



|                     |   |
|---------------------|---|
| 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   |
| Author(s)           | 山森, 晃一  |
| Degree Grantor      | 北海道大学   |
| Degree Name         | 博士(農学)  |
| Dissertation Number | 甲第14811号  |
| Issue Date          | 2022-03-24  |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14811">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14811</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/94646">https://hdl.handle.net/2115/94646</a>               |
| Type                | doctoral thesis   |
| File Information    | Yamamori_Koichi.pdf   |



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

北海道大学 大学院農学院

生産フロンティアコース 博士後期課程

山 森 晃 一

## 目次

|   |    |
|---|----|
| <b>第1章 緒言</b> . . . . .                             | 5  |
| <b>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</b>     |    |
| <u>緒論</u> . . . . .                                 | 7  |
| <u>材料および方法</u> . . . . .                            | 9  |
| 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  |    |
| <u>結果</u> . . . . .                                 | 13 |
| 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                                      |    |
| <u>考察</u> . . . . .                                 | 31 |
| 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 との関係性                                     |    |
| 新たに考えらえ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                                    |    |
| <b>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</b> |    |
| <u>緒論</u> . . . . .                                 | 35 |
| <u>材料および方法</u> . . . . .                            | 36 |
| 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   |    |

|  |    |
|--|----|
| <u>結果</u> . . . . .                              | 39 |
| 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                          |    |
| <u>考察</u> . . . . .                              | 56 |
| 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                   |    |
| <br>   |    |
| <b>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</b> |    |
| <u>緒論</u> . . . . .                              | 59 |
| <u>材料および方法</u> . . . . .                         | 61 |
| 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                             |    |
| <u>結果</u> . . . . .                              | 66 |
| 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                     |    |
| <u>考察</u> . . . . .                              | 94 |
| 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 | 99  |
| 引用         | 102 |
| 摘要         | 117 |
| 謝辞         | 119 |

## 第1章 緒言

イネ (*Oryza sativa* L.) は熱帯、亜熱帯原産の植物で、一般的に低温ストレスに弱い。特に花粉発達の初期段階である穂ばらみ期は低温ストレスの感受性が高く、穂ばらみ期の低温は花粉の発達において不可逆的なダメージを与える (Satake, 1976)。Hayase ら (1969) は雌性器官のめしべよりも雄性器官の葯において生育障害が起こりやすいことを報告しており、穂ばらみ期の低温によって子実の不稔が生じることを障害型冷害と呼ぶが、この主要な原因は花粉の不稔である。日本のコメ生産量の約 1/3 が寒冷地の東北と北海道の作付けに由来する (農林水産統計 2018 [http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou\\_kome/attach/pdf/index-60.pdf](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/attach/pdf/index-60.pdf))。これらの地域の水稻品種では、障害型冷害への耐性が備えるべき形質と考えられている。近年、地球温暖化による気温上昇が叫ばれており、地球温暖化による異常気象の増加は農作物への深刻な影響が危惧されている (Cai et al., 2015; Leng, 2018)。しかし、気温上昇は一年を通して一様ではなく、特に夏の気温上昇は小さいことが報告されている (下野 2012)。このように、地球温暖化が進行しても障害型冷害は完全になくならないといわれており、穂ばらみ期耐冷性に関わる研究はいまだに重要な課題である (下野 2018)。

障害型冷害の発生は収量の低下に直結するため、これまで多くの研究が行われている。その中でも 1943 年に Sakai が報告したタペート肥大と不稔花粉の関係は、長年にわたって障害型冷害が発生する原因とされてきた。タペート層は葯室の最も内側に存在し、小孢子へ同化産物を供給する働きを持つ。Sakai は 1943 年に穂ばらみ期の低温によってタペート層が肥大すること (タペート肥大) が、不稔花粉発生の原因であると主張した。この報告を受け、Nishiyama (1970, 1976) は葯の内部構造観察を通して酒井の主張を検証しつつ、タペート肥大を丘状、炎状、風船状の 3 つに分類した。2000 年代にはいると、イネのタペート肥大に関する分子生物学的な研究が進められた。Oliver ら (2005) は *OSINV4* と呼ばれるインベルターゼの活性と耐冷性の関係を示唆した。この *OSINV4* は葉で合成されたショ糖を分解し、小孢子へ輸送する働きを持ち、*OSINV4* の活性が低温によって低下すると、デンプンがタペート層に蓄積する。障害型冷害の一連の研究は、タペート肥大を障害型冷害の原因と関連付けて行われた。一方、Nishiyama (1970) や Suzuki (1978) はタペート肥大の発生率が障害型冷害の葯形態異常の割合として高くないことから、それだけが障害型冷害の直接的原因ではないことも示唆していたが、それを明言できる証拠は提示されていない。障害型冷害に関しては、複数の量的遺伝子座 (QTL) が同定されているが、詳細な分子メカニズムのほとんどが未解明である (Andaya & Mackill, 2003; Dai et al., 2004; Endo et al., 2016; Kuroki et al., 2007; 黒木ら., 2011; Li et al., 1997; Li et al., 2021; Oh et al., 2004; Saito et al., 2001, 2010; Shimono et al., 2016; Shirasawa et al., 2012; Suh et al., 2010; Sun et al., 2019; Takeuchi et al., 2001; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2017; Zhu et al., 2015)。

イネの穂ばらみ期における低温応答に限らず、植物のストレス応答メカニズムは複雑であり、様々な物質や遺伝子の相互作用によって成り立っている。植物の分子的な低温応答はまず、低温ストレスによる細胞膜の硬化や ROS (活性酸素種 : Reactive Oxygen Species) の発生などの細胞への生理的なダメージを引き金として起こる (Ding et al., 2019)。低温ストレス応答には  $Ca^{2+}$  や ABA といった様々な物質がシグナル伝達に用いられ、それぞれに異なった応答カスケードが存在することが示唆されている (Guo et al., 2019)。シグナル伝達物質は、*DREB* や *NAC* などの転写因子の発現を誘導し、下流の遺伝子発現を制御することで低温耐性を誘導することが知られている (Zhang et al., 2013)。一方、*DREB* などのストレス応答性転写因子は高発現によって耐性を誘導すると同時に、恒常的な過剰発現は生育の遅延をもたらすことが多く、植物のストレス耐性の完全な制御は実現していない (Liu et al., 1998; Moon et al., 2019; Nakashima et al., 2007; Takasaki et al., 2010)。そのため、植物のストレス応答の理解と制御には、従来の研究とは異なったアプローチが必要である。

生物のゲノムには遺伝子だけでなく、トランスポゾンなどの反復配列が含まれており、反復配列もストレス応答に関わることが知られている (Hou et al., 2021; Mao et al., 2015)。反復配列は通常時、エピジェネティックな制御により発現が抑制されている (Lisch, 2009)。しかし、McClintock (1984) はストレスに応答して反復配列の抑制が解除されることを提唱し、実際にストレスに対して応答する反復配列がトウモロコシ、シロイヌナズナおよびキンギョソウなど、複数の植物種で報告されている (Hu et al., 2012; Ito et al., 2011; Zhou et al., 2017)。これらの報告を受け、先行研究では、低温処理を行った穂ばらみ期のイネの葍において、反復配列由来のプローブを搭載したマイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を行った (Ishiguro et al., 2014)。その結果、低温処理による反復配列の発現変動は、ほしのゆめなどの低温耐性品種よりも、日本晴のような低温感受性品種で多くみられた。この結果から、特定の反復配列において耐冷性品種が示す低温に対する発現変動の小さい形質を '低温鈍感力' と呼び、低温鈍感力が耐冷性と関係しているという仮説が立てられた (石黒 2015)。

反復配列のほとんどはエピジェネティックな制御によって発現が抑制されており、具体的な制御機構としては、DNA のメチル化やクロマチン修飾があげられる (Lisch, 2009)。特に、クロマチン修飾のうち、ヒストン H3 タンパク質の 9 番目のリジンにおけるジメチル化 (H3K9me2) は反復配列の抑制マークとして知られ、ヘテロクロマチンの形成に関わっていることが知られている (Richards & Elgin, 2002)。H3K9me2 による反復配列の抑制は、転移因子の転移による変異を防ぐ役割がある (Yong Ding et al., 2007; Qin et al., 2010)。それ以外にも、クロマチン修飾の可塑性が、植物細胞の分化に関わっていることが分かっている (Baroux & Autran, 2015; Pecinka et al., 2020; S. Zhang et al., 2021)。特にイネの雄性配偶子形成においては、H3K9me2 修飾のゲノム全体での増加が小胞子における正常な減数分裂に必要であることが示されている (Liu & Nonomura, 2016)。

本論文では、穂ばらみ期のイネにおける低温ストレスによって花粉形成が攪乱を受ける

反応を理解するために、形態学およびゲノミクス的手法を用いて研究を行った。第 2 章では由来が異なる複数のイネ系統に対して低温処理を行い、パラフィン切片法によって葯の内部構造を観察した。低温処理による花粉稔性低下と葯の内部構造の変化を複数の品種で比較することで、障害型冷害として攪乱を受ける葯の構造を詳細に観察した。第 3 章では穂ばらみ期のイネの葯と生育初期の葉について、H3K9 のメチル化修飾パターンを比較することで生殖細胞と体細胞でのヒストン修飾の違いの一端を明らかにした。葯特異的な反復配列と H3K9me2 の結合パターンを明らかにすることで、Ishiguro ら (2014) が示唆した反復配列の低温応答性と耐冷性の関係の理解につなげる。第 4 章では多様な遺伝的背景を持つ複数のイネ品種に対して低温処理を行い、穂ばらみ期の葯におけるトランスクリプトーム解析を行った。穂ばらみ期の低温処理による攪乱反応を遺伝子の発現変動を指標にして、耐冷性程度が異なる多数の品種でゲノム全体の発現パターンと耐冷性との関連性および関わる遺伝子群の特徴化を行った。

## 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

イネ (*Oryza sativa*) は一般に低温に弱く、葯の内部で花粉が発達する時期にあたる穂ばらみ期に低温にさらされると不稔花粉が多く発生する (Hayase et al., 1969; Satake and Hayase 1970; Satake, 1976). 高緯度地域の寒冷な気候は、イネの花粉の不稔を発生させ米の収量の著しい減収を招く (下野 2018). 穂ばらみ期の低温障害は収量の減少に直結するため、1940年代から 1980年代にかけて、イネの葯の低温ストレスによる障害や形態異常に関する多くの研究が行われてきた (Nishiyama, 1970, 1976; Sakai, 1943; Suzuki 1981). Sakai (1943) は、穂ばらみ期の低温による不稔花粉の発生が、葯壁の最も内側の層にあたるタペート層の肥大と強い関連があることを報告した. タペート層は、花粉が発生する際に栄養分を供給する組織で、花粉の成熟に伴って徐々に退化する (Li et al., 2006; Niu et al., 2013). そのため、古くからタペート層の肥大化が花粉への栄養供給が阻害されていることを示す指標として考えられてきた. Nishiyama (1970, 1976) は、冷温条件下でのタペート層の形態的な変化を観察し、イネの葯において低温ストレスがタペート層の肥大を引き起こすという Sakai の観察 (1943) を確認した. また、低温ストレスによってタペート層に同様の形態異常が見られるという報告も複数ある (Ito, 1978a, b; Nishiyama., 1978; Oda et al., 2010). 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 (Suzuki, 1978).

現在のところ、穂ばらみ期の低温ストレスによるタペート肥大の発生頻度が不稔花粉の発生率を正確に反映しているという明確な証拠は得られていない. イネの葯に対する低温ストレスの影響は、タペート層の超微細構造、スクロースの蓄積、トランスクリプトーム解析、ジベレリン代謝の観点から特徴づけられてきた (Mamun et al., 2006; Nishiyama, 1970; Oda et al., 2010; Oliver et al., 2007; Sakata et al., 2014). これらの研究はいずれも、低温ストレスによるイネの花粉不稔を調べたものであり、それぞれの研究で明らかにされた基礎的なメカニズムによって、不稔花粉の発生を説明できると思われた. しかし、これらの研究では、1つか2つの品種を対象を絞って行われている. 本研究では、多様な遺伝的背景を持つ 13 品種のイネにおいて、穂ばらみ期の低温ストレスが花粉稔性に及ぼす影響を調べた.

## 材料および方法

### 植物材料

本研究で使用した植物材料は、13種類のイネ品種で構成されている。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種を用いた（表2-1）。材料は1つのワグネルポット（1/5000 100 m<sup>2</sup>）に20個体を播種し、分けつを切ることで主幹のみを維持した状態で25/19°C（昼夜サイクル）の温室内で栽培を行った（Satake et al., 1969, Satake 1972）。材料植物が花粉母細胞の減数分裂後、1核期の初期から中期の間にある穂ばらみ期に12°C、4日間の低温処理を行った。穂ばらみ期の時期は、止め葉と止め葉の1つ前に出葉した葉の葉耳の距離である葉耳間長（Auricle Distance: AD）から推定した（Matsushima 1957）。一般に、穂ばらみ期の開始はAD=0~2cmに相当するが、北海道の品種では、AD=-2~-4cmに相当する。低温処理の終了時に、低温処理を受けた植物から葯を採取した。対照として、通常の生育条件で維持された植物の葯を同時に採取した。開花期の葯を採取するために、同じポットに植えられた残りの植物は、低温処理後に温室環境下で栽培を続けた。開花後、低温処理を行った植物と行っていない植物から葯を採取した。すべてのサンプルをFAA（5%ホルムアルデヒド/0.5%酢酸/45%エタノール[v/v/v]）で固定した後、切片の作成、花粉稔性の調査、花粉数および葯長の計測に供試した。

### 花粉稔性の調査

各品種の穂の一次枝梗の先端から3, 4, 5番目の位置にある穎花から葯を採取し、花粉稔性の調査に供試した。花粉粒はルゴールヨウ素（KI-I2）溶液で染色した。この溶液は、稔性のある花粉を強く染色し、不稔花粉は染色されない。花粉稔性は、各品種、各生育条件において、全体の花粉粒数に対する稔性花粉粒数の割合として算出した。花粉稔性は、各品種、生育条件ごとに、少なくとも9個の穎花を調べて平均化した。

### 葯の横断切片の作成

各品種の低温処理した植物と無処理の植物からそれぞれ葯を採取し、パラフィン包埋法による横断切片を作成した。1つの葯から1つの横断切片を作成して観察する実験では、穂ばらみ期では少なくとも40個の葯、開花期では少なくとも13個の葯を用いた。1つの葯から連続的に切片を作成して観察する実験では、穂ばらみ期と開花期の両方で3つの植物から6つの葯を採取し、使用した。FAAで固定された葯をブタノールで脱水した後、ブタノールをパラフィンに置き換えて、葯をパラフィンに包埋した。埋め込んだ試料をマイクロト

ームで7 $\mu$ m厚の切片に切り出し、卵白を用いてスライドガラスに張り付けた。キシレンでパラフィンを除去した後、0.05%トルイジンブルーで染色し、カナダバルサムで密閉した。

#### 葯長と花粉粒数の測定

日本晴、ほしのゆめ、コシヒカリ、T65 および Kasalath の5品種について、各品種、各条件（無処理、低温処理）の少なくとも9個の穎花から得た葯について、各葯の葯長の測定と、花粉粒数の計測を行った。葯長は、VHX-1000 デジタルマイクロスコープ（キーエンス、大阪、日本）を用いて、各葯の両端と中心の3点間距離を用いて測定した。花粉数は、葯を粉碎し、ルゴールのヨウ素溶液で染色した後、染血球計算板（エルマ、東京、日本）を用いて計測した。

表2-1. 本研究に供試した品種

| 品種名         | <i>Sub. Species</i>       |
|-------------|---------------------------|
| 日本晴         | <i>temperate japonica</i> |
| 金南風         | <i>temperate japonica</i> |
| 台中 65 (T65) | <i>temperate japonica</i> |
| ニシホマ        | <i>temperate japonica</i> |
| 富国          | <i>temperate japonica</i> |
| ササニシキ       | <i>temperate japonica</i> |
| 北海287       | <i>temperate japonica</i> |
| シンレイ        | <i>temperate japonica</i> |
| キタアケ        | <i>temperate japonica</i> |
| ほしのゆめ       | <i>temperate japonica</i> |
| Silewah     | <i>tropical japonica</i>  |
| Kasalath    | <i>indica</i>             |

## 結果

### 13 品種における花粉稔性の比較

Nishiyama (1982)は、穎花の穂上の位置によって種子の稔実率が異なることを報告した。花粉稔性が穎花の穂上の位置によって異なるかどうかを検討するために、日本晴とほしのゆめの2品種のイネについて、すべての一枝梗の上位5つの穎花における花粉稔性を調査した(図2-1a)。温室内で正常な生育条件を維持した無処理区の植物と、穂ばらみ期に12°C4日間の低温処理を行った低温処理区の植物の花粉稔性を比較した(図2-1b)。無処理区と処理区の両方で、5つの穎花のうち先端から最初の2つの穎花は、下位3つの穎花に比べて低い花粉稔性を示した(図2-1b)。そこで、本研究では、一次枝梗の上から3、4、5番目の穎花を用いて花粉稔性を調査した。

供試したイネ13品種を12°Cの低温に4日間さらした後、少なくとも15個の穎花について無処理区と低温処理区の花稔性を比較した。その結果、低温処理区における13品種の花稔性は3.9%から77.4%の範囲で連続的な値を示した(図2-1c)。低温処理は一般に花粉の稔性を低下させるが、Silewah、ほしのゆめ、キタアケ、コシヒカリの各品種は他の9品種よりも低温処理に耐性があるように見えた。

### 穂ばらみ期と開花期における葯の形態的異常

穂ばらみ期の葯から横断切片を作成し、無処理区と低温処理区の植物の間で葯の内部構造の形態を調べ、比較した。図2-2a,b-1に、穂ばらみ期の正常な葯の横断面を示した。低温にさらした13品種から少なくとも40個の葯を採取し、これらの葯の横断切片(1つの葯につき1切片)を正常な葯の形態と比較した。その結果、無処理区と低温処理区の両方の切片で、葯室の内部構造に複数種類の異常が観察され、葯室にみられる異常構造をLRA(Locule-Related Abnormalities)と定義した。タペート肥大のほか、LRAに分類される異常としては、タペート層剥離、未発達葯室、空葯室があった(図2-2b)。タペート層剥離は、葯室からタペート層が部分的に剥離していることを特徴とする。また、未発達葯室は成熟前に発育が停止し、葯胞内が空胞化していないもの、空葯室は葯室が潰れて小胞子が退化したものと定義した。13品種の無処理区と低温処理区の横断面を比較した結果、LRAの発生率は低温処理直後に増加し、特にいくつかの低温感受性品種で顕著であった(図2-2c)。

無処理区の植物から採取した穂ばらみ期の葯では、そのほとんどで正常な構造が観察されたが、すべての品種においていくつかのLRAが観察された。無処理区の葯から作成した横断切片のうち、13品種の平均で17.7%に何らかの異常構造が観察されたのに対し、低温処理区では24.4%の切片に何らかの異常構造がみられた(表2-2)。無処理区における花粉稔性が最も低かった金南風とニシホマレの2品種では、無処理区における花粉稔性がそれぞれ58%と75%で、無処理条件下でも半数近くの葯で異常な構造がみられた(図2-2c)。

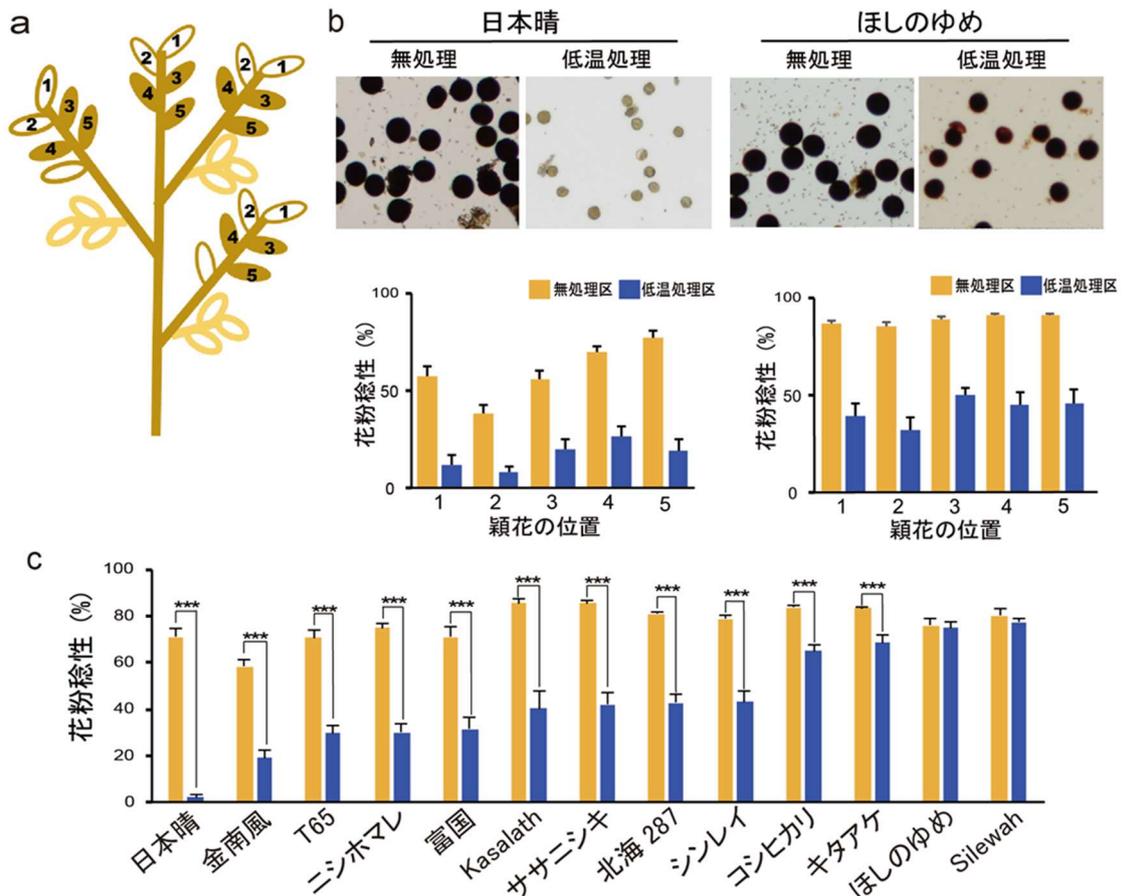


図2-1. 13品種のイネにおける花粉稔性の評価。(a) 花粉稔性を調べるために使用したえい花の位置。(b) 一次枝梗の位置ごとで花粉稔性を比較した。上段：日本晴およびほしのゆめの無処理区と低温処理区の花粉をKI-I2溶液で染色した写真を例として示した。下段：5つのえい花の位置ごとにおける、日本晴とほしのゆめの花粉稔性を示した。無処理区での結果を黄色、低温処理区での結果を青色で示した。エラーバーは標準誤差を表す。(c) 選抜された13品種花粉稔性を調べ、無処理区における結果を黄色、低温処理区における結果を青で示した。各品種および処理区について、15個以上のえい花について調査し、スチューデントのT検定による統計的有意差を示した (\*\*\*) $p < 0.001$ 。

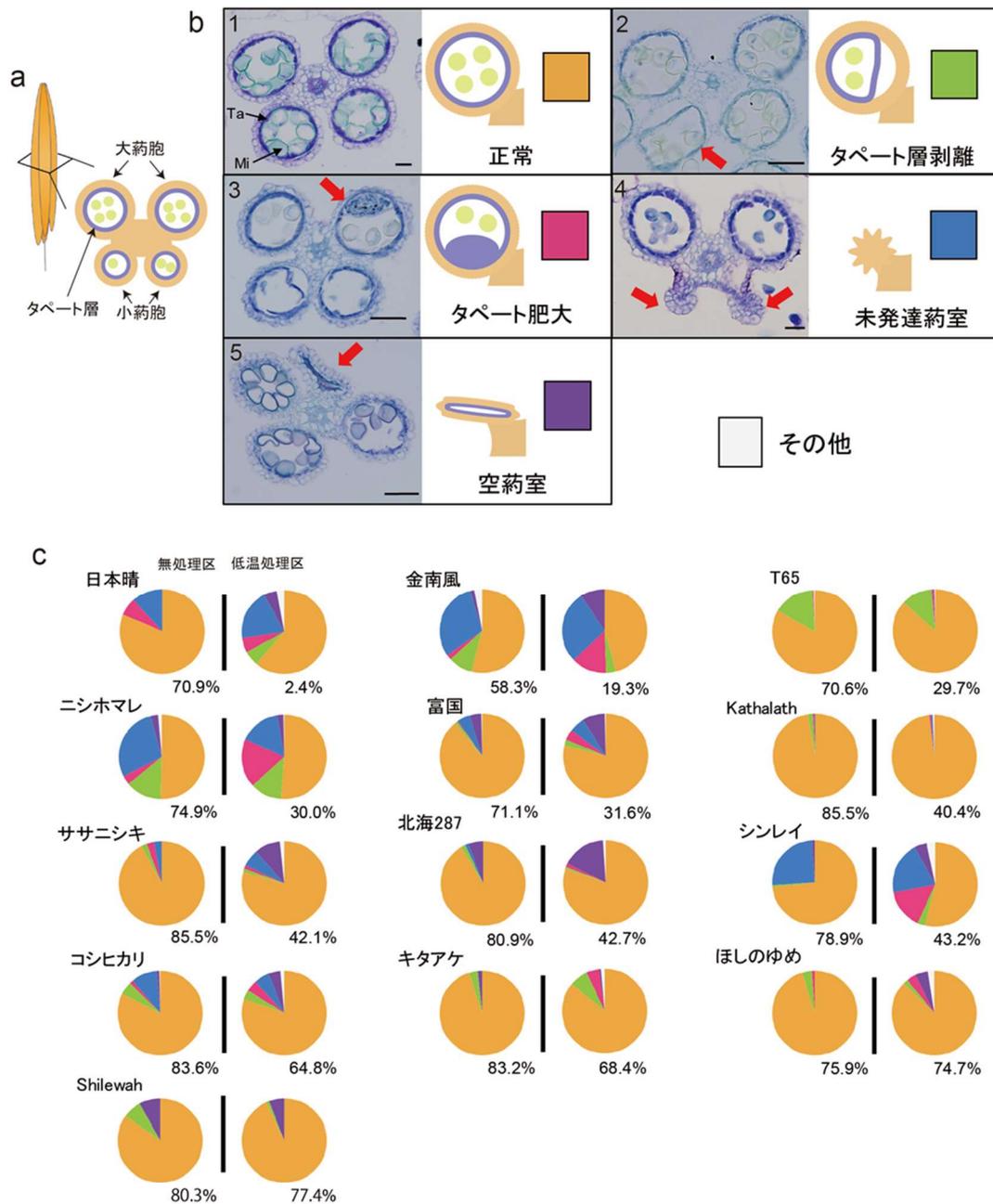


図2-2. 穂ばらみ期の葯の形態の分類. (a) 葯の構造を示す模式図. 左: 葯全体. 右: 2つの大葯胞と2つの小葯胞を示す葯の断面. タペート層(紫色)は、葯の最内層に位置する. (b) 本研究で定義された穂ばらみ期の5つの葯の内部構造を示した. 1: 正常な構造(オレンジ), 2: タペート層剥離(緑), 3: タペート肥大(赤), 4: 未発達葯室(青), 5: 空葯室(茶). 赤い矢印は異常な葯室を示した. 黒いバーは50 $\mu$ mを示す. Ta: タペート層, Mi: 小胞子. (c) 13品種それぞれにおいて、無処理区(左)と低温処理区(右)の5つの葯の構造の割合を円グラフで示した. 各円グラフの下のパーセンテージは、図1cに示した花粉稔性を示した. 葯の構造は、パネルbで定義した色で示した. 上記の5つの構造のいずれにも属さないサンプルは白(その他)で示した.

各異常葯構造の相対的な頻度は、それぞれの品種で異なっていた。例えば、T65 とニシホマレではタペート層剥離が優占的に見られ、日本晴、金南風、ニシホマレ、シンレイ、コシヒカリでは未発達葯室が主要な異常構造であった。また、金南風、富国、ササニシキ、北海 287 号、シンレイ、ほしのゆめの低温処理区の葯では、空葯室が頻繁に観察された。金南風、ニシホマレ、シンレイ、キタアケの低温処理区の葯では、タペート肥大が優先的に検出された。一般的に、タペート肥大が穂ばらみ期の低温ストレスによる花粉不稔の主な原因であると考えられているが、タペート肥大の発生率は低温処理サンプル全体の 6%にとどまった (表 2-2)。タペート肥大が最も高い頻度で観察されたのは低温感受性品種であるニシホマレだったが、その頻度は 18.6%であった (表 2-2, 図 2-2c)。これらの結果から、低温ストレス下におけるタペートの形態と稔性の関係は、従来考えられていた以上に複雑であることが示唆された。

各品種において、無処理区から採取した 15 本の葯と低温処理区の植物から採取した 13 本の葯を用いて、開花前の葯における横断切片観察を行った。開花期の正常な葯の切片では、タペート層の消失が確認された (図 2-3a, b-1)。前章と同様に、葯室の異常構造は 4 つに分類された。開花期における LRA は、穂ばらみ期にもみられた未発達葯室と空葯室に加えて 2 種類の異常が新たに観察され、それぞれタペート変性遅延 (*tdr*: tapetum degeneration retardation) 様葯室と小葯室と名付けた (図 2-3b)。イネ *TDR* 遺伝子の変異体は雄性不稔であり、通常は開花期までに起こるタペートの分解が遅延し、その結果、穂ばらみ期にタペートが肥大するような形態を示す (Li et al., 2006)。過去に報告された *tdr* 様の表現型は、本研究でも開花期の葯室で見られた (図 2-3b-2)。小葯室は葯室内の空間が極端に小さいのが特徴で、これにより小胞子の発生が阻止されていることが考えられる (図 2-3b-3)。

葯の異常構造は、低温処理区の葯の方が無処理区よりも多く見られた (図 2-3c, 表 2-3)。しかし、Silewah, ほしのゆめ, キタアケ, Kasalath, T65 では、いずれのサンプルにも異常構造は見られなかった。興味深いことに、このグループには、低温感受性 2 品種 (Kasalath と T65) と、低温耐性 3 品種 (Silewah, ほしのゆめおよび、キタアケ) が含まれていた。また、他の 8 品種 (日本晴, 金南風, ニシホマレ, 富国, ササニシキ, 北海 287, シンレイ, コシヒカリ) では、空葯室が主要な葯の異常形態であった。低温感受性品種では、*tdr* 様葯室が出現することがあったが、これらの品種の無処理区の葯でも *tdr* 様葯室が発生しており、低温処理の影響は明らかではなかった。

観察された異常葯構造と花粉不稔の発生との関係を調べるために、各品種の花粉末稔性と異常構造の発生率との相関を調査した。無処理区および低温処理区のサンプルともに、13 品種の穂ばらみ期における花粉の稔性と異常構造の総数との間に負の相関関係 (ピアソンの相関係数  $r = -0.6$ ) が得られた (図 2-4a)。しかし、異常構造の種類によって花粉稔性との相関の度合いは異なり、 $-0.64$  から  $0.03$  の範囲の値を示した。穂ばらみ期に観察された 4 種類の葯室の異常構造のうち、低温処理区における未発達葯室の発生率は、13 品種の花粉末稔性と負の相関があり、 $r = -0.64$  であった。一方、低温条件区におけるタペート肥大の発

表2-2 13品種の無処理および低温処理サンプルにおける6つの葯内部構造の発生率の平均値(穂ばらみ期)

| 葯構造の種類   | 無処理区                 |                 |                    | 低温処理区                |                 |                    |
|----------|----------------------|-----------------|--------------------|----------------------|-----------------|--------------------|
|          | Ave (%) <sup>a</sup> | SD <sup>b</sup> | Range <sup>c</sup> | Ave (%) <sup>a</sup> | SD <sup>b</sup> | Range <sup>c</sup> |
| 正常       | 82.31                | 14.37           | 50.3 - 97.3        | 75.57                | 16.23           | 45.7 - 98.2        |
| LRA      | 17.69                | 85.63           | 2.7 - 49.7         | 24.43                | 83.77           | 1.8 - 54.3         |
| 穂ばらみ期    |                      |                 |                    |                      |                 |                    |
| -タペート層剝離 | 5.00                 | 4.86            | 0 - 15.8           | 4.15                 | 3.82            | 0 - 12.1           |
| -タペート肥大  | 1.44                 | 1.86            | 0 - 6.7            | 5.67                 | 5.87            | 0 - 18.6           |
| -未発達葯室   | 8.81                 | 11.12           | 0 - 30.2           | 7.83                 | 9.26            | 0 - 27.8           |
| -空葯室     | 2.02                 | 2.46            | 0 - 8.0            | 5.58                 | 4.45            | 0 - 16.6           |
| -その他     | 0.42                 | 0.82            | 0 - 3.0            | 1.20                 | 1.04            | 0 - 3.3            |

a: Ave(%):13品種における発生率の平均値 b: SD: 標準偏差. c: Range: 13品種のうち最小値-最大値

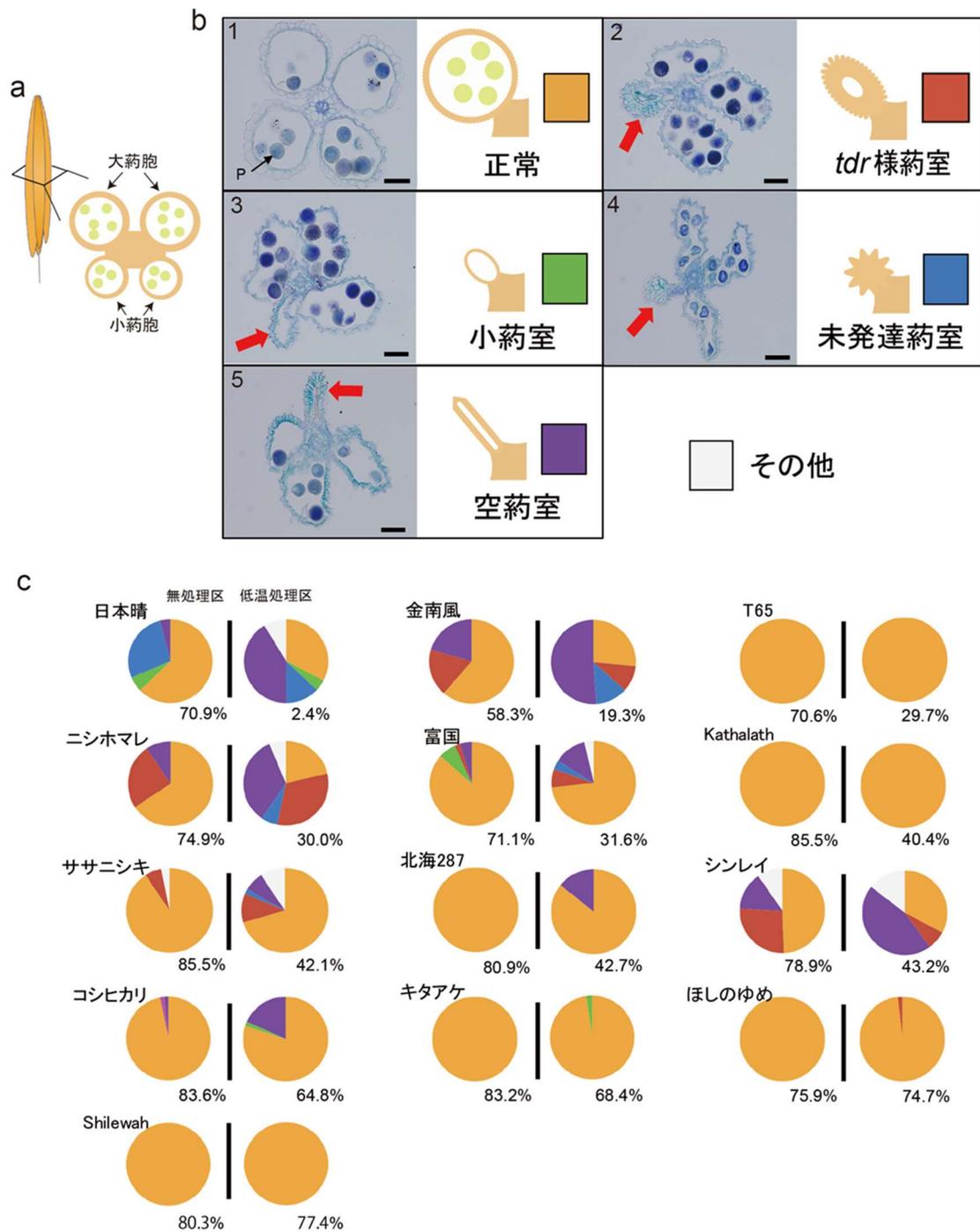


図2-3. 開花期の葯の形態の分類. (a) 葯の構造を示す模式図. 左: 葯全体. 右: 2つの大薬胞と2つの小薬胞を示す葯の断面. 開花期ではタペト層が退化している. (b) 本研究で定義された開花期の5つの葯の内部構造を示した. 1: 正常な構造(オレンジ), 2: *tdr*様薬室(茶色), 3: 小薬室(緑), 4: 未発達薬室(青), 5: 空薬室(紫). 赤い矢印は異常な葯室を示した. 黒いバーは50 $\mu$ mを示す. P: 花粉. (c) 13品種それぞれにおいて, 無処理区(左)と低温処理区(右)の5つの葯の構造の割合を円グラフで示した. 各円グラフの下のパーセンテージは, 図1cに示した花粉稔性を示した. 葯の構造は, パネルbで定義した色で示した. 上記の5つの構造のいずれにも属さないサンプルは白(その他)で示した.

表2-3 13品種の無処理および低温処理サンプルにおける6つの薬内部構造の発生率の平均値 (開花期)

|     | 薬構造の種類           | 無処理区                 |                 |                    | 低温処理区                |                 |                    |
|-----|------------------|----------------------|-----------------|--------------------|----------------------|-----------------|--------------------|
|     |                  | Ave (%) <sup>a</sup> | SD <sup>b</sup> | Range <sup>c</sup> | Ave (%) <sup>a</sup> | SD <sup>b</sup> | Range <sup>c</sup> |
| 開花期 | 正常               | 86.75                | 16.09           | 61.4 - 100.0       | 70.65                | 29.96           | 21.3 - 100.0       |
|     | LRA              | 13.25                | 83.91           | 0.0 - 38.6         | 29.35                | 70.04           | 0.0 - 78.7         |
|     | - <i>tdr</i> 様薬室 | 6.74                 | 11.07           | 0 - 34.4           | 5.34                 | 8.70            | 0 - 31.9           |
|     | -小薬室             | 0.97                 | 2.27            | 0 - 6.7            | 0.64                 | 1.29            | 0 - 4.3            |
|     | -未発達薬室           | 2.11                 | 7.31            | 0 - 27.5           | 2.85                 | 4.57            | 0 - 13.0           |
|     | -空薬室             | 4.50                 | 6.97            | 0 - 20.5           | 17.26                | 18.43           | 0 - 51.0           |
|     | -その他             | 1.20                 | 3.37            | 0 - 12.5           | 3.27                 | 4.70            | 0 - 14.5           |

a: Ave(%):13品種における発生率の平均値 b: SD: 標準偏差. c: Range: 13品種のうち最小値-最大値

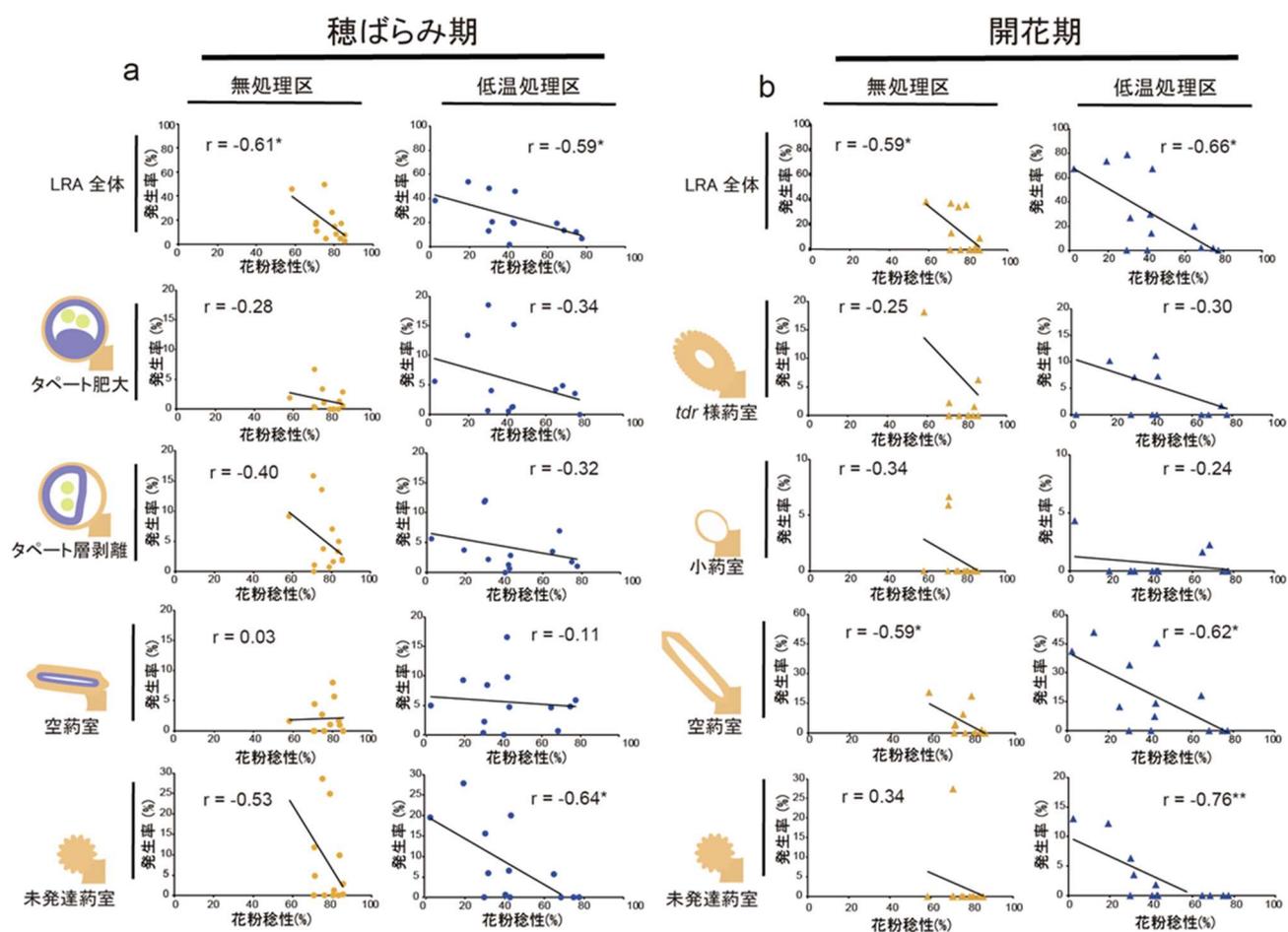


図2-4. 葯の異常構造と花粉稔性との関係. (a, b) 13品種の穂ばらみ期(a)と開花期(b)における, 無処理区と低温処理区の花粉稔性と各異常構造の発生率の関係を散布図で示した. 各パネルにはピアソンの相関係数( $r$ )が示されている. 相関係数と合わせてスチューデントのT検定で判定した相関関係の有意性を示した (\* $p < 0.05$ および\*\* $p < 0.01$ ).

