

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292004

研究課題名(和文) イネの初期胚をモデルとした細胞分化機構の理解と形態形質改変への利用

研究課題名(英文) Understanding the mechanism of cellular differentiation and its usage for the regulation of morphological traits in rice

研究代表者

佐藤 豊 (Sato, Yutaka)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：40345872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はイネの初期胚形成時の細胞分化機構を明らかにする事を目的とする。イネ球状型突然変異体を用いた我々のグループの解析から、イネ胚形成初期の細胞分化に受容体型キナーゼを介した情報伝達が働く事が明らかになった。受容体型キナーゼは細胞間情報伝達の基本的な構成要素であり、胚形成時の細胞分化を誘導する未知シグナルの存在を示唆している。そこで、イネの胚形成時の細胞分化に機能する細胞間の情報伝達の全容を明らかにすべく、既存のイネ球状型突然変異系統との遺伝学的関係性を二重突然変異体の作出により明らかにするとともに、抑圧変異体の単離と解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The goal of this research is to understand the molecular mechanism of cellular differentiation at the early stages of rice embryogenesis. We already demonstrated that, during the early stage of rice embryogenesis, a receptor like kinase has pivotal function in cellular differentiation by using rice embryogenesis defective mutants (odm mutants). This suggests that a mobile signal could function in the process of cellular differentiation at the early stage of rice embryogenesis, because receptor like kinases are generally important components of inter cellular signaling. In order to elucidate the entire components of the signaling module that operates at the cellular differentiation at the early stage of rice embryogenesis, we made double mutants with previously identified odm mutants. In addition, we screened and analyzed the suppressor mutations that restore odm phenotype.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：イネ 胚 分化

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

形態形成機構の解明は古くから生物学研究の重要な課題として盛んに研究が行われてきた。発生における器官や細胞の分化過程は分化を誘導するシグナルの「生成・伝播・受容・分化を誘導/維持する遺伝子発現」といったシステムの中に存在する。しかしながら高等植物の形態形成機構についてはその要ともなる細胞分化のシグナルに関する分子的基盤の多くが未解明である。胚形成は様々な器官の分化が連続的におきる過程である。特にイネ科植物ではシロイヌナズナなどの双子葉植物に比べ完成胚の形態が複雑である分、連続して様々な器官分化が胚形成の過程で観察される。このため、イネ科植物の胚形成過程は細胞分化のメカニズムを解析するには格好のモデル材料といえる。

イネ・トウモロコシ・シロイヌナズナのいずれにおいても胚形成に関わる変異体は最も頻りに単離される変異であり、この事は胚形成に関わる遺伝子数が多いことを示唆している。一方で、シロイヌナズナをはじめ多くの植物で、胚形成致死変異体は積極的に解析されてこなかったため、胚形成の過程で細胞分化に機能する具体的な情報のやり取りについては、オーキシンの関与以外には目立った報告は無い。

シロイヌナズナで胚発生致死変異体の解析が進まなかった理由の一つは、胚発生致死変異がハウスキーピング遺伝子の変異による場合と、発生を制御する因子の変異の場合とが区別し難い事があげられる。一方、イネの胚発生致死変異体の場合、胚乳形成が正常であれば、細胞の生存に必要なハウスキーピング遺伝子の変異の可能性は低い。実際、申請者は胚乳が正常で、胚形成に異常のある変異体をこれまでに解析してきた。その結果、これまでに茎頂分裂組織を特異的に欠失するイネ胚発生致死突然変異体の解析から、マイクロRNA (miRNA) や small interfering RNA (siRNA) といった小分子RNAによるシグナリングが胚形成時における器官分化に機能していることを発見した。さらに、胚形成過程で全く器官を分化

しない球状胚型突然変異体の解析からMAPキナーゼを介したシグナリングが、イネの器官分化に機能することも明らかにしている(論文投稿準備中)。胚形成の過程で、このように多様な情報のやり取りが機能している事は、シロイヌナズナを用いたこれまでの解析からは全く予想されていなかった。

2. 研究の目的

本研究はイネの初期胚形成時の細胞分化機構を明らかにする事を目的とする。発生における細胞分化過程は分化を誘導するシグナルの「生成・伝播・受容・分化を誘導/維持する遺伝子発現」といったシステムの中に存在する。申請者のこれまでの研究で、イネ胚形成初期の細胞分化に受容体型キナーゼを介した情報伝達が働く事を明らかにした。受容体型キナーゼは細胞間情報伝達の基本的な構成要素であり、胚形成時の細胞分化を誘導する未知シグナルの存在を示唆している。本研究ではイネの胚形成時の細胞分化に機能する細胞間の情報伝達を世界に先駆けて明らかにする。また、この細胞分化機構の胚形成後の機能や種を越えた普遍性を検証し、地上部形質改変等の育種学分野での応用も検討する。

