種した α -1,3-グルカン分解酵素発現イネでは防御関連遺伝子の発現が迅速に誘導された。つまり菌体表面の α -1,3-グルカンの分解により植物の自然免疫が活性化されたことを示す。以上の結果から、イネ病原性糸状菌は α -1,3-グルカンを利用して宿主植物の自然免疫を回避して感染していることが明らかになった。

(イ) ムギ類の防御応答を抑制するエフェクター*2因子の特定

感染シグナル活性化時に特異的に発現が誘導される遺伝子の中から、分泌シグナルを持つタンパク質遺伝子の機能解析を行った。これらの遺伝子の欠損

株や分泌シグナル欠損株はイネには感染できるがムギ類(オオムギ、コムギ、イタリアンライグラス)には感染できず、さらにオオムギの防御応答を強く引き起こすことが分かった。このことから、これらの遺伝子にはムギ類の防御応答を抑制していもち病菌の感染を促進するエフェクター機能があることが明らかになった。

工 考 察

(ア) α -1,3-グルカンを利用した植物免疫からのステルス化

本研究から、イネの3大病原性糸状菌(いもち病菌、ごま葉枯病菌、紋枯病菌)は感染時に菌糸表層へ α -1,3-グルカンを蓄積することにより細胞壁 PAMPs の露出を防ぎ、植物の PAMPs 認識を遅延させていることが明らかになった。すなわち、 α -1,3-グルカンはこれらの糸状菌において植物免疫からステルス化して感染するための因子であるといえる。

(イ) α -1,3-グルカナーゼの病害防除への利用

α -1,3-グルカナーゼ遺伝子導入イネはイネ病原性糸状菌(いもち病菌、ごま葉枯病菌、紋枯病菌)に対して同時に耐病性を示した。これらの病原菌は進

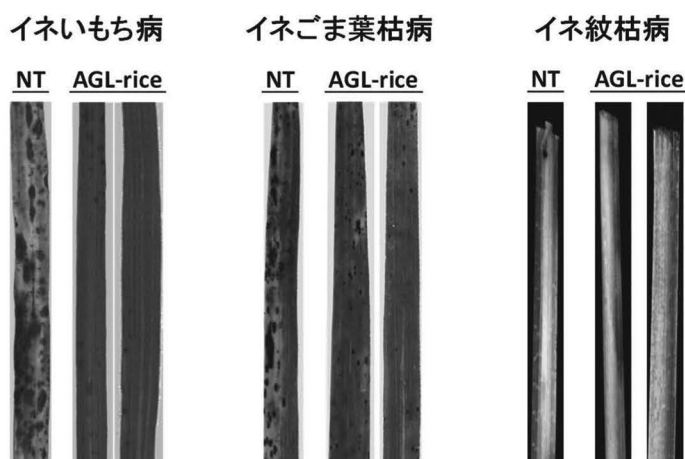


図 225-1 α -1,3-グルカナーゼ遺伝子導入によるイネへの病害抵抗性付与

- 1) 細菌由来の α -1,3-グルカン分解酵素遺伝子を導入したイネは、イネの3大病原性糸状菌(いもち病菌、ごま葉枯病菌、紋枯病菌)に対して抵抗性を示す。病原菌が侵入した部位は褐色に変化するが、AGL-riceでは感染が広がらなかったため葉の殆どは緑色に保たれている。NT: 非組換えイネ; AGL-rice: α -1,3-グルカン分解酵素遺伝子導入イネ

*1: α -1,3-グルカンとは糖(グルコース)からなる多糖の1つ。カビの細胞壁(細胞の外側を囲む構造)を構成する成分。

*2: エフェクターとは病原菌の分泌するタンパク質などで植物の免疫などに作用する物質の総称。

化上非常に遠い関係にあることから、他の多くの病原性糸状菌でも α -1,3-グルカンがステルス因子として機能していることが推測される。本研究結果は植物への α -1,3-グルカナーゼ遺伝子導入以外にも、 α -1,3-グルカナーゼ酵素自体や α -1,3-グルカナーゼ生産菌の利用などの方法による植物の自然免疫の活性化による「普遍的なカビ病害防除法」に応用できる可能性がある。

(ウ) ムギ類に対するエフェクターの同定

いもち病菌が分泌するムギ類に対するエフェクタータンパク質のホモログは多くの糸状菌が持っているものの、その機能は殆ど解析されていない。本研究からこのエフェクタータンパク質がムギ類の防御応答を抑制することが明らかになった。この遺伝子のホモログが特に病原菌ゲノム中に多く見られたことから、他の病原性糸状菌でも同様な機能を持っている可能性がある。

オ 今後の課題

(ア) 糸状菌ステルス因子としての α -1,3-グルカンの普遍的

イネの3大病原性糸状菌（いもち病菌、ゴマ葉枯病菌、紋枯病菌）では α -1,3-グルカンがステルス因子として利用して宿主植物の免疫をナーゼ遺伝子の導入によりイネに糸状菌病害抵抗性を付与することに成功したが、他の植物と病原菌の組み合わせでも同様の効果が見られることを確認する必要がある。

(イ) ムギ類のエフェクターの作用機構

ムギ類の防御応答を抑制するエフェクターを発見したがその作用機構は全く明らかになっておらず、今後解析をする必要がある。

カ 要 約

(ア) α -1,3-グルカナーゼを利用したイネ3大糸状菌病害の同時防除

イネ病原性糸状菌（イネいもち病菌、イネ紋枯病菌、イネゴマ葉枯病菌）ではイネが分解できない α -1,3-グルカンでPAMPsを覆い隠すことにより、イネの自然免疫の発動を遅延させることが明らかになった。

(イ) いもち病菌が分泌するムギ類の自然免疫を抑制するエフェクターの解明

植物認識シグナルにより発現が誘導される新規エフェクターを見出した。このエフェクターの分泌によりムギ類の防御応答が抑制され、結果としてイネいもち病菌のムギ類への感染が促進されることが明らかになった。

キ 引用文献

- 1) Fujikawa T, Kuga Y, Yano S, Yoshimi A, Tachiki T, Abe K and Nishimura M (2009). Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Molecular Microbiology*.73 : 553-570.
- 2) Fujikawa T, Sakaguchi A, Nishizawa Y, Yusuke Kouzai, Minami E, Yano S, Koga H, Meshi T and Nishimura M (2012). Surface α -1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by preventing innate immunity in plants. *PLoS Pathogens*. 8 : e1002882.

研究担当者（西村麻里江*、藤川貴史、坂口歩、南栄一）

6 いもち病菌エフェクタータンパク質によるイネ耐病性発現調節機構の解明（PM10010）

ア 研究目的

いもち病菌のイネ感染機構、イネのいもち病抵抗性機構を解明することは、イネの安定栽培に大きく貢献する。従来、イネ-いもち病菌相互作用に関する研究は、イネ抵抗性遺伝子といもち病菌の非病原性遺伝子の相互作用に集中してなされてきた。近年になって、病原微生物の病原性遺伝子「エフェクター」に関心が集まっている。病原菌エフェクターは、宿主の耐病性機構を操作することにより、感染に貢献していると考えられる。本研究課題では、新規いもち病菌エフェクターを多数同定することにより、いもち病菌感染機構、イネの新規耐病性機構を明らかにし、得られた新知見に基づいて、最終的にイネ抵抗性育種に貢献することを目的とする。

イ 研究方法

現在までに同定済みの、AVR-Pia、AVR-Pii、AVR-Pikの3種類の非病原力因子（Yoshida et al. 2009）のエフェクター機能解明を進める。さらに4

種類の新規エフェクター候補因子、MC69, RU528, GAS2, MAS3 について機能解明を進める。主な研究内容は、(1) エフェクターが標的としているイネタンパク質を同定する、(2) エフェクターのイネ細胞内への移行機構について解析することからなる。エフェクターの標的因子の探索には、酵母 2-ハイブリッド法および、共免疫沈降法を活用する。さらにエフェクターと相互作用する植物抵抗性タンパク質を酵母 2-ハイブリッド法により同定する。大規模イネ突然変異系統群および次世代シーケンサーを利用して、イネ全ゲノム解析により、新規抵抗性遺伝子 *Pii* を単離同定する。

ウ 研究結果

(ア) いもち病菌非病原力因子の相互作用因子の同定

いもち病菌非病原力因子、AVR-Pia、AVR-Pii、AVR-Pik と相互作用するイネ因子を同定する目的で、これらのタンパク質を過剰発現するイネ細胞を利用し、共免疫沈降実験を実施した。AVR-Pii と相互作用するイネ因子として、細胞外分泌に関わる新規 Exo70 タンパク質を同定した。AVR-Pii を過剰発現するイネでは、耐病性に関わるタンパク質の細胞外分泌が阻害されている可能性が示唆された。AVR-Pia および AVR-Pik は、主に膜局在性のタンパク質であることが示された。

(イ) いもち病菌非病原力因子 AVR-Pik と抵抗性タンパク質 Pik の相互作用

AVR-Pik と Pik の認識相互作用は、Pik-1 の coiled coil (CC) ドメインを介した物理的結合によって決定されていることが示された (Kanzaki et al. 2012)。さらに、いもち病菌非病原力因子 AVR-Pik と *Pik-1* 遺伝子の間に、直接結合を介した共進化が生じている可能性が示された (Kanzaki et al. 2012)。

(ウ) いもち病菌分泌タンパク質 MC69 の機能

いもち病菌分泌タンパク質 MC69 がいもち病菌の病原性に必要であることが明らかになった。さらに、MC69 のホモログタンパク質が、ウリ類炭疽病菌の病原性にも必要であることが示された (Saitoh et al. 2012)。

(エ) イネ全ゲノム解析手法の確立

イネ全ゲノム解析により、QTL 領域を迅速に同

定する技術「QTL-seq 法」(Takagi et al. 2013) を開発した。QTL-seq 法により、イネ品種「Nortai」の圃場抵抗性遺伝子領域を同定した。さらに、突然変異体の原因遺伝子を同定する技術 MutMap 法を開発した (Abe et al. 2012)。MutMap 法により、イネ品種「ひとめぼれ」の真正抵抗性遺伝子 *Pii* を同定した。さらに、MutMap 法を改良して、交配を必要とせず、突然変異体の原因遺伝子を同定する技術 MutMap+ 法を開発した。

エ 考察

(ア) いもち病菌非病原力因子の相互作用因子の同定

いもち病菌非病原力因子 AVR-Pii は、イネの細胞外分泌機構に作用している可能性が示唆された。

(イ) いもち病菌非病原力因子 AVR-Pik と抵抗性タンパク質 Pik の相互作用

いもち病菌 AVR-Pik とイネ *Pik* 遺伝子が共進化している可能性が示唆された。このことは、*Pik* 遺伝子に多様な対立遺伝子が存在する原因であると考察される。

(ウ) いもち病菌分泌タンパク質 MC69 の機能

MC69 タンパク質は、植物病原糸状菌に広く保存されていることから、MC69 を標的とした防除方法の可能性が示唆される。

(エ) イネ全ゲノム解析手法の確立

イネ全ゲノム解析により QTL や突然変異遺伝子を迅速に同定する技術基盤を確立した。本技術は、今後イネ有用遺伝子同定に広く活用されるものと推察される。さらに、有用な圃場抵抗性 QTL と真性抵抗性遺伝子 *Pii* の同定にも至ったので、今後の解析が待たれる。

オ 今後の課題

(ア) いもち病菌非病原力因子の相互作用因子の同定

AVR-Pia および AVR-Pik のイネ側相互作用因子の同定が急務である。

(イ) いもち病菌非病原力因子 AVR-Pik と抵抗性タンパク質 Pik の相互作用

AVR-Pik と Pik タンパク質の相互作用の構造解析が必要となる。

(ウ) いもち病菌分泌タンパク質 MC69 の機能

MC69 のイネ側因子との相互作用解明が必要である。

(エ) イネ全ゲノム解析手法の確立

イネ以外の作物への応用について検討する必要がある。

カ 要 約

(ア) いもち病菌非病原力因子の相互作用因子の同定

いもち病菌非病原力因子 AVR-Pii がイネの細胞外分泌に関わるタンパク質 Exo70 と相互作用することを明らかにした。

(イ) いもち病菌非病原力因子 AVR-Pik と抵抗性タンパク質 Pik の相互作用

AVR-Pik と Pik タンパク質が直接物理的相互作用することを明らかにした。

(ウ) いもち病菌分泌タンパク質 MC69 の機能

MC69 がいもち病菌の病原性に必要であることを明らかにした。

(エ) イネ全ゲノム解析手法の確立

QTL-seq 法、MutMap 法の開発に成功し、圃場抵抗性遺伝子領域と真性抵抗性遺伝子 *Pii* を同定した。

キ 引用文献

- 1) Yoshida, K. et al. (2009). Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell*. 21 : 1573-1591.
- 2) Kanzaki, H. et al. (2012). Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice *Pik* genes driven by their physical interactions. *Plant Journal*. 72 : 894-907.
- 3) Saitoh, H. et al. (2012). Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. *PLoS Pathogens* 8 : e102711.
- 4) Takagi, H. et al. (2013). QTL-seq : Rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant Journal* 74 : 174-193.
- 5) Abe, A. et al. (2012). Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nature Biotechnol.* 30 : 174-178.

研究担当者 (寺内良平*)

第 3 編 研 究 の 要 約

I 研究年次・予算区分

研究年次：2008 年度～2012 年度

予算区分：農林水産省農林水産技術会議 新農業
展開ゲノムプロジェクト

II 主任研究者

主 査：国立大学法人名古屋大学

推進リーダー：国立大学法人名古屋大学

生物機能開発利用研究センター

教授

松岡 信（2008～2012 年度）

サブリーダー（酸化還元ストレス、カドミウム、栄養不足等の環境ストレス耐性に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究）：
国立大学法人東京大学大学院農学生命科学研究科

教授

藤原 徹（2008～2012 年度）

サブリーダー（イネ種子の登熟や高温下での品質に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究）：

国立大学法人東北大学大学院生命科学
研究科

教授

渡辺 正夫（2008～2012 年度）

III 研究担当機関

国立大学法人名古屋大学

（委託先）公立大学法人福井県立大学

（委託先）国立大学法人東京大学

（委託先）国立大学法人名古屋大学

（委託先）国立大学法人岡山大学

（委託先）国立大学法人京都大学

（委託先）国立大学法人東北大学

（委託先）独立行政法人農業生物資源研究所

（委託先）国立大学法人埼玉大学

（委託先）大学共同利用機関法人情報・システム
研究機構国立遺伝学研究所

（委託先）国立大学法人奈良先端科学技術大学院
大学

（委託先）独立行政法人農業・食品産業技術総合
研究機構作物研究所

（委託先）独立行政法人農業・食品産業技術総合
研究機構中央農業総合研究センター

北陸研究センター

（委託先）国立大学法人新潟大学

（委託先）学校法人東京理科大学

IV 研究目的

1 穂や草型など収量の決定に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

穂や草型など収量の決定に係わる主要な質的形質遺伝子について、イネ穂の形と粒数、種子の形、及び耐倒伏性に関与する遺伝子の単離と機能解析を目的とする。

2 酸化還元ストレス、カドミウム、栄養不足等の環境ストレス耐性に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

酸化還元ストレス、カドミウム、栄養不足等の環境ストレス耐性に係わる主要な質的形質遺伝子について、ホウ素、ヒ素、カドミウム、ケイ酸輸送とアルミニウム耐性に関わる遺伝子、窒素・アンモニアと土壌固定リンの吸収能力に関わる遺伝子、穂発芽耐性や耐湿性に関わる遺伝子の単離と機能解析を目的とする。

3 イネ種子の登熟や高温下での品質に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

イネ種子の登熟や高温下での品質に係わる主要な質的形質遺伝子について、開花期低温ストレス耐性に関連する遺伝子、胚乳の初期発生とゲノムインプリンティング、登熟期高温で発生する乳白粒を低減し高温登熟性を改善する遺伝子発現特性解析と高温耐性関連遺伝子の単離と機能解析を目的とする。

V 研究方法

1 穂や草型など収量の決定に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

イネ穂の形と粒数、種子の形、及び耐倒伏性等に

関して、それらを制御する遺伝子群を分子遺伝学的、分子生物学的手法により単離し、それら遺伝子がコードするタンパク質を生化学的手法により機能解析を行い、機能の改変により形質を改変し、イネの分子育種を行った。

2 酸化還元ストレス、カドミウム、栄養不足等の環境ストレス耐性に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

ホウ素、ヒ素、カドミウム、ケイ酸輸送やアルミニウム耐性、窒素・アンモニアと土壌固定リンの吸収能力、穂発芽耐性や耐湿性に関して、それらを制御する遺伝子群を分子遺伝学的、分子生物学的手法

により単離し、それら遺伝子がコードするタンパク質を生化学的手法により機能解析を行い、機能の改変により形質を改変し、イネの分子育種を行った。

3 イネ種子の登熟や高温下での品質に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

開花期低温ストレス耐性、胚乳の初期発生とゲノムインプリンティング、登熟期高温で発生する乳白粒や高温登熟性、及び高温耐性に関して、それらを制御する遺伝子群を分子遺伝学的、分子生物学的手法により単離し、それら遺伝子がコードするタンパク質を生化学的手法により機能解析を行い、機能の改変により形質を改変し、イネの分子育種を行った。

研究計画表（研究室別年次計画）

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	08	09	10	11	12	機関	研究室
3 イネの質的形質遺伝子の単離と機能解明							
(1) おもな個別研究課題の成果							
1) 穂や草型など収量の決定に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究							
①イネ穂の形と粒数に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0001)	←				→	東京大学 農業生命科学研究科	栽培学研究室
②イネの種子形に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0002)	←				→	福井県立大学 生物資源学部	分子生物学研究領域
③イネの耐倒伏性に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0003)	←				→	名古屋大学 生物機能開発利用研究センター	植物分子育種分野
2) 酸化還元ストレス、カドミウム、栄養不足等の環境ストレス耐性に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究							
①ホウ素・ヒ素およびカドミウムの輸送機構の解明 (IPG0005)	←				→	東京大学 大学院農学生命科学研究科	植物栄養・肥料学研究室
②イネのケイ酸輸送とアルミニウム耐性に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0006)	←				→	岡山大学 資源植物科学研究所	植物ストレス学グループ

③地力窒素と土壌固定リンの吸収能力に優れたイネの選抜と育種 (IPG0007)	←				→	京都大学 農学研究科応用生命科学専攻	植物栄養学分野
④低アンモニウムイオン吸収利用能力に関わる遺伝子の単離と窒素利用機構の解析 (IPG0008)	←				→	東北大学 大学院農学研究科・附属先端農学研究センター	植物細胞生物学分野
⑤穂発芽耐性遺伝子の単離と機能解析 (IPG0010)	←				→	農業生物資源研究所 農業生物先端ゲノム研究センター	イネゲノム育種研究ユニット
⑥イネの耐湿性に寄与する遺伝子の同定と機能解析 (IPG0012)	←				→	名古屋大学 大学院生命農学研究科	植物遺伝育種学研究室
3) イネ種子の登熟や高温下での品質に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究							
①イネ胚乳の初期発生とゲノムインプリンティングの解析 (IPG0017)	←				→	奈良先端科学技術大学院大学	GCOE 植物生殖遺伝学
②開花期低温ストレス耐性関連遺伝子の単離と機能解析 (IPG0019)	←				→	バイオサイエンス研究科 東北大学 大学院生命科学研究科	植物生殖遺伝分野
③登熟期高温で発生する乳白粒を低減する遺伝子の単離・解析 (IPG0020)	←				→	農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センター	作物開発研究領域
④高温登熟性優良品種の遺伝子発現特性解析と高温耐性関連遺伝子の単離・解析 (IPG0021)	←				→	新潟大学 農学部 4	応用生物科学科
(2) 各個別研究課題の概要							
1) 穂や草型など収量の決定に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究							
①イネの直立葉形質に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0004)	←				→	名古屋大学 高等研究院	
2) 酸化還元ストレス、カドミウム、栄養不足等の環境ストレス耐性に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究							

①放射性核種を用いたカドミウム及びミネラル養分のイメージング・トレーサー解析 (IPG0009)	←					東京大学 大学院農学生命科学研究科	放射線植物生理学
②種子の休眠性と乾燥耐性に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0011)	←					名古屋大学 生物機能開発利用 研究センター	植物細胞機能研究 分野
③イネの細胞死関連遺伝子の単離と機能解析 (IPG0013)	←	→				農業生物資源研究 所 植物科学研究領域	植物・微生物間相 互作用研究ユニッ ト
④イネの酸化ストレス応答の分子基盤研究 (IPG0014)	←					埼玉大学 環境科学研究セン ター	
3) イネ種子の登熟や高温下での品質に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究							
①イネの花粉不稔突然変異体の解析 (IPG0015)	←	→				名古屋大学 大学院生命農学研 究科	植物生産化学第二
②イネ生殖細胞分化関連遺伝子の単離と機能解析 (IPG0016)	←					国立遺伝学研究所 実験圃場	
③開花期高温ストレス耐性関連遺伝子の単離・解析 (IPG0018)	←					農業・食品産業技 術総合研究機構 作物研究所	稲研究領域
④胚乳の特性を決める転写制御因子の単離と機能解明 (IPG0022)	←					東京理科大学 基礎工学部生物工 学科	植物分子生物学研 究室
⑤胚乳貯蔵物質の合成・蓄積を制御するシャペロンタンパク質の解析 (IPG0023)	←					農業生物資源研究 所 植物科学研究研究 領域	植物生産生理機能 研究ユニット

注) 文中の図、表、写真に付した番号は、上記研究課題番号とその中の一連番号を組合せて表示してある。
(例：3—(1)—1)—①の課題の1番目の図の場合は、図 3111-1 と表示)

VI 研究結果

1 穂や草型など収量の決定に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

イネの一穂粒数、種子の大きさや稈を太くする遺伝子を単離し、それらの機能を解析すると共に、これら遺伝子を利用することにより、イネの一穂粒数、種子サイズ、稈形質を改善することで、分子育種に貢献可能なことを示した。

2 酸化還元ストレス、カドミウム、栄養不足等の環境ストレス耐性に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

カドミウムやアルミニウム耐性に関わる遺伝子を複数単離し、それらの機能を明らかにすると共に、これらを用いて育種に利用できることを示した。イネの根を長くし、窒素の吸収を促進する遺伝子を単離し、バイオマス量を増加させることを示した。イネの穂発芽耐性 QTL を単離し、作用機作を明らか

にすると共に、コシヒカリを背景とした準同質遺伝子系統を育成した。イネの根の酸素漏出バリア形成に関与するスベリン生合成関連転写因子を単離し、過剰発現によりイネのROLバリアの機能が向上することを示した。

3 イネ種子の登熟や高温下での品質に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

イネの耐冷性に寄与する遺伝子を同定し、耐冷性に利用できることを示した。高温登熟玄米の外観品質維持に関わる遺伝子を単離し、高温登熟性向上に利用できることを示すとともに、デンプン分解酵素 α -アミラーゼ遺伝子の働きを抑えることで、登熟期高温で発生する乳白粒を低減できることを明らかにした。さらに、イネの胚乳成分を統御する制御因子を単離し機能解析を行った。

VII 今後の課題

着粒数を増加させる遺伝子、種子形決定遺伝子太稈遺伝子を利用した有用品種の生産現場における実証試験。カドミウムやアルミニウム耐性遺伝子利用による重金属低減イネ育種を実現すること。根の伸長性遺伝子導入有用系統の開発と圃場でのバイオマス増加の検証。イネ穂発芽耐性遺伝子やスベリン生合成関連転写因子を用いた、コムギ改良に向けた応用展開。コシヒカリの品質改善に向けて、 α -アミラーゼや高温登熟性関連遺伝子を利用した乳白粒低減イネの開発。

VIII 研究発表

原著論文

- 1) K. Tamai, J. F. Ma (2008). Reexamination of silicon effects on rice growth and production under field conditions using a low silicon mutant., *Plant Soil* 307 (1-2) : 21-27.
- 2) H. Takahashi, H. Matsumura, M. Kawai-Yamada, H. Uchimiya (2008). The cell death factor, cell wall elicitor of rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) causes metabolic alterations including GABA shunt in rice cultured cells., *Plant Signal Behav* 3 (11) : 945-953.
- 3) T. Sakata, A. Higashitani (2008). Male

sterility accompanied with abnormal anther developmental in plants-Genes and environmental stresses with special reference to high temperature injury., *Intl. J. Plant Dev. Biol.* 2 (1) : 42-51.

- 4) H. Yamakawa, T. Ebitani, T. Terao (2008). Comparison between locations of QTLs for grain chalkiness and genes responsive to high temperature during grain filling on the rice chromosome map., *Breed. Sci.* 58 (3) : 337-343.
- 5) N. Mitani, N. Yamaji, J. F. Ma (2008). Characterization of substrate specificity of a rice silicon transporter, *Lsi1*., *Pflügers Arch* 456 (4) : 679-686.
- 6) T. Kudo, A. Kawai, T. Yamaya, T. Hayakawa (2008). Cellular distribution of ACT domain repeat protein 9, a nuclear localizing protein, in rice (*Oryza sativa*)., *Physiol Plant* 133 (2) : 167-179.
- 7) J. Negi, O. Matsuda, T. Nagasawa, Y. Oba, H. Takahashi, M. Kawai-Yamada, H. Uchimiya, M. Hashimoto, K. Iba (2008). CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells., *Nature* 452 (7186) : 483-486.
- 8) T. Kazama, T. Nakamura, M. Watanabe, M. Sugita, K. Toriyama (2008). Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice., *Plant J* 55 (4) : 619-628.
- 9) N. Yamaji, N. Mitani, J. F. Ma (2008). A transporter regulating silicon distribution in rice shoots., *Plant Cell* 20 (5) : 1381-1389.
- 10) A. Endo, Y. Sawada, H. Takahashi, M. Okamoto, K. Ikegami, H. Koiwai, M. Seo, T. Toyomasu, W. Mitsunashi, K. Shinozaki, M. Nakazono, Y. Kamiya, T. Koshiba, E. Nambara (2008). Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells., *Plant Physiol* 147 (4) : 1984-1993.
- 11) J. F. Ma, N. Yamaji, N. Mitani, X. Y. Xu, Y. H. Su, S. P. McGrath, F. J. Zhao (2008).

- Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain., *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (29) : 9931-9935.
- 12) A. Shimizu, K. Kato, A. Komatsu, K. Motomura, H. Iekashi (2008). Genetic analysis of root elongation induced by phosphorus deficiency in rice (*Oryza sativa* L.) : fine QTL mapping and multivariate analysis of related traits., *Theor Appl Genet* 117 (6) : 987-996.
 - 13) T. Fujioka, F. Kaneko, T. Kazama, K. Suwabe, G. Suzuki, A. Makino, M. Endo, M. Kawagishi-Kobayashi, M. Watanabe (2008). Identification of small RNAs in late developmental stage of rice anthers., *Genes Genet Syst* 83 (3) : 281-284.
 - 14) M. Umehara, A. Hanada, S. Yoshida, K. Akiyama, T. Arite, N. Takeda-Kamiya, H. Magome, Y. Kamiya, K. Shirasu, K. Yoneyama, J. Kozuka, S. Yamaguchi (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones., *Nature* 455 (7210) : 195-200.
 - 15) K. Suwabe, G. Suzuki, H. Takahashi, K. Shiono, M. Endo, Y. Yano, M. Fujita, M. Masuko, H. Saito, T. Fujioka, F. Kaneko, T. Kazama, Y. Mizuta, M. Kawagishi-Kobayashi, N. Tsutsumi, N. Kurata, M. Nakazono, M. Watanabe (2008). Separated transcriptomes of male gametophyte and tapetum in rice : validity of a laser microdissection (LM) microarray., *Plant Cell Physiol* 49 (10) : 1407-1416.
 - 16) T. Hobo, K. Suwabe, K. Aya, G. Suzuki, K. Yano, T. Ishimizu, M. Fujita, S. Kikuchi, K. Hamada, M. Miyano, T. Fujioka, F. Kaneko, T. Kazama, Y. Mizuta, H. Takahashi, K. Shiono, M. Nakazono, N. Tsutsumi, Y. Nagamura, N. Kurata, M. Watanabe, M. Matsuoka (2008). Various spatiotemporal expression profiles of anther-expressed genes in rice., *Plant Cell Physiol* 49 (10) : 1417-1428.
 - 17) F. J. Munoz, E. Baroja-Fernandez, M. Ovecka, J. Li, T. Mitsui, M. T. Sesma, M. Montero, A. Bahaji, I. Ezquer, J. Pozueta-Romero (2008). Plastidial localization of a potato 'Nudix' hydrolase of ADP-glucose linked to starch biosynthesis., *Plant Cell Physiol* 49 (11) : 1734-1746.
 - 18) M. Watanabe (2008). Towards a comprehensive understanding of molecular mechanisms of sexual reproduction in higher plants., *Plant Cell Physiol* 49 (10) : 1404-1406.
 - 19) M. Tanaka, I. S. Wallace, J. Takano, D. M. Roberts, T. Fujiwara (2008). NIP6;1 is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in *Arabidopsis*., *Plant Cell* 20 (10) : 2860-2875.
 - 20) F. J. Zhao, J. F. Ma, A. A. Meharg, S. P. McGrath (2008). Arsenic uptake and metabolism in plants., *New Phytol* 181 (4) : 777-794.
 - 21) H. Shimada, H. Takeda, A. Tsunoda, T. Sasaki (2009). Regulatory mechanism on sucrose metabolism in rice endosperm by a specific protein kinase, SPK., *The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI* 16 : 1117-1123.
 - 22) M. Yamawaki, S. Kanno, H. Ishibashi, A. Noda, A. Hirose, K. Tanoi, T. M. Nakanishi (2009). The development of real-time RI imaging system for plant under light environment., *JOURNAL OF RADIOANALYTICAL AND NUCLEAR CHEMISTRY* 282 (1) : 275-279.
 - 23) S. Ito, T. Hara, Y. Kawanami, T. Watanabe, K. Thiraporn, N. Ohtake, K. Sueyoshi, T. Mitsui, T. Fukuyama, Y. Takahashi, T. Sato, A. Sato, T. Ohyama (2009). Carbon and Nitrogen Transport during Grain Filling in Rice Under High-temperature Conditions., *J. Agron. Crop Sci.* 195 (5) : 368-376.
 - 24) T. Ishimaru, A. K. Horigane, M. Ida, N. Iwasawa, Y. A. San-oh, M. Nakazono, N. K. Nishizawa, T. Masumura, M. Kondo, M. Yoshida (2009). Formation of grain chalkiness and changes in water distribution in developing rice caryopses grown under high-temperature stress., *J Cereal Sci* 50 (2) : 166-174.
 - 25) Y. Kato, K. Miwa, J. Takano, M. Wada, T. Fujiwara (2009). Highly boron deficiency-tolerant plants generated by enhanced expression of NIP5;1, a boric acid channel., *Plant Cell Physiol*

- 50 (1) : 58-66.
- 26) T. Kamiya, M. Tanaka, N. Mitani, J. F. Ma, M. Maeshima, T. Fujiwara (2009). NIP1;1, an aquaporin homolog, determines the arsenite sensitivity of *Arabidopsis thaliana*., *J Biol Chem* 284 (4) : 2114-2120.
 - 27) K. Oki, N. Inaba, K. Kitagawa, S. Fujioka, H. Kitano, Y. Fujisawa, H. Kato, Y. Iwasaki (2009). Function of the alpha subunit of rice heterotrimeric G protein in brassinosteroid signaling., *Plant Cell Physiol* 50 (1) : 161-172.
 - 28) H. Inoue, T. Kobayashi, T. Nozoye, M. Takahashi, Y. Kakei, K. Suzuki, M. Nakazono, H. Nakanishi, S. Mori, N. K. Nishizawa (2009). Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron (III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings., *J Biol Chem* 284 (6) : 3470-3479.
 - 29) M. Nagano, Y. Ihara-Ohori, H. Imai, N. Inada, M. Fujimoto, N. Tsutsumi, H. Uchimihya, M. Kawai-Yamada (2009). Functional association of cell death suppressor, *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome b5., *Plant J* 58 (1) : 122-134.
 - 30) S. Okamoto, E. Ohnishi, S. Sato, H. Takahashi, M. Nakazono, S. Tabata, M. Kawaguchi (2009). Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation., *Plant Cell Physiol* 50 (1) : 67-77.
 - 31) M. Fujimoto, S. Arimura, S. Mano, M. Kondo, C. Saito, T. Ueda, M. Nakazono, A. Nakano, M. Nishimura, N. Tsutsumi (2009). *Arabidopsis* dynamin-related proteins DRP3A and DRP3B are functionally redundant in mitochondrial fission, but have distinct roles in peroxisomal fission., *Plant J* 58 (3) : 388-400.
 - 32) C. F. Huang, N. Yamaji, N. Mitani, M. Yano, Y. Nagamura, J. F. Ma (2009). A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice., *Plant Cell* 21 (2) : 655-667.
 - 33) C. F. Huang, N. Yamaji, M. Nishimura, S. Tajima, J. F. Ma (2009). A rice mutant sensitive to Al toxicity is defective in the specification of root outer cell layers., *Plant Cell Physiol* 50(5) : 976-985.
 - 34) K. Toyooka, Y. Goto, S. Asatsuma, M. Koizumi, T. Mitsui, K. Matsuoka (2009). A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the Golgi to the plant cell exterior., *Plant Cell* 21 (4) : 1212-1229.
 - 35) K. Ikeda-Kawakatsu, N. Yasuno, T. Oikawa, S. Iida, Y. Nagato, M. Maekawa, J. Kyozuka (2009). Expression level of ABERRANT PANICLE ORGANIZATION1 determines rice inflorescence form through control of cell proliferation in the meristem., *Plant Physiol* 150 (2) : 736-747 .
 - 36) K. Oki, N. Inaba, H. Kitano, S. Takahashi, Y. Fujisawa, H. Kato, Y. Iwasaki (2009). Study of novel dl alleles, defective mutants of the alpha subunit of heterotrimeric G-protein in rice., *Genes Genet Syst* 84 (1) : 35-42.
 - 37) T. Arite, M. Umehara, S. Ishikawa, A. Hanada, M. Maekawa, S. Yamaguchi, J. Kyozuka (2009). dl4, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers., *Plant Cell Physiol* 50 (8) : 1416-1424.
 - 38) R. Y. Li, Y. Ago, W. J. Liu, N. Mitani, J. Feldmann, S. P. McGrath, J. F. Ma, F. J. Zhao (2009). The rice aquaporin Lsi1 mediates uptake of methylated arsenic species., *Plant Physiol* 150 (4) : 2071-2080.
 - 39) N. Mitani, Y. Chiba, N. Yamaji, J. F. Ma (2009). Identification and characterization of maize and barley Lsi2-like silicon efflux transporters reveals a distinct silicon uptake system from that in rice., *Plant Cell* 21 (7) : 2133-2142.
 - 40) H. Takahashi, K. Takahara, S. Hashida, T. Hirabayashi, T. Fujimori, M. Kawai-Yamada, T. Yamaya, S. Yanagisawa, H. Uchimiya (2009). Pleiotropic modulation of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis* plants overexpressing the NAD kinase2 gene., *Plant Physiol* 151 (1) : 100-113.
 - 41) I. Kasajima, K. Takahara, M. Kawai-Yamada, H.

- Uchimiya (2009). Estimation of the relative sizes of rate constants for chlorophyll de-excitation processes through comparison of inverse fluorescence intensities., *Plant Cell Physiol* 50 (9) : 1600-1616.
- 42) Y. Ito-Inaba, M. Sato, H. Masuko, Y. Hida, K. Toyooka, M. Watanabe, T. Inaba (2009). Developmental changes and organelle biogenesis in the reproductive organs of thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*)., *J Exp Bot* 60 (13) : 3909-3922.
- 43) K. Oki, K. Kitagawa, Y. Fujisawa, H. Kato, Y. Iwasaki (2009). Function of alpha subunit of heterotrimeric G protein in brassinosteroid response of rice plants., *Plant Signal Behav* 4 (2) : 126-128.
- 44) Y. Onda, T. Kumamaru, Y. Kawagoe (2009). ER membrane-localized oxidoreductase Erol is required for disulfide bond formation in the rice endosperm., *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (33) : 14156-14161.
- 45) M. Kawai-Yamada, Z. Hori, T. Ogawa, Y. Ihara-Ohori, K. Tamura, M. Nagano, T. Ishikawa, H. Uchimiya (2009). Loss of calmodulin binding to Bax Inhibitor-1 affects *Pseudomonas*-mediated hypersensitive response-associated cell death in *Arabidopsis thaliana*., *J Biol Chem* 284 (41) : 27998-28003.
- 46) N. Yamaji, J. F. Ma (2009). A Transporter at the Node Responsible for Intervascular Transfer of Silicon in Rice., *Plant Cell* 21 (9) : 2878-2883.
- 47) A. Kitajima, S. Asatsuma, H. Okada, Y. Hamada, K. Kaneko, Y. Nanjo, Y. Kawagoe, K. Toyooka, K. Matsuoka, M. Takeuchi, A. Nakano, T. Mitsui (2009). The Rice α -Amylase Glycoprotein Is Targeted from the Golgi Apparatus through the Secretory Pathway to the Plastids., *Plant Cell* 21 (9) : 2844-2858.
- 48) T. Kamiya, T. Fujiwara (2009). *Arabidopsis* NIP1;1 Transports Antimonite and Determines the Antimonite Sensitivity., *Plant Cell Physiol* 50 (11) : 1977-1981.
- 49) M. Endo, T. Tsuchiya, K. Hamada, S. Kawamura, K. Yano, M. Ohshima, A. Higashitani, M. Watanabe, M. Kawagishi-Kobayashi (2009). High Temperatures Cause Male Sterility in Rice Plants with Transcriptional Alterations during Pollen Development., *Plant Cell Physiol* 50 (11) : 1911-1922.
- 50) N. Yamaji, C. F. Huang, S. Nagao, M. Yano, Y. Sato, Y. Nagamura, J. F. Ma (2009). A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice., *Plant Cell* 21 (10) : 3339-3349.
- 51) Y. Abe, Kitano H., Ando T., Kono I., Yano M., Iwasaki Y (2010). Mapping of Small and Round Seed 2 (SRS2) gene in rice., *Rice Genet. Newsl.* 25 : 30-31.
- 52) 山脇 正人, 廣瀬 農, 菅野 里美, 石橋 弘規, 野田 章彦, 田野井 慶太朗, 中西 友子 (2010). 植物の研究のためのリアルタイム RI イメージングシステムの 109Cd 検出性能評価., *RADIOISOTOPES* 59 (3) : 155-162.
- 53) M. Isa, S. Bai, T. Yokoyama, J. F. Ma, Y. Ishibashi, T. Yuasa, M. Iwaya-Inoue (2010). Silicon enhances growth independent of silica deposition in a low-silica rice mutant, *lsil*., *Plant Soil* 331 (1-2) : 361-375.
- 54) T. Ookawa, K. Yasuda, H. Kato, M. Sakai, M. Seto, K. Sunaga, T. Motobayashi, S. Tojo, T. Hirasawa (2010). Biomass production and lodging resistance in 'Leaf Star', a new long-culm rice forage cultivar., *Plant Prod Sci* 13 (1) : 58-66.
- 55) K.C. She, H.Kusano, M.Yaeshima, T.Sasaki, H.Satoh, H. Shimada (2010). Reduced rice grain production under high-temperature stress closely correlates with ATP shortage during seed development., *Plant Biotechnology* 27 (1) : 67-73.
- 56) S.Uraguchi, T.Fujiwara (2010). Significant contribution of boron stored in seeds to initial growth of rice seedlings., *Plant and Soil* 340(1-2) : 435-442.
- 57) A.Miyagi, H.Takahashi, K.Takahara, T. Hirabayashi, Y.Nishimura, T.Tezuka, M.

- Kawai-Yamada, Uchimiya H (2010). Principal component and hierarchical clustering analysis of metabolites in destructive weeds; polygonaceous plants., *Metabolomics* 6 (1) : 146-155.
- 58) A.Miyagi, K.Takahara, H.Takahashi, M.Kawai-Yamada, H.Uchimiya (2010). Targeted metabolomics in an intrusive weed, *Rumex obtusifolius* L., grown under different environmental conditions reveals alterations of organ related metabolite pathway., *Metabolomics* 6 (4) : 497-510.
- 59) J. F. Ma, P. Ryan. (2010) Understanding how plants cope with acid soils. *Funct. Plant Biol.* 37 (4), iii-vi.
- 60) K. Kobayashi, M. Maekawa, A. Miyao, H. Hirochika, J. Kyojuka (2010). PANICLE PHYTOMER2 (PAP2), encoding a SEPALLATA subfamily MADS-box protein, positively controls spikelet meristem identity in rice., *Plant Cell Physiol* 51 (1) : 47-57.
- 61) Y. Yamagata, E. Yamamoto, K. Aya, K. T. Win, K. Doi, Sobrizal, T. Ito, H. Kanamori, J. Wu, T. Matsumoto, M. Matsuoka, M. Ashikari, A. Yoshimura (2010). Mitochondrial gene in the nuclear genome induces reproductive barrier in rice., *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (4) : 1494-1499.
- 62) W. Tamura, Y. Hidaka, M. Tabuchi, S. Kojima, T. Hayakawa, T. Sato, M. Obara, M. Kojima, H. Sakakibara, T. Yamaya (2010). Reverse genetics approach to characterize a function of NADH-glutamate synthase1 in rice plants., *Amino Acids* 39 (4) : 1003-1012.
- 63) K. Minakuchi, H. Kameoka, N. Yasuno, M. Umehara, L. Luo, K. Kobayashi, A. Hanada, K. Ueno, T. Asami, S. Yamaguchi, J. Kyojuka (2010). FINE CULM1 (FC1) works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice., *Plant Cell Physiol* 51 (7) : 1127-1135.
- 64) S. Yamaguchi, J. Kyojuka (2010). Branching hormone is busy both underground and overground. *Plant Cell Physiol* 51 (7) : 1091-1094.
- 65) T. Ookawa, T. Hobo, M. Yano, K. Murata, T. Ando, H. Miura, K. Asano, Y. Ochiai, M. Ikeda, R. Nishitani, T. Ebitani, H. Ozaki, E. R. Angeles, T. Hirasawa, M. Matsuoka (2010). New approach for rice improvement using a pleiotropic QTL gene for lodging resistance and yield., *Nat Commun* 1 : 132.
- 66) N. Yamaji, J. F. Ma (2011). Further characterization of a rice Si efflux transporter, Lsi2. *Soil Sci., Plant Nutr.* 57 : 259-264.
- 67) M.Obara, T.Takeda, T. Hayakawa, T. Yamaya (2011). Mapping quantitative trait loci controlling root length in rice seedlings grown with low or sufficient NH₄⁺ supply using backcross recombinant lines derived from a cross between *Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steud., *Soil Sci. Plant Nutr.* 57 (1) : 80-92.
- 68) T.Kamiya, T.Fujiwara (2011). A novel allele of the Arabidopsis phytochelatin synthase 1 gene conferring high sensitivity to arsenic and antimony., *Soil Sci. Plant Nutr.* 57 (2) : 272-278.
- 69) K.MIWA, T.FUJIWARA (2011). Role of overexpressed BOR4, a boron exporter, in tolerance to high level of boron in shoots., *Soil Sci. Plant Nutr.* 57 (4) : 558-565.
- 70) 田野井 慶太郎, 齊藤 貴之, 岩田 直子, 大前 芳美, 広瀬 農, 小林 奈通子, 岩田 錬, 中西 友子 (2011). 28Mg の製造とイネにおける Mg 吸収解析への利用., *RADIOISOTOPES* 60 (8) : 299-304.
- 71) K.Kaneko, C.Yamada, A.Yanagida, T.Koshu, U.Umezawa, K.Itoh, H.Hori, T.Mitsui (2011). Differential localizations and functions of rice nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase isozymes 1 and 3., *Plant Biotechnology* 28 (1) : 69-76.
- 72) W.Tamura, S.Kojima, A.Toyokawa, H.Watanabe, M.Tabuchi-Kobayashi, T. Hayakawa, T. Yamaya (2011). Disruption of a novel NADH-glutamate synthase2 gene caused marked reduction in spikelet number of rice.,

Front. Plant Sci. 2 (57) : 1-9.

- 73) T.Kato, S.Segami, M.Toriyama, I.Kono, T.Ando, M.Yano, H.Kitano, K.Miura, Y.Iwasaki (2011). Detection of QTLs for grain length from large grain rice (*oryza sativa* L.), Breed. Sci. 61 (3) : 269-274.
- 74) N. Mitani, N. Yamaji, Y. Ago, K. Iwasaki, J. F. Ma (2011). Isolation and functional characterization of an influx silicon transporter in two pumpkin cultivars contrasting in silicon accumulation., Plant J 66 (2) : 231-240.
- 75) J. Xia, N. Yamaji, J. F. Ma (2011). Further characterization of an aluminum influx transporter in rice., Plant Signal Behav 6 (1) : 160-163.
- 76) R. Ishikawa, T. Ohnishi, Y. Kinoshita, M. Eiguchi, N. Kurata, T. Kinoshita (2011). Rice interspecies hybrids show precocious or delayed developmental transitions in the endosperm without change to the rate of syncytial nuclear division., Plant J 65 (5) : 798-806.
- 77) M. Takahashi, M. Teranishi, H. Ishida, J. Kawasaki, A. Takeuchi, T. Yamaya, M. Watanabe, A. Makino, J. Hidema (2011). Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase repairs ultraviolet-B-induced CPDs in rice chloroplast and mitochondrial DNA., Plant J 66 (3) : 433-442.
- 78) M. Kusano, M. Tabuchi, A. Fukushima, K. Funayama, C. Diaz, M. Kobayashi, N. Hayashi, Y. N. Tsuchiya, H. Takahashi, A. Kamata, T. Yamaya, K. Saito (2011). Metabolomics data reveal a crucial role of cytosolic glutamine synthetase 1;1 in coordinating metabolic balance in rice., Plant J 66 (3) : 456-466.
- 79) Y. Onda, A. Nagamine, M. Sakurai, T. Kumamaru, M. Ogawa, Y. Kawagoe (2011). Distinct roles of protein disulfide isomerase and P5 sulfhydryl oxidoreductases in multiple pathways for oxidation of structurally diverse storage proteins in rice., Plant Cell 23 (1) : 210-223.
- 80) K. Miura, M. Ashikari, M. Matsuoka (2011). The role of QTLs in the breeding of high-yielding rice., Trends Plant Sci 16 (6) : 319-326.
- 81) K. L. Moore, M. Schroder, Z. Wu, B. G. Martin, C. R. Hawes, S. P. McGrath, M. J. Hawkesford, J. Feng Ma, F. J. Zhao, C. R. Grovenor (2011). High-resolution secondary ion mass spectrometry reveals the contrasting subcellular distribution of arsenic and silicon in rice roots., Plant Physiol 156 (2) : 913-924.
- 82) T. Tsutsui, N. Yamaji, J. Feng Ma (2011). Identification of a cis-acting element of ART1, a C2H2-type zinc-finger transcription factor for aluminum tolerance in rice., Plant Physiol 156 (2) : 925-931.
- 83) A. Nagamine, H. Matsusaka, T. Ushijima, Y. Kawagoe, M. Ogawa, T. W. Okita, T. Kumamaru (2011). A role for the cysteine-rich 10 kDa prolamin in protein body I formation in rice., Plant Cell Physiol 52 (6) : 1003-1016.
- 84) K. Ochiai, A. Shimizu, Y. Okumoto, T. Fujiwara, T. Matoh (2011). Suppression of a NAC-like transcription factor gene improves boron-toxicity tolerance in rice., Plant Physiol 156 (3) : 1457-1463.
- 85) M. S. Yun, T. Umemoto, Y. Kawagoe (2011). Rice debranching enzyme isoamylase3 facilitates starch metabolism and affects plastid morphogenesis., Plant Cell Physiol 52 (6) : 1068-1082.
- 86) N. Mitani-Ueno, N. Yamaji, F. J. Zhao, J. F. Ma (2011). The aromatic/arginine selectivity filter of NIP aquaporins plays a critical role in substrate selectivity for silicon, boron, and arsenic., J Exp Bot 62 (12) : 4391-4398.
- 87) N. Mitani-Ueno, N. Yamaji, J. F. Ma (2011). Silicon efflux transporters isolated from two pumpkin cultivars contrasting in Si uptake., Plant Signal Behav 6 (7) : 991-994.
- 88) T. Ohnishi, M. Yoshino, H. Yamakawa, T. Kinoshita (2011). The biotron breeding system : a rapid and reliable procedure for genetic studies and breeding in rice. Plant Cell Physiol 52 (7) : 1249-1257.

- 89) K. Asano, M. Yamasaki, S. Takuno, K. Miura, S. Katagiri, T. Ito, K. Doi, J. Wu, K. Ebana, T. Matsumoto, H. Innan, H. Kitano, M. Ashikari, M. Matsuoka (2011). Artificial selection for a green revolution gene during japonica rice domestication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (27) : 11034-11039.
- 90) K. Oda, M. Otani, S. Uruguchi, T. Akihiro, T. Fujiwara (2011). Rice ABCG43 is Cd inducible and confers Cd tolerance on yeast., *Biosci Biotechnol Biochem* 75 (6) : 1211-1213.
- 91) H. Takahashi, H. Saika, H. Matsumura, Y. Nagamura, N. Tsutsumi, N. K. Nishizawa, M. Nakazono (2011). Cell division and cell elongation in the coleoptile of rice alcohol dehydrogenase 1-deficient mutant are reduced under complete submergence., *Ann Bot* 108 (2) : 253-261.
- 92) I. Kasajima, K. Ebana, T. Yamamoto, K. Takahara, M. Yano, M. Kawai-Yamada, H. Uchimiya (2011). Molecular distinction in genetic regulation of nonphotochemical quenching in rice., *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (33) : 13835-13840.
- 93) M. Fukuda, M. Satoh-Cruz, L. Wen, A. J. Crofts, A. Sugino, H. Washida, T. W. Okita, M. Ogawa, Y. Kawagoe, M. Maeshima, T. Kumamaru (2011). The small GTPase Rab5a is essential for intracellular transport of proglutelin from the Golgi apparatus to the protein storage vacuole and endosomal membrane organization in developing rice endosperm., *Plant Physiol* 157 (2) : 632-644.
- 94) K. Yokosho, N. Yamaji, J. F. Ma (2011). An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice., *Plant J* 68 (6) : 1061-1069.
- 95) M. Tanaka, J. Takano, Y. Chiba, F. Lombardo, Y. Ogasawara, H. Onouchi, S. Naito, T. Fujiwara (2011). Boron-Dependent Degradation of NIP5;1 mRNA for Acclimation to Excess Boron Conditions in Arabidopsis., *Plant Cell* 23 (9) : 3547-3559.
- 96) T. Sakamoto, Y. T. Inui, S. Uruguchi, T. Yoshizumi, S. Matsunaga, M. Mastui, M. Umeda, K. Fukui, T. Fujiwara (2011). Condensin II Alleviates DNA Damage and Is Essential for Tolerance of Boron Overload Stress in Arabidopsis., *Plant Cell* 23 (9) : 3533-3546.
- 97) H. Tabuchi, Y. Zhang, S. Hattori, M. Omae, S. Shimizu-Sato, T. Oikawa, Q. Qian, M. Nishimura, H. Kitano, H. Xie, X. Fang, H. Yoshida, J. Kyozuka, F. Chen, Y. Sato (2011). LAX PANICLE2 of Rice Encodes a Novel Nuclear Protein and Regulates the Formation of Axillary Meristems., *Plant Cell* 23 (9) : 3276-3287.
- 98) K. Aya, G. Suzuki, K. Suwabe, T. Hobo, H. Takahashi, K. Shiono, K. Yano, N. Tsutsumi, M. Nakazono, Y. Nagamura, M. Matsuoka, M. Watanabe (2011). Comprehensive network analysis of anther-expressed genes in rice by the combination of 33 laser microdissection and 143 spatiotemporal microarrays., *PLoS One* 6 (10) : e26162.
- 99) S. Uruguchi, T. Kamiya, T. Sakamoto, K. Kasai, Y. Sato, Y. Nagamura, A. Yoshida, J. Kyozuka, S. Ishikawa, T. Fujiwara (2011). Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains., *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (52) : 20959-20964.
- 100) H. Takehisa, Y. Sato, M. Igarashi, T. Abiko, B. A. Antonio, K. Kamatsuki, H. Minami, N. Namiki, Y. Inukai, M. Nakazono, Y. Nagamura (2012). Genome-wide transcriptome dissection of the rice root system : implications for developmental and physiological functions., *Plant J* 69 (1) : 126-140.
- 101) C. F. Huang, N. Yamaji, K. Ono, J. F. Ma (2012). A leucine-rich repeat receptor-like kinase gene is involved in the specification of outer cell layers in rice roots., *Plant J* 69 (4) : 565-576.
- 102) C. F. Huang, N. Yamaji, Z. Chen, J. F. Ma (2012). A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice., *Plant J* 69 (5) : 857-867.
- 103) S. Marzougui, K. Sugimoto, U. Yamanouchi, M. Shimono, T. Hoshino, K. Hori, M. Kobayashi,

- K. Ishiyama, M. Yano (2012). Mapping and characterization of seed dormancy QTLs using chromosome segment substitution lines in rice., *Theor Appl Genet* 124 (5) : 893-902.
- 104) G. Duan, T. Kamiya, S. Ishikawa, T. Arao, T. Fujiwara (2012). Expressing ScACR3 in Rice Enhanced Arsenite Efflux and Reduced Arsenic Accumulation in rice grains., *Plant Cell Physiol* 53 (1) : 154-163.
- 105) J. Montpetit, J. Vivancos, N. Mitani-Ueno, N. Yamaji, W. Remus-Borel, F. Belzile, J. F. Ma, R. R. Belanger (2012). Cloning, functional characterization and heterologous expression of TaLsi1, a wheat silicon transporter gene., *Plant Mol Biol* 79 (1-2) : 35-46.
- 106) M. Fujii, K. Yokosho, N. Yamaji, D. Saisho, M. Yamane, H. Takahashi, K. Sato, M. Nakazono, J. F. Ma (2012). Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley., *Nat Commun* 3 : 713.
- 107) K. Takanashi, H. Takahashi, N. Sakurai, A. Sugiyama, H. Suzuki, D. Shibata, M. Nakazono, K. Yazaki (2012). Tissue-specific transcriptome analysis in nodules of *Lotus japonicus*., *Mol Plant Microbe Interact* 25 (7) : 869-876.
- 108) T. Abiko, L. Kotula, K. Shiono, A. I. Malik, T. D. Colmer, M. Nakazono (2012). Enhanced formation of aerenchyma and induction of a barrier to radial oxygen loss in adventitious roots of *Zea mays* contribute to its waterlogging tolerance as compared with maize (*Zea mays* ssp. *mays*)., *Plant Cell Environ* 35(9) : 1618-1630.
- 109) T. Yamamoto, A. Nakamura, H. Iwai, T. Ishii, J. F. Ma, R. Yokoyama, K. Nishitani, S. Satoh, J. Furukawa (2012). Effect of silicon deficiency on secondary cell wall synthesis in rice leaf., *J Plant Res* 125 (6) : 771-779.
- 110) K. Kobayashi, N. Yasuno, Y. Sato, M. Yoda, R. Yamazaki, M. Kimizu, H. Yoshida, Y. Nagamura, J. Kyojuka (2012). Inflorescence meristem identity in rice is specified by overlapping functions of three AP1/FUL-like MADS box genes and PAP2, a SEPALLATA MADS box gene., *Plant Cell* 24 (5) : 1848-1859.
- 111) H. Xiong, T. Kobayashi, Y. Kakei, T. Senoura, M. Nakazono, H. Takahashi, H. Nakanishi, H. Shen, P. Duan, X. Guo, N. K. Nishizawa, Y. Zuo (2012). AhNRAMP1 iron transporter is involved in iron acquisition in peanut., *J Exp Bot* 63 (12) : 4437-4446.
- 112) Z. C. Chen, N. Yamaji, R. Motoyama, Y. Nagamura, J. F. Ma (2012). Up-regulation of a magnesium transporter gene OsMGT1 is required for conferring aluminum tolerance in rice., *Plant Physiol* 159 (4) : 1624-1633.
- 113) M. Nagano, H. Uchimiya, M. Kawai-Yamada (2012). Plant sphingolipid fatty acid 2-hydroxylases have unique characters unlike their animal and fungus counterparts., *Plant Signal Behav* 7 (11) : 1388-1392.
- 114) L. Luo, W. Li, K. Miura, M. Ashikari, J. Kyojuka (2012). Control of Tiller Growth of Rice by OsSPL14 and Strigolactones, Which Work in Two Independent Pathways., *Plant Cell Physiol* 53 (10) : 1793-1801.
- 115) M. Hakata, M. Kuroda, T. Miyashita, T. Yamaguchi, M. Kojima, H. Sakakibara, T. Mitsui, H. Yamakawa (2012). Suppression of alpha-amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature., *Plant Biotechnol J* 10 (9) : 1110-1117.
- 116) N. Yamaji, Y. Chiba, N. Mitani-Ueno, J. Feng Ma (2012). Functional characterization of a silicon transporter gene implicated in silicon distribution in barley., *Plant Physiol* 160 (3) : 1491-1497.
- 117) N. I. Kobayashi, T. Saito, N. Iwata, Y. Ohmae, R. Iwata, K. Tanoi, T. M. Nakanishi (2012). Leaf senescence in rice due to magnesium deficiency-mediated defect in transpiration rate before sugar accumulation and chlorosis., *Physiol Plant*, 148 : 490-501.
- 118) T. Tsutsui, N. Yamaji, C. F. Huang, R. Motoyama, Y. Nagamura, J. F. Ma (2012). Comparative genome-wide transcriptional

- analysis of Al-responsive genes reveals novel Al tolerance mechanisms in rice., *PLoS One* 7 (10) : e48197.
- 119) M. Hakata, M. Kuroda, A. Ohsumi, T. Hirose, H. Nakamura, M. Muramatsu, H. Ichikawa, H. Yamakawa (2012). Overexpression of a rice TIFY gene increases grain size through enhanced accumulation of carbohydrates in the stem., *Biosci Biotechnol Biochem* 76 (11) : 2129-2134.
- 120) A.Sriprachote, P.Kanyawongha, K.Ochiai, T.Matoh (2012). Current situation of cadmium-polluted paddy soil, rice and soybean in the Mae Sot District, Tak Province, Thailand., *Soil Science and Plant Nutrition* 58 : 349-359.
- 121) A.Sriprachote, P.Kanyawongha, G.Pantuwan, K.Ochiai, T.Matoh (2012). Evaluation of Thai rice cultivars with low-grain cadmium., *Soil Science and Plant Nutrition* 58 : 568-572.
- 122) S. Segami, I. Kono, T. Ando, M. Yano, H. Kitano, K. Miura, and Y. Iwasaki (2012). Rice SMALL AND ROUND SEED5 gene encodes alpha-tubulin and regulates seed cell elongation., *Rice* 5 (4).
- 123) T. Abiko, M. Obara, F. Abe, K. Kawaguchi, A. Oyanagi, T. Yamauchi, M. Nakazono (2012). Screening of candidate genes associated with constitutive aerenchyma formation in adventitious roots of the teosinte *Zea mizcaraguensis*. : *Plant Root* 6, 19-27.
- 124) M. Ikeda, M. Matsuoka (2012). Major quantitative trait loci (QTLs) involved in high crop yield in rice. *Plant Genetics and Genomics : Crops and Models* , : in press.
- 125) Kao-Chih She, M. Yaeshima, T. Koumoto, M. Ohnuma, T. Hiromasa, M. Hirai, T. Matsunaga, R. Tashiro, T. Sasaki, H. Kusano, H. Shimada (2012). High-temperature stress susceptibility of representative japonica rice cultivars derived from Norin-22 : inadequate ATP supply during seed development may lead to severe damage., *Plant Biotechnology* , 29 : 465-471.
- 126) S. Suzuki, J. F Ma, N. Yamamoto, T. Hattori, M. Sakamoto, T. Umezawa (2012). Silicon deficiency promotes lignin accumulation in rice., *Plant Biotechnol* 29 : 391-394.
- 127) N. I. Kobayashi, N. Iwata, T. Saito, H. Suzuki, R. Iwata, K. Tanoi, T. M. Nakanishi (2013). Application of 28Mg for Characterization of Mg Uptake in Rice Seedling under Different pH Conditions. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 296 : 531-534.
- 128) K. Tanoi, N. I. Kobayashi, T. Saito, N. Iwata, A. Hirose, Y. Ohmae, R. Iwata, H. Suzuki, T. M. Nakanishi (2013). Application of 28Mg to the Kinetic Study of Mg Uptake by Rice Plants. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 296 : 749-751.
- 129) M. Tsuyukubo, T. Ookura, S. Tsukui, T. Mitsui, M. Kasai (2012). Elution Behavior Analysis of Starch Degrading Enzymes During Rice Cooking with Specific Antibodies., *Food Science and Technology Research* 18 (5) : 659-666.
- 130) M. Ikeda, K. Miura, K. Aya, H. Kitano, M. Matsuoka (2012). The quantitative trait loci (QTLs) and mutations related to breeding of high-yielding rice., *Curr Opin Plant Biol* , invited paper.
- 131) N. I. Kobayashi, K. Tanoi, A. Hirose, T. M. Nakanishi (2013). Characterization of rapid intervascular transport of cadmium in rice stem by radioisotope imaging., *J Exp Bot* 64(2) : 507-517.
- 132) T. Miyamoto, K. Ochiai, S. Takeshita, T. Matoh (2012). Identification of quantitative trait loci associated with shoot sodium accumulation in rice plants., *Soil Science and Plant Nutrition* 58 (6) : 728-736.
- 133) K. Tsutsui, K. Kaneko, I. Hanashiro, K. Nishinari, T. Mitsui (2013). Characteristics of opaque and translucent parts of high temperature stressed grains of rice., *Journal of Applied Glycoscience*, 60 (1), 61-67.
- 134) T. Kinoshita, Y. Ikeda, R. Ishikawa (2008).

総 説

- Genomic imprinting : a balance between antagonistic roles of parental chromosomes., *Seminars in Cell and Dev. Biol* 19 (6) : 574-579.
- 135) K.I. Nonomura, S. Yamaki (2008). Genetic dissection of sexual reproduction in rice (*Oryza sativa* L.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 62 : 191-204.
- 136) K. Shiono, H. Takahashi, T. D. Colmer, M. Nakazono (2008). Role of ethylene in acclimations to promote oxygen transport in roots of plants in waterlogged soils., *Plant Science*, 175 (41276) : 52-58.
- 137) J. F. Ma, N. Yamaji (2008). Functions and transport of silicon in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65 : 3049-3057.
- 138) J. Takano, K. Miwa, T. Fujiwara (2008). Boron transport mechanisms : collaboration of channels and transporters., *Trends Plant Sci.* 13 (8) : 451-457.
- 139) K. Miwa, J. Takano, T. Fujiwara (2008). [Molecular mechanisms of boron transport in plants and its modification for plant growth improvement] ., *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 53 (9) : 1173-1179.
- 140) T. Sakamoto, M. Matsuoka (2008). Identifying and exploiting grain yield genes in rice., *Current Opinion in Plant Biology* 11 (2) : 209-214.
- 141) 三ツ井敏明, 山川博幹 (2009). イネの高温登熟障害と熱ショック. *農林水産技術研究ジャーナル* 32 (7) : 20-25.
- 142) 米田典央, 野々村賢一 (2009). 減数分裂 — 相方を探すための植物染色体のダイナミックな挙動, 特集「植物染色体の最前線」., *遺伝* 63 (3) : 48-54.
- 143) R. Ishikawa, T. Kinoshita (2009). Epigenetic programming : the challenge to species hybridization. *Mol Plant* 2 (4) : 589-599.
- 144) K. Miwa, T. Kamiya, T. Fujiwara (2009) Homeostasis of the structurally important micronutrients, B and Si., *Curr Opin Plant Biol* 12 (3) : 307-311.
- 145) K. Fuji, K. Miwa, T. Fujiwara (2009). The intracellular transport of transporters : membrane trafficking of mineral transporters., *Curr Opin Plant Biol* , 12 (6) : 699-704.
- 146) X. J. Song, M. Matsuoka (2009). Bar the windows : an optimized strategy to survive drought and salt adversities., *Genes Dev.* 23(15) : 1709-1713.
- 147) K. Oki, Y. Fujisawa, H. Kato, Y. Iwasaki (2009). Heterotrimeric G proteins and plant hormone signaling in rice., *Integrated G proteins Signaling in Plants*. 123-134.
- 148) S. Komatsu, N. Ahsan, T. Mitsui, Y. Nozu (2009). Plant organelle proteomics : Approach and applications., *Research Communications in Biochemistry and Cell & Molecular Biology*, 13 : 71-118.
- 149) K. Kojima, N. von Wiren, T. Yamaya (2010). Ammonia absorption and assimilation in plants., *Nitrogen Assimilation in Plants*, 51-66.
- 150) K. Suwabe, G. Suzuki, M. Watanabe (2010). Achievement of genetics in plant reproduction research : the past decade for the coming decade. *Genes Genet Syst* 85 (5) : 297-310.
- 151) 大西孝幸, 木下 哲 (2010). イネ胚乳の初期発生., *Plant Morphology*. 22 : 15-22.
- 152) K. Kojima, T. Hayakawa, N. von Wiren, T Yamaya (2010). Ammonia absorption and assimilation in plants., *Nitrogen Assimilation in Plants*, 51-66.
- 153) 馬 建鋒 (2010). ケイ素. *植物栄養学* 第2版, 185-197.
- 154) 馬 建鋒 (2010). 不良土壌に対する植物の応答. 1. 酸性土壌. *植物栄養学* 第2版 11 (2) : 199-209.
- 155) J. F. Ma (2010). Silicon transporters in higher plants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*., *MIPs and Their Role in the Exchange of Metalloids*, 99-109.
- 156) K. Miwa, T. Fujiwara (2010). Boron transport in plants : co-ordinated regulation of transporters., *Ann Bot.*105 (7) : 1103-1108.
- 157) C. A. Beveridge, J. Kyojuka (2010). New genes in the strigolactone-related shoot

- branching pathway., *Curr Opin Plant Biol.* 13(1) : 34-39.
- 158) Y. Onda, Y. Kawagoe (2011). Oxidative protein folding : selective pressure for prolamin evolution in rice., *Plant Signaling & Behavior*, 6 (12) : 1966-1972.
- 159) 山川博幹, 羽方誠 (2011). 米の外観品質・食味研究の最前線 [8] - 登熟期の高温が種子遺伝子発現および登熟代謝に及ぼす影響., *農業および園芸* 86 (5) : 562-569.
- 160) 山川博幹 (2011). シリーズ解説: 米の話 (第8回) 米の品質 (1) 玄米品質 登熟期の高温が玄米の品質に及ぼす影響., *食品と容器* 52 (4) : 201-205.
- 161) 山川博幹, 羽方誠 (2011). イネも夏バテをする? / 遺伝子レベルで明らかとなった猛暑が米の品質に及ぼす影響., *化学と生物*. 49 (9) : 624-629.
- 162) H. Yamakawa (2011). Omics-based approach for cereal starch biosynthesis : Toward a determination of key factors for quality of rice grain affected by high temperature., *Journal of Applied Glycoscience*. 58 (2) : 35-38.
- 163) 阪田忠, 東谷篤志 (2011). 植物の高温障害による雄性不稔とオーキシン - 葯特異的にシグナル伝達活性が低下 -, *化学と生物*, 49 : 152-154.
- 164) T. Ishikawa, N. Watanabe, M. Nagano, M. Kawai-Yamada, E. Lam (2011). Bax inhibitor-1 : a highly conserved endoplasmic reticulum-resident cell death suppressor., *Cell Death Differ* 18 (8) : 1271-1278.
- 165) J. F Ma, N. Yamaji, N. Mitani-Ueno (2011). Transport of silicon from roots to panicles in plants., *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 87 : 377-385.
- 166) H. Kusano, K. C. She, H. Shimada (2012). Identification of rice FLOURY ENDOSPERM 2. Introduction to Sequence and Genome Analysis.
- 167) 三ツ井敏明 (2012). 米の外観品質・食味研究の最前線 - 高温耐性イネの開発戦略 (澱粉代謝関連酵素の細胞分子生物学の視点から) -, *農業および園芸*. 8 (6) : 627-634.
- 168) 山内卓樹, 西内俊策, 中園幹生 (2012). 植物の通気組織形成過程におけるメタロチオネインの組織特異的な発現制御., *生化学*, 84 : 857-862.
- 169) S. Nishiuchi, T. Yamauchi, H. Takahashi, L. Kotula, M. Nakazono (2012). Mechanisms for coping with submergence and waterlogging in rice., *Rice* 5, 2.
- 170) 山地直樹, 馬 建鋒 (2012). 近年の農業へのケイ酸利用と研究. 1. 植物のケイ酸栄養と輸送., *日本土壤肥科学雑誌* 83 : 319-325.
- 171) E. Delhaize, J. F. Ma, P. Ryan (2012). Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes., *Trends Plant Sci.* 17 : 341-348.
- 172) Magnesium transporters and their role in Al tolerance in plants. *Plant and Soil* 368 : 51-56 (2013).
- 173) J. F Ma (2012). Silicon Transporters. In "Encyclopedia of metalloproteins" (Kretsinger R. H., Uversky V.N. and Permyakov E. A., eds), springer science 2013.
- 174) S. Uruguchi, T. Fujiwara (2012). Cadmium transport and tolerance in rice : for reducing grain cadmium accumulation., *Rice* 5, 5.
- 175) Y. Kawagoe (2012). The characteristic polyhedral, sharp-edged shape of compound-type starch granules in rice endosperm is achieved via the septum-like structure of the amyloplast., *Journal of Applied Glycoscience* 60 (1) : 29-36.

その他の出版物

- 176) T. Tsuchiya, H. Hakozaiki, H. Masuko, M. Watanabe, J.-I. Park, M. Kawagishi-Kobayashi, and M. Endo (2008). Gene expression analysis with DNA array technology in legumes. *Handbook of New Technologies for Genetic Improvement of Legumes*, 467-476.
- 177) 川合真紀 (2008). 植物細胞死の検出法. 作物の形態研究法ーミクロからマクロまでー *Methods for studying morphology of crops*, 47-49.
- 178) Y. Iwasaki, H. Kato, Y. Fujisawa, and K. Oki (2008). Rice heterotrimeric G protein signaling. *Rice Biology in the Genomics Era.* - *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 62 : 135-148.
- 179) 三ツ井敏明 (2009). イネ高温登熟による白米

熟粒発生の謎を解く., JANU (国立大学協会情報誌).13 (7) : 4.

180) 金子美未, 藤岡智明, 諏訪部圭太, 渡辺正夫 (2009). 植物の生殖システム: 低温下の遺伝子発現及び発現制御機構., 温度と生命システムの相関学, 179-191.

181) 野々村賢一 (2009). 受粉と受精., 種子の科学とバイオテクノロジー, 13-16.

182) T. Mitsui, K. Itoh, H. Hori, H. Ito (2010). Biosynthesis and degradation of starch., Bull Fac Agric Niigata Univ.62 (2) : 49-73.

受賞

183) 山木辰一郎, 倉田のり, 野々村賢一 (2009) 第116回講演会日本育種学会優秀発表賞「イネの胚珠分化に異常を示す osmads13 変異体の解析.」

184) 野々村賢一, 高嶋和哉, 中野睦子, 永口貢, 宮尾安藝雄, 廣近洋彦, 倉田のり (2009) 第115回講演会日本育種学会優秀発表賞「減数分裂への移行に必須であるイネ遺伝子の単離と機能解析.」

185) 中村元昭, 塩野克宏, 安藤美保, 松尾優一, 土反伸和, 藤本優, 高橋宏和, 高牟礼逸朗, 矢崎一史, 堤伸浩, 中園幹生, 加藤清明 (2009) 日本育種学会優秀発表賞 (第116回講演会)「イネのABCトランスポーター RCN1 は耐湿性獲得に重要な根への効率的酸素運搬に関与する.」

186) 藤原 徹 (2009) 日本土壤肥料学会賞「植物の必須微量元素輸送体の同定と機能解析.」

187) 大西孝幸, 石川 亮, 山川博幹, 木下 哲 (2010) 日本育種学会優秀発表賞「イネの biotron breeding system; 年6度の戻し交配を可能にする栽培法.」

188) 塩野 克宏, Al Imran Malik, 山崎 聡, 西澤直子, 長村 吉晃, 堤 伸浩, Timothy D Colmer, 中園 幹生 (2010) 日本育種学会第117回講演会優秀発表賞「イネの耐湿性獲得に重要な Radial O₂ loss バリアの形成組織における網羅的遺伝子発現解析.」

189) 中西友子 (2010) 日本放射化学会賞「放射線ならびにアイソトープを駆使した植物生理学の研究.」

190) 白矢武士, 森太紀, 大久保英奈, 丸山達也, 金古堅太郎, 三ツ井敏明 (2011) 鈴木紘一メモリ

アル賞優秀プレゼンテーション賞「イネの高温登熟耐性におけるマンガン型スーパーオキシドジスムターゼ (MSD1) の機能解析.」

191) 甲州努, 金古堅太郎, 梅澤幸歩, 三ツ井敏明 (2011) 鈴木紘一メモリアル賞優秀プレゼンテーション賞「イネにおけるヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼの生理機能解析.」

192) 山内卓樹, 塩野克宏, 高牟礼逸朗, 長村吉晃, 堤伸浩, 西澤直子, 加藤清明, 中園幹生 (2011) 日本育種学会第120回講演会優秀発表賞「rcn1変異体を用いたイネの根の通気組織形成遺伝子の発現解析.」

193) Imene Rajhi, Takaki Yamauchi, Hirokazu Takahashi, Shunsaku Nishiuchi, Katsuhiko Shiono, Ryosuke Watanabe, Ahmed Mliki, Yoshiaki Nagamura, Nobuhiro Tsutsumi, Naoko K. Nishizawa, Mikio Nakazono (2011) The Best Poster Award in Tunisian Japanese Symposium on Science, Society and Technology 11「Study of aerenchyma formation in maize roots during waterlogged conditions.」

194) 丸山達也, 佐々木麻衣子, 白矢武士, 金古堅太郎, 三ツ井敏明 (2012) ポスター賞「高温ストレスにより発生した白未熟米粒の定量的プロテオーム解析.」

195) 西内俊策, 渡邊宏太郎, 塩野克宏, 槌田 (間山) 智子, 光田展隆, 高木優, 市川裕章, 中園幹生 (2012) 第122回講演会日本育種学会優秀発表賞「NAM型転写因子 OsNAC34 のイネのスベリン生合成への関与.」

196) 小原 実広 (2012) 日本土壤肥料学会奨励賞受賞「イネの窒素利用に関する研究.」

197) 馬 建鋒 (2012) 第20回木原記念財団学術賞「植物におけるミネラル輸送機構.」

IX 特許取得・申請

1)「植物におけるアルミニウムの取り込みに関する遺伝子の利用」(特許 2009-209170) 馬 建鋒.

2)「保湿性エタノールの製造方法」(特願 2009-256555) 木元久, 西岡真也, 酒井信治, 平橋昇, 青柳薫始, 岩崎行玄.

3)「イネの側根を発達させる方法」(特願 2009-

053434) 西澤 洋子, 望月 進, 南 栄一.

4) 「イネ科植物の雄性不稔を回復させる方法及び
雄性不稔回復剤」(特願 2009-002354) 東谷篤志,
渡辺正夫, 阪田忠.

5) 「 α -アミラーゼ遺伝子の発現を抑制する RNA
又は DNA, 及びそれらの利用」(特許 2012-
080709) 三ツ井敏明, 山川博幹, 羽方 誠, 黒田昌治.

6) 「高温耐性植物及びそのスクリーニング法」(特
許 2010-054838) 島田浩章, 草野博彰.

7) 「高温登熟性イネ」(特願 2011-246579) 三ツ井
敏明.

8) 「植物の栽培方法」(特許 2011-054313) 木下 哲,
大西 孝幸.

