

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380005

研究課題名(和文) イネの胚形成における器官分化の分子機構

研究課題名(英文) Analysis of organogenesis in rice embryo

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) 11,800,000円、(間接経費) 3,540,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はイネの胚形成において器官分化を制御する二つのシグナリング経路に着目して研究を行った。一つは茎頂分裂組織の構築過程に機能する低分子RNAによるシグナリング、もう一つがMAPキナーゼを介したシグナリングである。これらのシグナリング経路自体はシロイヌナズナなど多くの植物で保存されているが、胚における器官分化への関与はイネを用いた申請者らの研究により初めて明らかにされた。そこで、本研究はこれまでの成果をさらに発展させ、分化を誘導する一連のシステムをイネにおいて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research, we focus on two signaling pathways that regulate rice embryogenesis. One is a small RNA pathway that governs shoot apical meristem formation during rice embryogenesis and another is a MAPK signaling that governs early embryo patterning in rice. These signaling pathways themselves are both exist in rice and Arabidopsis, however, their functions seem different in both species. In this research, we demonstrated the involvement of these pathways in the early organogenetic events during rice embryogenesis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：イネ 胚 キナーゼ 低分子RNA

## 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。高等植物の形態形成機構についてはその要ともなる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。胚形成の過程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器官分化のメカニズムを解析するには格好の材料といえる。これまでの研究で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)といった低分子RNAによるシグナリングに関わる因子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)。これらの結果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。このような現状から、胚形成時における器官分化を誘導する一連のシステムをイネにおいて明らかにする必要性を痛感し本研究を行うに至った。

## 2. 研究の目的

本研究はイネの胚形成において器官分化を制御する二つのシグナリング経路に着目して研究を行った。一つは茎頂分裂組織の構築過程に機能する低分子RNAによるシグナリング、もう一つがMAPキナーゼを介したシグナリングである。これらのシグナリング経路自体はシロイヌナズナなど多くの植物で保存されているが、胚における器官分化への関与はイネを用いた申請者らの研究により初めて明らかにされた。そこで、本研究はこれまでの成果をさらに発展させ、分化を誘導する一連のシステムをイネにおいて明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 胚における器官分化に機能するMAPキナーゼを介した情報伝達経路の解析

イネから単離した球状胚突然変異体(*gle4*)の原因遺伝子はMAPキナーゼをコードしていた。このMAPキナーゼはこれまで病原抵抗性やストレス応答との関わりが明らかにされているが、器官分化との関わりは未解明な点が多かった。胚における初期の器官分化にはオーキシンの勾配による軸形成とそれに伴う非対称細胞分裂が重要な役割を果たすことがシロイヌナズナで明らかにされている。また、*gle4*変異体はオーキシンの分布異常に関連すると思われる表現型も観察される。そこで、*gle4*変異体における胚形成

初期の細胞分裂様式の解析を行った。具体的には、野生型の初期胚を用いて、透明化並びに染色方法の検討を行った。次いで、*gle4*変異型胚を用いて、野生型と変異型胚で細胞分裂のパターンに違いがあるか否かを検討した。

東京大学の長戸らにより単離された一連のイネ胚発生致死突然変異体の中には*gle4*と表現型が類似した変異体が多数単離されている。これらの中に、GLE4/MAPキナーゼを介した情報伝達経路の上流が下流に関する因子の突然変異が含まれている可能性は極めて高い。そこで、*gle4*突然変異体に加えて*gle4*に類似した新規球状型胚突然変異体の表現型の解析を行った。具体的には、胚形成の過程や胚の領域化/器官分化をモニターできるマーカー遺伝子のセットの開発に取り組んだ。ついで、これらマーカー遺伝子の発現を*in situ*ハイブリダイゼーションにより解析し野生型と変異体間で比較した。さらに、新規球状型胚突然変異体の遺伝子単離に向けたマッピングと遺伝子単離をとおして、GLE4/MAPキナーゼを介した情報伝達経路の上流が下流に関する因子の同定を目指した。

### (2) イネの ta-siRNA 経路突然変異体を用いた低分子RNAシグナルの作用機序の解明

イネゲノムにはta-siRNAの転写後抑制の標的になるETT/ARF転写制御因子は4コピー存在し、それぞれ*OsETT1*~*OsETT4*と呼ばれている。これら4つのETT/ARF転写因子の発現は程度の差こそあれta-siRNA合成経路突然変異体*sh1/sho*で亢進しており、このことが胚におけるシュート構築異常の一因と考えられる。これまでの研究では、4つの*OsETT*遺伝子のある程度の機能分担が予想され、その中でも*OsETT1*と*OsETT3*がイネの胚で高発現しており胚形成に必須であると考えられる結果が得られている。そこで、本研究では*OsETT1*と*OsETT3*の下流探索を重点的に行うこととした。

まず、*OsETT1*と*OsETT3*の誘導過剰発現体を作成した。さらに、SELEX法により*OsETT1*と*OsETT3*の結合DNA配列を明らかにし、両者の機能分担の可能性などを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 胚における器官分化に機能するMAPキナーゼを介した情報伝達経路の解析

本研究は胚形成時における器官分化の分子機構に関し、特に分化を誘導するシグナル伝達に着目して研究を行った。研究代表者はイネの胚発生致死突然変異体を用いた解析から、MAPキナーゼによるシグナリングがイネの胚形成の過程で器官分化に重要な働きをすることをすでに明らかにしている。本研究ではこれらのシグナリング経路の詳細を明らかにすることを目指した。胚における器官分化に機能するMAPキナーゼを介した情報伝達経路の解析を行った。胚形成初期の分裂

様式に着目して表現系の解析系の立ち上げを重点的に行った結果、共焦点レーザー蛍光顕微鏡により受精後 24 時間以内の細胞分裂様式を効率よく観察する実験系を立ち上げることに成功した。本実験系により、野生型と *gle4* 変異型胚における、初期細胞分裂様式を比較したが、劣性ホモ型の *gle4* 変異型胚の同定が難しいため、はっきりとした野生型と変異型胚の違いを明らかにする事ができなかった。

次に、*gle4* 変異型胚の分化状態を可視化する分子マーカーの開発を行った。LMD 法により野生型胚を分割して RNA を抽出し発現の局在する遺伝子をマイクロアレー法による探索を東京大学伊藤 / 桧原らおよび生物資源研究所の佐藤らとともにに行った。その結果、多数の発現局在遺伝子を見いだした。このうち、代表的な遺伝子を約 60 に絞り込み、野生型胚における発現を解析した。その結果、8 遺伝子が明瞭な局在パターンを示し、*in situ* ハイブリダイゼーションを行うにあたり、非常に有用な分子マーカーを得る事に成功した。

*gle4* に類似したイネ球状型胚変異体の解析については、研究期間中に 3 系統のラフマッピングが終了し、そのうち 2 系統については候補遺伝子を一つに絞り込む事に成功した。これら 2 系統については、相補試験などにより、原因遺伝子が候補遺伝子と同一である事の検証がすすんでいる。

## (2) イネの ta-siRNA 経路突然変異体を用いた低分子 RNA シグナルの作用機序の解明

低分子 RNA を介した茎頂分裂組織構築に機能するさらなる因子の同定を、抗体を用いて免疫沈降により複合体の精製を試みた。しかし、作成した抗体が当初期待していたほど免疫沈降に機能せず、新たな抗体の作成を行ったが、免疫沈降はうまく行かなかった。そこで、分化を誘導するシグナルとしての低分子 RNA の特性解析を行った。低分子 RNA の標的である ETT/ARF 遺伝子の発現解析を詳細に行った。その結果、HD-ZIP III 遺伝子の発現と相互排他的であることが判明し、両者がお互いの発現を負に制御していることが予想された。このため、現在、ETT/ARF 遺伝子をもつ低分子 RNA 結合シグナルを融合したレポーターと融合していないレポーターを恒常的プロモーター下で発現することにより、相互排他的な発現が低分子 RNA シグナルに依存するか否かを検討した。その結果、ETT/ARF 遺伝子が ta-siRNA により負の制御を受けて発現が局在する事が明らかになった。小分子 RNA を介した茎頂分裂組織構築に機能するさらなる因子の同定については、小分子 RNA の標的である ETT/ARF 遺伝子の機能解析を中心に取組んだ。ETTIN 遺伝子ファミリーの RNAi 系統や過剰発現系統を作出しその表現型を観察した。その結果、イネに 4 種ある ETTIN 遺伝子に機能分化が見られる事が明らかになった。SELEX 法

により、ETT 遺伝子群の転写因子としての機能分化の有無を検討した結果、いずれの ETT タンパクもほぼ同一の配列に結合する事が明らかとなった。この事から、ETT 遺伝子の下流は、各 ETT 遺伝子の発現部位の違いか、または、ETT タンパクと相互作用する因子の違いにより、もたらされる事が予想出来た。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

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 1936-1945, DOI: 10.1242/dev.090209, 2013. 査読有り

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. 査読有り

Misuzu Nosaka, Jun-ichi Itoh, Yasuo Nagato, Akemi Ono, Aiko Ishiwata Yutaka Sato: Role of transposon-derived small RNAs in the interplay between genomes and parasitic DNA in rice. *PLoS Genetics* 8(9), e1002953, DOI:10.1371/journal.pgen.1002953, 2012. 査読有り

Katsutoshi Tsuda, Yutaka Sato, Yukihiko Itoh, Nori Kurata: Positive autoregulation of a KNOX gene is essential for shoot meristem maintenance in rice. *Plant Cell* 23, 4368-4381, DOI: 10.1105/tpc.111.090050, 2011. 査読有り

Hiroaki Tabuchi, Yu Zhang, Susumu Hattori, Minami Omae, Sae Shimizu-Sato, Tetsuo Oikawa, Qian Qian, Minoru Nishimura, Hidemi Kitano, He Xie, Xiaohua Fang, Hitoshi Yoshida, Junko Kyojuka, Fan Chen, and Yutaka Sato: *LAX PANICLE2* of rice encodes a novel nuclear protein and regulates the formation of axillary meristems. *Plant Cell*, 23, 3276-3287, DOI: 10.1105/tpc.111.088765, 2011. 査読有り

Daisuke Ogawa, Kiyomi Abe, Akio Miyao, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Megumi Mizutani, Haruka Morita, Yosuke Toda, Tokunori Hobo, Yutaka Sato, Tsukaho Hattori, Hirohiko Hirochika, Shin Takeda: *RSS1* regulates the cell cycle and

maintains meristematic activity under stress conditions in rice. *Nat. Commu.*, 2, 278, DOI: 10.1038/ncomms1279, 2011. 査読有り

Masashi Abe, Takanori Yoshikawa, Misuzu Nosaka, Hitoshi Sakakibara, Yutaka Sato, Yasuo Nagato, Jun-ichi Itoh: WAVY LEAF 1, an Ortholog of Arabidopsis HEN1, Regulates Shoot Development by Maintaining microRNA and trans-acting siRNA Accumulation in Rice. *Plant Physiol.*, 154, 1335-1346, DOI: 10.1104/pp.10.160234, 2010. 査読有り

Shinya Nakamura, Shoji Mano, Yuji Tanaka, Masato Ohnishi, Chihiro Nakamori, Masami Araki, Tomoko Niwa, Mikio Nishimura, Hironori Kaminaka, Tsuyoshi Nakagawa, Yutaka Sato, Sumie Ishiguro: Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1315-1319, DOI: 10.1271/bbb.100184, 2010. 査読有り

〔学会発表〕(計 12 件)

石本聖絵、八木陽也、佐藤豊：イネ球状型胚突然変異体 globular embryo 4 (gle4) の解析、第 54 回日本植物生理学会年会、岡山大学、2013 年 3 月 21~23 日

大前南美、八木陽也、石本聖絵、野田祐作、佐藤豊、桧原健一郎、伊藤純一、佐藤豊：イネの初期胚発生時に細胞特異的発現をする遺伝子マーカーの探索と利用、第 123 回日本育種学会講演会、東京農業大学、2013 年 3 月 27-28 日

Yutaka Sato: Battles between plant genome and its parasitic elements through the action of small RNAs. Japan-China rice developmental biology meeting-Morphology to Yield, Beppu, Oita, Japan 2013/3/7-9

大前南美、八木陽也、石本聖絵、野田祐作、佐藤豊、桧原健一郎、伊藤純一、佐藤豊：イネの初期胚発生時に細胞特異的発現をする遺伝子マーカーの探索、第 20 回育種学会中部支部談話会、名古屋大学、2012 年 12 月 8 日

八木陽也、石本聖絵、佐藤豊：イネの胚形成における器官分化を制御するレセプター型キナーゼの解析、日本育種学会第 122 回講演会、京都産業大学、2012 年 9 月

佐藤豊：イネの胚形成における器官分化を支える情報伝達、日本育種学会第 122 回講演会ワークショップ W07 種子形成シナリオの分子遺伝学、京都産業大学、2012 年 9 月

榊井沙紀、佐藤豊：イネの胚形成における ETTIN/ARF 転写因子の機能解析、日本育種学会第 121 回講演会、宇都宮大学、2012 年 3 月

八木陽也、山田章雄、佐藤豊：イネの未分化型胚発生突然変異体 o-192 の解析、第 18

回育種学会中部支部談話会、愛知教育大学、2010 年 12 月 5 日

Yutaka Sato, Analysis of organogenesis defective mutants in rice. Japan-China rice developmental biology meeting, Beijing, China 2010/10/9-11

八木陽也、山田章雄、中尾梨沙、長戸康郎、佐藤豊：イネの未分化型胚発生突然変異体の解析、第 118 回日本育種学会講演会、秋田県立大学、2010 年 9 月 24 日

佐藤豊：イネの胚形成における器官分化の分子機構、日本植物学会シンポジウム「多様な形を作り出す植物の発生機構-その共通性と独自性」、中部大学、2010 年 9 月 11 日

Yutaka Sato: Regulation of meristem function by the small RNA pathway in rice. FASEB summer conference 2010-Mechanisms in Plant Development, Vermont Academy USA, Aug 15-20 2010

〔図書〕(計 1 件)

佐藤豊、小島晶子、町田千代子：植物のシグナル伝達・シュート形成調節における低分子 RNA の役割、共立出版刊、pp139-147, 2010.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：害虫防除方法

発明者：新美輝幸、吉岡博文、佐藤豊

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：PCT/JP2010/059499(WO)

出願年月日：2010 年 6 月 4 日

国内外の別：国外

取得状況(計 1 件)

名称：害虫防除方法

発明者：新美輝幸、吉岡博文、佐藤豊

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：5305489

取得年月日：2013 年 7 月 5 日

国内外の別：国内

〔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