

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570034

研究課題名(和文)

イネ胚発生の器官形成におけるマイクロRNAとオーキシンの制御機構の解明

研究課題名(英文)

Functional Analysis of auxin and microRNA in organ formation during rice embryogenesis

研究代表者：

佐塚 隆志 (TAKASHI SAZUKA)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：70362291

研究成果の概要(和文)：

イネの胚発生突然変異体 *club-shaped embryo1 (cle1)*、*tryptphan deficient dwarf1 (tdd1)*、*club-shaped embryo3 (cle3)* の3系統を用いて、イネ胚の器官形成におけるマイクロRNAやオーキシンによる制御機構について解析を行った。*cle1*、*cle3*は、胚が棍棒状になる変異体であり、*tdd1*は胚が球状になる変異体で、共に器官形成を行うことができない。ポジショナルクローニングの結果、*cle1*の原因遺伝子は*OsDCL1*、*tdd1*はアントラニル酸シンターゼベータサブユニット遺伝子であることが明らかとなった。これらの変異体を用いた詳細な解析の結果、イネの胚発生におけるマイクロRNA及びオーキシンによる制御機構が解明された。また、別の棍棒状胚変異体 *cle3*の原因遺伝子は第6染色体に、また、重力屈性が異常な変異体 *crown root less2 (cr12)*は第1染色体に原因遺伝子が座乗することが明らかとなり、イネの胚発生とオーキシンの関係についての研究基盤が構築された。

研究成果の概要(英文)：

The three rice mutants, *club-shaped embryo1 (cle1)*, *club-shaped embryo3 (cle3)*, *tryptphan deficient dwarf1 (tdd1)* were used to study the regulation for organ differentiation in rice embryogenesis by auxin and miRNA. The embryonic phenotype of two mutants, *cle1* and *cle3*, are *club-shaped*, and that of *tdd1* is globular; the three mutants are defective for the organ formation during embryogenesis. The positional cloning indicates that the responsible genes for *cle1* and *tdd1* are *OSDCL1* and *ASBI*, respectively. The detailed analysis revealed the important regulation by auxin and miRNA for rice embryogenesis. The other two mutants, *cre3* and *tdd1*, were also analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：イネ、胚発生、器官形成、オーキシン、マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

オーキシンは植物の生長や発生過程の多くのプロセスで重要な役割を担っている。しかし、

イネの胚発生におけるオーキシンの役割については分子的理解があまり進んでいなかった。双子葉植物のモデル生物であるシロイヌナズナの胚発生過程の研究から、オ

ーキシンは胚の頂部-基部軸の形成などに重要であることが明らかとなってきたが、単子葉植物と双子葉植物の胚発生は異なる部分があり、単純なアナロジーでは説明できない。つまり、イネの胚発生の研究にはイネの変異体が必要であるが、これまでに確実にオーキシン異常と考えられるイネ変異体（例えばオーキシン合成酵素の変異体）は同定されていなかった。また、イネの胚発生では trans-acting siRNA (tasiRNA) の重要性が示唆されてきたが、tasiRNA の経路と関わらない microRNA (miRNA) の制御はほとんど明らかではなかった。これについては、我々の最近のイネ棍棒状胚突然変異体の研究から、胚における miRNA の合成酵素の異常によって、器官形成能の喪失を導く可能性が示唆されていた。つまり、これまで独立にその重要性が認識されてきたオーキシンと miRNA という二つの因子は、イネの胚発生の器官形成においてはその機能に共通点が見られる。しかし、それらがどのような関係にあり、どのように器官分化を制御しているのかは、これまでほとんど理解が進んでいなかった。

## 2. 研究の目的

イネ胚発生の器官形成において、オーキシンや miRNA の機能はこれまで明らかにされていない。そこで本研究では、イネ胚発生の突然変異体を活用し、植物分子生物学的や植物生理学的なアプローチによって、オーキシンや miRNA の機能について理解を深めることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 棍棒状胚変異体 *club-shaped embryo1* (*cle1*) の原因遺伝子の同定と機能解析

*cle1* とインド稲カサラスとの F<sub>2</sub> 雑種集団を用いたポジショナルクローニングを進める。候補遺伝子は相補性検定により原因遺伝子として同定する。相補性検定は、棍棒状胚変異体系統が胚性致死であるため、ヘテロ型胚を用いる。つまり、ヘテロ型胚からカルスを誘導し、原因遺伝子の野生型ゲノム断片を形質転換する。得られた形質転換体カルスを再分化させ育成したのち、その後代の種子を得る。このうち、遺伝的背景が変異型ホモで、かつ外来の野生型のゲノム断片を持つ個体を選抜する。この個体が正常復帰すれば、その遺伝子が棍棒状胚変異体の原因遺伝子で

あることの証明となる。

### 棍棒状胚変異体で蓄積している miRNA 前駆体の同定

既知の miRNA 前駆体をマイクロアレイ化し、棍棒状胚の全 RNA を用いて、miRNA 前駆体の網羅的発現解析を行う。用いる miRNA は、イネ miRNA の網羅的解析で実績のある米国デラウェア大学の B. C. Meyers 博士と協力し、既知及び彼らの未公開 miRNA データベースから候補配列を抽出し、アジレント社 44K カスタムアレイを作成し、網羅的に miRNA 前駆体の発現解析を進める。

### 棍棒状胚変異体における miRNA167, *ARF6/8*, *GH3* の発現レベルの検証と機能解析

定量的 RT-PCR 法、または *in situ* ハイブリダイゼーション法によって、miRNA167, *ARF6/8*, *GH3* の発現レベルを野生型胚と変異体胚で比較する。また、変異体背景での *ARF8* のアンチセンス RNA の過剰発現、野生型背景での改変 *ARF8* 遺伝子の過剰発現、*ARF8* 機能欠失変異体と棍棒状胚変異体の二重変異体などを作成し、解析を行う。

### 球状胚変異体 *tryptophan deficient dwarf1* (*tdd1*) の原因遺伝子の同定と機能解析

*tdd1* 変異体は、トリプトファン (Trp) 合成経路のアントラニル酸合成酵素に変異が原因である可能性が示唆されており、胚で IAA レベルが低下した変異体の可能性がある。そこで、この原因遺伝子を相補性検定によって証明する。また、Free (活性型) IAA について、野生型、及び変異体胚でのレベルを GC-MS によって定量する。

### 他の棍棒状変異体系統の解析

棍棒状胚変異体には *cle1* 以外の遺伝子座に変異の可能性がある系統 (*cle3*) が同定されている。この遺伝子座を明らかにするとともに、その形態学的解析を行う。

### 他のイネのオーキシン関連変異体系統の解析

イネではオーキシン異常の変異体が明らかではないが、重力屈性が異常な変異体系

統は同定されている。そこで、その原因遺伝子の遺伝子座を明らかにするとともに、その形態学的解析を行う。

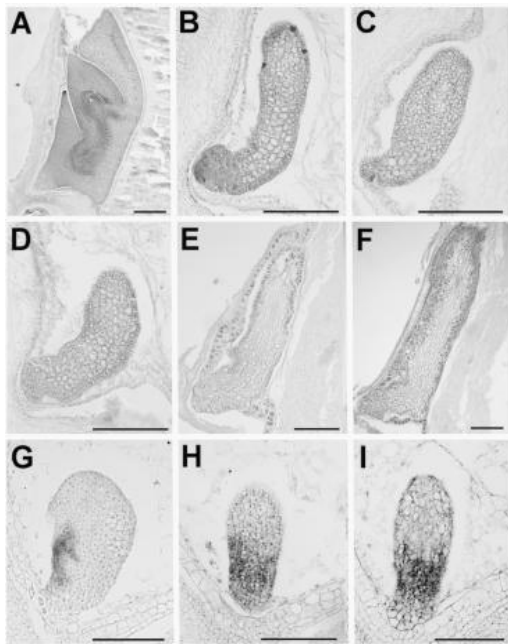
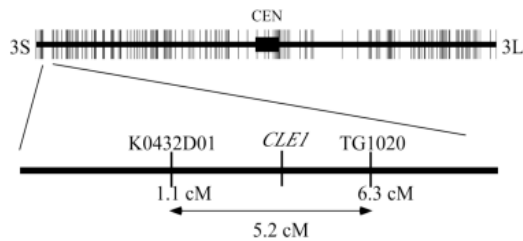


