

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22119008

研究課題名(和文)植物の分枝を制御するメカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanisms controlling shoot branching

研究代表者

経塚 淳子(Kyozuka, Junko)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90273838

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 47,200,000円

研究成果の概要(和文): 分枝パターンを決定する主要な要因である腋芽の休眠と花序の分枝について分子遺伝学的解析を行った。腋芽の休眠については、休眠を再現性よく観察する実験系を確立し、腋芽が休眠する際には腋芽全域で細胞分裂活性が急速に低下し、休眠が解除される際には細胞分裂が復活することが明らかになった。腋芽だけを採取してトランスクリプトーム解析を行い、腋芽休眠開始・解除に伴う遺伝子発現変化を網羅的に解析した。その結果、休眠にはストリゴラク톤の下流でABAやジャスモン酸、植物に特異的な細胞周期抑制遺伝子などが関わることを明らかになった。

研究成果の概要(英文): Dormancy of the axillary buds and shoot branching in the inflorescence were analyzed at a molecular level. First, an experimental system to analyze the bud dormancy was established. By using this system, it was found that cell divisions were stopped in the whole area of the buds when they go to the dormancy state. On the other hand, cell division restarts when buds start to grow. Microarray analysis using laser dissected buds showed a possibility that ABA, Jasmonic acids and plant specific class of cell cycle inhibitors work downstream of Strigolactonn to control bud dormancy.

研究分野：植物分子遺伝

キーワード：イネ 分枝 腋芽休眠 ストリゴラク톤 穂の分枝 TAWAWA1

1. 研究開始当初の背景

植物は枝分かれを繰り返しながら成長し、種ごとに特徴的な枝分かれパターンを築く。枝分かれの基になるのは、葉の付け根につくられる腋芽である。形成されたすべての腋芽が成長するわけではなく、形成部位や環境要因などによって、腋芽ごとに成長を続けるか休眠するかという決定が下される。休眠することが決定すると、腋芽は伸長せずに葉の付け根に留まって待機し、条件が整うと成長を再開する。一般に、腋芽にとっては「休眠」がデフォルト状態であり、腋芽伸長を抑えるしくみがはたらいていると考えられてきた。

腋芽の休眠に関しては、植物ホルモンであるオーキシシンとサイトカイニンの関与が知られていたが、腋芽の伸長制御に関する分子遺伝学的研究が進むにつれて、これらふたつのホルモン以外の「腋芽伸長抑制ホルモン」が腋芽の伸長を抑えていると考えられるようになった。2008年には、イネ、エンドウ、シロイヌナズナを用いた研究から、ストリゴラクトン（あるいはその代謝物）がその「腋芽伸長抑制ホルモン」であることが報告された (Gomez-Roldan et al. Nature 2008)。

ストリゴラクトンの発見は腋芽休眠の研究において重大なブレークスルーとなったが、依然、休眠とはどのような現象なのか、休眠・伸長と芽の状態が変化する際に腋芽で何が起こるのか、ストリゴラクトンがどのように腋芽伸長を抑制するのかなどについては不明であった。

上記のように、栄養成長期には腋芽は休眠するが、一般に、生殖成長期に至ると腋芽は休眠しなくなる。イネの穂が形成される過程では、新たに形成された腋芽は穂の枝分かれとしてさらに次の段階の腋芽をつくるか、または、花（小穂）に分化して活動を終える。すなわち、それぞれの腋芽における「枝になるか花になるか」という選択の繰り返しにより穂の枝分かれ程度が決まり、イネ穂の形態

が決まる。これまでに *TAWAWAI* (*TAWI*) 遺伝子は花への分化を抑制する遺伝子であり、*TAWI* のはたらきが強くなると穂の枝分かれが増加することを見出した。*TAWI* 遺伝子の単離は終了したが、その分子レベルでの機能は不明である。

穂の枝分かれが増える *taw1-D* 変異体 機能獲得、優性変異体



2. 研究の目的

研究1：腋芽休眠の制御メカニズムの解析

腋芽の休眠と休眠解除を分子レベルで記述する。これにより、ストリゴラクトンがどのようなメカニズムで腋芽を休眠させるのかという点に関して理解を深める。

研究2：花序の分枝制御メカニズムの解析

TAWI 遺伝子の分子機能を明らかにする。

3. 研究の方法

研究1：腋芽休眠機構の解析

イネを研究材料として用い、腋芽の休眠をモニターする実験システムを確立する。その実験系を用いて、休眠前後、休眠解除前後の腋芽における遺伝子発現の変化をマイクロアレイ解析により網羅的に解析する。その結果に基づき、腋芽の休眠や休眠解除への関与が考えられる遺伝子群について詳細な発現様式の解析や機能解析を行う。

研究2：穂の分枝機構の解析

すでに単離した *TAWAWAI* 遺伝子について、GFP をマーカーとして時間的・空間的な発現

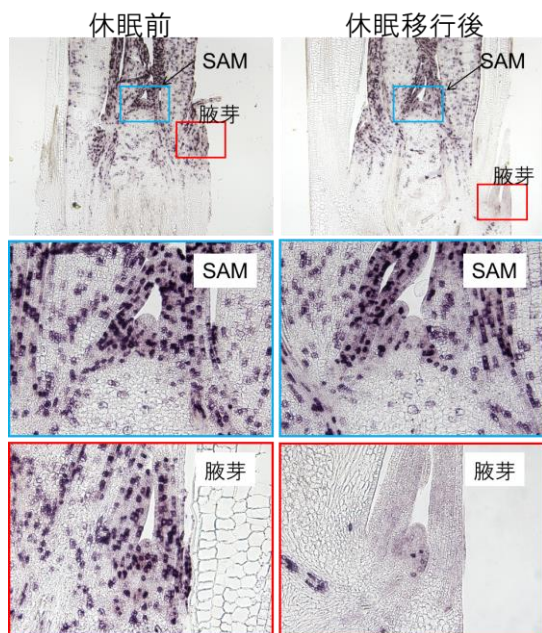
パターンを観察する。TAW1 タンパク質が転写因子であるという予想に基づき、TAW1 タンパク質の DNA への結合の有無、また結合配列を決定する。酵母ツーハイブリッド法により TAW1 と相互作用因子を単離し、TAW1 と相互作用因子による転写制御機構を解析する。

4. 研究成果

研究 1

1) 腋芽の休眠開始を解析するための実験系を確立した

イネでは、植物体の成長に伴い規則正しく葉が分化し、その付け根に腋芽が形成される。そこで、イネを用いて、再現性良く腋芽を観察できる水耕栽培条件を確立した。この実験系では、第 2 葉 (2 番目の葉) の成長段階が P5.5 の段階の腋芽では活発な細胞分裂が見られ、第 2 葉の成長段階が P6 に至ると腋芽全体で細胞分裂が一斉に停止し腋芽が休眠する。P5.5 から P6 への移行は約 2 日で起こることが明らかになった。この段階に着目して解析を進めることにした



2) 腋芽での細胞分裂の停止にはストリゴクトン(SL)が必要である

腋芽の伸長抑制に必要な植物ホルモンである SL を合成しない変異体 *dwarf10(d10)* で

は、1) の条件下で P6 以降も活発な細胞分裂が続き腋芽が伸長する。したがって、1) で観察される細胞分裂の停止や腋芽の伸長抑制は SL 依存的であり、*d10* に SL を与えると濃度依存的に腋芽が休眠することを示した。

3) 腋芽休眠に伴う遺伝子発現変化を明らかにした

腋芽休眠に伴う遺伝子発現変化を解析するために、野生型イネ(日本晴)の第 2 葉の腋芽 (P5.5 と P6.0 段階) をレーザーマイクロダイセクション法によりサンプリングし、マイクロアレイにより遺伝子発現を比較した。コントロールとして *d10* でも同様に P5.5 と P6.0 段階の第 2 葉の腋芽の遺伝子発現を比較した。この解析により腋芽休眠時に発現レベルが変化する遺伝子群を単離できた。休眠開始時に発現が上昇する遺伝子は発現減少遺伝子よりも多いことが特徴的であった。210 遺伝子において 4 倍以上の発現上昇が認められ、71 遺伝子について 4 倍以上発現レベルが低下した。休眠腋芽特異的遺伝子である *Dormancy Related (DR)* 遺伝子の 4 つのイネオーソログの発現が上昇し、実験系の妥当性が示された。また、多数のリボソームタンパク質遺伝子の発現減少が顕著であった。

4) 腋芽休眠への ABA の関与を見出した

最大の発現上昇を示した遺伝子は機能未知の ABA 誘導遺伝子であり、また多数の既知の ABA 誘導性遺伝子の発現が上昇した。ABA やストレス (乾燥、低温、塩) 誘導性遺伝子、ABA 合成酵素遺伝子などの発現も上昇した。シロイヌナズナ ABA 欠損変異体 (*aba2-2*, *aba3-1*) ではロゼット葉の分枝数が増加し、イネに ABA を投与すると腋芽の伸長が抑制されることから腋芽休眠と ABA の関係が示唆された。

5) 腋芽休眠への細胞周期関連遺伝子の関与を見出した

マイクロアレイ解析により、腋芽休眠と植物特異的細胞周期抑制遺伝子 (*EL2*) の関連が示唆された。*EL2* およびそのパラログ *EL2LIKE* を構成的に発現させると、倍数化が進行し、細胞サイズが増加したが、腋芽伸長に対する顕著な効果は認められなかった。そこで、CRIPR法により機能欠損体を作成した。これらにおける腋芽休眠を解析中である。

研究 2

1) TAW1 と相互作用する遺伝子を単離した

酵母ツーハイブリッド法により、TAW1 と相互作用する遺伝子として BTB ドメインとアンキリンドメインの繰り返しをもつ *BLADE-ON-PETIOLE (BOP)* 遺伝子、BAH と PHD ドメインをもつ *EARLY BOLTING IN SHORTDAYS (EBS)* 遺伝子を単離した。BiFC 法によりイネの 3 つの BOP タンパク質のいずれもが、植物細胞内で TAW1 と相互作用することを確認した。*BOP* は葉とメリステムの境界領域で発現し、TAW1 の発現領域と重複する。また、EBS はクロマチンを介して遺伝子発現を抑制することが知られている。

2) TAW1 の DNA 結合配列を特定した

TAW1 が DNA に結合することを明らかにし、その標的配列を決定した。1) と 2) の結果を総合し、TAW1 は器官の境界領域で BOP と協調し下流標的遺伝子の発現を抑制するというモデルが考えられた。

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)

- ① Kameoka H, Kyozuka J, Downregulation of rice DWARF 14 LIKE suppress mesocotyl elongation via a strigolactone independent pathway in the dark.

Journal of Genetics and Genomics 42: 119–124 (2015)

- ② Ohashi M, Ishiyama K, Kusano M, Fukushima A, Kojima S, Hanada A, Kanno K, Hayakawa T, Seto Y, Kyozuka J, Yamaguchi S, Yamaya T. Lack of cytosolic glutamine synthetase1;2 in vascular tissues of axillary buds caused severe reduction in their outgrowth and disorder of metabolic balance in rice seedlings. *Plant J.* 81:347-356 (2015)
- ③ Li, W, Yoshida A, Takahashi M, Maekawa M, Kojima M, Sakakibara, H, Kyozuka J. SAD1, an RNA polymerase I subunit A34.5 of rice, interacts with Mediator and controls various aspects of plant development. *Plant J.* 81:282-291 (2015)
- ④ Yoshida A, Sasao M, Yasuno N, Takagi K, Daimon Y, Chen R, Yamazaki R, Tokunaga H, Kitaguchi Y, Sato Y, Nagamura Y, Usijima T, Kumamaru T, Iida S, Maekawa M, Kyozuka J. TAWAWA1, a novel regulator of rice inflorescence architecture, functions through the suppression of meristem phase transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:767-772 (2013).
- ⑤ Yoshida S, Kameoka H, Tempo M, Akiyama K, Umehara M, Yamaguchi S, Hayashi H, Kyozuka J, Shirasu K. The D3 F-box protein is a key component in host strigolactone (SL) responses essential for arbuscular mycorrhizal

symbiosis. **New Phytologist** 196:1208-1216. (2012).

- ⑥ Luo L, Li W, Miura K, Ashikari M, **Kyozuka J.** Control of Tiller Growth of Rice by *OsSPL14* and Strigolactones, which Work in Two Independent Pathways. **Plant Cell Physiol.** 53: 1793-1801 (2012).
- ⑦ Kobayashi K, Yasuno N, Sato Y, Yoda M, Yamazaki R, Kimizu M, Yoshida H, Nagamura Y, **Kyozuka J.** Inflorescence Meristem Identity in Rice is Specified by Overlapping Functions of Three *AP1/FUL*-like MADS Box Genes and *PAP2*, a *SEP* MADS Box gene. **Plant Cell** 24: 1848-1859 (2012).
- ⑧ Minakuchi K, Kameoka H, Yasuno N, Umehara M, Luo L, Kobayashi K, Hanada A, Ueno K, Asami T, Yamaguchi S, **Kyozuka J.** *FINE CULM1 (FC1)* works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice. **Plant Cell Physiol.** 51:1127-35 (2010)
- ⑨ Kobayashi K, Maekawa M, Miyao A, Hirochika H, **Kyozuka J.** *PANICLE PHYTOMER2 (PAP2)*, encoding a SEPALLATA subfamily MADS-box protein, positively controls spikelet meristem identity in rice. **Plant Cell Physiol.** 51:47-57 (2010)

[学会発表] (計 10 件)

- ① **Kyozuka J.** 'Genome-wide analysis of developmental phase change in rice tiller buds' XII France-Japan Workshop on Plant Science 2014,

Tokyo, Japan, 2014 年 10 月 28 日

- ② **Kyozuka J.** Meristem Activity, Inflorescence Form and Yield of Rice, 25th International Conference on Arabidopsis Research, Vancouver (Canada), 2014 年 7 月 31 日
- ③ **Kyozuka J.** 'Genome-wide analysis of developmental phase change in rice tiller buds' Cold Spring Harbor Asia Conferences: Genome assisted biology of crops and molecular model plant systems, Suzhou (China), 2014 年 4 月 24 日
- ④ **Kyozuka J.** 'Rice inflorescence development' FASEB conference: Mechanisms in plant development, Vermont (USA), 2013 年 8 月 14 日
- ⑤ **Kyozuka J.** 'Inflorescence development and yield traits in rice' 21st Conference of the International Plant Growth Substances Association (IPGSA), Shanghai (China), 2013 年 6 月 21 日
- ⑥ **Kyozuka J.** 'TAWAWA1, a molecular link between yield and meristem phase transition in rice inflorescence development' The 4th NIBB-MPIPZ-TLL Symposium 'Arabidopsis and emerging model systems', 基礎生物學研究所、岡崎, 2012 年 11 月 20 日
- ⑦ **Kyozuka J.** 'Control of shoot branching in rice' 10th International Conference on Plant Molecular Biology, Jeju (Korea), 2012 年 10 月 24 日
- ⑧ **Kyozuka J.** 'Control of rice inflorescence development' 10th International Conference on Plant Molecular Biology, Jeju (Korea), 2012 年 10 月 25 日
- ⑨ **Kyozuka J.** 'Rice inflorescence development' Plant Reproduction for

Food 2012, Melbourne (Australia),
2012年2月18日

- ⑩ **Kyozuka J.** 'Isolation of *TAW1* which negatively regulates spikelets identity through positive regulation of MADS box genes in rice'. Botaniker Tagung 2011, Berlin (Germany) 2011年9月19日

⑪

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

経塚 淳子 (KYOZUKA Junko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90273838

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし