

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16160

研究課題名(和文) イネの腋芽幹細胞の新生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of stem cell establishment during axillary bud formation in rice

研究代表者

田中 若奈 (Tanaka, Wakana)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・助教

研究者番号：10725245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、モデル単子葉植物イネを材料として、側枝を生み出す腋芽の新生メカニズムを明らかにすることを目的として、分子遺伝学的解析を実施した。

まず、腋芽新生過程の幹細胞維持には TAB1-FON2 経路が重要であること、そして、TAB1-FON2 経路と WOX4 遺伝子との関連を明らかにした。次に、OSH1 遺伝子が、TAB1 の下流で、腋芽新生過程の未分化細胞を維持する働きをしていることも見出した。さらに、D-type cyclin のメンバーである OsCYCD3;1 遺伝子が、腋芽幹細胞の活性制御に重要な働きをしていることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の形態形成を理解する上で、側枝をつくりだす腋芽の新生機構を明らかにすることは非常に重要であるが、従来、腋芽新生に着目した研究は十分に行われていなかった。したがって、本研究により、腋芽新生に関わる複数の遺伝子や、それらの関係性が明らかになった点に、学術的意義があると考えられる。また、イネの側枝形成は穂数(米収量)を決定することから、本研究結果は、将来的にはイネの品種改良の基盤になり得るものであり、この点から社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We conducted a molecular genetic analysis using a model monocot, rice (*Oryza sativa*) to elucidate the mechanisms of axillary bud formation that gives rise to vegetative branches. First, we revealed that TAB1-FON2 pathway is important for stem cell maintenance during axillary bud formation, and that both TAB1 and FON2 negatively regulate expression of WOX4, a close paralog of TAB1. Next, we found that OSH1 acts downstream of TAB1 to maintain undifferentiated cells during the process of axillary bud formation. Furthermore, we revealed that OsCYCD3;1, a member of D-type cyclins, plays an important role in maintaining the activity of the axillary meristem.

研究分野：植物発生遺伝学

キーワード：腋芽分裂組織 ブランチ 幹細胞 TILLERS ABSENT1 (TAB1) イネ (*Oryza sativa*)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は、成長段階に応じて形成される腋芽幹細胞から腋芽をつくり出し、それを側枝として伸長させることにより複雑な形態へと成長する。したがって、植物の形態形成を理解する上で、側枝をつくりだす腋芽の新生機構を明らかにすることは非常に重要である。しかしながら、腋芽新生に着目した研究は十分に行われていないのが現状である。

これまでに、私たちの研究チームは、モデル単子葉植物のイネ (*Oryza sativa*) の腋芽新生に着目して研究を行ってきた。腋芽幹細胞の新生時期と場所を特定し、その幹細胞の維持に必須な *TILLERS ABSENT1 (TAB1)* 遺伝子を見出してきた (Tanaka et al., *Plant Cell*, 2015)。しかしながら、腋芽新生機構に関する理解は、どの植物においてもあまり進んでおらず、中でも、腋芽幹細胞の新生や維持の制御機構については未解明な点ばかりであった。

2. 研究の目的

本研究では、イネの腋芽の新生メカニズムを明らかにすることを目的とした。この目的を達成するために、以下の4つのサブテーマについて研究を行った。

- (1) 腋芽新生過程の幹細胞維持機構の解明
- (2) 腋芽幹細胞制御候補遺伝子 *FON1* の機能解析
- (3) 腋芽新生における *OSH1* 遺伝子の機能解明
- (4) 腋芽新生における *OsCYCD3;1* 遺伝子の機能解明

3. 研究の方法

(1) 腋芽新生過程の幹細胞維持機構の解明

これまでの研究によって、*TAB1* 遺伝子が腋芽幹細胞維持の促進因子として働いていることを見い出していた。今回、腋芽幹細胞維持の抑制因子候補である *FLORAL ORGAN NUMBER2 (FON2)* 遺伝子に着目して解析を実施した。具体的には、*fon2* 変異体や *FON2* 過剰発現体の表現型を解析した。さらに、*TAB1* 遺伝子と *FON2* 遺伝子の遺伝学的な関係を明らかにするための解析も実施した。

