

イネの鱗被形成関連遺伝子と  
閉花受粉性突然変異体の解析

2019年 1月

大森伸之介

イネの鱗被形成関連遺伝子と  
閉花受粉性突然変異体の解析

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
生物圏資源科学専攻  
博士（農学）学位論文

大 森 伸 之 介

# 目次

	頁
第1章 緒論	1
第2章 イネの鱗被で発現する <i>MOSAIC FLORAL ORGANS1</i> の機能解析と 同遺伝子を利用した閉花受粉性イネ作出の可能性の検討	13
2-1 材料および方法	15
2-2 結果	18
2-3 考察	26
第3章 イネ閉花受粉性突然変異体 <i>superwoman1-cleistogamy1</i> の閉花受粉性が 農業形質に与える影響とその交雑抑制能力の検証	46
3-1 材料および方法	48
3-2 結果	52
3-3 考察	56
第4章 <i>superwoman1-cleistogamy1</i> 変異による閉花受粉性の温度感受性の解析	67
4-1 材料および方法	68
4-2 結果	72
4-3 考察	77
第5章 総合考察	90
摘要	97
謝辞	101
引用文献	102

## 第1章 緒論

### 遺伝子組換え作物の開発および普及

近年、分子生物学や遺伝子工学の研究が目覚ましく進展し、生物の DNA の塩基配列の解読や編集、そして新たな塩基配列を創り出すことが可能となった。その中で Cohen *et al.* (1973) の大腸菌プラスミドの組換え実験から遺伝子組換え技術の発展は始まった (喜多村 2006)。今日この技術は、医薬品生産の分野において高品質なヒトのインスリン、成長ホルモン、インターフェロン等の生産を可能とすることで多くの患者の治療に役立っており、また旨味調味料、澱粉の糖化やチーズ生産のための酵素等の食品加工用の添加物、さらには洗濯用洗剤に含まれる酵素等の日用生活品の生産にも広く使用されている (農研機構 2017)。そしてこの技術は植物の形質転換系の開発と併せて農業分野にも応用され、作物の改良に使用できる遺伝資源を飛躍的に拡大した。その結果、従来の交配等の育種方法のみでは作出が難しかった画期的な新形質を持つ遺伝子組換え作物 (Genetically Modified Crops (GM 作物)) の開発が可能となった (田部井 2005, 喜多村 2006)。

1996 年に 6 カ国の約 1700 万ヘクタールで開始された GM 作物の商業栽培は、2017 年にはその面積が 24 カ国の約 1 億 8980 万ヘクタールにまで拡大し、今後もこの増加傾向が続くと予測されている (ISAAA 2017)。現在最も広く普及している GM 作物は、特定の除草剤に対する抵抗性や病虫害への抵抗性を付与したものである。除草剤抵抗性 GM 作物の利点は栽培時の除草剤散布回数の低減や不耕起栽培による土壌流亡の防止が可能となることであり (有井・山根 2006)、また病虫害抵抗性 GM 作物の利点は栽培期間中の殺虫剤等の農薬の散布量を削減できることである (農研機構 2017)。これらの GM 作物の利用は、栽培に必要な労力やエネルギー等の削減を通して農家収益の増加をもたらすだけでなく、コスト減による食糧価格の上昇抑制や減農薬栽培による環境に農業が与える負荷の低減を可能とし、ひいては人類が直面する急激な人口増加や地球規模の気候変動に伴う食糧問題・環

境問題に対する解決策の一つとなり得る。また近年では収穫物の栄養成分の改良や医療用途での使用を目指した GM 作物の研究・開発が進められている他、これまでにない花色の花き等新しい価値の創出が試みられた GM 作物も開発されており、これらは多くの人々の健康状態の改善やより豊かな生活の実現に資することが期待されている（喜多村 2006, 農研機構 2017）。

### **GM 作物の自然交雑に対する懸念とこれを抑制する技術の開発の意義**

GM 作物には多くの利点がある一方で、その利用が生物多様性に影響を及ぼすことがあってはならない。このため、「生物多様性条約におけるバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」において GM 作物を含む人為的に改変された生物の生物多様性への影響のリスクを管理することが定められ、国内では「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」に基づいて、GM 作物の生物多様性への影響が「競合における優位性」、「有害物質の産生性」、「交雑性」等の観点から評価されている（田部井 2010, 農研機構 2017）。このうち交雑性で問題となるのは、GM 作物とその近縁野生種との間の自然交雑により生じた雑種が、GM 作物から受け継いだ人為的に導入された遺伝子の効果により環境中で有利となり、元々生育していた近縁野生種と置き換わることで遺伝的多様性を喪失させることである。このため、GM 作物の利用にあたって特に交雑可能な近縁野生種が存在する場合には、自然交雑を介した導入遺伝子の拡散（遺伝子拡散）について慎重にその可能性を検討し、これが遺伝的多様性に影響を与える可能性がある場合にはその自然交雑の抑制策を講じなければならない。

また、生物多様性には含まれない一般農作物（非 GM 作物）と GM 作物との自然交雑も問題となる場合がある。これは、自然交雑によるものを含む GM 作物の非 GM 作物への混入が非 GM 作物の経済的価値を毀損することがあるためである。EU においてはこれに対応するために、GM 作物の非 GM 作物への混入を回避するための区分管理手法や混入が発

生した場合の経済的補償に関する GM 作物栽培と非 GM 作物栽培の共存ガイドラインが策定されており，EU 加盟国はこれを元に共存ルールの整備を行っている（立川 2017）．GM 作物と非 GM 作物のそれぞれの栽培が，相互に制限されることなく継続的に共存することの実現にも，自然交雑を抑制する技術が必要となるだろう．

これらとは逆に，自然交雑を通して GM 作物が近縁野生種や非 GM 作物から影響を受ける可能性も存在する．例えば，医療用途や工業原料用途に向けて開発された GM 作物が近隣で栽培された同種の非 GM 作物の花粉を受粉した場合，それ自身が持つ特別な形質を失ってしまうことが考えられる．GM 作物自体の生産物の品質維持や品種の純度維持のためにも，自然交雑を防ぐことは重要である．

以上のことから，GM 作物と交雑可能な近縁野生種および非 GM 作物との自然交雑を抑制する技術は，（1）GM 作物栽培が生物多様性に影響を与えることを防ぎ（2）GM 作物栽培と非 GM 作物栽培の共存を実現し（3）GM 作物の特性を安定的かつ持続的に利用するための鍵となるものであり，今後さらに拡大する GM 作物の利用にあたって不可欠なものである．

### 遺伝子組換えイネの開発状況と自然交雑の可能性

現在のところ，イネ（*Oryza sativa* L.）ではトウモロコシ（*Zea mays* L.），ダイズ（*Glycine max* (L.) Merr.），ワタ（*Gossypium* spp.）等と比べて遺伝子組換え品種の普及が進んでいない．しかし，これまでに国外では中国において虫害抵抗性イネの研究が盛んに行われており（Chen *et al.* 2011），また発展途上国における栄養改善を目的として胚乳内にベータカロテンを含有する「ゴールデンライス」（Ye *et al.* 2000, Al-Babili and Beyer 2005, Paine *et al.* 2005）の開発が進められている．国内では，転写因子 *WRKY45* を使用した複合病害抵抗性を持つイネ（Goto *et al.* 2014）や光合成能力を増強したイネ（農研機構 2016）の研究が行われており，またスギ花粉症への治療効果を持つ医薬品としての「スギ花粉症緩和米」

(Takagi *et al.* 2005, 高岩・清野 2010) の開発も進行している。これらの遺伝子組換えイネ (GM イネ) 品種が実用化されれば、その栽培が広く行われるものと予想される。

これらの研究開発の流れと並行して、これまでに GM イネからの遺伝子拡散を想定した自然交雑の試験が行われてきた (Messeguer *et al.* 2001, Rong *et al.* 2007, Endo *et al.* 2009, Rong *et al.* 2012)。これらの試験において栽培イネの交雑率はいずれも低い値を示したが、これは栽培イネの多くの穎花では開花前に穎花内で自花の花粉が自花の柱頭に受粉する自家受粉が行われることにより、開花後に他の花の花粉が柱頭に到達して受粉する他家受粉が非常に起こりにくいからである (星川 1975)。しかし、栽培イネであっても雄蕊や雌蕊等の花器官の形状によっては交雑率が高まること (加藤・生井 1987a, b, Marathi and Jena 2015) が知られている他、幼穂形成時に低温に遭遇した場合に花粉形成障害が起こって雄性不稔となることで、交雑率が高まることもあることも報告されている (佐藤・横谷 2008, 丹野ら 2011)。さらに、野生イネの一種である *Oryza rufipogon* Griff. では一年生型のものでは 5% 程度、多年生のものでは 50% 前後の他家受粉を行うものがあり (森島 1984, 秋本 2005)、実際に既存の栽培イネとの交雑が確認されている。このため、他の GM 作物と同様に GM イネ栽培に当たっても近縁野生種や既存の栽培品種 (両方を併せて非 GM イネとする) との自然交雑を抑制する技術が求められる。

#### 閉花受粉性による自然交雑の抑制

花粉の拡散による交雑を抑制する手段としては、雄性不稔の利用や花粉親と種子親を時間的に隔離する (開花期を分散させる) あるいは空間的に隔離する (防風資材の設置や作付圃場間に距離を取る) こと、そして閉花受粉性の利用等が挙げられる (Daniell 2002, Gressel 2010, Hüsken *et al.* 2010)。このうち閉花受粉 (Cleistogamy, 閉花受精とも) とは、被子植物において花が開く前の蕾の状態で行われる受粉/受精とされる (八杉ら 1996)。閉花受粉性を示す花では、花粉は自花の内側に閉じ込められるため外部に拡散されることはな

く、また雌蕊の柱頭は外部から隔離されることで他花の花粉に曝されることがないため、結果として自然交雑が起こらない。これまでにいくつかの作物で、この形質の研究と導入が進められている。

オオムギ (*Hordeum vulgare* L.) では赤かび病への対策として閉花受粉性の研究と利用が進んでおり、我が国では二条オオムギで複数の閉花受粉性品種が作出されている。これまでの報告では、オオムギの 2 HL 染色体上に座乗する *Cleistogamy1* (*Cly1*) と *Cly2* の 2 つの遺伝子がそれぞれ閉花受粉性に関与することが明らかにされている (Turuspekov *et al.* 2004, Honda *et al.* 2005, Wang *et al.* 2013)。このうち *Cly1* は map-based クローニング法によって単離されており、その機能とマイクロ RNA による転写制御の変化によって閉花受粉性が発現するメカニズムが解明されている (Nair *et al.* 2010, Wang *et al.* 2015)。

セイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) でも閉花受粉性系統およびその原因遺伝子が報告されている (Renard and Tanguy 1997, Lu *et al.* 2012)。これらの品種は栽培時に交雑の割合を減少させる効果があり、他の遺伝子拡散を抑制する方策と組み合わせて使用することで、自然交雑のリスクを低減する効果があると考えられている (Leflon *et al.* 2010)。

その他にコムギ (*Triticum aestivum* L.) (Ueno and Itoh 1997, 久保ら 2012, Ning *et al.* 2013) やダイズ (Takahashi *et al.* 2001, Khan *et al.* 2008) 等でも閉花受粉性に関する研究の報告がされている。

閉花受粉性となった植物の受粉は全て自家受粉となるため、トウモロコシ等の他花受粉が主となる作物にはこの性質を付与することは困難である。一方で、先にも述べた通り栽培イネは元来自家受粉の割合が非常に高いため、閉花受粉性の付与に障害はない。実際にイネの開花が雨天と重なった場合には閉花受粉となることが知られている (星川 1975)。常時閉花受粉性を示すイネの突然変異体はこれまでに複数見つかっており、このうち最初に報告されたのは *d7* 変異体 (閉穎大黒, *cleistogamous dwarf*) である (長尾・高橋 1954)。この変異体の内穎と外穎は基部で融合しており、これにより出穂後も開花しない。しかし、*d7*

変異体は閉花受粉性の多面発現として籾の小粒化や草型の矮小化、稔実率の低下等の収量低下に直結する好ましくない形質を持っており（図1-1）、この突然変異を利用した実用的な品種を作出することは困難と考えられる。その後、Maeng *et al.* (2006)によって *lodiculeless spikelet(t)* (*ld(t)*)が報告されたが、この変異体の原因遺伝子や農業形質への影響は明らかにされていない。Ni *et al.* (2014)も *DENSE AND ERECT PANICLE2/SMALL AND ROUND SEED1* (*DEP2/SRS1*) の変異が原因である閉花受粉性突然変異体 *cl7(t)*を報告しているが、この変異体も粒が短くなる形質を併せ持つため、収量性に悪影響があるものと考えられる。このように、閉花受粉性はイネにおいても自然交雑を抑制する有効な手段となり得るが、これまでに報告されたイネの閉花受粉性突然変異には栽培品種に導入して使用可能なものは無く、農業形質への悪影響が無いことと自然交雑を抑制する効果があることを両立した実用的な突然変異を新たに探索する必要がある。

#### イネの花器官形成の仕組みと鱗被の改変による閉花受粉性イネの作出

ABCモデル (Coen and Meyerowitz 1991) は、双子葉植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) やキンギョソウ (*Antirrhinum majus*) の突然変異体を使用した研究により高等植物における花器官形成の仕組みを説明するモデルとして導き出された。これは、花を同心円状に4つの部位 (whorl) に分け、それぞれの部位に形成される4種類の花器官は3つの遺伝子群 (クラス A, クラス B, クラス C) の働き組み合わせにより形成されるというものである。具体的には、一番外側の whorl 1 に形成されるがくはクラス A 遺伝子の働きにより、whorl 2 に形成される花弁はクラス A とクラス B の遺伝子の働き組み合わせにより形成される。さらに内側の whorl 3 に形成される雄蕊はクラス B 遺伝子とクラス C 遺伝子の働きで、そして whorl 4 に形成される雌蕊はクラス C 遺伝子の働きで形成される (図1-2)。その後 ABC モデルは雌蕊の内部で胚珠を形成するのに必要なクラス D 遺伝子 (Angenent *et al.* 1995)、全ての whorl で発現し各クラスの遺伝子と協調して機能するクラス E 遺伝子

(Pelaz *et al.* 2000, Ditta *et al.* 2004) を加えて, ABCDE モデルに拡大された (図 1 – 2, Theissen 2001, Theissen and Saedler 2001).

イネの花器官形成においてもこの ABCDE モデルを概ね当てはめることが可能である (図 1 – 2, Kozuka *et al.* 2000, Nagasawa *et al.* 2003, Kater *et al.* 2006, 平野・阿部 2018). イネの穎花は外穎, 内穎, 一对の鱗被, 6 本の雄蕊, 1 本の雌蕊から構成されている (図 1 – 3, Bommert *et al.* 2005, 平野・阿部 2018) が, このうちの鱗被が花弁に代わって whorl 2 に形成される花器官であり, 雄蕊と雌蕊はそのまま whorl 3 と 4 の花器官となる. なお, イネの whorl 1 に形成される花器官についてはまだ結論が得られていない. これまでにイネのクラス A 遺伝子として *OsMADS14*, *OsMADS15*, *OsMADS18* (Kozuka *et al.* 2000, Fornara *et al.* 2004), クラス B 遺伝子として *OsMADS2*, *OsMADS4*, *SUPERWOMAN1* (*SPWI*) / *OsMADS16* (Nagasawa *et al.* 2003, Prasad and Vijayraghavan 2003, Yao *et al.* 2008), クラス C 遺伝子として *OsMADS3*, *OsMADS58* (Yamaguchi and Hirano 2006, Yamaguchi *et al.* 2006) が報告されている. またクラス D 遺伝子として *OsMADS13*, *OsMADS21* (Dreni *et al.* 2007), クラス E 遺伝子として *LEAFYHULL STERILE1* (*LHS1*) / *OsMADS1*, *OsMADS5*, *OsMADS7*, *OsMADS8*, *OsMADS34* (Jeon *et al.* 2000, Malcomber and Kellogg 2005, Kater *et al.* 2006, Yamaguchi and Hirano 2006, Arora *et al.* 2007) が報告されている. これらの遺伝子は全て MADS-box 遺伝子ファミリーに属しており, それらの転写産物は, 共通して持つ MADS ドメインを介して同種あるいは異なる種の MADS-box 遺伝子の転写産物と相互作用し, 転写因子として機能することが明らかにされている (Norman *et al.* 1988, Han *et al.* 2003).

イネの開花に重要な役割を果たすのは鱗被である. 外穎の内側, 内穎の基部に接して形成される一对の魚鱗状の形態をしたイネの鱗被は, 開花時に急速に吸水・膨潤して体積を増し, その機械的な圧力によって内外穎の間を押し開く. その後, 鱗被はしばらく内外穎の間で圧力を維持するが, 60 分から 150 分後には水分を失って収縮し, 外穎は元の位置に戻って開

花が終了する (星川 1975). このことから, イネを閉花受粉性とするにはこの鱗被が機能しない状態にすることで実現が可能である. これには (1) 鱗被の形態形成に関わる遺伝子に着目し, 正常な鱗被が形成されない突然変異を探索する (2) 鱗被の膨潤機能に着目し, その生理的応答系が阻害された突然変異を探索する, の 2 つの方法が考えられる. (1) の鱗被の形態形成については, 先に述べた ABCDE 遺伝子のうちクラス B 遺伝子の *OsMADS2*, *OsMADS4*, *SPW1* やクラス E 遺伝子の *LHS1* が関与していることが示されており (Jeon *et al.* 2000, Nagasawa *et al.* 2003, Prasad and Vijayraghavan 2003, Yao *et al.* 2008), 実際に *spw1* 変異体や *lhs1* 変異体では鱗被が正常に形成されないことが明らかにされている. また, ABCDE 遺伝子には含まれない MADS-box 遺伝子の一つである *MOSAIC FLORAL ORGANS1* (*MFO1*) も鱗被での発現が報告されている (Moon *et al.* 1999). 一方 (2) の開花時の鱗被の膨潤機能にはジャスモン酸が関与するとされている (Zeng *et al.* 1999, Qin *et al.* 2005) ため, ジャスモン酸に関する生理や代謝経路に変異が生じたイネは開花しない可能性がある. このように鱗被の機能を喪失した突然変異を得るには複数のアプローチ方法があるが, これまでにこれらの方法から実用的な閉花受粉性突然変異は得られていない.

## 本研究の目的と本論文の構成

以上を踏まえて本研究では前項の (1) のアプローチ方法を採用し, イネの鱗被形成に関わる遺伝子の変異による鱗被形成不全を利用した実用的な閉花受粉性イネの作出が可能かどうかを検討することを目的とした. 具体的な遺伝子としては, イネの花器官形成に関与する MADS-box 遺伝子群の中から鱗被での発現が報告されている *MFO1* および *SPW1* の二つの遺伝子に着目し, その突然変異体を研究材料とした. 本論文の第 2 章では, *mosaic floral organs1-1* (*mfo1-1*) と *mfo1-2* の 2 種類の機能喪失型突然変異体を解析し, 未知であった花器官形成における *MFO1* の機能を明らかにするとともに, *mfo1* 変異が閉花受粉性の遺伝資源として利用可能かどうかを評価した. また第 3 章および第 4 章では *superwoman1-*

*cleistogamy1 (spw1-clsl)* 変異体について、この変異体を持つ閉花受粉性の農業形質への影響や実際の交雑抑制能力の評価を行い、また分子生物学的解析で明らかにされた変異型タンパク質の温度による相互作用の変化の知見に基づいて、異なる温度環境下での閉花受粉性の安定性を詳細に解析し、その特性を明らかにした。これらを通じて第5章では、最終的な目標である GM イネと非 GM イネとの自然交雑を効果的に抑制し、かつ収量性等の農業形質への影響が少ない実用的な閉花受粉性突然変異を見出すことの達成に向け、本研究で得られた知見から鱗被形成関連遺伝子の変異による閉花受粉性イネの作出の可能性を考察した。



図1-1 *d7*変異体の籾と玄米

左：日本晴（対照） 右：*d7*変異体

閉花受粉性の多面発現として小粒となるため、収量に影響がある。（bar= 1.0 cm）

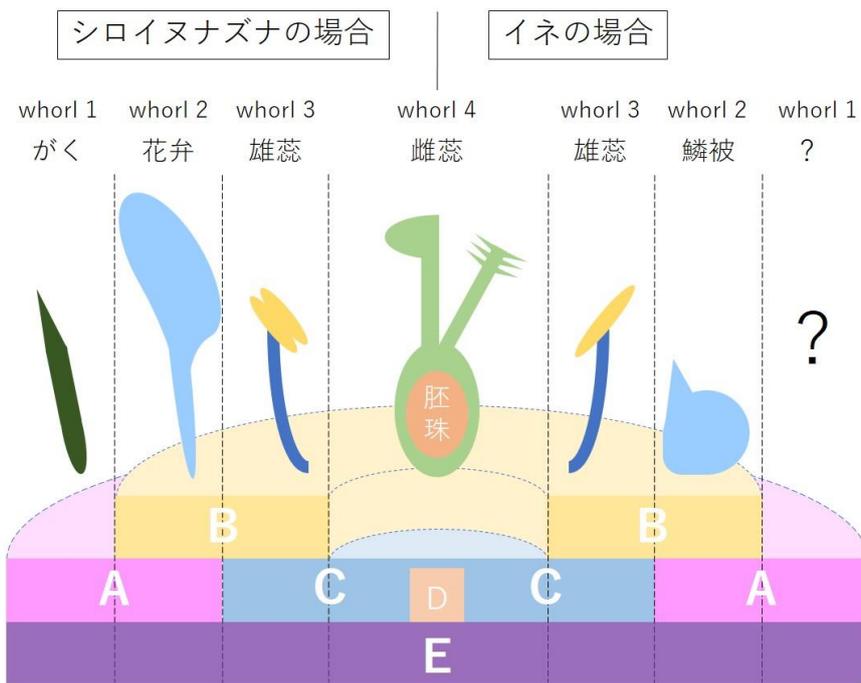


図 1 - 2 ABCDE モデル概略図



図1-3 イネの小花と花器官

## 第2章 イネの鱗被で発現する *MOSAIC FLORAL ORGANS1* の機能解析と同遺伝子を利用した閉花受粉性イネ作出の可能性の検討

シロイヌナズナの *AGAMOUS-LIKE6* (*AGL6*) (Ma *et al.* 1991, Rounsley *et al.* 1995) に代表される *AGL6*-like 遺伝子群は様々な植物で見つかっており (Becker and Theissen 2003), ABCDE モデルの各クラスの遺伝子のうちクラス E に近縁であることが系統解析で明らかにされている (Theissen *et al.* 2000, Becker and Theissen 2003, Zahn *et al.* 2005). イネには *MOSAIC FLORAL ORGANS1* (*MFO1*) / *OsMADS6* と *OsMADS17* の二つの *AGL6*-like 遺伝子があり (Arora *et al.* 2007, Reinheimer and Kellogg 2009), このうち *MFO1* については Moon *et al.* (1999) によって鱗被で強く発現することが報告されている. このことは *MFO1* が鱗被の形態形成に関わる可能性を示唆し, 併せてその変異により鱗被形成不全を引き起こすことで閉花受粉性イネを作出できる可能性を示している.

一方で, *AGL6*-like 遺伝子群の機能については未解明の部分が多い. シロイヌナズナの *AGL6* は ABCDE モデルにおける全ての whorl で発現していることが報告されている (Mouradov *et al.* 1998) が, 機能喪失変異体が発見されないことにより花器官形成における役割は明確になっていない (Schauer *et al.* 2007). イネの *AGL6*-like 遺伝子についても, Moon *et al.* (1999) や Favaro *et al.* (2002) が *MFO1* の発現パターンや他の MADS-box 遺伝子との転写産物間の相互作用について報告しているが, その花器官形成における詳細な役割については明らかにされておらず, *OsMADS17* はこれまでに機能解析の報告がされていない.

そこで本章では, *MFO1* 内に突然変異が生じた二種類の変異体の表現型を詳しく解析し, 鱗被を含む花器官形成における *MFO1* の役割を明らかにした. また *MFO1* の発現パターンについて, 幼穂の形成初期のステージや穎花の部位別に発現を調査することで, これまでの Moon *et al.* (1999) や Favaro *et al.* (2002) の報告よりも詳細に調査を行った. これに加え

て、*OsMADS17*についても発現パターンの調査を行ったほか、*MFO1*と*OsMADS17*の機能の関係について RNAi による組換えノックダウン系統を作出して表現型を比較することで明らかにした。これらの結果から、これまで不明であったイネの *AGL6*-like 遺伝子の穎花形成における役割を明らかにするとともに、*MFO1* を利用した実用的な閉花受粉性イネ作出の可能性について検討を行った。

## 2-1 材料および方法

### 供試系統・品種

イネ突然変異体 *mosaic floral organs1-1* (*mfo1-1*) は、日本型品種「金南風」を N-メチル-N-ニトロソウレア (MNU) によって突然変異処理した集団の M<sub>2</sub> 世代から選抜された。変異体の名称は、穎花の中に複数の器官がモザイク状になった器官 (Mosaic Floral Organs) が形成されることから命名された。原因遺伝子 *MOSAIC FLORAL ORGANS1* は、*mfo1-1* とインド型品種「Kasalath」との交配 F<sub>2</sub> 集団について行われたマッピングと組換え体を用いた相補性試験により、第 2 染色体上の *OsMADS6* であることが確認された。また塩基配列の解析から、*mfo1-1* 変異では第 1 エクソン内にアミノ酸置換 (24 番目のアルギニンがヒスチジンに置換) を伴う一塩基置換が生じていることが判明した (図 2-1 A)。

イネ突然変異体 *mfo1-2* は独立行政法人農業生物資源研究所 (現国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (農研機構) 次世代作物開発研究センター) が配布する品種「日本晴」の *Tos17* ミュータントパネル (Miyao *et al.* 2003) から、*MFO1* にレトロトランスポゾン *Tos17* が挿入されている系統をデータベースで検索することにより選抜されたもので、系統名は NE4011 であった。*mfo1-2* アリルでは *Tos17* レトロトランスポゾンが *MFO1* の第 8 エクソンのストップコドンから 119bp 下流に挿入されており (図 2-1 A)、*MFO1* の発現が野生型よりも低下していた (図 2-1 B)。

野生型の花器官や組織の観察、各遺伝子の発現解析の比較用サンプルおよび野生型の遺伝的背景を持つ RNAi 組換え個体の作出には品種「日本晴」を使用した。

### 形態・組織観察および *in situ* ハイブリダイゼーション実験

切片試料作製のために採集した穎花のサンプルは FAA (ホルマリン, 70% 氷酢酸, エタノールを 1:1:18 で混合) で固定 (4°C, 一晚) し、水分含量を徐々に減らしたエタノールシリーズを使用して脱水した。これをキシレンで置換した後、Paraplast Plus (McCormick

Scientific 社) 内に包埋してからロータリーマイクロトームを使用して厚さ 8  $\mu\text{m}$  の切片を切り出した。切片はスライドガラス上でトルイジンブルーを用いて染色し、光学顕微鏡で観察した。電子顕微鏡を用いた観察は、サンプルを直接走査型電子顕微鏡 (VE-8000, 株式会社キーエンス) で観察した。

*in situ* ハイブリダイゼーション実験に使用した各種プローブは、*MFO1* および *OsMADS17* の cDNA から各遺伝子に特異的なプライマー (表 2-1) と Roche Diagnostics 社の DIG RNA ラベリングキットを使用して作製し、ハイブリダイゼーションや洗浄等の工程は小松ら (2005) のプロトコルに従って行った。

## RNA の単離と分析

幼穂と各花器官からのトータル RNA サンプル抽出には RNeasy plant mini kit (Qiagen 社) を使用し、そのマニュアルの手順に従って採集した。RT-PCR 解析には、Titan One Tube RT-PCR system (Roche Diagnostics 社) を使用し、コントロール遺伝子としてイネの *ACTIN1* または *Adenine Phosphoribosyltransferase1 (OsAPT1)* を使用した。RT-PCR 解析で使用した各遺伝子の特異的プライマーは表 2-1 に示した。

定量的 RT-PCR 解析は Thermal Cycler Dice Real Time System Single TP850 system と SYBR Premix Ex Taq kit (いずれもタカラバイオ社) を使用し、シングルカラー・リアルタイム検知システムを使用した。cDNA はトータル RNA から 6 塩基のランダムプライマーと Super Script III 逆転写酵素 (Invitrogen 社) を使用して合成した。実験は個別の 3 個体から得られた cDNA について 2 反復ずつ行い、得られた結果はクロッシングポイント法で解析した後 *OsUBQ* の発現レベルで標準化した。定量的 RT-PCR 解析で使用した各遺伝子の特異的プライマーは表 2-1 に示した。

## RNAi 実験

RNAi 実験にトリガー配列として使用した DNA 断片は *MFO1* (GenBank のアクセッション番号 AK069103 の塩基配列データを使用) の 624 番目から 994 番目の塩基までの 370bp および *OsMADS17* (同 AY551918 の塩基配列データを使用) の 634 番目から 994 番目の塩基までの 360bp を, Pfu Ultra DNA ポリメラーゼ (Stratagene 社) を使用した PCR 反応で増幅して合成した. この断片を, Yoshida *et al.* (2007) と同様の方法で先頭が向かい合う形で pZH2B ベクター (農研機構中央農業研究センター, 黒田氏より分譲) に組込み, このベクターを一般的なハイグロマイシンによる選抜を使用したアグロバクテリウム法によって, 野生型または *mfo1-2* の胚盤由来のカルスに導入した (Toki *et al.*, 2006). *mfo1-2* のホモ個体のカルスは, *Tos17* トランスポゾンの挿入位置に作成した DNA マーカーで選抜した.

