

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18626

研究課題名(和文) microRNAを介したイネ種子根の皮層細胞層数の制御

研究課題名(英文) microRNA-mediated regulation of several cortical cell layers in rice seminal root

研究代表者

高橋 実鈴 (NOSAKA-TAKAHASHI, Misuzu)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：20738091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：イネの根は根端分裂組織で内皮細胞が分裂を繰り返すことで複数層の皮層細胞を形成する。イネのT11-22-2変異体は皮層細胞層数の増加により種子根が太くなり、原因遺伝子はmicroRNAの合成に関わるOsDCL1をコードしている。そこで本研究はイネの複数層の皮層細胞の形成がmicroRNAの制御を受けているか明らかにすることを目指した。その結果、Class III homeodomain leucine zipper転写因子をコードしている2つのOSHB遺伝子がmicroRNAの制御を受けて根の太さや長さの決定に関与する可能性の高いことがわかった。

研究成果の概要(英文)：In rice seminal root, several layers of cortex cells are formed by repeated periclinal division of endodermis cells in the root apical meristem region. Seminal root of T11-22-2 mutant is thicker than that of wild type. This is because of the increased number of cortical cell layers in the seminal root of mutant. The causal gene of T11-22-2 mutant encodes OsDCL1, which is related to microRNA biosynthesis. Thus, in this research, we aimed to clarify the formation of several cortical cell layers in rice seminal root possibly regulated by microRNA. As a result, we found that the expression of two genes in OSHB family, which encode transcription factors in Class III homeodomain leucine zipper family, are regulated by microRNA and related to the control of root thickness and length.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：種子根 皮層 発現制御 microRNA イネ

### 1. 研究開始当初の背景

(1)イネ T11-22-2 変異体は皮層細胞層数の増加により種子根が太くなる

イネの根は根端分裂組織において1層の内皮細胞が分裂を繰り返すことで、複数層の皮層細胞を形成する。イネの T11-22-2 変異体は wild type に比べて種子根が太く長くなり、種子根が太くなる原因は皮層細胞層数の増加によることがわかった。T11-22-2 変異体の原因遺伝子は microRNA の合成に関わる OsDCL1 をコードしており、イネの皮層細胞層数は microRNA による制御を受けていることが予想された。T11-22-2 変異体と似た表現型を示す crl2-like 変異体は wild type と比べて冠根が出ず、種子根が太く長くなる。crl2-like 変異体の原因遺伝子は miRNA の輸送や安定性に関わる HASTY 遺伝子であった。よって miRNA を介した制御機構がイネの複数層の皮層細胞の形成に関与することが強く示唆された。

(2)シロイヌナズナの皮層形成は miRNA による制御を受けている

miRNA を介した皮層細胞層数の制御についてはシロイヌナズナにおいて先行事例が報告されている。シロイヌナズナの Class III homeodomain leucine zipper (HD-ZIP) 転写因子をコードしている AtPHB 遺伝子は内皮細胞の並層分裂を正に制御しており、AtPHB 遺伝子が miR165 による負の発現制御を受けることで皮層細胞層が1層に制限されている。AtPHB 遺伝子のオルソログであるイネの OSHB 遺伝子は miR166 の制御を受けているという報告がある。よってイネにおいても miR166 による OSHB 遺伝子の負の制御が皮層細胞層数の決定に関与する可能性がある。シロイヌナズナの皮層細胞層数は1層であるのに対して、イネの複数層の皮層細胞がどのように miRNA による制御を受けているか明らかにしたいと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究はイネの種子根の太さが、どのように制御されているか明らかにするため、種子根において複数層からなる皮層細胞層の形成に着目して研究を進めた。イネの種子根が太くなる変異体(Osdcl1 変異体や Oshasty 変異体)と wild type において OSHB 遺伝子やその下流で働く遺伝子の発現を比較することで、miR166 による OSHB 遺伝子の発現制御がイネの種子根における皮層細胞層の形成をどのように制御しているのか明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

(1)miR166 の種子根における時空間的発現を調べる

OSHB 遺伝子改変イネを用いて種子根における miR166 局在を明らかにする

miR166 はイネゲノム上に13コピー存在し、各コピーによって miR166 前駆体の配列も miR166 最終産物の配列も異なる。13コピーのうち、どの miR166 が種子根で機能しているか明らかでないため、miR166 の標的である OSHB 遺伝子の miR166 認識配列に着目して実験を進めた。CRISPR 法により miR166 に認識されない改変型 OSHB 遺伝子を持つイネを作出し、通常型の OSHB 遺伝子を持つ wild type と種子根における OSHB 遺伝子の発現を比較することで、イネの種子根における miR166 の局在を明らかにする。

miR166 発現低下イネにおける OSHB 遺伝子の発現領域を明らかにする

miR166 が発現している wild type と miR166 の発現が無い若しくは低いと予想される T11-22-2 変異体と crl2-like 変異体において、標的である OSHB 遺伝子の種子根における発現領域を調べることで、miR166 の有無が皮層細胞の形成に及ぼす影響を明らかにする。

(2)OSHB 遺伝子の種子根における時空間的発現を調べる

OSHB 遺伝子はイネゲノム上に5コピー存在するので、OSHB1-5 の種子根における発現を明らかにする。T11-22-2 変異体、crl2-like 変異体と wild type において、OSHB 遺伝子の転写量についてはリアルタイム PCR 法、OSHB 遺伝子の mRNA 局在については in situ ハイブリダイゼーション法により調べる。

