

- A-0806 気温とオゾン濃度上昇が水稻の生産性におよぼす複合影響評価と適応方策に関する研究
 (3) 高温・オゾン適応のための分子マーカーの探索とオゾンストレス診断アレイの開発
 2) 穂と種子における分子マーカーの分析によるイネの高温・オゾン影響評価に関する研究

独立行政法人 国立環境研究所

生物圏環境研究領域 生理生態研究室

Kyoungwon Cho・久保明弘

<研究協力者>

独立行政法人 農業生物資源研究所 基盤研究領域

菊池尚志・佐藤浩二

昭和大学 医学部

Randeep Rakwal

財団法人 電力中央研究所 環境科学研究所

河野吉久

平成21～22年度累計予算額：4,600千円（うち、平成22年度予算額：2,300千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 米生産におけるオゾンと高温の単独及び複合影響を解明するため、イネの穂と種子における高温、オゾン、またはこれらの複合ストレスに応答する遺伝子を、アジレント社のイネDNAマイクロアレイを用いて調べた。種子分析のために、まず、日本型イネ品種（コシヒカリ、きらら397）及びインド型イネ品種（タカナリ、Kasalath）を、小型オーブントップチャンバー（小型OTC）で全生育期間にわたって野外のオゾンにさらして収量を調べた。その結果、“タカナリ”がオゾン感受性で“コシヒカリ”がオゾン耐性であることが判明したので、これらの種子における個々の遺伝子の発現パターンを比較した。その結果、245個の遺伝子が野外オゾンにさらされた“タカナリ”の収量減少に関連していた。次に、サブテーマ(1)で得られた収量、品質等を調べた結果と、上記の4品種及び日本型イネ品種“日本晴”と“にこまる”の種子における遺伝子発現パターンとの関連を調べた。その結果、3,300個のストレス応答性遺伝子と、これらのうちで、収量・品質等への影響と相関のある遺伝子が明らかになった。この相関を利用して、種子の遺伝子発現マーカーによる影響評価法を開発した。

上記の6品種を、制御温室（25℃）で成熟するまで生育させ、それぞれの開花期に、グロースキャビネット（200 ppb）、高温（35℃）、またはこれらの複合環境に一過的に8時間さらし、それぞれのストレスに応答する穂の遺伝子発現を調べた。その結果、19,227個のストレス応答性遺伝子と、これらのうちで、収量・品質等への影響と相関のある遺伝子が明らかになり、穂の遺伝子発現マーカーによる影響評価法を開発した。また、耐性品種と感受性品種の間での各ストレス因子に対する異なる分子応答が明らかになった。

[キーワード] DNAマイクロアレイ、高温、オゾン、イネ、収量

1. はじめに

温室効果ガスの排出を伴う化石燃料の使用が年々増加していることが、地球の平均気温の上昇を招いていると考えられているが、温室効果ガスのうちオゾンは、化石燃料の使用によって生じる窒素酸化物と揮発性有機化合物との光化学反応によって生成される有害なガス状環境汚染物質

の1つである。オゾン人間に健康被害をもたらす、植物の生長、発達及び生産を損なう。将来の地表面オゾン濃度の上昇は、特にアジア、アフリカ、米国で進み、植物に対して有害なレベルに達することが気候モデルにより予想されている¹⁾。日本では現在も100 ppb超の高濃度オゾンが頻りに観測されていることが報告されており、国立環境研究所のデータベースによれば、2005年には、東京周辺の関東地方にある29のモニタリング地点で、1時間平均のオキシダント最高濃度が200 ppbを超えている。

オゾン濃度の上昇は、植物細胞の膜の損傷や細胞における色素の蓄積を伴って、葉にクロロシス、ネクロシスを引き起こし、光合成の低下や収量の減少をもたらすため、作物の収量や品質への大きな脅威となる^{2, 3)}。このため、オゾンによる症状の初期診断と回避のための糸口を見つけるために、多くの研究グループがシロイヌナズナ⁴⁾、イネ^{5, 6)}及び数種の作物や樹木におけるオゾンに応答する遺伝子、タンパク質または代謝産物を明らかにしてきた。これらの研究により、オゾンストレスに対する細胞応答ネットワークを確立するための膨大なデータが提供された。しかしながら、これらは植物の葉を用いた研究であり、作物の収量や品質により直接的な関係があると予想される穂や種子に対するオゾン影響に関しては、分子レベルでの解析は行われていない。また、将来の地球環境において問題になるオゾンと高温の複合ストレスの穂や種子への影響についても分子レベルでの解析は行われていない。

2. 研究目的

本サブサブテーマでは、米の収量・品質に直結すると考えられるイネの穂と種子の分子マーカーを解析し、生殖成長期の情報を得て、穂と種子の分子マーカーの分析によるイネの高温・オゾン影響評価手法を開発することを目的としている。このため、ガス暴露チャンバーでオゾンや高温処理を施した代表的なイネ品種の穂と種子を用いて分子マーカーを網羅的に分析し、影響評価に適した分子マーカーを探索する。

3. 研究方法

(1) 小型オープントップチャンバー内でのイネの育成と調査

電力中央研究所赤城試験センター（群馬県）に設置された6個の小型オープントップチャンバー（小型OTC）内で日本型イネ品種（コシヒカリ及びきらら397）及びインド型イネ品種（タカナリ及びKasalath）を生育させた。6基の小型OTCのうち3基は活性炭フィルターで浄化空気が供給された浄化空気区（CF区）、他の3基は活性炭処理していないフィルターを備えた非浄化空気区（NF区）である。2009年6月18日に小型OTC内に各OTC内に4品種について各4個体の幼苗を定植し、収穫まで生育させた。種子の登熟後、品種ごとに順次収穫し、植物体の形態及び収量を調べた。

(2) 大型OTC内でのイネの育成とオゾン暴露および加温処理

サブテーマ(1)において2008年度と2009年度に大型OTCで実施した4品種の日本型イネ（コシヒカリ、日本晴、にこまる、きらら397）、及び2品種のインド型イネ（タカナリ、Kasalath）の玄米を分子マーカーの分析に用いた。

(3) 制御温室でのイネの育成と一過的オゾン・高温処理

温度25℃、相対湿度70%に制御された自然光温室内で生育させた日本型イネ品種の“コシヒカリ”、“きさら397”、“にこまる”、“日本晴”及びインド型イネ品種の“タカナリ”と“Kasalath”を、夏季のオゾン濃度と気温の急上昇を想定して、それぞれの開花期に人工光型グロースキャビネット内でオゾン（200 ppb）、高温（35℃）、またはオゾンと高温の複合環境（200 ppb/35℃）に8時間さらし、穂を採取後、直ちに-80℃で保存し、分子マーカーの分析に用いた。25℃で清浄空気で栽培したものを対照とした。

(4) イネ種子及び穂からの全RNAの抽出

遺伝子発現マーカーをDNAマイクロアレイで分析するために、イネ種子及び穂から全RNAを抽出した。イネの穂及び種子はデンプン、ある種の糖類及び色素に富み、非常に繊維が多いため、通常のRNA抽出手順を用いた場合、これら組織からの全RNA抽出はできないか、質の悪いRNAしか取れない。このため、酸性チオシアン酸グアニジン-フェノール-クロロホルム（AGPC）法に臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）法を組み合わせた方法⁷⁾を改変し、穂及び種子から高品質の全RNAを抽出する新しい方法を開発した。

実験に必要な、乳鉢と乳棒、スパチュラ、エッペンドルフチューブ（2 ml）またはクライオチューブ（5 ml）を液体窒素で前もって冷やしておき、穂と種子のサンプルを個々に液体窒素を加えて非常に細かな粉末になるまですりつぶした。100 mgずつに分割した粉末をRNA抽出に用いるまで-80℃で保存した。種子の場合は、各サンプルについて24粒の良好な種子を選択した。各サンプル（～100 mgの粉末）に、0.9 mlのCTAB緩衝液 [容量10 mlに、1MのTris-HCl (pH 8.0) を0.5 ml、500 mMのEDTA (pH 8.0) を1.0 ml、CTABを0.2 g (w/v)、5 MのNaClを1.68 ml、0.1 Mのβ-メルカプトエタノールを含む] を加えて30秒間攪拌し、室温 (RT) で5分間放置した。懸濁液に0.8 mlのフェノール-クロロフォルム-イソアミルアルコール (25:24:1) を加えて5分間よく混合し、4℃で5分間、15,000 gで遠心分離した。上層部分の一定量 (0.6-0.7 ml) を1容量のクロロホルムが入った1.5 mlのマイクロチューブに移し、ゆっくりと攪拌し、4℃で5分間、15,000 gで遠心分離した。得られた上澄液を別の1.5 mlマイクロチューブに移し、3 Mの酢酸ナトリウム (pH 5.5) を0.033容量、及び2-イソプロパノールを1容量加えた。混合液を15分間氷上で放置し、4℃で7分間、15,000 gで遠心分離した。RNAペレットをRNaseフリーの水0.1 mlで溶解させ、その後は、製造業者（米国メリーランド州、キアゲン社）による説明のとおりRNeasyミニプロトコルを用いてRNA精製を行った。単離した全RNAの収量と純度は、ナドロップ社（デラウェア州ウィルミントン）の分光光度計で測定し、ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動により確認した。

(5) cDNA合成および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

全RNAサンプルは最初にRNaseフリーのDNase（米国カリフォルニア州ラジョラ、ストラタジーン社）で処理した。次に、各対照サンプルおよび処理サンプルから分離された全RNAを1 μg用いて、製造業者によって提示されたプロトコルに従ってAffinityScript QPCR cDNA合成キット（米国ラジョラ、ストラタジーン社、アジレント・テクノロジーズ社）により、20 μL反応混合物中で1本鎖cDNAを合成した。反応条件は、25℃で5分間、42℃で5分間、50℃で40分間、および95℃で5分間であった。合成されたcDNAの品質を調べるため、RT-PCRで、ハウスキーピング/マーカー遺伝子

の発現を確認した。合成されたcDNAはキットに含まれている滅菌水を加えて50 μ Lとした。0.6 μ Lの1本鎖cDNA、7pmolの各プライマーセット、および6.0 μ LのEmerald Amp PCR Master Mix (2 \times 混合前) (京都、宝酒造社)にキットに含まれている滅菌水を加えて全容量を12 μ Lとした。

温度サイクルパラメーター (東京、バイオ・ラッドラボラトリーズ社、S1000サーマルサイクラー) は以下の通りであった。すなわち、97 $^{\circ}$ Cで5分間の初期変性後、サンプルは95 $^{\circ}$ Cで45秒、55 $^{\circ}$ Cで45秒、72 $^{\circ}$ Cで1分のサイクルを20回から40回繰り返して処理された。最終サイクルの終了後、72 $^{\circ}$ Cで10分間の追加延長段階を実施した。PCRの完了後、全反応混合物を遠心して集め、混合物 (3 μ L) を1.8%アガロース [京都、ナカライテスク社、アガロース (粉末) カタログ番号02468-95] のウェルに装填した。次に、Mupid-ex電気泳動システム (東京、アドバンス社) を用いて1 \times TAEバッファー中、100ボルトで20分間の電気泳動を行った。ゲルは7分間染色 (200 mlの1 \times TAEバッファー中に10 mg/mLの臭化エチジウムを8 μ L) し、染色されたバンドはUVトランスイルミネーター (東京、アトー社) を用いて可視化した。

(6) DNAマイクロアレイ分析

最近発売されたイネ4 \times 44Kカスタム (eARRAY、AMAdid-017845) オリゴDNAマイクロアレイ・チップ (米国カリフォルニア州パロアルト、アジレント・テクノロジーズ社) を使用して、ゲノム規模での遺伝子プロファイリングを行った。フリップ・ラベリング (Cy3及びCy5色素による色素交換または逆ラベリング) の手順を計画し、図-3-2-1に示すとおり、2種類のCy色素が処理区 (T) または対照区 (C) のcRNAに不均等に入ることによる色素の偏りを無効にした。色素交換アプローチは、発現量の異なる遺伝子をプロファイリングするために、色素の偏りが見逃される単なる2回か3回の再現実験よりも、より厳密な選択条件を提供するものである。

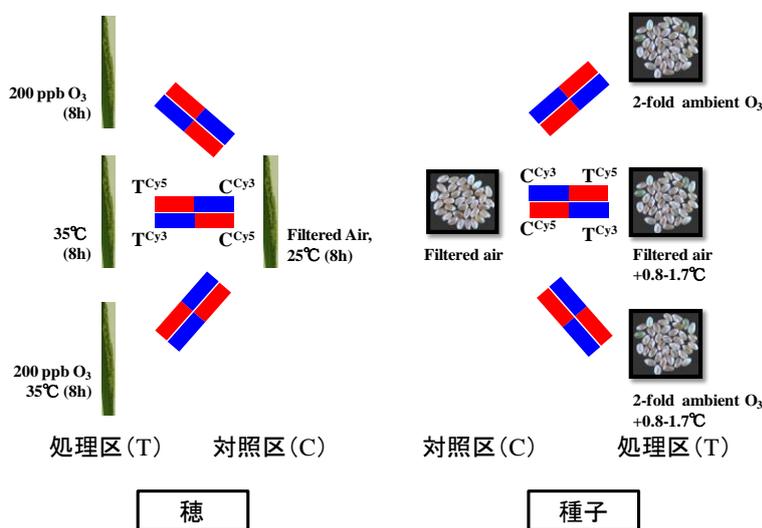


図-3-2-1 色素交換アプローチを用いたマイクロアレイ手順

マイクロアレイ分析を行う穂と種子を本文の記載どおりに調製する。マイクロアレイは、本文の記載どおりの色素交換法により、各ストレスへの暴露の際に各々のイネ品種ごとに2回実施した。

全RNA (800ng) は、アジレント社の少量RNAインプット蛍光リニア増幅キットを用いて、Cy3またはCy5色素でラベルした。対照及び処理サンプルの蛍光ラベルしたターゲットを、60-merプローブが固定されている同じマイクロアレイ・スライドにハイブリダイズした。色素交換法を用いて、2種類のCy色素がターゲットに不均等に入ることによる色素の偏りを考慮して、解析を行った。

ハイブリダイズしたマイクロアレイは、アジレント社のマイクロアレイスキャナーG2565BAを用いてスキャンした。対照及び処理サンプル間において有意に発現量が異なる遺伝子を検出するために、各スライドの画像をアジレント社のFeature抽出ソフトウェア (バージョン9.5.3.1) で処理した。また、このソフトによりプローブ全体のCy3及びCy5のシグナル強度を測定し、標準化した。さらに、人為産物による誤ったデータは、このソフトを用いてデータ分析前に除去した。GeneSpringソフトウェアGX10 (アジレント社) を用いて、発現量に差がある誘導性 (≥ 2.0) 及び抑制性 (≤ 0.5) 遺伝子のリストを作成し、注釈を付けた。ピアソンの相関テストを用いて、発現誘導レベルが6品種の収量等の変化に相関する遺伝子を選択した。その後、MapManツール⁸⁾ (バージョン3.1.1、ドイツ、Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology) を用いて、選択した遺伝子の機能を図示した。

(7) 代謝物質変動解析

イネ種子中の代謝産物へのオゾンの影響を検出するために、2009年度にサブテーマ(1)において赤城試験センターの大型OTCでオゾン暴露 (X2.0区) された“日本晴”の玄米と対照区 (CF区) の玄米からイオン性の低分子を抽出し、Agilent CE-TOFMSシステム (アジレント・テクノロジーズ社) を用いて、陽イオン性及び陰イオン性の代謝物質を検出して、量を比較した。

4. 結果・考察

(1) 野外オゾンに暴露されたイネ品種の形態的特徴

小型OTC内で野外オゾン暴露と対照実験を実施したイネ品種“きらら397”、“コシヒカリ”、“Kasalath”及び“タカナリ”を、登熟後、それぞれ9月2日、9月25日、10月2日、10月16日に収穫した。生育期間中の平均オゾン濃度は品種間で大きな差はなく、野外オゾン暴露区と活性炭フィルターを通した対照区でそれぞれ31.4~32.7、6.6~8.3 ppbであった。オゾンに暴露された“タカナリ”でのみ、オゾンによる有意な収量減少が見られたが、“コシヒカリ”では収量に有意差がみられなかった (図-3-2-2)。また、野外オゾンはイネ品種に応じて異なる形態的反応を引き起こすことが示された (図-3-2-2)。野外オゾンに暴露された“タカナリ”では、その生長、穂・止め葉・稈の長さおよび収量が著しく減少した (図-3-2-2A~D、G)。“コシヒカリ”では、野外オゾン暴露は稈および穂の長さとなすを減少させた (図-3-2-2AとF)。しかし、その収量に有意差がなかったことから (図-3-2-2G)、穂の中の穀粒数は増加したことが示唆された。実際、野外オゾンに暴露させた“コシヒカリ”および“タカナリ”における穂内の穀粒の数量はそれぞれ増加および減少したことから (図-3-2-2H)、“タカナリ”はオゾンに感受性が高く、一方で“コシヒカリ”は耐性であることが示唆された。

