

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2012～2016

課題番号：24380003

研究課題名（和文）イネの発生における脂肪酸合成酵素遺伝子の機能

研究課題名（英文）Roles of genes encoding a fatty acid biosynthesis enzyme on development of rice

研究代表者

伊藤 幸博（Ito, Yukihiro）

東北大学・（連合）農学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：70280576

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,500,000円

研究成果の概要（和文）：イネの発生における脂肪酸合成酵素遺伝子の機能を明らかにすることを目的として、脂肪酸合成に関わる遺伝子の突然変異体の解析を行った。その結果、極長鎖脂肪酸（炭素数が20以上の脂肪酸）が表皮の分化に重要であることがわかった。また、これらの突然変異体と同様な異常を示す受容体型プロテインキナーゼ遺伝子の突然変異体を同定し、脂肪酸と細胞膜を介したシグナル伝達の相互作用が表皮分化に重要である可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：To understand function of a fatty acid biosynthesis gene in rice, analyses of mutants associated with fatty acid biosynthesis were carried out, and it was revealed that very-long-chain fatty acids with the carbon number of 20 or more are important for epidermis development. In addition, a mutant of a receptor-like protein kinase gene was also identified, and its analysis suggested that interaction between signaling throughout plasma membrane and fatty acids are important for proper development of epidermis.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：シュート 脂肪酸 表皮 オーキシシン イネ

1. 研究開始当初の背景

極長鎖脂肪酸は植物の地上部を覆うクチクラの主成分として、植物を乾燥などの環境ストレスから守る物質と知られていた。しかし、イネの極長鎖脂肪酸合成酵素遺伝子の突然変異体の解析から、極長鎖脂肪酸は表皮の分化にも重要な物質である可能性が考えられた。しかし、イネの極長鎖脂肪酸合成酵素遺伝子の突然変異体で正常な表皮分化が見られないのは、極長鎖脂肪酸の合成の欠如が原因ではなく、極長鎖脂肪酸合成酵素が酵素として以外の機能も持っており、それが表皮分化に必要な可能性も考えられた。

いずれの場合も、極長鎖脂肪酸合成酵素遺伝子が、どのようにイネの表皮分化に関わっているかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

極長鎖脂肪酸合成酵素遺伝子の突然変異体が表皮分化に異常を示すことから、極長鎖脂肪酸は植物を環境ストレスから守るだけでなく、イネの表皮の分化にも重要な物質である可能性が考えられた。まずは、この可能性の真偽を検証する。

次に、極長鎖脂肪酸合成酵素遺伝子がイネの表皮の分化に必要なことは明らかにされているが、どのように表皮分化に関わっているかは明らかにされていない。この点を明らかにする。

また、イネにおいては極長鎖脂肪酸合成酵素遺伝子の他にどのような遺伝子が表皮分化に関わっているか明らかにされていない。そこで、そのような遺伝子を見出し、極長鎖脂肪酸合成酵素遺伝子との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 表皮分化の突然変異体の解析

表皮分化に異常を示す突然変異体と同様なシュートの形態異常を示す突然変異体の詳細な表現型観察と原因遺伝子の特定を行う。同定した遺伝子の発現パターンを調べる。

(2) 新たな突然変異体の選抜

変異源処理したイネの集団から、表皮分化に異常を示す突然変異体と同様なシュートの形態異常を示す新たな突然変異体を選抜する。

(3) 極長鎖脂肪酸合成酵素複合体の解析

表皮分化で機能する極長鎖脂肪酸合成酵素複合体の構成因子を同定する。

4. 研究成果

(1) *oni2*突然変異体の解析と原因遺伝子の同定

表皮分化に異常を示す *oni2* 突然変異体の原因遺伝子を同定した。その結果、*ONI2* は既に同定していた *ONI1* と同様に、極長鎖脂肪酸合成酵素 (ketoacyl CoA synthase) をコ

ードすることがわかった。*ONI2* の発現を調べたところ、*ONI2* はシュートの表皮特異的に発現することがわかった。*oni2* 突然変異体は正常な表皮細胞が見られず、表皮のマーカー遺伝子の発現も低下していた。さらに、クチクラの突起も減少し、極長鎖脂肪酸量も減少していた。極長鎖脂肪酸から合成される脂質の組成にも異常が見られた。以上のことから、*ONI2* は表皮の正常な分化に必要な極長鎖脂肪酸合成酵素をコードすることが明らかになった。