図1 棍棒状胚変異体の表現型と *OSH1* の発現パターン (A-F) 10日胚の表現型、(G-I) *OSH1* の発現パターン。(A, G)野生型, (B, H) *cle1-1*, (C) *cle1-2*, (D) *cle1-3*, (E) *cle1-4*, (F, I) *cle1-5*。

#### 4. 研究成果

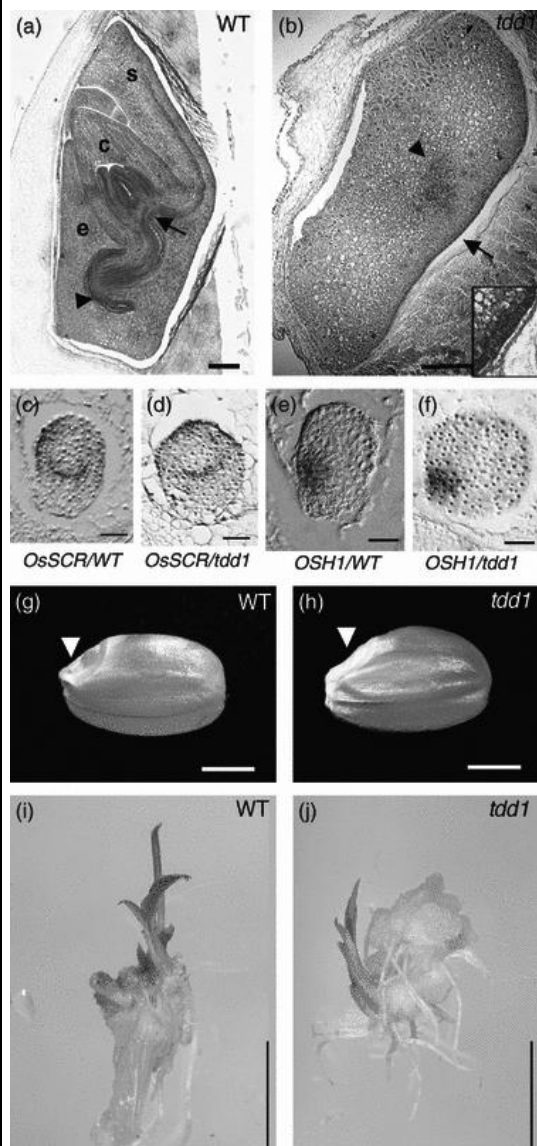
イネ胚発生の器官形成において、オーキシンの制御を明らかにすることを目的に、器官形成能を失った棍棒状胚突然変異体 *cle1* (Imamura et al. 2008), *tdd1* (sazuka et al. 2009), *cle3* (Imamura et al. 2010) の3系統と、重力屈性が異常な変異体 *cr12*



(Yamamoto et al. 2010)、計4系統の解析を進めた結果、次の成果を挙げた。  
図2 第3染色体におけるSTSマーカーと *CLE1* のリンケージマップ

#### *CLE1* のポジショナルクローニングと、変異体における茎頂分裂組織予定領域

棍棒状胚変異体 *cle1* (図1) について、原因遺伝子単離のポジショナルクローニングを進めた結果、原因遺伝子は第3染色体の短腕1.1-6.3 cMの領域内に座乗することが明らかとなった (図2)。この領域内に座乗する候補遺伝子 *OsDCL1* による相補性検定を進めた。その結果、*OsDCL1* が *cle1* の原因遺伝子であることを明らかにした (投稿準備中)。また、茎頂分裂組織予定領域のマーカーである *OSH1* の発現が異常であり、基部領域に発現していたこ



とから、茎頂分裂組織の領域的確立に *CLE1* が関わっていることが考えられた。  
図3 球状胚突然変異体 (*tdd1*) の表現型 (a-b) 野生型胚 (a) と *tdd1* (b) の半切切片。

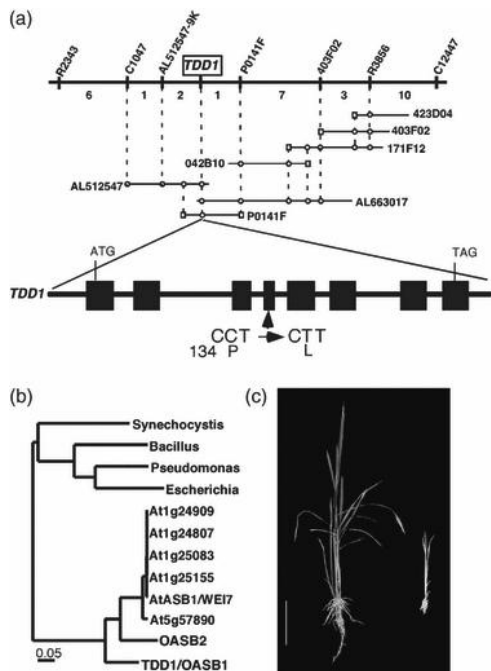
(c-f) OsSCR及びOSH1の発現。(g-h) 野生型(g)と *tdd1*(h)の成熟胚。(i-j) 野生型(g)と *tdd1*(h)の再分化個体。

### 棍棒状胚変異体で蓄積しているmiRNA前駆体の同定

既知のイネmiRNA前駆体配列100以上をアレイ化し、胚 RNAを用いてmiRNA前駆体の網羅的発現解析を行った。その結果、*cle1*胚では特定のmiRNA前駆体(特にmiRNA167)が蓄積していることを明らかにした(投稿準備中)。

### 棍棒状胚変異体における*miRNA167*, *ARF6/8*, *GH3*の発現レベル

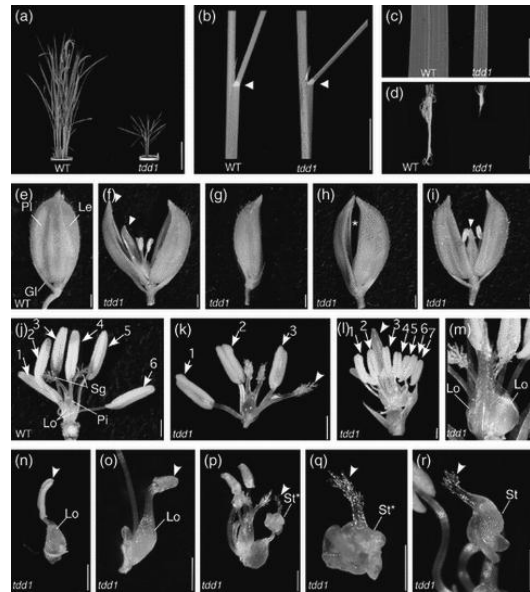
定量的RT-PCR実験によって、*miRNA167*, *ARF6/8*, *GH3*の発現レベルを野生型胚と変異体胚で比較した。その結果、*cle1*胚では野生型に比べ*ARF8*が強く発現していることを明らかにした(投稿準備中)。また、変異体背景での*ARF8*のアンチセンスRNAの過剰発現、野生型背景での改変*ARF8*遺伝子の過剰発現などの解析の結果、*cre1*変異体はmiRNA167のレベル低下によって、ARF8が過



剰となった結果による表現型である可能性が示唆された。

図4 *TDD1*遺伝子のポジショナルクローニング

(a) *tdd1*遺伝子座の高解像度連鎖地図と物理地図。(b) *TDD1*遺伝子産物の系統樹解析。



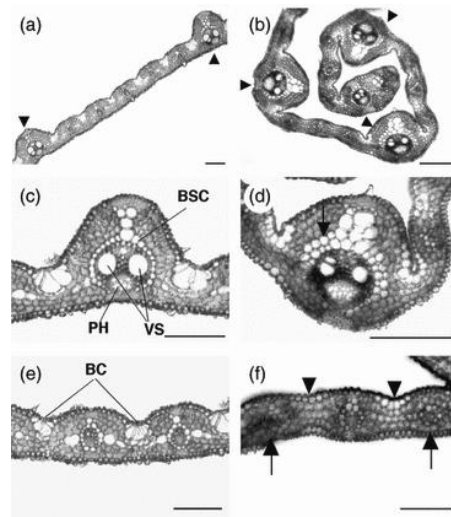
(c)相補性検定。左;*TDD1*遺伝子を形質転換したイネ。右;*tdd1*変異体再分化個体の表現型。

