

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570048

研究課題名（和文）

イネ 3 量体 G タンパク質が制御する遺伝子群の解明

研究課題名（英文）

Study of genes regulated by heterotrimeric G protein in rice

研究代表者

岩崎 行玄（IWASAKI YUKIMOTO）

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：20193732

研究成果の概要（和文）：

イネ 3 量体 G タンパク質 α サブユニット遺伝子欠失変異体 *d1* が示す矮性の原因は、細胞数の減少であることを明らかにした。マイクロアレイ解析を行った結果、G α 欠失変異体において、11 個の細胞数の制御に関わる可能性のある候補遺伝子を同定した。これらの候補遺伝子の特徴から、(i) 細胞分裂速度が遅延する可能性と (ii) 細胞分裂方向に異常が生じ、正しい方向への分裂ができないために細胞数が減少する可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The rice mutant for heterotrimeric G protein α subunit gene *d1* showed dwarf. The cause of dwarf in *d1* was due to the reduction of cell number. By microarray analysis, transcripts for eleven genes, which may be concerned with cell division, were suppressed in *d1*. In reduction of cell number in *d1*, two hypotheses are considered, the former is reduction of cell division frequency and the latter is the impaired vertical development due to abnormal orientation of cell division.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：植物生化学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物学、生理学

キーワード：RNAi 法、イネ、細胞分裂、3 量体 G タンパク質、シグナル伝達、ブラシノステロイド、植物

1. 研究開始当初の背景

植物は、動物と同様に、3 量体 G タンパク質サブユニット（G α 、G β 、G γ サブユニット）を有する。研究開始年度では、シロイヌナズナは、1 種類の G α 遺伝子、1 種類の G β 遺伝子、2 種類の G γ 遺伝子が同定される

とともに、これらサブユニット遺伝子に対する変異体が単離されていた。イネは、1 種類の G α 遺伝子、1 種類の G β 遺伝子、2 種類の G γ 遺伝子が同定されるとともに、G α サブユニット遺伝子欠失変異体 *d1* が唯一同定されていた。植物 3 量体 G タンパク質シグナ

リングの研究は、シロイヌナズナもイネも、最初に発見されたG α サブユニット遺伝子欠失変異体の解析結果が充実していた。研究開始年度における重要な特色(問題)は、シロイヌナズナもイネも、G α 遺伝子は1種類にも関わらず、この遺伝子の欠失変異体が多様な植物ホルモン、エリシター、光などに対して低感受性を示した点であろう。動物の知見を参考にすれば、3量体Gタンパク質シグナリングの構成因子は複雑である。高等植物においても、外来シグナル、Gタンパク質共役受容体、3量体Gタンパク質、3量体Gタンパク質と直接相互作用する効果器、その効果器に制御される情報伝達因子などを想定すべきであろう。加えて、これらの想定因子が組織特異性を持って発現制御されることにより、組み合わせが倍化し、植物において、3量体Gタンパク質シグナリングの多様性が生じていることが想定できた。

2. 研究の目的

本研究は、このような外来シグナル応答の複雑さを鑑み、単純に、野生型イネ、G α 遺伝子欠失変異体 *d1*、およびG β 発現抑制個体の転写産物を比較から、G α およびG β サブユニット遺伝子が制御する遺伝子の同定を行い、その同定された遺伝子産物の機能から、植物3量体Gタンパク質シグナリングの特徴を推定できるかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究着手当初、イネにおいては、Gタンパク質シグナリングに関与する遺伝子欠失変異体は、*d1* (G α サブユニット遺伝子欠失変異体)が唯一であった。本申請課題では、イネG β サブユニット遺伝子の発現抑制個体をRNAi法により作出し、比較対象材料を増やした。

(2) 組織学的解析より、3量体Gタンパク質シグナリングに関与する全ての変異体・発現抑制個体が、おのおの、細胞数を制御するか、細胞長を制御するかを明らかにすることが重要と考えた。はじめに、*d1*は顕著な矮性を示すが、矮性の原因が細胞数の減少か細胞長の減少かが不明であった。この問題に答えるために、組織切片を観察し、細胞長を測定し、組織長を細胞長で除することで推定細胞数を算出した。同じ解析を、イネG β サブユニット遺伝子発現抑制個体に適用した。

(3) イネにおいて、ブラシノステロイド受容変異体 *d61*およびブラシノステロイド生合成変異体 *d2*は、矮性を示す点、葉が直立する点、第2節間の著しい伸長阻害が生じる点において、*d1*の異常と類似している。そこ

で2重変異体を作成し、表現型を比較検討した。

(4) 野生型、*d1*、G β 遺伝子発現抑制個体の転写産物を、マイクロアレイ法により解析し、蓄積量を比較検討した。

4. 研究成果

(1) イネG β 発現抑制個体の作出と解析
①野生型(WT)に、RNAi法を用いてイネG β 遺伝子発現抑制個体を作成した(*rbg1RNAi/WT*)。イネG β 遺伝子発現抑制の程度は、RT-PCRとWestern blotにより解析した。G β タンパク質が野生型の半分程度まで減少した個体はタンパク質の減少量に比例して矮性を示し、これ以上抑制された個体は幼苗で枯死した。G α タンパク質が作られない*d1*は親の半分の背丈(矮性)になることに対して、G β タンパク質が全く蓄積しない場合は、致死に至る可能性が示唆された。この結果は、G β はG α と協調する以外に、別途新たな機能も併せ持つことを示唆した。

②*rbg1RNAi/WT*はラミナジョイント部位と節間が枯死した。ラミナジョイント部位と節間の枯死は*d1*では観察されないため、G β はG α と異なり、両組織の維持に必須な機能を持つことが示唆された。

③G α とG β γダイマーが協調的に働いていれば、G β の発現抑制は、*d1*と同じになるだろうと想定していた。これを確認するために、*d1*にRNAi法を用いてイネG β 遺伝子発現抑制個体を作成した(*rbg1RNAi/d1*)。その結果、この遺伝子発現抑制個体は、*d1*よりさらに矮化した。この結果は、G β はG α と異なる機能を持つことを裏づけた。

④*rbg1RNAi/d1*でも、ラミナジョイント部位と節間が枯死した。ラミナジョイント部位と節間の枯死は*d1*では観察されないため、G β はG α と異なり、両組織の維持に必須な機能を持つことを裏づけた。

(2) G α およびG β の発現様式の解析と*d1*およびG β 発現抑制個体の矮性の原因の解明

①イネG α サブユニット遺伝子の発現様式は、G α プロモーター::GUSを導入した形質転換体を用いて各組織でのプロモーター活性の観察、G α RNAの定量(RT-PCR)、G α タンパク質の定量(Western blot)により解析した。この結果、G α は、伸長する組織で発現量が高いことが示された。

②イネG β サブユニット遺伝子の発現様式は、G α サブユニット遺伝子の場合と同様の手法で解析した。その結果、G β サブユニット遺伝子の発現様式は、G α サブユニットの場合に酷似し、伸長する組織で発現量が高い

ことが示された。

③ *d1* の組織長 (葉鞘、節間、種子) は、野生型の約半分である。よって、これらの組織の細胞長を測定し、組織を細胞長で除して推定の細胞数を算出した。*d1* の細胞長は野生型と同じか長めであったため、*d1* の矮性の原因は細胞数の減少であると結論できた。この結果より、イネ $G\alpha$ は、細胞数を制御することが示された。

④ $G\beta$ 発現抑制個体 (*rbg1RNAi/WT* および *rbg1RNAi/d1*) の内、致死に至らず種子を結実するが、顕著な矮性を示す個体の細胞長を解析したところ、発現抑制個体の細胞長は、親の細胞長と同じであった。この結果は、イネ $G\beta$ は、細胞数を制御することが示された。

⑤ $G\alpha$ および $G\beta$ 、共に、細胞数を制御することが示されたが、 $G\beta$ 遺伝子発現抑制実験より、 $G\beta$ は $G\alpha$ 以外の機能も有している可能性が示唆された。

(3) *d1* と類似した表現型を示すブラシノステロイド変異体との遺伝学的関係

イネブラシノステロイド受容変異体 *d61* およびブラシノステロイド生合成変異体 *d2* は、矮性を示す点、葉が直立する点、第2節間の著しい伸長阻害が生じる点において、*d1* が示す形態異常と類似している。そこで2重変異体 (*d1 d61*, *d1 d2*) を作出し、表現型を比較検討した。

① 2重変異体 (*d1 d61*, *d1 d2*) の表現型は、単独の変異体の異常を加算した表現型を示した。この結果は、3量体Gタンパク質シグナリングとブラシノステロイドシグナリングが独立していることを示唆した。

② *d61* と *d2* の各組織の組織切片を作成し、細胞長を測定後、細胞数を算出した結果、両ブラシノステロイド関連変異体の矮性の原因は、細胞長が短くなることが原因であった。この結果は、*d1* が細胞数の減少であることを考えると、2重変異体の加算的な異常を合理的に説明した。

③ ラミナジョイント部位にブラシノライドを投与した場合、屈曲する。*d1* にブラシノステロイドを投与した場合、ラミナジョイントの屈曲が野生型に比べ抑制されることから、*d1* はブラシノステロイド応答において、低感受性変異体として知られていた。しかしながら、上記の結果を踏まえて考察すると、*d1* は、屈曲する細胞数が減少しているため、屈曲度合いが少ない可能性 (低感受性) が考えられた。

