

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：33919  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～ 2012  
 課題番号：22580108  
 研究課題名（和文）植物の枝分かれ機構の遺伝学的・生化学的研究

研究課題名（英文）Biochemical and genetic analysis of a control mechanism for shoot branching

### 研究代表者

森上 敦（MORIKAMI ATSUSHI）  
 名城大学・農学部・教授  
 研究者番号：10211608

### 研究成果の概要（和文）：

シロイヌナズナのアクティベーションタグライブラリーの中から単離した、腋芽形成の異常から枝葉が極度に繁茂した形態となる *chestnut* 変異株を解析した。この変異株では、1つの転写因子の遺伝子の発現量が 10-30 倍になっていた。また、*chestnut* 変異株では、病害抵抗性に関わる *PR1* 遺伝子の発現量が上昇していた。この結果は、病害抵抗性と腋芽メリステム形成機構の間に何らかの共通な機構があることを示していると考えられる。

### 研究成果の概要（英文）：

By screening an activation tagging library, we isolated an *Arabidopsis* mutant, *chestnut*, which has a severe bushy phenotype resulting from the formation of extra-axillary meristems. Compared to the Col-0 wild type, *chestnut* showed a 10–30-fold increase in the expression of a transcription factor gene than. The mutation in *chestnut* leads to the upregulation of *PR1* genes, which are required for plant defense responses. This result suggests that the defense responses of plants and the formation of axillary meristems might share some common factors.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：遺伝子、植物、形作り、枝分かれ、脂質

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 枝分かれ（側性器官形成）の制御は、作物には分けつや穂の分岐をもたらして、収穫できる穀物・果実の量やその品質に直接影響し、花卉園芸では、その品種の美観を決定する重要な要素となるなど、農業的に重要である。

(2) 植物の枝分かれは、葉の付け根に形成された腋芽が成長して枝となることにより完成するが、それまでには、大きく分けて2段階の制御がある。その第1は、側枝の原基となる腋芽の形成段階にある。発生的な制御により、葉の付け根に新たなメリステム（分裂組織）の形成が行われる。その第2は、完成した腋芽の伸張制御の段階である。腋芽は一定のところまで形成が進むと、一旦休眠状態となって成長を止める。しかし、生育条件の変化などの刺激によって活性を取り戻すと成長伸長が進んで新たな枝となる。

第2の制御は、頂芽優勢としてよく知られ、古くからオーキシンの関与が示されているし、最近ではカロテノイド誘導体であるストリゴラクトンが、この反応系に関与することが明らかにされている。しかしながら、第1の制御に関しては、シロイヌナズナやイネの突然変異株の解析が始まっているものの、十分に解析が進められているとは言い難く、また第二の制御に関しても、それに関わる因子がすべて明らかにされたわけではないと考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 我々は、エンハンサー配列を含むDNA配列をランダムにシロイヌナズナ染色体上に導入した自作のアクティベーションタグラインの植物体群の中から、*chestnut* と名付けた突然変異株を単離した。この変異株で

は、分岐が異常に進んだ叢生性（bushy）の植物体が形成される。

この形質の遺伝子要因を調べたところ、1つの転写因子遺伝子の転写制御領域上流にエンハンサー配列が挿入されていることが明らかになった。この転写因子遺伝子のイネのホモログは、幼穂の枝梗形成時特異的に発現していることが報告されている。

この転写因子遺伝子の遺伝子破壊株を取得し、その植物を生育させたところ、隣同士の葉が時に癒合を起こしているのが観察された。このような表現型は、葉の表皮の疎水成分の合成に関わる酵素遺伝子の機能欠損により引き起こされることから、この遺伝子は脂質の合成に関わる転写因子をコードしていると予想された。

そこで、本研究では、この転写因子遺伝子の転写量の増大が、過剰な分岐を起こす形態異常をもたらしていることを示すとともに、この転写因子が関わると考えられる脂肪酸合成系と形態異常との関わりを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 形態異常を形態学的に精査するための、組織切片を作製や、走査電子顕微鏡を用いた観察。

(2) 原因遺伝子の解明のために、詳細な遺伝子マッピングおよび形質発現の為の構造を持った遺伝子の形質転換株の作製。

(3) マイクロアレイ法およびリアルタイムPCR法を用いた下流遺伝子の同定。

(4) 原因遺伝子の候補遺伝子に関する遺伝子破壊株の表現型解析。脂肪酸合成系や病害

抵抗性に関わる変異株や脂肪酸合成系阻害剤の *chestnut* 変異株の表現型への影響の解析。

#### 4. 研究成果

(1) *chestnut* 変異株における腋芽形成異常を解析するために、メリステム特異的プロモーターにマーカー遺伝子を連結した融合遺伝子の発現スポットを検出することにより、腋芽メリステム形成の時期・位置および数を調べたところ、*chestnut* 変異株における腋芽分裂組織の形成は、野生型株より早く、播種後 9 日目に始まることが明らかになった。また、腋芽分裂組織が早期にできるだけでなく、*chestnut* 変異株では、1 枚の葉の根元に複数のメリステムが存在することが確認された(図 1)。*chestnut* 変異体に見られる形態異常は、腋芽形成の亢進が原因と考えられる。

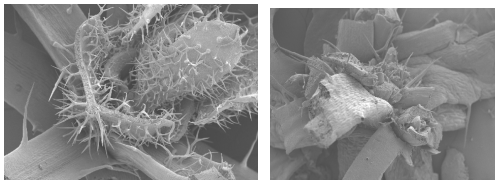


図 1. *chestnut* 変異株茎頂の走査電顕図

左: Col-0 右: *chestnut* 変異株

(2) *chestnut* 変異株では、転写因子遺伝子の近傍にエンハンサー配列を含む T-DNA の挿入が起こっているが、この挿入では、この領域に推定される特定遺伝子の翻訳領域での遺伝子破壊は起こっていない。しかし、遺伝学的な解析は、*chestnut* の表現型は、劣性の単一遺伝子の変異によって起こっていることが示されている。

そこで、遺伝子近傍の近傍に T-DNA の挿入部位以外の第二の変異が存在する可能性も考え、*chestnut* 変異株を異なる背景となるアクセッション Landsberg *electa* に掛け合わせを行い、その F<sub>2</sub> 約 5,500 個体の中から明白に変異型を示した 325 個体を用いて詳細なマッピングを行った。その結果、原因遺伝子の存在する領域は、

転写因子遺伝子上流域約 13kb 内に絞られた。この領域については、全塩基配列を決定したわけではないが、既知の T-DNA の挿入以外には、大きな欠失や挿入はおきていないことは確認した。

転写因子遺伝子の近傍に挿入されたエンハンサー配列の影響を調べるために、転写因子遺伝子およびその上流遺伝子の発現量の変化を調べた。すると、転写因子遺伝子は、Col-0 野生型株に対して 10~25 倍発現量が高くなっていた。一方、この転写因子のすぐ上流の遺伝子については、発現量の変化は見られなかった(図 2)。

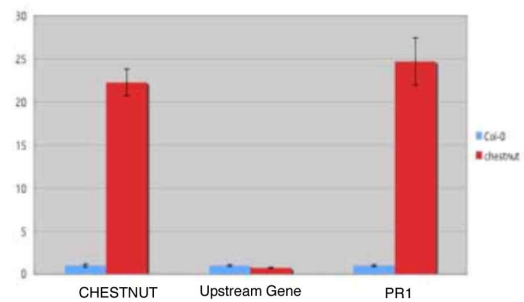


図 2. 転写因子遺伝子およびその近傍遺伝子の発現

*chestnut* 変異の原因が、転写因子遺伝子の過剰発現にあることを分子生物学的手法により示すために、エンハンサーを含む 35S プロモーターもしくは転写因子遺伝子プロモーター上流域に 35S エンハンサー部分を加えたプロモーターを転写因子の cDNA に連結した融合遺伝子を作製し、シロイヌナズナの野生型株に導入した。約 150 系統の過剰発現型 形質転換株を作製したが、形質転換第一世代においては、すべての系統において表現型に異常は見られなかった。しかし、それぞれの系統株を自殖して得た形質転換第二世代においては、6 系統について、ロゼット様の増加や異所的なメリステムの形成といった *chestnut* 様の表現型が見られた。

以上の結果から、この遺伝子の過剰発現が、

*chestnut* 変異をもたらすことを示していると考えられた。しかし、この変異が劣性を示すことと合わせると、この転写因子遺伝子の発現制御が、転写後調節を含めて複雑であることが推定される。

(3) ①マイクロアレイにより、転写因子により発現が制御される遺伝子を解析したところ、脂肪酸合成系・病害抵抗反応応答・酸化還元応答・ABA 反応などに関連する遺伝子群が影響を受けていることが明らかになった。この中で、特に PR1 タンパク質の発現を調べたところ、Col-0 野生型株に対して 10〜25 倍発現量が高くなっていた(図 2)。

病害抵抗反応応答系と植物の形態異常に関しては、病害抵抗性に関わる受容体に似たタンパク質の異常により *chestnut* 変異株に非常に良く似た叢状の形態を示す *uni* 変異株がある (Igari et al Plant J. 2008)。今回得られた *chestnut* 変異解析の結果は、*uni* 変異株の結果と合わせ、病害抵抗性反応と植物の形態形成の関連性を明らかにすることに繋がると考えられる。

② *chestnut* 変異は、原因と想定される転写因子遺伝子の構造が、恒常的な高発現型になっているのに対し、表現型は劣性となっていることを解析するために、*chestnut* 変異株と野生型株を交配した後代を、転写因子遺伝子領域の遺伝子型がホモ型とヘテロ型の植物を分けて、遺伝子発現状態をリアルタイム PCR およびマイクロアレイにより解析を行った。