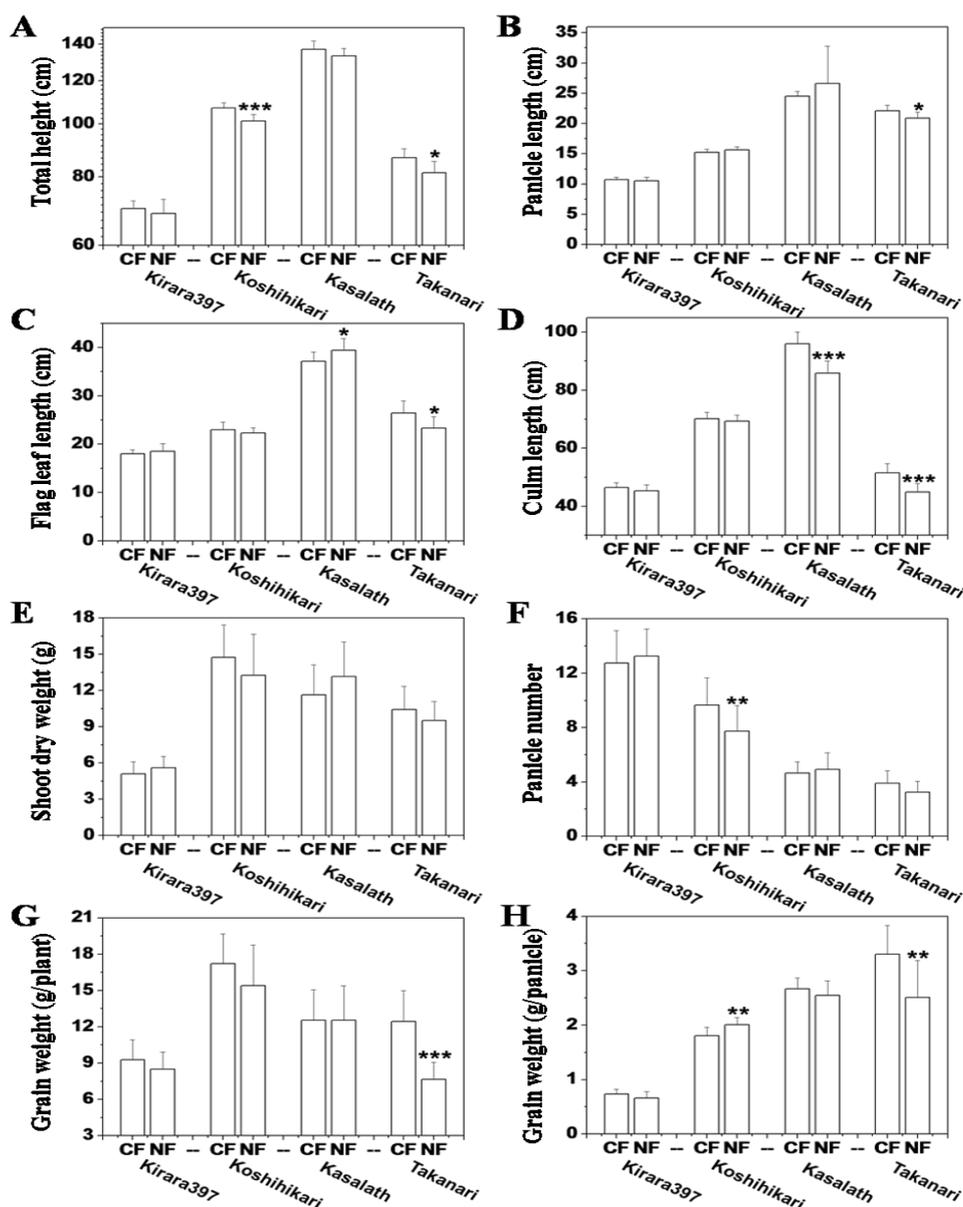


図-3-2-2 野外オゾン (NF) または活性炭ろ過空気 (CF) に暴露させた4種類のイネ品種における形態的パラメーターと精籾重量

本実験では、6個の小型OTCのうち3個は活性炭フィルターを備えており、他の3個は備えていない。ひとつのOTC内では各イネ品種について4植物体を収穫まで生育させた。グラフAは各イネ品種における野外オゾン暴露植物体または活性炭フィルター空気暴露植物体の全長の平均値を示している。全長は土壌上部から各植物体の先端までを測定した。さらに、穂の長さ (B: 各穂の頸部から先端まで)、止葉の長さ (C: 各止葉の基部から先端まで)、稈長 (D: 各稈の最下部から穂の頸部下まで) の平均値を測定した。シュートの乾燥重量 (E)、稈 (穂) の数 (F)、各植物体の精籾重量 (G)、各穂における精籾重量 (H) を測定した。星印は、一元分散分析 (シェッフェ検定) を行った場合の、NFおよびCFの平均値を比較した有意差を示す (* $P < 0.1$ 、** $P < 0.05$ 、*** $P < 0.01$)。

(2) イネ種子および穂から抽出された全RNAの品質

イネ種子および穂から前述の方法で抽出した全RNAの品質をホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動により確認した (図-3-2-3)。また、この全RNAから合成したcDNAの品質を調べるため、RT-PCRで、ハウスキーピング/マーカー遺伝子の発現を確認した (図-3-2-3)。いずれもはっきりとしたバンドが生じていた。このように、イネ種子および穂から高品質の全RNAを抽出する新しい方法を確立した。

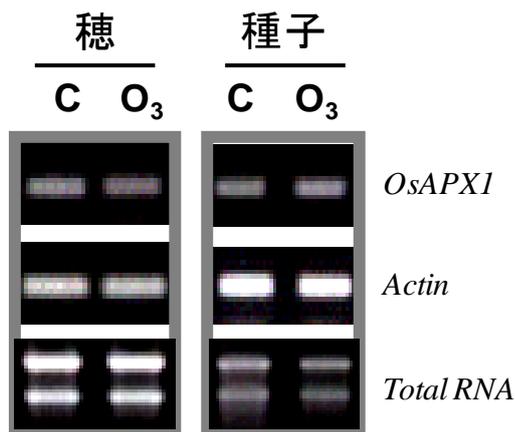


図-3-2-3 穂および種子からの全RNA抽出物およびハウスキーピング/マーカー遺伝子のRT-PCR産物

200 ppbで8時間オゾン暴露したコシヒカリの穂と赤城の小型OTCで野外オゾンに暴露して生育させたコシヒカリの玄米から全RNAを抽出した。Cは対照のサンプル。ハウスキーピング/マーカー遺伝子として、それぞれ*Actin*と*OsAPX1*を使用した。

(3) 野外オゾン暴露によるイネ種子における遺伝子発現変化

アジレント社の4×44KイネDNAチップを用いて、野外オゾンに暴露させた“タカナリ”及び“コシヒカリ”の収穫された種子中のオゾンに応答した遺伝子発現を解析した。野外オゾンに暴露された“タカナリ”の種子においては、338遺伝子及び170遺伝子の発現がそれぞれ誘導及び抑制され、“コシヒカリ”では、24遺伝子及び106遺伝子の発現がそれぞれ誘導及び抑制されたことがわかった (図-3-2-4)。それらのうち、7遺伝子および16遺伝子は両者に共通して、それぞれ誘導および抑制された。

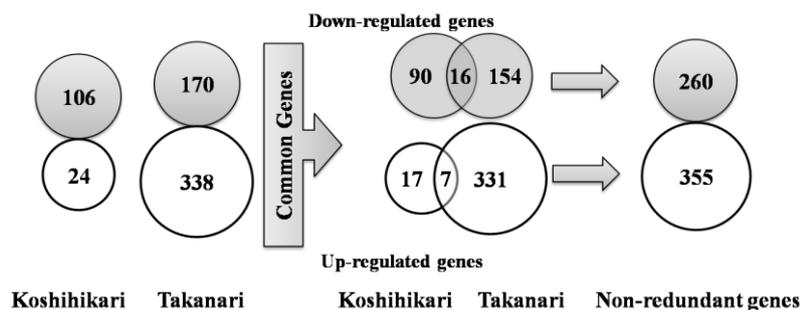


図-3-2-4 全生育期間を通じて野外でオゾンに暴露させた“コシヒカリ”および“タカナリ”の種子において発現量に差があった遺伝子数

(4) 野外オゾン暴露により“タカナリ”に生じる収量減少に関連する遺伝子の調査

“タカナリ”と“コシヒカリ”を対象に、マイクロアレイを用いて、両品種の比較を行った。イネ44Kマイクロアレイにおける各遺伝子の発現プロファイルをCy5とCy3の色素交換法を用いて2度調べた。1回目は、Cy5-オゾン処理 (Cy5-T) 及びCy3-対照 (Cy3-C) がハイブリダイズされ、各

遺伝子のCy3-Cシグナルに対するCy5-Tの比率をアウトプットとして求めた。2回目は、Cy5-C及びCy3-Tで逆のハイブリダイゼーションを行い、Cy3-Tシグナルに対するCy5-Cの比率をアウトプットとして求めた。各品種の1回目と2回目の値の間には負の相関がある。“コシヒカリ”及び“タカナリ”の収量に関するオゾン感受性の違いを反映する遺伝子を明らかにするために、まず、以下の基準に合致する遺伝子について調べた。すなわち、第1は“コシヒカリ”では誘導されるが“タカナリ”では抑制される遺伝子である。第2は、“コシヒカリ”では抑制されるが“タカナリ”では誘導される遺伝子である。その結果、これらの基準を満たす遺伝子は存在しないことが明らかになった。

さらに、野外オゾンに暴露された“タカナリ”では収量が減少するが、“コシヒカリ”では減少しないことから、“コシヒカリ”ではほとんどオゾン暴露で変化せず、“タカナリ”で誘導または抑制される遺伝子を探索した。すなわち、野外のオゾンに暴露された“コシヒカリ”における遺伝子発現変化の \log_2 [コシヒカリ1回目]、 $-\log_2$ [コシヒカリ2回目] 及びそれらの平均値の全ての倍率の値が、-1と1の間にあり、野外のオゾンに暴露された“タカナリ”における遺伝子発現変化の \log_2 [タカナリ1回目]、 $-\log_2$ [タカナリ2回目] 及びそれらの平均値の全ての値は、1より大きいか、-1より小さいものを探索した。その結果、野外のオゾンに暴露された“タカナリ”において、155の誘導性遺伝子及び90の抑制性遺伝子が明らかとなった。選択した遺伝子の機能分類を図-3-2-5に示した。インドール酢酸 (IAA)、ジャスモン酸 (JA)、デンプン代謝及び脂質とアミノ酸代謝に関係するタンパク質をコードしている遺伝子が特異的に誘導されるが、タクサン及びフラボノールのような二次代謝に関連する遺伝子は抑制されることが明らかになった。

これらの収量減少に関連している合計245個の遺伝子は、イネがオゾンにさらされ収量影響を受けたことを示す種子のマーカーとして利用できる可能性がある。

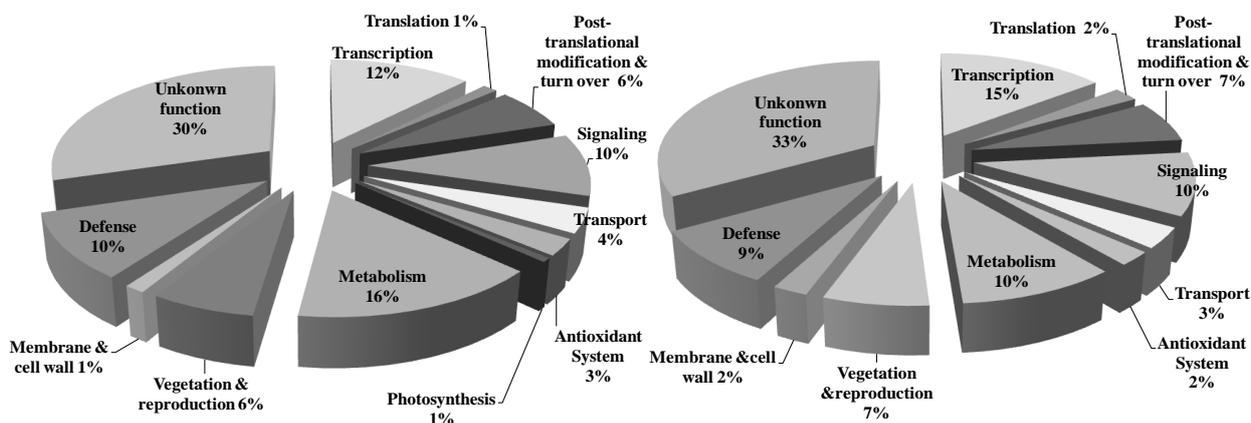


図-3-2-5 野外オゾンに暴露された“タカナリ”における収量減少に関連する遺伝子の機能分類

左) 収量減少に関連した155の誘導性遺伝子。右) 収量減少に関連した90の抑制性遺伝子。

(5) イネの穂と種子における、高温、オゾンまたは複合ストレスに応答する遺伝子

イネ6品種の穂と種子における高温、オゾンまたはこれらの複合ストレス (オゾン/高温) に応答する遺伝子をイネ44Kマイクロアレイで調べたところ、高温、オゾンまたは複合ストレスの影響

で誘導または抑制される多数の遺伝子が明らかになった。穂と種子において、それぞれ19,227と3,300の遺伝子が同定された(図-3-2-6)。図-3-2-6はこれらの各ストレスに応答する遺伝子の数を示している。穂においては“Kasalath”を除く全ての品種において、高温応答遺伝子がオゾン応答遺伝子より多く、これらの品種では、オゾン(200 ppb)より高温(35℃)の方が、一過的なストレスとして、より大きいことを示唆するものとする。また、穂においては、高温に応答する遺伝子は“コシヒカリ”で、オゾンに応答する遺伝子は“Kasalath”で、複合ストレスに応答する遺伝子は“にこまる”で、最も多かった。種子においては、高温に応答する遺伝子は“コシヒカリ”で、オゾンに応答する遺伝子は“日本晴”で、複合ストレスに応答する遺伝子は“タカナリ”で、最も多かった。

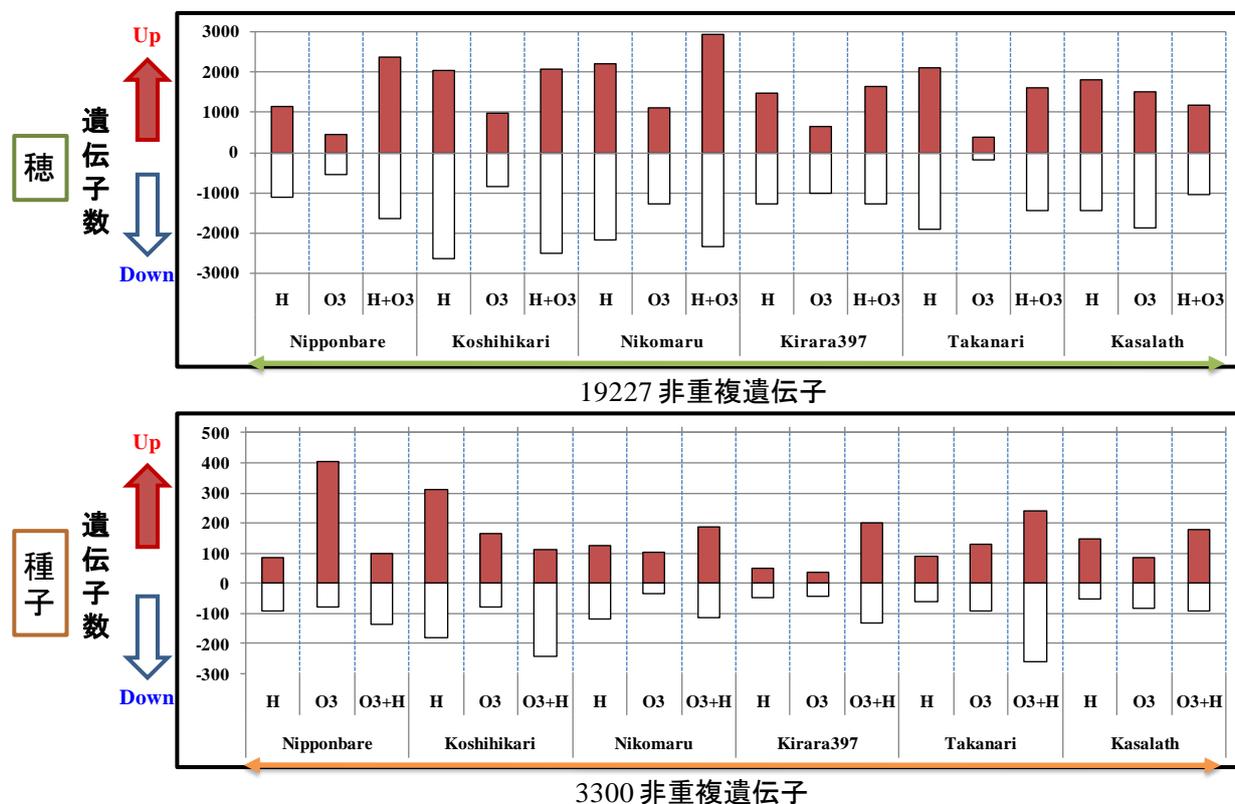


図-3-2-6 穂と種子における、オゾンに応答して発現量の異なる遺伝子

全体では、穂及び種子においてそれぞれ重複のない19,227及び3,300の遺伝子が対応する対照を基準として2倍以上差のある発現をしていた。

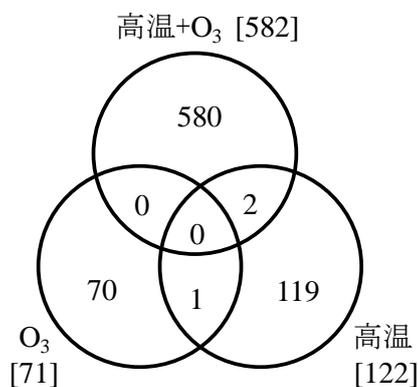
(6) 高温、オゾン、または複合ストレスによる収量変化に関連する遺伝子の調査

高温、オゾン、または複合ストレスによる収量変化に関連する遺伝子を調べるために、各品種の収量変化パラメーターと各品種のイネDNAチップでの遺伝子の発現誘導レベルとの間の相関テストを行った。収量データはサブテーマ(1)から提供されたもの、収量変化パラメーターはサブサブテーマ(3)の1)で調べたものを用いた。このテストのためには、イネDNAチップ上の遺伝子全ての発現レベルが必要であった。マイクロアレイ分析での生データを得るために、上記のマイクロアレイ分析において2つの異なる段階の標準化を行った。まず、順方向実験での各スポットの T^{Cy5}

シグナルと C^{Cy3} シグナルとの比率値と、逆方向実験での C^{Cy5} シグナルと T^{Cy3} シグナルとの比率値を、LOWESS（局所重み付き直線回帰）補正を用いて標準化した。次に、各スポットについての \log 比の値を、 $\log_2 F_{1st} = \log_2 [T^{Cy5}/C^{Cy3}]$ 及び $\log_2 F_{2nd} = \log_2 [C^{Cy5}/T^{Cy3}]$ のように計算した。最後に、残った遺伝子特異的な色素の偏りを修正するために、サンプル1個あたり色素を交換して2個のアレイを用いて、各遺伝子の平均倍率値（M）を $M = 1/2[\log_2 F_{1st} - \log_2 F_{2nd}]$ のように計算した。

穂または種子における高温による収量変化と緊密に関わる可能性がある候補遺伝子を見つけるために、3つの基準を満たす遺伝子を選択した。まず、発現誘導レベルがイネ6品種における収量変化の違いと正または負の関連を持つ遺伝子のみを選択するために、各遺伝子に対して、相関テストを行った。この相関テストでは、エクセルプログラムを用いて、各遺伝子の発現誘導レベル（M値）と収量変化パラメーターとの間の相関係数（R）を計算した、相関係数の高い（ ≥ 0.8 または ≤ -0.8 ）遺伝子を選択した（第1基準）。次に（第2基準）、各品種の収量変化を比較すると、1品種（にこまる）と3品種（きらら397、タカナリ、日本晴）の間に有意差があることが示されたため、“にこまる”と3品種のM値に有意差（ $p < 0.05$ ）のある遺伝子を選択した。第3基準では、M値の差を-1未満か+1超に設定した。穂または種子におけるオゾンまたは複合ストレスによる収量変化と緊密に関わる候補遺伝子の調査も、同様の手順を用いて行い、その結果、高温、オゾン、複合ストレスにさらした穂においては、それぞれ122、71、582個の遺伝子を、種子においては167、144、782個の遺伝子を選択した（図-3-2-7）。その中で、穂においては119、70、580個の遺伝子、種子においては156、128、758個の遺伝子が、それぞれ高温、オゾン、複合ストレスに特異的であった（図-3-2-7）。

収量影響と相関のある穂の遺伝子数



収量影響と相関のある種子の遺伝子数

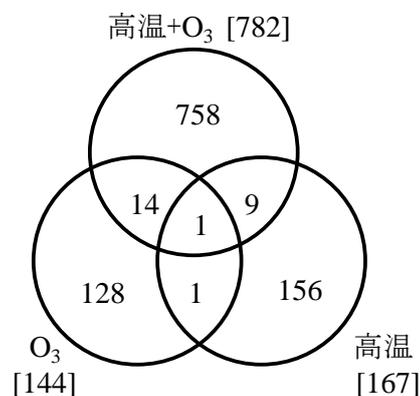


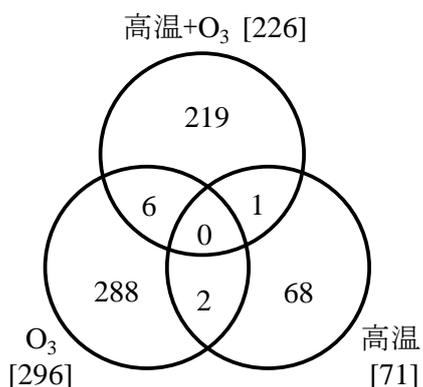
図-3-2-7 穂（左図）及び種子（右図）における高温、オゾン、複合ストレスによる収量変化と相関のある遺伝子の数

（7）高温、オゾン、または複合ストレスによる米の品質への影響に関連する遺伝子の調査

高温、オゾン、または複合ストレスによる米の品質への影響に関連する遺伝子を調べるために、各品種の玄米のタンパク質含量および粳の不稔歩合への影響パラメーターと各品種のイネDNAチップでの遺伝子の発現誘導レベルとの間の相関テストを行った。玄米のタンパク質含量および不

稔歩合のデータはサブテーマ(1)から提供されたものを用い、収量変化との相関を調べたのと同様の方法で調査した。その結果、玄米のタンパク質含量への影響と相関する遺伝子として、高温、オゾン、複合ストレスにさらした穂においては、それぞれ71、296、226個の遺伝子を、種子においては76、301、321個の遺伝子を選択した(図-3-2-8)。その中で、穂においては68、288、219個の遺伝子、種子においては72、288、310個の遺伝子が、それぞれ高温、オゾン、複合ストレスに特異的であった(図-3-2-8)。

玄米のタンパク質含量への影響と相関のある穂の遺伝子数



玄米のタンパク質含量への影響と相関のある玄米の遺伝子数

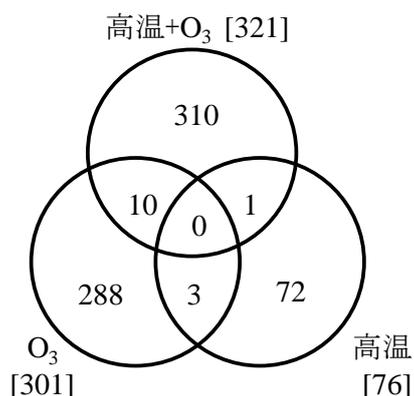


図-3-2-8 穂(左図)及び種子(右図)における高温、オゾン、複合ストレスによる玄米のタンパク質含量への影響と相関のある遺伝子の数

籾の不稔歩合への影響と相関のある穂の遺伝子数

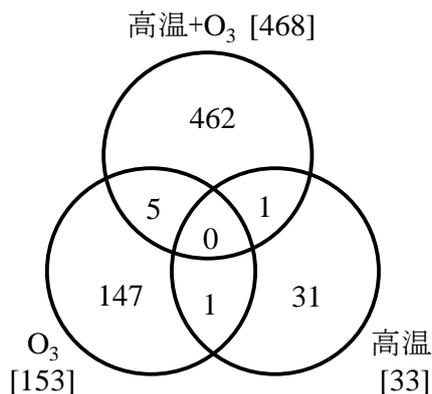


図-3-2-9 穂における高温、オゾン、複合ストレスによる籾の不稔歩合への影響と相関のある遺伝子の数

高温、オゾン、またはこれらの複合ストレスによる籾の不稔歩合の増加は、穂への影響を介していると考えられる。不稔歩合への高温、オゾン、複合ストレスの影響と相関する穂の遺伝子として、それぞれ33、153、468個の遺伝子を選択した(図-3-2-9)。この場合には、相関係数 ≥ 0.8 または ≤ -0.8 では、高温影響と相関のある遺伝子は得られなかったので、 ≥ 0.7 または ≤ -0.7 を