(2) 腋芽幹細胞制御候補遺伝子 *FON1* の機能解析

花幹細胞の維持において、分泌型ペプチドをコードする *FON2* 遺伝子は、受容体型キナーゼをコードする *FON1* 遺伝子を通して機能していることが知られている (Suzaki et al., *Plant & Cell Physiology*, 2006)。上記(1)において、*FON2* が、腋芽幹細胞の維持に関与していることを明らかにしたが、*FON1* の役割については未解明であったため、*FON1* の機能解明を目指し、遺伝学的な解析も実施した。

(3) 腋芽新生における *OSH1* 遺伝子の機能解明

KNOX 遺伝子ファミリーに属する *ORYZA SATIVA HOMEBOX1 (OSH1)* 遺伝子は、茎頂分裂組織の新生や未分化細胞の維持を担っていることが報告されていた (Tsuda et al., *Plant Cell*, 2011)。今回、腋芽新生における *OSH1* の役割を明らかにすることを目的として、*osh1* 変異体を用い、遺伝学的解析を実施した。

(4) 腋芽新生における *OsCYCD3;1* 遺伝子の機能解明

Cyclin は、細胞分裂の制御因子として知られているが、中でも、D-type cyclin (CYCD) は、シロイヌナズナの様々な発生現象に関与していることが知られている。シロイヌナズナの10個の *CYCD* 遺伝子のうち、*CYCD3* サブグループに属する3つの *CYCD* (*CYCD3;1*, *CYCD3;2*, *CYCD3;3*) は、側枝形成や茎頂分裂組織活性制御において重要な働きをしている (Dewitte et al., 2007)。イネにおいては、*CYCD3* サブグループには *OsCYCD3;1* 遺伝子のみが存在していることが知られていたものの、発生における機能については未解明であった。そこで、*OsCYCD3;1* 遺伝子の機能解明を目指して逆遺伝学的な解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 腋芽新生過程の幹細胞維持機構の解明

fon2 変異体の腋芽新生過程における幹細胞マーカーの発現を調べた結果、野生型における発現と比較して、発現領域が大幅に広がっていることがわかった。さらに、*FON2* 過剰発現体では、腋芽幹細胞を維持できないことが判明した。これらの結果から、*FON2* 遺伝子が、腋芽幹細胞維持の抑制因子として働いていることが示唆された。

FON2 と *TAB1* の関係を明らかにするために、*fon2* 変異体において *TAB1* 遺伝子の発現

パターンを調べた結果、その発現領域が拡大することがわかった。このことから、*FON2* 遺伝子は、*TAB1* 遺伝子の発現を適度に抑えていると考えられる。さらに、*tab1* と *fon2* の二重変異体を作製した結果、予想外なことに、腋芽幹細胞が維持され、腋芽が新生されることが明らかになった。この表現型から、*fon2* 変異によって、*TAB1* の機能を代替する腋芽幹細胞の促進因子が活性化されたため、*tab1* の腋芽幹細胞維持不全が救済されたと考えられた。*TAB1* の機能を代替する腋芽幹細胞の促進因子の候補として、腋芽新生過程において、一過的に発現する *TAB1* の機能を引き継いで、後から発現を開始する *WOX4* 遺伝子の可能性が浮上した (Tanaka et al., Plant Cell, 2015)。そこで、*fon2 tab1* 二重変異体の腋芽新生における *WOX4* 遺伝子の発現パターンを解析した結果、早期に発現を開始することが判明した。さらに、*TAB1* プロモーターで *WOX4* の発現を早期に誘導するコンストラクトを作製し、*tab1* 変異体に導入したところ、*tab1 fon2* と同様に、腋芽幹細胞が維持され、腋芽が新生されることが明らかになった。以上の結果から、*fon2 tab1* で腋芽幹細胞が維持され腋芽が新生されるのは、*WOX4* が早期に発現するためであることが示唆された。この解析によって、*TAB1* と *FON2* は、腋芽新生初期においては、*WOX4* の発現を抑制していることが明らかになった。本研究成果に関する論文が New Phytologist 誌に受理された。

(2) 腋芽幹細胞制御候補遺伝子 *FON1* の機能解析

上述したように、*fon2* 変異は、*tab1* の腋芽幹細胞維持不全を救済することから、*fon1* 変異にも同様な作用があるかどうかを解析した。*fon1 tab1* の表現型を解析した結果、*tab1* の腋芽幹細胞維持不全は救済されず、*fon2 tab1* で見られたような野生型様の腋芽も観察されなかった。次に、*fon1* 単独変異体の表現型を解析した結果、側枝数も腋芽の形態も、野生型同様であることが判明した。これら *fon1* の表現型は、*fon2* の表現型と対照的であったことから、*FON1* は腋芽幹細胞の制御には関与していないことが明らかになった。腋芽新生過程における *FON1* の時空間的発現パターンを解析したが、発現は全く検出されず、この結果も上記の結果と一致した。以上から、腋芽新生過程では、*FON2* は *FON1* 以外の受容体を介して機能している可能性が示唆された。本成果をまとめた論文を、Cytologia 誌に発表した。

(3) 腋芽新生における *OSH1* 遺伝子の機能解明

まず、腋芽新生過程における *OSH1* の発現パターンを解析した。腋芽新生初期の *TAB1* が発現する時期において *OSH1* の発現が開始し、その後もその発現が維持されることが明らかになった。*tab1* 変異体では、腋芽新生がいろいろな発生段階で停止する。そこで、*tab1* の腋芽新生過程における *OSH1* の発現パターンを解析した結果、腋芽新生の初期段階において *OSH1* の発現が低下していることが判明した。この結果から、*tab1* で見られる腋芽新生不全の原因の1つは、腋芽新生初期の未分化状態の低下である可能性が考えられた。

次に、*osh1* 変異体の表現型を解析した結果、*osh1* では分げつが全く形成されないこと、その原因は、腋芽分裂組織が形成されていないためということが判明した。したがって、*OSH1* は、腋芽新生過程においても未分化細胞を維持しており、腋芽分裂組織の形成に必須であると考えられた。さらに、本研究によって、*TAB1* の役割の1つは、腋芽新生初期の *OSH1* の発現を維持することであることも明らかになった。本成果に関する論文を、Cytologia 誌に発表した。

(4) 腋芽新生における *OsCYCD3;1* 遺伝子の機能解明

まず、*OsCYCD3;1* 遺伝子の時空間的な発現パターンを解析した。その結果、茎頂分裂組織や葉原基で発現していることがわかった。また、腋芽新生過程においても明瞭な発現が検出された。*OsCYCD3;1* は、腋芽分裂組織の予定領域において発現を開始し、完成された腋芽分裂組織と葉原基において発現していた。これらの結果から、*OsCYCD3;1* が、腋芽新生に関与している可能性が示唆された。次に、CRISPR/Cas9 によって、*OsCYCD3;1* 遺伝子の突然変異体を作製し、表現型を解析した。その結果、*oscycd3;1* 変異体では、野生型と比較して、有意に側枝数が減少することが判明した。側枝数が減少したことから、腋芽の形態を詳細に観察した結果、*oscycd3;1* の腋芽分裂組織は、野生型のものと比較して、サイズが小さかったり、形が歪であることが明らかになった。また、こういった異常は、*oscycd3;1* の腋芽新生過程の初期段階から観察されることが判明した。以上から、*oscycd3;1* では、腋芽分裂組織の活性が正常に維持されておらず、それが原因で、側枝数が減少したと考えられた。また、D-type cyclin は細胞周期において機能することから、*oscycd3;1* で見られた腋芽分裂組織の活性低下は、細胞分裂の異常が原因であると推測された。

以上の研究によって、イネの *OsCYCD3;1* は、腋芽幹細胞の活性制御に重要な働きをしていることが明らかになり、本成果を Journal of Plant Physiology 誌に発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wakana Tanaka, and Hiro-Yuki Hirano	4. 巻 85
2. 論文標題 The roles of two FLORAL ORGAN NUMBER genes, FON1 and FON2, differ in axillary meristem development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 319-324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1508/cytologia.85.319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hikari Matsumoto, Yukiko Yasui, Yoshihiro Ohmori, Wakana Tanaka, Tetsuya Ishikawa, Hisataka Numa, Kenta Shirasawa, Yojiro Taniguchi, Junichi Tanaka, Yasuhiro Suzuki, and Hiro-Yuki Hirano	4. 巻 104
2. 論文標題 CURLED LATER1 encoding the largest subunit of the Elongator complex has a unique role in leaf development and meristem function in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Journal	6. 最初と最後の頁 351-364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tbj.14925	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiro-Yuki Hirano, and Wakana Tanaka	4. 巻 85
2. 論文標題 Stem cell maintenance in the shoot apical meristems and during axillary meristem development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 3-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1508/cytologia.85.3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wakana Tanaka, Katsutoshi Tsuda, and Hiro-Yuki Hirano	4. 巻 84
2. 論文標題 Class I KNOX gene OSH1 is indispensable for axillary meristem development in rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 343-346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1508/cytologia.84.343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chie Suzuki, Wakana Tanaka, Hiroyuki Tsuji, and Hiro-Yuki Hirano	4. 巻 14
2. 論文標題 TILLERS ABSENT1, the WUSCHEL ortholog, is not involved in stem cell maintenance in the shoot apical meristem in rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1640565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2019.1640565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wakana Tanaka, and Hiro-Yuki Hirano	4. 巻 225
2. 論文標題 Antagonistic action of TILLERS ABSENT1 and FLORAL ORGAN NUMBER2 regulates stem cell maintenance during axillary meristem development in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 974-984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.16163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wakana Tanaka, Suzuha Ohmori, Naoto Kawakami, Hiro-Yuki Hirano	4. 巻 148
2. 論文標題 Flower meristem maintenance by TILLERS ABSENT 1 is essential for ovule development in rice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev199932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.199932	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ami Ohyama, Rumi Tominaga, Taiyo Toriba, Wakana Tanaka	4. 巻 270
2. 論文標題 D-type cyclin OsCYCD3;1 is involved in the maintenance of meristem activity to regulate branch formation in rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 153634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jplph.2022.153634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中若奈、平野博之
2. 発表標題 イネの分けつ形成を制御する遺伝的機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中若奈、平野博之
2. 発表標題 イネの腋芽形成において2つの FON 遺伝子は異なる役割を担っている
3. 学会等名 日本育種学会第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中若奈、平野博之
2. 発表標題 イネの腋芽形成を開始する遺伝的機構
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会 シンポジウムS08「若手研究者が切り拓くイネ科植物形態形成の最前線」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 並木愛海、平野博之、田中若奈
2. 発表標題 2次シュート形成に異常を生じるイネ変異体 tiller elongation defective1 (ted1) に関する発生遺伝学的解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中若奈, 津田勝利, 平野博之
2. 発表標題 イネの腋芽形成における WOX および KNOX 遺伝子の働き
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大森涼葉, 川上直人, 平野博之, 田中 若奈
2. 発表標題 イネ tillers absent1 変異体は小穂に多面的な異常を示す
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 並木愛海, 平野博之, 田中 若奈
2. 発表標題 分けつ形成に異常を生じるイネ変異体 tiller elongation defective1 (ted1) に関する発生遺伝学的解析
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 並木愛海, 平野博之, 田中若奈
2. 発表標題 分けつが形成されないイネ突然変異体に関する発生遺伝学的解析
3. 学会等名 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大森涼葉, 川上直人, 平野博之, 田中 若奈
2. 発表標題 小穂形成に異常があるイネ突然変異体の解析
3. 学会等名 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakana Tanaka
2. 発表標題 Genetic regulation of stem cell maintenance during axillary bud formation in rice
3. 学会等名 Tohoku Forum for Creativity Thematic Program 2019 Plant Stem Cells: Source of Plant Vitality, Workshop1: Stem cells and Plant Reproduction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakana Tanaka, Suzuha Ohmori, Chie Suzuki, Naoto Kawakami, Hiro-Yuki Hirano2
2. 発表標題 Genetic mechanism and significance of stem cell maintenance in rice flower development
3. 学会等名 The 85th Annual Meeting of the Botanical Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中若奈, 大森涼葉, 川上直人, 平野博之
2. 発表標題 イネの TAB1 遺伝子は花メリステム維持を通じて胚珠形成を促している
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------