(2) *oni3*突然変異体の解析と原因遺伝子の同定

表皮分化に異常を示す *oni3* 突然変異体の原因遺伝子を同定した。その結果、*ONI3* は長鎖脂肪酸 アルコールデヒドロゲナーゼをコードすることがわかった。*ONI3* の発現を調べたところ、*ONI3* は *ONI2* 同様にシュートの表皮特異的に発現することがわかった。*oni3* 突然変異体の表現型も *oni2* 突然変異体と同様で、表皮の異常やクチクラの突起の減少が見られた。さらに、長鎖脂肪酸の生合成酵素をコードするものの、極長鎖脂肪酸量の減少や脂質組成の異常も見られた。以上のことから、*ONI3* は長鎖脂肪酸の生合成を介して極長鎖脂肪酸や脂質の量や組成に影響を及ぼし、表皮の分化に関わることが推測された。

(3) *ONI2* と複合体を形成する因子の同定

極長鎖脂肪酸の合成は、4 つの酵素反応により炭素鎖を 2 つずつ伸長させる反応であり、4 つの酵素が複合体を構成していると考えられている。*ONI2* は最初の反応を触媒する酵素である。そこで、*ONI2* の次の反応を触媒する酵素をコードする遺伝子の同定を行った。2 つ目の反応は ketoacyl CoA reductase により触媒されるため、イネゲノム中からその遺伝子を検索したところ、10 個の遺伝子 (*KCR1* ~ *KCR10*) が存在することがわかった。これらの遺伝子と *ONI2* の発現パターンをマイクロアレイデータを利用して比較したところ、*KCR1* と *ONI2* の発現パターンが類似していることがわかった。そこで、*ONI2* と *KCR1* の相互作用を酵母 two-hybrid 法と GST プルダウンにより調べたところ、両者が結合することがわかった。以上のことから、*ONI2* と *KCR1* が複合体を形成すると考えられた。

(4) *oni4*突然変異体の解析と原因遺伝子の同定

表皮分化に異常を示す *oni4* 突然変異体の原因遺伝子を同定した。その結果、*ONI4* はこれまでの突然変異体と全く異なり、受容体型プロテインキナーゼをコードすることがわかった。受容体型プロテインキナーゼは細胞膜を介したシグナル伝達を担うタンパク質である。しかし、*oni4* 突然変異体でも *oni1*、*oni2*、*oni3* 突然変異体と同様に表皮分化の異常、表皮マーカー遺伝子の発現低下、隣接す

る器官の融合、クチクラの突起の減少が見られた。以上のことから、極長鎖脂肪酸・脂質の経路 (*ONI1*, *ONI2*, *ONI3*) と受容体型プロテインキナーゼを介した経路 (*ONI4*) には何らかの相互作用があり、それが正常な表皮の分化に重要であることが推察された。具体的には、*ONI1*, *ONI2*, *ONI3* が *ONI4* の上流で機能する可能性、逆に *ONI4* が *ONI1*, *ONI2*, *ONI3* の上流で機能する可能性、また、*ONI1*, *ONI2*, *ONI3* と *ONI4* が相加的に表皮分化に関わる可能性が考えられた。これらの可能性を検証していくことにより、表皮分化の仕組みを明らかにしていくことが、今後の課題である。

(5) 新たな突然変異体の選抜

Tos17 ニュータントパネルから既知の *oni* 突然変異体と同様なシュートの形態異常を示す突然変異体を選抜した。その結果、新たに3系統の突然変異体を同定した。これらのクチクラの構造を調べたところ、2系統はこれまでの *oni* 突然変異体と同様に、突起の減少が見られた。1系統は逆に突起の増加が見られた。これらの突然変異体の原因遺伝子をマッピングしたところ、いずれも既知の *ONI* 遺伝子とは異なる領域に原因遺伝子が座乗し、新たな遺伝子の突然変異体であることがわかった。

また、イネの重イオンビーム照射集団を作成し、その中から突然変異体の選抜を行った。これまでに10系統程の突然変異体の候補が得られている。これらの解析を進めることで、イネの表皮分化の仕組みが明らかになっていくと期待される。

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 3 件)

Ishikawa T, Ito Y, Kawai-Yamada M (2016) Molecular characterization and targeted quantitative profiling of the sphingolipidome in rice. *Plant J* 88, 681-693 (査読有)
DOI: 10.1111/tpj.13281