生率は、花粉稔性との間に顕著な相関関係を見いだせなかった ( $r = -0.34$ ).

開花期においても、13 品種の異常葯室の発生率は花粉稔性と負の相関を示し、無処理区のサンプルの葯ではピアソンの相関係数  $r = -0.59$ 、低温処理区のサンプルの葯では  $r = -0.66$  となった (図 2-4b). 無処理区における花粉稔性と 4 つの構造の発生率との間で計算されたピアソンの相関係数のうち、空葯室の発生率が最も強い相関を示した ( $r = -0.59$ ). また、低温処理区では、空葯室と未発達葯室の発生率も花粉稔性に対して有意な相関を示し、それぞれ  $r = -0.62$  ( $p < 0.05$ ),  $-0.76$  ( $p < 0.01$ ) となった.

### 穂ばらみ期と開花期に発生する葯の異常構造の関連性

供試した 13 品種について、穂ばらみ期と開花期それぞれで観察された LRA の発生に関連性があるかどうかを調べた (図 2-5a). 観察された LRA それぞれについて、各品種の穂ばらみ期における発生率を X 軸、開花期における発生率を Y 軸にとってプロットし、相関関係を調査した. 図 2-5a に、2 つのステージにおける異常な葯室構造間の 16 個の組み合わせから得られたすべてのピアソンの相関係数をまとめた. 最も強い相関が見られたのは、穂ばらみ期の未発達葯室と開花期の空葯室の間であり (未発達葯室/空葯室,  $r = 0.96$ ), 次いで、タペート肥大と空葯室 ( $r = 0.80$ ), 未発達葯室と未発達葯室 ( $r = 0.80$ ), タペート肥大と *tdr* 様葯室 ( $r = 0.75$ ) の順であった (図 2-5b). これらの結果から、穂ばらみ期の未発達葯室は開花期にも未発達葯室のままであるか空葯室の発生に関与している可能性があり、タペート肥大は開花期に *tdr* 様葯室か空葯室に分化する可能性が示唆された (図 2-5c). これらの相関関係から、穂ばらみ期で発生したタペート肥大や未発達葯室は開花期までの間で修正されず、開花期でみられる異常構造の発生の原因となることが示唆された. 一方、穂ばらみ期でのタペート層剥離や空葯室は、開花ステージでの異常構造の発生にはほとんど影響しないことが予想された.

### 葯長と花粉稔性との相関関係

複数の品種において、低温処理区における葯長は無処理区に比べて短くなる傾向が見られた (図 2-6a). 特に、キタアケ、コシヒカリ、北海 287, Kasalath, T65, 金南風の 6 品種では、無処理区と低温処理区の間で有意な差が見られた. また、低温処理した 13 品種において、葯長と花粉稔性との間に有意な相関関係 ( $r = 0.65$ ) が認められ (図 2-6b), この正の相関関係は、無処理植物から採取したサンプルでもみられた ( $r = 0.53$ ) (図 2-6c). この結果は、低温処理の有無にかかわらず、葯長と花粉稔性には相関があることを示唆している. 葯長と花粉稔性の相関は、無処理植物と低温処理したサンプルを合わせると、 $r = 0.57$  ( $p < 0.001$ ) であった (図 2-6d). しかし、低温ストレスによる花粉稔性の低下度合いと葯長の縮小程度には相関が見られなかった (図 2-6e). したがって、花粉稔性に大きく影響するの

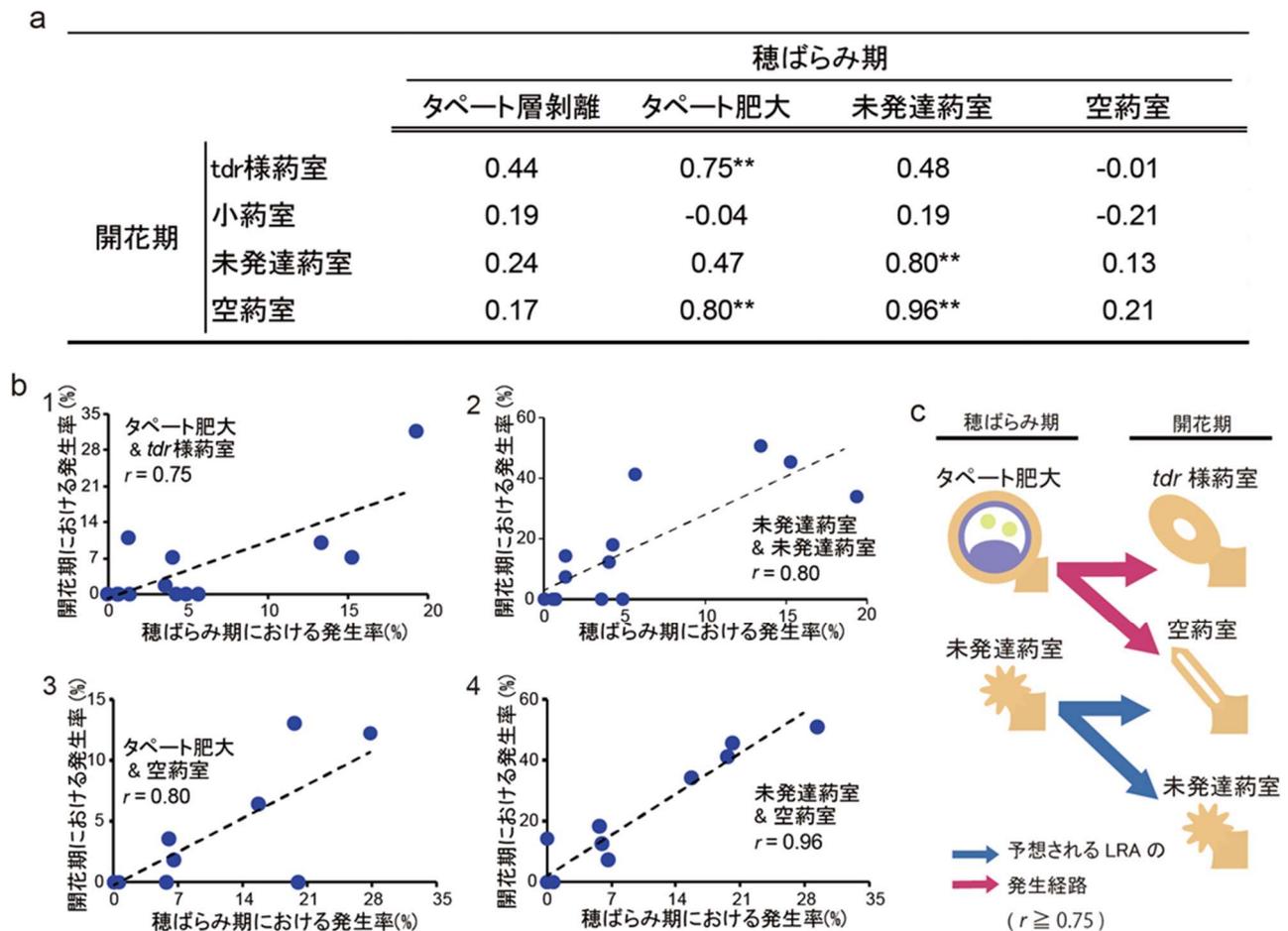


図2-5. 穂ばらみ期と開花期における薬の異常構造の相関関係. (a) 13品種における開花期と穂ばらみ期の薬の異常構造の組み合わせ全16パターンピアソンの相関係数( $r$ ). スチューデントのT検定で相関の有意性を判定した (\*\* $p < 0.01$ ). (b) 4つの有意な相関関係を散布図で示した. 1: タペート肥大とtdr様薬室, 2: 未発達薬室と未発達薬室, 3: タペート肥大と空薬室, 4: 未発達薬室と空薬室. (c) 穂ばらみ期から開花期にかけての異常構造の発生上のつながりを模式的に表したもの.

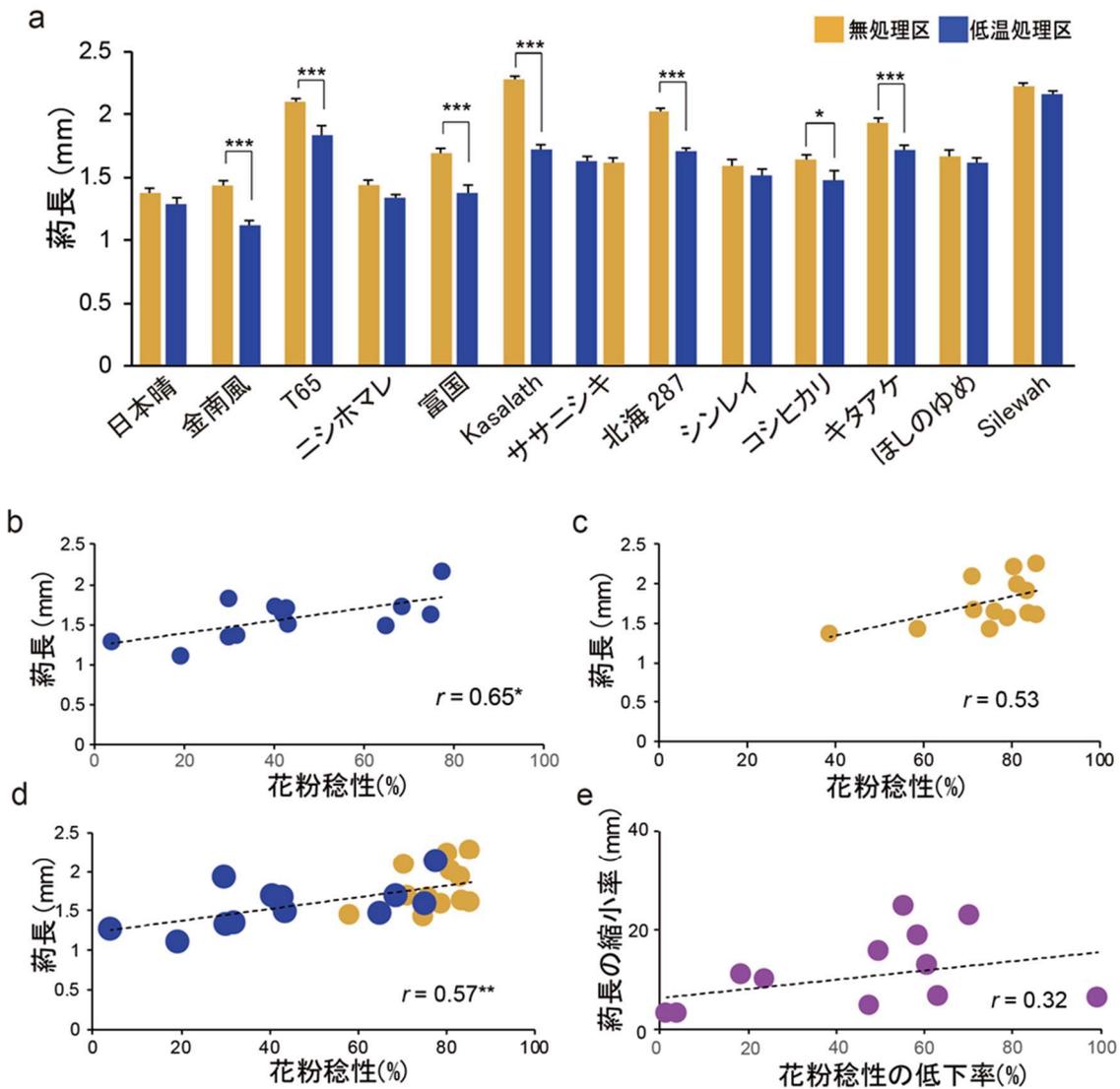


図2-6. 試験した13品種における葯の長さや花粉の稔性との相関。(a) 13品種における無処理区での葯長を黄色、低温処理区での葯長を青で示した。エラーバーは標準誤差を示す。各品種において、処理区間の葯長の差の有意性をスチューデントのT検定で調査した(\* $p < 0.05$  および \*\*\* $p < 0.001$ )。 (b, c) 低温処理区(b)と無処理区(c)における花粉稔性と葯の長さの相関関係を示し、ピアソンの相関係数 $r$ を求めた。相関関係の有意性をスチューデントのT検定で調査した(\* $p < 0.05$ )。 (d) 全ての処理区における花粉稔性と葯の長さの相関関係を示した。ピアソンの相関係数 $r$ を求め、相関関係の有意性をスチューデントのT検定で調査した(\* $p < 0.01$ )。 (e) 低温処理による花粉稔性の低下率と葯の萎縮率の相関関係を示した。

は、葯の縮小の程度ではなく、葯長であることがわかった。

LRA の発生率も葯長と関連が示され、穂ばらみ期および開花期における LRA の発生率と葯長の間には、それぞれ  $r = -0.78$  および  $r = -0.79$  と、負の相関関係にあった (図 2-7a)。無処理区においても、同様の負の相関関係が開花期および穂ばらみ期に見られた (図 2-7b)。特に、穂ばらみ期では未発達葯室とタペート肥大が葯長と有意な相関を示し ( $r < -0.65$ )、開花期では未発達葯室と空葯室が葯長と有意な相関を示した ( $r < -0.75$ ) (図 2-7c,d)。

### 低温処理による葯の外部形態変化

これまでの観察に供試した 13 品種から、5 品種 (日本晴, ほしのゆめ, T65, Kasalath, コシヒカリ) を選んで、連続切片による葯全体の形態観察を行った。これらの品種のうち、日本晴は特に低温感受性品種、ほしのゆめは耐冷性品種、残りの 3 品種は中間的な耐性を示す品種である。前章の結果から、T65 と Kasalath は、無処理区と低温処理区の両方で、穂ばらみ期でも開花期でもほとんどの葯で異常構造がみられなかったが、同様に異常構造の発生率が少ない Silewah やほしのゆめなどの他の品種に比べて、低温処理区の花粉稔性が相対的に低かった。また、コシヒカリは一般に耐冷性があるとされているが、前章の結果から、葯の構造異常の割合が相対的に高かったため供試した。これらの品種は、最初に行った実験とは別に育成したものであるため、再度、花粉稔性を測定した (図 2-8a)。これら 5 品種の結果は、先の実験の結果とほぼ一致した。一部例外的に、本実験において日本晴は Kasalath よりも低温処理後の花粉稔性が高かったが、前章の結果では Kasalath は日本晴よりも低温処理区における花粉稔性が高かった。

実体顕微鏡で葯の外観を観察すると、形は直線的なものと湾曲したものの 2 つに分かれる (図 2-8b)。湾曲した葯は、不稔花粉の発生と関連している傾向がみられたため、この影響を定量化するために、葯の両端と中心の 3 点で構成される葯の角度 ( $\theta$ ) を定義し、計測した (図 2-8c)。耐冷性品種であるほしのゆめでは、無処理区と低温処理区の間で平均的な葯の角度は同等であり、いずれも  $180^\circ$  に近い値を示すような直線形の葯であった。一方、コシヒカリと T65 では、低温にさらされると葯の角度が減少した。興味深いことに、無処理の日本晴の葯は最も湾曲しており、その角度は平均  $143^\circ$  であったが、低温処理によってその角度は平均  $163^\circ$  に増加していた。

### 葯内部における異常構造の局在

葯室全体の内部構造を調べるために、選抜した 5 品種の無処理および低温処理した葯の連続した横断面を作成した。これまでの解析では、1 つの葯から 1 つの横断面を作成していた。しかし、1 つの葯の中で、端から端まで均一な形態を示すわけではなく、葯の部位によってさまざまな形態を示すことが予想される。そこで、葯の先端から基部まで  $7\mu\text{m}$  ごとに

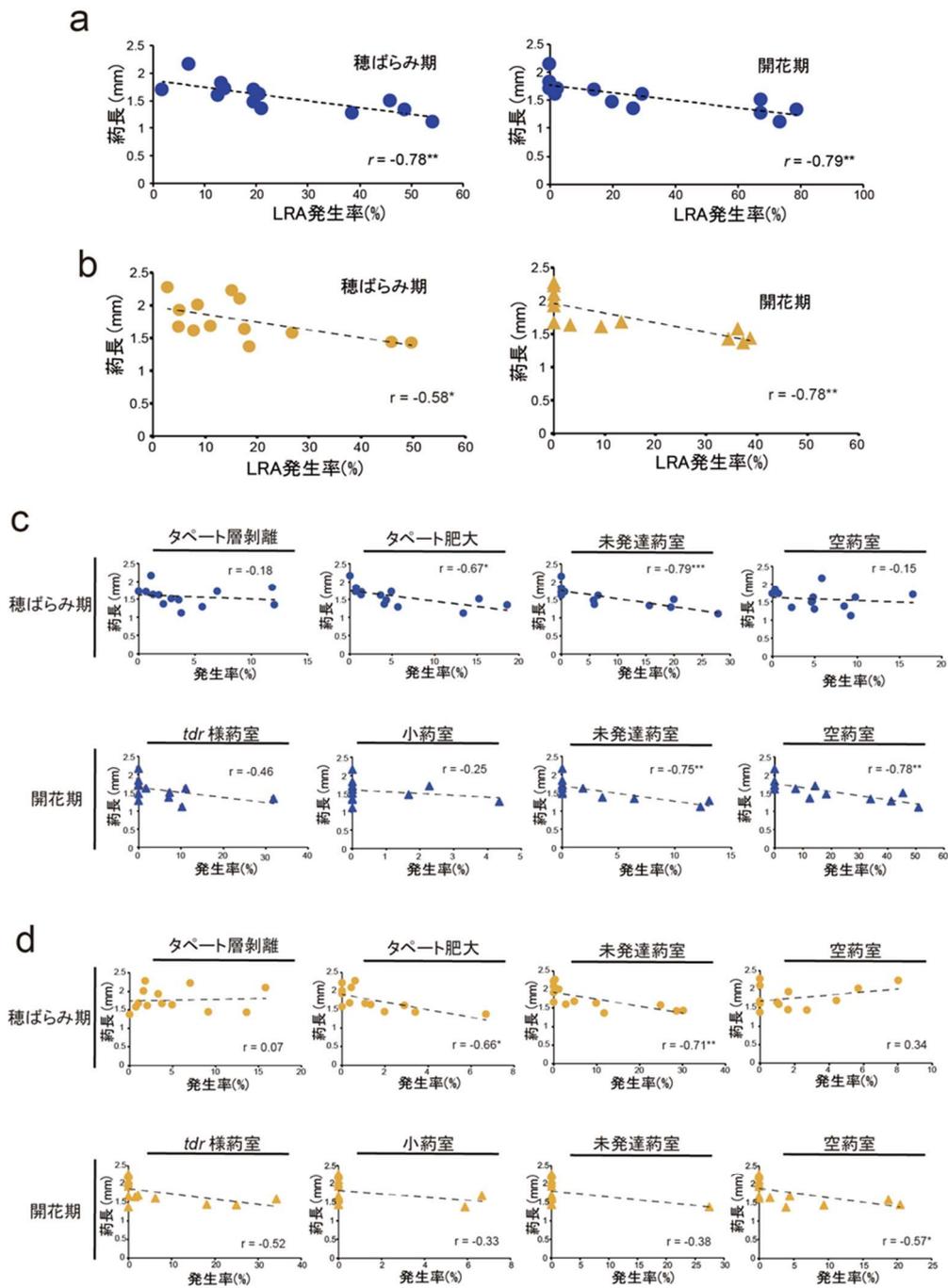


図2-7. 薬長とLRAの発生率の関係. (a, b) 低温処理区(a)と無処理区(b)の穂ばらみ期および開花期における薬長とLRA発生率の散布図を示した. (c, d) 低温処理区(c)と無処理区(d)における, 各LRAタイプの発生率と薬長の散布図を示した. 全体を通して, LRAの発生率と薬長の間でピアソンの相関係数 $r$ を求め, その有意性をスチューデントのT検定で検定した示す (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

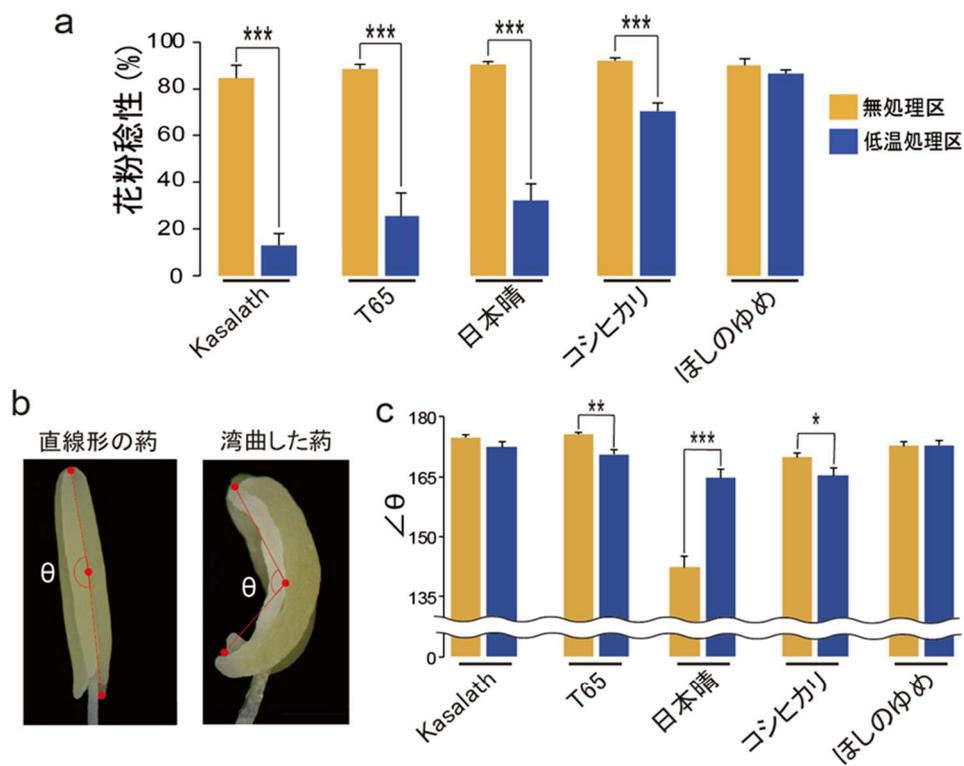


図2-8. 5品種における低温処理に伴う葯全体の形態変化。(a) 5品種の無処理区(黄色)および低温処理(青)における花粉稔性を示した。(b) 代表的な葯の形状:直線(左)と曲線(右)について示した。葯の湾曲の度合いは、3点間の角度( $\angle\theta$ )として測定した。(c) 5品種の無処理区(黄)と低温処理区(青)における葯の湾曲度合いを示した。全体を通して、エラーバーは標準誤差を表し、スチューデントのT検定によって決定された無処理区と低温処理区との有意差を示した(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )。

連続した横断切片を作成し、1つの葯当たり平均65個の横断切片を作成した。各品種について、各条件で3つの穎花から6つの葯を採取し、観察に用いた(図2-9a)。

同じ葯から作成された連続切片には、予想通り正常な葯室と異常な葯室が混在していたが、正常な部位が圧倒的に多く、異常な構造を持つ部分の割合は品種や生育条件によって異なっていた(図2-9b)。耐冷性品種のほしのゆめでは、低温処理を行っても異常がほとんど見られなかった。一方、もう一つの耐冷性品種であるコシヒカリでは、低温処理によってLRAが大幅に増加し、無処理植物の葯ではLRAが葯全体を占める割合は5%であったのに対し、低温処理区では約20%まで増加した。コシヒカリの低温処理後の葯内部に占めるLRAの割合は、日本晴と同程度であった。また、興味深いことに、低温耐性を持たない2品種のT65とKasalathでは、低温処理しても異常構造がほとんど見られなかった。穂ばらみ期の低温による不稔花粉の発生の原因であるとされてきたタペート肥大はほとんど観察されず、低温処理区の日本晴の葯で全体の3%を占めるにとどまった。低温処理区における日本晴とコシヒカリの葯では、空葯室や未発達葯室がタペート肥大よりも多く見られた。

開花期の葯においても連続切片を作成し、低温処理による影響を調査した。ほしのゆめ、コシヒカリ、T65、Kasalathの各品種の葯は、低温処理後もほぼ正常な構造を示したが、日本晴では、LRAの占める割合が無処理区の葯では10%だったのに対し、低温処理後には20%近くにまで増加した。日本晴で見られたこの葯室異常率の上昇は、空葯室や未発達葯室によるものであった。

葯の連続切片で観察された異常構造と葯内部での位置に注目すると、LRAの発生パターンに部位特異性があることが分かった(図2-10)。図2-10には特に、LRAがよく観察される日本晴とコシヒカリの結果を示した。葯には大小2つずつ計4つの葯室があり大葯胞と小葯胞をそれぞれ上部、中部、下部の3つに分けることで、計6つの領域を区別した。それぞれの領域にある正常な葯室の数と異常な葯室の数を計測し、葯の部位ごとで異常構造の占有率を調査した。低温処理区において、日本晴とコシヒカリの葯に見られた異常構造は、穂ばらみ期と開花期のいずれにおいても、大葯胞の中央部と小葯胞の上部および下部に集中して見られ、そのほかの部位ではほとんど観察されなかった(図2-10a, b)。無処理区でも異常構造は小葯胞の上部と下部に集中していることが分かった(図2-10c, d)。これらの結果から、イネの葯の形態異常は、大葯胞の中央部、小葯胞の上部および下部の3つの領域で発生しやすいことが示唆された。

### 低温処理による花粉粒数の変化

稔性花粉と不稔性花粉を含む花粉粒数と葯長は、ほしのゆめがわずかに増加したのを除いて、すべての品種で低温処理に応じて減少した(図2-11a, b)。花粉粒数の増減の幅は5品種間でばらつきが見られたが、コシヒカリとKasalathでは低温処理により花粉粒数が有意に減少した。低温処理区におけるコシヒカリの花粉数は無処理区の57.8%にまで減少し

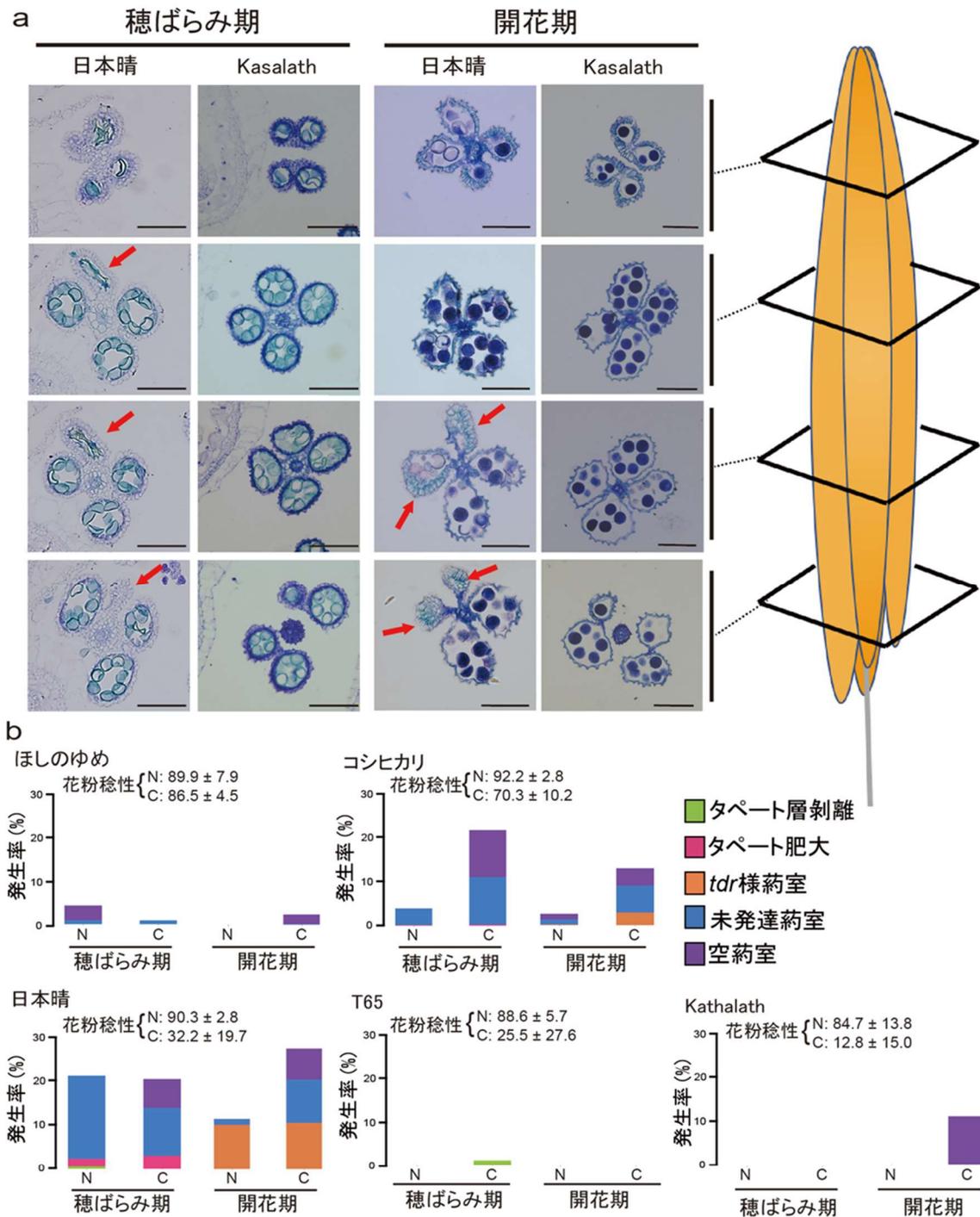


図2-9. 葯全体における内部構造の観察. (a) 1つの葯から作成した連続切片の一部を例として示した. 穂ばらみ期と開花期の日本晴とKasalathの葯について, 無処理区と低温処理区の結果を示した. 赤い矢印は異常な葯室を示し, スケールバーは50 $\mu$ mを示す. (b) 5品種について, 1葯における異常構造の平均占有率を示した. 無処理区(N)および低温処理区(C)の穂ばらみ期および開花期の葯についてそれぞれ示した. 各異常構造の占有率は, タペート剥離を緑, タペート肥大を赤, *tdr*様葯室を橙, 未発達葯室を青, 空葯室を紫でそれぞれ示した.

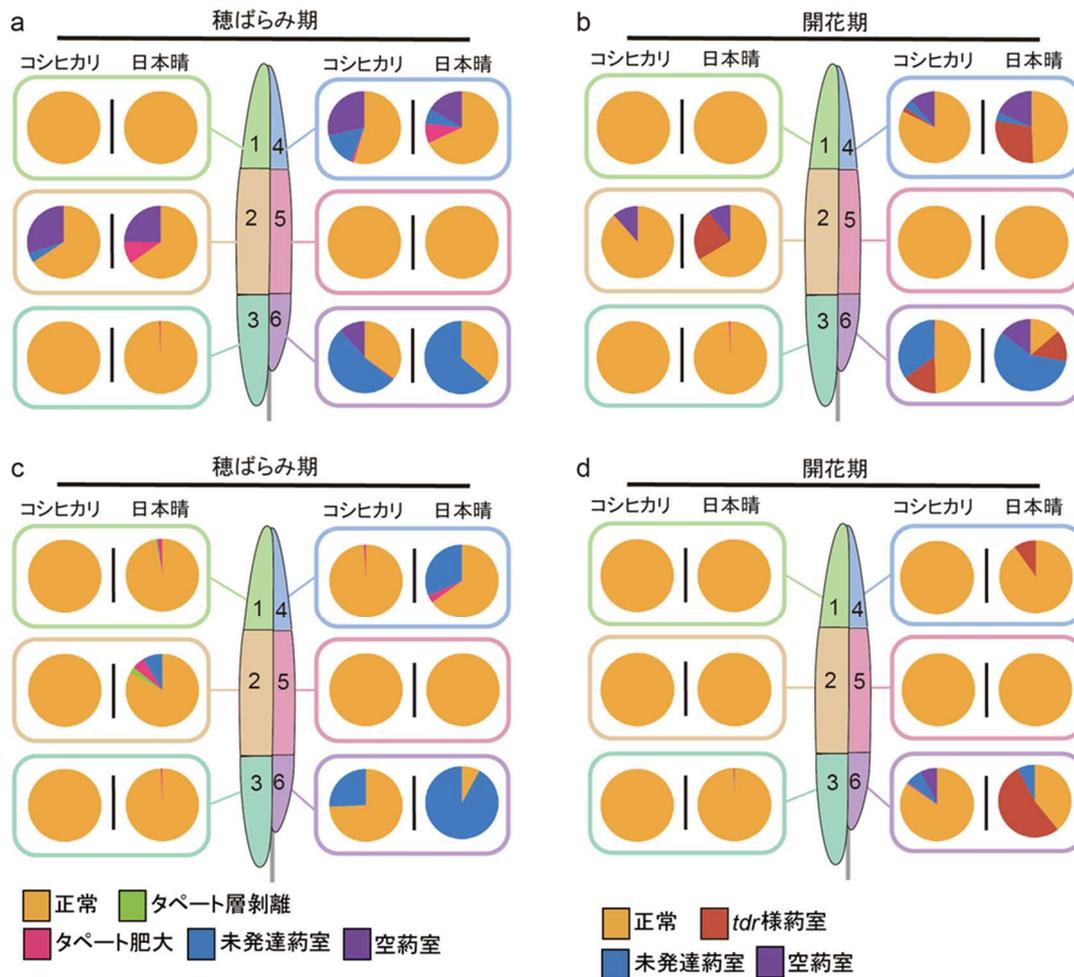


図2-10. 日本晴とコシヒカリにおける薬の部位ごとの異常構造の発生率。(a-d) 日本晴とコシヒカリの薬について、先端から基部まで連続横断切片を作成し、部位ごとに観察結果を集計した。薬は大小2組の薬室で構成されており、6つの領域(大薬胞は1, 2, 3, 小薬胞は4, 5, 6)に分けた。(a)穂ばらみ期における低温処理区での結果。(b)開花期における低温処理区での結果。(c)穂ばらみ期における無処理区での結果。(d)開花期における無処理区における結果。各内部構造の占有率は、正常を黄色、タペート剥離を緑、タペート肥大を赤、*tdr*様薬室を茶色、未発達薬室を青、空薬室を紫でそれぞれ示した。

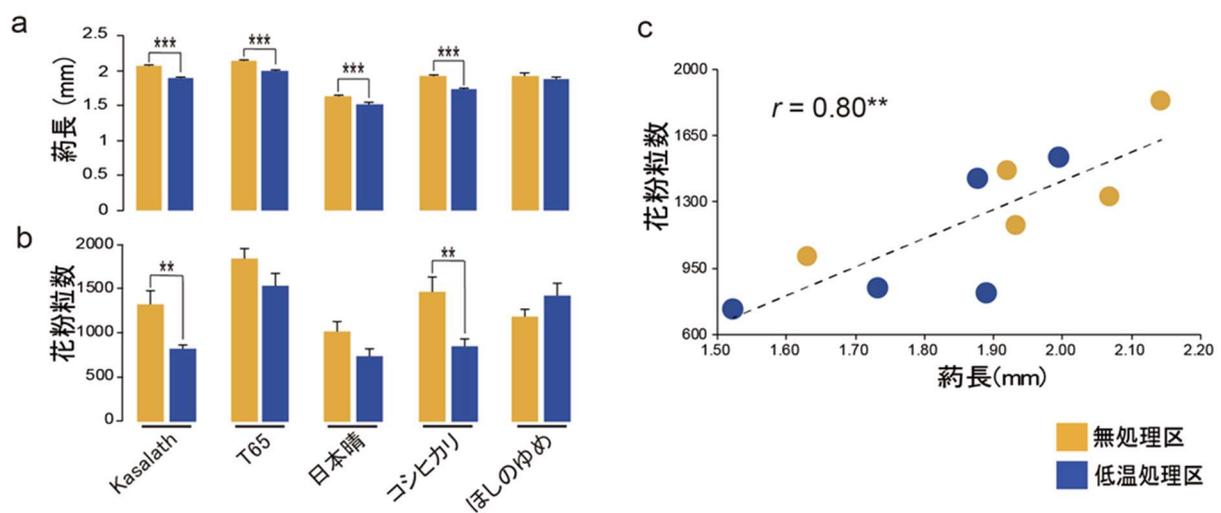


図2-11. 葯長と花粉粒数の相関関係. (a)5品種の無処理区(黄色)と低温処理区(青)における葯長の比較を行った. エラーバーは標準誤差を表し, スチューデントの T検定により無処理区と低温処理区間の有意差を示した (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). (b)5品種の無処理区(黄色)と低温処理区(青)における花粉粒数を示した. (c) 葯長と花粉粒数の散布図を示した. 葯長と花粉粒数は無処理区(黄)と低温処理区(青)の両方で正の相関を示した.

