



Title	イネの低温ストレスによる攪乱反応の理解と育種学的ゲノミクス研究 [全文の要約]
Author(s)	山森, 晃一
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14811号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85556
Type	doctoral thesis
File Information	Yamamori_Koichi_summary.pdf



博士論文の要約

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 山森晃一

学位論文題名

イネの低温ストレスによる攪乱反応の理解と育種学的ゲノミクス研究

本論文は3つの研究をまとめた全5章で構成され、その目次を文末に載せた。以下に第2-4章の要約を示す。

第2章 多様なイネ品種における穂ばらみ期の低温による葯形態変化と花粉稔性の関係性

背景：イネは熱帯原産の植物で一般的に低温ストレスに弱い。花粉母細胞が減数分裂を終えた直後の‘穂ばらみ期’の葯は特に低温に弱い。イネの葯の最も内側に存在するタペート層は植物側から小孢子への様々な物質輸送を行う。低温にさらされた穂ばらみ期のイネでは、タペート層でのでんぷんの分解と分解産物であるスクロースの輸送が滞り、それらがタペート層に蓄積することで‘タペート肥大’が発生する。タペート肥大によって小孢子へのでんぷんの蓄積が滞ることで不稔花粉が発生し、米の収量が低下することが穂ばらみ期の低温障害の発生メカニズムとして支持されてきた。そのため、タペート肥大の発生を穂ばらみ期の低温障害における主な要因であるという前提で多くの研究が行われてきた。しかし、花粉の不稔とタペート肥大の因果関係は、典型的な寒さに弱いイネ品種における観察に基づくものであり、タペート肥大の頻度と耐冷性の強弱の関係については検討されていない。そのため、品種によってタペート肥大の発生頻度や程度が異なる可能性があるという主張もある。本研究では、多様な低温耐性を示すイネ13品種を用いて、穂ばらみ期の低温による葯形態変化と花粉稔性の関係性を調査した。

材料および方法：本研究では11種の *temperate japonica* 品種（日本晴、金南風、台中65号（T65）、ニシホマレ、富国、ササニシキ、北海287、シンレイ、コシヒカリ、キタアケ、ほしのゆめ）、*tropical japonica* 品種（Shilewah）1種、*indica* 品種（Kasalath）1種を実験に用いた。材料植物は温室条件（昼：25°C、夜：19°C）で栽培し、穂ばらみ期にあたる時期に12°C、4日間の低温処理を行った。低温処理直後の葯を採取し、パラフィン切片法を用いて厚さ7μmの横断切片を作成、観察を行った。低温処理を行った植物の一部は温室条件に戻して生育を続け、開花期の葯でも観察を行った。葯の横断切片観察は低温処理を行っていない植物でも行い、対照区とした。また、開花期の葯から花粉を採取し、ルゴールヨウ素溶液で染色することで花粉稔性の計測を行った。ルゴールヨウ素溶液は稔性のある花粉を染色するため、染色の有無で花粉の稔性を判定した。

結果：葯の構造的変化は、穂ばらみ期および開花期の葯の内部構造に関連する8つの異常に大別された。これらの葯室関連異常（LRA：Locule-Related Abnormalities）には、これまで穂ばらみ期における低温障害の発生原因とされてきたタペート肥大も含まれた。LRAの発生頻度と耐冷性の相関関係を調査すると、低温処理区におけるタペート肥大の発生率と花粉稔性の間に有意な相関関係を見いだせなかつ

た (ピアソン相関係数 $r = -0.18$). この結果から, イネのタペート肥大は, 穂ばらみ期の低温ストレスによる花粉不稔の指標にはなり得ないことがわかった. タペート肥大以外の LRA のうち, 穂ばらみ期に観察される未発達葯室や開花期に観察される空葯室の発生率は花粉稔性との間に有意な相関 ($r = -0.79$ および $r = -0.78$) が検出され, これらの LRA と不稔花粉の発生には関連があることが判った. 一方で興味深いことに, 葯の中で LRA が占める割合と分布を調査すると, LRA は葯の特定の部位に集中して発生し, およそ 70% の花粉が不稔となる品種でも, 葯内部における LRA の占有率は 50% を下回った. このことは, LRA は不稔花粉発生の直接的な原因ではないことを示した. また, 低温処理によって一定以上の不稔花粉が発生するにもかかわらず, 葯の構造に異常が発生しない品種を発見した.

