

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24780004

研究課題名(和文) イネの栄養生長期における発生を時間的に制御する遺伝子カスケードの解明

研究課題名(英文) Elucidation of genetic cascade temporally regulating juvenile development in rice

研究代表者

永澤 奈美子(佐藤奈美子)(Satoh-Nagasawa, Namiko)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00535289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： 栄養生長初期から栄養生長後期への相転換に関わっており既に単離された鍵遺伝子は少数であり、その遺伝的制御の全貌は明らかになっていない。本研究では、発芽後生育ステージが進まず、栄養生長を続ける korpokkur (kor) 1-1 および kor 1-2 変異体の単離および解析を行った。

突然変異体では、栄養生長初期の継続だけでなく、細胞形態異常が観察された。KOR1 遺伝子は、機能未知の植物特有タンパク質をコードするシングルコピー遺伝子であり、分裂組織付近を中心にパッチ上に発現していた。したがって、KOR1 遺伝子は、栄養生長期の相転換だけでなく、正常な細胞の発達にも必須であると考えられた。

研究成果の概要(英文)： We analyzed korpokkur (kor) mutants which show continuous vegetative growth to elucidate the function of KOR gene. kor mutants continuously produce small leaves during their vegetative growth. The leaves don't have midrib and the initiation of node / internode structure is delayed in the mutants. Such characters indicate that vegetative phase change does not occur in the mutants. In addition to the character, kor mutants have abnormal cell morphology. KOR gene has been cloned and revealed to encode an unknown single-copied protein in rice. It is expressed in patchy way throughout the rice plant. That indicates KOR gene expression is specific during cell cycle.

From the results in the report, it is revealed that KOR gene is essential to vegetative phase change and proper cellular development.

研究分野：植物発生遺伝学

キーワード：突然変異体 細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

植物の発生は、多くの遺伝子が階層的に機能することで、空間的にだけでなく時間的にも制御されている。すなわち、あるステージでの形質発現に必要な遺伝子の一群の上流で機能し、ステージの開始や終了時期を調節する遺伝子が存在する。以後、このような遺伝子を鍵遺伝子と呼ぶ。あるステージにおける鍵遺伝子の機能が喪失し、発生の時間的制御が異常になると、そのステージの発生が短縮して次のステージの発生が早期開始するなどといった、異時的な（ヘテロクロニックな）形質発現が起こる。植物の栄養生長期の発生が遺伝子の機能により時間的に制御されていることは、シロイヌナズナ、トウモロコシ及びイネを用いた研究によって示唆されてきたが、包括的理解はされていない状況であった。

本研究に際し、鞘葉様、第1葉様、第2葉様の葉をそれぞれ複数枚短い葉間期で生じる *11A-s-266* 突然変異体が同定された。それは、他の植物においてもこれまで同定されたことのないユニークな突然変異体であった。新規な表現型の突然変異体の同定は、イネの栄養生長期における発生の時間的制御機構に未解明な部分があることを示していると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、突然変異体を用いてイネの栄養生長期における発生を時間的に制御する遺伝子カスケードを明らかにする。具体的な目的は下記のとおりである。

- (1) 栄養生長初期の発生の進行が遅滞したと考えられるイネ突然変異体、*11A-s-266* の原因遺伝子の機能解明。
- (2) イネの栄養生長期における発生を時間的に制御する新規遺伝子の同定と機能解明。
- (3) イネの栄養生長期における発生の時間的制御機構に関与する既知の遺伝子、(1)及び(2)で解析された遺伝子間の相互関係の解明。

以上が研究開始当初の研究目的であったが、実際には(1)に絞って研究を行った。

3. 研究の方法

栄養生長初期の発生の進行が遅滞したと考えられるイネ突然変異体、*11A-s-266* の表現型の形態学的及び生理学的な解析と原因遺伝子の単離や発現解析を行い、その機能を解明する。

4. 研究成果

- (1) *11A-s-266* 突然変異体の形態学的解析以後、*11A-s-266* を *korpokkur (kor) 1-1*、アレルである *11A-s-34* を *kor1-2* とする。