(3)内皮細胞のマーカである SCR 遺伝子の種子根における時空間的発現を調べる  
両変異体と wild type において内皮細胞のマーカである SCR 遺伝子の発現を in situ ハイブリダイゼーション法により調べる。

#### 4. 研究成果

(1)イネの種子根が太くなる変異体で共通して発現上昇する OSHB 遺伝子を同定した  
イネの種子根が太くなる変異体(T11-22-2 変異体と crl2-like 変異体)と wild type の種子根における OSHB1-5 の発現量をリアルタイム PCR 法によって解析した結果、種子根の根端領域では、ある 1 つの OSHB 遺伝子の発現上昇が共通して検出された。よってイネの種子根における皮層形成は miR166 による OSHB 遺伝子の発現制御を受けていると考えられた。

(2)miR166 に認識されない改変型 OSHB 遺伝子をもつイネは根の短い表現型を示した  
miR166 の種子根における時空間的発現を調べるために miR166 に認識されない改変型 OSHB 遺伝子をもつイネの作出を試みた。その結果、1 つの OSHB 遺伝子について miR166 に認識されない改変型 OSHB 遺伝子をもつイネが作出できた。その改変型 OSHB 遺伝子をもつイネは根の短い表現型を示した。よって OSHB 遺伝子は根の太さだけでなく、長さの決定にも関与することが考えられた。

(3)根の太さや長さの決定に関与すると考えられた 2 つの OSHB 遺伝子は miRNA により発

現領域が中心柱に制限されていた

イネの種子根が太くなる変異体と wild type の種子根において、着目した 2 つの OSHB 遺伝子の発現領域を in situ ハイブリダイゼーション法により検出した結果、wild type と比べて変異体では中心柱の外側まで 2 つの OSHB 遺伝子の発現領域が拡大していた。よって、根の太さや長さの決定に関与する可能性の高い 2 つの OSHB 遺伝子は miR166 の負の制御により発現領域が中心柱に制限されていると考えられた。またイネの種子根ではコルメラ始原細胞においても 1 つの OSHB 遺伝子の発現が見られた。

イネの種子根が太くなる変異体と wild type の種子根において、内皮細胞のマーカである SCR 遺伝子の発現領域を in situ ハイブリダイゼーション法により検出した結果、変異体では wild type と比べて SCR の発現している細胞群に乱れがあった。よって変異体では内皮細胞の細胞列が乱れていることが予想された。

(4)得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究によりイネ種子根において 2 つの OSHB 遺伝子が miR166 の制御を受けて根の太さや長さの決定に関与する可能性を示せた。本研究に類似した植物の根の内皮と皮層に着目した研究論文は本研究期間内に国内外で 2 報発表されている。1 報目はシロイヌナズナの根における皮層 / 内皮始原細胞とその娘細胞の数が増加する変異体についての報告であり、2 報目は 2 層の皮層を持つシロイヌナズナ近縁種の根における miR165/166 による PHB 発現制御についての報告である。イネの種子根における内皮細胞は根端分裂組織において分裂を繰り返して複数層の皮層細胞を形成するため、本研究により miR166 による OSHB 発現制御を介した複数層の皮層細胞形成機構が明らかになれば、そのインパクト

は大きいと予想される。加えてイネの皮層細胞層数の制御機構が明らかになれば、皮層細胞層数に着目した育種が行えるようになり、耐湿性を向上する育種技術に応用できる可能性がある。

#### (5)今後の展望

根の太さや長さは作物の根系形態を決定する重要な要素である。イネの T11-22-2 変異体および *crl2-like* 変異体はいずれも wild type に比べて種子根が太く長い表現型を示す。皮層細胞層数と根長との関係は未解明な部分が多く、今後、本研究は両変異体の根端分裂組織における分裂活性を精査し、分裂活性と miRNA 制御との間に関連性が見られるか明らかにしたい。

#### <引用文献>

Miyashima, S. et al. (以下3名省略),  
“Non-cell-autonomous microRNA 165 acts in a dose-dependent manner to regulate multiple differentiation status in the Arabidopsis root”, *Development*, 138, 2303-2313 (2011)

Itoh, J-I. et al. (以下3名省略),  
“Developmental role and auxin responsiveness of Class III homeodomain leucine zipper gene family members in rice”, *Plant Physiol.*, 147, 1960-1975 (2008)

Kinoshita, A. et al. (以下20名省略),  
“A plant U-box protein, PUB4, regulates asymmetric cell division and cell proliferation in the root meristem”, *Development*, 142, 444-453 (2015)

Di Ruocco, G. et al. (以下7名省略),  
“Differential spatial distribution of miR165/6 determines variability in plant root anatomy”, *Development*, 145, dev153858 (2018)

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

高橋(野坂)実鈴・佐藤(永澤)奈美子・  
桧原健一郎・犬飼義明、「イネ種子根における OshB 転写産物の解析」、イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2016 (2016年)

高橋(野坂)実鈴・佐藤(永澤)奈美子・  
桧原健一郎・犬飼義明、「イネ種子根における OSHB 遺伝子の発現解析」、日本育種学会第 131 回講演会 (2017年)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋(野坂)実鈴 (NOSAKA-TAKAHASHI, Misuzu)  
国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・  
助教

研究者番号: 20738091