基準とした。この中で、31、147、462個の遺伝子が、それぞれ高温、オゾン、複合ストレスに特異的であった（図-3-2-9）。

（8）収量変化と関連する候補遺伝子の機能的経路についての概観

穂及び種子において、高温、オゾン、または複合ストレスのいずれかによる収量変化と関連する遺伝子を選択した（図-3-2-7）。それらの遺伝子をMapMan⁸⁾に従って分類し、それらの注釈による機能を、アジレント社の4×44KイネDNAチップ上の全ての遺伝子のために新たに構築したイネマッピングファイルに基づき、MapManプログラムを用いて視覚化した。前述のマッピングファイルは、MapCaveツール（<http://mapman.gabipd.org>）を用いて自動検索により確立したもので、*Arabidopsis thaliana* TAIR8、*Arabidopsis thaliana* TAIR9、*Hordeum vulgare*、*Oryza sativa* TIGR5、SwissProt/PPAP、*Vitis vinifera* Gene Index R5という6つの異なるデータベースとリンクしており、GeneSpringプログラム（GX10版、アジレント社）から出されているDNAチップ上の全遺伝子の系統名を備えている。

MapMan分析によると、種子と穂の両方における高温による収量変化と関連する遺伝子では、ほとんどのエチレンシグナル伝達系遺伝子が感受性品種よりも耐性品種で誘導されたが、大多数のシグナル伝達関連遺伝子は、穂においては抑制された。種子と穂におけるオゾンによる収量変化と関連する遺伝子では、耐性品種で7つのタンパク質分解、1つのレドックス、1つのペルオキシダーゼ、1つのオーキシシグナル伝達関連遺伝子が種子において誘導されたが、1つのジャスモン酸（JA）と2つのシグナル伝達関連遺伝子が穂において誘導された。種子及び穂における複合ストレスによる収量変化と関連する遺伝子では、エチレンシグナル伝達及び細胞壁関連遺伝子が、耐性品種の種子においてはそれぞれ誘導及び抑制されたが、穂においては逆に抑制及び誘導された。

（9）オゾンにさらして生育させたイネにおける種子代謝産物プロファイリング

2009年度に赤城試験センターの大型OTCのX2.0区（日平均オゾン濃度が71.2-74.9 ppb）で生育させた“日本晴”の種子においては、解糖/グリコーゲン合成、ペントースリン酸、TCAサイクル、GABAシャント、尿素サイクル、アミノ酸、及びヌクレオチド代謝産物経路にグループ分けされる66の代謝産物が、CE-TOF-MS分析を用いて検出された。GABA、ウラシル、グルタチオンを含む3つの代謝産物の量は、対照種子における量の2倍以上増加した。これは、これらの代謝産物がオゾンに関連する何らかの役割を担っていることを示している。

（10）穂と種子における分子マーカーの分析によるイネの高温・オゾン影響評価法

高温、オゾン、またはそれらの複合により影響を受けるイネの収量、品質（玄米のタンパク質含量）、籾の不稔歩合と相関のある遺伝子発現マーカーが多数得られたが、その中でも特に良い相関を示し、また、発現誘導の品種間差が大きいものを選択した（図-3-2-10～14）。これらの相関関係を利用することにより、遺伝子発現マーカーを調べることによって、高温・オゾン影響を評価することが可能になった。

図-3-2-10～14に示した遺伝子発現マーカーの一覧を表-3-2-1に示した。これらの遺伝子は、耐性品種の育種に利用できる可能性があると考えられる。

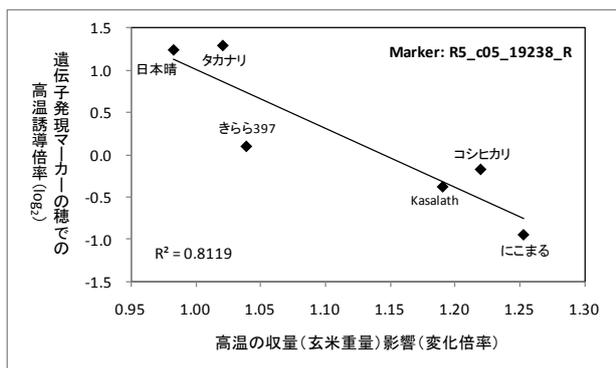
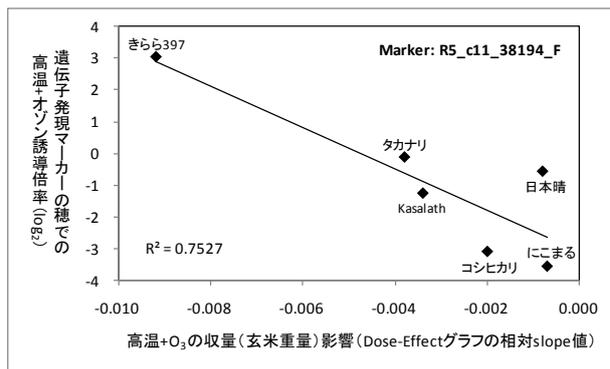
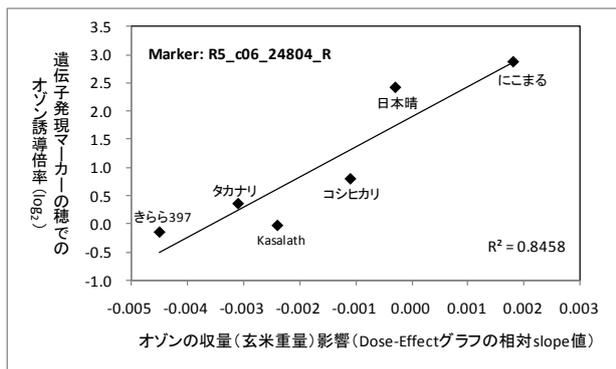


図-3-2-10 穂の遺伝子発現マーカーとオゾン (左上図)、高温 (左下図)、高温+オゾン (右上図) の収量影響との相関

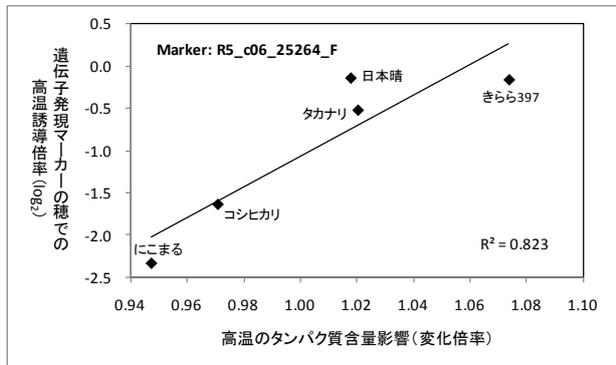
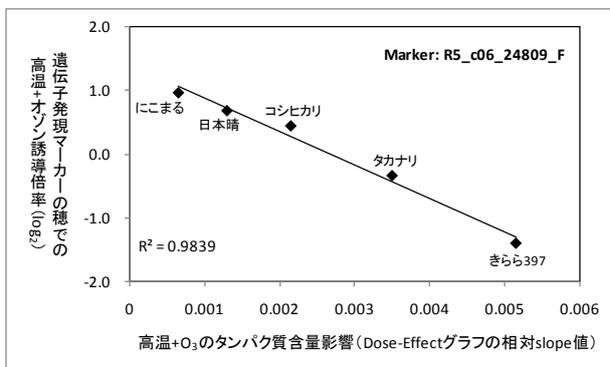
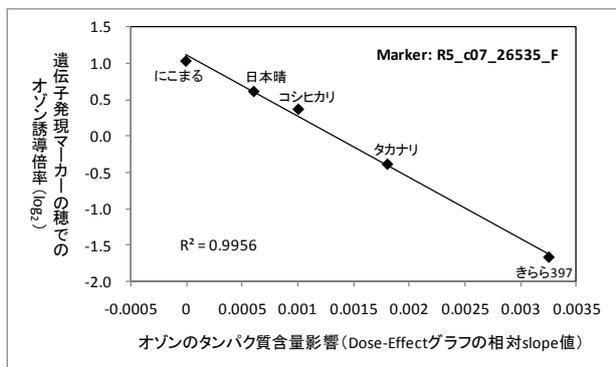


