

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：23780002

研究課題名（和文）イネにおける胚と胚乳比率を決める分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Dissection of molecular mechanisms governing embryo-endosperm ratio in Rice

研究代表者

桧原 健一郎（HIBARA KEN-ICHIRO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：10595713

研究成果の概要（和文）：種子において胚の大きさに異常を示す 5 つのイネ突然変異体を用いて、胚と胚乳サイズを決定するメカニズムの解明を行った。その結果、胚と胚乳の比率の決定要因は、胚よりも胚乳に存在し、とくに胚周辺胚乳組織における細胞死を伴った層構造の構築が重要であることを見いだした。また、この層構造の構築には転写因子として働く *RE* 遺伝子や水酸化酵素として働く *GE* 遺伝子が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

I investigated the molecular mechanisms governing embryo-endosperm ratio using five rice mutants, which are defective in embryo size. I found that the major determinant for embryo-endosperm size balance exists in endosperm region especially in embryo facing region of endosperm (EFR) rather than embryo region. In addition, I found that the establishment of layer structure through cell death of endosperm cell in EFR contributes embryo-endosperm size control. Identification and expression studies of *RE* genes and *GE* gene showed that these genes are required for establishing the proper size balance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、胚乳、細胞死、胚サイズ、発生

1. 研究開始当初の背景

植物における葉や花といった器官や種子の成長は、初期の細胞増殖期間における細胞数の増加とその後の細胞伸長や肥大によって成し遂げられると考えられている。ただ、無限大に成長するのではなく、種特有の決められた大きさにまでしか成長しない。これまでにモデル植物であるシロイヌナズナを中心に側生器官や種子などの大きさに影響を及ぼす遺伝子がいくつか単離・同定されており、これらの解析から、最終的にあらかじめ決められていた大きさにまで器官や種子が成長する過程には細胞増殖期間の制御や植物ホ

ルモンであるオーキシンやアブジジン酸などによる制御などいくつかの異なる調節経路によって綿密に制御されていることが示唆されている。

一方、多くの植物（とくに双子葉植物）では、胚乳が種子成熟過程で衰退し、成熟した種子の中には存在が認められない無胚乳種子を作る。そのため、シロイヌナズナを含めた分子遺伝学的解析の中心にあるモデル植物において種子内における胚と胚乳についての解析例はほとんどなく、限られた種子体積において胚と胚乳がどのような分子メカニズムによってそれらのサイズが決定されてい

るかについてはほとんど知見がない。我々の研究室では、胚と胚乳との大きさの決定因子を同定するため、これまでに MNU 変異原処理によって胚のサイズが小さくなる（胚乳部分が大きくなる）*reduced embryo1 (re1)*、*re2*、*re3* という 3 つの遺伝子座と胚のサイズが大きくなる（胚乳部分が小さくなる）*giant embryo (ge)*、*goliath (go)* 変異体という 2 つの遺伝子座を同定している。これまでの解析から *re1-re3* と *ge* 変異体の胚サイズの変化にはそれぞれの胚乳細胞における細胞死が深く関与していることが遺伝学的、形態学的解析から示唆されている。一方、*go* 変異体についてはマッピングによって原因遺伝子が同定され、*GO* 遺伝子は glutamate carboxypeptidase をコードし、これまでに動物で見いだされているファミリータンパク質の機能からペプチドを切断・修飾し、なんらかの小さなシグナル分子を生産して、代謝やシグナル経路に影響を及ぼすことが示唆されている。しかし、植物における *GO* タンパク質の実際の機能やその基質などについての分子生物学的知見は多く得られていない上、*go* と *re* や *ge* 間の遺伝学的関係については不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、イネ種子を構成する胚と胚乳におけるそれぞれのサイズを規定する分子機構について、5 つの独立した遺伝子座に起因する突然変異体を用いて、原因遺伝子の同定ならびにそれらの遺伝学的、分子生物学的関係を明確にすること、そして胚と胚乳間に存在すると考えられる相互作用の分子メカニズムを解明することを目的とする。そして、得られた知見から、胚-胚乳のサイズの比率を人為的に制御し、それぞれに含まれる栄養成分をニーズに見合った量に改変するための分子遺伝学的基盤を確立することを目指す。

3. 研究の方法

(1) マップベースドクローニング法により *re1-re3* の原因遺伝子の同定を行う。変異が同定できたものから随時候補遺伝子領域を含むゲノム断片の導入、過剰発現体の作成や mRNA およびタンパク質の局在性などについて調べる。すでにタンパク質の機能が注記されているものはそのタンパク質の機能について生化学的解析を進める。

(2) *re1-re3*、*ge*、*go* 間の遺伝学的な関係を明確にするため、二重変異体作成を行う。

(3) 野生型、各変異体における胚、胚乳細胞をマイクロダイゼクション法により組織別に RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行う。マイクロアレイから得られた胚-胚乳サイズに関わる候補遺伝子に対して、Tilling 法によ

る機能欠損変異体の探索や過剰発現体の作出を行い、遺伝子機能について考察する

4. 研究成果

(1) 胚が小さくなる *re1-re3* 変異体の原因遺伝子の同定と発現解析：① マッピングにより、胚が小さくなる変異体 (*re1*、*re2*、*re3*) の原因遺伝子の探索を行った結果、*re1* は R2R3-type MYB ドメインをもつタンパク質に、*re2* は LOB/ASL ドメインをもつタンパク質にそれぞれアミノ酸置換が生じる変異をもつことが明らかとなった。この 2 つの遺伝子をもつ保存されたドメイン (MYB, LOB) はこれまでの知見から DNA に結合し、転写因子として機能することが見いだされているものであり、*RE1*、*RE2* タンパク質の細胞内局在を調べた結果、どちらも核に局在することが明らかとなった。また、各遺伝子のゲノム断片を変異体に導入する相補性実験を行った結果、どちらの変異体の表現型も相補されたことから、*RE1* は MYB ドメインをもつ転写因子を、*RE2* は LOB/ASL ドメインをもつ転写因子をコードすると結論づけた。real-time PCR 解析から *RE1*、*RE2* の mRNA はどちらも受精後の子房で特異的に発現しており、さらに *in situ* hybridization によって、これら 2 つの遺伝子は胚周辺の胚乳組織で特異的に発現することを見いだした (図 1)。② *re3* 変異体に関しては、20 遺伝子を含む 150Kbp の領域にまで候補領域を狭めているが変異の同定ならびに原因遺伝子の特定には至らなかった。*re3* 変異体に関しては今後、候補領域に絞ったゲノムシーケンスやバイサルフェートシーケンスによる候補領域の DNA メチル化解析などを行うことで原因遺伝子の特定に結びつくと考えている。

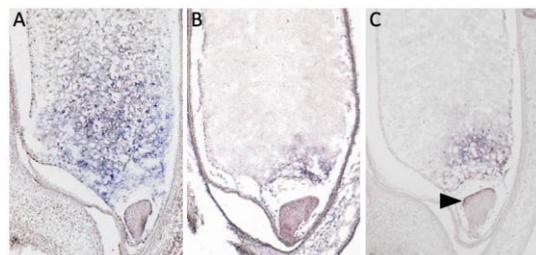


図1. *RE1*、*RE2*、*GE* mRNAの子房(受精後4-5日目)における (A) *RE1*、(B) *RE2*、(C) *GE*の発現パターン。*RE1*と*RE2*は胚周辺胚乳組織においてシグナルが検出されるが、*GE*は胚周辺胚乳組織と胚盤上皮組織(矢頭)でも発現が観察される

(2) 胚周辺胚乳組織における層構造の発見と胚サイズ変異体との関係：① 詳細な細胞形態学的な観察により *RE1*、*RE2* が発現している胚周辺の胚乳組織では他の胚乳組織には見られない層構造が存在し、その形成過程には細胞死が関与することを示す結果が得

られた (図 2)。② 胚が小さくなる *re1*, *re2* 変異体では層構造が減少しており、また胚が大きくなる *ge* 変異体では層構造が多層になっていた (図 2)。③ *GE* 遺伝子の発現領域を *in situ* hybridization で調べた結果、*RE1*, *RE2* と同様に胚周辺の胚乳組織で強く発現していた (図 1)。変異体の胚周辺胚乳組織の形態学的観察ならび *RE1*, *RE2*, *GE* 遺伝子の発現パターンの解析から *RE1*, *RE2*, *GE* は胚サイズを胚乳側から規定する鍵因子である可能性が高いことが明らかとなった。④ *RE1*, *RE2* 遺伝子の子房での機能をさらに詳細に調べるために、胚乳あるいは胚で特異的に過剰発現させる形質転換体の作成を行った。しかし、胚あるいは胚乳で特異的に *RE1*, *RE2* 遺伝子が高発現する形質転換系統は得られず、これら遺伝子の発現量変化に伴う胚-胚乳比率への影響について考察することはできなかった。この実験を遂行するためには適切な時期、場所で発現を誘導することができるプロモーター配列の選別が今後の課題である。

(3) *RE1*, *RE2*, *GE* 遺伝子間の遺伝学的解析：
 ① 本研究に用いた胚が小さくなる変異体 (*re1*, *re2*) と胚が大きくなる変異体 (*ge*)

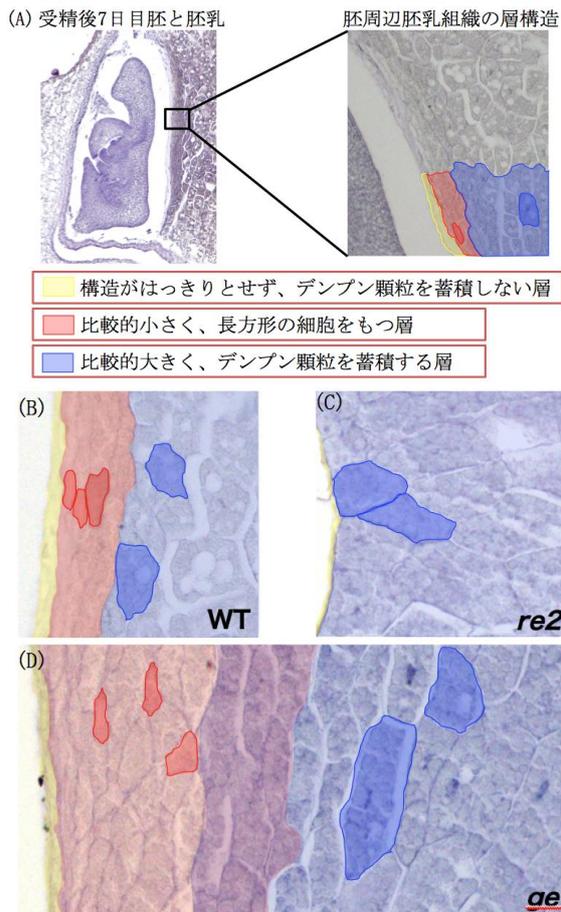


図2. 胚周辺胚乳組織における層構造と胚サイズ変異体における層構造の変化

(A) 野生型における胚周辺胚乳組織の層構造とその特徴 (B) 野生型、(C) *re2*変異体、(D) *ge*変異体における層構造

との遺伝学的関係を明らかにするため、二重変異体の作成を行った。その結果、*re1 ge*, *re2 ge* 二重変異体では *re* に比べ、若干胚が大きくなったものの野生型に比べると小さくなっていった。さらに *re* 変異体において *GE* の発現を *in situ* hybridization で調べた結果、胚周辺胚乳領域での発現は完全に消失していた。このことから *RE1*, *RE2* 遺伝子は *GE* の上流で働くことが明らかとなった。また、*re* 変異体では胚周辺胚乳領域における層構造が減少していることから、層構造の確立のためには *RE* 遺伝子の機能が必要であること、そして *ge* 変異体のように層構造が多層化する変異体では *RE1* と *RE2* が機能しなければ多層化しないことが明らかとなった。②しかし、*re1 ge*, *re2 ge* 二重変異体では、*re* 変異体よりもやや大きい胚になっていた。その要因として、*GE* 遺伝子の胚での発現が挙げられる。図 1 (B) で示したように *GE* の発現は胚周辺胚乳だけではなく、胚側の胚盤上皮組織でも特異的な発現が観察された。また、この胚盤上皮での発現は *RE1* や *RE2* によって制御されないこともわかった。このことから、*GE* 遺伝子は胚乳側からの胚サイズ制御に関わるだけではなく、胚側からの胚サイズ制御にも関与することが見いだされた。本研究から、胚乳側からの胚-胚乳比率制御において多くの知見が得られたが、一方で胚側にも胚-胚乳比率を制御する未解明のメカニズムが存在することも発見することができた。今後はとくに胚側から胚-胚乳比率コントロールに深く関与する *GE* に着目して、*GE* 遺伝子がコードするシトクロム P450 の基質の同定や胚を大きくする要因について詳しく解析を行うことでイネ種子における胚-胚乳比率制御メカニズムを包括的に捉えることができると考えている。

(4) 胚と胚乳における遺伝子プロファイリング：胚と胚乳間での遺伝子発現プロファイルを行うため、胚、胚周辺胚乳組織、中央領域の胚乳組織の3つの組織をレーザーマイクロディセクションによって回収し、マイクロアレイ解析を行った。また、*re1*, *re2*, *ge* 変異体の受精後5日目の子房のRNAを回収し、マイクロアレイを行った。複数のアレイ解析から得られたデータから、胚周辺胚乳組織で特異的に発現し、*re* 変異体で発現減少を、*ge* 変異体で発現上昇を示す13個の候補遺伝子の抽出を行った。このうち、3遺伝子は *RE1*, *RE2*, *GE* 遺伝子であり、本研究におけるアレイデータの精度・信頼性が高いことが裏付けられた。*RE1*, *RE2*, *GE* を除く新規の候補遺伝子の発現を *in situ* hybridization 法によって観察した結果、*RE1*, *RE2*, *GE* と同様に胚周辺胚乳領域に局在化した発現していることがわかった。Tilling 法を用いて、各候補遺

伝子の機能欠損変異体の獲得を目指したが、我々の研究室で保有する系統内に変異体を見いだすことはできなかった。今後は、各遺伝子の過剰発現体や RNAi 法を用いたノックダウン系統の作出を行っていくことで、今回の解析で抽出された遺伝子の胚-胚乳比率制御における役割を明確にできると考えている。

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 3 件)

(1) 著者名 : Nagasawa, N.*, Hibara, K.*, Heppard E.P., Vander Velden., K.A., Luck, S., Beatty M., Nagato, Y. and Sakai H.

* Co-First Author

論文標題 : GIANT EMBRYO encodes CYP78A13, required for proper size balance between embryo and endosperm in rice.

雑誌名 : The Plant Journal、査読 : 有、巻 : 未定、発行年 : 2013 年、頁 : 未定 (in press)

(2) 著者名 : Yoshikawa, T., Eiguchi, M., Hibara, K., Ito, J. and Nagato, Y.

論文標題 : Rice SLENDER LEAF 1 gene encodes cellulose synthase-like D4 and is specifically expressed in M-phase cells to regulate cell proliferation.

雑誌名 : Journal of Experimental Botany、査読 : 有、巻 : 64、発行年 : 2013 年、頁 : 2049-2061.

(3) 著者名 : Itoh, J., Hibara, K., Kojima M., Sakakibara H. and Nagato Y.

論文標題 : Rice DECUSSATE controls phyllotaxy by affecting the cytokinin signaling pathway.

雑誌名 : The Plant Journal、査読 : 有、巻 : 72、発行年 : 2012 年、頁 : 869-881

[学会発表] (計 6 件)

(1) 発表者 : 桧原健一郎、永澤信洋、石綱史子、佐藤豊、伊藤純一、H. Sakai、長戸康郎
発表標題 : 胚の大きさはどのように遺伝的に制御されているのか?

学会名 : 育種学会第 122 回講演会 (招待講演)

発表年月日 : 2012 年 09 月 14 日

発表場所 : 京都産業大学

(2) 発表者 : 桧原健一郎

発表標題 : 胚乳発生が胚サイズを規定する学会名 : イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2012

発表年月日 : 2012 年 07 月 05 日

発表場所 : 奈良県文化会館

(3) 発表者 : 桧原健一郎、永澤信洋、H. Sakai、長戸康郎

発表標題 : 胚-胚乳比率を制御する RE 遺伝子の解析

学会名 : 育種学会第 121 回講演会

発表年月日 : 2012 年 3 月 30 日

発表場所 : 宇都宮大学

(4) 発表者 : 桧原健一郎、永澤信洋、竹田潤、酒井一、長戸康郎

発表標題 : イネ REDUCED EMBRYO1 (RE1) と RE2 は胚の大きさを規定する

学会名 : 第 53 回植物生理学会

発表年月日 : 2012 年 3 月 17 日

発表場所 : 京都産業大学

(5) 発表者 : 桧原健一郎、堀島裕月

発表標題 : 胚乳が胚のためにできること

学会名 : 2011 年度遺伝研イネ研究集会 (招待講演)

発表年月日 : 2011 年 11 月 18 日

発表場所 : 国立遺伝学研究所

(6) 発表者 : 桧原健一郎、永澤信洋、竹田潤、H. Sakai、長戸康郎

発表標題 : イネ REDUCED EMBRYO2 遺伝子は胚の大きさに影響を及ぼす

学会名 : 育種学会第 120 回講演会

発表年月日 : 2011 年 9 月 23 日

発表場所 : 福井県立大学

[その他]

ホームページ

http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/pbg/y_u_zhong_yanHP/TOP.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桧原 健一郎 (HIBARA KEN-ICHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号 : 1 0 5 9 5 7 1 3