Akiba T, Hibara K, Kimura F, Tsuda K, Shibata K, Ishibashi M, Moriya C, Nakagawa K, Kurata N, Itoh J-I, Ito Y (2014) Organ fusion and defective shoot development in *oni3* mutants of rice. *Plant Cell Physiol* 55, 42-51 (査読有)
DOI: 10.1093/pcp/pct154

Tsuda K, Akiba T, Kimura F, Ishibashi M, Moriya C, Nakagawa K, Kurata N, Ito Y (2013) *ONI2* fatty acid elongase is required for shoot development in rice. *Plant Cell Physiol* 54, 209-217 (査読有)
DOI: 10.1093/pcp/pcs169

[学会発表](計 33 件)

久慈正義、小暮恵太、菊池達也、石橋まゆ、小松陽花、佐藤菜々、佐藤優花里、藤倉理帆、益子恵利那、佐藤知美、佐々木長将、佐久間仁徳、高橋ほなみ、伊藤幸博、極長鎖脂肪酸に関連した新たなイネシュート発生突然変異体の解析、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日~12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

久慈正義、石橋まゆ、酒井義文、松木悠、陶山佳久、伊藤幸博、シュートの形態とクチクラに異常を示すイネ突然変異体の解析、第29回植物脂質シンポジウム、2016年11月25日-26日、大阪大学(大阪府・大阪市)

小暮恵太、菊池達也、小松陽花、佐藤菜々、益子恵利那、佐藤知美、佐々木長将、佐久間仁徳、久慈正義、伊藤幸博、極長鎖脂肪酸に関連した新規イネシュート発生突然変異体の選抜と解析、第29回植物脂質シンポジウム、2016年11月25日-26日、大阪大学(大阪府・大阪市)

久慈正義、石橋まゆ、酒井義文、松木悠、陶山佳久、伊藤幸博、シュートの形態とクチクラに異常を示すイネ突然変異体の解析、第11回東北育種研究集会、2016年11月12日、山形大学(山形県・鶴岡市)

小暮恵太、菊池達也、益子恵利那、佐藤知美、佐々木長将、佐久間仁徳、久慈正義、伊藤幸博、極長鎖脂肪酸合成に関わる新たなイネ突然変異体 *oni4* の解析、第11回東北育種研究集会、2016年11月12日、山形大学(山形県・鶴岡市)

Kuji S, Kogure K, Kikuchi T, Ishibashi M, Ito Y, Analysis of rice mutants defective in shoot morphology and cuticle, 14th International Symposium on Rice Functional Genomics, 2016年9月26日~29日、モンペリエ(フランス)

久慈正義、石橋まゆ、酒井義文、松木悠、陶山佳久、伊藤幸博、シュートの形態とクチクラに異常を示すイネ突然変異体の解析、第34回日本植物細胞分子生物学会大会、2016年9月1日~3日、信州大学(長野県・上田市)

小暮恵太、小松陽花、佐藤菜々、久慈正義、高橋ほなみ、伊藤幸博、イネのシュート発生で機能する新たな極長鎖脂肪酸関連遺伝子の探索、第38回日本分子生物学会年会、2015年12月1日~4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

小暮恵太、伊藤幸博、イネのシュート発生に必要な ketoacylCoA synthase と相互作用する ketoacylCoA reductase の探索、第 10 回東北育種研究集会、2015 年 11 月 14 日、東北大学（宮城県・仙台市）

小暮恵太、小松陽花、佐藤菜々、久慈正義、高橋ほなみ、伊藤幸博、極長鎖脂肪酸合成に関わる新たなイネ突然変異体 *oni4* の解析、第 10 回東北育種研究集会、2015 年 11 月 14 日、東北大学（宮城県・仙台市）

佐藤優花里、藤倉理帆、益子恵利那、佐々木長将、小松陽花、佐藤菜々、久慈正義、高橋ほなみ、伊藤幸博、極長鎖脂肪酸によるシュート発生に関わる新たなイネ突然変異体の解析、第 10 回東北育種研究集会、2015 年 11 月 14 日、東北大学（宮城県・仙台市）

久慈正義、石橋まゆ、伊藤幸博、イネのシュート発生に影響を及ぼす VLCFA の機能の研究、第 10 回東北育種研究集会、2015 年 11 月 14 日、東北大学（宮城県・仙台市）