図-3-2-11 穂の遺伝子発現マーカーとオゾン (左上図)、高温 (左下図)、高温+オゾン (右上図) の玄米のタンパク質含量影響との相関

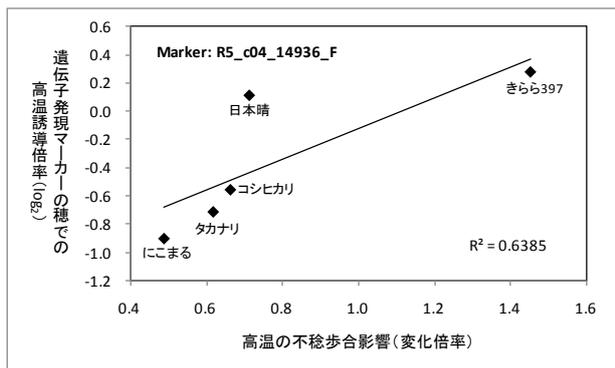
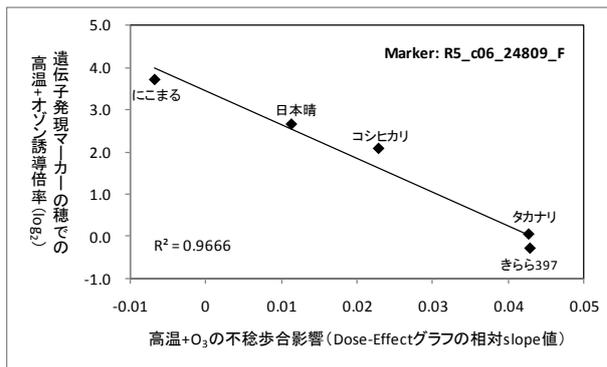
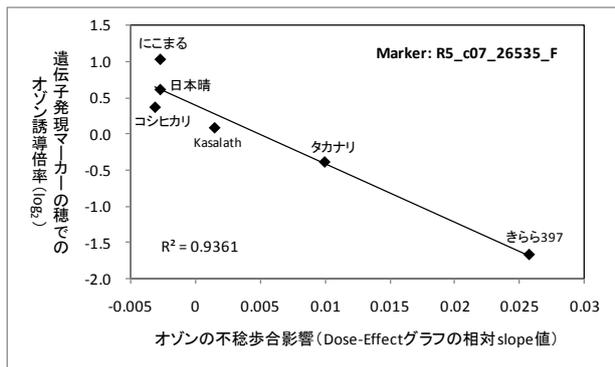


図-3-2-12 穂の遺伝子発現マーカーとオゾン（左上図）、高温（左下図）、高温+オゾン（右上図）の不稔歩合影響との相関

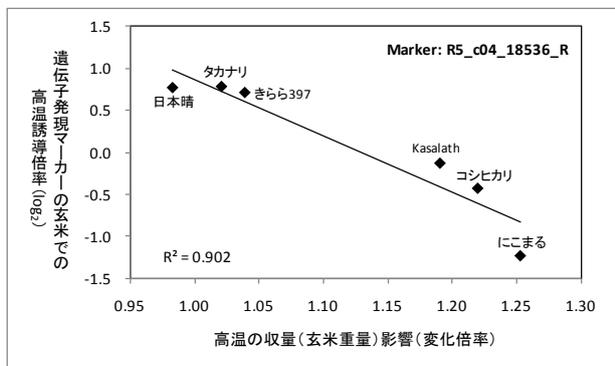
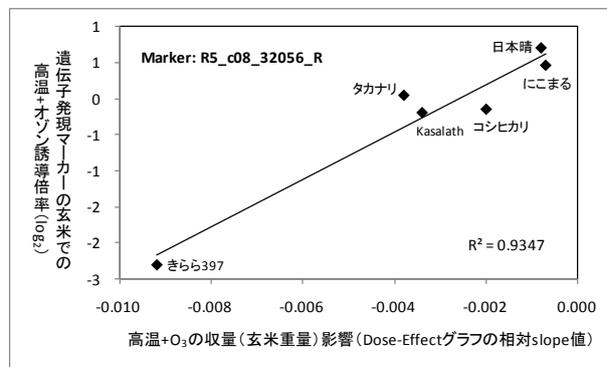
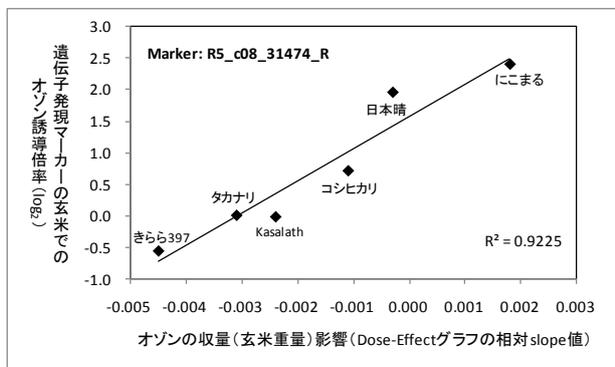


図-3-2-13 種子の遺伝子発現マーカーとオゾン（左上図）、高温（左下図）、高温+オゾン（右上図）の収量影響との相関

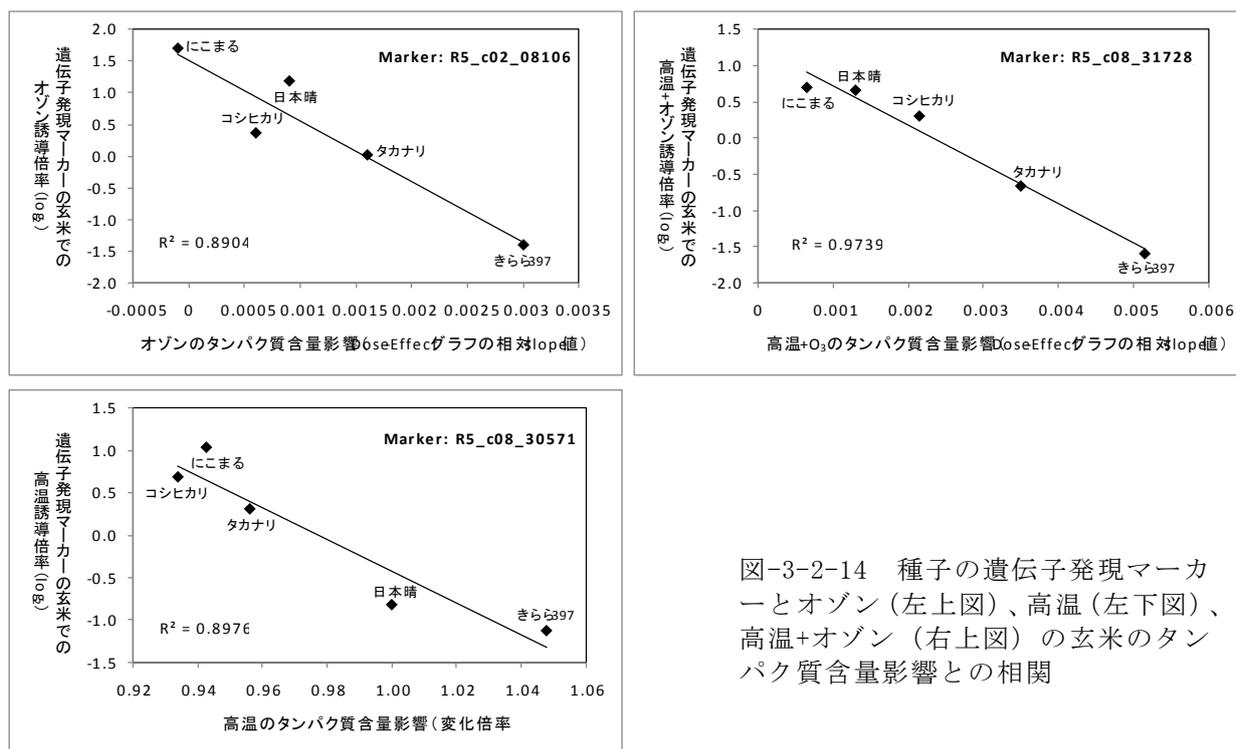


図-3-2-14 種子の遺伝子発現マーカーとオゾン (左上図)、高温 (左下図)、高温+オゾン (右上図) の玄米のタンパク質含量影響との相関

表-3-2-1 影響評価に利用できる遺伝子発現マーカー

プローブ名	発現部位	ストレス	影響	注釈
R5_c05_19238_R	穂	高温	収量	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
R5_c06_24804_R	穂	オゾン	収量	receptor-like protein kinase precursor
R5_c11_38194_F	穂	高温+オゾン	収量	cycloartenol synthase
R5_c06_25264_F	穂	高温	玄米タンパク質含量	fibroin heavy chain precursor
R5_c07_26535_F	穂	オゾン	玄米タンパク質含量	hypothetical protein
R5_c04_16331_F	穂	高温+オゾン	玄米タンパク質含量	NAE
R5_c04_14936_F	穂	高温	不稔歩合	expressed protein
R5_c07_26535_F	穂	オゾン	不稔歩合	hypothetical protein
R5_c06_24809_F	穂	高温+オゾン	不稔歩合	vignain precursor
R5_c04_18536_R	種子	高温	収量	Cyclin-like F-box domain containing protein.
R5_c08_31474_R	種子	オゾン	収量	Similar to 4-coumarate-CoA ligase 1
R5_c08_32056_R	種子	高温+オゾン	収量	Similar to Auxin efflux carrier component 1
R5_c08_30571_R	種子	高温	玄米タンパク質含量	hypothetical protein
R5_c02_08106_R	種子	オゾン	玄米タンパク質含量	E3 ubiquitin ligase EL5 (EC 6.3.2.-).
R5_c08_31728_R	種子	高温+オゾン	玄米タンパク質含量	Non-protein coding transcript

(11) 結論

本研究では、穂および種子における分子マーカーを調べ、オゾンと高温の単独および複合影響を評価するために、2種類の独立した分析を行った。第1は、種子中の分子マーカーの分析によるオゾンの影響に関する研究である。この研究では、野外でオゾンに暴露されたイネ品種における形態的变化 (例えば、生長低下および収量減少) が観察され、“タカナリ” はオゾン感受性であ

り、“コシヒカリ”はオゾン耐性であることが示唆された。さらに、DNAマイクロアレイ分析を用いたイネ2品種の種子中のオゾン応答性遺伝子の遺伝子発現プロファイルから、“タカナリ”は“コシヒカリ”よりオゾンに感受性が高いことが明らかとなり、これは形態学的データと合致し、相関するものであった。野外でオゾンに暴露させた“タカナリ”および“コシヒカリ”におけるDNAマイクロアレイ分析を用いた各遺伝子の転写産物レベルと2品種の収量減少との相関から、総計245遺伝子が“タカナリ”での収量減少に関連していることが明らかになった。収量減少に関係して選択された遺伝子の機能分類は、IAA、JA、デンプン代謝、脂質およびアミノ酸代謝、およびタクサンおよびフラボノールといった二次代謝に関与したものである。

次に、高温、オゾン、または複合ストレスが6種のイネ品種の収量・品質等に及ぼす影響を評価するため、イネの2つの異なる成長段階である穂と種子の組織における各ストレスに対するゲノム規模での転写プロファイリング、及び相関テストを行った結果、穂または種子における、高温、オゾン、または複合ストレスによる収量変化等と関連する信頼度の高い多数の遺伝子のインベントリが作成できた。これらの遺伝子の機能に基づくマッピングによる耐性品種と感受性品種の比較では、(1)高温では耐性品種の穂と種子でエチレンシグナルのレベルが高いこと、(2)オゾン暴露では耐性品種の穂でJAシグナルのレベルが高く、種子でオーキシシグナルのレベルが高いこと、(3)複合ストレスでは耐性品種の穂でエチレンシグナルのレベルが低く、種子で高いことなどが示唆され、ストレスや組織の違いによりストレス耐性に関与する分子応答がかなり異なることが明らかになった。さらに、オゾンにさらしたイネ植物体の種子での代謝産物プロファイリングでは、GABA、ウラシル、グルタチオンの蓄積が明らかになった。

以上のような研究により、遺伝子発現マーカーの誘導レベルと高温、オゾン、または複合ストレスによる収量・品質影響との相関が明らかになり（図-3-2-10~14）、このような相関関係を利用した影響評価が可能になった。例えば、前述の6品種のいくつかと共にオゾン感受性が未知の品種を野外オゾンにさらし、これらの遺伝子発現マーカーのレベルを比較することで、OTCを使わなくても、未知品種のオゾン感受性を評価できる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究によって、イネの穂と種子における分子マーカーの高温・オゾンによる変化及びその品種間差が明らかになった。穂や種子の分子マーカーの分析により、高温・オゾンによる収量・品質影響を評価する手法が開発できた。特に、種子は保存・運搬が容易なため、この手法により海外も含めた広域的な試料の分析・評価が可能になったと考える。さらに、これらの分子マーカーの解明は高温・オゾン影響メカニズムの解明や耐性品種の選択・育種に繋がると考える。

(2) 環境政策への貢献

穂や種子の分子マーカーを利用した新しい影響評価手法の確立により、温暖化時のオゾン影響評価の効率化に寄与できるとともに、適応策のための栽培品種の選択・育種に活用できる遺伝子情報の提供が可能となったことから、アジアの開発途上国における食糧供給戦略の構築に本成果の活用が期待される。

6. 引用文献

- 1) Dentener, F., D. Stevenson, K. Ellingsen T. van Noije, M. Schultz, M. Amann, C. Atherton, N. Bell, D. Bergmann, I. Bey, L. Bouwman, T. Butler, J. Cofala, B. Collins, J. Drevet, R. Doherty, B. Eickhout, H. Eskes, A. Fiore, M. Gauss, D. Hauglustaine, L. Horowitz, I. S. A. Isaksen, B. Josse, M. Lawrence, M. Krol, J. F. Lamarque, V. Montanaro, J. F. Müller, V. H. Peuch, G. Pitari, J. Pyle, S. Rast, J. Rodriguez, M. Sanderson, N. H. Savage, D. Shindell, S. Strahan, S. Szopa, K. Sudo, R. Van Dingenen, O. Wild, and G. Zeng (2006) The global atmospheric environment for the next generation. *Environ. Sci. Technol.* 40:3586-3594.
- 2) Omasa, K., H. Saji, S. Youssefiam, and N. Kondo (2002) Air pollution and plant biotechnology: Prospects for phytomonitoring and phytoremediation, Springer-Verlag, Tokyo.
- 3) Feng, Z. Z. and K. Kobayashi (2009) Assessing the impacts of current and future concentrations of surface ozone on crop yield with meta-analysis. *Atmos. Environ.* 43:1510-1519.
- 4) Tamaoki, M., N. Nakajima, A. Kubo, M. Aono, T. Matsuyama, and H. Saji (2003) Transcriptome analysis of O₃-exposed *Arabidopsis* reveals that multiple signal pathways act mutually antagonistically to induce gene expression. *Plant Mol. Biol.* 53:443-456.
- 5) Agrawal, G. K., R. Rakwal, M. Yonekura, A. Kubo, and H. Saji (2002) Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics* 2:947-959.
- 6) Cho, K., J. Shibato, G. K. Agrawal Y.-H. Jung, A. Kubo, N.-S. Jwa, S. Tamogami, K. Satoh, S. Kikuchi, T. Higashi, S. Kimura, H. Saki, Y. Tanaka, H. Iwahashi, Y. Masuo, and R. Rakwal (2008) Integrated transcriptomics, proteomics, and metabolomics analyses to survey ozone responses in the leaves of rice seedling. *J. Proteome Res.* 7:2980-2998.
- 7) Suzuki, Y., T. Mae, and A. Makino (2008) RNA extraction from various recalcitrant plant tissues with a Cethyltrimethylammonium bromide-containing buffer followed by an acid guanidium thicyanate-phenol-chloroform treatment. *Biosci. Biotech. Biochem.* 72:1951-1953.
- 8) Usadel, B., F. Poree, A. Nagel, M. Lohse, A. Czedik-Eysenberg, and M. Stitt (2009) A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: a case study in the crop species, Maize. *Plant, Cell Environ.* 32:1211-1229.

7. 国際共同研究等の状況

なし

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり)>

- 1) Cho, K., S. Tiwari, S. B. Agrawal, N. L. Torres, M. Agrawal, A. Sarkar, J. Shibato, G. K. Agrawal, A. Kubo, and R. Rakwal (2011) Tropospheric ozone and plants: Absorption, responses and consequences. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 212:61-111.

<査読付論文に準ずる成果発表>

なし

<その他誌上発表（査読なし）>

なし

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) Cho, K., A. Kubo, J. Shibato, K. Satoh, S. Kikuchi, G. K. Agrawal, and R. Rakwal (2010) Investigating the effects of ozone on rice by analysis of seed transcriptomes in two different ozone-fumigated rice cultivars. 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

なし

(6) その他

なし