ていた (図 2-11b)。しかし、コシヒカリの花粉稔性は低温処理後も 60%以上を維持しているのに対し、日本晴、T65、Kasalath の花粉稔性は 30%以下であった (図 2-8a)。このように、低温処理による花粉生産への影響は多様であり、コシヒカリは、花粉稔性は高く保つことができるが、花粉粒数が減少するタイプの障害を示し、日本晴、T65、Kasalath は不稔花粉が多く発生するタイプの障害を示した。前述のように、ほしのゆめを除く 4 品種では、低温処理によって葯長が短くなり、花粉粒の数も減少した (図 2-11a, b)。無処理区と低温処理区のすべての葯において、葯長と花粉粒数のピアソン相関係数  $r$  を調べたところ、葯長と花粉粒数の間に顕著な相関関係 ( $r=0.80$ ) が示された (図 2-11c)。このことから、イネの花粉粒数は葯の大きさに依存していると考えられた。

## 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

1943年の Sakai の報告により、イネの穂ばらみ期の低温による不稔花粉の発生は、葯の内部構造異常であるタペート肥大が原因であるという説が支持されてきた。Zhang ら (2020) は、低温による不稔花粉の発生に関わる研究のほとんどがタペート肥大と関連していると指摘している。タペート肥大は、低温によってスクロースの分解が阻害されタペート層に蓄積することや、スクロースの輸送が滞ることが原因と考えられており、それらに関わる遺伝子が同定されている (Mamun et al., 2006; Oliver et al., 2005)。しかし、Nishiyama (1970, 1976) は、花粉不稔の原因がすべてタペート肥大であると仮定した場合、タペート肥大の発生は、仮定よりもはるかに少ない数しか観察されないと指摘している。本研究では、低温下での花粉稔性が異なる 13 品種について、花粉稔性と葯の異常構造の関係について調べた。その結果、低温によるタペート肥大の発生は低温感受性品種が示す典型的な特徴ではないことが明らかとなり、本結果は Nishiyama らの報告と一致した。

13 品種の葯の切片を観察した結果、タペート肥大を含む 8 種類の葯室関連異常 (LRA) が確認された。タペート肥大と花粉稔性との間のピアソン相関係数は  $r = -0.35$ 、LRA 全体と花粉稔性との間のピアソン相関係数は  $r = -0.6$  であった (図 2-4a)。このことから、タペート肥大は何らかの影響を与えているものの、低温処理後の花粉不稔を説明する唯一の構造異常ではなく、LRA 全体としてはタペート肥大だけよりも花粉不稔に強く寄与していることが分かった。

### 葯室の異常構造が葯において局在する意義

これまでの研究では、低温ストレスに対して耐性を持つものと持たないものの 2 品種の対照によって低温応答を比較してきた (Oda et al., 2010; Oliver et al., 2005)。このような耐性のある品種と感受性のある品種の比較分析は有用であるが、これらの比較ではイネ品種間の低温感受性の幅を捉えることはできなかった。本研究では幅広い耐冷性を示す 13 品種のイネを供試した。このうち、T65 と Kasalath は低温処理による葯構造の変化が比較的少なく、この点では耐冷性品種に似ていた。他の 7 つの低温感受性品種では、穂ばらみ期または開花期のいずれかの段階で低温処理後の LRA の発生率が高いほど不稔花粉が多く発生する傾向にあった (図 2-4)。しかし、低温による不稔花粉の発生率に対して、葯室の異常構造の発生率はかなり低い傾向にあった (図 2-2c, 3c)。実際に、最も低温に弱く、低温処理区での花粉稔性が 4% であった日本晴でさえ、観察された異常な葯室構造は全切片の 40% 以下であった。この、不稔花粉に対して異常構造の発生率が少ない現象の理由の 1 つとして、図 2-10 に示すように、LRA が葯の 3 つの領域、すなわち、大葯胞の中部、小葯胞の上、下部領域に集中して発生していることが挙げられる。LRA が局所的に発生することで、葯

全体に占める異常部位の割合は 50%以下に抑えられることが考えられる。

不稔花粉の割合に対して異常構造の発生頻度が少ないことから、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。すなわち、低温処理による影響が大薬胞の中部および小薬胞の上、下部に LRA として顕在化し、それと並行して不稔花粉が発生するというモデルが考えられた。葯の形態異常がどのようにして、またなぜこれらの 3つの領域に集中するのかは、今後の課題である。

### 花粉不稔と LRA との関連性

葯で観察された葯室の形態を、穂ばらみ期と開花期で 8つのタイプに分類した。低温障害による葯室の構造異常は、低温感受性に対応した定量的な表現型となる。前述のように、花粉不稔に関連して研究されている葯の形態的異常は、タペート肥大だけである。Nishiyama (1976) は、電子顕微鏡を用いて低温障害による葯の形態変化を解析し、4つのタイプに分類したが、いずれもタペート肥大に由来する形態として報告している。

葯の形態異常に関する多くの研究は、タペート肥大に焦点を当てている。しかし、13品種を対象とした今回の研究では、タペート肥大とは明らかに区別できる形態異常が観察された。その結果、LRA は開花期と穂ばらみ期でそれぞれ4つのタイプに分けられた(図 2-2b, 3b)。これらの形態異常のうち、花粉不稔との関連性が最も高いと思われる穂ばらみ期の LRA は、未発達葯室であった(図 2-4a)。同様に、開花期にみられる LRA 花粉不稔との関連性が最も高いと思われるものは未発達葯室や空葯室であり、穂ばらみ期の未発達葯室が開花期におけるこれらの異常の発生に直接由来している可能性がある(図 2-4b, 5b, c)。また、穂ばらみ期におけるタペート肥大の発生は、開花期に *tdr* 様葯室や空葯室の形成に関与する可能性が示唆された(図 2-5b, c)。穂ばらみ期と開花期の LRA の正確な関係を明らかにするには、今回明らかになった相関関係をもとにさらなる調査が必要である。葯室が発生過程でどのように変化するかを調べた研究報告はほとんどない。花粉の発生と密接に関係しているこれらの変化を理解することは、花粉不稔の原因を明らかにする上で重要である。LRA 形成の遺伝的制御は複雑であると考えられ、穂ばらみ期の耐冷性に関与する遺伝子や量的形質遺伝子座(QTL)が多数存在することからも推測される(Andaya & Mackill, 2003; Dai et al., 2004; Endo et al., 2016; Kuroki et al., 2007; 黒木ら., 2011; Li et al., 1997; Li et al., 2021; Oh et al., 2004; Saito et al., 2001, 2010; Shimono et al., 2016; Shirasawa et al., 2012; Suh et al., 2010; Sun et al., 2019; Takeuchi et al., 2001; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2017; Zhu et al., 2015)。

### 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

本研究では、13品種のイネの葯が穂ばらみ期の低温ストレスにより様々な内部異常を示

すことを発見した。本研究から得られた、それぞれの異常構造の発生パターンと不稔花粉との相関関係から、筆者は低温ストレスによる葯内部の形態的な変化と不稔花粉の新たな関係を3タイプ定義した(図2-12)。1つ目は、穂ばらみ期に未発達葯室が発生し、開花期には未発達葯室および空葯室が発生することが特徴である(図2-12, Type1)。ただし、前述のように、これらの異常構造は葯の特定の部位に集中して発生し、不稔花粉が発生する直接的な原因ではない可能性が高い。2つ目のタイプは、低温処理区でも正常な葯の内部構造を保つが、不稔花粉が発生することが特徴である(図2-12, Type2)。T65とKasalathはこのタイプ反応を示す品種の例で、LRAがほとんど見られないにも関わらず不稔花粉の発生率が高かった。このタイプを示す品種にみられる花粉稔性の低下は、葯の構造の異常ではなく、低温による他のダメージが原因であることは明らかである。例えば、花粉の発達に必要なスクロースの合成は、低温ストレスによって阻害されることが知られており(Saini & Westgate, 1999)、葯へのスクロースの転流が滞ることで花粉の発達が妨げられることが知られている(Thakur et al., 2010)。3つめは、コシヒカリに代表してみられる反応であった。コシヒカリは、低温ストレスにより花粉粒全体が減少したにもかかわらず、低温処理区での花粉稔性は約60%を示し、一般的に耐冷性品種に分類されている(図2-12, Type3)。以上のように、本結果から、葯の形態変化と不稔花粉の新たな関係を3つ定義することができた。これらの形態的な変化が葯の内部に発生するメカニズムに注目した研究は、新たなストレス応答メカニズムの解明につながることを期待される。

### 葯室の異常の考えられるメカニズム

上述のように、葯の形態異常はイネの耐冷性メカニズムの解明において大きなヒントとなりうる。各葯室の異常は、葯の異なる細胞層間でのデンプン化合物の正常な輸送や保持が阻害されていることや、糖が過剰に生産されていることを示すサインと考えられる。Mamunら(2006)は、イネの葯の発育過程において、低温ストレスがスクロースの分解や糖類の輸送に関わるいくつかの遺伝子の発現を阻害し、内皮やタペートにスクロースが過剰に蓄積されると述べている。また、葯では、花粉が成長する過程でいくつかの植物ホルモンの濃度が増加する(Hirano et al., 2008)。例えば、イネの葯では、低温によりアブシジン酸(ABA)の産生が増加し、ジベレリン酸(GA)の産生が減少する(Oliver et al., 2007; Sakata et al., 2014)。これら2つの植物ホルモンは、成長・発達時に拮抗的に作用するため、低温によって両者の連携が崩れると、葯の発達に異常が生じる可能性がある。

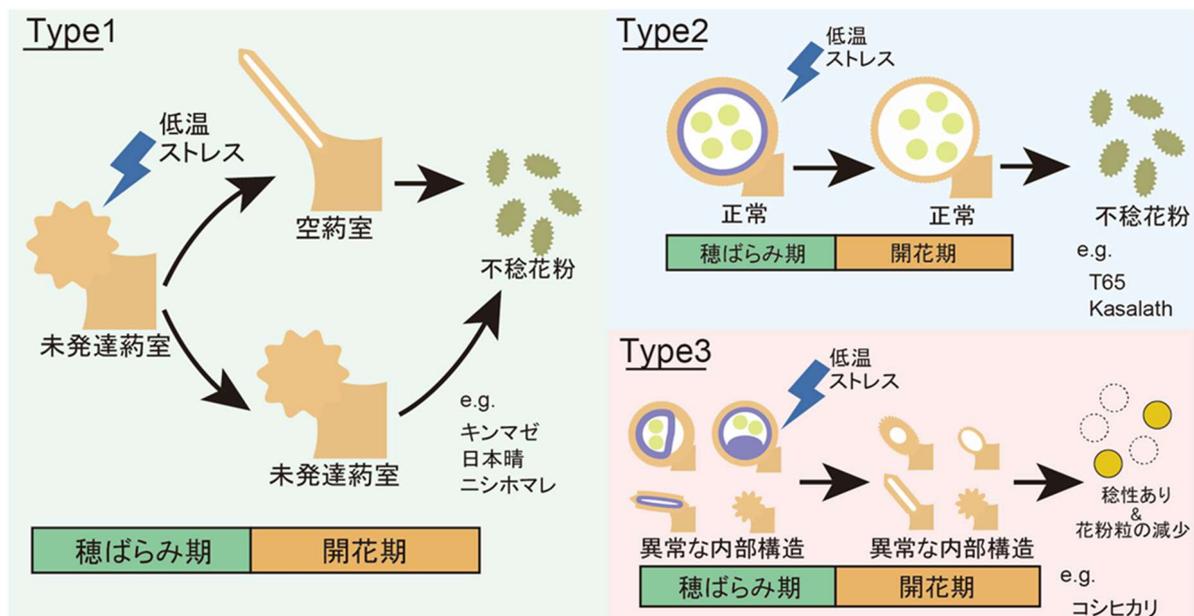


図2-12. 穂ばらみ期の低温ストレスによる新たな攪乱反応. Type1:低温ストレスにより, 穂ばらみ期にみられる未発達葯室が, 開花期に空葯室もしくは未発達葯室を発生させ, その結果, 花粉が不稔になる. キンマゼ, 日本晴, ニシホマレなどの低温感受性品種でみられた. Type2:穂ばらみ期に低温ストレスにさらされた後, 穂ばらみ期, 開花期ともに異常構造はほとんど発生しないが, 不稔花粉が多く発生する. T65とKasalathをType2の例として挙げた. Type3:他の低温感受性品種と同程度の異常構造が発生し, 花粉粒数は減少するが, 高い花粉稔性を示す. コシヒカリはType3に属する.

## 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

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 (Higo et al., 2020). 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 (Lisch, 2009). 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。イネでは特定の遺伝子のプロモーターに存在する転移因子へのエピジェネティックな制御が変化することで、草丈、分げつの角度および出穂性などの形質が変化することが報告されている (Wei et al., 2014; Xu et al., 2020a; Zhang et al., 2021). また、転移因子を発見した McClintock (1984) は植物がストレスに曝されると反復配列における抑制が解除され、転写が活性化するという「ゲノムストレス説」を唱えた。実際に、低温に曝されたトウモロコシでは、'ノブ' と呼ばれるヘテロクロマチン領域において転移因子が一過的に転写される現象が報告されている (Hu et al., 2012). Hu (2012) らは、この一過的な活性化が特定の転移因子にしか見られなかったことや、それによる転移が確認されなかったことから、低温に対するシグナル応答として特定の転移因子が発現することを予想した。さらに、Ishiguro ら (2014) は、穂ばらみ期のイネにおけるトランスクリプトーム解析から、低温によって発現変動がみられた反復配列の数は、低温耐性品種よりも感受性品種で多いことを報告した。以上のように、反復配列は直接タンパク質に翻訳される遺伝子とは異なるメカニズムで生命現象に組み込まれている。

反復配列の制御機構の解明は、ゲノムの安定化やストレス応答などの様々な生命現象の理解において重要である。反復配列のエピジェネティックな転写抑制には、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) や DNA のメチル化が用いられる (Lisch, 2009). イネでは反復配列における DNA メチル化に関わる研究が多く行われてきた (Higo et al., 2020; Wei et al., 2014; Xu et al., 2020a). その一方で、イネゲノムの H3K9me2 について調査した例は少ない。それらは H3K9me2 と反復配列の具体的な関連について注目していない (Atighi et al., 2021; Liu & Nonomura, 2016). 本研究では、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 によって、イネの生殖組織である葯と栄養組織である葉のゲノム内における H3K9me2 の分布パターンを比較した。

## 材料および方法

### 植物材料とその育成

本研究ではイネ品種の日本晴を供試した。材料植物は第 2 章と同様に、1つのワグネルポット (1/5000 100 m<sup>2</sup>) に 20 個体を播種し、分げつを切ることで主幹のみを維持した状態で 25/19°C (昼夜サイクル) の温室内で栽培を行った。材料植物が 5 葉期に、最上位展開葉である第 5 葉を複数の個体から採取した。ヒストンタンパク質と DNA の相互作用を維持するために、固定操作を行った。採取された葉はメラミンスポンジを用いて表層のワックス層を除き、30mM の HEPES バッファーに入れた。HEPES バッファーに 1%質量パーセント濃度になるようにホルムアルデヒドを加え、葉に溶液が浸透するまで脱気を行った。その後、室温で 30 分静置し、溶液に 0.25M になるようにグリシンを加え、再び脱気を行った。5 葉を採取した個体群とは別のポットで同様に生育された穂ばらみ期の複数の個体から葍をサンプリングした。穂ばらみ期の判定は第 2 章と同様に葉耳間長 (Auricle Distance : AD) をもとに行った。採取された葍は直ちに 30mM の HEPES バッファーに入れ、葉と同様の固定操作を行った。

### クロマチン免疫沈降

ChIP-seq 解析のために複数の個体から得た葍や葉は、SDS バッファー内で破碎し、抽出液の上澄みに含まれるクロマチンをソニケーターによって断片化した。上澄み液は一度、フェノール/クロロホルム処理とエタノール沈殿によって精製し、そこへ H3K9me2 抗体を加えた。抗原抗体反応をオーバーナイト (~15 時間) で行い、抗体が結合したクロマチンは磁気ビーズを用いて回収した。回収されたクロマチンに Proteinase K を加えて反応させることでヒストンタンパク質と分離し、フェノール/クロロホルム処理とエタノール沈殿によって DNA を精製した。以上の工程は東京大学大学院農学生命科学研究科の金鐘明博士によって行われた。抽出された DNA は QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN ドイツ ヒルデン) を用いて、そのプロトコルに従って精製された。

### シーケンシング

葉から得られた ChIP サンプルおよび input サンプルは、NovaSeq6000 (Illumine, アメリカ, カルフォルニア) を用いて 150bp のペアエンド解析が行われた。シーケンスの工程は Rhelixa (日本, 東京) の委託解析によって進められた。葍から得られた ChIP サンプルおよび input サンプルは、HiSeq 2500 (illumina) を用いて 100bp のペアエンド解析に供した。シーケンスの工程は北海道システムサイエンス (日本, 北海道) の委託解析によって進められた。

## ChIP-seq 解析

シーケンス解析によって得られたショートリードの情報から、PCR 増幅に用いたプライマー配列を除くため、cutadapt (3.1) を用いてトリミングを行った。トリミング後、bowtie2 (2.4.2) を用いてショートリードマッピングを行った。リファレンスには RAP-DB (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) が公開している日本晴の全ゲノム情報 (IRGSP1.0 2021-05-10) を使用した (Kawahara et al., 2013; Sakai et al., 2013)。以降の解析にはペアエンドリードの双方が適切かつ、1 回のみマップされたリード情報のみを用いた。Bowtie2 によって得られた.sam 形式のファイルを samtools (1.7) で.bam 形式に変換し、bedtools (2.30.0) で bedpe 形式のファイルに変換した。

リードマッピングの結果をもとに、Python (3.8.5) を用いてゲノム上の H3K9me2 の分布密度を求めた。Bedtools から得られた bedpe 形式のファイルを読み込み、各ペアエンドリードの中点を取得した。ゲノム上の同じ位置に過剰に検出された各ペアエンドリードの中点を除くことで、オルガネラゲノムの情報が混入することを防いだ。リファレンスゲノムにマッピングされたペアエンドリードの中点の位置を平均( $\mu$ )、ペアエンドリード間の距離 (インサートサイズ) を標準偏差( $\delta$ )とした、以下のような切断正規分布を定義した(i)。

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\delta^2}} \exp\left[-\frac{(x-\mu)^2}{2\delta^2}\right] \quad (\mu - 3\delta \leq x \leq \mu + 3\delta) \quad \dots (i)$$

(i) で定義した切断正規分布をゲノム上に集積させ、これを DNA-タンパク質間の相互作用の中心が分布する確率分布とした。この切断正規分布カーネルをゲノム上に集積させ、ChIP サンプルの集積程度の値を input サンプルの集積程度の値で割った相対値を H3K9me2 の密度として 1 塩基単位で検出し、ゲノム全体で可視化したマップを構築した。

## マイクロアレイ解析

本研究に用いたマイクロアレイ解析は、石黒 (2015) が解析したデータを用いて行われた。解析に使用した、反復配列由来のプローブを 31366 個搭載したマイクロアレイ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE49561>) は、Agilent Technologies 社 (アメリカ, カルフォルニア) の eArray を利用してプローブが設計された。プローブの由来となる反復配列のデータは Rice Genome Annotation Project が提供していた Oryza Repeat Database ([http://rice.plantbiology.msu.edu/annotation\\_oryza.shtml](http://rice.plantbiology.msu.edu/annotation_oryza.shtml)) および RetrOryza (<http://www.retroryza.org/>) データベースを参照した。なお、2021 年時点で両データベースの URL は無効となっている。eArray を用いたプローブの設計では、データベースの 3' 末端側の配列からプローブを作成し、Tm 値は 80°C 付近、塩基数は 60mer になるように設定した。全ての配列に対しセンス鎖・アンチセンス鎖をそれぞれ 1 プローブず

つ作成した。反復配列のほかに、Agilent 社のイネカタログアレイ(G2519F)からランダムに選択した遺伝子由来のプローブを 9563 個搭載し、pre-miRNA 配列のデータベースである miRBase (<http://www.mirbase.org/>) から 864 個の プローブを作成した。

## 結果

### ショートリードのマッピングと分布

イネゲノム全体の発現変動を捉えるうえで、クロマチンレベルのゲノム修飾機構を把握することは重要である。日本晴の第5葉期の展開葉と穂ばらみ期の葍を用いて、栄養生長器官と生殖生長器官のヒストンタンパク質のメチル化修飾について調査した。ヒストンタンパク質 H3 の9番目のリジンを修飾するジメチル化 (H3K9me2) は転移因子を抑制する働きが知られている。本研究では、H3K9me2 抗体による ChIP-seq を行い、H3K9me2 のゲノム上の位置を調査した。複数の日本晴植物体から集められた葍と葉をホルムアルデヒドによって固定した後、ヒストンタンパク質との相互作用を保ったまま DNA を抽出した。抽出物は2つの試験区に分けられ、一方は H3K9me2 抗体による免疫沈降の後に精製し (ChIP サンプル)、一方は免疫沈降を行わずに精製した (Input サンプル)。葍と葉から得た2種類のサンプルを次世代シーケンシングに供試した。葍から得たサンプルでは100bp、葉から得たサンプルでは150bp のペアエンド解析が行われた。解析によって得られたペアエンドリードは cutadapt (3.1) によってプライマー配列を除去したのち、bowtie2 (2.4.2) によって日本晴 (IRGSP1.0) のリファレンスゲノムにマッピングされた。bowtie2 によるマッピングの条件として、1リードあたりに許容するミスマッチについて3条件 (デフォルト、1ミスマッチまで許容、ミスマッチ許容なし) でマッピングを行った結果を表3-1に示した。葍の ChIP サンプルにおいて、最も多くのリードが重複せずにマッピングされる条件はミスマッチなしで、他のサンプルでは1ミスマッチ条件が最適であった。葍の解析では100bp、葉の解析では150bp のペアエンド解析を行っており、葍よりも葉のリード長が長いことが原因で1リードあたりのミスマッチは葉でより起きやすいことが考えられた。そのため、葍のサンプルはミスマッチなし、葉のサンプルでは1ミスマッチ条件を採用した。

全ゲノム上にマッピングしたリードの分布と密度から、葍と葉のゲノムにおける H3K9me2 の分布を推定した。ChIP サンプルにおいてリードをマップしたゲノム領域には、ヒストンタンパク質が結合したゲノム DNA 部位が抽出される。リードマッピングの結果から、ペアエンドリードの中点を平均、ペアエンドリード間の距離を標準偏差とした切断正規分布カーネルをゲノム上に推定し、これを DNA-タンパク質間の相互作用の中心が分布する確率分布とした (図 3-1a)。この切断正規分布カーネルをゲノム上に集積させ、ChIP サンプルの集積程度の値を Input サンプルの集積程度の値で割った相対値を H3K9me2 の密度として1塩基単位で検出し、ゲノム全体で可視化したマップを構築した (図 3-1b)。その結果、第1染色体から12染色体の12本の染色体いずれでも、セントロメア周辺のペリセントロメア領域で特に高い H3K9me2 の集積が確認された (図 3-1b)。第1染色体の例で見ると、ペリセントロメア領域以外でも H3K9me2 が多く集積している領域はゲノム上に散在していることがわかった (図 3-1c)。

表3-1. bowtie2によるショートリードマッピングの条件検討

|             |           | 葯_ChIP      | 葯_input     | 葉_ChIP      | 葉_input     |
|-------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Input reads |           | 44,964,918  | 44,583,072  | 56,057,430  | 48,565,746  |
| Default     | mapped    | 42,849,910  | 43,239,390  | 51,938,200  | 45,983,998  |
|             | unique    | 13,632,048  | 29,334,304  | 16,930,472  | 24,170,166  |
|             | ratio (%) | 31.81       | 67.84       | 32.60       | 52.56       |
| 0mm         | mapped    | 37,955,606  | 38,452,356  | 35,765,892  | 34,695,598  |
|             | unique    | *32,379,588 | 34,669,898  | 31,408,536  | 25,312,316  |
|             | ratio (%) | 85.31       | 90.16       | 87.82       | 72.96       |
| 1mm         | mapped    | 41,187,414  | 41,927,306  | 46,206,510  | 42,905,082  |
|             | unique    | 29,853,840  | *35,743,854 | *36,492,604 | *29,360,296 |
|             | ratio (%) | 72.48       | 85.25       | 78.98       | 68.43       |

mm: ショートリードあたりに許容するミスマッチの数

\*: 各サンプルにおいて最も多くのユニークリードが得られた条件

## ゲノム構造と H3K9me2 の分布の関係

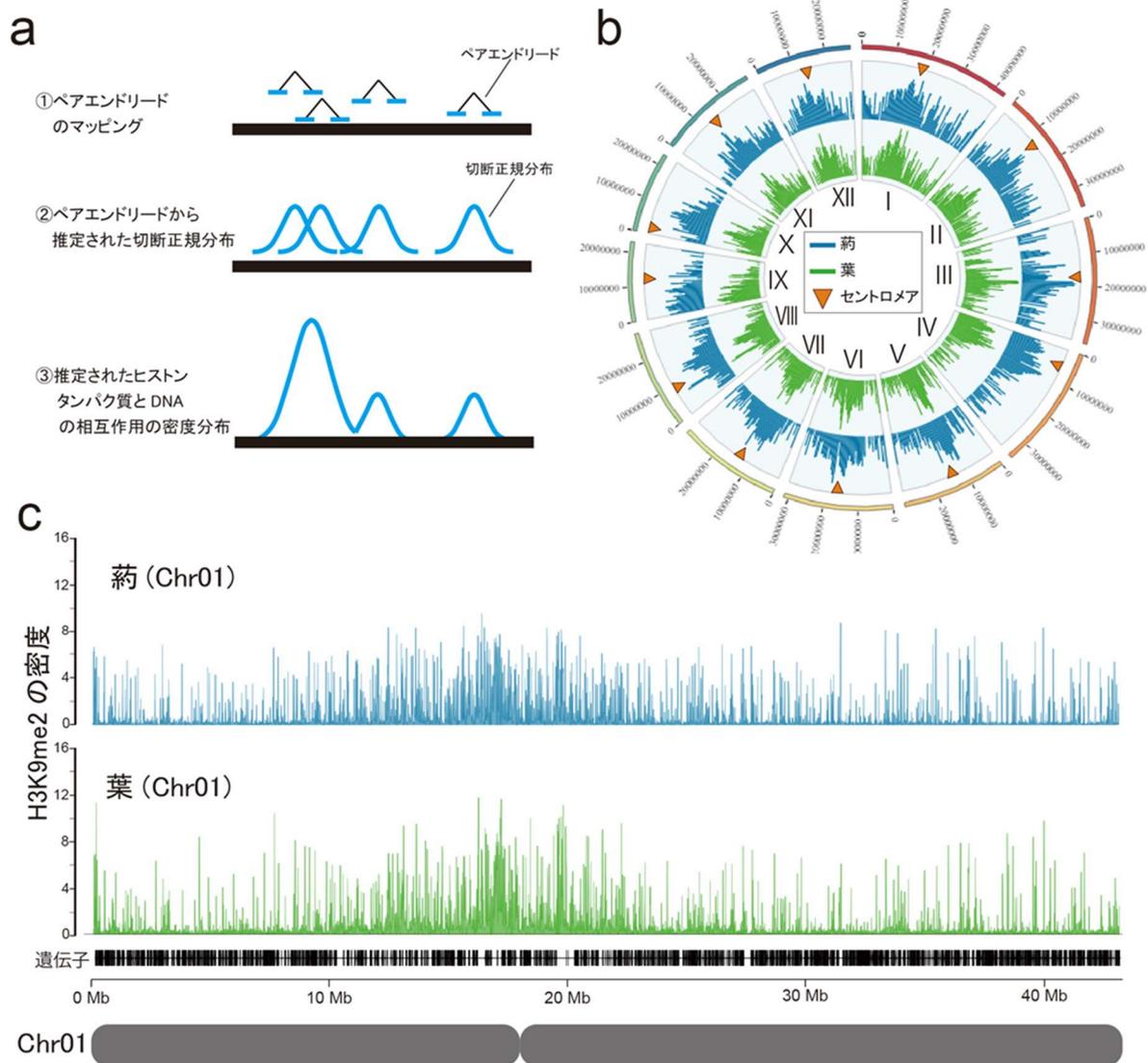


図3-1. ChIP-seqによって得られたショートリードのマッピング結果. (a) ペアエンドリードのマッピング結果からヒストンタンパク質とDNAの相互作用の密度分布を推定するフローチャートを示した. (b) 第1-12染色体における推定されたH3K9me2の密度分布を示した. 薬の結果は青, 葉の結果は緑で示した. 橙色の三角形は各染色体のセントロメアを示す. (c) 第1染色体におけるH3K9me2の密度分布を示した. 薬の結果は青, 葉の結果は緑で示した.

ChIP-seq 解析から得られたゲノムワイドな H3K9me2 の分布情報をもとに, epic2 (0.0.48) によるピークコールを行った (Stovner & Sætrom, 2019). H3K9me2 が多く集積している領域を例示すると, 図 3-2a に示した第 12 染色体の領域のように特徴化でき, 特に反復配列の位置と重なる. ピークコールによってゲノム全体で検出された, H3K9me2 が集積した領域 (ピーク領域) の全長は, 葯で 85,761,676bp, 葉では 76,363,709bp と葉よりも葯の方が長く, 検出されたピーク領域はイネゲノム全長の約 20% を占めた. 検出されたピーク領域に存在する遺伝子の全長は葯で 766,566bp, 葉で 994,117bp であったのに対し, 反復配列の全長は葯で 41,612,964bp, 葉で 39,756,742bp であり, H3K9me2 は遺伝子よりも反復配列に集積しやすいことが示された (図 3-2b). 反復配列や遺伝子が存在しない遺伝子間領域にも反復配列領域と同程度の H3K9me2 の分布がみられ, 葯では 43,382,146bp, 葉では 35,612,850bp の遺伝子間領域にピーク領域が検出された. イネゲノム全体では遺伝子領域および反復配列領域はそれぞれ 136,022,376bp および 159,203,063bp であるので, 葯において遺伝子領域, 反復配列領域の 0.6% あるいは 26.1% が H3K9me2 によって修飾されることになる. 一方, 葉においては 0.7% および 25.0% が遺伝子領域と反復配列領域それぞれで H3K9me2 修飾領域が占める. これに対し, 葯では全遺伝子間領域の 55.6%, 葉では 45.6% が H3K9me2 のピーク領域に対応した. 従って, 葯および葉の両器官とも, 遺伝子間領域, 反復配列の順で H3K9me2 の標的になりやすく, 遺伝子領域はほとんど H3K9me2 が結合していないことが確認できた (図 3-2b). 葉と葯で詳細を比較すると, 遺伝子が存在する領域では葯よりも葉で長いピーク領域が検出され, 反復配列と遺伝子間領域では葉よりも葯で長いピーク領域が検出された. 一方で 2 つの器官におけるピーク領域長の差はいずれの領域でも 10% 未満と小さく, 多くが葯と葉で共通した H3K9me2 領域を保持していることを示す.

H3K9me2 の集積とゲノム構造の関係をより詳しく調査するため, アノテーションされているすべての遺伝子と反復配列について, 上流 1kb (プロモーター領域) もしくは配列本体の全長の 90% にわたって H3K9me2 ピーク領域が検出された配列数を調査した (図 3-2c, 表 3-2). 調査した 37,859 か所の遺伝子のうち, プロモーターにピーク領域が検出された遺伝子は, 葯では 622 か所, 葉では 893 か所だった. 遺伝子本体にピーク領域が検出されたものは葯と葉でそれぞれ 504 か所と 647 か所で, プロモーター領域よりも少なかった. プロモーターと遺伝子本体にピーク領域が検出された遺伝子は一部が重複しており, 遺伝子の本体にピーク領域が検出された配列のうち 70% 以上がプロモーターにもピークが検出された (図 3-2c). 以上の結果から, H3K9me2 は遺伝子の本体よりもプロモーター領域に集積しやすい傾向が葯と葉の両方でみられた. 葯と葉で比較すると, 葯よりも葉で多くの遺伝子の周辺に H3K9me2 が集積しており, プロモーター領域もしくは遺伝子の本体にピーク領域が検出された遺伝子は葯で 761 か所に対し, 葉では 1,084 か所だった. 調査した 283,848 か所の反復配列のうち, 上流 1kb 領域にピーク領域が検出されたものは葯で 33,798 か所,

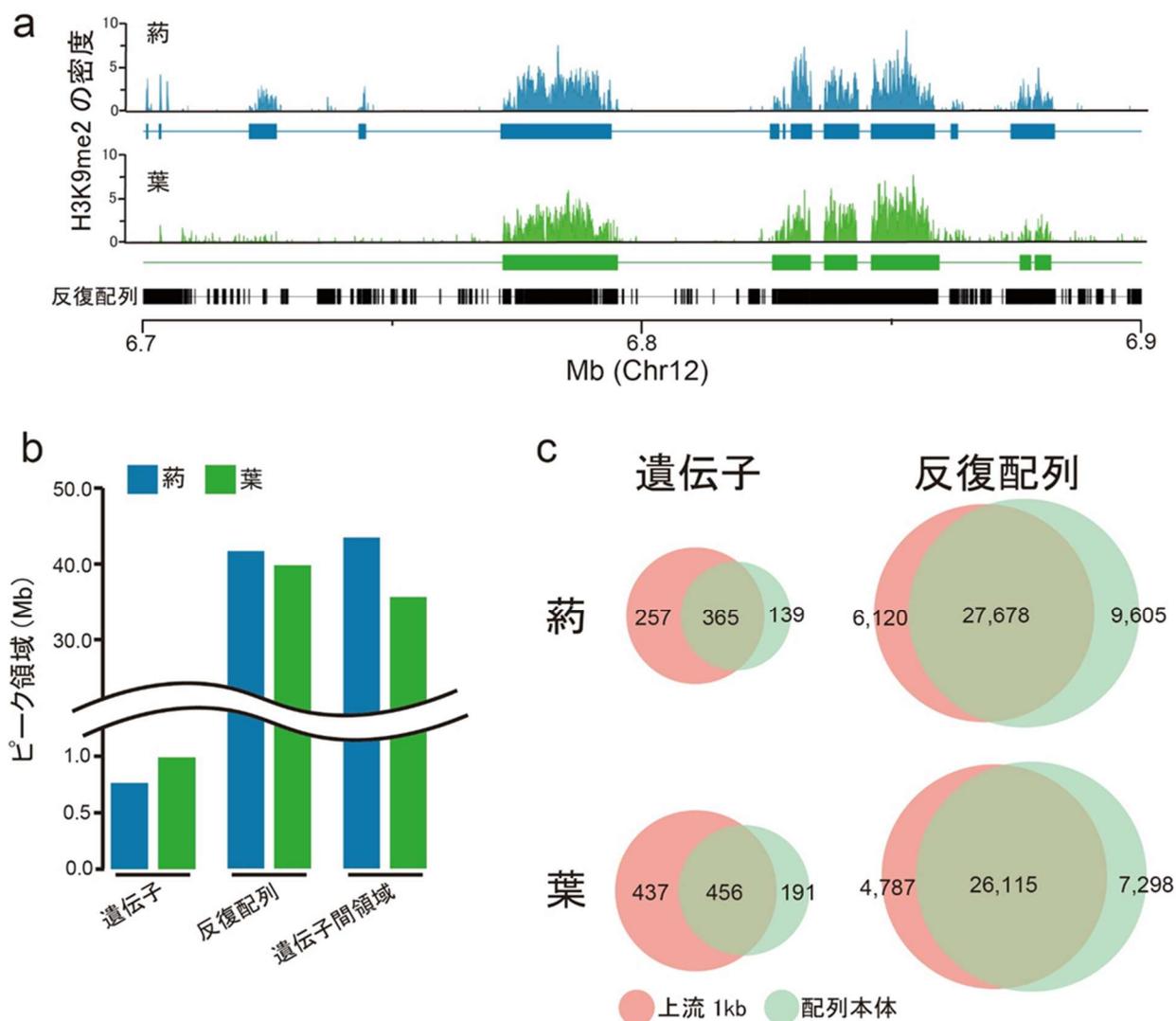


図3-2. 薬と葉におけるH3K9me2のピーク領域の推定。(a)第12染色体の6.7 - 6.9Mbにおけるピークコールの結果を示した。薬の結果を青、葉の結果を緑で示し、H3K9me2の分布を示したグラフの下に推定されたピーク領域を四角い箱で示した。(b)葉と薬で推定されたH3K9me2のピーク領域に存在する遺伝子と反復配列の全長を示した。薬の結果は青、葉の結果は緑で示した。(c)遺伝子と反復配列の上流1kbおよび配列本体にH3K9me2のピーク領域が検出された箇所の配列の数を示した。

葉では 30,902 か所で、反復配列の本体にピーク領域が検出されたものは葯で 37,283 か所、葉で 33,413 か所であった。上流 1kb 領域もしくは反復配列本体にピーク領域が検出された配列のうち、60%以上が上流 1kb 領域と反復配列本体のどちらにもピーク領域が検出され、反復配列は配列本体とその周辺に H3K9me2 が分布しやすいことがわかった(図 3-2c)。葯と葉を比較すると、上流 1kb 領域もしくは反復配列本体にピーク領域が検出された配列は葉よりも葯で多く、葯では 43,403 か所、葉では 38,200 か所だった。

### 反復配列の種類における H3K9me2 の分布頻度

前項の結果から、葯および葉のゲノムにおいて検出されたピーク領域のほとんどが、反復配列領域にみられた。次に、反復配列を MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Element)、MITE 以外のトランスポゾン、LTR (Long Terminal Repeat) 型レトロトランスポゾン、非 LTR 型レトロトランスポゾン、Helitron、セントロメアリピートおよびその他に種類分けし、種類ごとで H3K9me2 の分布頻度に差があるかどうかを調べた。本研究で調査対象とした 283,848 か所の反復配列の内訳を表 3-2 に示した。対象の反復配列は、トランスポゾンを 139,452 か所 (うち 89,284 は MITE)、レトロトランスポゾンを 134,736 か所 (うち 118,512 は LTR 型および 16,224 は非 LTR 型)、Helitron を 761 配列、セントロメアリピートを 931 か所およびその他の反復配列を 7,968 か所含む。配列本体の全長の 90%以上にわたってピーク領域が検出された箇所の反復配列を種類ごとに集計し、ゲノム全体に存在する配列に対する割合を求めた (図 3-3)。ピーク領域が検出された箇所の割合が最も高かった反復配列はセントロメアリピートで、葯では 53.8%、葉では 48.2%の配列でピーク領域が検出された。転移因子であるレトロトランスポゾンとトランスポゾンで比較すると、レトロトランスポゾンでより多くの箇所でピーク領域が検出された。葯と葉それぞれで LTR 型レトロトランスポゾンでは 18.4%と 17.4%、非 LTR 型レトロトランスポゾンでは 15.2%と 13.0%の配列にピーク領域が検出された。一方、トランスポゾンの MITE はピーク領域が検出された配列の割合が特に低く、葯で 4.3%、葉で 2.7%であった。葯と葉で比較すると、どの配列でもピーク領域が検出された割合は葉よりも葯の方が高かった。以上の結果から、葯および葉の両方でセントロメアリピートやレトロトランスポゾンには H3K9me2 が分布しやすい一方、MITE には H3K9me2 が分布しにくいことがわかった。

### 葯と葉における H3K9me2 の分布の比較

葯と葉で検出されたピーク領域を比較し、両器官で共通もしくは器官特異的な H3K9me2 のピーク領域を決定することで、葯と葉のゲノムにおける H3K9me2 の分布パターンの特徴化を行った。葯あるいは葉において Input サンプルのリードがマッピングされていなかった領域を除き、器官特異的な擬陽性ピーク領域を排除した。次いで葯および葉で検出され

表3-2. イネゲノム情報から得られる  
反復配列の種類と配列数

| 配列種               | 配列数     |
|-------------------|---------|
| <u>トランスポゾン</u>    | 139,452 |
| └ MITE            | 89,284  |
| <u>レトロトランスポゾン</u> | 134,736 |
| └ LTR型            | 118,512 |
| └ 非LTR型           | 16,224  |
| Helitron          | 761     |
| セントロメアリピート        | 931     |
| その他               | 7,968   |

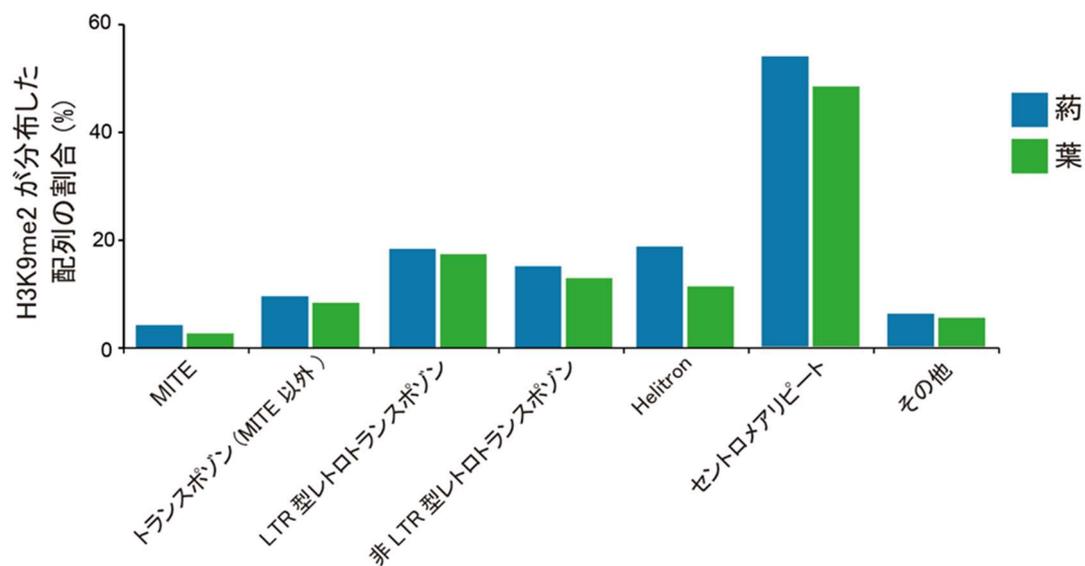


図3-3. 薬と葉におけるH3K9me2のピーク領域に存在する反復配列の割合. ゲノム上に存在する反復配列のうち、ピーク領域が配列本体に検出された配列数の割合を示した. 薬の結果は青, 葉の結果は緑で示した.

た共通のピーク領域や特異的ピーク領域を算出した。両器官の共通のピーク領域は 67,273,291bp だった (図 3-4a)。これは葉と葯でそれぞれ検出されたピーク領域の 80%近くを占める。器官特異的なピーク領域は葉よりも葯の方が広く、葯特異的なピーク領域は 18,117,879bp で、これは葯全体のピーク領域の 21.1%にあたる。葉特異的なピーク領域は 9,072,051bp で、葉で検出されたピーク領域の 11.9%だった。葯と葉で共通した H3K9me2 のピーク領域、もしくはどちらか一方の器官特異的なピーク領域に存在する反復配列を調べた (図 3-4b)。葯と葉の共通ピーク領域に存在する反復配列は 26,717 か所で、葯および葉にそれぞれ特異的なピーク領域に存在する反復配列は 7,715 か所と 3,915 か所で葉よりも葯の方が多く、H3K9me2 による反復配列の抑制作用は葉よりも葯で多くの反復配列に働いているといえた。

葯と葉で共通した H3K9me2 のピーク領域、葯および葉特異的なピーク領域に存在する反復配列を種類分けし、種類ごとの内訳を 3つの領域とゲノム全体で比較した (図 3-4c)。ピーク領域が検出された箇所の反復配列を MITE、トランスポゾン (MITE 以外)、レトロトランスポゾンおよびその他に種類分けし、それぞれの割合を図 3-4c に示した。葯特異的ピーク、葉特異的ピークおよび共通に存在するピーク内に存在する反復配列は、レトロトランスポゾンが最も多く、それは葯や葉を通じて観察された。ゲノム全体に存在する 283,848 か所の反復配列のうち、レトロトランスポゾンの割合が 47.5%なのに対し、葯と葉で共通したピーク領域のレトロトランスポゾンはピーク内の反復配列全体の 75.8%を占めた。これをフィッシャーの正確率検定を用いて検定すると、有意な差がみられた ( $p < 0.01$ )。同様に葯あるいは葉特異的なピーク領域の反復配列に、レトロトランスポゾンが占める割合は、それぞれ 51.4%、および 62.6%であり、いずれもゲノム全体の反復配列におけるレトロトランスポゾンの割合と比べて有意に多い ( $p < 0.01$ )。一方、反復配列の中で最も H3K9me2 の集積が少ない MITE は、ゲノム全体の反復配列の 31.5%を占めるが、葯と葉で共通したピーク領域内の反復配列に占める割合は 7.2%だった。ところが、葯特異的なピーク領域では 24.0%で、葉特異的なピーク領域の MITE の割合 12.8%に対して 2 倍と、有意に多い ( $p < 0.01$ )。トランスポゾンはゲノム内の分布の割合に対して 2つの器官のピーク領域間で検出された集積に大きな変化は見られなかった。レトロトランスポゾンはイネゲノムの中で最も H3K9me2 の修飾が多い、一方、葯と葉では共通に H3K9me2 によって修飾されている反復配列が多く、反復配列と遺伝子配列の特徴が際立っていた。

### H3K9me2 による反復配列の発現抑制

葯と葉における反復配列の発現量を調査し、H3K9me2 の分布と比較することで、H3K9me2 によるエピジェネティックな発現制御の効果について検証した。発現解析には 31,366 種類の反復配列由来のプローブと 9,563 種類の遺伝子由来のプローブを搭載した

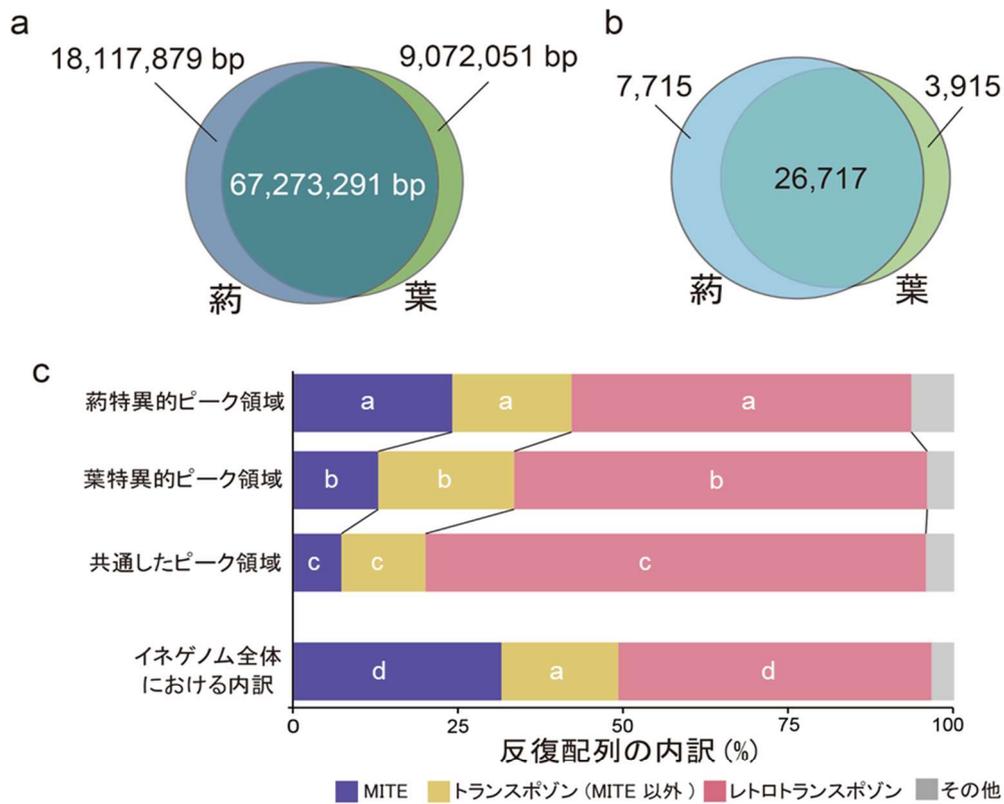


図3-4. 薬と葉におけるH3K9me2のピーク領域の比較。(a) 薬と葉で共通して検出されたピーク領域と、薬もしくは葉で特異的に検出されたピーク領域の全長をベン図で示した。薬で検出されたピーク領域を青、葉で検出されたピーク領域を緑で示した。(b) 薬と葉で共通もしくは器官特異的に検出されたピーク領域に存在する反復配列の配列数をベン図で示した。薬で検出されたピーク領域に存在した反復配列の数を青、葉で検出されたピーク領域に存在した反復配列の数を緑で示した。(c) 薬と葉で共通もしくは器官特異的に検出されたピーク領域に存在する反復配列の種類ごとの内訳を示した。MITEの割合を紫、MITE以外のトランスポゾンを黄色、レトロトランスポゾンを赤、その他の配列を灰色で示した。各反復配列の割合における異なるアルファベットは、それぞれのピーク領域における各反復配列が占める割合に有意な差( $p < 0.01$ )がみられたことを示す。

44k マイクロアレイを用いた (表 3-3). マイクロアレイ解析には ChIP-seq に供試したイネ品種の日本晴を用い, 第 5 葉期の葉と穂ばらみ期の葯から RNA を抽出したサンプルを 3 サンプルずつ解析に用いた. マイクロアレイの各プローブの蛍光量を対数化 ( $\log_2$ ) したものを発現量とし, サンプル間の発現量は Quantile 正規化によって補正した. マイクロアレイに搭載されたプローブの由来となる反復配列はゲノム中に複数のコピーを持つため, その平均が各配列の発現量として得られる. よって, 同じ配列を持つ反復配列のコピーの多くに H3K9me2 が分布する配列は, H3K9me2 の少ない配列に比べて発現量が低いことが予想される. H3K9me2 の発現抑制効果を検証するため, 同じ配列を持つコピーのうち H3K9me2 が分布するコピー数の割合とその配列の発現量の関係を調査した (図 3-5a). その結果, 3 つのグループ, すべてのコピーが H3K9me2 のピーク領域に存在しない配列 (0%), 半数以上のコピーがピーク領域に存在する配列 (50%) およびすべてのコピーがピーク領域に存在する配列 (100%) の発現量の平均には有意な差がみられなかった. これは H3K9me2 の分布がみられない配列でも, DNA メチル化や H3K9me2 以外のヒストン修飾による発現抑制が働いているためと考えられる. 一方, より多くのコピーに H3K9me2 が分布する配列では極端に高い発現量を示す配列の頻度が低いことから, マイクロアレイでも H3K9me2 の発現抑制効果を確認できることが示された.

次に, 葯と葉における H3K9me2 修飾による反復配列の発現制御の違いについて検証するため, 葯と葉で有意な発現量の差がみられた反復配列を選抜した. 発現量の差は学生検定の  $t$  検定によって求められた  $p$  値から, BH 法によって得られた FDR (false discovery rate :  $q$  値) を用いてその有意性を判定した. 葯と葉の間で 2 倍以上の発現量の差があり,  $q < 0.1$  の反復配列を選抜した (図 3-5b). マイクロアレイ解析の結果, 葯よりも葉で低い発現量を示した反復配列は 689 種類に対し, 葉よりも葯で低い発現量を示した反復配列は 1325 種類だった (図 3-5c). 発現解析から得られた, 葉よりも葯で低い発現量を示した反復配列が多い傾向は, ChIP-seq で得られた葉よりも葯で多くの反復配列に H3K9me2 が分布する傾向と一致した (図 3-4b). 反復配列は同じ配列を持つコピーがゲノム上に複数存在するため, マイクロアレイではコピーごとの発現量を調査できず, すべての反復配列について H3K9me2 による発現抑制の効果を検証できない. そのため, 葯と葉で有意な発現量の差がみられた配列のうち, 明確に H3K9me2 による抑制の効果がみられた反復配列を選抜した. 発現量に差がみられた配列のうち, 発現が低かった器官でのみ H3K9me2 のピーク領域が検出された反復配列を, H3K9me2 よって発現が抑制された配列として選抜した. その結果, 複数の反復配列において明確な H3K9me2 による発現抑制が確認され, 葉で 6 種類, 葯で 50 種類の反復配列が確認された (表 3-4).

表3-3. マイクロアレイに搭載した  
プローブの内訳

| 因子の種類           | プローブ数  |
|-----------------|--------|
| MITE            | 19,041 |
| トランスポゾン(MITE以外) | 5,294  |
| レトロトランスポゾン      | 2,581  |
| セントロメアリピート      | 2,413  |
| その他             | 2,037  |
| 反復配列の合計         | 31,366 |
| 遺伝子             | 9,563  |
| miRNA           | 864    |

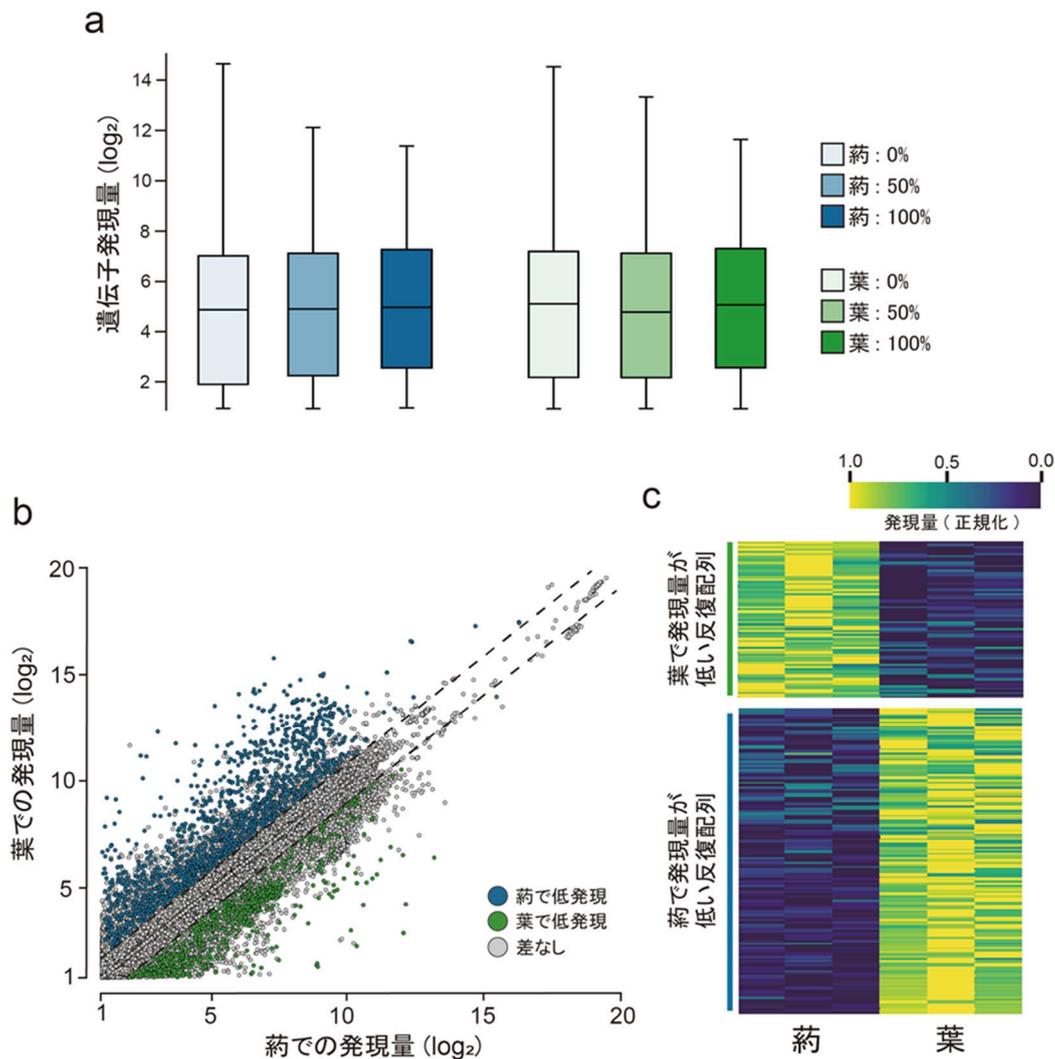


図3-5. 薬と葉における反復配列の発現量の比較. (a) マイクロアレイで発現量を調査した 31,266種類の反復配列を3つのグループ, **0%**:すべてのコピーがピーク領域に存在しない配列, **50%**:半数以上のコピーがピーク領域に存在する配列, **100%**:すべてのコピーがピーク領域に存在する配列 に分けてその発現量の頻度分布を箱ひげ図で示した. (b) 反復配列の薬での発現量をx軸, 葉での発現量をy軸にとってスキャッタープロットで示した. 点線は $y = x + 1$ と $y = x - 1$ を示している. 葉よりも薬で有意に発現が低かったものを青, 薬よりも葉で有意に発現が低かったものを緑で示し, 有意な差がみられなかったものは灰色で示した. (c) 薬と葉で発現量に有意な差がみられた反復配列の発現量をヒートマップで示した. 各反復配列において, 薬と葉でそれぞれ3サンプルにおける発現量の最大値が1, 最小値が0となるように正規化された.

表3-4. 薬と葉それぞれでH3K9me2による発現抑制が明確に確認できた反復配列

|                             | 反復配列のID            | 反復配列の種類                 | コピー数 | H3K9me2が分布していたコピー数 |   |    |
|-----------------------------|--------------------|-------------------------|------|--------------------|---|----|
|                             |                    |                         |      | 薬                  | 葉 | 共通 |
| 葉でH3K9me2による<br>発現抑制がみられたもの | ORSgTEMT00500443   | MITE Gajjin/Gaigin-like | 8    | 0                  | 1 | 0  |
|                             | ORSgTEMT00900863   | MITE Ditto-like         | 1    | 0                  | 1 | 0  |
|                             | ORSgTEMT02300012   | MITE-adh                | 6    | 0                  | 1 | 0  |
|                             | ORSgTEMT04800086   | MITE Stola-like         | 1    | 0                  | 1 | 0  |
|                             | ORSiTETM01100025   | SINE                    | 21   | 0                  | 1 | 0  |
|                             | ORSiTERTO0T00225   | レトロトランスポゾン              | 2    | 0                  | 1 | 0  |
|                             | ORSgTEMT00300064   | MITE Crackle-like       | 12   | 1                  | 0 | 0  |
|                             | ORSgTEMT00300125   | MITE Crackle-like       | 7    | 1                  | 0 | 0  |
|                             | ORSgTEMT00300129   | MITE Crackle-like       | 11   | 2                  | 0 | 0  |
|                             | ORSgTEMT00501343   | MITE Gajjin/Gaigin-like | 5    | 1                  | 0 | 0  |
| ORSgTEMT00600156            | MITE Castaway-like | 2                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT00600164            | MITE Castaway-like | 5                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT00600170            | MITE Castaway-like | 2                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT00600380            | MITE Castaway-like | 8                       | 2    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT00900039            | MITE Ditto-like    | 1                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT00900079            | MITE Ditto-like    | 2                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT00900748            | MITE Ditto-like    | 1                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT00900823            | MITE Ditto-like    | 1                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT00900945            | MITE Ditto-like    | 24                      | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT00900991            | MITE Ditto-like    | 4                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT00901057            | MITE Ditto-like    | 3                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT00901088            | MITE Ditto-like    | 2                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT00901458            | MITE Ditto-like    | 5                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT00901805            | MITE Ditto-like    | 4                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT01600575            | MITE-adh           | 1                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT01700088            | MITE-adh           | 3                       | 2    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT01700146            | MITE-adh           | 3                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT01700575            | MITE-adh           | 4                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT01700898            | MITE-adh           | 11                      | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT01700989            | MITE-adh           | 11                      | 1    | 0                  | 0 |    |
| 薬でH3K9me2による<br>発現抑制がみられたもの | ORSgTEMT01701179   | MITE-adh                | 10   | 1                  | 0 | 0  |
|                             | ORSgTEMT01701223   | MITE-adh                | 5    | 1                  | 0 | 0  |
|                             | ORSgTEMT01701452   | MITE-adh                | 1    | 1                  | 0 | 0  |
|                             | ORSgTEMT01701691   | MITE-adh                | 1    | 1                  | 0 | 0  |
|                             | ORSgTEMT01702182   | MITE-adh                | 1    | 1                  | 0 | 0  |
|                             | ORSgTEMT01702345   | MITE-adh                | 7    | 1                  | 0 | 0  |
|                             | ORSgTEMT01900034   | MITE-adh                | 6    | 1                  | 0 | 0  |
|                             | ORSgTEMT01900043   | MITE-adh                | 8    | 1                  | 0 | 0  |
|                             | ORSgTEMT03800009   | MITE Buhui-like         | 3    | 1                  | 0 | 0  |
|                             | ORSgTEMT03800020   | MITE Buhui-like         | 3    | 1                  | 0 | 0  |
| ORSgTEMT03800036            | MITE Buhui-like    | 8                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT03800085            | MITE Buhui-like    | 8                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT03800088            | MITE Buhui-like    | 2                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT03800089            | MITE Buhui-like    | 4                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT03800091            | MITE Buhui-like    | 4                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT03800094            | MITE Buhui-like    | 3                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT03800096            | MITE Buhui-like    | 6                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTEMT04800048            | MITE Stola-like    | 3                       | 2    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTETNOOT01124            | トランスポゾン            | 3                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgTETNOOT01903            | トランスポゾン            | 4                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSiTETM01100010            | SINE               | 30                      | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgRGRR00500001            | rRNA               | 6                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgRGRR00500004            | rRNA               | 2                       | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSiTRTA00000003            | テロメアリピート           | 16                      | 5    | 0                  | 0 |    |
| ORSgOTOT00000192            | 未分類反復配列            | 13                      | 1    | 0                  | 0 |    |
| ORSgOTOT00000485            | 未分類反復配列            | 6                       | 1    | 0                  | 0 |    |

### 反復配列へのヒストン修飾を介した遺伝子発現制御

前項までの結果から、葯と葉のゲノムでは H3K9me2 によって発現が抑制されている反復配列の数や種類に違いがあることが分かった。反復配列がエピジェネティックな制御を受けることにより、それが転移因子である場合、転移が抑制される。そのほかにも、遺伝子近傍に H3K9me2 による抑制を受けた反復配列が存在する場合、その遺伝子の発現に影響を与える可能性がある。図 3-6 は葯および葉特異的ピーク、両器官共通ピーク領域において検出された 6 種類の反復配列のうち、遺伝子のプロモーター（遺伝子上流 1kb 以内）に存在した配列数の割合を示している。遺伝子近傍の H3K9me2 の集積は 6 種類の反復配列全体として、葉特異的なピーク領域に検出された反復配列の割合が他のピークに対して大きい。遺伝子上流に存在する各反復配列の中で、葯や葉に共通して H3K9me2 修飾された因子が葯や葉特異的なピーク領域に存在する因子よりも少ないことは、各遺伝子の発現機構が葯や葉で異なっていることと関連することが予想される。

実際に H3K9me2 による遺伝子の発現制御について調べるため、イネ遺伝子発現データベースの Rice x Pro (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>) を用いて、葉と葯における遺伝子発現量の差を調査した (Sato et al., 2013)。葉における発現量は、昼 (12:00) と夜 (0:00) に採取された栄養成長期の葉のデータを用い、葯における発現量は、穂ばらみ期にあたる 0.7-1.0mm および 1.2-1.5mm の葯のデータを用いた。Rice x Pro に登録されているトランスクリプトームデータは、日本晴を用いたマイクロアレイ解析によって得られ、各条件で 3 反復ずつ行われている。器官特異的なピーク領域が検出された反復配列がプロモーターに存在する遺伝子は、葯と葉でそれぞれ 435 個と 398 個選抜され、これらのうち 269 個と 256 個については Rice x Pro を用いた発現量の追跡調査ができた。これらの遺伝子について、葯と葉における遺伝子発現量を比較し、両器官の間で有意な差 ( $q < 0.05$ ) がみられた遺伝子を選抜すると、葯で低く発現する遺伝子は 73 個で、葉で低く発現する遺伝子は 127 個だった。これらの遺伝子はプロモーター領域に存在する反復配列が H3K9me2 修飾を受けたことで発現が抑制されている遺伝子の可能性がある。その証拠として、葉で発現抑制がみられた 127 遺伝子には、細胞周期の調整に関わる F-box ドメインを含む遺伝子 (Os07g0535700 および Os11g0209600) が含まれていた。図 3-7 には、これらの遺伝子のうち、葯と葉における遺伝子発現量の差が特に顕著 ( $q < 0.001$ ) だったものを示した。穂ばらみ期の葯では小胞子の発達に伴って細胞分裂が起こるが、一般的に成熟しきった葉における細胞分裂は活発ではない。このように、その器官で発現する必要のない遺伝子のいくつかは、プロモーター領域に存在する反復配列を介して発現が抑制されていることが示され、その数は葯よりも葉の方が多いたことが分かった。

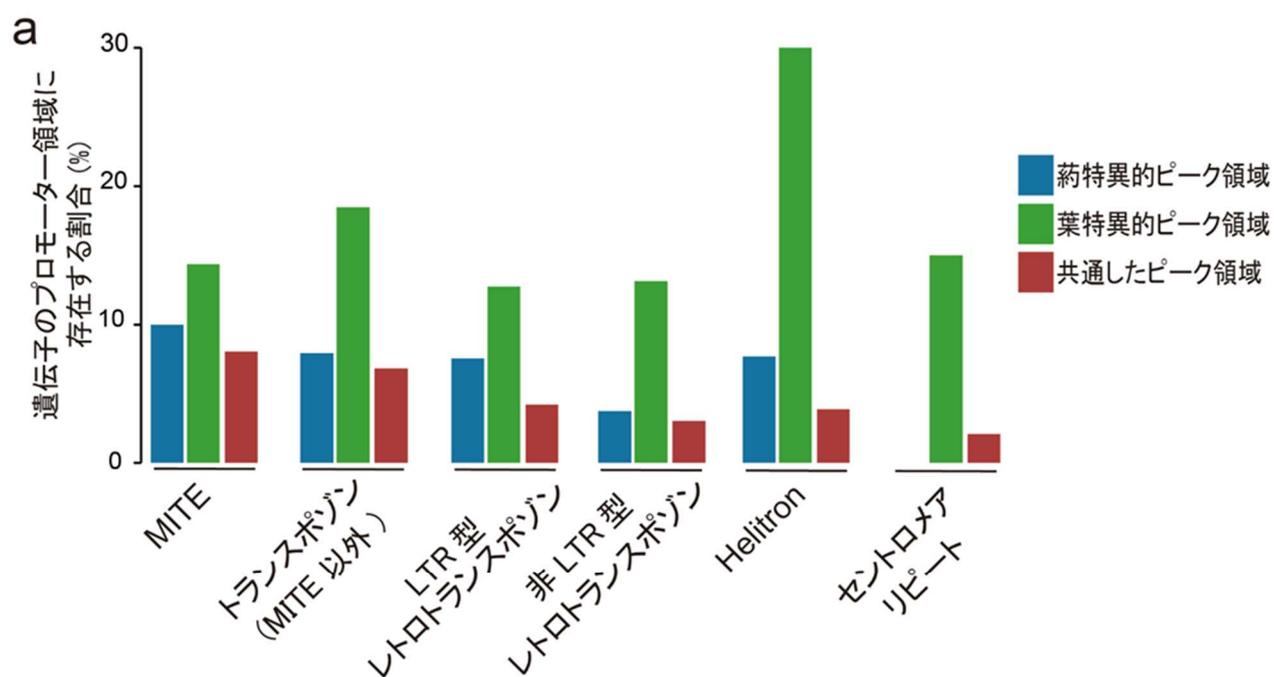


図3-6. H3K9me2のピーク領域内に存在する反復配列のうち遺伝子の近傍に存在するものの割合. 葯と葉で検出されたピーク内の反復配列のうち、遺伝子のプロモーター領域 (上流1kb) に存在する箇所の割合を示した. 葯特異的なピーク領域の結果を青, 葉特異的なピーク領域の結果を緑, 葯と葉で共通したピーク領域の結果を赤で示した.

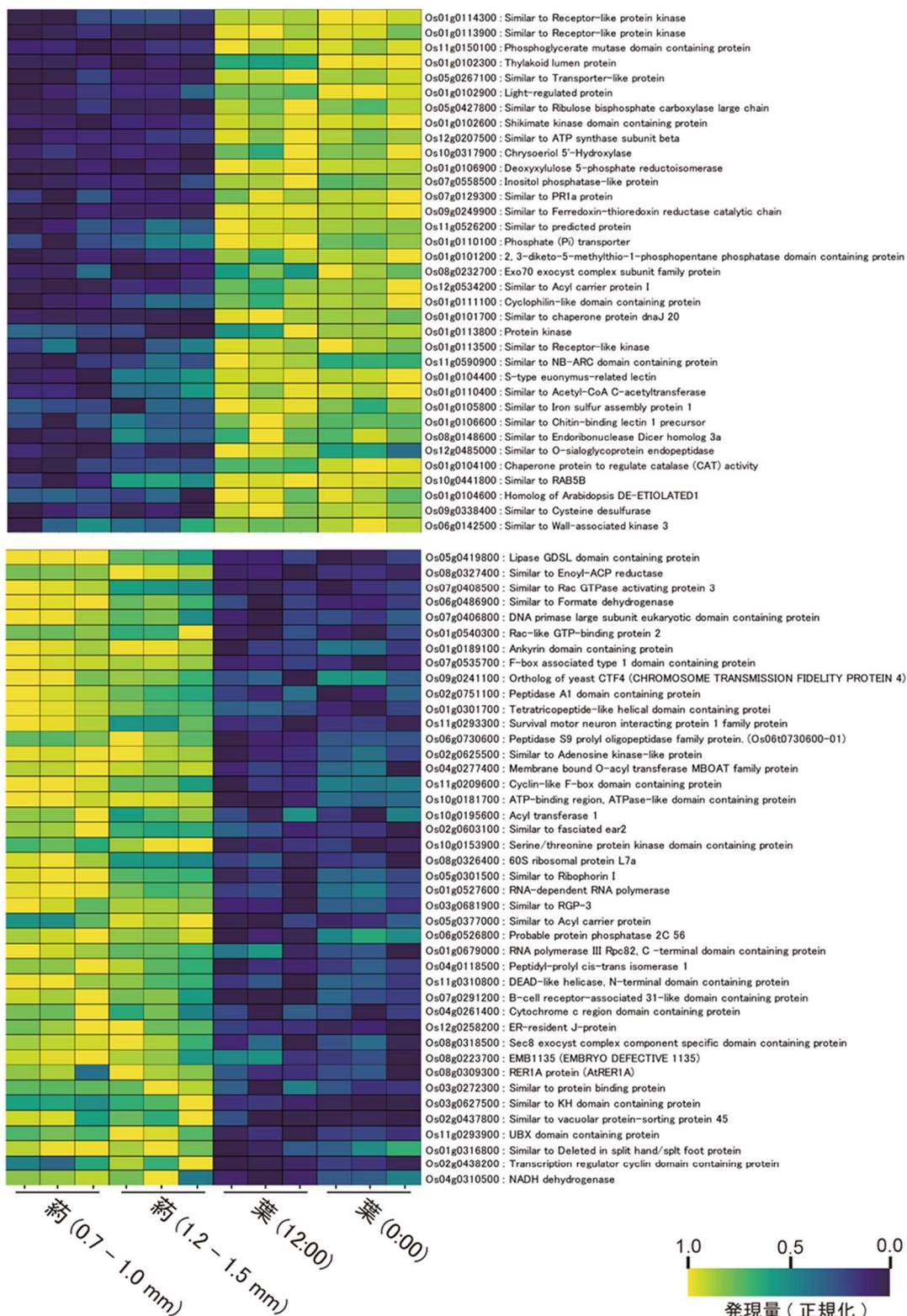


図3-7. プロモーターにH3K9me2と相互作用する反復配列が存在する遺伝子の葯と葉における発現量を示すヒートマップ。葯もしくは葉で特異的にH3K9me2との相互作用が検出された反復配列がプロモーターに存在する遺伝子のうち、葯と葉における発現量の差が特に顕著 ( $q < 0.001$ ) だったものを示した。遺伝子発現量は葯と葉の計12サンプル間で最も高い値が1, 低い値が0になるように正規化して示した。

## 考察

### イネゲノムにおける H3K9me2 修飾パターン

本研究では、イネの葍と葉のゲノムにおける H3K9me2 の分布パターンについて調査を行った (図 3-1b)。大まかな傾向は葍と葉で一致しており、H3K9me2 の集積がよくみられた領域は、ペリセントロメア領域や第 4 染色体の短腕など、Cheng ら (2001) が染色体の顕微鏡観察から推定したヘテロクロマチン領域と一致していた。H3K9me2 はヘテロクロマチン構造の形成に関わるため、本結果はイネのクロマチン構造を正確に反映しているといえる (Richards & Elgin, 2002)。イネと同じモデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) もヘテロクロマチン領域に H3K9me2 が集積するが、イネのヘテロクロマチン領域はシロイヌナズナに比べて不連続でゲノム上に散在しているという相違点がある (Cheng et al., 2001; Roudier et al., 2011)。この傾向は本結果でも得られ、セントロメア領域以外にも、H3K9me2 が狭い範囲に多く集積している領域がゲノム上に散在してみられた (図 3-1c)。以上で述べたイネゲノム全体における H3K9me2 分布の特徴は、葍と葉のゲノムにおいて大まかに一致していた。

葍と葉における H3K9me2 のピーク領域のパターンについて、遺伝子、反復配列および遺伝子間領域に分けて調査すると、H3K9me2 のピーク領域が占める割合は、遺伝子間、反復配列、遺伝子領域の順で高かった (図 3-2b)。遺伝子間領域と遺伝子領域では H3K9me2 の集積頻度に大きな差がみられ、葍と葉において遺伝子間領域の全長のうちおよそ 50% に H3K9me2 のピーク領域がみられた。一方で、遺伝子領域の全長に占めるピーク領域の割合は 1% 未満にとどまっている。反復配列領域では、全長の 25% にわたって H3K9me2 のピーク領域が検出されたが、反復配列の種類ごとでその頻度は大きく異なっていた (図 3-3)。イネゲノムの反復配列全体の数に対する平均的な H3K9me2 の集積頻度がおよそ 20% に対して、セントロメアリピート 931 箇所に対する実際の H3K9me2 の集積頻度はおよそ 50% と、高い値を示した。この結果は Neumann ら (2007) が報告した、イネのセントロメアリピートには H3K9me2 が集積する傾向と一致する。反復配列のうち転移因子では、Helitron やレトロトランスポゾンにおいてセントロメアリピートに続き高い頻度で H3K9me2 の集積がみられた一方、MITE やそのほかのトランスポゾンでは H3K9me2 の集積頻度は低かった。同様に、Kowar ら (2016) はビート (*Beta vulgaris*) における ChIP-seq 解析から、H3K9me2 修飾は LTR 型のレトロトランスポゾンと En/Spm タイプのトランスポゾンに集中していることを報告している。以上のような、反復配列の種類ごとで H3K9me2 修飾の起こりやすさが異なる原因は、H3K9me2 修飾が集積される仕組みにあると予想される。

SET ドメインを持つタンパク質は H3K9me2 を集積する働きを持つ (Shi et al., 2015)。シロイヌナズナが持つ SET ドメインタンパク質遺伝子の *SUVH4* はメチル化された DNA と結合することが知られており、H3K9me2 の集積は DNA メチル化をターゲットにして起こるといわれている (Johnson et al., 2007)。イネの SET ドメインタンパク質遺伝子の *SDGs*

(*SET DOMAIN GROUP*) は複数存在し、特に *SDG710* は幼穂で顕著な高発現を示すなど、それぞれ作用する器官や発達ステージが異なる (Qin et al., 2010). しかし、それぞれの *SDGs* 遺伝子の機能的な特徴化は行われていないため、どのように H3K9me2 の集積パターンが決定するかはわかっていない (Shi et al., 2015; Zhang et al., 2021). 本結果はイネゲノムにおける反復配列への明確な H3K9me2 修飾パターンに関するデータを得ており、これは *SDG* 遺伝子の特徴化を含むヒストン修飾と遺伝子発現制御メカニズムを解明するうえで重要な情報といえる.

### 葯と葉における反復配列の H3K9me2 修飾パターンの違い

葉と葯でそれぞれ検出された H3K9me2 のピーク領域を比較し、両器官で特異的あるいは共通のピーク領域を求めると、葯と葉で H3K9me2 のピーク領域のほとんどが一致していることが分かった (図 3-4a). 器官特異的ピーク領域に注目すると、葯における H3K9me2 のピーク領域の全長は葉のおよそ 2 倍であった. 減数分裂初期の葯では、ゲノム全体で H3K9me2 の修飾量が増加することが知られており、本研究で用いた穂ばらみ期の葯でもヒストン修飾レベルが高く維持されていることが示された (Liu & Nonomura, 2016). 葯と葉で検出されたピーク領域に存在する反復配列に注目すると、ピーク領域が広い分、葉よりも葯で多くの反復配列に器官特異的な H3K9me2 の集積がみられた (図 3-4b). この結果から、葉よりも葯で反復配列の抑制が強く働いていることが予想され、それはマイクロアレイによる網羅的な発現量解析によっても確認された (図 3-5). 葯と葉で検出された H3K9me2 のピーク領域に存在した反復配列を、MITE, MITE 以外のトランスポゾン, レトロトランスポゾン, その他の反復配列に分け、それぞれの配列数の内訳を比較すると、その割合はピーク領域ごとで異なっていた (図 3-4c). まず、ゲノム全体における上記 4 種類の反復配列の内訳と、両器官で共通もしくは特異的なピーク領域における内訳を比較すると、いずれのピーク領域でもレトロトランスポゾンが多く、MITE が少ない傾向にあった. しかし、ピーク領域間で比較すると、レトロトランスポゾンの割合は共通、葉特異的、葯特異的なピーク領域の順に多く、逆に MITE は葯特異的、葉特異的、共通ピークの順で多かった.

このように、葯と葉で共通もしくは特異的なピーク領域では、H3K9me2 が集積しやすい反復配列の種類に差がみられ、葉と葯はそれぞれ特異な H3K9me2 による反復配列の抑制パターンを持つことが示された. RNA ポリメラーゼ IV の転写によって作られる反復配列由来の二本鎖 RNA は、siRNA を産生することで他の配列の発現制御に働く (Saze et al., 2012). そのため、葉と葯でみられた H3K9me2 の集積パターンの違いは器官特異的な遺伝子発現制御パターンの違いを生み出すことが考えられる. この具体的な事例として、Jung ら (2015) はシロイヌナズナの生殖細胞で特異的に発現する遺伝子の発現が、体細胞では siRNA を介したエピジェネティックな制御によって抑制されていることを報告している.

このほかに、反復配列に対するエピジェネティックな制御の変化が他の因子の発現パタ

ーンに影響する例として、反復配列のエピジェネティックな抑制は近傍の遺伝子の発現に影響する場合がある。特に遺伝子のプロモーターに存在する反復配列への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報告されている (Wei et al., 2014; L. Xu et al., 2020a; S. Zhang et al., 2021)。例えば Mao ら (2015) は、トウモロコシの乾燥感受性系統で *ZmNAC111* のプロモーター領域に MITE が挿入されていることを発見した。また、同氏らは挿入された MITE が DNA メチル化や H3K9me2 修飾を受けることで *ZmNAC111* の発現が抑制されていることを報告した (Mao et al., 2015)。本研究で明らかになった、葯と葉の H3K9me2 の集積パターンの違いは、反復配列の近傍遺伝子発現パターンに影響を及ぼしていることが予想された。実際に、ピーク領域の反復配列のうち、遺伝子のプロモーターに存在する配列数の割合を調査すると、葉で特異的なピーク領域に存在する反復配列においてその頻度が最も高かった (図 3-6)。遺伝子発現量を調査すると、プロモーターに存在する反復配列への H3K9me2 修飾によって発現が抑制されている近傍遺伝子は葉でより多く確認された (図 3-7)。以上のことから、葉では葯よりも高い割合で反復配列を介した H3K9me2 による遺伝子の抑制が起こることが示された。また、プロモーター領域だけでなく、遺伝子領域において検出された H3K9me2 のピーク領域の比較からも、葯よりも葉で H3K9me2 による遺伝子の抑制が盛んであることが分かる (図 3-2c)。

本研究では、イネで初めて葯と葉における H3K9me2 の分布の違いに着目した解析を行い、それぞれの器官で特徴的なパターンを見出した。本結果をもとに、ストレス条件下における発現変動などのトランスクリプトームデータを重ね合わせることで、より詳細な発現制御機構に関する知見の得られることが期待できる。

## 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

### 緒論

植物は固着性の生物で、その生活環を通して移動することができず、高温、乾燥、塩および低温などの外因性のストレスに常にさらされる。イネ (*Oryza sativa* L.) は熱帯作物であり、低温に弱いことが知られている。特に、花粉発達の初期段階にあたる穂ばらみ期の葯は低温によるダメージを受けやすく、不可逆的な花粉不稔が発生する (Hayase et al., 1969)。イネの栽培が可能な高緯度地域では、低温による花粉不稔が原因となっており、米の収穫量が大幅に減少するため、低温耐性を付与したイネ品種の作出が不可欠である。日本では、冷害による花粉不稔が米の収量低下の大きな要因となっており、その脅威は今後も続くことが予測されている (下野 2018)。持続可能な食料生産のためには、穂ばらみ期の耐冷性に関する研究が重要であり、イネの穂ばらみ期耐冷性に関連する量的遺伝子座 (QTL) が数多く同定されている (Andaya & Mackill, 2003; Dai et al., 2004; Endo et al., 2016; Kuroki et al., 2007; 黒木ら., 2011; Li et al., 1997; Li et al., 2021; Oh et al., 2004; Saito et al., 2001, 2010; Shimono et al., 2016; Shirasawa et al., 2012; Suh et al., 2010; Sun et al., 2019; Takeuchi et al., 2001; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2017; Zhu et al., 2015)。

穂ばらみ期のイネの葯以外にも、植物の低温応答メカニズムに関する研究は多く行われ、耐性に関与する遺伝子が複数単離されている。特に CBF/DREB や NAC ファミリーに属するストレス応答性の転写因子は、低温だけでなく乾燥や塩ストレスに応答し、下流の遺伝子発現を制御することで耐性を誘導することが知られている (Zhang et al., 2013)。これらのストレス応答性の転写因子は過剰発現によって強い耐性を誘導することができるが、ほとんどの場合、生育の遅延を同時に引き起こす。例えば、イネの NAC ファミリー遺伝子である *OsNAC6* は、過剰発現によって強力な低温耐性を誘導することができるが、過剰発現変異体は同じ生育期間を経た野生型に比べて草丈が 20 - 40% も低かった (Nakashima et al., 2007)。このように、ストレス耐性と生育はトレードオフの関係にあり、過剰なストレス応答の誘導を利用したストレス耐性作物の作出は容易ではない (Kudo et al., 2017; Nakashima et al., 2014)。

以上のように、植物のストレス応答に関する研究は盛んに行われてきたが、完全な解明にはほど遠く、ましてやその完全な制御は実現していない。そのため、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、穂ばらみ期の葯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 (Ishiguro et al. 2014)。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 (石黒 2015)。Ishiguro ら (2014) の研究では複数のイ

ネ品種を供試しており、複数の耐冷性品種と感受性品種の比較から、反復配列にみられた低温鈍感力と低温耐性の関係を明らかにしている。従来の穂ばらみ期耐冷性に関わる研究では、低温感受性の程度に明確な差がみられる2品種の対比によって行われることが多かった。Ishiguroら(2014)のように、多様な低温感受性程度を示す複数のイネ品種を用いた研究は、穂ばらみ期耐冷性においてより普遍的な事実を明らかにできる。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

### 植物材料

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, *indica* 品種 (Kasalath) 1 品種, 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 (表 4-1)。I33 と A58 の RIL は帯広畜産大学の 大西一光博士より分譲いただいた。材料の生育は第 2 章と同様に行い, 1 つのワグネルポット (1/5000 100 m<sup>2</sup>) に 20 個体を播種し, 分けつを切ることによって主幹のみを維持した状態で 25/19°C (昼夜サイクル) の温室内で栽培を行った。減数分裂後の小胞子が 1 核期の初期から中期の間にある穂ばらみ期に人工気象器を用いて 12°C, 4 日間の低温処理を行った。穂ばらみ期の判定は葉耳間長 (Auricle Distance : AD) から推定し, 北海道の品種では AD = -2 ~ -4 cm, そのほかの品種では D = 0 ~ 2 cm を穂ばらみ期とした。RNA サンプルを得るために, 低温処理終了後, もしくは同程度の生育時期にあたる無処理の植物から葯を採取し, 直ちに -80°C で保存した。葯の採取は一次枝梗の先端から 3, 4, 5 番目の位置にある穎花から行った。マイクロアレイに供試するサンプルは各品種および各処理区において, 複数の個体から得られた葯をバルクにして 1 サンプルとし, それぞれ別の個体から得られた 2 サンプルを用意した。RNA-seq に供試するサンプルは同様に, 複数の個体から得られた葯をバルクにしたものを 3 つ用意した。また, 花粉稔性を調査するため, 低温処理後の一部の個体は温室環境に戻して生育が続けられた。

### 花粉稔性の調査

開花期にあたる各品種の穂の一次枝梗の先端から 3, 4, 5 番目の位置にある穎花から葯を採取し, 花粉稔性の調査に供試した。花粉粒はルゴールヨウ素 (KI-I2) 溶液で染色した。この溶液は, 稔性のある花粉を強く染色し, 不稔花粉は染色されない。花粉稔性は, 各品種, 各生育条件において, 全体の花粉粒数に対する稔性花粉粒数の割合として算出した。花粉稔性は少なくとも 9 穎花ずつサンプリングし, その平均を各品種および各生育条件における花粉稔性とした。

### マイクロアレイプローブのデザイン

本実験では反復配列由来のプローブを 23,103 個, 遺伝子および pre-miRNA 由来のプローブを 37,955 個搭載した 8x60k マイクロアレイを設計した(表 4-2)。反復配列由来のプローブは Ishiguro ら (2014) の設計した 4x44k マイクロアレイから, 同研究で検出した蛍光

表4-1. 本研究で用いた供試材料

| 品種名         | 遺伝的背景                            | 原産地      |
|-------------|----------------------------------|----------|
| 台中 65 (T65) | <i>temperate japonica</i>        | 台湾       |
| 北海PL9 (PL9) | <i>temperate japonica</i>        | 日本 (北海道) |
| A58         | <i>temperate japonica</i>        | 日本 (北海道) |
| コシヒカリ       | <i>temperate japonica</i>        | 日本 (福井)  |
| 北海287       | <i>temperate japonica</i>        | 日本 (北海道) |
| 日本晴         | <i>temperate japonica</i>        | 日本 (愛知)  |
| きらら397      | <i>temperate japonica</i>        | 日本 (北海道) |
| ササニシキ       | <i>temperate japonica</i>        | 日本 (宮城)  |
| 富国          | <i>temperate japonica</i>        | 日本 (北海道) |
| Lambayeque1 | <i>tropical japonica</i>         | ペルー      |
| Kasalath    | <i>indica</i>                    | インド      |
| R45         | RILs (A58 x I33 F <sub>7</sub> ) | -        |
| R85         | RILs (A58 x I33 F <sub>7</sub> ) | -        |
| R75         | RILs (A58 x I33 F <sub>7</sub> ) | -        |

表4-2. 60Kマイクロアレイに搭載されたプローブの内訳

| プローブの由来    | プローブ数  |
|------------|--------|
| MITEs      | 14,127 |
| レトロトランスポゾン | 1,227  |
| トランスポゾン    | 3,787  |
| セントロメア配列   | 2,041  |
| 未分類リピート配列  | 1,121  |
| その他        | 710    |
| 反復配列の合計    | 23,013 |
| 遺伝子        | 37,955 |
| Total      | 60,968 |

シグナル値が 100 以上の、十分に発現していた反復配列を選抜し、搭載した。遺伝子および pre-miRNA 由来のプローブは、Agilent 社のカタログアレイ (G2519F) のものをすべて搭載した。

### マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析に用いた total RNA は、液体窒素による凍結、粉碎後、TRIzol® Plus RNA purification Kit (Life Technologies 社, アメリカ, カルフォルニア) を用いて抽出・精製した。RNA は各品種、試験区における複数の植物から得た葯をバルクにして抽出したものを 1 サンプルとして 2 サンプルずつ解析に供試した。抽出した RNA の濃度は Nano Drop ND-2000 (Thermo Fisher scientific 社, アメリカ, マサチューセッツ) で計測し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社, アメリカ, カルフォルニア) で品質チェックを行った。マイクロアレイ解析には 1 サンプルあたり、100ng の RNA を用いた。RNA サンプルに One-color spike-mix を追加し、cyanine-3 (Cy3)-CTP を含む Quick Amp Labeling Kit, One-Color (Agilent 社) を用いてラベル化を行った。RNA サンプルから合成した 600 ng の cRNA をフラグメント化し、65°C で 17 時間反応させてマイクロアレイプローブとのハイブリダイゼーションを行った。その後、スライドの洗浄を行い、Agilent Technologies 社の C バージョンスキャナを用いて蛍光を検出した。読み取られた蛍光シグナルデータは Agilent Feature Extraction software (Agilent 社) によって数値化された。得られた全 56 サンプルのシグナルデータは、R (4.1.0) を用いて  $\log_2$  対数化され、R 内のライブラリーである limma (3.48.3) を用いた Quantile Normalization 法によって正規化された (Ritchie et al., 2015)。

### RNA-seq

RNA-seq に供試したサンプルはマイクロアレイ解析と同様の方法で葯から抽出された RNA を用いた。RNA-seq には各品種および各処理区において複数の植物から得た葯をバルクにしたものを 1 サンプルとし、3 サンプルを用いた。抽出した RNA サンプルは strand-specific ライブラリー調製法 (dUTP 法) によってライブラリー調整が行われた。ライブラリー調整の後、NovaSeq6000 (illumine, アメリカ, カルフォルニア) を用いて 150bp のペアエンド解析が行われた。ライブラリーの調整からシークエンスの工程は Rhelixa (日本, 東京) の委託解析によって進められた。シークエンス解析によって得られたデータから、kallisto (0.46.2) を用いて遺伝子ごとの発現量を求めた (Bray et al., 2016)。この時、ブートストラップは 100 を指定し、発現量は TPM (transcripts per million) に補正され、各サンプル中にショートリードが 100 万個存在するときに各遺伝子にマップされるリードの数として示された。kallisto から出力されたファイルをもとに R (4.1.0) のライブラリーである

sleuth (0.30.0) を用いて各品種の低温処理区と無処理区、および品種間における発現量の比較を行った (Pimentel et al., 2017). 各品種における処理区間の発現量の差は尤度比検定を用いて統計的に検定した. RNA-seq 解析のリファレンスは RAP-DB が公開している IRGSP-1.0 (2021-05-10)を用いた (Kawahara et al., 2013; Sakai et al., 2013).

### 遺伝子のアノテーションおよび GO 解析

本研究で選抜された遺伝子のアノテーションは RAP-DB が提供している IRGSP-1.0 (2021-05-10) をもとに行った. 本研究で選抜した遺伝子から、遺伝子の機能についてまとめた Fun rice genes (<https://funricegenes.github.io/>) をもとに、過去に低温ストレス関連遺伝子として報告されている遺伝子を選抜した (Yao et al., 2018). 選抜された遺伝子群の GO 解析は The Gene Ontology Consortium が提供する PANTHER (<http://geneontology.org/>) (Mi et al., 2019) を用いた. GO 解析では、公開されている GO データ (version: 10.5281/zenodo.5228828, Released : 2021-08-18) をもとに、本研究で選抜した遺伝子群につけられた GO の内訳と全遺伝子につけられた GO 内訳を比較した. フィッシャーの正確率検定によって、選抜した遺伝子群に有意 ( $q < 0.05$ ) に多くみられた GO を検出した. GO 解析の結果は、REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) (Supek et al., 2011) と Cytoscape (3.9.0) (Shannon et al., 2003) を用いてネットワークとして可視化した.

## 結果

### マイクロアレイに供試したイネ 14 品種の花粉稔性

表 4-1 に示した 14 品種を用いて実験を行った。供試する 14 品種は北海道で育成された品種を中心に、国内で育成された 8 品種のほかに、台湾で育成された T65 や耐冷性品種として知られるペルーの在来種である Lambayeque1 を含む。そのほかにはインドの在来種である I33 と北海道の品種 A58 の組換え自殖系統である R45, R75 および R85 を供試した。以上のように本実験に供試する 14 品種は遺伝的に多様な集団であり、様々な程度の耐冷性を示すことが期待された。供試材料は第 2 章と同様に生育を行い、穂ばらみ期に 12°C4 日間の低温処理を行った。低温処理後、温室条件(昼:25, 夜:19°C)に戻し、出穂した個体の花粉稔性を調査した。花粉稔性の調査も第 2 章と同様に行い、各一次枝梗の上から 3, 4, 5 番目の穎花を採取し、各品種、低温処理個体および無処理個体それぞれ 3 個体以上について調査を行った。調査した 14 品種の花粉稔性は、無処理区では 70.2 % から 94.2 % の間で分布し、低温処理区では 2.2% から 87.9% と分布の範囲が広がった(図 4-1)。低温処理区で最も花粉稔性の低い品種は R75 で、最も高い品種は T65 だった。

本章で用いた 14 品種のうち一部は、第 2 章でも用いているが、品種によって各条件下における花粉稔性に大きな違いがみられた(第 2 章, 図 2-1)。特に T65 は、第 2 章の結果では低温区における花粉稔性が 29.7% を示したが、本結果では 87.9% を示し、14 品種中最も高い値を示した。本章の実験で用いた植物は第 2 章とは異なり、日照条件や制御できない細かな温度変化などの生育条件によって、花粉稔性に差がみられた。以降に行うマイクロアレイ解析は花粉稔性を調査した個体と同じ生育条件で育成された個体を用いており、図 4-1 で示された花粉稔性と遺伝子発現量を対応させて実験を行った。

### マイクロアレイ解析による品種間の発現変動

低温処理を施した穂ばらみ期の葍全体の転写パターンを、無処理の葍との比較に基づいて調査するため、マイクロアレイ解析を行った。解析に用いたマイクロアレイは、37,955 個の遺伝子由来のプローブと 23,013 個の反復配列由来のプローブを含む約 60,000 個の DNA 因子を搭載したものを独自に設計した。このマイクロアレイにより、ほぼすべてのイネゲノムの転写産物を網羅的に調査することが可能である(表 4-2)。葍のサンプルは花粉稔性を調査した個体と同一ポットに栽培された同じ品種からの個体群を 2 つに分け、それぞれ穂ばらみ期の低温処理直後の個体と無処理の個体から、花粉稔性サンプルと同様に一次枝梗の上から 3, 4, 5 番目の穎花から葍を集め、RNA を抽出した。これにより、各処理 2 回の生物学的反復実験を行うことができる。

マイクロアレイの各プローブの蛍光量を対数化 ( $\log_2$ ) したものを発現量とし、全 56 サンプルでの発現量は Quantile 正規化によって補正した。各品種で低温処理区と無処理区に

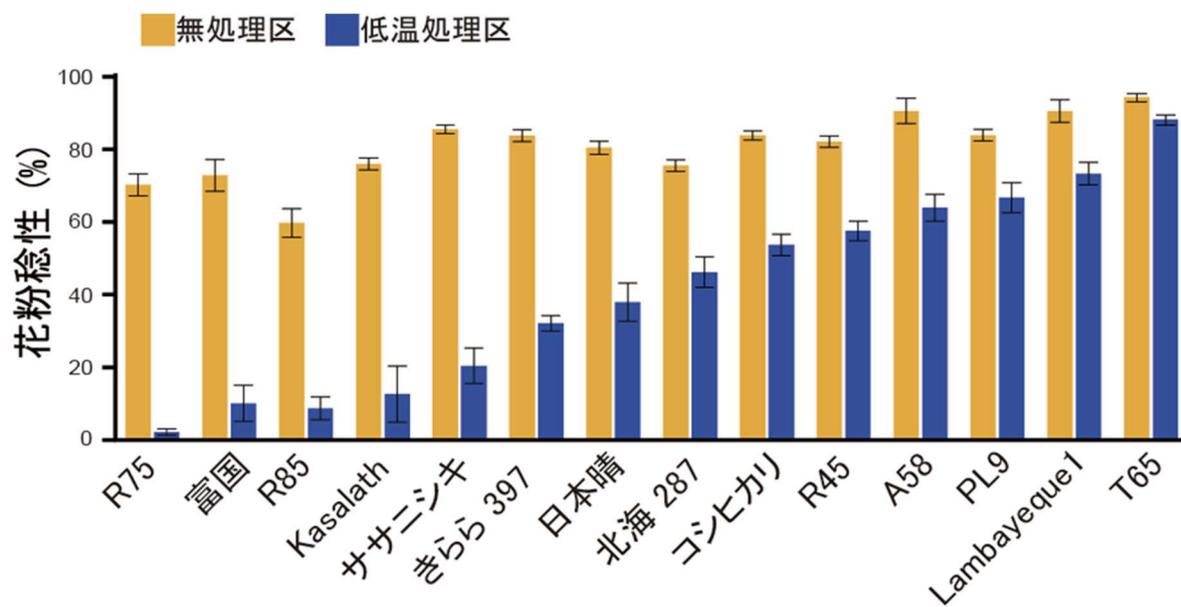


図4-1. 供試14品種の無処理区および低温処理区における花粉稔性. 無処理区における花粉稔性を黄色, 低温処理区における花粉稔性を青で表した. エラーバーは標準誤差を示す.

おける発現の変動とその相関をスクアッタープロットに表した (図 4-2). 各品種の低温処理区と無処理区間の発現量の相関は  $r^2 = 0.83$  (A58) から  $r^2 = 0.94$  (富国ほか 5 品種) と高い決定係数を示した. 一方で各品種には  $y = x$  の対角線の範囲から外れたプロットも多くみられ, 品種ごとに独自のスクアッタープロットの形状を示した. これらのスクアッタープロットのパターンからも, 品種間で低温に対する反応の違いがよく表れている.

2 反復間の各プローブにおける発現量のばらつき (Coefficient of Variation : CV) とその平均値を比較すると, 低い発現量を示すプローブほど反復間のばらつきが大きい傾向にあった (図 4-3a). 一般的に蛍光の弱いプローブほど安定せず測定精度が悪いため  $\log_2 < 5$  のプローブは定量できないと判定した. 各処理区のいずれかで発現があった因子から, 低温処理によって発現が変動した因子 (Differential Expressed Genes : DEGs) を検出し, その分類を行った. まず, DEG は同一品種の同じプローブで処理区間の発現量の違い (Fold Change : FC) が 2 倍以上の因子を選抜した.  $FC \geq 2$  の変化を示す因子群は 2 つのタイプに分類でき, 低温処理で発現量が上昇する Up-regulated expression (Ure) タイプ, 下降する Down-regulated expression (Dre) タイプとした. 14 品種それぞれで 2 つのタイプに分類された因子数は Ure : 2,193 – 6,235, Dre : 2,486 – 6,945 となった (図 4-3b). これらの分類は以降の分析において用いられる.

## 2 つのタイプの DEG における品種間の共通性

前項で分類した 2 つのタイプの発現変動因子に関して, 供試 14 品種間で共通した遺伝子数を図 4-4 に示す. 7 品種以上で共通した DEG は Ure : 1151 遺伝子, Dre : 1225 遺伝子であり, 低温によってイネ品種で共通に変化する薬発現因子が多数存在することが明らかになった. さらに共通遺伝子数は対象品種数の増加に伴い減少するが, Ure と Dre においてその数が 100 遺伝子以下になるのは 12 品種の共通を超えてからになる (図 4-4 左側). 一方, 反復配列は遺伝子に比べて共通性が低く, 6 品種を超えると 100 因子以下となる (図 4-5). 14 品種すべてで共通した DEG は, Ure タイプが 25 因子, Dre タイプが 26 因子で, すべて遺伝子であった (表 4-3, 4). これらの遺伝子は薬が低温ストレスに遭遇したとき, 普遍的に応答する遺伝子群であると考えられ, 特に発現の変動が大きいものは, 穂ばらみ期のイネにおける低温応答マーカーとして利用できるかもしれない. 14 品種すべてで発現が上昇した 25 因子のうち, ホメオドメインを含む Os06g0728700 は 14 品種全体で発現の上昇が最も大きく, 7 品種で 10 倍以上発現が上昇している (表 4-3). Os06g0728700 はこれまで, 明確に低温ストレスとの関連が示されていない遺伝子である. そのほかに, ストレス応答に関わる転写因子として知られる NAC ファミリーの *OsNAC5* (Os11g0184900) や WRKY ファミリーの *WRKY69* (Os08g0386200) はそれぞれ 10 品種以上で 5 倍以上発現が上昇している. 同じく Dre タイプでは, セリン/スレオニン特異的キナーゼ様タンパクをコードする Os06g0285400 の発現が最も大きく減衰しており, Lambayeque1 および日本晴を

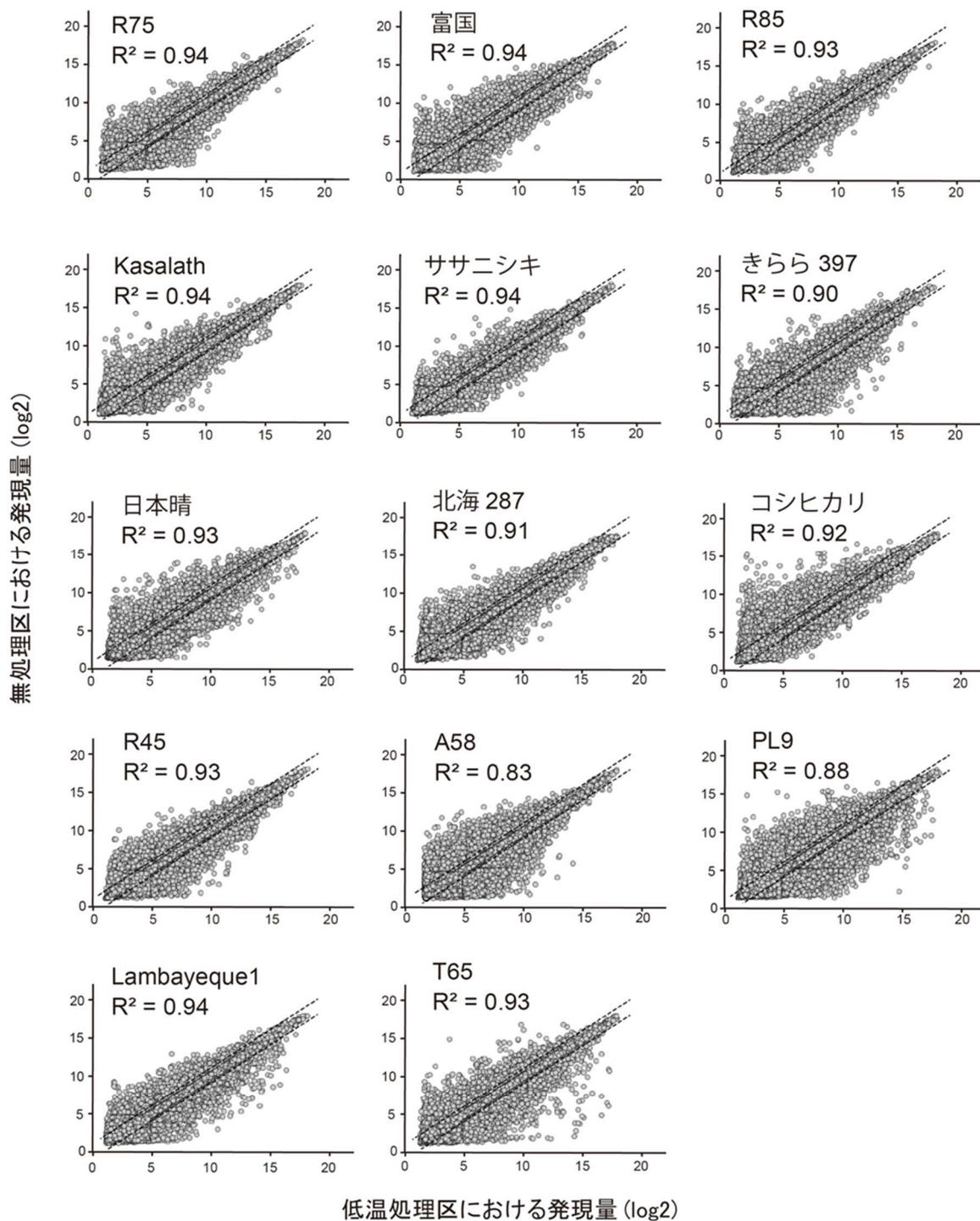


図4-2. 各品種の無処理区と低温処理区における遺伝子発現量のスクアッタープロット. 各品種の低温処理区における発現量(log2)をx軸, 無処理区における発現量(log2)をy軸にとつてマイクロアレイに搭載されているプローブの発現量をプロットした. 点線は $y = x + 1$ および $y = x - 1$ を示した.

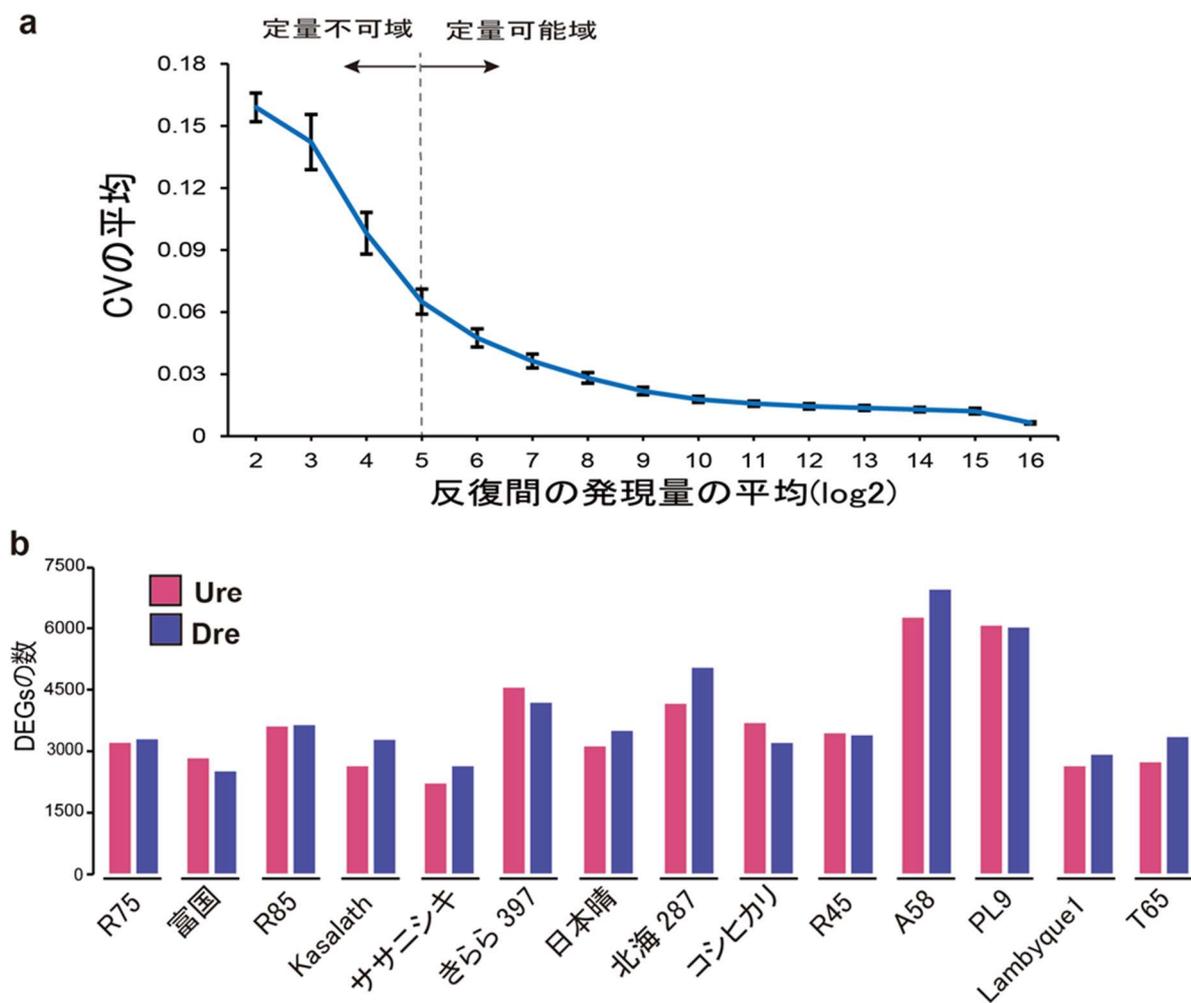


図4-3. イネ14品種におけるDEGsの選抜。(a)各品種および各処理区の2反復間における各プローブの発現量のばらつき(CV)を発現量の平均値ごとで調査し、平均を求めた。エラーバーは標準誤差を示す。(b)供試した14品種において検出された2種類のDEGs(Ure, Dre)の数を示した。Ureの数を赤、Dreの数を青で示した。

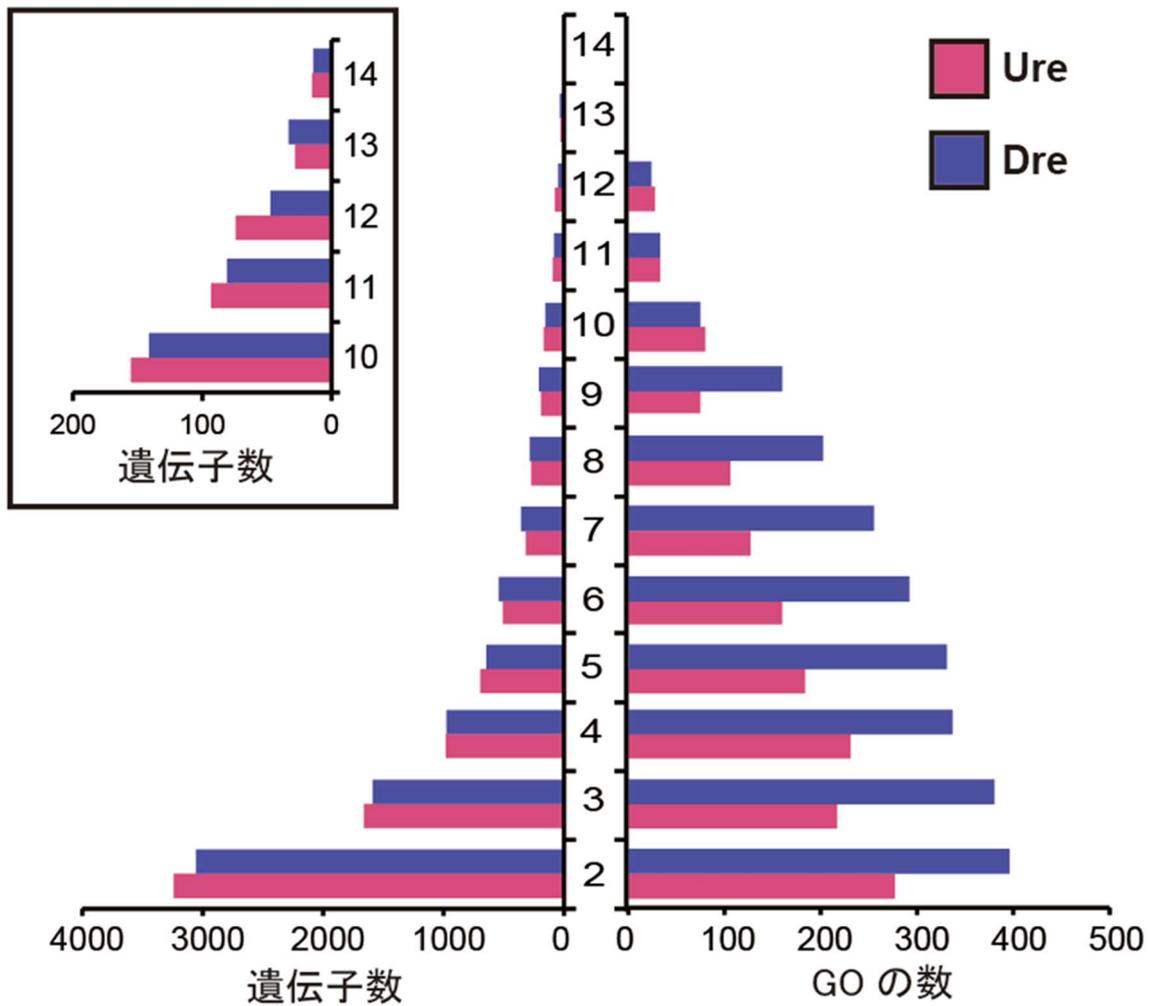


図4-4. 2つのタイプのDEGsにおける品種間の共通性. Y軸は共通した発現変動がみられた品種の数を表し, X軸は各品種数で共通した遺伝子の数, もしくはそれらの遺伝子で検出されたGOの数を表す. 左側に複数品種で共通した発現変動を示す遺伝子の数を示し, 左上には10品種以上で共通した発現変動がみられた遺伝子の結果を拡大して示した. 右側には複数品種で共通した発現変動を示した遺伝子において行われたGO解析によって検出されたGOの数を示した.

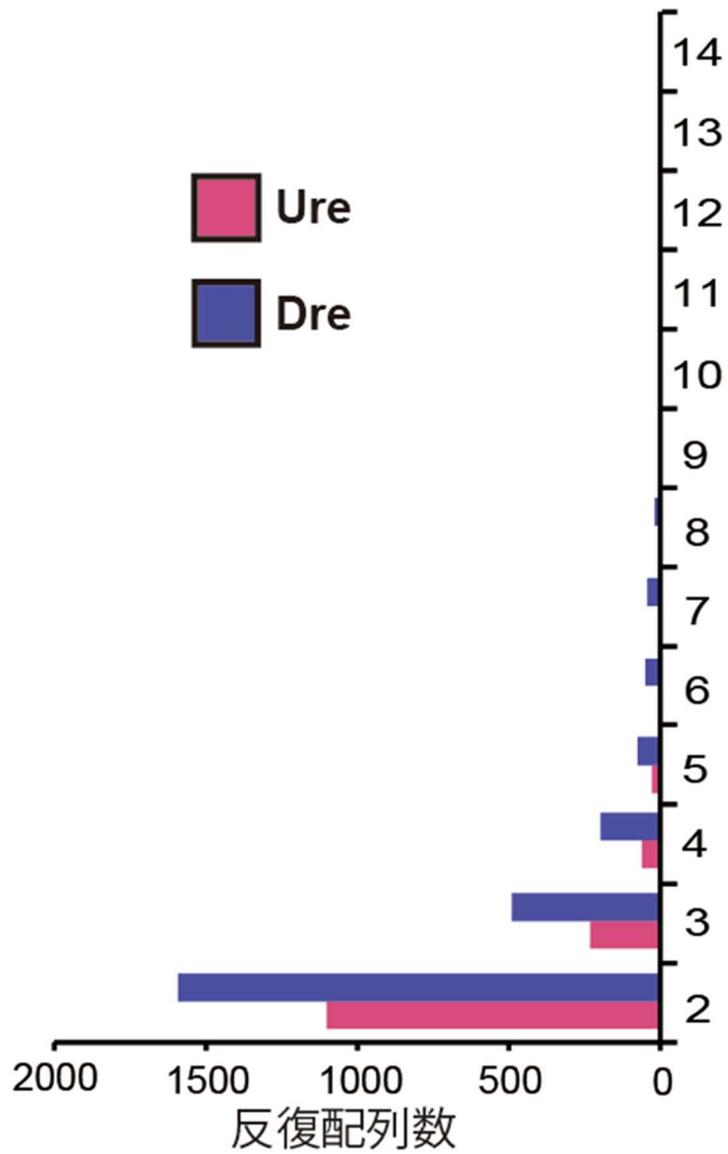
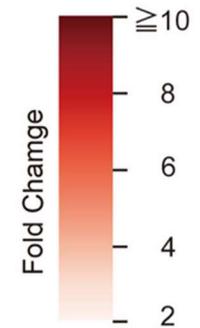


図4-5. 2つのタイプのDEGsにおける品種間の共通性（反復配列）. Y軸は共通した発現変動がみられた品種の数を表し, X軸は各品種数で共通した反復配列の数を表す.

表4-3. 14品種すべてで発現が上昇した遺伝子の機能と各品種における発現変動

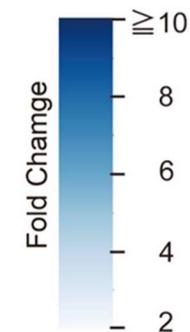
| Gene ID      | Annotation   | Fold Change |      |      |      |     |      |      |      |      |      |       |      |      |      |
|--------------|--|-------------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| Os09g0445600 | Similar to oxidoreductase/ transition metal ion binding protein        | 9.8         | 15.6 | 13.3 | 11.1 | 2.4 | 7.3  | 92.3 | 4.3  | 2.3  | 5.9  | 197.0 | 6.7  | 2.2  | 2.1  |
| Os06g0728700 | Homeodomain-like containing protein                                    | 7.8         | 3.7  | 15.2 | 10.4 | 4.0 | 6.0  | 80.6 | 4.2  | 7.8  | 20.6 | 69.8  | 7.1  | 24.9 | 25.5 |
| Os03g0807900 | Chaperonin-like RbcX family protein                                    | 26.1        | 4.9  | 22.0 | 6.9  | 2.7 | 2.6  | 54.1 | 6.6  | 4.4  | 14.6 | 15.5  | 3.9  | 30.3 | 6.0  |
| Os08g0386200 | WRKY transcription factor 69   | 34.1        | 5.1  | 28.1 | 11.6 | 5.1 | 2.1  | 14.1 | 20.1 | 15.9 | 4.9  | 3.0   | 20.3 | 3.2  | 7.6  |
| Os10g0456100 | Similar to Brn1-like protein   | 6.3         | 6.7  | 10.3 | 5.1  | 6.6 | 10.8 | 14.5 | 4.8  | 5.7  | 28.5 | 36.1  | 9.3  | 15.7 | 6.2  |
| Os03g0141200 | Similar to Beta-amylase PCT-BMY1                                       | 7.8         | 11.5 | 8.1  | 5.9  | 3.0 | 4.8  | 32.7 | 4.8  | 2.2  | 7.2  | 40.6  | 5.6  | 12.8 | 4.5  |
| Os11g0184900 | Similar to OsNAC5 protein  | 7.7         | 6.0  | 12.9 | 11.8 | 3.2 | 5.3  | 10.7 | 8.2  | 7.4  | 9.9  | 27.7  | 13.7 | 9.7  | 2.3  |
| Os03g0176700 | Conserved hypothetical protein   | 28.8        | 2.2  | 9.8  | 3.6  | 6.6 | 14.9 | 15.0 | 6.5  | 2.4  | 5.6  | 26.4  | 2.4  | 9.0  | 2.8  |
| Os01g0264000 | Dof transcription factor   | 4.5         | 5.5  | 8.2  | 3.5  | 3.8 | 2.6  | 26.9 | 5.2  | 2.1  | 2.8  | 45.8  | 6.3  | 2.5  | 9.1  |
| Os06g0246500 | Similar to Pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit                     | 2.7         | 6.6  | 3.7  | 4.2  | 5.7 | 12.0 | 12.3 | 9.5  | 3.9  | 9.1  | 24.5  | 11.1 | 9.7  | 4.0  |
| Os05g0457200 | Similar to protein phosphatase 2C                                      | 3.9         | 5.0  | 10.8 | 6.6  | 3.2 | 8.0  | 30.8 | 3.3  | 2.3  | 7.3  | 17.5  | 4.3  | 11.2 | 4.4  |
| Os03g0176600 | -  | 13.5        | 3.8  | 11.8 | 3.7  | 5.0 | 12.4 | 8.3  | 6.0  | 2.7  | 11.4 | 8.0   | 2.9  | 9.1  | 9.7  |
| Os05g0421600 | No apical meristem (NAM) protein domain containing protein             | 9.2         | 10.4 | 10.3 | 10.7 | 3.7 | 2.1  | 15.5 | 5.3  | 5.8  | 5.5  | 5.6   | 6.2  | 2.7  | 3.7  |
| Os03g0272300 | BRING-finger containing E3 ubiquitin ligase                            | 14.4        | 11.8 | 4.2  | 7.1  | 7.0 | 7.1  | 5.3  | 13.1 | 2.7  | 3.2  | 4.2   | 7.2  | 2.7  | 4.1  |
| Os04g0667600 | Heavy metal transport/detoxification protein domain containing protein | 3.8         | 15.3 | 7.4  | 5.3  | 3.0 | 3.1  | 7.3  | 7.0  | 10.1 | 4.0  | 9.8   | 6.0  | 6.3  | 4.0  |
| Os05g0494200 | Similar to Cystatin  | 5.2         | 6.0  | 3.4  | 2.6  | 2.8 | 3.2  | 4.4  | 2.3  | 7.4  | 6.3  | 4.5   | 29.5 | 3.7  | 2.1  |
| Os04g0568700 | Similar to Heat stress transcription factor Spl7                       | 2.7         | 2.7  | 5.2  | 3.0  | 2.3 | 3.4  | 8.4  | 5.0  | 3.9  | 18.3 | 8.1   | 2.1  | 9.8  | 3.6  |
| Os04g0117900 | Amidase family protein   | 7.9         | 5.6  | 7.9  | 3.1  | 4.3 | 7.2  | 2.7  | 11.2 | 6.1  | 2.9  | 6.0   | 3.8  | 3.8  | 4.8  |
| Os01g0731100 | Similar to Pathogen-related protein                                    | 2.0         | 2.6  | 2.6  | 13.5 | 3.1 | 2.9  | 7.4  | 3.1  | 4.9  | 7.9  | 2.4   | 8.2  | 2.5  | 12.4 |
| Os02g0771600 | Similar to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase                   | 12.7        | 8.4  | 3.8  | 5.2  | 7.5 | 2.1  | 2.6  | 6.6  | 4.6  | 2.1  | 2.7   | 4.7  | 4.9  | 2.5  |
| Os01g0835600 | AT hook DNA-binding conserved site domain containing protein           | 3.7         | 3.4  | 3.0  | 3.3  | 3.9 | 3.9  | 3.3  | 5.2  | 3.0  | 3.3  | 15.1  | 3.9  | 2.9  | 2.5  |
| Os05g0186000 | Similar to 30S ribosomal protein                                       | 3.4         | 3.1  | 2.7  | 2.3  | 4.8 | 8.5  | 2.0  | 3.5  | 2.8  | 3.7  | 8.1   | 3.0  | 2.8  | 3.4  |
| Os07g0440100 | Conserved hypothetical protein   | 2.3         | 5.0  | 3.8  | 3.2  | 3.7 | 2.3  | 5.0  | 3.0  | 3.5  | 3.3  | 2.4   | 5.4  | 3.2  | 4.7  |
| Os02g0105900 | Similar to 40S ribosomal protein S4                                    | 4.0         | 2.8  | 3.1  | 3.5  | 3.8 | 3.8  | 2.3  | 5.3  | 2.4  | 6.0  | 2.9   | 3.0  | 4.6  | 2.5  |
| Os02g0656500 | DnaJ-like protein  | 2.1         | 3.8  | 2.3  | 3.0  | 3.6 | 3.3  | 2.8  | 2.8  | 2.2  | 2.9  | 2.8   | 3.4  | 3.6  | 2.3  |



R75 富国 R85 Kasalath カサニシキ 397 日本晴 北海 287 コシヒカリ R45 A58 PL9 Lambayeque1 T65

表4-4. 14品種すべてで発現が減衰した遺伝子の機能と各品種における発現変動

| Gene ID      | Annotation  | Fold Change |      |      |          |       |        |      |       |       |      |      |      |            |      |
|--------------|---|-------------|------|------|----------|-------|--------|------|-------|-------|------|------|------|------------|------|
|              |   | R75         | 富田   | R85  | Kasalath | ササニシキ | きらら397 | 日本晴  | 北海287 | コシヒカリ | R45  | A58  | PL9  | Lambayque1 | T65  |
| Os06g0285400 | Similar to Serine/threonine-specific kinase like protein      | 6.9         | 11.9 | 7.8  | 6.9      | 10.1  | 9.9    | 4.4  | 6.3   | 13.2  | 9.9  | 10.9 | 50.4 | 2.8        | 13.7 |
| Os11g0150400 | Stress responsive alpha-beta barrel domain containing protein | 4.3         | 6.4  | 5.0  | 2.4      | 5.3   | 3.1    | 6.7  | 3.4   | 6.1   | 5.0  | 57.5 | 37.6 | 2.9        | 11.7 |
| Os01g0756900 | Hypothetical protein  | 4.9         | 13.5 | 10.3 | 7.8      | 8.2   | 8.5    | 4.2  | 2.8   | 9.8   | 9.8  | 15.9 | 44.7 | 2.2        | 3.5  |
| Os02g0814400 | Cytochrome c 2C monohaem domain containing protein            | 2.5         | 4.5  | 3.2  | 5.1      | 4.2   | 5.7    | 7.3  | 6.1   | 5.0   | 6.1  | 68.7 | 8.8  | 2.6        | 8.3  |
| Os08g0427700 | Histone H2A   | 6.8         | 15.0 | 5.0  | 16.6     | 18.8  | 5.0    | 2.1  | 5.4   | 14.5  | 5.3  | 8.1  | 14.0 | 3.3        | 2.2  |
| Os04g0396800 | Peptidase S10 serine carboxypeptidase family protein          | 3.2         | 8.3  | 4.4  | 4.0      | 5.3   | 4.1    | 13.8 | 5.2   | 6.6   | 11.3 | 8.5  | 22.3 | 2.2        | 18.9 |
| Os06g0683900 | Similar to OSIGBa0115M15.5 protein                            | 4.4         | 8.3  | 4.5  | 5.9      | 7.3   | 5.8    | 4.9  | 2.2   | 8.3   | 8.9  | 9.2  | 35.8 | 2.6        | 2.8  |
| Os01g0367400 | Conserved hypothetical protein                                | 3.3         | 3.8  | 4.0  | 2.2      | 4.1   | 4.6    | 8.7  | 5.0   | 3.0   | 4.5  | 55.1 | 3.7  | 2.0        | 2.7  |
| Os01g0620900 | Conserved hypothetical protein                                | 6.0         | 5.5  | 9.4  | 8.5      | 3.8   | 4.2    | 4.3  | 11.0  | 7.6   | 3.8  | 13.9 | 16.9 | 3.3        | 4.9  |
| Os01g0303800 | UspA domain containing protein                                | 7.4         | 3.9  | 3.5  | 2.5      | 6.2   | 16.4   | 3.8  | 4.9   | 4.7   | 2.6  | 14.6 | 11.4 | 3.7        | 11.9 |
| Os04g0386600 | Pyruvate/Phosphoenolpyruvate kinase                           | 2.8         | 3.2  | 2.9  | 3.4      | 3.1   | 3.0    | 3.9  | 3.4   | 2.6   | 2.5  | 53.2 | 2.3  | 2.6        | 4.8  |
| Os08g0301500 | Similar to Sucrose-phosphate synthase 2                       | 4.6         | 4.9  | 3.9  | 4.6      | 6.1   | 6.6    | 3.6  | 7.6   | 2.8   | 3.4  | 27.0 | 5.5  | 4.4        | 3.0  |
| Os08g0490900 | Similar to Histone H2B.2                                      | 3.7         | 8.6  | 3.9  | 13.7     | 10.5  | 2.8    | 2.2  | 3.2   | 7.0   | 5.1  | 3.2  | 11.9 | 2.6        | 2.0  |
| Os04g0176400 | Similar to serine carboxypeptidase 1                          | 4.0         | 4.2  | 3.8  | 5.7      | 3.3   | 2.9    | 9.8  | 5.9   | 2.8   | 3.2  | 11.7 | 14.3 | 3.0        | 3.1  |
| Os06g0663800 | Similar to FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase      | 2.2         | 4.2  | 2.5  | 4.6      | 3.6   | 5.8    | 7.8  | 7.7   | 3.5   | 3.5  | 9.8  | 9.2  | 3.7        | 5.7  |
| Os03g0666500 | Similar to Ras-related protein RHA                            | 2.9         | 3.7  | 2.5  | 2.4      | 4.4   | 3.7    | 2.5  | 5.9   | 2.6   | 3.4  | 27.3 | 4.7  | 2.1        | 2.2  |
| Os06g0194200 | Conserved hypothetical protein                                | 5.5         | 5.3  | 4.7  | 2.5      | 3.0   | 5.4    | 2.0  | 5.6   | 7.5   | 2.7  | 2.1  | 6.1  | 3.2        | 2.5  |
| Os02g0753300 | Lipoxygenase LH2 domain containing protein                    | 2.6         | 4.5  | 2.4  | 4.9      | 3.5   | 3.8    | 4.1  | 6.2   | 2.7   | 5.4  | 4.5  | 4.7  | 3.3        | 3.8  |
| Os05g0133100 | Similar to PII protein  | 2.2         | 5.0  | 2.1  | 3.2      | 5.2   | 6.7    | 4.6  | 5.2   | 2.9   | 5.2  | 3.5  | 2.5  | 3.7        | 3.4  |
| Os06g0336200 | Delta-tonoplast intrinsic protein                             | 4.0         | 4.1  | 2.5  | 3.3      | 2.8   | 5.4    | 7.2  | 5.0   | 3.3   | 6.2  | 2.6  | 3.0  | 3.3        | 2.5  |
| Os06g0486800 | Similar to Formate dehydrogenase mitochondrial precursor      | 3.8         | 3.4  | 3.9  | 4.0      | 4.1   | 3.7    | 2.6  | 4.2   | 3.0   | 5.8  | 3.6  | 2.3  | 5.0        | 2.5  |
| Os03g0297400 | Acyl transferase domain containing protein                    | 2.9         | 3.6  | 2.9  | 2.7      | 2.5   | 2.1    | 5.1  | 5.1   | 2.4   | 3.4  | 4.7  | 4.6  | 3.0        | 2.9  |
| Os09g0413700 | Conserved hypothetical protein                                | 3.4         | 3.8  | 3.8  | 2.0      | 2.5   | 3.8    | 3.5  | 5.3   | 3.2   | 2.9  | 3.6  | 3.3  | 2.4        | 2.2  |
| Os10g0419100 | Similar to Perakine reductase                                 | 2.6         | 3.2  | 2.7  | 4.3      | 3.2   | 3.0    | 2.8  | 2.5   | 2.6   | 3.0  | 5.4  | 3.4  | 2.4        | 2.6  |
| Os06g0232200 | Similar to Fructokinase-2                                     | 2.2         | 3.2  | 2.6  | 3.9      | 3.2   | 2.4    | 3.1  | 2.3   | 3.1   | 4.0  | 2.9  | 3.3  | 3.4        | 3.0  |
| Os12g0512000 | Flavin monooxygenase-like enzyme Auxin biosynthesis           | 4.1         | 2.2  | 2.0  | 2.1      | 3.3   | 2.1    | 2.9  | 2.1   | 2.0   | 2.3  | 2.4  | 3.8  | 2.6        | 5.2  |



除く 12 品種で 1/5 以上の発現が減衰した (表 4-4). 14 品種で 2 倍以上発現が変動した 2 つのタイプの 51 因子について, その発現変動の大きさと耐冷性には明確な相関関係を見出すことはできなかった. このことから, これら 51 因子はあくまで耐冷性に寄与するものではなく, 穂ばらみ期のイネにおいて普遍的な低温応答因子であることが考えられた.