転写因子遺伝子の発現は、変異型ヘテロ型の発現量は、変異型ホモ型の 5 割程度で有り、野生型ホモ株に比べると有意に発現上昇が起きていることが明らかになった。

その他の遺伝子の発現については、変異型ホモ個体で野生型ホモ個体に比べて有意に発現上昇が起きている遺伝子は 263 遺伝子、変異型ヘテロ個体で野生型ホモ個体に比べて有意に

発現上昇が起きている遺伝子は 281 遺伝子であった。驚いた事に変異型ホモ個体と変異型ヘテロ個体の間で共通に発現上昇が起きている遺伝子は、たった 15 遺伝子しかなかった(図 3)。

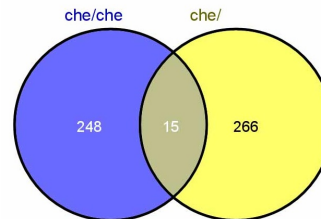


図 3. *chestnut* 変異株のマイクロアレイ解析

実際に、リアルタイム PCR によって、1 つの遺伝子の発現量の比較を測定してみると、変異型ヘテロ個体では、むしろ野生型ホモ個体より低い発現量しか見られなかったのに対して、変異型ホモ個体では野生型ホモ個体の 10 倍から 25 倍の発現量となっていた(図 4)。

同じ転写因子の発現上昇株において、遺伝子の状態がホモかヘテロかで発現する遺伝子の種類が大きく変動しているのは、非常に興味深い。

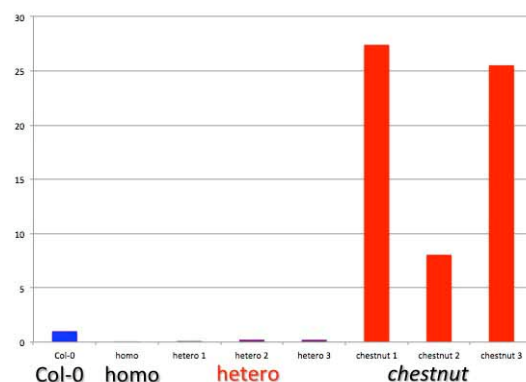


図 4. 転写因子遺伝子領域遺伝子型と下流遺伝子の発現量との関係

(4) ①転写因子遺伝子の機能を探るために、転写遺伝子の構造遺伝子部分に挿入がある破壊株を得て、その表現型を調べた。すると、葉の

クチクラ層の形成に異常が生じた時に見られる葉の癒合現象が見られた(図 5)。また、この現象に関しては、トルイジンブルーによる染色法によっても確認された。

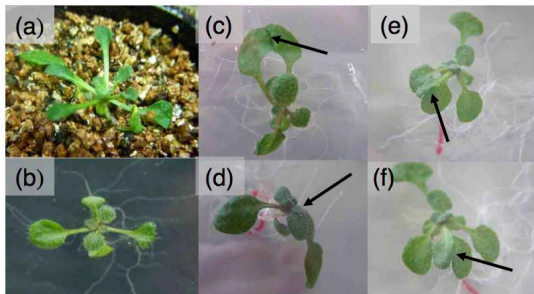


図 5. 転写因子遺伝子欠損株における葉の融合  
(a, b) Col-0 野性型株、(c,d) 転写因子遺伝子欠損株、(e, f) 転写因子遺伝子と関連遺伝子の二重変異株

② *chestnut* 変異株および形態的に異常がみられる 35S で過剰発現した転写因子 cDNA 導入株を乾燥条件で生育し、野性型株との比較を行った所、*chestnut* 変異株および形態的に異常がみられる 35S 過剰発現株は、野性型株に比して顕著に乾燥に強いことが明らかになった(図 6)。つまり、脂質組成の変動と形態異常との間には相関関係があることが明らかになった。



図 6. 転写因子 cDNA 過剰発現株に見られる乾燥耐性  
左 3 個体(乾燥耐性):形態異常有り、右 3 個体

(乾燥枯死):形態異常無し

③ *chestnut* 変異株と各種変異株との二重変異株の表現型の解析は、掛け合わせにより表現型の発現に影響が出る場合が、続出したため、結果を得ることはできなかった。脂肪酸合成系素材剤の影響は現在までの所見られていない。

以上の *chestnut* 変異株の解析から、脂肪酸合成系および病傷害抵抗性に関わる転写因子が、腋芽メリステムの異常形成に係わる事が示唆された。また、この転写因子が引き起こす発現制御の解析は、単一の転写因子が、その発現量の差によって全く異なる遺伝子群を制御するという、遺伝学的にそして分子遺伝学的に非常に興味深い新しい遺伝子制御系の存在を示すこととなった。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等 なし

#### 7. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森上 敦 (MORIKAMI ATSUSHI)  
名城大学・農学部・教授  
研究者番号：10211608

##### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：