①突然変異体の葉身は葉位が進んでも伸長せず(図1)、野生型で形成される adult phase のしるしである中肋も、同葉位の突然変異体

では観察されなかった(図2)。また、突然変異体での節の形成も野生型に比べて遅れていた。これらのことから、突然変異体では栄養生長期 juvenile phase が継続していると考えた。

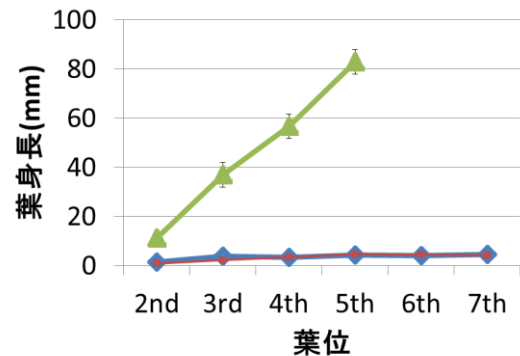


図1 野生型及び *kor1-1* および *kor1-2* 突然変異体の葉身長。緑線：野生型、青線：*kor1-1*、赤線：*kor1-2*。

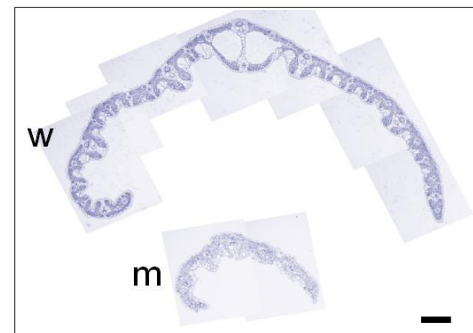


図2 野生型及び *kor1-1* 変異体の葉身横断面。w：野生型、m：*kor1-1*。バー：100 μ m。

- ②突然変異体の茎頂分裂組織は野生型より扁平であったが、未分化細胞の分子マーカー *OSHI* 遺伝子の発現は観察され(図3)、突然変異体の茎頂分裂組織内の細胞アイデンティティには異常がないことが明らかになった。

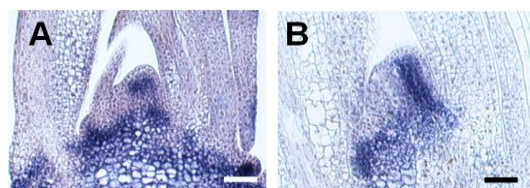


図3 野生型及び *kor1-1* 変異体の茎頂分裂組織における *OSHI* の発現パターン。A:野生型、B：*kor1-1*。バー：50 μ m。

- ③細胞分裂周期のS期に発現する *Histone H4* 遺伝子の発現パターンを調査したことにより、突然変異体の発生中の葉原基での細胞分裂活性低下が野生型より早く起こることが明らかになった(図4)。

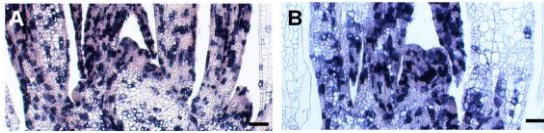


図4 野生型及び *kor1-1* 変異体の茎頂分裂組織付近における *Histone H4* の発現パターン。A: 野生型、B: *kor1-1*。バー: 50 μ m。

④胚乳や葉の細胞の配列や形に異常が見られた(図5)。細胞核が2つあるようにみられた細胞もあり(図5B矢印)、細胞質分裂過程に異常がある可能性が示唆された。

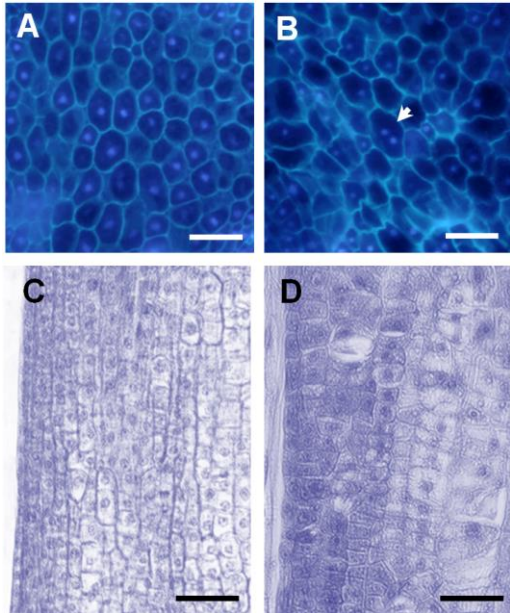


図5 野生型及び *kor1-1* 変異体の胚乳(A, B)及び葉鞘(C, D)の細胞。A, C: 野生型、B, D: *kor1-1*。バー: 50 μ m。

(2) *kor1* 突然変異体の分子生物学的解析

①ポジショナルクローニングの結果、*KORI* 遺伝子は、植物特異的なシングルコピー遺伝子であることが明らかになった。コードするタンパク質内に、既知のドメインなどは存在しなかった。

②*KORI* 遺伝子は、イネの分裂組織付近で特に強く発現していたが、他の部位でも弱い発現は見られた(図6)。

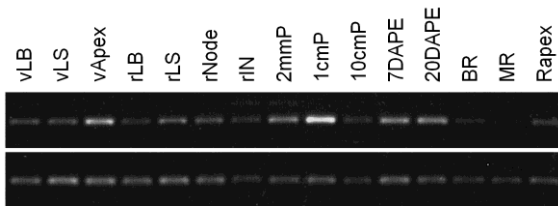


図6 半定量的PCRによる *KORI* 遺伝子の発現解析。下は Actin 遺伝子の発現(コントロール)。v; vegetative phase plants, r; reproductive phase plants, LB; leaf blade; LS; leaf sheath, IN; internode, P;

immature panicle, DAP; days after pollination, E; embryo, BR; basal part of roots, MR; middle part of roots, Rapex; root apex.

③*KORI* 遺伝子は、*Histone H4* 遺伝子とは別の細胞で、パッチ状に発現することが明らかになり、*KORI* 遺伝子が細胞分裂過程で機能している可能性が示唆された(図7)。

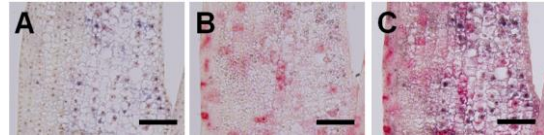


図7 葉鞘における *KORI* 遺伝子及び *Histone H4* 遺伝子の発現パターン。A: *KORI* 遺伝子、B: *Histone H4* 遺伝子、C: A及びBを重ねたもの。バー: 50 μ m。

④栄養生長期の相転換における分子マーカーである miR156 及び miR172 の発現解析の結果、突然変異体では miR156 は野生型よりは高いものの葉位の進展にしたがった低下は見られ、それにもかかわらず miR156 に抑制されているという知見のある miR172 の発現は低かった(図8)。*kor1* 突然変異体では miR156 以外の因子が miR172 の発現を抑制している可能性がある。つまり、*KORI* 遺伝子はこれまでに知見の得られていない方法で栄養生長期の相転換に関わっている可能性がある。

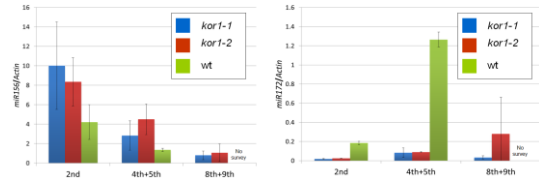


図8 野生型及び *kor1-1* および *kor1-2* 突然変異体の第2葉、第4及び5葉、第8及び9葉における miR156(左)及び miR172(右)の発現をアクチン発現により標準化したもの。青: *kor1-1*、赤: *kor1-2*、緑: 野生型。

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6件)

①Kumagai, S., Suzuki, T., Tezuka, K., Satoh-Nagasawa, N., Takahashi, H., Sakurai, K., Watanabe, A., Fujimura, T., Akagi, H., Functional analysis of the C-terminal region of the vacuolar cadmium-transporting rice OsHMA3. FEBS Letters 588, 789-794 (2014)、査読有 DOI: 10.1038/ng.2534

②Satoh-Nagasawa, N., Mori, M., Sakurai, K., Takahashi, H., Watanabe, A. and Akagi, H., Functional relationship heavy metal

