

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02955

研究課題名(和文) イネ科作物の葉の機能性に関与する遺伝学的機構の解明

研究課題名(英文) Genetic mechanisms involved in leaf functionality in rice

研究代表者

伊藤 純一 (Itoh, Jun-ichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：30345186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：イネの葉の機能性に重要な遺伝子を同定するために大規模な遺伝子発現解析を行い、どのような遺伝子がどのような場所で、どのようなタイミングで働くのかを明らかにした。それらの中からイネ科の葉の機能性に重要な働きをすることが予想される遺伝子を複数抽出し、ゲノム編集により実際の遺伝子の機能を明らかにした。それらの遺伝子には葉の通気組織形成や気孔の分化といった、イネが健全に生育するために必要な新規遺伝子が含まれている。本研究により、これまで明らかにされてこなかった、イネ科の葉の機能性を向上させるための遺伝学的な知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネ科はイネやコムギ、トウモロコシといった主要穀物を含む農業上最も重要な植物分類群である。その優位性にはイネ科の葉が持つ特殊な形態と機能が深く関わっていると考えられるが、どのような遺伝子の働きによって実現しているのかについての知見はほとんど得られていない。本研究で得られたイネやイネ科の葉の形態形成に特異的な遺伝子は、葉形態の遺伝的イノベーションに関する知見と共に、今後のイネ科作物の葉の緻密な制御による分子育種に役立ることが可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Large-scale gene expression analysis was conducted to identify genes important for rice leaf functionality, and to determine which genes work where and when during rice leaf development. We extracted several genes that were predicted to be important for rice leaf functionality, and revealed the actual functions of the genes by genome editing. Those genes include novel genes such as leaf aerial tissue formation and stomatal differentiation, which are necessary for the healthy growth of rice plants. This study provides genetic insights into the functionality of rice leaves that have not been previously elucidated.

研究分野：植物発生育種学

キーワード：イネ 発生 トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

イネ科はイネやコムギ、トウモロコシといった多くの主要穀物を含む、農業上最も重要な植物分類群である。また、地球上で最も広い生育域を持った、環境への適応性に優れた科でもある。これらイネ科の持つ農業上、生態上の優位性には、イネ科の葉が持つ特殊な形態と機能性が深く関わっていると考えられる。例えば、基部と頂部で葉身と葉鞘という機能の異なる二つの部位に分けることによって、茎頂分裂組織の相対的位置を下げ、環境耐性を高めている。また、葉鞘の葉縁には膜状の構造が分化することによって若い葉原基や茎頂分裂組織を保護している。そしてイネにおいては葉鞘と葉身の中肋部に多数の通気組織を分化させることで、倒伏強度と軽量化の両立がはかれるのと同時に、冠水条件での気体輸送を可能にしている。このような様々な葉の形態的イノベーションはイネやイネ科の総合的な環境耐性の向上に貢献している。しかしながら、この特殊性と機能性がどのような遺伝子の働きによって実現しているのかについての知見はほとんど得られていない。従って、このようなイネ科の葉の形態形成の遺伝学的制御機構の理解を深めることは、イネ科作物の優位性を活かした今後の緻密な形態改変に役立つと考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではイネ科が作物としての優位性を確立できた遺伝的背景(どのような遺伝子がどのようにして働いたのか)を明らかにし、利用することを最終目標として、イネ科の葉の特殊性、機能性に着目し、それを実現している発生遺伝的機構を明らかにするための解析を行う。本研究は研究材料としてイネを用い、以下の2つの研究、「葉の発生過程で働く新奇遺伝子の探索と機能解析」と「イネの葉の特殊形態の発生遺伝学的解析」を行う。

(1) 葉の発生過程で働く新奇遺伝子の探索と機能解析

イネやイネ科の葉には他の植物種には見られない、特殊な器官や組織、細胞などが認められる。これらの特異的な器官、組織、細胞の分化は葉の機能性と深く関わっていると考えられるが、それらに関与する変異体はほとんど知られていない。一方、このような葉の特殊な発生イベントに関わる新奇遺伝子を同定する為には効率的な逆遺伝学的手法を用いる必要がある。本研究では、大規模な遺伝子発現データを用いた統計学的解析、*in situ* hybridization 解析を用いた半網羅的な発現解析、遺伝子の系統解析、CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊と機能解析を組み合わせることで、葉の特殊形態に関わる多くの新奇遺伝子を効率良く同定する。

(2) イネの葉の特殊形態の発生遺伝学的解析

葉身と葉鞘の分化機構

イネ科の葉の大きな特徴は、機能の異なる2種類の領域、葉身と葉鞘が分化することにある。しかし、これまで葉身/葉鞘の分化に関与する遺伝子はほとんど同定されていない。葉身/葉鞘の構築機構を明らかにするために、網羅的遺伝子発現解析から、葉身のみで発現する遺伝子を抽出し、詳細な発現解析やCRISPR/Cas9による遺伝子の機能解析を行う。また、発芽初期に葉身を全く形成しない *ndl1* 変異体の解析により、葉身の分化機構についての知見を得る。