X 研究担当者

1 イネの質的形質遺伝子の単離と機能解明

国立大学法人東京大学

経塚淳子*

公立大学法人福井県立大学

岩崎行玄*

国立大学法人名古屋大学

松岡信*

国立大学法人名古屋大学

坂本知昭*

国立大学法人東京大学

藤原徹*

国立大学法人岡山大学

馬建鋒*

国立大学法人京都大学

間藤徹*

国立大学法人東北大学

山谷知行、小原実広*

国立大学法人東京大学

田野井慶太郎*、中西友子

独立行政法人農業生物資源研究所

杉本和彦*

国立大学法人名古屋大学

服部束穂*

国立大学法人名古屋大学

中園幹生*

独立行政法人農業生物資源研究所

西澤洋子*

国立大学法人埼玉大学、国立大学法人東京大学

内宮博文*、川合真紀

国立大学法人名古屋大学

土井一行*

大学共同利用機関法人情報・システム研究機構国
立遺伝学研究所

野々村賢一*

国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学

木下哲*

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構作
物研究所

川岸万紀子*

国立大学法人東北大学

渡辺正夫*

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中
央農業総合研究センター北陸研究センター

山川博幹*

国立大学法人新潟大学

三ツ井敏明*

学校法人東京理科大学

島田浩章*

独立行政法人農業生物資源研究所

川越靖*

(*執筆者)

XI 取りまとめ責任者あとがき

本プロジェクトで得られた成果を活用することにより、画期的な収量増、種々の環境ストレス耐性付与、イネ種子の登熟や高温下での品質に向けた画期的品種の育成が可能となり、国民へ与えるインパクトおよび社会への波及効果は大きいと確信している。

(推進リーダー：松岡 信)

第3編 イネの質的形質遺伝子の単離と機能解明

第1章 おもな個別研究課題の成果

1 穂や草型など収量の決定に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

(1) イネ穂の形と粒数に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0001)

ア 研究目的

穂の形態（枝梗数、穎花数、穎花着生パターン）は収量に直結する。本課題では、穂の形態を改変することにより収量を増加させることを最終目的として、そのために必要な基礎的知見を得ることを目的とする。具体的には、穂の形態に関する変異体および原因遺伝子を単離・解析することにより、イネ穂の形態を決める遺伝子のネットワークを明らかにする。さらに得られた遺伝子の育種への応用可能性を検討する。

イ 研究方法

（ア）イネの粒数を決定する遺伝子の分子遺伝学的解析

穂の形態（枝梗数、穎花数、穎花着生パターン）に異常が認められる変異体をスクリーニングする。得られた変異体の表現型を詳細に解析し、原因遺伝子の機能を推測する。原因遺伝子を特定し、その機能を解析する。

（イ）イネの穂形成にかかわる遺伝子の網羅的解析

レーザーマイクロダイセクション法を用いて分化初期の穂を限定的にサンプリングする。このサンプルから単離したRNAを使ってマイクロアレイ解析を行い、穂の発生初期の遺伝子発現に関するゲノムワイドな知見を得る。穂の形態を決定するうえで重要な機能を果たすことが予想される遺伝子については、ミュータントパネルやティリング集団などを利用して入手する。変異体を得られない場合は、RNAi法により発現抑制体を作成し表現型を解析する。また、必要ならば過剰発現体を作成し表現型を解析する。

ウ 研究結果

（ア）イネの粒数を決定する遺伝子の分子遺伝学的解析

内在性トランスポゾン *nDart* が高頻度で転移することが知られている集団（文献1）をスクリーニングすることにより、4種類の突然変異体を得た。これらの変異体を用いて研究を開始した。これらの変異体では、栄養成長期には顕著な表現型が認められなかったが、穂に着生する穎花数が増加しており、またそのパターンにも異常が見られた。遺伝学的解析から、2つの変異体は一つの遺伝子に生じた独立の突然変異であることが明らかになった。また、一つの変異体が既報の *APOL* 遺伝子に起こった変異体であることが明らかになった。そこで、本報告書では最終的な遺伝子名と表記を統一し、これら4つの変異体を (*tawawal* (*tawl*)-*D1*、*tawl*-*D2*、*aberrant panicle organization1* (*apo1*)-*D4*、*panicle phytomer2* (*pap2*)) と表す。

遺伝解析の結果、*tawl*-*D1*、*tawl*-*D2* は半優性の変異体であることが明らかになった。これらの変異体では、穎花形成へのプログラム切換えが遅れるために分枝形成が増加する。その結果、二次枝梗や三次枝梗が増加した。*tawl*-*D2*/+、*tawl*-*D2*、*tawl*-*D1*/+、*tawl*-*D1* の順に穂の分枝が増加するという表現型が強くなった。*tawl*-*D1* をホモに持つ個体では、穎花形成プログラムへの切換えが起こらず分枝が無限に形成された結果、穂はメリステムの塊状となった。弱いアレルである *tawl*-*D2* では穂の分枝の増加により、最終的に一穂穎花数が野生型の約1.7倍に増加した。これらの表現型から、*TAW1* は、穂形成過程において枝梗形成から穎花形成へのプログラム転換を抑制する機能を持つ遺伝子であることがわかった（文献2）。

TAW1 は内在性のトランスポゾン (*nDart*) が活性化した集団から発見された変異体であるため、トランスポゾンディスプレイ法によって遺伝子を単離した。まず、表現型と完全な連鎖を示す *nDart1* を特定した。この挿入領域 (Os10g0477800

と Os10g0478000 の間) はラフマッピングで特定した *TAW1* 座上領域と重なっていた。*nDart1* の挿入領域が二つの遺伝子の間であったため、変異体における発現を比較したところ、Os10g0478000 の発現は *taw1-D1*、*taw1-D2* の両方で顕著に増加していたが、Os10g0477800 の発現には差が認められなかった。さらに、Os10g0478000 のゲノム領域を野生型イネに導入すると *taw1-D* 様の表現型が観察されたことから Os10g0478000 が *TAW1* であると結論した。ティリング法によりこの遺伝子の機能欠損(抑制)変異体 (*taw1-3*、*taw1-4*) を得、その表現型を解析したところ、優性変異体とは逆に穂の分枝が減少した。また、RNAi により *TAW1* の発現を抑制した植物でも枝梗が減少し小さな穂が形成された。これらは *TAW1* の発現量が増加している優性変異体 (*taw1-D1*、*taw1-D2*) とは逆の表現型であり、*TAW1* 遺伝子の活性に依存して枝梗が形成され穂が大型化すると結論した。

TAW1 は 205 アミノ酸からなる機能未知のタンパク質をコードする。イネでもシロイヌナズナでも約 10 の遺伝子からなる小さな遺伝子族を形成する。これらのタンパク質は核移行配列を持っており、GFP を利用した解析から *TAW1* が核に局在することが示された。*TAW1* の mRNA 発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて調べたところ、*TAW1* は茎頂分裂組織、花序分裂組織、枝梗分裂組織、穎花分裂組織、根端分列組織など、イネのすべての頂端分裂組織で発現していた。*TAW1* をアクチンプロモーターや 35S プロモーターで発現させると植物体の根や葉が異常に旺盛に成長し、植物体はすぐに枯死した。したがって、収量増加には *TAW1* 遺伝子の本来の発現調節パターンが重要であると結論した。

TAW1 の機能を明らかにするために、*taw1-D* 変異体の幼穂での遺伝子発現をマイクロアレイで解析した。その結果、SVP グループの MADS ボックス遺伝子 (*OsMADS22*、*OsMADS47*、*OsMADS55*) の発現が顕著に増加していた。*TAW1* の発現を誘導するとこれらの *SVP* 遺伝子の mRNA 発現が誘導されることを示した。また、これらの MADS ボックス遺伝子を CaMV35S プロモーターで発現すると、*taw1* 優性変異体のように穂の分枝(枝梗)が増加した。これらの結果から、*TAW1* が *SVP* 遺伝子の発現を

促進することにより穂形態を制御することが証明された。

taw1-D2 変異を交配によりコシヒカリに導入したところ、枝梗の増加により粒数が増加し、収量が増加した。また、遺伝子組換えにより野生型イネに *TAW1* ゲノム領域を導入することによっても、穂の粒数を増加させることができた。

APO1 遺伝子の解析：プロジェクト開始時に見出した4つの変異体のひとつでは、*ABERRANT PANICLE ORGANIZATION1* (*APO1*) 遺伝子(文献3、4)の制御領域に *nDart1* が挿入していた。この挿入と表現型との完全な連鎖が確認されたこと、*nDart1* のこの領域からの転移(離脱)により表現型が正常に戻ったことから、*APO1* がこの変異体の原因遺伝子であると結論した。*APO1* はシロイヌナズナ *UFO* の相同遺伝子である。シロイヌナズナでは *UFO* は *LFY* とともに花芽の分化を促進する。本研究で見出した変異体は優性変異であり、*APO1* のプロモーター領域にトランスポゾンが挿入したことにより *APO1* の発現が増加していた。さらに 35S プロモーターを使って発現させたところ、穂の分枝が劇的に増加した。したがって、*APO1* 遺伝子の発現量に依存して分枝が増加することが明らかになった。*APO1* は粒数を決定する QTL および穂軸の太さを決定する QTL としても報告された。

PAP2 遺伝子の解析：4つの変異体のひとつは劣性に遺伝する変異であり、*panicle phytomer2* (*pap2*) と命名した(文献5)。*pap2-1* 変異体では一穂に形成される一次枝梗が増加した。また、一次枝梗上には二次枝梗と穎花が形成されるが、*pap2-1* 変異体では、二次枝梗の割合が高くなり、また、野生型ではほとんど形成されない3次枝梗が高頻度で形成された。*PAP2* 機能が損なわれると小穂形成が阻害され、その結果、穂の分枝が増加したと解釈できる。したがって、*PAP2* は *TAW1* や *APO1* とは逆に枝梗形成を抑え小穂を形成する遺伝子である。マップベースクローニング法により *PAP2* 遺伝子を単離した。*PAP2* は *MADS34* として登録されているタンパク質をコードする遺伝子であった。*MADS34* は、イネにゲノムの約 100 存在する *MADS* ボックス遺伝子ファミリーのうち、*SEP* サブグループに分類されるタンパク質をコードする。イネでは *PAP2* を含めて5つのタンパク質が *SEP* サブグループに分類

されるが、*PAP2*はSEPサブファミリーの中でもさらにイネ科植物にだけ存在するグループであることがわかった。*PAP2*を35Sプロモーターで発現させると小穂への転換が促進され、小さな穂が形成された。*PAP2*以外のイネSEPサブグループの遺伝子のうち、*PAP2*と同様にイネ科特異的な*OsMADS1*と*OsMADS5*は花メリステムの有限性を制御することを明らかにした。

(イ) イネの穂形成にかかわる遺伝子の網羅的解析

レーザーマイクロダイセクション (LMD) 法により分化中の穂をサンプルしRNAを単離した。これらのRNAを使ってマイクロアレイ解析を行い、メリステム (穂) での遺伝子発現情報を得た。本解析により、花成により茎頂分裂組織が花序分裂組織に転換する際の遺伝子発現の変化について興味深い結果を得た。茎頂分裂組織から花序分裂組織への相転換は植物の成長において非常に重要な相転換である。LMDマイクロアレイからこの相転換時に4つのMADSボックス遺伝子 (*PAP2*と*OsMADS14*、*OsMADS15*、*OsMADS18*) の発現が顕著に増加することが明らかになった。*PAP2*以外の3遺伝子は*FRUITFUL (FUL)* サブグループに分類される。これら4つの遺伝子のメリステムの相転換における機能を明らかにするために、RNAi法により機能不明の3つの*FUL* 遺伝子の発現を抑制した。3つの*FUL* タイプMADSボックス遺伝子の機能を抑えただけでは花成が若干遅れた以外はほぼ正常の穂が形成された。ところが、トリプルノックダウンにさらに*pap2-1* 変異を加えた4重変異体を作成すると、メリステムの相転換が起こらず、穂が作られず葉が形成され続けるという顕著な異常が起こった (文献6)。また、*pap2-1* 背景ではイネフロリゲン遺伝子*Hd3a*の過剰発現による超早咲き表現型が緩和されたことから、*PAP2* および3つの*FUL* 様MADSボックス遺伝子がフロリゲンの情報を受けてメリステムの成長相を転換させることがわかった。*PAP2*を35Sプロモーターで発現させることにより、小穂への転換が早まり小さな穂が形成されることを示した。

遺伝学的解析から一穂粒数に関わる3つの遺伝子を単離した。これらのうち、*TAW1* 遺伝子は穂の成長ステージの進行を抑える新規な遺伝子であると考

えられた。また、弱い変異体は粒数増加に利用できる可能性が示唆された。*AP01*は他のQTL解析からも単離されている重要遺伝子である。*PAP2*はこれまでに知られている唯一の小穂分化運命遺伝子である。さらに、小穂だけではなく花成によるメリステムの相転換にも重要な遺伝子であることがわかった。*PAP2*はイネ科だけに存在する遺伝子であることから、イネ科に特徴的な小穂器官の進化に貢献したのではないかと考えられる。さらに、*TAW1*や*AP01*はイネの収量増加に利用できる可能性がある。

工 考 察

(ア) イネの粒数を決定する遺伝子の分子遺伝学的解析

イネ穂形成過程には新たなメリステムが次々に分化する。穂形成の初期には、これらのメリステムが枝梗メリステムに分化し、その後、メリステムが穎花に分化する時期に移行する。枝梗メリステムはさらにメリステムを生み出すことができる「無限」メリステムであり、穎花メリステムはそれ以上のメリステムを生み出さない「有限」メリステムである。したがって、枝梗メリステム形成から穎花メリステム形成へのプログラムの切り換えは「無限」成長から「有限」成長へのプログラムの切り換えでもある。この切り換えが起こるタイミングがイネ穂の形態を決定する。枝梗メリステムをつくる「無限」成長の時期が長く続けば穂の枝分かれが増え、最終的には多数の穎花が形成される。逆に、穎花形成へのプログラム転換が早まれば、分枝が少なく粒数が減少した穂が形成される。本研究では、粒数決定に関わる3つの遺伝子、*TAW1*、*AP01*、*PAP2*を単離することができた。これらのうち、*TAW1*と*AP01*は枝梗形成から穎花形成へとプログラムが切り換わる際のブレーキとして働き、*PAP2*はアクセルとして働く。穂の形成においては、これらのアクセルとブレーキの微妙なバランスにより穂の大きさ、すなわち粒数が決定される。

taw1-D 変異遺伝子をコシヒカリに導入したところ、予想通り、一穂粒数が増加し、個体あたりの収量が増加した。さらに、*taw1-D2* 変異体では稈長がわずかに減少すること、他の大型穂変異体では一般的に穂数が減少するが、*taw1-D* 変異体では穂

数には影響がないことも利点である。しかしながら、種子がやや小型化するために千粒重が減少する。*taw1-D* 変異を実際の栽培に利用するにはこの点を改良する必要がある。

(イ) イネの穂形成にかかわる遺伝子の網羅的解析

本研究により、イネの穂形成時に働く遺伝子に関する詳細な情報を得ることができた。発生・分化の過程では、それぞれの遺伝子は限定的なタイミングにおいて限られた組織や細胞でのみ発現すると考えられる。イネ穂形成では、短時間に発生がどんどん進行する。この過程において働く遺伝子に関して情報を得るには、できる限り限定的な組織・タイミングにおける遺伝子発現を調べることが望ましい。本実験で行った、穂の成長段階ごとのレーザーマイクロダイセクション・マイクロアレイにより、個体が栄養成長から生殖成長に転換する際にメリステムの相転換を決定する遺伝子を単離することができたことから、アプローチの有効性が示されたと考えている。本研究では、MADS ボックス 遺伝子に着目したが、データの分析を続けることにより、さらに有用な情報が得られると思われる。

オ 今後の課題

(ア) イネの粒数を決定する遺伝子の分子遺伝学的解析

taw1-D2 変異を導入したコシヒカリの収量についてさらに解析を続ける必要がある。*taw1* コシヒカリの収量を安定して増加させるための栽培法の検討や、他の品種への導入なども試みる。

(イ) イネの穂形成にかかわる遺伝子の網羅的解析

得られたデータをさらに分析し、穂形成に関する重要遺伝子の発掘を継続する必要がある。

カ 要 約

(ア) イネの粒数を決定する遺伝子の分子遺伝学的解析

イネ穂の形態に異常が見られる変異体の解析から、粒数決定に関わる 3 つの遺伝子、*TAW1* と *PAP2* を単離した。また、既に報告されていた *APO1* 遺伝子も一穂粒数の決定に関わることを明らかにした。*TAW1* と *APO1* は穎花形成を抑制する機能を持ち、

PAP2 は穎花形成を促進する。*TAW1* の優性変異遺伝子をコシヒカリに導入したところ、一穂粒数が増加し、個体あたりの収量が増加した。

(イ) イネの穂形成にかかわる遺伝子の網羅的解析

イネ穂分化初期にメリステムで特異的に働く遺伝子群をレーザーマイクロダイセクション法により単離した。特に、生殖成長への転換期のメリステムにおいて *PAP2* を含む 4 つの MADS ボックス 遺伝子の発現が顕著に発現上昇することを見出した。これら 4 つの MADS 遺伝子の発現を抑制したところ、メリステムの相転換が抑えられた。この解析から、イネでは、フロリゲンがメリステムに輸送されたのちに、*PAP2*、*MADS14*、*MADS15*、*MADS18* が協調してメリステムの成長相の転換に働くことを明らかにした。

キ 引用文献

- 1) Tsugane K, Maekawa M, Takagi K, Takahara H, Qian Q, Eun CH, Iida S. (2006). An active DNA transposon *nDart* causing leaf variegation and mutable dwarfism and its related elements in rice. *Plant J.* 45 : 46-57.
- 2) Yoshida A, Sasao M, Yasuno N, Takagi K, Daimon Y, Chen R, Yamazaki R, Tokunaga H, Kitaguchi Y, Sato Y, Nagamura Y, Usijima T, Kumamaru T, Iida S, Maekawa M, Kyoizuka J. (2013). *TAWAWAI*, a novel regulator of rice inflorescence architecture, functions through the suppression of meristem phase transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110 : 767-772.
- 3) Ikeda K, Ito M, Nagasawa N, Kyoizuka J, Nagato Y. (2007). Rice *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1*, encoding an F-box protein, regulates meristem fate. *Plant J.* 51 : 1030-1040.
- 4) Ikeda-Kawakatsu K, Yasuno N, Oikawa T, Iida S, Nagato Y, Maekawa M, Kyoizuka J. (2009). Expression Level of *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1* Determines Rice Inflorescence Form through Control of Cell Proliferation in the Meristem. *Plant Phys.* 150 : 736-747.
- 5) Kobayashi K, Maekawa M, Miyao A, Hirochika H, Kyoizuka J. (2010). *PANICLE PHYTOMER2*

(*PAP2*), encoding a SEPALLATA subfamily MADS-box protein, positively controls spikelet meristem identity in rice. *Plant Cell Physiol.* 51 : 47-57.

- 6) Kobayashi K, Yasuno N, Sato Y, Yoda M, Yamazaki R, Kimizu M, Yoshida H, Nagamura Y, Kyojuka J. (2012). Inflorescence Meristem Identity in Rice is Specified by Overlapping Functions of Three AP1/FUL-like MADS Box Genes and PAP2, a SEP MADS Box gene. *Plant Cell* 24 : 1848-1859.

研究担当者 (経塚淳子*)

(2) イネの種子形に関する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0002)

ア 研究目的

収量の増大は、重要な育種目標の1つである。収量は、種子の大きさ、穂に結実する種子数、分げつ数、草型に適した栽培法など、多様な要因の総和として規定される。この意味で、種子形は収量増加を目指す上での重要な育種目標となる形質である。我々は、種子形に関する遺伝子群を同定し、それら遺伝子の機能を研究するとともにその育種的利用を図る。種子形を制御する遺伝子群の中には、背丈、穂に結実する種子数、草形、耐病性と連動しているものが存在する。よって、これらの遺伝子が、収量性に関わる多数の重要形質にどの程度関与しているかについて留意しつつ、種子の形に関する遺伝子の評価を行い、多収に向けての育種素材を供給する。

イ 研究方法

(ア) 種子形の制御に関与する6系統の新奇変異体を見出している (*srs1*、*srs2*、*srs3*、*srs4*、*Srs5*、*srs6*)。これらの変異体を用いて、マップベースクローニング法により、種子形の制御に関与する原因遺伝子の単離を行う。

(イ) 大粒・長粒の種子を結実する4系統(Cytoto、Choukoutou、Mutashali、BG23)に着目し、QTL解析により、大粒・長粒を可能にする新奇遺伝子座を探索する。遺伝子座が同定されたものから、ファインマッピングに着手し、遺伝子の単離を目指す。

(ウ) コシヒカリ背景変異体コレクションより、大粒変異体を選抜する。この後、収量性を調査し、これらの変異体の有用性を評価する。有用なものは、遺伝解析用の雑種集団を育成し、遺伝子単離を目指す。

(エ) 種子を大きくする遺伝子と他の有用な遺伝子を集積し、両者の性質を併せ持つ品種の有用性を評価する。

ウ 研究結果

(ア) 種子形の制御に関与する新規遺伝子の解析
本申請課題で用いた多様なイネ種子形変異体と品種を示す。(図 3112-1)

研究期間内に、*SRS1*、*SRS3*、*SRS5* の遺伝子を同定した。(図 3112-2)

SRS1 は、1365 個のアミノ酸残基からなる新奇タンパク質をコードしていた。このタンパク質には、既知の機能ドメインは存在しなかった。この遺伝子は、外穎の細胞長を制御した。(図 3112-2 上段)

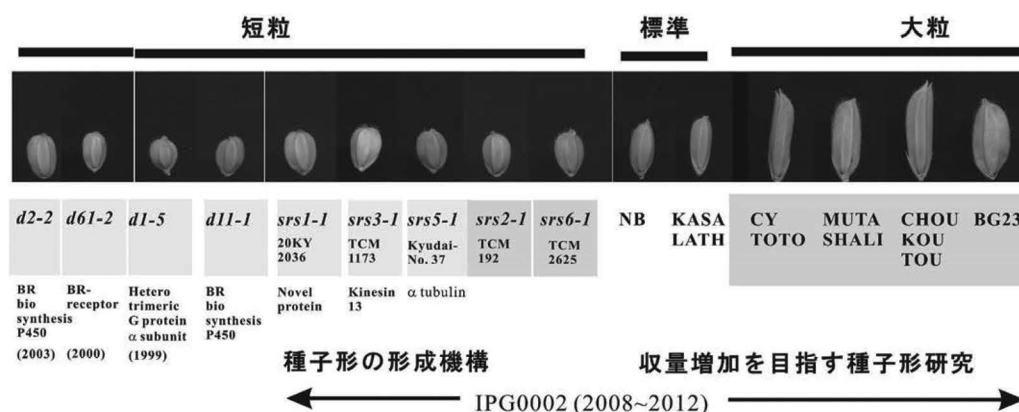
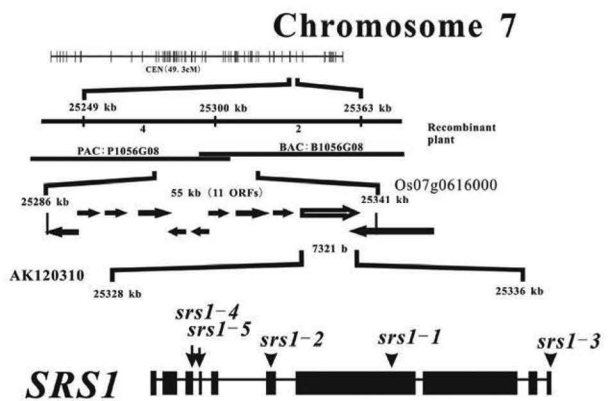
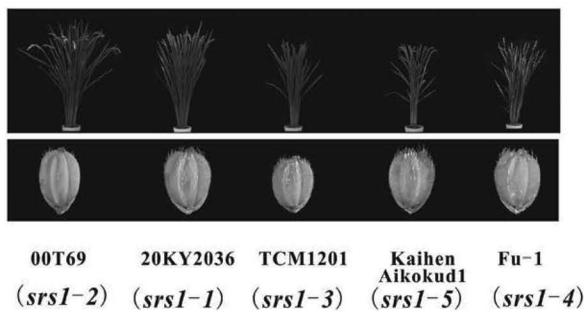
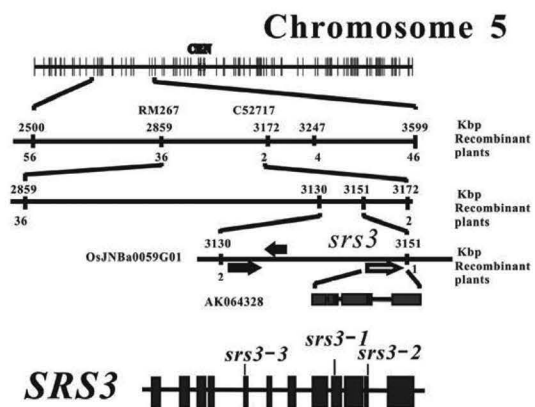
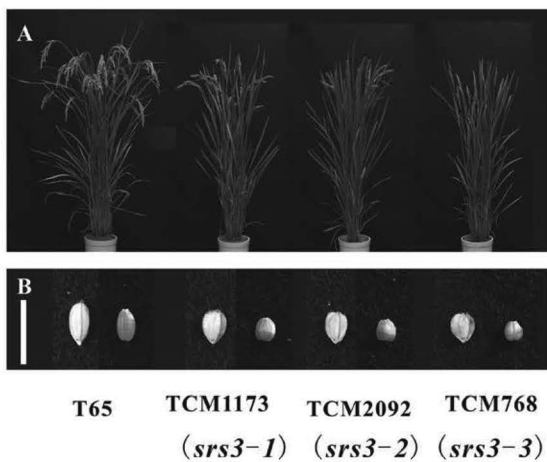


図 3112-1 イネ種子形研究の材料

srs1



srs3



Srs5

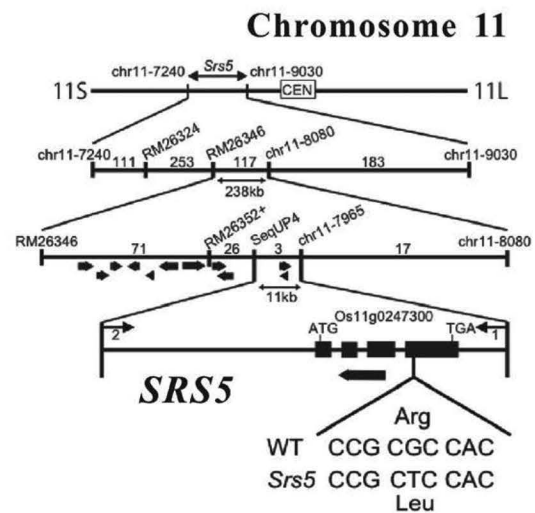
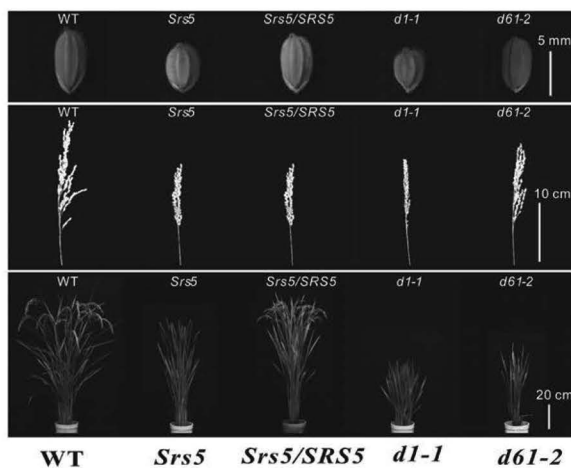


図 3112-2 新奇粒形制御遺伝子 SRS1, SRS3, SRS5 の同定

(Abe ら、¹⁾)

SRS3 は、キネシン 13 タンパク質をコードし、翻訳産物は 819 個のアミノ酸残基からなる。この遺伝子は、外穎の細胞長を制御した。(図 3112-2 中段)(Kitagawa ら、²⁾)

SRS5 は、 α チューブリンをコードし、451 個のアミノ酸残基からなる。この遺伝子は、外穎の細胞長を制御した。(図 3112-2 下段)(Segami ら、³⁾)

外穎の内表皮細胞に着目し、走査型電子顕微鏡(SEM)により細胞長を測定後、種子長を細胞長で除することで、大まかな細胞数が算出できる。この解析により、本申請期間中に同定できた *SRS1*、*SRS3*、*SRS5* は、いずれも外穎の細胞長を制御する遺伝子であった。*SRS2*、*SRS6* は、原因遺伝子を単離できていないが、細胞数を制御する遺伝子であった。(図 3112-3)

イネ 3 量体 G タンパク質 α サブユニット 遺伝子 (*D1*) は細胞数を制御し、ブラシノステロイド関連遺伝子 (*D2*、*D11*、*D61*) は細胞長を制御する。これらの結果より、イネの種子形は、概ね、細胞数を制御する仕組みと細胞長を制御する仕組みの 2 つが重要であることが明らかになった。(図 3112-4)

(イ) 大粒・長粒を可能にする新奇な候補遺伝子

座の決定

大粒・長粒の種子を結実する 4 系統 (Cytoto、Choukoutou、Mutashali、BG23) は全て japonica 型イネであったので、indica 型イネのカサラスと交配後、後代の F_2 および F_3 世代の集団を用いて、種子長・種子幅に関する QTL 解析により、大粒・長粒を可能にする新奇な遺伝子座の検索を行った。(図 3112-5)

この内、*GW2* と *GS3* はすでに単離された既知遺伝子である。研究期間内に同定できた新奇 QTL は、種子長に関して 6 遺伝子座、種子幅に関して 1 遺伝子座であった。

上記の内、Cytoto 由来の *qGL4* に着目し、遺伝子単離を試みた。その結果、第 4 染色体上の PCR マーカー、RM5586-RM3524 に挟まれる 3Mb 内に *qGL4* が座上することを明らかにし、この間に染色体組換えが生じている 250 個体を得た。(Kato ら、⁴⁾)

(ウ) コシヒカリ背景大粒変異体

コシヒカリに変異原処理した集団より、7 系統の大粒変異体を選抜した。この大粒変異体の有用性を確認するため、福井県農業試験場と共同研究を行い、6 系統 (系統番号: 346, 347, 349, 348, 350, 353) に関して、収量性及び生産特性の評価を行った。その

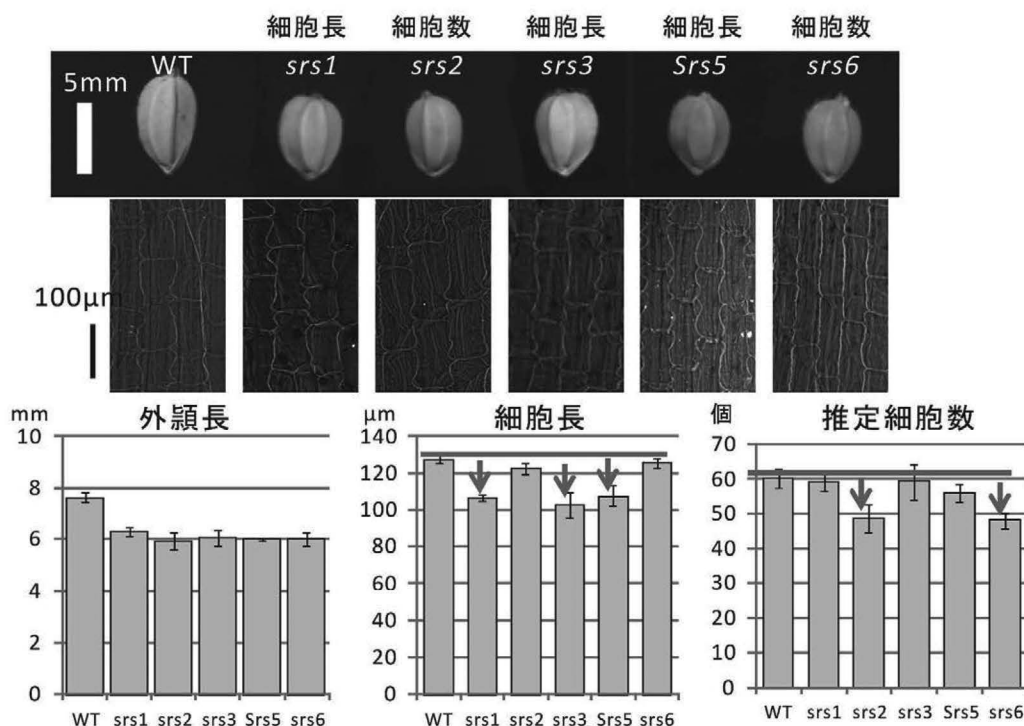


図 3112-3 細胞数変異体と細胞長変異体

結果、全ての系統で玄米 1000 粒重は増加していた。1.9mm の篩で選別した精玄米収量では、6 系統中 5 系統は収量性が低下したが、1 系統（系統番号 348）は 10% の増加がみられた。（図 3112-6）

（エ）種子を大きくする遺伝子と、他の有用な遺伝子の集積

コシヒカリ背景の大粒系統（KSM307）に、耐倒伏性を付与する *sd1*、種子数を増加する *Gn1* を集積した。（図 3112-7）

sd1 背景でも、KSM307 による大粒化が観察できた（*sd1* vs *sd1* KSM307）。また、*Gn1* 背景でも、KSM307 による大粒化が観察できた（*Gn1* vs *Gn1* KSM307）。*sd1* と *Gn1* の両方の遺伝子を有する背景でも、KSM307 による大粒化が観察できた（*sd1 Gn1* vs *sd1 Gn1* KSM307）。これらの結果は、種子を大きくする遺伝子は、他の有用な遺伝子と併せて、利用できる可能性が示唆された。

エ 考 察

（ア）種子形の制御に関与する新奇変異原因遺伝子の解析

外穎の細胞長を制御する新奇な 3 遺伝子を単離した。これらの解析を進める中で、SEM を用いた外

穎内表皮の細胞長の測定が、細胞数の見積もりに有効であった。この解析により、*srs2* と *srs6* は細胞数が減少している変異体であることを明らかにした。現在イネにおいて外穎の細胞数を制御する遺伝子は、3 量体 G タンパク質 α サブユニット遺伝子だけが知られており、*srs2* と *srs6* 遺伝子の単離は、種子形制御を理解する上で重要であろう。

（イ）大粒・長粒を可能にする新奇な候補遺伝子座の決定

種子長に関する新奇 QTL 座を 6 遺伝子座、種子幅に関する新奇 QTL 座を 1 遺伝子座、種子長に関する既知 QTL を 1 遺伝子座（*GS3*）、種子幅に関する既知 QTL を 1 遺伝子座（*GW2*）検出した。本研究により、種子形に関わる未同定な遺伝子がまだ数多く存在することが明らかになったと同時に、解析した全ての系統に *GS3* が使われており、この遺伝子が品種育成で選択されてきたことが示された。

（ウ）コシヒカリ背景大粒変異体

変異原処理をしたコシヒカリ集団から大粒変異体を選抜した。この小課題においては、遺伝子単離に先立ち、これらの変異体が生産レベルで使えるものか否かの評価を優先した。種子自体が大きく、且つ、

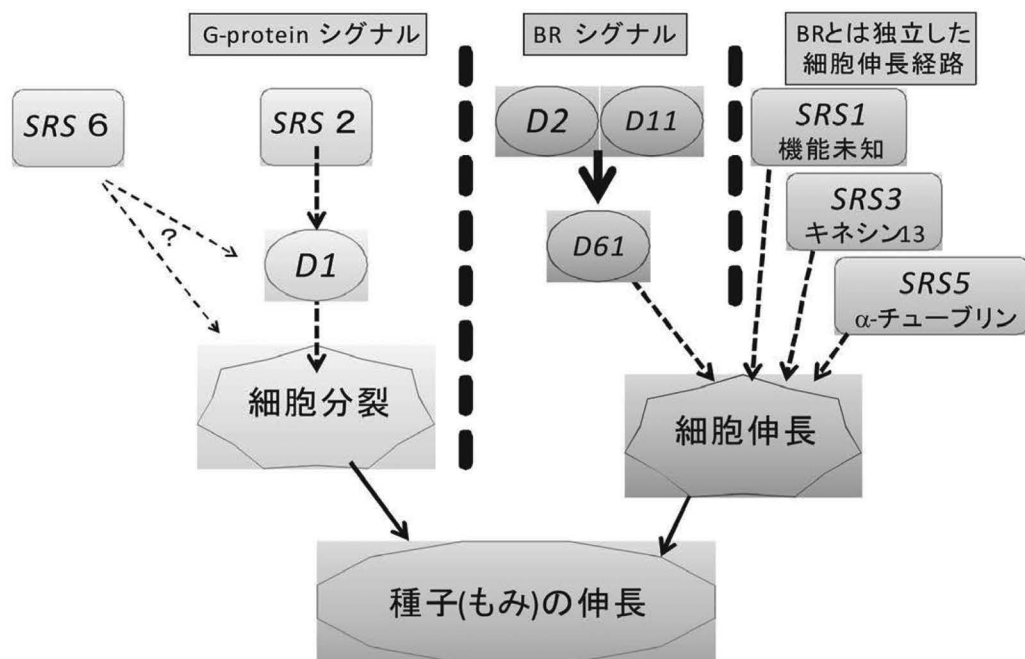


図 3112-4 種子形制御機構のモデル図

日本晴 カサラス Cytoto Mutashali 長香稻 BG23

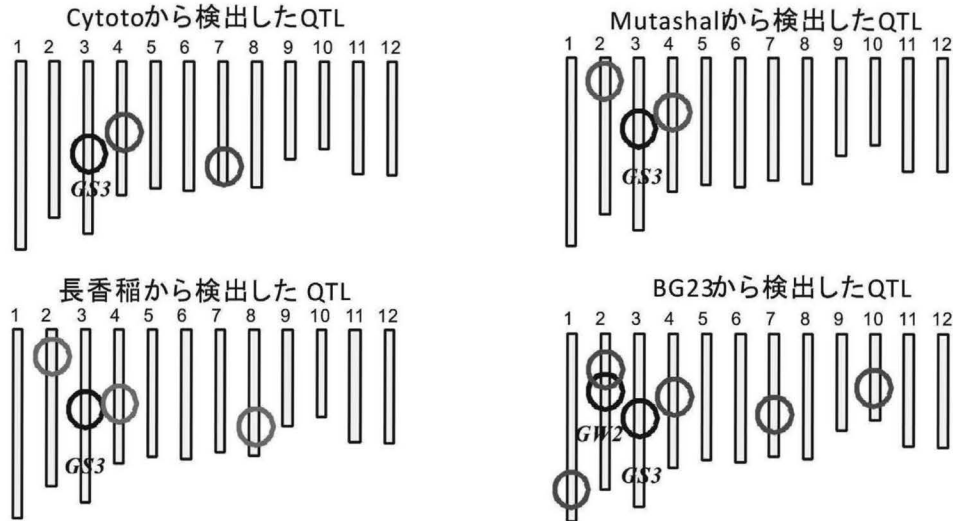
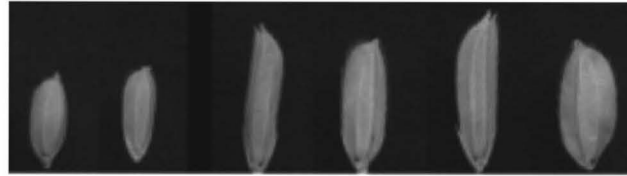


図 3112-5 イネ種子を大きくする QTL

- 1) 種子長を制御する QTL
 Cytoto : *GS3*, *qGL4*, *qGL7*
 Mutashali : *qGL2*, *GS3*, *qGL4*
 Choukoutou : *qGL2*, *GS3*, *qGL4*, *qGL8*
 BG23 : *qGL1*, *qGL2*, *GS3*, *qGL4*, *qGL7*, *qGL10*
- 2) 種子幅を制御する QTL
 BG23 : *qGW1*, *GW2*

単位面積当たりの収量も増大している変異体（系統番号 348）を見出すことができた。この系統を解析し、粒を大きくしている遺伝子の単離が重要である。

（エ）種子を大きくする遺伝子と、他の有用な遺伝子の集積

コシヒカリ背景の大粒系統（KSM307）に、耐倒伏性を付与する *sd1*、種子数を増加する *Gn1* を集積した結果、KSM307 が保持する種子を大きくする遺伝子の機能は、*sd1* や *Gn1* の影響を受けなかった。このことは、今後の遺伝子集積実験の有用性を示した。

オ 今後の課題

（ア）種子形の制御に関与する新奇変異体の解析

この小課題で取り扱っているイネ変異体は、短粒・小粒であるので、単離された変異型アレルが、直接育種利用される可能性は低い。しかしながら、原因遺伝子の機能解析を行い、仮に原因遺伝子が機能喪

失型変異なら機能付与を行う試み、あるいは、機能付与型変異なら機能喪失を行う試みから、有用な遺伝子型（変異型）を見出せる可能性があり、継続して進める価値のある研究課題と考えている。

（イ）大粒・長粒を可能にする新奇遺伝子座の決定

この小課題では、種子長に関する新奇 QTL を 6 遺伝子座と種子幅に関する新奇 QTL を 1 遺伝子座、同定できたが、同時に、既知遺伝子座（*GS3* と *GW2*）に比べて、種子を大きくする効果が小さいことも判明した。効果は小さいが、集積することで大きな効果を示すことから、継続して有用遺伝子の単離を進める必要がある。

（ウ）コシヒカリ背景大粒変異体

変異原処理をしたコシヒカリ集団から大粒変異体を選抜でき、その中から、単位面積当たりの収量も増大している変異体（系統番号 348）を見出せたことは、今後の育種素材の開発のあり方として、大き



コシヒカリ 346 347 349 348 350 353

☆1.9mm のふるいをかけた後の精玄米重量

	稈長(cm)	穂長(cm)	穂数(本/m)	玄米1000粒重(g)	玄米重(kg/a)	収量比(%)	外観品質(良1-9悪)	食味(悪-2? 2良)
コシヒカリ	83	19.7	385.0	22.8	60.9	100	3.5	0.0
346	65	19.1	397.0	25.6	42.4	70	4.1	0.3
347	91	19.5	428.0	23.6	61.7	101	3.8	-0.4
349	85	20.0	277.0	26.8	47.3	78	4.3	-0.4
348	89	22.1	315.0	25.6	67.0	110	3.6	0.0
350	85	20.2	333.0	23.2	48.6	80	3.4	0.3
353	90	24.0	346.0	24.0	41.3	68	4.1	-0.5

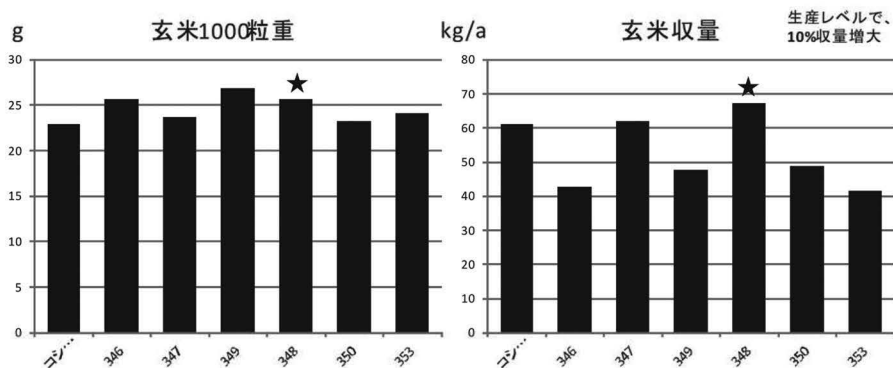
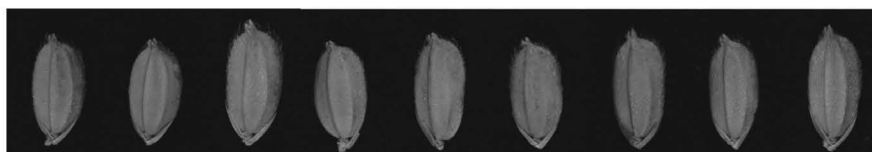


図 3112-6 コシヒカリ背景の大粒変異体



コシヒカリ *sd1 Gn1* コシヒカリ KSM307 *sd1* *sd1*KSM307 *Gn1* *Gn1*KSM307 *sd1 Gn1* *sd1 Gn1* KSM307

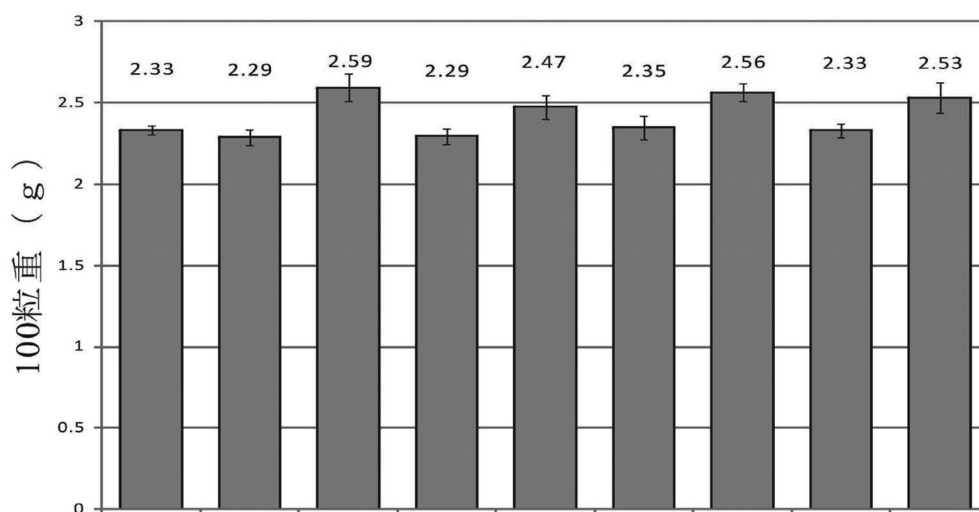


図 3112-7 有用形質遺伝子の集積

な希望を示した。この方法は、戻し交配を必要としない点が大きな魅力である。スクリーニング集団を大きくし、有用な変異体を見つけ出す試みは、今後も継続して進める価値があると考えている。次世代シーケンサーを用いて、原因遺伝子の単離を急ぐ必要がある。

(エ) 種子を大きくする遺伝子と、有用遺伝子の集積

本申請課題の期間では、最も早くスクリーニングされたコシヒカリ背景の大粒系統 (KSM307) を用いて、これに、耐倒伏性を付与する *sd1*、種子数を増加する *Gn1* を集積した。その結果、種子を大きくする遺伝子の機能は、*sd1* や *Gn1* の影響を受けず、遺伝子集積の有効性が示唆された。今後、種子が大きくかつ収量性の高い系統番号 348 に、耐倒伏性を付与する *sd1*、種子数を増加する *Gn1* を集積し、その収量調査をすることが重要である。

カ 要 約

(ア) 新奇種子形制御遺伝子として *SRS1*、*SRS3*、*SRS5* の遺伝子を同定した。*SRS1* は新奇なタンパク質を、*SRS3* はキネシン 13 タンパク質を、*SRS5* は α チューブリンをコードしていた。

(イ) 大粒・長粒の種子を結実する 4 品種 (Cytoto、Choukoutou、Mutashali、BG23) より、種子を大きくする QTL を探索した結果、種子長を伸ばす遺伝子座として、*qGL1*、*qGL2*、*GS3*、*qGL4*、*qGL7*、*qGL8*、*qGL10* を見出した。また、種子幅を制御する QTL として *qGW1*、*GW2* を見出した。この内、*GS3* と *GW2* は既知遺伝子であるため、新奇 QTL は、種子長に関して 6 遺伝子座 (*qGL1*、*qGL2*、*qGL4*、*qGL7*、*qGL8*、*qGL10*)、種子幅に関して 1 遺伝子座 (*qGW1*) であった。

(ウ) コシヒカリに変異原処理した集団より、大粒かつ単位面積当たりの収量性が高い系統 (系統番号 348) を選抜した。この系統は、今後、遺伝子集積の母本として使用する。

(エ) コシヒカリ背景の大粒変異体 (KSM307) に、耐倒伏性を付与する *sd1* や種子数を増加する *Gn1* を集積した (*sd1* KSM307、*Gn1* KSM307)。その結果、*sd1* や *Gn1* に結実する種子と比べて、遺伝子集積をしたイネは、KSM307 の効果により、大きな種子を結実した。これらの結果は、種子を大きくする遺伝

子は、他の有用な遺伝子と併せて利用できる可能性が示された。

キ 引用文献

- 1) Abe, Y., Mieda, K., Ando, T., Kono, I., Yano, M., Kitano, H. and Iwasaki, Y. (2010). The *SMALL AND ROUND SEED1* (*SRS1/DEP2*) gene is involved in the regulation of seed size in rice. *Genes Genetic Systems*. 85 : 327-339.
- 2) Kitagawa, K., Kurinami, S., Oki, K., Abe, Y., Ando, T., Kono, I., Yano, M., Kitano, H., and Iwasaki, Y. (2010). A novel kinesin 13 protein regulating rice seed length. *Plant Cell Physiol.*, 51 : 1315-1329.
- 3) Segami, S., Kono, I., Ando, T., Yano, M., Kitano, H., Miura, K. and Iwasaki, Y. (2012). Rice *SMALL AND ROUND SEED5* gene encodes α -tubulin and regulates seed cell elongation. *Rice*. 5 : 4.
- 4) Kato, T., Segami, S., Toriyama, M., Kono, I., Ando, T., Yano, M., Kitano, H., Miura, K. and Iwasaki, Y. (2011). Detection of QTLs for grain length from large grain rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science*. 61 : 269-274.

研究担当者 (岩崎行玄*, 三浦孝太郎)

(3) イネの耐倒伏性に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0003)

ア 研究目的

現在、全世界でエネルギー生産と食糧生産の競争、気候温暖化による天候不順、先進国への食料輸入の集中等、複合的要因により食料価格高騰が顕著となっており、社会不安を引き起こす大きな原因となっている。また、この食糧危機を引き起こす社会的要因は容易に解決できる状況にはなく、たとえ直近の食料価格暴騰の状況は収まっても、食料価格は高いレベルで推移される予想されている。このような状況下において、ゲノム情報の利用による超多収作物の作出の要請はにわかに高まっている。

我々は、これまでイネの収量決定に関与する遺伝子やそのメカニズムを研究してきた。イネの収量は、様々な機構が複合的に関与して決定される複雑形質

である。この決定機構を要素に分解して考えると、大きく3つに分けることが出来る。すなわち、穂の構造（穂のサイズ、着粒構造、粒数の増大、粒の大きさ等）、植物体全体の構造（強稈、耐倒伏性、厚葉、短葉身、株数、穂数、分枝性等）、栽培特性に関連する形質（直播特性、直立葉、施肥特性等）である（Krishnan, A. et al.¹⁾, Sakamoto T, Matsuoka M.²⁾, Xing Y, Zhang Q.³⁾, Miura K, et al.⁴⁾）。

このうち、本プロジェクトで主に対象とする形質は「植物体全体の構造」、特に耐倒伏性に関わる形質である。登熟期におけるイネの倒伏は収量や品質の劇的な低下をもたらす。これまでの近代育種、特に20世紀後半の育種は、この耐倒伏性を主幹品種に付与することを最大のターゲットとして来たと言って過言ではない。実際、*sdl* 遺伝子が導入されたIR8に代表される一連の半矮性イネ品種や、*RHT1* 遺伝子が導入された半矮性コムギは、それまでの収量を画期的に増大させることに成功し、いわゆる「緑の革命」をもたらした。その後、このイネの*SD1* やコムギの*RHT1* は、どちらも植物ホルモンであるジベレリン（GA）に関わる遺伝子であることが明らかにされるに至り（Hedden, P.⁵⁾, Peng, J.⁶⁾, Sasaki, A.⁷⁾）、GAをターゲットに分子育種を行う戦略の有効性が明らかになった。我々は、平成15年度から19年度に行われた「重要形質プロジェクト」において、このGAを標的に、GAの合成や受容に関わる遺伝子を多く単離し、これらを用いた分子育種の戦略をいくつか提案してきた（Sakamoto, T. et al.⁸⁾, Sakamoto, T. et al.⁹⁾, Ikeda et al.¹⁰⁾）。

一方、本新農業ゲノムプロジェクトにおいては、イネの稈の太さや強さをターゲットとした耐倒伏性育種を試みた。上述したように、これまでの育種は、もっぱらGAを対象として、すなわち草丈を矮化させることにより耐倒伏性を獲得させてきた。しかし、イネのサイズを矮化させることは、バイオマスや収量の観点からすると、矮化させたことにより不可避免的にそれらを減少させることになり、必ずしも好ましい戦略とは言えない。従って、矮化させることなくイネの耐倒伏性を強化することは、今後の高バイオマスイネの育種にとっては必須な要件となる。さらに、イネの着粒数とも密接な関係がある。すなわち、稈または穂首の太さが太くなると、ほとんどの場合、その中の維管束数も増加する傾向を持つ。こ

の穂首の維管束数と一次枝梗数は密接な関係があることが知られていることから、結果として、太稈形質を獲得することはとりもなおさず、一次枝梗数すなわち着粒数の増加に結びつくことが期待できる。従って、本研究では、太稈形質と一次枝梗数との関連についても研究を行い、着粒数の増加についても研究の対象とした。具体的には、イネの太稈突然変異体の原因遺伝子を単離しその機能解析及び太稈化のメカニズムを探ると共に、高子実収量や高バイオマス品種の太稈化に貢献したQTL遺伝子の解析を行い、QTL遺伝子の分子生物学的研究を行うと共に、それらの遺伝子を用いた分子育種を試みた。

イ 研究方法

（ア）耐倒伏性の評価方法（Ookawa, T. & Ishihara, K.¹¹⁾, Ookawa et al.¹²⁾）

倒伏抵抗性の計測については出穂後30日から40日の間に稈経やテンシロンにより基部の伸長節間である第IV節間の稈の挫折時モーメントを測定した。測定後、第IV節間の挫折部の稈横断面の短・長半径、稈の中空楕円の短・長半径を測定し、断面係数を求めた。曲げ応力は稈の挫折時モーメント＝断面係数×曲げ応力の式より算出した。

（イ）遺伝子単離

稈形質に関わる突然変異体の探索、評価。原因遺伝子の単離をマップベーススクローニングにより行うため日印交雑したF2集団を用いて常法に従ってマッピングを行った。

（ウ）QTL解析

ササニシキ/ハハタキ染色体断片置換系統群（CSSLs）18系統とその両親のササニシキ・ハハタキ及びQTL解析用のSL420/ササニシキF2集団195個体を供試し、農工大農学部附属広域都市圏フィールドサイエンス教育研究センターにて22.2株/m²（30×15cm）、1本/株の栽植密度でBILsと両親を移植した。1系統1.8 m²を3反復とした。基肥として堆肥3,000kg/10a、N、P2O5、K2Oの各成分で3kg/10a、追肥として各成分で2kg/10a施用した。F2集団はCTAB法によりDNAを抽出し、10個のSSRマーカーから成る連鎖地図を作成した。QTL解析にはQTL Cartographer ver.2.0を用い、LODの閾値を2.5としてQTLを検出した。

ウ 研究結果

(ア) GA と耐倒伏性との関係

GA 欠乏による半矮性化により倒伏抵抗性が向上することはよく知られているが（イネの緑の革命の *sd1* 変異体がその代表例）、GA 欠乏半矮性変異が実際に稈の性質にどのような効果を与えるかは調べられていない。本プロジェクトの我々の研究により、GA 欠乏や非感受により矮性化したイネ変異体の稈は稈径が小さくなり軟弱になることが解明された。そこで、GA 関連変異体全 6 種類、すなわち GA 不感受性変異体 2 種、GA 欠乏である短銀坊主、*d35*、と *sd1* 変異を導入したコシヒカリ、さらに 2 種の GA 多量蓄積型変異体（図 3113-1）の耐倒伏性評価を行った。それらのバイオマス収量を比較したところ、矮化の程度に応じてバイオマスは減少することが確かめられた（図 3113-2）一方、GA 欠乏型及び不感受型変異体は、矮性化に伴いなぎき型倒伏に対しては抵抗性を示したが、稈径（図 3113-3）や挫折抵抗値（図 3113-4）は低下することが明らかになっ

た。この結果は、*sd1* 変異に代表される GA 欠乏による半矮性育種は、草丈を下げることで耐倒伏性を上昇させるものの、稈自体の強度は低める結果を導くことを示しており、将来の耐倒伏性育種はこれまでとは全く異なった戦略で取り組む必要があることを示している。

(イ) 太稈・多収品種、ハバタキと中国 117 号の持つ太稈遺伝子の育種的利用

インディカの太稈・多収品種であるハバタキと中国 117 号の持つ太稈遺伝子（それぞれ *STRONG CULM2* (*SCM2*) と *STRONG CULM3* (*SCM3*)) について QTL 解析を行い、原因遺伝子を単離し、その機能について解析を行った。その結果、*SCM2* はその機能欠失型変異体が穂の形状に異常を来すとして既に報告されていた *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1* (*APO1*) の機能獲得型のアリルであり（Ookawa et al.¹³⁾）、*SCM3* はその機能欠失型変異体が矮性で分蘖数が異常に増加する *FINE CULM 1* (*FC1*) の機能獲得型アリルであることが

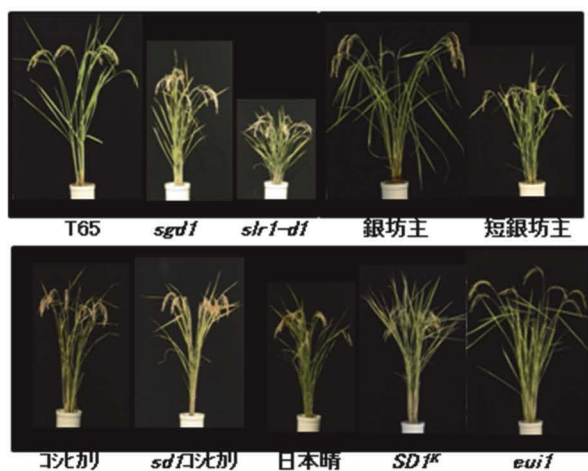


図 3113-1 実験に用いた GA 関連変異体

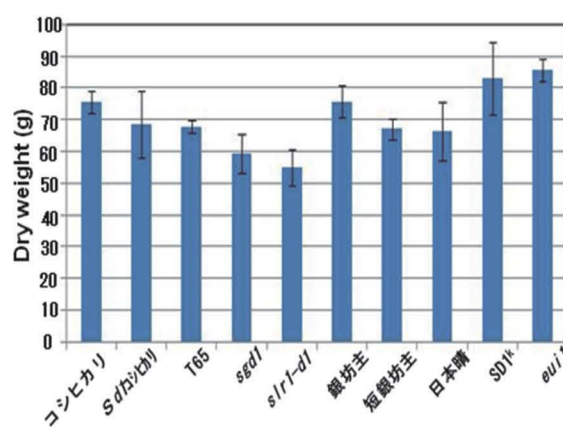


図 3113-2 各変異体のバイオマス量比較

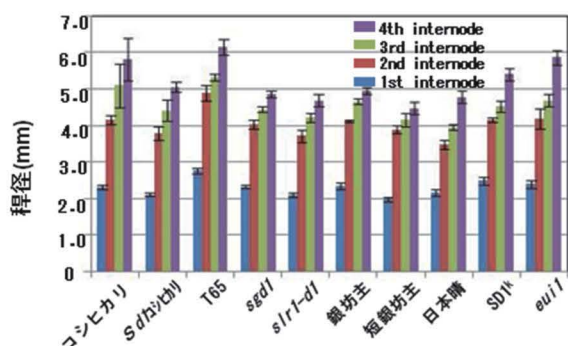


図 3113-3 各変異体の稈径比較

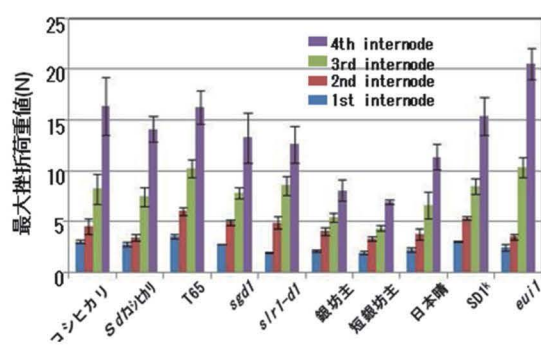


図 3113-4 各変異体の最大挫折荷重値比較

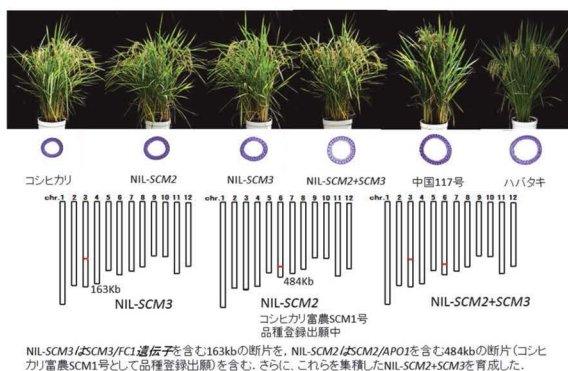


図 3113-5 SCM2 及び SCM3 を導入した NIL-SCM2, NIL-SCM3 及び親系統の草型と稈型の比較

明らかになった。SCM2 と SCM3 の強稈性質を育種的に利用する目的でそれぞれをコシヒカリに戻し交配により導入し、NIL (SCM2 については挿入断片が 500kb 程度、SCM3 については挿入断片が 150kb 程度) を作成した。さらに、NIL-SCM2 と NIL-SCM3 を交配し、ピラミディングライン NIL-SCM2 + SCM3 を育成した (図 3113-5)。次にこれらの出穂期の株の全体像と主稈の横断面をそれぞれの親系統であるコシヒカリ、中国 117 号、およびハバタキのそれと並べて比較した。図から明らかなように、それぞれの NIL はオリジナルのコシヒカリに比して草丈に関してはほとんど差異がない一方で、稈の太さは有意に大きくなっていることが分かる。次に、第 5 節間の曲げ応力 (稈材質の強さを反映するパラメーター) と断面係数 (稈の太さ・稈壁の厚さなど稈の構造的強度を反映するパラメーター) について、これらのイネ個体について測定した (図 3113-6)。まず親品種のジャポニカのコシヒカリとインディカのハバタキ・中国 117 号についてこれらのパラメーターを比較すると、断面係数に関しては、コシヒカリに比してハバタキ・中国 117 号は 2 倍から 3 倍と構造的強度は極めて頑強であることが分かる。一方で、稈材質については、コシヒカリがハバタキ・中国 117 号に対して 2 倍程度であり、これらを統合した稈の強さは、ハバタキ・中国 117 号はコシヒカリに比して、20 - 50% 程度の強度を持つことが分かる。一方、一つの強稈遺伝子を導入した NIL-SCM2 や NIL-SCM3 はハバタキの稈強度と同程度であり、ピラミディングライン NIL-SCM2 + SCM3 は中国 117 号とほぼ同程度の稈強度にまで補強されること

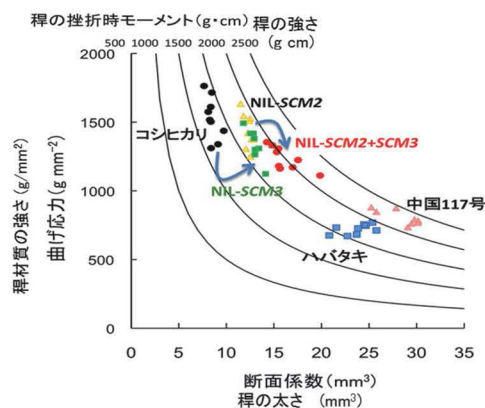


図 3113-6 第 V 節間の断面係数と曲げ応力との関係

が明らかとなった。

(ウ) ハバタキと中国 117 号の持つ太稈遺伝子の穂構造に及ぼす効果

次に、SCM2、SCM3 及び SCM2 + SCM3 の穂構造にもたらす効果について検討した。その結果、SCM2 導入は枝梗数の増加をもたらし、結果として一穂穎花数を増加させた。一方、SCM3 の導入でも 1 次枝梗数は僅かに、2 次枝梗数については有意に増加することが分かった。さらに、SCM2 + SCM3 の導入では、1 次枝梗数・2 次枝梗数ともに有意に増加することが分かった (図 3113-7)。SCM2 や SCM3 は APO1 や FC1 をコードする。これまでの研究より、APO1 や FC1 は分蘗数に大きな影響を与えることが知られている。そこで、NIL-SCM2、NIL-SCM3、NIL-SCM2 + SCM3 の 1 株穂数、精玄米収量、およびバイオマス収量について測定した (図 3113-8)。その結果、想定されたように SCM2 や SCM3 の導入により 1 株穂数は 2 本から 3 本程度減少した。一方、1 次枝梗数・2 次枝梗数の増加に伴い一穂穎花数は全ての NIL で増加するため、精玄米収量については、SCM3 はコシヒカリとほぼ同程度、SCM2 はコシヒカリよりも増加し、SCM2 + SCM3 については 20% 程度の増加となった。この結果は、SCM2 + SCM3 の導入により強稈の性質だけでなく、収量増加についても期待できることを示している。

(エ) 稈の太さ・一穂粒数と分蘗数はトレードオフの関係

イネの多収を考える際、一穂にたくさんのタネを付け、一株にたくさんの穂を形成されることができ

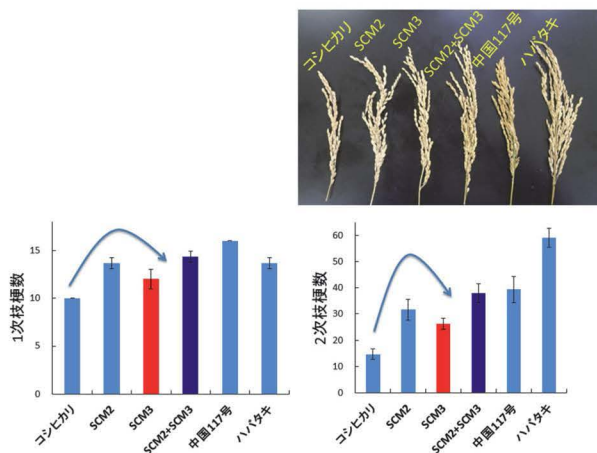


図 3113-7 NIL-SCM2, NIL-SCM3 はコシヒカリより収量が上昇し、NIL-SCM2+SCM3 はさらに上昇する

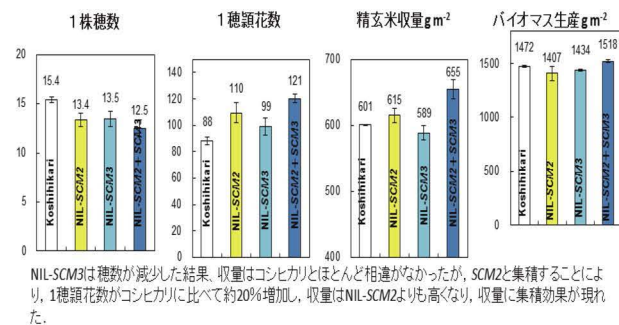


図 3113-8 強稈QTL集積系統の1株穂数、1穂穎花数、バイオマス生産量、精玄米収量

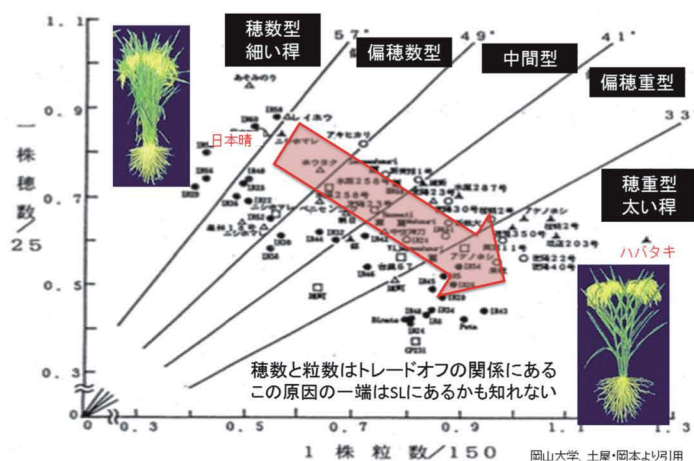


図 3113-9 一穂粒数と一株穂数はトレードオフの関係にある

れば、一株の収量が飛躍的に増加させられる。しかし、これまでのイネ多収研究の結果は、一穂粒数と一株穂数はトレードオフの関係にあり、一穂にたくさんの粒を形成させる穂重型の穂を作らせると一株に形成される穂数は減少し、一株にたくさんの穂を形成させる穂数型のイネは一穂当たりの着粒数は減少するとされている（図 3113-9）。この現象は、SCM2 や SCM3 がコードするタンパク質が APO1 や FC1 であることを考えると納得できる。すなわち、APO1 や FC1 の機能を増強すると、稈は太くなり枝梗数が増加し一穂粒数も増える一方、機構は未解明だが、他面発現の効果により分蘖の発達が阻害され穂数が減少する。しかしながら、今回、我々が育成した NIL-SCM2、NIL-SCM3、NIL-SCM2 + SCM3 においては分蘖数の減少は顕著ではなく、太稈で

一穂粒数の増加を達成しつつ、1株穂数はさほど減少していなかった。この機構について検討するため、イネの生育に伴い分蘖数がどのように推移したかを調べた（図 3113-10）その結果、NIL-SCM2 についてはコシヒカリとほぼ同様な変動を示すものの、最高分蘖期の茎数に対して出穂期穂数の比率は NIL-SCM2 が高く、結果として出穂期穂数は同程度となっていた。一方、NIL-SCM3 や NIL-SCM2 + SCM3 においては、最高分蘖期の茎数はコシヒカリに比して 4 - 4.5 本減少したが、出穂期穂数が最高分蘖期の茎数とほぼ同程度であり（それぞれ 97% と 92%）、コシヒカリの 83% に比して有効分蘖歩合が非常に高いことが分かった。

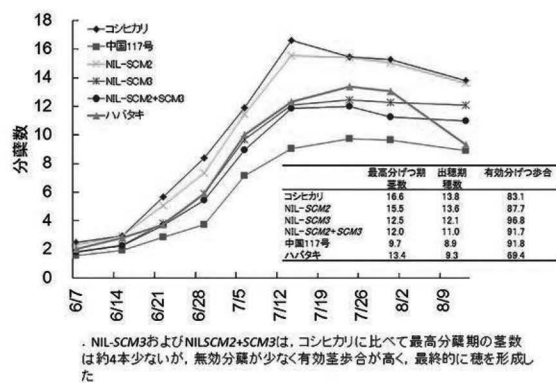


図 3113-10 イネ生長に伴う茎数の推移および最高分蘖期の茎数、出穂期の穂数、有効分蘖歩合の比較

工 考 察

(ア) 作物の多収化を目標としたとき耐倒伏性を向上させることは重要であり、これまでの育種は主に半矮性化により耐倒伏性を向上させてきた。しかしさらなるイネの多収化を目標とする場合、半矮性化のみではなく稈の強度を強化することは必須である。本研究では稈の太さや強さに関与する遺伝子の単離と機能解析を行い、一穂当たりの種子数が増加しても倒れにくいイネの作出を目的とした。本年度は耐倒伏性の研究を行っていく上で必要不可欠な耐倒伏性の評価方法を用いて、GA と耐倒伏性の関係、ハバタキから太稈遺伝子の単離とその育種的利用、さらに、新規変異体からの強稈性遺伝子の探索・単離を行った。その結果、これまで盛んに用いられてきた、GA の欠乏や不感受による半矮性形質を用いた耐倒伏性の改善は限界があり、これからの超多収を考えると、全く異なった耐倒伏性を目指す必要があることが判明した。

(イ) 上の議論を踏まえて、これまでの半矮性ではなく、稈形質に直接関与する遺伝子の単離解析を行った。利用した材料は、インディカ多収品種のハバタキとインディカ強稈品種の中国 117 号の 2 系統である。これら 2 つの系統について、それぞれゲノムマーカーを作出し、QTL 解析を行った結果、これらの系統の強稈性はいずれも QTL により制御されていることが判明した。この結果は、GA 欠乏や不感受と言ったこれまで育種に用いられてきた遺伝子と比較して、稈形質を制御する遺伝子の取り扱いが NIL を作成し導入する必要があることが分かった。

(ウ) 太稈 QTL 遺伝子の育種的利用を目指して

中国 117 号の太稈 QTL - SCM3 とハバタキの太稈 QTL - SCM2 をそれぞれ導入したコシヒカリ (NIL-SCM2、NIL-SCM3) およびそれらをピラミディングした系統 (NIL-SCM2+SCM3) を作出した。これらの中で最も強稈性を示した NIL-SCM2+SCM3 は、ハバタキ並みに強稈となり、収量も 20% 程度増加することが確認された。SCM2 は穂の形態形成に関わることが報告されていた Apo1 であり、SCM3 はストリゴラクトンの受容に関与すると考えられている TCP ドメインを持つ転写因子である。これらの結果は、穂構造やストリゴラクトン信号に関わる遺伝子がイネの稈構造の決定にも重要な役割を担っていることを示している。

(エ) 従来、一穂粒数と一株穂数はトレードオフの関係にあり、一穂にたくさんの粒を形成させる穂重型の穂を作らせると一株に形成される穂数は減少し、一株にたくさんの穂を形成させる穂数型のイネは一穂当たりの着粒数は減少するとされている (図 3113-9)。今回の SCM2・SCM3 がコードするタンパク質が APO1・FC1 であったことは、このトレードオフを良く説明する結果となっている。また今回用いた SCM2 や SCM3 といったアレルが適度な強度を持つものであり、太稈で一穂粒数の増加を達成するも分蘖数の減少を最小限に抑えた結果と考察できる。また、育種には、以上のケースのように、最適な機能を持つアレルを探索し利用することが重要であると考えられた。

オ 今後の課題

本研究において単離された、SCM2 および SCM3 は本研究でも明らかにされたように、コシヒカリの

耐倒伏性を劇的に向上させる。さらに、穂構造の変化ももたらし、その結果、収量も約 20% 程度向上をもたらす。このように改良された NIL については、富山県農試に於いて育種母本として利用するべく品種登録を進めている。

カ 要 約

(ア) 耐倒伏性の評価方法の確立

なぎき型倒伏、挫折型倒伏、ころび型倒伏の 3 つのタイプについて耐倒伏性評価方法を確立した。

(イ) ハバタキ強稈遺伝子の単離と育種的利用

多収インド型ハバタキの稈径を太くする QTL 遺伝子 *SCM2* は既に穂の異常形態の原因遺伝子として単離されていた APO1 と同一であった。ハバタキ *SCM2* アリルをコシヒカリに導入した NIL は耐倒伏性が *sd1* 導入コシヒカリ並みに向上するとともに、一穂粒数がコシヒカリに対して 20% 程度増加した。

(ウ) 中国 117 号の強稈遺伝子の単離と育種的利用

極強稈品種中国 117 号の稈は非常に頑強な構造を有する。中国 117 号の強稈遺伝子の解析を行い、Chr.3 に座乗する *SCM3* の単離を行った結果、*SCM3* は多分蘖・矮性変異体 *fine culm 1* の原因遺伝子である TCP ドメインを持つ転写因子 *FC1* コードした。また、NIL-*SCM3* はコシヒカリ及び *SCM2* を導入したコシヒカリ NIL より稈径が太くなり、*SCM2/SCM3* を集積した NIL はさらに稈径が太く曲げ応力も高くなった。

キ 引用文献

- 1) Krishnan A, Guiderdoni E, An G, Hsing YI, Han CD, Lee MC, Yu SM, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q et al. (2009). Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses. *Plant Physiol.* 149 : 165-170.
- 2) Sakamoto T, Matsuoka M (2008). Identifying and exploiting grain yield genes in rice. *Curr Opin Plant Biol.* 11 : 209-214.
- 3) Xing Y, Zhang Q (2010). Genetic and molecular bases of rice yield. *Annu Rev Plant Biol.* 61 : 421-442.
- 4) Miura K, Ashikari M, Matsuoka M (2011). The role of QTLs in the breeding of high-yielding rice. *Trends Plant Sci.* 16 : 319-326.
- 5) Hedden, P. (2003). The genes of the Green Revolution. *Trends Genet.* 19 : 5-9.
- 6) Peng, J. R., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J. W., Gale, M. D., and Harberd, N. P. (1999). "Green revolution" genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400 : 256-261.
- 7) Sasaki, A., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Itoh, H., Nishimura, A., Swapan, D., Ishiyama, K., Saito, T., Kobayashi, M., Khush, G. S., Kitano, H., and Matsuoka, M. (2002) Green revolution : A mutant gibberellin-synthesis gene in rice—New insight into the rice variant that helped to avert famine over thirty years ago. *Nature* 416 : 701-702.
- 8) Sakamoto, T., Morinaka, Y., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Itoh, H., Kayano, T., Iwahori, S., Matsuoka, M., and Tanaka, H. (2003) Genetic manipulation of gibberellin metabolism in transgenic rice. *Nature Biotech.* 21 : 909-913.
- 9) Sakamoto, T., Miura, K., Itoh, H., Tatsumi, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Agrawal, G. K., Takeda, S., Abe, K., Miyao, A., Hirochika, H., Kitano, H., Ashikari, M., and Matsuoka, M. (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol.* 134 : 1642-1653.
- 10) Ikeda, M. Miura, K. Aya, K. Kitano, H. and Matsuoka, M. (2013). Genes offering the potential for designing yield-related traits in rice Current Opinion in Plant Biology. 16 : 1-8.
- 11) Ookawa, T. & Ishihara, K. (1992) Varietal difference of physical characteristics of the culm related to lodging resistance in paddy rice. *Jpn. J. Crop. Sci.* 61 : 419-425.
- 12) Ookawa, T. et al. (2010). Biomass production and lodging resistance in 'Leaf Star', a new long-culm rice forage cultivar. *Plant Prod. Sci.* 13 : 56-64.
- 13) Ookawa T, Hobo T, Yano M, Murata K,

Ando T, Miura H, Asano K, Ochiai Y, Ikeda M, Nishitani R et al. (2010). New approach for rice improvement using a pleiotropic QTL gene for lodging resistance and yield. Nat Commun. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1132>.

研究担当者（松岡信*、大川泰一郎、蛭谷武志）

2 酸化還元ストレス、カドミウム、栄養不足等の環境ストレス耐性に関わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

(1) ホウ素、ヒ素およびカドミウムの輸送機構の解明 (IPG0005)

ア 研究目的

ホウ素・ヒ素およびカドミウムはいずれも高濃度で植物の生育障害を引き起こし、また植物の生育に影響を及ぼさない程度の濃度であっても、可食部に蓄積することによって、短期的、長期的に人畜の健康を害する。本研究では、これら元素の分子機構を明らかにし、植物に耐性を付与したり可食部の含量を低下させることを目的とした。

イ 研究方法

取り上げる3つの元素について、輸送に関与すると思われる分子の活性や発現、発現の制御機構などを通じてその輸送機構や制御機構を明らかにすることを目標としている。さらに、得られた遺伝子や解析結果を基に植物生育の改善の可能性についても追求したいと考え、分子遺伝学、分子生物学、生理学等を駆使して研究を進めてきた。

ウ 研究結果

(ア) ホウ素の輸送機構

ホウ素については、これまでに同定していたBOR1に加えて、BOR2, BOR3, BOR4の発現パターンを明らかにした。生理機能としては特にBOR4の研究を行い、BOR4は花粉で特に強く発現すること、BOR4のTos17挿入系統では、分離の異常が見られること、BOR4に変異を持つ花粉は発芽や花粉管伸長に異常がみられることを明らかにした。コムギのBOR1を同定し、活性や発現の特徴を調査した（Leaungthitikanachanaら、印刷中）

また、BORを過剰発現することによって、ホウ

素欠乏やホウ素過剰耐性をイネに付与できるかどうかを試した。BOR1の過剰発現によりホウ素欠乏耐性を、BOR4の過剰発現によりホウ素過剰耐性を示す系統が得られることを見出した。

(イ) ヒ素の輸送機構

ヒ素については、ヒ酸輸送に関与する遺伝子の同定を進めた。イネのヒ素に対する感受性はリン酸欠乏で高くなることを明らかにした。イネのリン酸トランスポーター13個のうち、比較的発現量の多い4つの遺伝子についてのヒ素応答性やリン酸欠乏誘導性を調べたところ、組織特異性やリン酸に対する応答性が異なっていた。このうち最も発現の高い遺伝子のT-DNA挿入系統では植物体のヒ素濃度が低下していた。この遺伝子を形質転換を用いてイネでの発現を抑制してもヒ素濃度低下傾向が見られた。これらの結果から、リン酸トランスポーターの一つがイネでのヒ素の吸収や地上部への蓄積に関与していることを明らかにすると共に、ヒ素の蓄積を低下する方法を提示することができた。（Kamiya et al 2013）

また、酵母の持つ排出型のヒ素トランスポーターを発現させることで、イネの玄米のヒ素濃度を低下させることができることを示した。（図3121-1 Duan et al 2012）

(ウ) カドミウムの輸送機構

カドミウムについては、LCT1遺伝子の機能解析を中心に研究を進めてきた。LCT1はコムギで見出された遺伝子でイネには1コピー存在する。LCT1 cDNAを発現すると酵母のカドミウム濃度が発現

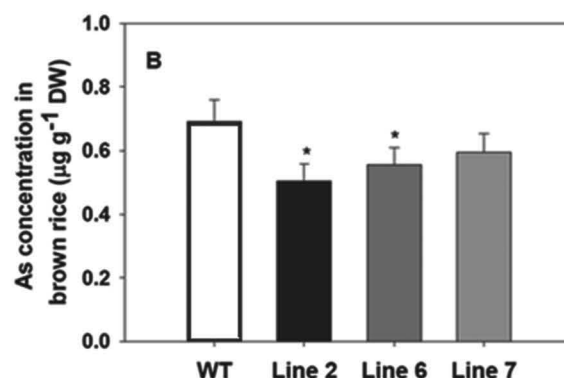


図3121-1 酵母の排出型ヒ素トランスポーターの発現による玄米ヒ素濃度の低下

酵母の排出型ヒ素トランスポーターを発現する植物を3系統（Line2, 6, 7）玄米のヒ素濃度を野生型（WT）と比較したもの。

しない対照に比べて低下した。LCT1 遺伝子の発現を抑制した形質転換体では玄米のカドミウム濃度が低下する傾向が見られた（図 3121-2）。発現抑制体では、カドミウムの根から葉への輸送は影響されおらず、玄米のカドミウム濃度が低下することから、カドミウムが吸収され地上部に輸送された後に玄米に送られる過程で LCT1 が機能している可能性が考えられた。発現を調べると、維管束の木部と師部の中間に発現しており、同位体カドミウムを用いたトレーサー実験を行ったところ、発現抑制体ではカドミウムの吸収や葉への蓄積でなく、玄米への輸送が影響を受けていることが明らかになった。これらのことから、LCT1 はイネの節においてカドミウムを導管から篩管へ積み替える役割を担っていると考えられた（Uraguchi et al 2011）。

さらに、LCT1 に変異を持つ系統を Tilling 法を用いて選び出した。得られた変異を持つ系統を水田で栽培し、玄米のカドミウム濃度を測定したところ、変異を持たない系統に比べて、低下している傾向が認められた。

エ 考 察

（ア）ホウ素の輸送機構

ホウ素については、イネの欠乏症の報告例が世界的にはあり、ホウ素欠乏やホウ素過剰耐性を付与することは、ホウ素欠乏やホウ素過剰地域でのコメの生産に重要である。本研究でイネのホウ素輸送機構の一端を明らかにし、遺伝子導入によってイネのホウ素欠乏耐性やホウ素過剰耐性を付与する技術を開発したことは意義があると考えている。

また、BOR4 が花粉管の発芽や伸長に関わることを明らかにした。ホウ素は花粉管の伸長に重要であるといわれてきたが、どのような仕組みでホウ素が花粉管伸長に関与しているのかは明らかでなかった。ホウ素の輸送体が関与しているという発見は、花粉管伸長におけるホウ素の役割の一端を明らかにしたものであると考えている。

（イ）ヒ素の輸送機構

イネのヒ素輸送に関与する遺伝子を同定しその発現抑制によってヒ素の蓄積を低下させることができることを示した。また、外来遺伝子の発現によってもヒ素蓄積を低下させることができることを示した。

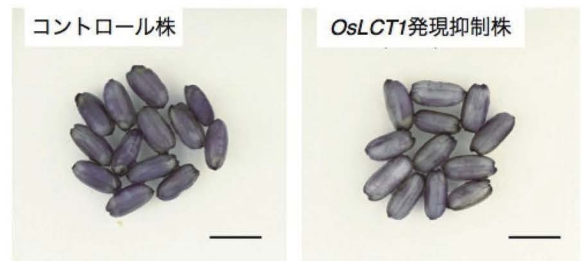


図 3121-2 LCT1 の発現低下による玄米カドミウム濃度の低下

LCT1 の発現抑制株と対照のコントロール株を同じ土壌で栽培し、得られた玄米のカドミウムを染色試薬を用いて染色したもの。

（ウ）カドミウムの輸送機構

カドミウムの節における導管から篩管への積み込みに関与する新たな遺伝子 LCT1 を見出し、この遺伝子の変異によって、イネのカドミウム蓄積を低下させることができることを明らかにした。カドミウムは栄養成長期に吸収されたカドミウムが玄米に蓄積する傾向があることが知られていたが、根から導管を通じて地上部へ運ばれたカドミウムがどのようにして、篩管に積み替えられるのかについては分子レベルでの理解はされていなかったが、本研究によって積み替え機構を明らかにすることができたと考えている。

オ 今後の課題

（ア）ホウ素の輸送機構

輸送機構の一端を明らかにすることができたが、形質転換を使わずにホウ素欠乏や過剰特性を付与することが課題である。これまでに知られているホウ素欠乏耐性に違いのあるイネ品種でのホウ素輸送体の発現には差異があることを見出してきており、輸送機構の理解を基にした品種の選抜や育種に用いることのできる遺伝子座を見出すことが今後の課題であると考えている。

（イ）ヒ素の輸送機構

ヒ素の輸送機構の研究は進展してきており、遺伝子導入による発現抑制でヒ素を低下させることができつつある。その一方で、これらの知見を利用して、実際の育種に使うことのできる遺伝子座を見出すことが重要な課題である。

（ウ）カドミウムの輸送機構

カドミウムについては、LCT1 遺伝子に変異を持

つ系統の玄米でのカドミウム蓄積が低下していることを見出した。今後の課題としては、見出した変異型 LCT1 を導入した品種を確立することであると考えている。

カ 要 約

3つの元素について、イネにおける輸送機構の一端を明らかにするとともに、これら元素の蓄積を制御する手法を開発した。カドミウムについては変異によって毒物蓄積を低下させることが明らかになった。このような遺伝子座を将来の育種に用いることができる。

キ 引用文献

- 1) Leaungthitikanchana S, Fujibe T, Tanaka M, Wang S, Sotta N, Takano J, Fujiwara T (2013). Differential Expression of Three BOR1 Genes Corresponding to Different Genomes in Response to Boron Conditions in Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.) *Plant Cell Physiol.* 54 : 1056-1063. 10.1093/pcp/pct059.
- 2) Duan G, Kamiya T, Ishikawa S, Arao T, Fujiwara T. (2012). Expression of ScACR3 in Rice Enhanced Arsenite Efflux and Reduced Arsenic Accumulation in rice grains. *Plant Cell Physiol.* 53 : 154-63.
- 3) Kamiya T, Islam MR, Duan G, Uruguchi S, Fujiwara T (2013) Phosphate deficiency signaling pathway is a target of arsenate and phosphate transporter OsPT1 is involved in As accumulation in shoots of rice. *Soil Science and Plant Nutrition* 59 : 580-590.
- 4) Uruguchi S, Kamiya T, Sakamoto T, Kasai K, Sato Y, Nagamura Y, Yoshida A, Kyojuka J, Ishikawa S and Fujiwara T (2011). Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains. *PNAS* 108 (52) : 20959-64.

