



Title	イネの網羅的転写解析を中心とした穂ばらみ期耐冷性の育種・遺伝学的研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	石黒, 聖也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11815号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58630
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Seiya_Ishiguro_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名： 石 黒 聖 也

学 位 論 文 題 名

イネの網羅的転写解析を中心とした穂ばらみ期耐冷性の育種・遺伝学的研究

本論文では、イネ (*Oryza sativa* L.) の特にストレスに弱いとされる穂ばらみ期において、ゲノム全体の変化を調査するために反復配列を含む網羅的転写解析を中心に行った。反復配列は通常はエピジェネティックな制御を受けて転写が抑えられているものの、ストレスを受ける事で活性化するという特徴があるため、反復配列を含むゲノム全体の変化は植物が受けたストレスの程度を目安となることが期待できる。

第 I 章では、温帯 *japonica* の日本晴と T65 の 2 系統を用いて、葉と葯でのゲノム全体の転写の様子を反復配列由来のプローブ 32000 個と遺伝子プローブ 10000 個を含むマイクロアレイを用いた網羅的転写解析によって調査し、葯で反復配列を含む多くの因子が発現している事を明らかにした。転写が活発な葯において、穂ばらみ期の低温ストレスに対するゲノム全体の反応を穂ばらみ期耐冷性の異なる 5 系統で、ゲノム全体で見いだされた低温への安定性と花粉稔性とを比較して評価を行った。低温に弱かった日本晴は低温に多くの因子が反応しており、発現変化が見られた因子はゲノムの全体に偏りなく存在していることも明らかとなった。各因子の発現を調節するストレスに特異的な *cis*-motif も存在しないことも確認し、低温ストレスによる転写の変化が一様なシグナル経路によらないことを示した。

さらに穂ばらみ期耐冷性の異なる 8 系統の温度反応性をイネの遺伝子由来のプローブを全て (39755 個) 含んだマイクロアレイで調査し、花粉稔性とゲノムの安定性の関係性を考察した。低温でゲノム全体の発現変動の小さな系統でも耐冷性が弱い場合も見いだされ、逆に低温で発現変動の大きな系統で耐冷性が比較的強いものもあった。発現変動と耐冷性の関係は一様な傾向で全て説明できるわけではなかったが、温度反応の大きさは系統間ではっきりと異なり、低温に反応する方向も上方制御されているものと下方制御されているものが様々に存在した。温帯 *japonica* の T65、北海 PL9 および *indica* の Kasalath の 3 系統が低温によって発現が下方制御されている系統として見いだされ、エピジェネティックな制御を含めて、ゲノムの主要なストレス反応の機構が系統間で根本的に異なることを示唆した。同時に温度反応と花粉稔性が強く関与する 116 因子を検出したほか、本実験で用いた 8 系統の間で花粉稔性に関わる遺伝子として *OsABA8OX2* を見いだした。

穂ばらみ期の葯が他組織と比較して転写段階でストレス反応が過剰であるかを温帯 *japonica* の日本晴と A58 の 2 系統で、異なる組織や時期における低温への反応性の調査によって明らかにした。温度に反応した因子の数は転写が活発なことが明らかになった葯よりも葉の方が両系統とも多かった。成長点ではその他の組織と比較して温度によるクロマチン構造に対する影響は小さいとされることから、転写段階でのストレス反応は葯では抑えられていることが示唆された。この実験では、全ての組織で低温に反応して転写が活性化する未報告の転移因子が検出された。

第 II 章では、低温とは異なる環境ストレスである高温ストレスを穂ばらみ期の葯に対して与え、ユークロマチンおよびヘテロクロマチン領域を含むゲノム全体の反応性を調査した。実験に用いた *indica* を含む 11 系統全てで高温ストレスによる花粉稔性の低下が見られ、高温に強かった温帯 *japonica* のさらさら 397 では高温

ストレスによってその他の系統で発現が低下した膜代謝関連遺伝子である Os02g0110000 が発現上昇していた。ゲノム全体の発現変化としては、特にヘテロクロマチン領域と考えられている部分での発現の上昇が見受けられ、ユークロマチン領域と考えられている部分ではそういった傾向は強く見られなかった。つまりゲノム全体で発現量が増加するなどの一方向的な変化ではなく、クロマチン構造の違いによって温度への反応の仕方が異なる可能性がある。ヘテロクロマチン領域では、穂ばらみ期の高温ストレスでエピジェネティックな制御が一部失われることが示唆された。

低温と高温という 2 種類の温度ストレスに対するゲノムの反応の比較も行った。低温ストレスでも一部の反復配列では発現量の増加が見られたものの、高温ストレスによる変化と比べると小さな変化にとどまった。高温ストレスにおいては反復配列領域で低温ストレスよりも大きな変化が引き起こされることが推定された。

第 III 章では、北海道在来温帯 *japonica* の A58 と *indica* の I33 の間の組み換え自殖後代の F₆ 集団及び F₇ 集団を用いて穂ばらみ期耐冷性に関わる遺伝解析と発現解析を行った。低温処理は稈長や到穂日数など他の形質の耐冷性への影響を緩和する空冷法で行い、第 10 染色体に耐冷性に関わる遺伝領域を検出した。この領域は、2013 年に F₇ 集団で行った調査で低温時における葯長の長さに関わる可能性も示された。第 10 染色体にある穂ばらみ期耐冷性遺伝子領域は、*indica* と温帯 *japonica* の間の組み換え自殖系統で同様に耐冷性に関わる遺伝解析を行った研究 (Andaya and Mackill, 2003) においては検出されていないことから新規の遺伝子領域である可能性が高い。候補領域においては、遺伝子の発現解析も行った。A58 と I33 で発現パターンが異なる遺伝子は 20 個あったものの、後代の系統の花粉稔性と強く関わる遺伝子は見つけられなかった。

第 IV 章では、低温ストレスで発生する小孢子期での葯内部構造の異常、「タペート肥大」、「葯室崩壊」、「未分化葯室」、「タペート層剥離」を見出し、これら異常の発生頻度と葯の花粉生産能力の関連を調査した。本章では北海道や他府県で育成された温帯 *japonica* の 11 系統に加え、熱帯 *japonica* の Silewah や *indica* の Kasalath を含む遺伝背景の異なる 13 系統を用い、葯内部構造を観察した。葯内部構造の観察は小孢子期にあたる穎花を採取、FAA 固定液で固定後パラフィン包埋、さらに包埋後マイクロームで薄切することにより行った。葯室の観察で「タペート肥大」、「未分化葯室」、「葯室崩壊」、「タペート層剥離」の 4 つの異常を捉え、耐冷性強度の低い系統の中でも不稔花粉にいたる機序はさまざまであることが示唆された。またこれら葯室の異常と花粉稔性率との相関が示され、葯長が大きいほど葯室の異常が起りにくくなる可能性が示された。

本研究でのイネゲノムに散在する反復配列を含んだ網羅的転写解析を中心としたゲノム全体のストレス反応の調査を通じて、反復配列の中でもイネに多く存在する MITE 因子が低温においてゲノム全体の変化と同調した発現変動を示し、高温において花粉稔性との高い相関を示すなど興味深い変化を示した。MITE はユークロマチン領域に多くが存在しながら、エピジェネティックな制御を受けヘテロクロマチン化していることが予想され、様々なクロマチンの状態が散在するゲノム全体の変化を反映している可能性を本研究の結果が示している。このように、反復配列を含めてストレスに対する網羅的な転写解析を行うことで、温度反応性という新たな形質の評価を行うことができ、耐冷性に対する直接的な発現変化の一端を捉えることができた。温度反応性の評価は、イネにおいては MITE の因子群が有力であり、簡易な評価が行える期待がある。