考察: 穂ばらみ期の低温障害に関する研究のほとんどはタペート肥大の発生によることを前提に行われてきた. しかし, 本研究結果から, 低温ストレスによる不稔花粉の発生と葯構造の関係は, タペート肥大の発生だけで説明できるほど単純な要因によるものではないことが判った. さらに, LRA は葯の特定部位に集中して発生し, 葯内部に占める割合が不稔花粉の発生率よりも顕著に低かった. このことから, LRA の発生自体は低温ストレスによる結果であって, 不稔花粉発生の原因ではないことが予想される. 本研究の結果から, 葯の異常構造と花粉稔性の複数の要因が関係する新たなモデルを構築することができた.

第 3 章 イネの葉と葯のゲノムにおけるヒストン H3K9 のメチル化修飾パターンの比較解析

背景: 生物のゲノムには遺伝子以外に, 主に転移因子に由来する反復配列が含まれ, イネでは全ゲノム長のうち, およそ半分は反復配列である. 反復配列の大部分を占める転移因子は利己的な因子として知られ, 活性化すると転移によって宿主ゲノムの変異を誘発する. 生物は転移によるゲノムの破壊を防ぐため, DNA のメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな機構によって, 反復配列の発現を抑制している. しかし近年, 反復配列は単なる利己的な因子ではなく, 宿主の生命現象にも関与するゲノム配列として徐々に認識されつつある. 例えば, 遺伝子のプロモーター領域に存在する反復配列に対するエピジェネティックな修飾は下流の遺伝子の発現を抑制することが知られている. 以上のように, ゲノム全体における遺伝子発現制御には, 反復配列のエピジェネティックな制御が関係する.

反復配列の転写抑制に関与するエピジェネティックな機構として, DNA メチル化とヒストン修飾が知られるが, イネでは DNA メチル化に関する研究に比べヒストン修飾に関する研究が少ない. 本研究では, 反復配列の転写抑制やヘテロクロマチン構造の形成に関わるヒストン H3 タンパク質の 9 番目のリジン(K) におけるジメチル化 (H3K9me2) のゲノムワイドな分布に注目した. H3K9me2 抗体を用いた ChIP (クロマチン免疫沈降: Chromatin Immunoprecipitation) と全ゲノムシーケンス解析を組み合わせた ChIP-seq 解析を行い, イネの生殖器官である穂ばらみ期の葯と栄養器官である五葉期の葉のゲノムにおける H3K9me2 の分布パターンを比較した.

材料および方法: 本研究ではイネ品種の日本晴を材料に用いた. 日本晴を温室条件 (昼: 25°C, 夜: 19°C) で栽培し, 五葉期に最上位展開葉を, 穂ばらみ期に葯をそれぞれ複数の個体から採取した. 採取した組織はホルムアルデヒドを用いて固定処理が行われた. 固定後の組織からヒストンタンパク質との

相互作用を保ったままの DNA を抽出し、H3K9me2 抗体を用いた免疫沈降反応によって、H3K9me2 と相互作用する DNA 配列のみを回収した。回収された DNA 配列はペアエンド解析によって配列が読まれ、ショートリードを日本晴のリファレンスゲノムにマッピングすることで、ゲノム上に H3K9me2 と相互作用する領域を特定した。

結果： 葯と葉の ChIP-seq 解析から、H3K9me2 が分布する領域はイネゲノム全長のおよそ 20% を占めることが判った。イネの第 1-12 染色体において特に H3K9me3 が高頻度で分布する領域は、ヘテロクロマチン領域として知られるセントロメア周辺領域だった。ゲノムに存在する遺伝子と反復配列の全長に対して、H3K9me2 が分布したそれぞれの配列の長さの割合を計算すると、H3K9me2 が分布する遺伝子は全体の 1% 未満であったのに対し、反復配列では 25% にあたる領域に H3K9me2 が分布していた。このように、葯と葉で共通した傾向として、H3K9me2 は遺伝子よりも反復配列において圧倒的に多くみられ、これは多くの生物で報告されている傾向と一致した。反復配列の種類ごとでみると、セントロメアリピートやレトロトランスポゾンでは高い頻度で H3K9me2 の分布がみられ、反対に MITE などのトランスポゾンでは分布頻度が低かった。このことから、H3K9me2 の反復配列への分布パターンは反復配列の種類ごとで異なることが判った。

葯と葉で比較すると、両器官で検出された H3K9me2 分布領域のおよそ 80% が共通した領域だった。両器官で特異的に H3K9me2 が分布する領域は葉よりも葯の方が広く、その塩基長は葉のおよそ 2 倍であったことから、葯でより多くの反復配列が H3K9me2 によって発現が抑制されていることが判った。葯と葉でそれぞれ特異的に H3K9me2 が分布している反復配列の種類ごとの内訳を比べると、葯では葉よりも MITE に H3K9me2 が分布する頻度が高いことが判った。また、器官特異的に H3K9me2 が分布する反復配列のうち、遺伝子のプロモーター領域に存在する配列の割合は葯よりも葉の方が多かった。遺伝子のプロモーター領域に存在する反復配列に H3K9me2 が集積すると下流の遺伝子発現が抑制されることが知られ、実際に発現が抑制されている遺伝子を複数確認できた。

考察： 本研究では反復配列の抑制に関わる H3K9me2 のゲノムワイドな分布について、生殖器官の葯と栄養器官の葉で比較した。葯と葉のどちらでも H3K9me2 は反復配列に多く分布することが判り、反復配列の種類ごとでも H3K9me2 の分布頻度に差がみられた。レトロトランスポゾンとトランスポゾンで比較すると、前者の方が H3K9me2 の分布頻度が高く、イネゲノムが警戒している反復配列であることが確認できた。

葯と葉を比較すると、器官特異的な H3K9me2 の分布領域は葯の方が広く、H3K9me2 が分布する反復配列の種類の内訳も異なっていた。葯と葉のゲノムでみられたこの違いは、官特有の発現パターンを形成することが考えられる。実際に、器官特異的に H3K9me2 が分布する反復配列のうち、遺伝子のプロモーター領域に存在ものの割合は葉の方が高く、それによる下流の遺伝子発現の抑制も確認できた。本研究で明らかになった葯と葉の H3K9me2 の分布パターンの違いは、器官特有の発現パターンを形成することが考えられ、今後、低温ストレスによる遺伝子発現変動との関係が明らかになることを期待する。

第4章 多様なイネ品種を用いた穂ばらみ期のトランスクリプトーム解析と低温鈍感力

背景：これまでに穂ばらみ期の耐冷性に関わる量的遺伝子座 (QTL) はイネの 12 本の染色体すべてにわたって 30 か所以上特定されているが、そこから単離された遺伝子は 3 つしかない。そのため、イネの穂ばらみ期耐冷性に関わる分子的なメカニズムはほとんどわかっておらず、効率的な耐冷性品種の作出は困難である。また、ストレス耐性植物の作出のための戦略として、ストレス応答性の転写因子を過剰発現させ、過敏なストレス応答による耐性の付与が試されてきた。しかし、そのほとんどの場合、耐性の付与と同時に深刻な生育遅延がもたらされ、ストレス耐性と生育速度はトレードオフの関係にあるといわれてきた。以上のように、イネの穂ばらみ期耐冷性を含むストレス応答機構の解明には、これまでの研究とは異なる新たな視点で研究を行う必要がある。筆者らの研究チームでは、穂ばらみ期の薬を用いたトランスクリプトーム解析を行い、耐冷性品種ほど低温による反復配列の発現変動が少ないことを報告した。この結果を受け、低温耐性品種が示す低温ストレスに対する応答性の低さを‘低温鈍感力’と定義した。本研究では多様な遺伝的背景を持つイネ 14 品種に対して低温処理を行い、穂ばらみ期の薬におけるトランスクリプトーム解析を行った。

材料および方法：本研究には 14 種類のイネ品種を用いた。9 種の *temperate japonica* 品種 (台中 65 (T65), 北海 PL9 (PL9), 黒色稲 2 号 (A58), コシヒカリ, 北海 287, 日本晴, きらら 397, ササニシキ, 富国), *tropical japonica* 品種 (Lambayeque1) 1 種, および *japonica* 品種の A58 と *indica* 品種の Surjamkhi (I33) の組み換え自殖系統 (Recombinant Inbred Line : RIL) の R45, R75 および R85 を研究に用いた。材料植物は温室条件 (昼 : 25°C, 夜 : 19°C) で栽培し、穂ばらみ期にあたる時期に 12°C, 4 日間の低温処理を行った。品種ごとで複数の個体から低温処理直後の薬を採取し、RNA を抽出した。RNA は低温処理を行っていない植物からも抽出し、対照区とした。抽出した RNA はマイクロアレイ解析に供試した。使用したマイクロアレイは主に遺伝子由来のプローブを搭載し、イネの全遺伝子を網羅するように設計された。低温処理を行った植物の一部を温室条件に戻して生育を続け、花粉稔性の調査に供試した。マイクロアレイ解析に供試した品種のうち、耐冷性品種として Lambaeque1 と PL9, 感受性品種として日本晴とササニシキを選抜し、RNA-seq 解析を行うことで、マイクロアレイ解析の結果を検証した。RNA-seq 解析に供試した植物はマイクロアレイ解析に用いたものとは別に用意した。

結果：マイクロアレイ解析に供試した 14 品種の花稔性を調査すると、低温処理後の花稔性は最小で 2.2%, 最大で 87.9% を示し、品種間で低温感受性程度に大きな差があることが判った。マイクロアレイ解析によって 14 品種それぞれで発現変動因子を検出すると、その数や種類は品種ごとに固有のパターンを示したが、14 品種すべてで同様の発現変動を検出した 51 因子を選抜した。このうち、15 因子については RNA-seq 解析に供試した 4 品種すべてで同様の発現変動が検出できた。発現変動が共通した 15 因子は穂ばらみ期のイネの薬において普遍的に低温応答を示す因子であり、低温応答メカニズムの理解につながるだけでなく、低温応答の指標としての応用も期待できる。

次に、イネの穂ばらみ期耐冷性に関わる遺伝子を選抜するため、遺伝子発現変動と耐冷性の相関関係を調査し、顕著な相関 (ピアソンの相関係数 $|r| \geq 0.53, p < 0.05$) を示した因子を選抜した。その結果、耐性品種ほど発現変動が大きい因子を 58 個、変動が小さい因子を 113 個選抜した。耐性品種ほど発現変動が大きい因子より小さい因子の方が多いため、耐冷性品種は感受性品種に比べてゲノム全

体の発現変動が小さい傾向にあることが言えた。また似たような傾向は低温区における発現量と耐冷性の相関分析からもいえた。低温区における花粉稔性と発現量に正の相関 ($r \geq 0.53$) を検出した因子は 429 個に対し、負の相関 ($-0.53 \geq r$) を検出した因子は 825 個で、耐性品種で高発現する因子よりも低発現する因子の方が多く選抜された。興味深いことに、穂ばらみ期耐冷性遺伝子として知られる *CTB1* や、過剰発現によって耐冷性を誘導する *OsMYB4* などの遺伝子は低温感受性ほど高発現を示した。以上のことから、低温耐性品種ほど低温ストレスへの応答が少なく、むしろ低温感受性品種ほどストレスに過敏に反応していることが言えた。この傾向は RNA-seq 解析でも確認され、マイクロアレイ解析で相関が検出された 429 個と 825 個の因子のうち、RNA-seq 解析で同様の傾向がみられた因子はそれぞれ 28 個と 125 個だった。

考察：イネの穂ばらみ期における低温ストレスは収量の低下に直結するため、北海道のような高緯度地域において必須の形質である。しかし、穂ばらみ期の耐性性に関わる遺伝子はこれまでに 3 つしか単離されておらず、そのメカニズムはほとんどわかっていない。また、特定の転写因子を過剰発現することで低温を含む様々なストレス耐性が向上する例が複数報告されているがそのほとんどが生育の遅延を同時にもたらす。筆者らの研究チームが過去に報告した、耐冷性品種にみられた反復配列の低温ストレスへの応答の低さは遺伝子でも見られた。耐冷性品種が示す、'低温鈍感力' とも呼べる低温ストレスに対する応答の低さを解明することは、穂ばらみ期耐冷性品種を育成するにあたって新たな戦略を提供できる。また、本研究を通して、穂ばらみ期耐冷性と発現パターンが顕著な相関関係を示す 100 以上の遺伝子を選抜しており、それらのほとんどはこれまでに穂ばらみ期耐冷性との関連が示されていない。これらの穂ばらみ期耐冷性候補遺伝子に注目することで、低温鈍感力をもたらす仕組みの解明に期待する。

博士論文目次

第1章 緒言

第2章 多様なイネ品種における穂ばらみ期の低温による葯形態変化と花粉稔性の関係性

緒論

材料および方法

植物材料

花粉稔性の調査

葯の横断切片の作成

葯長と花粉粒数の測定

結果

13 品種における花粉稔性の比較

穂ばらみ期と開花期における葯の形態的異常

穂ばらみ期と開花期に発生する葯の異常構造の関連性

葯長と花粉稔性との相関関係

低温処理による葯の外部形態変化

葯内部における異常構造の局在

低温処理による花粉粒数の変化

考察

低温による花粉不稔とタペート肥大の関係の再定義

葯室の異常構造が葯において局在する意義

花粉不稔と LRA との関連性

新たに考えられた低温ストレスによる形態的な変化と不稔花粉の関係

葯室の異常の考えられるメカニズム

第3章 イネの葉と葯のゲノムにおけるヒストン H3K9 のメチル化修飾パターンの比較解析

緒論

材料および方法

植物材料とその育成

クロマチン免疫沈降

シーケンシング

ChIP-seq 解析

マイクロアレイ解析

結果

ショートリードのマッピングと分布

ゲノム構造と H3K9me2 の分布の関係

反復配列の種類における H3K9me2 の分布頻度

葯と葉における H3K9me2 の分布の比較

H3K9me2 による反復配列の発現抑制

反復配列へのヒストン修飾を介した遺伝子発現制御

考察

イネゲノムにおける H3K9me2 修飾パターン

葯と葉における反復配列の H3K9me2 修飾パターンの違い

第4章 多様なイネ品種を用いた穂ばらみ期のトランスクリプトーム解析と低温鈍感力

緒論

材料および方法

植物材料

花粉稔性の調査

マイクロアレイプローブのデザイン

マイクロアレイ解析

RNA-seq

遺伝子のアノテーションおよび GO 解析

結果

マイクロアレイに供試したイネ 14 品種の花粉稔性

マイクロアレイ解析による品種間の発現変動

2つのタイプの DEG における品種間の共通性

遺伝子の発現変動パターンと花粉稔性低下率の相関

低温条件下における花粉稔性と遺伝子発現量の相関

マイクロアレイ解析と RNA-seq 解析の等価性

RNA-seq 解析を用いた低温関連遺伝子の検証

発現変動と耐冷性の関係の検証

低温条件下における花粉稔性と遺伝子発現量の相関関係の検証

考察

穂ばらみ期のイネの葯で普遍的に低温に応答する因子

耐冷性と低温応答性の関係

低温鈍感力と耐冷性の関係

第5章 総合討論

引用

摘要

謝辞