研究担当者 (藤原 徹*)

(2) イネのケイ酸輸送とアルミニウム耐性に関する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0006)

ア 研究目的

ケイ素はイネの倒伏や病虫害などのストレスを軽減し、その高集積はイネの安定多収に必要不可欠である。しかし、イネにおけるケイ素の輸送分子機構の全貌はまだ明らかにされていない。本研究では、根によるケイ酸の吸収から地上部での沈積までの過程に関与する遺伝子を同定し、それらの遺伝子の機能を明らかにすることを目的とする。一方、アルミニウムイオン毒性は酸性土壌における主な作物生育阻害因子である。本研究では、アルミニウム感受性突然変異体を用いて、アルミニウム耐性に関与する遺伝子を単離し、その機能をも明らかにする。

イ 研究方法

(ア) イネケイ酸輸送体に関する研究

遺伝子の発現量は定量 RT-PCR で調べた。また組織局在は抗体染色で観察した。イネの各部位 (節間、節、止葉、穂軸、籾殻) に分けて、ケイ素の定量を発色法で行った。

シロイヌナズナの根で特異的に発現する NIP5;1 のプロモーターあるいは 35S プロモーターに Lsi1 を繋いだコンストラクトを作成し、シロイヌナズナに形質転換した。形質転換体をケイ酸を含む培養液で栽培し、その生育を野生型と比較した。また地上部のケイ酸濃度の測定は発色法で行った。

Lsi1 をアフリカツメガエル卵母細胞あるいは酵母に発現させて、亜ヒ酸、ヒ酸、亜セレン酸、メチルヒ素に対する輸送活性を ICP-MS で測定した。またケイ酸吸収欠損変異体 *lsi1* と *lsi2* を用いて、短期間のヒ素の吸収と圃場における植物体内の集積量を測定した。

(イ) アルミニウム耐性遺伝子に関する研究

アルミニウム耐性は根の伸長阻害で評価した。クエン酸の分泌量は根を Al 溶液に 24 時間曝した後、酵素法で測定した。ART1 の転写活性化能は酵母 one-hybrid を用いて調べた。ART1 タンパク質の細胞内局在を明らかにするため GFP 融合遺伝子を作成しイネカルスプロトプラストに PEG 法を用いて一過的に導入して、蛍光顕微鏡で観察した。ART1 の結合 cis 配列を同定するために、酵母 one-hybrid やゲルシフトを用いた。

アルミニウムイオンや他の金属に対する輸送活性を測るために、遺伝子を酵母に発現させて、原子吸光法で測定した。また遺伝子の発現を定量的 RT-PCR で、組織・細胞局在性を抗体染色法か GFP との融合遺伝子の形質転換植物を作成して観察した。さらに細胞内局在性は、GFP との融合遺伝子を作成し、タマネギの表皮細胞に打ち込んで、蛍光顕微鏡で観察した。

新規アルミニウム耐性遺伝子の単離は基本的に map-based cloning の手法を用いた。アルミニウム感受性突然変異体 (c68) とカサラス、あるいは 93-11 との交配から得た F2 集団を用いて、まずは InDel マーカーで、バルク法により目的遺伝子のラフマッピングを行った。次に、新たな InDel や CAPS マーカーを設計し、ファインマッピングを行った。新規アルミニウム耐性遺伝子 C68 の相補性試験を行うために、2.8kb のプロモーターと C68 遺伝子とつないだコンストラクトを作成し、変異体に導入した。

ウ 研究結果

(ア) イネケイ素集積に関与する輸送体の解析

イネの外向きケイ酸輸送体 OsLsi2 の機能をさらに解析した結果、OsLsi2 は OsLsi1 と同様、側根と主根に発現し、根毛には発現しなかった (Yamaji

and Ma)¹⁾。また側根では、主根同様、外皮と内皮の向心側に偏在していた。OsLsi2 の発現パターンを調べたところ、出穂の前後に一過的な高発現を示した。また OsLsi2 の発現は乾燥や ABA 処理によって低下された。さらに OsLsi2 の発現量は野生型では、ケイ酸添加によって低下したが、変異体ではほとんど低下しなかった。このことは地上部に沈積したケイ素が OsLsi2 の発現調節を行っている可能性を示唆している。

Lsi6 はイネケイ酸内向きトランスポーター OsLsi1 遺伝子のゲノム上唯一の相同遺伝子である (Yamaji ら)²⁾。この遺伝子は栄養成長期において主に葉鞘と葉身に発現し、ケイ酸の導管からのアンローディングに関与している (Yamaji ら)²⁾。生殖生長期において Lsi6 は出穂期以降の上位の節で著しく発現が増大し、特に肥大維管束の周縁部の木部柔組織において導管に面した極性局在が見られた (図 3122-1)。Lsi6 の T-DNA 挿入変異株では穂 (籾、穂軸、穂首) のケイ素蓄積量が約 1/3 に低下し、逆に止め葉の葉身には 2 倍の蓄積が見られた (Yamaji and Ma)³⁾。また切除した未熟穂について水分の蒸散量を測定したところ、T-DNA 挿入株では蒸散速度が有意に増大し、「白穂」が容易に再現された。これらの結果から、蒸散流に伴って根から地上部へと吸い上げられたケイ酸は、節において穂の維管束

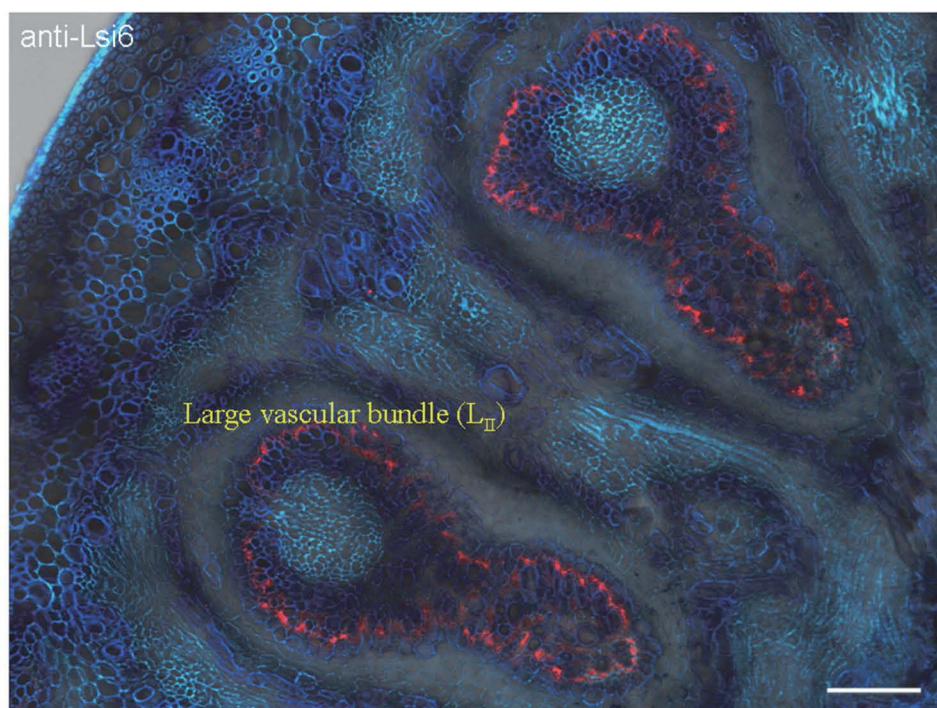


図 3122-1 イネの節における Lsi6 の局在

へと積み替えられ、その過程のうち Lsi6 は下位の導管からのケイ酸の積み降ろしを担うと考えられた。

ケイ素非集積植物にケイ素の集積性を付与することを目的に、イネ由来の内向きケイ酸輸送体 *Lsi1* をシロイヌナズナに導入した。35S プロモーター制御下で GFP と *Lsi1* の融合遺伝子をシロイヌナズナで過剰発現させたところ、GFP の蛍光は根全体に観察された。mRNA の発現が確認された独立した 2 ラインについて、1.0mM のケイ酸を含む培養液で 2 週間栽培したところ、地上部のケイ素含量は野生型と比較して 4 倍から 5 倍高くなった。この時リンの含量には有意な差は見られなかった。形質転換体の表現型を観察すると、ケイ素無添加の条件下では野生型と同じ生育を示したが、2.0 mM のケイ酸処理条件下では、約 10 日間で葉の矮化が見られ、地上部の乾物重が野生型の約半分程度に低下した。また葉の周縁部に白変した箇所が見られ、果実の成熟にも異常を呈した。SEM-EDX を用いて葉のケイ素の分布を観察したところ、葉の周縁部の白変した部位に一致してケイ素の集積が見られた。以上の結果から *Lsi1* を過剰発現させることによって細胞内へ取り込まれたケイ酸が蒸散流の末端部に無秩序に沈着してしまったため、生育に異常を呈したことを示唆している。しかし、根特異的発現遺伝子のプロモーターを用いてシロイヌナズナへのイネ *Lsi1* の導入を試みた結果、地上部のケイ素の集積量は 4-5 倍に増加し、ケイ素供給による生育の低下も見られなかった (Montpetit ら)⁴⁾。

そのほかに、イネのケイ酸トランスポーター *Lsi1* と *Lsi2* が亜ヒ酸を輸送することを明らかにした (Ma ら)⁵⁾。*Lsi1* を発現させた酵母とアフリカツメガエル卵母細胞は亜ヒ酸の輸送活性を示したが、ヒ酸の輸送活性は認められなかった。水耕栽培による短期間の亜ヒ酸吸収実験では、*lsi1*、*lsi2* 変異株ともに地上部へのヒ素蓄積量が野生型の半分程度に低下した。またケイ酸の添加によって野生型のヒ素集積量は減少したが、変異体は影響を受けなかった。導管液中のヒ素形態を同定したところ、主に亜ヒ酸として存在していた。さらに圃場で栽培した種子中のヒ素濃度を比較したところ、*lsi2* は野生型の半分であったが、*lsi1* はあまり変わらなかった。これらの結果はイネでは亜ヒ酸がケイ酸の輸送シス

テムを使って、体内に取り込まれていることを示している。さらに、最近、ケイ酸内向きトランスポーター *Lsi1* はメチル化ヒ素、亜ヒ酸の細胞外への排出や亜セレン酸の吸収にも関与していることを明らかにした (Zhao ら)⁶⁾、(Zhao ら)⁷⁾、(Li ら)⁸⁾。

(イ) イネアルミニウム耐性遺伝子の解析

アルミニウム感受性変異体 *art1* を単離した。この変異体はアルミニウム害のないバーミキュライトで野生型と同じ生育を示すが、酸性土壌では根の伸長が著しく阻害される (写真 3122-1)。その原因遺伝子をマッピングした結果、新規の zinc finger 型の転写因子であった (Yamaji ら)⁹⁾。*ART1* 遺伝子は根において構成的に発現し、Al 処理によって変動しなかった。GFP 融合タンパク質と免疫組織染色によって細胞 / 組織局在性を調査したところ、成熟した表皮を除く根のすべての細胞において *ART1* は核に検出され、Al によってその局在は変化しなかった。*GAL4* DNA 結合ドメイン - *ART1* 融合タンパク質を酵母に発現させたところ、*GAL* プロモーター下流の遺伝子発現が誘導され、*ART1* に転写活性化能があることがわかった。

マイクロアレイを用いて野生型と *ART1* 変異体の遺伝子発現応答を比較したところ、野生型においては Al に応答して発現が増加するが、*ART1* 変異体では応答がみられなくなった遺伝子が約 30 種類見いだされた。

ART1 制御下にある 4 つの遺伝子 (*Nrat1*, *OsALS1*, *OsFRDL4*, *OsMGT1*) の機能について解析を行った。*Nrat1* (Nramp Aluminum Transporter 1) は Nramp ファミリーに属している。*Nrat1* は根で発現しており、地上部には発現がなかった (Xia ら)¹⁰⁾。また根での発現はアルミニウムによって誘導された。さらに根においては、根の先端より基部での発現が多かった。*Nrat1* の発現は pH や他の金属に応答せず、Al のみに応答した。*Nrat1* の局在性を抗体染色で調べた結果、根の先端ではすべての細胞、基部では表皮以外のすべての細胞に局在していた。また細胞膜に局在していた。

OsNrat1 を酵母に発現すると、アルミニウム耐性が弱くなった (図 3122-2)。しかし、同じファミリーに属する *AtNramp4* を発現してもアルミニウム耐性は変わらなかった。また酵母へのアルミニウムの取り込みが *Nrat1* の発現によって増加した。しかし、



写真 3122-1 アルミニウム感受性変異体 *art1* 及び *star1* の酸性土壌での生育

他の2価金属（マンガン、鉄、カドミウム）に対して輸送活性を示さなかった。さらにアルミニウム-クエン酸やアルミニウム-シュウ酸複合体に対する輸送活性も示さなかった。

Nrat1 が破壊されたイネでは、アルミニウム耐性が野生型に比べ弱くなった。しかし、他の金属（Cd と La）に対する耐性は変わらなかった。また細胞内のアルミニウム濃度を比較すると、Nrat1 破壊株では、いずれの根の部位においてもアルミニウム濃度が野生型に比べ低くなっていたが、細胞壁に結合したアルミニウムは根の先端では逆に多くなっていた。一方で Nrat1 をイネで過剰発現した結果、アルミニウム耐性が弱くなり、根のアルミニウム濃度も高くなっていた。

これらの結果は Nrat1 がアルミニウムイオンを特異的に輸送するトランスポーターであることを示している。

一方、OsALS1 はハーフサイズの ABC トランスポーターをコードし、根と地上部で発現していた。

しかし、根での発現量は短時間のアルミニウム処理で誘導されたのに対し、地上部での発現は影響されなかった（Huang ら）¹¹⁾。OsALS1 と GFP を連結させたコンストラクトをタマネギの表皮細胞に発現させて観察した結果、OsALS1 は液胞膜に局在していた。また OsALS1 プロモーターに OsALS1 と GFP を連結させた融合遺伝子をイネに形質転換し、細胞局在性を調べた結果、OsALS1 は根のすべての細胞に発現していた。OsALS1 を破壊した株を用いて、アルミニウム耐性を野生型と比べた。その結果、アルミニウムによる根の伸長阻害は OsALS1 破壊株が野生型より顕著であった。しかし、他の金属に対する耐性は同程度であった。Morin 染色で根の先端の細胞でのアルミニウムの分布を調べた結果、破壊株の細胞質に高濃度のアルミニウムが観察された。さらに、酵母を用いて OsALS1 のアルミニウム輸送活性を調べたところ、*OsALS1* を発現させた酵母はおそらく植物とは細胞内局在が異なるため、アルミニウム耐性が弱くなった。これらの結果から、

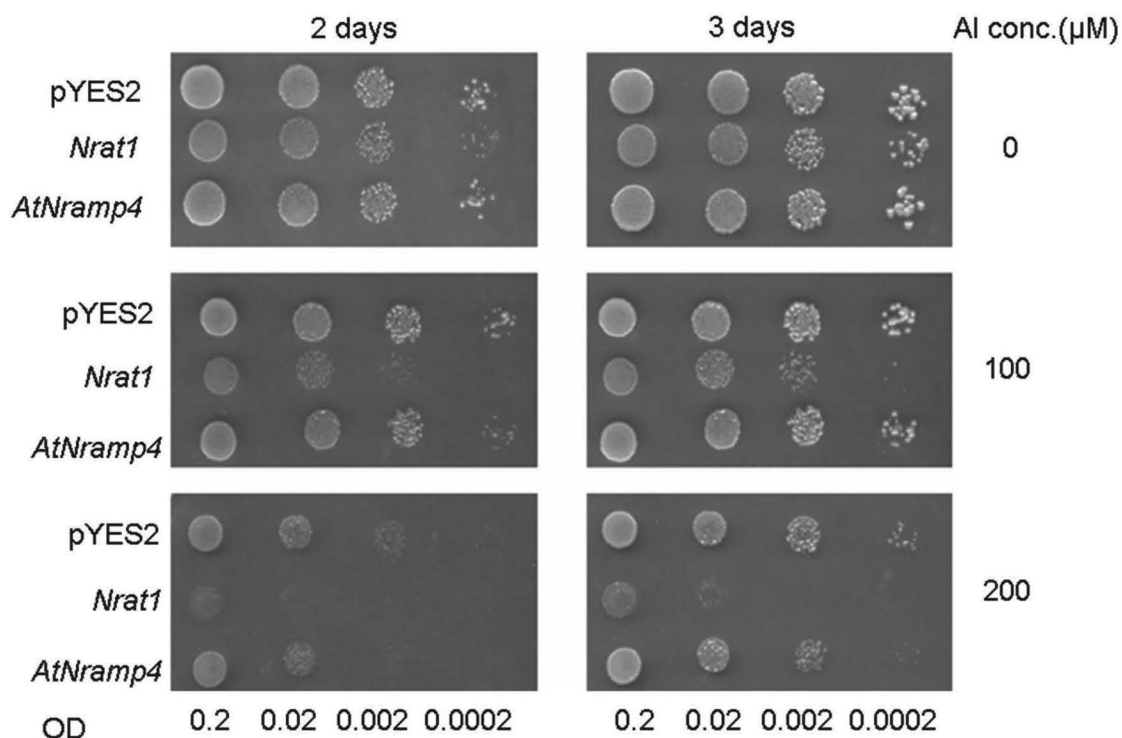


図 3122-2 酵母での *Nrat1* の発現が生育に対する影響

OsALS1 は液胞膜に局在するアルミニウムトランスポーターをコードし、細胞内に入ってくるアルミニウムを液胞に輸送することによって、アルミニウムの無毒化に機能していると考えられる。

OsFRDL4 は MATE ファミリー属し、細胞膜に局在するクエン酸トランスポーターである (Yokosho ら)¹²⁾。*OsFRDL4* は主に根で発現し、その発現量はアルミニウムによって数時間で 100 倍程度に増加していた。この遺伝子の Tos-17 挿入破壊株 (NF) においてはアルミニウムに誘導される根圏へのクエン酸の分泌量が WT に比べて著しく低下していた。また破壊株のアルミニウム耐性は野生型と比べ、少し低下していた。これらのことは *OsFRDL4* がアルミニウムによって誘導される根圏へのクエン酸の分泌に機能していることを示している。

さらにアルミニウム耐性の異なるイネ品種を用いて、*OsFRDL4* の発現量とクエン酸の分泌量、アルミニウム耐性との関係を調べた結果、*OsFRDL4* の発現量とクエン酸の分泌量、*OsFRDL4* の発現量とアルミニウム耐性との間に正の相関が見られた。各品種のプロモーター領域を比較すると、*OsFRDL4* の発現量の少ない品種では、1kb 近くの欠損があっ

た。その欠損領域配列に ART1 が結合するアルミニウム応答シス因子が多数含まれていた。

OsMGT1 はマグネシウムトランスポーターをコードしている (Chen ら)¹³⁾。*OsMGT1* は細胞膜に局在し、アルミニウム処理で *OsMGT1* の発現が素早く誘導され、その結果、細胞内へのマグネシウム吸収が増加した。一方、この遺伝子を破壊すると、マグネシウムの吸収が減少し、アルミニウム耐性が弱くなった。しかし、マグネシウムの添加で耐性が回復した。これらのことは細胞内のマグネシウム濃度の増加がイネのアルミニウム耐性に寄与することを示している。

アルミニウム耐性転写調節因子 ART1 結合 cis 因子を同定するために、Yeast one hybrid assay と Gel shift assay を行った。その結果、ART1 が特異的に認識しているコアのシス配列は GGNVSN で、ART1 下流のほとんどの遺伝子のプロモーター領域に共通なコア配列を有していることを明らかにした (Tsutsui ら)¹⁴⁾。

新規アルミニウム感受性突然変異体を単離するために、 γ 線で照射したコシヒカリの M3 種子から根の伸長阻害を指標に選抜を行った。その結果、新規アルミニウム感受性突然変異体 c68 を単離すること

ができた (Huang ら)¹⁵⁾。c68 はアルミニウムだけではなく、他の金属 (カドミウムとランタン) にも感受性を示した。また根の形態を観察したところ、変異体では、1. 根毛と表皮細胞が萎縮していた；2. 外皮細胞の一部が厚壁細胞に変わっていた；3. 根の先端では lateral root cap が剥がれにくくなっていた；4. 分裂組織では表皮と下皮の層序が一部不規則に変化していた。Morin 染色の結果、アルミニウムの浸入は野生型では外皮で止まっていたのに対して、変異体では皮層まで浸入していた。

map-based クローニング法で原因遺伝子を単離した結果、receptor-like kinase をコードしている遺伝子を突き止めた (Huang ら)¹⁶⁾。この遺伝子 (*DOCS1*) は、根の表皮細胞および根毛で発現していた。またタンパク質は細胞膜に局在していた。これらの結果から、この遺伝子はイネ根の外周細胞 (表皮、外皮と厚壁細胞) の分化に必要であること、また表皮及び外皮細胞が有害金属の進入に対して重要な役割を果していることを示している。

エ 考 察

(ア) イネケイ素沈積に関与する遺伝子

ケイ素はイネの生物的ストレス及び非生物的ストレスを軽減し、その高集積はイネの安定多収に不可欠である。これまでに根によるケイ酸の吸収には内向きケイ酸トランスポーター *Lsi1* と外向きケイ酸トランスポーター *Lsi2* が関わっていることを明らかにしてきた (Ma ら)¹⁷⁻¹⁸⁾。本研究では、*Lsi2* について更なる解析を行った結果、*Lsi2* は *Lsi1* と同じ発現パターンを示すことが明らかとなった。*Lsi1* は根の外皮と内皮細胞の遠心側に、*Lsi2* は同じ細胞の向心側に偏在していることから、*Lsi2* は *Lsi1* と協同してケイ酸の吸収を効率よく行っていることが考えられる。

生殖成長期において籾殻へのケイ素の沈積は穂からの過蒸散や病原菌の感染を防ぎ、稔実歩合を左右する重要な因子である。しかし、籾へのケイ素の沈積に関与するトランスポーターはこれまでに同定されていなかった。本研究では、*Lsi1* の相同遺伝子である *Lsi6* がもみ殻へのケイ素の分配に関与していることを明らかにした。生殖成長期では、*Lsi6* は上位の節の木部転送細胞に局在し、肥大維管束から穂へと繋がる分散維管束へのケイ酸の輸送 (維管

束間輸送) に必要である。

Lsi1 の輸送基質を詳しく調べた結果、ケイ酸以外に、亜ヒ酸、亜セレン酸、メチルヒ素も輸送することが分かった。これらの分子は電荷を持たない中性分子という点で共通している。しかし、土壤中にケイ素は他のミネラルより圧倒的に多いので、*Lsi1* は主にケイ酸トランスポーターとして働くことが考えられる。

高等植物の中でケイ素を積極的に集積する植物はイネ科とカヤツリ科だけで、ほとんどの植物はケイ素をあまり集積することができず、ケイ素の有益効果を受けることができない。集積できない植物にケイ酸集積能を付与する目的で、シロイヌナズナにイネのケイ酸輸送体 *Lsi1* を導入した。35S プロモーター制御下で *Lsi1* を発現させると、ケイ素の集積エネルギーが高まったが、地上部でのケイ素の沈積が無秩序になり、かえてケイ素が生育を阻害した。これらのことはケイ素の地上部での分配も重要であることを示している。根特異的な発現プロモーター制御下で *Lsi1* を発現させると、生育阻害することなく、ケイ酸の吸収能力を高めることができた。

(イ) イネのアルミニウム耐性機構

アルミニウム毒性は酸性土壌での主な作物生育障害因子であるが、植物の種類によってアルミニウム耐性が大きく異なる。イネは最もアルミニウム耐性の高い穀物の一つであるが、その耐性機構はほとんど解明されていなかった。本研究で同定したアルミニウム耐性転写因子 *ART1* の解析から、イネの高いアルミニウム耐性は複数の耐性遺伝子が共同で機能して達成されることが分かった。例えば、*OsFRDL4* は根圏へクエン酸を分泌して、アルミニウムを無毒化する。*Nrat1* はアルミニウムを細胞内へ輸送し、*OsALS1* によって液胞へ隔離して無毒化する。また *OsMGT1* の発現がアルミニウムによって増加し、マグネシウムの吸収を促進することによって細胞内のアルミニウム毒性を軽減する。ほかのイネ科作物、例えばオオムギの場合、根圏へのクエン酸の分泌という耐性機構しか持っていないので、イネと比べると、アルミニウム耐性が非常に弱い。

イネの中でも日本型イネとインド型イネはアルミニウム耐性が異なる。一般的に、日本型イネのほうのアルミニウム耐性が強い。そのアルミニウム耐性の品種間差について多数の QTL が報告されている

が、いまだ遺伝子の同定には至っていない。最近、ART1 下流の遺伝子 Nrat1 がイネのアルミニウム耐性の品種間差に関与していることが報告されている。

オ 今後の課題

ケイ素に関しては、本研究で、Lsi6 が穂へのケイ素の分配に重要であることを明らかにしたが、穂へ効率よくケイ素を高集積するためには、他の輸送体の関与も必要で、今後同定していく必要がある。

また Lsi1 と Lsi2 は特徴的な極性分布を示すが、その極性分布を制御する機構が明らかではない。Lsi1 と Lsi2 の発現制御機構も合わせて明らかにしていく必要がある。さらに、地上部では、ケイ素が特定の細胞に秩序よく沈積するが、その沈積に関与する輸送体を今後同定する必要がある。

ケイ酸輸送体、特に Lsi1 は他のメタロイドに対しても輸送活性を示すことから、今後、これらの輸送体の基質選択性を変化させて、ケイ酸のみを輸送するように改変すれば、有害ミネラル吸収が抑えられる。またイネのケイ酸輸送体遺伝子を重要な作物に導入すれば、各種ストレスに対して耐性の高い作物の作出が考えられる。

アルミニウムに関しては、アルミニウムシグナルの受容機構、転写因子 ART1 の活性化機構、ART1 下流遺伝子の機能を明らかにしていくことは今後の課題となる。またアルミニウム耐性に関する QTL 遺伝子の同定、アルミニウム感受性品種への耐性遺伝子の導入なども重要である。

カ 要 約

ケイ素輸送体 Lsi2 の更なる解析を行い、発現パターンや組織・細胞局在を明らかにすることができた。また穂へのケイ素の分配に上位節で発現する Lsi6 が関与することを突き止めた。さらにイネのケイ酸輸送体をシロイヌナズナに導入して、ケイ酸吸収能力の強化に成功した。そのほか、Lsi1 は亜ヒ酸、メチルヒ素、亜セレン酸をも輸送できることを明らかにした。

イネの高いアルミニウム耐性に関わる転写因子 ART1 を同定した。ART1 制御下の 4 つの遺伝子の機能を明らかにした。Nrat1、OsFRDL4、OsMGT1 はともに細胞膜に局在する輸送体で、Nrat1 はアル

ミニウムイオン、OsFRDL4 はクエン酸、OsMGT1 はマグネシウムを輸送する。一方、OsALS1 は液胞膜に局在するアルミニウム輸送体であり、これらの輸送体はイネのアルミニウム耐性に貢献することを明らかにした。さらに ART1 のシス因子を同定した。

新規のアルミニウム耐性に関わる遺伝子 DOCS1 を同定し、この遺伝子はイネの根の外周細胞の分化に関与し、アルミニウムなどの金属イオンの侵入を防ぐことに働くことが明らかとなった。

キ 引用文献

- 1) Yamaji, N. and Ma, J. F. (2011). Further characterization of a rice Si efflux transporter, Lsi2. *Soil Sci. Plant Nutr.* 57 : 259-564.
- 2) Yamaji, N., Mitatni, N. and Ma, J. F. (2008). A Transporter regulating silicon distribution in rice shoots. *Plant Cell.* 20 : 1381-1389.
- 3) Yamaji, N. and Ma, J. F. (2009). A transporter at the node responsible for inter-vascular transfer of silicon in rice. *Plant Cell.* 21 : 2878-2883.
- 4) Montpetit, J., Vivancos, J., Mitani-Ueno, N., Yamaji, N., Rémus-Borel, W., Belzile, F., Ma, J. F. and Richard R. Bélanger, R.R. (2012). Cloning, functional characterization and heterologous expression of TaLsi1, a wheat silicon transporter gene. *Plant Mol Biol* 79 : 35-46.
- 5) Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X. Y., Su, Y. H., McGrath, S. and Zhao, F. J. (2008). Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *PNAS.* 105 : 9931-9935.
- 6) Zhao, X. Q., Mitani, N., Yamaji, N., Shen, R. F. and Ma, J. F. (2010). Involvement of silicon influx transporter OsNIP2;1 in selenite uptake in rice. *Plant Physiol.* 153 : 1871-1877.
- 7) Zhao, F. J., Ago, Y., Mitani, N., Li, R. Y., Su, Y. H., Yamaji, N., McGrath, S. P. and Ma, J. F. (2010). The role of the rice aquaporin Lsi1 in arsenite efflux from roots. *New Phytol.* 186 : 392-399.
- 8) Li, R.Y., Ago, Y., Liu, W. J., Mitani, N., Feldmann, J., McGrath, S. P., Ma, J. F. and Zhao,

- F. J. (2009). The rice aquaporin Lsi1 mediates uptake of methylated arsenic species. *Plant Physiol.* 150 : 2071-2080.
- 9) Yamaji, N., Huang, C. F., Nagao, S., Yano, M., Sato, Y., Nagamura, Y. and Ma, J. F. (2009). A Zn-finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell.* 21 : 3339-3349.
- 10) Xia, J. X., Yamaji, N., Kasai, T. and Ma, J. F. (2010). Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107 : 18381-18385.
- 11) Huang, C. F., Yamaji, N., Chen, Z. and Ma, J. F. (2012). A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *Plant J.* 69 : 857-867.
- 12) Yokosho, K., Yamaji, N. and Ma, J. F. (2011). An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J.* 68 : 1061-1069.
- 13) Chen, Z. C., Yamaji, N., Motoyama, R., Nagamura, Y. and Ma, J. F. (2012). Up-regulation of a magnesium transporter gene OsMGT1 is required for conferring aluminum tolerance in rice. *Plant Physiol.* 159 : 1624-1633.
- 14) Tsutsui, T., Yamaji, N., and Ma, J. F. (2011). Identification of a cis-acting element of ART1, a C2H2-type zinc finger transcription factor for aluminum tolerance in rice. *Plant Physiol.* 156 : 925-931.
- 15) Huang, C. F., Yamaji, N., Nishimura, M., Tajima, S. and Ma, J. F. (2009). A rice mutant sensitive to Al toxicity is defective in the specification of root outer cell layers. *Plant Cell Physiol.* 50 : 976-985.
- 16) Huang, C. F., Yamaji, N., Ono, K. and Ma, J. F. (2012). A leucine-rich repeat receptor-like kinase gene is involved in the specification of outer cell layers in rice roots. *Plant J.* 69 : 565-576.
- 17) Ma, J. F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y. and Yano, M. (2006). A silicon transporter in rice. *Nature.* 440 : 688-691.
- 18) Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Tamai, K., Konishi, S., Fujiwara, T., Katsuhara, M. and Yano, M. (2007). An efflux transporter of silicon in rice. *Nature.* 448 : 209-211.

研究担当者（馬 建鋒*、山地直樹）

（3） 地力窒素と土壌固定リンの吸収能力に優れたイネの選抜と育種（IPG0007）

ア 研究目的

〔カリ〕 食料需要の増加とともにカリウム肥料も増加の一途をたどり、カリウム肥料価格は高騰している。ナトリウムは植物の必須元素ではないが、カリウムの供給が制限された環境では、ナトリウム塩の施用によってカリウム欠乏による生育障害が軽減される。土壌溶液中にはカリウムイオンよりもナトリウムイオンの方が多く含まれているので、イネが土壌からナトリウムを多く吸収するようになり、ナトリウムイオンをカリウムイオンの代替として利用できるようになれば、カリウム施肥の低減することができる。本研究では、カリウム施肥量の低減を目的とし、イネのカリウム代替イオンとしてのナトリウム吸収遺伝子、ナトリウム吸収能力を高める遺伝子の同定を試みた。

〔リン〕 リン肥料はすべてリン鉱石から製造され、わが国ではすべて輸入に依存している。昨今の化石エネルギー価格の上昇や肥料需要量の増加によって輸入価格は高騰しており、さらに地球上の資源賦存量にも限りが見えてきた。リン鉱石は地球上に偏在し国際的な戦略物資の1つとしても利用されるため、作物栽培におけるリン肥料の効率的な利用は農業上の長年の重要課題となっている。わが国の水田土壌には不可給態のリンが多く存在しているため、これを吸収利用できれば、新規輸入リン鉱石への依存度を低下させることができる。作物のリン利用率の上昇は環境汚染を緩和策にもなるだろう。そのため、特にインディカ品種カサラスのもつ低リン耐性機構と関与遺伝子の解明を目指す。具体的にはカサラスに由来するリン欠乏ストレス誘導性の、根の伸長遺伝子および下位葉葉身の酸性ホスファターゼ活性上昇を制御する遺伝子の単離を行う。

〔カドミウム〕 タイ国ターク県メーソット郡にはタイ国最大の亜鉛鉱山が存在し、この鉱山を流れる

メータオ川の下流には、鉱山から流出したカドミウムに汚染された水田地帯が広がっている。本研究では、現地生産者のカドミウム摂取リスクの軽減するため、コメ中のカドミウム蓄積量が少なく、かつ現地での栽培に適したタイ国品種の圃場栽培選抜試験を行った。

イ 研究方法

(ア) ナトリウム吸収能力に優れたイネの選抜とナトリウム吸収遺伝子の同定

a 低カリウム環境イネのナトリウム吸収品種間差の検討

ジャポニカ品種3品種（コシヒカリ、ササニシキ、日本晴）、インディカ品種3品種（カサラス、IR36、IR64）をカリウム充分条件及び低カリウム条件で播種後10日間水耕栽培し、地上部ナトリウム含有率を測定した。

b ナトリウム吸収遺伝子座乗領域の同定

コシヒカリとカサラスに由来する染色体部分置換系統群について、低カリウム条件での地上部ナトリウム含有率を測定し、遺伝子型との対応から、品種間差の原因遺伝子座乗領域を同定した。さらにIR64を遺伝的背景とし、6番染色体長腕末端にコシヒカリ由来領域をもつ染色体部分置換系統をもちいて遺伝子座乗候補領域の絞り込みをすすめた。

(イ) 土壌固定リンの吸収能力に優れたイネの選抜と育種

a 低リンで誘導される根の伸長（REP）を制御する遺伝子qREP-6の、精密マッピングと、マイクロアレイ解析による低リン誘導遺伝子の探索、および遺伝子組換えイネを用いた候補遺伝子の機能確認

リン欠乏区と対照区の2水準の吉田の水耕液で5週間育てたイネ苗62品種のスクリーニング結果から、イネには低リンで根が伸びる品種群と伸びない品種群およびその中間があることが分かり、低リンで根が伸びるカサラスと伸びない銀坊主のRecombinant Inbred Linesを用いた量的形質遺伝子座（QTL）解析では、低リン誘導性の根伸長（Root Elongation under Phosphorus-deficiency、以下REP）形質をもたらすカサラス由来の遺伝子座は、染色体6長腕に検出された（Shimizu et al. 2004）。また、日本晴を遺伝的背景とする置換系統群を用いた形質マッピングにおいても、染色体6長

腕がカサラスに置換したSL29はREP形質を示したことから、SL29と日本晴の交雑後代を用いたファインマッピングにより、イネ染色体6長腕に検出された低リン応答性QTL、qREP-6の単離を目指した。また、カサラスのREP形質は0.5～1.36mg/Lの閾値以下の低リン濃度で発現し、1週間ごとのリン欠乏区および対照区との移行実験により、水耕栽培3-4週間目のリン欠乏処理がREP形質の発現に重要であることが分かった。そこで、リン欠乏および対照区で4週間水耕栽培したカサラスおよび日本晴の根から抽出したRNA（各4個体反復）を用いてAgilent社の44K発現遺伝子マイクロアレイ解析を行い、この時期の低リンで誘導される転写産物の探索を行った。以上のqREP-6のマップベース・クローニングおよび低リン誘導発現遺伝子のマイクロアレイ解析より絞り込んだ候補遺伝子については、遺伝子組換えイネを用いた相補性検定を行った。より具体的にはqREP-6領域中の低リン誘導性転写因子PiTF-6について、新農業展開ゲノムプロジェクトのARM0001およびARM0004で作成された過剰発現（OX）系統およびキメラリプレッサーを発現させた機能抑制（OR）系統を分譲していただき、水耕栽培による生育調査と、マイクロアレイおよびリアルタイムPCRによる発現遺伝子解析を行った。

b 低リン誘導性の下位葉身酸性ホスファターゼ活性を制御する遺伝子のマッピングと、マイクロアレイ解析による低リン応答性酸性ホスファターゼ遺伝子の探索、およびT-DNAタギング系統による候補遺伝子の機能確認

ホスファターゼは不可給態リンの一つである有機態リンを加水分解し無機リン酸つまり可給態リンにする酵素である。特に最適pHを7以下に持つ酸性ホスファターゼは基質特異性が低く、植物体内中で不要になったリンの再利用を促し利用効率を高める可能性がある。リンが欠乏したイネは下位葉葉身が黄化しやがて脱落するが、下位葉葉身の酸性ホスファターゼは、リン欠乏条件に移行1週間後には上昇することがわかり、リン利用効率向上への寄与が考えられる。この活性の上昇程度は日本晴に比べカサラスで有意に高く、これらF₂集団を用いたQTL解析では染色体8に有意な染色体領域が検出できqACP-8と名付けた（Shimizu et al. 2008a）。そこでこの形質についても染色体断片置換系統を用

いた、有意なカサラス染色体断片の探索と、マッピングを行った。また、日本晴とカサラスの4週齢シュートから抽出したRNA（各3個体反復）を用いたマイクロアレイ解析も行い、低リン誘導性酸性ホスファターゼ発現遺伝子の絞り込みを行った。その結果とマッピングの暫定結果により絞り込んだ低リンで誘導される酸性ホスファターゼ遺伝子PiACP-8については、5'UTR 上端またはイントロンに T-DNA が挿入したタギング系統（Jeon et al. 2000）を KyungHee 大学より入手して、表現型への影響を調査した。

c qREP-6 および qACP-8 のコシヒカリへの集積

イネゲノムリソースセンターが提供するカサラス染色体断片をコシヒカリ遺伝的背景にもつ置換系統群のうち、SL218 は qREP-6 の、SL224 は qACP-8 のカサラス対立遺伝子を染色体断片に持つ系統に相当する。そこで SL224 と SL218 の F₂192 個体を用いて、リン欠乏条件で5週栽培し、最大根長と第四葉葉身の酸性ホスファターゼ活性および最上位完全展開葉のリン含量を計測し、染色体6および8の置換領域それぞれ83.3cMと101.0cMについて9種および6種のSSRマーカーを用いて調査した遺伝子型を用いてQTL解析を行った。単一遺伝子座ごとのQTL解析にはWinQTLCart ver 2.5のコンポジット・インターバルマッピングを使用し、遺伝子座間の交互作用の検出にはR/qtl ver 2.15.1のTwoQTLscanを利用し、それぞれの閾値の計算には1000回の並べ替え検定を用いた。

(ウ) 低カドミウム蓄積タイ国イネ品種の選抜

タイ国北西部のターク県メーソット郡のカドミウム汚染圃場においてタイ国近代品種42品種を3年間に渡って栽培し、穀実中のカドミウム含有率を測定し、現地人気品種のKDM105号に比べて穀実カドミウム含有率の低い品種を選抜した。さらに、選抜された品種の中で現地で生産者に受け入れられやすい農業特性をもつ5品種について試験圃場数を8圃場に増やして栽培試験を行った。

ウ 研究結果

(ア) 低カリウム環境イネのナトリウム吸収品種間差の原因遺伝子の同定

イネ地上部ナトリウム含有率は、培養液に添加し

たナトリウム濃度は同じであるにもかかわらず、カリウム十分条件に比べて低カリウム条件で増加した。このときの地上部ナトリウム含有率は、コシヒカリなどのジャポニカ品種で、インディカ品種よりも大きく、低カリウム条件でのイネのナトリウム吸収能力に大きな品種間差があることが示された（図3123-1）。低カリウム条件で水耕栽培した場合、ナトリウム吸収量の大きいコシヒカリでは培養液へのナトリウム塩の添加によって有意な生育の改善が見られた一方、ナトリウム吸収量の小さいIR64ではナトリウム塩添加による生育の改善は認められなかった。このことは、ナトリウム吸収能力は低カリウム環境でのイネの生育を実際に有利にすることを示している。

そこで、コシヒカリとナトリウム吸収量の小さいカサラスに由来する染色体部分置換系統39系統について地上部のナトリウム含有率を測定したところ、ほとんどの系統では遺伝的背景であるコシヒカリと同程度のナトリウム含有率を示したが、系統SL215とSL218ではコシヒカリに比べて著しく低い値を示した（図3123-2）。この結果から、低カリウム条件におけるイネのナトリウム吸収品種間差の原因遺伝子が6番染色体長腕末端の領域に存在することが示された（Miyamoto et al 2012）。

さらに、コシヒカリとIR64に由来する染色体部分置換系統を用いて候補染色体領域の絞り込みをすすめ、これを約120kbの領域に狭めた。

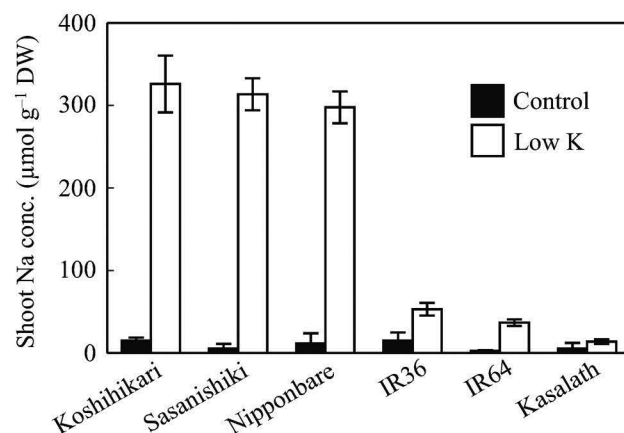


図3123-1 カリウム充分条件及び低カリウム条件で栽培した播種後10日齢イネの地上部ナトリウム含有率

1) 培養液添加ナトリウム濃度はどちらも0.38 mmol L⁻¹である。

(イ) 低リン誘導性の、根伸長形質を制御する遺伝子 qREP-6 および下位葉酸性ホスファターゼ活性を上昇させる qACP-8 の候補遺伝子の絞り込みと、両遺伝子座の集積

a qREP-6 のファインマッピングと、低リン応答遺伝子の探索および候補遺伝子 PiTF-6 組換えイネを用いた相補性検定

染色体6長腕がカサラスに置換した SL29 と背景親である日本晴との F₂ 集団を用いたファインマッピングにより、qREP-6 の座乗位置は染色体6長腕の 28.3～31.1Mbp の領域にまで絞り込めた (Shimizu et al. 2008b)。更なる絞り込みを進めるためには、近傍で単離された根のバイオマスを増加させるカサラス由来の対立遺伝子 qRL6.1 (小原ら、新農業展開ゲノムプロジェクト IPG0008) の影響を取り除く必要があった。qRL6.1 がホモ接合体に固定し、qREP-6 染色体領域がヘテロ接合体である交雑後代を用いたファインマッピングより、qREP-6 の推定座乗領域は、SSR マーカー RM439 と RM5814 の間の最大 260kbp に絞り込むことができた。また、マイクロアレイ解析の結果より、低リンで誘導される多くの遺伝子を検出することができ、その発現量には品種間差を持つものも多く見られた。qREP-6 の座乗推定領域の間の遺伝子座についてリン充分区に

対するリン欠乏区の遺伝子発現量をみると、低リン誘導性の発現量に品種間差を持つ転写因子 PiTF-6 が検出できた (図 3123-3)。この qREP-6 の候補遺伝子 PiTF-6 について、新農業展開ゲノムプロジェクト AMR0001 および AMR0004 より作出された過剰発現 (OX) 系統およびキメラリプレッサー発現 (OR) 系統を用いた水耕栽培実験を行った。その結果より、5 週齢の根長は、対照区 (P+) および低リン区 (P-) において、OR<日本晴<OX の順で有意となり、相補性が確認できた (図 3123-4)。また PiTF-6 は低リン区の最上位完全展開葉のリン含量にも影響を持ち、OR は日本晴や OX よりも低くなった (図 3123-5)。

b 低リン誘導性の下位葉葉身酸性ホスファターゼ活性を制御する qACP-8 のマッピングと、低リン応答性酸性ホスファターゼ遺伝子の探索、および T-DNA タギング系統による候補遺伝子 PiACP-8 の機能確認

低リン条件で 5 週間水耕栽培した染色体断片置換系統群の第四葉 (下位葉) 葉身の酸性ホスファターゼ活性を調査した結果、染色体8がカサラスに置換した SL223 や SL224 は背景親のコシヒカリに比べ有意に活性が高くなることが分かった。また SL224 × コシヒカリの F₂ 集団を用いた QTL 解析でも、

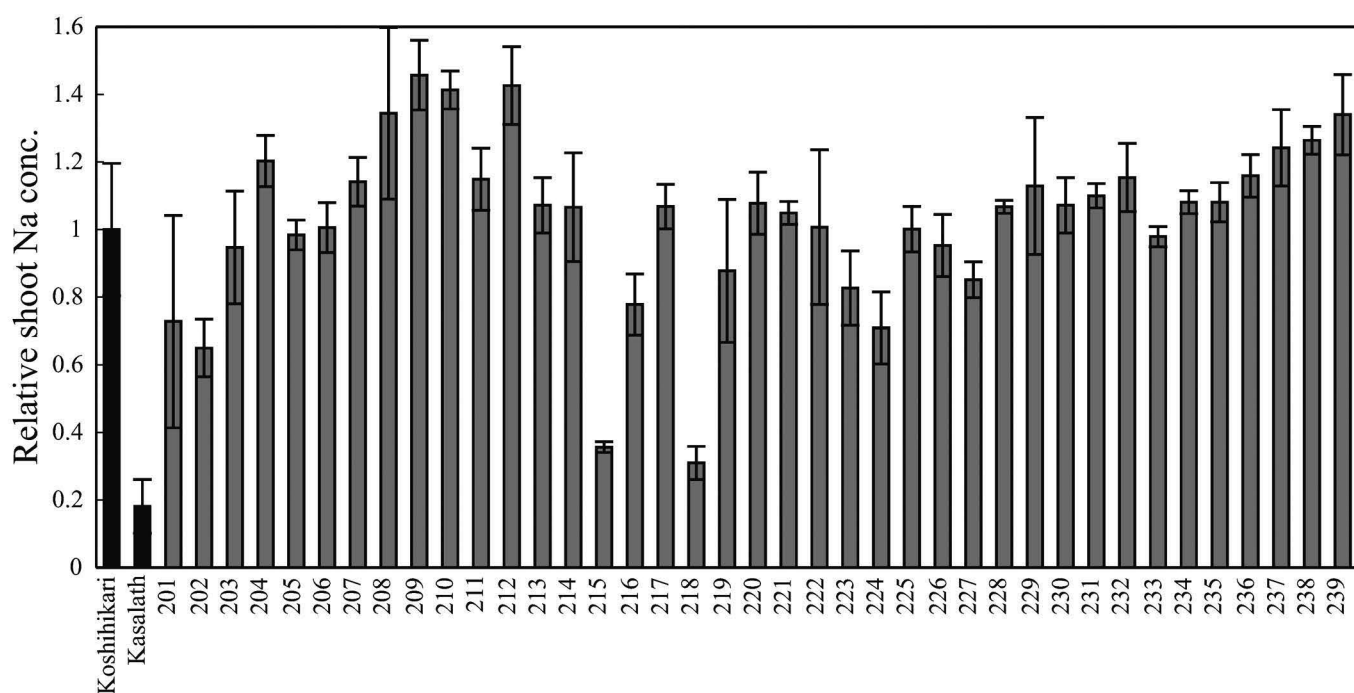


図 3123-2 コシヒカリ／カサラス染色体部分置換系統の地上部ナトリウム含有率
1) コシヒカリに対する相対値を示した。

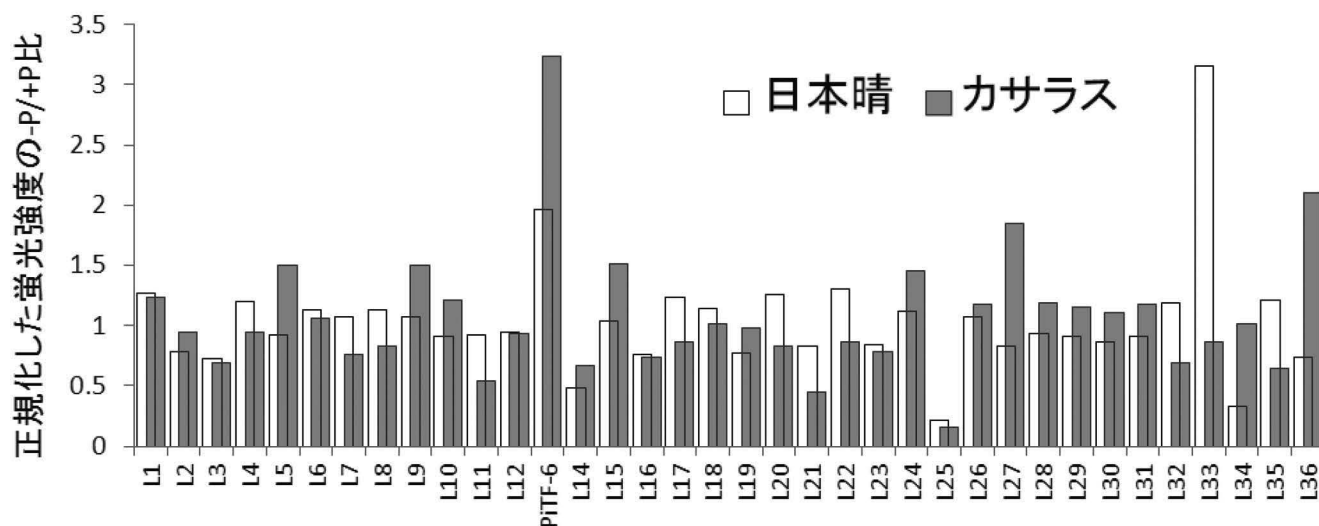


図 3123-3 qREP-6 座乗推定領域における 4 週齢の根の発現遺伝子変動 (-P/+P)

- 1) SSR マーカー RM439 から RM5814 間に座乗する 38 遺伝子座のうち、Agilent 社 44K マイクロアレイでは 36 遺伝子座の発現量が調査できた。
- 2) 同一遺伝子座内の複数の転写産物データは、平均値で示した。

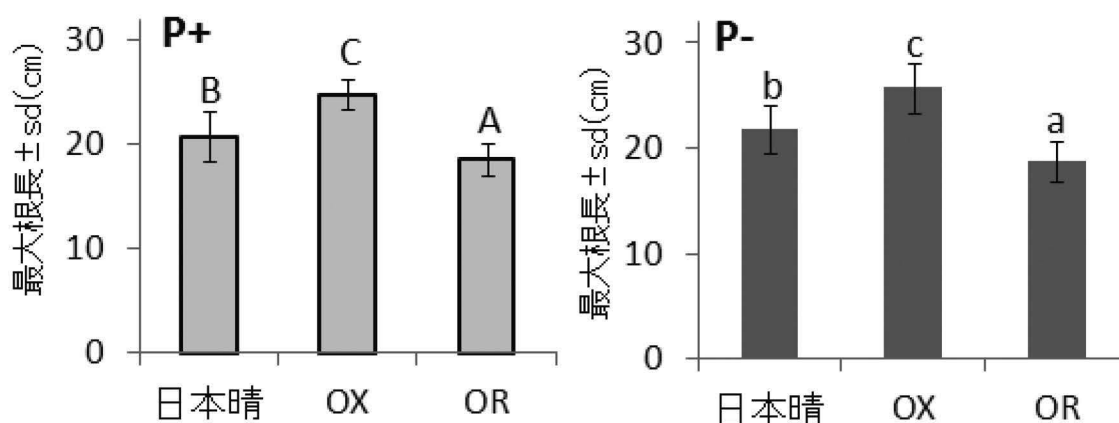


図 3123-4 PiTF-6 過剰発現 (OX) および機能抑制 (OR) によるリン充分 (P+) およびリン欠乏 (P-) 区における最大根長の差

- 1) リン充分 (P+) 区およびリン欠乏区 (P-) のそれぞれの根長平均について Tukey の多重比較を行い、異なるアルファベットで有意差を示した ($p < 0.01$)。

qACP-8 領域に LOD スコア 3.2 の有意な LOD ピークが検出できた。また、イネゲノムのアノテーション・データベース (RAP-DB) に登録される 44,514 種類の転写産物のうち、酸性ホスファターゼ遺伝子の分子機能オントロジー GO:0003993 を持つものまたは遺伝子注釈に acid phosphatase という記述を持つものは 81 種類 (63 遺伝子座) 見つかった。これらのうち 76 種類 (58 遺伝子座) の転写産物は、Agilent 社の 44K マイクロアレイによって発現量を調査することができた。4 週齢のシュートおよび根のマイクロアレイ解析の結果より、日本晴

または Kasalath の少なくともどちらか一方で、リン充分区に比べリン欠乏区における発現量が 2 倍以上に増加する低リン誘導性の酸性ホスファターゼ遺伝子は 40 種であった。この値は全遺伝子中の低リン誘導性遺伝子の割合 13.5% よりも 4 倍弱高い結果となった。そのうちリン欠乏区のシュートにおいて日本晴に対するカサラスの発現量比が最も高い酸性ホスファターゼ遺伝子は染色体 8 に座乗しており、*PiACP-8* と呼ぶことにした。*PiACP-8* のゲノム上の位置は、QTL 解析で検出された *qACP-8* 領域内に含まれる。そこで *PiACP-8* 近傍への T-DNA

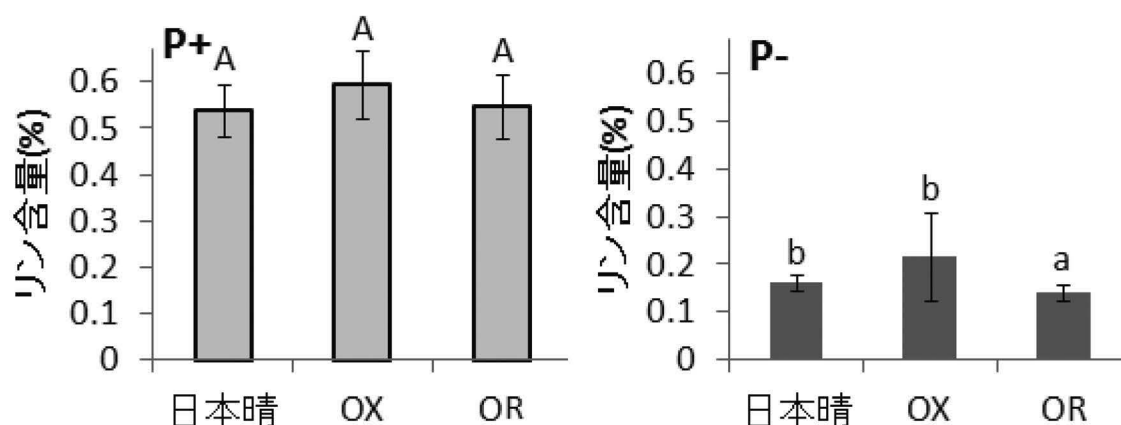


図 3123-5 PiTF-6 過剰発現 (OX) および機能抑制 (OR) によるリン充分 (P+) およびリン欠乏 (P-) 区における最上位展開葉のリン含量の差
1) リン充分 (P+) 区およびリン欠乏区 (P-) のそれぞれのリン含量 (乾燥重量あたり) の平均について Tukey の多重比較を行い、異なるアルファベットで有意差を示した ($p < 0.05$)。

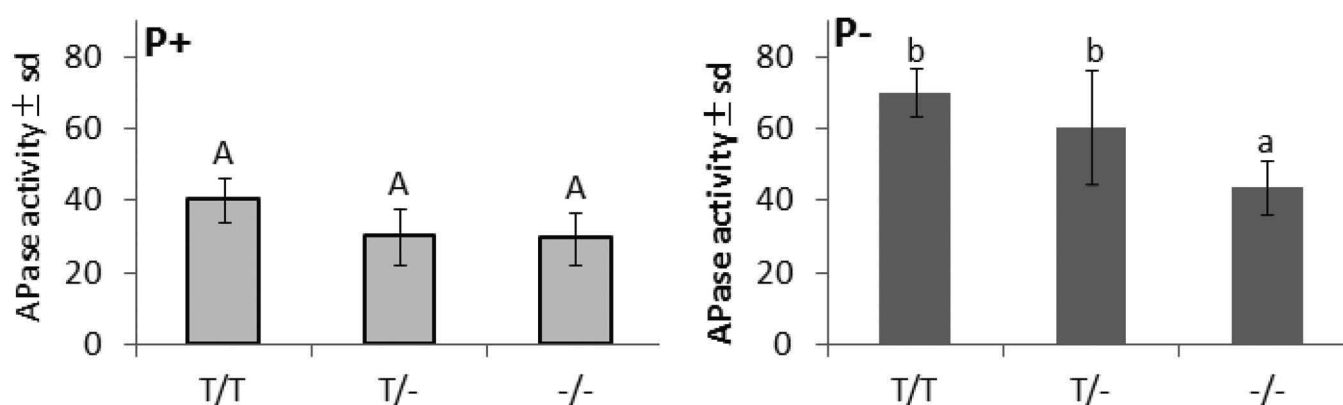


図 3123-6 T-DNA 挿入変異体遺伝子型別の下位葉葉身の酸性ホスファターゼ活性の比較
1) リン充分 (P+) 区およびリン欠乏区 (P-) のそれぞれの酵素活性 (単位時間あたり可溶性タンパク量あたりの pNP 生成量) の平均について Tukey の多重比較を行い、異なるアルファベットで有意差を示した ($p < 0.05$)。
2) T/T、T/-、-/- はそれぞれ T-DNA 挿入のホモ、ヘテロおよび挿入なしを示す。

挿入変異体 2 種類を調べたところ、5'UTR 上端に T-DNA が挿入した系統は、*PiACP-8* の持つ低リン誘導性が保持・強化されることが分かり (図 3123-6)、T-DNA 挿入変異は最上位完全展開葉のリン含量にも影響を及ぼした (図 3123-7)。

c SL224 × SL218 の F₂ 集団を用いた qREP-6 および qACP-8 の効果の確認と相互作用

5 週間のリン欠乏条件での水耕栽培後に調査した最大根長、第四葉葉身の酸性ホスファターゼ活性および最上位完全展開葉のリン含量の各形質について QTL 解析を行った。最大根長および第四葉葉身の酸性ホスファターゼ活性は、それぞれの候補遺伝子 PiTF-6 および PiACP-8 近傍で LOD ピークが検出

された (図 3123-8)。リン含量については単一 QTL 解析では有意な LOD ピークは検出できなかったが、座間の相互作用を探索すると PiTF-6 と PiACP-8 それぞれの近傍マーカー間で有意な相互作用が検出された (図 3123-9)。

(ウ) 低カドミウム蓄積タイ国イネ品種の選抜

2009 年から 2011 年にタイ国のカドミウム汚染圃場において、延べ 42 品種を栽培し、籾カドミウム含有率を測定した。現地人気品種である KDM105 号の籾カドミウム含有率は 0.49 mg kg^{-1} であった。試験した 42 品種のカドミウム含有率は KDM105 号を 100 として、2 から 196 の範囲に分布し、日長非感受性の品種で穀実カドミウム含有率が低い傾向が

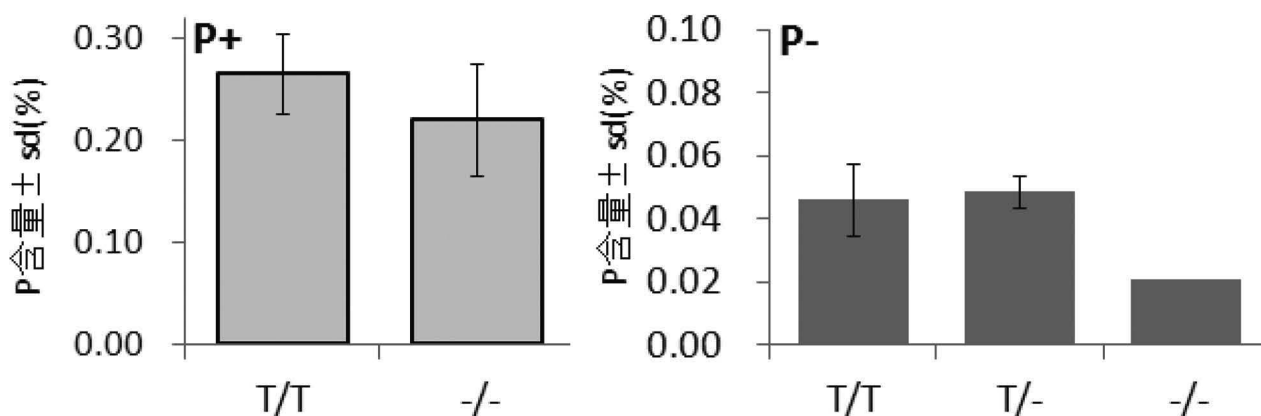


図 3123-7 T-DNA 挿入変異体遺伝子型別の最上位完全展開葉のリン含量

- 1) リン充分 (P+) 区およびリン欠乏区 (P-) の最上位完全展開葉のリン含量の平均を示す。
- 2) T/T、T/-、-/- はそれぞれ T-DNA 挿入のホモ、ヘテロおよび挿入なしを示す。

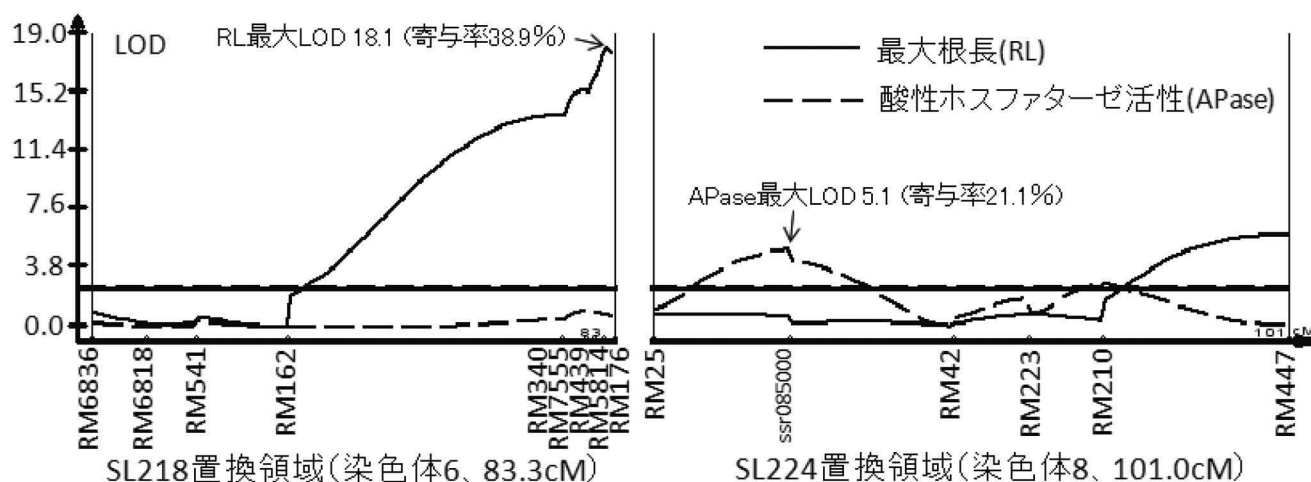


図 3123-8 SL224 × SL218F₂ を用いた QTL 解析

- 1) 最大根長および酸性ホスファターゼ活性の LOD ピークの位置はそれぞれの候補遺伝子 PiTF-6 および PiACP-8 の極近傍 SSR マーカー付近で検出された (解析には WinQTLCart ver 2.5 のコンポジット・インターバルマッピングを使用した)。
- 2) 1000 回の並べ替え検定により計算した QTL の閾値はそれぞれ 2.5 と 2.6 であった。

あった (図 3123-10, Sriprachote et al. 2013a, b)。しかし、日長非感受性品種は雨期中に収穫期を迎えることや、肥料コストがかさむことから、現地での栽培品種としては不適である。そこで、日長感受性品種の中で KDM に比べて、穀実中のカドミウム含有率が小さかった RD5 号、RD15 号、SangYod、Khao' Niaw Ubon1、Khao' Niaw Ubon2 の 5 品種について、2012 年には圃場数を 8 圃場に増やして栽培試験を行い、穀実カドミウム含有率が KDM105 号よりも低いことを確認した。

工 考 察

(ア) 高ナトリウム吸収遺伝子の同定

ナトリウムをカリウムの代替イオンとして利用する能力は、作物のカリウム利用効率を決定する因子の一つである。植物細胞内においてナトリウムがカリウムの代替として機能するためには、まず、ナトリウムが植物によって吸収される必要がある。本研究からも、ナトリウム吸収能力の高いイネ品種では、低カリウム環境での生育が有利になる可能性が示された。低カリウム条件でのナトリウム吸収にはイネ品種間で大きな差があった一方、これらの品種のカリウム吸収にはほとんど差がなく、カリウム利用効

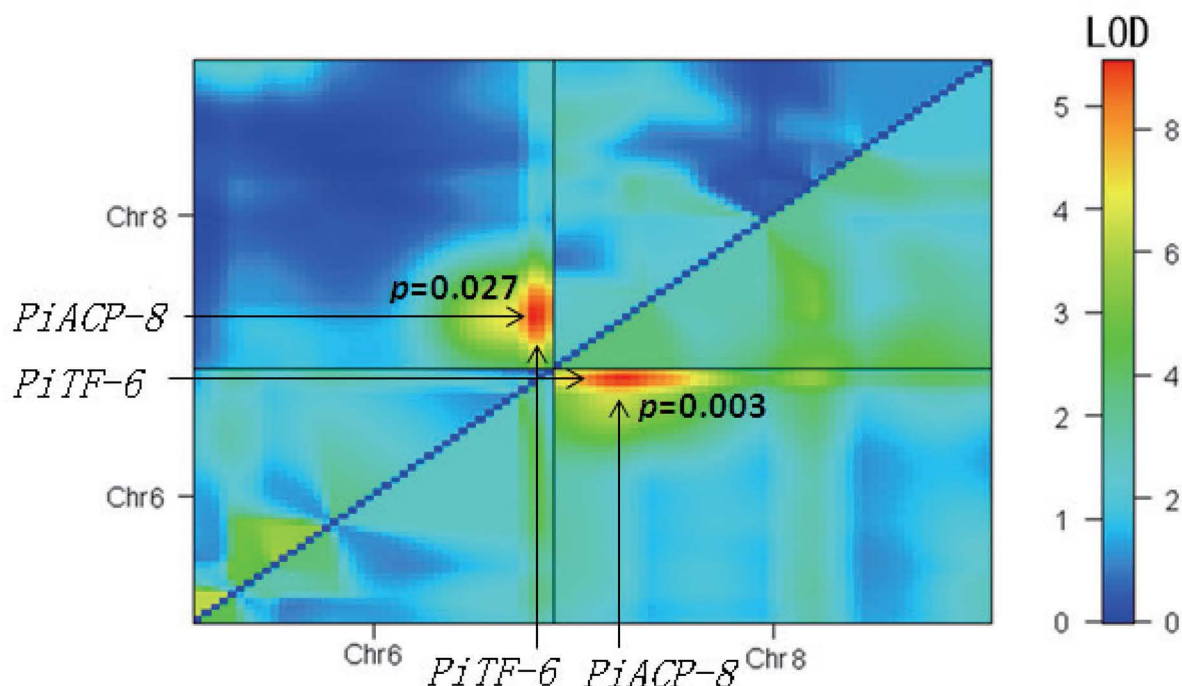


図 3123-9 最上位完全展開葉のリン含量に関する座間交互作用のカラーマップ

- 1) 横軸および縦軸に示す連鎖地図位置間における交互作用 QTL の LOD スコア分布図で、上三角は相互作用モデルのみ、下三角は各座単一の効果と相互作用を合計したフル QTL モデルの場合を示す（解析には R/qtl ver 2.15.1 の Two QTL scan を使用した）。
- 2) LOD スコアのピーク（カラーマップ中の赤色）の有意確率は図中の p で表し、それぞれ 1000 回の並べ替え検定より計算した。有意な LOD ピークは両モデルとも、2つの候補遺伝子 PiTF-6 および PiACP-8 同士の交互作用位置に検出された。

率を高めるための育種においてナトリウム吸収能力は有用な形質であると考えられた。

ナトリウム吸収量の大きいコシヒカリと、ナトリウム吸収量の小さい IR64 の組み合わせにおいて、ナトリウム吸収遺伝子が 6 番染色体長腕末端に存在することが示されたが、これまでに絞り込んだ 120kb の領域内にはナトリウムトランスポーター遺伝子 *OsHKT2;1* が存在する。機能的にこの遺伝子が品種間差の原因である可能性が高いが、コシヒカリと IR64 では *OsHKT2;1* の予測アミノ酸配列に違いはない。*OsHKT2;1* の発現量は低カリウム条件で誘導され、発現量は IR64 に比べてコシヒカリで大きい。従って、*OsHKT2;1* 発現量の多寡が、ナトリウム吸収の品種間差に寄与すると考えて検討を進めている。

(イ) 低リン応答性遺伝子の絞り込みと候補遺伝子による機能確認およびコシヒカリへの集積

a qREP-6 の単離と候補遺伝子 PiTF-6 による相補性検定

qREP-6 のマップベース・クローニングでは、低

リン条件下で栽培した分離集団の最大根長の形質値に影響を及ぼすノイズの除去に時間がかかってしまった。具体的には約 500kb 長腕側に位置し恒常的に根のバイオマスを増加させる qRL6.1 (IPG0008 小原ら) のカサラス対立遺伝子は、低リンでの最大根長にも影響を及ぼすため、精密マッピングを困難にした。この状況の打開は、qRL6.1 遺伝子型がホモ接合体になった交雑後代の大規模マッピングによって可能になるため準備を進めているところである。一方で、マップベース・クローニングによって絞り込んだ領域内の発現遺伝子の解析結果から、低リン誘導性転写因子 PiTF-6 が検出できた。この遺伝子の過剰発現 (OX) および機能抑制 (OR) 組換えイネを用いた実験より、最大根長に対する相補性とリン含量に対する影響を明らかにすることができた。PiTF-6 は GARP ファミリーに属する転写因子で、リン酸トランスポーターの制御が報告されリン酸ホメオスタシス維持機能を持つと推察されるナズナの *PHR1* (Rubio et al. 2001) およびイネホモログである *OsPHR2* (Zhou et al. 2008) も同じ GARP ファ

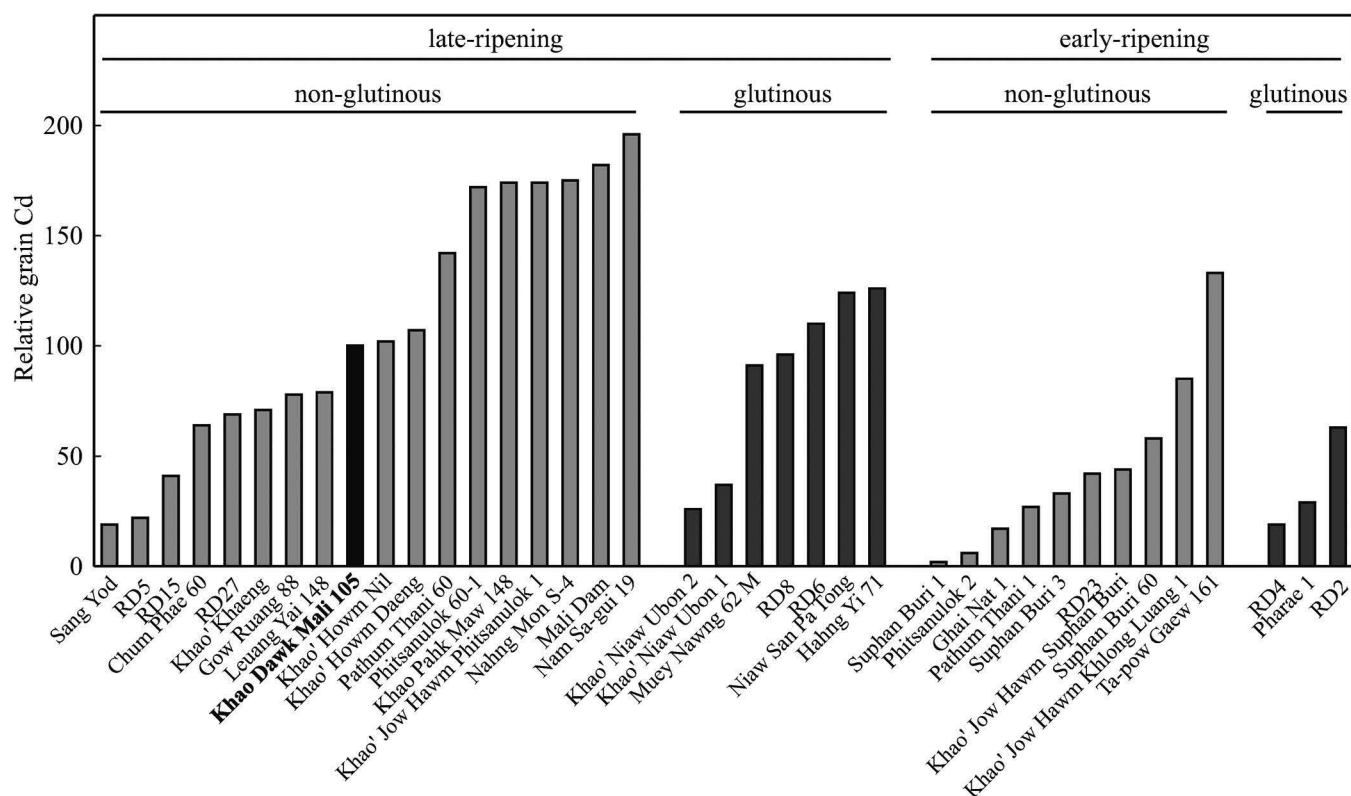


図 3123-10 タイ国品種の籾カドミウム含有率

- 1) 現地人気品種 KDM105 号の籾カドミウム含有率 (0.49 mg kg^{-1}) に対する相対値として示した。
- 2) 圃場栽培試験は 2009-2011 の三年間に渡って行った。
- 3) 鳥獣害によって十分な種子が得られなかった 4 品種についてはカドミウム含有率を測定していない。

ミリーである。*PHR1* や *OsPHR2* 自身はリン欠乏ストレスによって発現が誘導されず、低リン耐性育種に利用されていない。本研究で発見された *PiTF-6* は低リン誘導性を示すため、この転写因子の機能解明は、複数の低リン誘導性遺伝子発現を調節した耐性イネの開発に寄与するだろう。

b *qACP-8* のマッピングと候補遺伝子 *PiACP-8*
染色体断片置換系統群のスクリーニングおよび置換領域の分離集団を用いた QTL 解析結果より、染色体 8 に検出された *qACP-8* のカサラス対立遺伝子は、日本晴およびコシヒカリの遺伝背景の両方で効果を示すと考えられた。また、低リン誘導性の酸性ホスファターゼ遺伝子の探索結果より検出された *PiACP-8* は、*qACP-8* 領域内に座乗する有力な候補遺伝子であるといえた。更に *PiACP-8* の 5'UTR 上端に、CaMV エンハンサーを 4 縦列で持つアクチベーションタギング系統を用いた実験でも、低リン誘導性の下位葉葉身の酸性ホスファターゼ活性上昇への関与が確認され、最上位完全展開葉のリン含量

増加（下位葉から上位葉へのリン転流）の可能性も示唆された。

c *qREP-6* および *qACP-8* のコシヒカリへの集積

qREP-6 および *qACP-8* のカサラス染色体領域を置換断片に持つ SL218 と SL224 との交配 F_2 集団を用いた QTL 解析より、各形質に対する QTL の作用はそれぞれ独立であり、両者の効果はコシヒカリの遺伝的背景で集積できることが確かめられた。また、座間の相互作用では、通常の単一 QTL 解析では有意な領域が検出できなかった最上位完全展開葉のリン含量について、*qREP-6* の候補遺伝子 *PiTF-6* 近傍と *qACP-8* の候補遺伝子 *PiACP-8* 近傍との間に有意な相互作用が検出できた。このことは、*qREP-6* および *qACP-8* の集積によりコシヒカリのリン欠乏ストレス耐性の改善と交配用母本育成の可能性を示唆している。

(ウ) タイ国品種の穀実カドミウム含有率

本栽培試験では、タイ国近代品種 42 品種を現地

汚染圃場において栽培した。籾カドミウム含有率は品種によって異なっており、低カドミウム蓄積品種への作付け転換を進めることによって、現地生産者のカドミウム摂取リスクを低減できる可能性が示された。

一方で、同一の品種（KDM105号）内でも、籾カドミウム含有率は年度や圃場によって大きく異なっていた。このことは、穀実へのカドミウムの集積において、品種による違いだけではなく、土壌条件が大きく関与することを示唆している。これまでに、KDM105のポット栽培試験によって、登熟期に湛水状態を維持することで、籾のカドミウム含有率が低下することを示しており、水管理技術の向上と低カドミウム蓄積品種を組み合わせることが有効だと考えられる。

オ 今後の課題

（ア）カリウム施肥のいらぬイネの育種に向けて

コシヒカリとインディカ品種の品種組み合わせにおいて見いだされた6番染色体上の遺伝子に関してはファインマッピングを続けている。この領域内にはナトリウムトランスポーター遺伝子 *OsHKT2;1* が存在しており、候補遺伝子の一つとしてこの遺伝子についての解析もすすめている。

この遺伝子はインディカ品種のナトリウム吸収能力を高めていく上で有用であり、我々はファインマッピングと同時に、IR64にコシヒカリの持つ高ナトリウム吸収遺伝子を導入した準同質遺伝子系統の作出を進めている。

コシヒカリなどのジャポニカ品種のナトリウム吸収能力をさらに高めるためにはコシヒカリよりも多くナトリウムを吸収する品種を見だし、その遺伝子を導入していく必要がある。現在までに、約100品種のイネについて、低カリウム条件下でのナトリウム吸収能力を検討し、ベトナム在来イネの Khau Tan Chiem はコシヒカリよりも有意に高い地上部ナトリウム含有率を示すことを明らかにしている。今後さらに、この遺伝子についても検討していく予定である。

（イ）土壌固定リンの吸収能力に優れたイネの選抜と育種に向けて

a qREP-6の更なる絞り込みと候補遺伝子

PiTF-6の機能解析

qREP-6の更なる絞り込みについては、PiTF-6を標的とした近傍マーカー組換え個体を用いたファインマッピングを進めており、日本晴およびコシヒカリとカサラスとの品種間に見られるPiTF-6の遺伝子発現量の差を説明できる塩基多型の探索を行う必要がある。また、OX系統およびOR系統を用いた発現遺伝子解析により、特にリン欠乏条件において酸性ホスファターゼやリン酸トランスポーターなどのリン代謝に関わりうる複数の低リン応答遺伝子の発現量がOR系統よりもOX系統で有意に高くなることがわかっている。このことの分子生物学的な証拠を得るために、今後PiTF-6の転写因子機能の解析を行う必要がある。PiTF-6組換えタンパクの発現系を得たので、これを用いて低リン応答遺伝子の発現調節への関与について調査を進める予定である。

b qACP-8の精密マッピングとリン再利用への影響評価

現在、SL224 × コシヒカリのF₃集団を用いた大規模な精密マッピングを進めており、現時点での候補遺伝子PiACP-8の関与の有無を調べる予定である。また、PiACP-8のアクチベーションにより下位葉葉身酸性ホスファターゼの上昇は確認できたため、この形質がリンの再利用に与える影響について、有機態リンの葉面塗布実験などを現在行っている。またPiACP-8はイネの根でも強く発現しているため、土壌中の有機態リン獲得への関与についても調査を進める予定である。

c 低リン耐性コシヒカリの作出に向けて

SL224 × SL218の自殖後代を用いた準同質遺伝子系統化を進めることで、qREP-6およびqACP-8の効果についてのより緻密な実験ができるとともに、低リン耐性育種母本の作出を可能にすることができるだろう。またF₂世代で検出された座間相互作用については、後代検定による再現性確認を行う必要性と、土耕試験による評価が課題といえる。座間相互作用の分子生物学的な証明はPiTF-6の機能解析で用いる組換えタンパクを用いた実験により明らかにできる可能性がある。

（ウ）タイ国カドミウム汚染地帯での生産者のカドミウム摂取リスク低減に向けて

現地生産者に低カドミウム蓄積品種への作付け転

換をすすめていくうえでは、品種のもつ他の農業上の特性、日長感受性であることや鳥獣害の少なさ、食味などが重要となる。選抜された品種の中で RD15 号は KDM105 号よりも穀実カドミウム含有率が 70% 低い。この品種は KDM105 号のガンマ線照射ミュータントに由来し、比較的現地生産者に受け入れられやすい品種だと考えられる。そこで、今後 RD15 を現地で大規模に作付けし、そのパフォーマンスを評価していく予定である。

また、RD15 号は KDM105 号に比べて出穂が 10 日早く、このことは、鳥獣害リスクをもたらす。RD15 号と KDM105 号の交配によって、カドミウム含有率が低く、出穂期は KDM105 号並である系統を選抜していくことも計画している。

力 要 約

(ア) ナトリウム吸収能力に優れたイネの選抜とナトリウム吸収遺伝子の同定

ナトリウムイオンにはカリウムの供給が制限された環境下での作物の生育を改善する効果がある。土壌溶液中にはナトリウムイオンはカリウムイオンよりも多く含まれているので、イネが土壌からナトリウムを多く吸収できるようになれば、ナトリウムイオンをカリウムの代替イオンとして利用することができ、カリウム施肥量の低減につながる。

本研究では、低カリウム環境でのイネのナトリウム吸収能力に大きな品種間差があり、コシヒカリなどのジャポニカ品種ではナトリウム吸収量が大きく、IR64 などのインディカ品種では小さいことを見いだした。さらに低カリウム環境でのナトリウム吸収品種間差の原因遺伝子について検討を行い、6 番染色体長腕末端に原因遺伝子が存在することを示した。

(イ) 土壌固定リンの吸収能力に優れたイネの選抜と育種

a 低リンで誘導される根の伸長を制御する遺伝子 qREP-6 の絞り込みと候補遺伝子 PiTF-6 組換えイネによる機能確認

低リンで誘導される根の伸長形質は土壌からのリン吸収能力向上に寄与しうる形質であり、これを制御する QTL として検出された qREP-6 について、精密マッピングと発現遺伝子解析による候補遺伝子の絞り込みを行った。その結果により候補遺伝子と

して選抜された低リン誘導性の転写因子 PiTF-6 について、過剰発現系統および機能抑制系統を用いた水耕栽培実験を行ったところ、根伸長形質に対する相補性が確認できた。

b 低リン誘導性の下位葉葉身酸性ホスファターゼ活性を制御する qACP-8 のマッピングと発現遺伝子解析および T-DNA タギング系統による候補遺伝子 PiACP-8 の機能確認

低リンによって誘導される下位葉葉身酸性ホスファターゼ活性は、イネ地上部のリン利用効率向上に寄与しうる形質であり、この形質を制御する QTL として検出された qACP-8 について、染色体断片置換系統群を利用したゲノム領域の確認と発現遺伝子解析による候補遺伝子の絞り込みを行った。候補遺伝子 PiACP-8 のアクチベーションタギング系統を用いた水耕栽培実験の結果より、低リン誘導性の下位葉葉身酸性ホスファターゼ活性への関与を示すことができた。

c qREP-6 および qACP-8 のコシヒカリへの集積

土壌からのリン吸収能力向上および植物体内のリン利用効率向上に寄与しうる QTL、*qREP-6* および *qACP-8* のカサラス対立遺伝子のコシヒカリへの集積効果を検証するため、それぞれを染色体断片として持つ置換系統同士の交配 F₂ 集団を用いた低リン水耕栽培による形質評価と QTL 解析を行った。その結果、*qREP-6* および *qACP-8* の効果は集積できることが分かり、一方で葉身リン含量形質については両者の有意な交互作用が検出された。

(ウ) 低カドミウム蓄積タイ国イネ品種の選抜

タイ国北西部のターク県メーソット郡の亜鉛鉱山下流に広がるカドミウム汚染水田において、タイ国品種 42 品種の栽培試験を 3 年間行い、穀実にカドミウムを蓄積しにくい 5 品種を選抜した。さらにこれら 5 品種について、8 カ所の圃場で栽培し穀実カドミウム含有率が現地人気品種の KDM105 号に比べて低いことを確認した。

キ 引用文献

- 1) Shimizu et al (2004). Phosphorus deficiency-induced root elongation and its QTL in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics. 109 : 1361-1368.

- 2) Shimizu et al. (2008a). Genome and transcriptome analyses for acid tolerance in rice : phosphorous deficiency and low pH stress. In : Proceedings of the Final International Meeting for 21th Century Center for Excellence (COE) Program, "Development of New Bioremediation Systems of Acid Sulfate Soil for Agriculture and Forestry" . S. Sasaki (eds), SHOUKADOH Book Sellers.25-28.
- 3) Jeon et al. (2000). T-DNA inserational mutagenesis for functional genomics in rice. Plant Journal. 22 : 561-570.
- 4) Miyamoto et al. (2013). Identification of quantitative trait loci associated with shoot sodium accumulation under low potassium conditions in rice plants. Soil Science and Plant Nutrition. 58 : 728-736.
- 5) Shimizu et al. (2008b). Genetic analysis of root elongation induced by phosphorus deficiency in rice (*Oryza sativa* L.) : fine QTL mapping and multivariate analysis of related traits. Theoretical and Applied Genetics. 117 : 987-996.
- 6) Rubio et al. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. Genes & Development. 15 : 2122-2133.
- 7) Sriprachote et al (2012a). Current situation of cadmium-polluted paddy soil, rice and soybean in the Mae Sot District, Tak Province, Thailand. Soil Science and Plant Nutrition. 58 : 349-359.
- 8) Sriprachote et al (2012b). Evaluation of Thai rice cultivars with low-grain cadmium. Soil Science and Plant Nutrition. 58 : 568-572.
- 9) Zhou et al. (2008). OsPHR2 Is Involved in Phosphate-Starvation Signaling and Excessive Phosphate Accumulation in Shoots of Plants. Plant Physiology. 146 : 1673-1686.

研究担当者（間藤徹*、清水顕史、落合久美子）

(4) 低アンモニウムイオン吸収利用能力に関わる遺伝子の単離と窒素利用機構の解析 (IPG0008)

ア 研究目的

イネの個体生育は、主に吸収した窒素量によって制限されている。また、イネは施肥された窒素量に応じて、その表現型を個体レベルで変えることによって、効率的に拡大生産を行っていることが知られている。そのために、特に低アンモニウム濃度域における、窒素利用及び生産性の向上には、根系の改良によって、窒素の吸収を促進させることが有効な方法の一つである。これまでに、根系の改良候補遺伝子として、低窒素において根を伸長させる遺伝子 *qRL6.1* を単離してきた。本研究においては、窒素利用及び生産性への *qRL6.1* の機能を明らかにするとともに、低アンモニウム濃度域において窒素の利用を制御している遺伝子群の機能解析を行う。また、窒素の初期同化に関わる遺伝子を欠損した突然変異体を用いて、炭素やエネルギー代謝の連携機構の解明を目的とする。これらの研究から、低アンモニウム濃度域においても、高い窒素利用及び乾物生産イネ作出の基盤を構築する。

イ 研究方法

(ア) 低窒素において根を伸長させる遺伝子の単離

a コシヒカリとカサラスの染色体断片置換系統である SL-208 とコシヒカリの交配自殖後代から、組み換え系統群、準同質遺伝子系統を選抜した。これを用いて、窒素利用に関する生理学的解析を行った。

b 台中 65 号と *Oryza glaberrima* IRGC 104038 に由来する戻し交配自殖系統群、染色体断片挿入系統群と台中 65 号との交配自殖後代 F₂ 系統群を養成した。

c イネは屋外型人工気象室で、0、5、50、500 μ M NH₄Cl を与え、8 日間栽培した。

(イ) 窒素と炭素やエネルギー代謝の連携機構の解明

a Tos17 挿入による遺伝子破壊株のスクリーニングを以下の遺伝子について行った。イネサイトゾル型グルタミン合成酵素 1;1 (*OsGSI;1*)、イネサイトゾル型グルタミン合成酵素 1;2 (*OsGSI;2*)、イ

ネサイトゾル型グルタミン合成酵素 *I;3* (*OsGS1;3*)、イネ NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 *I* (*OsNADH-GOGAT1*) およびイネ NADH 依存性グルタミン酸合成酵素 *2* (*OsNADH-GOGAT2*)。

b 遺伝子破壊株を用いた、メタボローム解析を行った。

ウ 研究結果

(ア) 低窒素において根を伸長させる遺伝子の単離

低窒素濃度において、根の伸長に関わる *qRL6.1* の根の伸長における効果を広い窒素濃度域で調査した。その結果、*qRL6.1* の領域がカサラスの染色体に置換された準同質遺伝子系統は、コシヒカリに比較して、5、50、500 μM アンモニウム濃度下での根長が13.5-21.1%有意に長いことが判明した(Obara et al.¹⁾)。また、*qRL6.1* を高精度にマッピングしたところ、第6染色体の長腕側 336 kb の領域に存在することが明らかとなった (Obara et al.¹⁾)。

台中 65 号と *Oryza glaberrima* IRGC 104038 に由来する戻し交配自殖系統を用いて、低から十分なアンモニウム濃度域における、根長を支配している遺伝子座 (QTL) をマッピングした (Obara et al.²⁾)。5 μM のアンモニウム濃度で栽培された台中 65 号と IRGC 104038 の根長の間には、有意な差は認められなかった。台中 65 号においては、5 μM のアンモニウム濃度における根長に比較して、50 μM アンモニウム濃度では 12%、500 μM 濃度では 30% 低く、外来のアンモニウム濃度の上昇による、根長の有意な低下が認められた。一方、IRGC 104038 においては、5 μM のアンモニウム濃度における根長に比較して、50 μM アンモニウム濃度では 2% 高く、500 μM アンモニウム濃度では 1% 低く、外来のアンモニウム濃度の上昇による、根長の低下が認められなかった。交配自殖系統群を用いて、それぞれのアンモニウム濃度における、根長を支配している QTL 解析を行った所、5 μM アンモニウム濃度において 4QTL、50、500 μM アンモニウム濃度においては、それぞれ 5QTL が検出された。そのうち、3QTL に関しては、低いアンモニウム濃度において効果があることが判明した。さらに、*qRL1.1* を詳細にマッピングしたところ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子 2 が *qRL1.1* の原因遺伝

子であることが推察された。

(イ) 窒素と炭素やエネルギー代謝の連携機構の解明

OsNADH-GOGAT1 欠損変異体を単離し、圃場栽培および生理解析を行った (Tamura et al.³⁾)。 *OsNADH-GOGAT1* 欠損変異体を圃場で栽培したところ、有効分げつ数や穂数が顕著に減少していた。また、幼植物期では、欠損変異体の根におけるアンモニウムイオンの初期同化の抑制が認められた。植物ホルモンの網羅的解析を行ったところ、欠損変異体の幼植物の根では、オーキシン関連分子のみが有意に増減していることが判明した。この欠損変異体は、他の *Fd-GOGAT* や *NADH-GOGAT2* の遺伝子は正常に発現していることも判明した。

OsNADH-GOGAT2 欠損変異体を単離し、圃場栽培および生理解析を行った (Tamura et al.⁴⁾)。 *OsNADH-GOGAT2* 欠損変異体の収量構成要素について野生型と比較したところ、変異体の穂数は野生型と有意な差が見られないものの、欠損変異体の一つの穂につく小穂の数は、野生型と比較して顕著に減少することが判明した。プロモーター解析などの発現解析から、*NADH-GOGAT2* は成熟ないし老化した葉の維管束に多く分布することが判明した。

OsGS1;2 欠損変異体を単離し、圃場栽培および生理解析を行った (Funayama et al.⁵⁾)。変異体は、*OsNADH-GOGAT1* 欠損変異体と同様に有効分げつ数や穂数が顕著に減少していた。幼植物の根および導管液ではグルタミンをはじめとするアミノ酸の減少と遊離アンモニウムイオンの増加が認められ、これらの表現型は *GS1:2* プロモーター：*GS1;2cDNA* の導入で完全に相補された。

OsGS1;1 欠損変異体を単離し、メタボローム解析を行った (Kusano et al.⁶⁾)。欠損変異体にアンモニウムを供与し、根の代謝産物を比較した。その結果、変異体は、糖、アミノ酸およびクエン酸回路の代謝物が大きく変化すると同時に、二次代謝化合物が蓄積していた。相関解析の結果、変異体の根はトリプタミンと他の一次代謝との間に新規のネットワークが形成されたことが明らかとなった。

エ 考 察

(ア) 低窒素において根を伸長させる遺伝子の単離

低窒素において根を伸長させる遺伝子をインド型の在来品種カサラスから単離した。また、*Oryza glaberrima* の対立遺伝子が低窒素において根を伸長させる遺伝子領域を見出した。緑の革命以来、イネ育種は多くの窒素肥料を与えて、高収量を得るという戦略がとられてきた。しかしながら、施肥された窒素のうち約30%はイネに吸収されるものの、残りの70%は環境へと放出されている。このことから、施肥された窒素の肥料の吸収効率が高いイネの開発が望まれている。単離したカサラス *qRL6.1* 遺伝子は低から十分な濃度の窒素濃度域において、窒素の吸収が高いことが認められており、この遺伝子は、窒素の吸収効率が高いイネの開発に寄与することが大いに期待される。イネが栽培されている土壌は多様である。その多様な土壌条件において、カサラス *qRL6.1* 遺伝子が窒素の吸収に寄与するか否かを検討することが重要である。また、低窒素において根を伸長させる遺伝子を新たに単離すること、*qRL6.1* 遺伝子の機能変換をもたらすアレルの探索も重要と考えられる。これらを用いて、土壌に対応したテーラーメイドイネ育種へと発展させる必要がある。

(イ) 窒素と炭素やエネルギー代謝の連携機構の解明

イネの存在している2種類のNADH-GOGATは、それぞれに異なる機能を分担していることが、かなり明らかとなった。GS1;2とNADH-GOGAT1は根におけるアンモニウムの初期同化で、またGS1;1とNADH-GOGAT2は老化組織における窒素転流の送りだしで、それぞれ機能を担っていることが強く示唆された。また、OsGS1;1欠損変異体の代謝産物を詳細に解析したことで、OsGS1;1は、アンモニウムを窒素源として生育するイネの代謝において、広範な役割を有することが強く示唆された。

オ 今後の課題

(ア) 低窒素において根を伸長させる遺伝子の単離

品種間に存在する自然変異に基づいて、低窒素において根を伸長させる遺伝子を新たに単離するとともに、*qRL6.1* 遺伝子の機能変換をもたらすアレルの探索を進める。同時に、人為的に誘発された突然変異も利用し、新たな遺伝子の単離とアレルの探索を進める。

(イ) 窒素と炭素やエネルギー代謝の連携機構の解明

OsGS1;1での研究のように、機能欠損変異体の代謝産物などを詳細に解析し、窒素と炭素やエネルギー代謝の連携機構の解明を進める。

カ 要 約

(ア) 低窒素において根を伸長させる遺伝子の単離

低窒素において根を伸長させるカサラスの*qRL6.1* 遺伝子が、低アンモニウムイオンの吸収を促進することを明らかにした。また、*Oryza glaberrima* の対立遺伝子が低窒素において根を伸長させる遺伝子領域を見出した。

(イ) 窒素と炭素やエネルギー代謝の連携機構の解明

遺伝子破壊変異体を用いた解析から、2つのNADH—GOGATの窒素代謝における機能分担をほぼ明らかにできた。また、OsGS1;1を介した、根での窒素と糖、アミノ酸およびクエン酸回路の連携ネットワークを見出した。

キ 引用文献

- 1) Obara, M., Tamura, W., Ebitani, T., Yano, M., Sato, T. and Yamaya, T. (2010). Fine-mapping of *qRL6.1*, a major QTL for root length of rice seedlings grown under a wide range of NH_4^+ concentration in hydroponic conditions, Theoretical and Applied Genetics. 121 : 535-547.
- 2) Obara, M., Takeda, T., Hayakawa, T., Yamaya, T. (2011). Mapping quantitative trait loci controlling root length in rice seedlings grown with low or sufficient NH_4^+ supply using backcross recombinant lines derived from a cross between *Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steud. Soil Science & Plant Nutrition. 57 : 80-92.
- 3) Tamura, W., Hidaka, Y., Tabuchi, M., Kojima, S., Hayakawa, T., Sato, T., Obara, M., Kojima, M., Sakakibara, H. and Yamaya, T. (2010). Reverse genetics approach to characterize a function of NADH-glutamate synthase1 in rice plants. Amino Acids. 39 : 1003-1012.

- 4) Tamura, W., Kojima, S., Toyokawa, A., Watanabe, H., Tabuchi-Kobayashi, M., Hayakawa, T., and Yamaya, T. (2011) Disruption of a novel *NADH-glutamate synthase2* gene caused marked reduction in spikelet number of rice. *Front. Plant Sci.* 2 : 57.
- 5) Funayama, K., Kojima, S., Tabuchi-Kobayashi, M., Sawa, Y., Nakayama, Y., Hayakawa, T. and Yamaya, T. (2013). Cytosolic glutamine synthetase1;2 is responsible for the primary assimilation of ammonium in rice roots. *Plant Cell Physiol.* 54 : 934-943.
- 6) Kusano, M., Tabuchi, M., Fukushima, A., Funayama, K., Diaz, C., Kobayashi, M., Hayashi, N., Tsuchiya N. Y., Takahashi, H., Kamata, A., Yamaya, T. and Saito, K. (2011). Metabolomics data reveal a crucial role of cytosolic glutamine synthetase 1;1 in coordinating metabolic balance in rice. *Plant J.* 66 : 456-466.

研究担当者（山谷知行、小原実広*、小島創一）

（５） 穂発芽耐性遺伝子の単離と機能解析 (IPG0010)

ア 研究目的

植物種子は発芽能力を獲得した後、温度や水、光など適当な環境が得られるまで、自らの発芽を抑制するとともに乾燥などの環境ストレスに対する耐性を獲得して休眠状態に移行する（種子休眠）。種子休眠は、作物が栽培化されるにしたがってその程度が小さくなり、最近の品種・系統では、齊一に発芽させるために種子休眠性が弱くなったものが多い。一方、種子休眠性が弱くなると、収穫前の種子でも、発芽に好ましい温度や水分が与えられることにより、収穫前の発芽、穂発芽が発生する。穂発芽の発生により玄米品質の低下が引き起こされることから、穂発芽耐性の付与は育種上重要な目標となっている。また、同じイネ科に属し、本来乾燥した気候を好むムギ類にとって、穂発芽はさらに重要な課題となっている。本課題においては穂発芽性に関わる遺伝子を単離・機能解析することにより、種子休眠メカニズムを研究するとともに、育種への利用を図る。

イ 研究方法

（ア）穂発芽耐性遺伝子 *Sdr4* の単離と機能解析

日本晴／Kasalat 戻し交雑自殖系統群 (BILs) を用いた解析により見出された穂発芽耐性遺伝子 *Sdr4* の候補領域を遺伝地図法により絞り込む。候補領域の配列を解読し、候補遺伝子を絞り込み、相補性試験、発現抑制などにより候補遺伝子が *Sdr4* であることを示す。遺伝子が特定された後に発現解析や塩基配列の品種間差違などを解析する事により、*Sdr4* の機能を明らかにする。

（イ）穂発芽耐性遺伝子 *Sdr7* の単離と機能解析

ササニシキ／ハバタキ戻し交雑自殖系統群 (BILs) および染色体断片置換系統 (CSSLs) を用いた解析により見出された穂発芽耐性遺伝子 *Sdr7* の候補領域を遺伝地図法によりしぼりこむ。候補領域の配列を解読し、候補遺伝子を絞り込み、相補性試験、発現抑制などにより候補遺伝子が *Sdr7* であることを示す。

（ウ）新規穂発芽耐性遺伝子の検出とマッピング

コシヒカリ／Nona Bokra 染色体断片置換系統群 (CSSLs) を用いた解析により見出された穂発芽耐性遺伝子候補をマッピングし、その存在を証明する。

ウ 研究結果

（ア）穂発芽耐性遺伝子 *Sdr4* の単離と機能解析

インド型品種 Kasalath は強い穂発芽耐性を示す。穂発芽耐性遺伝子 *Sdr4* は第7染色体長腕に座乗する（図3125-1）。遺伝地図法により *Sdr4* 候補遺伝子が絞り込まれ、*Os07g0585700* を含む断片を穂発芽耐性の弱い日本晴に導入した結果、発芽を抑制することが出来た（図3125-2）。インド型品種は発芽抑制効果の高い Kasalath 型（以降 *Sdr4-k*）と効果の低い日本晴型（以降 *Sdr4-n*）をもつ品種に分かれるが、日本稲はすべて *Sdr4-n* を持っていた。野生イネの *Sdr4* の塩基配列を解析し、*Sdr4-k* は存在を認められたが、*Sdr4-n* を見いだすことができなかった。（引用文献1）

（イ）穂発芽耐性遺伝子 *Sdr7* の単離と機能解析

ササニシキ／ハバタキの CSSL 系統を用いた遺伝解析により見出された4つの遺伝子のうち、3つがF2解析によって確認された。その内の一つは第3染色体短腕、*Sdr1* と見られ、第1染色体から見出

された残る二つは新規の遺伝子である可能性が高い。第1染色体に座乗するより作用の大きい遺伝子を *Sdr7* と命名し、そのマッピングに集中することとした。高精度連鎖解析 (n = 4600) によるマッピングに取り組んだところ、日本晴ゲノム配列にして 24kb まで候補領域を狭めることに成功した。この領域に相当する BAC のクローン化と配列決定の結果、ハバタキではトランスポゾンの挿入などにより 46 kb であることが明らかとなった。ハバタキのみに存在する領域にシロイヌナズナから単離された休眠性を制御する遺伝子である *Deley of Germination 1 (DOG1)* に類似した配列が見出された (図 3125-3 左)。この *DOG1-like* をササニシキに導入する、あるいは、cDNA をユビキチン (Ubi) プロモーターで過剰発現することにより、発芽を抑制することが示された。これにより、*Sdr7* が *DOG1-like* であることが示された (図 3125-3 中、右)。

(ウ) 新規穂発芽耐性遺伝子の検出とマッピング
コシヒカリ / Nona Bokra の CSSLs の解析から、第1染色体短腕と第6染色体に作用の大きい QTL が検出され、F2 世代を用いた遺伝解析によりその

存在が確認された。これら遺伝子を *Sdr6*、*Sdr9*、*Sdr10* と命名し、単離に取り組んでいる。また、CSSL を用いた生理実験から、*Sdr6* は ABA の蓄積レベル、そして、生合成の鍵酵素である *NCED3* の発現に差が見られたこと、*Sdr9* と *Sdr10* を持つ CSSL は ABA に対する感受性が高いことを明らかにした (引用文献 2)。

工 考 察

(ア) 穂発芽耐性遺伝子 *Sdr4* の単離と機能解析

日本晴型アリルである *Sdr4-n* は、二本鎖切断と修復の際のスリップによる 1 回の突然変異で生じたと推測された。イネの栽培地域と *Sdr4* の塩基配列を比較すると、*Sdr4-n* を持つ品種の割合が東に行くほど高く、周辺配列の情報も踏まえると *Sdr4-n* がその良好な発芽性からインド型品種に伝播したと推察された (図 3125-4)

(イ) 穂発芽耐性遺伝子 *Sdr7* の単離と機能解析

シロイヌナズナでは種子休眠性を司るとされる *DOG1* の同祖体で有ったことから、穂発芽耐性と休眠性を、あるいは、単子葉植物であるイネと双子葉

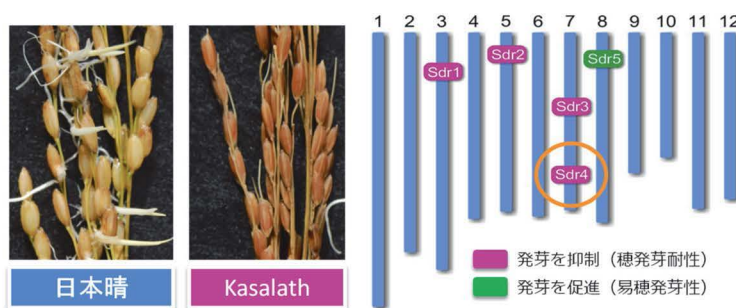


図 3125-1 穂発芽耐性を示す Kasalath と穂発芽耐性込み耐性遺伝子の座乗する位置



図 3125-2 *Sdr4* の候補領域の絞り込みと相補性試験

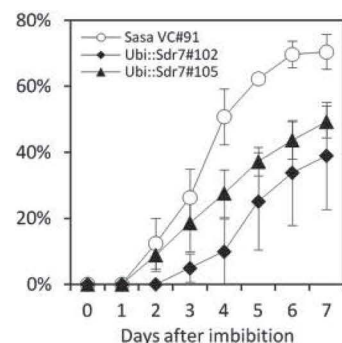
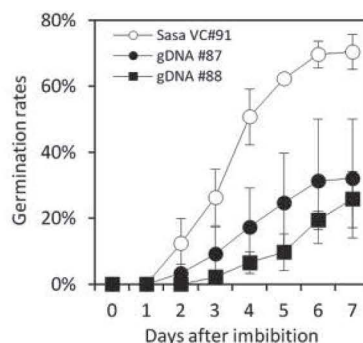
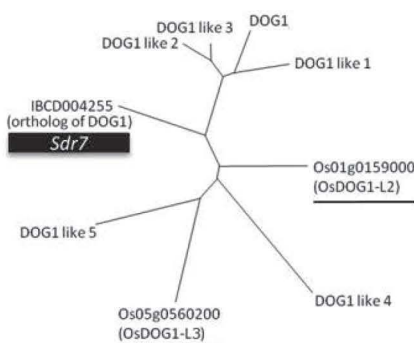


図 3125-3 *Sdr7* とシロイヌナズナ *DOG1* の比較、および、相補試験と過剰発現による解析

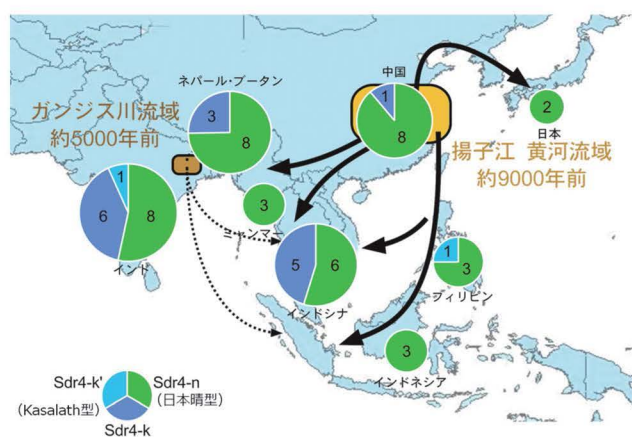


図 3125-4 イネの栽培化のモデルと栽培イネにおける *Sdr4* の遺伝子型の地理的分布

植物であるシロイヌナズナの比較を行うことが可能となり、植物の穂発芽耐性／種子休眠性の理解が深まると考えられる。

(ウ) 新規穂発芽耐性遺伝子の検出とマッピング

穂発芽耐性遺伝子 *Sdr4* や *Sdr7* は種子の発芽を抑制するアブシジン酸との関連は見出されなかったが、*Sdr6* や *Sdr9* と *Sdr10* をもつ染色体断片置換系統がそれぞれ、ABA 合成量、ABA 感受性に差が見られたことから、新たな切り口からイネの穂発芽耐性の理解につながるものが期待される。

オ 今後の課題

(ア) 穂発芽耐性遺伝子 *Sdr4* の単離と機能解析

Sdr4 は機能未知のタンパク質をコードしており、今回分子機構に関する知見が得られなかった。今後は相互作用因子の特定などにより、*Sdr4* が係わる穂発芽耐性ネットワークの解明に取り組む必要が有るだろう。比較的穂発芽耐性の強いコシヒカリ（引用文献3）を背景とした準同質遺伝子系統 NIL[*Sdr4*] では、さらに穂発芽耐性が増大したことから、さまざまな品種への穂発芽耐性の付与が期待される（図 3125-5）。育種への利用を促進するために、このような成果を広く提供する事が必要であろう。また、穂発芽耐性がより重要なコムギへの利用が期待されることから、*Sdr4* のコムギ同祖体の解析に取り組む必要が有る。

(イ) 穂発芽耐性遺伝子 *Sdr7* の単離と機能解析

Sdr7 と *Sdr4* の相互作用を調べることにより、イネ穂発芽耐性の機構の理解が進むと考えられることから、これに取り組む必要が有る。また、シロイヌ



図 3125-5 コシヒカリ NIL [*Sdr4*] のグラフ遺伝子型と穂発芽耐性

ナズナ DOG1 タンパク質の分解が種子休眠からの覚醒であるとする報告があることから、*Sdr7* に関してもタンパク質の分析が必要であろう。穂発芽耐性と種子休眠性の接点と成る因子であることから、これまで明確ではなかった両者の関係が明らかになるものと期待される。

(ウ) 新規穂発芽耐性遺伝子の検出とマッピング

イネ *Sdr6*、*Sdr9*、*Sdr10* 等の単離に取り組み、イネ穂発芽耐性ネットワークの理解が進むものと期待される。

力 要 約

(ア) 穂発芽耐性遺伝子 *Sdr4* の単離と機能解析

遺伝地図法によりインド稲である Kasalath に由来する穂発芽耐性遺伝子 *Sdr4* を単離した。様々な品種の *Sdr4* の遺伝子型を調べた結果、Kasalath 型を持つ品種は穂発芽耐性が強く、イネの中でも重要な役割を果たしていることが示された。

(イ) 穂発芽耐性遺伝子 *Sdr7* の単離と機能解析

遺伝地図法によりインド稲であるハバタキに由来する穂発芽耐性遺伝子 *Sdr7* を単離した。*Sdr7* はシロイヌナズナの休眠性を制御する *Deley of Germination 1 (DOG1)* 同祖体で有り、シロイヌナズナとイネで共通の仕組みが存在することが示された。

(ウ) 新規穂発芽耐性遺伝子の検出とマッピング

インド稲である Nona Bokra から3つの穂発芽耐性遺伝子、*Sdr6*、*Sdr9*、*Sdr10* の検出と確認に成功した。*Sdr6* をもつ染色体断片置換系統はアブシジン酸 (ABA) の蓄積レベルが高く、残る2つをも

つ染色体断片置換系統は ABA に対して高感受性を示した。

キ 引用文献

- 1) Sugimoto K, Takeuchi Y, Ebana K, Miyao A, Hirochika H, Naho Hara N, Ishiyama K, Kobayashi M, Ban Y, Hattori T, Yano M (2010). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107 (13) : 5792-5797.
- 2) Marzougui S, Sugimoto K, Yamanouchi U, Shimono M, Hoshino T, Hori K, Kobayashi M, Ishiyama K, Yano M. (2012). Mapping and characterization of seed dormancy QTLs using chromosome segment substitution lines in rice. *Theor Appl Genet*. 124 : 893-902.
- 3) Hori K, Sugimoto K, Nonoue Y, Ono N, Matsubara K, Yamanouchi U, Abe A, Takeuchi Y, Yano M (2010). Detection of quantitative trait loci controlling pre-harvest sprouting resistance by using backcrossed populations of japonica rice cultivars *Theoretical and Applied Genetics*. 120 : 1547-1557.

研究担当者（杉本和彦*、山内歌子、矢野昌裕）

(6) イネの耐湿性に寄与する遺伝子の同定と機能解析 (IPG0012)

ア 研究目的

近年、我が国においては、減反政策の推進によって生じた休耕田や耕作放棄田を有効利用するために、水田を畑へ転用することが推奨されている。しかし、本来水田として利用していた圃場は排水性が低いと、転換作物として栽培の拡大が見込まれるコムギ、オオムギ、ダイズなどの湿害がしばしば問題になる。畑作物の耐湿性はいずれも低いというのに、育種に利用できる耐湿性の高い遺伝資源がないために耐湿性品種の作出は困難な状況にある。

畑作物が過湿環境で障害をうける最大の原因は、根端に酸素が効率よく供給されないために根の活力が落ちることである。一般的に、コムギなどの畑作物は、イネと同様に根に通気組織を形成することができるが、酸素が通気組織を介して根端へ移動する過程で、その大部分が通気組織をとり囲む表皮・外皮から土壌へ漏出してしまふ（この酸素漏出は

Radial Oxygen Loss (ROL) と呼ばれる）。その結果、成長点のある根端部へ供給される酸素量が極端に減少するため、根の伸長が停止し、障害が生じる。一方、耐湿性の高いイネは、根の基部の通気組織の外側に、過湿環境に誘導的に ROL バリアを形成することによって、根端まで効率よく酸素を供給し、過湿土壌で根を伸長させることができる。このように植物の耐湿性には根端への酸素運搬が必須であるが、これには通気組織の形成だけでは十分でなく、ROL バリアを形成して根端まで効率的に酸素を供給することが重要である。

本研究では、円筒型酸素電極計を用いた ROL 測定法や Laser Microdissection (LM) 法などを用いて、ROL バリア形成に関わる遺伝子を同定し、イネの耐湿性獲得のメカニズムを明らかにする。さらに ROL バリア形成の制御遺伝子をコムギに形質転換して、コムギに ROL バリアが形成させるかどうかを検証することを目的とする。

イ 研究方法

(ア) Laser Microdissection (LM) - マイクロアレイ法による ROL バリア形成に関わる候補遺伝子の同定

ROL バリアの形成過程において根の外皮付近の組織特異的に発現する遺伝子を同定するため、以下の実験を実施した。数種の ROL バリアの誘導される条件と誘導されない条件で生育させたイネの根を用いて、ROL バリアが形成される根の外皮付近の組織のみを LM 法で単離した。それぞれの組織から RNA を抽出後、イネ 44K オリゴ DNA マイクロアレイスライド (Agilent Technologies) を用いて網羅的な発現解析を行った。

(イ) ROL バリア形成過程におけるイネ転写因子遺伝子とスベリン生合成関連遺伝子の発現解析とスベリンの蓄積の確認

LM- マイクロアレイ解析によって、ROL バリア形成過程で発現誘導するイネ転写因子遺伝子として複数の候補遺伝子を同定した。野生型 (品種 日本晴) を用い、これまでに見出した ROL バリア形成過程で発現誘導する候補遺伝子について、嫌気条件のイネの根における詳細な発現と ROL バリアの形成のパターンを比較することで、候補遺伝子の ROL バリアへの関与を検証した。さらに、ROL バリアの

形成過程において根の外皮周辺組織で発現が誘導されることの確認されたスベリン生合成関連遺伝子の発現についても ROL バリア形成パターンとの比較を行った。

(ウ) 外皮におけるスベリン沈着量が低下した変異体を用いた ROL バリア形成能の評価

円筒型酸素電極計を用いて、*OsABCG5* 遺伝子内に点突然変異が起きた *reduced culm number-1* (*rcn1*) 変異体¹⁾と野生型(品種しおかり)の根からの酸素漏出量(ROL 量)を測定した。また、この変異体の根におけるスベリンの含量および蓄積パターンを調査した。

rcn1 変異体と野生型の根を、periodic acid とシッフ試薬を用いた細胞外輸送能に依存する染色法²⁾で観察して、外皮へのスベリンの蓄積が水溶性物質に対するアポプラストバリアとして機能するかどうかを検証した。さらに、透過型電子顕微鏡を用いて、野生型と *rcn1* 変異体の外皮の細胞の細胞壁周辺の構造(スベリンの蓄積パターン)に変化があるかどうかを観察した。

(エ) *OsNAC34* 過剰発現イネ系統の ROL バリア形成能の評価とスベリン蓄積の観察

ROL バリア形成過程で発現誘導するイネ転写因子遺伝子として単離された候補遺伝子が、ROL バリアの形成関連遺伝子として機能しているかどうかを判断するために、新農業展開ゲノムプロジェクト「人為的変異を利用したイネ実験系統群の作出(AMR)」の研究課題「転写因子 cDNA 等を過剰発現するトランスジェニックイネ系統の作出・評価及び利用(AMR0001)」、「イネ転写因子キメラリプレッサーを用いた変異体の作出・評価及び利用(AMR0004)」と連携して、これら候補遺伝子の過剰発現系統と CRES-T 法³⁾によるキメラリプレッサー発現系統の作出と評価を行った。これらのうち、得られた *OsNAC34* の過剰発現系統(T_2 世代)を用いて、円筒型酸素電極計を用いて根からの ROL を測定し、ROL バリア形成の調査を行った。その後、根からの ROL の測定とスベリンの蓄積について比較を行った。

(オ) *OsNAC34* 遺伝子のコムギへの導入および形質転換コムギ系統の ROL バリアの形成能の評価とスベリン蓄積の観察

新農業展開ゲノムプロジェクト「イネ以外の

作物の遺伝子導入技術の開発(GMZ)」の研究課題「効率的で安定したコムギ形質転換技術の開発(GMZ1001)」と連携し、イネの ROL バリア形成能に関連すると考えられる候補遺伝子 *OsNAC34* を含むゲノム断片を、アグロバクテリウム法によってコムギ(品種 Fielder)に導入した。得られた *OsNAC34* 導入コムギ系統(T_1 世代)の植物体を好気処理もしくは嫌気処理して、導入遺伝子の mRNA 量を qRT-PCR で調査した。*OsNAC34* 導入コムギ系統と非形質転換体の植物体の根を嫌気処理して、スベリン染色を行った。さらに、円筒型酸素電極計を用いて根からの ROL を測定し、ROL バリア形成の調査を行った。その後、根からの ROL の測定とスベリンの蓄積について比較を行った。

ウ 研究結果

(ア) LM-マイクロアレイ法による ROL バリア形成候補遺伝子の同定

LM-マイクロアレイ解析の結果から $p\text{-value} \leq 0.05$ 、 $\text{fold change} \geq 2.0$ または ≤ 0.5 に該当する遺伝子を選抜した。その結果、ROL バリア形成中の部位で発現量が増加する遺伝子が 98 種類、減少する遺伝子が 30 種類選抜された(図 3126-1)。そしてこれらの遺伝子の中にはスベリン生合成に関与すると考えられる遺伝子⁴⁾が 24 種類含まれていた(図 3126-1)。

(イ) ROL バリア形成過程におけるイネ転写因子遺伝子とスベリン生合成関連遺伝子の発現解析とスベリンの蓄積の確認

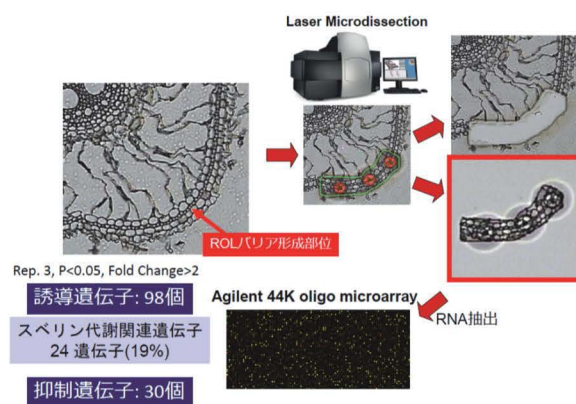


図 3126-1 LM-マイクロアレイによる ROL バリア形成部位での網羅的な発現解析

ROL バリアの形成部位である根の外皮付近の組織を LM 法によって単離し、RNA を抽出後、マイクロアレイ解析を行った。

水耕液を嫌気状態にして野生型を栽培し、その根における ROL の測定と候補転写因子遺伝子の空間的発現解析を行った。その結果、根からの ROL は嫌気状態の根の先端から 10-30 mm の区間で有意に減少し、それより基部側では ROL はほとんど見られなかった。したがって、根端から 30 mm よりも基部側では ROL バリアが形成されることが明らかになった。候補転写因子遺伝子 *OsNAC34*、*OsNAC92* および *OsWRKY23* が嫌気状態の根で、ROL バリア形成中のステージである根端から 10-30 mm の部位で最も高い発現を示すことを確認した (図 3126-2)。

LM- マイクロアレイ法によって同定された、ROL バリアの形成過程において根の外皮周辺組織で発現が誘導されるスベリン生合成関連遺伝子についても、同様に根の部位別の発現解析を行った。その結果、ほとんどのスベリン生合成関連遺伝子が、根端から 5-30 mm の範囲で最も高い発現を示すことが明らかになった (図 3126-3)。

この条件で根の横断切片を作成し、Fluorol Yellow 088 によるスベリン染色を行ったところ、嫌気状態では、スベリンの染色が根端から 20 mm

離れた部位の横断切片から確認され、そこより基部側ではスベリンの染色が観察された (図 3126-4)。

アポプラストバリアを構成するスベリンラメラの発達が ROL の減少と関連することが示唆されており、本研究のスベリンの染色と生合成関連遺伝子の発現パターンの解析は、スベリンと ROL バリアの関係を裏付ける結果となった。野生型を嫌気条件で栽培した場合、根では根端から 10-30 mm の部位で ROL バリアが形成され、30 mm より基部側では完成した ROL バリアが酸素の漏出を防いでいることが示唆された。複数の候補遺伝子の発現のピークも、スベリン生合成遺伝子と同じ 10-30mm の部位で見られたことから、候補遺伝子がスベリン生合成経路の調節に関与する可能性が考えられた。

(ウ) 外皮におけるスベリン沈着量が低下した変異体を用いた ROL バリア形成能の評価

ROL バリアの形成過程で発現が誘導される遺伝子の中に、*OsABCG5* 遺伝子 (Os03g0281900) が存在していた。*OsABCG5* は ABC トランスポーターの G サブファミリーに属するタンパク質で、その変異体は *reduced culm number-1 (rcn1)* と呼ばれ、分げつ数が減少する形質を示すことが報告されてい

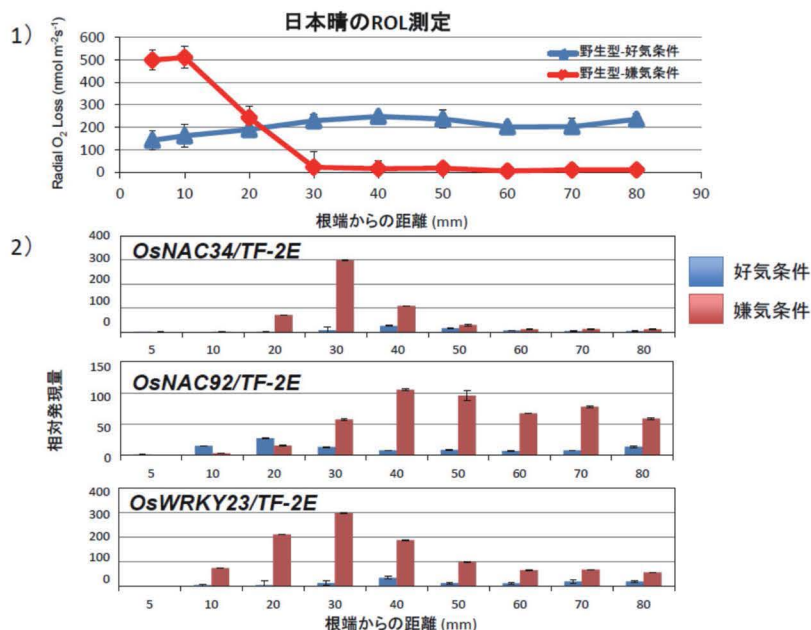


図 3126-2 野生型 (日本晴) の ROL 測定と候補遺伝子の根における空間的発現解析

- 1) 野生型を好気条件で 9 日間栽培した後、ROL バリアの形成されない好気条件、および ROL バリア形成条件である嫌気条件でそれぞれ 2 週間栽培した植物体の根 (100-130 mm) からの ROL の測定を、円筒型酸素電極計を用いて行った (n=3-4)。
- 2) ROL バリア形成に関与するイネ転写因子の候補遺伝子 (*OsNAC34*、*OsNAC92*、*OsWRKY23*) について、特異的なプライマーを用いて定量 RT-PCR を行った。供試したサンプルは、前述の根を部位別にサンプリングし、抽出した RNA を逆転写したものである。リファレンス遺伝子として TF-2E 遺伝子を用い、好気条件の 5mm 部位の発現量を 1 としたときの相対値を示してある。

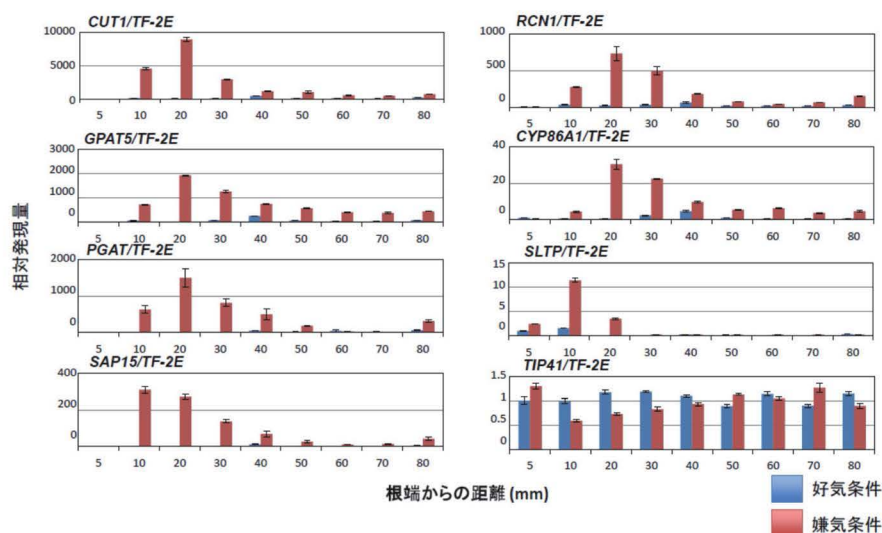


図 3126-3 野生型（日本晴）のスベリン合成関連遺伝子の根における空間的発現解析

これまでに同定された ROL バリアの形成過程で根の外皮周辺組織で発現が誘導されるスベリン合成関連遺伝子（CUT1、RCN1、PGAT、CYP86A1、SAP15、SLTP、GPAT5）と、どの組織でも恒常的発現をする TIP41 遺伝子（コントロール）について、特異的なプライマーを用いて定量 RT-PCR を行った。供試したサンプルは、野生型を好気条件で 9 日間栽培した後、好気、嫌気条件でそれぞれ 2 週間栽培し、根を部位別にサンプリングして抽出した RNA を逆転写したものである。リファレンス遺伝子として TF-2E 遺伝子を用い、好気条件の 5mm 部位の発現量を 1 としたときの相対値を示している。

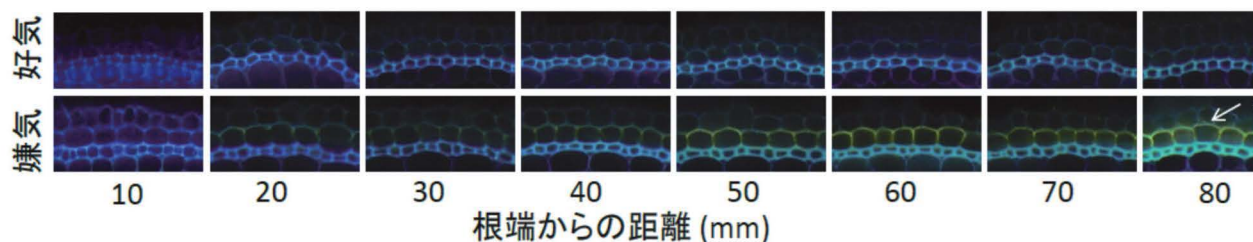


図 3126-4 野生型（日本晴）の根のスベリン染色

好気と嫌気条件で栽培した野生型の根の横断切片を作製し、スベリン染色を行った（露光 50 msec）。好気条件では外皮にスベリンの染色が確認されないが、嫌気条件の根では根端から 20mm の切片から弱いスベリンの蓄積が確認された。

た¹⁾。水耕液を嫌気状態にして、イネ *rcn1* 変異体の根の形質を調査したところ、野生型と比較してこの変異体では顕著に根の伸長が抑制されていた。この変異体では嫌気条件下での根の伸長阻害および根の形態異常が観察されたことから、根の ROL バリア形成能が低下している可能性が考えられたので、円筒型酸素電極計を用いて根からの ROL を測定した。その結果、*rcn1* 変異体では ROL バリア形成能が低下していることが明らかになった（図 3126-5）。

野生型と *rcn1* 変異体を用いて、根の横断切片を作製しスベリン染色を行ったところ、野生型では外皮と内皮の両方でスベリンの染色が観察されるのに

対して、変異体では内皮では染色されるものの外皮でのスベリンの沈着は観察されなかった（図 3126-6）。

透過型電子顕微鏡を用い、野生型と *rcn1* 変異体の外皮細胞の細胞壁周辺を観察した結果、水耕液を嫌気状態にした場合に野生型でみられる細胞外の層状の構造が *rcn1* 変異体では発達していないことがわかった（図 3126-7）。この層状の構造は内皮細胞でも観察され、導管への物質輸送を担う特定の部位の内皮細胞（passage cell）ではあまり発達していないことから、スベリンラメラであると判断された。

水耕液を嫌気状態にして、野生型と *rcn1* 変異体

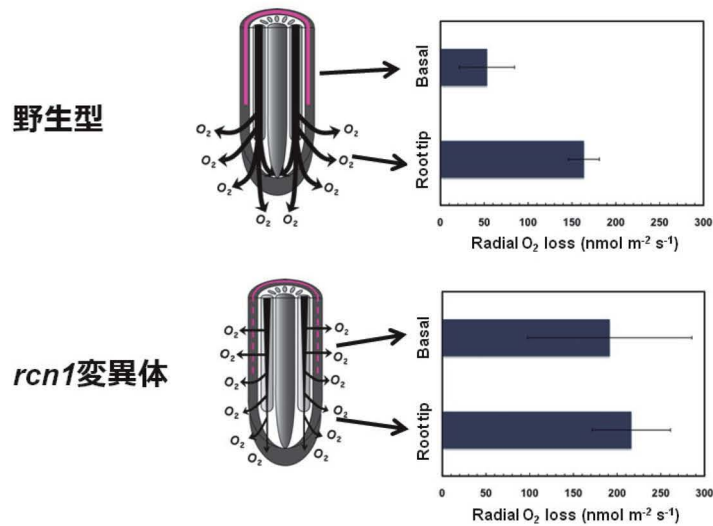


図 3126-5 *rcn1* 変異体と野生型における根の基部と先端部の酸素漏出 (ROL) 量の測定
野生型では根の基部で ROL バリアが形成されるために ROL が減少しているのに対して、*rcn1* 変異体では ROL バリア形成能が低下しており、ROL 量が多い。

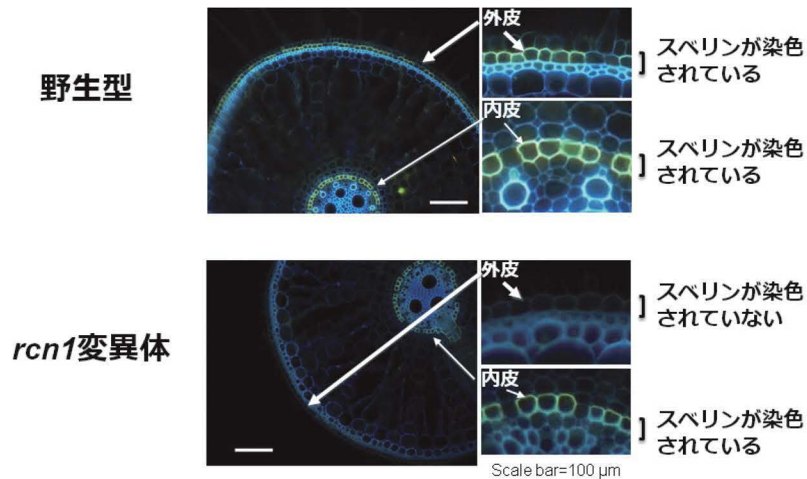


図 3126-6 *rcn1* 変異体と野生型における根の外皮および内皮のスベリン染色
野生型では根の外皮、内皮ともにスベリン染色が観察されるが、*rcn1* 変異体では内皮のスベリンは染色されるものの、外皮のスベリンはほとんど染色されなかった。

を periodic acid とシッフ試薬を用いた細胞外輸送能に依存する染色法²⁾で観察したところ、野生型では外皮のカスパー線が存在すると考えられる部位で水溶性物質の侵入を阻止できているのに対して、*rcn1* 変異体では皮層まで水溶性物質の透過がみられることが明らかとなった (図 3126-8)。

(エ) *OsNAC34* 過剰発現イネ系統の ROL バリア形成能の評価とスベリン蓄積の観察

OsNAC34 過剰発現イネ系統の T₂ 世代の種子を用いて、円筒型酸素電極計を用いた根からの ROL の測定を行ったところ、好気条件で栽培した場合、野生型と比べ、根端から 60-80mm の基部側では酸素

の漏出量が少なく、嫌気条件では根端から 5-10mm の根端側で酸素の漏出量が少ないことが明らかとなった (図 3126-9)。野生型では外皮にスベリンの蓄積しない好気状態で、*OsNAC34* 過剰発現系統のスベリンの蓄積を観察したところ、根端から 80mm の部位の外皮で、弱いスベリンの蛍光が観察された (図 3126-9)。

OsNAC34 過剰発現イネ系統と非形質転換体を用い、空間的な発現解析の結果からスベリン生合成関連遺伝子の発現が上がりはじめる部位の、不定根の根端から 5-15 mm 離れた部位に着目し、経時的な遺伝子発現解析を行った (図 3126-10)。その

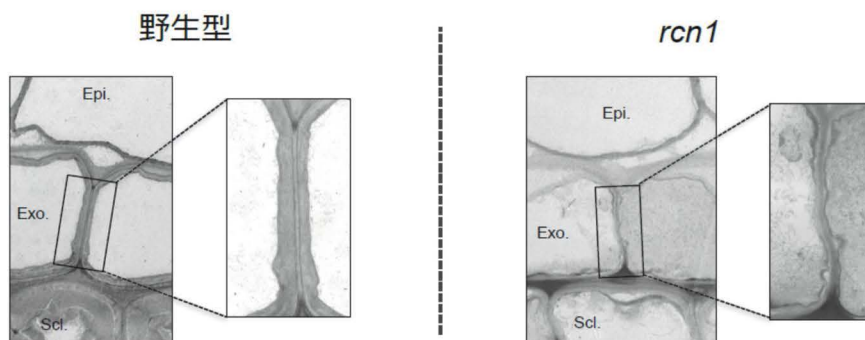


図 3126-7 *rcn1* 変異体と野生型の根の外皮組織の透過型電子顕微鏡観察像

透過型電子顕微鏡を用い、*rcn1* 変異体と野生型の外皮細胞周辺を観察した。水耕液を嫌気状態にした場合に野生型でみられる細胞外の層状の構造が、*rcn1* 変異体では発達していないことが明らかになった。

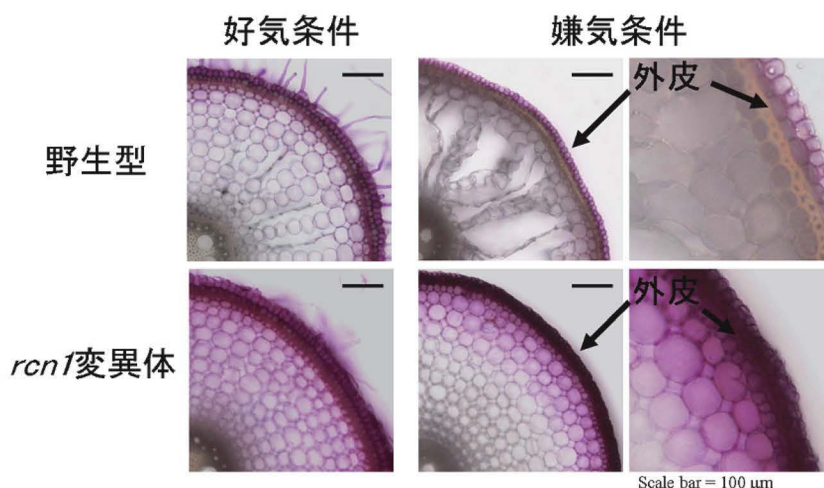


図 3126-8 Periodic acid を使った *rcn1* 変異体と野生型における根の透過性試験

嫌気条件では、野生型の外皮までが periodic acid により染色されるが、*rcn1* 変異体では皮層部分まで染色が進んでおり、*rcn1* 変異体の根の透過性が野生型に比べて高いことが明らかになった。

結果、非形質転換体では1日間の嫌気処理により *OsNAC34* の発現が最大1.4倍に増加し、スベリン生合成関連遺伝子 (*CUT1*、*RCN1*、*CYP86B3*、*GPAT*) の発現が上昇することが明らかになった。そして、*OsNAC34* 過剰発現系統では、好気条件下におけるスベリン生合成関連遺伝子の発現は非形質転換体に比べ、最大25%程度の増加が確認されたが、嫌気条件下ではスベリン生合成関連遺伝子の発現が非形質転換体に比べ顕著に増加することが明らかとなった(図3126-10)。このことは、*OsNAC34* 以外にもスベリン生合成関連遺伝子の発現を制御する転写因子が存在することを強く示唆する結果となった。

(オ) *OsNAC34* 遺伝子のコムギへの導入および形質転換コムギ系統のROLバリアの形成能の評価と

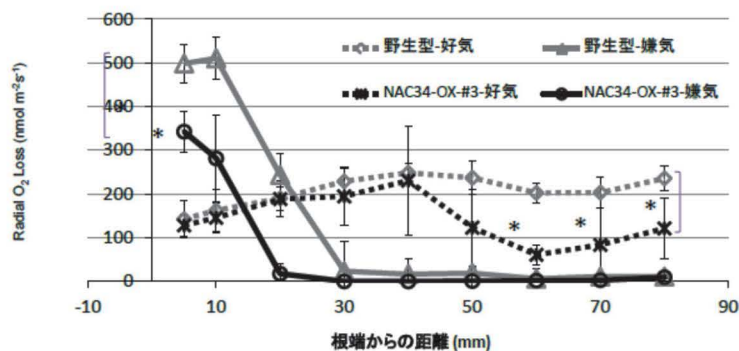
スベリン蓄積の観察

OsNAC34 のプロモーター領域と遺伝子コード領域を含むゲノム断片をコムギ品種 Fielder に導入した形質転換体を作出し、*OsNAC34* 発現系統として用いた。66ラインの *OsNAC34* 発現系統から導入遺伝子が低コピーの系統を選抜し、以降の研究に用いた。

導入した *OsNAC34* 遺伝子の発現の確認を qRT-PCR によって行った。その結果、嫌気条件下で生育させた形質転換コムギだけでなく、好気条件下で生育させた形質転換コムギにおいても導入された *OsNAC34* の発現が確認された(図3126-11)。また、非形質転換体と *OsNAC34* 導入系統の間では生育条件に関わらず生育期間を長くした場合でも、地上部

1)

OsNAC34過剰発現系統のROL測定



2)

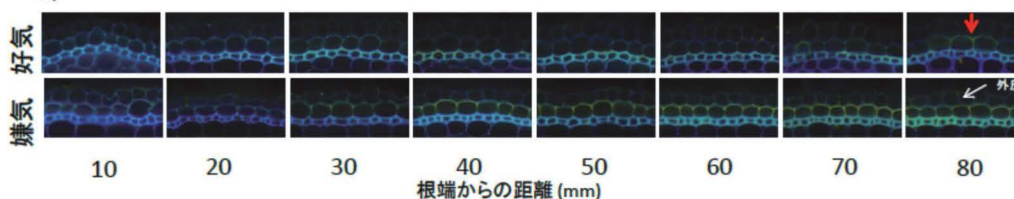
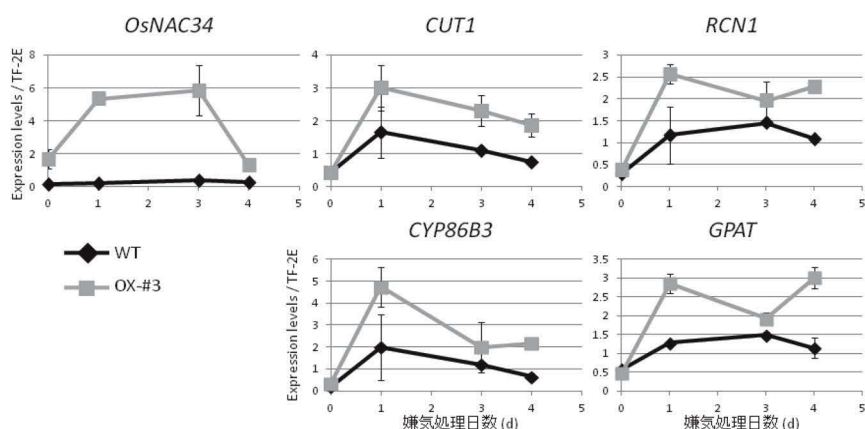


図 3126-9 OsNAC34 過剰発現系統のROL 測定とスベリン染色

- 1) 野生型（非形質転換体）と *OsNAC34* 過剰発現系統 #3 を、それぞれ好気条件で 9 日間栽培した後、ROL バリアの形成されない好気条件、および ROL バリア形成条件である嫌気条件でそれぞれ 2 週間栽培した植物体の根（100-130 mm）からの ROL の測定を、円筒型酸素電極計を用いて行った（ $n=3-4$ ）。各処理の野生型と過剰発現系統間で有意性検定を行った（T-test *: $P<0.05$ ）。
- 2) 好気と嫌気条件で栽培した *OsNAC34* 過剰発現系統の根の横断切片を作製し、スベリン染色を行った（露光 50 msec）。好気条件の根端から 80mm の部位では外皮に弱いスベリンの染色が確認された（赤矢印）。

図 3126-10 *OsNAC34* 過剰発現系統におけるスベリン生合成関連遺伝子の発現解析

野生型（非形質転換体：WT）と *OsNAC34* 過剰発現系統（OX-#3）を好気条件下で 23 日間生育させ、一定期間嫌気条件下で処理した。処理後、処理開始時の根端から 5-15 mm 上部に相当する部位を切り出してサンプリングを行い、RNA を抽出後、qRT-PCR によるスベリン生合成関連遺伝子の発現解析を行った。リファレンス遺伝子として TF-2E を用いた相対発現量を示してある。（ $n=3$ ）

の表現型に大きな違いは見られなかった（図 3126-11）。

次に、*OsNAC34* の発現が認められた個体を選抜し、さらに好気条件下および嫌気条件下で 7 日間生育させた後、円筒型酸素電極計を用いて根の ROL の測定を行った。その結果、好気条件下で生育させた場合、非形質転換体と *OsNAC34* 発現系統の間に

は有意な差が認められなかったが、嫌気条件下で生育させた場合には非形質転換体に比べ *OsNAC34* 発現系統は根端から 30-60 mm の領域で ROL 量が低くなる傾向が観察された（図 3126-12）。その際の通気組織形成率を比較したところ、*OsNAC34* 発現系統において、不定根の根端から 30-60 mm の部位の通気組織形成率は非形質転換体と有意な差が認めら

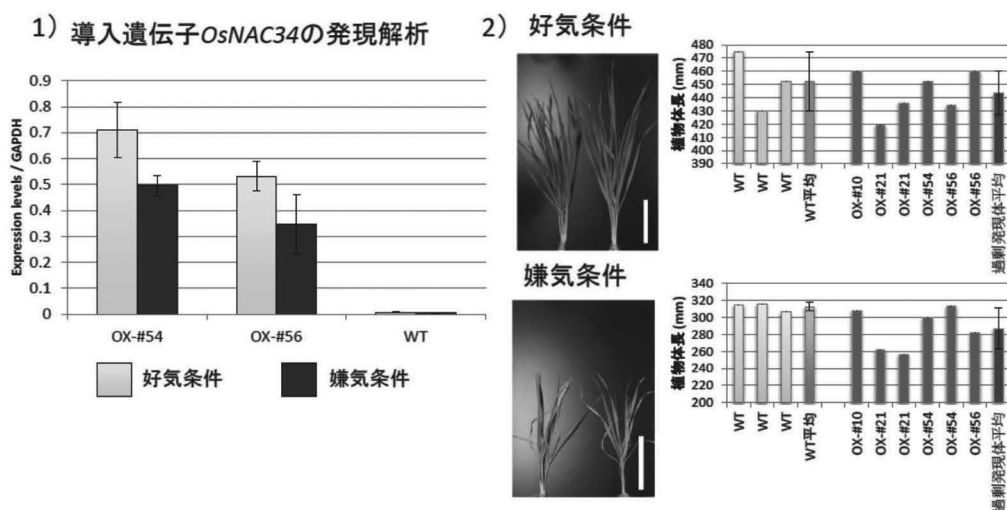
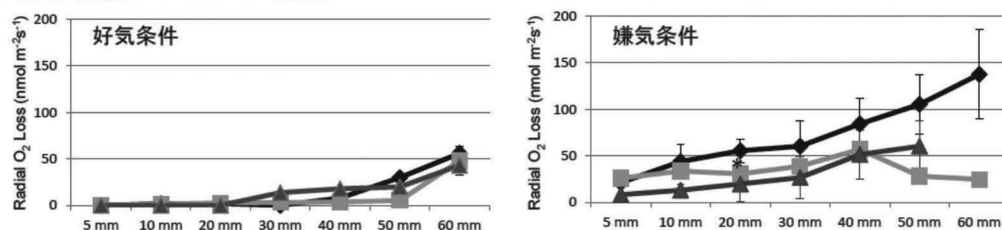


図 3126-11 形質転換コムギにおける導入遺伝子の発現解析と地上部の表現型

野生型（非形質転換体：WT）、*OsNAC34* 発現コムギ系統（OX-#10、#21、#54、#56）を好気条件で9日間水耕栽培した後、好気条件、もしくは嫌気条件で栽培し導入遺伝子の発現解析と地上部の表現型の評価を行った。

- 1) 好気条件、もしくは嫌気条件で14日間生育させ、不定根（50-80 mm）のサンプリングを行った。qRT-PCRを用いて導入遺伝子 *OsNAC34* の発現解析を行った。
- 2) 好気条件、もしくは嫌気条件で28日間生育させ、地上部の測定を行った。写真のスケールバーは100mmである。

1) 形質転換コムギのROL測定



2) 形質転換コムギの通気組織形成率

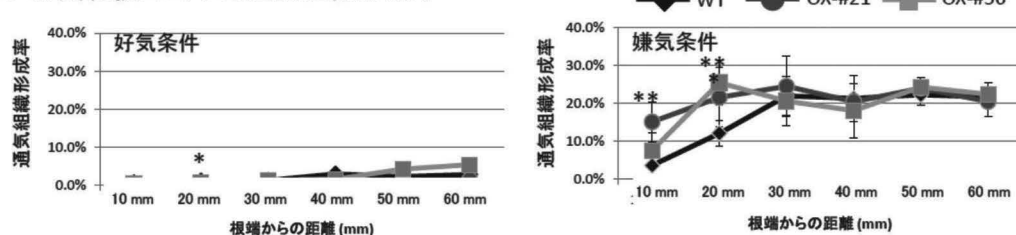


図 3126-12 形質転換コムギのROL測定と通気組織形成率

- 1) 円筒型酸素電極計を用いてROL測定を行った。(n = 2-3)
 - 2) 根の切片を作成し、ImageJを用いて根の通気組織と断面積を測定し、通気組織 / 断面積 (%) を通気組織形成率として求めた。(n = 6)
- 各処理の非形質転換体と *OsNAC34* 発現系統間で有意差検定を行った (t-test *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)

れなかった (図 3126-12)。

また、非形質転換体と *OsNAC34* 発現系統について、それぞれ好気条件下もしくは嫌気条件下で生育させた植物体の根の横断切片を作製し、Fluorol Yellow 088 によるスベリン染色を行った。その結果、非形質転換体では生育条件によらず内皮への

スベリン蓄積が確認されたが、外皮にはスベリンの蓄積は観察されなかった (図 3126-13)。一方、*OsNAC34* 発現系統では、内皮へのスベリンの蓄積に加え、外皮へのスベリン蓄積が観察された。この外皮へのスベリンの蓄積は、イネの根の外皮におけるスベリン蓄積と比べると非常に少ないが、コムギ

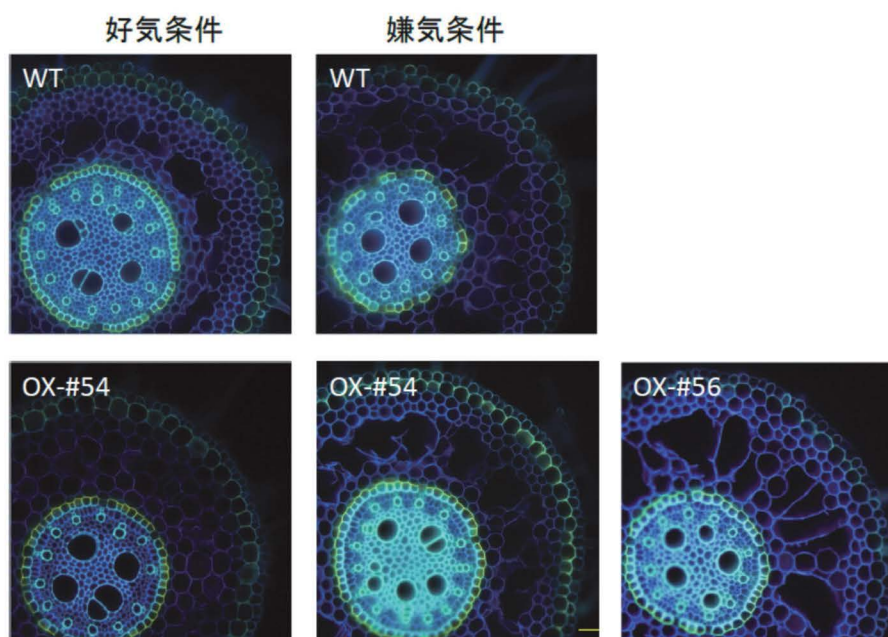


図 3126-13 形質転換コムギのスベリン染色

野生型（非形質転換体：WT）、*OsNAC34* 発現系統 を好気条件で 9 日間水耕栽培した後、好気条件、もしくは嫌気条件で 21 日間栽培し、不定根（60-80 mm）の根端から 50 mm の部位の横断切片を作成し、スベリン染色を行った

の非形質転換体と比べて有意な増加であった（図 3126-13）。この傾向は複数の *OsNAC34* 発現系統で観察された。

エ 考 察

ROL バリアの形成は植物への耐湿性付与に重要な形質であるにも関わらず、この研究を開始した時点で、ROL バリア形成に関与する遺伝子は不明であった。本研究では、LM およびマイクロアレイによって、ROL バリアが形成される根の外皮・厚壁組織付近で特異的に発現する遺伝子の網羅的解析を行い、ROL バリア形成に関わる遺伝子候補の絞り込みを行った。これにより、ROL バリアの形成過程において外皮付近の組織特異的に発現が上昇する 98 遺伝子、発現が低下する 30 遺伝子を同定した。発現が上昇した遺伝子の 19% にあたる 24 遺伝子がスベリン（およびリグニン）の生合成に関わる遺伝子であった。これらの結果より、特にスベリンが ROL バリアの構成成分である可能性が考えられた。

野生型（品種 日本晴）を用い、嫌気条件下のイネの根におけるスベリン関連候補遺伝子の詳細な発現と ROL バリアの形成のパターンを比較することで、候補遺伝子の ROL バリアへの関与を検証した。水耕液を嫌気状態にして野生型を栽培し、その根に

おける ROL の測定を行ったところ、根からの ROL は嫌気状態の根の先端から 10-30 mm の区間で有意に減少し、それより基部側では ROL はほとんど見られないことが明らかとなった。さらに、スベリン生合成関連遺伝子は、根端から 5-30 mm の範囲で最も高い発現を示すことが明らかになった。そして、同じ条件で根の横断切片を作製し、Fluorol Yellow 088 によるスベリン染色を行ったところ、嫌気状態では、根端から 20 mm の部位から基部側の横断切片においてスベリンの染色が観察された。これらの結果から、候補遺伝子がスベリン生合成経路の調節に関与し、根端に近い組織でスベリンの生合成が活性化することにより、ROL バリアが形成されるという可能性が示唆された。

ROL バリアの形成過程で発現が誘導される遺伝子の中に、*OsABCG5* 遺伝子（Os03g0281900）が存在しており、その変異体は *rcn1* と呼ばれていた¹⁾。我々はこの *rcn1* 変異体の水田で生育低下はスベリンの蓄積量の減少および ROL バリアの形成能の低下にあるのではないかと予想した。その可能性を確かめるために、*rcn1* 変異体の根を嫌気処理して、根のスベリンの染色を行ったところ、野生型の根では外皮でスベリンの染色が観察されたのに対して、*rcn1* 変異体では外皮におけるスベリンの蓄積がみら

れなかった。さらにROLバリア形成能を調査した結果、*rcn1*変異体の根の基部ではROLバリアが部分的にしか形成されていないことが分かった。透過型電子顕微鏡を用い、野生型と*rcn1*変異体の外皮細胞の細胞壁周辺を観察した結果、嫌気状態にした場合に野生型でみられる細胞外の層状の構造（スベリンラメラ）が*rcn1*変異体では発達していないことが分かった。これらの結果より、*rcn1*変異体では、外皮のアポプラストバリアを構成するスベリンラメラが未発達なため、外皮細胞の物質透過性が上昇し、通気組織から外部への酸素の漏出も増加したと考えられた。*rcn1*変異体の原因遺伝子はABCトランスポーターOsABCG5をコードしているので、RCN1はスベリン前駆体の輸送体として働くと考えられた。さらにRCN1がROLバリアの形成に関与することが示され、世界で初めてROLバリア形成関連遺伝子を同定できた。

ROLバリア形成過程で発現誘導するイネ転写因子遺伝子として単離された*OsNAC34*遺伝子が、ROLバリア形成過程で機能しているかどうかを確認するために、*OsNAC34*遺伝子の過剰発現系統の評価を行った。得られた*OsNAC34*の過剰発現系統（T₂世代）を用いて、ROLバリア形成の有無を確認したところ、好気条件下で生育させた場合、非形質転換体と比べ、根端から60-80mmの基部側では酸素の漏出量が少なく、さらに嫌気条件下では根端から5-10 mmの部位で酸素の漏出量が少ないことが明らかとなり、弱いROLバリア形成が誘導されていることが明らかとなった。好気条件下で生育させた*OsNAC34*過剰発現系統の根において、根端から80mmの部位の外皮で弱いスベリンの染色が観察された。さらに、LM-マイクロアレイ解析によって同定されたスベリン生合成関連遺伝子の発現について、根に沿って発現を確認したところ、*OsNAC34*過剰発現系統では*CYP86A1*遺伝子と*RCN1*遺伝子の発現が栽培条件によらず上昇していることが明らかになった。これらのことから、*OsNAC34*は一部のスベリン生合成関連遺伝子の発現を正に制御し、その過剰発現系統ではスベリンの生合成が活性化された結果、根の外皮組織周辺に蓄積したスベリンが基部側でROLバリアとして機能したことが示唆された。また、*OsNAC34*過剰発現系統を嫌気処理した際には、非形質転換体に比べてスベリン生合成関

連遺伝子（*CUT1*、*RCN1*、*CYP86B3*、*GPAT*）の発現の誘導がより顕著になることが明らかになった。このことから、*OsNAC34*のほかにもスベリンの生合成関連遺伝子の発現を調節する転写因子が存在することが示唆された。今後、他の転写因子遺伝子の過剰発現系統、キメラリプレッサー発現系統を用いて同様の解析を行い、それらの転写因子が外皮でのスベリン合成・蓄積およびROLバリアの形成に関与するかどうかの検証を行う必要がある。

さらに、コムギ（品種 Fielder）に*OsNAC34*のゲノム断片を導入した形質転換体の作出を行った。イネで*OsNAC34*プロモーターは嫌気処理に応答して活性を示すが、*OsNAC34*プロモーター領域と遺伝子コード領域を含むゲノム断片をコムギ品種 Fielder に導入した*OsNAC34*発現コムギ系統では、その嫌気応答性が観察されず、好気条件、嫌気条件下の両方で導入した*OsNAC34*の発現が確認された。このことはイネとコムギでは嫌気応答性に関与する転写因子の認識配列、もしくは活性化能が異なることを示した。また、根で恒常的に*OsNAC34*が発現した場合でも、*OsNAC34*発現コムギ系統は非形質転換体と比べ目立った表現型を示さなかった。

*OsNAC34*発現コムギ系統と非形質転換体を好気条件下で9日間生育させた後、好気条件下または嫌気条件下で21日間生育させ、ROL測定を行ったところ、嫌気条件下で生育させた*OsNAC34*発現コムギ系統において非形質転換体に比べROL量の減少が認められた。ROL量の減少が認められた部位では、地上部から根への酸素の供給経路である通気組織の形成率には非形質転換体と*OsNAC34*発現コムギ系統の間で有意差が認められなかったことから、ROLの減少は通気組織を介した酸素の供給量の減少に起因するものではなく、弱いROLバリアが形成されたためだと考えられる。Fluorol Yellow 088を用いた根の横断切片のスベリン染色結果から、*OsNAC34*発現コムギ系統が外皮にスベリンを蓄積することが明らかになった。これは非形質転換体では観察されないことから、導入した*OsNAC34*遺伝子による影響だと考えられる。

本研究ではスベリンの蓄積によってROLバリアが形成されると仮説を立てており、弱いROLバリアの形成が示唆された部位で外皮へのスベリンの蓄積が見られたことは、この仮説を強く裏付けるもの

である。また、*OsNAC34* 発現コムギ系統においてスベリンの蓄積が観察されたこと、ROL バリア形成が確認されたことより、*OsNAC34* 遺伝子はコムギにおいてもスベリンの生合成を正に調節し、ROL バリア形成に関与する転写因子として機能することが示唆された。

オ 今後の課題

本研究によって、スベリンがROL バリアの構成成分の一つであることが示唆された。しかし、スベリンの他にリグニンなどの二次代謝産物もROL バリアに関与している可能性が考えられるので、今後はそれらの物質とROL バリアとの関連を詳細に調査する必要がある。

LM-マイクロアレイ解析により、合計128個のROL バリア形成過程で発現が変動する遺伝子を同定したが、本研究ではその中の一部しか詳細な解析ができなかった。したがって、ROL バリア形成機構の一層の理解のためには、今後引き続き、有望な候補遺伝子の機能解析を進めていく必要がある。

本研究では、コムギに*OsNAC34* 遺伝子を形質転換することによって、根の外皮へのスベリンの蓄積量を若干増やすことに成功した。さらにROL バリアが部分的に形成されることを確認した。しかし、ROL バリアの形成が不十分なために根端での酸素漏出量が増加しておらず、コムギの耐湿性の向上には至らなかった。その理由として、スベリン生合成関連遺伝子の制御に関与する因子が他にも存在しており、*OsNAC34* の導入だけではコムギにタイトなROL バリアを形成させるのに不十分であったことが考えられた。LM-マイクロアレイ解析では他にも転写因子をコードする遺伝子が見出されており、それらの遺伝子もコムギに導入することで、タイトなROL バリアを形成でき、その結果としてコムギの耐湿性が向上する可能性がある。したがって、それらの転写因子遺伝子の選抜、機能解析が今後の課題となる。

力 要 約

近年我が国で問題になっているコムギなどの畑作物の湿害の低減を目指し、イネの耐湿性に関する遺伝子の単離と機能解析を進めた。特に耐湿性獲得に重要な根端への酸素供給に関わるROL バリアに焦

点を当てて研究を行った。

LM およびマイクロアレイによって、ROL バリアが形成される根の外皮付近で特異的に発現する遺伝子の網羅的解析を行い、ROL バリア形成に関わる候補遺伝子を同定した。それらの中で、スベリン生合成に関わる遺伝子、スベリン前駆体の輸送に関与すると考えられる遺伝子 [*OsABCG5 (RCN1)*]、スベリン生合成遺伝子の発現制御に関与すると考えられる転写因子遺伝子 (*OsNAC34*) に着目して、詳細な解析を行った。その結果、これらの遺伝子はイネの根の外皮におけるスベリンの蓄積に関与することが示唆され、外皮でのスベリンラメラの蓄積とROL バリア形成の関連性について確認することができた。

さらに*OsNAC34* 遺伝子をコムギに形質転換して形質評価を行った。*OsNAC34* 発現コムギ系統では、スベリン生合成遺伝子の発現が誘導され、根の外皮にスベリンが蓄積しており、部分的にROL バリアが形成されていた。*OsNAC34* はコムギにおいても部分的にROL バリア形成を誘導できることが示唆された。

本研究によって、当初のROL バリア形成関連遺伝子を少なくとも2個同定するという目標は達成できた。また、世界に先駆けて植物の耐湿性付与に重要なROL バリアの形成機構の一端を解明できた。

キ 引用文献

- 1) Yasuno N, Takamure I, Kidou S, Tokuji Y, Ureshi AN, Funabiki A, Ashikaga K, Yamanouchi U, Yano M, Kato K (2009). Rice shoot branching requires an ATP-binding cassette subfamily G protein. *New Phytologist*. 182 : 91-101.
- 2) Soukup A, Armstrong W, Schreiber L, Franke R, Votrubová O. (2007). Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration : a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *New Phytologist*. 173 : 264-278.
- 3) Mitsuda N, Matsui K, Ikeda M, Nakata M, Oshima Y, Nagatoshi Y, Ohme-Takagi M. (2011). CRES-T, an effective gene silencing

system utilizing chimeric repressors. *Methods in Molecular Biology*. 754 : 87-105.

- 4) Ranathunge K, Schreiber L, Franke R. (2011). Suberin research in the genomics era : new interest for an old polymer. *Plant Science*. 180 : 399-413.

担当研究者 (中園幹生 *)

3 イネ種子の登熟や高温下での品質に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

(1) イネ胚乳の初期発生とゲノムインプリンティングの解析 (IPG0017)

ア 研究目的

イネ胚乳は人類が食料として利用している組織であり、その品質・収量は重要な育種形質である。しかしながら、その初期発生は最終的な米の品質・収量に大きく影響するにも関わらず、十分な解析がなされてこなかった。我々の解析により、胚乳の初期発生には、ゲノムインプリンティングが関与しており、そのエピジェネティックなプログラムに従って最終的な胚乳のサイズが決定されることがわかりつつあった。本研究では、インプリント遺伝子を含む胚乳発生・サイズを決定しうる遺伝子候補を多数単離し、胚乳サイズに着目した解析と選抜を行った。得られた遺伝子情報は飼料米などの胚乳サイズの改良を通じて、収量の増大に寄与することを目的とした。

また、異常高温下における登熟では、様々な知見から胚乳発生のプログラムが変化することが示唆されており、その初期発生制御機構が関与している可能性が高い。本研究では、2つ目の課題として、高温時の胚乳初期発生を詳細に解析することで、乳白米、胴割れ米の遺伝的要因を解明し育種に資することを目的とした。

イ 研究方法

(ア) 胚乳サイズ制御に関わる遺伝子の同定

栽培イネと野生イネの種間交雑、ならびに栽培イネを用いて倍数体間交雑を行った。マイクロアレイ

解析や、包括的解析から、*OsFIE1* ポリコム遺伝子ならびにその標的遺伝子候補の *OsMADS87* 遺伝子に着目し、その詳細を解析した。

(イ) 高性能人工気象器を用いた、屋内イネ育成系の開発

人工気象器 (日本医科 ; NC-350HC) を使い、シロイヌナズナ栽培用の小さなポットを使い、イネを単稈で育てること、胚救済すること、二酸化炭素を制御することなどを試みた (Ohnishi *et al*,¹⁾)。

(ウ) 屋内イネ育成系を用いた胚乳の高温登熟異常の解析

人工気象器を用い、光量 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、日長 (明期 11 hr / 暗期 13 hr)、湿度 70 %、CO₂ 濃度 475 ppm、粒状土 140 ml の条件で日本晴ならびにコシヒカリを栽培した。ヒートパルス実験では、対照区 (昼温 27 度 / 夜温 22 度) と処理区 (昼温 32 度 / 夜温 27 度) の 2 台の人工気象器を用いて、受粉後に 24 時間もしくは 72 時間のヒートパルスを経時的に与えた。

ウ 研究結果

(ア) 胚乳サイズ制御に関わる遺伝子の同定

多くの植物では、胚乳のサイズは母由来ゲノムと父由来ゲノムのせめぎ合いにより決まることが知られている (大西と木下²⁾; Ishikawa and Kinoshita,³⁾)。そこで、ゲノムの配列が異なる種間を組み合わせで交雑し、詳細に胚乳の発生を解析した上でマイクロアレイ解析により鍵遺伝子を探索できると考えた。日本晴を母本として、野生イネ *O. longistaminata*, *O. punctata*, *O. australiensis* を組み合わせで、胚乳の発生を解析した結果、胚乳サイズが大小するにも関わらず初期胚乳の分裂頻度に変化が認められないことが明らかとなった。一方で、胚乳発生の進行は胚乳が小さくなる組み合わせでは亢進し、大きくなる組み合わせでは遅延することが明らかとなった。これらの表現型と相関して、ポリコム複合体の標的遺伝子と考えられる *OsMADS87* 転写因子遺伝子の発現が増大、または減少することが明らかとなった。また、胚乳サイズのせめぎ合いはインプリント遺伝子 *1 が行っていると予測されているが、これらの

*1 : インプリント遺伝子とは、対立遺伝子の遺伝子発現がその遺伝子の父・母の由来の違いにもとづいて遺伝子発現のオンオフが制御されるタイプの遺伝子を言う。

OsFIE1 と *OsMADS87* 遺伝子はインプリントされていることが明らかとなった (Ishikawa *et al.*,⁴⁾) (図 3131-1)。

(イ) 高性能人工気象器を用いた、屋内イネ育成系の開発

人工気象器を用いたイネの育成は、稔実率の低さなどの問題で特に生殖過程の研究には不向きであった。人工気象器による環境制御を野外環境に可能な限り近づけることと、イネの育成条件を人工気象器の性能に合わせることの両面を考えた。まず、光環境に関しては、野外環境にまで光量を増やすことは技術的には可能であるが、設備コスト等で現実的ではないため、葉の単位面積あたりで十分に光量がある単稈で育成する方法を取り入れた。次に、人工気象器内は密閉環境であり、二酸化炭素量が大気レベルと比較すると著しく下がることを考慮し、二酸化炭素を人工気象器に供給することを考えた。この2つの方法の導入と従来から知られている人工気象器でのイネ育成の最適温度、日長、湿度のパラメーターと組み合わせることで、健全な育成が可能に

なった。この方法では、稔実率も飛躍的に向上し、人工交配も再現性よく行える。加えて、胚救済法により登熟期間を回避することにより、年6世代の戻し交配も可能となった (Ohnishi *et al.*,¹⁾)。

(ウ) 屋内イネ育成系を用いた胚乳の高温登熟異常の解析

近年の地球温暖化の問題で、乳白米や胴割れ米の発生が問題となっている。イネの胚乳発生などのステージが高温に脆弱であるかを詳細に検討する必要性があった。上記人工気象器を用いた育成系を用いて、胚乳発生の様々なステージにおいてヒートパルス(一過的な高温処理)をあたえ、乳白ならびに胴割れ米の発生率を解析した。その結果、乳白米の発生率は胚乳発生初期の多核体期にあたるステージとデンプン合成期にあたるステージに脆弱性のピークが認められるが、全体としてどのステージの高温においても対照区と比較して乳白米の発生率は高かった。一方で、胴割れ米の発生率は、受粉後4-7日目から開始される3日間のヒートパルスに対して明瞭なピークを示した(図 3131-2)。

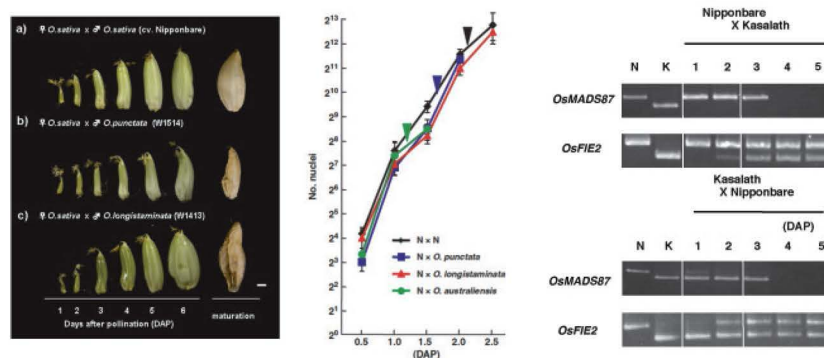


図 3131-1 種間交雑による胚乳サイズ変化と鍵因子のインプリンティング

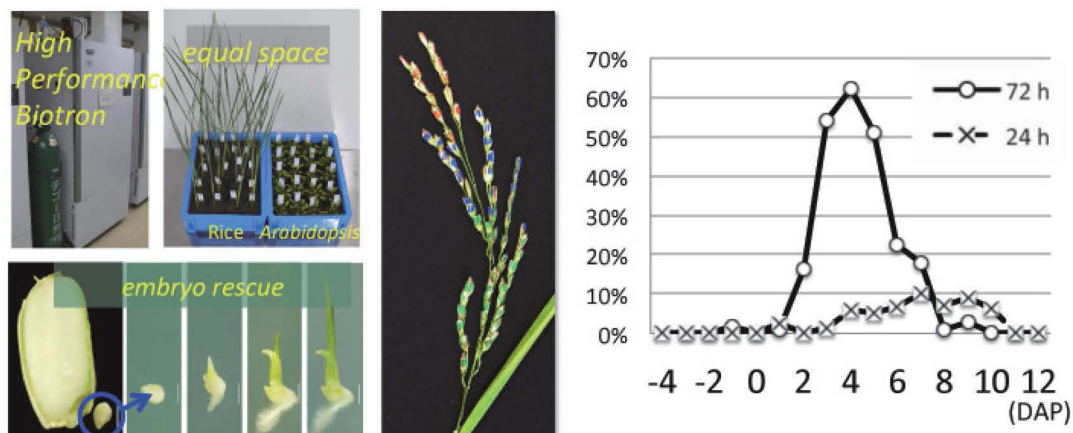


図 3131-2 イネの屋内栽培法と胴割れ米における高温感受期

エ 考 察

(ア) 胚乳サイズ制御に関わる遺伝子の同定

種間交雑等の解析から、*OsFIE1* ポリコム遺伝子とその標的遺伝子と考えられる *OsMADS87* を同定した。両者ともに胚乳特異的に発現するインプリント遺伝子であった。*OsMADS87* は種の組み合わせに応じて、細胞化のタイミングが変わること、種子のサイズが変わることとその遺伝子発現を始め様々な相関関係が見られるため、胚乳のサイズ制御において鍵を握る遺伝子と考えられた。

(イ) 高性能人工気象器を用いた、屋内イネ育成系の開発

これまでのイネ研究においては、屋内での優れた育成系がなく、そのため特に生殖過程の研究に関しては夏の季節を待たねばならなかった。本課題にて再現性の良い育成系を確立できたため、我々が示した胚乳発生解析以外にも、実験室内の多くの実験に展開することが可能である。例えば、圃場展開が困難な組み換えイネの詳細な解析にも有効であろう。加えて、人工気象器の設定を変えるだけで、何時でもどのような地域でも容易に人工交配が出来る点は大きい。従来は、2重、3重変異体の作成等には年月を要していたが、モデル植物のシロイヌナズナと比較できる迅速さでこれらを作成することが可能となった。

(ウ) 屋内イネ育成系を用いた胚乳の高温登熟異常の解析

乳白米の温度感受期は発生初期から後期まで幅広い。その原因は多くの発生ステージに複合的に存在するか、細胞の恒常性を維持するような基本的な因子に脆弱性があると考えられた。一方、胴割れ米は、受粉後4-7日目に胴割れ米発生の顕著な感受期を示す。従って、このステージに特異的なイベントに高温の脆弱性があり、胴割れ米が引き起こされている可能性が高い。

オ 今後の課題

(ア) 胚乳サイズ制御に関わる遺伝子の同定

OsFIE1 と *OsMADS87* の機能の詳細な実証実験が必要である。胚乳発生の分子機構にどのように作用するか、詳細に解析する必要がある。

(イ) 高性能人工気象器を用いた、屋内でイネ育成系の開発

現在、日本晴等の感光性のある品種において、プロトコールを確立している。感光性のない品種や野生イネに関して育成条件を検討する必要がある。

(ウ) 屋内でのイネ育成系を用いた胚乳の高温登熟異常の解析

受粉後4-7日目に胴割れ米発生の顕著な感受期を示すことができた。今後は原因となる分子機構、及び関与する遺伝子を同定する必要がある。

カ 要 約

(ア) 胚乳サイズ制御に関わる遺伝子の同定

OsFIE1 と *OsMADS87* 遺伝子を単離し、両者ともに胚乳において母親から特異的に発現するインプリント遺伝子であることを示すとともに、胚乳サイズとの相関を多くの種間交雑から示した。

(イ) 高性能人工気象器を用いた、屋内でイネ育成系の開発

年6世代の戻し交配と安定した屋内でのイネ育成系を確立した。

(ウ) 屋内でのイネ育成系を用いた胚乳の高温登熟異常の解析

胴割れ米に関して、受粉後4-7日目が最も高温に脆弱であることを詳細な解析から示した。

キ 引用文献

- 1) Ohnishi T., Yoshino M., Yamakawa H., Kinoshita T. (2011). The biotron breeding system : a rapid and reliable procedure for genetic studies and breeding in rice. *Plant Cell Physiol.* 52 : 1249-57.
- 2) 大西 孝幸, 木下 哲 (2010). イネ胚乳の初期発生, *Plant Morphology*, 22 : 15-22.
- 3) Ishikawa R., Kinoshita T. (2009). Epigenetic reprogramming; challenge to species hybridization. *Molecular Plant.* 2 : 589-599.
- 4) Ishikawa R., Ohnishi T., Kinoshita Y., Eiguchi M., Kurata N., Kinoshita T. (2011). Rice interspecies hybrids show precocious or delayed developmental transitions in the endosperm without change to the rate of syncytial nuclear division. *Plant J.* 65 : 798-806.