複数の品種で共通した発現変動因子について, Ure および Dre タイプそれぞれで GO (Gene Ontology) 解析を行い, 特定の数以上の品種で発現変動が共通した遺伝子に有意 ( $q < 0.05$ ) に多くつけられた生物学的経路に関する GO を検出した図 4-4 (右側). 14 品種で共通性の高い遺伝子ほどその数が少ないため, 検出された GO の数も減少し, 13 品種以上では GO は検出されない. そのため, 12 品種以上で共通して Ure および Dre タイプに分類された遺伝子の GO 解析結果を図 4-6 に示した. 12 品種以上で共通した Ure タイプの遺伝子で検出された GO は 28 個で, 図 4-6a ではそのうち, REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) を用いて意味的重複を除いたうえで類似性が高い GO を線でつないで示した. Ure タイプで検出された GO には response to temperature stimulus (GO:0009266) などの外部刺激応答に関わる機能を示すものが含まれていた (図 4-6a). 同様に, Dre タイプで共通した遺伝子は 24 個の GO が検出され, chromatin silencing (GO:0006342) などのエピジェネティックな遺伝子の発現抑制に関わる機能を示すものが含まれていた (図 4-6b). 12 品種以上で共通した発現変動を示した遺伝子のうち, Ure タイプの遺伝子には遺伝子発現を促進するものが多くみられ, Dre タイプには遺伝子発現を抑制するものが多くみられた. このことから, 供試した多くの品種で穂ばらみ期の低温ストレスによるエピジェネティックな遺伝子抑制が弱まり, 遺伝子発現の活性化による積極的な刺激応答が起こっていると考えられた.

### 遺伝子の発現変動パターンと花粉稔性低下率の相関

低温ストレスによる遺伝子の発現変動と耐冷性との関連性を 14 品種の調査結果に基づいて分析した. 発現変動の指標は前項で行った遺伝子 37,000 プローブと反復配列 23,000 プローブを搭載したマイクロアレイ解析による低温処理区と無処理区との差によって得た  $\log_2$  値の発現変動値を用いた. 耐冷性の指標は無処理区の花稔性に対する低温処理区の花稔性の割合を花粉生存率として用いた. これら 14 品種の 6 万プローブのマイクロアレイ解析と花粉生存率から各プローブの相関係数を求め,  $p < 0.05$  を満たす有意な相関 ( $r \geq 0.53$  もしくは  $r \leq -0.53$ ) を示す 2494 因子を選んだ. さらに, 顕著な発現変動を示す因子を選抜するため, 各因子の 14 系統における発現変動値の中央値が 1 以上もしくは -1 以下の因子をそれぞれ 63 因子と 108 因子選んだ. さらに中央値 1 以上の 63 因子, -1 以下の 108 因子の中で発現変動値と花粉生存率が正あるいは負の相関を示すものに分類した (図 4-7). その結果, 以下 4 つのタイプを定義した. Type1 は 17 因子 (1 つの反復配列を含む) で, 中央値 1 以上で正の相関を示し, 耐冷性品種ほど発現が上昇する因子が含まれる (図 4-7, Type1). Type2 の 67 因子は中央値 -1 以下で正の相関があり, このタイプは感受性品種は

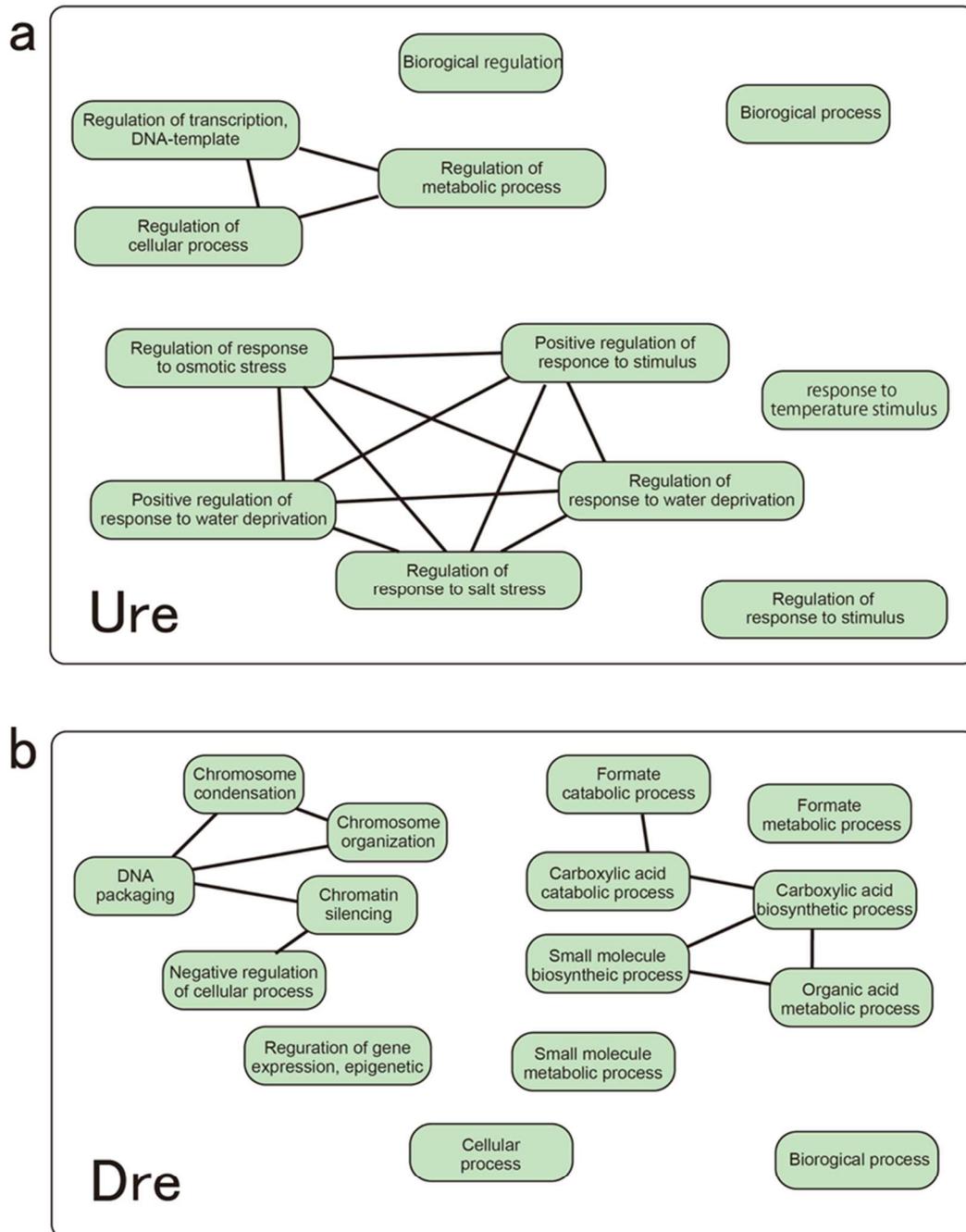


図4-6. マイクロアレイ解析に供試した14品種中12品種以上で共通した発現変動がみられた遺伝子のGO解析結果. (a, b) 12品種以上で共通して発現が変動した遺伝子に有意に多くつけられた28個の生物学的経路に関するGOから, REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>)を用いて意味的重複を除いたうえで, 類似性が高いGOを線をつないで示した. (a) Ureの結果. (b) Dreの結果.

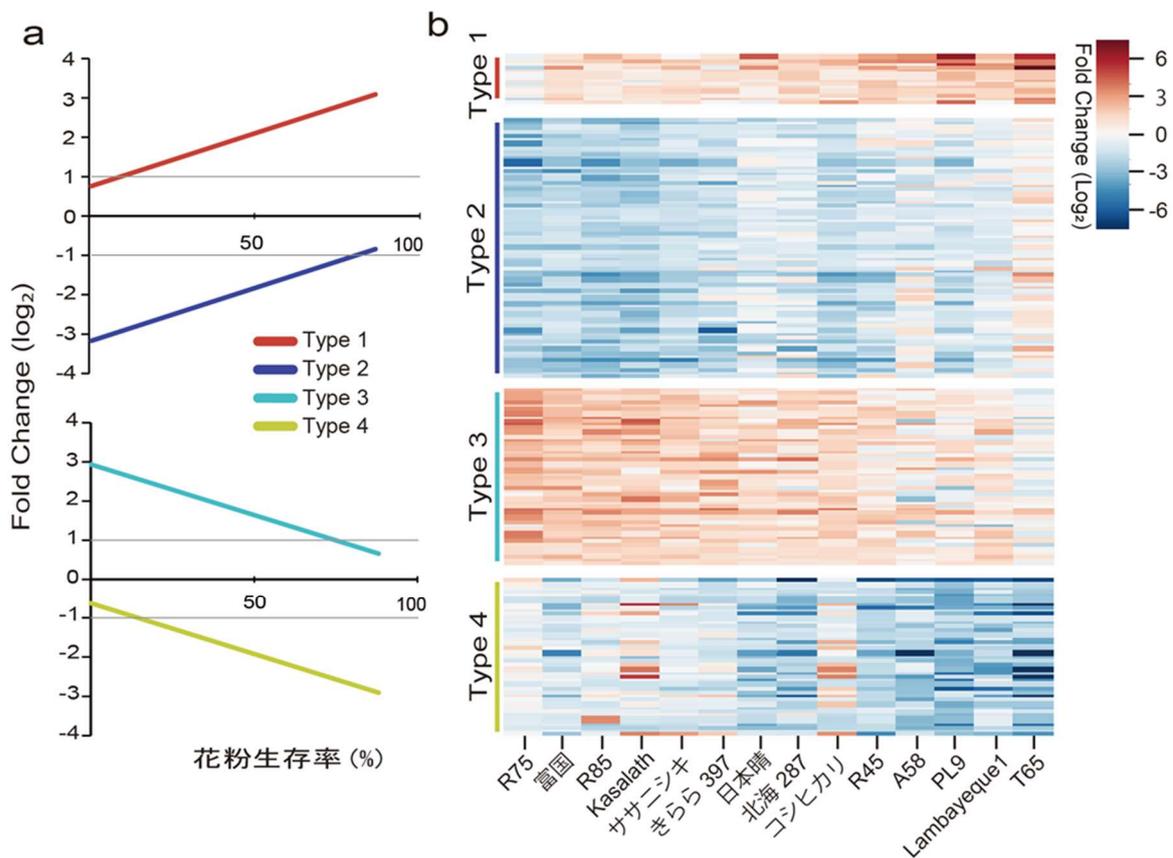


図4-7.遺伝子発現変動と耐冷性の関係。(a)無処理区における花粉稔性に対する低温処理区での花粉稔性の割合(%)と低温に対する過敏な発現変動に相関がみられた因子のタイプ分けを示した。発現変動と耐冷性に正の相関がみられた因子のうち、発現変動の14品種における中央値が1以上であったものをtype1、-1以下であったものをtype2として分類した。発現変動と耐冷性に負の相関がみられた因子のうち、発現変動の14品種における中央値が1以上であったものをtype3、-1以下であったものをtype4として分類した。(b)4つのタイプに分類された因子の各品種におけるFC(log<sub>2</sub>)を示したヒートマップ。品種は無処理区における花粉稔性に対する低温区における花粉稔性の割合が低い順に左から並んでいる。

ど発現が減衰する (図 4-7, Type2). Type3 は 46 因子 (1 つの反復配列を含む) で, 中央値 1 以上で負の相関を示し, 感受性品種ほど発現が上昇する (図 4-7, Type3). Type4 は 41 因子が該当し, 中央値-1 以下で負の相関を有し, 耐性品種ほど発現が減衰する (図 4-7, Type4). 発現変動に着目すると, Type1 と 4 の 58 因子は発現変動が耐性品種ほど大きく, 感受性品種では小さいタイプで, 逆に Type2 と 3 の 113 因子は発現変動が耐性品種ほど小さく, 感受性品種では大きいタイプといえる. 耐性品種と感受性品種を比較した場合, 耐性品種は相対的に顕著な発現変動を示す因子が少ない. 言い換えると, 低温ストレス下でも耐性品種では安定して発現する遺伝子が不安定な遺伝子より多いことを表している. 例えば, Type2 に分類された, Os08g0197500 および Os10g0126700 は細胞周期に関連する Cyclin-like F-box domain を有する遺伝子であり, 感受性系統ほど発現が低下し, 耐性品種では発現変動は少ない傾向にある (表 4-5). このことから, 細胞周期が遅滞しにくい状態を保っているのかもしれない. また, Type3 には WRKY, Zinc-finger domain タンパク質および NAC domain タンパク質遺伝子などのストレス応答遺伝子が含まれていた (表 4-5). これらのストレス応答遺伝子が Type3 に含まれることから, 低温ストレスに対する過敏な反応が感受性と関連していることが考えられる.

以上の, 遺伝子の発現変動と耐冷性との相関関係の分析から, 耐冷性品種は感受性品種に対してより発現変動が小さい傾向にあることが示唆された.

### 低温条件下における花粉稔性と遺伝子発現量の相関

前項の結果から, 低温に対して耐性品種は感受性品種に比べ, ゲノム全体で遺伝子の発現の変動が小さいことが示された. 本項では低温処理区における花粉稔性と各遺伝子の低温下での遺伝子発現量の関係を調べるため 2 つの相関関係を分析した. 調査には低温処理区においてすべての品種で検出可能な発現量 ( $\log_2 \geq 5$ ) があつた 22,063 個の因子を用い, ピアソン相関によって各因子の相関係数  $r$  を求めた. 22,06 因子から,  $p < 0.05$  で顕著な相関を示したもの ( $r \geq 0.53$  もしくは  $-0.53 \geq r$ ) を選抜した (図 4-8a). 低温処理区における花粉稔性と発現量に正の相関があつた遺伝子は 396 個, 反復配列は 33 個, 負の相関があつた遺伝子は 812 個, 反復配列は 13 個であつた (図 4-8b). 花粉稔性と低温処理区の発現量の間で正の相関関係があつた因子数は負の相関があつた因子数に比べて少ない. すなわち, 14 品種の中で, 低温処理区において耐冷品種では感受性品種に比べ, 全体の遺伝子発現量が相対的に抑えられている遺伝子が多いことを示している. 耐性品種において発現が抑えられている遺伝子として, 最も負の相関係数が低いのはカルシウムイオンレセプタータンパク質をコードする *OsCML14* (Os05g0577500) であつた.  $\text{Ca}^{2+}$  は植物内で外部刺激に対するシグナル伝達物質であることが知られている (図 4-9) (Guo et al., 2019). また, 低温を含む様々な非生物ストレスに応答し, 耐性を向上されることが知られている *DREB* ファミリーに属する遺伝子 Os09g0369000 も花粉稔性と負の相関関係にあつた ( $r = -0.75$ )

表4-5. 耐性品種ほど発現変動がみられなかった因子 (Type2, 3) のうち, 耐冷性と発現変動の間  $|r| \geq 0.6$  もしくは  $-0.6 \geq r$  の顕著な相関関係がみられた因子

|       | Gene ID          | Annotation  | r     |
|-------|------------------|---|-------|
|       | Os01g0730600     | Conserved hypothetical protein  | 0.81  |
|       | Os01g0963800     | Conserved hypothetical protein  | 0.78  |
|       | Os02g0170900     | Conserved hypothetical protein  | 0.74  |
|       | Os01g0222500     | Similar to Vacuolar ATP synthase subunit E  | 0.72  |
|       | Os03g0238300     | Endonuclease/exonuclease/phosphatase domain containing protein                                | 0.71  |
|       | Os05g0409400     | Similar to Microtubule-associated protein MAP65-1a  | 0.71  |
|       | Os03g0764900     | DOF transcription factor  | 0.71  |
|       | Os02g0326000     | Protein of unknown function DUF2232   | 0.70  |
|       | Os07g0191600     | Protein of unknown function DUF569 domain containing protein                                  | 0.70  |
|       | Os12g0621700     | Conserved hypothetical protein  | 0.68  |
|       | Os08g0496400     | Conserved hypothetical protein  | 0.68  |
|       | Os09g0537700     | S-like ribonuclease   | 0.68  |
|       | Os01g0756200     | Similar to VirE2-interacting protein VIP1   | 0.67  |
|       | Os12g0211400     | A/G-specific adenine glycosylase MutY   | 0.67  |
|       | Os03g0143200     | Non-protein coding transcript   | 0.67  |
|       | Os01g0633100     | ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit   | 0.67  |
|       | Os11g0167800     | Abscisic acid- stress- and ripening-induced (ASR) protein                                     | 0.67  |
| Type2 | Os08g0299300     | Conserved hypothetical protein  | 0.66  |
|       | Os06g0724700     | Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase catalytic domain containing protein                      | 0.65  |
|       | Os01g0167700     | Conserved hypothetical protein  | 0.65  |
|       | Os04g0457500     | Similar to H0523F07.13 protein  | 0.65  |
|       | Os08g0197500     | Cyclin-like F-box domain containing protein   | 0.64  |
|       | Os11g0616300     | Remorin C-terminal region domain containing protein   | 0.64  |
|       | Os04g0437300     | Zinc finger RING/FYVE/PHD-type domain containing protein                                      | 0.64  |
|       | Os06g0668200     | Similar to Phosphoglycerate kinase cytosolic  | 0.64  |
|       | Os06g0232600     | Similar to Dehydroascorbate reductase   | 0.64  |
|       | Os06g0681600     | Haem peroxidase family protein  | 0.63  |
|       | Os11g0147800     | Similar to Wali7 protein  | 0.63  |
|       | Os03g0851800     | Similar to Pantoate--beta-alanine ligase  | 0.63  |
|       | Os02g0165500     | Conserved hypothetical protein  | 0.62  |
|       | Os05g0122600     | Prefoldin domain containing protein   | 0.62  |
|       | Os12g0580300     | Similar to TATA-binding protein TBP2  | 0.61  |
|       | Os03g0214000     | Similar to Diphosphonucleotide phosphatase 1 precursor  | 0.61  |
|       | Os10g0126700     | Similar to F-box domain containing protein  | 0.61  |
|       | Os03g0727900     | GTP1/OBG domain containing protein  | 0.60  |
|       | Os07g0545400     | Protein H2A   | 0.60  |
|       | Os11g0459300     | Protein of unknown function DUF1719   | -0.76 |
|       | Os01g0945200     | Similar to BAT1 (BIDIRECTIONAL AMINO ACID TRANSPORTER 1) amino acid transmembrane transporter | -0.75 |
|       | Os02g0307800     | Protein of unknown function DUF3082 domain containing protein                                 | -0.72 |
|       | Os01g0895200     | DOMON related domain containing protein   | -0.72 |
|       | Os01g0893400     | Zinc finger TAZ-type domain containing protein  | -0.70 |
|       | Os11g0572200     | Exo70 exocyst complex subunit family protein  | -0.68 |
|       | Os11g0148300     | Similar to Peptidyl-prolyl isomerase  | -0.67 |
|       | Os01g0734000     | Similar to WRKY DNA binding protein   | -0.66 |
|       | Os04g0413200     | Cell-wall Invertase 3   | -0.65 |
|       | Os07g0683200     | Similar to NAC domain transcription factor  | -0.65 |
| Type3 | Os01g0935300     | Similar to cullin-1   | -0.64 |
|       | Os03g0327100     | Similar to CUC1   | -0.64 |
|       | ORSgTETNOOT01831 | Unclassified repeat sequence  | -0.63 |
|       | Os01g0113500     | Similar to Receptor-like kinase   | -0.63 |
|       | Os01g0835700     | CCT domain containing protein   | -0.63 |
|       | Os03g0754400     | -   | -0.62 |
|       | Os02g0122600     | EF-Hand type domain containing protein  | -0.62 |
|       | Os06g0146700     | Similar to Cytochrome P450 CYP86A35   | -0.61 |
|       | Os02g0192100     | Conserved hypothetical protein  | -0.61 |
|       | Os04g0443200     | Protein of unknown function DUF538 family protein   | -0.61 |
|       | Os06g0535200     | Zinc finger RING/FYVE/PHD-type domain containing protein                                      | -0.61 |

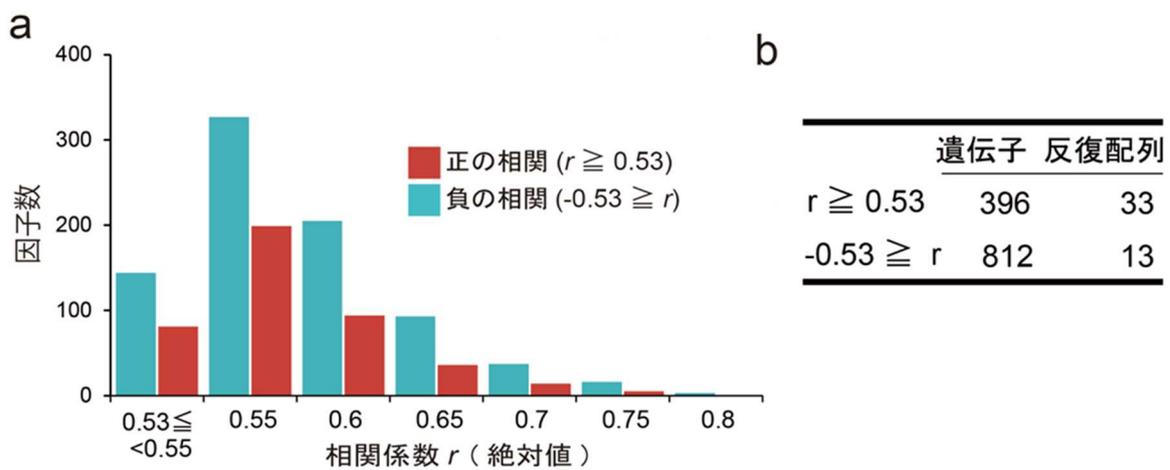


図4-8. 低温区における花粉稔性と遺伝子発現量に有意な相関がみられた因子の数. (a) 有意な相関がみられた因子の頻度分布を示した. X軸には相関係数 $r$ の絶対値をとり, 赤が正の相関, 青が負の相関を示した因子の分布を示す. (b) 有意な相関がみられた因子のうち遺伝子と反復配列の数を示した.

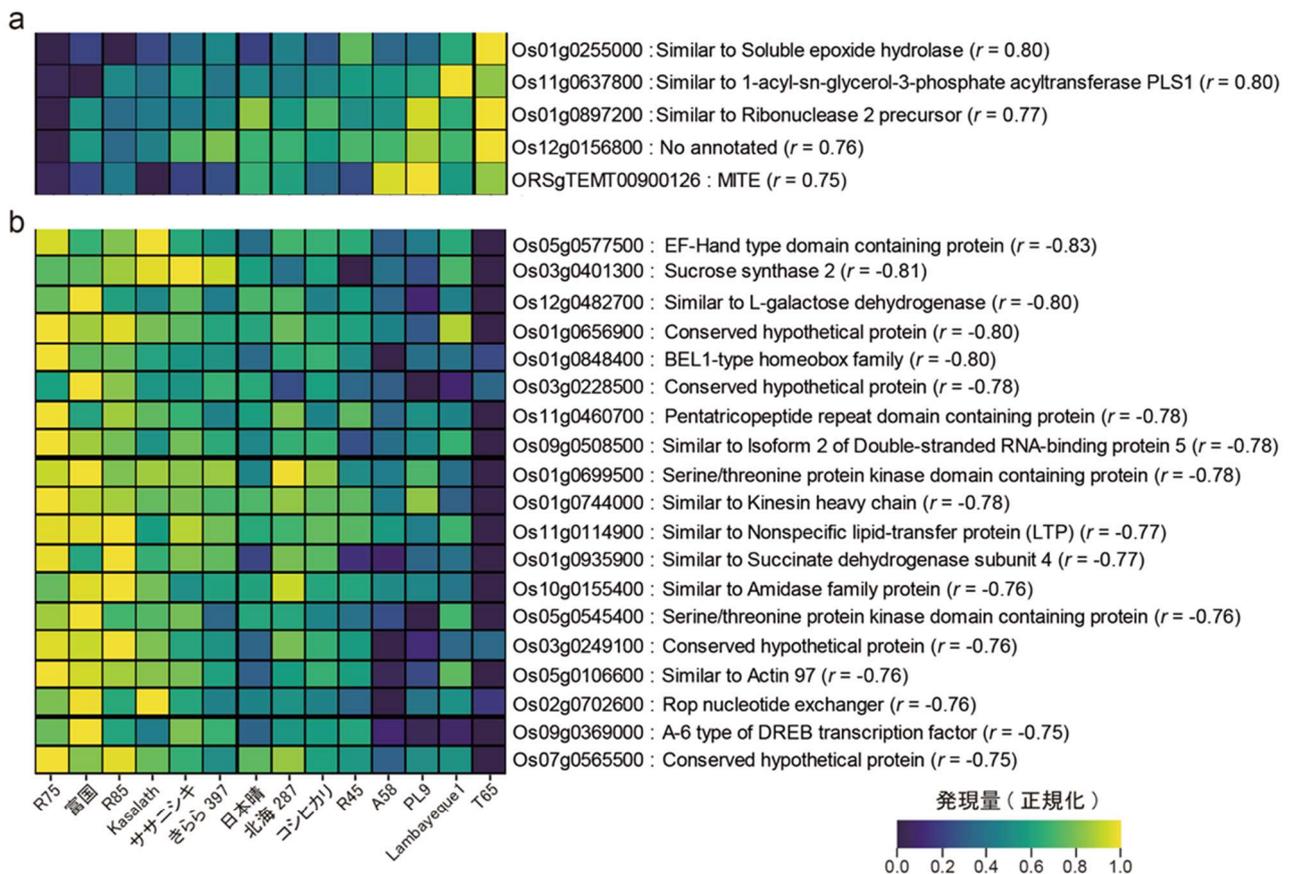


図4-9. 低温区における花粉稔性と遺伝子発現量に有意な相関がみられた遺伝子のうち、ピアソンの相関係数が0.75以上もしくは-0.75以下だった遺伝子について、発現量をヒートマップで表した。各遺伝子のIDに右側には遺伝子のアノテーションを表し、括弧内には遺伝子発現量と花粉稔性の間にみられた相関係数を表した。品種は低温区における花粉稔性が低い順に左から並んでいる。(a)発現量と花粉稔性に正の相関があったもの。(b)発現量と花粉稔性に負の相関があったもの。

(図 4-9) (Liu et al., 1998; Matsukura et al., 2010; Moon et al., 2019; Ravikumar et al., 2014).  
 このように、低温処理区において *OsCML14* や *DREB* 遺伝子の発現量は、花粉稔性が低い品種ほど高い。また、花粉稔性と発現量に有意な正の相関がみられた遺伝子のうち、Fun rice genes データベース (<https://funricegenes.github.io/>) 上で低温ストレス関連タグが付いたものは2つだったのに対し、有意な負の相関がみられた遺伝子は11個であった(図 4-10)。正の相関がみられた遺伝子は活性酸素種の除去に関わる機能を持つ *OsAPX2* (Os07g0694700) や細胞周期に関わる *OsRAN2* (Os05g0574500) を含んでいる(Chen et al., 2011; Zhang et al., 2013)。負の相関がみられた遺伝子のうち Fun rice genes に低温関連遺伝子として登録されている11個の遺伝子には、過剰発現によって穂ばらみ期の耐冷性の向上に関連することが知られている *OsMYB4* (Os04g0517100) と *Ctb1* (Os04g0619300) が含まれていた(Park et al., 2010; Saito et al., 2010)。低温耐性の向上に関わる遺伝子は、低温感受性品種ほど高く発現しており、低温ストレスに対して感受性を原因づける要因になることが示唆される。逆に *OsWRKY45* (Os05g0322900) は低温によって誘導されるが、過剰発現することで低温障害をより深刻にすることが分かっており、低温下での花粉稔性が低い品種ほど *OsWRKY45* の発現量が高いことが本研究でも裏付けられた(Tao et al., 2011)。

低温処理区における花粉稔性と発現量に相関があった遺伝子群の機能的特徴を知るために GO 解析を行った。低温区における14品種の発現量が花粉稔性と負の相関を示した遺伝子群について、各遺伝子につけられた生物学的経路に関わる GO のうち、有意 ( $q < 0.05$ ) に多かった GO は89個検出された。このうち、図 4-11 には特に有意 ( $q < 0.01$ ) に多く検出された GO について、REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) を用いて意味的重複を除いたうえで類似性が高い GO を線でつないで示した。検出された GO には regulation of signaling (GO:0023051) や regulation of response to stress (GO:0080134) などの、刺激応答に関わるものが含まれており、感受性品種ほど低温ストレスに対する応答が敏感であることが示された。一方、花粉稔性と発現量に正の相関がみられた遺伝子群で検出できた GO タームは数が少なく、明確な結果が得られなかった。

低温耐性と感受性品種の遺伝子発現にみられる特徴は2つの間で発現量が顕著に異なる遺伝子の数に反映され、前者は後者に比べ、高発現遺伝子の数が少ないことが判明した。感受性品種で発現量が高い傾向にある遺伝子には、過剰発現が耐性を誘導することが報告されている *OsMYB4* や *DREB* などの転写因子が含まれていた(図 4-9, 10)。このことは、感受性品種ほど低温ストレスに敏感に応答していることを反映し、負の相関を示した遺伝子に、刺激応答に関わる GO がついているものが多く含まれていたこともこれを支持している(図 4-11)。

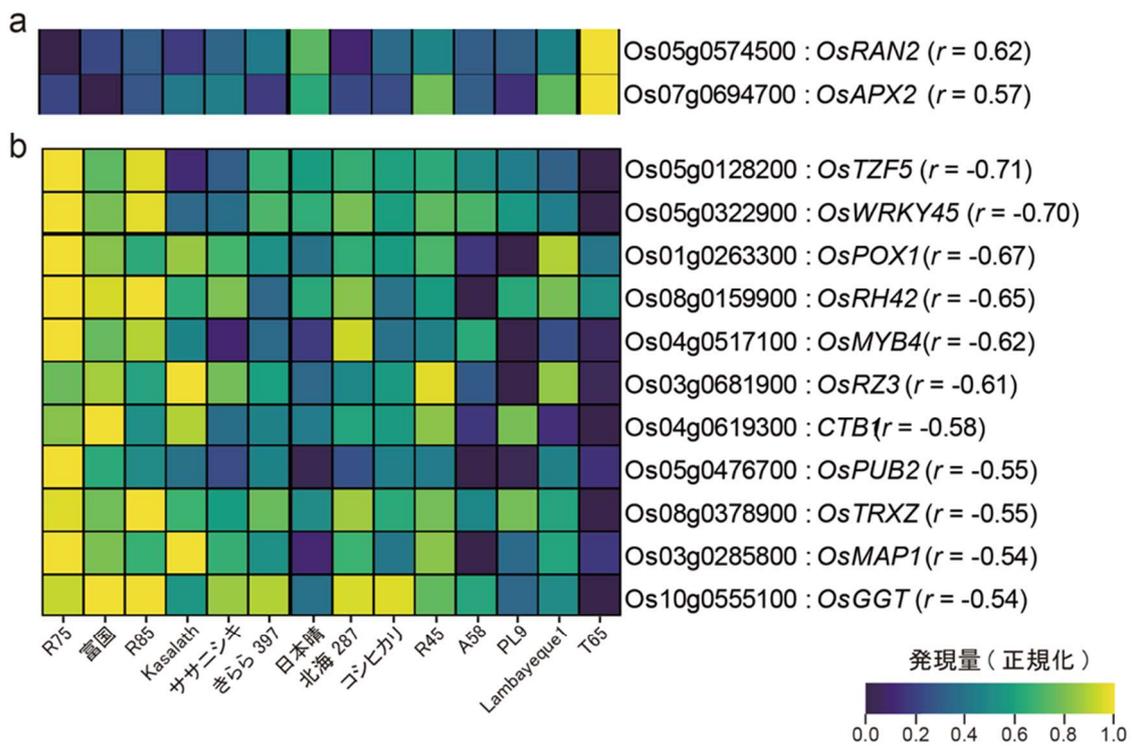


図4-10. 低温区における花粉稔性と遺伝子発現量に有意な相関がみられた遺伝子のうち、低温ストレスとの関連が報告されているものの各品種の発現量をヒートマップで表した。各遺伝子のIDに右側には遺伝子のアノテーションを表し、括弧内には遺伝子発現量と花粉稔性の間にみられた相関係数を表した。品種は低温区における花粉稔性が低い順に左から並んでいる。(a)発現量と花粉稔性に正の相関があったもの。(b)発現量と花粉稔性に負の相関があったもの。

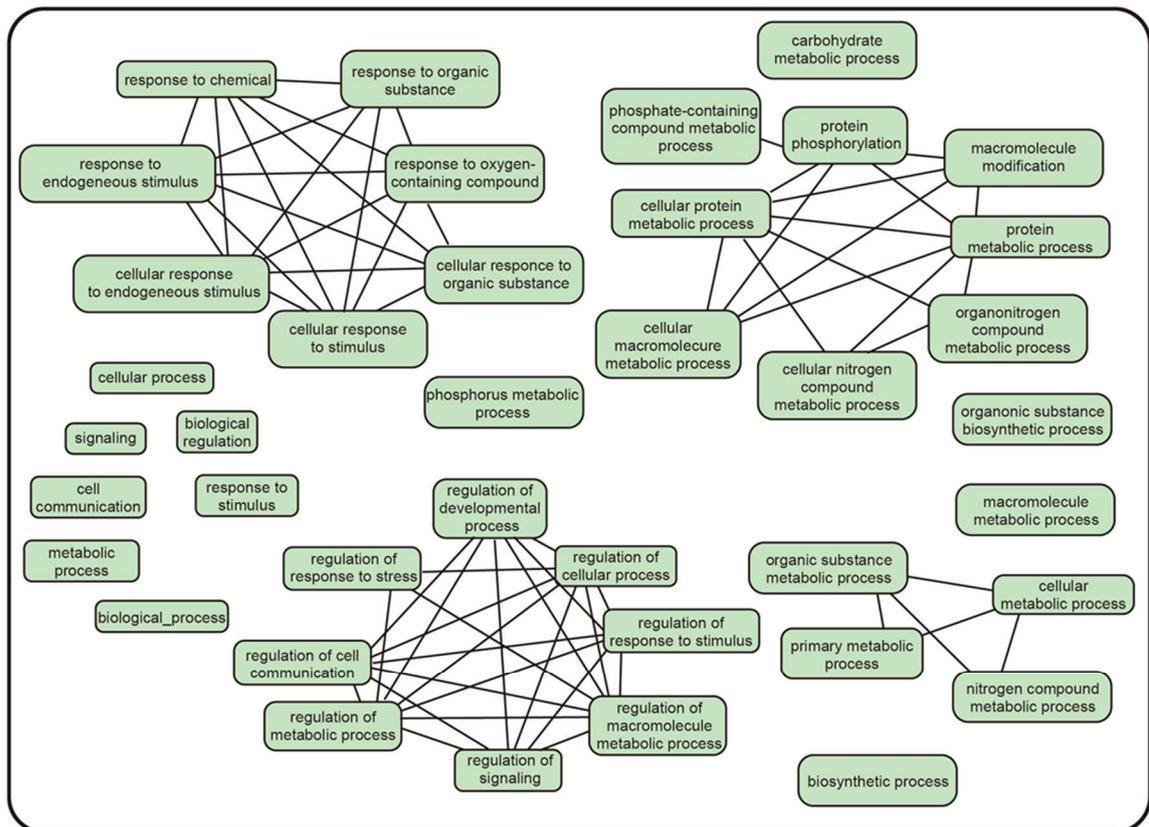


図4-11. 低温区における花粉稔性と遺伝子発現量に負の相関がみられた遺伝子のGO解析の結果. 検出された生物学的経路に関するGOのうち、特に有意( $q < 0.01$ )に多く検出されたGOについて、REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>)を用いて意味的重複を除いたうえで、類似性が高いGOを線でつないで示した.

### マイクロアレイ解析と RNA-seq 解析の等価性

マイクロアレイ解析では、低温ストレスに対する感受性程度が異なる 14 品種の転写パターンから、低温処理に対する発現変動や相関の程度に着目して、特徴的な低温関連因子を選抜した。それらの結果を RNA-seq 解析を用いて検証するため、マイクロアレイに供試した品種のうち、耐冷性品種の PL9 および Lambayeque1、感受性品種の日本晴およびササニシキの 4 品種を利用し、改めて栽培した。これらの 4 品種をマイクロアレイ解析の条件と同様に、穂ばらみ期に 12°C、4 日間の低温処理を行い、花粉稔性を調べ、RNA-seq 解析を行った。これにより、マイクロアレイ解析で低温ストレスとその発現パターンに関連が示された遺伝子から、細かな栽培条件の違いや解析手法の差異に影響されず、同様の傾向を示す遺伝子の選抜を試みた。RNA-seq 解析に用いた材料の低温区における花粉稔性は、日本晴、ササニシキ、Lambayeque1、PL9 の順で 3.9、24.8、72.1、85.8%であり、マイクロアレイ解析の際の日本晴とササニシキの間での花粉稔性に違いはあるものの、4 品種は低温耐性と感受性として明確に区別できる (図 4-12a)。

穂ばらみ期の葍における RNA-seq には、各品種、各処理区において、複数の個体から得た葍をバルクにして RNA を抽出したものを 1 サンプルとし、解析は 3 反復のサンプルを用いて行った。RNA-seq 解析では、日本晴のリファレンスゲノム情報 (IRGSP-1.0 2020-12-02) をもとに、全 37,860 遺伝子について発現量を調査した。各品種および各処理区における全 24 サンプルの発現量は TPM (Transcripts Per Million) によって補正された。マイクロアレイ解析の結果を RNA-seq 解析によって検証するには、まず 2 つの解析結果の類似性を評価する必要がある。各品種で両解析から得られた遺伝子発現量の相関係数を求めると、4 品種の無処理区におけるピアソン相関係数は日本晴、ササニシキ、Lambayeque1 および PL9 で 0.79、0.76、0.73 および 0.71 であった (図 4-12b)。同様に低温処理区の相関係数は日本晴、ササニシキ、Lambayeque1 および PL9 で 0.77、0.74、0.74 および 0.69 であった。これらの 8 つの相関は全て有意な正の相関関係を示したことから、マイクロアレイ解析の結果と RNA-seq の結果の間には十分な等価性が示された。

### RNA-seq 解析を用いた低温関連遺伝子の検証

まず、マイクロアレイ解析で低温ストレスに対する発現変動が共通した、Ure および Dre タイプそれぞれ 26 および 25 遺伝子の合計 51 遺伝子について検証する (表 4-6, 7)。2 つのタイプの発現変動がみられた 51 遺伝子のうち、RNA-seq 解析を行った 4 品種すべてで、無処理区と低温処理区で有意に 2 倍以上の発現変動があった遺伝子を選抜した。処理区間における発現量の平均の差は、最尤度比較法によって求められた  $p$  値をもとに計算された FDR (False Discovery Rate:  $q$  値) によって検定され、 $q$  値が 0.05 以下を示す場合に有意な差があると判断した。RNA-seq 解析によって 4 品種すべてで発現が上昇したのはマイクロアレイ解析から検出した Ure タイプの 26 遺伝子のうち 6 つだった (表 4-6)。同様に、マイ

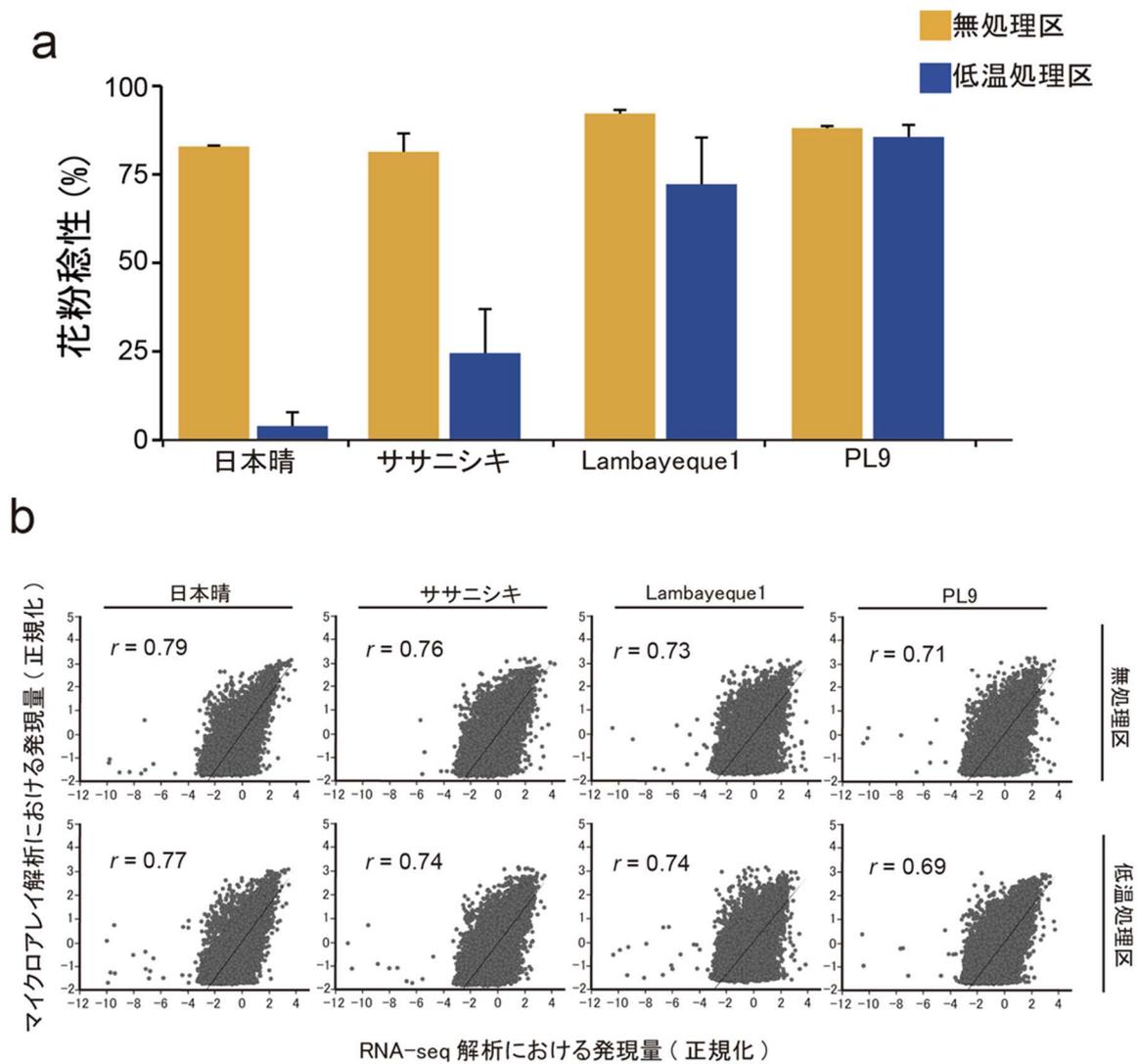


図4-12. RNA-seq解析に供試した4品種におけるマイクロアレイ解析との等価性. (a) RNA-seqに供試した4品種の無処理区および低温処理区における花粉稔性. 無処理区における花粉稔性を黄色, 低温処理区における花粉稔性を青で表した. エラーバーは標準誤差を示す. (b) マイクロアレイ解析とRNA-seq解析のそれぞれで得られた遺伝子発現量の相関関係. X軸にRNA-seq解析における発現量を, Y軸にマイクロアレイ解析における発現量を取り, 相関関係を調査した. 遺伝子発現量は平均値が0, 分散が1になるように正規化されている. 各品種の上段に無処理区での結果, 下段に低温処理区での結果をそれぞれ示した. 各グラフ内の直線は $y = x$ を示す.

表4-6. マイクロアレイ解析とRNA-seq解析に供試したすべての品種で発現が上昇した遺伝子

| Gene ID      | Annotation                                       | Fold Change |       |             |      |
|--------------|--|-------------|-------|-------------|------|
|              |  | 日本晴         | ササニシキ | Lambayeque1 | PL9  |
| Os06g0728700 | Homeodomain-like containing protein              | 378.9       | 18.7  | 26.6        | 27.9 |
| Os08g0386200 | WRKY transcription factor 69                     | 25.1        | 22.1  | 38.1        | 42.4 |
| Os03g0141200 | Similar to Beta-amylase PCT-BMY1                 | 42.7        | 26.0  | 51.7        | 9.0  |
| Os05g0494200 | Similar to Cystatin                              | 10.3        | 7.7   | 10.7        | 7.9  |
| Os04g0568700 | Similar to Heat stress transcription factor Spl7 | 50.1        | 23.3  | 6.3         | 6.9  |
| Os04g0117900 | Amidase family protein                           | 5.6         | 5.7   | 4.9         | 6.6  |

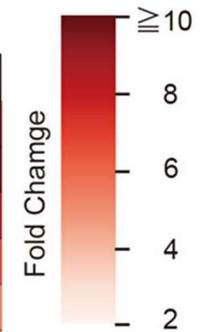
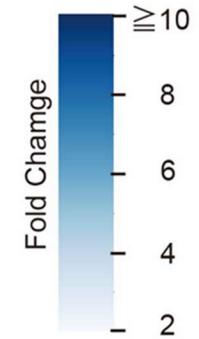


表4-7. マイクロアレイ解析とRNA-seq解析に供試したすべての品種で発現が減衰した遺伝子

| Gene ID      | Annotation  | Fold Change |       |            |      |
|--------------|---|-------------|-------|------------|------|
|              |   | 日本晴         | ササニシキ | Lambayque1 | PL9  |
| Os11g0150400 | Stress responsive alpha-beta barrel domain containing protein | 9.5         | 40.8  | 40.1       | 9.3  |
| Os02g0814400 | Cytochrome c 2C monohaem domain containing protein            | 16.3        | 21.0  | 12.2       | 24.4 |
| Os04g0396800 | Peptidase S10 serine carboxypeptidase family protein          | 16.7        | 32.0  | 44.3       | 57.6 |
| Os06g0663800 | Similar to FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase      | 50.9        | 29.6  | 10.9       | 21.8 |
| Os02g0753300 | Lipoxygenase LH2 domain containing protein                    | 6.3         | 12.6  | 5.2        | 6.7  |
| Os05g0133100 | Similar to PII protein  | 3.6         | 3.9   | 3.0        | 2.9  |
| Os09g0413700 | Conserved hypothetical protein                                | 3.1         | 3.9   | 4.6        | 3.0  |
| Os10g0419100 | Similar to Perakine reductase                                 | 2.3         | 2.9   | 5.6        | 2.8  |
| Os12g0512000 | Flavin monooxygenase-like enzyme Auxin biosynthesis           | 2.7         | 4.1   | 3.6        | 7.1  |



クロアレイ解析で Dre タイプに分類された 25 遺伝子のうち RNA-seq 解析で 4 品種において発現が減衰したのは 9 遺伝子だった (表 4-7). RNA-seq 解析によって, 複数の品種で低温ストレスに対する一様な発現変動が再確認された 15 遺伝子 (Ure: 6 個, Dre: 9 個) は, 穂ばらみ期のイネに普遍的な低温応答遺伝子である可能性が特に高い. マイクロアレイ解析と RNA-seq 解析に供試したすべての品種で発現が上昇していた 6 遺伝子のうち, ホメオドメインタンを含む Os06g0728700 は, マイクロアレイ解析において最も発現の上昇が大きかった (表 4-3, 6). Os06g0728700 は低温処理を施した穂ばらみ期のイネ品種において普遍的かつ明確な発現上昇がみられる遺伝子であるため, イネが低温を感知しているかどうかを判別するための分子マーカーとして利用できる. 加えて, Os06g0728700 はこれまで, 明確に低温ストレスとの関連を示す報告はなく, 本結果で初めて低温応答遺伝子であることが示された. 同様に, マイクロアレイ解析と RNA-seq 解析の両方で共通して発現が減衰した Os11g0150400 は, 両解析において最も大幅に発現が減衰する遺伝子で, ストレス応答性  $\alpha$ - $\beta$  バレルタンパク質をコードする (表 4-4, 7). ストレス応答性  $\alpha$ - $\beta$  バレルタンパク質は具体的な機能が分かっていないが, ポプラ (*Populus euphratica*) において塩ストレス応答性が報告されている (Gu et al., 2004).

#### 発現変動と耐冷性の関係の検証

マイクロアレイ解析から, 14 品種の低温耐性と発現変動の間に相関がみられた 169 遺伝子について検証を行う (図 4-13). 169 遺伝子は発現変動のパターンとの相関関係から 4 つのタイプ, 耐性品種ほど発現が上昇する遺伝子 (Type1: 16 個), 感受性品種ほど発現が減衰する遺伝子 (Type2: 67 個), 感受性品種ほど発現が上昇する遺伝子 (Type3: 45 個) および耐性品種ほど発現が減衰する遺伝子 (Type4: 41 個) に分けられた (図 4-13). これら 169 遺伝子の中で 4 品種の RNA-seq 解析で低温耐性品種もしくは感受性品種の間で有意な ( $q < 0.05$ ) 発現変動が検出された遺伝子は Type1: 3 つ, Type2: 4 つ, Type3: 3 つ, Type4: 7 つであった.

マイクロアレイ解析で耐性品種ほど発現が上昇した 16 遺伝子 (Type1) のうち, 耐性の PL9 および Lanbayequel の両方の RNA-seq 解析で, 有意な ( $q < 0.05$ ) 2 倍以上の発現上昇がみられた遺伝子は 3 つだった. この Type1 (耐性品種ほど発現が上昇) で検出された 3 遺伝子は 4 品種共通に有意な発現上昇が検出され, その中で耐性の PL9 と Lanbayequel でみられた発現上昇が大きい遺伝子はリン酸トランスポーター様遺伝子の Os09g0554000 のみだった (図 4-13). Os09g0554000 は RNA-seq 解析からも耐性品種ほど発現が上昇する遺伝子であることが確認された. 感受性品種ほど発現が減衰する Type2 (感受性品種ほど発現が減少) の 67 遺伝子のうち, RNA-seq で同様な傾向が観察された 4 遺伝子のうち, 耐性 2 品種のよりも感受性 2 品種において発現が大きく減衰していた遺伝子は 3 つで, これらは感受性ほど発現が減少することが再確認された (図 4-13). RNA-seq 解析において Type3

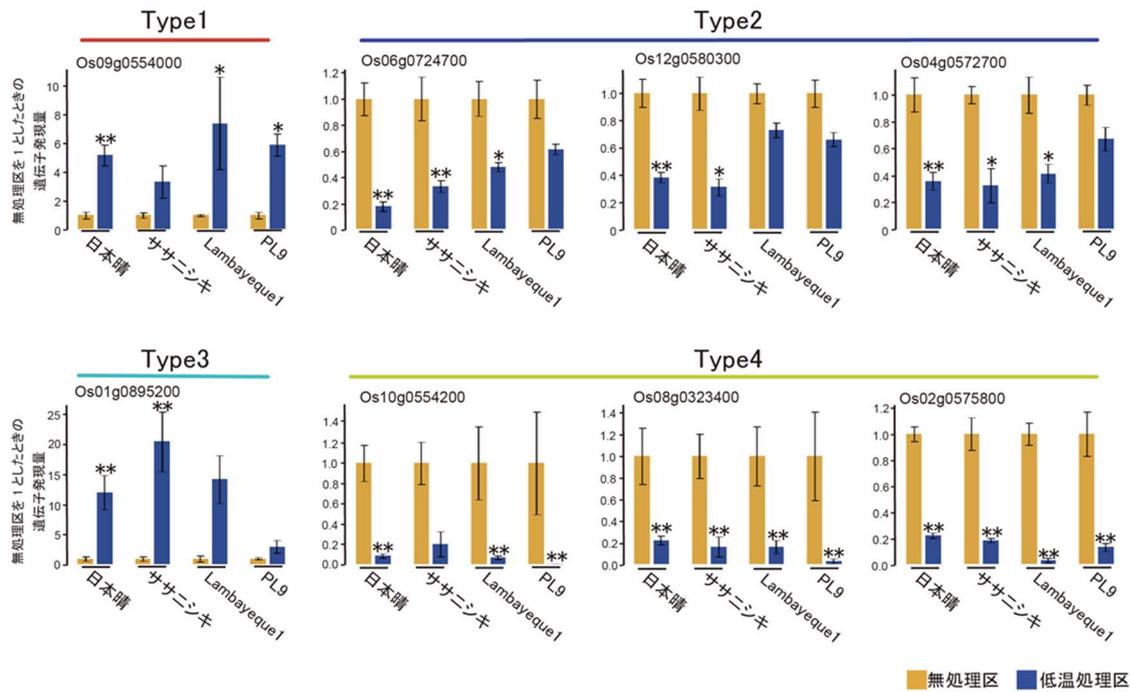


図4-13. マイクロアレイ解析で発現変動と耐冷性に相関がみられた遺伝子のうち、RNA-seq解析でも同様の傾向が確認された遺伝子の発現量。図4-7に示した1-4にタイプ分けされた遺伝子のうち、RNA-seqでも同様の傾向がみられた遺伝子について、各品種の無処理区における発現量の平均を1としたときの相対値で遺伝子発現量を示した。無処理区における発現量を黄色、低温処理区における発現量を青で表した。エラーバーは標準誤差を示す。処理区間で発現量の平均を比較し、FDR ( $q$ 値)が0.05以下を示す有意な差がみられた場合は\*を、FDR ( $q$ 値)が0.01以下の場合には\*\*で表した。

(感受性品種ほど発現が上昇) は 3 遺伝子が感受性品種の日本晴とササニシキで発現が上昇していた。このうち DOMON ドメインを持つタンパク質遺伝子 Os01g0895200 は日本晴とササニシキのみで有意に発現が上昇しており、そのほかは耐冷性と発現の上昇程度に明確な関連は見いだせない (図 4-13)。Type4 (耐性品種ほど発現が減衰) のうち、RNA-seq 解析で耐性品種の PL9 と Lambayeque1 において発現が減衰していた遺伝子は 7 つだった。7 遺伝子のうち、3 つは感受性品種の日本晴とササニシキより、耐性品種の PL9 と Lambayeque1 における発現の減衰が大きかった (図 4-13)。

以上のように、マイクロアレイ解析で 14 品種の低温耐性と発現変動の間に相関がみられた 169 遺伝子のうち、8 つの遺伝子について RNA-seq 解析でも同様の傾向が確認できた。少なくともこれら 8 つの遺伝子は、その発現変動とイネの穂ばらみ期耐冷性にみられるそれぞれの相関関係が RNA-seq 解析で再現性が確認された。8 個の遺伝子の中で、相関係数が最も顕著だったものは Type3 に分類される DOMON ドメインタンパク質遺伝子 Os01g0895200 だった ( $r = -0.72$ ) (図 4-13, 表 4-5)。DOMON ドメインタンパク質は膜貫通型タンパク質として知られているが、低温ストレスとの明確な関連性はこれまでに報告がない。

#### 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

マイクロアレイ解析に供試した 14 品種において、低温処理区の遺伝子発現量と花粉稔性に有意な相関関係がみられた遺伝子として、正の相関がみられた 396 個、負の相関がみられた 812 個選抜をした (図 4-8b)。これら 1308 個の遺伝子について、RNA-seq 解析に供試した感受性品種の日本晴およびササニシキの 2 品種と、耐性品種の Lambayeque1 および PL9 の 2 品種の間で低温処理区における発現量を比較し、耐冷性と遺伝子発現量の関係を検証した。マイクロアレイ解析で、耐冷性品種ほど発現量が高い傾向にあった遺伝子 (正の相関) 396 個のうち、RNA-seq 解析で得られた耐性 2 品種の 3 反復ずつにおける発現量の平均が、感受性 2 品種の発現量の平均よりも有意 ( $q < 0.05$ ) に高かった遺伝子は 28 個だった。同様に、マイクロアレイ解析で、感受性品種ほど発現量が高い傾向にあった遺伝子 (負の相関) 812 個のうち、RNA-seq 解析でも耐性品種より感受性品種で高い発現量を示したものは 97 個だった。これら合計 125 個の遺伝子は、その発現程度が穂ばらみ期のイネにおける低温感受性と強い関連がある遺伝子といえる。図 4-14a, b には、これら 125 個の遺伝子の中で、マイクロアレイ解析で花粉稔性と遺伝子発現量の間に  $r \geq 0.65$  もしくは  $-0.65 \leq r$  の相関がみられた 21 遺伝子を選抜し、それらの RNA-seq 解析における発現量について表した。マイクロアレイ解析によって 14 品種の花粉稔性と遺伝子発現量に最も顕著な正の相関があった遺伝子は、GDSSL リパーゼ遺伝子 Os06g0636700 ( $r = 0.72$ ) であり、負の相関では油脂輸送タンパク質遺伝子 Os11g0114900 (*OsLTP1.8*) ( $r = -0.77$ ) だった (図 4-14a, b)。これらの遺伝子は、穂ばらみ期の低温ストレスとの関連を明確に示した報告がこれまで

にないため、新規の低温ストレス関連遺伝子の可能性がある。一方、125 個の遺伝子のうち、Fun rice genes データベースに低温関連遺伝子として登録されている既知の遺伝子はペルオキシダーゼ遺伝子の *OsPOX1* (Os01g0263300) と MAPK 関連遺伝子の *OsMAPK5* (Os03g0285800) で、いずれも感受性品種でより高発現する遺伝子だった(図 4-14c)。 *OsPOX1* および *OsMAPK5* はいずれもイネにおいて低温ストレスによって誘導されることが報告されている (Kim et al., 2012; Xiong & Yang, 2003)。しかし、本結果では感受性品種ほどこれらの遺伝子が高発現する傾向にあり、このことは耐性品種よりも感受性品種の方が低温ストレスに対して過敏に応答していることを示唆している。感受性品種でより低温ストレスに対する応答が盛んな傾向は、マイクロアレイ解析でも示されているが、RNA-seq 解析でも同傾向を確認することができた。

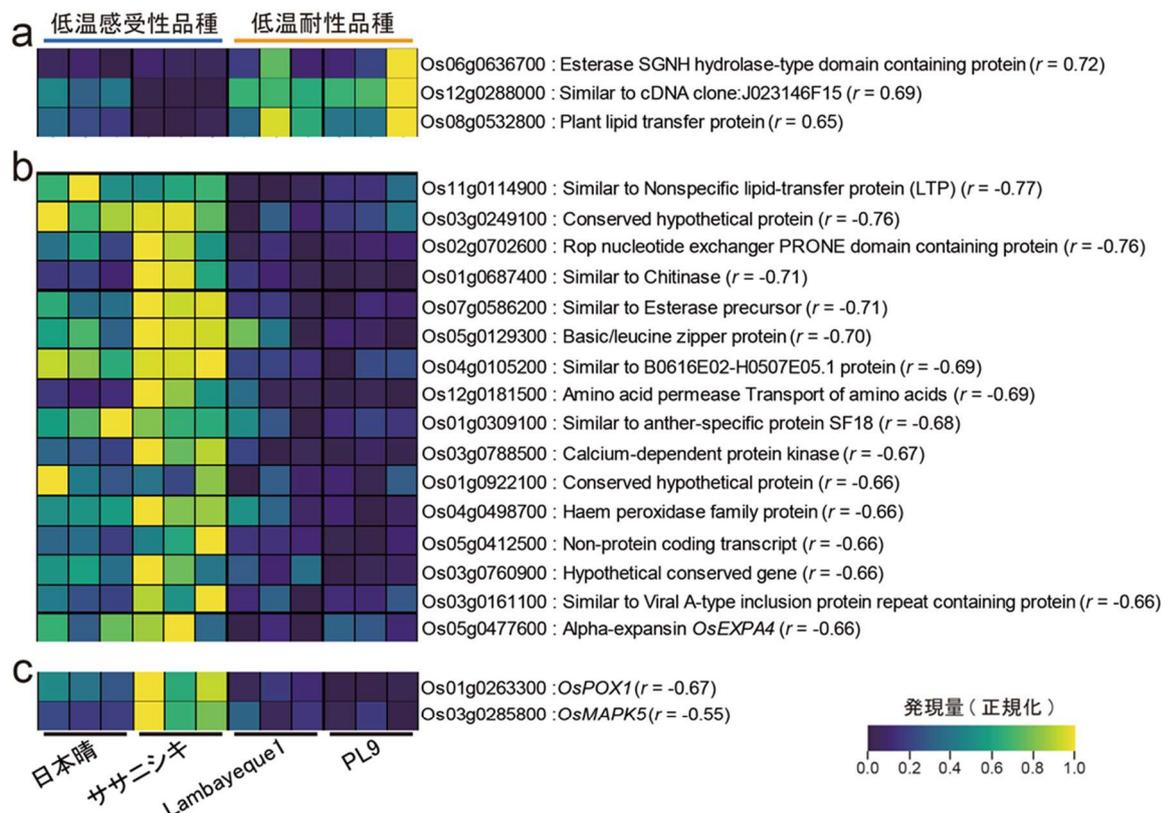


図4-14. マイクロアレイ解析で低温区における遺伝子発現量と花粉稔性に相関がみられた遺伝子のうち、RNA-seq解析でも同様の傾向がみられた遺伝子の発現量。マイクロアレイ解析から、低温区における花粉稔性と遺伝子発現量に相関関係がみられた遺伝子のうち、マイクロアレイ解析で $r \geq 0.65$ もしくは $-0.65 \leq r$ を示した遺伝子について、RNA-seqにおける発現量をヒートマップで表した。各遺伝子のIDの右側にはその遺伝子の機能を示し、括弧内にはマイクロアレイ解析で得られた相関係数を表した。(a) マイクロアレイ解析とRNA-seq解析の両方で耐冷性品種ほど低温区において高発現を示した遺伝子の発現量。(b) マイクロアレイ解析とRNA-seq解析の両方で低温感受性品種ほど低温区において高発現を示した遺伝子の発現量。(c) 低温感受性品種ほど高発現する遺伝子のうち、既知の低温関連遺伝子の発現量。

## 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

熱帯原産のイネは低温ストレスに弱く、特に穂ばらみ期の低温は不可逆的な花粉不稔を発生させ、結果として収量の低下につながる (Hayase et al., 1969; Satake, 1976). 現在、イネは北海道のような高緯度地域でも栽培がおこなわれているが、これには穂ばらみ期における耐冷性形質の獲得が重要な役割を果たしてきた (Li et al., 2021; Liu et al., 2018; Zhang et al., 2017). 穂ばらみ期の低温に対して耐性を示す品種が持つ耐冷性因子を特定するために様々な品種の組み合わせで遺伝解析が行われ、多くの QTL が特定されてきた (Andaya & Mackill, 2003; Dai et al., 2004; Endo et al., 2016; Kuroki et al., 2007; 黒木ら., 2011; Li et al., 1997; Li et al., 2021; Oh et al., 2004; Saito et al., 2001, 2010; Shimono et al., 2016; Shirasawa et al., 2012; Suh et al., 2010; Sun et al., 2019; Takeuchi et al., 2001; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2017; Zhu et al., 2015). 表 4-8 には、これまでに明らかになった QTL やそこから単離された遺伝子の一覧を示した。これまでに 30 を超える QTL が、イネの持つ 12 本の染色体すべてにおいて特定されているが、そこから単離された遺伝子は *Ctb1*, *CTB2* および *CTB4a* の 3 つにとどまっている (Li et al., 2021; Saito et al., 2010; Zhang et al., 2017). *Ctb1* は穂ばらみ期耐冷性遺伝子として初めて単離された遺伝子であるが、具体的な機能はわかっておらず、耐冷性を誘導する仕組みは不明である (Saito et al., 2010). *CTB4a* は *Ctb1* に続いて単離された穂ばらみ期耐冷性遺伝子で、耐性アレルを持つイネでは低温条件下における ATP の合成が活発であることが分かっている (Zhang et al., 2017). *CTB2* は Li ら (2021) によって最近単離された性遺伝子で、*CTB4a* の近傍に存在する。*CTB2* は UDP グルコースステロールグルコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子で、具体的な機能はわかっていないが、*CTB4a* と合わせてイネの低温適応に寄与したことが推定されている (Li et al. 2021). 以上のように、穂ばらみ期における耐冷性が誘導されるメカニズムに関する遺伝学および分子生物学的な情報は限られており、理解が進んでいない。

本研究では、穂ばらみ期の低温ストレスに関係する因子を探索するため、イネ 14 品種を用いたトランスクリプトーム解析から、穂ばらみ期の低温に応答する因子を選抜した (図 4-4). その結果、14 品種中 12 品種で共通した発現変動が検出された因子は、Ure タイプで 176 個、Dre タイプで 164 個だった。これらについて GO 解析を行うと、Ure タイプと Dre タイプの遺伝子群にはそれぞれ、外部刺激への応答とエピジェネティックな遺伝子発現抑制に関わる機能を持つものが多いことが分かった (図 4-6). このことから、低温にさらされた穂ばらみ期の葯ではエピジェネティックな遺伝子への発現抑制が弱まり、ストレス応答が活発に起きていることが示唆された。さらに多くの品種で共通した発現変動が検出された遺伝子について注目すると、14 品種すべてで発現上昇もしくは減衰する遺伝子は 26 個と 25 個選抜できた (表 4-3, 4). このうち、6 個と 9 個の遺伝子において、RNA-seq 解析に供試した全 4 品種でも同様の発現変動が確認でき、この 15 遺伝子はより普遍的に低温に応

表4-8. これまでに特定された穂ばらみ期耐冷性に関わるQTLと遺伝子の一覧.

| 染色体    | QTL / 遺伝子名      | 引用                      |
|--------|-----------------|-------------------------|
| Chr 1  | <i>Set1</i>     | Li et al 1997           |
|        | <i>qCT-1</i>    | Takeuchi et al 2001     |
|        | <i>qCTB1</i>    | Andaya and Mackill 2003 |
|        | <i>qCTB1.2</i>  | 黒木ら 2011                |
| Chr 2  | <i>qCTB2</i>    | Andaya and Mackill 2003 |
| Chr 3  | <i>qCTB3</i>    | Andaya and Mackill 2003 |
|        | <i>qRCT3</i>    | Dai et al 2004          |
|        | <i>qPSST-3</i>  | Suh et al 2010          |
|        | <i>qLTB3</i>    | Shirasawa et al 2012    |
| Chr 4  | <i>qCT-3-2</i>  | Zhu et al 2015          |
|        | <i>Ctb-2</i>    | Saito et al 2001        |
|        | <i>qCT-4</i>    | Endo et al 2016         |
|        | <i>qPSST4-1</i> | Xu et al 2008           |
|        | <i>Ctb1 *</i>   | Saito et al 2010        |
| Chr 5  | <i>CTB4a *</i>  | Zhang et al 2017        |
|        | <i>CTB2 *</i>   | Li et al 2021           |
|        | <i>qCTB5-1</i>  | Xu et al 2008           |
| Chr 5  | <i>qCTB5-2</i>  | Xu et al 2008           |
|        | <i>qCTR5</i>    | Shimono et al 2016      |
| Chr 6  | <i>qRCT6a</i>   | Dai et al 2004          |
|        | <i>qRCT6b</i>   | Dai et al 2004          |
| Chr 7  | <i>qCT-7</i>    | Takeuchi et al 2001     |
|        | <i>qRCT7</i>    | Dai et al 2004          |
|        | <i>qPPST-7</i>  | Suh et al 2010          |
|        | <i>qCTB-7-a</i> | Sun et al 2019          |
|        | <i>qCTB-7-b</i> | Sun et al 2019          |
| Chr 8  | <i>qCTB8</i>    | Kuroki et al 2007       |
| Chr 9  | <i>qPPST-9</i>  | Suh et al 2010          |
| Chr 10 | <i>qCTR10</i>   | Dai et al 2004          |
| Chr 11 | <i>qCT-11</i>   | Takeuchi et al 2001     |
|        | <i>fert11</i>   | Oh et al 2004           |
|        | <i>qPSST11</i>  | Suh et al 2010          |
| Chr 12 | <i>Ste2</i>     | Li et al 1997           |
|        | <i>qCTR12</i>   | Shimono et al 2016      |

\* : 単離された穂ばらみ期耐冷性遺伝子

答する遺伝子と考えて間違いない (表 4-6, 7). マイクロアレイ解析と RNA-seq 解析の両方で発現が上昇していた 8 遺伝子の中には WRKY タイプの転写因子である *OsWRKY69* が含まれており, この遺伝子はイネの低温応答にかかわる (Viana et al., 2021). 同様に, 両解析で共通して発現が減衰していた *Os11g0150400* は, ストレス応答性の  $\alpha$ - $\beta$  バレルタンパク質をコードし, このタンパク質は機能が分からないものの, ストレス応答性のタンパク質として知られている (Gu et al., 2004). 両解析で共通した発現変動が確認出来た 15 遺伝子はこれまで, 明確な穂ばらみ期耐冷性との関連性が示されていない. 今後, これらの遺伝子に注目することで, 穂ばらみ期の耐冷性に関わる新たな発見が期待される.

また, すべての品種で共通した発現変動が検出された 15 遺伝子には, イネが低温を感知しているかどうかを知るためのバイオマーカーとしての応用も期待される. 特定の遺伝子発現を指標に植物の状態を知る手法は, 概日周期に関わる研究ではすでに用いられており, シロイヌナズナでは時計遺伝子である *TOC1* の日周変動を調査することで植物の体内時刻を調べることができる (Nakamichi et al., 2009; Uehara et al., 2019). 同様の手法をイネの低温ストレスに適用することで, 例えば気温が変動する野外条件においてイネが低温ストレスに曝されているかどうかを知ることができる. これまでに植物のストレスを簡便に可視化する方法は開発されていない. 本研究で選抜した 15 遺伝子を用いた手法が確立すれば, 植物のストレス応答に関する研究において強力なツールとなるだろう.

### 耐冷性と低温応答性の関係

地球温暖化による気候変動によって, 農作物の収量や品質に負の影響が懸念されている昨今では, 高度なストレス耐性を持った植物の育成が課題となっている (Cai et al., 2015; Leng, 2018). これまでに DREB や NAC などに代表されるストレスに積極的に応答する因子の探索と, その過剰発現による耐性の獲得が試みられてきたが, 多くの場合, 耐性の獲得だけでなく同時に生育の遅延も生じた (Matsukura et al., 2010; Nakashima et al., 2007). このことから, 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え, 過剰なストレス応答による耐性の付与は農作物への応用において現実的ではない. 一方で, Ishiguro ら (2014) は, 低温処理を行った穂ばらみ期の葍における反復配列の発現変動を調査し, 低温耐性品種では感受性品種よりも低温ストレスによって発現が変動する反復配列が少ないことを報告した. この結果から石黒 (2015) は, 耐冷性品種が示した低温ストレスへの応答を '低温鈍感力' と名付け, 耐冷性と低温鈍感力の関連を示唆した. つまり, 耐冷性品種は, ストレスへの過剰な応答を抑えることで耐性を示しており, 上述した遺伝子の過剰発現による耐性の付与とは反対の性質を持つメカニズムを持つことが予想された.

本研究でも耐性品種ほど低温ストレスに応答する遺伝子数が少ない傾向を得ている. まず本研究では, 14 品種の耐冷性と遺伝子発現変動の相関関係を調査し, 耐冷性を反映する発現変動を示した因子を選抜, 4 つのタイプに分類した (図 4-7). Type1 と 4 に分類され

た 58 因子は耐冷性品種ほど発現変動が大きい傾向を示し、Type2 と 3 に分類された 113 因子は耐冷性品種で発現変動が抑えられていた。前者と後者の数を比較すると後者の方が多く、耐冷性品種では低温ストレスに応答する因子よりも、低温に応答せず安定した発現を示す因子の方が多く傾向があった。また、マイクロアレイ解析に供試した 14 品種の低温区における花粉稔性と遺伝子発現量の相関関係を調査し、耐冷性品種ほど低温下で高発現を示した 429 因子と低発現を示した 825 因子をそれぞれ選抜した (図 4-8)。選抜した因子の数は、低発現を示したもののが多く、このことは、耐冷性品種ほど低温ストレス下で遺伝子発現を抑える傾向を表している。以上のように、2 種類の相関分析から、耐冷性品種ほど低温ストレスによる発現変動が少なく、低温下での発現量が抑えられており、この傾向は石黒 (2015) の主張を支持している。つまり、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応答していることが改めて確認できた。本研究で改めて示された、耐性品種が示す低温ストレスへの鈍感性は、ストレスに対する応答性を向上させることで耐性を獲得する従来の戦略とは真逆の考え方である。そのため、耐冷性品種が低温鈍感力を示すメカニズムを解明することは、耐性の獲得と生育速度のトレードオフを解消できる可能性がある。

### 低温鈍感力と耐冷性の関係

前項で述べたように、本研究では耐冷性品種ほど低発現や少ない発現変動を示す遺伝子が多い傾向がみられた。興味深いことにそのような傾向を示した遺伝子には、すでに低温耐性との関連が知られている遺伝子が含まれていた (図 4-10)。特に穂ばらみ期耐冷性として知られる *Ctb1* が低温感受性品種ほど高発現する傾向にあった (Saito et al., 2010)。そのほかには過剰発現によって穂ばらみ期の耐冷性が誘導される *OsMYB4* などの転写因子も、感受性品種ほど高発現を示した (Park et al., 2010)。このように、耐冷性品種で低発現や少ない発現変動を示す遺伝子には、低温に応答し耐性を向上させる機能を持つものが多数含まれていた。この傾向から、低温ストレスに対する応答は感受性品種ほど過敏であるといえる。また、これらのゲノム全体の発現を制御している低温応答経路の存在も同時に推測することができる。この制御因子は低温ストレスを受けた直後に反応する遺伝子と考えて間違いない。

低温ストレスは細胞膜の硬化やタンパク質の活性の低下を引き起こし、それによる活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species) の発生は細胞へのダメージとなる (Bechtold et al., 2018; Örvár et al., 2000)。生理的な細胞へのダメージが感知されると、 $Ca^{2+}$  などのシグナル伝達物質が放出され、遺伝子発現などの分子的なストレス応答が活性化する (Ding et al., 2019)。このように、低温ストレスはまず、生理的な障害を引き起こすため、耐冷性品種ほど遺伝子発現レベルの低温応答が少ない原因は、生理的な障害の起きにくさにあるのではないか。実際に、穂ばらみ期における低温ストレスは ROS を発生し、それによって不稔花粉

が発生することが報告されている (Xu et al., 2020c). この仮説を支持する証拠として, ROS を除去する機能を持つ複数の遺伝子において, 発現パターンと耐冷性の間に相関関係が検出できたことがあげられる.

ROS を除去する機能を持つペルオキシダーゼをコードする *OsPOXI* は, マイクロアレイ解析と RNA-seq 解析の両方で低温感受性品種ほど高発現を示した (Kim et al., 2012). このことから, 感受性品種ほど ROS の除去効率が悪いが, ROS による生理的な障害が起きやすいことが考えられる. ROS は細胞壁や細胞膜を酸化することで細胞にダメージを与えるため, 細胞壁の構造や代謝の差によっても低温耐性が獲得されることが考えられる. 実際に, 細胞壁の構造は耐冷性に関わることが知られている (Xu et al., 2020b). 本結果でも細胞壁の形成に関わる遺伝子で, その発現量と耐冷性に顕著な相関関係を検出している. マイクロアレイ解析から Os06g0636700 と Os11g0114900 は低温区における発現量と耐冷性の相関分析において, それぞれ  $r = 0.72$  および  $r = -0.77$  を示し, RNA-seq 解析でも耐冷性と発現量の間と同様の傾向が確認されている (図 4-14). Os06g0636700 は GDSL リパーゼをコードする遺伝子で, 同じタンパク質ファミリーに属するイネの遺伝子 *RMS2* が花粉の形成に重要な役割を持つことが分かっている (Zhao et al., 2020). Os11g0114900 は非特異的脂質転移タンパク質 (LTP : The nonspecific lipid transfer proteins) をコードする遺伝子であり, LTP は細胞膜の外側に局在して, クチクラワックスなど細胞壁の形成に必要な物質の輸送を行っている (Edqvist et al., 2018). 今後, これらの遺伝子に注目した解析によって, ROS の感受性程度が低温鈍感力を決定するという上述の仮説が検証されることを期待する.

本研究では, 多数の遺伝子においてその発現パターンと耐冷性に顕著な相関関係を見出し, それらのほとんどはこれまでに低温ストレスとの関連を知られていない. 本研究で選抜した新たな低温関連遺伝子に着目することで, 低温鈍感力を含む, 新たな耐冷性メカニズムの発見につながることを期待する.

## 第5章 総合討論

### イネ耐冷性の複雑さ

イネは日本をはじめとする多くの国で主食として消費される重要な作物であるが、熱帯原産で低温ストレスに弱く、穂ばらみ期の葯は特に低温に弱い (Hayase et al., 1969; Satake 1976). 穂ばらみ期の低温は不稔花粉の発生による種子収量の低下を招き、その原因はタペート肥大の発生であると考えられてきた (Mamun et al., 2006; Nishiyama, 1970; Oliver et al., 2007). 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こなかった。

第2章ではこの問題を解決するため、多様な低温感受性程度を示すイネ13品種を用いて葯の内部構造の変化を観察し、不稔花粉の発生と形態的な変化の関係を調査した。その結果、タペート肥大と不稔花粉の発生率に相関関係はなく、タペート肥大という単一の現象では穂ばらみ期の低温障害を説明できないことを示した (図2-4a)。また、本研究では葯の形態的な異常と耐冷性の間に相関を検出したが、花粉稔性が著しく低いにも関わらず、葯の形態的な変化が観察されなかった T65 や Kasalath など、必ずしも2つの関連性が示されない品種も存在し、単一の遺伝的メカニズムで説明できるほど葯の形態異常と低温障害の発生機序は単純ではない (図2-12)。

低温障害の発生機序が複雑であることは、イネの持つ耐冷性メカニズムが複雑であることを意味する。これまでイネの穂ばらみ期の耐冷性に関わる QTL は15報以上の論文に掲載されている (Andaya & Mackill, 2003; Dai et al., 2004; Endo et al., 2016; Kuroki et al., 2007; 黒木ら., 2011; Li et al., 1997; Li et al., 2021; Oh et al., 2004; Saito et al., 2001, 2010; Shimono et al., 2016; Shirasawa et al., 2012; Suh et al., 2010; Sun et al., 2019; Takeuchi et al., 2001; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2017; Zhu et al., 2015)。その中で、イネが持つ穂ばらみ期の耐冷性遺伝子として単離されたものは *Ctb1*, *CTB2* および *CTB4a* だけである (Li et al., 2021; Saito et al., 2010; Zhang et al., 2017)。 *Ctb1* は初めて単離された穂ばらみ期の耐冷性遺伝子であるが、その機能はいまだにわかっていない (Saito et al., 2010)。 *CTB4a* はロイシンリッチリピート受容体様キナーゼをコードする遺伝子で、低温条件下において ATP 合成を促進する働きを示すが、耐性を誘導する具体的な機構は不明である (Zhang et al., 2017)。 UDP-グルコースステロールグルコシルトランスフェラーゼをコードする *CTB2* はイネの栽培化において、 *CTB4a* とともに耐冷性に寄与したと考えられている (Li et al., 2021)。この2つの遺伝子は *indica* と *japonica* の穂ばらみ期の耐冷性に関する基本的差異を説明する遺伝的メカニズムの理解には有用であるが、北海道系統のように極端に強い耐性品種との遺伝的関連性までを説明できるものではない。そのため、第4章では、北海道で育成され、強い耐冷性を持つ品種を含むイネ14品種のトランスクリプトーム解析を行い、

耐冷性と関連する遺伝子を選抜した。低温によるゲノム全体の遺伝子発現の攪乱と耐冷性の関係に注目すると、耐冷性品種の特徴として低温に対する過敏な遺伝子発現が少ない、いわゆる‘低温鈍感力’ともいえる共通した性質が見えてきた。

### 低温鈍感力と低温耐性の関係

第4章では、マイクロアレイ解析から14品種の耐冷性と遺伝子発現変動に有意な相関を示した因子を選抜し、発現変動パターンからそれらを4つのタイプに分類した(図4-7)。その結果、耐性品種で発現が変動する因子(Type1, 4)よりも感受性品種で発現が変動する因子(Type2, 3)の数が多く、耐性品種ほど低温ストレスに応答する因子の数が少ないことが示された。また、低温区における遺伝子発現量と耐冷性の相関解析では、耐冷性品種で高発現する因子よりも感受性品種で高発現する因子の数が多かった(図4-8b)。以上の2種類の相関解析は、耐冷性品種ほど低温ストレスに対する応答が緩やかであることを示している。同様の傾向をIshiguroら(2014)は報告しており、穂ばらみ期の低温による反復配列の発現変動が、低温感受性品種に比べて耐性品種では抑えられることを示した。同氏はこの結果を受け、耐性品種が持つ、低温ストレスに対する応答性の低さを‘低温鈍感力’と呼んだ(石黒2015)。耐性品種が低温鈍感力を示す理由として、遺伝子や反復配列レベルでの応答を誘導する以前の、低温ストレスを感知する段階に原因があると考えている。

低温ストレスに曝された植物では、細胞膜の硬化やROSの発生などの生理的な障害が発生することで、様々な代謝が攪乱される(Bechtold et al., 2018; Örvar et al., 2000)。細胞においてROSによるダメージが発生すると、WRKYタイプの転写因子が発現し、MAPキナーゼカスケードが活性化され、遺伝子の発現応答が起こる(Guo et al., 2019; Zhang et al., 2014)。つまり、耐冷性品種ではROSによる生理的な攪乱作用が起きにくく、結果として遺伝子発現レベルでの低温応答が抑えられるのではないだろうか。実際に、ROSの除去能力は穂ばらみ期耐冷性に関係することが知られ、Xuら(2020c)は*OsLTT1*(Os10g0482200)の変異体で低温ストレス下におけるROSの除去活性が高く、花粉の稔性が低下しにくいことを報告している。本結果でも、低温処理区においてROSの除去に関わる*OsAPX2*や*OsPOX1*などの遺伝子の発現量が、耐冷性と有意な相関を示した(図4-10, 14)(Kim et al., 2012; Zhang et al., 2013)。以上のことから、本結果で耐冷性品種が示した低温鈍感力は、低温ストレスによって生じたROSの除去能力が関係していると筆者は考えている。

また、Ishiguroら(2014)が報告した反復配列の発現変動と耐冷性の関係も、同様のメカニズムが関連していると考えてもおかしくない。転移因子の発見者であるMcClintockは、ストレスに遭遇した植物のゲノムでは反復配列の転写が活性化するというゲノムストレス説を提唱している(McClintock, 1984)。一般に、転移因子の活性化は転移による変異を発生させるため、エピジェネティックに抑制されている(Lisch, 2009)。一方で、転移因子の転移が生存に有利に働く場合もある。イネではトランスポゾンが遺伝子のプロモーター領

域に転移することで *cis* エレメントとして振る舞い、下流の遺伝子にストレス応答性が付与された例が報告されている (Naito et al., 2009). この他にも転移因子による変異が宿主の生存に有利に働く場合があるため、転移因子は生物の進化における原動力の 1 つとして考えられている (Biémont, 2010; Oliver and Greene, 2009). つまり、ストレスによる転移因子の活性化は単なる攪乱反応ではなく、変異を生じることで適応性を得るための生存戦略の 1 つである可能性もある. しかし上述したように、耐冷性品種では ROS による生理的な攪乱が起きにくいとすれば、転移因子の発現変動は変異のリスクを回避するために抑制されることが予想できる. 第 3 章では正常な生育条件における薬ゲノムの H3K9me2 修飾パターンを調査し、栄養器官である葉に比べて生殖器官の薬では反復配列におけるエピジェネティックな発現抑制が強いことが示された (図 3-2). 低温ストレスによる H3K9me2 修飾パターンの変化を調査することで、反復配列の発現変動と耐冷性の関係について明らかになることが期待される.

#### 耐性作物の育成における低温鈍感力

近年、地球温暖化による気候変動が世界各地で観測され、農作物への影響が懸念されている (Cai et al., 2015; Leng, 2018). そのため、ストレスに応答する転移因子の探索と、それらを過剰発現させることでストレス耐性植物を作出する試みが行われてきたが、その多くは耐性の獲得と同時に生育の遅延をもたらした (Liu et al., 1998; Moon et al., 2019; Nakashima et al., 2007; Takasaki et al., 2010). つまり、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え、このトレードオフを打破することがストレス耐性作物を育成するうえでの大きな課題となっている (Kudo et al., 2017; Nakashima et al., 2014). すでに述べたように、第 4 章の結果から、イネの耐冷性品種は低温鈍感力を示し、過剰発現によって耐性をもたらす MYB などの転写因子の発現量が感受性品種に比べて低かった (図 4-10). 以上の結果は、低温鈍感力を付与することでストレス条件下でも通常通り生育させることが、低温耐性と生育のトレードオフを打破する解決策である可能性を示している. 本研究では低温鈍感力を誘導する明確なメカニズムは特定できていないが、低温ストレスに関連する発現パターンを示した遺伝子を多数選抜している. 例えば、マイクロアレイ解析と RNA-seq の両方で耐性品種ほど低温区で高発現することが確認された Os06g0636700 は細胞壁の形成に関わる GDSL エステラーゼをコードする遺伝子である (図 4-14b) (Chepyshko et al., 2012). 細胞壁の構造は耐冷性に関わることが知られており、この Os06g0636700 は新しい穂ばらみ期耐冷性遺伝子かもしれない (Xu et al., 2020b).

地球温暖化による影響を加味すると、イネの品種育成において重要なのは低温耐性よりも高温耐性に思えるかもしれない. 実際、登熟期のイネに対する高温は胴割れ米を発生させ、品質の低下を招く (長田ら 2013). しかし、高温障害のほとんどが品質の低下に関するものである一方、低温障害は収量の低下に直結するため、その重要性は低温耐性の方が高いと著

者は考える。さらに、地球温暖化による夏季の気温上昇は他の季節に比べて緩やかであるため、冷害のリスクはさほど変わらないという意見もある（下野 2012）。以上のことから、イネの低温障害への対応は今も重要な課題であるといえる。また、乾燥や高温と同様、低温ストレスは植物にとって基本的な非生物ストレスであり、植物のストレス応答機構を理解するうえで無視できない。今後、本研究で選抜された遺伝子に注目した研究を行い、前項で述べた低温鈍感力と耐性の関係における仮説を検証することで、ストレス耐性植物の作出における新たなアプローチの開拓につながることを期待する。

## 引用文献

Andaya, V. C., & Mackill, D. J. (2003). QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a japonica x indica cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(6), 1084–1090.

Atighi, M. R., Verstraeten, B., De Meyer, T., & Kyndt, T. (2021). Genome-wide shifts in histone modifications at early stage of rice infection with *Meloidogyne graminicola*. *Molecular Plant Pathology*, 22(4), 440–455.

Baroux, C., & Autran, D. (2015). Chromatin dynamics during cellular differentiation in the female reproductive lineage of flowering plants. *Plant Journal*, 83(1), 160–176.

Bechtold, U., Ferguson, J. N., & Mullineaux, P. M. (2018). To defend or to grow: Lessons from *Arabidopsis* C24. *Journal of Experimental Botany*, 69(11), 2809–2821.

Biémont, C. (2010). A brief history of the status of transposable elements: from junk DNA to major players in evolution. *Genetics*, 186(4), 1085–1093.

Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology*, 34(5), 525–527.

Cai, W., Santoso, A., Wang, G., Yeh, S. W., An, S. Il, Cobb, K. M., Collins, M., Guilyardi, E., Jin, F. F., Kug, J. S., Lengaigne, M., Mcphaden, M. J., Takahashi, K., Timmermann, A., Vecchi, G., Watanabe, M., & Wu, L. (2015). ENSO and greenhouse warming. *Nature Climate Change*, 5(9), 849–859.

Chen, N., Xu, Y., Wang, X., Du, C., Du, J., Yuan, M., Xu, Z., & Chong, K. (2011). OsRAN2, essential for mitosis, enhances cold tolerance in rice by promoting export of intranuclear tubulin and maintaining cell division under cold stress. *Plant, Cell and Environment*, 34(1), 52–64.

Cheng, Z., Buell, C. R., Wing, R. A., Gu, M., & Jiang, J. (2001). Toward a cytological characterization of the rice genome. *Genome Research*, 11(12), 2133–2141.

- Chepyshko, H., Lai, C. P., Huang, L. M., Liu, J. H., & Shaw, J. F. (2012). Multifunctionality and diversity of GDSL esterase/lipase gene family in rice (*Oryza sativa* L. *japonica*) genome: New insights from bioinformatics analysis. *BMC Genomics*, 13(1).
- Dai, L., Lin, X., Ye, C., Ise, K., Saito, K., Kato, A., Xu, F., Yu, T., & Zhang, D. (2004). Identification of quantitative trait loci controlling cold tolerance at the reproductive stage in Yunnan landrace of rice, Kunmingxiaobaigu. *Breeding Science*, 54(3), 253–258.
- Ding, Yanglin, Shi, Y., & Yang, S. (2019). Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. *New Phytologist*, 222(4), 1690–1704.
- Ding, Yong, Wang, X., Su, L., Zhai, J. X., Cao, S. Y., Zhang, D. F., Liu, C. Y., Bi, Y. P., Qian, Q., Cheng, Z. K., Chu, C. C., & Cao, X. F. (2007). SDG714, a histone H3K9 methyltransferase, is involved in Tos17 DNA methylation and transposition in rice. *Plant Cell*, 19(1), 9–22.
- Edqvist, J., Blomqvist, K., Nieuwland, J., & Salminen, T. A. (2018). Plant lipid transfer proteins: Are we finally closing in on the roles of these enigmatic proteins? *Journal of Lipid Research*, 59(8), 1374–1382.
- Endo, T., Chiba, B., Wagatsuma, K., Saeki, K., Ando, T., Shomura, A., Mizubayashi, T., Ueda, T., Yamamoto, T., & Nishio, T. (2016). Detection of QTLs for cold tolerance of rice cultivar ‘Kuchum’ and effect of QTL pyramiding. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(3), 631–640.
- Gu, R., Fonseca, S., Puskás, L. G., Hackler, L., Zvara, Á., Dudits, D., & Pais, M. S. (2004). Transcript identification and profiling during salt stress and recovery of *Populus euphratica*. *Tree Physiology*, 24(3), 265–276.
- Guo, Z., Liu, C., Xiao, W., Wang, R., Zhang, L., Guan, S., Zhang, S., Cai, L., Liu, H., Huang, X., Guo, J., Zhou, X., Du, X., Pan, G., & Chen, Z. (2019). Comparative transcriptome profile analysis of anther development in reproductive stage of rice in cold region under cold Stress. *Plant Molecular Biology Reporter*, 37(3), 129–145.
- Hayase, H., Satake, T., Nishiyama, I., & Ito, N. (1969). Male sterility caused by cooling treatment at the meiotic stage in rice plants: II. The most sensitive stage to cooling and the fertilizing ability of pistils. *Japanese Journal of Crop Science*, 38(4), 706–711.

Higo, A., Saihara, N., Miura, F., Higashi, Y., Yamada, M., Tamaki, S., Ito, T., Tarutani, Y., Sakamoto, T., Fujiwara, M., Kurata, T., Fukao, Y., Moritoh, S., Terada, R., Kinoshita, T., Ito, T., Kakutani, T., Shimamoto, K., & Tsuji, H. (2020). DNA methylation is reconfigured at the onset of reproduction in rice shoot apical meristem. *Nature Communications*, 11(1), 1–12.

Hirano, K., Aya, K., Hobo, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Shim, R. A., Hasegawa, Y., Ueguchi-Tanaka, M., & Matsuoka, M. (2008). Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice. *Plant and Cell Physiology*, 49(10), 1429–1450.

Hou, J., Lu, D., Mason, A. S., Li, B., An, S., Li, G., & Cai, D. (2021). Distribution of MITE family Monkey King in rapeseed (*Brassica napus* L) and its influence on gene expression. *Genomics*, 113(5), 2934–2943.

Hu, Y., Zhang, L., He, S., Huang, M., Tan, J., Zhao, L., Yan, S., Li, H., Zhou, K., Liang, Y., & Li, L. (2012). Cold stress selectively unsilences tandem repeats in heterochromatin associated with accumulation of H3K9ac. *Plant, Cell and Environment*, 35(12), 2130–2142.

石黒聖也. (2015). 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 (*Doctoral dissertation*, 北海道大学).

Ishiguro, S., Ogasawara, K., Fujino, K., Sato, Y., & Kishima, Y. (2014). Low temperature-responsive changes in the anther transcriptome's repeat sequences are indicative of stress sensitivity and pollen sterility in rice strains. *Plant Physiology*, 164(2), 671–682.

Ito, N. (1978a). Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants: XVI. changes in carbohydrates, nitrogenous and phosphorous compounds in rice anthers after cooling treatment. *Japanese Journal of Crop Science*, 47(2), 318–323.

Ito, N. (1978b). Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants: XVII. Changes in carbohydrates, nitrogenous and phosphorous compounds in rice anthers during cooling treatment. *Japanese Journal of Crop Science*, 47(2), 324–329.

Ito, H., Gaubert, H., Bucher, E., Mirouze, M., Vaillant, I., & Paszkowski, J. (2011). An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature*, 472(7341), 115–120.

Johnson, L. M., Bostick, M., Zhang, X., Kraft, E., Henderson, I., Callis, J., & Jacobsen, S. E. (2007). The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Current Biology*, 17(4), 379–384.

Jung, C. H., O'Brien, M., Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2015). Epigenetic landscape of germline specific genes in the sporophyte cells of arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, 6, 321.

Kawahara, Y., Bastide, M. De, Hamilton, J. P., Kanamori, H., McCombie, W. R., Ouyang, S., Schwartz, D. C., Tanaka, T., Wu, J., Zhou, S., Childs, K. L., Davidson, R. M., Lin, H., Quesada-Ocampo, L., Vaillancourt, B., Sakai, H., Lee, S. S., Kim, J., Numa, H., Itoh, T., Buell, C. R., & Matsumoto, T. (2013). Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice*, 6(1), 1–10.

Kim, S. H., Choi, H. S., Cho, Y. C., & Kim, S. R. (2012). Cold-responsive regulation of a flower-preferential class III peroxidase gene, OsPOX1, in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Biology*, 55(2), 123-131.

Kowar, T., Zakrzewski, F., Macas, J., Kobličková, A., Viehoveer, P., Weisshaar, B., & Schmidt, T. (2016). Repeat composition of CenH3-chromatin and H3K9me2-marked heterochromatin in Sugar Beet (*Beta vulgaris*). *BMC Plant Biology*, 16(1), 1–16.

Kudo, M., Kidokoro, S., Yoshida, T., Mizoi, J., Todaka, D., Fernie, A. R., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Double overexpression of DREB and PIF transcription factors improves drought stress tolerance and cell elongation in transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal*, 15(4), 458–471.

黒木慎, 斎藤浩二, 松葉修一, 横上晴郁, 安藤露, 佐藤裕, 安東郁男, 清水博之. (2011). イネ系統「北海 PL9」の穂ばらみ期耐冷性に関する QTL の検出. *育種学研究*, 13(1), 11-18.

Kuroki, M., Saito, K., Matsuba, S., Yokogami, N., Shimizu, H., Ando, I., & Sato, Y. (2007). A quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 8. *Theoretical and Applied Genetics*, 115(5), 593–600.

Leng, G. (2018). Keeping global warming within 1.5 ° C reduces future risk of yield loss in the United States: A probabilistic modeling approach. *Science of the Total Environment*, 644, 52–59.

Li, H. B., Wang, J., Liu, A. M., Liu, K. D., Zhang, Q., & Zou, J. S. (1997). Genetic basis of low-temperature-sensitive sterility in indica-japonica hybrids of rice as determined by RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(7), 1092–1097.

Li, J., Zeng, Y., Pan, Y., Zhou, L., Zhang, Z., Guo, H., Lou, Q., Shui, G., Huang, H., Tian, H., Guo, Y., Yuan, P., Yang, H., Pan, G., Wang, R., Zhang, H., Yang, S., Guo, Y., Ge, S., Li, J., Li, Z. (2021). Stepwise selection of natural variations at CTB2 and CTB4a improves cold adaptation during domestication of japonica rice. *New Phytologist*, 231(3), 1056–1072.

Li, N., Zhang, D. S., Liu, H. S., Yin, C. S., Li, X. X., Liang, W. Q., Yuan, Z., Xu, B., Chu, H. W., Wang, J., Wen, T. Q., Huang, H., Luo, D., Hong, M., & Zhang, D. B. (2006). The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell*, 18(11), 2999–3014.

Lisch, D. (2009). Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 43–66.

Liu, C., Ou, S., Mao, B., Tang, J., Wang, W., Wang, H., Cao, S., Schläppi, M. R., Zhao, B., Xiao, G., Wang, X., & Chu, C. (2018). Early selection of bZIP73 facilitated adaptation of japonica rice to cold climates. *Nature Communications*, 9(1), 1–12.

Liu, H., & Nonomura, K. I. (2016). A wide reprogramming of histone H3 modifications during male meiosis I in rice is dependent on the Argonaute protein MEL1. *Journal of Cell Science*, 129(19), 3553–3561.

Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell*, 10(8), 1391–1406.

Mamun, E. A., Alfred, S., Cantrill, L. C., Overall, R. L., & Sutton, B. G. (2006). Effects of chilling on male gametophyte development in rice. *Cell Biology International*, 30(7), 583–591.

Mao, H., Wang, H., Liu, S., Li, Z., Yang, X., Yan, J., Li, J., Tran, L. S. P., & Qin, F. (2015). A transposable element in a NAC gene is associated with drought tolerance in maize seedlings. *Nature Communications*, 6, 1–7.

Matsukura, S., Mizoi, J., Yoshida, T., Todaka, D., Ito, Y., Maruyama, K., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Molecular Genetics and Genomics*, 283(2), 185–196.

Matsushima, S. (1957). Analysis of development factors determining yield and yield prediction in lowland rice. *Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences in Japan*, A5, 1-271.

McClintock, B. (1984). The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, 226(4676), 792-801.

Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X., & Thomas, P. D. (2019). PANTHER version 14: More genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D419–D426.

Moon, S. J., Min, M. K., Kim, J. A., Kim, D. Y., Yoon, I. S., Kwon, T. R., Byun, M. O., & Kim, B. G. (2019). Ectopic expression of OsDREB1G, a member of the OsDREB1 subfamily, confers cold stress tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science*, 10, 297.

長田健二, 佐々木良治, & 大平陽一. (2013). 高温登熟条件下における米粒の胴割れ発生の品種間差異. *日本作物学会紀事*, 82(1), 42-48.

Naito, K., Zhang, F., Tsukiyama, T., Saito, H., Hancock, C. N., Richardson, A. O., Okumoto, Y., Tanisaka, T., & Wessler, S. R. (2009). Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression. *Nature*, 461(7267), 1130–1134.

Nakamichi, N., Kusano, M., Fukushima, A., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T., Saito, K., Sakakibara, H., & Mizuno, T. (2009). Transcript profiling of an arabidopsis PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant and Cell Physiology*, 50(3), 447–462.

Nakashima, K., Jan, A., Todaka, D., Maruyama, K., Goto, S., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). Comparative functional analysis of six drought-responsive promoters in transgenic rice. *Planta*, 239(1), 47–60.

Nakashima, K., Tran, L. S. P., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant Journal*, 51(4), 617–630.

Neumann, P., Yan, H., & Jiang, J. (2007). The centromeric retrotransposons of rice are transcribed and differentially processed by RNA interference. *Genetics*, 176(2), 749–761.

Nishiyama, I. (1970). Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants: VII. electron microscopical observations on tapetal cells dilated by the cooling treatment. *Japanese Journal of Crop Science*, 39(4), 480-486.

Nishiyama, I. (1976). Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants: XII. classification of tapetal hypertrophy on the basis of ultrastructure. *Japanese Journal of Crop Science*, 45(2), 254-262.

Nishiyama, I. (1978). Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants: XVIII. Some enzyme activities in anthers during and after the cooling. *Japanese Journal of Crop Science*, 47(4), 551-556.

Nishiyama, I. (1982). Male Sterility Caused by Cooling Treatment at the Young Microspore Stage in Rice Plants: XXII. A method to predict sterility just after the young microspore stage. *Japanese Journal of Crop Science*, 51(3), 386-392.

Niu, N., Liang, W., Yang, X., Jin, W., Wilson, Z. A., Hu, J., & Zhang, D. (2013). EAT1 promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice. *Nature Communications*, 4, 1–11.

Oda, S., Kaneko, F., Yano, K., Fujioka, T., Masuko, H., Park, J. I., Kikuchi, S., Hamada, K., Endo, M., Nagano, K., Nagamura, Y., Kawagishi-Kobayashi, M., Suwabe, K., Suzuki, G., & Watanabe, M. (2010). Morphological and gene expression analysis under cool temperature conditions in rice anther development. *Genes and Genetic Systems*, 85(2), 107–120.

Oh, C. S., Choi, Y. H., Lee, S. J., Yoon, D. B., Moon, H. P., & Ahn, S. N. (2004). Mapping of quantitative trait loci for cold tolerance in weedy rice. *Breeding Science*, 54(4), 373–380.

Oliver, K. R., & Greene, W. K. (2009). Transposable elements: powerful facilitators of evolution. *Bioessays*, 31(7), 703-714.

Oliver, S. N., Dennis, E. S., & Dolferus, R. (2007). ABA regulates apoplastic sugar transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice. *Plant and Cell Physiology*, 48(9), 1319–1330.

Oliver, S. N., Van Dongen, J. T., Alfred, S. C., Mamun, E. A., Zhao, X., Saini, H. S., Fernandes, S. F., Blanchard, C. L., Sutton, B. G., Geigenberger, P., Dennis, E. S., & Dolferus, R. (2005). Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene OSINV4 is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility. *Plant, Cell and Environment*, 28(12), 1534–1551.

Örvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F., & Dhindsa, R. S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant Journal*, 23(6), 785–794.

Park, M. R., Yun, K. Y., Mohanty, B., Herath, V., Xu, F., Wijaya, E., Bajic, V. B., Yun, S. J., & de Los Reyes, B. G. (2010). Supra-optimal expression of the cold-regulated OsMyb4 transcription factor in transgenic rice changes the complexity of transcriptional network with major effects on stress tolerance and panicle development. *Plant, Cell and Environment*, 33(12), 2209–2230.

Pecinka, A., Chevalier, C., Colas, I., Kalantidis, K., Varotto, S., Krugman, T., Michailidis, C., Valles, M. P., Munoz, A., & Pradillo, M. (2020). Chromatin dynamics during interphase and cell division: Similarities and differences between model and crop plants. *Journal of Experimental Botany*, 71(17), 5205–5222.

Pimentel, H., Bray, N. L., Puente, S., Melsted, P., & Pachter, L. (2017). Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty. *Nature Methods*, 14(7), 687–690.

Qin, F. J., Sun, Q. W., Huang, L. M., Chen, X. S., & Zhou, D. X. (2010). Rice SUVH histone methyltransferase genes display specific functions in chromatin modification and retrotransposon repression. *Molecular Plant*, 3(4), 773–782.

Ravikumar, G., Manimaran, P., Voleti, S. R., Subrahmanyam, D., Sundaram, R. M., Bansal, K. C., Viraktamath, B. C., & Balachandran, S. M. (2014). Stress-inducible expression of AtDREB1A transcription factor greatly improves drought stress tolerance in transgenic indica rice. *Transgenic Research*, 23(3), 421–439.

Richards, E. J., & Elgin, S. C. R. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: Rounding up the usual suspects. *Cell*, 108(4), 489–500.

Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47.

Roudier, F., Ahmed, I., Bérard, C., Sarazin, A., Mary-Huard, T., Cortijo, S., Bouyer, D., Caillieux, E., Duvernois-Berthet, E., Al-Shikhley, L., Giraut, L., Després, B., Drevensek, S., Barneche, F., Dérozier, S., Brunaud, V., Aubourg, S., Schnittger, A., Bowler, C., Martin-Magniette, M.L., Robin, S., Caboche, M., & Colot, V. (2011). Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. *EMBO Journal*, 30(10), 1928–1938.

Saini, H. S., & Westgate, M. E. (1999). Reproductive development in grain crops during drought. *Advances in Agronomy*, 68, 59-96.

Saito, K., Miura, K., Nagano, K., Hayano-Saito, Y., Araki, H., & Kato, A. (2001). Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 of rice and their association with anther length. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(6), 862-868.

Saito, K., Hayano-Saito, Y., Kuroki, M., & Sato, Y. (2010). Map-based cloning of the rice cold tolerance gene Ctb1. *Plant Science*, 179(1–2), 97–102.

Sakai, K. (1943). Zytologisch-histologische untersuchungen uber die sterilitatserscheinungen bei reispflanzen nordnippons im Jahre 1941. *Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Station Report*, 40, 1-17.

Sakai, H., Lee, S. S., Tanaka, T., Numa, H., Kim, J., Kawahara, Y., Wakimoto, H., Yang, C. C., Iwamoto, M., Abe, T., Yamada, Y., Muto, A., Inokuchi, H., Ikemura, T., Matsumoto, T., Sasaki, T., & Itoh, T. (2013). Rice annotation project database (RAP-DB): An integrative and interactive database for rice genomics. *Plant and Cell Physiology*, 54(2).

Sakata, T., Oda, S., Tsunaga, Y., Shomura, H., Kawagishi-Kobayashi, M., Aya, K., Saeki, K., Endo, T., Nagano, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Watanabe, M., Matsuoka, M., & Higashitani, A. (2014). Reduction of gibberellin by low temperature disrupts pollen development in rice. *Plant Physiology*, 164(4), 2011–2019.

Satake, T. (1972). Circular dense culture of rice plants in pots for the obtaining of many uniform panicles in main stems. *Japanese Journal of Crop Science*, 41(2).

Satake, T. (1976). Determination of the most sensitive stage to sterile-type cool injury in rice plants. *Research Bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station*, 113, 1-43.

Satake, T., & Hayase, H. (1970). Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants: V. Estimations of pollen developmental stage and the most sensitive stage to coolness. *Japanese Journal of Crop Science*, 39(4), 468-473.

Satake, T., Nishiyama, I., Ito, N., & Hayase, H. (1969). Male sterility caused by cooling treatment at the meiotic stage in rice plants: I. Methods of growing rice plants and inducing sterility in the phytotron. *Japanese Journal of Crop Science*, 38(4), 603-609.

Sato, Y., Takehisa, H., Kamatsuki, K., Minami, H., Namiki, N., Ikawa, H., Ohyanagi, H., Sugimoto, K., Antonio, B. A., & Nagamura, Y. (2013). RiceXPro Version 3.0: Expanding the informatics resource for rice transcriptome. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 1206–1213.

Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T., & Nishimura, T. (2012). DNA methylation in plants: Relationship to small rnas and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant and Cell Physiology*, 53(5), 766–784.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504.

Shi, J., Dong, A., & Shen, W. H. (2015). Epigenetic regulation of rice flowering and reproduction. *Frontiers in Plant Science*, 5, 803.

下野裕之. (2012). 地球温暖化でも冷害はなくなる: そのメカニズムと対策. 農山漁村文化協会.

Shimono, H., Abe, A., Aoki, N., Koumoto, T., Sato, M., Yokoi, S., Kuroda, E., Endo, T., Saeki, K. I., & Nagano, K. (2016). Combining mapping of physiological quantitative trait loci and transcriptome for cold tolerance for counteracting male sterility induced by low temperatures during reproductive stage in rice. *Physiologia Plantarum*, 157(2), 175–192.

下野裕之. (2018). イネの障害型冷害. *日本作物学会紀事*, 87(2), 113-124

Shirasawa, S., Endo, T., Nakagomi, K., Yamaguchi, M., & Nishio, T. (2012). Delimitation of a QTL region controlling cold tolerance at booting stage of a cultivar, “Lijiangxintuanheigu”, in rice, *Oryza sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 124(5), 937–946.

Stovner, E. B., & Sætrum, P. (2019). Epic2 efficiently finds diffuse domains in ChIP-seq data. *Bioinformatics*, 35(21), 4392–4393.

Suh, J. P., Jeung, J. U., Lee, J. I., Choi, Y. H., Yea, J. D., Virk, P. S., Mackill, D. J., & Jena, K. K. (2010). Identification and analysis of QTLs controlling cold tolerance at the reproductive stage and validation of effective QTLs in cold-tolerant genotypes of rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 120(5), 985–995.

Sun, Z., Du, J., Pu, X., Ali, M. K., Yang, X., Duan, C., Ren, M., Li, X., & Zeng, Y. (2019). Near-isogenic lines of japonica rice revealed new QTLs for cold tolerance at booting stage. *Agronomy*, 9(1), 1–14.

Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011). Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE*, 6(7), e21800.

Suzuki, S. (1978). Anther and pollen abnormalities induced by cold treatment and their varietal differences in rice plants. *Japanese Journal of Breeding*, 28(1), 21-32.

Suzuki, S. (1981). Cold tolerance in rice plants [*Oryza sativa*] with special reference to the floral characters, 1: Varietal differences in anther and stigma lengths and the effects of planting densities on these characters. *Japanese Journal of Breeding*, 28, 21-32.

Takasaki, H., Maruyama, K., Kidokoro, S., Ito, Y., Fujita, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Nakashima, K. (2010). The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 284(3), 173–183.

Takeuchi, Y., Hayasaka, H., Chiba, B., Tanaka, I., Shimano, T., Yamagishi, M., Nagano, K., Sakai, T. & Yano, M. (2001). Mapping quantitative trait loci controlling cool-temperature tolerance at booting stage in temperate japonica rice. *Breeding Science*, 51(3), 191-197.

Tao, Z., Kou, Y., Liu, H., Li, X., Xiao, J., & Wang, S. (2011). OsWRKY45 alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4863–4874.

Thakur, P., Kumar, S., Malik, J. A., Berger, J. D., & Nayyar, H. (2010). Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 67(3), 429-443.

Uehara, T. N., Mizutani, Y., Kuwata, K., Hirota, T., Sato, A., Mizoi, J., Takao, S., Matsuo, H., Suzuki, T., Ito, S., Saito, A. N., Nishiwaki-Ohkawa, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Yoshimura, T., Kay, S. A., Itami, K., Kinoshita, T., Yamaguchi, J., & Nakamichi, N. (2019). Casein kinase 1 family regulates PRR5 and TOC1 in the Arabidopsis circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 166(23), 11528–11536.

Viana, V. E., Carlos da Maia, L., Busanello, C., Pegoraro, C., & Costa de Oliveira, A. (2021). When rice gets the chills: comparative transcriptome profiling at germination shows WRKY transcription factor responses. *Plant Biology*, 23(S1), 100–112.

- Wei, L., Gu, L., Song, X., Cui, X., Lu, Z., Zhou, M., Wang, L., & Hu, F. (2014). Dicer-like 3 produces transposable element-associated 24-nt siRNAs that control agricultural traits in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 111(10), 3877-3882.
- Xiong, L., & Yang, Y. (2003). Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell*, 15(3), 745-759.
- Xu, L. M., Zhou, L., Zeng, Y. W., Wang, F. M., Zhang, H. L., Shen, S. Q., & Li, Z. C. (2008). Identification and mapping of quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage in a japonica rice near-isogenic line. *Plant Science*, 174(3), 340-347.
- Xu, L., Yuan, K., Yuan, M., Meng, X., Chen, M., Wu, J., Li, J., & Qi, Y. (2020a). Regulation of rice tillering by RNA-directed DNA methylation at Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements. *Molecular Plant*, 13(6), 851-863.
- Xu, Y., Hu, D., Hou, X., Shen, J., Liu, J., Cen, X., Fu, J., Li, X., Hu, H., & Xiong, L. (2020b). OsTMF attenuates cold tolerance by affecting cell wall properties in rice. *New Phytologist*, 227(2), 498-512.
- Xu, Y., Wang, R., Wang, Y., Zhang, L., & Yao, S. (2020c). A point mutation in LTT1 enhances cold tolerance at the booting stage in rice. *Plant Cell and Environment*, 43(4), 992-1007.
- Yao, W., Li, G., Yu, Y., & Ouyang, Y. (2018). funRiceGenes dataset for comprehensive understanding and application of rice functional genes. *GigaScience*, 7(1), 1-9.
- Zhang, Q., Chen, Q., Wang, S., Hong, Y., & Wang, Z. (2014). Rice and cold stress: methods for its evaluation and summary of cold tolerance-related quantitative trait loci. *Rice*, 7(1), 1-12.
- Zhang, Q., Jiang, N., Wang, G.-L., Hong, Y., & Wang, Z. (2013). Advances in understanding cold sensing and the cold-responsive network in rice. *Advances in Crop Science and Technology*, 1(1), 104.

Zhang, S., Hao, H., Liu, X., Li, Y., Ma, X., Liu, W., Zheng, R., Liang, S., & Luan, W. (2021). SDG712, a putative H3K9-specific methyltransferase encoding gene, delays flowering through repressing the expression of florigen genes in rice. *Rice*, 14(1), 1-13.

Zhang, Z., Hu, M., Xu, W., Wang, Y., Huang, K., Zhang, C., & Wen, J. (2020). Understanding the molecular mechanism of anther development under abiotic stresses. *Plant Molecular Biology*, 1-10.

Zhang, Z., Li, J., Pan, Y., Li, J., Zhou, L., Shi, H., Zeng, Y., Guo, H., Yang, S., Zheng, W., Yu, J., Sun, X., Li, G., Ding, Y., Ma, L., Shen, S., Dai, L., Zhang, H., Yang, S., Guo, Y., & Li, Z. (2017). Natural variation in CTB4a enhances rice adaptation to cold habitats. *Nature Communications*, 8(1), 1-13.

Zhang, Z., Zhang, Q., Wu, J., Zheng, X., Zheng, S., Sun, X., Qiu, Q., & Lu, T. (2013). Gene knockout study reveals that cytosolic ascorbate peroxidase 2(OsAPX2) plays a critical role in growth and reproduction in rice under drought, salt and cold stresses. *PLoS ONE*, 8(2), e57472.

Zhao, J., Long, T., Wang, Y., Tong, X., Tang, J., Li, J., Wang, H., Tang, L., Li, Z., Shu, Y., Liu, X., Li, S., Liu, H., Li, J., Wu, Y., & Zhang, J. (2020). RMS2 encoding a GDSL lipase mediates lipid homeostasis in anthers to determine rice male fertility. *Plant Physiology*, 182(4), 2047–2064.

Zhou, H., Hirata, M., Osawa, R., Fujino, K., & Kishima, Y. (2017). Detainment of tam3 transposase at plasmamembrane by its BED-zinc finger domain. *Plant Physiology*, 173(2), 1492–1501.

Zhu, Y., Chen, K., Mi, X., Chen, T., Ali, J., Ye, G., Xu, J., & Li, Z. (2015). Identification and fine mapping of a stably expressed QTL for cold tolerance at the booting stage using an interconnected breeding population in rice. *PLoS ONE*, 10(12), e0145704.

## 摘要

本論文ではイネ (*Oryza sativa* L.) の穂ばらみ期の低温ストレスによる攪乱反応の理解を目指し、葯の形態観察とゲノミクス解析を行った。これまでイネの穂ばらみ期耐冷性に関する研究は多く行われてきたが、その多くは明確に異なる低温感受性低を示す 2 品種の比較によって行われている。本論文では主に、極端に強い耐冷性を示す北海道の品種を含む 10 以上の品種を用いて研究を行うことで、より多くの遺伝的バックグラウンドで共通するメカニズムに迫った。以下に各章の要約をまとめる。

第 2 章では、穂ばらみ期の低温ストレスによって生じる葯の形態的異常に注目し、イネ 13 品種を用いて葯の内部構造の変化と耐冷性の関係を調査した。観察は穂ばらみ期と開花期の葯を用いて行い、それぞれで 4 種類ずつの異常構造を観察した。本研究で観察した計 8 種類のそれぞれの異常構造の発生率と不稔花粉の発生率の相関分析から、未発達葯室などのいくつかの異常構造と不稔花粉の発生率の間に正の相関関係が検出できた。このことは特定の異常構造の発生と不稔花粉の発生が関連することを示す。一方で、これまで穂ばらみ期の低温障害の原因とされてきたタペート肥大は、不稔花粉の発生と明確な相関関係を示さなかった。また興味深いことに、異常構造は葯の一部に集中して発生し、その占有率は不稔花粉の発生率よりも低いことから、葯の異常構造は不稔花粉の直接的な原因ではないことを示した。さらに、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も発見した。このように、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を本研究では示すことができた。

第 3 章では、栄養器官の葉と生殖器官の葯において特異的な H3K9me2 の分布パターンを明らかにすることで、体細胞と生殖細胞におけるエピジェネティックな発現制御機構の差異の検出を試みた。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。葯と葉で比較すると、H3K9me2 の分布は葉よりも葯で広く、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数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。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、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章では、多様な遺伝的背景を持つイネ14品種を用いて穂ばらみの葯におけるトランスクリプトーム解析を行い、低温ストレスによる遺伝子発現の攪乱と耐冷性の関係を調査した。14品種の葯におけるトランスクリプトーム解析にはイネの全遺伝子を網羅するように設計されたマイクロアレイを用いた。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で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因子を複数選抜した。14品種で発現変動が共通した因子は穂ばらみ期のイネの葯において普遍的に低温応答を示す可能性が高く、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。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た。その結果、耐性品種ほど発現変動が大きい因子よりも変動が小さい因子が多く選抜され、耐冷性品種は感受性品種に対してより発現変動が小さい傾向にあることを示した。また似たような傾向として、低温区における発現量と耐冷性の相関分析から、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。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遺伝子を多数選抜しており、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。

## 謝辞

本研究の遂行および本論の執筆にあたり、直接の指導教官であられる北海道大学農学研究員教授 貴島祐治博士には、本研究の遂行及び日々の研究生活での御助言、御助力を賜り心より感謝の意を表します。圃場試験を中心に実験指導および助言を賜った北海道大学農学研究員講師 高牟禮逸郎博士に心から感謝申し上げます。多大なるご指導ならびにご援助賜った北海道大学農学研究員助教授 小出陽平博士に厚く御礼申し上げます。NARO 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター寒地作物研究領域 佐藤裕博士にはマイクロアレイ実験を中心に実験のご指導をいただき誠に感謝いたします。東京大学 大学院農学生命科学研究科 特任准教授 金鐘明博士には ChIP-seq 解析において実験のご協力とご助言をいただき心よりお礼申し上げます。最後に、遠く離れた北海道の地で学業に励めるようフォローしていただいた家族の皆さん、そして私生活を一番近くで支えてくれた妻に感謝します。