特集記事

小分子 RNA 合成経路を介したイネのシュート構築機構

佐藤 豊

名古屋大学大学院生命農学研究科, 名古屋市, 〒464-8601
 科学技術振興機構 さきがけ, 川口市, 〒332-0012

Mechanisms of shoot meristem initiation through the action of small RNAs in rice

Yutaka Sato

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Aichi 464-8601, Japan
 PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Saitama 332-0012, Japan

キーワード

イネ, シュート構築, 小分子 RNA, RNA サイレンシング, *shootless* 変異体

1. はじめに

シュートは一本の茎とその周りに規則的に配列する複数の葉からなる単位をさす。シュート内に存在する茎頂分裂組織と呼ばれる未分化な幹細胞から茎葉が連続的に形成されることにより植物体は作られていく。シュートに含まれる茎頂分裂組織の活性は、イネをはじめとするほとんどあらゆる作物にとって、その生産性を大きく左右する葉や花などの器官数や大きさに多大な影響を与えるものであり、その形成機構の解明は生産性の向上をめざして植物の地上部形態を戦略的に改良する上でも新たな方策の糸口となる可能性がある。

2. イネの胚形成におけるシュート構築

植物の形を構成する基本的な要素となる葉・茎・枝は植物の軸の先端（植物の一番先端とは少し異なるが、ここでは詳しい説明は省略する）にある茎頂分裂組織と呼ばれる未分化細胞の集まりから、その一部を使って作られる（図 1）。葉などの器官を沢山作っているうちに茎頂分裂組織の未分化細胞はだんだん少なくなり最終的にはなくなってしまうはずだが、茎頂分裂組織では器官を作るために使って減ってしまった未分化細胞を補う機構が存在する。すなわち、茎頂分裂組織は自分自身の性質を維持しながら新たな性質を持った細胞を生み出すことができる。この点が、茎頂分裂組織が幹細胞のような性質を持った細胞の集団としばしば呼ばれる所以である。また、このような性質により、植物は一生のほとんどを通じて新たな器官を作り続けていくことが可能である。逆

に考えると、植物によっては動物と比べものにならないくらい長生きする物もあるが、このような植物が毎年沢山の葉を作ることができるのも、茎頂分裂組織が持つ幹細胞のような性質によるといえる。

植物が形を作る上で中心的な役割を果たしている茎頂分裂組織に多くの研究者が興味を持ち、植物の形作りの仕組みを明らかにするためにシロイヌナズナなどを用いた解析が盛んに行われている。その中において、筆者の研究グループでは茎頂分裂組織が形成される仕組みに着目し、イネを材料に研究を行っている。茎頂分裂組織は種子の中にある胚が形成されるごく初期の過程で作られる。また、イネは胚形成の過程で茎頂分裂組織が3枚の本葉を形成する。すなわち、イネでは胚形成の過程でシュート構造が作られている（図 2）。しかも茎頂分裂組織とそこから作られた本葉が鞘葉と呼ばれる胚形成の初期に作られる器官により包まれており、教科書等で見慣れているシロイヌナズナの胚に比べると複雑な印象を持つかもしれない。本研究では、胚形成の過程で、茎頂分裂組織を特異的に欠失する突然変異体の解析を行い、分子遺伝学的な手法によりこのプロセスを明らかにすることを目指した。

3. イネのシュート構築に関わる突然変異体

イネではこれまでに多数の胚発生関連突然変異体が長戸らにより収集されており、その中には胚におけるシュート部の構造を特異的に欠失する突然変異体として、少なくとも3つの *shootless* 変異体 (*shl1*, *shl2*, *shl4*) の存在が明らかにされている（図 2）（Sato et al. 1999）。一方、*shoot organization* 突然変異体 (*sho*) は茎頂分裂組織の構造と機能の異常により、糸のように細い葉を無秩序に作り出す（図 2）（Itoh et al. 2000）。*sho* 遺伝子座はこれまで

図 1. イネの茎頂分裂組織

A. イネの茎頂分裂組織の縦断切片の微分干渉顕微鏡像。
B. イネの茎頂分裂組織の縦断切片を未分化細胞のマーカーである OSH1 タンパクを認識する抗 OSH1 特異抗体を用いた蛍光免疫染色像。白色が OSH1 タンパク質の発現を示す。灰色は PI 染色により核を可視化している。スケールバーは 50 μ m。

図 2. イネの *shootless* 及び *shoot organization* 突然変異体

A. 野生型イネ胚
B. *sh12-4* 胚
C. *sho1-1* 幼苗

矢印はシュート、矢頭は幼根を示す。

に 2 つ (*sho1*, *sho2*) 知られているが、その後の解析により、*sho2* が *shl4* の対立遺伝子であることが明らかにされた。また、*shl2* の表現型の弱い対立遺伝子も同定され、これらが *shoot organization* 変異体と酷似していることから、*shoot organization* 突然変異は *shootless* 変異の表現型の弱い対立遺伝子であると考えられた (Sato *et al.* 2003)。そこで、これらの変異体において機能欠損を起こした遺伝子を同定することにより、茎頂分裂組織構築に必須な遺伝子の同定を試みた。その結果、同定した 3 つの遺伝子 (*SHL2*, *SHL4/SHO2*, *SHO1*) はいずれも 2006 年度ノーベル医学生理学賞受賞研究であったことでも有名な RNA サイレncing を起こすのに必須の因子であることが明らかになった (Nagasaki *et al.* 2007)。このことは、イネの茎頂分裂組織の形成が RNA サイレncing と類似した経路により制御されていることを意味している。これまでに、シロイヌナズナを始めいくつかの植物種で茎頂分裂組織の形成に関わる因子が同定されているが、RNA サイレncing に関わる因子が直接茎頂分裂組織の構築に関わるという報告はなく、イネを材料にした本研究に

より初めて明らかになった茎頂分裂組織構築の経路だといえる。

4. 植物の内在性小分子 RNA 合成経路

RNA サイレncing は外来遺伝子由来の 21nt 前後の小分子 RNA により内在性遺伝子の発現が抑制される現象としてよく知られている。この現象自体は、人為的な遺伝子発現抑制技術 (RNA 干渉法) として利用されている一方で、ウィルスの感染やトランスポゾン転移といった外来遺伝子やゲノム寄生因子の侵入に対するホストの防御機構の一部であると理解されている (Matzke *et al.* 2001)。最近、内在性の遺伝子座由来の小分子 RNA も多数存在することが明らかにされている。内在性的小分子 RNA は主に 2 つの種類に分類される。1 つが micro RNA (miRNA) と呼ばれる内在性小分子 RNA で、ヘアピンループ構造を取り得る non-coding RNA に由来することが知られている。他方が、small interfering RNA (siRNA) である。これらの内在性小分子 RNA の生成経路や、それによる遺伝子発現制御の果たす役割が動植物で盛んに研究されている。植物においても、小分子 RNA による遺伝子発現制御が発生や環境応答などさまざまな場面で機能していることが知られているし、植物に独特の小分子 RNA 生成経路が存在することも知られている。これらの小分子 RNA は RNase III ドメインを持つ DICER と呼ばれる酵素が長い 2 重鎖 RNA をさいの目状に切断することにより作られる。また、DICER の基質となる長い 2 重鎖 RNA は RNA 依存的 RNA 合成酵素 (RdRP) により作られる。DICER により作られる小分子 RNA は RISC (RNA induced silencing complex) と呼ばれるタンパク-核酸複合体に取り込まれ、さらに配列相補性を利用して特異的な mRNA を認識し、植物の場合主に RNA の切断により標的遺伝子の発現を抑制することが知られている。ARGONAUTE (AGO) タンパクは RISC 複合体の主要な構成要素であり、小分子 RNA との結合ならびに標的の切断に関わると考えられている (図 3)。筆者らが同定した *SHL/SHO* 遺伝子は *SHL2* が RdRP, *SHL4* が AGO, *SHO1* が DICER タンパクをそれぞれコードしていた。このように *SHL/SHO* 遺伝子は小分子 RNA の生産と、小分子 RNA による遺伝子発現抑制に関与するタンパクをコードしていたことから、イネでは小分子 RNA による遺伝子発現制御が茎頂分裂組織の構築に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

5. イネのシュート構築を制御する小分子 RNA 生成経路

筆者らのグループはこれまでに *shl2*, *shl4/sho2*, *sho1* 突然変異の原因遺伝子を同定した (Nagasaki *et al.* 2007)。*SHL2*, *SHL4/SHO2*, *SHO1* はそれぞれシロイヌナズナの

図3. RNA サイレンシング経路の模式図

RDR6/SDE1/SGS2, *AGO7/ZIPPY*, *DCL4* のオルソログをコードしていた。これらはいずれも ta-siRNA と呼ばれる小分子 RNA 生産に関わるコンポーネントであることがシロイヌナズナを用いた研究により明らかにされている。このため、イネではシュート構築に ta-siRNA 経路が働いていることが強く予想される。シロイヌナズナではこれまでに4つの *TAS* 遺伝子座が同定されている (Yoshikawa *et al.* 2005)。このうち *TAS3* 遺伝子はイネにも存在する。*TAS3* 遺伝子は *tasiR-ARF* を作り出す前駆体を生産する。そこで、*tasiR-ARF* の標的となる *ARF* 転写因子の発現を *shl/sho* 変異体で調べてみると発現が上昇していた。また、*tasiR-ARF* による標的の分解産物を RT-PCR により検出すると、変異体で減少していた。このことは、*shl/sho* 変異体において確かに ta-siRNA 経路の働きが低下していることを示している。トウモロコシにおいても *sho* と葉の表現型が類似した変異体 *leaf bladeless1 (lbl1)* が存在し、その原因遺伝子はシロイヌナズナにおいて ta-siRNA 経路に関わることが知られている *SGS3* と高い相同性を有していた (Nogueira *et al.* 2007)。*lbl1* 突然変異体において ta-siRNA とは別の種類の小分子 RNA である *miR166* の発現上昇とその標的である *HD-ZIPIII* の発現低下が観察されている。イネの *shl/sho* 変異体においても *miR166* の発現上昇とその標的である *HD-ZIPIII* の発現低下が観察されている。このことは、イネとトウモロコシにおいて *miR166* の発現が ta-siRNA 経路の因子により制御されることを示唆している。しかしながら、筆者らの解析においても、トウモロコシの *lbl1* の解析においても *miR166* を介した *HD-ZIPIII* の発現制御と *tasiR-ARF* による *ARF* の発現制御がどのように結びつくのか明らかになっていない。

6. 茎頂分裂組織構築の多様性

筆者らの研究から、イネの茎頂分裂組織構築に小分子 RNA 生成経路（おそらくは ta-siRNA 経路）が必須の役割を果たしていることが明らかになった。同時に大きな疑問も湧き上がってきた。シロイヌナズナにおいて ta-siRNA 経路は茎頂分裂組織の構築に関与しない。このことは、シロイヌナズナの ta-siRNA 経路の突然変異体がシュートを欠損しないことから明らかである。茎頂分裂組織は幹細胞とも呼ばれる未分化細胞の集団からなり、植物体の地上部を作り上げる源となる。従って、その形成過程は陸上植物で保存されていて不思議はない。実際、これまで同定されてきた茎頂分裂組織構築に関わる転写因子やそのファミリーは陸上植物に保存されており、*HD-ZIPIII* も例外ではない。

筆者らの研究から茎頂分裂組織の構築における *HD-ZIPIII* の発現制御にシロイヌナズナと異なりイネでは ta-siRNA 生産経路が関与することが明らかとなった。発生の過程で器官や組織の分化機構を考えると、分化のスイッチとなる因子（例えば転写因子など）が適切な場所とタイミングで発現し機能するケースはよく知られている。このような因子は多くのケースで、イネとシロイヌナズナで似たような発現パターンを示す。しかしながら、発現パターンが同じだからといってその制御機構も同一であるというわけではないのであろう。

一部の microRNA (miRNA) など、いくつかの低分子 RNA による遺伝子発現調節は多くの植物に普遍的に存在することが知られている。一方で、他の多くの低分子 RNA は進化の過程で新たな出現と消失を繰り返す進化の速い遺伝子と考えられている。このため、小分子 RNA を介した遺伝子発現調節のいくつかは種に特異的な遺伝子発現に関与していると私たちは考えている。逆に言えば、このことが *HD-ZIPIII* の発現制御の多様性を生み出しているのかもしれない。

7. まとめ

動物と比較すると、植物の小分子 RNA 生成経路は多様で複数存在することが明らかになってきた。それぞれの経路に関わる DICER や AGO をコードする遺伝子の数も多い。また、小分子 RNA 生成経路はそれぞれ独立の経路として考えられがちであるが、ある経路に必要なタンパク質が別の経路でも機能を果たしていることがある。このため、植物には多様な内源性小分子 RNA が存在し、内源性小分子 RNA の多様性はタンパク質をコードする遺伝子よりも遙かに大きいことも最近明らかになってきた。これらのことは、植物の小分子 RNA 生産やそれによる発現制御がいかに多様で複雑であることを示している。今後、解析が進むにつれ、形態形成機構に限らず小分子 RNA の果たす思いがけない役割が明らかになることが期

待される。一方、小分子 RNA は RNA サイレンシングを引き起こすトリガーとしても知られている。本研究を含め小分子 RNA に着目した研究の成果として、機能が明らかになった内在性小分子 RNA を遺伝子発現抑制のトリガーとして利用し、作物の生産性向上につながる応用研究に発展することを期待している。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、東京大学の長戸康郎教授及び、伊藤純一准教授、名古屋大学の松岡信教授及び、北野英己教授に深く謝意を表させていただきます。また、東京大学大学院農学生命科学研究科、名古屋大学大学院生命農学研究科、名古屋大学生物機能開発利用研究センターの関係研究室の多くの方々に多大なるご支援をいただきました。皆様に深く感謝いたします。

引用文献

- Itoh, J.I., H. Kitano, M. Matsuoka and Y. Nagato (2000) *SHOOT ORGANIZATION* genes regulate shoot apical meristem organization and the pattern of leaf primordium initiation in rice. *Plant Cell* 12: 2161–2174.
- Matzke, M., A.J.M. Matzke and J.M. Kooter (2001) RNA: Guiding gene silencing. *Science* 293: 1080–1083.
- Nagasaki, H., J.I. Itoh, K. Hayashi, K.I. Hibara, N. Satoh-Nagasawa, M. Nosaka, M. Mukouhata, M. Ashikari, H. Kitano, M. Matsuoka, Y. Nagato and Y. Sato (2007) The small interfering RNA production pathway is required for shoot meristem initiation in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 14867–14871.
- Nogueira, F.T.S., S. Madi, D.H. Chitwood, M.T. Juarez and M.C.P. Timmermans (2007) Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes Dev.* 21: 750–755.
- Satoh, N., S.K. Hong, A. Nishimura, M. Matsuoka, H. Kitano and Y. Nagato (1999) Initiation of shoot apical meristem in rice: characterization of four SHOOTLESS genes in rice. *Development* 126: 3629–3636.
- Satoh, N., J.I. Itoh and Y. Nagato (2003) The SHOOTLESS2 and SHOOTLESS1 genes are involved in both initiation and maintenance of shoot apical meristem through regulating the number of indeterminate cells. *Genetics* 164: 335–346.
- Yoshikawa, M., A. Peragine, M.Y. Park and R.S. Poethig (2005) A pathway for the biogenesis of trans-acting small RNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 19: 2164–2175.