研究担当者 (木下 哲 *)

(2) 開花期低温ストレス耐性関連遺伝子の単離と機能解析 (IPG0019)

ア 研究目的

受粉の前後に受ける温度ストレスは受粉反応を妨げ、不稔を生じさせ、大幅な収量低下となる。特に、東北、北海道では10年に一度は冷害が起きると言われており、収量安定化にとって耐冷性は必須な形質であるが、分子レベルでの実態は明らかにされておらず、「経験と勘」による品種改良しかなされていない。本課題においては、19℃という低温でも稔実可能な品種が有する耐冷性遺伝子を探索し、その機能解明を図る。また、高温ストレス耐性プロジェクト (IPG0018) と連携することで、高温不稔制御遺伝子とのクロストークを考察した。この遺伝子を逆に用いれば、人工的に不稔を誘発することも可能となる。こうした、稔性制御機構のメカニズムを研究するとともに、中間母本の育成を目ざし、その育種の利用を試みた。また、植物ホルモンなど生理活性物質を利用した非遺伝子組換えによる稔性回復効果についても検討した。さらに、バイオマス増強の観点から多収性の形質が最も重要視されるが、それら多収性の形質における環境変動による不稔増強リスクについても評価した。

さらに、オオムギ・シロイヌナズナの実験系をイネなど重要作物のモデル系とし、雄性生殖成長過程とその障害時のカギとなる重要遺伝子群を同定した。これらの研究を統合し、最終的に環境ストレス耐性作物種創出への応用研究を究極の目的とした。

イ 研究方法

(ア) 地球規模での温暖化での植物ホルモン利活用により作物の安定供給を目指す

シロイヌナズナ・オオムギ・イネ組換え体の研究は人工気象器 (日本医化器機) を用いて、その他のイネの研究はバイオクライترون (小糸工業: 27℃/22℃、12時間日長) と野外温室で栽培した。低温処理は播種後30日目から出穂期まで、200Lのコンテナを用い、植物体の成長にあわせて水位を調節し、最終的に地上部の25～30cmが水没する深水条件で、バイオクライترون内21.5℃、野外温室20.5℃の水温が保たれるように、循環コイルで冷却と攪拌を行った。対照区では水没する深水条件のみ同一とし、水温は外気温の変化のままにした。花粉数・種

子稔性調査は主茎のみにサンプリングし、出穂期と登熟後に行った。

(イ) 低温栽培時のイネ雄性生殖器官発達に関するマイクロアレイ解析とRILを利用した耐冷性に関するQTL解析の統合

マイクロアレイ data について、バイオインフォマティックス解析 (階層的クラスタリング、CA 解析等) を行い、低温耐性遺伝子群および低温感受性遺伝子群を選抜した。これら遺伝子群について、イネゲノムデータベースを用いてゲノム中の座乗位置を特定した。常温育成下で花粉稔性・稔実率に差異がないことを確認したひとめぼれ x ササニシキのRIL (F₈、186 個体) について、19℃低温ストレス下での各系統の耐冷性程度について評価した。選抜した遺伝子群について、現在までに同定されている耐冷性QTL (Ctb1、qFRT6、qCT7 等) との座乗位置を比較し、その関連性を調査した。QTL と関連のある遺伝子あるいは新規耐冷性候補遺伝子については、品種間・ステージ間・処理区間での詳細な発現解析や既存の遺伝子発現プロファイルとの比較を行い、耐冷性遺伝子の候補を絞った。

ウ 研究結果

(ア) 地球規模での温暖化での植物ホルモン利活用により作物の安定供給を目指す

IPG0019 では、はじめに、オオムギを用いて高温障害研究を展開した。花粉始原細胞の増殖過程が最も高温に脆弱で、また、薬特異的にオーキシシン量、そのシグナル活性が低下すること、さらに、薬発現オーキシシン生合成遺伝子 *YUCCA* が高温で発現抑制されることを見出した (Sakata et al.¹⁾, Oshino et al.²⁾)。一方、イネ低温障害時には薬ジベレリン応答が活性化し、ジベレリン生合成酵素 SD1 の低下型 (半矮性型) イネ品種では低温に弱く、インド型カサラス *SD1* 置換系統では低温耐性を獲得することを証明した。

オオムギ・シロイヌナズナ高温障害時にはオーキシシンを、イネ冷害時にはジベレリンを、それぞれ外から与えることで花粉形成回復を見出した (図3132-1)。ジベレリンと糖の添加が最も効果的にイネ低温障害の克服が可能であることを示した (図3132-2)。これらは、遺伝子組換え技術を用いることなく、気温変動時に、適切なステージで、オーキ

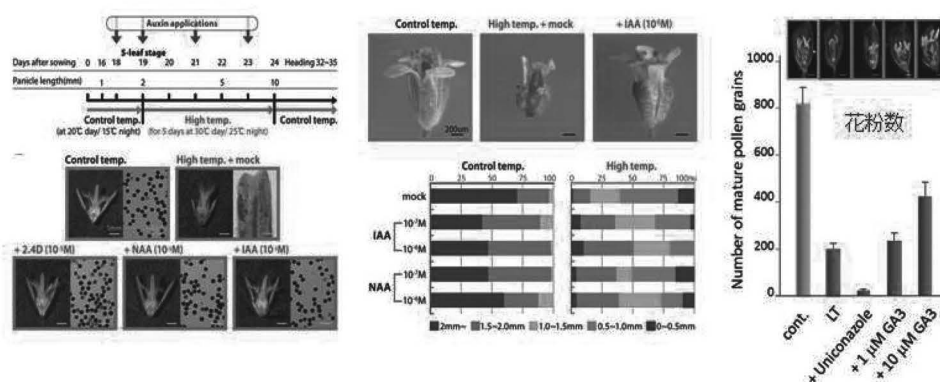


図 3132-1 温度ストレスからの回復に向けた植物ホルモン処理

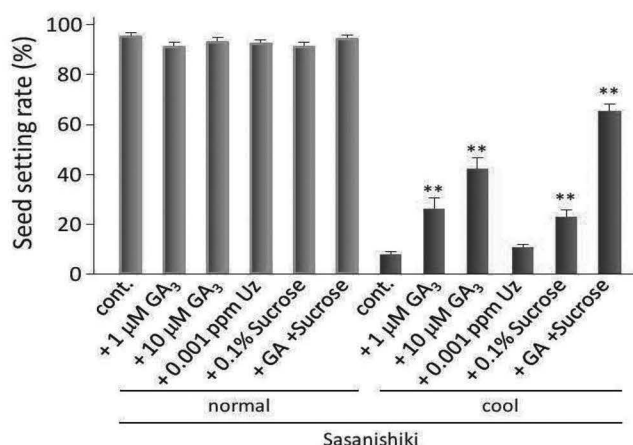


図 3132-2 ササニシキの低温障害におけるジベレリンや糖の添加による種子稔性の回復効果

シン、ジベレリン、糖散布により、温度ストレスに最も脆弱な花粉形成過程を無事通過させ、最終的に種子を結実させ、作物の安定供給に資する新たな技術を確認することができた。

(イ) 低温栽培時のイネ雄性生殖器官発達に関するマイクロアレイ解析と RIL を利用した耐冷性に関する QTL 解析の統合

薬切片観察から、穂孕み期の低温処理で不稔となるササニシキでは、1 細胞性花粉期の葯内でタペート組織の異常肥大を確認した (Oda et al. ³⁾)。

この事実をもとに、低温栽培したササニシキ、ひとめぼれの 1 細胞性花粉期葯のマイクロアレイ発現解析、バイオインフォマティクス解析による評価を行った (Watanabe ⁴⁾, Suwabe et al. ⁵⁾, Hobo et al. ⁶⁾, Endo et al. ⁷⁾, Hamada et al. ⁸⁾, Aya et al. ⁹⁾)。マイクロアレイデータから RAP-DB をもとに遺伝子をクラスタリングし、発現パターンに特異

的な変動がみられる遺伝子を 3 グループ (Group 1: ひとめぼれでのみ発現が上昇 (耐冷性に関与)、Group 2: ササニシキでのみ発現が減少 (低温不稔に関与)、Group 3: ササニシキでのみ発現が上昇) に分類した。Group 1 (56 遺伝子)、Group 2 (47 遺伝子)、Group 3 (25 遺伝子)、あわせて 128 遺伝子が特異的に発現していること、うち Group 1 の 3 遺伝子、Group 2 の 1 遺伝子、Group 3 の 3 遺伝子は既知の耐冷性 QTL 上に座乗することを明らかにした (図 3132-3)。RIL を利用した耐冷性に関する QTL 解析のため、ササニシキ、ひとめぼれ間で確認した各 Indel、SNP 情報をもとにプライマーを作成した。307 Indel プライマーと 68 SNP プライマーの計 375 プライマーにおいて品種識別ができ、これらが QTL 解析マーカーとして適用できることを確認した。

なお、本プロジェクトと関連したイネ、生殖という観点で 100 件以上のアウトリーチ活動を行い、イネの多様性・生殖分野の理解につながったなど、好評を得た。

工 考 察

(ア) 地球規模での温暖化での植物ホルモン利活用により作物の安定供給を目指す

高温・低温ストレス時における花粉稔性の低下の原因が、オーキシン、ジベレリンの生合成低下であり、これらの植物ホルモン添加有効であることを証明できたのは、画期的技術開発であると考えられた。

(イ) 低温栽培時のイネ雄性生殖器官発達に関するマイクロアレイ解析と RIL を利用した耐冷性に関する QTL 解析の統合

アレイによる発現・QTL 解析と RIL を組合せる

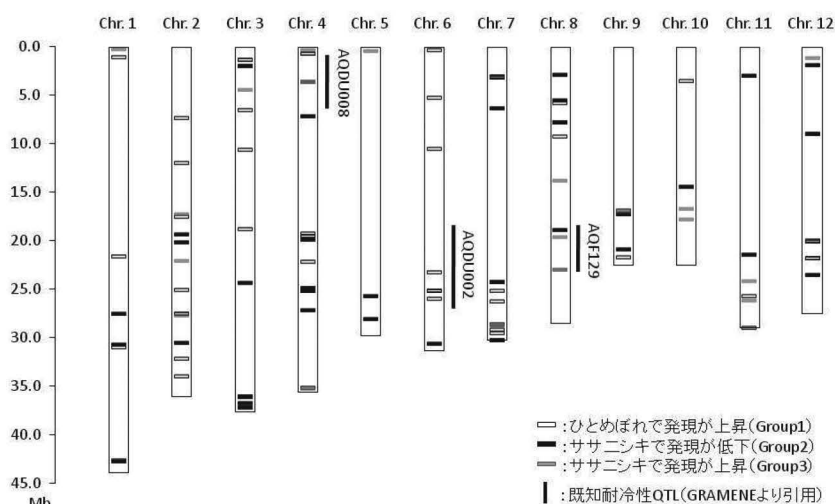


図 3132-3 低温栽培個体の 1 細胞性花粉期葯において発現の特異的変動がみられた遺伝子の座上位置

ことによって、ひとめぼれが有する耐冷性遺伝子の実態解明が可能と考えられる。この手法は、耐冷性だけでなく、複雑な形質の遺伝解析に有効であると考えられた。

オ 今後の課題

(ア) 地球規模での温暖化での植物ホルモン活用により作物の安定供給を目指す

植物ホルモン処理による生殖ステージストレス克服法の普及に向けて、高温、低温障害からの回復にはオーキシン、ジベレリンが重要であることをいくつかの植物、作物種で示したが、どこまで汎用性があることなのか、検証する必要性はある。これらが真に実用化されれば、異常気象に対しての迅速な対応が可能な画期的手法となり得ることから、その普及も重要と考える。

(イ) 低温栽培時のイネ雄性生殖器官発達に関するマイクロアレイ解析と RIL を利用した耐冷性に関する QTL 解析の統合

開花期低温ストレス耐性品種育成に向けて、RIL を用いた QTL 解析から、コシヒカリより良食味であるササニシキをベースとしたコシヒカリに近い耐冷性を持つ系統も存在した。こうした系統を利用することで、脱コシヒカリ品種育成と耐冷性をリンクさせることも可能になると考えられる。

カ 要約

(ア) 地球規模での温暖化での植物ホルモン活用により作物の安定供給を目指す

遺伝子組換え技術では、変動する環境条件に可塑的に対応する作物の作出は現状では困難である。一方、本プロジェクトで明らかにした、高温・低温ストレスという変動温度ストレスを克服し、稔性のある作物を栽培するために、適切な植物ホルモンなどの処理が有効であることを証明し、数種の作物種で有効性があることも示した。

(イ) 低温栽培時のイネ雄性生殖器官発達に関するマイクロアレイ解析と RIL を利用した耐冷性に関する QTL 解析の統合

ひとめぼれが有する耐冷性遺伝子候補を同定し、アレイによる発現・QTL 解析と RIL を組合せる手法が耐冷性だけでなく、複雑な形質の遺伝解析に有効であると考えられた。なお、本プロジェクトと関連したイネ、生殖という観点で 100 件以上のアウトリーチ活動を行い、イネの多様性・生殖分野の理解につながったなど、好評を得た。

キ 引用文献

- 1) Sakata et al. (2010). Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107 : 8569-8574.
- 2) Oshino et al. (2010). Auxin depletion in barley plants under high temperature conditions represses DNA proliferation in organelles and nuclei via transcriptional alterations. *Plant Cell Environ.* 34 : 284-290.
- 3) Oda et al. (2010). Morphological and gene expression analysis under cool temperature

conditions in rice anther development. *Genes Genet. Syst.* 85 : 107-120.

- 4) Watanabe, M. (2008). Towards a comprehensive understanding of molecular mechanisms of sexual reproduction in higher plants. *Plant Cell Physiol.* 49 : 1404-1406.
- 5) Suwabe et al. (2008). Separated transcriptomes of male gametophyte and tapetum in rice : validity of a laser microdissection (LM) microarray. *Plant Cell Physiol.* 49 : 1407-1416.
- 6) Hobo et al. (2008). Various spatiotemporal expression profiles of anther-expressed genes in rice. *Plant Cell Physiol.* 49 : 1417-1428.
- 7) Endo et al. (2009). High temperatures cause male sterility in rice plants with transcriptional alterations during pollen development. *Plant Cell Physiol.* 50 : 1911-1922.
- 8) Hamada et al. (2011). OryzaExpress : An integrated database of omics information and gene expression networks in rice. *Plant Cell Physiol.* 52 : 220-229.
- 9) Aya et al. (2011). Comprehensive network analysis of anther-expressed genes in rice by the combination of 33 laser microdissection and 143 spatiotemporal microarrays. *PLoS One.* 6 : e26162.

研究担当者（渡辺正夫*、東谷篤志）

(3) 登熟期高温で発生する乳白粒を低減する遺伝子の単離・解析 (IPG0020)

ア 研究目的

近年の温暖化によって、イネの登熟期が高温となっており、乳白粒の発生による米品質の低下が問題となっている。高温登熟性は大規模かつ再現性の高い検定が困難であるため、品種育成において改良が難関な形質である。乳白粒の白濁部位では、デンプン粒の充実が不足し、残った空隙が光を乱反射して白濁してみえることが報告されているため、高温によるデンプン蓄積の阻害が乳白粒発生の原因と考えられる。本課題では、登熟期の高温が種子登熟代謝、特にデンプン代謝に及ぼす影響を遺伝子・代謝

物質レベルで解析し、乳白粒が発生する分子メカニズム解明を試みた。特に、高温によるデンプン分解酵素 α -アミラーゼの活性化に着眼し、同酵素の抑制による乳白粒発生の低減効果について検証した。

イ 研究方法

(ア) マイクロアレイ／メタボローム解析による高温登熟代謝の解明

登熟前期の穂が26℃以上の高温に遭遇すると、乳白粒が多発することが知られている。そこで、人工光型インキュベーターを用いて、高温感受性の時期に相当する開花後5-20日目（DAF）のイネ「日本晴」に33℃/28℃（昼温／夜温）の高温処理および25℃/20℃（同）の対照処理を施した。登熟速度の違いを考慮してそれぞれ開花後10日目および12日目に登熟途中種子を採取し、マイクロアレイ解析、メタボローム分析、植物ホルモニー斉定量分析に供試した。マイクロアレイ解析は、登熟途中穎花試料よりRNAを抽出し、アジレント社製44Kマイクロアレイを用い、KEGGおよびRiceCycデータベースを参照し、一次代謝関連遺伝子群の発現プロファイルを整理した。メタボローム分析は、キャピラリー電気泳動-質量分析（CE-MS）によってアミノ酸、糖リン酸、有機酸および糖を定量した。また、植物科学最先端研究拠点ネットワーク（理化学研究所植物科学研究センター榊原均グループディレクター、小嶋美紀子博士）の支援を受けて、LC-MS/MSを用いて主要な植物ホルモンのジベレリン（GA）、アブシジン酸（ABA）、オーキシシン、サイトカイニン、サリチル酸、ジャスモン酸について一斉定量した。

(イ) 登熟期高温で誘導される α -アミラーゼの遺伝子発現解析および酵素活性

インキュベーターを用いて、開花後5-20日目（DAF）のイネ「日本晴」に33℃/28℃（昼温／夜温）の高温処理および25℃/20℃（同）の対照処理を施し、登熟途中の種子を採取し、遺伝子発現解析およびアミラーゼ活性測定に供試した。遺伝子発現はアジレント社製44Kマイクロアレイおよび定量的RT-PCR法によって解析し、アミラーゼ活性は可溶性デンプンを基質としたヨウ素呈色法によって測定した。また、各 α -アミラーゼ遺伝子の組織別（登熟途中種子の胚および胚乳、発芽種子）の発現局在特性について、RiceXProおよびMSUデータベー

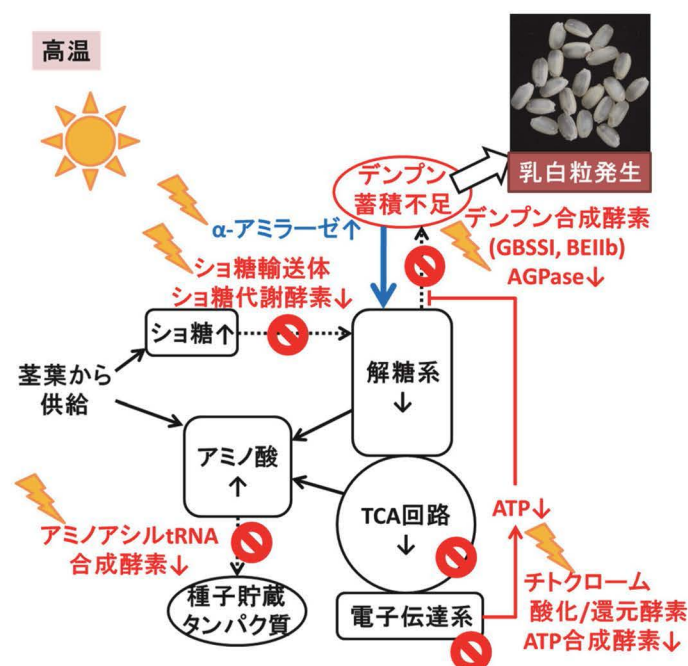


図 3133-1 トランスクリプトーム / メタボローム解析によって明らかとなった
高温が登熟代謝に及ぼす影響
矢印は代謝物質および遺伝子発現の増減を示す。

スを参照し整理した。

(ウ) α -アミラーゼ遺伝子の抑制による乳白粒低減イネの開発

イネゲノム配列において α -アミラーゼ遺伝子は8個存在し、遺伝子ファミリーを形成している。できるだけ多くの α -アミラーゼ遺伝子群の発現を同時に抑制することをねらい、8個の α -アミラーゼ遺伝子間で保存された領域129bpを用いてRNAi系統を作出し、登熟途中種子で大部分の α -アミラーゼがノックダウンされた系統を選抜した。複数の独立した系統について、3世代にわたり、インキュベーター高温登熟システムを用いて登熟期に31℃/26℃の高温処理を施し、玄米外観品質および粒重を評価した。同時に、登熟途中の種子を採取し、各 α -アミラーゼ遺伝子の発現抑制程度を解析した。

ウ 研究結果

(ア) マイクロアレイ / メタボローム解析による高温登熟代謝の解明

これまでの我々の解析から、登熟期の高温によって、登熟期種子においてデンプン合成遺伝子の発現低下およびデンプン分解遺伝子の発現上昇が示唆されており (Yamakawa ら¹⁾)、また、それらの遺伝子のいくつかは既報の乳白粒発生程度を制御す

る QTL の近傍に存在することが明らかとなっていた (Yamakawa ら²⁾)。高温が登熟代謝に及ぼす影響を代謝物質レベルで解明し、デンプン蓄積阻害を引き起こす代謝ステップをより詳細に解明するために、メタボローム解析を行った。その結果、登熟期の高温によって、スクロースの含量が増加し、解糖系および TCA 回路を構成する糖リン酸および有機酸が減少した (図 3133-1) (Yamakawa ら³⁾)。このことから、高温条件において、登熟途中種子へのスクロースの流入と単糖への分解の低下、デンプン合成酵素の低下、 α -アミラーゼ誘導によるデンプンの消化、解糖反応の促進、チトクローム呼吸鎖阻害における ATP 生産効率の低下がデンプン蓄積を低下させる要因と考えられた (図 3133-1)。

(イ) 登熟期高温で誘導される α -アミラーゼの遺伝子発現解析および酵素活性

高温で発生した乳白粒の胚乳白濁部位において、充実不良なデンプン粒の表面に分解痕の小孔が報告されている。このことから、高温による胚乳デンプンの分解が示唆される。そこで、登熟温度が α -アミラーゼの遺伝子発現解析および酵素活性に及ぼす影響を解析した。登熟期の種子におけるアミラーゼ活性を測定したところ、一般的に用いられる反応条件の 37℃、登熟温度を反映した条件の対照区 22℃

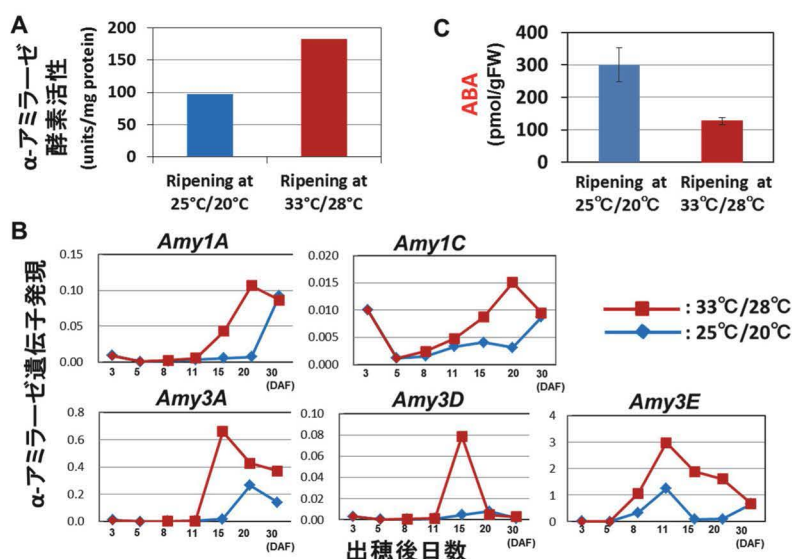


図 3133-2 登熟期の高温による α -アミラーゼの活性化

- A) 高温によって登熟期種子中の α -アミラーゼ酵素活性が上昇した。
 B) 高温によって α -アミラーゼ遺伝子の発現が上昇した。
 C) α -アミラーゼを抑制する植物ホルモンのアブシジン酸は高温によって減少した。

／高温区 30℃のいずれにおいても、登熟前半期（5-20 DAF）の高温処理によって α -アミラーゼ活性が 2 倍程度上昇した（図 3133-2A）（Hakata ら⁴⁾）。また、 α -アミラーゼ遺伝子のうち、*Amy1A*、*Amy1C*、*Amy3A*、*Amy3D* および *Amy3E* は高温によって発現量が増加した（図 3133-2B）（Hakata ら⁴⁾）。このうち *Amy3E* と *Amy3A* は発現レベルが相対的に大きい。RiceXPro データベースを参照すると、*Amy3E* は胚で、*Amy3A* は胚乳で発現するタイプの α -アミラーゼ遺伝子であった。また、MSU データベースによると、*Amy3A* は発芽種子で発現が弱く、登熟途中種子のデンプン性胚乳特異的な発現が示されている。

さらに、高温によって登熟途中種子の α -アミラーゼ遺伝子発現および酵素活性が増加したので、 α -アミラーゼ発現および活性調節に密接に関与する GA や ABA 等の植物ホルモンの登熟期種子中含量を定量した。登熟温度の上昇にともなって、GA₇ および GA₁₉ はわずかに減少したが、活性型 GA 量の増加はみられなかった。一方、登熟期の高温によって ABA 含量は対照区の半分以下に低下した（図 3133-2C）（Hakata ら⁴⁾）。また、ABA 合成遺伝子 *NCED* と ABA 不活化遺伝子 *ABA8ox* の発現もそれぞれ減少および増加した。このことから、 α -アミラーゼは、登熟期の高温によって、遺伝子発現の上

昇のみならず、ABA による抑制が解除されることによって、活性化されていることが示唆された。

（ウ） α -アミラーゼ遺伝子の抑制による乳白粒低減イネの開発

高温によるデンプン分解酵素 α -アミラーゼの活性化が明らかとなったので、 α -アミラーゼの抑制によって乳白粒の発生が低減するか検証した。 α -アミラーゼ遺伝子間で保存された活性制御領域周辺の 129bp を用いて、RNAi による α -アミラーゼ遺伝子群発現抑制組換えイネを作出したところ、複数の独立した系統において、世代を渡り、高温登熟条件（31℃ / 26℃）において乳白粒が低減し、透明な整粒が多く含まれた（図 3133-3）（Hakata ら⁴⁾）。稈実率や粒重の低下はみられなかった。抑制系統の登熟途中種子における α -アミラーゼ遺伝子の発現を解析したところ、コントロール系統と比較して、ほとんどの α -アミラーゼ遺伝子について発現抑制が確認されたが、*Amy1A*、*Amy1C*、*Amy3A* および *Amy3B* の発現レベルが乳白粒の低減程度と高い相関を示した。

エ 考 察

（ア）マイクロアレイ／メタボローム解析による高温登熟代謝の解明

マイクロアレイ解析による代謝関連遺伝子の発現

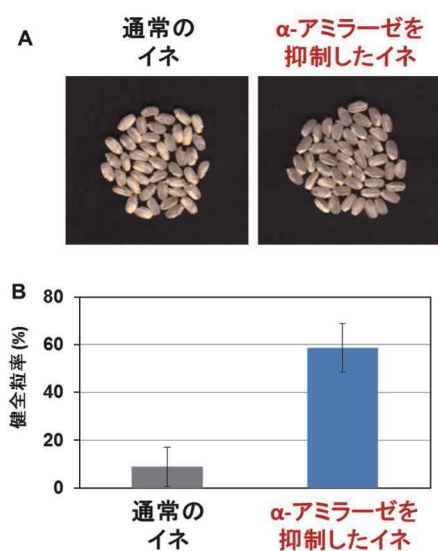


図 3133-3 α -アミラーゼ遺伝子の発現抑制による高温登熟障害の軽減

- A) α -アミラーゼを抑制することによって高温で発生する乳白粒を低減できた。
 B) α -アミラーゼの抑制によって透明な健全粒が増加した。

プロファイルとメタボローム解析による代謝物質の変動を統合解析することによって、登熟期種子において高温によるデンプン合成能力の低下およびデンプン分解の亢進が示唆された (図 3133-1) (Yamakawa ら³⁾)。

高温で発現が低下する遺伝子のうち、スクローストランスポート (SUT1)、ADP-グルコース合成酵素 (AGPS2)、デンプン合成関連酵素 (SSIIIa、BEIIb、PHOL)、糖新生関連酵素 (PPDKB) は、変異体が乳白粒あるいはデンプン蓄積不良となることが知られている。一方、デンプン分解酵素 α -アミラーゼ遺伝子は高温によって発現が誘導され、胚乳強発現によって乳白粒を生じることが知られている。これらのことから、前者の強発現あるいは後者の発現抑制によって、高温による乳白粒発生あるいは粒重低下の抑制が可能と考えられる。本課題では、比較的単純に制御可能なデンプン分解に着眼して、 α -アミラーゼについて高温の影響を解析することとした。

(イ) 登熟期高温で誘導される α -アミラーゼの遺伝子発現解析および酵素活性

高温によって登熟期種子の α -アミラーゼの酵素活性が上昇し、複数の α -アミラーゼ遺伝子の発現が誘導された (Hakata ら⁴⁾)。遺伝子発現プロファイル

データベース RiceXPro を参照すると、デンプン粒の分解痕が認められる胚乳組織においては、*Amy3A* が主働遺伝子と考えられるが、胚乳の周辺部分で発現が誘導される他の α -アミラーゼ遺伝子由来の酵素タンパク質が胚乳に輸送されてデンプン粒を分解する可能性も否定できない。また、 α -アミラーゼは、高温による遺伝子発現の上昇のみならず、植物ホルモン ABA による抑制が解除されることによって、活性化されていることが示唆された。

(ウ) α -アミラーゼ遺伝子の抑制による乳白粒低減イネの開発

(ア) の登熟代謝解析から、デンプン蓄積を向上させ乳白粒の発生を低減させるためには、デンプン合成能力の向上とデンプン分解の抑制の 2 つの方法が考えられる。デンプン合成は、多数の酵素・遺伝子が関与し複雑に制御されていると予想される。一方、高温によるデンプン分解は α -アミラーゼ活性化のみが関与する単純な制御と考えられる。予想通り、登熟期特異的な α -アミラーゼの抑制によって乳白粒の発生が低減した (図 3133-3) (Hakata ら⁴⁾)。 *Amy1A*、*Amy1C*、*Amy3A* および *Amy3B* の発現低下が、乳白粒の低減程度と高い相関を示したことから、これらの遺伝子産物が乳白粒の発生に関与する可能性が高い。しかしながら、本課題ではデンプン合成能力を強化するアプローチについては十分に検討していないため、今後の解析が必要である。

通常は、種子の中にデンプンが蓄積し、透明な健全粒となる。ところが、登熟期に猛暑に遭遇すると、葉の光合成で作られた糖からデンプンを合成する能力が低下するとともに、せっかく作ったデンプンを分解する α -アミラーゼの働きが強まる。このことが、胚乳におけるデンプンの蓄積を低下させ、乳白粒が発生する原因である。 α -アミラーゼ遺伝子群の発現を抑制し、登熟途中段階で働くことができなくなると、高温で発生する乳白粒を低減することができた。

オ 今後の課題

α -アミラーゼ遺伝子の抑制によって乳白粒を低減できることを明示することができたが、今後は、組換え技術を利用せずに、 α -アミラーゼ機能欠失変異を探索し、コシヒカリ等の主力品種へ導入することが求められている。近年、TILLING 法等によって、

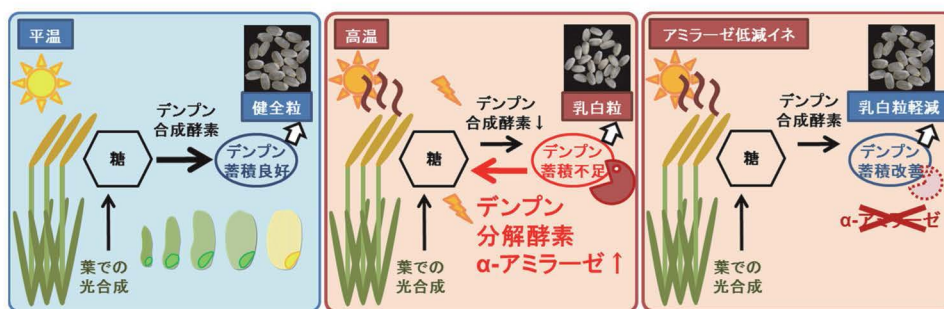


図 3133-4 登熟期高温で乳白粒が発生するメカニズムと α -アミラーゼの抑制による乳白粒発生の軽減

任意の遺伝子の変異アレルを探索することが可能となっている。同法を適用し、予備的に α -アミラーゼ遺伝子変異系統のスクリーニングを行っており、一部の α -アミラーゼ遺伝子領域に変異を有する系統を取得している。現在国内には、九州大学遺伝子資源開発研究センターの金南風・日本晴・台中 65 号や岩手生物工学研究センターのひとめぼれの変異集団ライブラリーが存在するが、まだまだ機能欠失型変異を確実に取得するためには充分とは言い難い。主力品種のコシヒカリ等の背景での変異集団の充実が必要である。

カ 要 約

(ア) マイクロアレイ／メタボローム解析による高温登熟代謝の解明

登熟期の高温によって乳白粒が発生する分子メカニズムを解明するために、登熟期のイネ種子に高温処理を施し、遺伝子発現（トランスクリプトーム）、代謝物質（メタボローム）、植物ホルモン（ホルモノーム）等の種々の網羅的分析を行い、高温条件での登熟代謝の全容解明を試みた。これらの分析結果を統合すると、高温によって種子胚乳へのデンプンの蓄積が阻害されることが示唆された。すなわち、登熟期の高温によって、デンプン合成関連遺伝子（デンプン合成酵素、ADP-グルコース合成酵素等）の発現が低下するとともに、デンプン分解関連遺伝子（ α -アミラーゼ）の発現が上昇し、デンプンの蓄積が阻害されることが見出された。特に、デンプン分解酵素 α -アミラーゼについては、高温下で、その抑制ホルモンであるアブシジン酸が減少し、登熟期種子中の α -アミラーゼ酵素活性の上昇も認められた。高温によるデンプン合成の抑制とデンプン分解の促進の両方が、乳白粒が発生する原因であることが推

察された（図 3133-4）。以上のように、これまで形態観察から予想されていた、高温登熟で発生する乳白粒においてデンプン粒の発達が不充分であるということ、遺伝子および代謝物質レベルで科学的に解明することができた。

(イ) α -アミラーゼ遺伝子の抑制による乳白粒低減イネの開発

次に、乳白粒の発生が低減したイネを開発するために、デンプン分解酵素 α -アミラーゼ遺伝子群を抑制したイネを作出した。同系統は乳白粒の発生が少なく、高温登熟耐性組換えイネとなった。このことから、高温による α -アミラーゼの活性化が、デンプンの蓄積を阻害し、乳白粒を引き起こす原因であることが強く示唆された（図 3133-4）。本研究によって、デンプン分解酵素 α -アミラーゼの抑制という科学的知見に裏付けされた方法で、乳白粒の発生が低減したイネの開発法を提示できた（三ツ井ら⁵⁾、Yamakawa⁶⁾、山川ら⁷⁾、山川ら⁸⁾、山川⁹⁾、山川ら¹⁰⁾、山川¹¹⁾）。

さらに、実用的な高温登熟耐性イネを開発するため、 α -アミラーゼ遺伝子群の機能欠失変異系統を探索するための TILLING スクリーニング条件も構築し、育種素材創出に向けて準備を整えた。

キ 引用文献

- 1) Hiromoto Yamakawa, Tatsuro Hirose, Masaharu Kuroda, Takeshi Yamaguchi (2007). Comprehensive expression profiling of rice grain filling-related genes under high temperature using DNA microarray. *Plant Physiology*. 144 : 258-277.
- 2) Hiromoto Yamakawa, Takeshi Ebitani, Tomio Terao (2008). Comparison between locations of

QTLs for grain chalkiness and genes responsive to high temperature during grain filling on the rice chromosome map. *Breeding Science*. 58 : 337-343.

- 3) Hiromoto Yamakawa, Makoto Hakata (2010). Atlas of rice grain filling-related metabolism under high temperature : Joint analysis of metabolome and transcriptome demonstrated inhibition of starch accumulation and induction of amino acid accumulation. *Plant and Cell Physiology*. 51 : 795-809.
- 4) Makoto Hakata, Masaharu Kuroda, Tomomi Miyashita, Takeshi Yamaguchi, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Toshiaki Mitsui, Hiromoto Yamakawa (2012). Suppression of α -amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature. *Plant Biotechnology Journal*. 10 : 1110-1117.
- 5) 三ツ井敏明・山川博幹 (2009). イネの高温登熟障害と熱ショック. 農林水産技術研究ジャーナル. 32 : 20-25.
- 6) Hiromoto Yamakawa (2011). Omics-based approach for cereal starch biosynthesis: Toward a determination of key factors for quality of rice grain affected by high temperature. *Journal of Applied Glycoscience*. 58 : 35-38.
- 7) 山川博幹・羽方誠 (2011) イネも夏バテをする? / 遺伝子レベルで明らかとなった猛暑が米の品質に及ぼす影響. 化学と生物. 49 : 624-629.
- 8) 山川博幹・羽方誠 (2011). 米の外観品質・食味研究の最前線 [8] - 登熟期の高温が種子遺伝子発現および登熟代謝に及ぼす影響. 農業および園芸. 86 : 562-569.
- 9) 山川博幹 (2011) シリーズ解説: 米の話 (第8回) 米の品質 (1) 玄米品質 登熟期の高温が玄米の品質に及ぼす影響. 食品と容器 52 : 201-205.
- 10) 山川博幹・羽方誠・黒田昌治・宮下朋美・山口武志・小嶋美紀子・榊原均・三ツ井敏明 (2013) 高温で乳白粒が発生する原因を遺伝子レベルで解明—高温登熟耐性品種の開発に期待—. JATAFF ジャーナル. 1 (4) : 24-27.
- 11) 山川博幹 (2013). 遺伝子情報を活用して暑さに強いイネを開発する—デンプンの分解を抑制し、

乳白粒の発生を低減する—. 全農グリーンレポート. 528 : 16-17.

研究担当者 (山川博幹*)

(4) 高温登熟性優良品種の遺伝子発現特性解析と高温耐性関連遺伝子の単離・解析 (IPG0021)

ア 研究目的

地球温暖化に伴うイネ登熟期の異常高温による白濁粒発生が新潟県などの良質米生産地域でも多発している。今後もより深刻な高温被害が懸念されており、高温ストレスに強く、高温登熟性の良いイネの開発が求められている。本研究課題においては、高温登熟性優良品種の遺伝子発現特性の解析から高温登熟で生じる白濁粒発生の分子メカニズムを明らかにし、高温ストレス耐性に関連する遺伝子並びに高温登熟による品質低下に関わる遺伝子を同定、単離する。さらに、単離遺伝子のコメ品質維持に対する有効性について形質転換体や突然変異体を用いて評価し、得られた知見に基づいてこれらの分子育種的利用を目的とする。

イ 研究方法

(ア) 高温登熟性優良品種の遺伝子発現特性の解析

高温登熟性優良品種「ゆきん子舞」、その親品種「ゆきの精」と「どまんなか」並びに高温登熟性の悪い「トドロキワセ」を用いて、35℃の温水を水深15 cm、水量80 L/minで掛け流すことによって高温ストレス処理(石崎¹⁾)し、登熟種子におけるmRNA、酵素および蛋白質の発現変動を調べる。

(イ) 玄米白濁部位の澱粉分子構造解析

整粒と白濁粒の各部位を冷0.2% NaOHに浸漬後、粉碎し、さらに水洗中和、DMSO/エタノールによる脱脂を行う。脱脂澱粉は、イソアミラーゼによる枝切り後、2-アミノピリジン(AP)蛍光標識と分子ふるいクロマトグラフィーに供する。澱粉単位鎖は蛍光検出器と示差屈折計により検出する(花城ら²⁾)。また、イソアミラーゼによる枝切り後、8-アミノピレン-1,3,6-トリスルホン酸(APTS)蛍光標識とキャピラリー電気泳動により解析する(Morellら³⁾)。加えて、整粒と白濁粒の各部位の遊離グルコース量を酵素法により定量する。

(ウ) 玄米白濁部位の局所プロテオーム解析

高温登熟（昼／夜：33℃ 12h / 28℃ 12h）により生じたコシヒカリ白濁粒の白濁部位と整粒の同じ部位を調製する。それぞれの胚乳サンプルからタンパク質を抽出し、トリプシンで消化後、iTRAQ 試薬による標識を行う。陽イオン交換カラムによる分画および C18 カラムによる脱塩処理を行った標識ペプチドサンプルについて nanoLC-LTQ-Orbitrap XL を用いた質量分析を行い、Proteome Discoverer ソフトウェアによるタンパク質定量解析、および同定を行う。（三ツ井ら⁴⁾）

(エ) 高温登熟耐性遺伝子の解析

a Mn 型スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子を強発現および登熟胚乳特異的に発現抑制させた形質転換イネ（日本晴およびゆきん子舞）をグロースチャンバー（昼／夜：30℃ 12h / 23℃ 12h または 33℃ 12h / 28℃ 12h）で育て、収穫した種子（T2）の玄米形質を調査する。

b ゆきん子舞、トドロキワセ、日本晴並びに Mn 型スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子高発現体（日本晴）をグロースチャンバーにおいて高温条件（昼／夜：33℃ 12h / 28℃ 12h）とコントロール条件（昼／夜：28℃ 12h / 23℃ 12h）で処理し、出穂後 4 日目の登熟種子から全 RNA および蛋白質を抽出し、AmyII-3 mRNA の発現解析およびタンパク質発現解析を行う。

(オ) 高温登熟によるコメ品質低下に関わる澱粉分解酵素遺伝子の解析

a アミラーゼ遺伝子の *Tos17* 挿入変異体イネ (*amyI-1* および *amyI-C*) を実験温室で登熟（平均温度：29.77 ± 1.52）させ、穂数、不稔率、千粒重並びに穀粒判別器を用いて玄米の正常粒率を調査する。

(カ) コシヒカリ培養変異系統の解析

コシヒカリのカルス化、懸濁培養、そして再分化を行い、コシヒカリ培養変異系統を作出する。得られたコシヒカリ培養変異系統を実験温室で登熟（平均温度：29.77 ± 1.52）させ、高温登熟玄米の形質調査を行う。

ウ 研究結果

(ア) 高温登熟性優良品種の遺伝子発現特性の解析

登熟温度を 1.4 ~ 1.9℃ 上昇させることができる温水掛け流し圃場（新潟県農業総合研究所）を用いて、ゆきん子舞、ゆきの精、どまんなか並びにトドロキワセの高温登熟性の調査を行ったところ、ゆきの精とどまんなかの両親品種ともにゆきん子舞のような高温登熟耐性は見られなかった。ゆきん子舞とトドロキワセの開花後 4 日目の登熟種子の遺伝子発現特性をマイクロアレイ解析により調べたが、高温登熟耐性に関わる候補遺伝子を見いだすことはできなかった。ゆきん子舞、ゆきの精とトドロキワセの高温登熟種子におけるタンパク質発現を 2 次元ゲル電気泳動法によるプロテオーム解析を行ったところ、ゆきん子舞において特徴的に Mn 型スーパーオキシドジスムターゼが恒常的に強く発現していることが見いだされた。また、高温登熟性の悪いトドロキワセにおいては、高温登熟によってアミラーゼ活性が顕著に高まることが分かった（図 3134-1）。

(イ) 玄米白濁部位の澱粉分子構造解析

高温登熟によって生じた玄米白濁部位の澱粉顆粒構造の観察については以前から研究が行われており、整粒のそれとは大きく異なることが示されている（田代ら⁵⁾）。2009 年（登熟平均気温：24.4℃）と 2010 年（登熟平均気温：28.0℃）の新潟産コシヒカリの白濁粒の白濁部位と透明部位並びに整粒の澱粉鎖長分布を AP 蛍光標識／分子ふるいクロマトグラフィーによって調べたところ、明確な鎖長分布の違いは見られなかった（図 3134-2）。

さらに、同じサンプルを APTS 蛍光標識／キャピラリー電気泳動法により解析した場合においても、澱粉鎖長分布の差異は整粒と白濁粒（透明部位および白濁部位）間で認められなかった。また、異なる収穫年でも差異は見られなかった。しかし、白

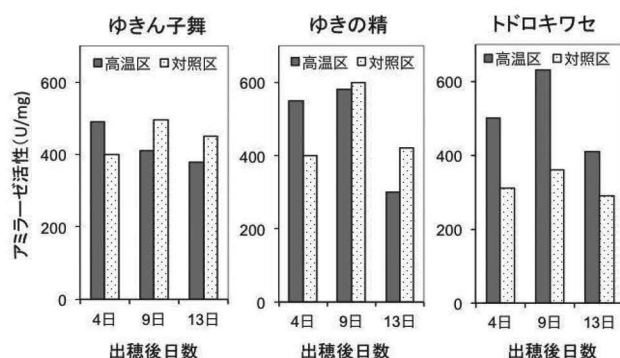


図 3134-1 高温登熟胚乳のアミラーゼ活性変化

濁部位と透明部位（整粒）の遊離グルコースを定量したところ、白濁部位の遊離グルコース量は整粒に比べ2.4倍増加していた。（表 3134-1：筒井ら⁶⁾）

（ウ）玄米白濁部位の局所プロテオーム解析
高温登熟により生じたコシヒカリ玄米の白濁部位

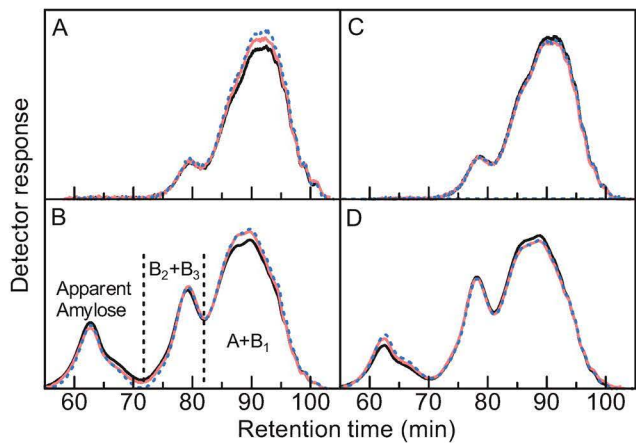


図 3134-2 玄米白濁部位の澱粉鎖長分布
青点線、整粒；ピンク実線、白濁粒透明部位；黒実線、白濁粒白濁部位
A,B) 2009 年度産コシヒカリ、C,D) 2010 年度産コシヒカリ
A,C) 蛍光による単位鎖検出、B,D) 屈折率による単位鎖検出

と整粒の対照部位のタンパク質組成を比較解析したところ、白濁／対照部位の比が2以上に上昇したタンパク質は熱ショックタンパク質やリボソームタンパク質をはじめ89種類あり、0.5以下に減少したものはプロラミン等12種類あった。スターチシンターゼIや枝付け酵素（BE-I、BE-IIb）等の澱粉合成系酵素についてはその発現変動（0.8～1.2倍）は殆ど見られなかったが、興味深いことに、澱粉分解酵素 AmyII-3（Amy3E）については白濁／対照部位の比が約2.6となり、乳白部位で特徴的に増加することが見いだされた（図 3134-3）。

（エ）高温登熟耐性遺伝子の解析
a 高温登熟優良品種であるゆきん子舞において恒常的に強く発現していた Mn 型スーパーオキシドジスムターゼを高温登熟耐性候補遺伝子として解析した。Mn 型スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子を強発現させた形質転換イネを高温登熟させ、玄米形質を調査したところ、野生型（日本晴）に比べ整粒率の向上が認められた。一方、Mn 型スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子を登熟胚乳特異的に発現抑制させた形質転換ゆきん子舞においては野生型と比較して整粒率の低下が見られた。

表 3134-1 白濁部位における遊離グルコース量の変化

($\mu\text{mol}/1\text{g}$ 乾燥試料)

2009		2010	
整粒	白濁粒透明部位	整粒	白濁粒白濁部位
$5.27^c \pm 0.34$	$11.37^b \pm 0.92$	$5.46^c \pm 0.36$	$13.35^a \pm 2.35$
$n = 6; a, b, c \ p < 0.05$			

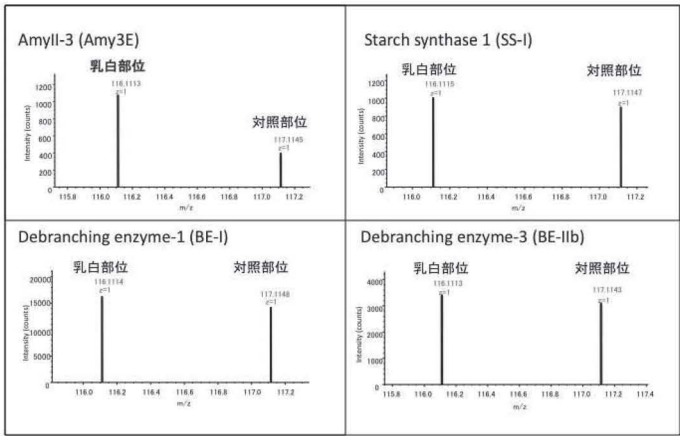


図 3134-3 白濁／対象部位の局所プロテオーム解析

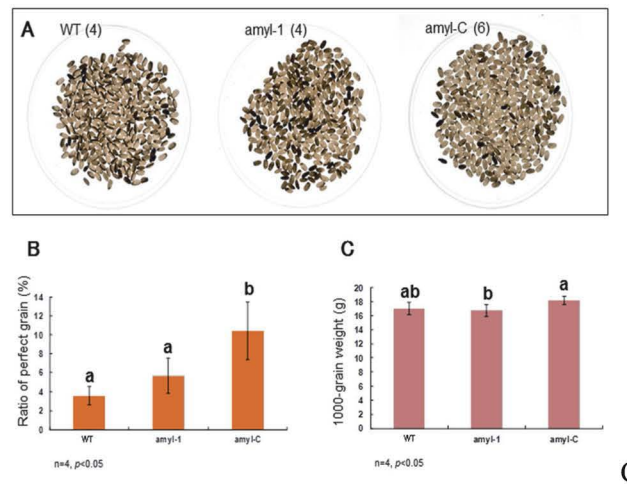


図 3134-4 *Tos17* 挿入 α -アミラーゼ遺伝子変異体の高温登熟性

- A) *amyI-1* および *amyI-C* の高温登熟米の外観
 B) *amyI-1* および *amyI-C* の高温登熟米の整粒率
 C) *amyI-1* および *amyI-C* の高温登熟米の千粒重

b ゆきん子舞、トドロキワセ、日本晴並びに Mn 型スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子高発現体（日本晴）の高温登熟種子の AmyII-3 mRNA の発現をリアルタイム PCR 法により調べた。日本晴野生型の登熟初期の AmyII-3 mRNA 発現は高温条件下で著しく上昇するが、Mn 型スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子高発現体では AmyII-3 mRNA の発現が野生型と比較して約 5 分の 1 に低下した。また、ゆきん子舞とトドロキワセの登熟初期の AmyII-3 mRNA 発現を見ると、Mn 型スーパーオキシドジスムターゼを構成的に発現しているゆきん子舞では高温処理による AmyII-3 mRNA の発現変動は少ないが、一方、トドロキワセでは高温による AmyII-3 mRNA の発現誘導が見られた。続いて、Mn 型スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子高発現イネの高温登熟種子の定量的ショットガンプロテオーム解析を行ったところ、野生型と比較して活性酸素消去系および分子シャペロン／クオリティーコントロール系のタンパク質発現が著しく増加することが分かった。しかし、コントロール条件においては大きな発現変動は見られなかった。さらに興味深いことに、Mn 型スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子高発現イネにおいては AmyII-3 (Amy3E) の著しい発現抑制が見いだされた。

(オ) 高温登熟によるコメ品質低下に関わる澱粉分解酵素遺伝子の解析

上述のように、高温登熟で生じた玄米白濁部位に

おいて α -アミラーゼの発現が高まること、そして α -アミラーゼ遺伝子強発現イネにおいて玄米白濁化がより顕著になること（浅妻ら⁷⁾）から、高温登熟による α -アミラーゼの異常発現がコメ品質低下の要因の 1 つと推察される。そこで、 α -アミラーゼ遺伝子の *Tos17* 挿入変異体イネ (*amyI-1* および *amyI-C*) を高温登熟させ、穂数、不稔率、玄米千粒重並びに正常粒率を調査した。本実験条件では、野生型日本晴の不稔率および玄米正常率はそれぞれ 60%、3.6%であったが、*amyI-C* 変異体では若干の改善傾向を示した。玄米千粒重と穂数については α -アミラーゼ遺伝子の欠損によって特に影響は見られなかった。（図 3134-4）

(カ) コシヒカリ培養変異系統の解析

現在、2,000 のコシヒカリ培養変異系統を保持しており、さらにコシヒカリ培養変異系統の拡充のためカルス懸濁培養、再分化、種子採取を進めている。コシヒカリ培養変異系統を高温登熟させ玄米品質の調査をしたところ、比較的高頻度（約 1%）にコシヒカリ原種に比べて高温登熟性の改善された系統が出現することが分かった（図 3134-5）。高温登熟性の向上したコシヒカリ培養変異系統（NNK306）については、高 CO₂ 環境による品質低下についても耐性を示すことが見いだされた。

工 考 察

(ア) 玄米白濁部位の澱粉グライコミクスおよび

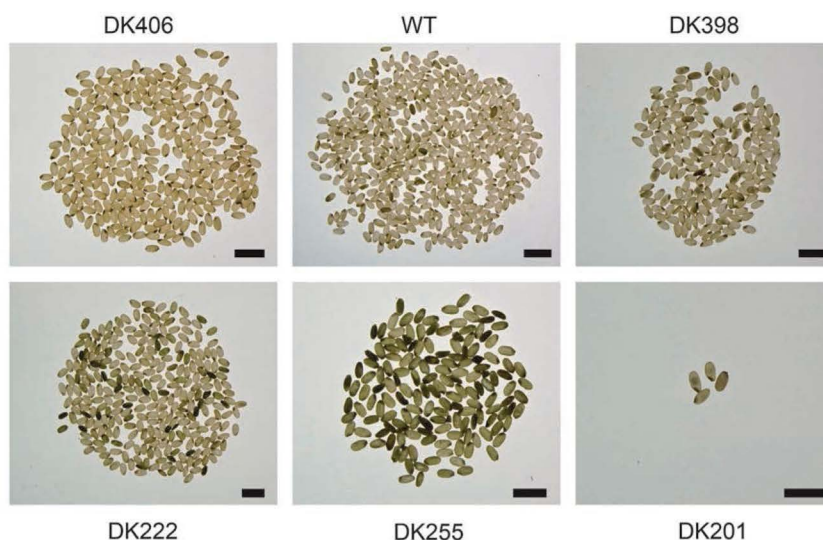


図 3134-5 コシヒカリ培養変異系統の玄米形質
WT、原種コシヒカリ；DK、培養変異系統

プロテオミクス

高温登熟による白濁粒の発生の要因として、高夜温による呼吸量の増加による光合成産物の減少、穂への輸送機能の低下、高温下での穂における同化産物受入れ能力の低下、穂における貯蔵組織の細胞成長やデンプン集積プログラムの乱れなどが考えられている。これらの要因が複雑に絡み合って白濁化が起るものと思われるが、明快な答えは未だ明らかになっていないのが現状である。しかし、玄米の白濁化は澱粉顆粒の異常形態が主要原因であることは間違いない。高温登熟による米粒澱粉鎖長分布の変化が多くの研究グループによって観察されている。そして、澱粉鎖長の変化は澱粉枝付け酵素 (BEIIb) の機能低下によるものであることが報告されている (西ら⁸⁾)。これらの報告から、澱粉生合成能の低下によって丸みを帯びた澱粉顆粒が形成され、米粒の白濁化を引き起こすものと考えられている。私達は、新潟県で 2009 年度 (登熟平均温度: 24.4 °C) と 2010 年度 (28.0 °C) に収穫されたコシヒカリを用いて玄米白濁部位の澱粉微細構造の解析を行った。玄米白濁部位とそれと同じ整粒の部位の澱粉鎖長分布を調べたところ、アミロペクチンの鎖長分布には殆ど違いが見られなかった。一方、整粒と白濁部位の遊離グルコース量を定量したところ、白濁部位において遊離グルコースの顕著な蓄積が見られた (筒井ら⁶⁾)。これらの結果と米粒局所プロテオミクスの解析データから、澱粉合成よりはむしろ澱粉分

解酵素が玄米白濁化のメカニズムに強く関与しているものと推察された。

(イ) 高温登熟耐性遺伝子

高温登熟優良品種「ゆきん子舞」の登熟種子において特徴的に強く発現する Mn 型スーパーオキシドジスムターゼを見いだした。Mn 型スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子を強発現させると高温登熟性が向上し、発現を抑制すると低下することが分かった。ゆきん子舞および Mn 型スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子強発現体の登熟種子の AmyII-3 の発現を mRNA およびタンパク質レベルで調べてみたところ、高温ストレスによる発現上昇が著しく抑制されていることが分かった。これらの結果は Mn 型スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子が高温登熟性に関わる重要な因子の 1 つであることを示している (図 31344)。

(ウ) 高温登熟による米品質低下に関わる澱粉分解酵素遺伝子

高温登熟性の悪いトドロキワセにおいては高温登熟によってアミラーゼ活性が顕著に高まるが、ゆきん子舞ではそれほど大きな変化はないことが分かった。また、 α -アミラーゼ遺伝子の強発現によって玄米の白濁化が起こり (浅妻ら⁷⁾)、発現抑制によって高温登熟による品質低下が軽減されることが明らかになった (羽方ら⁹⁾)。これらの結果から、高温登熟による α -アミラーゼの異常発現、澱粉合成・分解のバランス異常がコメ品質低下の要因の 1 つであ

ると考えられた。

オ 今後の課題

(ア) 玄米白濁部位の澱粉グライコミクスおよびプロテオミクス

玄米の白濁化は高温ストレスのみならず日照不足や高CO₂濃度など他の環境要因でも助長される。様々な環境要因で生じた白濁部位の澱粉グライコムおよびプロテオームを比較解析し、白濁化メカニズムを理解する必要がある。

(イ) 高温登熟耐性遺伝子

Mn型スーパーオキシドジスムターゼの機能を強化すると高温登熟性の向上をもたらす。Mn型スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子強発現体の特徴的な性質として高温登熟による α -アミラーゼ発現の異常な上昇を抑えることが明らかになってきたが、その α -アミラーゼ発現制御メカニズムの詳細を明らかにする必要がある。

(ウ) 高温登熟によるコメ品質低下に関わる澱粉分解酵素遺伝子

登熟期における α -アミラーゼ遺伝子の異常発現がコメ品質低下に関わる1つの重要な因子であることが分かってきた。一方、 α -アミラーゼの発現はイネ種子の発芽には必須である。従って、発芽時における α -アミラーゼの働きを維持し、登熟期の α -アミラーゼ発現を抑える技術を開発することが今後の課題である。

カ 要 約

高温登熟性優良品種の遺伝子発現特性の解析並びに玄米白濁部位の澱粉グライコムおよび局所プロテオーム解析から高温登熟耐性遺伝子としてMn型スーパーオキシドジスムターゼを見だし、また、玄米の外観品質の低下を引き起こす α -アミラーゼを見いだした。これらの遺伝子の発現を調節することによって高温登熟性を改善できることを示した。今後は、コシヒカリの品質改善における高温登熟性関連遺伝子の有効性の検証を進める必要がある。

キ 引用文献

- 1) 石崎和彦 (2005). 水稻の高温登熟性の評価法と品種間差異. 農業技術. 60 : 458-461.
- 2) I. Hanashiro, M. Tagawa, S. Shibahara, K. Iwata and Y. Takeda (2002). Examination of molar-based distribution of A, B and C chains of amylopectin by fluorescent labeling with 2-aminopyridine. *Carbohydr. Res.* 337 : 1211-1215.
- 3) M.K. Morell, M.S. Samuel and M.G. O'Shea (1998). Analysis of starch structure using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *Electrophoresis.* 19 : 2603-2611.
- 4) T. Mitsui, T. Shiraya, K. Kaneko and K. Wada (2013). Proteomics of rice grain under high temperature stress. *Front Plant Sci.* 4 : 36.
- 5) T. Tashiro and I.F. Wardlaw (1991). The effect of high temperature on kernel dimensions and the type and occurrence of kernel damage in rice. *Aust. J. Agric. Res.* 42 : 485-496.
- 6) K. Tsutsui, K. Kaneko, I. Hanashiro, K. Nishinari and T. Mitsui (2013). Characteristics of opaque and translucent parts of high temperature stressed grains of rice. *J. Appl. Glycosci.* 60 : 61-67.
- 7) S. Asatsuma, C. Sawada, A. Kitajima, T. Asakura and T. Mitsui (2006). α -Amylase affects starch accumulation in the rice grain. *J. Appl. Glycosci.* 53 : 187-192.
- 8) A. Nishi, Y. Nakamura, N. Tanaka and H. Satoh (2001). Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiol.* 127 : 459-472.
- 9) M. Hakata, M. Kuroda, T. Miyashita, T. Yamaguchi, M. Kojima, H. Sakakibara, T. Mitsui and H. Yamakawa (2012). Suppression of α -amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature. *Plant Biotechnol. J.* 10 (9) : 1110-1117.

研究担当者 (三ツ井敏明*)

第2章 各個別研究課題の概要

1 穂や草型など収量の決定に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

(1) イネの直立葉形質に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0004)

ア 研究目的

理想的な直立葉の実現を目指して、ブラシノステロイド (BR) 生合成酵素遺伝子 *CYP90D2/D2* に生じた変異 (*d2*) について、その応用効果を検証する。前年度までに単離した BR 不活性化酵素遺伝子を利用して、直立葉形質を有する遺伝子組換えイネを作出する。

イ 研究方法

(ア) 直立葉を示す *d2* 変異体弱アリルについてその効果を検証するため圃場栽培試験を行った。

(イ) BR 生合成酵素遺伝子のプロモーターを用いて BR 不活性化酵素遺伝子を発現させた形質転換イネについて形質評価を行った。

(ウ) オーキシシン処理がイネの BR 感受性を高めるメカニズムについて、BR 受容体遺伝子 *OsBRI1* の発現調節を介していることを明らかにした。

ウ 研究結果

(ア) *d2* 弱変異の効果を正確に検証するため、昨年度単離した台中 65 号由来の TCM885 と TCM886 について圃場栽培試験を行った (表 3211-1)。その結果、*d2* 弱変異 (TCM885, TCM886) は穂数 (有効分げつ数; 73, 63%)、草丈 (78, 74%)、稈長 (68, 67%) を減少させたが、穂軸長 (122, 114%)、枝梗数 (119, 126%)、枝梗長 (116, 121%) を増加させたほか、1 枝梗あたりの稈実種子数 (126, 143%) を増やし、株あたりの稈実種子数 (113, 114%) の増加に結びついた。

(イ) *d2* 弱変異体は矮性を示すと同時に稈が太くなる傾向が認められたことから、本年度圃場栽培した個体を用いて稈強度の測定を行った (表 3211-2)。第 4 節間を用いて大川・石原 (1992) の方法を用いたところ、*d2* 弱変異 (TCM885, TCM886) は外長径 (112, 111%)、内長径 (114, 114%) が増加し、挫折時モーメント (152, 140%) も著しく増加していた。一方、曲げ応力は両変異体で有意に変化していなかったことから、*d2* 弱変異は稈質に影響を与

表 3211-1 圃場栽培した *d2* 変異体の草型および穂形質

(<i>n</i> = 5)	穂数	草丈 (cm)	稈長 (cm)	穂軸長 (cm)	枝梗数	枝梗長 (cm)
台中65号	8.2 ± 0.6	119.46 ± 1.99	85.81 ± 2.21	17.04 ± 1.15	11.6 ± 0.8	6.35 ± 0.30
TCM885	6.0 ± 0.4	92.9 ± 1.2	58.55 ± 1.60	20.80 ± 1.22	13.8 ± 0.3	7.39 ± 0.27
TCM886	5.2 ± 0.6	88.20 ± 1.16	57.66 ± 1.24	19.50 ± 0.55	14.6 ± 0.6	7.69 ± 0.39

(<i>n</i> = 5)	稈実種子/株	稈実種子/穂	稈実種子/枝梗	不稈種子/株	不稈種子/穂	不稈種子/枝梗
台中65号	657.6 ± 78.1	81.1 ± 11.8	6.9 ± 0.6	273.8 ± 33.4	33.8 ± 5.1	2.9 ± 0.4
TCM885	739.8 ± 42.6	123.6 ± 2.9	8.7 ± 0.3	235.8 ± 29.8	39.3 ± 3.2	2.9 ± 0.2
TCM886	746.6 ± 28.9	144.3 ± 16.5	9.9 ± 1.2	252.0 ± 72.0	47.9 ± 8.4	3.3 ± 0.6

えるのではなく、稈を太くすることによって稈強度を高めていることが明らかとなった。

(ウ) 上記の結果から、d2 弱変異体は New Plant Type 型の多収品種とよく似た形質を示していることが明らかとなった。実際にハバタキ、タカナリ、ホシアオバ、クサホナミなどの多収品種には共通した d2 弱変異 (V725M) が見付き、同変異はそれらの品種に共通した交配親である IR8 にまで起源を遡ることができた。この結果から、d2 弱変異が New Plant Type 型の多収性品種育成に利用されてきた可能性が考えられた。

(エ) 前年度作出した BR 不活性化酵素遺伝子発現イネの後代を用いて形質評価を行った。d2 弱変異体の表現型を再現することを目的として、D2 遺伝子のプロモーター制御下で BR 不活性化酵素遺伝子 CYP734A6 を発現させた形質転換体のうち、草

丈の減少が認められなかった 2 系統の後代について隔離温室内でポット栽培試験を行った (表 3211-3)。その結果、穂軸長、枝梗数、枝梗長の増加傾向が認められ、その効果は穂数 (有効分げつ数) が減少した系統でより顕著であった。

(オ) d2 変異体の表現型が品種の遺伝的背景に影響される現象について、トランスポゾン mPing の挿入による BR 受容体遺伝子 OsBRI1 の発現抑制が原因である可能性を前年度までに示した。この研究過程で見出した、OsBRI1 の発現がオーキシン処理により一過的に上昇する現象 (図 3211-1) について解析を行った。

その結果、OsBRI1 のプロモーター領域にはオーキシン応答配列 (AuxRE) が存在し、イネのオーキシン情報伝達因子 OsARF24 が同配列に結合すること (図 3211-2)、osarf24 変異体では OsBRI1 の発

表 3211-2 圃場栽培した d2 変異体の稈形質および強度

(n = 25)	外長径 (mm)	外短径 (mm)	内長径 (mm)	内短径 (mm)	挫折時モーメント (g cm)	断面係数 (mm ³)	曲げ応力 (g/mm ²)
台中65号	5.73 ± 0.42	5.38 ± 0.35	4.42 ± 0.35	3.82 ± 0.26	1536.4 ± 250.4	11.96 ± 2.29	129.94 ± 11.22
TCM885	6.43 ± 0.18	6.12 ± 0.14	4.90 ± 0.24	4.26 ± 0.16	2333.2 ± 255.6	17.58 ± 1.55	132.89 ± 10.14
TCM886	6.37 ± 0.29	6.12 ± 0.26	4.91 ± 0.29	4.33 ± 0.28	2149.2 ± 374.4	17.04 ± 2.36	125.96 ± 12.10

表 3211-3 ポット栽培した形質転換体の草型および穂形質

(n = 5)	穂数	草丈 (cm)	稈長 (cm)	穂軸長 (cm)	枝梗数	枝梗長 (cm)
Control	8.6 ± 0.6	119.80 ± 2.12	82.10 ± 2.93	17.02 ± 0.52	11.5 ± 0.6	6.02 ± 0.16
TD2 #2-2	7.3 ± 0.9	119.78 ± 4.43	84.15 ± 5.62	19.56 ± 0.63	12.3 ± 0.5	7.44 ± 0.47
TD2 #4-2	10.8 ± 1.3	111.70 ± 3.30	82.44 ± 1.09	17.72 ± 1.11	12.9 ± 0.2	6.46 ± 0.29

(n = 5)	稈実種子/株	稈実種子/穂	稈実種子/枝梗	不稈種子/株	不稈種子/穂	不稈種子/枝梗
Control	564.8 ± 91.4	65.5 ± 7.9	5.8 ± 0.4	315.8 ± 51.7	36.8 ± 6.2	3.2 ± 0.5
TD2 #2-2	579.3 ± 44.3	80.9 ± 6.8	6.5 ± 0.3	265.8 ± 26.6	37.2 ± 4.3	3.1 ± 0.5
TD2 #4-2	724.3 ± 112.3	67.0 ± 4.2	5.3 ± 0.3	436.3 ± 62.8	40.5 ± 2.2	3.2 ± 0.3

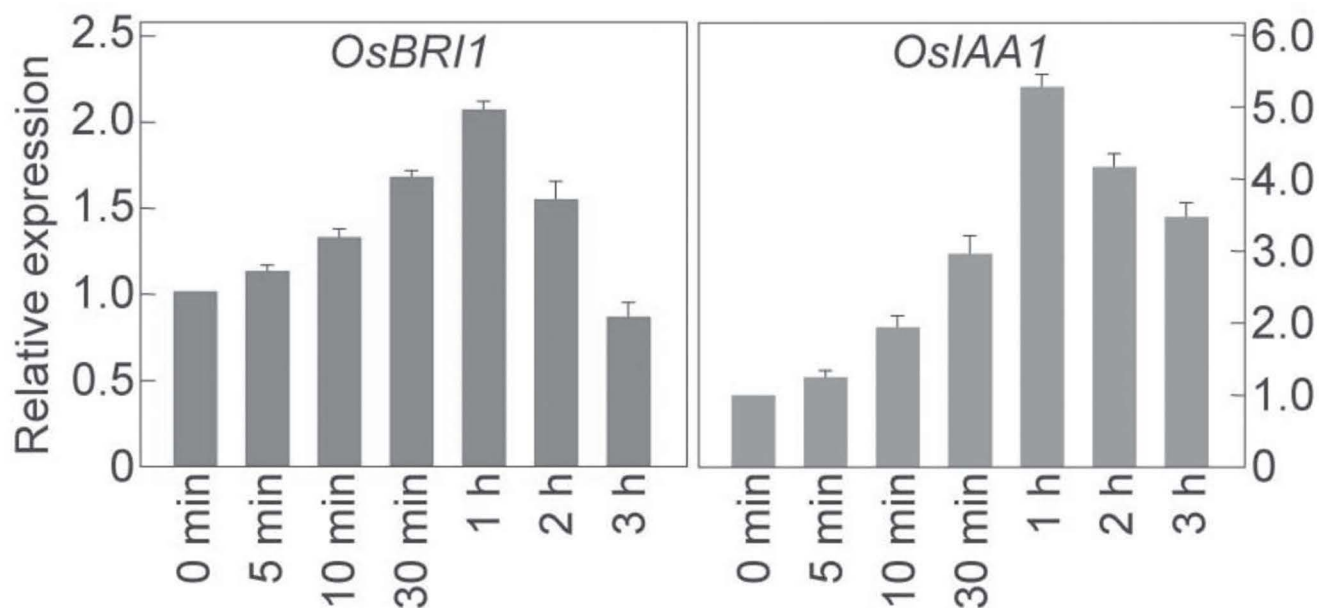
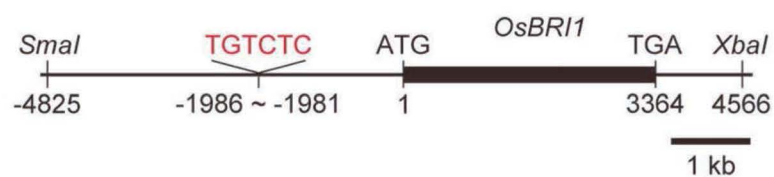


図 3211-1 オーキシン処理による *OsBRI1* 遺伝子発現の一過的誘導



WT:attccttacTGTCTCagggtcat.....

M1:attccttacAGTCTCagggtcat.....

M2:attccttacAAAAATCagggtcat.....

Vector control	+	-	-	-	-	-	-	-
OsARF1	-	+	+	+	+	+	+	+
WT probe	+	+	+	+	+	+	+	+
WT comp.	-	-	×1	×10	×100	-	-	-
M1 comp.	-	-	-	-	-	×10	×100	-
M2 comp.	-	-	-	-	-	-	-	×10 ×100

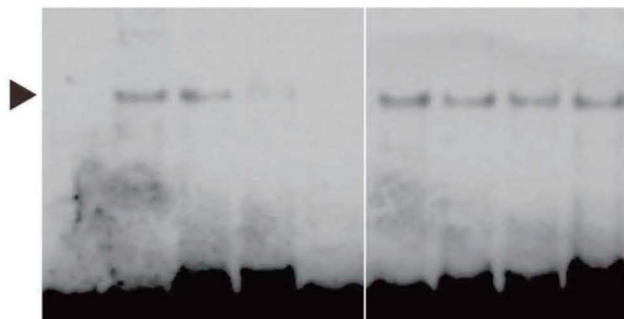


図 3211-2 *OsBRI1* プロモーターにはオーキシン応答配列がある

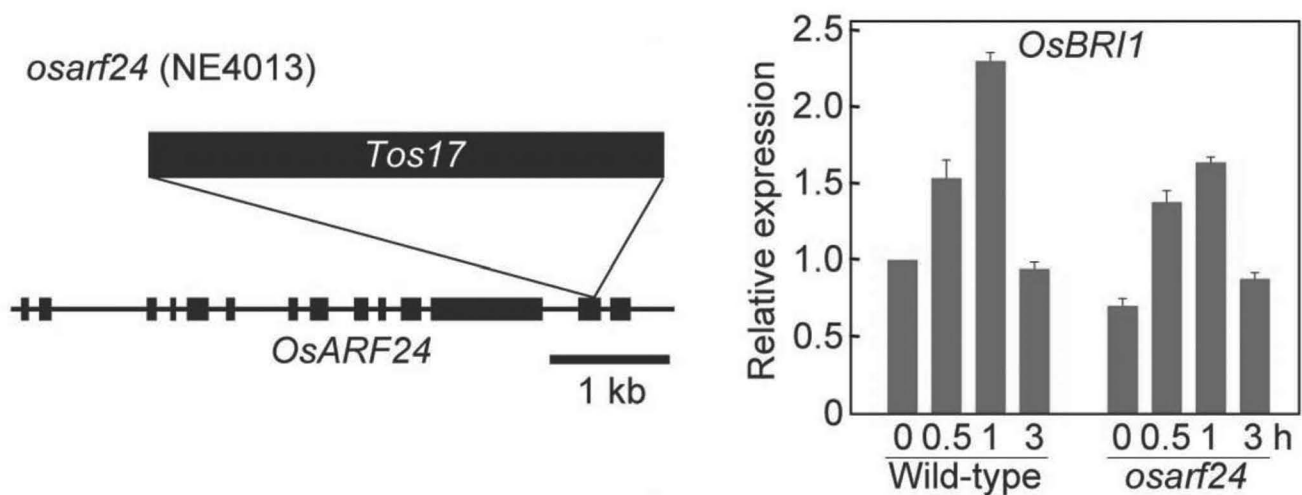


図 3211-3 *OsARF24* は *OsBRI1* 遺伝子の転写調節に関わっている

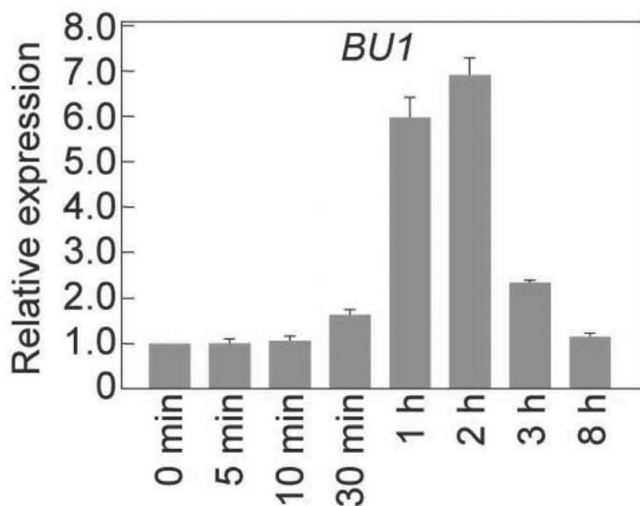


図 3211-4 *BU1* はオーキシン処理によって一過的に発現誘導される

現が低下していること（図 3211-3）、オーキシン処理によって BR 応答性遺伝子 *BU1* の発現が一過的に上昇すること（図 3211-4）などを明らかにした。

オーキシン存在下では BR の濃度依存的な *BU1* の発現誘導が 100 倍程度高まることが明らかになった（図 3211-5）。

エ 考察

New Plant Type 型の多収品種は 20 世紀後半に IIRI が展開した多収育種の結果開発された小分蘗多粒穂を持つイネを中心とした試みである。今回明らかとなった d2 弱変異体（V725M）がハバタキ、タカナリ、ホシアオバ、クサホナミなどの多収品種に共通して維持されており、それらの品種に共通し

た交配親である IR8 にまで起源を遡ることがと言うことは、これまでの育種過程で d2 弱変異が New Plant Type 型の多収性品種育成に利用されてきた可能性が考えられた。さらに、図 3211-5 で示したように、オーキシン存在下で BR の濃度依存的な *BU1* の発現誘導が 100 倍程度高まることが明らかになった。この結果から、オーキシン処理が BR 受容体 *OsBRI1* の発現量を増やすことにより BR 感受性を高めている事が想定出来る。さらにこれらの結果は、植物生長調節剤として BR を利用する上で有効に利用できると考えられた。

オ 今後の課題

（ア）本年度の圃場栽培試験結果は猛暑の影響を強く受けていると考えられる。引き続き d2 変異の弱アリルおよび形質転換イネについて検証する必要がある。

（イ）d2 遺伝子座に隣接して別の多収形質関連遺伝子 *Gn1a* が存在する。両者の関係について明らかにする。

カ 要 約

イネの草型を制御する因子として、ブラシノステロイドに着目して研究を行った。内生ブラシノステロイド含量を人為的に制御するために、ブラシノステロイド不活性化に関与すると考えられた C-26 水酸化酵素に着目し、過剰発現イネを作出したところ、実際にイネ内でブラシノステロイド含量を低下されることを示した。さらに、酵素学的特性について解

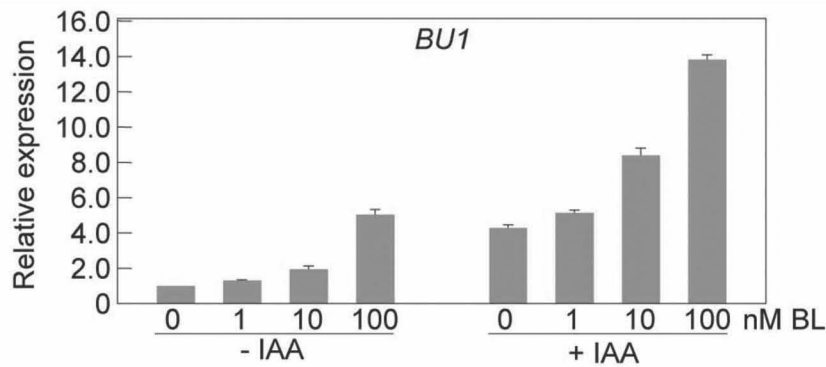


図 3211-5 オーキシシン処理は BR 応答性を高める

析し、シロイヌナズナやトマトのそれとは異なる形質を有することを明らかにした。さらに、ブラシノステロイド非感受性変異体の原因遺伝子としてユビキチン E3 リガーゼを単離しその機能解析を行った。これらの結果は、イネの草型改良に向けての分子の基盤を提供しうる。

キ 引用文献

- 1) Tomoaki Sakamoto and Makoto Matsuoka (2008). Identifying and exploiting grain yield genes in rice, Current Opinion in Plant Biology. 11 (2) : 209-214.

研究担当者 (坂本 知昭*)

2 酸化還元ストレス、カドミウム、栄養不足等の環境ストレス耐性に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

(1) 放射性核種を用いたカドミウム及びミネラル養分のイメージング・トレーサー解析 (IPG0009)

ア 研究目的

放射性核種を用いたカドミウム (Cd) やミネラル養分 (マグネシウム) のイメージング・トレーサー解析技術を開発し、Cd 動態を把握することにより有用な表現型を探索することを目的とした。Cd イメージングについては、個体レベルから組織レベルに至る広範囲の対象において解析できるための技術開発を目的とした。

イ 研究方法

(ア) カドミウム -109 によるトレーサー実験とイ

メージング

イネにおいてカドミウム動態を広範囲な対象において解析した。すなわち、生産上重要な穂を含めた地上部全体から玄米内分布および節における導管・師管付近に至る微細空間に至る範囲まで解析した。(図 3221-1)

a 地上部全体のカドミウムトレーサーイメージング

経根で Cd-109 を 72h 吸収させたイネにおいて、イメージング・プレートで Cd-109 を検出した後、Cd-109 強度をヒートマップ図で表した画像を、光学スキャナー図と重ね合わせた。また、葉身において約 25 μ m の凍結切片を作成後、イメージング・プレートで Cd-109 を検出した。

b 各器官におけるカドミウムトレーサーイメージング

(a) 凍結切片法とイメージング・プレートを用いたカドミウム分布の可視化

切片画像の検出効率および高解像度のための条件を、シミュレーションを用いて検討した。Cd-109 が発する放射線の強度や量を調べ、それらの透過力や相互作用のパラメーターを基にモンテカルロシミュレーション計算コード EGS5 にて検出の検証を行った。次に、最適と思われる条件を選択して実際の Cd イメージングを行った。自然光バイオトロンで生育させたイネについて、Cd-109 を 24 時間吸収させたのち、サンプリングを行い、凍結切片を作成した。凍結切片はあらかじめ冷した BAS-TR にコンタクトさせ、バックグラウンド低減のための 1mm 鉛で覆って -80 $^{\circ}$ C で 5 日間感光させた。感光された BAS-TR は、FLA-5000 で 10 μ m を 1 ドットとして読み取りを行った。

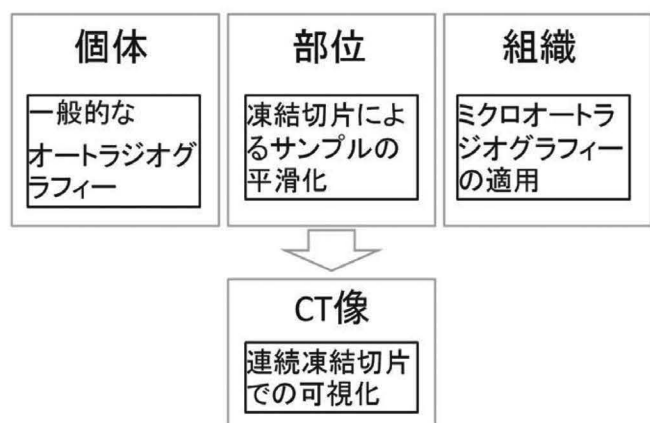


図 3221-1 本研究で取り扱った Cd-109 イメージング

(b) 地上部におけるカドミウム分配解析

① 根から吸収された Cd の移行を調べるため、日本晴（第 6 本葉抽出時期）の幼植物に Cd-109 を 15 分間吸収させ、直後、1 時間後、3 時間後に葉位ごと葉身 (Blade)、葉鞘 (Sheath) に分けて移行量を求めた。

② Cd^{+} 等の溶質を分配していると考えられる茎について、切片を作成しイメージングを行った。

(c) CT 像の構築

播種後約 1.5 か月に最初の開花を確認し、5、10、15、20 日目に 1MBq の Cd-109 を水耕液に添加し 24 時間吸収させた。その後開花後 26 日目に達した玄米をサンプリングした。尚、この時既に登熟していた。サンプリングした玄米は凍結させ、 $5\mu\text{m}$ の切片を $100\mu\text{m}$ ごとに川本法で取得し、イメージング・プレート (TR) にコンタクトさせた。5 日後に FLA-5000 で画像化した。背腹軸、左右軸、上下軸の 3 軸それぞれに直交する面を観察可能なように、3 粒の玄米を同時に包埋・切片採取・撮像した。得られた連続切片の画像は、Image J で 3D 構築を行った。

c 各組織レベルの解像度を目指したマイクロオートラジオグラフィの植物組織内溶質解析への応用

Cd が水溶性画分にも存在している状況で可視化するために、全ての行程は凍結環境下で実施した。すなわち、凍結切片を作成し、前適用法（分離法）において、Cd-109 の検出を実施した。撮像した試料植物組織は、Cd-109 添加水耕液を吸収させたイネ（日本晴）の止め葉節とした。原子核乳剤には、Ilford nuclear research emulsion K5 (Harman technology) を用いた。感光時間である 10 ～ 20 日

間の後、現像した。現像液として D-19 (Kodak) (40g/L)、停止液としてイオン交換水、定着液としてチオ硫酸ナトリウム溶液 (300g/L) を用いた。現像・停止・定着処理時間はそれぞれ $3 \cdot 1 \cdot 4$ 分とした。

(イ) マグネシウム—28 の製造・精製とトレーサー実験

マグネシウムの放射性同位体である Mg-28 は半減期が約 21 時間と大変短いため、市販されておらず、自ら製造し直ちに実験に供する必要がある。そこで、本課題では、Mg-28 を製造・精製の後、イネの Mg 欠乏実験に供した。

a マグネシウム—28 の製造・精製

純アルミニウム箔 (99.999%、ニラコ：厚さ 0.1mm 、直径 10mm) 20 枚に対して、AVF サイクロトロン (CYRIC、東北大学) で発生させた 50MeV アルファ線ビーム (約 $3\mu\text{A}$) を約 6 時間照射し、 $^{27}\text{Al}(\alpha, 3p)^{28}\text{Mg}$ の核反応で Mg-28 を製造した。塩酸で溶解後、Sep-Pak Plus tC18 カートリッジ (Waters) を通した後シュウ酸を添加し、陽イオン交換樹脂 AG50W-X4 (H^{+} ; $100\text{--}200\text{ mesh}$) を通すことでアルミニウムやナトリウムを除去した。最後に、塩酸で Mg-28 を溶出した。蒸発乾固を 2 回繰り返して純水に溶解して Mg-28 溶液とした。

b マグネシウム—28 を用いたイネにおける Mg 欠乏応答試験

播種後 2 週間のイネをマグネシウムを含まない水耕液に移植した 8 日後において、Mg-28 (400 kBq/L) を供与し、30 分後の Mg-28 分布をイメージング・プレートによるオートラジオグラフィで検出した。

ウ 研究結果

(ア) カドミウム -109 によるトレーサー実験とイメージング

イメージング・プレートで、出穂したイネ全体の Cd イメージングを日本晴で行った。その結果、節において強いシグナルが確認できた (図 3221-2)。尚、解像度を調べるために葉鞘を拡大して調べたところ、葉脈を確認できる程度の解像度であった。

続いてより詳細を観察するため、イメージング・プレートに接する部位の平滑化等の目的で凍結切片を作成し、EGS5 によるシミュレーションの検討結果を基にイネ切片を $10\mu\text{m}$ で作成してイメージングを行った (図 3221-3)。その結果、成熟初期の玄米

縦断面において、Cd-109の分布を明確に示すことができた。また、節の横断面においては、維管束へのCd-109の集積を、不伸長節間の縦断面図では、節や維管束へのCd-109の集積を検出することができた。

Cdについて実施したところ、吸収直後は、下位葉が最も多く新しい葉には少ないことが示された(図3221-4)。その後1時間、3時間と時間が進むに従い、最新葉に多く移行していた¹⁾。

仮にCdが最新葉に茎から直接移行しているとすると、吸収直後の時点で葉の根元で検出されるはずである。そこで、葉の根元および茎部の切片を作成してイメージングを行った。その結果、Cdは中心の最新葉と茎の接続部位に多く分布しており、成熟葉の維管束部にも分布していた(図3221-5)¹⁾。

凍結切片法を用いて、玄米中のカドミウム分布を様々な角度から観察できるよう、CT像の構築を目指した。玄米はサンプリング後直ちに凍結させ、凍結状態のまま連続切片を作成し、トリチウム専用のイメージング・プレートであるTR型を利用して可視化した。その概要を図3221-6に示す。この技術を用いて様々な時期にCd-109をパルス投与したイネを用いて、玄米中のCd-109分布の3D化(CT像)

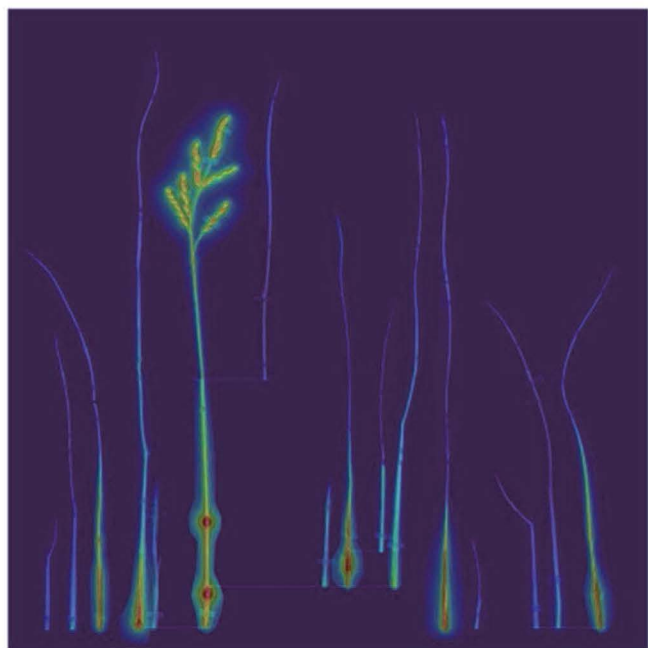


図3221-2 開花後約2週間のイネにおける¹⁰⁹Cd分布。経根で¹⁰⁹Cdを72時間吸収させた。イメージング・プレートで¹⁰⁹Cdを検出した後、¹⁰⁹Cd強度をヒートマップ図で表した画像を、光学スキャナー図と重ね合わせた

を行ったところ、登熟していない種子ではCdが種子全体に広がるのに対し、登熟した種子では、周囲の組織の留まっていることがわかった(図3221-7)。

さらに、より詳細なCd分布を知るために、マイクロオートラジオグラフィー法の植物への適用を試みた。Cdは水溶性画分にも存在している可能性が高いため、感光操作が終了するまで水溶性物質が移動・拡散しない手法であることが求められた。そこで、凍結切片試料に適用可能である技術開発を実施した。条件検討の結果、3つのプロトコル(図3221-8)まで候補を絞り、実際の植物試料を用いて試験を実施した。尚、乳剤薄膜と切片の関係から「分離法」「非分離法」と呼称する。さらに、分離法については、原子核乳剤薄膜の形成手法として、ディッピング法とワイヤーループ法(図3221-9)の検討を、また、スライドガラスの表面処理として、剥離防止シランコート処理を試行した。その結果、シランコート処理済スライドガラスにワイヤーループ法で乳剤膜を形成する方法が最も成績が良かった。つまり、現像中にスライドガラスから乳剤膜が剥離してしまうこともなく、膜厚にムラも少なかった。次に分離法の結果を図3221-10に示す。試料は止め葉節の横断切片で、比較のため光学像およびIP像を並べて示した。分離法ではIP像と比較して高精細な像が得られており、今回の結果からは直径100μm前後の維管束における篩部と木部を識別できた。

(イ) マグネシウム-28の製造・精製とトレーサー実験

Mg-28は半減期約21時間と短いことから市販されていない核種である。よって、植物でMg-28のトレーサー実験をしたい場合は、その直前に自ら製造する必要がある。今回実施した方法で製造・精製したMg-28は純度が高く、他の放射性物質は存在しなかった(図3221-11)^{2), 3)}。直ちに東京大学へ輸送し農学部で実験を実施した。

播種後2週間後のイネにおいて、Mg欠乏処理を行うと最初に第5葉(L5)でネクロシスが表れ、8日後のMg欠乏処理後にMgを再投与しても数日後にL5は枯死した⁴⁾。この条件において、Mg欠乏処理後8日目のイネにおいて、Mg-28を利用して移行分布を観察したところ、L5において極端にMg移行量が少なかった(図3221-12)⁴⁾。

エ 考 察

(ア) カドミウム -109 によるトレーサー実験とイメージング

出穂したイネにおいて節に Cd-109 の局在が見られたこと（図 3221-2）から、節がカドミウムの分配に大きな役割を果たすことが示された。さらに、凍結切片による詳細な可視化を節で実施したところ、Cd は中心の最新葉と茎の接続部位に多く分布しており、成熟葉の維管束部にも分布していた（図 3221-5）。新しい葉で Cd が比較的早い時間に検出されること（図 3221-4）を合わせて考えると、根から吸収された Cd は茎部で最新葉へ移行することが示された¹⁾。

本研究では、解像度を最大限高めるための検討を重ねた。また、対象が溶質であることを考慮し、全ての行程を凍結のまま進める方法にこだわった。そ

の結果、凍結切片を作成し、イメージング・プレートで検出する方法が確立された。この方法の最大の利点は、高い定量性である。切片にすることで、サンプルの厚さが一定となり、イメージング・プレートへ密着させることができるようになった。この高い定量性を応用することで、比較的簡易な画像データ処理から、サンプルの立体視（3D）や CT 像を構築するに至った。

物質動態を解析するにあたっては、長距離輸送の要である導管や篩管といった組織が観察できるレベルの解像度が求められることが多い。そこで、さらなる高解像度を目指しマイクロオートラジオグラフィを行った。ここでも、凍結下で全ての作業をするべく検討した結果、節において維管束レベルを分けられる程度の解像度で可視化が可能となった。植物サンプルにおいて、凍結下で溶質の分布を詳細

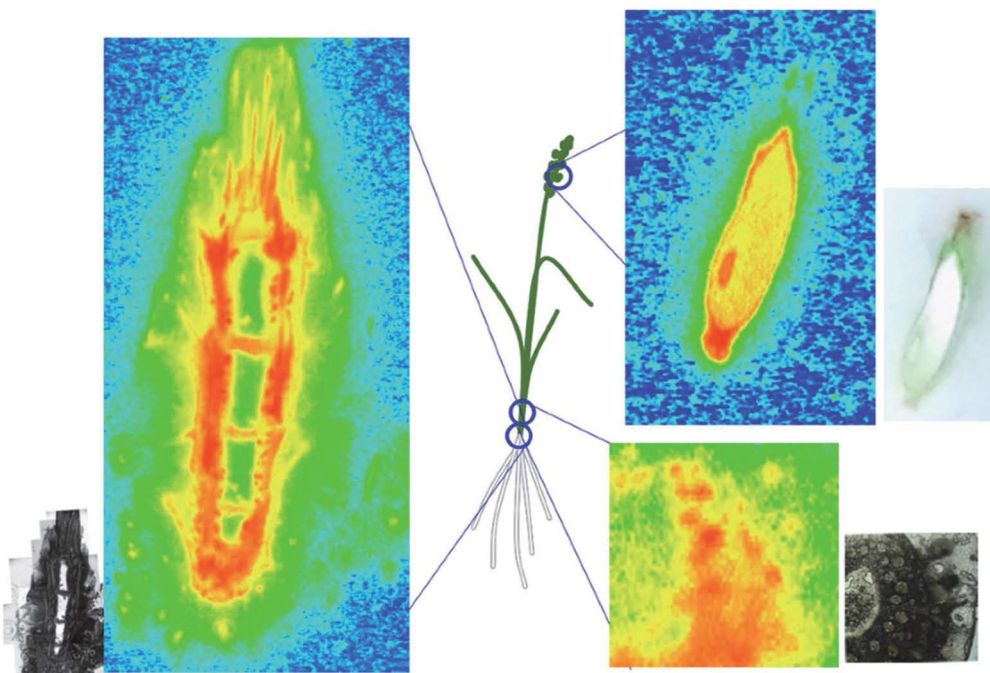


図 3221-3 節、玄米において作成した凍結切片を用いた Cd-109 の可視化。凍結切片をイメージング・プレートで検出した

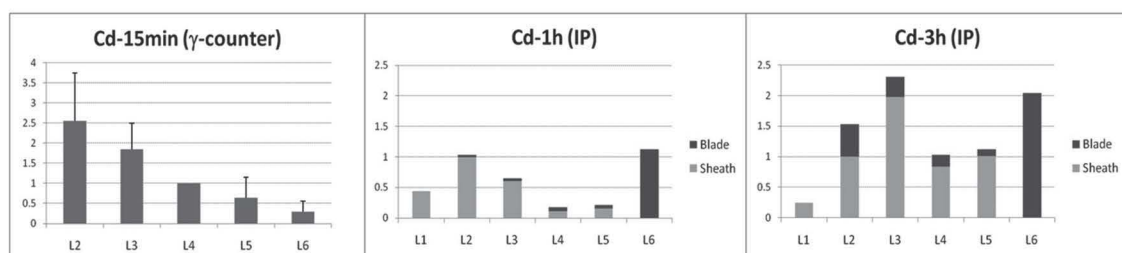


図 3221-4 15 分間カドミウム -109 を経根吸収させた後の地上部分配

a: ガンマーカウンターで各葉を測定し相対計数値で表した

b, c: 葉をイメージング・プレートで可視化した後、シグナル強度を相対値で表した

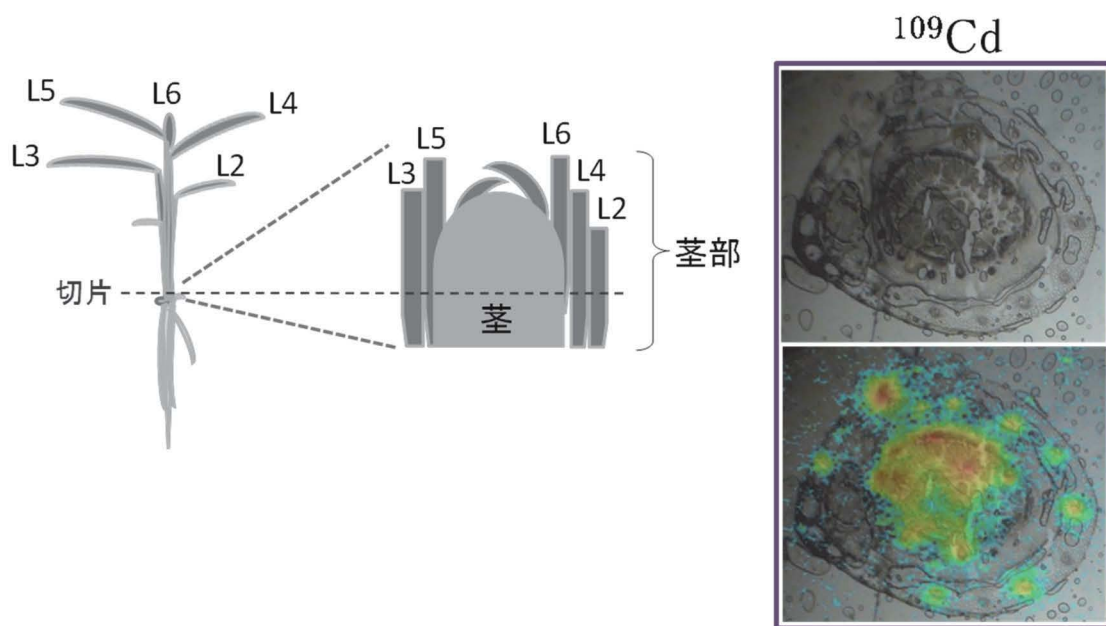


図 3221-5 茎の凍結切片の Cd-109 の可視化

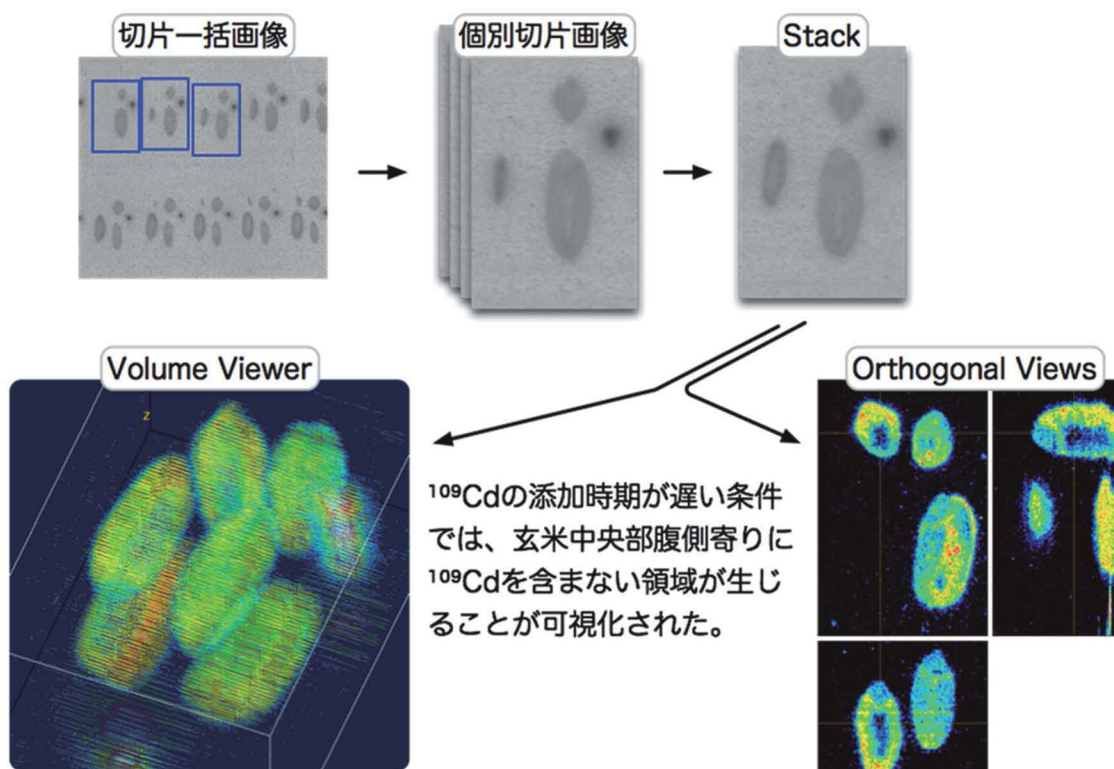


図 3221-6 連続凍結切片のオートラジオグラムに基づく 3 次元画像構築の概略図

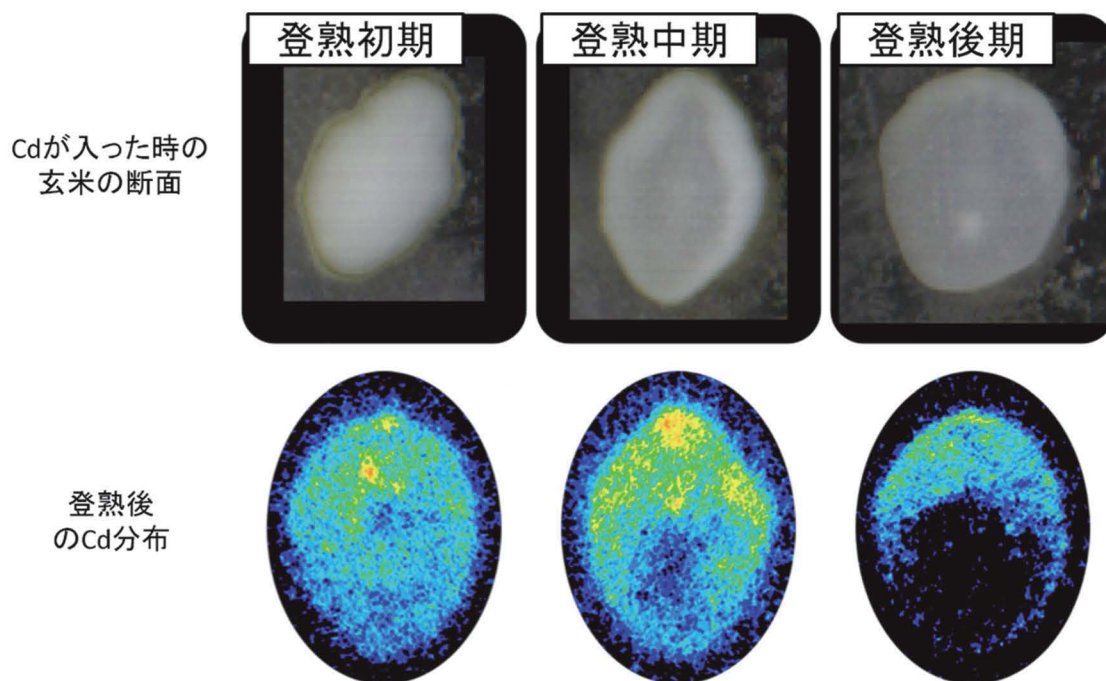


図 3221-7 カドミウム 109 をパルス投与した玄米の登熟後のカドミウム 109 分布

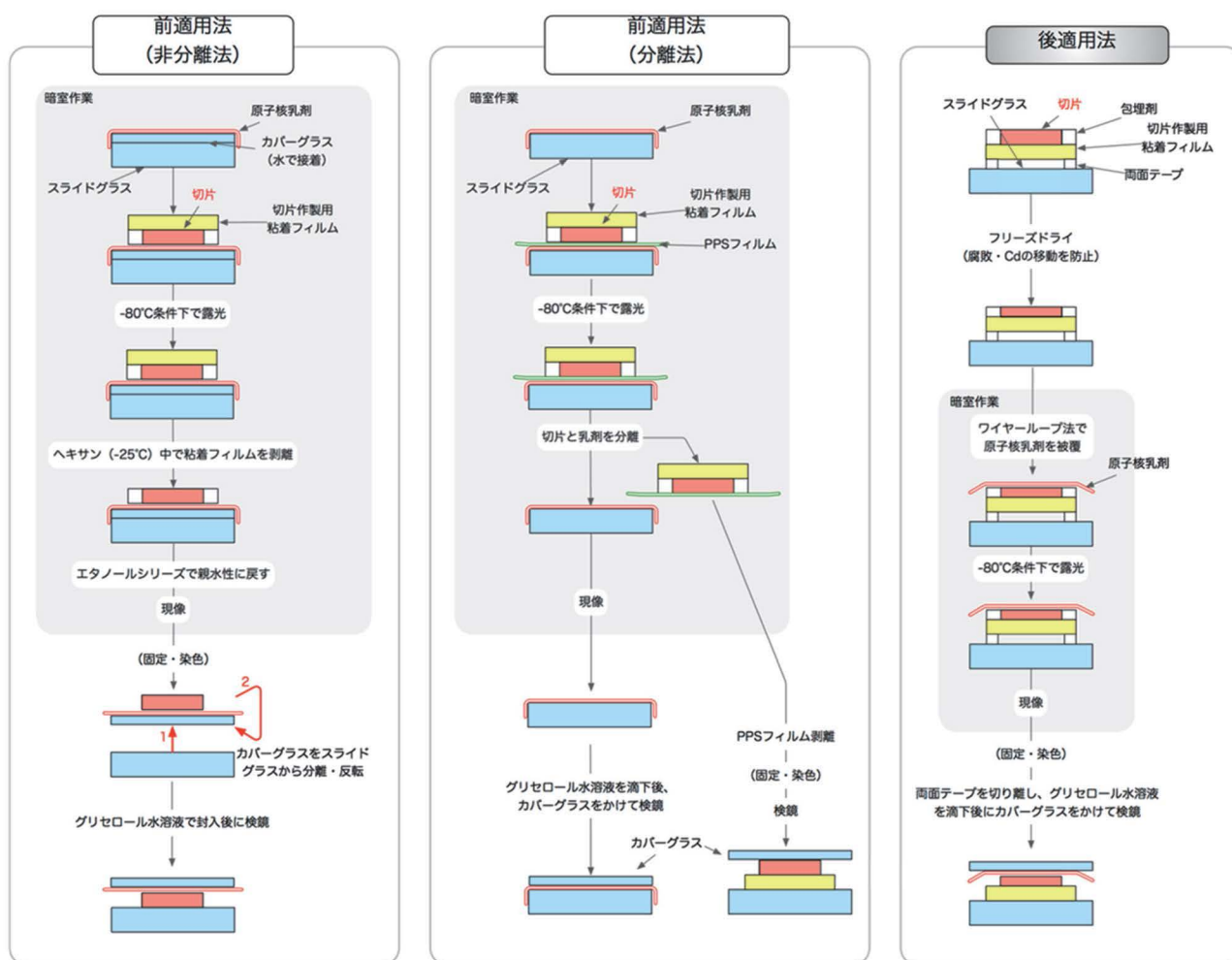


図 3221-8 凍結切片のマイクロオートラジオグラフィーの各行程：前適用法（非分離法、分離法）、後適用法

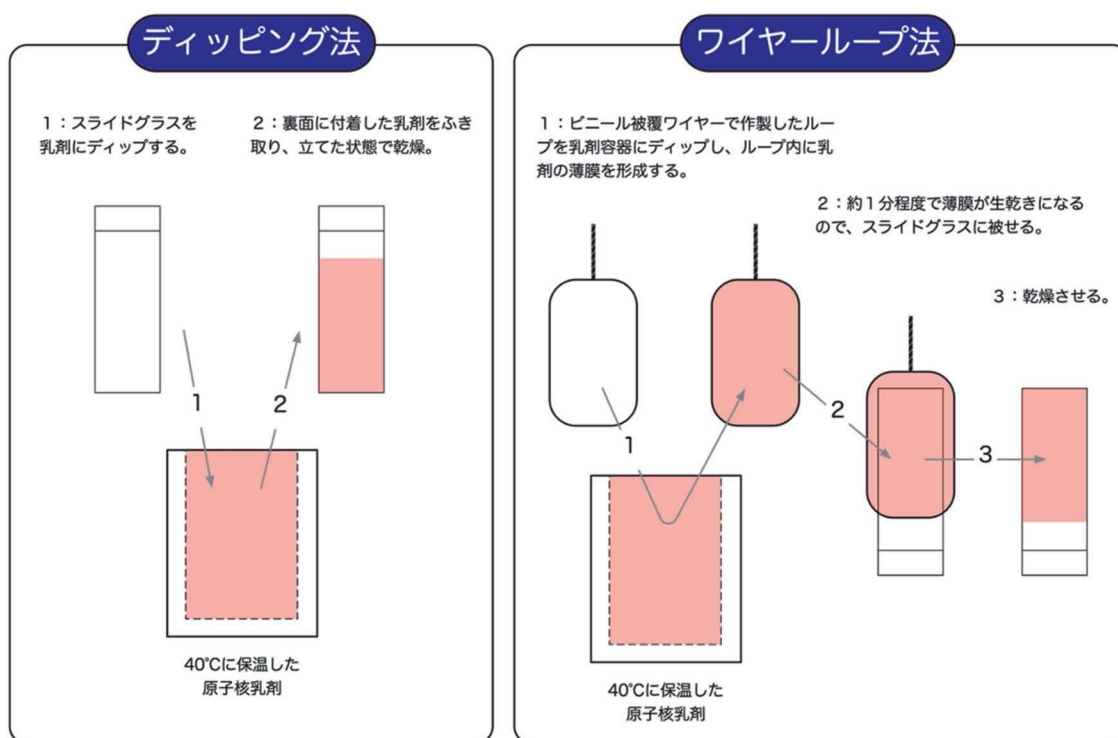


図 3221-9 原子核乳剤薄膜の形成手法（ディッピング法とワイヤーループ法）

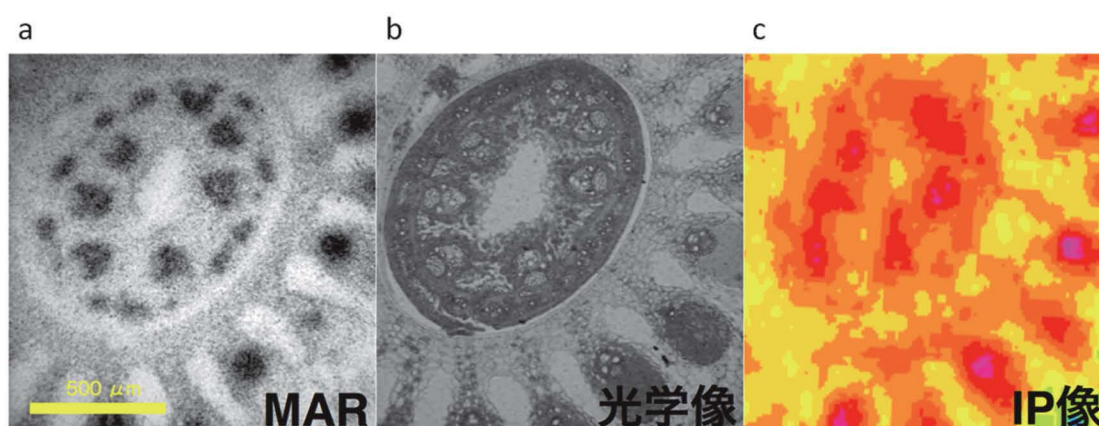


図 3221-10 分離法で取得したマイクロオートラジオグラフィー像の例。a: 分離法による感光銀粒子像（RI 分布像） b: 同じ切片的光学像 c: 同じ切片的イメージング・プレート像

にトレーサー解析できるこの手法は、多くのニーズに応えられる解像度を有する。

（イ）マグネシウム-28 の製造・精製とトレーサー実験

マグネシウムの輸送機構を調べるにあたっては、安定同位体が存在するものの、放射性同位体はその半減期の短さから、実験に用いることが困難であった。そこで、本研究では製造して実験に供する系を確立した³⁾。現況、世界中で Mg-28 を製造・精製してトレーサーとして利用しているのは、本研究グ

ループのみである。

マグネシウム欠乏症状として最初に現れる形質については既報があり、シロイヌナズナにおいては葉に糖が蓄積することが初期症状であった。イネで調べたところ、マグネシウム欠乏によりすべての葉が枯れ始めるわけではなく、ある特定の葉から順番に枯れることがわかった⁴⁾。さらに Mg 欠乏下の Mg 輸送を Mg-28 で解析したところ、Mg 欠乏処理後 8 日目の植物体において、特定の葉（L5）の Mg-28 移行量が激減していることがわかった。さらに解析

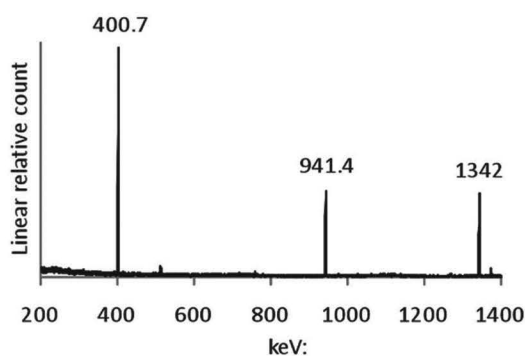


図 3221-11 精製したマグネシウム 28 (Mg-28) のガンマスペクトル

を進めたところ、L5 において欠乏 6 日目では光合成活性に変化がないものの、蒸散速度はやや減少した。さらに 8 日目では、L5 の光合成活性がやや減少し、蒸散速度は大きく減少した。これらのことから、Mg 欠乏が生じる順として、葉の蒸散速度低下による養分元素の供給不足がまずおこり、その後光合成活性が減少することが分かった⁴⁾。Mg 欠乏症状や応答においては未知な部分が多いが、葉ごとに明確に分けて試験できるイネで本実験を実施することは大きなメリットがある。

その他、Mg-28 が製造できたことにより、pH による Mg 吸収への影響⁵⁾、アルミニウムによる Mg 吸収への影響⁶⁾、根の Mg 吸収部位の解析⁷⁾といった解析が可能となった。今後も、多くのトレーサー実験に用いられることが期待される。

オ 今後の課題

(ア) カドミウム -109 によるトレーサー実験とイメージング

節での RI イメージングが高解像度で可能となった。この技術を様々な元素・溶質の動態に適用していく必要があるであろう。

(イ) マグネシウム -28 の製造・精製とトレーサー実験

確立された実験系を、変異体解析等実際の実験に適用していくことが必要である。

力 要 約

(ア) カドミウム -109 によるトレーサー実験とイメージング

イネの様々な組織、様々な大きさ、様々な解像度

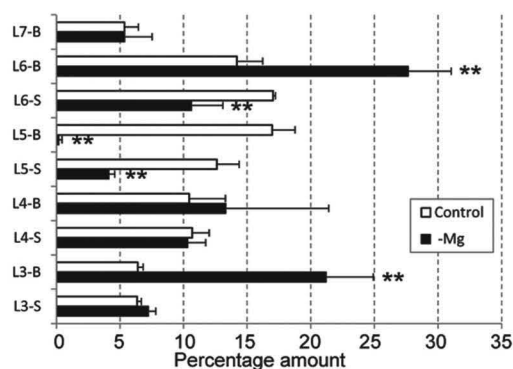


図 3221-12 マグネシウム欠乏イネにおけるマグネシウム 28 を経根吸収後の地上部分分布

にて Cd-109 のイメージング技術を開発した。その結果、器官レベルの可視化においては CT 像を得ることができるようになった。さらに高解像度での撮像としてマイクロオートラジオグラフィーが凍結切片下で検討され、組織レベルでの可視化が可能となった。

(イ) マグネシウム -28 の製造・精製とトレーサー実験

半減期約 21 時間のため市販されていないマグネシウム 28 をイネにおいてトレーサー実験をするための実験系を確立した。この Mg-28 をイネのマグネシウム欠乏時の吸収実験に用いたところ、特定の葉 (L5) へ Mg-28 が移行しないことがわかった。この葉は、Mg 欠乏を続けると最初に枯れる葉であった。さらに解析を進めたところ、この葉のみ蒸散速度が低下していたことから、イネにおいて Mg 欠乏時に葉が枯れる症状は、その葉の物質全体の輸送が止まることが原因であることが示唆された。

キ 引用文献

- 1) Kobayashi, N. I., Tanoi, K., Hirose, A. and Nakanishi, T. M. (2013). Characterization of rapid intervascular transport of cadmium in rice stem by radioisotope imaging. J Exp Bot. 64 : 507-517.
- 2) Tanoi, K., Kobayashi, N.I., Saito, T., Iwata, N., Hirose, A., Ohmae, Y., IWATA, R., Suzuki, H., and Nakanishi, T.M. (2013). Application of ²⁸Mg to the kinetic study of Mg uptake by rice plants. J Radioanal Nucl Ch. 296 : 749-751 .
- 3) 田野井慶太郎. 斉藤貴之. 岩田直子. 大前芳美.

広瀬農, 小林奈通子, 岩田錬, 中西友子 (2011). ^{28}Mg の製造とイネにおける Mg 吸収解析への利用. RADIOISOTOPES 60 : 299-304.

4) Kobayashi, N.I., Saito, T., Iwata, N., Ohmae, Y., Iwata, R., Tanoi, K., and Nakanishi, T.M. (2013). Leaf senescence in rice due to magnesium deficiency mediated defect in transpiration rate before sugar accumulation and chlorosis. *Physiol Plant*. 148 : 490-501.

5) Kobayashi, N.I., Iwata, N., Saito, T., Suzuki, H., Iwata, R., Tanoi, K., and Nakanishi, T.M. (2013). Application of ^{28}Mg for characterization of Mg uptake in rice seedling under different pH conditions. *J Radioanal Nucl Ch*. 296 : 531-534 .

6) 田野井慶太郎, 小林奈通子, 齊藤貴之, 岩田直子, 大前芳美, 広瀬農, 岩田錬, 中西友子 (2011). アルミニウム及び阻害剤で処理されたイネ根における Mg 吸収様式の ^{28}Mg イメージング解析. RADIOISOTOPES. 60 : 497-503.

7) Kobayashi, N.I., Iwata, N., Saito, T., Suzuki, H., Iwata, R., Tanoi, K., and Nakanishi, T.M. (2013). Different magnesium uptake and transport activity along the rice root axis revealed by ^{28}Mg tracer experiments. *Soil Sci Plant Nutr*. 59 : 149-155.

研究担当者 (田野井慶太郎 *, 中西友子, 広瀬農, 小林奈通子)

(2) 種子の休眠性と乾燥耐性に関与する遺伝子の単離と機能解析 (IPG0011)

ア 研究目的

収穫期の穀類の種子が長雨にさらされたり、台風によって倒伏、冠水したりすることが原因となり、穂についたまま発芽してしまうことがある。この現象を穂発芽という。このように穂発芽した種子は、発芽時に活性化する貯蔵タンパク質やデンプンを加水分解する酵素により粒質が劣化し、商品価値が著しく下がる。この経済的打撃は大きく、特に日本におけるコムギ栽培では収穫期と高温多雨の時期が重なることもあり、年間 100 億円もの被害があるといわれている。コムギ栽培ほどではないものの、稲作においても収穫期の台風による冠水は穂発芽を引き

起こすことから収穫期の懸念事項であり、その損害は少なくない。穂発芽を回避するために、適切な休眠性を作物に与えることが必要であるが、一方で深すぎる休眠は均一な発芽が難しくするため望ましくない。したがって、収穫時期には深い休眠を、播種期には休眠が十分解除されることが理想的である。このような背景のもと本研究では、遺伝子導入により収穫期において適切な休眠性を人為的に付与することにより穂発芽耐性を持つイネの作出することを目的とした。また、マイクロアレイ解析によりこの時期における種子の休眠・発芽メカニズムについて新たな知見を得ることも試みた。

イ 研究方法

(ア) 導入遺伝子コンストラクトの作製

コンストラクト作製には GATEWAY 法を用いた。すべてのエントリークローンは PCR Directional TOPO クローニング (pENTR/D-TOPO Cloning kits; Invitrogen) によって構築するため、フォワードプライマーの 5' 末端には CACC を付加したプライマーを用いた。導入遺伝子を農業生物資源研究所イネゲノムリソースセンターより分与された導入遺伝子の cDNA クローンをテンプレートとした PCR により増幅をした。クローニングしたエントリーベクター pENTR- “遺伝子名” を LR 反応により、プラスミドベクターに組み込んだ。プラスミドベクターには、pIG121pEMGWdHAHis プラスミドベクター、pIG121pEMGWdeltatag プラスミドベクター、pIG121pCpeptGWdHAHis プラスミドベクター、pIG121pGrichGWdHAHis プラスミドベクターの 4 種類を使用した。このプラスミドをそれぞれ、pIG121pEM “遺伝子名” dHAHis、pIG121pEM “遺伝子名” deltatag、pIG121pCpept “遺伝子名” dHAHis、pIG121pGrich “遺伝子名” dHAHis、とした。これらを導入した形質転換植物を pEm- “遺伝子名”、pCpept- “遺伝子名”、pGrich- “遺伝子名” と記した。

(イ) 形質転換イネの作製

目的遺伝子を組み込んだバイナリーベクターを用いて、エレクトロポレーション法によるアグロバクテリウム (EHA101) の形質転換を行った。イネの胚由来のカルスを用いた形質転換は基本的に Terada et al. ¹⁾ の方法に従った。

(ウ) マイクロアレイデータの取得とトランスクリプトーム解析

胚由来全 RNA を用い、農業生物資源研究所ゲノムリソースセンターにてマイクロアレイハイブリダイゼーションおよびデータ取得を行った。マイクロアレイにはイネ オリゴ DNA マイクロアレイ 4 X 44K RAP-DB (Agilent Technologies, USA) を用い、サンプルの標識は Cy3 による 1 色ラベリング法を用いた。データの標準化には R パッケージ (<http://www.r-project.org/>) を用いた VSN 法により行った。データ解析には TIGR MeV (<http://www.tm4.org/mev/>) を用いた。

(エ) 形質転換イネ種子の発芽特性の評価

出穂日に穂をマーキングし 6 週間後に種子を収穫した。この種子を 2 枚のろ紙を敷いたプラスチックシャーレ上に置き、水を加えて 28℃ 明所にて吸水・発芽処理を行い、7 日間にわたって 24 時間おきに発芽をカウントした。T0 個体について T1 種子で行う実験を T0-T1、T1 個体について T2 種子で行う実験を T1-T2 と表記した。T1-T2 を用いた実験では、兄弟個体 2 個体以上についてそれぞれ 3 反復の発芽処理を行い評価を行った。T2-T3 および T3-T4 を用いた実験では、兄弟 4 個体以上について 1 発芽処理 30 粒以上で反復を行った。

ウ 研究結果

(ア) 遺伝子工学的手法による穂発芽性の操作

休眠や発芽抑制を正に制御する因子の発現増強コンストラクト、あるいは発芽を正に制御する因子の発現抑制コンストラクトをイネに形質転換し、イネの穂発芽性を遺伝子工学的に抑制することを試みた。発現抑制には、簡便であることに加えて様々なレベルの発現抑制が起こるアンチセンス法を用いた。導入する遺伝子は、文献情報や公開マイクロアレイデータ、および独自に行ったマイクロアレイ解析に基づき選択した。これらの遺伝子について、その機能とともに表 3222-1 にまとめた。

a プロモーターの選択

イネ種子の穂発芽性が問題になる時期は種子成熟後期、およびそれ以降水分が急速に失われていく時期（ここでは完熟期と定義する）にあたる。完熟期における遺伝子発現に関してはほとんど知見がないため、他の成長段階には影響を与えずに、穂発芽特性を操作しうるプロモーターとして、種子成熟後期に種子胚で特異的かつ強力に発現する以下の 3 つプロモーターを選択し、導入遺伝子の発現に用いた。

(a) *OsEM* プロモーター

OsEM は VP1 と ABA によって制御され、種子成熟後期特異的に強い発現を示す。プロモーター：：GUS を導入した形質転換体においてその挙動が明らかにされている (Hattori et al. ²⁾、Hattori et al. ³⁾)。このプロモーターを以下 pEm と表記した。

(b) Grich ならびに Cpept プロモーター

農業生物資源研究所によるマイクロアレイ公

表 3222-1 作製した形質転換系統と評価

コンストラクト名	遺伝子名	遺伝子 ID	性質など	遺伝子機能	挿入方向	T0-T1 結果*	T1-T2 結果*
pGpEM-ZmVP1	ZmVP1	M60214	Viviparous 1	種子成熟のマスターレギュレーター	Sense	○	○
pGpEM-AtABI3	AtABI3	At3g24650	シロイヌナズナ VP1	種子成熟のマスターレギュレーター	Sense	○	◎
pGpEM-NCED9	NCED9	Os07g0154100	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	ABA 生合成酵素	sence	○	○
pGpEM-MYBS1(AS)	OsMYBS1	Os01g0524500	Myb transcription factor	α -amylase 転写活性化	Anti-sense	○	◎
pGpEM-MYBS2(AS)	OsMYBS2	Os10g0562100	Myb transcription factor	α -amylase 転写活性化	Anti-sense	○	○
pGpCpept-GA20ox1(AS)	GA20ox1	Os03g0856700	Gibberellin 20 oxidase 1	ジベレリン生合成酵素	Anti-sense	×	×
pGpGrich-GA20ox1(AS)	GA20ox1	Os03g0856700	Gibberellin 20 oxidase 1	ジベレリン生合成酵素	Anti-sense	×	×
pGpCpept-KO2(AS)	KO2	Os06g0569900	Ent-kaurene oxidase 1	ジベレリン生合成酵素	Anti-sense	×	×
pGpGrich-KO2(AS)	KO2	Os06g0569900	Ent-kaurene oxidase 1	ジベレリン生合成酵素	Anti-sense	○	○
pGpCpept-OsACO7(AS)	OsACO7	Os01g0580500	ACC oxidase	エチレン生合成酵素	Anti-sense	△	△
pGpGrich-OsACO7(AS)	OsACO7	Os01g0580500	ACC oxidase	エチレン生合成酵素	Anti-sense	×	×
pGpCpept-OSACS6(AS)	OsACS6	Os05g0149300	ACC oxidase	エチレン生合成酵素	Anti-sense	△	△
pGpGrich-OSACS6(AS)	OsACS6	Os05g0149300	ACC oxidase	エチレン生合成酵素	Anti-sense	○	×
pGpCpept-OsDWF7(AS)	OsDWF7	Os01g0134500	Delta-7-sterol-C5(6)-desaturase	ブラシノステロイド生合成酵素	Anti-sense	○	△
pGpGrich-OsDWF7(AS)	OsDWF7	Os01g0134500	Delta-7-sterol-C5(6)-desaturase	ブラシノステロイド生合成酵素	Anti-sense	○	○
pGpCpept-OsDWARF(AS)	OsDWARF	Os03g0602300	Cytochrome P450 85A1	ブラシノステロイド生合成酵素	Anti-sense	—	—
pGpGrich-OsDWARF(AS)	OsDWARF	Os03g0602300	Cytochrome P450 85A1	ブラシノステロイド生合成酵素	Anti-sense	○	△
pGpCpept-OsDWARF4(AS)	OsDWARF4	Os03g0227700	Cytochrome P450 90B	ブラシノステロイド生合成酵素	Anti-sense	○	○
pGpGrich-OsDWARF4(AS)	OsDWARF4	Os03g0227700	Cytochrome P450 90B	ブラシノステロイド生合成酵素	Anti-sense	○	○
pGpCpept-OsRR6(AS)	OsRR6	Os04g0673300	A-type response regulator	サイトカインシグナル転写因子	Anti-sense	—	—
pGpGrich-OsRR6(AS)	OsRR6	Os04g0673300	A-type response regulator	サイトカインシグナル伝達転写因子	Anti-sense	—	—
pGpCpept-OsTAA1.1(AS)	OsTAA1.1	Os01g0169800	transferase	オーキシン生合成酵素	Anti-sense	○	○
pGpGrich-OsTAA1.1(AS)	OsTAA1.1	Os01g0169800	transferase	オーキシン生合成酵素	Anti-sense	○	×
pGpCpept-OsTAA1.3(AS)	OsTAA1.3	Os01g0717700	alliinase domain protein.	オーキシン生合成酵素	Anti-sense	×	×
pGpGrich-OsTAA1.3(AS)	OsTAA1.3	Os01g0717700	alliinase domain protein.	オーキシン生合成酵素	Anti-sense	×	×
pGpCpept-YUCCA7(AS)	OsYUCCA7	Os04g0128900	FAD-dependent monooxygenase	オーキシン生合成酵素	Anti-sense	○	○
pGpGrich-YUCCA7(AS)	OsYUCCA7	Os04g0128900	FAD-dependent monooxygenase	オーキシン生合成酵素	Anti-sense	○	○

* 発芽抑制効果：強い (◎)、やや強い (○)、認められる (△)、認められない (×)、評価出来ず (—)

開データ (RiceXpro; <http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>) をもとに、種子成熟後期に種子胚で強力に発現し、他の成長段階では殆ど発現しない遺伝子をまず選び出した。さらに、吸水後もしばらく発現が持続するプロモーターが穂発芽抑制にはより適当であると考え、本研究で行ったマイクロアレイデータを用いてさらに絞り込んだ結果、これら2つの遺伝子、Glycine rich protein をコードする Os02g0587000 と Cysteine endopeptidase をコードする Os01g0907600 を選んだ。これらプロモーターをそれぞれ、pGrich、pCpept と表記した。これらのプロモーターはホルモン合成系遺伝子の発現抑制に主に用いた。

(イ) 閉鎖系温室における形質転換体種子の発芽特性の評価

16 遺伝子 26 コンストラクト 227 系統の形質転換イネにおける種子の発芽特性の調査を行った。T0 世代イネを閉鎖系温室で育成し、出穂後6週間の穂から T1 種子を採取し、7 日間にわたって 24 時間おきに発芽をカウントした。得られる T1 種子の数は限られており、ある基準を設けて導入遺伝子の有効性を判定することは困難であった。このため、発芽抑制の傾向は状況に応じて判断し、次世代での評価を行うべきコンストラクトおよび系統を選抜した (表 3222-1)。T0-T1 のスクリーニングでは、16 コンストラクト (12 遺伝子)、45 系統について、発芽抑制傾向が見られたため、これらの系統を次世代で評価した。T1-T2 世代の評価には複数の兄弟個体について3反復の評価を行った。その結果、12 個のコンストラクト (10 遺伝子) について、明確な発芽抑制が確認できた (表 3222-1)。

(ウ) 隔離圃場で育成させた T2-T3 および T3-T4

世代での発芽特性の評価

2011 年度には、T1-T2 種子で発芽抑制の効果が高かった pEm-ABI3 系統 A3S001 および A3S002、pEm-MYBS1 (AS) 系統 M1A001 および M1A002 を韓国晋州市の隔離圃場で育成させ評価した。その結果どの系統についても、明確な発芽抑制が確認された (図 3222-1)。両導入遺伝子の効果は、閉鎖系温室での評価よりもはるかに明確であった。ただ、pEm-MYBS1 (AS) の2系統および pEm-ABI3 のうち効果が強かった A3S002 については、収量の低下がみられた。収量低下は、有効分げつ数の減少によるもので、初期生育の問題であると考えられた。その原因にはハイグロマイシン選抜後の移植における技術的な問題も含まれている可能性が考えられた。そこで、2012 年度には、A3S-001 および M1A-002 の T3-T4 世代、および pEm-MYBS1 (AS) の別系統 M1A-003T2-T3 世代の圃場テストを行った。この年は非形質転換体コントロール (日本晴) の休眠の程度が前年より高く、導入遺伝子の見かけ上の効果は前年に比べて弱かったが、十分な発芽抑制効果が確認され、収量にも前年ほどの大きな影響は見られなかった。したがって 2011 年度にみられた収量低下の大きな要因は移植の失敗にあったと思われる。

2012 年度には、トウモロコシ *ZmVP1* 導入植物 (pEm-ZmVP1) 2 系統 (ZVS-001 および ZVS-002)、および ABA 合成系遺伝子 *OsNCED9* 導入植物 (pEmOsNCED9) 2 系統 (N9S-001 および N9S-002) の T2-T3 世代の圃場テストも行い、いずれについても明瞭な発芽抑制効果が観察された。

以上の結果から、pEm-ABI3、pEm-MYBS1 (AS)、pEm-ZmVP1 および pEmOsNCED9 は、実用的に

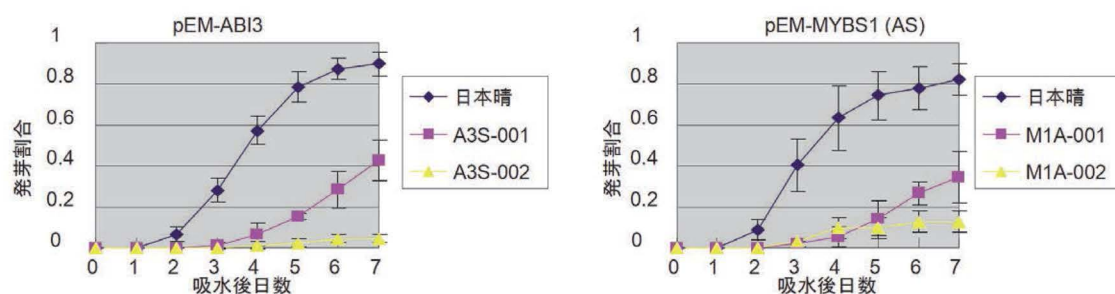


図 3222-1 隔離圃場で生育・収穫 (出穂後6週間) した pEm-ABI3 (左) および pEm-MYBS1 (AS) (右) 形質転換体の種子の発芽特性
それぞれ2系統についてその代表個体のデータを示した。

も有望なコンストラクトと考えられた。

(エ) 休眠程度の異なる種子の比較トランスクリプトーム解析

種子の休眠性は品種などの遺伝的な差異、および種子のステージや保存期間などの生理的要因によって大きく異なる。そこで、このような遺伝的および生理的要因によって休眠状態が異なる種子およびその吸水過程でのトランスクリプトーム比較を行った。穂発芽性（開花後5週目における発芽プロファイル）が異なる5品種・系統〔日本晴-SDR4^K (SDR5W)、日本晴 (NPB5W)、キヌヒカリ (KIN5W)、こがねもち (KOG5W)〕に加え、開花後6週間 (NPB6W) および後熟6か月 (NPB6-AR) の種子について、吸水0、12および24時間の胚からRNAを抽出しマイクロアレイデータを得た。易発芽性の順序は NPB-AR > KOG5W > NPB6W > KIN5W > NPB5W > SDR5W であった。日本晴だけでみると NPB-AR と NPB6W では50% 発芽に至る時間は12時間以上、NPB6W と NPB5W では72時間以上

上（発芽開始のタイミングでは24時間）異なっていた。

(a) 吸水に応答する遺伝子の多くは休眠程度に関わらず共通して発現を変動する

いずれかの種子サンプルで吸水24時間以内に10倍以上の顕著な発現誘導を受ける遺伝子は約1,800あったが、これらのほとんどが品種・系統間のみならず、同一品種内の異なる休眠状態における比較においても易発芽性とは無関係に、吸水によって同じように顕著な誘導を受け、易発芽性と相関する遺伝子の数は少数であった（図3222-2）。このことは、吸水24時間までで、発芽の実行に関わっていると考えられる遺伝子の数は決して多くないことを示唆している。

(b) イネ種子胚は吸水によって嫌氣的な応答を示す

開花後5週間の日本晴で吸水後24時間の間で誘導レベル高い順に並べたリストを概観したところ、嫌氣的エネルギー代謝、アルコール発酵に関わる、

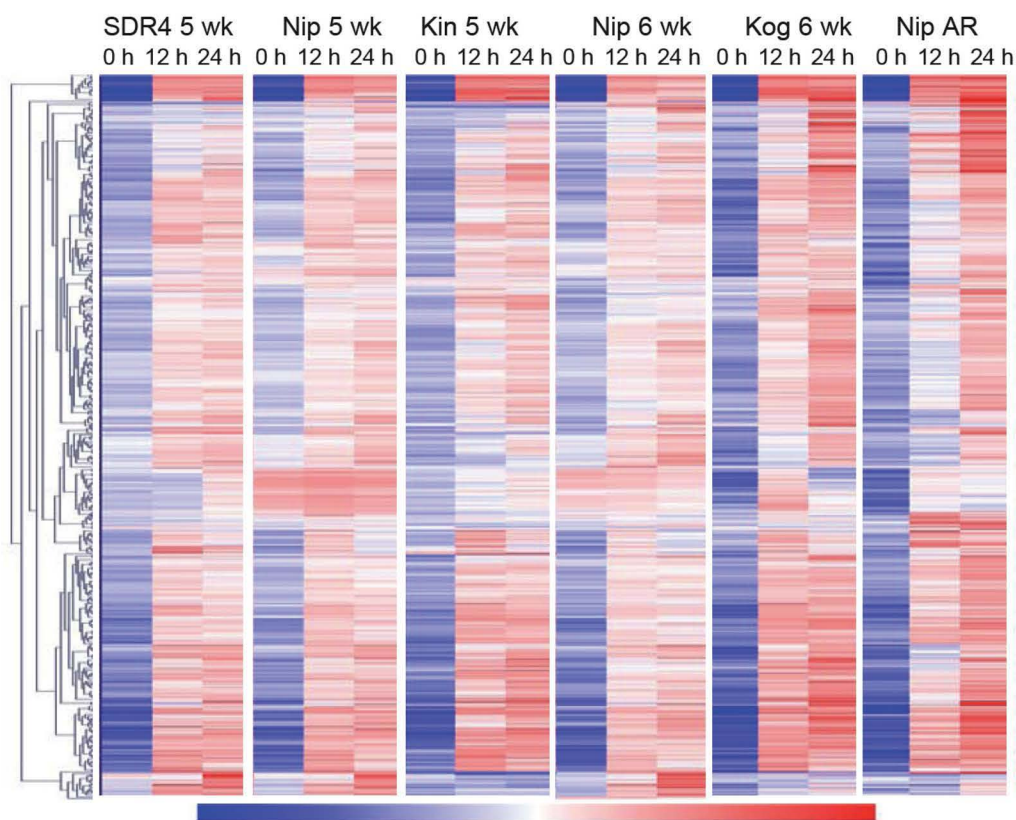


図 3222-2 発芽速度の異なる種子の吸水発芽初期（0, 12, 24 h）における遺伝子応答

いずれかの種子サンプルで吸水24時間以内に10倍以上の顕著な発現誘導を受ける遺伝子をマイクロアレイデータより抽出し、クラスター解析を行った。日本晴-SDR4NIL (SDR5W)、日本晴 (NPB5W)、キヌヒカリ (KIN5W)、こがねもち (KOG5W)、開花後6週間 (NPB6W) および後熟6か月 (NPB-AR) の易発芽性は、NPB-AR > KOG5W > NPB6W > KIN5W > NPB5W > SDR5W。

pyruvate decarboxylase 遺伝子 *PDC1* (Os05g0469600) が 3000 倍以上の誘導をうけ 4 位に位置づけられていた。そこで、嫌氣的条件で誘導される遺伝子が吸水によっても誘導されている可能性を疑った。実際、このリストのトップ 30 に入る遺伝子（プローブ）を好氣的および嫌氣的条件で生育させたイネ芽生え子葉鞘を比較した公開マイクロアレイデータに照らし合わせてみると、これらはほぼ全て嫌氣条件に応答して活性化される遺伝子であることが明らかとなった。また、*PDC1* の発現が吸水に応答して著しく上昇していたことから、同酵素の次のステップの酵素すなわち、*alcohol dehydrogenase* 遺伝子、およびピルビン酸の生産に至る解糖系酵素遺伝子を抽出し、発現挙動を調べた。その結果、開花後 5 週間の日本晴のみならずすべての種子サンプルの吸水において、*alcohol dehydrogenase* 遺伝子 *ADH2* (Os11g0210500) の他、解糖系のいくつかのステップを担う遺伝子が高いレベルの誘導を受けていること、および他の解糖系のステップの遺伝子や嫌氣的

エネルギー代謝を担う遺伝子も穏やかな誘導を受けていることがわかった。これらの結果から、休眠の程度に関わらず、イネ種子は吸水に応答して嫌氣応答シグナル経路を活性化していることが示唆された。

(c) 吸水前の *α-amylase* 遺伝子発現と発芽し易さは関連する

NPB6W と NPB5W ではその発芽開始までにかかる時間が大きく異なることから、両者の吸水 0 時間の種子において発現が顕著に異なる遺伝子に着目した。NPB6W の NPB5W に対する発現比が 3 倍以上の遺伝子を抽出したところ 60 遺伝子のみであった。これらを階層クラスタリングで分類したところ、7 つの種子サンプル間でその発現レベルと易発芽性の関連が予想される遺伝子はわずかであり、その中には 2 つの *α-amylase* 遺伝子族メンバー *RamyA3* および *Ramy3D* が含まれていた（図 3222-3）。このような易発芽性と 2 つの *α-amylase* 遺伝子の発現レベルとの相関は、日本晴より休眠性の高いコシヒカリ

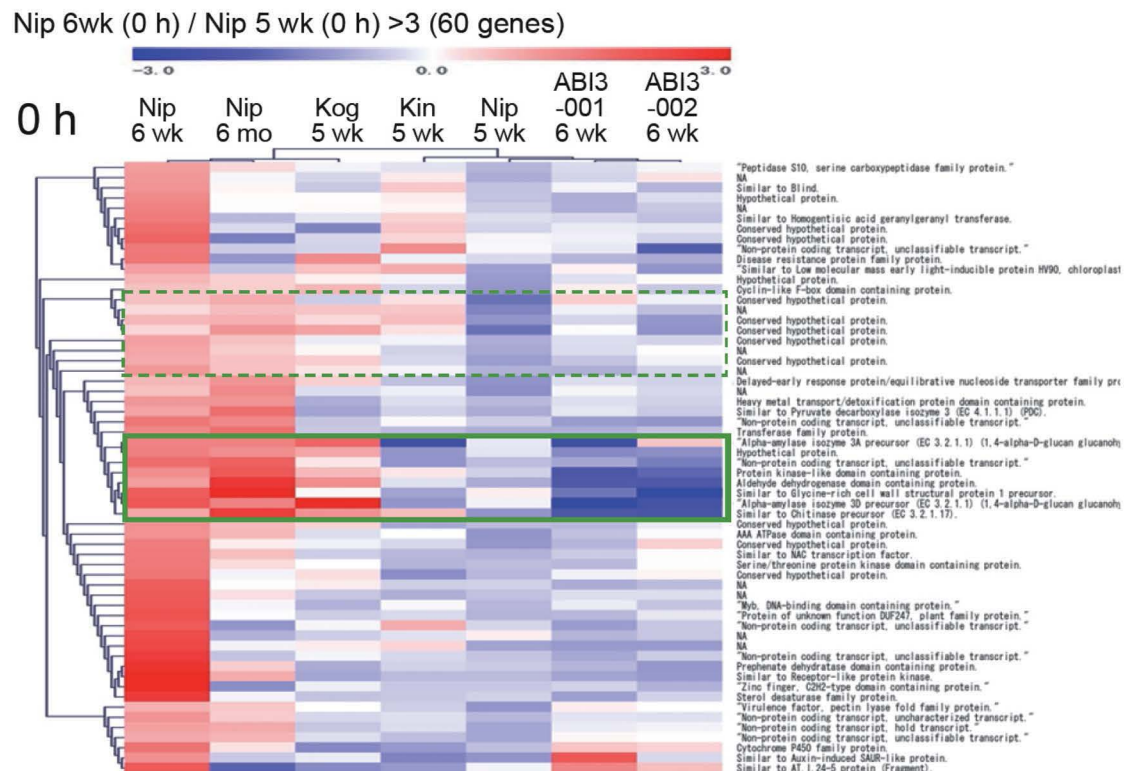


図 3222-3 出穂後 6 週間と 5 週間の種子胚で発現比が 3 倍以上の遺伝子のクラスター解析（吸水前の発現レベル）

や休眠が増加した pEm-ABI3 および pEm-MYBS1 (AS) トランスジェニック系統を含めた独立サンプルによる定量 PCR 解析によっても確認された。これらの結果から、吸水前における α -amylase 遺伝子の発現レベルが種子の発芽性にとって重要な制限要因になっていることが強く示唆された。

工 考 察

(ア) 遺伝工学的手法によるイネの穂発芽性の制御

本研究では、文献情報や公開および独自のマクロアレイデータをもとに、その種子での発現を増強あるいは抑制することによりイネの穂発芽を抑制しうる可能性のある遺伝子選抜し、形質転換により評価した。その結果有効な遺伝子がいくつか同定された。その中でも α -amylase 遺伝子の活性化転写因子 MYBS1 の発現抑制体、種子成熟マスターレギュレーター VP1/ABI3 および ABA 合成系酵素 NCED9 の発現増強体については、T2-T3 および T3-T4 世代を用いた圃場テストにおいてもその有効性が実証され、応用可能なコンストラクトであることがわかった。2011 年度に行った MYBS1 の発現抑制体および ABI3 発現増強体の圃場テストでは、閉鎖系温室における評価よりも格段に強い穂発芽抑制効果がみられた点は注目に値する。種子形成・成熟過程における環境の休眠に対する影響は古くから知られているが、このような形質に関する組換え体については野外環境における早い段階での評価が重要であることが改めて認識された。

(イ) イネ種子の休眠・発芽制御における α -amylase 遺伝子の役割

トランスクリプトーム解析および MYBS1 の発現抑制体の解析からは、収穫期の休眠・発芽性における α -amylase 遺伝子の重要性がクローズアップされた。この α -amylase 遺伝子の役割は、発芽時にジベレリン誘導を受け実生の生育を支える α -amylase の従来から知られている働きとは全く異なるものである。MYBS1 は、DNA 結合ドメインを 1 箇所のみ持つ MYB 型タンパク質で、糖によりフィードバック抑制を受ける α -amylase 遺伝子である *RAmy3D* や *RAmy3E* のプロモーター配列に存在する Sugar response complexes (SRCs) に結合するタンパク質として酵母 one-hybrid 法により単

離された転写因子である (Lu et al.⁴⁾)。SRCs には GC box、G box、TA box の 3 つのモチーフが含まれているが、MYBS1 はこのうち、TA box に結合する。また、TA box はジベレリン (GA) 誘導性の α -amylase 遺伝子プロモーター中の GA response complex (GARC) にも含まれる。トランジェント発現実験において MYBS1 は、SRC や GARC をもつプロモーターからの転写を TA box を介して活性化することから、複数の α -amylase 遺伝子の転写活性化因子として働くと考えられている (Huang et al.⁵⁾、Chen et al.⁶⁾)。ただし、植物体での過剰発現や発現抑制、あるいは機能喪失変異による機能解析は行われていなかった。本研究における MYBS1 の発現抑制は当初、吸水発芽時に働く α -amylase の発現抑制を期待したものであったが、トランスクリプトーム解析から、吸水前の *RAmy3A* および *RAmy3D* の発現レベルが発芽ポテンシャルとよく相関すること、また、これら遺伝子の発現レベルが pEm-MYBS1 (AS) の吸水前種子において顕著に抑制されていたことから、種子成熟および完熟過程におけるこれら α -amylase 遺伝子の発現低下が発芽性の抑制に寄与した可能性が高い。このことは、発芽ポテンシャルの高低に関わらず、吸水過程において速やかに嫌氣的代謝経路の遺伝子が活性化されること関係するのではないかと推察される。

イネ種子の吸水前の胚のミトコンドリアはクリステが発達しておらずその呼吸は低いと考えられている。吸水に伴いミトコンドリアが十分発達するには、12 から 24 時間かかる (Howell et al.⁷⁾)。一方、呼吸による酸素消費は吸水直後一旦急速に増大するが、その後は 48 時間にわたって漸増していく。したがって、吸水からしばらくの間は呼吸によるエネルギー生産能は低い可能性があり、吸水初期においてはエネルギー生産を発酵に依存して行っている可能性が考えられる。Yu ら⁸⁾ は、吸水 0 ~ 12 時間の間に胚のデンプン分解が進むにもかかわらずグルコース量が 1/3 以下になることを示している。このような点を考慮すると、初期のエネルギー生産のためにアルコール発酵遺伝子が迅速に誘導されると考えることは妥当であろう。Yu et al.⁸⁾ の報告では、吸水 12 時間以内に胚の中のデンプンも 1/3 以下に減少する。これは、12 時間以前に存在している α -アミラーゼによる分解であることを意味してい

る。後熟した日本晴や開花後5週間のこがねもちの種子など休眠の浅い種子では、成熟期・完熟期あるいは後熟期間に *RAmy3D* や *RAmy3A* コードされる α -アミラーゼが働き、グルコースを他より高いレベルで蓄積することにより、より迅速な発芽が可能な状態になっているのではないかと推察される。すなわち、*MYBS1* のアンチセンス発現抑制によって発芽が抑制されたのは、成熟・完熟期における発現抑制によるものと推察される。

オ 今後の課題

本研究では、遺伝子工学的手法によりイネの収穫期における発芽特性を操作することにより、圃場レベルで穂発芽耐性を付与することができることを明らかにした。しかし、形質転換体系統によっては収量低下の兆候がみられるものもあった。種子成熟期に特異性の高いプロモーターを用いたが、植物体生育への影響が若干ある可能性は残った。したがって、さらに特異性の高いプロモーターを探索するなり、デザインすることが重要であろう。本研究の成果をコムギ等、穂発芽がより深刻な穀類へと応用していくことが今後の課題である。

カ 要 約

コムギをはじめ、穀類の穂発芽被害は甚大である。本研究は、遺伝子工学的手法により穀類に穂発芽耐性を付与することを目的とし、イネを用いて利用可能な遺伝子の探索を行った。プロモーターには種子成熟過程特異的な *Osem* プロモーター（既知）を主に用いた。これに加え、公開マイクロアレイデータをもとに新たに選択した *CEPT1* および *Grich1* プロモーターも使い、遺伝子の性質によりセンスあるいはアンチセンス過剰発現コンストラクトを作成した。文献情報および独自のマイクロアレイ解析より選択した16遺伝子26コンストラクトについて合計227系統のトランジェニックイネを作成し、T0-T1 および T1-T2 世代でその出穂後6週の種子の発芽性を評価した。その結果、T1-T2 での評価で12個のコンストラクト（10遺伝子）について発芽抑制が確認できた。そのうち、センス発現の *NCED9* (N9S; ABA 合成系遺伝子)、*ABI3* (A3S; シロイヌナズナ種子成熟マスターレギュレーター)、*ZmVPI* (ZVS; トウモロコシ成熟マスターレギュ

レーター)、アンチセンス発現の *MYBS1* (M1A; *alamylase* 遺伝子のポジティブレギュレーター)、*OsDWARF4* (ブラシノステロイド合成系遺伝子)、*OsYUCCA7* (オーキシン合成系遺伝子) が安定して有効であった。これらのうち、A3S2 系統、M1A3 系統、N9S2 系統および ZVS2 系統は、その T2-T3 世代について韓国隔離圃場での屋外栽培も行い、閉鎖系温室での試験に比べてさらに良好な発芽抑制効果を確認した。また、A3S および M1A それぞれ1系統については、次世代 (T3-T4) 世代でも圃場テストを行い良好な結果を得た。

これらのトランスジェニックイネの評価と平行して、様々な遺伝的背景（品種ならびにトランスジェニック）や生理条件（屋外・閉鎖系温室、開花後日数、あるいは年の違い）により発芽特性が異なる種子サンプルを用いたトランスクリプトーム比較を行った。この解析により次のことを明らかにした。(i) 通常の日本の品種で見ると、吸水初期における遺伝子発現変動は、発芽開始の時期とは無関係に、同じタイミングでほとんど同じ遺伝子セットについて起こること、(ii) これらの中で最も変動が多いグループには解糖系遺伝子群が含まれていること、(iii) 吸水時に誘導を受けかつ発芽のタイミングと相関がある遺伝子は多くなく、そこには GA および BR 合成系遺伝子が含まれていること、(iv) 発芽性と吸水前種子での発現が相関する遺伝子も多くはなく、そこには α 芽 *amylase* 遺伝子 (*Ramy3D* および *Ramy3A*) が含まれていること、(v) この α の *amylase* 遺伝子発現と発芽性とが相関相関するという結果は、そのポジティブレギュレーター *MYBS1* のアンチセンス発現による発芽抑制効果の結果とも合致すること、などである。吸水前の α 芽 *amylase* 遺伝子発現と発芽性の相関、ならびに吸水初期における解糖系遺伝子の誘導から、発芽初期のエネルギー供給は、すでに蓄積している遊離糖に依存し、その蓄積レベルが発芽開始の早遅に強く影響する可能性が考えられた。

キ 引用文献

- 1) Terada R. et al. (2004). A large-scale Agrobacterium-mediated transformation procedure with a strong positive-negative selection for gene targeting in rice (*Oryza sativa*

- L.). Plant Cell Rep. 22 : 653-659.
- 2) Hattori T. et al. (1995). Regulation of the Osem gene by abscisic acid and the transcriptional activator VP1 : analysis of cis-acting promoter elements required for regulation by abscisic acid and VP1. Plant J. 7 : 913-925.
- 3) Hattori T. et al. (2002). Experimentally determined sequence requirement of ACGT-containing abscisic acid response element. Plant Cell Physiol. 43 : 136-140.
- 4) Liu Y. et al. (2007). The absence of histone H2B monoubiquitination in the Arabidopsis hub1 (rdo4) mutant reveals a role for chromatin remodeling in seed dormancy. Plant Cell 19 : 433-444.
- 5) Huang N. et al. (1980). Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. Plant Mol. Biol. 14 : 655-668.
- 6) Chen PW. et al. (2006). Rice alpha-amylase transcriptional enhancers direct multiple mode regulation of promoters in transgenic rice. J. Biol. Chem. 277 : 13641-13649.
- 7) Howell KA. et al. (2006). Ordered assembly of mitochondria during rice germination begins with pro-mitochondrial structures rich in components of the protein import apparatus. Plant Mol. Biol. 60 : 201-223.
- 8) Yu SM. et al. (1996). Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of alpha-amylase genes and metabolic activities in germinating cereal grains. Plant Mol. Biol. 30 : 1277-1289.

研究担当者 (服部東穂*, 武田真、加藤大和)

(3) イネの細胞死関連遺伝子の単離と機能解析 (IPG0013)

ア 研究目的

植物は水、栄養、光、塩、感染、傷害など様々なストレスに対し、細胞内の酸化還元状態を保持する機構で対処しながら生育する。酸化還元状態の不均衡すなわち酸化ストレスが続くと細胞は生理活性を失い、生育不良ひいては枯死に至る。一方で、この

保持機構の自発的崩壊であるプログラム細胞死は病害抵抗性反応や導管、通気組織等の形態形成においては必須の生体反応である。このように植物の細胞死は二面性を持つため、その主要因となる活性酸素 / 窒素種 (ROS) の作用機構を明らかにし、生死を適正に制御することが収量増加に貢献する複合ストレス耐性イネを分子育種する上で重要であるが、ROS の作用機構や細胞死制御に関する知見は極めて少ないのが現状である。そこで本研究では、主にイネの根形成における ROS の作用機構と細胞死制御機構を明らかにし、細胞の生死をコントロールする方法を見いだすことを目的とした。

イ 研究方法

(ア) 根形成における硝酸態窒素と細胞死誘導の関係

イネの EL5 遺伝子は、RING-H2 フィンガードメイン (RFD) を含む膜局在性のユビキチンリガーゼ (E3) をコードしている。RFD 内のアミノ酸置換によって E3 活性を低下させた各種 EL5 を発現する各種優性阻害変異イネのうち、EL5W165A 遺伝子 (E3 活性欠損型) を発現するイネ (mEL5-3) は冠根原基が壊死するために無根になるが、EL5V162A 遺伝子 (E3 活性低下型) を発現するイネ (mEL5-5) は硝酸態窒素やカルシウムイオンを含まない培地では発根することがわかっていた。そこで、硝酸態窒素非含有水耕液で冠根を伸長させた mEL5-5 を亜硝酸で処理することによって側根原基の細胞死を一斉に誘導する系を確立し、非形質転換体 (NT; 品種 : 日本晴) と mEL5-5 間で、硝酸態窒素を与える前後の根における i) 形態、ii) 細胞死誘導部位、iii) ROS 生成量と生成部位を比較解析した。また、NO 消去剤 PTIO や硝酸還元酵素阻害剤であるタンゲステン酸ナトリウムなどの影響を解析した。

(イ) イネ細胞内で EL5 と相互作用するタンパク質の探索

mEL5-3 カルスとベクターコントロールカルスを NO 発生剤 (Sodium Nitroprusside : SNP) で 24 時間処理すると、mEL5-3 カルスではコントロールカルスよりも細胞死が有意に誘導される。そこで、Flag-tag 付きの mEL5-3 を発現させたイネ培養細胞 (mEL5-3CFlag) を SNP 処理してからミクロソーム画分を調製し、1% TritonX-100 で可溶化後、抗

Flag 抗体 - アガロースを用いて免疫沈降させた。免疫沈降によって得られたサンプルを Trypsin で消化した後、質量分析装置 (MALDI-TOF/TOF) により peptide の質量を同定し、MASCOT によりタンパク質の同定を行った。次に、同定されたタンパク質の抗体を用いて、免疫共沈物のウェスタン分析を行い、EL5 との相互作用を確認した。

(ウ) 活性窒素で修飾されるイネ培養細胞タンパク質の検出

NO は主にシステイン残基のチオール基に結合し、S- ニトロソチオールを形成することが知られている。最近、このタンパク質の SNO 化を介して活性窒素シグナルが伝達されることが明らかになってきた。そこで、このタンパク質の SNO 化をイネで検出する方法を検討した。すなわち、SNP で処理した mEL5-3 カルスとベクターコントロールカルスの可溶性画分に対し、Biotin switch 法を試みた。

ウ 研究結果

(ア) 根形成における硝酸態窒素と細胞死誘導の関係

a mEL5-5 の窒素欠乏時の表現型

胚乳および根を取り除いた播種後 7 日目の NT シュートに窒素源非含有水耕液 (3% スクロース含有) で 1 週間培養しても側根はほとんど発達しない (冠根 1cm 当たりの側根数は、 3.95 ± 0.33 本/cm)。一方、MS 培地で継代培養している無根の mEL5-5 シュートを窒素源非含有水耕液 (3% スクロース含有) で培養すると、NT と同程度の長さの冠根が伸長し、さらに、NT の約 4 倍の側根原基が分化し (16.35 ± 1.11 本/cm)、伸長することが明らかに

なった (図 3223-1)。窒素存在下では mEL5-5 の側根は褐変化した、NT の側根は伸長した。

b mEL5-5 の亜硝酸処理時の表現型

mEL5-5 は、窒素源含有培地では発根直後の冠根端の壊死によって根が伸長しないことがわかっていたが、それを直接観察することは困難であった。そこで、側根形成部における細胞死を直接観察できる系 (窒素源非含有培地 (3% スクロース含有) で 4 日間発根させた後、最終濃度 1mM の亜硝酸で 24 時間処理) を確立し、褐変化する部位を解析した。その結果、褐変細胞は側根そのものだけではなく、側根形成部に隣接した冠根の皮層細胞であることがわかった。さらに、PI 染色や DAPI 染色によって褐変細胞が壊死していることを確認した。

c 亜硝酸処理による ROS 生成と細胞死

DAF2 蛍光法によって 1mM 亜硝酸、24 時間処理前後の NO 産生量を測定したところ、根における NO 量は亜硝酸処理によって増加したが、NT と mEL5-5 との間で有意な差は認められなかった。また、DAF2 蛍光局在は褐変細胞と同じ位置であったが、この局在性にも NT と mEL5-5 間で差が見られなかった。しかし、PTIO やタングステン酸ナトリウム添加により NO 量を減少させたところ、亜硝酸で誘導される mEL5-5 の褐変が抑制された。一方、NBT 染色法でスーパーオキシドの局在を調べた結果、NT、mEL5-5 いずれにおいても亜硝酸でスーパーオキシドの蓄積が増加したが、mEL5-5 でより顕著に増加することがわかった。また、DPI 同時処理によってスーパーオキシド生成を阻害した結果、亜硝酸で誘導される mEL5-5 の褐変が抑制された。

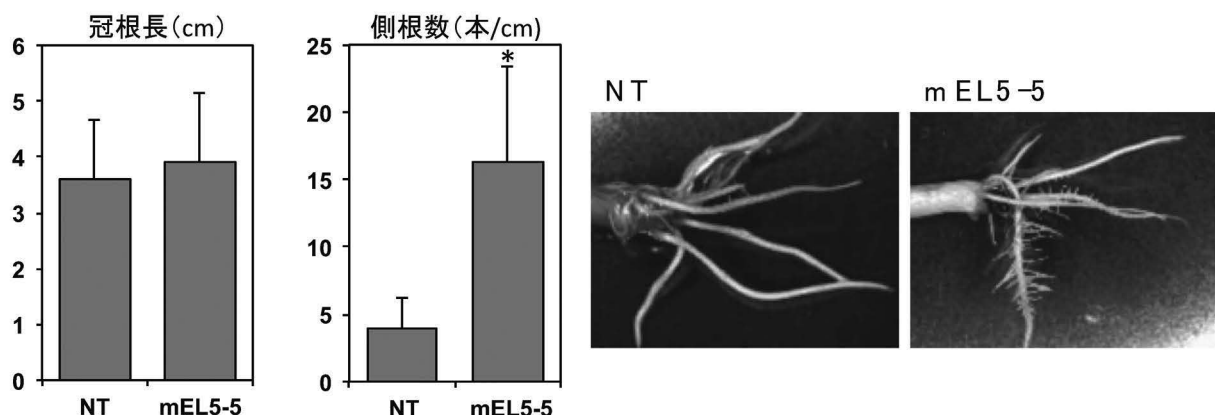


図 3223-1 窒素非含有水耕液栽培で形成された最長冠根の平均長、側根形成数、および根の様子

(イ) イネ細胞内で EL5 と相互作用するタンパク質の探索と同定

mEL5-3CFlag カルスからミクロソーム画分を調製し、mEL5-3 タンパク質を可溶化した後、BN-PAGE を行い、抗 FLAG 抗体でウェスタン分析した。その結果、約 250kDa の位置にバンドが検出された。抗 FLAG 抗体を用いて mEL5-3 を免疫沈降した後 BN-PAGE した実験でも同様の結果が得られ、SNP 処理の有無でそのパターンは変化しなかった。SDS-PAGE では EL5-3 は約 45kDa のところに検出された。また、BN-PAGE では、抗 FLAG 抗体に反応するシグナルがスメア状に検出された。さらに、mEL5-3 と共沈降してくるサンプルを銀染色すると、mEL5-3CFlag 発現カルス特異的なバンドが検出され、これを二次元電気泳動したところ、塩基性側に複数のスポットが確認された。

mEL5-3CFlag カルスの膜画分について抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った後、得られたサンプルを SDS-PAGE し、コントロールカルス由来のバンドと比較して mEL5-3CFlag に特異的に見られるバンド (100kDa, 60kDa, 40kDaH, 40kDaL) を切り出し、質量分析を行った。その結果、糖代謝酵素群、タンパク質翻訳関連酵素群、アクチンなどが同定された。同定されたタンパク質のうち入手可能な抗体 (抗 ADH, PDC, GAPDH) を用いて、免疫沈降サンプルについてウェスタン分析を行った。その結果、ADH と PDC はコントロールと mEL5-3CFlag カルス双方から同程度に検出された。

(ウ) 活性窒素で修飾されるイネ培養細胞タンパク質の検出法の確立

S-ニトロソチオール形成は可逆的で、還元剤処理によってフリーのチオール基が生じる。Biotin switch 法は、これをマレイミド-biotin により標識後、avidin 結合試薬により検出する方法であるが、還元剤処理の条件によってはジスルフィド結合も切断されてフリーのチオール基が生じてしまうため、還元剤の最適濃度の検討が必要であった。これまでに、アスコルビン酸処理でイネ培養細胞から biotin 標識されたタンパク質を濃縮し、二次元電気泳動で検出することが可能になった。

工 考 察

(ア) イネの根形成における EL5 遺伝子の機能

EL5 の機能を抑制すると側根数が増加したことから、EL5 は冠根において、窒素欠乏時に側根原基の分化や側根伸長を抑制する機能を持つことが強く示唆された。また、mEL5-5 における亜硝酸による細胞死誘導は、活性酸素の局所的な増加に起因することが示唆された。以上をまとめると、EL5 は、窒素シグナル下流の活性酸素生成を制御することで硝酸吸収にともなう酸化ストレスから根細胞を保護し、根系発達に寄与していることが示唆された。

(イ) EL5 の作用機構

カルスのミクロソーム画分の非変性条件と還元条件下での電気泳動におけるバンドの位置の差から、EL5 は細胞膜上で約 250kDa の複合体を形成していることが強く示唆された。また、その泳動像はスメア状であったが、この様な高分子側のシグナルは SDS-PAGE などの還元条件下では確認されないことから、EL5 と複合体を形成しているタンパク質がユビキチン化などの修飾を受けている可能性が考えられた。免疫共沈法によって新たに同定された ADH と PDC はコントロールと mEL5-3CFlag カルス双方から同程度に検出されたことから、抗 Flag 抗体アガロースに非特異的に吸着していたタンパク質であると考えられた。

オ 今後の課題

本研究課題は2年間で終了したが、EL5 と GAPDH の相互作用の生物学的意義については今後の課題である。また、イネのストレス耐性を高めるためには、今回解析した高濃度窒素による根形成阻害だけでなく、乾燥、低温、高塩濃度など各種ストレス下での根端分裂組織の保護に関わる分子メカニズムを明らかにする必要がある。

カ 要 約

活性酸素の作用機構と細胞死制御機構を明らかにするために、根端分裂組織の細胞死に関与することがわかっていたイネのユビキチンリガーゼ EL5 の機能を解析した。その結果、イネには窒素シグナル下流の活性酸素生成を制御することで硝酸吸収にともなう酸化ストレスから根細胞を保護し、冠根および側根を発達させるメカニズムがあることが明らかになった。

（４） イネの酸化ストレス応答の分子基盤研究 (IPG0014)

ア 研究目的

自然界では、多様な環境変動が複合的なストレスを植物にもたらしている。このため、我々が得る穀物の収量は、最適環境下で作物を生育させた場合の半分程度になっていると考えられている。多くの環境ストレスは、植物細胞内で光合成や呼吸鎖の電子伝達系に影響を与え、細胞内酸化還元（レドックス）制御の破たんによる酸化ストレスを植物にもたらし、これが生育阻害や収量低下の要因となる。したがって、個々のストレスに特異的な耐性機構の付与を考えると共に、多くの環境ストレスに共通して引き起こされる酸化ストレス耐性を考える事は、多様な環境変動に強い、複合ストレス耐性を付与する事につながる。このため、本研究では、酸化還元反応の電子伝達因子であるニコチンアミド補酵素 (NAD (P) (H)) の代謝改変、および細胞膜の改変により、環境変化の影響を受けにくい高収量性イネの分子育種につながる基盤研究を試みた。

イ 研究方法

（ア）NAD 代謝改変イネの作出と表現型の解析

生物の細胞内には数百の酸化還元反応が存在し、その補酵素として機能するのがニコチンアミド補酵素 NAD(P) (H) である。これらの物質は、古くより、その存在量比が代謝の方向性や効率に影響を与える事が知られており、その生合成系の改変は、細胞全体の代謝に大きな影響を与える事が期待できる。そこで、イネの NAD 類の生合成に関わる酵素である NAD 合成酵素 (NADS)、葉緑体型 NAD リン酸化酵素 (NADK2)、ニコチン酸／ニコチンアミドモノヌクレオチドアダデニル基転移酵素 (NMNAT) をトウモロコシ由来ユビキチンプロモーターの制御の下で高発現したイネ系統（日本晴）を作出した（図 3224-1）。得られた形質転換体について、導入遺伝子の発現量、酵素活性の比較、NAD 代謝物の定量比較を行った。さらに、主要一次代謝産物を、キャピラリー電気泳動質量分析計 (CE-MS) を用いたメタボローム解析により詳細に比較し、それぞれの系統における代謝変動の全体像をつかんだ。加えて、

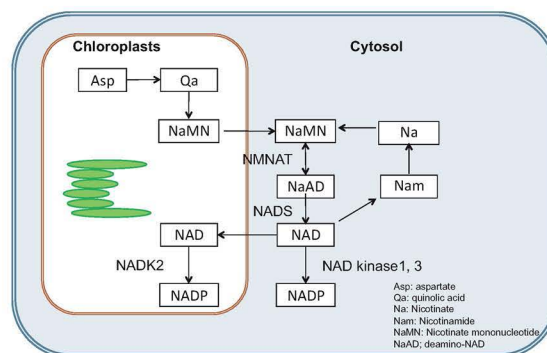


図 3224-1 植物におけるニコチンアミド補酵素生合成経路

植物では、ニコチンアミド補酵素類は葉緑体と細胞質をまたぐ形で合成される。NADS, NAD 合成酵素; NMNAT, ニコチン酸／ニコチンアミドモノヌクレオチドアダデニル基転移酵素; NADK, NAD リン酸化酵素。

作出系統の表現解析として、光合成能力、成長データの比較を行う事によって、それぞれの代謝改変がイネの成長や光合成能力に及ぼした影響の評価をおこなった。

（イ）細胞膜の改変による植物の酸化還元能力の改変

酸化ストレスは植物細胞にストレス誘導性の細胞死を引き起こす事が知られている。この細胞死を抑制する機能を持つ因子として *Bax Inhibitor 1* 遺伝子 (BI-1) がシロイヌナズナやイネから単離されていた (Kawai ら¹⁾, Kawai-Yamada ら²⁾)。そこで、機能に関する研究が進んでいたシロイヌナズナの *AtBI-1* を、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターの制御下で高発現するイネ系統（日本晴）を作出した。この形質転換イネ系統における膜組成がどのように変化したか、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) を用いて解析するとともに、酸化ストレス耐性能力の評価をおこなった。さらに、シグナル受容体やイオンチャネルタンパク質が局在し、細胞のストレス応答性の決定に重要な役割を果たしていると考えられている細胞膜マイクロドメインに含まれるスフィンゴ脂質とタンパク質のプロフィアリングをおこない、イネの酸化ストレス応答性を決定する因子の同定を試みた。

ウ 研究結果

（ア）NAD 代謝改変イネにける代謝・生育解析
3 種類 の NAD (P) (H) 代謝 酵 素 (NADS,

NADK2, NMNAT) をユビキチンプロモーター下で高発現するイネ系統 (日本晴) の作出をおこない、得られた植物体における遺伝子発現、酵素活性測定をおこない、発現量が約 1.2-1.8 倍になった形質転換植物系統を得た。キャピラリー電気泳動質量分析計 (CE-MS) により代謝物を定量した結果、NADK2 高発現系統では、NADP (H) 量の増加が検出された。また、この時、全ピリジンヌクレオチド量 (Total NAD (P) (H)) は変化していないが、NADP/NAD 比が上昇しており、NADP (H) プールが増大していることが明らかとなった (図 3224-2)。

これらの植物体に酸化ストレスとして過酸化水素、メチルビオロゲン処理をおこない、細胞外へのイオンの漏出を指標として感受性評価をおこなった結果、形質転換体ではイオン漏出量が低く抑えられており、酸化ストレスに対する感受性が低下してい

ることが明らかとなった (Takahara ら³⁾)。

(イ) NAD 代謝改変イネにおける代謝・生育解析

NADK2 高発現イネ系統について、光合成パラメータを指標に NADP (H) プールの増加が光合成電子伝達系に与える影響を評価した。その結果、NADK2 高発現イネでは生育光強度である 300 ネでは生育光²/s で光化学系 II を通る電子伝達の量子収量である ϕ 通るがコントロール個体より高い値を示した。そこで、光強度を変えて電子伝達速度を測定した結果、形質転換イネは 300 値を示した。²/s 以上の強光下で電子伝達速度が優位に増加していた (図 3224-3)。さらに NADK2 高発現イネでは、炭酸同化速度、および ATP/ADP 比が増加していたことから、NADP (H) 量が増加することで還元力の供給が増し、下流の代謝系が促進していることが示唆された。さらに NADK2 高発現イネ系統に

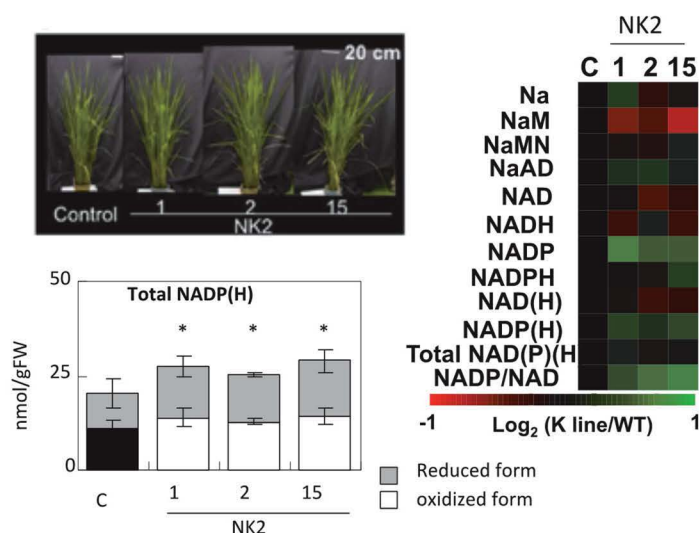


図 3224-2 NAD キナーゼ高発現イネの作出と代謝特性

葉緑体局在性 NAD キナーゼ 2 の高発現系統では、NADP(H) 量が増加していた。C, コントロール; NK2, NADK2 高発現系統。赤色がコントロールよりも減少、緑色が増加を示す。

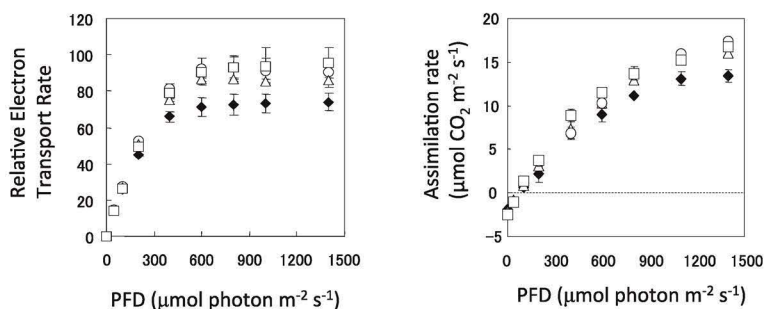


図 3224-3 NAD キナーゼ高発現イネにおける光合成電子伝達と炭酸同化の解析

葉緑体局在性 NAD キナーゼ 2 の高発現系統における電子伝達速度 (左) と炭酸同化速度 (右) を調べた結果、高い光強度の条件下でコントロール個体より高い値が示された。

ついて、生育調査を人工気象室内（14 時間明期 /10 時間暗期、光強度 300-400 μ mol $\cdot$ m⁻²·s⁻¹）で行った結果、草丈、穂長、粒数などにおいて、コントロール系統に対し、1.1-1.3 倍の増加が観察された。これらの結果から、葉緑体局在性 NADK2 の過剰発現による NADP (H) プールの増加が、イネの光合成能力の増強や酸化ストレス耐性の付与に有効であることが示された。

一方、NAD 量のさらなる増進を目的として NMNAT 及び NADS 高発現イネを選抜・確立したが、NAD の分解産物である Nicotinamide と ADP-ribose の蓄積が観察され、NAD 分解の促進が示唆された。NAD プールの増大が代謝に及ぼす影響を明らかにするために、CE-MS により代謝物を定量した結果、有機酸含量が約 20% 増加していた。また、NAD プールサイズと Adenylate energy charge (AEC) が相関関係にあり、NADS 系統において高い AEC を示した。さらに NADS 系統において、暗所における二酸化炭素放出量が有意に高かった。これらの結果から、NADS 高発現系統では、増加した NAD プールの NAD/NADH 比を一定に保つために、呼吸を促進することで NADH 産出量を増加させ、その結果、共役している ATP 合成が増大しているのではないかと考えられた。

（ウ）NADK2 高発現系統における代謝亢進の分子メカニズム

これまでの研究から、葉緑体内の NADP (H) 量を増やすことがイネの光合成活性や物質生産能力の増大に正の効果を持つ事が示された。この分子メカニズムを解明するため、内生の NAD キナーゼ遺伝子の発現パターンと外的に導入した遺伝子の発現パターンを調べた。イネゲノムは、細胞質局在性の酵素をコードする *Nadk1* および *Nadk3* と、葉緑体局在性の *Nadk2* を持つ。これらの遺伝子の発現をリアルタイム PCR によって調べた結果、*Nadk1*、および *Nadk3* は一日を通して大きな発現量の増減を示さなかったが、*Nadk2* のみは、明るくなると mRNA の蓄積量が減少を始め、暗くなると蓄積量が増加するという概日リズムを示す事が明らかとなった（図 3224-4）。従って、夜明け前の段階に最も mRNA が蓄積していることとなる。これまでの知見では、光合成に直接関わる遺伝子は、光によって発現誘導を受け、日中に発現量が最大となるもの

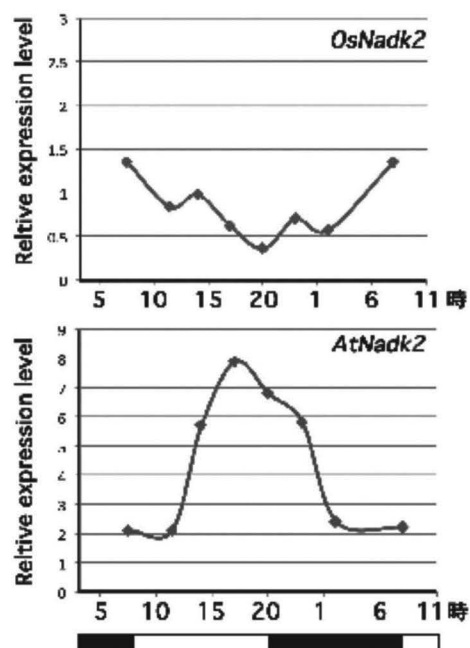


図 3224-4 NAD キナーゼ高発現イネにおける内生 *Nadk2* 遺伝子 (*OsNadk2*) と外来 *Nadk2* 遺伝子 (*AtNadk2*) の発現解析

内生の *OsNadk2* は暗条件下で発現量が上昇し、一方、導入した *AtNadk2* 遺伝子は明期に発現が上昇することがわかった。

が多い。明らかに *OsNadk2* 遺伝子の発現パターンはこれらとは異なることが示された。*OsNadk2* と類似の発現パターンを持つ因子を検索したところ、光化学中心に存在する D2 タンパク質などの翻訳に関与するシグマ因子の一つが、同様に夜間に発現量が増加し、日中に発現量が減少するパターンを示す事が明らかとなった。この因子は、夜間に、葉緑体内の環境を整え、光合成を行う為の準備をしていると考えられている。イネの内生の *Nadk2* も本来このような役割を担っているとも考えられた。一方、形質転換体では、導入した *AtNadk2* は、日中に高い mRNA の蓄積を示し、夜間に発現量が減少していた（図 3224-4）。本遺伝子は、ストレス応答性の発現をすることが知られているトウモロコシのユビキチンプロモーターにより発現制御されている。光合成の開始に伴い発生する活性酸素などに応答して、導入遺伝子が日中に高発現を示した可能性が考えられる。これらの結果を総合すると、NADK2 高発現体では、本来、内生の *OsNadk2* の発現量が低い昼間に NADK2 を高発現させることにより、光合成や一次代謝を促進することができたのではないかと

考えられた。

(エ) 細胞膜の改変による植物の酸化還元能力の改変

シロイヌナズナの *BI-1* 遺伝子をカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター下に連結したコンストラクションをイネ（日本晴）に導入し、形質転換個体を得た。発現解析をおこない、本遺伝子の高発現を確認した。イオンの漏出による電気伝導度の変化を指標としてストレス感受性を調べた結果、これらの形質転換系統では、酸化ストレス薬剤であるメナジオンに対する耐性が上昇していることが明らかとなった（Ishikawa ら⁴⁾）。本因子は近年、複数の脂質代謝酵素と複合体を作り、その代謝を制御すると予測されている（Nagano ら⁵⁾、Nagano ら⁶⁾、Nagano ら⁷⁾）。そこで、酸化ストレス下で過酸化されたり、シグナルとして作用することが知られている細胞膜脂質の組成が変化することが予測された。そこで、ガスクロマトグラフィー質量分析計により脂質分析をおこなった結果、本形質転換系統では、スフィンゴ脂質が増加していることが明らかとなった。さらに、スフィンゴ脂質が細胞膜上に存在するマイクロドメインの構成要素であることから、*BI-1* の高発現により、酸化ストレス耐性能が上昇した細胞と、コントロールイネ細胞より細胞膜マイクロドメイン画分を精製し、含まれているタンパク質の比較をおこなった。マイクロドメインには、様々なシグナル受容体やイオンチャネル、キナーゼなどのタンパク質が局在している事が知られている。プロテオーム解析の結果、複数のタンパク質の存在量が、*BI-1* の高発現によって変化している事が明らかとなった。

工 考 察

(ア) NAD 代謝改変イネにおける代謝亢進のメカニズム

NADP (H) の増大が酸化ストレス耐性の付与や代謝の亢進につながる事は、動物や菌類では良く知られている。動物細胞の系では、NADK によって産生された NADP は、種々のデヒドロゲナーゼによって NADPH に還元され、これが還元酵素によって使われ、再び NADP に戻るというリサイクルシステムが成り立っていると考えられている。本植物系統においても、葉緑体内で NADK2 により産生

された NADP が光合成電子伝達により還元力を受け取って NADPH が生成し、これがグルタチオンレダクターゼやチオレドキシシンレダクターゼによって酸化型にリサイクルされる系が動いていることが推測される。実際に、この植物体は、NADK を高発現した動物細胞と同様に、酸化薬剤ストレスに対する耐性を示した（Takahara ら³⁾）。近年、光合成関連酵素の活性がチオレドキシシンやグルタチオンを介したレドックス制御を受けるとする知見が報告されている。NADK2 高発現系統においても、mRNA の蓄積量の変化を伴わない、RubisCO や GAPDH、FBPase 活性の上昇が検出されていることから、NADPH/NAD のリサイクリング系を介したレドックス制御系が機能している可能性が考えられる（図 3224-5）。

また、イネとモデル植物であるシロイヌナズナの NAD 代謝改変の影響を光合成電子伝達能力の観点から比較すると、同様に葉緑体局在型 NAD キナーゼを高発現体させた個体でも、光強度に対する応答がイネとシロイヌナズナで異なっていることが示されている（Takahashi ら⁸⁾、Takahara ら³⁾）。すなわち、シロイヌナズナではその生育光強度（60 μ mol/m²/s）では顕著な光合成パラメータの変化を示さなかった。この現象は、シロイヌナズナに比べ、イネの方がより強い光強度に適応して光合成をおこなう能力に優れていることを示しており、葉緑体内還元力プールの改変の影響がイネでより顕著に現れた原因であると考えられる。

(イ) 細胞膜の改変による植物の酸化還元能力の改変の可能性

酸化ストレス誘導性細胞死を抑制する機能を有する *BI-1* を高発現した形質転換イネでは、その細胞膜組成が変化し、細胞膜マイクロドメイン上に存在する複数のタンパク質の存在量が変化していることが明らかとなった。量が減少していた因子の中には、病原抵抗性反応の際にみられる過敏感細胞死において発現量が増加することが報告されているもの等が含まれており、これらの因子の量を減らす事により、酸化ストレスに対する耐性を獲得している可能性が示された。新たに単離されたこれらの因子は、イネの酸化ストレス応答性を決定する役割を担っている可能性があり、今後、イネのストレス応答分子育種のターゲットとして注目される。

オ 今後の課題

(ア) さらなる代謝改変によるイネの成長制御の可能性

本研究では、複数の NAD 代謝改変イネ系統の代謝解析をおこない、葉緑体内の NADP (H) プールを増大させる事がイネの成長や物質生産能力を高める方向に作用することを明らかにした。これまでの研究では、モデル品種として日本晴を用いて形質転換系統の作出を行ってきたが、他品種での再現性、及び、より実用に近い品種でのデータ取得が今後必要となる。また、NADK2 単独での NADP (H) プールの増加は 1.1-1.3 倍という測定値を示しているが、これは NADK2 の基質の生合成経路がサイトゾルに存在するため、葉緑体への輸送の部分が律速となっている可能性が考えられる。実際に、NAD 合成系を高めた形質転換イネ (NMNAT, NADS の高発現体) では、NAD 分解系が活性化しており、サイトゾルにおける NAD の最大量が制限されていると考えられた。葉緑体内の NAD 類の量をさらに増加させる試みとして、葉緑体への NAD 輸送体の機能を強化したり、NAD キナーゼの酵素タンパク質自身の活性抑制制御を解除するといった手法を考案する必要がある。また、本研究では厳密に制御された室内人工気象室を用いた生育調査をおこない、NADK 高発現形質転換系統では、可食部、非食部双方のバイオマス増大を検出した。このような形質が、実際の野外で生育させた際にもみられるか、今後、網室での生育調査などを含め、検討していく必

要がある。

カ 要 約

(ア) NAD 代謝改変による酸化ストレス耐性の付与

酸化還元反応の電子伝達因子であるニコチンアミド補酵素 (NAD (P) (H)) の代謝改変により、環境変化の影響を受けにくい高収量性イネの分子育種を目指して研究を行った。作出した複数の NAD 代謝改変イネ系統のうち、葉緑体局在性の NAD キナーゼ遺伝子を高発現する系統では、細胞内の NADP (H) 量が増加し、カルビンサイクルや硝酸同化を含めた基礎代謝能力の増加が検出された。クロロフィル蛍光を用いた光合成電子伝達系の解析から、本系統では、利用できる光エネルギーの割合が増加しており、これにより、NADPH と ATP 量が増加していることが明らかとなった。さらにこの系統は、酸化ストレス薬剤に対する感受性が低くなっていることも示され、葉緑体内の NADP (H) を増加させる代謝改変が、イネの成長や物質生産能力に対して正の効果を有する事を明らかにした。

(イ) 細胞膜の改変による酸化ストレス耐性の付与

酸化ストレス誘導性細胞死の抑制因子としてシロイヌナズナで研究が進んでいる BI-1 遺伝子を高発現させたイネ系統を作出した。本形質転換細胞は、酸化ストレス薬剤であるメナジオンに対して抵抗性を示した。BI-1 は、小胞体膜上で脂質代謝酵素の制

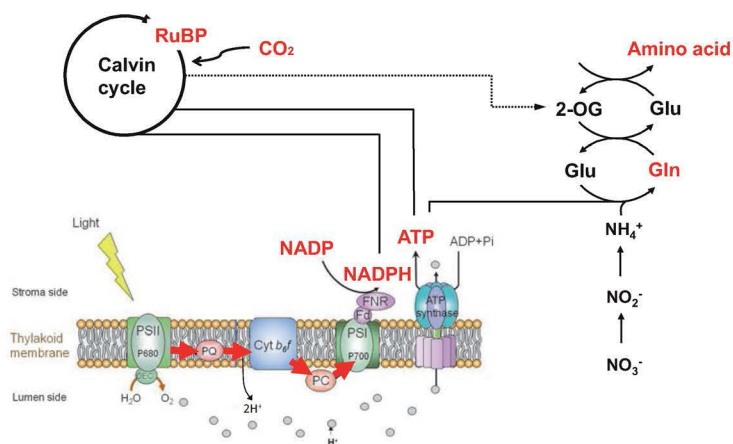


図 3224-5 NAD キナーゼ高発現イネにおける代謝変動

葉緑体内の NADP 量が増加する事により、光合成電子伝達に利用できる光エネルギー量が増加していることが示された。光合成電子伝達系により生産された ATP と NADPH は C / N 双方の代謝に正に働き、一次代謝全体が向上したと考えられる。赤字は NADK 高発現系統で増加していた代謝物。

御をおこなっていると考えられていることから、脂質分析を行った結果、スフィンゴ脂質量が増加していることが明らかとなった。スフィンゴ脂質は、細胞膜上のマイクロドメインを構成する成分である。そこで、細胞膜マイクロドメインタンパク質のプロテオーム解析をおこなった結果、複数のタンパク質の存在プロファイルが変化しており、こうした量的変動がイネの酸化ストレス応答性を制御していることが示唆された。

キ 引用文献

- 1) Kawai, M., Pan, L., Reed, J.C., Uchimiya, H. (1999). Evolutionally conserved plant homologue of the Bax Inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Lett.* 464 : 143-147.
- 2) Kawai-Yamada, M., Jin, L., Yoshinaga, K., Hirata, A., Uchimiya, H. (2001). Mammalian Bax-induced plant cell death can be downregulated by over-expression of *Arabidopsis Bax Inhibitor-1* (*AtBI-1*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 : 12295-12300.
- 3) Takahara, K., Kasajima, I., Hashida, S., Takahashi, H., Onodera, H., Toki, S., Yanagisawa, S., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. (2010). Metabolome and photochemical analysis of rice plants over-expressing *Arabidopsis* NAD kinase gene. *Plant Physiology.* 152 : 1863-1873.
- 4) Ishikawa, T., Takahara, K., Hirabayashi, T., Matsumura, H., Fujisawa, S., Terauchi, R., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M. (2010). Metabolome analysis of response to oxidative stress in rice suspension cells overexpressing cell death suppressor Bax inhibitor-1. *Plant Cell Phys.* 51 : 9-20.
- 5) Nagano, M., Ihara-Ohori, Y., Imai, H., Inada, N., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M. (2009). Functional association of cell death suppressor, *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome *b₅*. *Plant J.* 58 : 122-134.
- 6) Nagano, M., Takahara, K., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M. (2012). *Arabidopsis* sphingolipid fatty acid 2-hydroxylases (AtFAH1 and AtFAH2) are functionally differentiated in fatty acid 2-hydroxylation and stress responses. *Plant Physiology.* 159 : 1138-1148.
- 7) Nagano, M., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M. (2012). Plant sphingolipid fatty acid 2-hydroxylases have unique characters unlike their animal and fungus counterparts. *Plant Signaling & Behavior.* 7 : 1388-1392.
- 8) Takahashi, H., Takahara, K., Hashida, S., Hirabayashi, T., Fujimori, T., Kawai-Yamada, M., Yamaya, T., Yanagisawa, S., Uchimiya, H. (2009). Pleiotropic modulation of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis* plants overexpressing *NAD kinase 2* gene. *Plant Physiology.* 151 : 100-113.

研究担当者（内宮博文*、川合真紀）

3 イネ種子の登熟や高温下での品質に係わる主要な質的形質遺伝子に関する研究

(1) イネの花粉不稔突然変異体の解析 (IPG0015)

ア 研究目的

イネの遠縁交雑においては、雑種不稔が頻繁に観察される。また、低温や高温などのストレスによっても不稔が引き起こされる。これらの不稔現象は、主に花粉が異常となることにより起こる。不稔は収量の低下に直接つながるだけでなく、野生イネ由来の有用遺伝子の利用、遠縁交雑ハイブリッド品種の育成を困難にするなど、様々な場面で重要な問題となっている。

花粉形成に関わる遺伝子群は、これまで主に組織特異的な cDNA のスクリーニングにより同定されてきた。しかしながら、個々の遺伝子の機能を詳細に解析した例はまだ多くない。すなわち、イネの花粉形成に関与する遺伝子やそれらの機能に関する基礎的知見は、不十分であると考えられる。

これらの解析には、突然変異体を用いた手法が有用であると考えられるため、イネにおける花粉不稔突然変異系統の作出を行ってきた。本研究では、これらの花粉不稔系統に関して細胞学的解析を行うと

共に、原因遺伝子の単離と機能解析を行った。

イ 研究方法

(ア) 花粉不稔系統の細胞学的解析

四分子変異体の原因遺伝子 (*SPOROPHYTIC POLLEN STERILITY 12*, *sps12*) および配偶体型変異体の代表として、*GAMETOPHYTIC POLLEN STERILITY 4* (*gps4*) および *gps6* の詳細な形態観察を行った。

(イ) 花粉不稔突然変異遺伝子の単離

sps12 の候補遺伝子アプローチによる単離を、および *gps4* および *gps6* のマップベースクローニングによる単離を試みた。

ウ 研究結果

(ア) 花粉不稔系統の細胞学的解析

sps12 は花粉稔性や種子稔性が低下するほか、一部の花粉が花粉四分子のまま成熟する表現型を示す。また、イネの染色体7にマップされていた。*sps12* 変異体の成熟期花粉をアニリンブルー染色して蛍光顕微鏡により観察した結果、四分子花粉の接着面に明るい部分が見られ、カロース様の物質の存在が示唆された (図 3231-1)。

gps4 および *gps6* 変異体のヘテロ個体においては変異 allele を持つ花粉が異常となるため、花粉稔性が約 50% に低下し、変異 allele を持つ花粉は後代に伝達しない。DNA マーカー選抜によりヘテロ個体を選抜し、サンプリングと観察を行った。*gps4* ヘテロ個体では、約半数の花粉でデンプン粒の蓄積が不十分となり、それらの異常花粉は2細胞期または成熟していない3細胞期で開花を迎えていた (図 3231-2)。*gps6* ヘテロ個体では、成熟期においては、正常花粉、異常花粉ともに3細胞期まで到達し、デンプンの蓄積も観察された (図 3231-3)。また、そ

れよりも若い、正常花粉が2細胞期前半の時期 (デンプン蓄積が始まっていない) を観察したところ、1細胞の花粉と2細胞の花粉がほぼ半数ずつ観察された (図 3231-3)。これは、既にこの時期において、変異 allele を持つ花粉に異常が生じている事を示唆した。異常花粉においては液胞が未発達、核が花粉の中心部分に存在するなどの成育遅延、および正常花粉には観察されない繊維状に染色されるものが観察されるなどの特徴が見られた (図 3231-2 D)。

(イ) 花粉不稔突然変異遺伝子の単離

sps12 の特徴はシロイヌナズナの *qrt* 変異体と類似しているためイネオースログの探索を行った結果、*qrt1* のイネオースログが、*sps12* がマップされている領域に存在した。このため、当該遺伝子 (Os07g0607400) の塩基配列を解析した。cDNA 配列の翻訳領域およびイントロン領域を解析したが、塩基配列変異は見つからなかった。*sps12* 変異体は、*qrt1* 変異体とは 1) 花粉稔性が低下する、2) 四分子花粉の割合が少ない、という点で異なることから、イネの *qrt1* 変異体ではない可能性がある。

gps4 および *gps6* 遺伝子に関しては、高精度連鎖

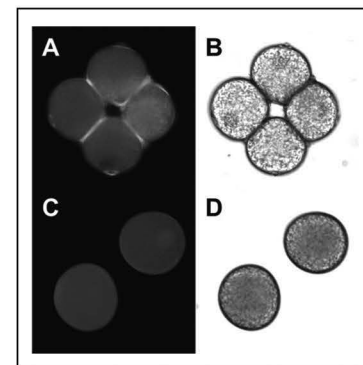


図 3231-1 *sps12* 個体の四分子花粉 (A、B) および正常個体の花粉 (C、D) アニリンブルー染色 (A、C)、および同視野の明視野像 (B、D)

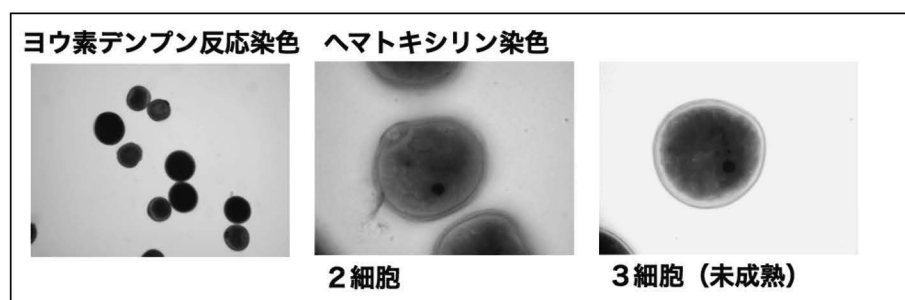


図 3231-2 *gps4* ヘテロ個体の花粉

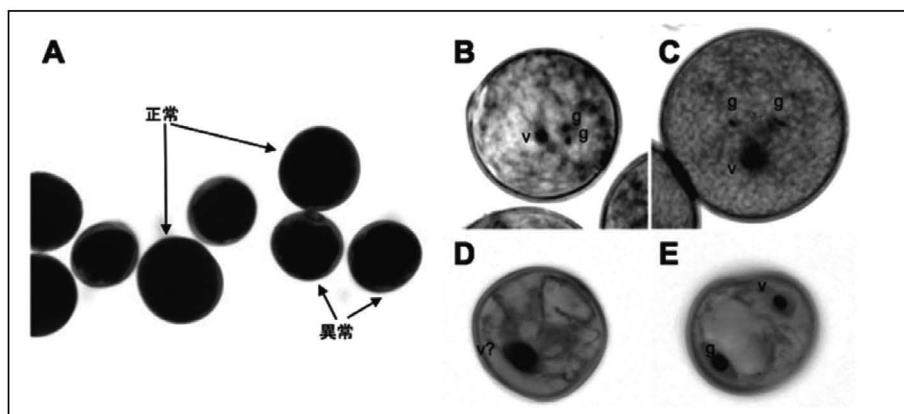


図 3231-3 *gps6* ヘテロ個体の花粉

成熟期花粉のヨウ素デンプン反応染色 (A)、
成熟期花粉のヘマトキシリン染色 (B、C)、
二細胞期花粉のヘマトキシリン染色 (D、E)。
B および D は異常花粉、C および E は正常花粉。

解析による原因遺伝子単離を試みた。*gps4* に関しては、減数分裂時の組換え頻度が低い領域に存在したため、3.6Mb までにしか、存在領域を絞り込めなかった。*gps6* に関しては座乗領域をイネゲノム上の約 50kb の領域に絞り込んだ。

エ 考察

(ア) 花粉不稔の細胞学的観察による特徴付け

花粉不稔の突然変異体の解析においては、細胞学的観察による特徴とその原因遺伝子を関連付ける情報が不足していた。本研究では、原因遺伝子が異なれば、異常の形態も異なっていることが示された。

(イ) 花粉不稔遺伝子の単離

通常の突然変異と同様のマップベース法による遺伝子単離を試みたが、遺伝子単離には至らなかった。候補遺伝子を絞り込む情報の少なさや、多型親に野生イネイントログレッション系統を用いた事による組換え頻度の低さ・マーカー作成の困難さなどが原因であった。

オ 今後の課題

(ア) 花粉不稔現象の理解に向けて

遠縁交雑やストレスによるイネの不稔には、花粉不稔が大きく関わっている。今後、研究を進めて、花粉不稔の形態と原因遺伝子の関係を明らかに出来れば、不稔現象克服に向け、有益な情報となるであろう。ただ、花粉不稔を引き起こす遺伝子は非常に多いと考えられており、更に多くの花粉形成関連遺

伝子の解析および、より詳細な花粉不稔の特徴付けのための手法開発が望まれる。

力 要 約

(ア) 花粉不稔系統の細胞学的解析

花粉不稔突然変異系統 *sps12*、*gps4*、*gps6* の花粉の形態を明らかにした。

(イ) 花粉不稔突然変異遺伝子の単離

gps4、*gps6* の候補領域を、それぞれ 3.5Mb、50kb に絞り込んだ。

研究担当者 (土井一行*)

(2) イネ生殖細胞分化関連遺伝子の単離と機能解析 (IPG0016)

ア 研究目的

生殖細胞の分化初期から減数分裂に至る過程は、遺伝学および育種学の根幹をなす重要な生命現象であるが、イネを含む植物ではこの過程に関わる遺伝子の単離・解析が、動物と比較して遅れている。発達段階の生殖組織は、高温や低温などの環境ストレスに脆弱であることが知られる (文献 1)。また、栽培イネ品種と遠縁野生イネとの種間雑種で生じる減数分裂異常は、野生イネ有用遺伝子の育種利用を困難にする直接的な原因である (文献 2)。生殖細胞分化の初期過程で働く遺伝子の機能を解析することで、植物の生殖細胞分化・発生のメカニズムを理解するための基礎科学的な知見が得られるだけでな

く、生殖器官の環境ストレスに対する脆弱性を克服し、安定的な種子生産を可能にする分子育種学的手法の開発に対する重要なヒントが得られると期待できる。

本課題では、生殖器官の発生過程で、生殖細胞が体細胞分裂から減数分裂へと移行するタイミングを制御するイネ遺伝子 *MEL2* を同定し、その機能を解析した。またマイクロアレイ技術と、減数分裂や生殖組織の発生に関与する突然変異体を組み合わせたトランスクリプトーム解析により、新規の生殖細胞分化関連遺伝子の単離に成功したので報告する。

イ 研究方法

(ア) 突然変異遺伝子の同定

農業生物資源研究所ゲノムリソースセンターで管理・提供される *Tos17* 挿入変異系統から、種子稔性に異常をきたす 600 系統を入手し、種子不稔個体の減数分裂染色体の挙動を光学顕微鏡で観察した。一方、各系統の M3 分離集団 20 個体の成葉から DNA を抽出し、*Tos17* の DNA 配列をプローブとしてサザンブロット解析を行った。種子不稔形質と遺伝的に完全連鎖するバンドが得られた系統は、翌年に集団数を約 100 個体に増やして、同様に連鎖解析を行い、*Tos17* 隣接ゲノム配列の解読により原因候補遺伝子を絞り込んだ。

(イ) 正常型ゲノム配列を用いた突然変異表現型の相補性試験

絞り込んだ遺伝子領域のゲノム配列について、上流 2 ～ 3kbp 領域を含む蛋白質コード領域をバイナリーベクター pPZP2H-lac にクローニングし、突然変異イネ個体の形質転換を行い、種子稔性の回復程度を調査した。

(ウ) 減数分裂染色体の挙動観察と MEL2 蛋白質の細胞内局在解析

以下の蛋白質に対する抗体を用いて減数分裂染色体の挙動を共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM) で観察した；動原体蛋白質 CenH3、テロメア結合蛋白質 OsPOT1、相同染色体対合に必須の蛋白質 PAIR2 と OsZYP1 である。MEL2 の細胞内局在は、上流 2kbp を含む MEL2 遺伝子ゲノム配列について、その MEL2 翻訳産物の N-末端あるいは C-末端に T7 タグ (MAS MTGGGQMG) を付加するような配列を挿入し、pPZP2H-lac ベクターを用いて *mel2*

突然変異ホモ個体に導入し、T7 抗体の蛍光染色による細胞内局在を CLSM で観察した。

(エ) 前減数分裂期 DNA 複製の検出

約 3 ～ 4cm 長の幼穂を 100 μ M ブロモデオキシウリジン (BrdU) 溶液に 4 時間浸した後、4% パラフォルムアルデヒド溶液で固定し、抗 BrdU 抗体により減数分裂細胞への BrdU の新規取り込み程度を観察した。細胞周期マーカーである *CDKB2;1*、*Histone H4*、*MEL1* 遺伝子の時空間的発現について、正常型イネと *mel2* 突然変異体の間で比較した。

(オ) トランスクリプトーム解析

正常型イネおよび種子不稔性を示すイネ突然変異体から、前減数分裂間期あるいは減数分裂第一前期の雄性生殖細胞を含む葯 (0.4-0.5 mm あるいは 0.6-0.7 mm) から RNA 抽出し、イネ 44K マイクロアレイを用いた解析に供した。正常型と変異体とで発現程度が有意に異なる遺伝子を選抜し、*Tos17* ミュタントパネルから変異系統を選抜した。

ウ 研究結果

(ア) 体細胞分裂から減数分裂への移行に必要なイネ遺伝子 MEL2 の解析

本成果は、PLoS Genetics 誌上で発表した (文献 3)。

a MEL2 遺伝子の同定

Tos17 挿入突然変異系統のなかで種子不稔性を示す個体を対象として光学顕微鏡による減数分裂染色体の挙動観察を行い、減数分裂への移行が正常に行われない変異系統を見いだした。連鎖解析の結果、この変異表現型は *Tos17* の挿入と完全連鎖しており、*Tos17* 配列を利用して原因遺伝子を同定し、*MEL2* と命名した。*Tos17* による *MEL2* 遺伝子破壊個体は、減数分裂初期段階において生殖母細胞 (減数分裂細胞) およびタペート細胞がアポトーシスによる肥大化を起こし、雌雄ともに配偶子が全く出来ない。

b MEL2 は雌雄の生殖細胞およびタペート細胞で発現

イネ遺伝子発現データベース RiceXPro (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp>) で検索したところ、*MEL2* 転写産物は、減数分裂前の若い穂および生殖器官で高発現していた。組織 *in situ* ハイブリダイゼーションの結果から、雌雄の始原生殖細胞の発生

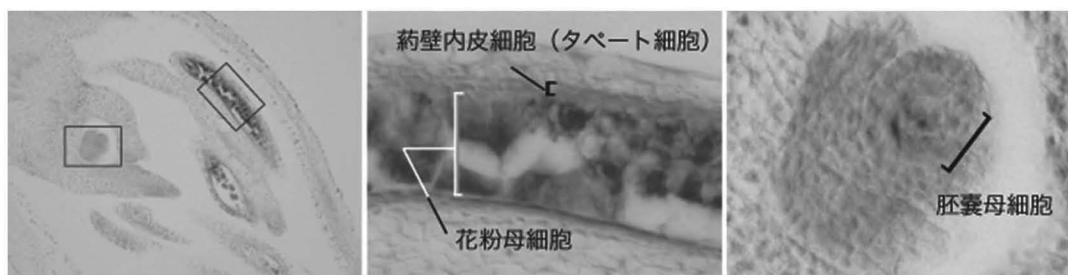


図 3232-1 *MEL2* mRNA は雌雄の生殖母細胞およびタペート細胞を含む葯壁内皮で発現する

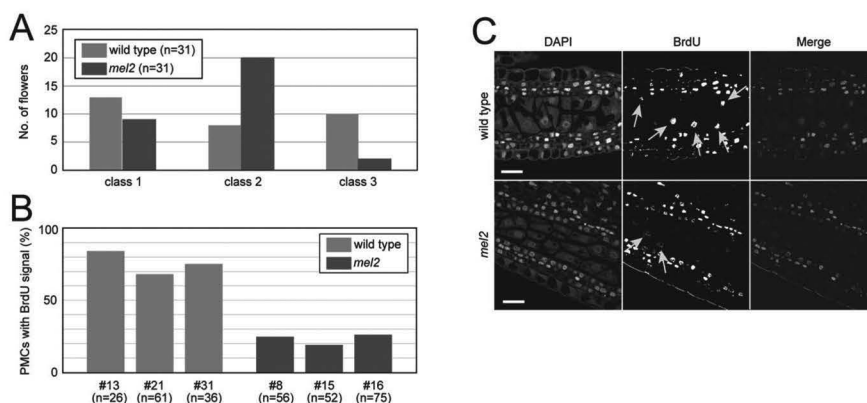


図 3232-2 *mel2* 突然変異体の葯では減数分裂前 DNA 複製が同調的に起こらない

- A) 0.4mm 葯内での前減数分裂 DNA 複製期の同調性。クラス 1；BrdU が取り込みが全く見られない穎花、クラス 2；BrdU を取り込んだ生殖細胞の割合が 50% 未満の穎花、クラス 3；BrdU を取り込んだ生殖細胞の割合が 50% 以上の穎花。
- B) クラス 2 と 3 の穎花を 3 つずつ調べたところ、正常型では同一穎花内で約 80% の生殖細胞が BrdU シグナルを示すが、*mel2* 変異体では約 20% だった。
- C) 抗 BrdU 抗体を用いた間接蛍光抗体法の実験。矢印は BrdU シグナル。Bar = 10μm。

後まもなく増加し、減数分裂前の生殖母細胞で徐々に減少することが確認された。*MEL2* 遺伝子は、雌雄の孢子母細胞（減数分裂細胞）に加えて、小孢子に栄養や物質を供給するタペート細胞など、雄性生殖細胞を包む保育細胞でも発現する（図 3232-1）。

c *MEL2* は減数分裂前 DNA 複製開始の同調性の確立に必要

mel2 突然変異体では、多くの生殖母細胞が減数分裂に入れず、細胞および核の大きさも正常型と比較して明らかに不均一だった。また低頻度ではあるが、体細胞様の細胞分裂をするものも観察された。これらの結果から *mel2* 変異体では、同一葯内での雄性減数分裂細胞の発生の同調性が失われている可能性が示唆された。同一葯内での減数分裂の同調性は、減数分裂前 DNA 複製の同調的な開始により確立することが知られる。同時期における *mel2* 変異体の DNA 複製を観察するため、BrdU 取り込み実験を行った。正常型では同一葯内の 80% 以上の

花粉母細胞が同調的に BrdU を取り込んでおり（図 3232-2）、減数分裂前の DNA 複製開始が同調的に行われていた。一方 *mel2* 変異体では同調性が失われていた。

次に、細胞周期マーカーとして、G2/M 期および S 期でそれぞれ転写が活性化される *CDKB2;1* および *Histone H4* 遺伝子による *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果 *mel2* 突然変異体では、本来は葯内で同調的に進行するはずの前減数分裂 DNA 複製がほとんど開始されず、依然として非同調的な細胞周期を継続していることがわかった（図 3232-3）。また減数分裂前のイネ生殖細胞で特異的に発現する *Argonaute* 遺伝子 *MEL1* の発現をみたところ、正常型では *MEL1* 発現が低下し減数分裂に移行している時期でも、*mel2* 突然変異体では *MEL1* 発現が継続し、減数分裂にほとんど移行していないことが明らかとなった（図 3232-3）。これらの結果を総合して考えると、*MEL2* 遺伝子は、減数分裂直

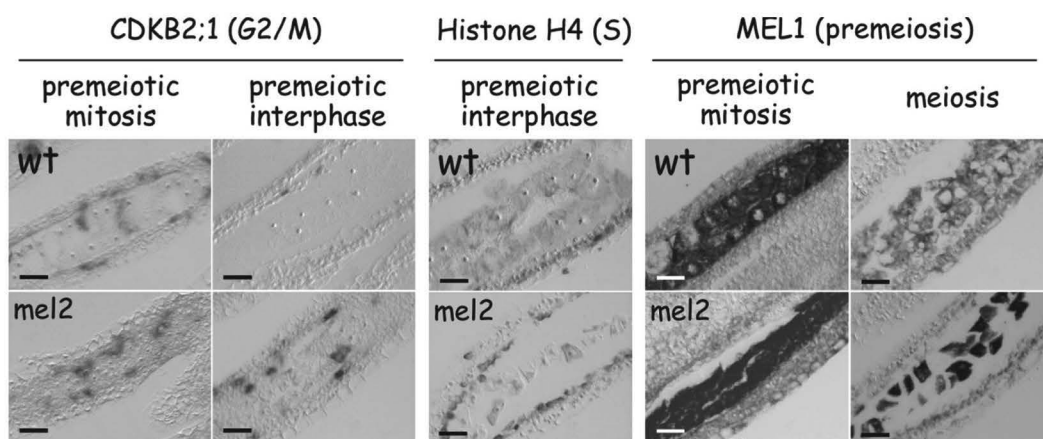


図 3232-3 *mel2* 突然変異体の葯では減数分裂直前 DNA 複製の同調性が確立されない

左) G2/M 期マーカー *CDKB2;1* 遺伝子の発現。変異体の生殖細胞では、前減数分裂 DNA 複製期でも、体細胞分裂期と同様にパッチ状のシグナルが観察される。
 中) S 期マーカー *Histone H4* 遺伝子の発現。正常型の生殖細胞では、前減数分裂 DNA 複製が同調的に起こるが、変異体ではバラバラに S 期に入っている。
 右) *MEL1* 遺伝子の発現。正常型の生殖細胞では、減数分裂に移行すると *MEL1* mRNA 量が著しく低下するが、*mel2* 変異体では mRNA 量の低下が起こらない。
 以上の結果は、*mel2* 生殖細胞の減数分裂移行が異常であることを示す。Bars = 20μm。

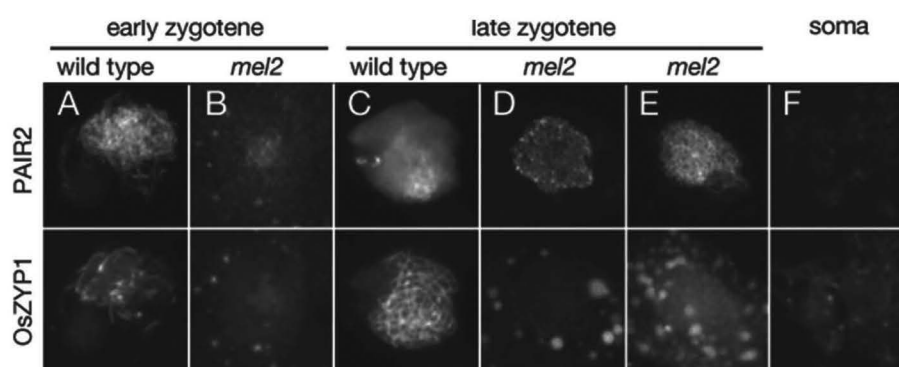


図 3232-4 *mel2* 変異では減数分裂移行が阻害あるいは遅延する

PAIR2 はレプトテン期、OsZYP1 はザイゴテンからパキテン期にかけて染色体上にひも上のシグナルを示すが (A, C)、体細胞では全く発現しない (F)。*mel2* 変異体の減数分裂細胞の多く (80%) では PAIR2 および OsZYP1 のひも上のシグナルが全く見えない (B, D)。約 20% の細胞は PAIR2 シグナルを示すが (E)、ステージ進行は遅れている。

前の G1 期から S 期の移行に必要であると結論できる。

d MEL2 は減数分裂の正常な進行にも必要

相同染色体の対合に必須の蛋白質 PAIR2 および OsZYP1 の蛍光抗体染色を行った。両遺伝子は、変異体でも正常に転写されていた。正常型の花粉母細胞では、ザイゴテン前期から後期にかけて、PAIR2 シグナルが徐々に ZYP1 と入れ替わっており (図 3232-4A, C)、相同染色体のシナプシス進行は正常だった。一方 *mel2* 変異体のザイゴテン前期では、両シグナルとも全く検出されなかった (図 3232-4B)。後期になると、80% 程度の *mel2* 花粉母細胞で

PAIR2 の核への蓄積が観察されたが、その局在は異常であり、ZYP1 の局在は認められなかった (図 3232-4D)。しかし残りの 20% では PAIR2 シグナルが検出できたが、ステージ進行は明らかに遅延していた (図 3232-4E)。この結果は、MEL2 機能は減数分裂そのものを進行させるメカニズムには含まれないことを意味する。しかし *mel2* 変異体では減数分裂の進行が遅れていたことから、*mel2* 変異は、減数分裂前 DNA 複製の開始だけでなく、正常な進行にも影響を及ぼすと考えられた。

e MEL2 蛋白質は生殖母細胞およびタペート細胞の核膜周辺の細胞質に局在

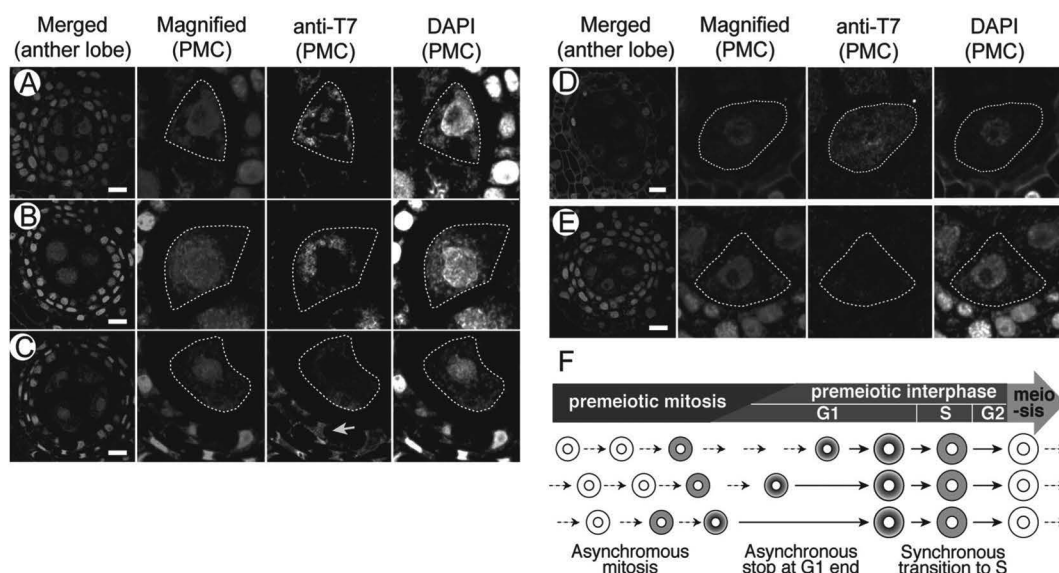


図 3232-5 MEL2 蛋白質は減数分裂前間期において細胞質側の生殖細胞核周辺に局在する
A - C) MEL2-T7n 蛋白質の細胞内局在。
A) 減数分裂前体細胞分裂期。MEL2 は細胞質全体に散在する形で発現を開始する。
B) 減数分裂前間期。MEL2 蛋白質は細胞質側の核周辺に局在するようになる。
C) 減数分裂レプトテン期。MEL2 は細胞質に分散。タペートにも局在 (矢印)。
D) 減数分裂前間期。MEL2-T7c では、T7n (B) と異なりシグナルが細胞質に散在。
E) 免疫前血清を用いた陰性コントロール。Bar = 10 μ m。
F) MEL2 蛋白質の局在をまとめた模式図。生殖細胞の細胞質における MEL2 の局在性の変化を、灰色および灰色のグラデーションで示す。

MEL2 の C-末端側 (MEL2-T7c) あるいは N-末端側 (MEL2-T7n) に T7 ペプチドを付加した 2 種類の融合蛋白質を、MEL2 プロモーターにより発現させた形質転換植物を作成した。2 種類の融合蛋白質の発現はともに *mel2* 変異による種子不稔性を一部回復したため、抗 T7 抗体を用いた以下の細胞抗体染色を行った。減数分裂前の花粉母細胞において、それまで細胞質全体に分布していた MEL2-T7c が、細胞質側の核膜周辺に局在する傾向が認められた (図 3232-5A、B)。減数分裂に移行後は、花粉母細胞での核膜周辺への局在性は失われ、代わりにタペート細胞で核膜周辺への局在が認められた (図 3232-5C)。一方 MEL2-T7n では、細胞質全体に均一な T7 シグナルが検出され (図 3232-5D)、N-末端側は、C-末端側とは異なる何らかの翻訳後制御 (切断等) を受ける可能性が示唆された。

(イ) 突然変異体を用いたトランスクリプトーム解析と新規遺伝子の同定

生殖細胞、とくに減数分裂前の細胞は、それ以外の生殖器官の体細胞と切り離して収集、解析することが難しく、それゆえ生殖細胞特異的な遺伝子発現解析や生化学的解析などを行うのが極めて困難であ

る。そこで本課題では、前項で概説した遺伝子も含め、本課題あるいはそれ以前の課題で同定・解析を行った減数分裂への移行に必須の働きをもつ 3 つのイネ遺伝子 *MEL1*、*MEL2*、*MSP1* について (文献 3、4、5)、その突然変異体を利用して、減数分裂期の穎花のマイクロアレイ解析を行った。これら 3 遺伝子が機能欠損した突然変異体は、いずれも減数分裂細胞の発達、あるいは周辺の保育細胞の発達など、生殖器官のなかの特定の組織・細胞でのみ観察される。そのため、正常型と変異体型で得られた結果を比較することで、生殖細胞での事象に起因する結果のみを抽出することが可能になるとと思われる。

a 3 つの突然変異体を利用したマイクロアレイ解析

イネ遺伝子 *MEL1*、*MEL2*、*MSP1* の機能が欠損した突然変異体は、いずれも減数分裂進行、あるいは生殖細胞周辺保育細胞の発生が異常となり、種子稔性がほぼ完全に欠損する (文献 3、4、5)。正常型および変異体型の若い穂から全 RNA を抽出し、イネ 44K マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。その結果、正常型と比較して有意に発現の変動がみられる遺伝子を、それぞれ 368 個、

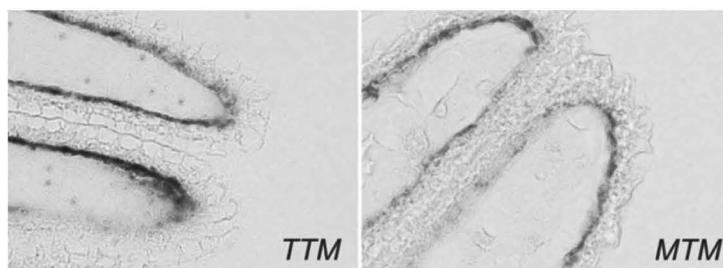


図 3232-6 イネ遺伝子 *TTM* および *MTM* は葯壁内層で特異的に発現する

イネの減数分裂期における葯の縦切り切片を作成し、*TTM* および *MTM* の cDNA 配列の一部をプローブとした *in situ* ハイブリダイゼーション。*TTM* の mRNA (左) は、葯壁 4 層のうち最内層であるタペート組織で特異的に発現していた。一方 *MTM* (右) は、内側から 2 番目の中間層で特異的に発現していた。

944 個および 847 個見いだした。

b 新規生殖細胞分化関連遺伝子の絞り込み

これら 3 遺伝子の突然変異体では、減数分裂前の生殖細胞あるいはその周辺細胞のみで特異的に変異表現型が観察されることから、同マイクロアレイで抽出される遺伝子は、それらの細胞で何らかの役割を果たしている可能性が充分期待できる。更に、Tang et al. (文献 6) が報告した前減数分裂期で特異的に発現する 365 個を加え、合計 2,524 遺伝子 (重複を含む) を変異体選抜の対象遺伝子とした。

上記で選抜した遺伝子について、RiceXPro で発現の特異性を確認すると共に、*Tos17* ミュータントパネルその他のリソース DB にアクセスして、突然変異体の有無を確認した。その結果、以降に示す 5 つの候補遺伝子が得られた。

c 葯壁内層組織で機能するイネ遺伝子 *TTM* と *MTM* の解析

msp1 突然変異体を利用したマイクロアレイ解析から、タペートなど葯壁内層組織での発現が示唆された 2 つのイネ遺伝子 *TTM* と *MTM* の解析を行った (文献 7)。*TTM* と *MTM* は真核生物に広く存在する転写因子をコードし、植物の機能未知の同一サブファミリーに属するパラログである。両転写産物は 4 層の葯壁が形成される前減数分裂期以降で発現し、前者はタペートで、後者は中間層でそれぞれ特異的な発現を示した (図 3232-6)。*ttm* 変異体では、小孢子期のタペート崩壊が起こらない。一方 *mtm* 変異体では葯壁細胞が異常に肥大していた。両変異体ともに、パキテン後期周辺の減数分裂細胞で染色体断片などの異常が観察された。現在、正常型ゲノム配列を用いた変異表現型の相補性試験を実施しており、*TTM* については原因遺伝子であると確定す



図 3232-7 *isd* 突然変異体では生殖成長期の節間伸長および種子休眠性が異常になる

A-B) 正常型の植物体 (A) および成熟穂 (B)。
C-D) *isd* 変異体の植物体 (C) および成熟穂 (D)。
E) 正常型 (左) および *isd* 変異体 (右) の成熟穂。
矢頭は穂発芽した種子を示す。
F) 穂発芽した *isd* 変異体の種子の拡大図。

ることができた。

d 節間伸長、種子稔性および穂発芽性に関与するイネ遺伝子 *ISD* の同定

mell 突然変異体を利用したマイクロアレイ解析から、生殖細胞の初期発生への関与が予想されるイネ遺伝子 *ISD* の解析を行った。*ISD* 遺伝子は、メタロペプチダーゼ M20 ファミリーに属する機能未知の蛋白質をコードしていた。*ISD* 遺伝子はイネ生活環で全般的に発現しているが、特に胚乳で高い発現を示した。*isd* 変異体では、生殖成長期における節間伸長に異常が見られ、特に上から数えて第一、第二節間が正常型と比較して有意に短かった。また、種子稔性が低下するとともに、稔実種子では休眠性の低下が起こり、降雨後にほとんどで穂発芽する傾向が認められた (図 3232-7)。

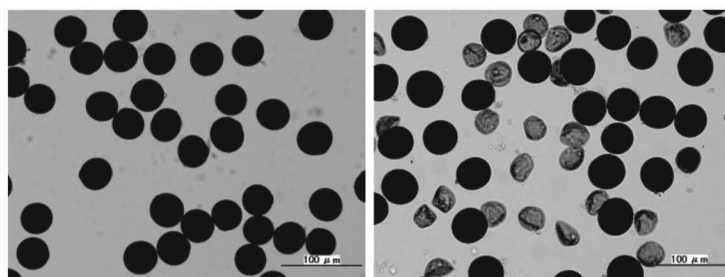


図 3232-8 ヨード染色したイネ花粉

$+/cap1$ ヘテロ接合体では、約半数の花粉でデンプンが蓄積せず、染色されない (右)。左は正常型イネ ($+/+$) の花粉。

e 種子稔性に寄与するイネ遺伝子 *RCP* の解析
種子不稔性を示す *Tos17* 突然変異体の解析から、種子稔性に寄与するイネ遺伝子 *RCP* を同定した。*RCP* 遺伝子は、水酸化酵素ファミリーであるシトクロム P450 蛋白質をコードしていた。同じくシトクロム P450 をコードするイネ遺伝子 *CYO704B2* は、タペート組織で機能することが既に報告されているが、本課題で同定した *RCP* とは異なる遺伝子であった。現在、*rcp* 変異体では生殖器官のどの発生ステージが異常になっているのかを詳細に解析しているところである。

f 花粉形成過程で重要な役割を果たすイネ遺伝子 *CAP1* の解析

本遺伝子の同定は、上記 4 遺伝子とは異なる経緯で同定した。本課題遂行のために栽培、遺伝解析をしていた *Tos17* ミュータントパネル系統のなかで、配偶体型遺伝様式 (花粉からの突然変異遺伝子の伝達が抑制される遺伝様式) を示す *Tos17* 挿入変異を含む 1 系統を見だし、秋田県立大学の上田健治博士らとの共同研究で原因遺伝子の単離と機能解析を行った。

イネ *CAP1* 遺伝子は、精細胞が分裂する前の二細胞花粉期の葯で強く発現する。*cap1* 突然変異を保有する花粉は、ほとんどの細胞成分が失われて花粉外壁 (エキシン) だけの構造になり、花粉管伸長能が失われる (図 3232-8)。しかし、受精能力をもつ極めて少数の *cap1* 変異花粉が生産されるため、低い頻度ながら *cap1* ホモ接合体が得られる。ホモ接合体では花粉形成以外のイネの成長は全く正常であることから、*CAP1* の花粉特異的な機能が明らかとなった。*CAP1* タンパク質は、植物の L- アラビノキナーゼと高い相同性を示し、細胞壁代謝の過程で

生じる L- アラビノースを再利用のためリン酸化している可能性が示唆される。遺伝子発現パターンがシロイヌナズナのアラビノキナーゼ様遺伝子の 1 つと酷似することから、*CAP1* 機能が被子植物で広く保存されており、花粉形成過程において非常に重要な役割を果たすことが示唆された。本研究の成果は、*Plant Physiology* 誌上で発表した (文献 8)。

工 考 察

(ア) 体細胞分裂から減数分裂への移行に必要なイネ遺伝子 *MEL2* の解析

本課題では、*MEL2* 遺伝子について以下のことを明らかにした；

(A) RNA 認識モチーフ (RRM) を持つ新規のイネ蛋白質をコードする、

(B) 突然変異体では、雌雄の生殖器官で減数分裂への移行が阻害される、

(C) 突然変異体の葯では、前減数分裂 DNA 複製の同調的な進行が阻害される、

(D) 前減数分裂 DNA 複製期において生殖細胞の細胞質側核周縁部に局在し、その前後では細胞質に分散する。

以上の結果からイネ *MEL2* 遺伝子は、イネの生殖器官における生殖細胞の体細胞分裂から減数分裂への移行に必須の役割を担う RNA 結合蛋白質をコードしていると結論した。*MEL2* 蛋白質が保存する RRM およびその周辺のアミノ酸配列は、ヒトの無精子症との関連性が報告される *DAZAP1* 遺伝子と高い相同性を示す (文献 3)。ヒト *DAZAP1* は、無精子症の原因蛋白質である *DAZ* と結合する蛋白質である。*DAZ* を含む蛋白質複合体は、生殖細胞で発現するメッセンジャー RNA の 3'-側非翻

訳領域の AU リッチ配列に結合し、ポリ A 結合蛋白質 (PABP) と協調して、ターゲットである mRNA の翻訳制御に関わっているとの報告がある (文献 9)。最近、本課題とは異なる私たちの研究成果として、イネ MEL2 蛋白質が保存する RRM は、U リッチなコンセンサス配列に結合する傾向があることを *in vitro* の実験から見いだした (Miyazaki et al. 投稿中)。本課題は、減数分裂移行が植物と動物で共通したメカニズムで制御される可能性を、世界で初めて明らかにした。

以上の結果について、MEL2 蛋白質が DNA 複製期の減数分裂細胞の細胞質側の核膜周辺に一過的に局在するという観察結果 (図 3232-5F) と考え合わせると、以下のようなモデルが考えられた。すなわち、生殖細胞の核膜周辺の小胞体上には、減数分裂期に発現する遺伝子の mRNA を含むポリソームが多数存在しており、そのうち 3'-側非翻訳領域に U リッチな配列を保存する mRNA に MEL2 が結合することで、同遺伝子のコードする蛋白質の翻訳が促進あるいは抑制され、その結果、減数分裂への移行が進行するというモデルである。細胞質側核膜への MEL2 局在が一過的であることを考えると、MEL2 は減数分裂移行に抑制的に働き、MEL2 核膜局在が一斉に失われることで同調的な減数分裂移行が開始されるモデルが考えやすい。今後はこのモデルを作業仮説として検証を進める予定である。MEL2 の核膜周辺への一過的な局在がどのように制御されているかは不明であるが、ターゲット mRNA の発現・局在に依存する可能性や、MEL2 の細胞内局在を規定する未知の蛋白質の存在などが考えられる。MEL2 の N 末端には、生体膜の細胞質側に蛋白質をアンカーする役割を持つミリスチル基の付加サイト (ミリスチル化モチーフ) がある。ミリスチル化酵素は、標的蛋白質の翻訳と協調して第一メチオニンを切り離し、露出した 2 番目のグリシンにミリスチル基を付加する (文献 10)。MEL2-T7n では、MEL2-T7c でみられた細胞質側核膜周辺への局在性が失われることから (図 3232-5E)、MEL2 の核膜周辺への局在にミリスチル化が関与する可能性も考えられる。イネ MEL2 のホモログであるマウス DAZAP1 は、核と細胞質を行き来するシャトル蛋白質であり、核から細胞質へのターゲット mRNA の移行を担うと考えられている (文献 11)。

一方、イネ MEL2 は核内への局在性は認められなかったことから、核に局在して MEL2 と相互作用する未知の RRM 蛋白質がイネ減数分裂細胞で機能する可能性も考えられ、今後の研究の進展次第では、生殖細胞における植物固有の翻訳制御システムの解明につながると十分に期待できる。

形質転換イネを用いた細胞内局在解析から、減数分裂前期にタペート細胞核の周辺にも現れることがわかった (図 3232-1)。シロイヌナズナでは、相同染色体の対合が完了する減数分裂第一前期 (レプトテン期) の前後で、タペート細胞が同調的に二核化することから (文献 12)、イネ MEL2 遺伝子は、生殖細胞の減数分裂への移行の制御だけでなく、タペート細胞の同調的二核化にも関わっている可能性が充分考えられる。

(イ) 突然変異体を用いたトランスクリプトーム解析と新規遺伝子の同定

これまでの研究から、主に小孢子期において雄性生殖細胞とタペート細胞の発生には相互依存関係があることが知られている。しかし減数分裂への移行から初期減数分裂期にかけての両者の関係については、ほとんど知見がない。イネ *mspl* 突然変異体では、タペート組織の欠損が原因で、減数分裂の進行がパキテン期から第一分裂中期あたりで停止することから、タペート組織と減数分裂進行との相関が示された (文献 4)。また、イネ *mill* 突然変異体では、タペート組織での MIL1 蛋白質の発現が欠損することにより、生殖細胞が減数分裂に移行せず、体細胞分裂を続けてしまうことが示された (文献 13)。

本課題の成果により、転写因子 TTM と MTM が、葯壁のうち、それぞれタペート層と中間層で発現することが、正常なイネの雄性減数分裂の進行に必要であることが示された (文献 7)。特に *ttm* 突然変異体では、減数分裂後のタペート層の崩壊が起こらない変異表現型がみられたが、減数分裂期のタペートの形態は正常に近いにも関わらず、減数分裂の進行に異常が認められた。この結果は、過去の報告と同様に、葯における減数分裂細胞とタペート細胞との間に何らかのシグナル伝達経路が存在することを強く示唆する。減数分裂前まで、タペート細胞と雄性生殖細胞とは原形質連絡 (プラズモデスマータ) で細胞質同士が繋がっており、細胞周期を細胞間で互いにモニターするシグナル伝達系が存在する可能

性は古くより議論されている（文献 14）。TTM あるいは MTM 転写因子が、細胞質間を移動して相互作用し、葯壁内層組織の発生および減数分裂の進行に寄与する可能性は十分に考えられる。前項で述べたイネ RRM 蛋白質 MEL2 は、減数分裂細胞に加えてタペート層での発現がみられた（図 3232-1）。本課題で同定した花粉形成に必須の遺伝子 *CAP1* の発現は、二細胞期の花粉に加えて葯壁の内皮でも認められた（データ示さず）。減数分裂後の花粉発生段階で、特に花粉外壁の形成に必要な蛋白質の多くがタペート組織から分泌されることが知られている（文献 15）。*CAP1* に関する本課題の成果は、減数分裂後の雄性生殖細胞と周辺体細胞との相互作用を新たに示した事例といえる。

CAP1 を除く上記の 4 遺伝子（*TTM*、*MTM*、*ISD*、*RCP*）は、*msp1*、*mell* あるいは *mel2* 突然変異体を用いたマイクロアレイ解析を通じて選抜されたものである。従って、これら 4 遺伝子は、減数分裂前での機能が報告されている *MSP1* や *MEL1*、あるいは *MEL2* の下流で機能している可能性が考えられる。*ISD* に関しては、*mell* 変異体で発現が上昇していた（データ示さず）。節間伸長や種子休眠性など多面的な機能が示唆される *ISD* 遺伝子が、減数分裂前の生殖細胞の維持に機能する *MEL1* の制御を受けている可能性が示されたことは、植物の生殖細胞発生の観点から非常に興味深い。

（ウ）総合考察

本課題の成果から、特に減数分裂期のイネ葯において、減数分裂細胞とタペート細胞の間の相互作用が、生殖細胞の維持や減数分裂の進行に極めて重要な役割を果たすことが明らかとなった。Satake and Hayase は、穂孕み期のイネに低温処理を施し、最も低温に弱い時期は減数分裂直後の小孢子期であることを示したが、二番目に弱い時期が減数分裂期初期であることも併せて報告している（文献 1）。穂孕み期に低温に晒された穂では、しばしばタペート組織の肥大化に伴う減数分裂細胞の損傷・崩壊が認められる。本課題で同定した *MEL2* および *MTM* 遺伝子の突然変異体では、低温障害とよく似たタペート組織の肥大化と減数分裂進行の異常が観察されたことから、少なくともこれら 2 つの遺伝子は低温障害時にタペート組織で起こる現象に、何らかの関わりがある可能性が考えられる。今後、本課題で同定

された遺伝子を含め、イネ生殖細胞分化関連遺伝子の発現・制御の機序を明らかにし、低温や高温などのストレス障害の研究に有用な情報を提供していくことが望まれる。

オ 今後の課題

今後は、環境ストレスの影響を受けやすい穂孕み期における問題の解消と安定した収量を得られる品種育成への応用に向けて、本課題で得られた知見をいかに活用していくかが課題である。具体的には過剰発現体の作成、突然変異体を用いた環境ストレス応答の解析、などが考えられる。

同定した 5 つの遺伝子のうち *ISD* 遺伝子については、図らずも穂発芽性という農業上極めて重要な形質への関与が示唆された。穂発芽による米粒品質の低下の解消に向けた重要な知見となることが期待されるため、今後は同形質に詳しい研究者と連携して進めていく予定である。

カ 要 約

（ア）体細胞分裂から減数分裂への移行に必要なイネ遺伝子 *MEL2* の解析

植物では、短い季節に効率的に受粉・受精するため、花粉が同調的に生産され、それに合わせて胚嚢（雌性配偶体）も成熟する。この同調性の確立は、減数分裂直前の DNA 複製の同調性に起因する。本課題では、生殖細胞の減数分裂への移行を促進し、上記同調性の確立に寄与する植物遺伝子 *MEL2* を、世界に先駆けてイネで発見した。植物の生殖研究への貢献に加え、将来的には環境ストレスによる種子稔性の低下を克服する糸口となる成果が期待できる。

（イ）突然変異体を用いたトランスクリプトーム解析と新規遺伝子の同定

イネの生殖細胞での機能が明らかなイネ遺伝子 *MEL1*、*MEL2*、*MSP1* の突然変異体をマイクロアレイ解析と組み合わせることで、新たな生殖細胞分化関連遺伝子の同定を試みた。その結果、*TTM*、*MTM*、*ISD*、*RCP*、*CAP1* の 5 つの遺伝子を同定した。*TTM* および *MTM* は、ともに転写因子をコードし、葯壁内層組織（タペートおよび中間層）で発現し、減数分裂の進行に必須の働きを持つことを明らかにした。*ISD* は機能未知のメタロペプチダーゼ M20

ファミリー蛋白質をコードし、節間伸長や種子稔実性、そして穂発芽性への関与が示唆された。*RCP* はシトクロム P450 蛋白質をコードし、種子稔実性への関与が示唆された。*CAP1* は L-アラビノキナーゼ様蛋白質をコードし、花粉形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。

キ 引用文献

- 1) Satake, T. and Hayase, H. (1974). Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants : V. Estimation of pollen developmental stage and the most sensitive stage to coolness. *Proc. Crop. Sci. Soc. Jpn.* 43 : 36-39.
- 2) Nonomura, K. I., Morishima, H., Miyabayashi, T., Yamaki, S., Eiguchi, M., Kubo, T. and Kurata, N. (2010). The wild *Oryza* collection in National BioResource Project (NBRP) of Japan : History, biodiversity and utility. *Breed. Sci.* 60 : 502-508.
- 3) Nonomura, K. I., Eiguchi, M., Nakano, M., Takashima, K., Komeda, N., Fukuchi, S., Miyazaki, S., Miyao, A., Hirochika, H. and Kurata N. (2011). A novel RNA-recognition-motif protein is required for premeiotic G1/S-phase transition in rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS Genet.* 7 : e1001265 (PMID : 21253568).
- 4) Nonomura K.I., Miyoshi, K., Eiguchi, M., Suzuki, T., Miyao, A., Hirochika, H. and Kurata, N. (2003). The *MSP1* gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. *Plant Cell.* 15 : 1728-1739.
- 5) Nonomura, K. I., Morohoshi, A., Nakano, M., Eiguchi M., Miyao A., Hirochika, H. and Kurata N. (2007). A germ cell-specific gene of *ARGONAUTE* family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *Plant Cell.* 19 : 2583-2594.
- 6) Tang, X., Zhang, Z.Y., Zhang, W.J., Zhao, X.M., Li, X., Zhang, D., Liu, Q.Q. and Tang, W.H. (2010). Global gene profiling of laser-captured pollen mother cells indicates molecular pathways and gene subfamilies involved in rice meiosis. *Plant Phys.* 154 : 1855-1870.
- 7) 小野聖二郎・野々村賢一 (2012). イネ葯壁内層で特異的に発現する2つの転写因子パラログは減数分裂の進行に重要である. *育種学研究* 14(別2) : p. 70.
- 8) Ueda, K., Yoshimura, F., Miyao, A., Hirochika, H., Nonomura, K. I. and Wabiko, H. (2013). *COLLAPSED ABNORMAL POLLEN1* gene encoding the arabinokinase-like protein is involved in pollen development in rice. *Plant Physiology* (Online publication ahead of print; April 29).
- 9) Yang, H. T., Pegg, M. Cohen, P. and Rousseau, S. (2009). DAZAP1 interacts via its RNA-recognition motifs with the C-termini of other RNA-binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380 : 705-709.
- 10) Resh (1999). Fatty acylation of proteins : new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 1451 : 1-16.
- 11) Kurihara, Y., Watanabe, H., Kawaguchi, A., Hori, T., Mishiro, K., Ono, M., Sawada, H. and Uesugi, S. (2004). Dynamic changes in intranuclear and subcellular localizations of mouse Prpp/DAZAP1 during spermatogenesis : the necessity of the C-terminal proline-rich region for nuclear import and localization. *Arch. Histol. Cytol.* 67 : 325-333.
- 12) Weiss, H. and Maluszynska, J. (2001). Molecular cytogenetic analysis of polyploidization in the anther tapetum of diploid and autotetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Annals Bot.* 87 : 729-735.
- 13) Hong, L., Tang, D., Zhu, K., Wang, K., Li, M. and Cheng, Z. (2012) Somatic and reproductive cell development in rice anther is regulated by a putative glutaredoxin. *Plant Cell.* 24 : 577-588.
- 14) Heslop-Harrison, J. (1966). Cytoplasmic connexions between angiosperm meiocytes. *Annals Bot.* 30 : 221-230.
- 15) Chapman, G. P. (1987). The tapetum. *International Review Cytology.* 107 : 111-125.

研究担当者（野々村賢一*、宮崎さおり）

（３） 開花期高温ストレス耐性関連遺伝子の単離・解析（IPG0018）

ア 研究目的

気象条件が原因となって引き起こされる農作物の収量の低下は世界中で問題となっている。作物の稔実率を低下させるさまざまな気象要因のなかでも、高温ストレスに関しては、近年地球規模での温暖化が進んでいることから、その被害が広まってきているとされる。2007年8月の関東以西の地域で平年に比べて非常に高い気温が観測され、水田でも稔実率の低下が報告されている。農作物の収量のロスを防ぐ方策を探ることを最終的な目標におきながら、本研究では、生殖過程における高温ストレス応答と稔実率低下の分子基盤を明らかにすることを目的とする。イネの高温ストレスによる稔実率低下の要因を構成する遺伝子を単離して、その発現様式、コードするタンパク質の生化学的性質などを解析することによって、その遺伝子の生殖反応における生理的機能を明らかにすることを目指す。また、低温ストレス耐性に関する研究（IPG0019）と共同して、温度ストレスに関する応答の仕組みを考察する。

イ 研究方法

（ア）高温が葯や花粉の発達に与える影響

これまでの研究から2日間の高温処理（昼39℃／夜30℃）で不稔が誘導されることがわかっている。そこでこの高温処理が葯や花粉の発達に与える影響を調べる目的で、高温による葯長の変化を調べた。無処理と高温処理との出穂始期の穂について、葯長を測定し比較した。また、それぞれの開花期の花粉の培地上での発芽能を調べた。花粉の形態や花粉に含まれるタンパク質の変化などについても解析した。

（イ）高温不稔におけるジベレリンの関与

これまでの結果から、高温処理によって、ジベレリンの合成や伝達にかかわる遺伝子群やGAMYBの制御下にある遺伝子の一部の発現が低下することがわかっている（Endo et al.¹⁾, Tsuji et al.²⁾）。そこで、高温処理開始時にジベレリン（GA3 10μM）を与えて、葯長や種子稔性に与える影響を調べた。

また、高温で発現が低下し、かつ、GAMYBの制御を受けると考えられる遺伝子を同定し、GUSレポーター構築を用いて制御領域の解析を行った。さらに、高温応答とジベレリンの関係を解析すること、および葯内のジベレリン濃度をコントロールすることを目指して、ジベレリン合成に関わる遺伝子のうち、葯特異的な発現を示すGA20ox3遺伝子のノックダウンや高発現系統を作出した。同様にして、おもに茎葉で発現する類似遺伝子GA20ox2遺伝子についても実験を行い比較解析した。

ウ 研究結果

（ア）高温が葯や花粉の発達に与える影響

2日間の高温処理後に常温で育てたイネの出穂期の葯長と穎花長を測定した。高温処理によって、穎花長は変化しないのに対し、葯長は無処理の約9割程度に短くなることが確認された。花粉のヨード染色では、高温処理花粉も無処理花粉と同様にヨード染色されるが、花粉発芽培地上での発芽を観察したところ、無処理花粉に比べて高温処理花粉の発芽が低下していること、また、葯から花粉培地上に飛び散る花粉粒の数が高温処理により減少すること、がわかった（図3233-1）。

開花直前の葯からタンパク質の粗抽出液を調製し、SDS-PAGEにより分析した。無処理と高温処理で差の見られたバンドを切り出し、含まれるタンパク質を質量分析法によって同定した。これまでに、糖代謝やエネルギー代謝に関わる酵素類やシャペロンタンパク質などが高温により減少すると考えられる結果が得られている。

（イ）高温不稔におけるジベレリンの関与

高温処理開始時、あるいはその2週間前からジベレリンを与えても、葯長や種子稔性に有意な改善はみられなかった。

GAMYBのターゲットであるCYP703とKAR遺伝子について、レポーター構築を用いた解析において、高温で発現が低下することが観察された。また、高温応答性遺伝子の制御領域のレポーター解析を行い、欠失や点変異の構築と解析から共通の新規モチーフを同定した（図3233-2）。高温応答性かつGAMYBの制御を受けると考えられるYY2（Os10g0484800）とABCトランスポーター（Os06g0607700）の2つの遺伝子についても、同様

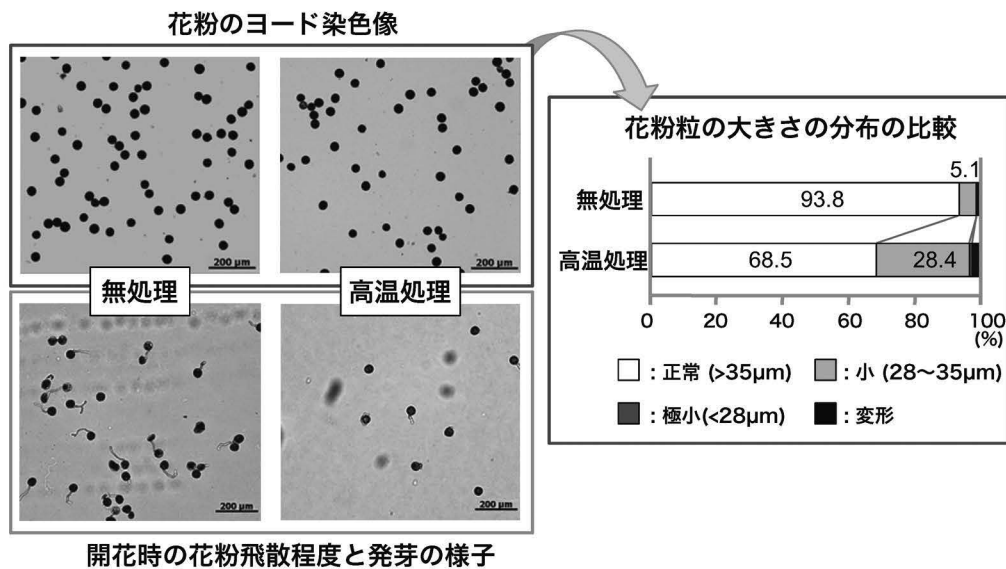


図 3233-1 高温処理後の花粉の特性

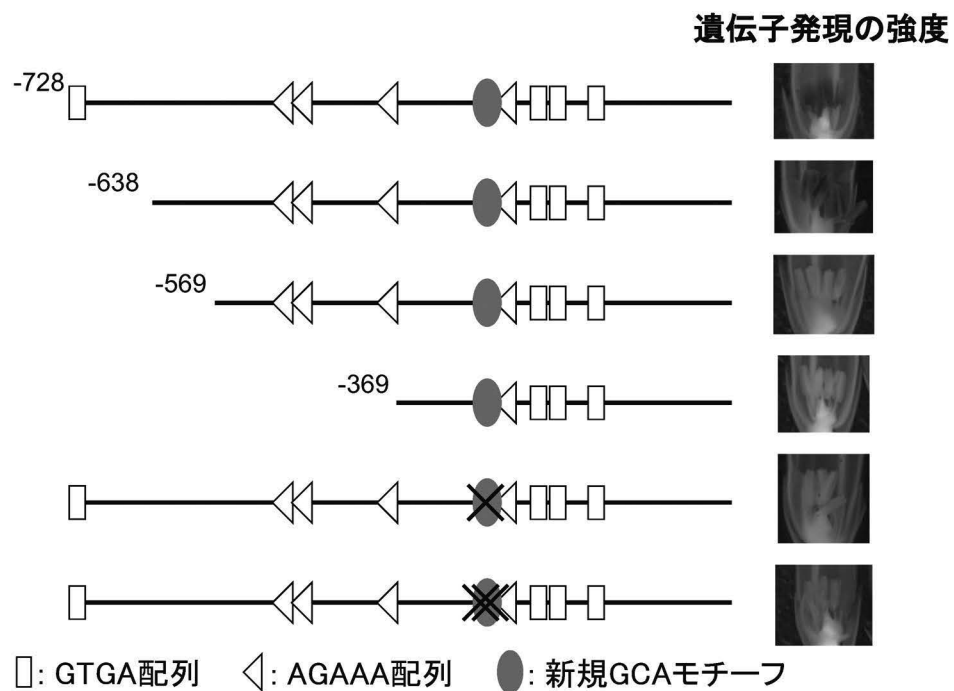


図 3233-2 高温応答性遺伝子の制御領域の解析例

なレポーター実験を行い、発現制御に必要な領域を同定した。また、これらの遺伝子の機能解析を行い、正常花粉の発達に必須の役割を果たすことを明らかにした。

イネのもつ4つの *GA20ox* 遺伝子のうち、*GA20ox3* は薬特異的に高く発現する (Suwabe et al.³⁾, Hobo et al.⁴⁾)。 *GA20ox3* 遺伝子を 35S プロモータの下流につないで過剰発現させると草丈が伸び、その効果は *GA20ox2* の場合と同様であっ

た。 *GA20ox2,3* とも高発現系統は種子稔性が低下した。 *GA20ox2* の発現抑制は草丈を小さくするが、 *GA20ox3* では予想通り顕著な変化はなかった。また、これまでに調べた範囲では、薬での *GA20ox3* の発現レベルが原品種の 0.3 倍程度に低下している系統でも稔実し、逆に発現レベルが高いと不稔になることがわかった (図 3233-3)。さらに、高温に応答せず発現を保つプロモータの候補として、薬特異的転写因子 TDR のプロモータに *GA20ox3* をつないで

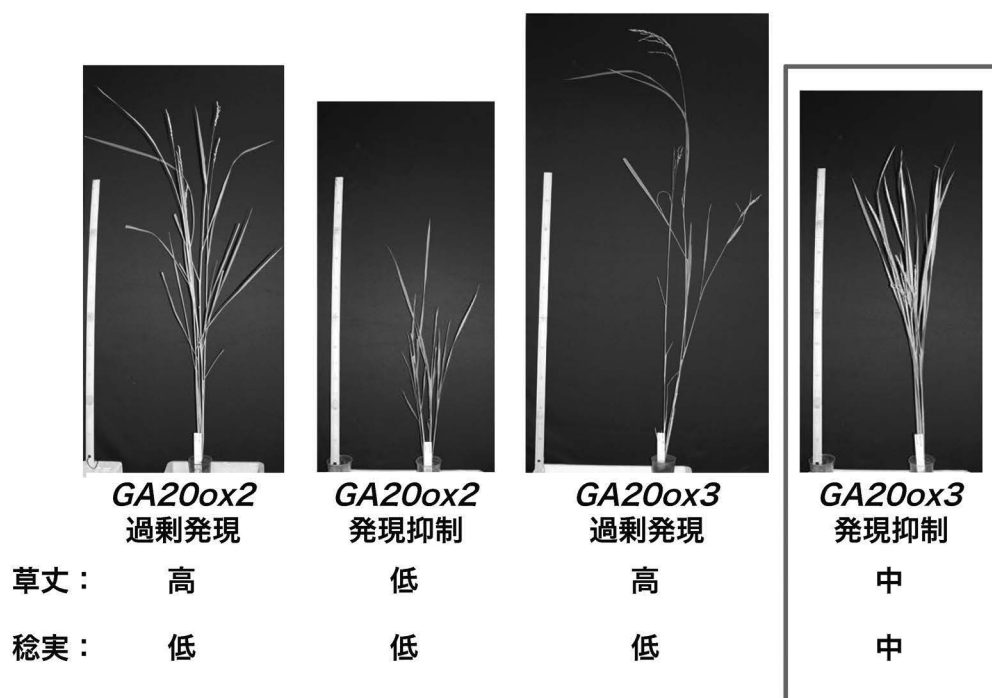


図 3233-3 *GA20ox2,3* 遺伝子の過剰発現・発現抑制の効果

導入した系統も作出した。現在、これらの系統の葯長や葯や花粉の形態、種子稔性などを調査している。

エ 考 察

小孢子期の2日間の高温処理で種子稔性が低下するが、その直接的な要因と考えられることとして、以下のことが観察された。1) 開花期の葯長が無処理の場合に比べて9割程度に短くなる。2) 花粉の総数は変化しないが、径の小さい花粉が増える傾向がみとめられる。3) 開花時に葯から飛び散る花粉数が減少するとともに、花粉の発芽能も低下する。また、高温処理花粉では、糖代謝やエネルギー代謝などに関わるタンパク質量が低下していると考えられ、花粉の発芽能が低下する一因である可能性が考えられた。高温処理の直後に著しく発現の低下する遺伝子群の一部は、GAMYB 転写因子の制御下にあると考えられ、高温応答とジベレリンの制御の関係性を解き明かすことが重要と考えられる。高温処理時にジベレリンを添加しても、葯長や種子稔性の有意な回復は認められなかったことから、葯内のジベレリン量を精密にコントロールする必要があると考えられる。*GA20ox3* を高発現すると草丈が高くなることから、この遺伝子産物がジベレリンを合成する活性をもつことがわかる。しかし、高発現では種

子稔性は低下するので、発現レベルの精密な調節が必要である。現在、高温の影響を受けない *TDR* 遺伝子のプロモータに *GA20ox3* をつないだ構築を用いて形質転換体を作成し、その解析を行っている。

オ 今後の課題

高温により花粉の発達が阻害を受け、径が小さく発芽能の低下した花粉が生ずることがわかり、他方では花粉に含まれるタンパク質成分の変動の一部が明らかとなった。今後、これらの事象の因果関係を明らかにする必要がある。また、外部からジベレリンを添加しても回復効果がみとめられないことから、葯内のジベレリンの動態を把握する必要があると考えられる。その一端として、現在進行中の *GA20ox3* イネについて、高温による遺伝子発現の変化と葯長や花粉の形態、種子稔性への影響を詳細に解析し、その結果を踏まえて高温耐性を高める方策を考察する。

カ 要 約

高温による種子稔性の低下においては、葯長が短くなり、開花期に葯から飛び散る花粉数が減少するとともに、花粉の発芽能も低下することが明らかとなった。高温応答性遺伝子群の一部は、GAMYB

転写因子の制御下にあると考えられ、高温応答へのジベレリン関与が示唆される。外からのジベレリン供与は、葯長や種子稔性の有意な回復につながらなかったが、GA20ox の遺伝子工学的利用による葯内ジベレリン濃度の制御に期待がもたれる。

キ 引用文献

- 1) Endo et al. (2009). High temperatures cause male sterility in rice plants with transcriptional alterations during pollen development. *Plant Cell Physiol.* 50 : 1911-1922.
- 2) Tsuji et al. (2006). GAMYB controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. *Plant J.* 47 : 427-444.
- 3) Suwabe et al. (2008). Separated transcriptomes of male gametophyte and tapetum in rice : validity of a laser microdissection (LM) microarray. *Plant Cell Physiol.* 49 : 1407-1416.
- 4) Hobo et al. (2008). Various spatiotemporal expression profiles of anther-expressed genes in rice. *Plant Cell Physiol.* 49 : 1417-1428.