④ ラミナジョイント部位の組織切片を野生型と *d1* で比較した。野生型は屈曲する方向へ細胞が伸長したが、*d1* においては、横方向への細胞の肥大が観察された。この結果は、局所的に高濃度のブラシノライドに対しての応答に際し、*d1* では野生型が有している伸

長方向の制御が欠損している可能性を示唆した。

(4) $G\alpha$ 遺伝子と $G\beta$ 遺伝子が制御する遺伝子群の探索

① マイクロアレイは、44k 4x オリゴマイクロアレイ、一色法を用い、農業生物研究所イネゲノムリソースセンターにて行った。内部標準を基準に、スコア100以上のシグナル強度を示す遺伝子を解析対象とした。予備実験で、野生型(WT)だけでも、生育環境に応じて、転写産物がかなり変動することが解かっていた。一方、今回選択した生育環境では、いずれも *d1* は野生型の半分の組織長を示すことから、細胞数を制御する因子は、どの生育条件でも共通して検出できることが期待できた。そこで、複数の生育条件で育てたイネで、共通して、類似の挙動を示す転写産物を見出すことにした。マイクロアレイ解析は、材料が十分量準備できる野生型と *d1* で行った。

(ア) 幼苗期のイネの生育は、グロースチャンパー(30°C)で、3種類の生育条件、Yoshida 培地(12時間明所、12時間暗所)、Yoshida 培地(連続光)、1/2 MS 培地(12時間明所、12時間暗所)を比較した。

(イ) 幼苗期は、第4葉展開期に着目し、伸長が終了した第2葉(L2)と第3葉(L3)と伸長中の第4葉(L4)を比較し、L4で転写量が多いもの(L4/L2およびL4/L3比が共に1.0以上)を選択した。上記の3種類の生育条件全てにおいて同様の解析をした後、共通してL4/L2およびL4/L3比が共に1.0以上のものを選択した。

(ウ) 3種類の培地条件ごとに、各1回、アレイ解析をした。

(エ) 花芽は圃場で生育させたイネより採取した。今回は、4~6cmの花芽(野生型)、2~3cmの花芽(*d1*)用い、野生型(WT)と *d1* で、転写産物量を比較した。

② 上記の(ア)から(エ)全てに共通して、野生型より *d1* で減少または増加する転写産物を探索し、 $G\alpha$ 遺伝子が欠失すると、それに伴い減少する31個の転写産物を同定した。

(ア) 細胞数を制御する候補として、4種類の転写因子、1種類の細胞周期関連遺伝子、2種類の細胞骨格関連遺伝子、1種類のオーキシン応答遺伝子、3種類の情報伝達関連遺伝子、合計11個を同定した。これらの遺伝子の機能から、これらの遺伝子の発現抑制で、(i) 細胞分裂速度が遅延する可能性と (ii) 細胞分裂方向に異常が生じ、正しい方向への分裂ができないために、縦方向の伸長が抑制され、矮性を示す可能性が考えられた。

(イ) 機能未知等の遺伝子20個を同定した。

③ イネ $G\beta$ 遺伝子発現抑制個体は、矮性を示

すとともに、ラミナジョイント部位と節間の細胞死を生じる。組織別、生育段階別の解析はできていないが、野生型(WT)と *d1* の成葉を比較した場合、病気抵抗性遺伝子群 (*POX22.3*, *PBZ1*, *OsDTCl*) がイネGβ遺伝子発現抑制個体で顕著に増加していることを見出した。この結果は、イネGβ遺伝子は病気抵抗性遺伝子群の転写制御に関与していることを示しており、イネGβ遺伝子は、細胞数の制御以外にも機能を有することを示した。細胞分裂活性の高い組織は植物体の解体を伴うが、今回は、個体数が少ないので、種子を得ることを優先し、植物の解体を避けた。このため、成葉(細胞分裂・伸長を終えた組織)を用いたことが、細胞分裂に関与する遺伝子群の同定に至らなかった原因と考えている。

(5) 将来展望

組織学的解析からGαは細胞数を制御することを明らかにした。マイクロアレイ解析から、Gα欠失変異体において、11個の細胞数を制御する候補遺伝子を同定した。今後、RT-PCR定量で、これらの候補遺伝子の転写変動を解析し、真にGα遺伝子依存性か否かを検証する必要がある。前述したように、これらの候補遺伝子の発現抑制で、(i)細胞分裂速度が遅延する可能性と(ii)細胞分裂方向に異常が生じ、正しい方向への分裂ができないために、縦方向の細胞分裂が抑制され、結果として矮性を示す可能性が考えられた。イネGαは、上記の可能性のいずれか、あるいは両方を担う可能性があるため、これらの点を説明するための実験が求められる。細胞分裂速度に関する解析はヒストン遺伝子の *in situ hybridization* が、細胞分裂方向の異常の有無はチューブリンなどの細胞骨格のパターンを検出することで、ヒントを得ることができると考えている。加えて、この候補遺伝子の中から、真にGα遺伝子に依存する転写産物が同定できれば、植物Gタンパク質シグナリングの初めての転写マーカーになる。

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5件)

① Utsunomiya, Y., Samejima, C., Fujisawa, Y., Kato, H. and Iwasaki, Y. Rice transgenic plants with suppressed expression of the β subunit of the heterotrimeric G protein. *Plant Signaling Behavior*, 7, 443-446 (2012) (査読有)

② Abe, Y., Matsusita, K., Komatu, S. and Iwasaki, Y. Identification of heterotrimeric G protein α and β subunits in rice. *Protein Peptide Letters*, 19, 277-281 (2012) (査読有)

③ Utsunomiya, Y., Samejima, C., Takayanagi, Y., Izawa, Y., Yoshida, T., Sawada, Y., Fujisawa, Y., Kato, H. and Iwasaki, Y. Suppression of the rice heterotrimeric G protein β-subunit gene, *RGB1*, causes dwarfism and browning of internodes and lamina joint regions. *Plant J*, 67, 907-916 (2011) (査読有)

④ Izawa, Y., Minami, M., Ohki, S. and Iwasaki, Y. Expression profile of the α subunit of the heterotrimeric G protein in rice. *Plant Signaling Behavior*, 5, 1-3 (2010) (査読有)

⑤ Izawa, Y., Takayanagi, Y., Inaba, N., Abe, Y., Minami, M., Fujisawa, Y., Kato, H., Ohki, S., Kitano, H., and Iwasaki, Y. Function and expression pattern of the α subunit of the heterotrimeric G protein in rice. *Plant Cell Physiol.*, 51, 271-281 (2010) (査読有)

[学会発表] (計13件)

① Iwasaki, Y. Function of rice heterotrimeric G protein. Japan-China Joint Symposium on Rice Developmental Biology -From Morphogenesis to Yield. March 7-9, 2013-Beppu, Oita, Japan (2013)

② 瀬上修平、井沢 有希、香野みずき、北野英己、三浦孝太郎、岩崎行玄：短粒で矮性を示すイネ 3 量体Gタンパク質αサブユニット欠損変異体(*d1*) とブラシノステロイド関連変異体の組織学的な形態の比較。日本育種学会 第123回講演会 2013 3月27日～28日(東京農業大学)

③ 岩崎行玄、三浦孝太郎、瀬上修平：イネの種子形を制御する遺伝子。日本育種学会122回講演会 ワークショップ 2012年9月14日～16日(京都)

④ Abe, Y., Izawa, Y., Utsunomiya, U., Kato, H. and Iwasaki, Y. Study of heterotrimeric G protein complex in rice. Gordon Research Conferences, *Plant Molecular Biology*. July 15~20, NH, USA (2012)

⑤ 井沢有希, 香野みずき, 北野英己, 三浦孝太郎, 岩崎行玄: イネ 3 量体Gタンパク質 α サブユニットは、葉鞘の細胞数の制御において、ブラシノステロイドシグナリングの下流で機能する。第52回日本植物生理学会年会 平成23年3月20日~22日 (仙台)

⑥ 宇都宮有瑞子, 鮫島千裕, 高柳欣幸, 井沢有希, 吉田貴寿, 藤澤由紀子, 加藤久晴, 岩崎行玄: イネ 3 量体Gタンパク質 β サブユニットの機能解析。第52回日本植物生理学会年会 平成23年3月20日~22日 (仙台)

⑦ 香野みずき, 井沢有希, 北野英己, 三浦孝太郎, 岩崎行玄: 縦方向の伸長を制御するイネ遺伝子群の解析。日本育種学会第118回講演会 平成22年9月24日~25日 (秋田)

⑧ Utsunomiya, U., Samejima, C., Fujisawa, Y., Kato, H. and Iwasaki, Y. Analysis of β subunit of Rice Heterotrimeric G Protein. XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB), July 4~9, Valencia, Spain (2010)

⑨ Izawa, Y., Yoshiyuki Takayanagi, Y., Inaba, N., Abe, Y., Minami, M., Fujisawa, Y., Kato, H., Ohki, S., Kitano, H. Iwasaki, Y. Function and expression of the α subunit of rice heterotrimeric G protein. XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB), July 4~9, Valencia, Spain (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 行玄 (IWASAKI YUKIMOTO)
福井県立大学・生物資源学部・教授
研究者番号: 20193732

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: