

## 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：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840094

研究課題名(和文)シロイヌナズナ初期胚発生において放射軸を規定する分子基盤の解明

研究課題名(英文)Analysis on the molecular mechanism controlling the initiation of radial pattern formation during Arabidopsis embryogenesis.

## 研究代表者

宮島 俊介 (Miyashima, Shunsuke)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：20727169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナ胚発生期における放射パターン形成の基礎となる「放射軸」の決定の分子機構を明らかにするために、放射パターン形成に重要な機能をもつMicroRNA165およびMicroRNA166遺伝子の胚発生期での発現を制御するシスおよびトランス因子の同定を試みた。

その結果、胚におけるMIR165/166遺伝子の発現パターンを規定する2つの独立したシス領域を決定し、また、網羅的な胚発生変異体の解析から、これら2つのシス領域にそれぞれ作用する可能性のある2種類の転写因子群を同定した。

研究成果の概要(英文)：The formation of radially symmetric tissue pattern, which is one of the most basic processes in the development of vascular plants, is initiated during embryogenesis. Our previous works revealed that MIR165 and MIR166 genes, a mobile small RNA controlling radial pattern formation in Arabidopsis, exhibit the tissue-specific expression pattern during embryogenesis. To understand the molecular mechanism initiating the radial patterning during embryogenesis, we aimed to identify cis- and trans-factors regulating MIR165/166 expression during early embryogenesis.

As a result, we clarified two major cis-elements on MIR165/166 promoters determining the prodoerem-specific expression of MIR165/166 genes in the lower tier. In addition to that, two types of transcription factors were identified as candidates acting on these cis-elements in MIR165/166 promoter.

研究分野：植物発生学

キーワード：胚発生 MicroRNA シロイヌナズナ

## 1. 研究開始当初の背景

維管束植物の組織構造は、中心部の維管束組織を基本組織と表皮組織が取り囲んだ「放射パターン」を基本モジュールとしている。これは根や茎などの軸性器官で顕著にみられるが、葉などの扁平器官も軸性器官が変形したものと考えられる。この放射パターンは、胚発生期に決定される“中央 周縁”という体軸(以降、放射軸と記載する)に沿って形成される。シロイヌナズナ胚は、受精後から16-cell 期まで球状の形態だが、初期胞胚期 lt 領域において、内側から前維管束(provascular:Pv)、基本組織(ground tissue:Gt)及び前表皮(protoderm: Ptd)の組織系が作り出され、円柱状の形態へと移行する。つまり、16-cell 期から初期胞胚期にかけて lt 領域で行われるパターン形成が、維管束植物に共通して見られる構造モジュールの発生の起源である。

近年の様々な研究から、シロイヌナズナ胚におけるパターン形成過程における分子機構が明らかになりつつある。特に胚における上下軸の形成過程での植物ホルモンであるオーキシンおよびその下流因子の機能などが挙げられる。また、胚発生期において、決定された放射軸に沿って構築される放射パターンにおいて、各細胞層の分化および発生に関わる因子の同定が進んでいる。しかしながら、放射軸自体の決定機構については、その知見は乏しく、また、いくつかの報告から、オーキシンなど既存の胚で重要な機能を有する因子が、放射軸決定に関しては、有意な機能を持たないことも示唆されている。

シロイヌナズナの根では、維管束組織で HD-ZIP III 遺伝子群が、またこれを抑制する MicorRNA165/166(MIR165/6)が基本組織で発現し、放射パターンを制御する。この過程において、それに対し、根の発生起源である胚の lt 領域においては、MIR165/6 は 16-cell 期までは発現せず、初期胞胚期において、lt

領域の Prd に特異的に発現する。また、MIR165 は初期胞胚から発現開始するのに対し、MIR166 は 16-cell 期の lt 領域全体で発現が開始されたのち、初期胞胚期において Ptd に特異化されていく。これに加えて、MIR165/166 の標的である HD-ZIP III 遺伝子が同一時期に中心部の Pv で発現開始することは、16-cell 期から初期胞胚期にかけて lt 領域で形成される何らかの位置情報が、球状形態から円柱状形態への構造変換を制御しているという仮説を強く支持する。

## 2. 研究の目的

維管束植物に必須の基本構造である放射パターンは、胚発生期の初期段階において作り出される。その過程として、構築される放射軸が、どのような分子機構において決定されるかを解明する事を、最終的な目的とする。

前述のとおり、初期胚における放射軸の決定およびそれに伴う放射パターン形成の分子機構は、不明な点が多い。

MIR165/6 の発現の変遷は、放射軸が形成を可視化する有用なマーカーとなる。またこの胚発生での MIR165/6 の発現制御は、根における既知の経路とは独立していることが分かっている。そこで、本研究期間内において 16-cell 期から初期胞胚での MIR165/166 の発現を規定するシス因子と、それを制御する転写因子の同定を行う。それらの同定された転写因子群は放射軸の形成過程を上流で制御する鍵因子である可能性が非常に高く、それらの機能解析から、維管束組織の放射パターン形成の初発段階に起こる放射軸の形成というイベントを制御する機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

(1)MIR165 および MIR166 遺伝子の発現様式を規定するシス因子の同定。

MIR165 は 16-cell 期では発現せず、初期

胞胚期において It 領域 Ptd で発現を開始する。これに対し MIR166 は 16-cell 期の It 領域全体で発現した後、その発現が Ptd に集約化する。つまり、MIR165/6 の発現を規定する機構には、(1) 初期胞胚期の Prd で発現を ON にする制御、および (2) 16-cell 期から初期胞胚期にかけて、中心部での MIR166 の発現を OFF にする制御の 2 つが存在する。これらの 2 点に着目し、MIR165/6 のプロモーター解析を進めた。

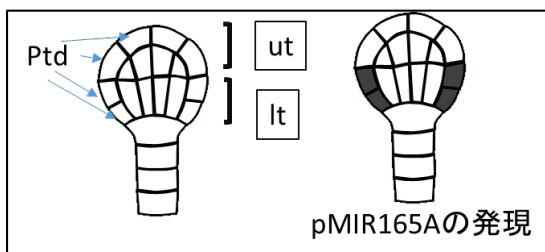
(2) MIR165 および MIR166 遺伝子の発現を制御する上流トランス因子の同定

上記の研究計画から抽出された胚発生において必要十分な MIR165 および MIR166 のシス領域を用い、Yeast-one hybrid アッセイを行い、それらシス領域に結合する転写因子群を同定する。同定された転写因子群に対し、胚発生前期の発現領域の決定を行うとともに、それらの機能欠損体の解析から、初期胚のパターン形成における機能を明らかにしようと試みた。

4. 研究成果

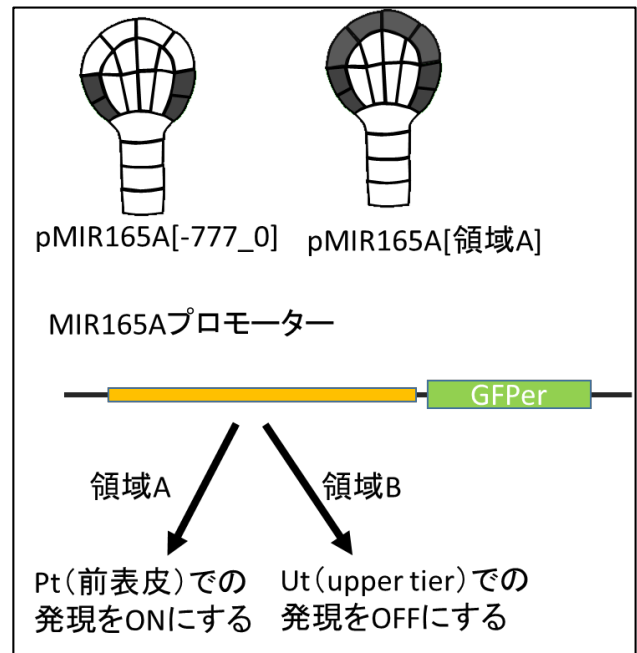
(1)MIR165 および MIR166 遺伝子の発現様式を規定するシス因子の同定。

第一に全長 3kb である MIR165A 遺伝子プロモーター(以降、pMIR165A)の deletion 解析を行い、胚で MIR165A の発現に必要な十分領域の同定を行った。前述もしたとおり、MIR165A 遺伝子は初期胞胚期の It 領域の前表皮 (Ptd) 細胞で特異的に発現する。



第一に、pMIR165A の様々な断片を用いて

GFP レポーターを発現させるコンストラクトを作成した。その結果、MIR165A の転写開始点より上流 777bp(以降、pMIR165A[-777\_0]とする)の領域が、胚における MIR165A の発現に十分であることが示された。さらなる、pMIR165A[-777\_0]の配列に対する deletion 解析から、Ptdでの発現を正に制御する cis を含むと考えられる領域 A、および、胚の ut 領域で発現を抑制する領域 B を同定した。実際に、領域 A のみをもちいた pMIR165A[領域 A]をもちいたレポーターラインは、It および ut とともに Ptd での発現が確認された。



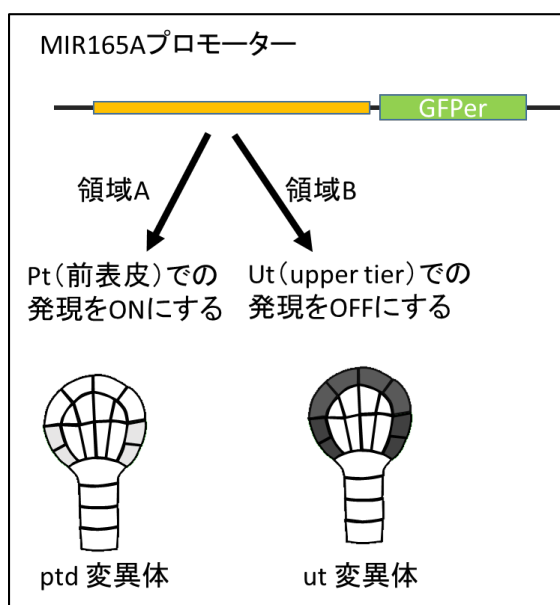
さらに、MIR166B 遺伝子の 3kb プロモーター領域に対して、MIR165A[領域 A]および MIR165A[領域 B]に、相同性の高い領域を探索した結果、MIR165B プロモーターにおいても、相同な配列がプロモーター上に存在し、MIR165A プロモーターと同様な機能を有していることを明らかにした。

(2) MIR165 および MIR166 遺伝子の発現を制御する上流トランス因子の同定

上記の結果から得られた cis 領域である領域 A および領域 B に対して、Yeast one hybrid

アッセイから、これら配列に作用する転写因子の同定を試みたが、結果的に有意に作用する因子の同定はできなかった。

そこで、MIR165 および MIR166 の発現を規定する転写因子の同定のため、シロイヌナズナ初期胚発生に異常をきたす既存の変異体背景において、MIR165A の発現を網羅的に観察した。その結果、Ptd での発現の誘導することに必要な Ptd 遺伝子および、ut での発現抑制に必須な ut 遺伝子を同定した。



以上の結果をまとめると、MIR165 および MIR166 遺伝子の胚での発現様式を規定するための、2つの独立したシス領域、領域Aおよび領域Bを見出した。領域AはPtdでの発現誘導に、また領域Bはut領域での発現抑制に機能するシスと考えられ、また、これらのシスを介して機能する可能性のある転写因子PTDおよびUTを見出した。

今後は、これら転写因子の機能解析を進めることで、MIR165 および MIR166 の胚での発現制御機構を詳細に明らかにする予定である。

#### 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 2 件)

1:

著者名:

Randall RS, Miyashima S, Blomster T, Zhang J, Elo A, Karlberg A, Immanen J, Nieminen K, Lee JY, Kakimoto T, Blajicka K, Melnyk CW, Alcasabas A, Forzani C, Matsumoto-Kitano M, Mähönen AP, Bhalerao R, Dewitte W, Helariutta Y, Murray JA.

論文表題 :AINTEGUMENTA and the D-type cyclin CYCD3;1 regulate root secondary growth and respond to cytokinins.

雑誌名: Biol Open.

査読: 有

発行年、巻、ページ : 2015 Sep 4;4(10):1229-36.

2:

著者名: Tatematsu K, Toyokura K, Miyashima S, Nakajima K, Okada K.

論文表題: A molecular mechanism that confines the activity pattern of miR165 in Arabidopsis leaf primordia.

雑誌名: Plant J.

査読: 有

発行年、巻、ページ : 2015 May;82(4):596-608.

[学会発表](計 0 件)

[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]

無し

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

宮島 俊介 (MIYASHIMA, Shunsuke)

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 助教

研究者番号 : 20727169