図5 *tdd1*再分化個体の表現型

(a-d)野生型と *tdd1*植物体。(a)草型、(b)ラミナジョイント、(c)葉身、(d)根、(e-r)花の形態。

### *TDD1*のポジショナルクローニングとオーキシン欠乏変異体の証明、及びイネにおけるオーキシンの機能

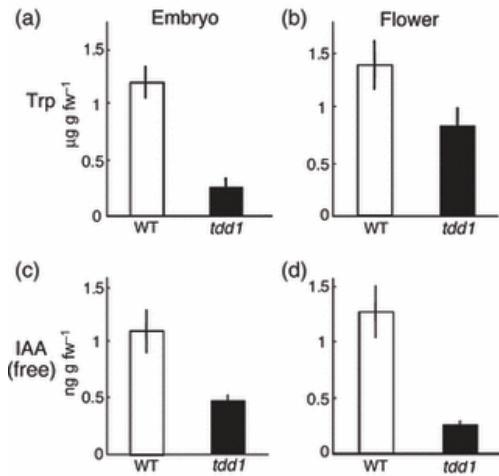
まず、球状胚変異体 *tdd1* (図3) の原因遺伝子のポジショナルクローニングを進めた。その結果、候補領域を約60kbに



狭めた。この領域にはアントラニル酸シンターゼベータサブユニットASB1をコードする遺伝子が座乗しており、*tdd1*変異体でアミノ酸置換を起こしていた。



図6 *tdd1*再分化個体における葉の内部構造

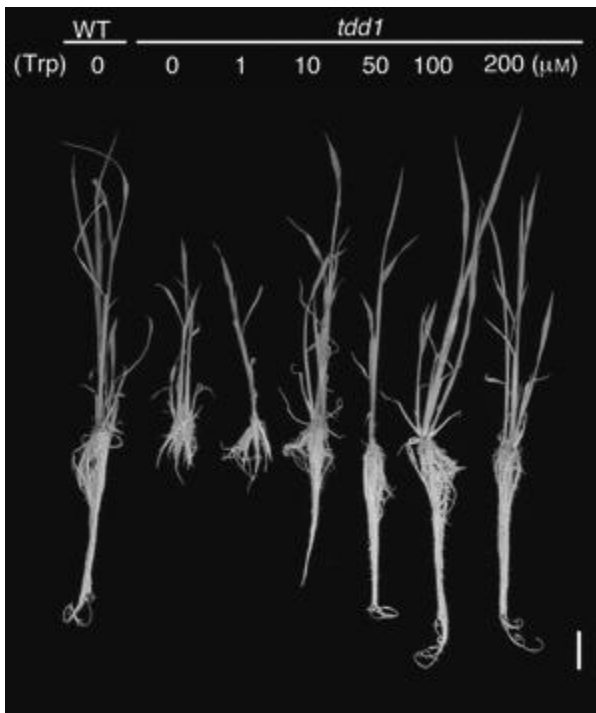


(a, c, e) 野生型、(b, d, f) *tdd1*。(a, b) 葉身、(c, d) 大維管束の拡大図、(e, f) 小維管束の拡大図。Bar = 100 µm。

これが原因遺伝子であることは相補性検定により証明された (図4)。

図7 *tdd1*植物体内のトリプトファン (Trp) と IAA レベル (a, c) 胚、(b, d) 花における trp と IAA レベル。

*tdd1*再分化個体の表現型は、他の植物のオーキシン異常で観察される表現型と近似

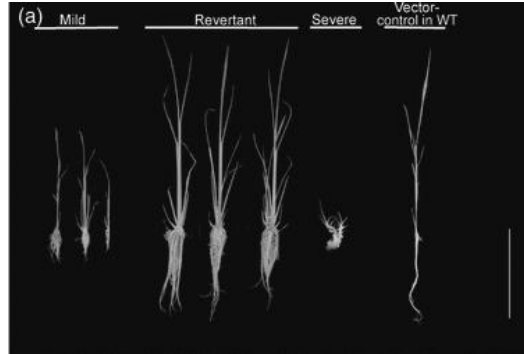


していること (図5、6)、*tdd1*の胚と花では Trp と IAA のレベルが低下していること (図7)、*tdd1* promoter-GUS による発現パ