小暮恵太、伊藤幸博、イネのシュート発生に必要な ketoacyl CoA synthase と相互作用する ketoacyl CoA reductase の探索、第 33 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム、2015 年 8 月 10 日～12 日、東京大学（東京都・文京区）

小松陽花、佐藤菜々、久慈正義、小暮恵太、高橋ほなみ、伊藤幸博、極長鎖脂肪酸合成に関連したイネの新しいシュート発生突然変異体の解析、第 33 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム、2015 年 8 月 10 日～12 日、東京大学（東京都・文京区）

Kogure K, Ito Y, Interaction of ONION2 ketoacyl CoA synthase with KCR1 ketoacyl CoA reductase in rice, Plant and Animal Genome Asia 2015, 2015 年 7 月 13 日～15 日、シンガポール（シンガポール）

Komatsu H, Sato N, Kogure K, Kuji, S Takahashi H, Ito Y, Analysis of rice mutants defective in shoot development and associated with biosynthesis of very-long-chain fatty acids, Plant and Animal Genome Asia 2015, 2015 年 7 月 13 日～15 日、シンガポール（シンガポール）

小暮恵太、伊藤幸博、極長鎖脂肪酸合成酵素遺伝子のイネのシュート発生における機能の解析、第 27 回植物脂質シンポジウム、2014 年 11 月 28 日～29 日、静岡市産業交流センター（静岡県・静岡市）

高橋ほなみ、高杉知彰、藤田雅丈、倉田のり、伊藤幸博、イネのサイトカイニン情報伝達系に直接発現誘導される転写制御因子遺伝子の候補の同定、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日～27 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

Kogure K, Ito Y, Analysis of a novel shoot-defective rice mutant associated with biosynthesis of very-long-chain fatty acids, 12th International Symposium on Rice Functional Genomics, 2014 年 11 月 16 日～19 日、ツーソン（アメリカ）

Takahashi H, Fujita M, Kurata N, Ito Y, Identification of transcription factor genes directly induced by a cytokinin signaling response regulator in rice, 12th International Symposium on Rice Functional Genomics, 2014 年 11 月 16 日～19 日、ツーソン（アメリカ）

⑳小暮恵太、伊藤幸博、極長鎖脂肪酸合成に関連すると思われる新たなイネのシュート発生突然変異体 *onion4* の解析、日本育種学会第 126 回講演会、2014 年 9 月 26 日～27 日、南九州大学（宮崎県・都城市）

㉑高橋ほなみ、高杉知彰、藤田雅丈、倉田のり、伊藤幸博、イネのサイトカイニン情報伝達系レスポンスレギュレーターの標的遺伝子の探索、第 32 回日本植物細胞分子生物学会大会、2014 年 8 月 21 日～22 日、アイーナ（岩手県・盛岡市）

㉒小暮恵太、伊藤幸博、シュート発生において異常を示す新たなイネ突然変異体 *onion4* の解析、第 32 回日本植物細胞分子生物学会大会、2014 年 8 月 21 日～22 日、アイーナ（岩手県・盛岡市）

㉓Takahashi H, Takasugi T, Fujita M, Kurata N, Ito Y, Identification of transcription factor genes directly induced by a cytokinin signaling pathway in rice, 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～6 日、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）

㉔Ito Y, Kimura F, Tsuda K, Akiba T, Nakagawa K, Kurata N, Fatty acid elongase genes required for shoot development in rice, 5th Asian Symposium on Plant Lipids, 2013 年 11 月 29 日～12 月 1 日、光州（韓国）

㉕高橋ほなみ、高杉知彰、藤田雅丈、倉田のり、伊藤幸博、イネのサイトカイニン情報

伝達系レスポンスレギュレーターに直接発現誘導される転写制御因子遺伝子の探索、第31回日本植物細胞分子生物学会大会、2013年9月10～12日、北海道大学(北海道・札幌市)

⑳木村ふみ子、伊藤幸博、仲川清隆、宮澤陽夫、イネ極長鎖脂肪酸合成酵素遺伝子変異体のクチクラワックスの長鎖脂肪酸および長鎖脂肪酸アルコール組成分析、第55回日本脂質生化学会、2013年6月6日～7日、松島大観荘(宮城県・松島町)

㉑Akiba T, Kimura F, Ishibashi M, Moriya C, Tsuda K, Kurata N, Nakagawa K, Ito Y, A role of VLCFAs for rice shoot development、第54回日本植物生理学会年会、2013年3月21日～23日、岡山大学(岡山県・岡山市)

㉒秋葉貴文、木村ふみ子、石橋まゆ、守屋千尋、津田勝利、倉田のり、仲川清隆、伊藤幸博、イネの極長鎖脂肪酸合成酵素遺伝子の突然変異体 *onion2* の表皮の解析、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、(福岡県・福岡市)

㉓ Ito Y, Tsuda K, Akiba T, Kimura F, Ishibashi M, Moriya C, Nakagawa K, Kurata N, A role of very-long-chain fatty acids in rice shoot development. 10th International Symposium on Rice Functional Genomics、2012年11月26日～29日、チェンマイ(タイ)

㉔ Ishibashi M, Akiba T, Ito Y, Identification of rice mutants associated with very-long-chain fatty acid biosynthesis、10th International Congress on Plant Molecular Biology、2012年10月21日～26日、済州島(韓国)

㉕秋葉貴文、石橋まゆ、守屋千尋、津田勝利、倉田のり、伊藤幸博、イネの極長鎖脂肪酸合成酵素遺伝子の突然変異体 *onion2* の解析、日本育種学会第122回講演会、2012年9月14日～16日、京都産業大学(京都府・京都市)

㉖石橋まゆ、伊藤幸博、極長鎖脂肪酸合成酵素遺伝子の突然変異体と類似したシュート発生異常を示す新たな突然変異体の解析、第30回日本植物細胞分子生物学会大会、2012年8月3日～5日、奈良先端科学技術大学院大学(奈良県・生駒市)

〔その他〕

アウトリーチ活動情報

JST グローバルサイエンスキャンパス 東

北大学飛翔型科学者の卵養成講座 実行委員

渡辺正夫、安藤晃、久利美和、伊藤幸博、日出間純、科学者の卵養成講座による分野横断的科学思考力の普及啓発、平成25年度科学技術分野の文部科学大臣表彰(科学技術賞、理解増進部門)、2013年4月16日

伊藤幸博、遺伝子と遺伝子組換え植物、福島県立磐城高等学校 SSH 総合の時間 模擬講義、仙台、2016年4月21日、2015年4月23日

伊藤幸博、エンジョイ DNA ～遺伝子組換え植物と植物の環境適応～、福島県立磐城高等学校 SSH 総合の時間 模擬講義、仙台、2014年4月24日、2013年4月24日、2012年4月20日

Ito Y, What is a gene? RSA Middle School Symposium, リバーサイド(アメリカ)、2016年3月26日

伊藤幸博、遺伝子(DNA)を自分の目で見てみよう、第15回東北大学出前授業、仙台、2015年12月7日、10日

伊藤幸博、宮城県宮城第一高等学校 理数科2年次課題研究中間発表会 助言者、仙台、2015年9月15日、2014年9月9日

伊藤幸博、いろんな野菜のDNAを見てみよう、東北電力グリーンプラザ実験教室、仙台、2015年8月22日

伊藤幸博、DNAと遺伝子組換え植物、宮城県宮城野高等学校 学問の世界、仙台、2015年5月30日

伊藤幸博、平成26年度宮城県高等学校理数科課題研究発表会 講師、仙台、2015年3月16日

伊藤幸博、遺伝子(DNA)を自分の目で見てみよう、第14回東北大学出前授業、仙台、2014年11月14日、12月11日、12日

伊藤幸博、DNAと遺伝子組換え植物、第66回東北大学祭 研究公開企画 模擬講義、仙台、2014年11月2日

伊藤幸博、遺伝子(DNA)を自分の目で見てみよう、第13回東北大学出前授業、仙台、2013年10月24日

伊藤幸博、東北・北海道地区 SSH 指定校発表会(宮城県仙台第三高等学校) 指導助

言講師、仙台、2013年1月26日～27日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 幸博 (ITO, Yukihiro)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：70280576

(2) 研究分担者

木村 ふみ子 (KIMURA, Fumiko)
尚絅学院大学・健康栄養学科・准教授
研究者番号：50321980

(3) 連携研究者

鳥山 欽哉 (TORIYAMA, Kinya)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：20183882