## 2-2 結果

### *mfo1-1*の表現型

栄養成長期の *mfo1-1* の生育には元品種である「金南風」と比較して異常は観察されなかった。出穂後の穎花は開花しなかったが、花器官の多くに異常が観察された。また、全ての穎花が不稔であった。

### 内穎の変化

*mfo1-1* の穎花の内穎は幾分伸長し、野生型では閉じている内外穎の間に隙間が生じていた (図 2-2 A, 2 B)。野生型の内穎の外穎側端部には表面が滑らかな構造 (内穎周縁部) があるが、*mfo1-1* ではこの部分が欠失して外穎と同様に粗い上表皮が末端まで連続していた (図 2-2 C, 2 D)。また、この異常な内穎は野生型のものよりも横幅が拡大していた。内穎の横断切片を観察すると、野生型では外穎の端と内穎周縁部が噛み合う構造が確認できたが、内穎周縁部が形成されない *mfo1-1* では鉤合が起こっていなかった (図 2-2 E, 2 F)。また、内穎に形成される維管束は野生型では 3 本であったが、*mfo1-1* では 5 本に増加しており、これは野生型の外穎の維管束の数と同じであった (図 2-2 G, 2 H)。

野生型のイネにおいて *DROOPING LEAF (DL)* は外穎では発現するが、内穎では発現しない (Yamaguchi *et al.* 2004) ため、*DL* の発現を指標として内穎と外穎を区別することが可能である。*mfo1-1* の内穎での *DL* の発現を RT-PCR 解析で確認したところ、弱くではあるが発現していることが確認された (図 2-2 I)。これらの結果から *mfo1-1* の内穎は、完全ではないが部分的に外穎に変化していることが明らかになった。

### whorl 構造の消失と各花器官の異常

野生型の穎花およびその横断切片を図 2-3 A および 3 B に、典型的な *mfo1-1* の穎花およびその横断切片を図 2-3 C および 3 D に示す。野生型の穎花の内穎より内側の領域で

は整った whorl 構造が観察され、外側から順に 2 つの鱗被 (whorl 2), 6 本の雄蕊 (whorl 3), そして 1 本の雌蕊 (whorl 4) が形成される。そして雌蕊の子房の内部には胚珠が形成される (図 2-3 B)。一方で, *mfo1-1* では明瞭な whorl 構造は観察されず, 各花器官の形態, 数, 形成位置が野生型とは大きく異なっていた (図 2-3 C, 3 D)。

*mfo1-1* の whorl 2 と whorl 3 に対応する領域に形成された花器官は主に穎状器官 (図 2-3 E), 伸長鱗被 (図 2-3 F), 雄蕊 (図 2-3 G) であった。各穎花で観察されたそれぞれの器官数の平均値は表 2-2 に示す。穎状器官は観察した全ての穎花で形成され, 緑色で硬く有毛の表面を持ち, 維管束を備えるなど内外穎に類似した断面構造となっていた (図 2-3 H)。この器官の大きさはバリエーションに富み, 時には内穎に近い大きさになることもあった (図 2-3 I)。伸長鱗被は細長く, 半透明で柔らかい器官であった。この器官の形成位置は本来の鱗被の位置とは異なり, また形成される数も野生型の鱗被より少なかったが, その形態がクラス B 遺伝子の機能喪失変異体において観察される鱗被の表現型と類似している (Nagasawa *et al.* 2003) ことから, この器官が異常な形態となった鱗被であると判断した。この伸長鱗被について, ABCDE 遺伝子のうちのクラス A, B, C 遺伝子の発現を野生型の鱗被と比較した結果を図 2-3 J に示す。野生型の鱗被では 3 つのクラス B 遺伝子 (*OsMADS2*, *OsMADS4*, *SPW1*) が発現していたが, クラス A 遺伝子 (*OsMADS14*, *OsMADS15*) とクラス C 遺伝子 (*OsMADS3*, *OsMADS58*) は発現していなかった。一方で, *mfo1-1* の伸長鱗被ではクラス B 遺伝子に加えてクラス A, クラス C 遺伝子も発現していた。このことは伸長鱗被が正常な鱗被のアイデンティティを失っていることを示している。*mfo1-1* の雄蕊の形態は野生型のものと同様に観察した穎花のほとんどで形成が確認されたが, その数は明らかに減少しており (表 2-2), *MFO1* が雄蕊の数の制御に関与している可能性が示された。*mfo1-1* ではこれら 3 種類の花器官に加えて, 穎状器官と伸長鱗被のモザイク器官 (図 2-3 K), 伸長鱗被と雄蕊のモザイク器官 (図 2-3 L), 穎状器官と伸長鱗被, 雄蕊の全ての組織を持つモザイク器官 (図 2-3 M) が観察された (表 2-2)。こ

これらの器官はその形態から複数の器官のアイデンティティを持っているものと判断される。なお、*mfo1-1*の各花器官およびモザイク器官の穎花内での配置に法則性は見られなかった。

以上の結果から、*MFO1*は whorl 2 および whorl 3 において花器官の形成やアイデンティティ維持、配置パターン決定等の多様な機能を持つことが明らかにされた。

### 分裂組織制御の異常

野生型の穎花では外穎および内穎は小穂軸の先端部分に非常に近接して形成される (図 2-4 A)。しかし、*mfo1-1*では外穎の着生部と内穎の着生部の間に軸状の部分が形成され、着生部位間に間隔が生じていた (図 2-4 B)。また、野生型では内穎の形成位置と whorl 2 の花器官である鱗被の形成位置も近接しており、その内側の花器官も間断なく順次形成されるが (図 2-4 A, 4 C)、*mfo1-1*では内穎形成後にすぐ花器官が形成されるのではなく、代わりに小穂軸から維管束が連続した軸状の構造が形成された (図 2-4 B, 4 D)。この軸状の構造は whorl 2 および whorl 3 の異常な花器官の形成前後にも生じることがあった (図 2-4 E)。

*mfo1-1*の小花の中心部 (whorl 4) では、未成熟で柱頭の数が増加していると考えられる雌蕊 (図 2-4 E) や穎状の器官の内側に異常な雌蕊が複数連続して形成された構造が観察された (図 2-4 F, 4 G)。これらの表現型は、花器官の分裂組織の有限性が失われていることを示している。また、*mfo1-1*の whorl 4 に形成された器官について、クラス A, C, D 遺伝子および胚珠の形成に関与する *DL* の発現を野生型と比較したところ、野生型ではクラス C, D および *DL* が発現していたのに対してクラス A の発現は見られなかったが、*mfo1-1*の whorl 4 の異常な雌蕊ではクラス A 遺伝子の発現が見られた (図 2-4 H)。さらに、いくつかの穎花では whorl 4 に未熟な小穂が新たに形成されることがあった (図 2-4 I)。

内穎形成部の前後や whorl 4 で観察されたこれらの *mfo1-1*の表現型は、器官を分化する

分裂組織の転換異常や制御異常によって生じていると考えられ、*MFO1* がこれらに関与していることが明らかになった。

### *mfo1-2*の表現型

*mfo1-2* も *mfo1-1* と同様に栄養成長期には異常は見られなかった。また出穂後の開花も観察されなかった。花器官で観察された表現型は *mfo1-1* の物に比べてマイルド（異常性が小さい）なものだったが、発芽能のある種子が形成されたのは、全穎花の2割程度であった（データ省略）。

*mfo1-2* の内穎は *mfo1-1* のものと同様に内穎周縁部を欠き（図2-5A）、外穎との鉤合部も形成されていなかった。またこの内穎でも *DL* の発現が確認された（図2-5B）が、維管束数は野生型と同じ3本で増加は見られなかった（データ省略）。*mfo1-1* で観察された外穎と内穎の着生部位間の軸状の構造は、*mfo1-2* でも観察された（図2-5C, 5D）。

*mfo1-2* の穎花では概ね野生型と同様の whorl 構造が維持されていた（図2-5E）。しかし *mfo1-2* の鱗被は数が増加しており（表2-2）、野生型では鱗被が形成されない内穎の内側部分にも形成されて雄蕊や雌蕊を取り囲んでいた（図2-5C, 5D, 5E）。鱗被の形状も異常となっており、多くは *mfo1-1* のものと同様に伸長していたが、小型のものが形成されることもあった（図2-5C, 5D）。伸長鱗被の組織の一部に穎のような緑色で硬い表面の構造が形成される場合もあった（図2-5F）。また、野生型の鱗被は内穎の内穎周縁部と融合している（図2-3B）が、*mfo1-2* では内穎と分離した状態で形成されていた（図2-5D）。雄蕊の形態は比較的正常に近かったが、その数は減少傾向にあり（表2-2）、鱗被と雄蕊のモザイク器官（図2-5G）または2本の雄蕊が融合した器官（図2-5D）が形成されることがあった。雌蕊については外見上正常に見えるが、内部の胚珠の形成がしばしば正常に行われず、異常に増殖した細胞によって胚嚢が満たされていた（図2-5E, 5H, 5I）。

これらの結果から、*mfo1-2*は*mfo1-1*と比べて whorl 構造や花器官の形態の異常が少ないマイルドな表現型を示し、かつ開花しないことが明らかになった。その一方で、*mfo1-2*の稔実率は 2 割程度と低く、この原因は雌蕊の内部の胚珠形成が異常になったためと考えられた。

### ***MFO1*および *OsMADS17*の発現パターン**

幼穂分化後、その全長が約 0.5 mm の頃は一次枝梗が分化している段階にあり、花器官の原基は形成されていない。全長が約 1 mm になると護穎、外穎、内穎の各器官が分化し、その後約 4 mm に達するまでに鱗被、雄蕊、雌蕊が分化する (Ikeda *et al.* 2004, Itoh *et al.* 2005)。この幼穂形成の初期について *MFO1* および *OsMADS17* の発現を調べた。*MFO1* の発現は葉および全長が 0.5 mm 以下の幼穂では見られなかったが、幼穂長が約 1 mm になると明確に観察されるようになり、約 3 mm、約 5 mm の段階でも発現は維持されていた (図 2 - 6 A)。*OsMADS17* も葉では発現しておらず、幼穂長が約 1 mm の段階で発現が明瞭となり、以降の約 3 mm、約 5 mm の段階でも発現は続いていた (図 2 - 6 A)。このように、幼穂形成初期の *MFO1* と *OsMADS17* の発現パターンはほぼ同様であった。

次に、成熟したイネの小穂、小花の器官毎に *MFO1* および *OsMADS17* の発現を調査した。その結果、*MFO1* は内穎、鱗被、雌蕊では強い発現が、護穎と雄蕊ではわずかな発現が見られたが、外穎での発現は確認できなかった (図 2 - 6 B)。*OsMADS17* の発現は調査した全ての器官で見られたが、鱗被と雌蕊では強く、護穎、外穎、内穎ではそれよりも弱く、雄蕊ではさらに弱い発現となっていた (図 2 - 6 B)。器官毎の発現解析では、*MFO1* と *OsMADS17* は鱗被と雌蕊での強い発現と雄蕊でのごく弱い発現が共通していたが、外穎での発現の点で相違が見られた。

二つの遺伝子の発現部位をより詳細に調査するために、野生型を用いて *in situ* ハイブリダイゼーション実験を行った。穎花の外穎原基が分化した直後のステージでは *MFO1* のシ

グナルは小花分裂組織で検出され、外穎原基、形成中の護穎、副護穎では見られなかった(図 2-6 C)。雄蕊の原基が分化するステージでは、内穎の原基と雄蕊の原基に囲まれた花器官分裂組織でシグナルが検出されたが、雄蕊の原基では検出されなかった(図 2-6 D)。心皮原基が分化するステージでは、内穎、鱗被と心皮原基でシグナルが確認されたが、雄蕊ではされなかった(図 2-6 E)。その後の胚珠が分化するステージでは、胚珠の珠皮の部分と小穂軸、鱗被および内穎周縁部でシグナルが確認された(図 2-6 F, 6 G)。外穎原基が分化した後の小花分裂組織では、*OsMADS17*のシグナルも確認された(図 2-6 H)。心皮原基が分化するステージでは、*OsMADS17*のシグナルは外穎の一部と内穎、鱗被で検出されたが、*MFO1*のような心皮原基での発現はしていなかった(図 2-6 I)。胚珠が分化するステージでは、胚珠と小穂軸と鱗被で *OsMADS17* のシグナルが見られたが、*MFO1* が発現していた内穎周縁部ではシグナルは見られなかった(図 2-6 J, 6 K)。

*MFO1* の発現が見られた器官は *mfo1-1* および *mfo1-2* で異常が観察された器官と一致しており、これらの器官の形成に *MFO1* が重要な役割を果たしていることが確認された。また *in situ* ハイブリダイゼーション実験では、*MFO1* が小花分裂組織、花器官分裂組織、心皮原基といった分裂組織としての活性を持っている部位で発現していることが示された。一方で、*OsMADS17* の発現パターンはおおよそ *MFO1* の発現パターンと類似していたが、*OsMADS17* は外穎で発現すること、内穎周縁部では発現しないこと等の違いも明らかになった。

### ***MFO1* と *OsMADS17* の遺伝的な相互作用**

*mfo1-2* において *OsMADS17* の発現量を定量的 RT-PCR で調べたところ、野生型よりも発現量が増加していることが確認された(図 2-7 A)。これは、*MFO1* と *OsMADS17* の間に何らかの相互作用がある可能性を示している。そこで二つの遺伝子間の関係をより明らかにするため、それぞれあるいは両方を RNAi によりノックダウンした組換え体を作成

し、その表現型を比較した。

野生型（日本晴）の遺伝的背景で作出した *MFO1* の RNAi ノックダウン系統（MFO1i）、*OsMADS17* の RNAi ノックダウン系統（OM17i）および両方を同時にノックダウンした系統（MFO1i+OM17i）における *MFO1* および *OsMADS17* の発現量を図 2-7B に示す。それぞれの系統では、標的遺伝子の発現量が抑制されていることが確認された。その一方で、MFO1i では *OsMADS17* の発現量が上昇する傾向にあったが、OM17i では *MFO1* の発現量の上昇は見られなかった。

調査した 20 個体の MFO1i の穎花での表現型は、*mfo1-2* の表現型とほぼ同様であり、whorl 構造は概ね維持されているものの内穎周縁部の消失や鱗被の伸長と増加、雄蕊の減少が見られた（図 2-7C）。一方で、OM17i では全ての個体の穎花に異常が観察されなかった（図 2-7D）。MFO1i+OM17i では 16 個体中 14 個体で MFO1i と同様の表現型となったが、2 個体で伸長した鱗被の一部が穎状の組織に変化し、この個体は MFO1i よりも表現型がシビア（異常性が強い）であると考えられた（図 2-7E）。

次にこれらの RNAi のコンストラクトを *mfo1-2* に導入し、*MFO1* の発現量が低下した遺伝的背景での表現型の比較を行った（各系統は「MFO1i：*mfo1-2*」「OM17i：*mfo1-2*」「MFO1i+OM17i：*mfo1-2*」と表記する）。MFO1i：*mfo1-2* では 18 個体中 12 個体で MFO1i+OM17i のものよりも伸長鱗被の穎状部分の拡大が進んでいるのが観察され、また *mfo1-1* で見られた穎状器官も観察されたことから、この系統の表現型は明らかに *mfo1-2* よりもシビアになっていると考えられた（図 2-7F）。対照的に OM17i：*mfo1-2* の穎花は、調査した 10 個体全てで *mfo1-2* と表現型の違いが無かった（図 2-7G）。MFO1i+OM17i：*mfo1-2* では、18 個体中 11 個体で *mfo1-1* と同様の表現型となり、内穎形成後の軸状構造、穎状器官、伸長鱗被、モザイク器官等の形成や、whorl4 での新たな小穂の形成が観察された（図 2-7H、7I）。

以上の 3 種類のトリガー配列を使用した RNAi ノックダウン系統の表現型の比較により、

*OsMADS17*は単独でノックダウンしても穎花の形成に影響しないが、*MFO1*と同時にノックダウンすると *MFO1* 単独でノックダウンした場合よりも表現型がシビアになることが明らかになった。

## 2-3 考察

### *MFO1*の花器官形成における機能

*mfo1*変異体の内穎で観察された内穎周縁部の欠損(図2-2D, 5A), 維管束数の増加(図2-2H), *DL*の発現(図2-2I, 5B)と言った表現型は, 野生型の外穎の特徴と一致している. このことから, *MFO1*の機能喪失は内穎の正常なアイデンティを失わせ, 内穎の外穎化を引き起こすと考えられる. 発現パターン解析においても *MFO1*が内穎では発現しているが外穎では発現していないことが確認され(図2-6B), 内穎のアイデンティ維持に *MFO1*が必要であることを支持している. さらに *in situ* ハイブリダイゼーション実験では, 内穎の中でも特に内穎周縁部で *MFO1*が発現している(図2-6G)ことが明らかにされ, *MFO1*がこの内穎特異的な構造の形成に関与していることが明らかにされた.

*MFO1*の鱗被での発現解析により, この遺伝子が鱗被の形成初期から発現を開始し, 器官が成熟した後も発現が続いていることが明らかにされた(図2-6B, 6E, 6F). さらに二種類の *mfo1*変異体ではいずれの鱗被でも異常が観察された(図2-3F, 2-5D, 5E)ことから, *MFO1*が鱗被の形態形成に関与することが確認された. *mfo1-1*の伸長鱗被では, 野生型の鱗被では発現していないクラスA, クラスCの遺伝子が発現していたが(図2-3J), このことは *MFO1*が鱗被においてクラスA, クラスC遺伝子の発現を抑制することによって鱗被のアイデンティを維持している可能性を示唆している. なお, ABCDEモデルではクラスA, B, C遺伝子のいずれもが発現する器官は無いため, 伸長鱗被が本来の鱗被からどの花器官に近くなったのかは不明である. また, 表現型がシビアで whorl 構造が失われてしまう *mfo1-1*では判然としなかったが, whorl 構造が維持される *mfo1-2*では, 鱗被の形成数や配置に異常が観察された(図2-5E). このことは, *MFO1*が鱗被の配置パターンにも関与していることを示している.

雄蕊の形成には *MFO1*の関与は小さい可能性がある. 表現型のシビアな *mfo1-1*におい

でも、雄蕊は野生型と変わらない形態のものが形成された (図 2 - 3 G). また *MFO1* の発現パターン解析でも雄蕊での発現は非常に弱かった (図 2 - 6 B). 一方で, *mfo1-1* の雄蕊の数は大幅に減少しており, *mfo1-2* においても雄蕊の数は少ない傾向にあった (表 2 - 2). *mfo1-2* では 2 本の雄蕊が融合しているものが観察され (図 2 - 5 E), これは雄蕊が異常に近接して形成されたためと考えられた. これらのことは, *MFO1* が雄蕊の配置パターンの決定に関与していることを示している. *mfo1* 変異体では雄蕊が形成されるスペースの確保がなされない, あるいは形成位置にずれが生じることによって, このような表現型が生じていると考えられる.

*mfo1-1* ではさらに複数の花器官のアイデンティティを持つと見られる器官が形成された (図 2 - 3 K, 3 L, 3 M). また *mfo1-2* でも異常となった鱗被の一部に穎のような構造が形成されたり, 伸長鱗被と雄蕊のモザイク器官が形成されたりする場合があった (図 2 - 5 F, 5 G). これらの器官の形成は, *MFO1* が各器官の形成時にアイデンティティを整理し, 一度決定されたものについてはこれを維持する機能を持つことを示唆している.

### ***MFO1* の分裂組織の転換における機能**

イネの外穎と内穎の形態は非常に似ているが, 一般的なイネ科の植物と同様に外穎は小穂軸に生じる苞葉, 内穎は小穂軸に生じた腋生分裂組織によって形成される前出葉に対応すると考えられている (Kellogg 2001). このため, 外穎は小穂分裂組織によって形成される器官, 内穎は小穂分裂組織から転換した小花分裂組織によって形成される器官となる. *mfo1* 変異体において外穎の次に不完全ながらも再度外穎が形成されたことは, 小穂分裂組織から小花分裂組織への転換が正常に行われなかったことを示している. *mfo1* 変異体の外穎と「外穎化」した内穎の間に生じた軸状の構造 (図 2 - 4 C, 4 D, 5 D) は, 本来は外穎の形成直後に起こるこの分裂組織の転換が起こらなかったかあるいは不十分だったために, 活性が維持された小穂分裂組織が引き続き小穂軸を形成したものと考えられる. *MFO1*

の発現解析において、外穎の分化後の小花分裂組織全体で *MFO1* の発現が観察される (図 2-6 C) ことも、*MFO1* が小穂分裂組織から小花分裂組織への転換に関与していることを支持している。またこの解析では、穎花の発達段階に対応して雄蕊原基の内側部分 (図 2-6 D)、心皮原基 (図 2-6 E) と *MFO1* の発現部位が遷移していたが、これらはいずれも分裂組織の活性を持つ部位であることから、この維持や制御にも *MFO1* が関与していると考えられる。

*mfo1-1* の whorl 4 で観察された表現型も分裂組織の制御が正常に行われなかったことによるものと考えられる。小花分裂組織は各花器官を分化し、最後に雌蕊と胚珠を形成した後その活性を消失する。しかし、*mfo1-1* では雌蕊を分化し続けるという表現型が観察され (図 2-4 F, 4 G)、これは分裂組織の有限性が失われていることを示している。なお、反復した雌蕊の形成はクラス C 遺伝子の *OsMADS3* とクラス D 遺伝子の *OsMADS13* の変異体でも報告されている (Yamaguchi *et al.* 2006, Dreni *et al.* 2007)。このことから、*MFO1* はこれらの遺伝子と共同で whorl 4 での分裂組織の有限性の制御を行っている可能性がある。

*mfo1-1* の whorl 4 に形成された器官ではクラス A 遺伝子の発現が観察され (図 2-4 H)、また一部の穎花の中心部では、新たな小穂が形成されることがあった (図 2-4 I)。クラス A 遺伝子である *OsMADS14* と *OsMADS15* は、穂や小穂の形成の初期に発現することが報告されている (Furutani *et al.* 2006)。このことは分裂組織がもう一度小穂分裂組織としての活性を持ったことを示しており、*MFO1* はこの分裂組織の「戻り」を抑制する機能を持っていると考えられる。whorl 4 での小穂の再形成はクラス E 遺伝子である *LHS1* の変異体でも観察されている (Jeon *et al.* 2000, Agrawal *et al.* 2005) が、*MFO1* タンパク質と *LHS1* タンパク質は相互作用することが報告されており (Moon *et al.* 1999)、*MFO1* はこの遺伝子とも協調して働いている可能性がある。

#### ***OsMADS17* の機能と *MFO1* との関係**

本研究で行ったイネのもう一つの *AGL6*-like 遺伝子である *OsMADS17* の発現解析では、発現開始のタイミングがほぼ *MFO1* と同時期 (図 2-6A) で、発現する器官や部位も共通であることが多かった (図 2-6B~6K)。一方で、*MFO1* との主な相違点は外穎で発現すること (図 2-6B, 6I) と心皮原基および内穎周縁部で発現しないこと (図 2-6I, 6K) であり、このことはこれらの器官を形成する上での *MFO1* と *OsMADS17* の役割が異なっていることを示唆している。

RNAi によるノックダウン系統の作出では、3 種類のトリガー配列を導入した組換え体の表現型の異常性の強さが、野生型, *mfo1-2* のいずれの遺伝背景においても、*MFO1i+OM17i* > *MFO1i* > *OM17i* の順となった (図 2-7C~7I)。*OM17i* の穎花で異常が見られなかったこと (図 2-7D) は *OsMADS17* が機能を持たないことを示している可能性もあるが、一方で *MFO1i+OM17i* と *MFO1i* の表現型の差が観察されたことは、*MFO1* と *OsMADS17* が限定的な機能の冗長性を持つことを示していると考えられる。つまり、*OsMADS17* がノックダウンされた場合は *MFO1* がその機能を全てカバーするために表現型が現れないが、逆に *MFO1* がノックダウンされた場合には *OsMADS17* はその機能を限定的にしか補完しないため、表現型が観察される。そして、*MFO1* と *OsMADS17* がともにノックダウンされると相互の機能補完が全て失われるため、*MFO1* 単独のノックダウンよりも表現型がシビアになると考えられる。

これらの発現解析やノックダウン系統の解析の結果から、*OsMADS17* は *MFO1* とは異なる機能 (内穎周縁部等の形成に関わらない等) と共通だがその冗長性は不均一である機能を持つことが明らかになった。なお、*OsMADS17* の機能欠損変異は正常な *MFO1* によりマスクされてしまうため鱗被の機能喪失は起こらないと考えられ、閉花受粉性イネの作出の観点からはこの遺伝子をターゲットとすることは難しいと考えられる。