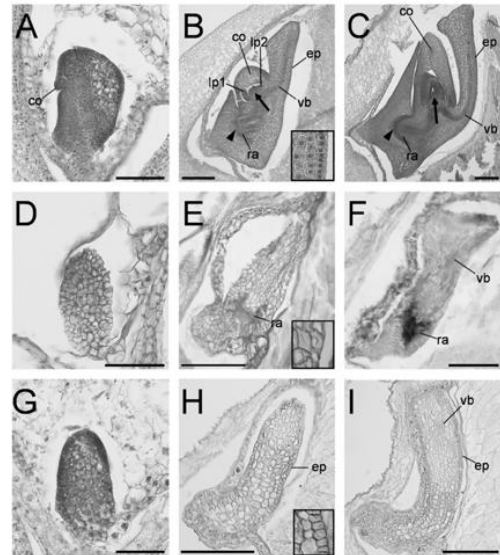
ターンが DR5-GUS のパターンと近似していることを明らかにした。

図8 Trp 供与による *tdd1* 表現型の回復

また、Trp の供与や、IAA 合成酵素の



*OsYUCCA1* を *tdd1* 変異体背景で過剰発現



が、*tdd1* 表現型を回復することから、*tdd1* 変異体は Trp、オーキシンの欠乏変異体であることが明らかになった (図8、9)。

図9 *OsYUCCA1* 過剰発現による *tdd1* 表現型の回復

図10 棍棒状胚変異体 *cle3* の表現型 A-C; 野生型、D-F; *cle3* 変異体、G-I; *cle1* 変異体

#### 他の棍棒状変異体系統の解析

棍棒状胚変異体 *cle3* は、*cle1* と類似の表現型を示す突然変異体であるが (図10)、*cle1* との二重変異体のアレイズム解析から、別の遺伝子が原因であることが明らかとなった。次に、*cle3* ヘテロ系統とインド稲カサラスとの F<sub>2</sub> 種集団を用いて *CLE3* 遺伝子座のラフマッピングを行った。この結果、

*CLE3*遺伝子は第6染色体に座乗することが明らかとなった(Imamura et al. 2010)。

他のイネのオーキシン関連変異体系統の解析  
重力屈性が異常なイネ突然変異体 *crown root less2 (cr12)* について、その表現型と原因遺伝子のラフマッピングを行った。この結果、原因遺伝子は第 1 染色体の 69.3cM から 70.1cM の間に座乗していることが明らかとなった(Yamamoto et al. 2010)。

#### 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)

[雑誌論文] (計 4 件)

1)Imamura, K., Nagato, Y., Matsuoka, M., Kitano, H. and Sazuka, T. Mapping and characterization of the rice gene, *CLUB-SHAPED EMBRYO3, CLE3*. Rice Gen. Newslett. (2010) 25, 27-29.

2)Yamamoto, Y., Inukai, Y., Kitano, H., Sazuka, T. and Matsuoka, M. Characterization and mapping of the *CROWN ROOTLESS2* gene, *CRL2*, in rice. Rice Gen. Newslett. (2010) 25, 25-26.

3)Sazuka, T., Kamiya, N., Nishimura, T., Ohmae, K., Sato, Y., Imamura, K., Nagato, Y., Koshihara, T., Nagamura, Y., Ashikari, M., Kitano, H. and Matsuoka, M. A rice tryptophan deficient dwarf

mutant, *tdd1*, contains a reduced level of indole acetic acid and develops abnormal flowers and organless embryos. Plant J. (2009) 60, 227-241.

4)Imamura, K., Imai, H., Nagato, Y., Matsuoka, M., Kitano, H. and Sazuka, T. Mapping and Analysis of the *CLUB-SHAPED EMBRYO1, CLE1*. Rice Gen. Newslett. (2008) 4, 22-24.

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~naikan/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐塚 隆志 (TAKASHI SAZUKA)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：70362291

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

北野英己 (KITANO HIDEMI)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：50144184