P-type ATPases (OsHMA2 and OsHMA3) of rice (*Oryza sativa*) using RNAi, *Plant Biotechnology* 30, 511-515 (2013)、査読有
URL:https://www.jstage.jst.go.jp/article/plantbiotechnology/30/5/30_13.0616a/_article

③ Bommert P, Satoh-Nagasawa N, Jackson D. Quantitative variation in maize kernel row number is controlled by the FASCIATED EAR2 locus, *Nat. Genet.* 45: 334-337. (2013)、査読有
DOI: 10.1038/ng.2534

④ Carill, P, Feil R, Gibon Y, Satoh-Nagasawa N, Jackson D, Bläsing O, Stitt M, Lunn JE., A fluorometric assay for trehalose in the picomole range, *Plant Methods* 9: 21. (2013)、査読有
DOI: 10.1186/1746-4811-9-21

⑤ Satoh-Nagasawa, N., Asari, K., Itoh, R., Nagasawa, N., Yasuda, K., Kobayashi, Y., Takahashi, H., Sakurai, K., Watanabe, A., Akagi, H., Hayashi, Y. and Abe, T., Effect of the heavy-ion beam irradiation on survival rates in sorghum, *RIKEN Accelerator Progress Report* 46:, 262 (2012)、査読有
URL:http://www.nishina.riken.jp/researcher/APR/index_e.html

⑥ Satoh-Nagasawa, N., Mori, M., Nakazawa, N., Kawamoto, T., Nagato, Y., Sakurai, K., Takahashi, H., Watanabe, A. and Akagi, H., Mutations in rice (*Oryza sativa*) heavy metal ATPase 2 (OsHMA2) restrict the translocation of Zn and Cd, *Plant and Cell Physiology* 53, 213-224 (2012)、査読有
DOI: 10.1093/pcp/pcr166

[学会発表] (計 6 件)

① 佐藤(永澤) 奈美子・永澤信洋・上田健治・長戸康郎・我彦廣悦、KORPOKKUR 遺伝子は正常な細胞の発達と栄養生長期の相転換に必須である、日本植物生理学会、第 57 回、2016. 3. 18. 岩手大学

② Yousra El mannai・Nao Konno・Kenji Ueda・Namiko Satoh-Nagasawa・Wabiko Hiroetsu、Searching the senescence associated genes of rice downstream of transcription factor gene OsyN37、日本植物生理学会年会、第 57 回、2016. 3. 18. 岩手大学

③ 佐藤(永澤) 奈美子・永澤信洋・長戸康郎、栄養生長を続ける新規イネ突然変異体の解析と原因遺伝子の解明、日本育種学会、第 127 回春季大会、2015. 3. 22. 玉川大学

④ 佐藤(永澤) 奈美子・坪井 香奈・シェザド タリク・奥野 員敏・米田 淳一・林 辰星・堤 伸浩・浦口 晋平・藤原 徹・伊藤 祐介・

徳永 毅・伊藤 正志・服部 浩之・永澤 信洋・伊藤 るみ子・浅利 圭子・高橋 秀和・櫻井 健二・渡辺 明夫・赤木 宏守、土耕栽培下でのソルガム在来種地上部におけるカドミウム蓄積様式の変異、第 125 回日本育種学会春季大会、2014.3.21. 東北大学

⑤ 佐藤(永澤) 奈美子・米田 淳一・奥野員敏・浦口 晋平・藤原 徹・林 辰星・徳永毅・伊藤裕介・伊藤正志・服部浩之・永澤信洋・伊藤るみ子・赤木宏守・高橋秀和・櫻井健二・渡辺明夫・堤伸浩、地上部へのカドミウム蓄積様式におけるソルガム品種間差異の同定、日本育種学会第 123 回講演会、2013.3.28. 東京農業大学

⑥ 佐藤(永澤) 奈美子・片寄雄太・櫻井健二・高橋秀和・渡辺明夫・長戸康郎・赤木宏守、異常な幼苗を示す新規イネ変異体の形態学的及び生理学的解剖、日本育種学会第 122 回講演会、2012.9.15. 京都産業大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

<http://www.akita-pu.ac.jp/stic/souran/scholar/detail.php?id=224>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永澤 (佐藤) 奈美子 (SATO-NAGASAWA, Namiko)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：00535289

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし