



北海道大学大学院
農学研究院
植物育種学研究室
助教
博士（農学）
高牟禮逸朗

1981年 北海道大学農学部農学科卒業
1983年 同大大学院農学研究科修士課程修了
1983年 北海道釧路支庁経済部農務課技師
1985年 北海道大学農学部助手
1999年 同大大学院農学研究科助手
2007年 同大大学院農学研究院助教
現在に至る

1 小穂 2 小花型突然変異体を用いたイネ小穂構造の 遺伝解析

はじめに

イネの穂や小穂は種子を生産し、収量に直接関係する重要な農業形質であり、これらの形態形成に関する遺伝的制御機構の解明は重要な研究課題である。イネでは1小穂に1小花とする説と外穎は1個だが複数の小花が着着したものとする説があり、未だに議論が続いている。イネの1小穂複数小花説は、外穎と内穎の類似性を重視し、どちらも小穂軸上の苞葉(外穎)であるとしたことに起因していると考えられるが、現在はイネの内穎についても、他のイネ科植物と同様に外穎の腋から側生する小花軸の小苞葉であり、外穎と内穎は異なる軸上の器官とするのが妥当であると考えられるようになりつつある。Arber(1934)や松葉(1979)は、このような観点到立ち、イネの小穂構造は基本的にはイネ科の一般的な小穂構造と同じであるとし、1小穂1小花の小穂構造のモデルを提唱した。すなわち、小穂軸の基部にほとんど伸長しない glume(副護穎)が2枚互生し、ついで lemma が3枚互生する。ただしイネでは、これらの lemmaのうち、最上位の lemmaのみが小花を腋生させる fertile lemma(外穎)であり、下位の2枚は sterile lemma(護穎)となる。外穎原基を分化した直後、小穂軸の始原体頂端は退化し、外穎に腋生する小花軸を分化し、その基部から palea(内穎)が1枚、ついで鱗被が2個、雄ずいが6本、雌ずいが1本生じる。その結果、1小穂1小花型を示す。さらに、松葉はこのような小穂構造を考えることにより、1小穂2小花以上の多穎型は、1つめの外穎原基を分化した直後に正常型では退化するはずの小穂軸始原体頂端の活性を保持して、2つめ以降の外穎を分化するために発生すると説明できることを報告した。著者らはこれまでにイネの穂や小穂の形態に関する既存の突然変異体や新たに発見した変異体の合計約30種について遺伝解析を行い、葉化穎不稔(*l/s*)、過

剩穎-1(*eg1*)および新たにガンマー線照射により誘発した2重外穎[*dbl(t)*]変異体の3種については松葉の提唱した小穂構造のモデルに従うと、外穎を2枚生じて1小穂2小花型を示す変異体であることを推定した(図1)。したがって、これら3種の変異遺伝子の各優性対立遺伝子は1小穂1小花型のイネ小穂構造に關与する重要な遺伝子であると考えられる。そこで本研究では、1小穂2小花型の突然変異体のうち、2重外穎[*dbl(t)*]変異体に着目し、遺伝解析を行った。さらに、この解析を通じて、Arber や松葉の提唱した1小穂1小花型の小穂構造モデルを検証した。