研究担当者 (川岸万紀子*)

(4) 胚乳の特性を決める転写制御因子の単離と機能解明 (IPG0022)

ア 研究目的

flo2 変異体ではデンプン生合成系遺伝子群や貯蔵タンパク質遺伝子などの種子貯蔵物質生合成に関わる多くの遺伝子の発現が大きく低下する¹⁾。また、ATP 合成酵素群の遺伝子発現量も低下する。このことからこの変異の原因遺伝子はこれらの遺伝子発現の制御に関わることが予想される。また、この形質は高温登熟種子の形態と共通点が多いため、*flo2* 変異体は高温登熟障害イネのモデル系となる。すなわち、登熟期に高温ストレスを被ったイネ種子では貯蔵デンプン生合成が阻害され、著しい品質低下が起こる。そのため、この変異体を用いて胚乳の特性に関する制御システムを解析し、高温障害イネとの比較を行うことで障害回避の方策が明らかになると考えられる。まず、*flo2* 変異の原因遺伝子 (*FLO2*)

の同定とこの下流で働く因子を探索し、これらの遺伝子の高温登熟による遺伝子発現の変化を調べる。次に高温ストレス耐性に関わる因子を探索する。また、*FLO2* 遺伝子と高温ストレスの関係を詳しく解析する。このような未熟種子では ATP 含量の減少が認められたため、登熟中の種子の ATP 合成に焦点をあて、ATP 合成酵素遺伝子群と高温ストレスとの関連を明らかにする。これにより、高温登熟障害を回避するための方策を調べる。

イ 研究方法

(ア) *flo2* 変異体における遺伝子発現の変化の網羅的解析

flo2 変異体の胚乳での遺伝子発現および胚乳デンプンの構造変化を詳細に解析した。また胚乳における遺伝子発現量の変化をマイクロアレイにより網羅的に解析した。さらに貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質の生合成に関わる遺伝子群について、これらの遺伝子発現量の変化をリアルタイム RT-PCR により解析した。

(イ) *flo2* 変異体の原因遺伝子の同定と機能解析

flo2 変異体の原因遺伝子をマッピングし、マップベースクローニング法により原因遺伝子を同定した。この遺伝子 (*FLO2*) と相互作用するタンパク質を酵母 two-hybrid システムを用いて探索した。*FLO2* のホモログ遺伝子を探索した。*FLO2* およびそのホモログ遺伝子の発現を詳細に解析した。

(ウ) 高温登熟と *flo2* 変異との関連の解析

代表的なイネ品種に関して、高温登熟ストレス(昼温：33℃、夜温：28℃)による *FLO2* の発現への影響を調べた。高温登熟種子と *flo2* 変異体のどちらにおいても ATP 合成酵素遺伝子の発現量が低下していることが示唆されたため、種子の登熟期での ATP 含量の変化を調べた。また、ATP 含量が *flo2* 変異体や高温登熟種子の登熟過程でどのように変化しているかを継時的に解析した。また、高温ストレスによる耐性の度合いの品種間差違を調べた。

(エ) *FLO2* 遺伝子の過剰発現形質転換体の作製と表現型の解析

全長の *FLO2* 遺伝子の下流にタグとなるタンパク質を結合したものを作製し、これを導入した形質転換体を作成した。これらの形質転換体の表現型を解析した。

ウ 研究結果

(ア) *flo2* 変異体における遺伝子発現の変化の網羅的解析

flo2 変異体の胚乳では胚乳デンプンに大きな構造変化が生じていた。また、アミロース含量にも変化が生じていた。未熟種子における遺伝子発現量を網羅的に解析したところ、貯蔵デンプンおよび貯蔵タンパク質の生合成に関わる遺伝子の発現量に減少が認められた。そこで、これらの個別の遺伝子に関して、発現量の変化をリアルタイム RT-PCR により解析したところ、*flo2* 変異体では、貯蔵デンプン生

合成に関わる遺伝子のうち、登熟期特異的な発現をすることが報告されている GBSSI, SSI, SSIIa, SSIIa, SSIVb, BEI, BEIIb, AGPL2, AGLS2b 遺伝子の発現量に顕著な低下が認められた。一方、継続的に発現をする遺伝子に関しては大きな変化が認められなかった。また、貯蔵タンパク質遺伝子や ATP 合成酵素をコードする遺伝子の発現量の低下が認められた。貯蔵タンパク質遺伝子群は、遺伝子により発現量の変化に差異が認められた (図 3234-1、2)。

(イ) *flo2* 変異体の原因遺伝子の同定と機能解析
flo2 変異体の原因遺伝子をマッピングしたとこ

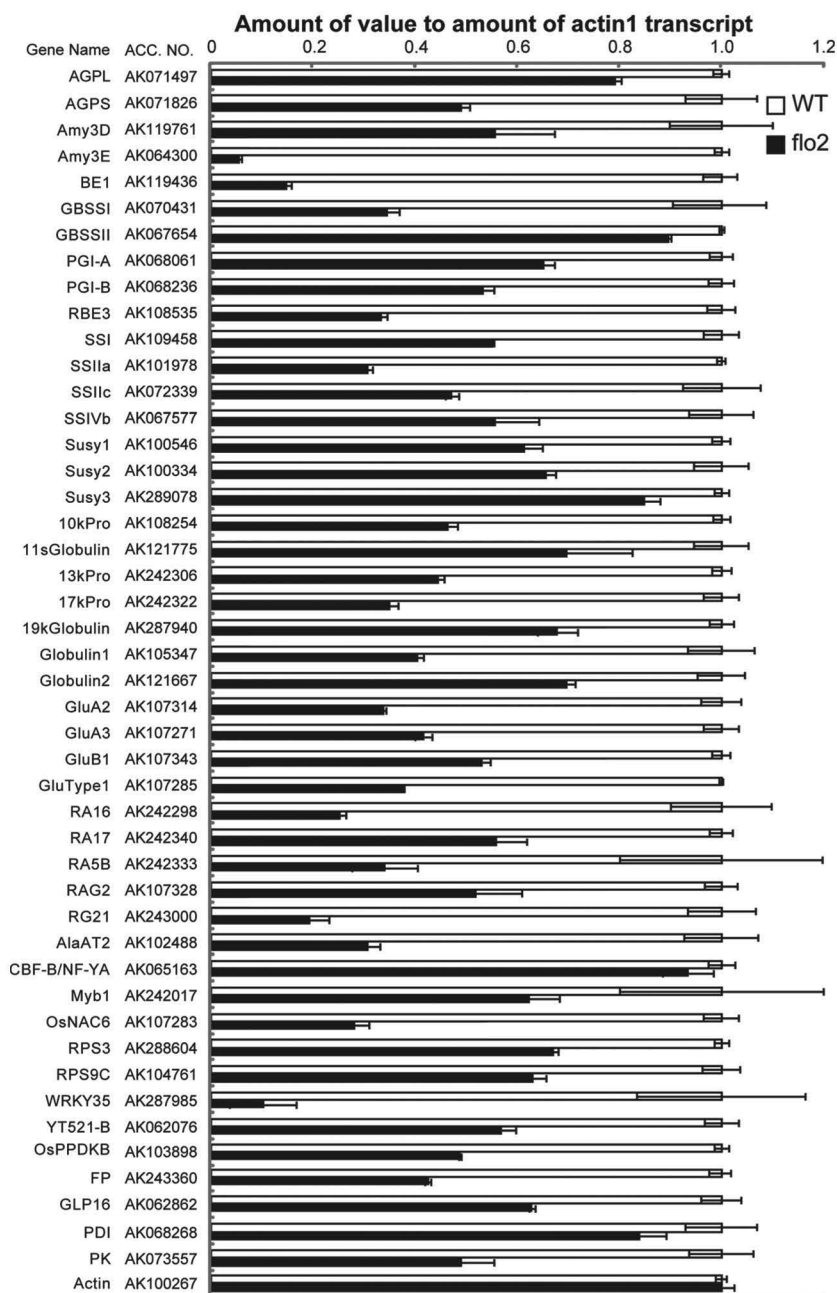


図 3234-1 *flo2* 変異体における胚乳で機能する遺伝子群の発現量の変化

リアルタイム RT-PCR によりそれぞれの遺伝子からの転写産物の量を定量した。アクチン (actin1) の転写産物量に対する相対値を用いて野生型の値と比較した比を示している。

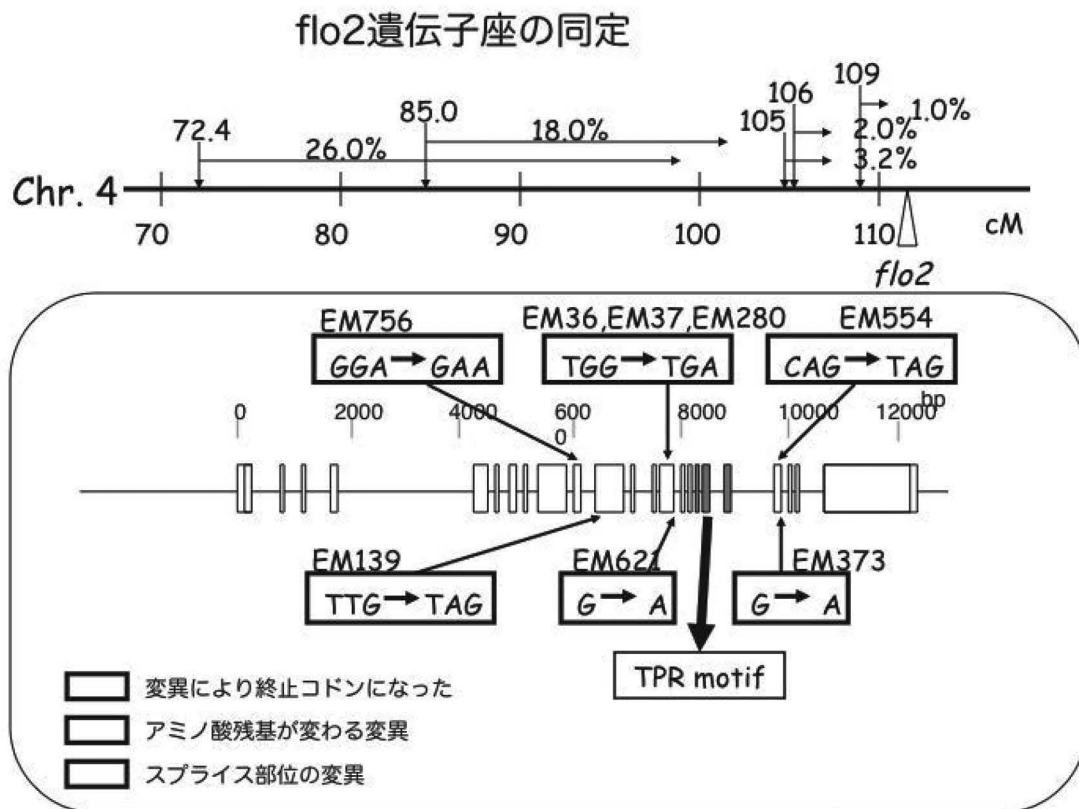


図 3234-2 *FLO2* 遺伝子の単離

flo2 遺伝子座のマッピング（上段）および *FLO2* 遺伝子の構造（下段）を示す。また、それぞれの *flo2* 変異体系統で検出された変異部位と塩基配列の変化を四角内に示す。

ろ、第4染色体の1つの遺伝子であることがわかった。*flo2* 変異体では、この遺伝子（*FLO2* 遺伝子）に点変異が生じて新たな終止コドンが生じていたため、これによる機能喪失変異であることが示唆された（図 3234-2）。また、*flo2* 変異体に *FLO2* 遺伝子を導入することで、野生型よりも高い *FLO2* の発現量を示す形質転換体を得られた（過剰発現形質転換体）。これらの形質転換体を栽培し、後代種子を採取した。得られた種子を観察したところ、野生型イネよりも10%程度大きな種子が得られた。また、この植物の未熟種子では、野生型に比べて貯蔵物質の生合成に関わる遺伝子の発現量が高いことがわかった（図 3234-3）。これらのことから *FLO2* は、種子貯蔵物質の生産性を決定づける重要な制御因子であることが強く示唆された²⁾。

FLO2 遺伝子にコードされるタンパク質は、中央部にタンパク質-タンパク質相互作用に関与するTPRモチーフを有していた。そこで、*FLO2* タンパク質を前半部、TPRモチーフを含む中央部、後半部の3つの部分にわけて、酵母 two-hybrid シス

テムを用いて、これと相互作用するタンパク質を検索した。その結果、TPR ドメインよりも上流部分と相互作用するタンパク質として、新規な LEA タンパク質が、下流部分と相互作用するタンパク質として、新規な bHLH タンパク質が検出された。TPR ドメインとの結合を示唆するタンパク質は確認できなかった。bHLH タンパク質は DNA と結合し、転写制御因子として機能すると予想されることから、*FLO2* は bHLH や LEA と相互作用をし、TPR モチーフを介して種子貯蔵物質の生合成系を協調的に制御している上位の制御因子である可能性が示唆された²⁾。

イネゲノムには2種類の *FLO2* ホモログ遺伝子が存在した。これらを *FLL1* (*FLO2-like 1*) および *FLL2* (*FLO2-like 2*) と命名した。*FLO2* は未熟種子で強く発現していたが、緑葉でも発現が認められた。一方、*FLL1* と *FLL2* は緑葉のみで発現が認められた（図 3234-4）。*FLO2*、*FLL1*、*FLL2* の遺伝子に由来するタンパク質は高等植物で広く保存されており、それぞれの相同性は高かった。一方、酵母や動

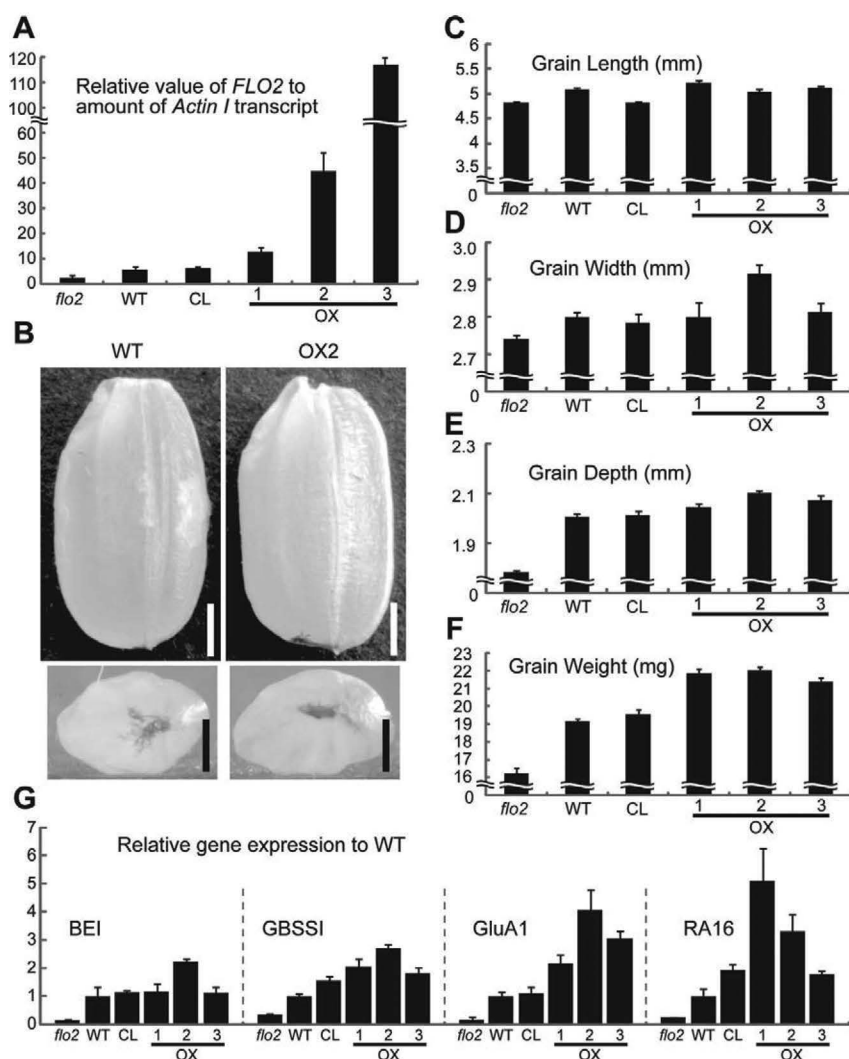


図 3234-3 *FLO2* 過剰発現形質転換体の形質

- (a) 形質転換体イネの未熟種子における *FLO2* 遺伝子の発現量。
WT: 野生型、CL: ベクターコントロール、OX: 形質転換体 (1 ~ 3)
- (b) 形質転換体イネの種子の形態
- (c) - (f) 種子の長さ、幅、厚み、重量の比較
- (g) 未熟種子におけるデンプン枝付け酵素 (BEI)、顆粒結合型デンプン合成酵素 (GBSS)、グルテリン A1 (GluA1)、16 kDa アレルゲンタンパク質 (RA16) 遺伝子の発現量の比較

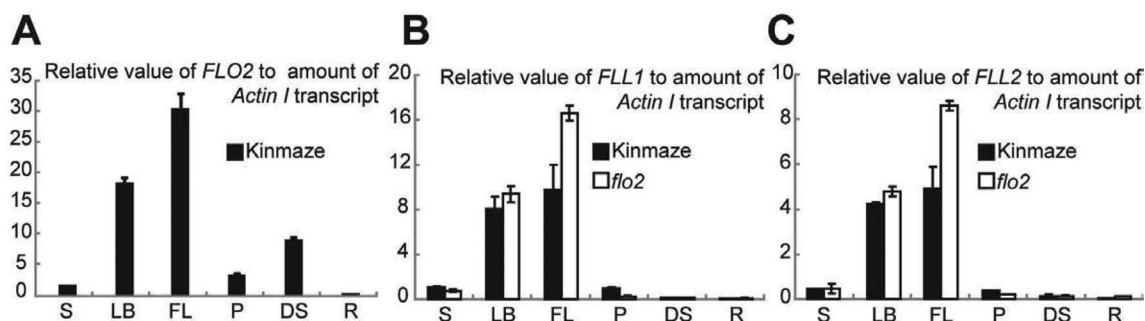


図 3234-4 *FLO2*、*FLL1*、*FLL2* 遺伝子の発現部位

FLO2 (A)、*FLL1* (B)、*FLL2* (C) 遺伝子の発現パターンを示す。

S: stem、LB: leaf blade、FL: flag leaf、P: panicle、DS: developing seed、R: root

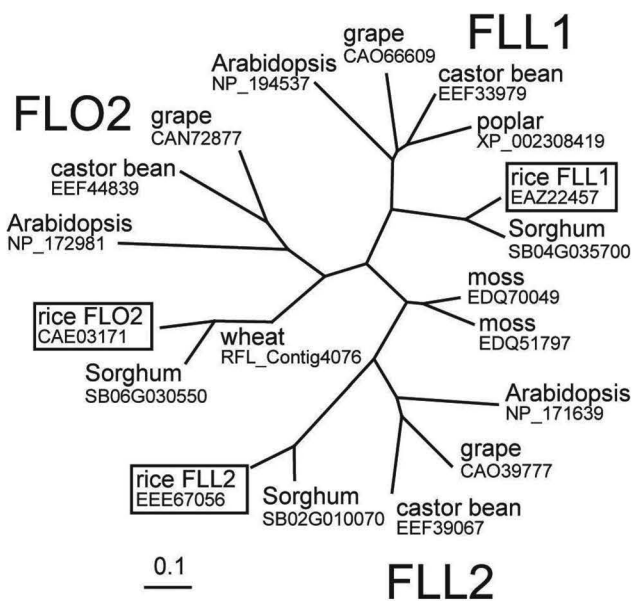


図 3234-5 *FLO2* およびそのホモログの系統樹
系統樹解析は Clustal X プログラム (<http://www.clustal.org/>) を用いて行った。

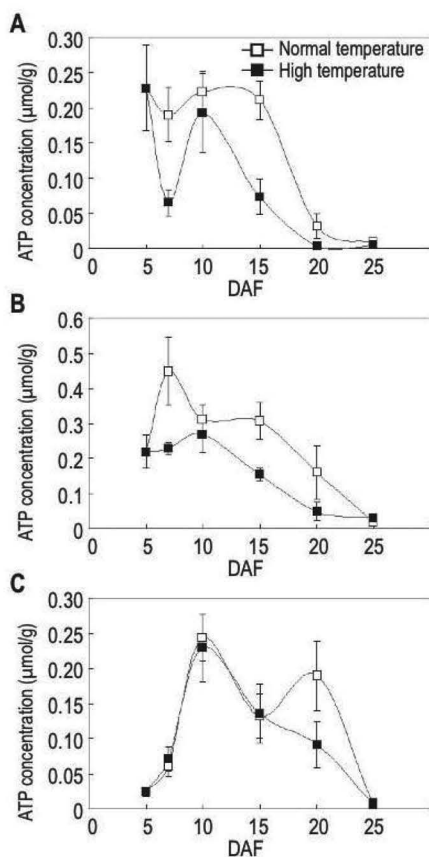


図 3234-6 高温登熟させた未熟種子における ATP 量の変動

日本晴 (A: 強い高温登熟障害が現れた)、台中 65 号 (B)、金南風 (C) の未熟種子における ATP 量の経時的解析結果を示す。DAF: days after flowering.

物には相当するタンパク質は見つからなかった (図 3234-5)。このことから *FLO2* ファミリーは植物特有の制御因子であることが強く示唆された 2)。

(ウ) 高温登熟と *flo2* 変異との関連の解析。

FLO2 遺伝子は登熟中期に発現量の極大が認められた。高温ストレス条件の日本晴未熟種子では *FLO2* 遺伝子の発現量が顕著に減少した。一方、同条件で育てた金南風では常温条件との間で *FLO2* の発現量に差は認められなかった。このことから、高温ストレスにより *FLO2* の発現が阻害され、このことによって、*FLO2* により発現制御されている貯蔵デンプン等の生合成に関与する遺伝子群の発現量の低下を招いている可能性が示唆された。

flo2 変異体では ATP 合成酵素遺伝子の発現量が顕著に低下した。そこで、*flo2* 変異体における ATP 量を測定し、野生型イネ (通常条件および高温条件) と比較した。その結果、*flo2* 変異体では ATP 含量の変動に顕著な差が認められた。また、高温障害が生じたイネでも同様に ATP 含量が低下していた。一方、金南風では高温ストレスを与えた場合でも通常栽培と同等の量の ATP 含量が検出され、あまり変化が生じないことがわかった (図 3234-6)。これらの結果から、*flo2* 変異体および高温障害イネで生じた白化米の発生と未熟種子に含まれる ATP 量の減少は強く連鎖していることが示唆された。未熟種子における ATP 量が登熟に与える影響を探るため、ユビキチン・プロモーターの下流にミトコンドリア F1-ATPase の複合体を構成する遺伝子に対する RNAi 遺伝子を導入した発現抑制形質転換体を作製した。その結果、この形質転換体は、常温で登熟させた種子でも白濁するなどの障害が生じた。

日本晴、台中 65 号、金南風それぞれの品種の高温登熟による障害の度合いを比較した。出穂後、昼間 33℃、夜間 28℃ の条件で栽培した結果、日本晴では 76% の割合で白化米が生じた。台中 65 号では白化米の割合は 6% 程度上昇したが、1 粒あたりの重量 (体積) が 7% 低下した。一方、金南風は高温登熟による障害はほとんど認められなかった³⁾。

そこで、これらの品種に加えて、主要な 8 種の品種 (神力、愛知旭、農林 1 号、にこまる、農林 8 号、フクマサリ、銀坊主、農林 22 号) についても同様の解析を試みた。これらのイネの未熟種子を常温で

表 3234-1 常温登熟および高温登熟における不良種子の割合

Grain feature	Shinriki		Aichi-asahi		Norin-1		Nikomaru	
	Normal	High	Normal	High	Normal	High	Normal	High
Perfect grain	96.0	76.0	96.0	45.5	96.2	40.0	91.3	38.1
Basal white	0	12.0	4.0	0	0	28.0	0	28.6
White back	0	12.0	0	40.9	0	32.0	4.3	14.3
White belly	4.0	4.0	0	31.8	3.8	16.0	0	4.8
White core	0	8.0	0	13.6	0	12.0	4.3	9.5
Milky white	0	0	0	0	0	0	0	14.3

Grain feature	Norin-8		Fukumasari		Ginbozu		Norin-22	
	Normal	High	Normal	High	Normal	High	Normal	High
Perfect grain	95.8	30.4	82.6	22.7	100	21.7	92.3	4.2
Basal white	0	17.4	13.0	36.4	0	0	7.7	25.0
White back	4.2	34.8	0	50.0	0	30.4	0	50.0
White belly	0	4.3	0	9.1	0	4.3	0	8.3
White core	0	26.1	4.3	13.6	0	26.1	0	41.7
Milky white	0	0	0	4.5	0	30.4	0	25.0

それぞれの種子の割合 (%) を示している。25 粒について検定した結果を示すが、複数の形態を示すものは重複して数えているため、合計で 100% を超える場合がある。なお、Normal は常温登熟種子、High は高温登熟種子であることを示す。

登熟（昼温：28℃、夜温：25℃）、および高温で登熟（昼温：33℃、夜温：28℃）させ、これらの未熟種子での ATP 量の変動を調べた。また、高温登熟障害の度合いを比較した。その結果、神力が非常によい結果を示すことが明らかになった（表 3234-1）。一方、農林 22 号は高温ストレスに非常に弱いことが明らかになった。さらに、にこまるは登熟期の ATP 含量が非常に高く保たれることがわかった（図 3234-7）。ATP 含量と完全種子の割合との相関を調べたところ有意な相関が認められた（図 3234-8）⁴⁾。

神力、愛知旭、農林 1 号、にこまる、農林 8 号、フクマサリ、銀坊主、農林 22 号の未熟種子における ATP 量の経時的解析結果を示す。DAF：days after flowering.

これと並行して、日本晴ゲノムの一部がカサラスに置換された染色体断片置換系統（CSSL 系統）54 系統を栽培し、同様の実験を行って、高温ストレスに対する影響を調べた。その結果、高温障害の度合

いは系統間で非常に大きいことがわかった。また、いくつかの系統は高温ストレスに対して強い耐性を示した。この結果を解析することで、カサラスゲノムにある高温ストレス耐性に関わる QTL を調べた。その結果、第 3 染色体などに QTL が存在することが示唆された。

（エ）*FLO2* 遺伝子の過剰発現形質転換体の作製と表現型の解析

グルテリン B4 プロモーターの下流に全長の *FLO2* 遺伝子を結合し、これを日本晴および *flo2* 変異体に導入して形質転換体を作製した。得られた組換え体における *FLO2* 遺伝子の発現量の定量と、高温ストレスに対する発現量の変動を調べたところ、これらの形質転換体では *FLO2* 遺伝子は登熟期の未熟種子で高い発現をしていることがわかった。また、完熟種子の形態を調べたところ高温登熟障害の改善が認められた（図 3234-9）。

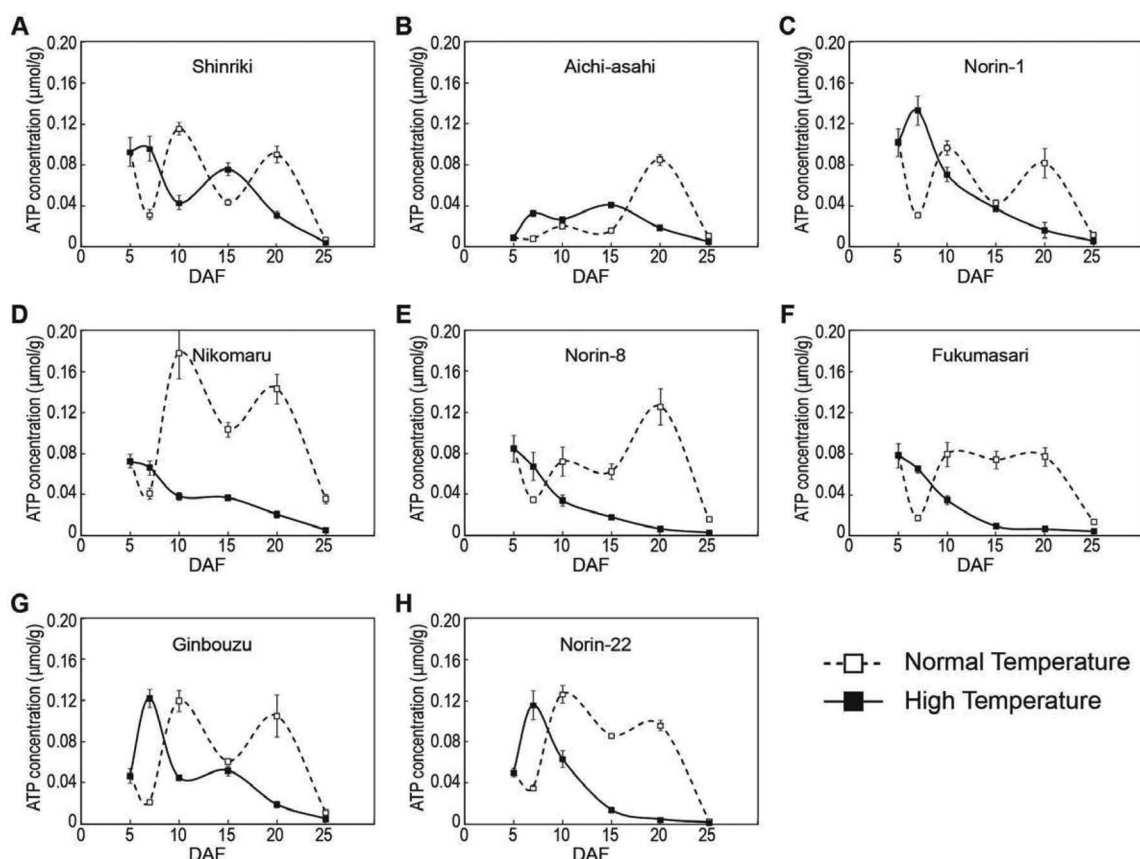


図 3234-7 高温登熟させた未熟種子における ATP 量の変動

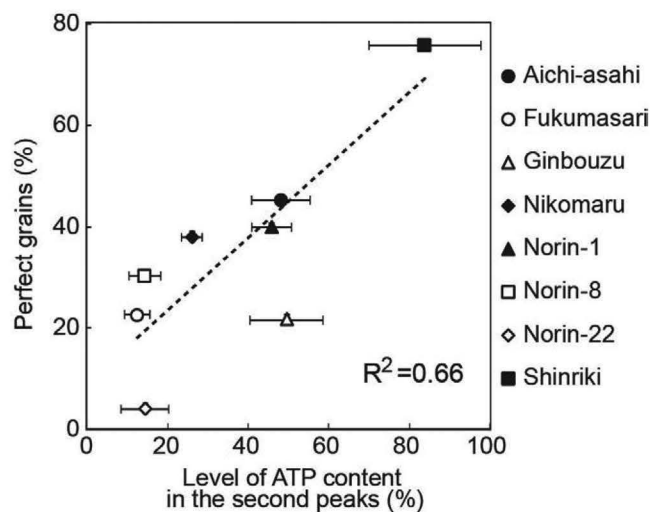


図 3234-8 障害を受けていない種子の割合と登熟中期の ATP 含量の関係
横軸は ATP 含量の比 (高温登熟/常温登熟) を示す。
縦軸は完全な種子が得られた割合を示す。

工 考 察

FLO2 遺伝子は胚乳における貯蔵物質の生合成にかかわる多くの遺伝子発現を制御している上位の制御遺伝子であることが明らかになった。デンプン合成酵素、デンプン枝つけ酵素、枝きり酵素、ADP-

glucose pyrophosphorylase をコードするほとんどの遺伝子がこの遺伝子の下流で制御されており、この遺伝子が胚乳デンプンの品質を決める鍵となる因子の1つであることが明らかである。

FLO2 の欠損した *flo2* 変異体ではデンプンに大きな構造変化が生じていた。また、多くの貯蔵タンパク質の生合成にも変化が生じており、貯蔵デンプンのみならず貯蔵タンパク質の生合成にも関与している制御因子であることが明らかとなった。この遺伝子を過剰発現させた形質転換体イネでは、これらの遺伝子発現量が顕著に増加し、かつ、種子重量も増加していることが観察された。この結果は、*FLO2* の発現量を有効的にコントロールすることで、イネ種子のバイオマスを増加させることが可能であることを強く示唆する。

flo2 変異体の原因遺伝子は第4染色体に座乗する新規な TPR タンパク質をコードする遺伝子であった。*flo2* 変異は、この遺伝子 (*FLO2* 遺伝子) の機能喪失変異であることがわかった。*FLO2* には2種類のホモログ遺伝子 (*FLL1*, *FLL2*) が見つかった。*FLO2* は未熟種子と緑葉でも発現が認められた

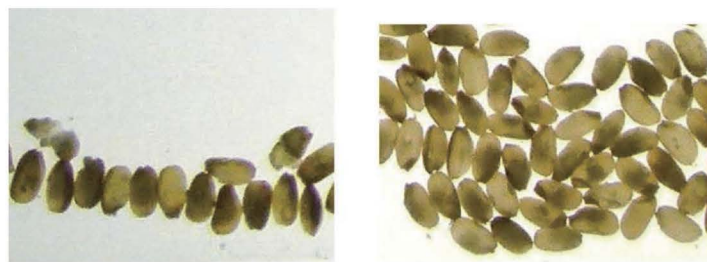


図 3234-9 高温登熟した日本晴（左）および *FLO2* 過剰発現形質転換体（右）の種子
透過光により玄米を撮影した。白濁した種子は黒く映る。

が、*FLL1* と *FLL2* は緑葉のみで発現していた。これらは互いに相補できると考えられるため、緑葉での *FLO2* の機能欠損は *FLL1* や *FLL2* により補われているものと考えられる。*FLO2*、*FLL1*、*FLL2* の遺伝子に由来するタンパク質は高等植物で広く保存されていたことから、これらは植物界において重要な機能を有する遺伝子群であることが示唆される。

FLO2 タンパク質は、新規な LEA タンパク質と新規な bHLH タンパク質との相互作用が示唆された。bHLH タンパク質は DNA と結合し、転写制御因子として機能すると予想されることから、*FLO2* は bHLH や LEA と相互作用をし、TPR モチーフを介して種子貯蔵物質の生合成系を協調的に制御している上位の制御因子である可能性が示唆される。しかしながら、この作用機作は不明である。

FLO2 遺伝子は登熟中期に発現量の極大が認められた。また、高温ストレス条件で登熟した未熟種子では *FLO2* 遺伝子の発現量が顕著に減少したことから、このことで *FLO2* により発現制御されている貯蔵デンプン等の生合成に関与する遺伝子群の発現量の低下を招いている可能性が示唆される。また、*flo2* 変異体では ATP 合成酵素遺伝子の発現量が顕著に低下していることから、*FLO2* は ATP 合成酵素遺伝子の発現制御にも関与していると思われる。このことから高温登熟障害と ATP 合成との関係が示唆される。実際に、*flo2* 変異体では ATP 含量が大きく減少していた。また、高温登熟障害が生じやすいイネ品種の未熟種子でも同様に ATP 含量の低下が認められた。

代表的なイネ品種について、高温登熟障害の度合いと登熟中の未熟種子に含まれる ATP 量の減少との関連を調べたところ、両者の間に有意な相関が認められた。すなわち、高温条件で登熟した未熟種子でも登熟期を通じて比較的高い ATP 含量を保持で

きるものは高温登熟障害が現れにくいことが明らかとなった。この結果から、未熟種子の ATP を高く保つことが高温登熟障害を緩和するための重要な因子であることが強く示唆された。

オ 今後の課題

FLO2 は胚乳の貯蔵物質生合成を統御する上位の制御因子であることがわかった。また、*FLO2* はバイオマス生産性に大きく寄与することがわかった。この後の育種材料として利用可能であると考えられる。しかしながら *FLO2* の作用機構は明らかでなく、これを明らかにすることが今後の課題である。これにより胚乳における貯蔵物質生合成の制御ネットワークの全体像が明らかになり、胚乳成分の品質向上につながるものと期待される。

FLO2 は *FLL1* と *FLL2* とともに大きな遺伝子群を形成することが明らかとなった。この遺伝子は植物界に広く保存されているが、動物や原核生物には認められないことから、植物の進化の過程で獲得された植物特有の形質であると考えられる。また、*FLL1*、*FLL2* については、塩基配列の情報のみしか得られておらず、これらの機能は全く未知である。おそらくこれらも *FLO2* と同様に遺伝子発現制御に関わる因子であると思われることから、この機能解明が待たれる。

高温登熟障害に関しては、*FLO2* の下流因子の 1 つである ATP 合成が重要なファクターであることが明らかとなった。この研究課題において、登熟中に高温ストレスを受けることで未熟種子中の ATP 量が減少すること、この度合いが強いほど高温登熟障害が強くなることを明らかにした。代表的なイネ品種に関して登熟中の未熟種子の ATP 量を調べたところ、在来品種の中に非常によい特性を示すものが存在することがわかった。これらは高温登熟障害

を受けにくいことがわかったことから、登熟中の未熟種子の ATP 量の高さが、高温登熟障害を起こしにくい品種の選抜における有用な指標となるものと考えられる。

力 要 約

FLO2 は新規な TPR タンパク質をコードする遺伝子であった。*flo2* 変異体では未熟種子特異的に機能する貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質の遺伝子の発現量が大きく低下していた。また、*FLO2* の過剰発現により貯蔵物質の生合成が促進され、種子サイズが大きくなった。これらのことから、この遺伝子は胚乳の貯蔵物質生合成を統御する上位の制御因子であることが明らかとなった。*FLO2* と相互作用する因子として、新規な LEA タンパク質と bHLH タンパク質が示唆されたことから、*FLO2* はこれらと協調的に作用して貯蔵物質生合成系の発現制御をしているものと考えられた。

FLO2 は未熟種子の登熟期で発現が認められた。また、高温登熟により *FLO2* 遺伝子の発現量が減少した。特に、下流の因子の 1 つと考えられる ATP 合成が抑制されることがわかった。高温登熟させたイネ未熟種子では ATP 含量が減少した。代表的なイネ品種に関して高温登熟と ATP 含量の変動との相関を調べたところ、高温ストレスにより ATP 量の減少が認められ、この減少量の多寡と高温登熟障害との間で強い相関が認められた。このことから ATP 生産性の高い未熟種子は高温登熟障害を受けにくいことが強く示唆された。

キ 引用文献

- 1) T. Kawasaki, K. Mizuno, H. Shimada, H. Satoh, N. Kishimoto, S. Okumura, N. Ichikawa, T. Baba (1996). Coordinated regulation of the genes participating in starch biosynthesis by rice Flourey-2 locus. *Plant Physiol.* 110. 89-96.
- 2) K-C. She, H. Kusano, K. Koizumi, H. Yamakawa, M. Hakata, T. Imamura, M. Fukuda, N. Naito, Y. Tsurumaki, M. Yaeshima, T. Tsuge, K. Matsumoto, M. Kudoh, E. Itoh, S. Kikuchi, N. Kishimoto, J. Yazaki, T. Ando, M. Yano, T. Aoyama, T. Sasaki, H. Satoh, H. Shimada (2010). A novel factor *FLOURY ENDOSPERM 2*

is involved in regulation of rice grain size and starch quality. *Plant Cell.* 22, 3280-3294).

- 3) K-C. She, H. Kusano, M. Yaeshima, T. Sasaki, H. Satoh, H. Shimada (2010). Reduced rice grain production with ATP shortage during seed development. *Plant Biotechnol.* 27 : 67-73.
- 4) K-C. She, M. Yaeshima, T. Koumoto, M. Ohnuma, T. Hiromasa, M. Hirai, T. Matsunaga, R. Tashiro, T. Sasaki, H. Kusano, H. Shimada (2012). High-temperature stress susceptibility of representative japonica rice cultivars derived from Norin-22 : inadequate ATP supply during seed development may lead to severe damage. *Plant Biotechnol.* 29 : 465-471.

研究担当者 (島田浩章*, 佐々木忠将, 草野博彰)

(5) 胚乳貯蔵物質の合成・蓄積を制御するシャペロン蛋白質の解析 (IPG0023)

ア 研究目的

近年、米粉を使用したパン、麺、菓子等の普及を通して米の消費拡大が期待されている。米の加工特性は澱粉、蛋白質、脂質、細胞壁多糖などの生体高分子の特性が複雑にからみあって決定される。加えて、これらの生体高分子の合成及び蓄積は環境要因の影響を受け易い。米の加工特性を従来の交配育種や遺伝子組換え技術を用いて意図通りに改変することは現時点では困難である。しかしながら、ゲノム情報を効果的に活用して製粉性や米粉の加工適性を決定する遺伝子群を同定し、それらの遺伝子を育種的に利用することは重要であり、かつ可能である。

蛋白質のジスルフィド架橋が米の加工特性を決定する大きな因子であることをこれまでに明らかにした。蛋白質のジスルフィド架橋は蛋白質ジスルフィドイソメラーゼ (protein disulfide isomerase, PDI) によって形成される。イネゲノムには典型的な PDI を含めて、19 の *PDI-like* 遺伝子 (*PDIL*) が同定されている。胚乳での各 *PDIL* 遺伝子の機能の詳細は不明である。本研究の一つめの研究目的は、蛋白質ジスルフィド架橋形成を触媒する *PDIL* 遺伝子ファミリーに着目し、各 *PDIL* 酵素の貯蔵蛋白質の輸送・集積、及びアミロプラストや澱粉粒の発達における機能を解明することである。二つめの研究目的は、

各 PDIL 酵素の発現制御によって米の品質や加工特性を改善する方法論及び技術を確立することである。加えて、*esp2* の米粉は優れた製パン特性を示すので、*esp2* 遺伝子を利用した品種開発を目指して、交配・選抜を行い、選抜系統の生育特性、及び収量の調査を行う。

イ 研究方法

(ア) PDIL1-1、PDIL1-4、PDIL2-3 の胚乳での機能の解析

PDIL1-1、PDIL2-3 と蛍光蛋白質との融合蛋白質を作製して、小胞体内腔での局在を比較観察した。小胞体内腔での特徴的な局在が酵素活性に依存するかどうかを明らかにする目的で、PDIL2-3 の a と a' のチオレドキシン (Trx) ドメインの活性部位 (CGHC) を AGHA に片方、又は両方置換して、触媒活性部位の有無と小胞体内腔での酵素蛋白質の局在との相関を解析した。

PDIL1-1 と PDIL2-3 の基質特異性を比較解析するために、各酵素の 2 つの活性部位を置換した変異体と野生型酵素の GST 融合蛋白質を大腸菌で発現させた。各組換え蛋白質を精製し、還元型変性 RNase の巻き戻し活性を比較した。イネ種子貯蔵蛋白質 α グロブリンの野生型と C79F 変異体を変性条件で精製し、PDIL1-1 と PDIL2-3 によるインビトロ巻き戻し実験の基質蛋白質として用いた。

α グロブリンは A、B、C 領域を含み、GFP と全長 α グロブリンの融合蛋白質 (GFP-ABC) は蛋白質貯蔵液胞 PB-II に輸送される。これに対し、C 領域を除いた GFP-AB はプロラミンが集積する PB-I に効率的に集積する。そこで、PDIL2-3 の発現抑制が GFP-AB の局在に及ぼす影響を調査して、胚乳細胞の蛋白質輸送・集積における PDIL2-3 の機能を解析した。

PDIL2-3 の a ドメインと a' ドメインの活性部位の CGHC をそれぞれ CGHA に置換して、GFP との融合蛋白質を作製し、組換えイネを作製した。完熟種子から非還元条件下で種子蛋白質を抽出し、ウェスタンブロット法で解析した。

PDIL1-1 と似たドメイン構造を持つ PDIL1-4 の抗体を作製し、野生型及び *esp2* 変異体での発現レベルを比較解析した。次に、PDIL1-4 と GFP との融合蛋白質を作製し、登熟種子での局在を共焦点レー

ザー顕微鏡を用いて観察した。PDIL1-4 の組換え蛋白質を精製し、常法に従って、PDIL1-4 と PDIL1-1 の還元型変性 RNase の巻き戻し活性を比較した。

(イ) PDIL2-3 の X 線結晶構造解析

PDIL2-3 の酵素特性を構造的特徴から明らかにするために、農業生物資源研究所生体分子研究ユニット藤本瑞主任研究員、門間充上級研究員との共同研究で X 線結晶構造解析を行った。PDIL2-3 はアミノ酸配列から 3 つの Trx ドメインを含むと推察され、活性部位 (CGHC) を有する a 及び a' ドメインと活性部位を含まない b ドメインが a-a'-b の順序で繋がっている。GST-aa'b、GST-a 及び GST-a'b の融合蛋白質を作製し、大腸菌で発現した。精製蛋白質をゲル濾過精製し、結晶化条件のスクリーニングを行った。

(ウ) PDIL1-1 がアミロプラストの発達に及ぼす影響の解析

PDIL1-1 の機能欠損変異体 *esp2* のアミロプラスト及びデンプン粒を、アミロプラストに局在する GFP を利用して観察を行った。また、精製澱粉粒を走査型電子顕微鏡で比較観察した。

(エ) プロラミンの蛋白質顆粒への集積機構と分子進化の解析

PDIL2-3 の活性を RNAi 法を使って胚乳特異的に抑制し、貯蔵蛋白質のプロラミンの蛋白質顆粒 PB-I への集積の影響を解析した。システイン残基を多く含んだ 10kD プロラミン crP10 とシステイン残基を含まないプロラミン cpP13 の両蛋白質の PB-I 内での分布を、蛍光蛋白質との融合蛋白質を作製し、それぞれの PB-I 内での局在を、野生型と PDIL2-3-KD の間で比較した。

イネゲノム (日本晴) の遺伝子アノテーションで同定された Cys-rich プロラミン (Os03g0766100、Os03g0766250、Os06g0507200、Os07g0206400、Os07g0206500、Os11g0535100、Os12g0269101、Os12g0269200)、Cys-poor プロラミン (Os05g0328800、Os05g0329100、Os05g0329300、Os05g0329400、Os05g0329700、Os05g0330600、Os05g0331800、Os05g0331550、Os05g0332000、Os07g0219300、Os07g0219400、Os07g0220050) のアミノ酸配列を、米に含まれる主要なアレルゲン RA16 (Os07g0214600) と RA17 (Os07g0214100) を含めて CLUSTALW で比較し、MEGA (version 4) を

用いて系統樹を作製して解析した。

(オ) *esp2* 米粉の実用化に向けた取り組みと製パンメカニズムの解析

esp2 は弱勢、不稔の増加、開花の遅れの表現型が顕著である。*esp2* 遺伝子の育種利用を目指してコシヒカリと *esp2* (台中 65 号) を単交配し、農業生物資源研究所イネゲノム育種研究ユニット山本敏央ユニット長が後代の選抜を行った。F5 の 9 系統を農業生物資源研究所圃場で栽培し、収量及び生育特性などの調査を行った。

小麦グルテンを必要としない米粉 100% の製パン法として、グルタチオンを添加する方法が開発された (Yano, 2010, J Agric Food Chem, 58, 7949-7954)。米の貯蔵蛋白質グルテリンの含量が低下したゆめかなえ (LGC1 x ひとめばれ、千葉県育成品種)、 α グロブリンが欠損し、グルテリン含量がさらに低下した LGC 潤 (農業生物資源研究所育成品種)、コシヒカリの各精米を材料とした。精米 310g を水洗し、脱イオン水と合わせて 600g を三洋 GOPAN のミル機能でペースト状に粉碎した。この粉碎液 560g を小麦パンケースに移し換え、グルタチオン 0.75g を添加・攪拌し室温で 5 時間放置した。その後、砂糖 15g、ドライイースト 6g を加えて通常の方法 (小麦おいそぎコース) で製パンした。焼成の前後で生地中央部での高さを計測して、貯蔵蛋白質含量が製パン性に及ぼす影響とグルタチオン添加の効果を検証した。

ウ 研究結果

(ア) PDIL1-1、PDIL1-4、PDIL2-3 の胚乳での機能の解析

恩田ら¹⁾ は PDIL1-1 と PDIL2-3 の胚乳細胞の小胞体内腔での局在を明らかにした。DsRed-PDIL1-1 は ER 内腔に均一に分散して存在するのに対し、GFP-PDIL2-3 はプロラミンが集積する PB-I 蛋白質顆粒の表面に主に局在した。次に、活性部位 (CGHC) を AGHA に置換した変異型 PDIL2-3 の局在を観察した。 α と α' の活性部位を両方置換すると、融合蛋白質は ER の内腔に均一に分散した。 α の活性部位を単独で置換した場合には、PB-I 表面での局在が減少した。これらの結果は PDIL2-3 の PB-I 表面での局在は、 α ドメインの活性部位に依存したものであることを示すと共に、プロラミンが PDIL2-3 の

基質蛋白質であることを示す。

恩田ら¹⁾ は、PDIL1-1 の α と α' の活性部位を AGHA に置換して、それぞれの活性部位がグルテリンの酸化的フォールディングに及ぼす影響を調査した。各酵素を spGFP の C 末端に連結し、*esp2* に遺伝子導入して、種子蛋白質の蓄積量を調査した。野生型の PDIL1-1 を導入した形質転換体では、グルテリン前駆体が減少し、10kD プロラミンが野生型のレベルに増加した。これに対し、2 つの活性部位を置換した変異体を導入すると、グルテリン前駆体の蓄積量に変化が認められなかった。 α 又は α' を置換した PDIL1-1 を導入した形質転換体では、グルテリン前駆体が減少し、crP10 の発現量が増加した。これに対し、PDIL2-3 を過剰発現する *esp2* ではグルテリン前駆体の蓄積量に変化が認められなかった。胚乳細胞の蛋白質顆粒を観察したところ、野生型の PDIL1-1 を発現する形質転換体では、野生型と同様に典型的な PB-I と PB-II が発達した。これに対し、PDIL2-3 を発現する形質転換体の胚乳細胞では、*esp2* と同様に、蛋白質顆粒が小さく、PB-I と PB-II の明確な区別が認められなかった。これらの結果から、グルテリンの酸化的フォールディングに PDIL1-1 が関与すること、PDIL2-3 は PDIL1-1 の機能を補完できないことが明らかになった。

次に恩田ら¹⁾ は、PDIL1-1 と PDIL2-3 の組換え蛋白質の酸化還元活性を比較した。PDIL2-3 の RNase の巻き戻し活性は PDIL1-1 よりも低いことを明らかにした。酸化還元活性の違いを更に詳しく比較するために、 α グロブリンの野生型と C79F 変異の組換え蛋白質を基質にして巻き戻し活性を比較した。その結果、PDIL1-1 は α グロブリンの巻き戻しを促進することを明らかにした。興味深いことに、PDIL2-3 は Glb (C79F) の分子間ジスルフィド結合形成を促進した。PDIL2-3 は分子間の酸化反応を促進することが示唆された。

PDIL2-3 の機能解析実験で、恩田、川越²⁾ はイネ種子貯蔵蛋白質 α グロブリンの細胞内輸送を詳細に解析した。GFP と α グロブリン全長の融合蛋白質 spGFP-ABC は蛋白質貯蔵液胞 PB-II に輸送されるが、C 領域を除いた融合蛋白質 spGFP-AB はプロラミンが集積する PB-I に輸送される。PDIL2-3 の発現を抑制した胚乳細胞での spGFP-AB の局在を

観察したところ、GFP-AB は PB-I に加えて、PB-II にも輸送されていた。この結果から、PDIL2-3 は dilated ER の内腔で GFP-AB の PB-I への集積を促進することが示された。福田ら³⁾は、貯蔵蛋白質の PB-II への輸送に small GTPase Rab5a が関与することを明らかにした。

PDIL2-3 の酸化酵素は不明である。PDIL2-3 活性部位の CGHC の N 末側のシステイン残基は、酸化型の酸化酵素の分子内ジスルフィド架橋を求核攻撃し、一過的に酸化酵素と PDIL2-3 との間で分子間ジスルフィド架橋が形成されると推察される。このような反応中間体の形成後、C 末側のシステイン残基が N 末側のシステイン残基を求核攻撃して、分子間ジスルフィド架橋が解消されると推察される。一方、活性部位の C 末側のシステイン残基がアラニン残基に置換された CGHA では、アラニン残基が反応中間体の分子間ジスルフィド架橋を解消できない。その結果、反応中間体が形成されても、その逆反応のみが可能になるため、酸化酵素と PDIL2-3 が比較的安定な複合体を形成すると推察される。そこで、a ドメインと a' ドメインの活性部位をそれぞれ CGHA に置換した変異体と GFP の融合蛋白質を発現する組換え体を作製し、高発現する系統を選抜した。蛋白質を非還元条件下で抽出し、抗 PDIL2-3 抗体でウェスタンブロットを行ったところ、高分子量の複合体が検出された。これらの複合体は還元剤を加えると検出されないことから、酸化酵素を含む未同定蛋白質との間で分子間ジスルフィド架橋が形成されたと推察される (図 3235-1)。

次に、PDIL1-4 の機能解析を行った。まず、GFP-PDIL1-4 を野生型 (品種ユキヒカリ) と *esp2* (品種台中 65 号) に遺伝子導入した。野生型の登熟種子で、GFP-PDIL1-4 は小胞体のルーメンに局在した。*esp2* (品種台中 65 号) で胚乳特異的に GFP-PDIL1-4 を発現させると、多くの細胞で、野生型の胚乳に特徴的な 2 種類の蛋白質顆粒 PB-I と PB-II が明確に分かれて形成された。このことから、導入した GFP-PDIL1-4 は PDIL1-1 の機能を部分的に補完することが明らかになった。次に、PDIL1-1 と PDIL1-4 のイソメラーゼ活性を比較するために、両酵素の組換え蛋白質を精製し、還元型変性 RNase の巻き戻しを比較した。PDIL1-4 は PDIL1-1 と比較すると、巻き戻し活性が著しく低いことが明らか

になった (図 3235-2)。

(イ) PDIL2-3 の X 線結晶構造解析

PDIL2-3 の組換え蛋白質を大腸菌で発現・精製した恩田ら¹⁾の研究で、ゲルろ過での蛋白質の挙動が単量体の分子量と大きく異なることが明らかになった。分子量マーカー蛋白質と比較したところ、GST 融合蛋白質、及び GST 切断後の PDIL2-3 は共に 4 量体であることが示唆された。

次に、PDIL2-3 の X 線結晶構造解析を目的にして、組換え蛋白質を精製し、結晶化条件のスクリーニングを行った。N 末が S19、L24、G28、F34 から開始する融合蛋白質を作製してスクリーニングを行ったが結晶は得られなかった。ところが、a の Trx ドメインを除いた a'b 蛋白質は結晶が安定的に得られた。X 線結晶構造解析の結果、結晶構造は両ドメインとも Trx ドメインを含み、b ドメインは a' ドメインより少し大きいことが判明した。

次に、a ドメインを単独で Superdex75 でゲルろ過して精製した。結晶が得られ、X 線結晶構造解析の結果、典型的な Trx ドメイン構造を含むことが確認された。

(ウ) PDIL1-1 がアミロプラストの発達に及ぼす影響の解析

川越⁴⁾は登熟種子のアミロプラストの観察に不可欠な技術 (蛍光蛋白質の利用法、形質転換イネの作製法、共焦点レーザー顕微鏡の使用法) を概説するとともに、イネに特徴的な複粒形成の分子機構について詳しく解説した。ユンら⁵⁾は、澱粉の枝切

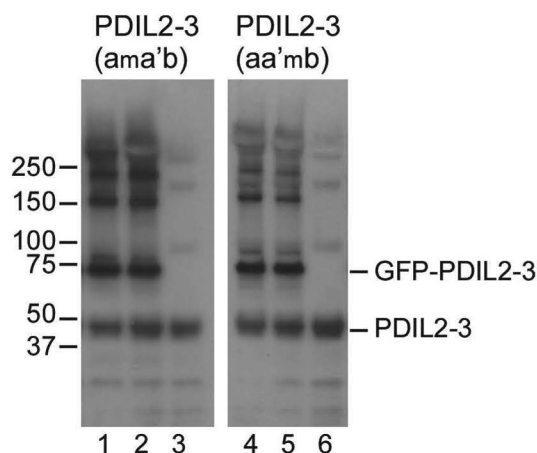


図 3235-1 PDIL2-3 の酸化酵素の同定に向けて全蛋白質を完熟種子から 3 粒別々に非還元条件下で抽出し、抗 PDIL2-3 抗体でウェスタンブロット。レーン 3 と 6 のサンプルは、分離で導入遺伝子を含まない。

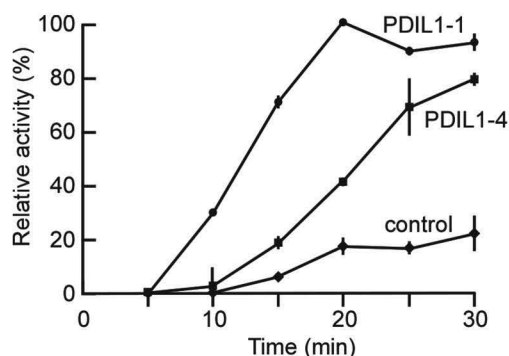


図 3235-2 変性 RNase の巻き戻し比較

PDIL1-1 と PDIL1-4 のイソメラーゼ活性を比較するために、変性 RNase の巻き戻しを常法によって比較した。酸化型と還元型のグルタチオンを含む溶液で比較し、組換え蛋白質を含まないものをコントロールとした (control)。

り酵素の ISA3 がアミロプラストの分裂と複粒形成に関与することを明らかにした。

GFP の蛍光シグナルを利用して *esp2* 変異体のアミロプラストを観察したところ、分裂が阻害されたアミロプラスト、及び複粒型澱粉粒の合成が阻害されたものが観察された。すなわち、*esp2* 変異体は貯蔵蛋白質の蓄積異常のみならず、澱粉合成にも異常をもたらすことが明らかになった (図 3235-3)。

(エ) プロラミンの蛋白質顆粒への集積機構と分子進化の解析

恩田ら¹⁾は、crP10 と cpP13 は、野生型の PB-I 内でそれぞれ、中心部、周辺部に分離して集積すること、PDIL2-3-KD では crP10 は PB-I 顆粒全体に分布することを明らかにした。これらの結果は、PDIL2-3 が PB-I 顆粒内で crP10 と cpP13 の分離に関与することを示唆する。次に、crP10 の発現を抑制して、spGFP-PDIL2-3 の局在を調査した。crP10 の発現を抑制させた個体 *crP10-KD* では、spGFP-PDIL2-3 は PB-I の表面ではなく、小胞体のルーメンに均一に分布して観察された。この結果から、crP10 と PDIL2-3 の小胞体での局在は相互依存的であることが明らかになった。関連して、長嶺ら⁶⁾は crP10 の発現を抑制すると、楕円形の顆粒が形成されることを明らかにした。

恩田ら¹⁾は、*esp2* での crP10-GFP と cpP13-DsRed の局在を観察したところ、野生型と異なり、cpP13-DsRed は小胞体に均一に分散し、顆粒での集積は認められなかった。一方、*esp2* バックグラウンドで PDIL2-3 を発現抑制させた組換え体では、

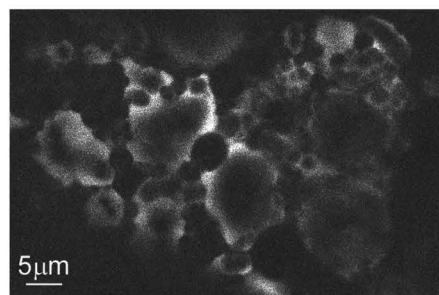


図 3235-3 *esp2* の登熟種子のアミロプラスト

野生型のアミロプラストを tpGFP で観察すると複粒澱粉が容易に観察できる。しかし、*esp2* を同じ tpGFP で観察すると、典型的な複粒が観察される細胞と、この細胞のように全く観察されないものに分かれる。

cpP13-DsRed は顆粒を形成した。しかしながら、crP10-GFP の顆粒中心での集積は観察されなかった。これらの結果から、crP10 と cpP13 の PB-I への集積には、PDIL1-1 と PDIL2-3 の両酵素が大きく関与することが明らかになった。

プロラミンは分子間ジスルフィド架橋を形成し蓄積する。一方、米に含まれる主要なアレルゲン蛋白質 RA16 (Os07g0214600)、RA17 (Os07g0214100) は、分子内ジスルフィド架橋を形成し、単量体である。恩田、川越⁷⁾は、ジスルフィド架橋形成様式の異なるこれら 2 つの遺伝子ファミリーについて系統樹を作製した。興味深いことに、プロラミン遺伝子ファミリーは RA16/17 を含むアレルゲン蛋白質を起源とすること、またその分子進化は比較的最近であることが示唆された。システイン残基を含まない Cys-poor プロラミンは第 5 染色体に 9 遺伝子、第 7 染色体に 3 遺伝子が確認された。これらの 12 個の Cys-poor プロラミンは、4 個のシステイン残基を含む Cys-rich プロラミン (Os07g0206400、Os07g0206500) と最も近い系統関係が認められた。系統樹から Cys-poor プロラミン遺伝子群は、Os07g0206400、Os07g0206500 のようなシステイン残基を 4 個含んだ Cys-rich プロラミンを起源とすることが示唆された。Cys-poor プロラミンの遺伝子進化の過程で、システイン残基を選択的に減少させる強い選択圧が働いた可能性が示唆された。

(オ) *esp2* 米粉の実用化に向けた取り組みと製パンメカニズムの解析

esp2 変異体 (台中 65 号由来) とコシヒカリの交

表 3235-1 選抜系統の生育特性（出穂期、稈長、穂長）と収量

系統	コシヒカリ	台中 65	esp2	F5-1	F5-2	F5-4	F5-6	F5-7	F5-8
出穂期	7/30	8/5	8/25	8/2	8/4	8/2	8/6	8/3	8/3
稈長 (cm)	95(2)	100(2)	92(3)	82(2)	79(2)	78(4)	92(8)	89(4)	85(3)
穂長 (cm)	18(2)	25 (2)	22(1)	20(2)	20(1)	23(1)	23(2)	25(2)	23(2)
収量 (g)	978 (109)	979 (50)	615 (10)	728 (50)	757 (87)	752 (44)	807 (35)	803 (16)	783 (36)
収量 (%)	100	100	63	74	77	77	82	82	80

- 1) 稈長と穂長は 5 個体の平均（標準偏差）を示す。
- 2) 収量は 30 株の籾重量で、2 区画の平均（標準偏差）を示す。
- 3) 収量（%）は台中 65 号を 100% としたときの相対的な収量を示す。
- 4) F5-3、F5-5 は不稔株が分離したため調査を中止した。F5-9 は出穂期が遅いため調査を中止した。

配後代（F5）の 9 系統について、農業生物資源研究所圃場で収量及び生育調査を行った（表 3235-1）。esp2 の出穂期は 8 月 25 日と最も遅い。コシヒカリは 7 月 30 日、台中 65 号は 8 月 5 日であった。選抜系統は 8 月 2 日から 6 日となり、esp2 の出穂期から 3 週間程度早まった。稈長についてはバラつきが大きく、どれも親系統よりも短くなった。穂長はどれもコシヒカリよりも長くなった。収量については esp2 と比較すると 18% から 31% の収量の増加があった。しかしながら、台中 65 号、コシヒカリと比較すると最も収量の高い F5-6 においても 18% 程度収量が低かった。

次に、米粉 100% の米粉パンの製パンにおけるイネ種子貯蔵蛋白質の機能を解析した。米の貯蔵蛋白質グルテリンの含量が低下したゆめかなえの精米に脱イオン水を加え、GOPAN（三洋電機）を使ってペースト状に粉碎した。グルタチオンを添加した実験区（+）、添加しない対照区（-）について、経時的に生地をサンプリングして、非還元条件下で蛋白質を抽出し、抗グルテリン抗体でウェスタンブロットを行った。グルタチオンを添加すると 1 時間後にはほとんどすべてのグルテリン多量体が単量体に還元された。しかしながら、その後、酸性及び塩基性サブユニットは検出されなかった。この結果から、グルタチオンはグルテリンの分子内ジスルフィド架橋は還元しないことが明らかになった（図 3235-4）。同様に還元型の α グロブリンも検出されなかった。

コシヒカリ（KH）とゆめかなえ（YK）では、グルタチオン添加の有無で、発酵での生地の膨らみに大きな違いはなかった。しかし、グルタチオンを添加しない生地では、膨らんだ生地は焼成が始まると直ぐに底まで陥没した。これに対し、グルタチオンを添加したコシヒカリの焼成では生地の陥没はなかった。一方、LGC 潤（LJ）では、グルタチオン添加の有無にかかわらず、発酵による生地の膨らみはコシヒカリの半分以下であった（図 3235-5）。

LGC 潤の発酵過程を詳細に観察したところ、生地の内部から気泡が表面に上昇し、活発に湧き出る様子が観察された。更に、発酵及び焼成過程で生地内部に生じた気泡は、融合して大きくなると湧き出やすいことが示唆された。これらの結果から、グルタチオンで単量体に還元されたグルテリンは、発酵及び焼成過程で、隣接する気泡の融合を阻害し、生地中の細かな気泡を安定化する作用があることが示唆された。グルテリン単量体は、製パン特性を向上させる機能性蛋白質であることが示唆された。

工 考 察

（ア）PDIL1-1、PDIL1-4、PDIL2-3 の胚乳での機能の解析

イネの主要な種子貯蔵蛋白質グルテリン、 α グロブリン、プロラミンは分子内又は分子間ジスルフィド架橋を含む。ジスルフィド架橋の形成はこれらの貯蔵蛋白質の局在に大きな影響を及ぼすことを明らかにした。驚くことに、PDIL1-1 と PDIL2-3 は同

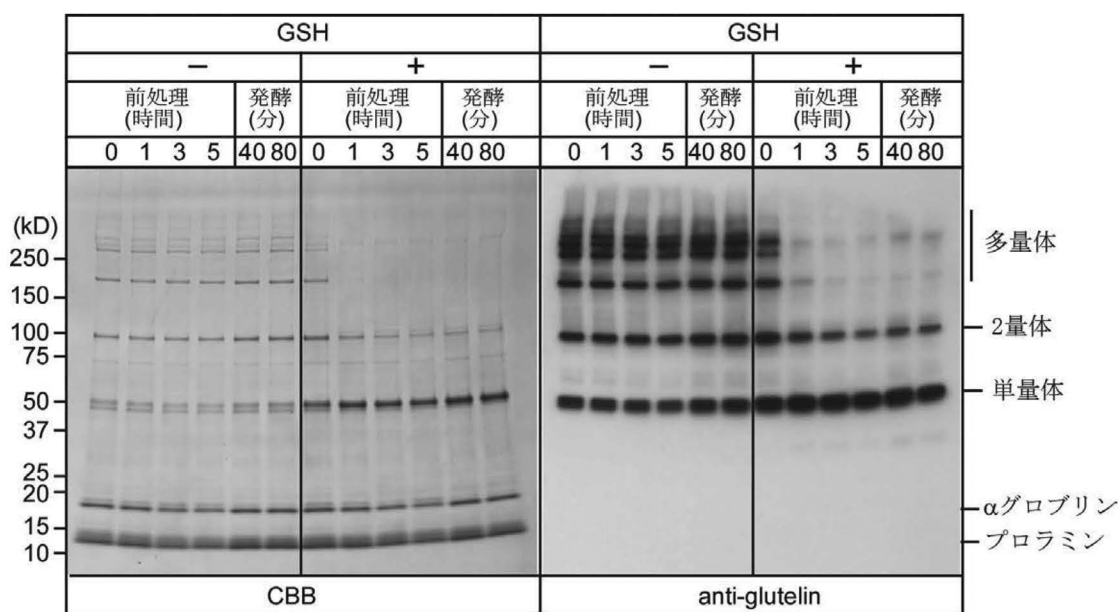


図 3235-4 グルタチオンはグルテリン多量体を単量体に還元

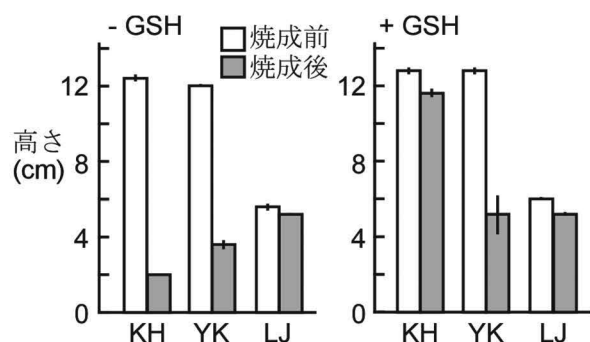


図 3235-5 グルテリン単量体が膨らんだ生地の陥没を防ぐ

じ胚乳細胞の同じ小胞体の内腔で、局在が異なることを発見した。局在の違いは、2つのPDIの機能が異なることを示唆する。PDIL1-1はグルテリンのフォールディングを促進し、PDIL2-3はプロラミンのPB-Iへの集積を促進すると考えられる。一方、PDIL1-4の機能の解明は今後の解析が必要である。PDIL1-1の機能欠損変異体 *esp2* では、PDIL2-3の発現量が上昇する。*esp2* ではグルテリン前駆体とプロラミンが分子間ジスルフィド架橋を形成して蓄積することから、PDIL2-3の酸化活性が大きな要因であると推察される。PDIL2-3は種子貯蔵蛋白質の酸化、及びプロラミンの集積にきわめて重量な機能があることが明らかになった。

(イ) PDIL2-3のX線結晶構造解析

PDIL2-3を含むP5ファミリーはTrxドメインがa-a'-bの特徴的な構造を持っている。本研究で3つ

全てのTrxドメイン構造が明らかになったことで、各ドメインの機能について、構造を基にした機能解析が可能になった。多くの条件でのスクリーニングにも関わらず、全長の結晶は得られなかったことから、aとa'を繋ぐリンカーは長く、自由度が大きいと推察される。

(ウ) PDIL1-1がアミロプラストの発達に及ぼす影響の解析

PDIL1-1は小胞体内腔で機能する。その機能の欠損で、アミロプラストの発達に異常が起きることは意外な結果である。しかしながら、葉組織では、小胞体から葉緑体にゴルジ経由でアミラーゼが小胞輸送される。胚乳細胞のアミロプラストにもゴルジ体経由の小胞輸送がある可能性は高い。すなわち、小胞体でPDIL1-1によって酸化的フォールディングが促進される何らかの分泌蛋白質が、アミロプラストにターゲットされストロマで機能することが複粒形成に必須であると考えられる。

(エ) プロラミンの蛋白質顆粒への集積機構と分子進化の解析

プロラミンが集積するPB-Iの顆粒内部ではシステインを多く含むプロラミンが中心部に、含まないプロラミンが周辺部に分離することは、顆粒での集積の時間的な順序だけでは説明できない。つまり、顆粒内は蛋白質が移動可能なゲル状であることが示唆された。

プロラミンファミリーの系統樹から、プロラミンファミリーは2Sアルブミンファミリーに属するRA16/17などの遺伝子から比較的近年派生してきたこと、また、Cys-depleted プロラミン遺伝子群はシステインを4個もったプロラミンから派生したことなどが示唆された。またこの遺伝子進化では、システイン残基を減少させる強い選択圧があったことが示唆された。

(オ) *esp2* 米粉の実用化に向けた取り組みと製パンメカニズムの解析

*esp2*とコシヒカ리의単交配後代の選抜系統の多くでは、出穂期が約3週間早まり、収量が約3割増加した系統が得られた。これらの結果から、*esp2* 変異体に特徴的な出穂の遅れ、不稔、弱勢は、PDIL1-1の機能欠損が直接の原因でないことが明らかになった。すなわち、これらの劣悪形質は、他の特定されていない複数の遺伝子での変異が原因である可能性が高い。

米粉100%製パン法(グルタチオン法)の特徴は、加水が多く、生地がメレンゲであること、また、食塩を加えると生地が膨らまないことである。本研究では、グルテリン含量が減少した品種を材料として用いることによって、米粉100%製パン法におけるグルテリンの機能を明らかにした。グルテリンは中性付近の水に不溶である。そのため、グルタチオン添加後の長時間のインキュベーションの過程で、徐々に界面活性剤としての性質を帯びてくると推察される。その結果、発酵による気泡の発生では、グルテリン単量体は、不溶性の部分は気相に、可溶性の部分は水相に向かって配列すると推察される。その結果、気泡の表面は幾分正または不の荷電を帯びることになる。隣の気泡との融合阻害のメカニズムは、これらの気泡表面での静電反発が要因と考えられる。食塩を加えると膨らまなくなる原因は、食塩を加えると気泡の電荷が打ち消され、その結果、隣り合う気泡との間の静電反発がなくなる。したがって気泡が融合し易くなり、生地が膨らまなくなると考えられる。

オ 今後の課題

(ア) PDIL1-1、PDIL1-4、PDIL2-3の胚乳での機能の解析

貯蔵蛋白質は翻訳直後は還元型のシステイン残基

のみを含むため、ジスルフィド架橋形成に必要な酸化力は酸化型のPDIL酵素によって伝達される。PDIL2-3はプロラミンの分子間ジスルフィド架橋形成に関与するが、PDIL2-3を酸化する酸化酵素は不明である。PDIL2-3の活性部位のCGHCをCGHAに置換した変異体は高分子量の複合体を形成した。今後、複合体に含まれる蛋白質を同定することによって、PDIL2-3の酸化酵素の同定を試みる。

(イ) PDIL2-3のX線結晶構造解析

PDIL2-3の3つ全てのTrxドメインの構造は明らかになったが、aドメインとa'bドメインの相対的な配置は不明である。PDIL2-3は安定な4量体を形成するため、単量体の構造ではなく、4量体分子の形状が機能に大きく影響する。得られた各ドメインの立体情報(3次構造)を生かして、4量体分子の4次構造の構築が今後の課題となる。

(ウ) PDIL1-1がアミロプラストの発達に及ぼす影響の解析

アミロプラスト内部での複粒形成にはゴルジ体經由の小胞輸送が必須であることが示唆されたことから、アミロプラストへの小胞輸送にかかわる因子の同定が今後の課題となる。

(エ) プロラミンの蛋白質顆粒への集積機構と分子進化の解析

できるだけ多様な栽培イネや野生イネのプロラミン遺伝子群の配列を比較することで、システイン残基を減少させた選択圧が、イネの進化のいつ起きたのか、またその選択圧は自然選択か人為選択であったのかが明らかになると期待される。

(オ) *esp2* 米粉の実用化に向けた取り組みと製パンメカニズムの解析

選抜した系統の品種登録に向けて作業を進めることが課題である。加えて、選抜系統の製粉性、パン、麺、菓子等への加工適性の評価が必要である。

米粉100%製パン法のメカニズムが分かったことから、米粉100%の新たな製パン法の開発の可能性が大きくなったと言える。グルテリン単量体と同様な界面活性作用のあるペプチド、蛋白質等をスクリーニングすることが今後の課題の一つとなる。

カ 要約

(ア) PDIL1-1、PDIL1-4、PDIL2-3の胚乳での機能の解析

イネの PDIL ファミリーの PDIL1-1、PDIL1-4、PDIL2-3 は機能、細胞内局在が異なることを明らかにした。

(イ) PDIL2-3 の X 線結晶構造解析

PDIL2-3 の組換え蛋白質の X 線結晶構造解析で 3 つ全ての Trx ドメインの構造を明らかにした。

(ウ) PDIL1-1 がアミロプラストの発達に及ぼす影響の解析

PDIL1-1 の機能は、アミロプラストの分裂と複粒型澱粉形成を促進する機能を含むことを明らかにした。

(エ) プロラミンの蛋白質顆粒への集積機構と分子進化の解析

プロラミンの PB-I への集積は PDIL1-1 と PDIL2-3 の両酵素に加え、10kD プロラミンの協調的な関与が必要であることを明らかにした。プロラミンファミリーの遺伝子進化でシステイン残基の数を減少させる選択圧があったことが判明した。

(オ) *esp2* 米粉の実用化に向けた取り組みと製パンメカニズムの解析

esp2 とコシヒカリの交配後代から出穂期が 3 週間早まり、収量が 3 割増収した系統を選抜した。小麦グルテンを含まない米粉 100% の製パン法におけるグルタチオンの効果とグルテリン単量体の機能を明らかにした。

キ 引用文献

1) Onda, Y, Nagamine, A, Sakurai, M, Kumamaru, T, Ogawa, M, and Kawagoe, Y (2011). Distinct roles of protein disulfide isomerase and P5 sulfhydryl oxidoreductases in multiple pathways for oxidation of structurally diverse storage proteins in rice. *Plant Cell*. 23 : 210-223.

2) Onda Y, Kawagoe Y (2013). P5-type sulfhydryl oxidoreductase promotes the sorting of proteins to protein body I in rice endosperm cells. *Plant Signaling & Behavior*. 8 : e23075.

3) Fukuda M, Satoh-Cruz M, Wen L, Crofts A.J, Sugino A, Washida H, Okita T.W, Ogawa M, Kawagoe Y, Maeshima M, Kumamaru T (2011). The small GTPase Rab5a is essential for intracellular transport of proglutelin from the Golgi apparatus to the protein storage vacuole and endosomal membrane organization in developing rice endosperm. *Plant Physiology*. 157 : 632-644.

4) Kawagoe Y (2013). The characteristic polyhedral, sharp-edged shape of compound-type starch granules in rice endosperm is achieved via the septum-like structure of the amyloplast. *Journal of Applied Glycoscience*. 60 : 29-36.

5) Yun, M.-S, Umemoto, T and Kawagoe, Y. (2011). Rice debranching enzyme isoamylase3 facilitates starch metabolism and affects plastid morphogenesis. *Plant and Cell Physiology*. 52 : 1068-1082.

6) Nagamine A, Matsusaka H, Ushijima T, Kawagoe Y, Ogawa M, Okita T.W, Kumamaru T (2011). A role for the Cysteine-rich 10 kD prolamin in protein body I formation in rice *Plant and Cell Physiology*. 52 : 1003-1016.

7) Onda Y, Kawagoe Y (2011). Oxidative protein folding : selective pressure for *prolamin* evolution in rice *Plant Signaling & Behavior*. 6 : 1966-1972.

研究担当者 (川越靖*)