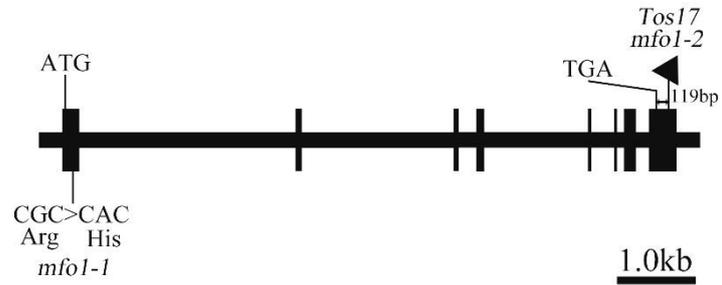
#### ***MFO1* の変異による閉花受粉性イネ作出の可能性**

本章で調査を行った2つの *mfo1* 変異体はともに出穂後に開花が観察されなかった。これは、*mfo1* 変異により正常な機能を持つ鱗被が形成されなかったこと、あるいは外穎と内穎を押し開くことが可能な適切な位置に鱗被が形成されなかったことによると考えられる。このことから、鱗被の形成に関与する遺伝子に着目し、その変異によってイネを閉花受粉性とする可能性は示されたと言える。しかし、本研究で解析した *MFO1* の変異を使用して閉花受粉性イネを作出することは困難であると考えられる。本章で明らかになったように *MFO1* は穎花の構造決定や花器官の形成に多くの役割を果たしており、その機能喪失による特に雌蕊や胚嚢の形成異常は収量性に直接影響してしまう。表現型のマイルドな *mfo1-2* 変異においてもその稔実率は低く、実用的とは言い難い。また、*mfo1* 変異による内穎からの内穎周縁部の欠失は、精密に閉じた状態となるはずの内外穎の間に隙間を生じさせる。このことは、仮に稔実性の高い *mfo1* 変異のアリルが発見されたとしても、登熟期に成長する胚乳の一部が露出することになり、品質への悪影響が懸念される。*MFO1* の変異を利用した閉花受粉性イネ作出の可能性については第5章の総合考察でさらに検討を行うが、実用的な閉花受粉性イネ品種の作出のためにはこれらの短所を克服するためのさらなる研究が必用になるであろう。

本章では、これまで明らかになっていなかったイネの二つの *AGL6-like* 遺伝子の機能、特に *MFO1* の花器官形成における役割が明らかになった。一方で、現時点では *mfo1* 変異による実用的な閉花受粉性イネの作出は困難であることも明らかになった。そこで第3章では、*MFO1* とは異なる MADS-box 遺伝子の *SPW1* に着目し、その新規変異体の解析を行った。

A

*MOSAIC FLORAL ORGANS1 (OsMADS6)* gene



B

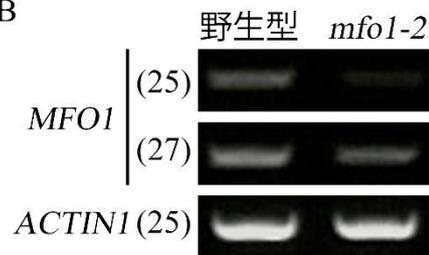


図 2 - 1 *mfo1-1* および *mfo1-2* について

(A) *MFO1* の遺伝子構造と *mfo1-1* 変異および *mfo1-2* 変異の位置

(B) *mfo1-2* での *MFO1* の発現低下 (RT-PCR 解析)

括弧内の数字は PCR 反応のサイクル数を示す。

表 2 - 1 第 2 章の各実験に使用した遺伝子特異的プライマー

遺伝子名		塩基配列 (5' - 3')
<i>in situ</i> ハイブリダイゼーション実験		
<i>MFO1</i>	forward	TAGGCAACTCAAGCACAAGC
	reverse	CAAGACCATTAGGTGGCTCG
<i>OsMADS17</i>	forward	TTCGCCGGAAGGAACGCCAG
	reverse	GATTGAAAAGATAGACGTCTTA
RT-PCR解析		
(クラスA)		
<i>OsMADS14</i>	forward	CCATTAACGAGCTTCAACGG
	reverse	CCAATCAGCAAGATAACGGAGAC
<i>OsMADS15</i>	forward	AGTACGCCACTGACTCCAGG
	reverse	ACACAAAGACACATCCTGATCCTTG
(クラスB)		
<i>OsMADS2</i>	forward	CCCCAAGACCTCGCTATC
	reverse	GCATGAAACCAAGCTTGCATAAA
<i>OsMADS4</i>	forward	GAGGAGGAGGAGGAGTTGGATA
	reverse	TGAATTCTGAGTGCTAATGCT
<i>SPW1</i>	forward	GCAAGATCGAGATCAAGCGG
	reverse	TTGTCCACGAACCCGAACG
(クラスC)		
<i>OsMADS3</i>	forward	GCCAACAACAGTGTGAAATCC
	reverse	TCATACAACACACACAATATGGC
<i>OsMADS58</i>	forward	CAACAACAGCGTGAAGGAAACTA
	reverse	GGTTGAACCAATACTTAGGTACATC
(クラスD)		
<i>OsMADS13</i>	forward	CAAGAAACGAAGTTGAGAGCAAG
	reverse	GGTGCAGAATGAAGTTCATGAGG
<i>OsMADS21</i>	forward	AGTTCTCCAATGTAAACAGCACAAG
	reverse	CGGAGTCGACCTTGAAGTAGC
(クラスE)		
<i>MFO1</i>	forward	TAGGCAACTCAAGCACAAGC
	reverse	AAACAGTTTACCCAAAGCTGGTAAG
<i>OsMADS17</i>	forward	TAGCGCCGGAATAACAAGAC
	reverse	AGAGTACCACCGGATAGGGGAG
(その他)		
<i>DL</i>	forward	GCAATGGATCTCGTGTCGCC
	reverse	TGAAGCGGTTGTAAGCAGATG
(比較対照)		
<i>ACTIN1</i>	forward	TGGTCGTACCACAGGTATTG
	reverse	CCACATCTGCTGGAATGTGCTG
<i>OsAPT1</i>	forward	ATTCATTTTTGGTCCGCCC
	reverse	CCCAAATAACTCATGTGCCTAC
定量的RT-PCR解析		
<i>MFO1</i>	forward	AGAGAAAGACGCAACTGATGATGG
	reverse	AGGCTTGCTGCATGGCTCTG
<i>OsMADS17</i>	forward	TTCGCCGGAAGGAACGCCAG
	reverse	AGAGTACCACCGGATAGGGGAG
(比較対照)		
<i>OsUBQ</i>	forward	CACCCTGGCTGACTACAACA
	reverse	TTCTTCTTGCGGCAGTTGAC

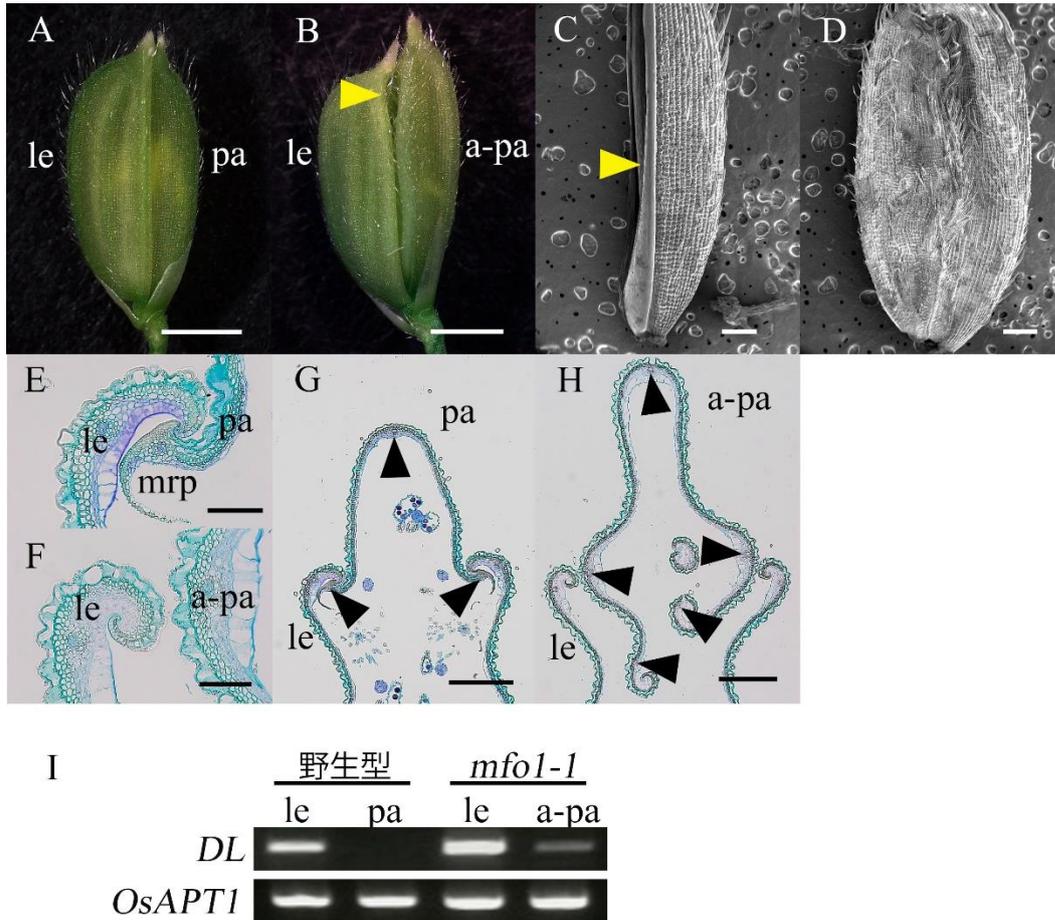


図 2 - 2 *mfo1-1* の内穎の表現型

(A) 野生型の小花

(B) *mfo1-1* の小花

黄色の矢尻は外穎と内穎の間に生じた隙間を示す.

(C) 野生型の内穎の SEM 写真

黄色の矢尻は内穎周縁部を示す.

(D) *mfo1-1* の内穎の SEM 写真

(E) 野生型の内外穎の鉤合部分の横断切片

(F) *mfo1-1* の内穎と外穎が重なる部分の横断切片

(G) 野生型の内穎の横断切片

(H) *mfo1-1* の内穎の横断切片

(G)(H)の黒色の矢尻は維管束を示す.

(I) 野生型と *mfo1-1* の外穎および内穎における *DL* の発現比較 (RT-PCR 解析)

PCR 反応は全て 30 サイクルで行った.

略語 a-pa : *mfo1-1* の異常な内穎, le : 外穎, mrp : 内穎周縁部, pa : 内穎

Scale bar = 2 mm (A, B), 500  $\mu$ m (C, D), 100  $\mu$ m (E, F), 400  $\mu$ m (G, H)

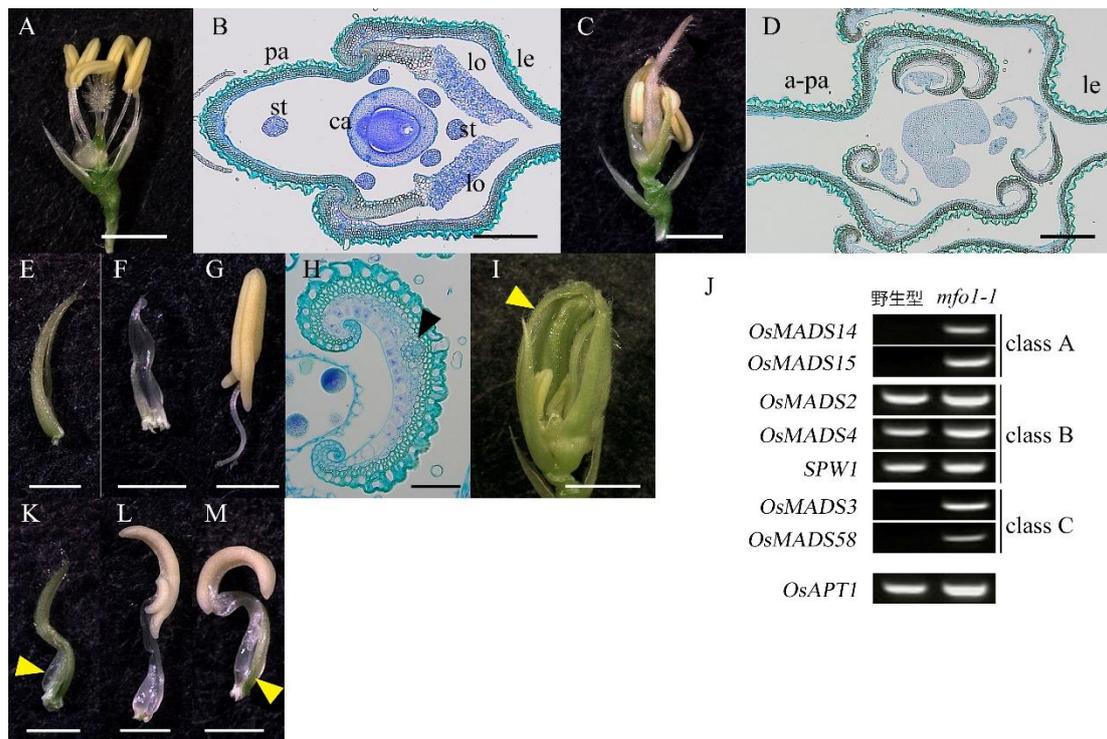


図 2 - 3 *mfo1-1* の whorl 2 および whorl 3 に形成された器官

- (A) 外穎および内穎を取り除いた野生型の穎花
- (B) 野生型の穎花の横断切片
- (C) 外穎および内穎を取り除いた *mfo1-1* の穎花
- (D) *mfo1-1* の小花の横断切片
- (E) *mfo1-1* の穎状器官
- (F) *mfo1-1* の伸長鱗被
- (G) *mfo1-1* の雄蕊
- (H) *mfo1-1* の穎状器官の横断切片
- (I) 大型化した *mfo1-1* の穎状器官

黄色の矢尻は大型化した穎状器官を示す。

- (J) 野生型の鱗被と *mfo1-1* の伸長鱗被におけるクラス A, B, C 遺伝子の発現比較 (RT-PCR 解析)

PCR 反応は全て 30 サイクルで行った.

(K) *mfo1-1* の穎状器官と伸長鱗被のモザイク器官

黄色の矢尻は伸長鱗被の組織を示す.

(L) *mfo1-1* の伸長鱗被と雄蕊のモザイク器官

(M) *mfo1-1* の穎状器官, 伸長鱗被および雄蕊の全ての組織を持つモザイク器官

黄色の矢尻は穎状器官の組織を示す.

略語 a-pa : *mfo1-1* の異常な内穎, ca : 子房, le : 外穎, lo : 鱗被, pa : 内穎, st : 雄蕊

Scale bar = 2 mm (A, C, I), 400  $\mu$ m (B, D), 1 mm (E, F, G, K, L, M), 100

$\mu$ m (H)

表 2 - 2 *mfo1-1* および *mfo1-2* の各花器官数

	穎状器官	穎状器官 + 伸長鱗被 (モザイク器官)	鱗被	伸長鱗被	雄蕊	伸長鱗被 + 雄蕊 (モザイク器官)	穎状器官 + 伸長鱗被 + 雄蕊 (モザイク器官)
野生型	—	—	2.0 ± 0.0	—	6.0 ± 0.0	—	—
<i>mfo1-1</i>	2.8 ± 1.1 (100.0%)	0.6 ± 0.6 (59.3%)	—	0.7 ± 0.9 (44.4%)	1.6 ± 1.0 (92.6%)	1.5 ± 1.2 (74.1%)	0.3 ± 0.4 (25.9%)
<i>mfo1-2</i>	—	0.3 ± 0.5 (30.2%)	—	3.6 ± 0.9 (100.0%)	5.7 ± 0.6 (100.0%)	0.1 ± 0.4 (12.8%)	—

平均値 ± S.D.

調査穎花数は *mfo1-1* は 27, *mfo1-2* は 172.

器官数の下部に記載したパーセンテージはその器官が観察された穎花の割合を示す.

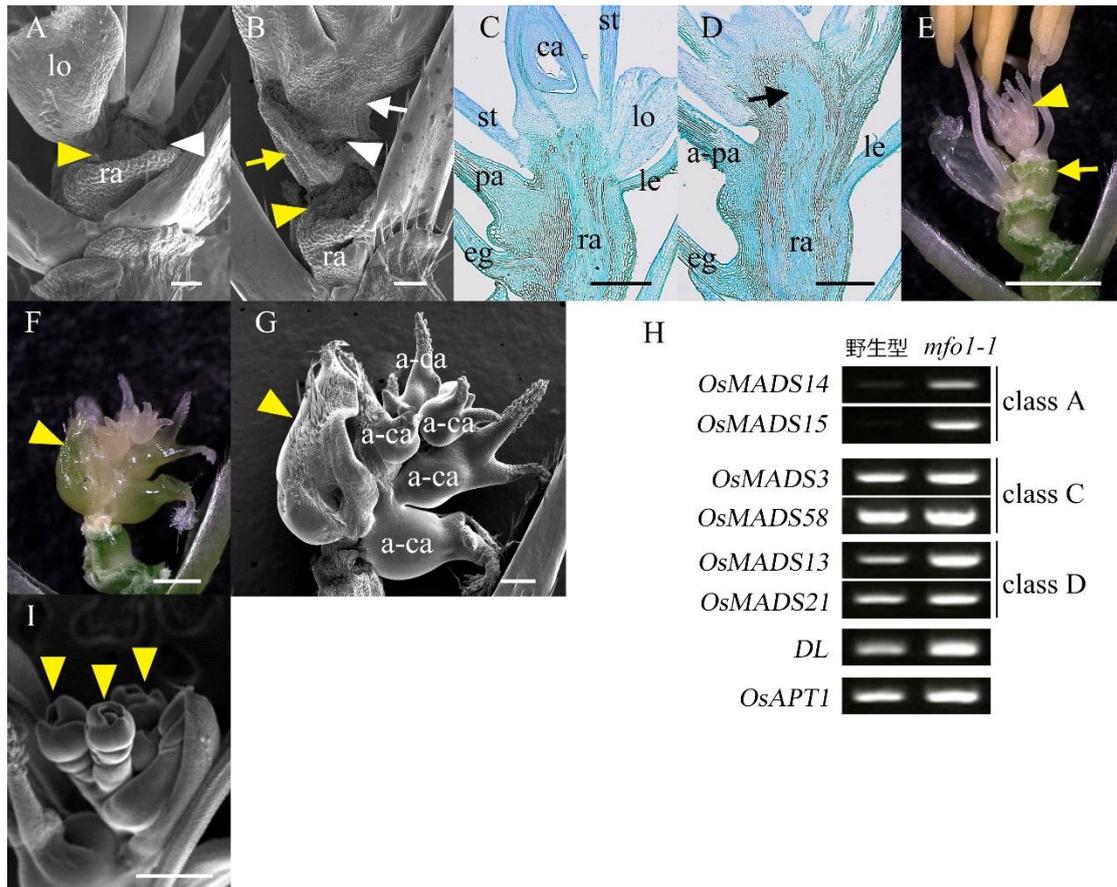


図 2 - 4 *mfo1-1* の軸状の構造

(A) 野生型の穎花の外穎と内穎の着生部

黄色の矢尻は外穎の着生位置を，白色の矢尻は内穎の着生位置を示す。

(B) *mfo1-1* の穎花の外穎と内穎の着生部

黄色の矢尻は外穎の着生位置を，黄色の矢印は外穎形成後に形成された軸状の構造を示す。

白色の矢尻は外穎の着生位置を，白色の矢印は外穎形成後に形成された軸状の構造を示す。

(C) 野生型の穎花の縦断切片

(D) *mfo1-1* の穎花の縦断切片

黒色の矢印は小穂軸から連続した軸状の構造を示す。

(E) *mfo1-1* の花器官形成後に再度形成された軸状構造と異常な雌蕊

黄色の矢印は雄蕊が形成された後に再度形成された軸状の構造を示す。

黄色の矢尻は未成熟で柱頭が異常に増加した雌蕊を示す.

(F) *mfo1-1* の whorl 4 に形成された穎状器官に覆われた異常な雌蕊が連続した構造

黄色の矢尻は連続した雌蕊を覆う穎状の器官を示す.

(G) (F) の SEM 写真

黄色の矢尻は連続した雌蕊を覆う穎状の器官を示す.

(H) *mfo1-1* の whorl 4 に形成された器官におけるクラス A, C, D 遺伝子と *DL* の発現解析

(RT-PCR 解析)

PCR 反応は全て 30 サイクルで行った.

(I) *mfo1-1* の whorl 4 に形成された新たな小穂

黄色の矢尻は新たに形成された小穂を示す.

略語 a-ca : *mfo1-1* の異常な子房, a-pa : *mfo1-1* の異常な内穎, ca : 子房, eg : 護穎,

le : 外穎, lo : 鱗被, pa : 内穎, ra : 小穂軸, st : 雄蕊

Scale bar = 142  $\mu\text{m}$  (A, B), 400  $\mu\text{m}$  (C, D), 1 mm (E, F), 200  $\mu\text{m}$  (G), 333  $\mu\text{m}$

(I)

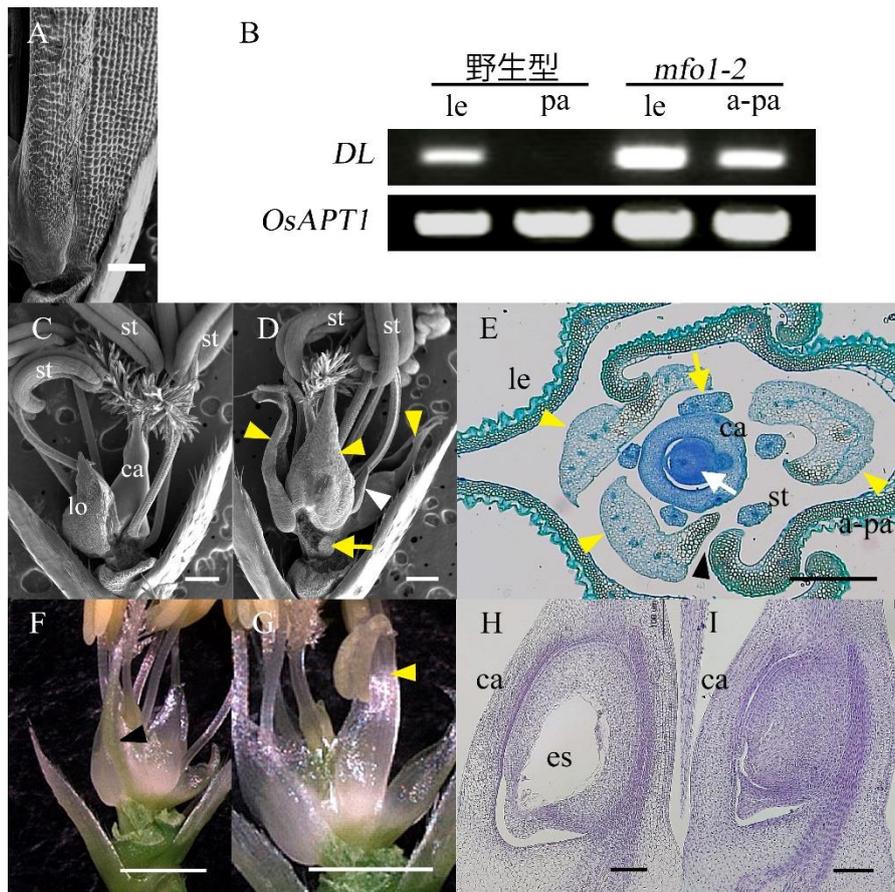


図 2 - 5 *mfo1-2* の表現型

(A) *mfo1-2* の内穎周縁部が失われた内穎

(B) 野生型と *mfo1-2* の外穎および内穎における *DL* の発現比較 (RT-PCR 解析)

PCR 反応は全て 30 サイクルで行った。

(C) 野生型の穎花の SEM 写真

外穎と内穎は取り除いてある。

(D) *mfo1-2* の穎花の SEM 写真

外穎と内穎は取り除いてある。黄色の矢印は外穎形成後に形成された軸状の構造を示す。黄色の矢尻は *mfo1-2* の異常な鱗被のうち、大型化しているものを示す。白色の矢尻は *mfo1-2* の異常な鱗被のうち、小型のものを示す。

(E) *mfo1-2* の穎花の横断切片

黄色の矢尻は *mfo1-2* の異常な鱗被を示す。黒色の矢尻は *mfo1-2* の内穎と鱗被が分離して形成されたことによって生じた隙間を示す。黄色の矢印は 2 本の雄蕊（花糸部分）が融合した器官を示す。白色の矢印は胚嚢が異常な細胞の増殖で塞がれた胚珠を示す。

(F) 緑色の構造が一部に形成された *mfo1-2* の伸長鱗被

黒色の矢尻は伸長鱗被の一部に形成された緑色の構造を示す。

(G) *mfo1-2* の鱗被と雄蕊のモザイク器官

黄色の矢尻は鱗被と雄蕊のモザイク器官を示す。

(H) 野生型の子房（胚珠）の縦断切片

(I) *mfo1-2* の子房（胚珠）の縦断切片

略語 a-pa : *mfo1-2* の異常な内穎, ca : 子房, es : 胚嚢, le : 外穎, st : 雄蕊

Scale bar = 333  $\mu$ m (A, C, D), 400  $\mu$ m (E), 1 mm (F, G), 100  $\mu$ m (H, I)

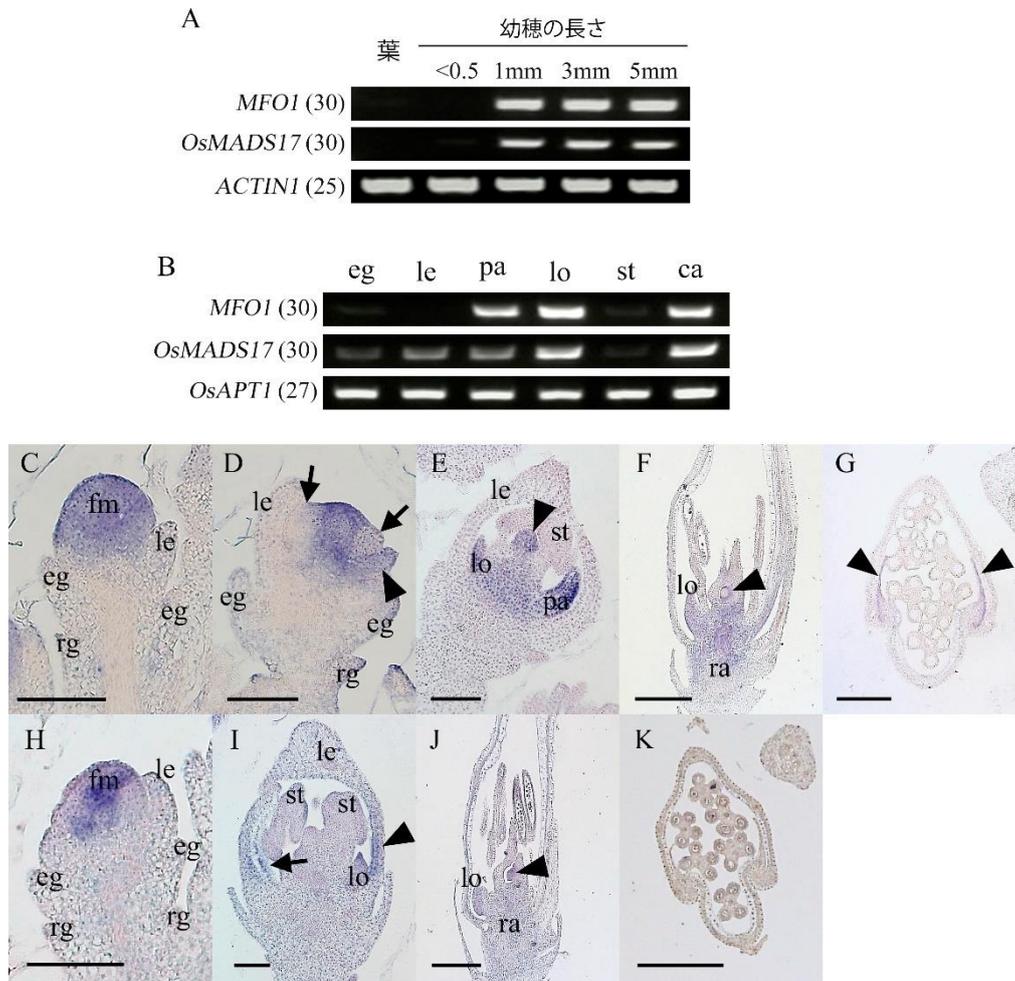


図2-6 *MFO1* および *OsMADS17* の発現パターン

(A) 幼穂形成初期における *MFO1* と *OsMADS17* の発現解析 (RT-PCR 解析)

括弧内の数字は PCR 反応のサイクル数を示す。

(B) 小穂, 小花の各器官における *MFO1* と *OsMADS17* の発現解析 (RT-PCR 解析)

括弧内の数字は PCR 反応のサイクル数を示す。

(C) 外穎原基分化後の穎花における *MFO1* の発現 (*in situ* ハイブリダイゼーション実験)

(D) 雄蕊原基分化後の穎花における *MFO1* の発現 (*in situ* ハイブリダイゼーション実験)

黒色の矢尻は内穎原基を示す。黒色の矢印は雄蕊原基の位置を示す。

(E) 心皮原基分化後の *MFO1* の発現 (*in situ* ハイブリダイゼーション実験)

黒色の矢尻は心皮原基を示す。

(F) 胚珠分化時の *MFO1* の発現 (*in situ* ハイブリダイゼーション実験)

黒色の矢尻は胚珠の珠皮部分を示す。

(G) 胚珠分化時の *MFO1* の発現 (*in situ* ハイブリダイゼーション実験・穎花の横断切片)

黒色の矢尻は内穎周縁部を示す。

(H) 外穎原基分化後の穎花における *OsMADS17* の発現 (*in situ* ハイブリダイゼーション実験)

(I) 心皮原基分化後の *OsMADS17* の発現 (*in situ* ハイブリダイゼーション実験)

黒色の矢尻は外穎での発現部位，黒色の矢印は内穎を示す。

(J) 胚珠分化時の *OsMADS17* の発現 (*in situ* ハイブリダイゼーション実験)

黒色の矢尻は胚珠を示す。

(K) 胚珠分化時の *OsMADS17* の発現 (*in situ* ハイブリダイゼーション実験・穎花の横断切片)

略語 ca : 子房, eg : 護穎, fm : 小花分裂組織, le : 外穎, lo : 鱗被, pa : 内穎, ra : 小穂軸, rg : 副護穎, st : 雄蕊

Scale bar = 100  $\mu$ m (C, D, E, H, I), 400  $\mu$ m (F, J), 200  $\mu$ m (G, K)

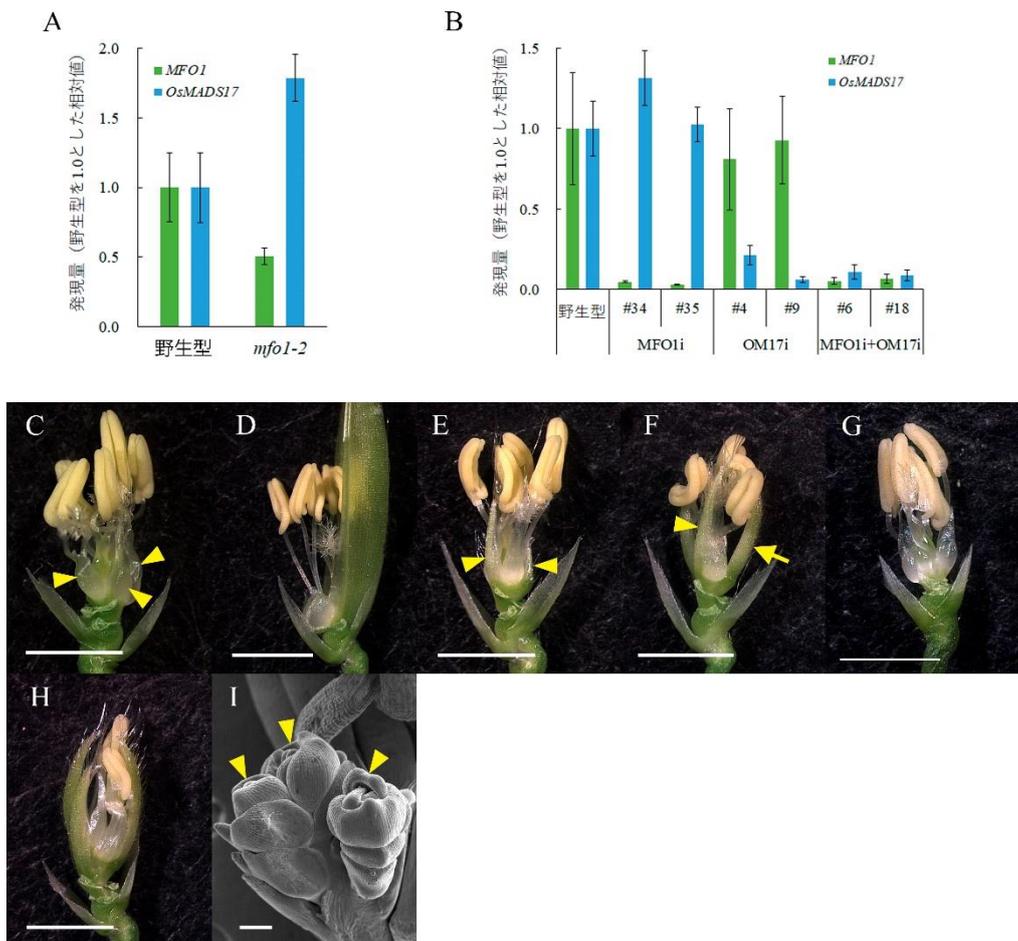


図2-7 *MFO1*と*OsMADS17*のノックダウン組換え体の表現型

(A) *mfo1-2*の穎花における *MFO1*と *OsMADS17*の発現量 (定量的 RT-PCR 解析)

(B) *MFO1i*, *OM17i*, *MFO1i+OM17i*の各系統の穎花における *MFO1*と *OsMADS17*の発現量 (定量的 RT-PCR 解析)

各系統とも2個体の穎花について解析を行った。横軸下の番号は供試した個体の識別番号を示す。

(C) 外穎および内穎を取り除いた *MFO1i*の穎花

黄色の矢尻は伸長鱗被を示す。

(D) 外穎を取り除いた *OM17i*の穎花

(E) 外穎および内穎を取り除いた *MFO1i+OM17i*の穎花

黄色の矢尻は伸長鱗被に生じた穎状の部分を示す。

(F) 外穎および内穎を取り除いた MFO1i : *mfo1-2* の穎花

黄色の矢尻は伸長鱗被に生じた穎状の部分を示す. 黄色の矢印は *mfo1-1* のものと同様の穎状器官を示す.

(G) 外穎および内穎を取り除いた OM17i : *mfo1-2* の穎花

(H) 外穎および内穎を取り除いた MFO1i+OM17i : *mfo1-2* の穎花

(I) MFO1i+OM17i : *mfo1-2* の穎花の whorl 4 に形成された新たな小穂

黄色の矢尻は新たに形成された小穂を示す.

Scale bar = 2 mm (C, D, E, F, G, H), 100  $\mu$ m (I)

### 第3章 イネ閉花受粉性突然変異体 *superwoman1-cleistogamy1* の閉花受粉性が農業形質に与える影響とその交雑抑制能力の検証

イネの鱗被の形成に関わる MADS-box 遺伝子には第2章で解析を行った *MFO1* の他に、クラス B 遺伝子の *SUPERWOMAN1* (*SPW1*) が存在する。この遺伝子は鱗被に加えて雄蕊のアイデンティティ決定に関与する (Nagasawa *et al.* 2003) ため、その機能欠損変異体 (例えば *spw1-1*) は鱗被形成不全とともに雄蕊形成不全を引き起こして不稔となるが、Yoshida *et al.* (2007) は *spw1* 変異体の新規アレルである *superwoman1-cleistogamy1* (*spw1-cls1*) が稔性を維持した閉花受粉性であることを報告した。この変異体では *SPW1* 内に 1 塩基置換が生じ、これにより転写産物である SPW1 タンパク質の MADS ドメイン内の 45 番目のイソロイシンがスレオニンへと置換されている (I45T)。*SPW1* は同じくクラス B に分類される *OsMADS2*, または *OsMADS4* の転写産物と二量体を形成することで鱗被および雄蕊の形態形成に関する機能を発揮する (Yoshida *et al.* 2007) が、*SPW1*<sup>I45T</sup> のアミノ酸置換はこのタンパク質間相互作用に関与する部位 (Norman *et al.* 1988, Han *et al.* 2003) にあり、Yoshida *et al.* (2007) は酵母ツーハイブリッドシステムを使用した実験により実際に *SPW1*<sup>I45T</sup> とパートナータンパク質 (*OSMADS2* および *OSMADS4*) との相互作用能が低下していることを明らかにした。この相互作用能の低下により *spw1-cls1* の鱗被はその正常なアイデンティティを維持することが出来ず、内穎の内穎周縁部に似た器官へと変化する。この変化した鱗被には膨潤する能力が無いいため、*spw1-cls1* の穎花は出穂後に開くことがない。一方で、低下したタンパク質間相互作用の下でも雄蕊の形成は正常に行われ、雄性不稔は示さない。*spw1-cls1* は鱗被にのみ変異の影響が現れる、*spw1* 変異体の中では非常にマイルドな表現型のアレルである。

Yoshida *et al.* (2007) は、*spw1-cls1* と対照系統との生育や収量関連形質に差は無く、この突然変異がイネにおける初めての実用的な閉花受粉性であるとした。しかしその試験で

は調査個体数および実験回数が限られたものとなっており，この変異を実際の品種に導入して使用可能かを検討するには追加のデータが必要と考えられる．このため本章では *spw1-clsl* を 5 年間にわたって試験栽培し，その閉花受粉性の農業形質への影響を追加調査した．加えて，既存の飼料イネ品種への *spw1-clsl* 変異導入による閉花受粉性付与を試み，作出した系統についても 2 年間の試験栽培と各種形質の確認を行って閉花受粉性の影響を調査した．さらに，Yoshida *et al.* (2007) では検証されなかった閉花受粉性による交雑抑制能力の効果を確認するため，野外での自然交雑試験を 2 年間行った．これらの結果から *spw1-clsl* 変異による閉花受粉性の実用性について評価した．

### 3-1 材料および方法

#### 供試系統・品種と栽培方法

閉花受粉性イネ突然変異体 *spw1-clsl* はイネ品種「台中 65 号」を MNU で変異処理した集団の後代から選抜された (Yoshida *et al.* 2007). この *spw1-clsl* と元品種「台中 65 号」を供試した栽培試験を, 2006 年から 2010 年まで農研機構中央農業総合研究センター北陸研究センター (現農研機構中央農業研究センター北陸研究拠点, 新潟県上越市) の実験水田にて行い, 各種農業形質を調査した. また, 飼料イネ品種「夢あおば」を反復親とした連続戻し交配と DNA マーカー選抜により, *spw1-clsl* 変異を持つ「夢あおば *cls1*」を作出し (作出に使用した DNA マーカーについては後述), 2009 年と 2010 年に「夢あおば *cls1*」と「夢あおば」を供試した栽培試験を行った. 使用した「夢あおば *cls1*」は, 2009 年は BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> 世代, 2010 年は BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> 世代であった. 栽培はいずれの年も 4 月中旬に播種, 5 月中旬に条間 30 cm, 株間 15 cm で移植し, 登熟が完了した 10 月初旬に収穫した. 施肥量は元肥として 10 a あたり堆肥 700 kg, 化成肥料 (尿素化成特 45 号, JA 東日本くみあい飼料株式会社) 4 kg を施肥し, 追肥は行わなかった.

自然交雑試験には, 花粉親系統として *spw1-clsl* と「台中 65 号」を使用し, 種子親系統には試験地でこれらと出穂期が重複する日本型の糯性品種「らいちょうもち」(2008 年と 2010 年) と「カグラモチ」(2008 年) を使用した.

#### 農業形質の調査方法

各系統の出穂期は, 系統内の各個体の最初の穂が出穂した日の平均値とした. また, 播種日を第 1 日とした出穂までの日数を各個体の到穂日数とした. 最長稈長は立毛状態で地際から最長稈の穂首節までを, 最長穂長は各個体の最長穂の穂首節から先端までをそれぞれ計測した. 最長穂粒数は各個体の最長穂の粒数を計測した. 登熟歩合は, 最長穂から脱穀・籾摺りをして得た玄米のうち 1.8 mm の篩で選別した精玄米数を, 最長穂の全粒数で除して

計算した。玄米一粒重は、20 粒の平均値として測定した精玄米の粒重から穀粒水分計（ライスタ M, 株式会社ケツト科学研究所）にて測定した水分含量分の重量を計算によって除いて算出した。株あたり玄米収量は、一株穂数、最長穂粒数、登熟歩合、玄米一粒重の調査結果から推定した。

## 統計解析

栽培試験結果の一元配置の分散分析には統計ソフトウェア Statcel（柳井（2011）付属ソフトウェア）を使用した。

## *spw1-cls1* 変異を認識する DNA マーカーの設計と PCR による選抜法

*spw1-cls1* 変異の一塩基置換を認識する dCAPS マーカーを表 3-1 のように設計した。PCR 反応に使用するゲノム DNA 試料は、液体窒素で凍結した葉を 1.5 ml のマイクロチューブに入れ、市販のミキサー（Cap Mix, 3MESPA）とガラスビーズを使用して粉碎したのから、Klimyuk *et al.* (1993) のアルカリ処理および湯煎を行う方法によって抽出した。PCR 反応には、DNA 合成酵素として TaKaRa Taq Hot Start Version, PCR 装置として TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Standard（いずれもタカラバイオ株式会社）を使用した。PCR 条件は、最初に 94°C で 3 分間の前処理を行い、その後増幅反応として熱変性 94°C・30 秒間、アニーリング 60°C・30 秒間、伸長反応 72°C・30 秒間の処理を 35 サイクル行い、最後に 72°C で 7 分間の後処理を行った。PCR 反応液は総量 14  $\mu$ L 中に 0.75 ユニットの DNA 合成酵素、0.2 mM の各 dNTP、各 0.2 mM の Forward 側および Reverse 側のプライマーが含まれる組成とし、これに葉から抽出したゲノム DNA 試料を 1  $\mu$ L 添加して PCR 反応に供した。反応終了後、反応液に 10 ユニットの制限酵素 NcoI (New England Biolabs Japan Inc.) と付属マニュアルにて指定された量の反応バッファーを加え、増幅した DNA を 37°C に設定した恒温器内で 2 時間処理した。制限酵素処理をした反応液は 2.4% アガロース

ゲルの電気泳動によって分離し、エチジウムブロマイドで染色後、UV 照射下で画像データを取得して遺伝子型の判定を行った。

### 自然交雑試験の設計と交雑率の算出方法

自然交雑試験は 2008 年と 2010 年に行った。実験水田内に花粉親系統 49 個体からなる花粉親区を設置し、その四方に種子親系統の 30 個体 (2008 年) あるいは 44 個体 (2010 年) からなる種子親区を 4 カ所配置した (図 3-1)。各系統の個体は条間 15 cm, 株間 15 cm の間隔で移植し、栽培した。花粉親系統および種子親系統の出穂期は、50%出穂期を達観で判定した。種子親系統の登熟後、それぞれの種子親区毎に全ての玄米を収穫し、粳性の系統の花粉が糯性の系統の雌蕊に受粉することで生じる半透明なキセニア粒を目視で選別した。

得られたキセニア粒については Monna *et al.* (2002) の迅速 DNA 調整法を以下の様に改良して DNA 試料を抽出した。2.0 ml のマイクロチューブに各キセニア粒および TPS バッファー (Tris-HCl : 100 mM, EDTA : 10 mM, KCl : 1 M, pH 8.0) 0.4 ml を入れ、破砕機を 2 分間・30 rpm に設定して破砕処理した。その後、それぞれのサンプルを室温で 10 分間遠心分離し、上澄みを新しい 1.5 ml のマイクロチューブに移した。次に 0.4 ml のクロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1 v/v) を加えてよく攪拌し、これを室温で 10 分間遠心分離して沈殿したペレットを 70%エタノールでリンスした後、乾燥させた。DNA は 0.1 ml の 1/10TE バッファー (Tris-HCl : 1 mM, EDTA : 0.1 mM, pH 8.0) に溶解させた。PCR 反応には、DNA 合成酵素として TaKaRa Taq Hot Start Version, PCR 装置として TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Standard (いずれもタカラバイオ株式会社) を使用した。PCR 条件は、最初に 94°C で 2 分間の処理を行い、その後増幅反応として熱変性 94°C・10 秒間、アニーリング 58°C・10 秒間、伸長反応 72°C・30 秒間の処理を 34 サイクル行い、最後に 72°C で 3 分間の処理を行った。PCR 反応液の組成は、総量 10  $\mu$ L 中に 0.25 ユニットの DNA 合成酵素, 0.2 mM の各 dNTP とした。DNA 試料は 5  $\mu$ L を使用した。遺伝子型

の判別用マーカーは、イネのゲノム中の一塩基変異 (SNP) を認識し (Hayashi *et al.* 2004), 「台中 65 号」と他の品種を区別できる SNP マーカーを 5 セット使用した (Tabuchi *et al.* 未発表データ). PCR 反応後の反応液は 2.4% のアガロースゲルによる電気泳動で分離し, 遺伝子型を判定した. 交雑率は, マーカーによる判別で花粉親区からの花粉との交雑によって生じたと確認されたキセニア粒の数を, 目視による調査を行った全玄米数で除して算出した.

### 3-2 結果

#### 受粉、登熟および玄米・精米品質への閉花受粉性の影響

*spw1-clsl* の鱗被 (図 3-2 A) は通常の鱗被のような膨潤する機能が失われているため、*spw1-clsl* の穎花は開花しない。イネは開花時に雄蕊の花糸の伸長に伴って、開いた内外穎の間隙から葯が穎花外へ抽出されるが、開花しない *spw1-clsl* ではこの現象は見られなかった (図 3-2 B)。これ以外の花糸の伸長、葯の裂開、柱頭への花粉の落下等の受粉のプロセスは正常に進み、その後の登熟の過程も野生型と違いはなかった (図 3-2 C)。穎花外に抽出されずに枯死した葯は登熟期間中も穎花内に残留したが、これらは胚乳の発達には影響を与えなかった。登熟完了後も枯死した葯は籾殻の内部に残っていた (図 3-2 D) が、それらは玄米に固着することはなく、籾摺りの段階でそのほとんどが籾殻と共に除去された。さらに精米を行うとこれらの葯は完全に取り除かれたため、*spw1-clsl* の精米は「台中 65 号」の精米と外観上同等の品質となった (図 3-2 E)。

#### 農業形質への閉花受粉性の影響

5 年間の *spw1-clsl* および「台中 65 号」の栽培試験結果を表 3-2 に示す。栽培期間中に、*spw1-clsl* には極端な矮性や初期生育不良、不稔の個体が出現したが、これらは MNU による変異処理時に生じた *spw1-clsl* 変異とは異なる二次変異が分離したものと判断し、データからは除外して解析を行った。

*spw1-clsl* の出穂期は「台中 65 号」のそれと一致するか幾分遅く、到穂日数は「台中 65 号」よりも 0.5 日から 2.5 日長かった。最長稈長は「台中 65 号」に比べて 2006 年と 2008 年は短く、2010 年は長く、2007 年と 2009 年はほぼ同等であった。一株穂数は「台中 65 号」に比べて 2006 年は少なく、2007 年と 2009 年は多く、2008 年と 2010 年はほぼ同じであった。全期間を通して *spw1-clsl* の最長穂長は「台中 65 号」よりも長い傾向にあり、最長穂粒数も「台中 65 号」よりも多い傾向にあったが、登熟歩合と玄米一粒重は「台中 65 号」

よりも劣る傾向にあった。農業形質の調査結果から算出した推定株あたり玄米収量は 2007 年を除いて *spw1-clsl* が「台中 65 号」を下回る結果となったが、その差は大きなものではなかった。2010 年の試験では二次変異によるものと考えられる *spw1-clsl* の異常個体の分離が比較的少なかったことから、そのデータについて一元配置の分散分析による解析を試みた。その結果、到穂日数および一株穂数では *spw1-clsl* と「台中 65 号」の間に有意差は検出されなかった。一方で、*spw1-clsl* は「台中 65 号」に対して最長稈長、最長穂長、最長穂粒数で有意に上回り、登熟歩合、玄米一粒重は有意に下回った。

### ***spw1-clsl* 変異を持つ「夢あおば clsl」の作出とその農業形質**

*spw1-clsl* 変異の有無を識別する dCAPS マーカーによる遺伝子型の判別例を図 3-3A に示す。このマーカーによる選抜と連続戻し交配によって作出した「夢あおば clsl」の鱗被は、*spw1-clsl* のものと同様の形態となり (図 3-3B)、開花は観察されなかった。

「夢あおば clsl」および反復親品種「夢あおば」の栽培試験結果を表 3-3 に示す。「夢あおば clsl」の出穂期は 2 年ともほぼ「夢あおば」と同じであった。最長稈長は「夢あおば」に対して 2009 年は長く、2010 年は短かった。一株穂数は両年とも少なく、最長穂長はほぼ同等であった。最長穂粒数と登熟歩合は 2009 年は「夢あおば」より優ったが、2010 年は逆の結果となった。玄米一粒重は、2 年とも「夢あおば clsl」が「夢あおば」を上回り、*spw1-clsl* と「台中 65 号」の試験結果とは異なった傾向となった。推定株あたり玄米収量は 2009 年は「夢あおば clsl」の方が大きく、2010 年は「夢あおば」の方が大きかった。2 年間のデータをまとめて「夢あおば clsl」と「夢あおば」の試験結果を一元配置の分散分析により解析したところ、一株穂数については「夢あおば」が「夢あおば clsl」を有意に上回り、玄米一粒重は逆に「夢あおば clsl」が「夢あおば」を有意に上回った。その一方で、到穂日数、最長稈長、最長穂長、最長穂粒数、登熟歩合に有意差は見られなかった。有意差の見られない項目数は *spw1-clsl* と「台中 65 号」の比較に比べて増加した。

### *spw1-clsl* の自然交雑試験

交雑試験に使用した花粉親系統と種子親系統の出穂期（50%出穂）の差は、2008年は2～6日、2010年は3～8日となった（表3-4）。一般的にイネの出穂は7～15日間続くことから（星川 1975）、それぞれの系統の出穂期および開花期は十分に重なっていたと考えられる。また試験を行った水田では、花粉親系統と種子親系統の開花期間中は両年とも北風が卓越風となった。

2008年の「らいちょうもち」を種子親、*spw1-clsl*を花粉親とした試験では、種子親の北側区、東側区、南側区、西側区でそれぞれ19粒、14粒、18粒、9粒のキセニア粒が生じた（表3-4）が、品種識別用DNAマーカーを使用した判定の結果、これらは*spw1-clsl*の花粉との交雑から生じたものでは無かった。一方で、「台中65号」を花粉親とした試験では、北側区、東側区、南側区、西側区で13粒、6粒、29粒、7粒のキセニア粒が生じ、このうち3粒、3粒、27粒、5粒が「台中65号」との交雑によるものだった。花粉親系統と種子親系統の交雑率は0.031～0.200%となった。「カグラモチ」を種子親とし、*spw1-clsl*を花粉親とした試験では、北側区、東側区、南側区、西側区で8粒、13粒、8粒、11粒のキセニア粒が生じたが、*spw1-clsl*との交雑によるものは無かった。花粉親を「台中65号」とした場合は北側区、東側区、南側区、西側区で生じた6粒、10粒、20粒、12粒のキセニア粒のうち2粒、7粒、17粒、6粒が「台中65号」との交雑によるものであり、交雑率は0.011～0.107%となった。

2010年に行った試験では全体的に交雑率が低かった。花粉親を*spw1-clsl*とした試験では北側区で1粒のみキセニア粒が見つかったが、これは*spw1-clsl*との交雑により生じたものではなかった。「台中65号」を花粉親とした試験では東側区、南側区、西側区で2粒、4粒、3粒のキセニア粒が発見され、そのうち1粒、4粒、2粒が「台中65号」との交雑によるものであった。交雑率は0.005～0.019%だった。

交雑試験全体を通して、「台中 65 号」を花粉親とした試験では全て花粉親との交雑粒が生じており、特に南側区で交雑率が高くなった。これは、試験中の卓越風が北風だったことが影響していると考えられる。一方で、花粉親として *spw1-clsl* を使用した試験では花粉親との交雑粒が 1 粒も生じることが無く、交雑率が 0.000% となった。

### 3-3 考察

#### *spw1-clt1*の閉花受粉性がイネの収量および品質に与える影響

通常のイネでは葯は開花時に穎花外に抽出され、閉穎後に穎花内に戻ることはない。一方閉花受粉性イネでは、葯は登熟期間を通して穎花内に残留し、そのまま枯死する。このことは、その後に発達する胚乳に対して変形や着色等の好ましくない影響を与える懸念があった。本研究ではこの点について、残留した葯が登熟過程を阻害しないこと（図3-2C, 2D）、玄米や精米に着色等の悪影響を与えないことを明らかにした（図3-2E）。籾殻内の葯は籾摺りと精米の過程で取り除かれるため、除去にあたって特別な処理は必要としない。このことは、*spw1-clt1*変異による閉花受粉性を持つイネの収穫調整作業や米品質が既存の開花する品種・系統と変わらないことを示している。

*spw1-clt1*の農業形質について本研究ではYoshida *et al.* (2007)が行ったものより詳細な調査を行った。これまでに報告されているイネの閉花受粉性変異体のうち、*d7*変異体（長尾・高橋 1954）と*cl7(t)*（Ni *et al.* 2014）は粒形が短くなることが報告されており、これは大きな玄米収量の低下を招く。今回の*spw1-clt1*の試験ではこのような収量性を大きく低下させるような特性は観察されなかった。栽培試験結果から推定した株あたり玄米収量は、*spw1-clt1*は「台中65号」に対して2007年を除いて若干下回る結果となった（表3-2）。その差は大きくはなかったが、登熟歩合および玄米一粒重が「台中65号」よりも劣ったことがこの原因と考えられる。*spw1-clt1*の登熟歩合は、試験期間を通じてあまり安定しなかった。これには*spw1-clt1*の系統内に残存するMNU変異処理時の二次変異が影響している可能性がある。一方で、2010年の試験結果の統計解析から*spw1-clt1*変異は出穂期や穂数に対して影響は無く、また*spw1-clt1*が「台中65号」を上回った穂長や籾数へのネガティブな影響も無いものと考えられる。農業形質への閉花受粉性の影響については、「夢あおば*clt1*」についての項でさらに考察する。

## 既存品種への閉花受粉性導入の可能性

既存品種に *spw1-cls1* 変異による閉花受粉性を新たに付与する場合、その手段は連続戻し交配が一般的となる。この閉花受粉性は劣性の形質である (Yoshida *et al.* 2007) ため、戻し交配後の *spw1-cls1* 変異を持つ個体の選抜には DNA マーカーの利用が効率的である。*spw1-cls1* 変異の一塩基変異の詳細は確認されており、本研究ではこの情報を元に変異を認識する DNA マーカーを作製した。また、飼料イネ品種「夢あおば」を反復親とし、この DNA マーカーと連続戻し交配によって閉花受粉性を示す「夢あおば *cls1*」を作出した。反復親として「夢あおば」を選択したのは、国内では消費者が抵抗感を持つ食用作物よりも飼料用作物の方が GM 品種の普及が見込まれること、近年栽培が増加している飼料イネ品種の中でも「夢あおば」がホールクロップサイレージに適した有望な品種であることによる (三浦ら, 2006)。

「夢あおば *cls1*」は *spw1-cls1* と同様の鱗被の変形が観察され (図 3 - 3B)、また 2 年間の水田での試験栽培で安定した閉花受粉性であったことから、*spw1-cls1* 変異の導入は本研究が示した方法で可能であることが示された。「夢あおば *cls1*」と「夢あおば」の農業形質の比較では、栽培年によって優劣が逆転する項目があったが、2 年間のデータをまとめた統計解析の結果、*spw1-cls1* と「台中 65 号」の比較時よりも多くの項目で有意差が検出されなかった。なお、「夢あおば *cls1*」が「夢あおば」を有意に下回った一株穂数は、*spw1-cls1* と「台中 65 号」の比較では有意差が検出されなかったため、*spw1-cls1* 変異の影響である可能性は小さいと考えられる。また、玄米一粒重については「夢あおば *cls1*」が「夢あおば」を有意に上回ったが、これは *spw1-cls1* / 「台中 65 号」の関係性と逆転しており、このことから *spw1-cls1* 変異が玄米粒重に対してネガティブな影響を持つ可能性も小さいと考えられる。

本実験で使用した「夢あおば *cls1*」の戻し交配の回数は 2 回と多くなく、その遺伝的背景

には *spw1-cla1* から持ち込まれた二次変異を含む領域が比較的まだ多く残存していると予想される。その中で「夢あおば cla1」と「夢あおば」の農業形質が近いものであったことは、*spw1-cla1* 変異の農業形質への影響は無いか、あるとしても実用上許容できる範囲内であることを示唆している。「夢あおば cla1」については戻し交配の回数を増やし、遺伝的背景をより「夢あおば」に揃えた同質遺伝子系統を作出すれば、農業形質はさらに反復親の「夢あおば」近づくであろう。本実験を通して、*spw1-cla1* 変異は連続戻し交配とマーカー選抜によって既存品種の農業形質を損ねることなく導入可能であることが明らかになったと言える。

#### ***spw1-cla1* 変異による閉花受粉性の交雑抑制能力**

本研究で行った自然交雑試験では、*spw1-cla1* 変異による閉花受粉性の交雑抑制能力が明確に示された（表 3-4）。「台中 65 号」を花粉親系統として使用した試験では 2010 年の北側区を除いた全ての試験区で、糯性品種に「台中 65 号」由来の花粉との交雑によるキセニア粒が生じ、特に卓越風の風下にあたる南側区でその数が多かった。しかし、同一の条件下で *spw1-cla1* を花粉親系統とした試験では、全ての区で *spw1-cla1* と糯性品種の交雑が生じなかったことから、閉花受粉性により *spw1-cla1* からの花粉の飛散が抑制されたと考えられた。DNA マーカーによる判定の結果、遺伝子型が台中 65 号型ではないキセニア粒は複数発見されたが、自然交雑試験を行った水田の周囲には様々な品種や系統が栽培されていた他の試験用水田があり、これらからの花粉飛散によりキセニア粒が生じたものと考えられる。また *spw1-cla1* を花粉親系統とした試験区では、「台中 65 号」を花粉親系統とした試験区よりも台中 65 号型以外と判定されたキセニア粒の数が多くなった。これは、*spw1-cla1* を花粉源とした試験区では花粉が飛散せず、周囲の水田の品種・系統由来の花粉と花粉親区からの花粉の受粉の競合が起きなかったためと考えられる。なお実験を行った 2008 年と 2010 年で「台中 65 号」を花粉親系統とした試験区の自然交雑率に違いが見られたが、これ

は気候の年次間変動により 2010 年の「らいちょうもち」の出穂が早まり、「台中 65 号」との出穂期の重複期間が短くなることで、自然交雑率が低下したためと考えられる。

イネの自然交雑率は、花粉親と種子親の距離に近いほど高いことが知られている（佐藤・横谷 2008, 丹野ら 2011）。本実験の設計では花粉親系統と種子親系統は隣接して栽培され、最も近いそれぞれの個体の穂は相互に直接接触することが可能だった。ほぼゼロ距離と言えるこの条件にも関わらず、*spw1-clt1* は種子親系統と交雑することがなかったことから、*spw1-clt1* 変異の閉花受粉性には高い交雑抑制能力があることが示された。

本章では、*spw1-clt1* 変異の閉花受粉性が、農業形質や品種特性に大きな影響を与えないこと、一般的な連続戻し交配と DNA マーカー選抜による方法で既存品種へ導入可能なこと、水田において実際に自然交雑を抑制することができることを示した。これらの *spw1-clt1* 変異の特性は、実用的な閉花受粉性イネ品種を作出する上で非常に好ましいものである。一方で、Yoshida *et al.* (2007) は *spw1-clt1* 変異によるタンパク質の相互作用能の低下が低温で回復することを示しており、これが実際に閉花受粉性に影響を与えるかどうかを確認する必要がある。この点については、引き続き第 4 章で検証する。

表 3 - 1 *spw1-cls1* 変異を認識する DNA マーカーの塩基配列

プライマー名	塩基配列
Forward側プライマー	
cls-dCAPS-f	5'-AGCGGATCGAGAACGCGACC-3'
Reverse側プライマー	
cls-dCAPS-r	5'-GGAAGGGCTGCAGAACTCGTGGTAC- -TTGCCGGTGGAGGAGAACACCATG-3'



図 3 - 1 自然交雑試験の試験区設計

花粉親区は 1 辺 105cm の正方形区画

種子親区の外周は 195cm (2008 年) または 210cm (2010 年)

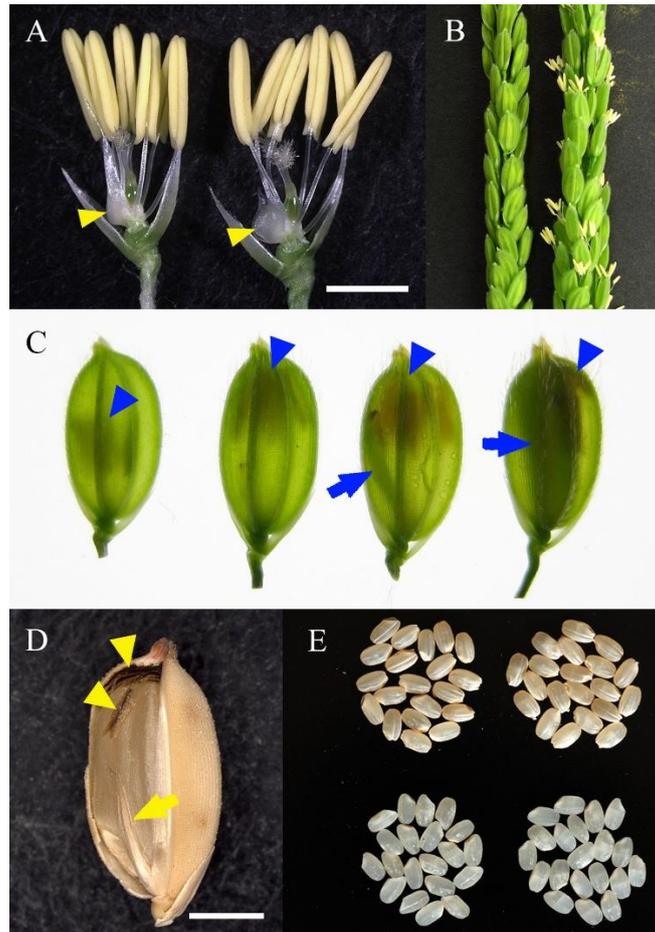


図3-2 *spw1-cla1* の鱗被の形状と閉花受粉による登熟・米品質への影響

(A) *spw1-cla1*(左)と台中 65 号(右)の穎花の比較

内外穎は除去してあり，黄色の矢尻はそれぞれの鱗被を示す。

(B) *spw1-cla1*(左)と台中 65 号(右)の開花期の穂の比較

(C) *spw1-cla1* の閉花受粉と子房の発達の様子

青色の矢尻は葯の位置を，青色の矢印は子房を示す。

(D)登熟が完了した *spw1-cla1* の粃殻の内部

外穎の半分は除去してある．黄色の矢尻は穎花内に残留した葯を，黄色の矢印は伸長した鱗被を示す。

(E) *spw1-cla1*(左)と台中 65 号(右)の玄米(上)と精米(下)の比較

Scale bar = 2.5 mm (A), 2.0 mm (D)

表3-2 spw1-clslと「台中65号」の農業形質

系統名	n	出穂期	到穂日数 (日)	最長稈長 (cm)	一株穂数 (本)	最長穂長 (cm)	最長穂粒数 (粒)	登熟歩合 (%)	玄米一粒重 (mg)	推定株あたり 玄米収量 (g)
2006年										
spw1-clsl	135	8/13	119.1 ± 2.22	87.1 ± 4.98	8.7 ± 2.68	22.6 ± 1.22	116.3 ± 17.16	77.1 ± 13.90	19.0 ± 0.70	14.9
台中65号	45	8/10	116.7 ± 2.09	88.2 ± 3.73	9.1 ± 1.30	22.4 ± 0.82	100.4 ± 14.08	86.6 ± 9.49	21.4 ± 1.41	17.0
2007年										
spw1-clsl	25	8/11	118.8 ± 1.52	90.3 ± 4.14	11.7 ± 3.11	23.1 ± 1.04	134.6 ± 14.02	83.4 ± 8.30	19.9 ± 0.57	26.0
台中65号	60	8/9	116.8 ± 1.75	90.3 ± 3.59	9.8 ± 1.58	22.1 ± 0.90	97.2 ± 13.88	88.7 ± 7.26	21.8 ± 1.16	18.3
2008年										
spw1-clsl	243	8/15	117.6 ± 2.33	95.6 ± 5.60	10.2 ± 2.39	23.1 ± 1.19	118.6 ± 15.65	77.6 ± 4.74	20.3 ± 0.66	19.1
台中65号	40	8/14	116.7 ± 2.57	98.4 ± 3.87	10.4 ± 2.18	22.4 ± 0.95	106.3 ± 16.50	86.2 ± 5.50	23.4 ± 1.12	22.2
2009年										
spw1-clsl	102	8/15	119.0 ± 1.76	99.1 ± 4.31	10.5 ± 1.94	23.0 ± 1.00	119.6 ± 12.89	80.2 ± 4.65	20.6 ± 0.52	20.9
台中65号	40	8/13	116.5 ± 1.96	99.3 ± 2.88	9.8 ± 2.16	21.5 ± 1.20	106.8 ± 17.25	91.2 ± 6.12	22.6 ± 1.06	21.5
2010年										
spw1-clsl	41	8/10	115.0 ± 1.72	89.8 ± 2.49	8.7 ± 1.65	22.9 ± 1.07	105.1 ± 12.71	76.7 ± 4.90	19.7 ± 0.59	13.7
台中65号	40	8/10	114.4 ± 2.19	86.4 ± 2.83	8.8 ± 1.79	21.8 ± 1.01	91.8 ± 14.96	92.5 ± 2.94	20.5 ± 0.81	15.3
			n.s.	**	n.s.	**	**	**	**	**

平均値 ± S.D.

推定株あたり玄米収量 = 一株穂数 × 最長穂粒数 × 登熟歩合 × 玄米一粒重.

n.s.: 一元配置の分散分析により有意差が無い.

\*\* : 一元配置の分散分析により1%水準で有意差がある.

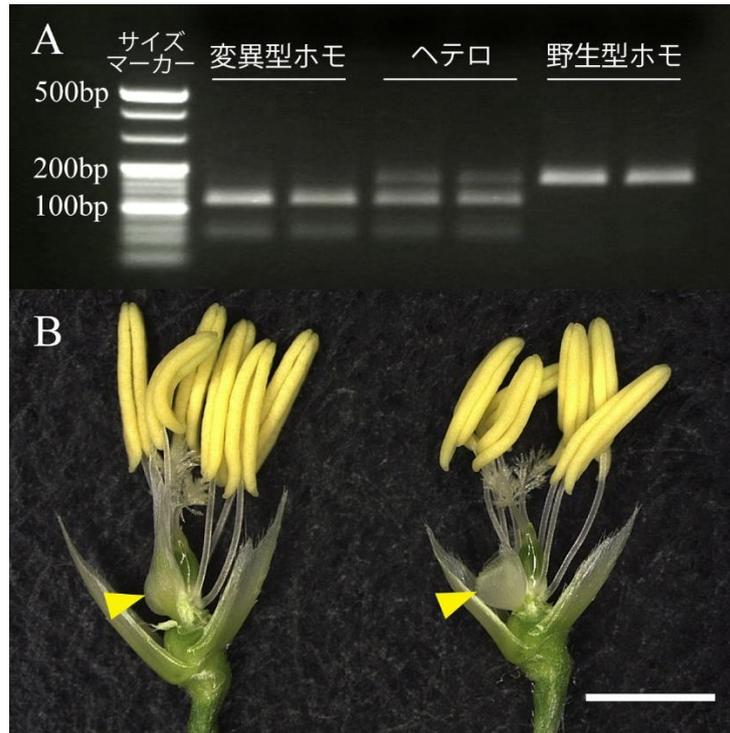


図3-3 *spw1-cls1* 変異を認識する DNA マーカーと「夢あおば cls1」の穎花

(A) *spw1-cls1* 変異を認識する dCAPS マーカーによる判定例

変異型ホモの場合は 109bp と 48bp の長さの産物が増幅され、野生型ホモの場合は 157bp の長さの産物のみが増幅される。ヘテロの場合は 3 種類すべてのバンドが観察される。

(B) 夢あおば cls1 (左)と夢あおば (右)の穎花

内外穎は除去してあり、黄色の矢尻はそれぞれの鱗被を示す。

Scale bar=2.0 mm

表 3 - 3 「夢あおおばcls1」と「夢あおおば」の農業形質

系統名	n=	出穂期	到穂日数 (日)	最長稈長 (cm)	一株穂数 (本)	最長穂長 (cm)	最長穂粒数 (粒)	登熟歩合 (%)	玄米一粒重 (mg)	推定株あたり 玄米収量 (g)
2009年										
夢あおおばcls1 (BC <sub>3</sub> F <sub>3</sub> )	40	8/6	109.1 ± 1.88	81.6 ± 3.37	7.7 ± 1.82	20.3 ± 1.10	148.7 ± 26.06	84.4 ± 7.04	25.0 ± 0.72	24.1
夢あおおば	36	8/6	109.4 ± 1.50	76.9 ± 2.57	8.6 ± 1.50	20.2 ± 0.90	139.3 ± 23.22	81.3 ± 15.42	23.7 ± 1.10	23.1
2010年										
夢あおおばcls1 (BC <sub>3</sub> F <sub>3</sub> )	40	8/2	106.2 ± 1.45	67.7 ± 1.98	6.5 ± 0.72	22.2 ± 0.98	159.7 ± 19.39	81.6 ± 6.73	22.9 ± 0.95	19.4
夢あおおば	36	8/1	105.7 ± 1.32	70.4 ± 3.26	7.2 ± 0.92	22.2 ± 1.28	170.2 ± 25.67	88.7 ± 3.72	21.9 ± 0.64	23.8
系統間差(2009-2010年)			n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	

平均値 ± S.D.

推定株あたり玄米収量=一株穂数×最長穂粒数×登熟歩合×玄米一粒重.

n.s.: 一元配置の分散分析により有意差が無い.

\*\* : 一元配置の分散分析により1%水準で有意差がある.

表 3-4 自然交雑試験で観測されたキセニア粒数と自然交雑率

花粉親 (出穂期 <sup>1)</sup> )	種子親 (出穂期)	試験区	供試玄米数	キセニア粒数	遺伝子型別内訳		花粉親との 自然交雑率 <sup>2)</sup> (%)
					台中65号型	それ以外	
2008年							
<i>spw1-clt</i> (8/11)	らいちょうもち (8/7)	北側区	14,727	19	0	19	0.000
		東側区	13,018	14	0	14	0.000
		南側区	18,186	18	0	18	0.000
		西側区	14,906	9	0	9	0.000
台中65号 (8/10)	らいちょうもち (8/7)	北側区	8,593	13	3	10	0.035
		東側区	9,764	6	3	3	0.031
		南側区	13,468	29	27	2	0.200
		西側区	9,629	7	5	2	0.052
<i>spw1-clt</i> (8/7)	カグラモチ (8/5)	北側区	14,150	8	0	8	0.000
		東側区	15,470	13	0	13	0.000
		南側区	10,212	8	0	8	0.000
		西側区	13,449	11	0	11	0.000
台中65号 (8/11)	カグラモチ (8/5)	北側区	18,378	6	2	4	0.011
		東側区	17,110	10	7	3	0.041
		南側区	15,822	20	17	3	0.107
		西側区	15,168	12	6	6	0.040
2010年							
<i>spw1-clt</i> (8/5)	らいちょうもち (8/2)	北側区	20,302	1	0	1	0.000
		東側区	22,727	0	0	0	0.000
		南側区	18,634	0	0	0	0.000
		西側区	20,672	0	0	0	0.000
台中65号 (8/9)	らいちょうもち (8/1)	北側区	20,345	0	0	0	0.000
		東側区	21,635	2	1	1	0.005
		南側区	20,644	4	4	0	0.019
		西側区	20,246	3	2	1	0.010

<sup>1)</sup>出穂期は各系統の50%出穂の日付。

<sup>2)</sup>交雑率(%)=台中65号型の遺伝子型を示した玄米数/供試した全玄米数×100。

#### 第4章 *superwoman1-cleistogamy1*変異による閉花受粉性の温度感受性の解析

Yoshida *et al.* (2007) は、酵母ツーハイブリッドシステムを使用した実験によって *spw1-cls1* の閉花受粉性の原因となる SPW1<sup>I45T</sup> のパートナータンパク質との相互作用能の低下を見出した際に、反応温度を低下させると相互作用能が回復する現象も発見した。しかし、この *in vitro* 実験におけるタンパク質の挙動の変化が、実際の *spw1-cls1* の閉花受粉性に影響を与えるかどうかは確認されていなかった。*spw1-cls1* を交雑抑制の目的で使用する場合、閉花受粉性の安定性は極めて重要なポイントとなる。そこで本章では、国内各地の様々な気候条件下や人工的に制御された温度環境下で *spw1-cls1* の栽培実験を行い、開花の有無と鱗被の表現型の変化を調査した。また、*spw1-cls1* の出穂前の様々な時期に異なるパターンの温度処理を行い、これに対する閉花受粉性の反応を明らかにすることを試みた。これらの結果から *spw1-cls1* の閉花受粉性の温度感受性について考察する。

## 4-1 材料および方法

### 供試系統・品種

栽培試験には閉花受粉性イネ突然変異体 *spw1-clsl* を使用した。また、野生型の鱗被の観察には元品種である「台中 65 号」を使用した。

### 国内各地における *spw1-clsl* の開花頻度と鱗被形態

*spw1-clsl* の栽培を行った試験地を図 4-1 に示す。2009 年は 8 か所全てで栽培試験を行い、2010 年は札幌、つくば、上越、福山の 4 か所で再度試験を行った。各試験地における *spw1-clsl* の開花頻度は「A (ほぼ全ての穎花が開花する)」、「B (半数前後の穎花が開花する)」、「C (少数の穎花のみ開花する)」、「N (まったく開花しない)」の 4 段階で達観により判定した。判定は *spw1-clsl* の出穂期 (50%出穂) の 2~3 日後に行った。出穂期前 30 日間の平均気温 (30MT) は各試験地に設置された気象観測機器の観測データから算出した。なお大仙のみ試験地から約 200 m の地点にある気象庁の大曲アメダスポイントの日平均気温データを使用した。

各試験地の *spw1-clsl* の鱗被の形態観察には出穂直前の穂から収集した穎花を供試し、走査型電子顕微鏡 (VE-8000, 株式会社キーエンス) で観察した。

### 人工的な温度環境下での *spw1-clsl* の閉花受粉性の温度感受性の解析

#### 栽培方法

幼穂形成のタイミングや穂の発達ステージを斉一化するため、円形 20 粒播き栽培法 (佐竹 1972) を行った。*spw1-clsl* 種子 20 粒を 1/5000a ワグネルポットに円形に播種し、分けつを切除して主稈のみを栽培した。栽培は長日条件とした温室内で開始し、各個体の葉齢が 12.0 前後に達した後、12 時間日長の短日処理を行った。ポット内の 1 個体について幼穂形成を確認 (図 4-2) した後、各ポットを後述の実験 1~3 に供試した。

第3章で行った栽培試験において、*spw1-clsl* の維持系統内に二次変異が残存する可能性が明らかになった。そこで *spw1-clsl* の遺伝的な不均一性の影響を極力除くため、各実験では1個体から得られた種子セットを使用した。それでもポット中に生育の悪い個体、あるいは出穂がそのポットの平均から大きく異なった個体が生じた場合は解析から除外した。

## 温度処理

### 実験1：温度による *spw1-clsl* の鱗被の形態および内部構造の変化

4台のグロースキャビネット（MLR-350HT または MLR-350，三洋電機株式会社）をそれぞれ 30°C/25°C（明期（12時間）/暗期（12時間），以下同じ），30°C/20°C，25°C/20°C，20°C/20°C に設定し（表4-1），*spw1-clsl* のポット 2 つずつを内部に設置して，幼穂形成期初期から 3 週間温度処理を行った。その後ポットを温室へ戻し，各個体の出穂直前の穂から穎花を採集した。穎花は外穎を取り除いて鱗被を露出させ，その基部から頂端までの長さ（鱗被長）をデジタルノギス（CD-15PSX，株式会社ミットヨ）を使用して測定した。

穎花の横断切片試料は第2章と同様の方法で処理し，観察した。

### 実験2：*spw1-clsl* の閉花受粉性が温度感受性となる時期の推定

事前の予備実験では，*spw1-clsl* の幼穂形成開始から出穂までの期間は約 4 週間であった（データ省略）。そこでこの期間を 7 日間ずつに分け，それぞれ I 期，II 期，III 期，IV 期とした。次に，2 室の人工気象室（特注仕様，Construction No. K31-6389，株式会社小糸製作所）を 30°C/25°C（通常温度室）と 24°C/20°C（低温室）に設定し，2 室の間で *spw1-clsl* のポットを移動させることで 12 通りのスケジュールの低温処理（表4-2）を行った。各処理スケジュールの名称は低温処理が行われるタイミングとした。例えば，LT-I では I 期のみポットを低温室内に置いて低温処理し，II~IV 期は通常温度室で栽培した。LT-I+III

ではポットを I 期と III 期に低温室に置き、II 期と IV 期は通常温度室に置いた。LT-I+II+III+IV では全期間で低温室に置いて栽培し（ポジティブコントロール）、一方で No-LT では低温処理を行わずに全期間を通して通常温度室で栽培した（ネガティブコントロール）。それぞれの低温処理スケジュールに対して *spw1-clt1* のポット一つを供試し、スケジュールの全工程を終えたポットは温室へ戻して開花率を調査した。

一般的に、イネは開花の際に花糸の伸長により葯が内外穎の間隙から穎花の外部へと押し出される。開花が終了すると内外穎は閉じるが、葯は穎花内に戻ることなく穎の外側に萎れた状態で付着する（星川 1975）。しかし、この現象は開花しない *spw1-clt1* では起こらない。このため、強風や降雨が起こらない人工環境下であれば、穎花外に葯が付着しているかどうかでその穎花が開花したか否かを判定することが可能である。そこで、*spw1-clt1* の各穂について全穎花の開花または閉花を判定し、開花した穎花数を全穎花数で除して穂ごとの開花率を計算した。なお、本実験は 2 回行った（実験 2-1, 2-2）が、それぞれ別の種子セットを使用して異なる時期に行ったことから反復ではなく個別の実験とみなし、結果の統計処理も個別に行った。

### 実験 3：日中の気温変化パターンと *spw1-clt1* の開花率の変化の関係

まず暗期の低温が *spw1-clt1* の閉花受粉性に与える影響を調べる実験（実験 3-1）として、2 台のグロースクャビネット（実験 1 と同じ）を 25°C/25°C（25-all）および 25°C/18°C（25-18）に設定し（表 4-3）、*spw1-clt1* をそれぞれ栽培して開花率を調査した。次に、明期の気温変化の効果を調べる実験（実験 3-2）として、4 台のグロースクャビネットを 25°C/18°C（25-18）設定とし、うち 3 台に 1 時間、2 時間、4 時間の 30°C の処理の時間を明期の中央に挿入し、4 種類の気温変化パターンとした（表 4-3、温度処理模式図参照）。各パターンの名称は 30°C 処理の長さに合わせて D30-0h, D30-1h, D30-2h, D30-4h とした。

実験には2ポットずつの *spw1-clsl* を供試し、出穂完了までグロースキャビネット内で栽培した。開花率は実験2と同じ方法で調査、計算し、実験3-2の結果は統計解析を行った。各気温変化パターンの日平均気温（DMT）は、グロースキャビネット内の設定温度から計算した。

### 統計解析

実験結果の多重解析には統計ソフトウェア Statcel（柳井（2011）付属ソフトウェア）によりシェッフエの F-test を使用した。

## 4-2 結果

### 国内各地における *spw1-clsl* の開花頻度と鱗被形態

表4-4に各試験地での開花頻度、出穂期、30MTの値を示す。2009年は全国的に冷夏であった。札幌では *spw1-clsl* の多くの穎花が開花し、開花頻度は「A」と判定された。盛岡、大仙、大崎および上越でも開花が観察されたが、その数は札幌よりも少なく、開花頻度は「B」と判定された。つくばでは開花が少数に留まったために開花頻度は「C」とされ、福山と糸満では開花が全く観察されなかったため「N」となった。30MTは試験地の中で最も北に位置する札幌で最も低く、一部東北地方の試験地では逆転する場合もあったが、概ね南方に向かうに従って上昇し、糸満で最も高くなった。