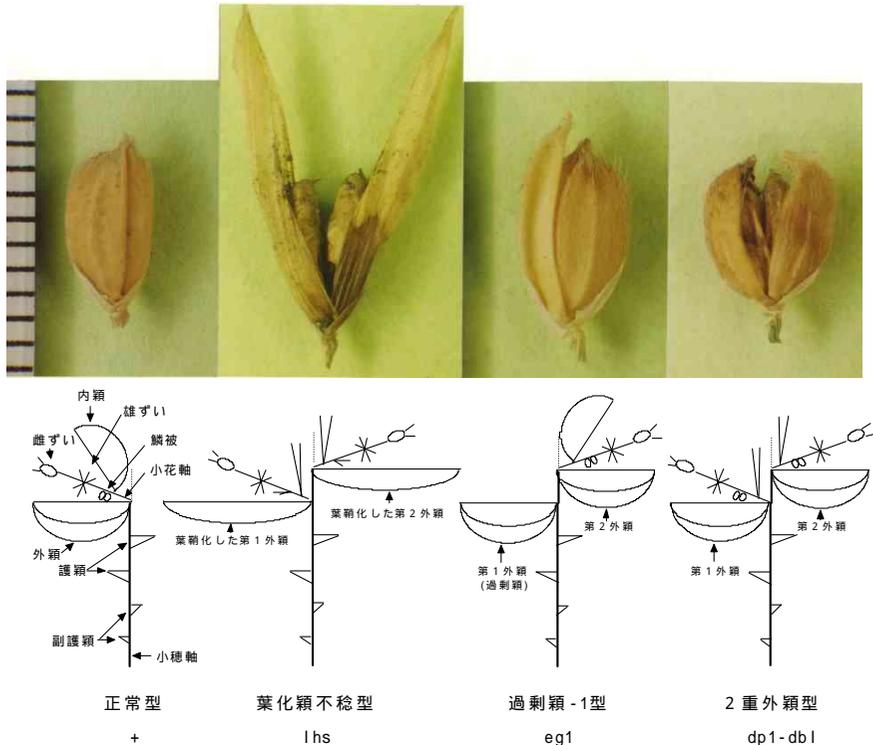


図1. イネ正常型および3種の1小穂2小花型変異遺伝体の小穂構造の写真と模式図

2重外穎遺伝子[*dbl(t)*]と内穎發育不全-1 遺伝子(*dp1*)の対立性検定

2重外穎突然変異体(K-99-56)は、北海道の水稲品種「キタアケ」のガンマー線照射後代から見出した突然変異体に由来する。本変異体は2枚の正常な外穎を向かい合う形で有する1小穂2小花型で、各小花の内穎を欠き、替わりに各2枚(計4枚)の葉状器官を生じる。また、これまでの研究から2重外穎変異には劣性1遺伝子[*dbl(t)*]が關与し、染色体6の*wx*(胚乳糯性)座近傍に座乗することを明らかにしてきた(高牟礼 2003)。一方、*wx*座近傍には*dp1*(内穎發育不全-1)遺伝子が存在する(Nagamatsu and Omura 1962)。すなわち、*dbl(t)*と*dp1*の両遺伝子は内穎の形態に關与し、第6染色体の*wx*座近傍に座乗することが

ら、同座の可能性が考えられるので、両者の対立性検定を実施した。

K-99-56 と *dp1* を有する九大系統の KL602 との交雑 F_1 個体を育成し、両親系統と小穂の表現度を比較した(表 1)。小穂のタイプは次の 4 種に分類された。正常型：正常な内外穎が 1 枚ずつある小穂、内穎發育不全型：正常な外穎が 1 枚と小型の内穎がある小穂、内穎退化型：正常な外穎が 1 枚で、内穎が退化し、2 枚の葉状器官を有する小穂、2 重外穎型：外穎が 2 枚で、それぞれの内穎が退化し、4 枚の葉状器官を有する小穂。K-99-56 の小穂では、2 重外穎型が 58%で、内穎退化型が 42%の表現度であった。KL602 の小穂では、内穎發育不全型が 66%で、正常型あるいは正常型に非常に近いものが 34%の表現度を示した。交雑 F_1 個体の小穂では正常型の小穂はなく、内穎退化型が 81%で、内穎發育不全型が 19%の表現度を示した。したがって、*dbl(t)* は *dp1* と同座であり、複対立遺伝子であることが明らかとなり、*dbl(t)* は *dp1-dbl* となる。なお、交雑 F_1 (ヘテロ型) の内穎退化型には、2 枚の葉状器官を有する小穂の他、2 枚の葉状器官が融合して 1 枚になった小穂などが観察された。さらに F_2 集団 54 個体を用いて表現型の調査を行ったところ、*dp1-dbl* 型：ヘテロ型：*dp1* 型が 13：29：12 に分離し、1：2：1 の比に適合して、*dp1* と *dp1-dbl* は共優性を示すと推定された。また、対立性検定に用いた F_1 個体および F_2 集団では、*dp1-dbl* 型の 2 枚の葉状器官を有する小穂の他、ヘテロ型の 2 枚葉状器官が融合して 1 枚となった小穂、2 枚の葉状器官が下から 3 分の 2 程度融合した小穂、さらに融合した部分から内穎化(表面に内外穎に特異的に見られる乳頭状突起やふ毛が存在する)している小穂、*dp1* 型の内穎發育不全型に至る幅広い変異が観察された。さらに *Dp1* 型の正常な内穎においても内穎両端の外穎との鉤合部より先の部分は、うすく表面が滑らかで葉状を呈しており、葉状器官の名残があると考えられた。なお、外穎の両端には内穎で見られるような葉状の部分はなかった。以上の *Dp1* 座の各遺伝子型が示す表現型の観察結果から内穎の起源について考察すると、他のイネ科植物と同様に、イネの内穎も外穎に腋生する小花軸の前出葉 2 枚が融合してできた器官であるという、Arber や松葉の提唱した説を支持するものと考えられた(図 2)。

表 1. K-99-56[*dbl(t)*] と KL602(*dp1*) の対立性検定 (表現度の比較)

	K-99-56 (<i>dbl</i> 系統)	K-99-56 × KL602 F_1	KL602 (<i>dp1</i> 系統)
2重外穎型	58	0	0
内穎退化型	42	81	0
内穎發育不全型	0	19	66
正常型	0	0	34
Total	100	100	100

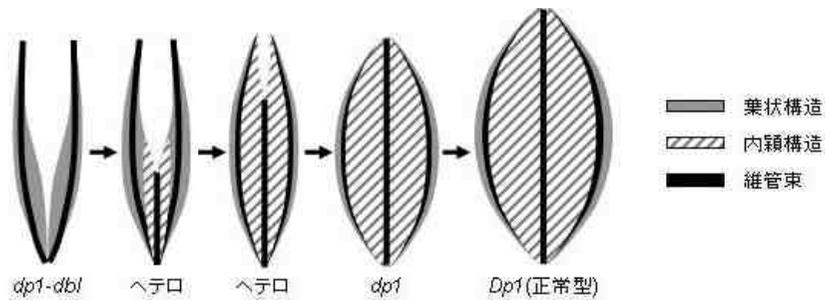


図 2. イネ内穎の起源に関するモデル (小穂軸の 2 枚の前出葉から内穎へ)

2 重外穎 (*dp1-dbl*) 遺伝子のマッピング

db1-dbl の座乗領域を明らかにするため、K-99-56 とインド型品種「カサラス」との交雑 F_2 集団を育成し、染色体 6 の *WX* 座近傍の数種の分子マーカーを用いて連鎖分析を行った。 F_1 個体は正常型となり、 F_2 集団 977 個体を栽培したところ、正常型が 810 個体、変異型が 167 個体であり、変異型は 3 : 1 の期待比よりはやや過少に分離したが、ほぼ *dp1-dbl* の 1 因子分離が認められた。しかし、その表現型にはほとんど 2 重外穎型はなく、内穎の退化のみが認められた。この F_2 集団で得られた劣性個体 167 個体を供試し、両親間で多型を示すことが明らかになっている *WX* 座付近に位置する 4 種の分子マーカー RM508、RM589、E0605P、R2219 と、さらに Sano *et al.* (2004) が報告した *WX* 座において多型を検出できる dCAPS マーカー WX を用いて、マッピングを行った。その結果、*dp1-dbl* 遺伝子は *WX* と E0605P の間に座乗することが示唆された (図 3)。

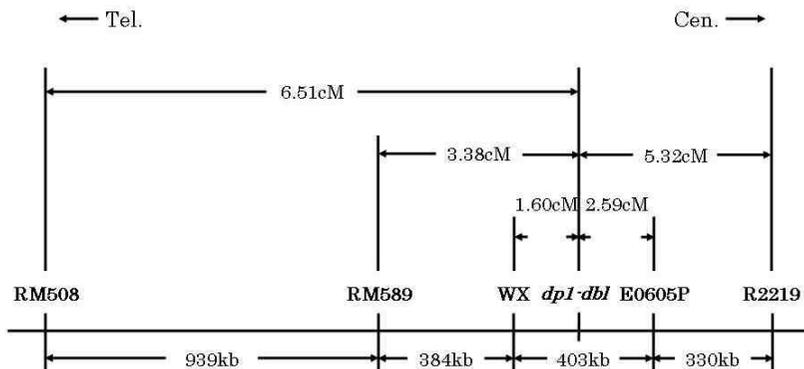


図 3. *dp1-dbl* と 5 種のマーカーの遺伝子座を示す第 6 染色体の連鎖地図

さらなる精密なマッピングを行うため、WX と E0605P の間に 2 種の新たな CAPS マーカー 7743 と C78 を設計し、WX と E0605P の間で組み換えが起きている 12 個体について遺伝子型を調べた。その結果、7743 と C78 の間では 5 個体の組み換え個体が得られた。以上の結果

