

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23248001

研究課題名(和文) イネ科作物の発生・形態形成を司る制御機構の解明と分子育種への展望

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism underlying development and morphogenesis in grass plants and prospects for molecular breeding

研究代表者

平野 博之 (Hirano, Hiroyuki)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00192716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,600,000円

研究成果の概要(和文)：穂の形や花の数などの作物の形態に関わる因子は、重要な農業形質と密接に関連している。本研究では、分子遺伝学的な解析に適したイネを研究対象として、その発生や形態形成の制御機構に関する研究を行った。着目した主な発生イベントとしては、(1) 花(小穂)や花序(穂)の発生・形態形成、(2) メリステムの形成と維持機構、(3) 葉の細胞分化と形態形成、である。これらの発生イベントを制御する新たな遺伝子を同定するとともに、その機能を解明することを目的として研究を進めた。その結果、イネの発生を制御する重要な遺伝子を10個以上発見し、その機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Morphological characteristics, such as branching pattern in the panicle and the number of flowers, are closely associated with important agronomical traits. We studied about the mechanism underlying the regulation of development and morphogenesis of rice (*Oryza sativa*), which is suitable for molecular genetic analyses. We mainly focused on the followings: (1) development and morphogenesis of the flower (spikelet) and inflorescence (panicle), (2) formation and maintenance of the meristem, (3) cellular differentiation and morphogenesis of the leaf. One of our main purposes is the identification of new genes that regulate developmental programs in rice. We found more than ten genes and revealed their molecular functions related to above developmental processes.

研究分野：植物発生遺伝学

キーワード：発生・形態形成 維管束 小穂 花序 腋芽 TAB1遺伝子 WOX遺伝子 イネ

1. 研究開始当初の背景

作物の形態は、重要な農業形質と密接に関連している。収量性の指標である穂重や穂数は、形態学的には枝梗や穎花の数、あるいは分蘖数に依存し、草型は受光体勢や栽植密度と強く関連している。主要作物の形態形質に関する分子遺伝学的研究はイネを中心に進められており、その研究成果は応用的な意義のみならず、基礎的な植物発生学の分野でも高い評価を得ている。その結果、十数年前までは、「収量」という指標でしか扱えなかった形質は、転写因子による遺伝子発現制御や植物ホルモンの働きとして理解されるようになってきた。これらの事実、逆に、腋芽メリステムの形成や小穂や枝梗、葉・穂などの形態を制御する遺伝子を単離し、その機能を分子レベルで理解を深めることが、今後、形態改変を伴う作物の品種改良に、大きく貢献する可能性を示している。

2. 研究の目的

以上の背景のもとに、本研究では、イネを主な研究材料として、その形態や発生・分化を制御する遺伝子を単離・同定しその機能を解明すること、および、その成果を形態改変による作物の分子育種へと展望することを、主な目的としている。具体的には、以下のような個別の発生イベントのメカニズムの解明を行ってきた。

- (1) 穂と小穂の発生・形態を制御する遺伝子の単離と機能解明
- (2) 発生・分化の根源であるメリステム・幹細胞の形成と維持の制御機構の解明
- (3) 中肋や維管束などの組織分化に着目した葉の形態形成を制御する遺伝子の解明

3. 研究の方法

(1) 遺伝学的研究方法：イネの形態や発生に異常を示す変異体を単離し、その表現型を詳細に解析することにより、各変異体の原因となる遺伝子の機能を推定する。また、既知のマーカー遺伝子の発現パターンを解析することによっても、機能推定を行う。原因遺伝子をポジショナルクローニング法や次世代シーケンサー法により単離・同定する。単離された遺伝子の時間的・空間的な発現パターンを、*in situ* ハイブリダイゼーションにより解析する。また、その遺伝子を、異所的あるいは異時的に発現誘導し、発生・形態形成への影響を解析する。これらを総合的か

つ有機的に統合し、遺伝子の機能を探るとともに着目している発生イベントの制御メカニズムを明らかにする。

(2) 逆遺伝学的手法：上記の方法で単離・解析したイネの遺伝子のパラログやシロイヌナズナの発生に重要な働きをしている遺伝子のイネオーソログに着目する。これらの時間的・空間的な発現パターンを、*in situ* ハイブリダイゼーションにより解析する。また、これらの遺伝子の機能が喪失あるいは低下した変異体や形質転換体を単離あるいは作出し、その表現型を詳細に解析し、発生・形態形成にかかわるそれらの遺伝子の機能を探る。機能喪失変異体の単離としては、**TILLING** 法による変異体の同定や **CRISPR-Cas9** 法によるノックアウト変異体の作製、機能低下した形質転換体の作製としては **RNA サイレncing** 法などを用いる。

4. 研究成果

(1) 穂と小穂の発生・形態を制御する遺伝子の単離と機能解明

① *tongari-boushi1(tob1)* 変異体は、小穂の形態に多面的な異常を示すこと、その変異は小穂メリステムの異常と密接に関連していることが判明した。ポジショナルクローニング法により遺伝子を単離したところ、*TOBI* 遺伝子は **YABBY** 転写因子をコードしていることが示された。*TOBI* は、内外穎などの小穂の側生器官原基で発現しているもののメリステムでは発現していないことから、細胞非自律的にメリステムに作用していることが推察された。一方、*TOBI* の過剰発現やキメラプレッサーの解析結果から、*TOBI* は転写抑制に関わることが示唆された。これまで、側生器官の分化にはメリステムからのシグナルが重要な働きをしていることは良く知られているが、側生器官からメリステムへのシグナルはあまり例がない。その意味でも、本研究の研究成果は大きいと考えられる。

② 穂のパターン形成と小穂形態が異常となる *aberrant spikelet and panicle1 (asp1)* 変異体では、転写コリプレッサーをコードしている遺伝子が機能を失っていることが明らかとなった。したがって、*ASPI* 遺伝子は不必要な遺伝子の発現を抑制することにより、発生プログラムを正常に進行させることに役立っていると考えられる。さらに、*ASPI* がオーキシンのシグナル伝達にかかること、また、ヒストンのアセチル化と密接に関連していることを明らかにした。

③ 野生イネの小穂の頂端部には芒という針状の器官が形成されるが、栽培イネ（特にジャポニカ）では芒はほとんど形成されない。これは、イネの栽培化の過程で芒の伸長が抑制される機構が獲得されてきたと考えられる。本研究の結果、芒形成には *DROOPING LEAF (DL)* 遺伝子と *OsETTIN2 (OsETT2)* 遺伝子が関与していることが判明した。DL 遺伝子は芒形成に必須であること、*OsETT2* 遺伝子の芒原基での異所的発現がジャポニカイネの変異体で芒形成が引き起こされる原因であることなどが明らかになった。栽培化の過程で、芒原基における *OsETT2* の発現が消失したことが、ジャポニカイネで芒が消失した一つの原因と考えられる。

④ このほかに、*SUPPRESSOR OF G1 (SUG1)* や *TRIANGULAR HULL1 (TH1)* などの研究を行った。護穎はイネ小穂に特異的な器官であり、*g1* 変異体では護穎が外穎化する。*G1* 遺伝子がイネの小穂の形態進化に関わっている可能性があることから、*g1* 変異を抑圧する *sug1* の作用を調べた。また、*SUG1* 遺伝子の単離を目指して、マッピングを行い、染色体上での座乗領域を絞りこんだ。*TH1* 遺伝子が内外穎の形態を微調整していることを示すとともに、*G1* や *EG1* との遺伝的相互作用を解析した。

(2) 発生・分化の根源であるメリステム・幹細胞の形成と維持の制御機構の解明

① 茎頂分裂組織などでは、幹細胞の増殖を促進する正の制御因子とそれを負に制御する因子とのバランスにより、メリステムのサイズが適切に維持されている。シロイヌナズナ以外では、正の制御因子は全く不明であった。本研究では、負の制御因子として *FON2-LIKE CLE PROTEIN1 (FCPI)* が重要な働きを担っていることを確認するとともに、幹細胞を促進する遺伝子として *WOX* 遺伝子ファミリーに属する *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN PROTEIN4 (WOX4)* を同定した。*WOX4* は茎頂メリステムで発現しており、その誘導的発現抑制はメリステムの機能停止を引き起こすことが明らかになった。また、*WOX4* の下流で、サイトカイニンが作用している可能性を示した。

② イネは分蘖によって個体増殖をおこない、一つの種子から多数の個体を形成する。分蘖は、葉の腋に形成された腋芽から伸長する。腋芽形成とその伸長は多くの植物では、分枝（ブランチ）形成であるが、イネにとっては栄養体生殖で

あり、種子収量とも密接に関わっている。*WOX* 遺伝子ファミリーのメンバーである *TILLERS ABSENT1 (TAB1)* の機能が欠損すると、分蘖が全く形成されない。詳細な解析の結果、*TAB1* は腋芽メリステムの初期過程で発現し、その形成に重要な働きをしていることが明らかになった。*TAB1* は、シロイヌナズナの幹細胞促進因子である *WUSCHEL (WUS)* 遺伝子のオーソログである。しかしながら、茎頂メリステムでは全く発現しておらず、その維持にも機能していないことが判明し、この2つの植物の間では、同じ遺伝子の発生における役割が大きく異なっていることが明らかとなった。また、*TAB1* は腋芽メリステム形成の途中までは発現が持続するが、完成した腋芽メリステムではその発現が消失する。一方、*WOX4* は腋芽形成の初期～中期では発現せず、腋芽メリステムが完成する頃になると発現するようになる。したがって、2つの *WOX* 遺伝子ファミリーに属する遺伝子が入れ替わるように発現して、イネの腋芽メリステムの形成が制御されていることが明らかとなった。

(3) 中肋や維管束などの組織分化に着目した葉の形態形成を制御する遺伝子の解明

① *WOX4* 遺伝子は、メリステムのみならず葉原基でも発現している。RNA サイレンシング法による *WOX4* の誘導的発現抑制の解析から、この遺伝子が葉の発生において非常に重要な働きをしていることが明らかとなった。たとえば、*WOX4* の発現を抑制すると葉の中肋構造の形成が妨げられる。中肋形成には *DL* 遺伝子が主要な働きをしているが、*WOX4* の発現抑制により *DL* 遺伝子の発現が低下していた。すなわち、*WOX4* は *DL* 遺伝子の発現を促進することにより、中肋形成にも関わっていることが明らかとなった。

② 中肋が全く形成されない *dl* 変異体と野生型とを比較することによって、*DL* 遺伝子が制御している遺伝的ネットワークを解明する目的で、トランスクリプトーム解析を行った。さらに絞り込みを行い、*in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った結果、中肋予定領域で優先的に発現しているいくつかの遺伝子を見いだした。また、中肋形成にはオーキシンが重要な働きをしていること、オーキシンは *DL* 遺伝子とは別の経路で中肋形成に関わっていることが示唆された。

③ 一般的な被子植物の花序は苞葉という特殊な葉に抱かれている。しかしながら、イネでは苞葉はほとんど退化しており、小さな葉として痕跡

的に残っているのみである。 *neck leaf1 (nl1)* や *nl2* 変異体では、苞葉が伸長しているため、これらの変異の原因遺伝子はイネの進化過程で苞葉の抑制に働くようになったと考えられる。 *nl1* および *nl2* の表現型を詳細に解析した結果、これらの変異体の苞葉は葉鞘の性質をも持っていることが示された。また、 *nl2* の変異の原因遺伝子をほぼ特定することができた。

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 14 件)

- ① Tanaka, W., Ohmori, Y., Ushijima, T., Matsusaka, H., Matsushita, T., Kumamaru, T., Kawano, S., and Hirano, H.-Y. (2015). Axillary meristem formation in rice requires the *WUSCHEL* ortholog *TILLERS ABSENT1*. *Plant Cell* 27, 1173-1184. (査読有)
DOI:10.1105/tpc.15.00074
- ② Suzuki, C., Tanaka, W., and Hirano, H.-Y. (2015). Analysis of rice *fickle spikelet1* mutant that displays an increase in flower and spikelet organ number with inconstant expressivity. *Genes Genet. Syst.* 90, 181-185. (査読有)
DOI:10.1266/ggs.90.181
- ③ Ikeda, T., Tanaka, W., Mikami, M., Endo, M., and Hirano, H.-Y. (2015). Generation of artificial drooping leaf mutants by CRISPR-Cas9 technology in rice. *Genes Genet. Syst.* 90, 231-235. (査読有)
DOI:10.1266/ggs.15-00030
- ④ Sato, D.-S., Ohmori, Y., Nagashima, H., Toriba, T., and Hirano, H.-Y. (2014). A role for *TRIANGULAR HULL1* in fine-tuning spikelet morphogenesis in rice. *Genes Genet. Syst.* 89, 61-69.
DOI:10.1266/ggs.89.61 (査読有)
- ⑤ Ohmori, Y., Yasui, Y., and Hirano, H.-Y. (2014). Overexpression analysis suggests that *FON2-LIKE CLE PROTEIN1* is involved in rice leaf development. *Genes Genet. Syst.* 89, 87-91. (査読有)
DOI:10.1266/ggs.89.87
- ⑥ Toriba, T., and Hirano, H.-Y. (2014). The *DROOPING LEAF* and *OsETTIN2* genes promote awn development in rice. *Plant J.* 77, 616-626. (査読有)
DOI:10.1111/tpj.12411
- ⑦ Ohmori, Y., Tanaka, W., Kojima, M., Sakakibara, H., and Hirano, H.-Y. (2013). *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* is involved in meristem maintenance and is negatively regulated by the CLE gene *FCPI* in rice. *Plant Cell* 25, 229-241. (査読有) DOI:10.1105/tpc.112.103432
- ⑧ Tanaka, W., Pautler, M., Jackson, D., and Hirano, H.-Y. (2013). Grass meristems II: inflorescence architecture, flower development and meristem fate. *Plant Cell Physiol.* 54, 313-324. (査読有)
DOI:10.1093/pcp/pct016
- ⑨ Pautler, M., Tanaka, W., Hirano, H.-Y., and Jackson, D. (2013). Grass meristems I: shoot apical meristem maintenance, axillary meristem determinacy and the floral transition. *Plant Cell Physiol.* 54, 302-312. (査読有)
DOI:10.1093/pcp/pct025
- ⑩ Ishiwata, A., Ozawa, M., Nagasaki, H., Kato, M., Noda, Y., Yamaguchi, T., Nosaka, M., Shimizu-Sato, S., Nagasaki, A., Maekawa, M., Hirano, H.-Y., and Sato, Y. (2013). Two *WUSCHEL*-related homeobox genes, *narrow leaf2* and *narrow leaf3*, control leaf width in rice. *Plant Cell Physiol.* 54, 779-792. (査読有) DOI:10.1093/pcp/pct032
- ⑪ Tanaka, W., Toriba, T., Ohmori, Y., and Hirano, H.-Y. (2012). Formation of two

florets within a single spikelet in the rice *tongari-boushi1* mutant. *Plant Signal. Behav.* 7, 793-795. (査読有)
DOI:10.4161/psb.20522

- ⑫ Tanaka, W., Toriba, T., Ohmori, Y., Yoshida, A., Kawai, A., Mayama-Tsuchida, T., Ichikawa, H., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., and Hirano, H.-Y. (2012). The *YABBY* gene *TONGARI-BOUSHI1* is involved in lateral organ development and maintenance of meristem organization in the rice spikelet. *Plant Cell* 24, 80-95. (査読有)
DOI:10.1105/tpc.111.094797
- ⑬ Yoshida, A., Ohmori, Y., Kitano, H., Taguchi-Shiobara, F., and Hirano, H.-Y. (2012). *ABERRANT SPIKELET AND PANICLE1* encoding a TOPLESS-related transcriptional corepressor is involved in regulation of meristem fate in rice. *Plant J.* 70, 327-337. (査読有)
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04872.

[学会発表] (計 52 件)

- ① 松本光梨, 安居佑季子, 熊丸敏博, 平野博之 “葉の表皮組織に部分的欠損を持つイネ変異体の解析” 日本育種学会 第129回講演会, 2016年3月21-22日, 横浜市立大学 (神奈川・横浜).
- ② 久保文香, 安居佑季子, 平野博之 “YUCCA阻害剤を用いたイネの葉の形態形成におけるオーキシン作用の解析” 第57回日本植物生理学会年会, 2016年3月18-20日, 岩手大学(岩手・盛岡).
- ③ 田中若奈, 河野重行, 平野博之 “イネの *TAB1* 遺伝子は分けつと穂の形成を制御する” 第128回日本育種学会講演会, 2015年9月11-12日, 新潟大学(新潟・新潟)
- ④ 安居 佑季子, 大森 良弘, 平野 博之

“*OsWOX4*はイネの葉の発生分化に多面的な機能を持つ” 第128回日本育種学会講演会, 2015年9月11-12日, 新潟大学(新潟・新潟)

- ⑤ 廣川拓也, 佐藤大輔, 鳥羽大陽, 吉田明希子, 永島はるか, 高牟禮逸朗, 平野博之 “*gl* 変異を抑圧する変異体の解析と原因遺伝子の単離の試み” 日本育種学会第127回講演会, 2015年3月21-22日, 玉川大学 (東京・町田)
- ⑥ 久保文香, 安居佑季子, 佐藤豊, 熊丸敏博, 平野博之 “イネ葉脈パターンの解析と細葉遺伝子 *ALM1* の単離” 日本育種学会第127回講演会, 2015年3月21-22日, 玉川大学 (東京・町田)
- ⑦ 安居 佑季子, 大森 良弘, 平野 博之 “イネの葉の初期発生における *OsWOX4* の機能解析” 第56回日本植物生理学会年会, 2015年3月16-18日, 東京農業大学 (東京・世田谷)
- ⑧ 田中若奈, 大森 良弘, 牛島 智一, 松坂弘明, 松下 智直, 熊丸 敏博, 河野重行, 平野博之 “イネの腋芽形成の初期過程を制御する遺伝子の解析” 第126回日本育種学会講演会, 2014年9月26-27日, 南九州大学 (宮崎・都城)
- ⑨ 佐藤大輔, 大森良弘, 永島はるか, 平野博之 “内外穎の形態が異常となったイネ突然変異体の表現型解析と遺伝子同定” 日本育種学会第125回講演会, 2014年3月21-22日, 東北大学(宮城・仙台)
- ⑩ 鳥羽大陽, 平野博之 “イネの発生を制御する主要遺伝子は芒形成にも必須である” 日本育種学会第125回講演会, 2014年3月21-22日, 東北大学(宮城・仙台)
- ⑪ 大森良弘, 田中若奈, 小嶋美紀子, 榊原均, 平野博之 “イネにおける栄養成長期メリス

ムの維持制御機構” 本育種学会第123回講演会, 2013年3月27-28日, 東京農業大学 (東京・世田谷)

- ⑫ 平野博之, 田中若奈 “イネ小穂の発生における側生器官とメリステムとのコミュニケーション” 日本遺伝学会第85回大会ワークショップ「植物の発生・分化とコミュニケーション」, 2012年9月24-26日, 九州大学 (福岡・福岡)
- ⑬ 大森良弘, 平野博之 “DEX誘導系をもちいたイネ *FON2-LIKE CLE PPROTEINI* (*FCPI*) の機能解析, 2012年3月29-30日, 宇都宮大学 (栃木・宇都宮)
- ⑭ 鳥羽大陽, 大森良弘, 平野博之 “*DROOPING LEAF* 遺伝子を用いた草型改良イネの収量性解析” 日本育種学会第120回講演会, 2011年9月23-24日, 福井県立大学 (福井・永平寺町)
- ⑮ 田中若奈, 鳥羽大陽, 大森良弘, 河合新, 吉田明希子, 光田展隆, 高木優, 槌田智子, 市川裕章, 平野博之 “イネの小穂に多面的な異常を生じる *tongari-boushi1 (tob1)* 変異体の解析および原因遺伝子の単離” 日本育種学会第120回講演会, 2011年9月23-24日, 福井県立大学 (福井・永平寺町)
- ⑯ 大島枝里子, 大森良弘, 吉田明希子, 平野博之 “イネの苞葉伸長抑制に関する発生遺伝学的解析” 日本遺伝学会第83回大会, 2011年9月20-22日, 京都大学 (京都・京都)
- ⑰ 永島はるか, 鳥羽大陽, 吉田明希子, 平野博之 “イネ G1タンパク質と相互作用する因子の探索” 日本遺伝学会第83回大会, 2011年9月20-22日, 京都大学 (京都・京都)

[図書](計2件)

- ① Tanaka, W. Toriba, T., and Hirano, H.-Y., (2014). Flower development in rice. "The molecular genetics of floral

transition and flower development ", F. Fornara, ed. pp. 221-262 (Elsevier: Amsterdam). Advances in Botanical Research vol. 72.

- ② Hirano, H.-Y., Tanaka, W., and Toriba, T. (2014). Flower development in grasses. In Methods in Molecular Biology "Flower Development" (vol. 1110), F. Wellmer and J.L. Riechmann, eds pp. 57-84 (Springer: New York).

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/hirano/EvoGenet_3/Japanese.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 博之 (HIRANO, Hiroyuki)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号: 00192716

(2)研究分担者

(3)連携研究者

北野 英己 (KITANO, Hidemi)
名古屋大学・大学院農学生命研究科・教授
研究者番号: 50144184

熊丸 敏博 (KUMAMARU, Toshihiro)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号: 00284555

高牟禮逸朗 (TAKAMURE, Itsuro)
北海道大学・大学院農学研究科・講師
研究者番号: 90179557