3. 研究の方法

本研究は以下の3点に着目して研究を行った。(1) 受容体型キナーゼの下流で働く遺伝子ネットワークの解明、(2) 受容体型キナーゼが制御する細胞分化イベントの特定、(3) 受容体型キナーゼのリガンドとして想定されるペプチドの解析。具体的には、受容体型キナーゼの変異体に更に変異処理後、サプレッサー変異の単離や二重突然変異体の作出による遺伝子ネットワークの解析、多数の球状型胚発生突然変異体の変異型胚を用いたマイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイル比較により、下流にある細胞分化イベントを明らかにし、さらに、リガンド候補をコードする遺伝子の挿入変異体/ノックダウン変異体の解析を計画した。

4. 研究成果

実験を計画した項目に対応する形で、研究成果を概略する。(1) 受容体型キナーゼの下流で働く遺伝子ネットワークの解明について、二つの実験を行った。最初の実験は、受容体型キナーゼ突然変異のサプレッサー変異の単離と解析から受容体型キナーゼの下流を明らかにするものである。本研究が解析の対象とする受容体型キナーゼ突然変異は、胚形成致死突然変異コレクションの中では、例外的に劣性ホモ型が野生型と全く区別がつかないほど普通に生育するという珍しい特徴がある。この性質は変異型胚の表現型がたとえ変異をホモ型に持っていたとしても、その表現型が球状型からほぼ野生型まで一定の割合で大きくぶれる特徴があるために生じる。この特徴を生かして、胚発生致死変異の場合通常は不可能な、サプレッサーの単離を試みた。具体的には、研究分担者の永澤博士の協力のもと、受容体型キナーゼのホモ型突然変異体を化学変異原により処理し、M2世代において、変異型胚の頻度が大きく低下する系統の選抜を行った。その結果、2系統、受容体型キナーゼのオリジナルの変異をホモに保つにもかかわらず、球状型胚の出現が著しく低下する系統を得ることができた。現在、サプレッサー変異の同定を行うとともに、オリジナル変異を除いた際の表現型を解析中である。次に、既存の胚発生致死球状型突然変異体との二重突然変異体の作出を行った。現在までに、二重突然変異体が作成でき、その表現型の解析を進めている。さらに、受容体型キナーゼ突然変異と表現型が類似している他の球状型胚発生突然変異体の解析ならびに原因遺伝子の単離を行った。原因遺伝子の単離には、次世代シーケンサを用いた新規の方法論の解析にも取り組んだ。その結果、致死遺伝子を効率良く見付け出す手法を開発した。この方法により、既存の原因遺伝子がわかっている突然変異をきちんと同定できることを検証した。また、新規突然変異についても、従来法のマッピング結果を裏付ける形で、原因を突き止めることができた。(2) 受容体型キナ

ーゼが制御する細胞分化イベントの特定については、イネ初期胚の領域分化を可視化できる遺伝子マーカーを多数同定し、論文に報告した。この成果を利用して、受容体型キナーゼ突然変異体の初期胚において、各種遺伝子マーカーの発現を解析した。その結果、初期胚において、胚の特定の領域を欠失していることが明らかになった。(3) 受容体型キナーゼのリガンドとして想定されるペプチドの解析に関しては、候補となるペプチド性リガンドの突然変異体の一つを入手して、その表現型を解析したが、目立った表現型を見出すことはできなかった。これは、比較的小さな遺伝子ファミリーを形成しており、他の分子種がリダグダントに働いていると考えられた。そこで、残りの分子種をコードする遺伝子も含めた、多重突然変異をCRISPR/cas9法により作成を試みている。

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 9件)

Aiko Ishiwata, Misa Ozawa, Hiroshi Nagasaki, Makio Kato, Yusaku Noda, Takahiro Yamaguchi, Misuzu Nosaka, Sae Shimizu-Sato, Akie Nagasaki, Masahiko Maekawa, Hiro-Yuki Hirano, Yutaka Sato: Two *WUSCHEL*-related homeobox Genes, *narrow leaf2* and *narrow leaf3*, Control Leaf Width in Rice. **Plant and Cell Physiology** 54, 779-792, doi: 10.1093/pcp/pct032, 2013. 査読あり

Kylee M Peterson, Christine Shyu, Christian A Burr, Robin J Horst, Masahiro M Kanaoka, Minami Omae, Yutaka Sato, and Keiko U Torii: Arabidopsis homeodomain-leucine zipper IV proteins promote stomatal development and their ectopic expression induces stomata beyond the epidermis. **Development**, 140 1924-1943, doi: 10.1242/dev.090209, 2013. 査読あり

Misuzu Nosaka, Akemi Ono, Aiko Ishiwata, Sae Shimizu-Sato, Kiyoe Ishimoto, Yusaku Noda and Yutaka Sato: Expression of the rice microRNA *miR820* is associated with

epigenetic modifications at its own locus. **Genes Genet. Syst.** 88, 105-112, 2013. 査読あり

Misuzu Nosaka, Aiko Ishiwata, Sae-Shimizu Sato, Akemi Ono, Kiyoe Ishimoto, Yusaku Noda, Yutaka Sato: The copy number of rice CACTA DNA transposon carrying *MIR820* does not correlate with *MIR820* expression. **Plant Signal. Behav.**, 8(8), e25169, **10.4161/psb.25169**, <http://dx.doi.org/10.4161/psb.25169>, 2013. 査読あり

田淵宏明、大森伸之介、西村実、佐藤豊、吉田均：イネ閉花受粉性変異体 *spw1-cl*s および疎粒変異体 M645 (*lax2-3* アレル) 識別用 PCR-based DNA マーカーの開発、北陸作物学会報 48, 31-33, 2013. 査読あり

Tomomi Hara, Hirokazu Katoh, Daisuke Ogawa, Yasuaki Kagawa, Yutaka Sato, Hidemi Kitano, Yasuo Nagato, Ryo Ishikawa, Akemi Ono, Tetsu Kinoshita, Shin Takeda, Tsukahara Hattori: Rice SNF2 family helicase ENL1 is essential for syncytial endosperm development. **Plant J.**, 81, 1-12, 2015, doi: 10.1111/tj. 12705. 査読あり

Masaharu Suzuki, Yutaka Sato, Shan Wu, Byung-Ho Kang, Donald R. McCarty: Conserved functions of the MATE transporter BIG EMBRYO 1 in regulation of lateral organ size and initiation rate. **Plant Cell**, 27, 2288-2300, 2015, doi: 10.1105/tpc.15.00290. 査読あり

Jun-ichi Itoh, Yutaka Sato, Yutaka Sato, Ken-ichiro Hibara, Sae Shimizu-Sato, Hiromi Kobayashi, Hinako Takehisa, Karen Sanguinet, Nobukazu Namiki, and Yoshiaki Nagamura. Genome-wide prediction of spatio-temporal gene expression patterns during early embryogenesis in rice. **Development**, 143, 1217-1227, 2016, doi: 10.1242/dev.123661. 査読あり

Hiroko Sawada, Keita Tsukahara, Yoshihisa Kohno, Keitaro Suzuki, Nobuhiro Nagasawa, Masanori Tamaoki. Elevated Ozone Deteriorates Grain Quality of Japonica Rice cv. Koshihikari, Even if it Does

Not Cause Yield Reduction. **Rice** 9, 7, 2016, doi 10.1186/s12284-016-0079-4. 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)
小澤美沙、佐藤豊:NAL2/3遺伝子によるイネ葉幅制御機構の解析、第124回 日本育種学会講演会、鹿児島、2014.3.21-22

石本聖絵、佐藤豊:MAPKカスケードによるイネ胚器官分化機構の解析、第55回 日本植物生理学会年会、富山、2014.3.18-20.

佐藤豊: Conservations and diversities of embryo morphology and patterning in plants、第55回 日本植物生理学会年会、富山、2014.3.18-20.

小澤美沙、佐藤豊: 外来遺伝子防御システムを利用した導入遺伝子高発現組換えイネの作成、第126回 日本育種学会講演会、宮崎、2014.9.27

Kiyoe Ishimoto, Yutaka Sato: Rice MAPK6 regulates organ differentiation during embryogenesis through determination of regional identity. International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium 2015、名古屋、2015.8.28.

Ai Sugiki, Yutaka Sato: A rice biotin auxotroph mutants reveal a function of water soluble vitamin, biotin, in organogenesis during embryogenesis. International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium 2015、名古屋、2015.8.28.

舟橋成仁、石綿愛子、佐藤豊:イネの胚盤形成異常変異体の表現型の解析、第23回育種学会中部地区談話会、長久手、2015.11.21.

石本聖絵、佐藤豊:イネ球状型胚発生突然変異体 odm-192 の解析、第57回 日本植物生理学会年会、岩手、2016.3.18-20.

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、第57回日本植物生理学会年会、2016.3.18.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 豊 (SATO, Yutaka)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准
教授
研究者番号：40345872

(2) 研究分担者

永澤 信洋 (NAGASAWA, Nobuhiro)
秋田県立大学・生物資源学部・准教授
研究者番号：90599268

(3) 連携研究者

()

研究者番号：