から、全劣性個体におけるこれら7種のマーカーRM508、RM589、WX、7743、C78、E0605P、R2219の周辺領域のグラフィカルジェノタイプを作成したところ、*dp1-dbl* 遺伝子は7743とC78の間、約133kbの領域に座乗することが示唆された(図4)。

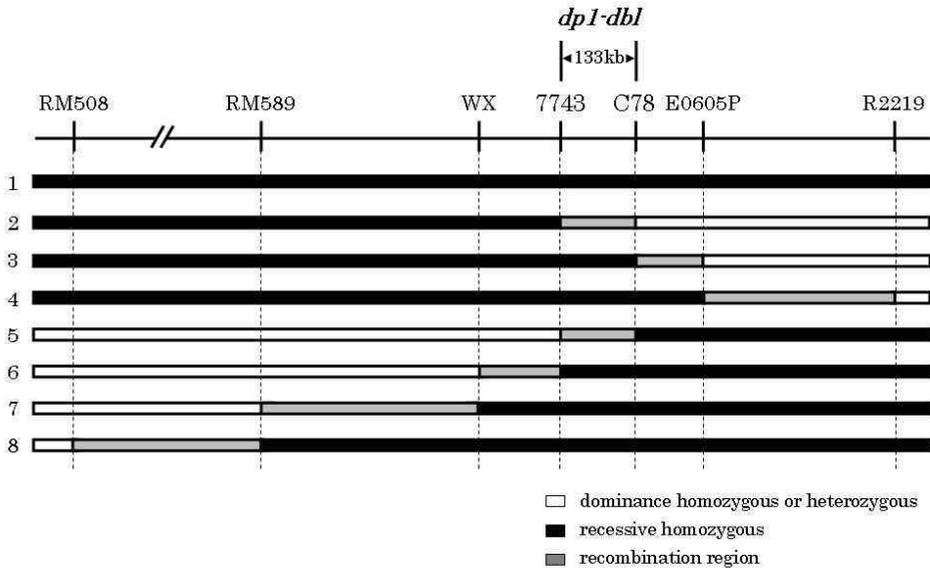


図4. K-99-56 × カサラス F₂ 集団に分離した変異型の第6染色体 *Dp1* 座周辺のグラフィカルジェノタイプ

Dp1 座候補遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列

Luo et al. (2005) が報告した内穎欠失-1(palealess1)劣性遺伝子 (*pal1*) の座乗推定領域はマッピングによって 35kb までに狭められており、この領域には DNA-binding proteinをコードする遺伝子 (DNA-binding protein AT-hook 2) が存在し、この遺伝子を候補遺伝子と推定した。本実験のマッピングで *dp1-dbl* 遺伝子が座乗すると推定された約133kbの領域は、*pal1* の座乗推定領域と重なっており、同座の可能性が示唆された(図5)。本来ならば、両変異体の交雑により対立性検定を行うことが必要であるが、今回はそれができなかったため、*Dp1* 座において異なる対立遺伝子を有するキタアケ (*Dp1*)、K-99-56 (*dp1-dbl*) と KL60 α (*dp1*) について *pal1* の候補遺伝子である DNA-binding protein AT-hook 2 の塩基配列を調べた。

データベース情報より、DNA-binding protein AT-hook 2 はイントロンを含まない 987bp をコードする遺伝子であった。この遺伝子のコード領域の上流約 1.5kb と下流約 1kb を含む約 3kb をターゲット領域とし、この領域を PCR で増幅できるよう 12 種類のプライマーを設計した。

野生型であるキタアケの塩基配列との比較の結果、K-99-56 では遺伝子コード領域内に 14bp の欠失が、また KL602 でも 6bp の欠失が見出された(図 6)。すなわち *Dp1* 座の 3 種の複対立遺伝子間に多型が検出され、*Dp1* 遺伝子は *PAL1* と同座であり、DNA-binding protein AT hook 2 である可能性が強く示唆された。また、これらの塩基配列をアミノ酸に置換してみると、K-99-56 では欠失が起こった部分でフレームシフトを生じ、それ以降は原系統のキタアケと全く異なることが明らかになった。KL602 においては、2 アミノ酸が欠失し、1 アミノ酸が変更されていたのみで、それ以外のアミノ酸配列や終止コドンはキタアケと全く同じであった(図 7)。

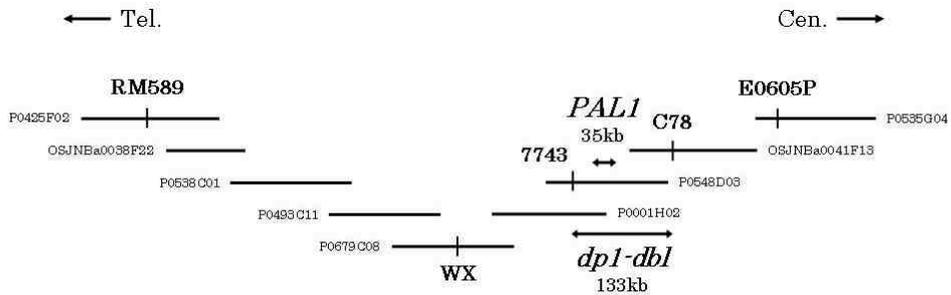


図 5. *dp1-dbl* と *PAL1* の第 6 染色体上の推定座乗領域の比較

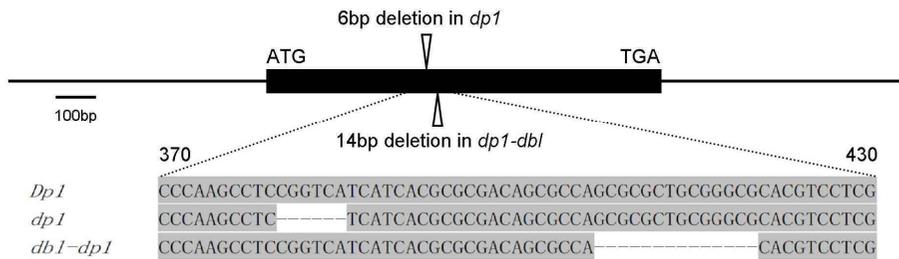


図 6. *Dp1* 座複対立遺伝子間の DNA-binding protein AT-hook 2 の塩基配列の比較

塩基配列解析より、内穎が小型化する *dp1* のアミノ酸配列は正常型と約 99% 相同であったが、内穎が退化し 2 枚の葉状器官を生じる *dp1-dbl* は正常型の終止コドンよりも後ろに終始コドンが形成され、正常型と約 45% の相同性を示した。したがって、正常型とのアミノ酸配列の相同性と表現型のシビアさには相関関係が存在する可能性が考えられた。なお、*pal1* 変異体では内穎が退化して 2 枚の葉状器官が発生し、*dp1-dbl* と表現型は類似していたが、まだ塩基配列は決定されていない。

DNA-binding protein AT hook 2 の AT hook とは、植物から同定された AT に富んだ DNA 結合ドメインである。Meijer *et al.*(1996) の研究において、AT hook を持つ DNA-binding protein はイネにおいて *Os-PF1*、*Os-AT1*、*Os-AT2* の 3 種が見つかり、このうち *Os-AT2* が