葉縁における膜状構造の形成機構

葉縁における膜状構造は内部の若い器官を保護する重要な組織である。しかしその形成に関わる遺伝子的な情報はほとんど得られていない。葉縁で発現し、変異体では膜状構造が不規則に欠失する *LSY1* 遺伝子について、オオムギのホモログを用いた解析を行い、イネ科での機能の保存性に関する新たな知見を得る。

葉の通気組織形成の遺伝学的機構の解明

イネは冠水条件で生育し、根に酸素を送り込むため、葉に多数の通気組織が形成される。葉の通気組織形成には特定領域の細胞死、通気組織を一定間隔で隔離する隔膜形成、通気組織に強度を与える肋状組織形成など、複数の複雑な制御過程が存在すると考えられるが、その大部分が未解明のままである。これらの組織に特異的に発現する新奇遺伝子についてCRISPR/Cas9による遺伝子破壊システムを作成し、遺伝子の機能を明らかにすることによって、通気組織形成の発生遺伝学的メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

葉の発生過程における大規模な遺伝子発現データは、クラスタリングや主成分分析を用いた様々な統計的手法によって、候補となる遺伝子を効率的に絞り込む。これらのデータ解析によって絞り込んだ遺伝子は、半網羅的な *in situ* hybridization 解析を行い、発現が葉の特定の領域でのみ認められる遺伝子を複数抽出する。これらの遺伝子の機能解析においては、CRISPR/Cas9によるゲノム編集によって、パラログも含めた多重遺伝子破壊システムを作成する。これらの遺伝子破壊システムは詳細な表現型解析を行うが、表現型解析には一般的な形態解析手法に加えて、X線CT解析装置を用いた内部構造の非破壊観察も利用する。また、*in situ* hybridization 解析の結果を参考に、レーザーマイクロダイセクション(LMD)によって特定の発現領域を切り出し、これらの遺伝子と共発現する遺伝子群を網羅的に同定することを試みる。

4. 研究成果

(1) 葉の発生過程で働く新奇遺伝子の探索と機能解析

これまでに取得した大規模遺伝子発現データのデータ解析と、様々なカテゴリーの分類に基づいた遺伝子抽出を行った。発現プロファイルのデータ解析においては、葉の発生段階、場所の異なる12のサンプルを用いた主成分分析を行い、遺伝子発現からそれぞれのサンプルの発生的な位置付けを考察した。その結果、P1・P2の葉原基を含む茎頂部、P3の葉原基全体、P4の葉鞘、P4の葉身基部の4部位、P4の葉身頂部とP5とP6を含む組織の7つ部位が、それぞれ似たトランスクリプトームを示した。P4に由来するサンプルはサンプル間でトランスクリプトームが大きく変動していたことから、イネでは葉のP4ステージにおいて、成熟や組織分化に関連したトランスクリプトームのシフトが葉の頂部基部方向に進んでいることが示唆された。またクラスターリング解析により、共通して特徴的な発現変化を示す遺伝子群のリストを入手した。

これらの中から複数の遺伝子を選出し、茎頂付近の葉原基において *in situ* hybridization を行った。これらの中で *OsROPGEF2* 遺伝子が、葉の二細胞性トライコーム(毛)の分化領域に発現することが明らかとなった。この遺伝子の機能破壊系統を CRISPR/Cas9 によって作出したところ、毛の長さや向きに異常が見られることがわかった。このことから、これまで報告のない二細胞性トライコームの成長に関わる初の遺伝子を同定することができた。

それに加えて、イネ科に特徴的な気孔の構成細胞(副細胞)や葉肉組織の気孔関連細胞に特異的に発現する遺伝子などを同定した。これらの機能未知遺伝子をターゲットに CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊系統の作出を行なった。それらの変異体の表現型を観察したところ、気孔関連細胞に細胞形態や分化パターンに異常が認められるものが出現した。

これらの結果より、葉の網羅的な遺伝子発現解析から抽出した複数の遺伝子は、確かにイネの葉に特徴的な形態形成機構に関わっており、さらに詳細な機能解析を行うことによって、これまで明らかになっていない発生制御過程の解明に向けた足掛かりになるものと考えられた。

また、イネの葉における組織や細胞レベルでの発現解析を行うため、レーザーマイクロダイセクションによる微小組織を切り出しと RNA の抽出の条件検討を行なった。その結果、サンプルの固定や保存法など、RNA クオリティーの最適化に資する条件が得られた。また、内部形態の観察におけるサンプルの解析対象をより広げる為に、乾燥サンプルを用いた X 線 CT 装置による非破壊的解析に関する条件検討を行った。その結果、乾燥時の細胞レベルで収縮が、観察結果に大きく影響することが明らかとなり、今後さらに適切なサンプル調整の検討が必要であると考えられた。

(2) イネの葉の特殊形態の発生遺伝学的解析

葉身と葉鞘の分化機構

網羅的遺伝子発現データと局所的発現解析から、葉原基の発生過程で葉身のみを発現する *TCP* 遺伝子を見出した。*TCP* 遺伝子は転写因子をコードする大きな遺伝子ファミリーを形成し、重複した機能を持つことが予想されたことから、当該遺伝子と発現場所が重なる二つのホモログを同定し、CRISPR/Cas9 による三重変異体を作成することによって、その機能を推定した。表現型観察の結果、多重変異体は葉身の幅が大きくなり、向軸に巻く表現型が観察された。従って、本遺伝子はイネの葉身の幅や巻き性の制御に関わる遺伝子であると考えられた。

発芽初期に葉身を全く形成しない *nd11* 変異体について、共同研究者との共同研究により、*NDL1* 遺伝子はオーキシン応答や合成経路に関与し、細胞非自律的に機能することによって、葉身の分化や茎頂分裂組織の維持に関わっていることが示された。

葉縁における膜状構造の形成機構

葉縁における膜状構造の形成機構に関しては、*WOX3* 転写因子をコードする *LSY1* 遺伝子が重要な制御因子であり、そのホモログである *NAL2/3* 遺伝子も *LSY1* と共に葉の葉縁の発生に関わることが示されていた。また、*LSY1* 遺伝子は葉の葉縁形成に加えて、葉のトライコーム形成にも機能を果たしている。一方オオムギについて、*NAL2/3* 遺伝子と *LSY1* 遺伝子のオルソログ遺伝子が単離され、オオムギでの機能とイネとの機能保存性についての考察がなされた。その結果、葉縁形成やトライコームの分化などにおける形質に対する機能は保存されているものの、遺伝子の機能分化の様式はイネとは異なることが示された。

葉の通気組織形成の遺伝学的機構の解明

網羅的遺伝子発現データと局所的発現解析から、葉原基の発生過程で通気組織の予定領域に発現する *OsHLH* 遺伝子を見出した。*OsHLH* 遺伝子は転写因子をコードする遺伝子ファミリーを形成し、重複した機能を持つことが予想されたことから、当該遺伝子と発現場所が重なる二つのホモログを同定し、CRISPR/Cas9 による三重変異体を作成することによって、その機能を推定した。表現型観察の結果、変異体では通気組織が野生型より大きく、逆に肋状組織が薄い傾向が認められた。このことから、同定した遺伝子は、通気組織形成を負に制御する因子であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ken-ichiro Hibara, Masayuki Miya, Sean Akira Benvenuto, Naoko Hibara-Matsuo, Manaki Mimura, Takanori Yoshikawa, Masaharu Suzuki, Makoto Kusaba, Shin Taketa, Jun-ichi Itoh	4. 巻 17
2. 論文標題 Regulation of the plastochron by three many-noded dwarf genes in barley	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1009292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Miya Masayuki, Yoshikawa Takanori, Sato Yutaka, Itoh Jun-Ichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Genome-wide analysis of spatiotemporal expression patterns during rice leaf development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12864-021-07494-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshikawa Takanori, Hisano Hiroshi, Hibara Ken-Ichiro, Nie Jilu, Tanaka Yuki, Itoh Jun-Ichi, Taketa Shin	4. 巻 14
2. 論文標題 A bifurcated palea mutant infers functional differentiation of WOX3 genes in flower and leaf morphogenesis of barley	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 AoB PLANTS	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/aobpla/plac019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kusnandar Andree S, Itoh Jun-Ichi, Sato Yutaka, Honda Eriko, Hibara Ken-ichiro, Kyojuka Junko, Naramoto Satoshi	4. 巻 63
2. 論文標題 NARROW AND DWARF LEAF 1, the Ortholog of Arabidopsis ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1/DORNROSCHEN, Mediates Leaf Development and Maintenance of the Shoot Apical Meristem in Oryza sativa L	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 265 ~ 278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcab169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桧原 健一郎, 味谷 雅之, ベン ヴェヌート アキラ, 桧原(松尾)直子, 三村 真生, 吉川 貴徳, スズキ マサハル, 草場 信, 武田真, 伊藤純一
2. 発表標題 オオムギ多節矮性変異体を用いた葉間期制御に関わる3遺伝子座の同定
3. 学会等名 日本育種学会139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 味谷 雅之, 高梨 秀樹, 伊藤 純一
2. 発表標題 イネの葉の発生過程に関わる新規遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本育種学会 第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡部 太緒, 三村 真生, 伊藤 純一, 吉川 貴徳
2. 発表標題 イネ juvenile-adult生育相転換を制御するqJA1が幼苗のトランスクリプトーム変動に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 日本育種学会 第142回講演会
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
---------	---------