2010年は前年から一転して気温の高い夏となった。この年の札幌での *spw1-clsl* の開花した穎花数は明らかに前年に比べて減少し、開花頻度は「B」となった。前年に開花が見られた上越、つくばでは開花が観察されず、開花頻度は「N」と判定された。福山では前年と同様に *spw1-clsl* は開花しなかった。各試験地の30MTの値は全て前年より高かった。

2009年の各試験地で栽培された *spw1-clsl* の鱗被の形態を図4-3に示す。札幌の *spw1-clsl* の鱗被は伸長の程度が小さく、野生型の「台中65号」のものと比較的近い形態を示した(図4-3A, 3B)。開花頻度が「B」であった東北地方の3か所と上越の *spw1-clsl* の鱗被は共通して札幌のものよりも長くなり(図4-3C, 上越のもののみ示す)、つくば、福山と試験地が南方に位置するほど鱗被の伸長はさらに進んだ(図4-3D, 3E)。糸満の *spw1-clsl* の鱗被は著しい伸長に加えて基部の丸みを帯びた形状が消失し、Nagasawa *et al.* (2003)によって報告された *spw1-1* 変異体の鱗被に似た形態となった(図4-3F)。南方の試験地で *spw1-clsl* の鱗被がより長くなる傾向は、2010年も同様だった(データ省略)。

各試験地での *spw1-clsl* の開花頻度、30MT および鱗被の形態には明らかな関連が見られなかった。30MTが低い北海道の試験地では *spw1-clsl* の開花が多く観察され、鱗被の伸長も小さく野生型に近い形態であったが、南下して試験地の30MTが高くなるにつれて開花頻度は

低下し鱗被も長くなっていった。中国地方以南の試験地では *spw1-clsl* は開花せず、著しく伸長した鱗被が観察された。また、年次間の気候変動も開花頻度に影響を与え、同一の試験地でも 30MT が高くなった 2010 年の方が 2009 年よりも開花頻度が低くなった。

### 人工的な温度環境下での *spw1-clsl* の閉花受粉性の温度感受性の解析

#### 実験 1：温度による *spw1-clsl* の鱗被の形態および内部構造の変化

第 3 章でも述べた通り、野生型のイネの鱗被は小さな鱗状の形態であるのに対して *spw1-clsl* の鱗被は内穎周縁部に似た表面構造と形態の鱗被となる (図 4-4 A, 4 B, Yoshida *et al.* 2007)。実験 1 では、様々な気温条件下で形成された *spw1-clsl* の鱗被の形態と内部構造を比較した。

最も設定温度が高い 30°C/25°C 試験区の *spw1-clsl* の鱗被は著しく伸長し (図 4-4 C, 左端)、2009 年に行った試験栽培における糸満のもの (図 4-3 F) および *spw1-1* 変異体の鱗被 (Nagasawa *et al.* 2003) と形状が類似していた (図 4-3 F)。平均鱗被長は 2.93 mm (表 4-1) で、全ての試験区の中で最も長かった。30°C/20°C 試験区でも *spw1-clsl* の鱗被は強く伸長し (図 4-4 C, 中央左側)、平均鱗被長は 2.80 mm であった。30°C/25°C 試験区の平均鱗被長との間には統計的な有意差が検出されたが、差は非常に小さかった。25°C/20°C 試験区の鱗被は、前出の 2 つの試験区のものより伸長が弱くなり (図 4-4 C, 中央右側)、平均鱗被長は 2.04 mm であった。最も温度が低い 20°C/20°C 試験区では、鱗被の形状は 2009 年の札幌のもの (図 4-3 B) と同様に野生型に近くなった。平均鱗被長は 1.57 mm で全試験区の中で最も短かった。なお、この試験区でのみ雄蕊の形成不全が観察されたが、これは設定された温度環境が影響を与えたものと考えられる。

本実験で観察された温度設定の異なる各試験区の *spw1-clsl* の鱗被の形態の変化は、国内各地で行った *spw1-clsl* の栽培試験で観察された鱗被の形態の変化と一致し、高温条件では鱗被長は長く、低温条件では逆に短くなることが確認された。また、この表現型の変化は連

続的なものであった。

イネの鱗被と内穎周縁部は隣接して形成され、その接触部分は癒合しているが、それぞれを構成する組織は異なっている（図4-4D）。鱗被の内部はトルイジンブルーによって青く染色される柔組織（PL, parenchyma of lodicule）と、二条に並んだ維管束によって構成されるのが特徴である。一方内穎周縁部の内部は、背軸側に形成される繊維状で密度の高い厚壁細胞組織（SM, sclerenchyma of marginal region of palea, 図4-4D 黒矢印）と向軸側に形成される鱗被のものとは異なるスポンジ状の外観の柔組織（PM, parenchyma of marginal region of palea, 図4-4D 黒矢尻）によって構成され（星川 1975）、これらは共にトルイジンブルーで青緑色に染色される。

30°C/25°C試験区で形成された *spw1-clsl* の鱗被の内部は、ほぼすべてが SM 様組織および PM 様組織によって占められていた（図4-4E）。PL はほとんど観察されず、また維管束の列も消失しており、この器官の内部構造は内穎周縁部に近かった。一方 20°C/20°C 試験区で形成された鱗被では、30°C/25°C試験区のものに比べて PL が占める割合が増加した（図4-4F）。また特に SM 様組織が占める割合が減少し、SM と PM の中間的な密度を示す組織（図4-4F, 橙色の矢印）が形成された。この鱗被には維管束列が欠失しているが、PL の存在が増えていることと高温条件下で形成されたものに見られた内穎周縁部の特徴が不明瞭になっていることから、野生型の鱗被と内穎周縁部の中間の特性を持つ器官であると考えられた。

これらの観察結果から、*spw1-clsl* の鱗被は気温によって異なる内部構造となり、高温条件下では SM および PM 様の組織で構成される内穎周縁部の特徴を持つ器官となるが、温度が低い場合は一部で内穎周縁部に特徴的な組織に代わって野生型の鱗被の組織である PL が形成されることが明らかになった。

## 実験2：*spw1-clsl*の閉花受粉性が温度感受性となる時期の推定

実験2では、*spw1-clsl*の幼穂形成開始から出穂までの期間において、閉花受粉性が最も低温に感受性になる時期とその長さを調べるために、人工気象室と様々な低温処理スケジュールを使用した実験を行った。

実験2-1において、7日間のみ低温処理を行ったLT-I, LT-II, LT-III, LT-IVの平均開花率は、それぞれ0.3%, 3.2%, 6.2%, 0.1%だった(表4-2)。このグループの中ではLT-IIIが他より高い開花率を示したが、全体的に開花率は非常に小さかった。連続14日間の低温処理を行ったLT-I+II, LT-II+III, LT-III+IVの平均開花率は3.3%, 67.0%, 11.7%だった。LT-II+IIIは他のスケジュールよりも明確に高い開花率を示し、これに続いてLT-III+IVが高い開花率となった。LT-I+IIは7日間のみ低温処理を行ったグループと同じレベルの開花率だった。同じく14日間の低温処理ではあるが、7日間ずつ2回に分けて処理を行ったLT-I+III, LT-II+IV, LT-I+IVの平均開花率はそれぞれ1.9%, 21.5%, 1.0%だった。LT-II+IVがこの中では比較的高い開花率となったが、LT-II+IIIよりは低かった。LT-I+IIIとLT-I+IVは著しく低い開花率となった。ポジティブコントロールであるLT-I+II+III+IVは最も高い開花率83.3%を示し、ネガティブコントロールのNo-LTでは開花しなかった。

統計解析の結果、LT-II+IIIの平均開花率はLT-I+II+III+IVと有意差がなかった。一方で、低温処理が1週間のスケジュールと14日間連続処理のLT-I+IIとLT-III+IV、7日間処理を2回行ったLT-I+IIIとLT-I+IVの開花率はNo-LTと有意差がなかった。LT-II+IVは中くらいの開花率でLT-I+II+III+IVおよびNo-LTとは有意差があったが、LT-IIIとLT-III+IVとは有意差がなかった。

実験2-2でも同様の結果となった(開花率は表4-2に示す)。統計解析からLT-II+IIIとLT-I+II+III+IVの処理が最も開花を促進し、LT-III+IVとLT-II+IVはこれに次ぐ開花促進効果があることが示された。それ以外の処理では開花を促進する効果は小さかった。

2回の実験を通して、II期とIII期を通した連続14日間の低温処理は開花率を劇的に上昇させ、LT-II+IVとLT-III+IVもわずかに開花を促進させた。その一方で、II期またはIII期

であっても 7 日間のみ処理はほとんど効果が無かった。このことから、*spw1-clsl* の閉花受粉性は II 期と III 期が最も低温に感受性のある時期で、この時期の少なくとも 8 日間以上の比較的長い低温処理により *spw1-clsl* の開花が促進されることが明らかになった。

### 実験 3：日中の気温変化パターンと *spw1-clsl* の開花率の変化の関係

一般的に、晴天の日には気温は夜明け頃から上昇し、午後の始めに最高となり、それ以降は下降する。実験 3 では、このような日中の気温の変化が *spw1-clsl* の閉花受粉性に与える影響を調査した。

実験 3 - 1 では、25-all の DMT と平均開花率は 25.0°C と 5.0%、25-18 では 21.5°C と 55.3% だった（表 4 - 3）。25-all では *spw1-clsl* の開花はわずかであったが、25-18 では暗期の気温を 18°C に低下させたことにより約半分の *spw1-clsl* の穎花が開花し、DMT は 25-all に対して 3.5°C 低くなった。これにより 25-18 の温度処理パターンが *spw1-clsl* の開花を明確に促進することが明らかになったため、実験 3 - 2 ではこれに 0, 1, 2, 4 時間の 30°C 処理の時間を明期に挿入することで、日中の気温変化を模したパターンとした。

実験 3 - 2 では、D30-0h, D30-1h, D30-2h, D30-4h の平均開花率はそれぞれ 49.9%, 24.0%, 13.4%, 0.3% となり（表 4 - 3）、これらは統計的に有意な差であった。明期中の 30°C の処理時間が長くなるにつれて開花率は低下し、4 時間の処理により *spw1-clsl* はほぼ完全な閉花受粉性を示した。各処理パターンの DMT はそれぞれ 21.5°C, 21.7°C, 21.9°C, 22.3°C だった。D30-4h の DMT は 25-all のものに比べて 2.7°C 低かったが、D30-4h の開花率は 25-all と比べて同等かわずかに低く、他の実験で見られた DMT の低下と開花率の上昇の関係とは異なる結果となった。

### 4-3 考察

#### *spw1-clsl* の閉花受粉性の温度反応

国内の様々な自然環境下で行った栽培試験では、各試験地の *spw1-clsl* の開花頻度が南北方向に連続的な変化をする傾向が観察された (表 4-4)。2009 年に札幌で栽培された *spw1-clsl* では多くの開花が観察されたが、東北・北陸地方の各試験地の開花頻度はそれよりも低かった。関東地方のつくばでは開花はさらに限定的となり、中国地方以南では完全な閉花受粉性となった。この開花頻度の変化は 30MT の値の増加と対応していた。また、*spw1-clsl* の開花頻度は気候の年次変動の影響も受けた。高温となった 2010 年夏季には札幌の *spw1-clsl* の開花頻度が前年よりも低下し、また *spw1-clsl* が閉花受粉性をとる地域が前年よりも北上して上越とつくばでも開花が見られなかった。これらの結果から、*spw1-clsl* の閉花受粉性には温度感受性があり、出穂前の気温が高い場合はそのまま閉花受粉性となるが、気温が低い場合は開花するようになることが確認された。

*spw1-clsl* の閉花受粉性の原因である鱗被の変形については、その程度が各試験地で異なる結果となった。気温の高い糸満で栽培されたものの鱗被は著しく伸長し、*spw1-1* の鱗被と似た形状 (Nagasawa *et al.* 2003) であったのに対して、気温の低い札幌で栽培されたものの鱗被は伸長の程度が小さく、野生型の鱗被と近い形状となった (図 4-3)。*spw1-1* は *nul* 変異体で *spw1-clsl* よりもシビアな表現型を示す (Nagasawa *et al.* 2003, Yoshida *et al.* 2007)。糸満で栽培された *spw1-clsl* の鱗被はその形状から変異の表現型が *spw1-1* に近いシビアなものになっており、一方札幌で栽培された *spw1-clsl* の野生型のものに近い形状の鱗被は表現型がマイルドになっていると考えられる。鱗被の表現型は開花頻度と同様に南北方向で連続的に変化しており (図 4-3)、試験地の気温条件に対応しているものと考えられる。この気温による鱗被の表現型の変化は、人工環境下で行った実験 1 においても再現された。30°C/25°C 試験区で形成された鱗被は、2009 年に糸満で形成されたものと同様にシビアな表現型を示した (図 4-3 F, 4-4 C 左端)。その内部は大部分が SM 様組織と

PM 様組織で構成されており、内穎周縁部に近い構造となっていた (図 4 - 4 E). 野生型の鱗被の組織で膨潤する機能を持つ PL はほとんど観察されず、これが閉花受粉性の原因であることが確認された. その一方で、20°C/20°C試験区で形成された鱗被は 2009 年の札幌市のものに似たマイルドな表現型を示した (図 4 - 3 B, 図 4 - 4 C 右端). この鱗被の内部構造は 30°C/25°Cのものに見られた内穎周縁部様の構造が不明瞭となっており、また PL が占める割合が明らかに増加していた (図 4 - 4 F). 維管束列が欠損していることからこの鱗被は完全に野生型と同じものではないが、札幌の *spw1-cla1* の開花は部分的に形成された PL が膨潤する機能を持っていたために引き起こされたと考えられる.

これらの観察結果と以前報告された変異型タンパク質 SPW1<sup>I45T</sup> の分子生物学的な解析 (Yoshida *et al.* 2007) を関連付けることで、低温によって *spw1-cla1* の閉花受粉性が失われるメカニズムについて考察する. 高温条件下では SPW1<sup>I45T</sup> が持つ MADS2 または MADS4 との相互作用能が低下することによってクラス B 活性を維持できず、*spw1-cla1* の鱗被はそのアイデンティティを失う. これにより鱗被形成時にその内部に膨潤機能を持つ PL を形成することが出来ず、閉花受粉性となる. 鱗被内にはクラス B 活性を必要としない内穎周縁部を構成する組織が形成される. 一方低温条件下では、SPW1<sup>I45T</sup> のタンパク質間相互作用能の部分的な回復によりクラス B 活性が弱く維持され、*spw1-cla1* の鱗被は不完全ながらもそのアイデンティティを回復する. これにより鱗被形成時に PL が部分的に形成されることで、*spw1-cla1* の開花が起こる. 気温条件によって開花頻度が連続的に変化することから、気温が低いほど *spw1-cla1* の鱗被内に形成される PL の量は増加すると考えられ、鱗被内に占める PL の比率が高まることでその穎花の開花の確立が上昇すると考えられる.

#### 閉花受粉性が温度感受性となる時期

各地での栽培試験および実験 1 の結果から、出穂前の気温により *spw1-cla1* の閉花受粉性が影響を受けることが明らかになったため、実験 2 ではこの温度感受性がある期間を一穂

単位で探索する実験を行った。その結果、*spw1-clt1*の開花率はII期からIII期にかけての連続14日間の低温処理で著しく上昇した(表4-2)。この低温処理の明確な効果は、この期間が各穎花での鱗被の形成期に当たり、先に考察した*spw1-clt1*が開花するようになるメカニズムがこの時期に働いていることを示している。LT-II+IVおよびLT-III+IVのようなIV期を含む低温処理も開花を促進したが、その効果はII期からIII期にかけてのものよりも小さかった。これは、鱗被の形成がIV期にはほぼ完了しているためと考えられる。一方で、I期を含む処理は開花率にほとんど影響を与えない。Ikeda *et al.* (2004)はイネの花序の発達ステージをIn1からIn9に分類、体系化した。本実験のI期の始めはこの分類のIn5に対応する。このステージでは鱗被の形成はまだ始まっておらず、また*SPW1*も発現していない(鱗被の形成と*SPW1*の発現はIn7のSp5から開始される)(Ikeda *et al.* 2004)。このことが、I期の低温処理が開花を促進しない理由と考えられる。またこれは、*spw1-clt1*の閉花受粉性の変化に*SPW1*<sup>I45T</sup>のタンパク質間相互作用能の変動が関与することを間接的に示している。

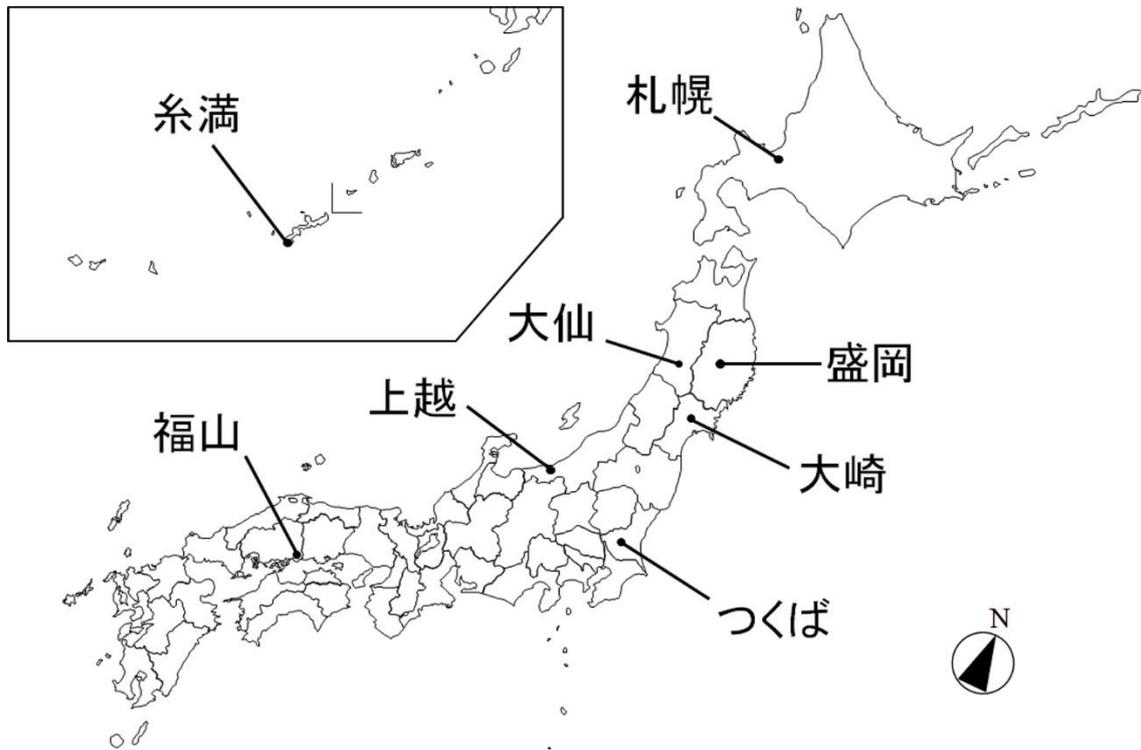
II期、III期およびIV期を単独で低温処理した場合は、開花は促進されなかった。これは、7日間の低温処理の期間が開花の原因となるPLの十分な量の形成には短かったことを示している。低温処理に感受性のある期間の長さは温度によって変化する可能性はあるが、今回の結果からは相対的に短い(7日以下)の低温では*spw1-clt1*の開花は大きく促進されないだろうと考えられる。

### ***spw1-clt1*の表現型の予測**

*spw1-clt1*を栽培する前に、栽培予定地の過去の気温データから予想される出穂期前の気温を使用して*spw1-clt1*の表現型をシミュレートし、その地域では閉花受粉性が維持されるか否かを予測することは可能であろう。予測の際には、出穂期前の一定期間の平均気温を使用することが最も簡便である。しかし、実験3では日中の比較的短い高温の時間が夜間の低

温による *spw1-clsl* の開花の促進をキャンセルする効果を持つことが明らかになった。これは、平均気温による予測が必ずしも *spw1-clsl* の表現型と一致しない場合があることを示している。例えば、実験3の D30-4h と 25-all の開花率は、DMT の明確な差にも関わらず大きな違いがない (表4-3)。また、実験条件が部分的に異なっていることは考慮に入れなければならないが、実験2の LT-I+II+III+IV の結果と実験3の D30-4h の開花率を比較してみると、LT-I+II+III+IV は出穂前の4週間の 24°C/20°C の処理により DMT が 22°C だった一方で、D30-4h の DMT は 22.3°C で LT-I+II+III+IV に極めて近かったにも関わらず、開花率は大きく異なっていた。このことは、*spw1-clsl* の表現型のシミュレーションには平均気温だけでなく、日最高気温とその持続時間も考慮に入れるべきであることを示唆しており、実際の栽培地において出穂前の平均気温が低い場合でも日中の気温 (最高気温を記録した時間の前後4時間程度の気温) が十分に高い地域では、*spw1-clsl* が閉花受粉性を示す可能性があることを示している。*spw1-clsl* の表現型のシミュレートや閉花受粉性が安定する地域を予測する方法については、総合考察においてさらに検討する。

本章で行った実験により、*spw1-clsl* の閉花受粉性には温度感受性があることが確認され、その開花に至るメカニズムは、分子生物学的な解析によって明らかにされていた温度による SPW1<sup>I45T</sup> と MADS2/4 との相互作用能の変動が引き金となって *spw1-clsl* の鱗被の内部構造が変化することであることが明らかにされた。また、*spw1-clsl* の温度感受性が幼穂形成から出穂までの4週間のうち2週目と3週目にある鱗被の形成時期に強くなること、日中の気温の変化パターンも閉花受粉性に影響を与えることも明らかにし、これらの特性を踏まえた気温データによる栽培予定地での *spw1-clsl* の表現型予測の可能性が示された。総合考察では、第3章と第4章で得られた知見を基に、*spw1-clsl* の閉花受粉性を交雑抑制の目的で使用するにあたっての実用性を考察する。



試験地	
北海道札幌市	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 (現国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター)
岩手県盛岡市	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター (現国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター)
秋田県大仙市	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター大仙研究拠点 (現国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター大仙研究拠点)
宮城県大崎市	宮城県古川農業試験場
茨城県つくば市	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所 (現国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 次世代作物開発研究センター)
新潟県上越市	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センター北陸研究センター (現国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業研究センター北陸研究拠点)
広島県福山市	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業研究センター (現国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 西日本農業研究センター)
沖縄県糸満市	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター (現国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター)

図4-1 栽培試験地一覧



図4-2 確認された *spw1-cls1* の幼穂

Scale bar = 83.3 μm

表 4 - 1 出穂前の温度環境の違いに対する鱗被長の変化

試験区名	温度処理模式図		n=	平均鱗被長 (mm)
	明期 (12h)	暗期 (12h)		
30°C/25°C	30°C	25°C	110	2.93 ± 0.15 a
30°C/20°C	30°C	20°C	125	2.80 ± 0.21 b
25°C/20°C	25°C	20°C	110	2.04 ± 0.17 c
20°C/20°C	20°C		105	1.57 ± 0.29 d

平均値 ± 標準偏差.

異なるアルファベット間には1%の水準で有意差がある(シェッフエのF-test).

表 4 - 2 出穂前の期間別温度処理実験による *spw1-clsl* の閉花受粉性が温度感受性となる時期の推定

温度処理 スケジュール名	温度処理模式図	実験 2-1		実験 2-2		
		低温処理期間	開花率 (%)	n =	開花率 (%)	n =
LT - I		7日間	0.3 ± 0.6 c	16	0.1 ± 0.3 c	19
LT - II		7日間	3.2 ± 3.8 c	12	0.9 ± 1.3 c	14
LT - III		7日間	6.2 ± 7.1 bc	10	3.4 ± 3.2 c	16
LT - IV		7日間	0.1 ± 0.3 c	15	0.0 ± 0.0 c	18
LT - I+II		14日間 (連続処理)	3.3 ± 6.0 c	14	0.2 ± 0.5 c	18
LT - II+III		14日間 (連続処理)	67.0 ± 16.0 a	12	68.5 ± 17.8 a	17
LT - III+IV		14日間 (連続処理)	11.7 ± 13.3 bc	14	27.6 ± 17.7 b	14
LT - I+III		7日間+7日間 (分割処理)	1.9 ± 1.4 c	14	2.3 ± 2.6 c	16
LT - II+IV		7日間+7日間 (分割処理)	21.5 ± 14.3 b	12	27.5 ± 9.6 b	19
LT - I+IV		7日間+7日間 (分割処理)	1.0 ± 2.4 c	14	0.0 ± 0.0 c	16
LT - I+II+III+IV		28日間 (連続処理)	83.3 ± 12.0 a	12	75.6 ± 9.4 a	6
No - LT		0日間	0.0 ± 0.0 c	9	0.0 ± 0.0 c	13

平均値 ± 標準偏差.

異なるアルファベット間には1%の水準で有意差がある(シェッフェのF-test).

表 4 - 3 日中の気温変化が *spw1-cls1* の開花率に与える影響

試験区名		温度処理模式図		開花率 (%)	n=	DMT (°C)
実験3-1	25 - all	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>明期(12h)</span> <span>暗期 (12h)</span> </div>		5.0 ± 5.5	36	25.0
	25 - 18	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span style="width: 100%; height: 15px; background-color: #00aaff;"></span> </div>		55.3 ± 17.5	35	21.5
実験3-2	D30-0h	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span style="width: 100%; height: 15px; background-color: #00aaff;"></span> </div>		49.9 ± 14.6 a	37	21.5
	D30-1h	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span style="width: 33%; height: 15px; background-color: #00aaff;"></span> <span style="width: 3%; height: 15px; background-color: #ffcc00;"></span> <span style="width: 33%; height: 15px; background-color: #00aaff;"></span> </div>		24.0 ± 13.5 b	39	21.7
	D30-2h	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span style="width: 33%; height: 15px; background-color: #00aaff;"></span> <span style="width: 3%; height: 15px; background-color: #ffcc00;"></span> <span style="width: 33%; height: 15px; background-color: #00aaff;"></span> </div>		13.4 ± 9.3 c	39	21.9
	D30-4h	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span style="width: 33%; height: 15px; background-color: #00aaff;"></span> <span style="width: 3%; height: 15px; background-color: #ffcc00;"></span> <span style="width: 33%; height: 15px; background-color: #00aaff;"></span> </div>		0.3 ± 0.7 d	38	22.3

25°C  
  18°C  
  30°C

平均値 ± 標準偏差.

異なるアルファベット間には1%の水準で有意差がある(シェッフェのF-test).

表 4 - 4 各試験地での *spw1-cls1* の開花頻度, 出穂期および 30MT

試験地	2009			2010		
	開花頻度 <sup>1)</sup>	出穂期	30MT (°C)	開花頻度	出穂期	30MT (°C)
札幌	A	9/7	19.5	B	8/25	22.9
盛岡	B	8/10	22.5	-	-	-
大仙	B	8/22	24.1	-	-	-
大崎	B	8/19	22.7	-	-	-
上越	B	8/16	24.3	N	8/11	27.4
つくば	C	8/22	25.6	N	8/21	28.4
福山	N	8/19	26.5	N	8/18	29.4
糸満	N	8/11	29.5	-	-	-

30MT: 出穂期前30日間の平均気温.

<sup>1)</sup>開花頻度の各階級が示す開花状況は以下の通り.

A: ほぼ全ての穎花が開花する, B: 半数前後の穎花が開花する, C: 少数の穎花のみ開花する, N: 全く開花しない.



図4-3 各試験地で栽培された *spw1-cls1* の鱗被の形態 (2009年)

- (A) 野生型 (台中 65 号) の鱗被
- (B) 札幌で栽培された *spw1-cls1* の鱗被
- (C) 上越で栽培された *spw1-cls1* の鱗被
- (D) つくばで栽培された *spw1-cls1* の鱗被
- (E) 福山で栽培された *spw1-cls1* の鱗被
- (F) 糸満で栽培された *spw1-cls1* の鱗被

黄色の矢尻はそれぞれの鱗被を示す.

Scale bar = 200  $\mu$ m

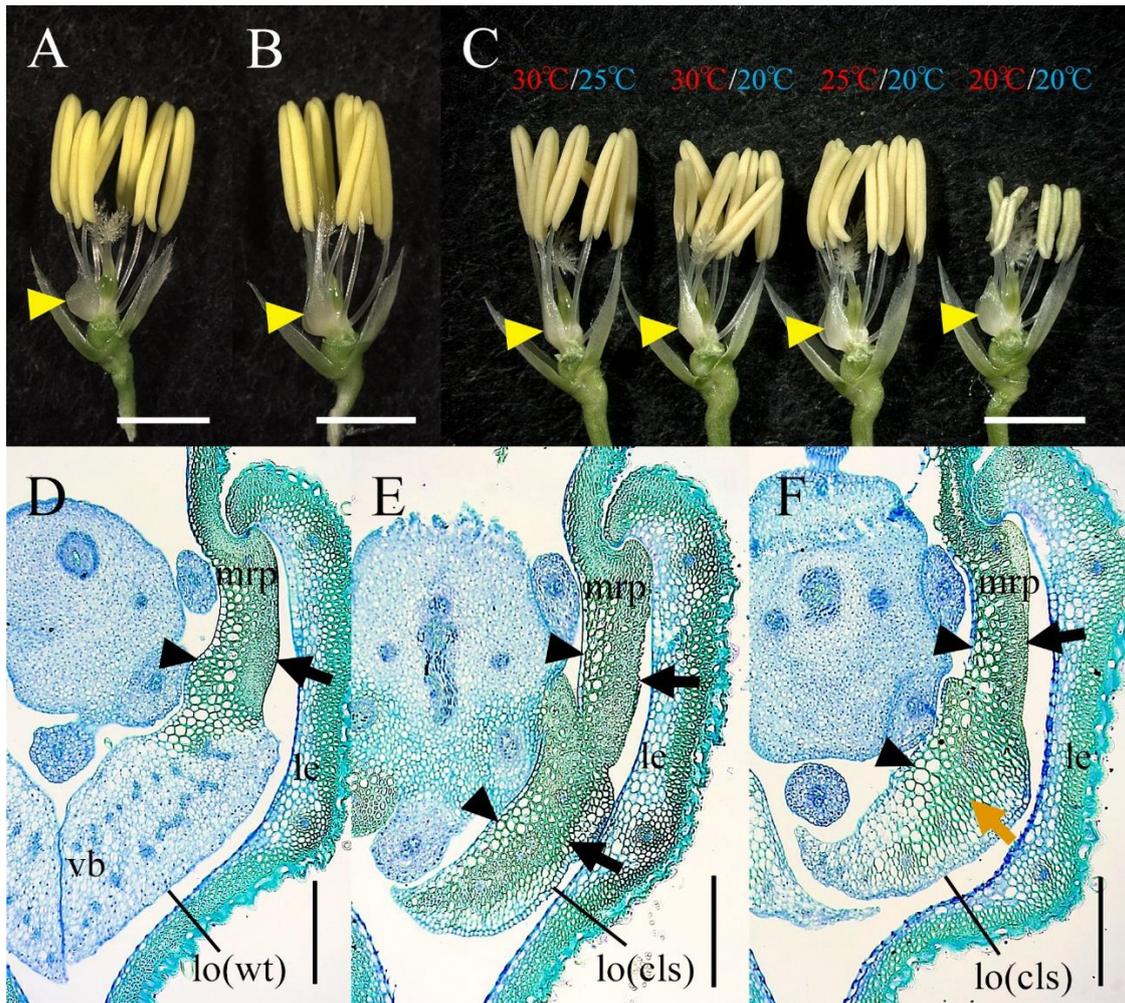


図4-4 様々な温度環境下で形成された *spw1-cls1* の鱗被の形態と内部構造

(A) 野生型 (台中 65 号) の鱗被

(B) 上越市の水田で栽培され、閉花受粉性を示した *spw1-cls1* の鱗被

(C) 様々な温度環境下で形成された *spw1-cls1* の鱗被 (各試験区の明期/暗期の気温を穎花の上部に示す)

いずれも穎花から内外穎は取り除き、黄色の矢尻によってそれぞれの鱗被を示した。

(D) 野生型 (台中 65 号) の鱗被と内穎周縁部の内部構造

(E) 30°C/25°C試験区で形成された *spw1-cls1* の鱗被と内穎周縁部

(F) 20°C/25°C試験区で形成された *spw1-cls1* の鱗被と内穎周縁部

いずれも穎花の横断切片をトルイジンブルーで染色した。

黒矢印は内穎周縁部の厚壁細胞組織 (SM), 黒矢尻は内穎周縁部の柔組織 (PM), 橙矢印は SM と PM の中間的な密度を示す組織を示す.

lo(wt) : 鱗被 (野生型), lo(cls) : 鱗被 (*spw1-cls1*), mrp : 内穎周縁部, le : 外穎, vb : 維管束

Scale bar = 2.5 mm (A, B, C), 200  $\mu$ m (D, E, F)

## 第5章 総合考察

現在の栽培イネは野生イネの一種である *O. rufipogon* から生じたとされ (Oka 1988), その後長い期間をかけて人類は収穫に不都合な脱粒性の排除や収量向上を目指した粒形の拡大等のいわゆる「栽培化」(Domestication)を行ってきた(森島 1999, Konishi *et al.* 2006, Li *et al.* 2006, Shomura *et al.* 2008). これについて, これまでに明確には確認はされていないものの, 栽培イネの交雑率が野生イネよりも明らかに低いことから, 自然交雑に関する形質についても栽培イネではより自然交雑をしないものが選抜されてきたと考えられる. 恐らくこれは, 栽培特性や「コメ」の品質の斉一化を図っているうちに無意識的になされた「栽培化」(無意識選択) (Ladizinsky 2000) であろう. 一方, イネの栽培品種が今後 GM 品種も含めてさらに多様化していく中で, イネの自然交雑がもたらす不利益が初めてクローズアップされるようになり, その解決策が求められている. 本研究で目指すイネの閉花受粉化とは, イネに対して人類が行ってきた自然交雑がより少ない方向への無意識選択から, イネの自然交雑を意図的にコントロールすることを目指す「栽培化」(意識的選抜)への転換であるとも言えるだろう. 一方で第1章でも述べた通り, これまでに得られているイネの閉花受粉性突然変異は農業形質に副次的な影響があり, 自然交雑の抑制効果があるとしても収量性の低下等をもたらすため実用的ではない. 自然交雑の抑制と好ましい農業形質を両立してこそこの「栽培化」は完成するものであり, 本研究は鱗被形成関連遺伝子の変異による閉花受粉性に注目してこれを目指すものである.

### ***MFO1*を利用した閉花受粉性イネの作出**

本研究により, これまで不明であった穎花形成時の *MFO1* の機能が, 花器官のアイデンティティ決定と分裂組織の転換制御であることが明らかになった. 具体的な *MFO1* の機能を穎花の形成順に沿って挙げると, 小穂分裂組織から小花分裂組織への転換, 内穎のアイデ

ンティティ決定（内穎周縁部の形成）、鱗被のアイデンティティ決定と形成位置の調整、雄蕊の形成位置の調整、雌蕊形成完了後の分裂組織消失の制御と多岐に渡っており、*MFO1* はイネの穎花形成の多くの段階に関与する重要な遺伝子であると言える。本研究では *MFO1* と近縁な遺伝子である *OsMADS17* についても解析を行ったが、こちらはその機能が喪失しても鱗被形成に異常が生じないことから、閉花受粉性イネ作出には利用できないと考えられる。

*MFO1* が多くの機能を持つことは、この遺伝子の変異によって実用的な閉花受粉性イネを作出することが困難であることを示す。本研究で使用した二種類の *mfo1* 変異体では、ともに鱗被の形態形成異常による機能喪失とそれによる閉花受粉性が確認されたが、それに加えて穎花の別の部位に変異の影響が生じていた。その中でも、雌蕊や胚珠の形成異常による稔実性の大幅な低下や内穎周縁部の欠失による穎花の密閉性の喪失は、収量性や玄米品質に悪影響を及ぼす。これらが閉花受粉性と不可分であれば、*MFO1* の変異による閉花受粉性は本研究が目指す実用的なものとは言えない。

この欠点を改善するためには、穎花の中で鱗被に限定して *MFO1* の機能をダウンさせなければならない。*MFO1* の発現領域の広範さ、複雑さを考慮すると、鱗被のみで *MFO1* が機能喪失した自然突然変異体を得ることは困難とみられるため、このためには遺伝子組換えを用いた *MFO1* の発現制御を行う方法が考えられる。具体的には、鱗被で特異的に発現するプロモーターと *MFO1* をノックダウンする RNAi トリガーを組み合わせ、閉花受粉性を付与したい品種に導入する方法である。GM 品種であれば、除草剤耐性や病虫害抵抗性等の目的形質を付与するコンストラクトにこれらの配列も含んだ形にすることで、一回の形質転換により閉花受粉性 GM 品種の作出が可能である。しかし、これまでに鱗被特異的プロモーターは開発されておらず、これを得るためにはイネの鱗被で発現する遺伝子の詳細な解析を待たねばならない。このように、*MFO1* の変異を利用した実用的な閉花受粉性イネの作出にはさらなる研究が必要であり、時間がかかると考えられる。

### *spw1-clsl* 変異による閉花受粉性の実用性

第3章での *spw1-clsl* および「夢あおば *cls1*」の解析により、*spw1-clsl* 変異による閉花受粉性は有望であることが明らかになった。この閉花受粉性は出穂期や草型に影響を与えず、また懸念された籾殻内に残留する枯死した葯の玄米や精米への悪影響も無かった。また、連続戻し交配により *spw1-clsl* の閉花受粉性を既存の品種に導入できること、*spw1-clsl* 変異が収量性に影響する可能性が小さいことも、本研究で作出した「夢あおば *cls1*」の解析により示された。水田で行った自然交雑試験では、それぞれの穂が接触する程の近距離でも *spw1-clsl* は種子親系統と交雑せず、その閉花受粉性が高い交雑抑制能力を持つことが明らかになった。自然交雑抑制能力が実証された閉花受粉性の報告は、これが最初のものである。

一方で、第4章では *spw1-clsl* 変異の閉花受粉性に温度感受性があることが明らかになり、夏季が冷涼な地域で交雑抑制に使用する場合には注意が必要であることが示唆された。これは *spw1-clsl* 変異による閉花受粉性の大きな弱点であり、この変異を実際に使用するにあたっては次のようなさらなる研究が求められる。

まず、低温により *spw1-clsl* 変異による閉花受粉性が失われ、開花した場合の自然交雑率の変化を明らかにする必要がある。第4章の各地での栽培試験において *spw1-clsl* の開花頻度は札幌市を除いて明らかに通常の開花する品種・系統よりも低かった。開花する穎花が少ないことは、空気中への花粉の放出量や雌蕊の露出頻度の減少につながり、本来栽培イネの自然交雑率が低いことを踏まえると、小規模な開花があっても *spw1-clsl* は十分な交雑抑制能力を維持する可能性がある。一方で、出穂前の低温が雄性不稔を引き起こした場合に交雑率が上昇すること（佐藤・横谷 2008, 丹野ら 2011）は考慮しなければならない。今後、*spw1-clsl* が開花する環境下での交雑試験を行って、どの程度の開花でどのような自然交雑率となるのかを明らかにする必要がある。

次に、*spw1-clsl* 変異を導入した閉花受粉性イネ品種が、その閉花受粉性を発揮できる「栽

培適地」を判定するための研究が必要である。第 4 章において、鱗被形成期の低温により SPW1<sup>I45T</sup> のパートナータンパク質との相互作用能が変化することで、鱗被の組織が変化して閉花受粉性が失われるというメカニズムが明らかにされた。そしてこの変化には、単純な平均気温の高低だけではなく、昼夜の気温較差や日中の気温が高い時間の長短も影響を与えることが示された。今後さらに、夜間の気温変化や日中と夜間の気温のバランス等が閉花受粉性に与える影響を調査するとともに、より多くの地点で *spw1-cls1* の栽培試験と気温データの収集を行うことで、出穂前の気温の変化パターンに対して *spw1-cls1* 変異導入品種が開花するか否かを予測する「開花予測モデル」の開発が可能であろう。一方で、農研機構では「メッシュ農業気象データシステム」(大野ら 2016) を公開し、1980 年以降の全国を網羅する気象データを公開している。このデータと開花予測モデルを組み合わせることで、国内各地における *spw1-cls1* 変異導入品種の開花/閉花をシミュレートし、閉花受粉性の自然交雑抑制能力が十分に発揮できる栽培適地を見出すことができるであろう。

本研究では *spw1-cls1* 変異による閉花受粉性の利点・欠点について多くを明らかにすることが出来た。この変異は使用可能な地域に制限があると見込まれるが、導入した品種の農業形質を損なわないことや交雑抑制能力が明らかにされていること等により、これまでに報告されたイネの閉花受粉性突然変異の中では最も実用性の高いものであると言える。

#### 温度感受性のない閉花受粉性イネの作出方法

Lombardo *et al.* (2017) は新規のイネ閉花受粉性突然変異体 *spw1-cls2* を報告した。*spw1-cls2* アリルの変異位置は *spw1-cls1* アリルとは異なり、転写産物の DNA との結合に関与する部分にあるため閉花受粉性が起こるメカニズムも *spw1-cls1* 変異とは異なっていると考えられるが、MADS ドメイン内のアミノ酸置換を伴う一塩基置換であることは共通している。そして *spw1-cls2* の閉花受粉性は温度感受性が無く、自然交雑抑制のために使用する際に温度環境の制約を受けない点で *spw1-cls1* 変異よりも実用上優れている。しかし、*spw1-*

*cls2*変異は稔実性が低下する傾向が見られるため、温度環境が適した栽培地では *spw1-cls1*の方が優れている。現状で自然交雑抑制のために *spw1-cls1*あるいは *spw1-cls2*を使用するとすれば、栽培地の気候と収量性を勘案してどちらかを選択することになるだろう。

2種類の *spw1-cls*変異体が存在し、その閉花受粉性の特性がそれぞれ異なることは、*SPW1*の未知のアリルからより実用的な閉花受粉性突然変異体が得られる可能性を示している。つまり、*SPW1*の MADS ドメイン内のいずれかの一アミノ酸に置換が生じた変異体には閉花受粉性を示し、かつ温度感受性も農業形質への悪影響も無いものが存在するかも知れない。そのような変異の探索には *SPW1*の塩基配列内の任意の場所に一塩基置換を生じさせる必要があるが、これには近年新たに開発され、イネにも応用されている TALEN や CRISPR/Cas9 等のゲノム編集技術 (Mohanta *et al.* 2017, Mishra *et al.* 2018) を用いるのが適当であろう。また、*SPW1*がパートナーとなるタンパク質 (例えば *OsMADS2* や *OsMADS4*) と相互作用をしながら機能することを踏まえれば、一塩基置換は *OsMADS2* や *OsMADS4* の遺伝子内に生じて閉花受粉性となる可能性があると考えられる。これまでに得られている二つの *spw1-cls* アリルの知見を基にして研究を進め、変異の位置とそれによる閉花受粉性が持つ特性を予測することが出来れば、最適な閉花受粉性となる変異体を人工的に作出することが可能になるだろう。

一方、イネと同じイネ科の作物であるオオムギでは既に閉花受粉性品種が実用化されているが、その閉花受粉性を司る *Cly1* は AP2 ドメインを持つ転写因子 *HvAP2* であることが報告されている (Nair *et al.* 2010, Wang *et al.* 2015)。閉花受粉性を示す *cly1* では、その転写産物中にあるマイクロ RNA の一種の miR172 によって認識されるサイト内に一塩基置換が生じており、miR172 による *HvAP2* の制御が失われることによって鱗被の形成不全が起こって閉花受粉性となる。イネにおいても *HvAP2* のオーソログ遺伝子および miR172 が存在することから、ゲノム編集技術を活用すれば同様のメカニズムにより閉花受粉性イネを作出できる可能性がある。このような、*SPW1* とその関連する遺伝子とは全く異なる系の

変異を *spw1-clsl* と組み合わせて閉花受粉性の二重変異体が作出できれば、より安定した閉花受粉性イネとなるであろう。

### イネの閉花受粉性の利用場面の拡大と今後の展望

本研究では、イネの閉花受粉性を GM イネと非 GM イネとの間の自然交雑を抑制し、「遺伝子拡散の防止」と「品種の純度維持」が可能となる有効な手段とした。しかしこれは、GM イネにのみに利用が限られるものではない。近年、米国で特定の除草剤に対して耐性を持つ非 GM イネ品種の栽培が行われているが、米国内の水田に発生する赤米の雑草イネがこの品種と交雑することでその除草剤耐性を獲得し、「スーパー雑草イネ」が発生している (Gealy *et al.* 2015)。また国内でも近年栽培品種に近い出穂・開花特性の難防除性雑草イネの発生が確認され、これが栽培品種と雑草イネの交雑によって生じた可能性が明らかにされている (細井・高松 2015)。このような既存の栽培品種から雑草イネへの自然交雑による「遺伝子拡散」の問題に対しても、閉花受粉性は有効である。

イネの糯性品種と粳性品種を同時に栽培した場合、粳性品種の花粉が糯性異品種に受粉することで糯性形質の喪失を引き起こすことは以前から指摘されている (鎌形ら 1988, 1990)。また、近年栽培が増加している赤米や柴黒米品種の栽培時にも、自然交雑により一般品種の玄米中に着色したものが生じ、それに伴って検査等級が低下する問題がある (山口ら 2005)。これらへの対策については品種間の時間的隔離・空間的隔離が行われてきたが、閉花受粉性を利用すればこれらに必要な労力や資材、スペース等のコストを削減することが可能となる。さらに、国内では水稻種子生産を取り巻く環境が関連する法律の改廃や制度の変更により大きく変化しているが、一部の地域では自治体から委託を受けて種子生産事業を行っている農家の高齢化や労力不足により、その継続が困難になっているところがある (大橋ら 2016, 高橋ら 2017)。この種子生産では水田に発生した異型株の除去作業が大きな負担となる。異型株は種子増殖をしようとする品種がその他の品種や雑草イネと自然

交雑することによって生じる場合もあるため、種子生産をしようとする品種が閉花受粉性であれば異型株の発生を抑制することができる。このように、「品種の純度維持」の目的においても、閉花受粉性が有効な場面は多くあると言える。

Koike *et al.* (2015) は閉じたままの穎花の内部の温度が外部の温度よりも低いレベルに保たれ、それにより花粉がその発芽活性を維持することから、閉花受粉性のイネが通常の開花するイネに比べて開花時の高温ストレスによる不稔（松井 2009）に耐性を持つことを報告した。このことは、イネの閉花受粉性が地球温暖化による高温ストレスが引き起こすイネの収量低下を回避する手段となる可能性があることを示している。今後も様々な研究が進んでいくことで、このような自然交雑抑制以外の閉花受粉性が活用される場面が見いだされる可能性があるであろう。

本研究では二つの鱗被形成関連遺伝子に着目し、実用的な閉花受粉性イネの作出の可能性を検討した。その結果、鱗被の形態形成に携わる遺伝子の変異により閉花受粉性イネを作出できることが示された。その中でも *spw1-cla1* 変異による閉花受粉性はこれまでに報告されたものの中では最も理想に近いものであったが、温度感受性のため安定的に閉花受粉性となる栽培地が限られるという欠点も明らかになった。今後は *spw1-cla1* の特性についてさらに解明することともに、*spw1-cla1* の有効な活用方法についても検討する必要があるだろう。これと併せて、本研究では対象としなかった他の鱗被形成関連遺伝子にも視野を広げ、ゲノム編集技術等も駆使してより理想的な閉花受粉性突然変異を見出す努力も継続していかなければならない。今後イネの自然交雑抑制が求められる場面が増加し、閉花受粉性が品種の必須形質となる場合に備えて、研究を進めていく必要があるだろう。

## 摘 要

世界各地で遺伝子組換え作物（GM 作物）の開発と普及が進んでいるが、GM 作物とその近縁野生種や従来からの非遺伝子組換え作物との間で自然交雑が起こった場合には、様々な問題が生じる可能性がある。イネにおいても遺伝子組換え品種（GM イネ）の研究開発が進行しており、将来的なその栽培に備えて GM イネと非 GM イネとの自然交雑を抑制する技術の開発が必要であろう。

イネの自然交雑抑制には、閉花受粉性（開花を伴わずに受粉・受精を行う性質）の利用が有効である。しかし、これまでに報告されたイネの閉花受粉性突然変異体は収量性等の農業形質にも変異の影響が及んでおり、それらの変異は栽培品種等で使用可能なものではなかった。このため、農業形質への悪影響が無いことと自然交雑を抑制する効果があることを両立した実用的な閉花受粉性突然変異を見出すことが求められている。

そこで本研究では、これを達成するための方法としてイネの開花の際に重要な機能を持つ花器官である鱗被の形態形成に着目し、これに関与する二種類の遺伝子とその突然変異体を解析することで、鱗被形成関連遺伝子の変異による鱗被形成不全を利用した閉花受粉性イネ作出の可能性について検討することを目的として以下の実験を行った。

### 1. イネの鱗被で発現する *MOSAIC FLORAL ORGANS1* の機能解析と同遺伝子を利用した閉花受粉性イネ作出の可能性の検討

イネの *MOSAIC FLORAL ORGANS1* (*MFO1*) は鱗被で発現することが報告されているが、その機能は明らかにされていない。そこで、二種類の *mfo1* 突然変異体の解析と *MFO1* の発現パターン解析を行うことで、イネの穎花形成における *MFO1* の働きを明らかにした。また、イネにおいて *MFO1* と近縁な遺伝子である *OsMADS17* についても解析を行い、両遺伝子を使用した閉花受粉性イネ作出の可能性について検討した。

*mfo1* 変異体の穎花の表現型解析により、*MFO1* が分裂組織の転換制御および花器官のアイデンティティ決定に関与していることが明らかになった。*MFO1* の発現部位や発現のタイミングも、この結果を支持するものだった。一方で、観察した二つの *mfo1* 変異体はいずれも開花しなかったが、稔性も大きく低下していた。これは、*MFO1* が穎花形成において多くの重要な役割を果たすため、その変異の影響が鱗被形成のみに限定されないことによる。このことから、*MFO1* の変異による実用的な閉花受粉性イネ作出は困難であると考えられた。*OsMADS17* は、その機能が喪失しても *MFO1* によってその機能が補完されるために鱗被形成異常が起こらず、この遺伝子は閉花受粉性イネ作出には使用できないと考えられた。

## 2. イネ閉花受粉性突然変異体 *superwoman1-cleistogamy1* の閉花受粉性が農業形質に与える影響とその交雑抑制能力の検証

イネ突然変異体 *superwoman1-cleistogamy1* (*spw1-clsl*) は閉花受粉性となることが報告されているが、実際の品種に導入して使用可能かどうかを判断するにはさらなる調査が必要であった。そこで、本研究では *spw1-clsl* を5年間にわたって試験栽培し、閉花受粉性が農業形質に与える影響を調査した。加えて、既存のイネ品種に *spw1-clsl* 変異を連続戻し交配によって導入し、作出した系統についても各種形質を確認した。さらに、この変異による閉花受粉性が持つ交雑抑制能力を野外での自然交雑試験によって検証した。

5年間の栽培試験により、*spw1-clsl* 変異による閉花受粉性は出穂期や草型に大きな影響を与えないこと、開花しないことによって籾殻内に残留する枯死した葯も玄米や精米の品質に影響しないことが明らかになった。収量性についても大きな低下は無いものと判断された。また、DNA マーカー選抜と連続戻し交配によって作出した *spw1-clsl* 変異を持つ準同質遺伝子系統は閉花受粉性を示し、この方法によりこの変異を既存品種に導入できることが実証された。2年間行った自然交雑試験では、*spw1-clsl* からの花粉飛散による交雑が

全く検出されず、*spw1-clsl* 変異による閉花受粉性には十分な交雑抑制能力があることが示された。このように、*spw1-clsl* の閉花受粉性は実用的な閉花受粉性イネを作出する上で非常に好ましい特性を持つことが明らかになった。

### 3. *superwoman1-cleistogamy1* 変異による閉花受粉性の温度感受性の解析

*spw1-clsl* の閉花受粉性は変異型タンパク質 SPW1<sup>I45T</sup> のタンパク質間相互作用能の低下によって引き起こされるが、低温条件下ではこの能力が回復することが報告されていた。そこで、気候が異なる国内各地で *spw1-clsl* の栽培を行って、その閉花受粉性が温度感受性であるかを確認した。次に、人工的に制御された環境下において *spw1-clsl* に様々なパターンの温度処理を行い、これに対する反応を詳細に調査した。

国内各地で行われた *spw1-clsl* 栽培試験では、夏季の平均気温が比較的低かった北方の地域の試験地で開花が観察され、平均気温が高かった南方の試験地では閉花受粉性が維持されたことから、閉花受粉性が温度感受性であることが示された。開花が観察された試験地と観察されなかった試験地では、*spw1-clsl* の鱗被の形態が異なっていた。

人工的な環境下で行った試験では、出穂前の温度によって *spw1-clsl* の鱗被の形態や内部組織の構成が変化し、鱗被の機能喪失程度が変わることが明らかになった。温度の影響は鱗被の形成が行われている期間に最も強くなった。また、閉花受粉性への影響は、単純な気温の高低のみではなく、日中の気温の変化パターンも関係することが示された。

以上の結果から、*spw1-clsl* 変異による閉花受粉性には温度感受性があり、SPW1<sup>I45T</sup> のタンパク質間相互作用能の温度に対する反応と一致していることが明らかになった。このことは、夏季が冷涼な地域でこの閉花受粉性を自然交雑抑制に使用する場合には注意が必要であることを示唆している。一方で本研究では、閉花受粉性が最も温度の影響を受ける期間を明らかにし、また気温変化パターンと閉花受粉性の維持／喪失の関係性についても知見が得られた。これらは、*spw1-clsl* 変異をもつイネの開花／閉花を予測できる可能性を示し

ている。

栽培されるイネ品種が多様化する中で、イネの交雑抑制は GM イネと非 GM イネの間だけでなく、非 GM イネ間の遺伝子拡散や品種の純度維持にも有効である。このため、これまであまり注目されてこなかったイネの閉花受粉性もその重要性が増しつつある。

本研究の結果、鱗被形成関連遺伝子の変異を利用した鱗被形成不全による閉花受粉性イネの作出は可能であると考えられる。しかし、*MFO1* についてはその変異を利用して実用的な閉花受粉性イネを作出することはかなり困難であると考えられた。その一方で、*spw1-cla1* 変異による閉花受粉性は、その温度感受性により使用できる地域が限られるものの、これまでに報告されたものの中では最も実用的であると考えられる。今後はシミュレーションモデル等を使用した *spw1-cla1* 変異を持つイネの栽培適地を予測する研究等を行っていく必要があるだろう。また、本研究で得られた知見やゲノム編集技術等を組み合わせることで、さらに実用的なイネの閉花受粉性突然変異を見出す研究も継続していく必要がある。

## 謝 辞

本論文を取りまとめるにあたり，筑波大学生命環境科学研究科生物圏資源科学専攻作物生産学研究室の丸山幸夫教授に手厚いご指導，ご校閲をいただきました．また学位論文の審査におきましては，筑波大学生命環境科学研究科生物圏資源科学専攻植物育種学研究室の大澤良教授，同先端農業技術科学専攻作物ゲノム育種研究分野の田中淳一教授，同生物圏資源科学専攻代謝ネットワーク科学研究室の王寧助教に貴重なお時間を割いていただき，ご指導とご鞭撻をいただきました．皆様に深く感謝いたします．

本論文の研究を遂行するにあたりましては，その全般にわたり（国研）農研機構生物機能利用研究部門遺伝子利用基盤研究領域組換え作物技術開発ユニット長の吉田均博士に実験指導をいただき，またそのとりまとめに際しては幾度も助言と温かい励ましをいただきました．そのご助力なくしては本論文を作成することは出来ず，ここに心よりの感謝を申し上げます．

本論文の実験を実施するにあたりまして，研究全般にわたりイネの栽培を補助していただきました農研機構中央農業総合研究センター北陸研究センター業務第4課の職員の皆様，および北陸研究センター稲遺伝解析研究室および稲遺伝子技術研究北陸サブチームにて各種実験補助をしていただいた木水真由美氏，塚田久美子氏，湯川京子氏，市村徳子氏，上坂直美氏に感謝いたします．また，第4章の国内各地の閉花受粉性イネ栽培試験に多大なご協力をいただいた北海道農業研究センターの佐藤裕氏，黒木慎氏（現次世代作物開発研究センター），東北農業研究センターの小池説夫氏，林高見氏（現北海道農業研究センター），山口知哉氏（現中央農業研究センター），山口誠之氏（現次世代作物開発研究センター），梶亮太氏（現北海道農業研究センター），中込弘二（現西日本農業研究センター），宮城県古川農業試験場の永野邦明氏，遠藤貴司氏，作物研究所の大島正弘氏，近畿中国四国農業研究センターの芦田かなえ氏（現北海道農業研究センター），九州沖縄農業研究センターの山口典子氏（現中央農業研究センター）に感謝いたします．

本論文に関わる研究の遂行に際して，元中央農業総合研究センター北陸研究センター作物開発研究領域長の矢頭治氏，九州沖縄農業研究センター畑作研究領域畑作物生理・遺伝グループ上級研究員の田淵宏朗氏，中央農業研究センター病害研究領域抵抗性利用グループ上級研究員の林敬子氏，筑波大学生命環境科学研究科生物圏資源科学専攻作物生産システム学研究室の加藤盛夫助教には，アカデミックな議論，有益なアドバイス，そして多くの激励をいただきましたことを深く感謝いたします．

## 引用文献

- Agrawal, G. K., K. Abe, M. Yamazaki, A. Miyao and H. Hirochika (2005) Conservation of the E-function for floral organ identity in rice revealed by the analysis of tissue culture-induced loss-of-function mutants of the *OsMADS1* gene. *Plant Molecular Biology* 59: 125-135.
- 秋本正博 (2005) 朱に交われば赤くなる –栽培イネとの浸透交雑による野生イネの遺伝的侵食–. *雑草研究* 50: 21-29.
- Al-Babili, S. and P. Beyer (2005) Golden Rice – five years on the road – five years to go? *Trends in Plant Science* 10: 565-573.
- Angenent G. C., J. Franken, M. Busscher, A. van Dijken, J. L. van Went, H. J. Dons and A. J. van Tunen (1995) A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. *Plant Cell* 7: 1569-1582.
- 有井彩・山根精一郎 (2006) 除草剤耐性遺伝子組換え作物の普及と問題点. *雑草研究* 51: 263-268.
- Arora, R., P. Agarwal, S. Ray, A. K. Singh, V. P. Singh, A. K. Tyagi and S. Kapoor (2007) MADS-box gene family in rice: Genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics* 8: 242.
- Becker, A. and G. Theissen (2003) The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 464-489.
- Bommert, P., N. Satoh-Nagasawa, D. Jackson and H. Y. Hirano (2005) Genetics and evolution of inflorescence and flower development in grasses. *Plant and Cell Physiology* 46: 69-78.
- Chen M., Shelton A. and Ye G. Y. (2011) Insect-resistant genetically modified rice in China: from research to commercialization. *Annual Review of Entomology* 56, 81-101.

- Coen, E. S. and E. M. Meyerowitz (1991) The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, H. W. Boyer and R. B. Helling (1973) Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3240-3244.
- Daniell, H. (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nature Biotechnology* 20: 581-586.
- Ditta G, A. Pinyopich, P. Robles, S. Pelaz and M. F. Yanofsky (2004) The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Current Biology* 14: 1935-1940.
- Dreni, L., S. Jacchia, F. Fornara, M. Fornari, P. B. Ouwkerk, G. An, L. Colombo and M. M. Kater (2007) The D-lineage MADS-box gene *OsMADS13* controls ovule identity in rice. *Plant Journal* 52: 690-699.
- Endo, T., H. Sato, M. Yamaguchi, T. Kataoka, K. Nakagomi, T. Ito and K. Mori (2009) Estimate of outcrossing rates in a rice plant (*Oryza sativa* L.) under field conditions using a purple grain rice cultivar, Okunomurasaki. *Breeding Science* 59: 195-202.
- Favaro, R., R. G. Immink, V. Ferioli, B. Bernasconi, M. Byzova, G. C. Angenent, M. Kater and L. Colombo (2002) Ovule-specific MADS-box proteins have conserved protein-protein interactions in monocot and dicot plants. *Molecular Genetics and Genomics* 268: 152-159.
- Fornara, F., L. Pařenicová, G. Falasca, N. Pelucchi, S. Masiero, S. Ciannamea, Z. Lopez-Dee, M. M. Altamura, L. Colombo, M. M. Kater (2004) Functional Characterization of *OsMADS18*, a Member of the *API/SQUA* Subfamily of MADS Box Genes. *Plant Physiology* 135: 2207-2219.
- Furutani, I., S. Sukegawa and J. Kyojuka (2006) Genome-wide analysis of spatial and temporal gene expression in rice panicle development. *Plant Journal* 46: 503-511.
- Gealy, D. R., N. R. Burgos, K. M. Yeater and A. K. Jackson (2015) Outcrossing potential

- between U.S. blackhull red rice and indica rice cultivars. *Weed Science* 63: 647-657.
- Goto S., F. Sasakura-Shimoda M. Suetsugu M. G. Selvaraj N. Hayashi M. Yamazaki M. Ishitani M. Shimono S. Sugano A. Matsushita T. Tanabata and H. Takatsuji (2014) Development of disease-resistant rice by optimized expression of *WRKY45*. *Plant Biotechnology Journal* 13:753-765.
- Gressel, J. (2010) Needs for and environmental risks from transgenic crops in the developing world. *New Biotechnology* 27: 522-527.
- Han, A., P. Fan, J. C. Stroud, H. D. Youn, J. O. Liu and L. Chen (2003) Sequence-specific recruitment of transcriptional co-repressor Cabin1 by myocyte enhancer factor-2. *Nature* 422: 730-734.
- Hayashi, K., N. Hashimoto, M. Daigen and I. Ashikawa (2004) Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1212-1220.
- 平野博之・阿部光知 (2018) 花の分子発生遺伝学 - 遺伝子のはたらきによる花の形づくり - . 裳華房, 東京. 93-105.
- Honda, I., Y. Turuspekov, T. Komatsuda and Y. Watanabe (2005) Morphological and physiological analysis of cleistogamy in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* 124: 524-531.
- 星川清親 (1975) 解剖図説 イネの生長. 農山漁村文化協会, 東京. 1-317.
- 細井淳・高松三生 (2015) 雑草イネにおける開花特性について. *北陸作物学会報* 50: 15-17.
- Hüsken, A., S. Prescher and J. Schiemann (2010) Evaluating biological containment strategies for pollen-mediated gene flow. *Environmental Biosafety Research* 9: 67-73.
- Ikeda, K., H. Sunohara and Y. Nagato (2004) Developmental course of inflorescence and spikelet in rice. *Breeding Science* 54: 147-156.
- ISAAA (2017) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop

Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years. ISAAA, New York, Brief No. 53: 1-143.

Itoh, J., K. Nonomura, K. Ikeda, S. Yamaki, Y. Inukai, H. Yamagishi, H. Kitano and Y. Nagato (2005) Rice plant development: from zygote to spikelet. *Plant and Cell Physiology* 46: 23-47.

Jeon, J. S., S. Jang, S. Lee, J. Nam, C. Kim, S. H. Lee, Y. Y. Chung, S. R. Kim, Y. H. Lee, Y. G. Cho and G. An (2000) *leafy hull sterile1* is a homeotic mutation in a rice MADS box gene affecting rice flower development. *Plant Cell* 12: 871-884.

鎌形民子・長谷川理成・畠山富治・藤代淳 (1988) 水稲採種栽培におけるもち品種のウルチ化現象 第1報 発生機構と現在の対応. 千葉県原種農場研究報告 10: 13-25.

鎌形民子・畠山富治・藤代淳 (1990) 水稲採種栽培におけるもち品種のウルチ化現象 第2報 品種と自然交雑防止方法. 千葉県原種農場研究報告 12: 1-7.

Kater, M. M., L. Dreni and L. Colombo (2006) Functional conservation of MADS-box factors controlling floral organ identity in rice and *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 57: 3433-3444.

加藤浩・生井兵治 (1987a) 日本型イネの F<sub>1</sub> 採種効率を高めるための花器形質の品種間差異. 育種学雑誌 37: 75-87.

加藤浩・生井兵治 (1987b) イネ F<sub>1</sub> 採種時の自然交雑率を高める花器形質と環境条件. 育種学雑誌 37: 318-330.

Kellogg, E. A. (2001) Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology* 125: 1198-1205.

Khan, N. A., S. M. Githiri, E. R. Benitez, J. Abe, S. Kawasaki, T. Hayashi and R. Takahashi (2008) QTL analysis of cleistogamy in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*. 117: 479-487.

喜多村啓介(2006) シリーズ 21 世紀の農学 遺伝子組換え作物の研究 第1編 遺伝子組換え研究の社会への貢献 第1章 遺伝子組換え技術が作物の品種改良に及ぼす影響. 日本農学会編. 養賢堂, 東京. 1-24.

- Klimyuk, V. I., B. J. Carroll, C. M. Thomas and J. D. G. Jones (1993) Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. *Plant Journal* 3: 493-494.
- Koike, S., T. Yamaguchi, S. Ohmori, T. Hayashi, O. Yatou and H. Yoshida (2015) Cleistogamy decreases the effect of high temperature stress at flowering in rice. *Plant Production Science* 18: 111-117.
- 小松契史・根本圭介・経塚淳子 (2005) イネにおける *in situ* ハイブリダイゼーション法. 島本功・岡田清孝・田畑哲之監修. 改訂3版 モデル植物の実験プロトコールーイネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編一. 秀潤社, 東京. 186-193.
- Konishi, S., T. Izawa, S. Y. Lin, K. Ebana, Y. Fukuta, T. Sasaki and M. Yano. (2006) An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. *Science* 312: 1392-1396.
- 久保堅司・河田尚之・藤田雅也・八田浩一・松中仁・小田俊介・波多野哲也・関昌子・吉岡藤治・乙部千雅子・中島隆 (2012) 閉花性で赤かび病抵抗性に優れる「小麦中間母本農9号」(赤かび系3号)の育成. 九州沖縄農業研究センター報告 57: 21-34.
- Kyozuka, J., T. Kobayashi, M. Morita and K. Shimamoto (2000) Spatially and temporally regulated expression of rice MADS box genes with similarity to Arabidopsis class A, B and C genes. *Plant and Cell Physiology*. 41: 710-718.
- Ladizinsky, G. (2000) 栽培植物の進化 - 自然と人間がつくる生物多様性 -. 藤巻宏訳 農山漁村文化協会, 東京. 141-155.
- Leflon, M., A. Hüsken, C. Njontie, S. Kightley, D. Pendergrast, J. Pierre, M. Renard and X. Pinochet (2010) Stability of the cleistogamous trait during the flowering period of oilseed rape. *Plant Breeding* 129: 13-18.
- Li, C., A. Zhou and T. Sang (2006) Rice domestication by reducing shattering. *Science* 311: 1936-1939.
- Lombardo, F., M. Kuroki, S. G. Yao, H. Shimizu, T. Ikegaya, M. Kimizu, S. Ohmori, T. Akiyama, T. Hayashi, T. Yamaguchi, S. Koike, O. Yatou and H. Yoshida (2017) The

*superwoman1-cleistogamy2* mutant is a novel resource for gene containment in rice. *Plant Biotechnology Journal* 15: 97-106.

Lu, Y. H., D. Arnaud, H. Belcram, C. Falentin, P. Rouault, N. Piel, M. O. Lucas, J. Just, M. Renard, R. Delourme and B. Chalhoub (2012) A Dominant Point Mutation in a RINGv E3 Ubiquitin Ligase Homoeologous Gene Leads to Cleistogamy in *Brassica napus*. *Plant Cell* 24: 4875-4891.

Ma, H., M. F. Yanofsky and E. M. Meyerowitz (1991) *AGL1-AGL6*, an Arabidopsis gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes & Development* 5: 484-495.

Maeng, J. Y., Y. J. Won, R. Piao, Y. I. Cho, W. Jiang, J. H. Chin and H. J. Koh (2006) Molecular mapping of a gene '*ld(t)*' controlling cleistogamy in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 112: 1429-1433.

Malcomber, S. T. and E. A. Kellogg (2005) *SEPALLATA* gene diversification: Brave new whorls. *Trends in Plant Science* 10: 427-435.

Marathi, B. and K. K. Jena (2015) Floral traits to enhance outcrossing for higher hybrid seed production in rice: present status and future prospects. *Euphytica* 201: 1-14.

松井勤 (2009) 開花期の高温によるイネ (*Oryza sativa* L.) の不稔. *日本作物学会紀事* 78: 303-311.

Messeguer, J., C. Fogher, E. Guiderdoni, V. Marfà, M. M. Català, G. Baldi and E. Melé (2001) Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using a herbicide resistance gene as tracer marker. *Theoretical and Applied Genetics*. 103: 1151-1159.

Mishra, R., R. K. Joshi and K. Zhao (2018) Genome editing in rice: Recent advances, challenges, and future implications. *Frontiers in Plant Science* 9: 1361.

三浦清之・上原泰樹・小林陽・太田久稔・清水博之・笹原英樹・福井清美・小牧有三・大槻寛・後藤明俊・重宗明子 (2006) 水稻新品種「夢あおば」の育成. *中央農業総合研究センター研究報告* 7: 1-23.

- Miyao, A., K. Tanaka, K. Murata, H. Sawaki, S. Takeda, K. Abe, Y. Shinozuka, K. Onosato and H. Hirochika (2003) Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell* 15: 1771-1780.
- Mohanta, T. K., T. Bashir, A. Hashem, E. F. Abd\_Allah and H. Bae (2017) Genome editing tools in plants. *Genes* 8: 399.
- Monna, L., N. Kitazawa, R. Yoshino, J. Suzuki, H. Masuda, Y. Maehara, M. Tanji, M. Sato, S. Nasu and Y. Minobe (2002) Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Research* 9: 11-17."
- Moon, Y. H., H. G. Kang, J. Y. Jung, J. S. Jeon, S. K. Sung and G. An (1999) Determination of the motif responsible for interaction between the rice *APETALA1/AGAMOUS-LIKE9* family proteins using a yeast two-hybrid system. *Plant Physiology* 120: 1193-1204.
- 森島啓子 (1984) イネの進化と生態. *化学と生物* 22: 695-700.
- 森島啓子 (1999) イネの進化研究を考える. *育種学研究* 1: 233-241.
- Mouradov, A., T. V. Glassick, B. A. Hamdorf, L. C. Murphy, S. S. Marla, Y. Yang and R. D. Teasdale (1998) Family of MADS-Box genes expressed early in male and female reproductive structures of monterey pine. *Plant Physiology* 117: 55-62.
- Nagasawa, N., M. Miyoshi, Y. Sano, H. Satoh, H. Hirano, H. Sakai and Y. Nagato (2003) *SUPERWOMAN1* and *DROOPING LEAF* genes control floral organ identity in rice. *Development* 130: 705-718.
- 長尾正人・高橋万右衛門 (1954) 稲の交雑に関する研究 : 第 XVIII 報 閉花受精稲に関する二三の観察. *育種学雑誌* 4: 135-139.
- Nair, S. K., N. Wang, Y. Turuspekov, M. Pourkheirandish, S. Sinsuwongwat, G. Chen, M. Sameri, A. Tagiri, I. Honda, Y. Watanabe, H. Kanamori, T. Wicker, N. Stein, Y. Nagamura, T. Matsumoto and T. Komatsuda (2010) Cleistogamous flowering in

barley arises from the suppression of microRNA-guided *HvAP2* mRNA cleavage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: 490-495.

Ni, D. H., J. Li, Y. B. Duan, Y. C. Yang, P. C. Wei, R. F. Xu, C. R. Li, D. D. Liang, H. Li, F. S. Song, J. L. Ni, L. Li and J. B. Yang (2014) Identification and utilization of cleistogamy gene *cl7(t)* in rice (*Oryza sativa* L.) Journal of Experimental Botany 65: 2107-2117.

Ning S., N. Wang, S. Sakuma, M. Pourkheirandish, J. Wu, T. Matsumoto, T. Koba and T. Komatsuda T (2013) Structure, transcription and post-transcriptional regulation of the bread wheat orthologs of the barley cleistogamy gene *Cly1*. Theoretical and Applied Genetics. 126: 1273-1283

Norman, C., M. Runswick, R. Pollock and R. Treisman (1988) Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the *c-fos* serum response element. Cell 55: 989-1003.

農研機構 (2016) 平成 28 年度遺伝子組換えイネの隔離ほ場における栽培(第一種使用等)に関する栽培実験計画書の公表及び説明会の開催 (2016 年 4 月 8 日付プレスリリース) [http://www.naro.affrc.go.jp/publicity\\_report/press/laboratory/nias/062310.html](http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/press/laboratory/nias/062310.html)

農研機構 (2017) 遺伝子組換え農作物・食品ハンドブック 2017, 農業・食品産業技術総合研究機構, 茨城. 1-172.

Oka, H.I. (1988) Origin of cultivated rice. Japan Scientific Societies Press, Tokyo / Elsevier, Amsterdam. 1-254.

大橋善之・細井淳・大久保和男・太田和也・高橋行継 (2016) 小集会「原種・種子生産に関わる問題点を探る」開催報告. 日本作物学会紀事 85: 445-446.

大野宏之・佐々木華織・大原源二・中園 江 (2016) 実況値と数値予報, 平年値を組み合わせたメッシュ気温・降水量データの作成. 生物と気象 16: 71-79.

Paine, J. A., C. A. Shipton, S. Chaggar, R. M. Howells, M. J. Kennedy, G. Vernon, S. Y. Wright,

- E. Hinchliffe, J. L. Adams, A. L. Silverstone and R. Drake (2005) Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* 23: 482-487.
- Pelaz S, G. S. Ditta, E. Baumann, E. Wisman and M. F. Yanofsky (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* 405: 200-203.
- Prasad, K. and U. Vijayraghavan (2003). Double-stranded RNA interference of a rice *PI/GLO* paralog, *OsMADS2*, uncovers its second-whorl-specific function in floral organ patterning. *Genetics* 165: 2301-2305.
- Qin Y, J. Yang and J. Zhao (2005) Calcium changes and the response to methyl jasmonate in rice lodicules during anthesis. *Protoplasma* 225: 103-112.
- Reinheimer, R. and E. A. Kellogg (2009) Evolution of *AGL6*-like MADS box genes in grasses (Poaceae): Ovule expression is ancient and palea expression is new. *Plant Cell* 21: 2591-2605.
- Renard, M. and X. Tanguy (1997) Obtention de mutants cléistogames de crucifères. Brevet FR 9715768.
- Rong, J., B. R. Lu, Z. Song, J. Su, A. A. Snow, X. Zhang, S. Sun, R. Chen and F. Wang (2007) Dramatic reduction of crop-to-crop gene flow within a short distance from transgenic rice fields. *New Phytologist* 173: 346-353.
- Rong, J., F. Wang, Z. Song, J. Su, R. Chen and B. R. Lu (2012) Scale effect on rice pollen-mediated gene flow: implications in assessing transgene flow from genetically engineered plants. *Annals of Applied Biology* 161: 3-11.
- Rounsley, S. D., G. S. Ditta and M. F. Yanofsky (1995) Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 7: 1259-1269.
- 佐竹徹夫 (1972) イネポット栽培の改良法：生育時期の揃った穂を得るために。日本作物学会紀事 42: 361-362.
- 佐藤裕・横谷砂貴子 (2008) 穂ばらみ期の低温による雄性不稔化がイネの交雑率に及ぼす

影響. 育種学研究 10: 127-134.

Schauer, S. E., R. Baskar, L. Brand, A. Bolanos, M. Grobei, M. Federer, U. Jauch and V. Gagliardini (2007) Examination of the role of the Arabidopsis MADS-box transcription factors *AGL6* and *AGL13* in reproduction. *Developmental Biology* 306: 312.

Shomura, A., T. Izawa, K. Ebana, T. Ebitani, H. Kanegae, S. Konishi and M. Yano (2008) Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nature Genetics* 40: 1023-1028.

田部井豊 (2005) 遺伝子組換え作物の現状. *生物と科学* 44: 345-349.

田部井豊 (2010) 遺伝子組換え植物の利用における遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)の概要と生物多様性影響評価. *日本農薬学会誌* 35: 145-150.

立川雅司 (2017) 遺伝子組換え作物をめぐる「共存」－EUにおける政策と言説－. 農林統計出版, 東京. 1-31.

Takagi H., T. Hiroi, L. Yang, Y. Tada, Y. Yuki, K. Takamura, R. Ishimitsu, H. Kawauchi, H. Kiyono and F. Takaiwa (2005) A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 17525-17530.

Takahashi, R., H. Kurosaki, S. Yumoto, O. K. Han and J. Abe (2001) Genetic and linkage analysis of cleistogamy in soybean. *Journal of Heredity* 92: 89-92.

高橋行継・大橋善之・細井淳・大久保和男・太田和也・青木優作・小口 悠 (2017) 小集会「どうなる? 奨励品種制度と種子生産」－原種・種子生産に関わる問題点を探る(第2弾)－. *日本作物学会紀事* 86: 389-390.

高岩文雄・清野宏 (2010) 医療に役立つ経口ワクチン米の開発について. *農業及び園芸* 85: 1169-1172.

- 丹野久・竹内徹・木内均・芝池博幸 (2011) イネの穂ばらみ期冷温による不稔発生条件下における隔離距離と交雑率との関係. 日本作物学会紀事 80: 49-58.
- Theissen, G. (2001) Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr. Opin. Plant Biology* 4: 75-85.
- Theissen, G. and H. Saedler (2001). *Plant biology. Floral quartets. Nature* 409: 469-471.
- Theissen, G., A. Becker, A. Di Rosa, A. Kanno, J. T. Kim, T. Munster, K. U. Winter and H. Saedler (2000) A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology* 42: 115-149.
- Toki, S., N. Hara, K. Ono, H. Onodera, A. Tagiri, S. Oka and H. Tanaka (2006) Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant Journal* 47: 969-976.
- Turuspekov, Y., Y. Mano, I. Honda, N. Kawada, Y. Watanabe and T. Komatsuda (2004) Identification and mapping of cleistogamy genes in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 109: 480-487.
- Ueno, K. and H. Itoh (1997) Cleistogamy in wheat: genetic control and the effect of environmental conditions. *Cereal Research Communications* 25: 185-189.
- Wang, N., S. Ning, J. Wu, A. Tagiri and T. Komatsuda (2015) An Epiallele at *cly1* Affects the Expression of Floret Closing (Cleistogamy) in Barley. *Genetics* 199: 95-104.
- Wang, N., S. Ning, M. Pourkheirandish, I. Honda and T. Komatsuda (2013) An alternative mechanism for cleistogamy in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 126: 2753-2762.
- 山口誠之・橘雅明・内野彰 (2005) 有色米品種における交雑粒の玄米色および漏生種子の発芽. 日本作物学会東北支部会報 48: 11-12.
- Yamaguchi, T. and H. Y. Hirano (2006) Function and diversification of MADS-box genes in rice. *Scientific World Journal* 6: 1923-1932.

- Yamaguchi, T., D. Y. Lee, A. Miyao, H. Hirochika, G. An and H. Y. Hirano (2006) Functional diversification of the two C-class MADS box genes *OSMADS3* and *OSMADS58* in *Oryza sativa*. *Plant Cell* 18: 15-28.
- Yamaguchi, T., N. Nagasawa, S. Kawasaki, M. Matsuoka, Y. Nagato and H. Y. Hirano (2004) The *YABBY* gene *DROOPING LEAF* regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. *Plant Cell* 16: 500-509.
- 柳井久江 (2011) 4Steps エクセル統計 第3版. 秀潤社, 埼玉. 1-277.
- 八杉龍一・小関治男・古谷雅樹・日高敏隆編 (1996) 岩波 生物学辞典 第4版. 岩波書店, 東京. 1264.
- Yao, S. G., S. Ohmori, M. Kimizu and H. Yoshida (2008) Unequal genetic redundancy of rice *PISTILLATA* orthologs, *OsMADS2* and *OsMADS4*, in lodicule and stamen development. *Plant and Cell Physiology*. 49: 853-857.
- Ye X., S. Al-Babili, A. Klöti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer and I. Potrykus (2000) Engineering the provitamin A ( $\beta$ -Carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.
- Yoshida, H., J. Itoh, S. Ohmori, K. Miyoshi, A. Horigome, E. Uchida, M. Kimizu, Y. Matsumura, M. Kusaba, H. Satoh and Y. Nagato (2007) *superwoman1-cleistogamy*, a hopeful allele for gene containment in GM rice. *Plant Biotechnology Journal* 5: 835-846.
- Zahn, L. M., H. Kong, J. H. Leebens-Mack, S. Kim, P. S. Soltis, L. L. Landherr, D. E. Soltis, C. W. Depamphilis and H. Ma (2005) The evolution of the *SEPALLATA* subfamily of MADS-box genes: A preangiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history. *Genetics* 169: 2209-2223.
- Zeng X, X. Zhou, W. Zhang, N. Murofushi, T. Kitahara and Y. Kamuro (1999) Opening of rice floret in rapid response to methyl jasmonate. *Journal of Plant Growth Regulation* 18: 153-158.