DP1	MDPVTA AAAH GCGHHHHHFF GAFPVA AFHH HFFHHGGGAH YPAAPQQQCE BQQQLVAAAA AAGGMAKQEL VDESNTTINS GGSNGSGGEE QRQQSGEEQH
dp1-dbl	MDPVTA AAAH GCGHHHHHFF GAFPVA AFHH HFFHHGGGAH YPAAPQQQCE BQQQLVAAAA AAGGMAKQEL VDESNTTINS GGSNGSGGEE QRQQSGEEQH
dp1	MDPVTA AAAH GCGHHHHHFF GAFPVA AFHH HFFHHGGGAH YPAAPQQQCE BQQQLVAAAA AAGGMAKQEL VDESNTTINS GGSNGSGGEE QRQQSGEEQH
DP1	QQGAAAPVVI RFRGRFPAGS KMKPKPVII TRDSASALRA HVLEVASGCD LVDSVATFAR RRQVWCVLS ATGAVINVSV RQFAGPGAV VNLTRGFDDIL
dp1-dbl	QQGAAAPVVI RFRGRFPAGS KMKPKPVII TRDSATRPIC RLRVRRRQR RHVRAPPPIC CLRAQRHRR HQRLRPAARR CRRRRRQFHR FLRHPLAVRL
dp1	QQGAAAPVVI RFRGRFPAGS KMKPKP-LI TRDSASALRA HVLEVASGCD LVDSVATFAR RRQVWCVLS ATGAVINVSV RQFAGPGAV VNLTRGFDDIL
DP1	SLSGSFLPPP APPSATGLTV YVSGQQQVV GCTVAGFLIA VGFVVIMAAS FGNAAYERLP LEDDEPPQHM AGGQSSPPP FPLPLPPHQQ PILQDHLPHN
dp1-dbl	LPPAAGASLR HRFHRLRLRR FGAQRGRHGR RTAHERRPRR HHGRLVRERR LRAPPARCR AAAAHGRRP VLAAA AAAAI TTTEAADSSR PSATQFDERN
dp1	SLSGSFLPPP APPSATGLTV YVSGQQQVV GCTVAGFLIA VGFVVIMAAS FGNAAYERLP LEDDEPPQHM AGGQSSPPP FPLPLPPHQQ PILQDHLPHN
DP1	LMNGIHLPGD AATGWTSGG GGGRAAPY. 328aa
dp1-dbl	PPRRRRRLR DQRRRRRPR GAVLSTSI SP ERKKMEKDR SEPCMV. 346aa
dp1	LMNGIHLPGD AATGWTSGG GGGRAAPY. 326aa

図 7. *Dp1* 座複対立遺伝子間の DNA-binding protein AT-hook 2 のアミノ酸配列の比較

*dp1*座に相当すると考えられる。*Os-AT2*タンパク質については転写活性化ドメインへの明確なホモログは特定されていないが、*Os-AT1*と*Os-PF1*のN-末端領域はヒストンのH1に類似性を示す。ヒストンタンパク質にはH1、H2A、H2B、H3、H4の5種類があり、このうち後者4種類が2個ずつ、計8個が1つの単位(ヒストンオクタマー)となり、これにDNAが約2回転巻き付く(ヌクレオソーム)。H1はこのヌクレオソームにゆるく結合するリンカーヒストンと呼ばれ、他の4種のヒストンタンパク質の集合に働く。これらの*Os-AT1*と*Os-PF1*の構造的な特性から、イネのAT hook proteinは、核内の他の因子の集合を左右する修飾タンパクとして、遺伝子プロモータ領域に結合するということが推測される。また、これらのタンパク質の発現は若い分裂組織で見られ、これはAT hook proteinの存在が細胞の分化状態を決定する遺伝子の発現に影響することを示唆するものである(Meijer *et al.* 1996)。このように、分子的機構は推定されているが、AT hook protein上の変異がイネの形態形成にどのように影響を及ぼすかは明らかになっていない。その点において、本実験で解析を行ったDp1がDNA-binding protein AT hook 2であることが証明できれば、イネの内穎の形態形成を制御する遺伝的機構の新たな知見になると期待される。しかし、本実験では各複対立遺伝子のDNA-binding protein AT hook 2の塩基配列に多型が検出されたものの、これらの変異が遺伝子発現にどのように影響を及ぼすかを明らかにすることはできなかった。今後、*Dp1*と*PAL1*の対立性検定および形質転換実験により、Dp1がDNA-binding protein AT hook2であることの証明が不可欠である。また、RT-PCRや*in situ* hybridizationを用いて遺伝子の転写量や発現時期や発現場所の特定制を行い、遺伝子の作用を検討する必要がある。

謝辞

本研究を助成して頂きましたサッポロ生物科学振興財団に心より感謝申し上げます。また、研究情勢候補者としてご推薦下さいました武田和義先生に御礼申し上げます。