

令和元年6月12日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18637

研究課題名(和文) イネKNOX・BLH転写因子複合体によるSAMの維持機構の解明

研究課題名(英文) Functional studies of KNOX-BLH complex in rice meristems.

研究代表者

津田 勝利 (Tsuda, Katsutoshi)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教

研究者番号：30756408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物の地上部を生み出す茎頂や節間の分裂組織の維持にはKNOX転写因子が不可欠な役割を果たしている。本研究では、KNOXのコファクターとして知られているBLH転写因子に着目し、主要穀物であるイネやトウモロコシにおける機能解析をおこなった。BLHは茎頂分裂組織の維持だけでなく、介在分裂組織や散在型維管束など、イネ科植物特有の茎構造形成にも不可欠な役割を果たしており、農業的にも重要な茎の発生メカニズムの一旦を解明した。さらに介在分裂組織形成における重要な下流遺伝子経路を同定した。また、イネ科植物の茎内構造観察のためマイクロCTを用いた手法を確立し、論文で発表したほか、他大学との共同研究でも貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は光獲得のために茎を伸ばす一方、過剰な身長は植物体の倒伏を招くため、適切な茎伸長制御は農業上重要な課題であるが、節間伸長機構はほとんど未解明であった。本研究では、重要穀物であるイネ・トウモロコシにおけるBLH転写因子の機能解析を行なった結果、これらの因子が節間を生み出す介在分裂組織形成・維持に不可欠な役割を果たすことがわかった。また、マイクロCTを用いた観察法を確立し、従来は困難であった茎の内部構造の全体像を把握することが可能となった。現在BLHの下流遺伝子経路が絞り込めて来ており、本研究の成果は将来的な穀物の節間成長制御のための重要な基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the function of BLH transcription factors in rice and maize.

Maize blh12/14 mutants showed unique phenotypes such as shortened internode and precocious anastomosis in the stem, suggesting BLH TFs play important roles in stem development. Rice blh mutants showed extremely shortened internode phenotypes. We carried out transcriptome analyses and identified several genes/pathways that are specifically working in the intercalary meristems. These BLH downstream genes will be keys to understand internode development, which is important to regulate plant height.

During these studies, we developed a method to observe internal structure using micro CT. This method can be used to obtain 3D modeling of various plant organs, as exemplified by the study of BLH function in the rice panicle development.

研究分野：植物発生学、育種学

キーワード：メリステム 介在分裂組織 節間伸長 転写因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

SAM (Shoot apical meristem: 茎頂分裂組織) は植物地上部すべての器官を生み出す組織であり、胚発生から生殖成長期まで一生を通じて未分化な状態に維持され続ける。KNOX とそのコファクターと考えられている BLH は、SAM の維持に不可欠な転写因子であり、その機能は進化の過程で維管束植物が SAM を獲得して以降、広く保存されている。主要穀物であるイネでは、KNOX と BLH は草丈や脱粒性という重要農業形質を制御することが知られており、KNOX-BLH の分子機能を明らかにすることは、植物発生学だけでなく、育種の観点からも意義が深い。

これまでの研究で代表者がイネの KNOX である OSH1 の下流経路を探索した結果、OSH1 は 4000 以上もの遺伝子近傍に結合しており、未知の重要な標的遺伝子が多く存在することが明らかになった。一方で、OSH1-GR を用いた過剰発現誘導系では、DEX 処理による誘導後 24 時間の範囲では標的遺伝子の約 1/10 が発現変動を示すのみで、大部分の下流遺伝子については、OSH1 がどのように転写制御をおこなうのか不明であり、さらに重要なターゲットを絞り込むには、異なる側面からのアプローチが必要であると考えた。

シロイヌナズナでの過去の研究で、KNOX のコファクターとして BLH 転写因子が同定されていたが、様々な植物で機能解明が進んでいる KNOX と比べ、BLH の機能解析は例が少なく、重要穀物であるイネ科植物ではほとんど解析されていない。また、KNOX-BLH 間の相互作用を示す研究結果はすべて *in vitro* での実験に基づいており、*in vivo* での複合体形成は実証されていない。

2. 研究の目的

本研究は、KNOX-BLH による SAM の維持機構の解明に向けて、1)イネ科植物（特にイネ）の SAM における BLH 遺伝子の機能を明らかにすること、2)下流遺伝子経路を同定すること、3) KNOX-BLH 転写因子複合体のさらなるコファクターの同定に向けた生化学的な実験系の立ち上げをおこなうことを目的とする。

3. 研究の方法

1) 機能欠損変異体を用いた BLH 転写因子の機能解析

イネおよびトウモロコシで、それぞれゲノム編集とトランスポゾンタギングを用いて機能欠損変異体を作成し、SAM を中心とした分裂組織における異常を観察する。また、抗体を作成し、免疫染色により発現部位を明らかにする。

2) 下流遺伝子経路の探索

野生型および *blh* 変異体を用いた mRNAseq 解析により、BLH 転写因子の下流で分裂組織を維持するために働く新規遺伝子経路を探索する。また、抗体を用いた ChIPseq 解析により、BLH の直接の標的遺伝子候補を絞り込む。

3) KNOX-BLH 転写因子複合体の免疫沈降系の確立

器官サイズの大きなトウモロコシを材料に、抗 BLH 抗体を用いた免疫沈降をおこない、KNOX と BLH が *in vivo* で複合体を形成することを実証する。

4. 研究成果

1)機能欠損変異体を用いた BLH 転写因子の機能解析

代表者が前所属先（カリフォルニア大学バークレー校）と共同で行っていた解析から、トウモロコシ BLH12 および BLH14 が腋芽形成・花序分枝および節間伸長に不可欠であることがわかった。特に、*blh12/14* 二重変異体の茎を詳細に観察したところ、節間基部に位置する介在分裂組織が維持されないこと、茎内維管束が過剰に融合して数が激減することがわかった。免疫染色による BLH12/14 の発現を調べたところ、SAM に加え維管束および介在分裂組織で見られた。これらの結果は、BLH が SAM の未分化性の維持だけでなく、介在分裂組織や維管束ネットワーク形成にも不可欠な役割を果たすことを示しており、これまでほとんど未解明であったイネ科植物の茎の発生メカニズムの一端を明らかにする発見となった (Tsuda et al. 2017)。また、茎内構造を観察する過程でマイクロ CT を利用した手法を確立し、プロトコル論文として発表した (Maeno and Tsuda, 2018)。

イネの BLH 転写因子 RI および RIL (トウモロコシ BLH14 および BLH12 のオーソログ) については、研究開始後に東京大学の平野博之教授のグループと同一の遺伝子を解析していることがわかったため、材料の提供を受け、かつマイクロ CT 観察で協力するなどし、共同研究に発展した (Ikeda et al. 2019)。イネの *ri ril* 二重変異体はトウモロコシに比べ強いメリステム異常を示し、胚性致死となった。これは KNOX の *osh1 osh15* 二重変異体の表現型と一致し、BLH のコファクターとしての機能を裏付けている。*ri +/- ril +/-* 個体は極度の節間伸長不全を引き起こし、トウモロコシの *blh12/14* 同様に介在分裂組織に異常をきたしていることを確認した。

2)BLH 下流遺伝子経路の探索

本項目では、イネ *ri +/- ril +/-* 個体を用いて、介在分裂組織の発生過程におけるトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、野生型では複数の幹細胞制御因子として知られる遺伝子が介在分裂組織付近で発現すること、およびこれらの発現が *ri +/- ril +/-* 個体では消失することが

わかり、RI および RIL の下流には介在分裂組織ではたらく幹細胞制御経路が存在することが示唆された。ChIP に向けては、RI および RIL を特異的に認識する抗体の作成を試みたが、トウモロコシ BLH と比べて大腸菌内での組換えタンパク質の発現が難しく（特に精製の過程が困難で）、良質の抗体を得るに至らなかった。代替案として GFP を融合した RI および RIL のゲノムコンストラクトを作成し、変異体に導入したが、変異体を完全には相補できず、また GFP の発現も検出できなかった。以上の理由から、ChIP による BLH の直接の標的遺伝子の同定には至っていない。なお、トウモロコシでの BLH 抗体を用いた ChIP 解析は代表者の前所属ラボにより現在行われている。

3)KNOX-BLH 転写因子複合体の免疫沈降系の確立

トウモロコシにおいては良質の抗体が得られたことから、免疫沈降を実施し BLH14 および BLH12 とともにトウモロコシ KNOX 転写因子の一つ KN1 と *in vivo* で直接相互作用することを立証できた (Tsuda et al. 2017)。しかしイネにおいては上記と同様の理由から、BLH の免疫沈降を実施することができなかった。

(まとめ)

良質の抗体を得ることができなかったことが主な理由で、当初予定していたイネにおける ChIP 解析や免疫沈降を実施することができず、予定していた進展は得られなかった。今後は抗原として用いるペプチド領域や相補性試験に用いるゲノム領域のさらなる検討を行うことで、生化学実験系のツール開発を継続する予定である。一方で BLH 転写因子の機能解析では、イネのみならずトウモロコシにおいても変異体の解析を行った結果、BLH の茎の発生過程における新機能を解明でき、イネ科植物の茎の発生において重要な知見を見いだすことができた。さらに本研究の過程で確立したマイクロ CT 法はイネ科植物の茎など比較的大きなサイズの植物体の内部構造を詳細に観察するのに適しており、価値のある手法を提案できたと考える。また、トランスクリプトーム解析の結果、介在分裂組織における幹細胞の存在を示唆する結果を得た。介在分裂組織は穀物の背丈を制御するための根幹となる組織であるが、その発生メカニズムの分子レベルでの理解はほとんど進んでおらず、今後新たに検証する価値のある方向性を生み出すことができたと言える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Ikeda K., Tanaka W., Toriba T., Suzuki C., Maeno A., Tsuda K., Shiroishi T., Kurata T., Sakamoto T., Murai M., Matsusaka H., Kumamaru T. and Hirano H.Y. "BELL-like homeobox genes regulate inflorescence architecture and meristem maintenance in rice." *The Plant Journal*. (2019). DOI: 10.1111/tpj.14230, 査読あり
2. Maeno A. and Tsuda K.*. "Micro-computed Tomography to Visualize Vascular Networks in Maize Stems" *Bioprotocol*, Vol 8, Iss 01, Jan 05, (2018). DOI:10.21769/BioProtoc.2682 (*corresponding author), 査読あり
3. Tsuda K., Abraham-Juarez M., Maeno A., Dong Z., Aromdee D., Meeley R., Shiroishi T., Nonomura K. and Hake S*. "KNOTTED1 Cofactors, BLH12 and BLH14, Regulate Internode Patterning and Vein Anastomosis in Maize." *Plant Cell*. 29:1105-1118. (2017) DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00967>, 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

1. Katsutoshi Tsuda and Ken-ichi Nonomura, "Control of subcellular localization of a KNOX transcription factor in rice.", 日本植物生理学会 2019 年 3 月、名古屋大学
2. Akiteru Maeno and Katsutoshi Tsuda, "Visualization of vascular networks in maize stems using micro-CT", 日本育種学会 第 133 回講演会 2018 年 3 月、九州大学
3. Katsutoshi Tsuda, Maria-Jazmin Abraham-Juarez, Akiteru Maeno, Zhaobin Dong, Dale Aromdee, Robert Meeley, Toshihiko Shiroishi, Ken-ichi Nonomura and Sarah Hake. "A role of KNOX-BLH transcription factors in scattered vein patterning in grasses" 日本植物生理学会、2017 年 03 月、鹿児島大学
4. Katsutoshi Tsuda. "Regulation of scattered venation and node/internode patterning in maize." 日本発生物学会秋季シンポジウム、2016 年 10 月、三島市民文化会館
5. 津田勝利, ドン ジャオビン, アブラハム マリア, 前野哲輝, アロムディ デイル, ミーリー ロバート, 城石俊彦, 野々村賢一, ヘイク サラ, "Regulation of scattered venation and internode patterning in maize", 日本植物学会、2016 年 09 月、沖縄コンベンションセンター
6. Katsutoshi Tsuda and Sarah Hake, "Chromatin dynamics of the knotted1 locus during

shoot development", Plant Genome Stability and Change 2016(国際学会)、2016年07月、
湘南国際村

〔図書〕(計 1 件)

1. Mizuta Y*. and Tsuda K. Three-Dimensional Multiphoton Imaging of Transcription Factor by ClearSee.

Methods Mol. Biol. 1830:257-268. 2018, doi: 10.1007/978-1-4939-8657-6_15, 査読なし

〔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

単子葉植物の茎に特徴的な形態形成を制御するメカニズム

https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2017/04/research-highlights_ja/20170410-2.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：ヘイク サラ (カリフォルニア大学バークレー校)、

ローマ字氏名：HAKE, Sarah (University of California, Berkeley),

研究協力者氏名：前野 哲輝 (国立遺伝学研究所)

ローマ字氏名：MAENO, Akiteru (National Institute of Genetics)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。