

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14445

研究課題名(和文)葉原基分化のタイミングを制御する分子機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the temporal regulation of leaf primordia initiation in rice

研究代表者

三村 真生(Mimura, Manaki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：80790378

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):葉が分化する時間的間隔である葉間期は葉の枚数に影響する形質である。本研究ではイネの葉間期を制御するPLA1、PLA2遺伝子の機能解析および制御下にある遺伝子の探索を行った。機能欠損変異体を用いた網羅的遺伝子発現解析では、PLA1、PLA2に共通の下流経路にある遺伝子群を同定した。また、RNA結合タンパク質であるPLA2の解析から結合RNAを同定し、これらの転写後制御が葉間期を調節するうえで重要な役割を果たす可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉間期は葉の枚数に影響することから植物体地上部の形態形成を理解する上で重要な形質であり、その分子制御機構の解明は地上部形態の農業形質改善につながる可能性を秘めている。本研究ではイネを材料として、葉間期制御に関わるPLA遺伝子の解析、下流制御遺伝子の探索等を行い、特に、PLA2遺伝子がコードするRNA結合タンパク質については、結合RNAの同定およびRNAに対する作用を明らかにした。本研究の成果は将来的に葉の枚数の調節による形態変化に向けた分子基盤情報となることが期待される。

研究成果の概要(英文):Temporal pattern of leaf initiation termed as plastochron is an important trait that affect the leaf number. In this study, we analyzed PLA1 and PLA2 genes, which regulate plastochron in rice, and explored their downstream factors. Transcriptome analysis identified a number of genes working downstream of both PLA1 and PLA2 genes. The analysis of RNA binding protein encoded by PLA2 genes identified its binding partner and our results suggest that the post-transcriptional regulation of these RNAs is important to modulate the plastochron in rice.

研究分野：植物発生学、植物遺伝育種学

キーワード：イネ 発生 葉原基 葉間期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

形態形質に着目したこれまでのイネの品種改良では、半矮性遺伝子の利用や穂サイズなどの改変が収量増加に大きく貢献し、その分子制御機構の解析も進められてきた。一方、同化産物生成の場であり地上部形態の大半を占める葉のサイズや数を人為的に制御する試みは限られており、その分子メカニズムも不明な点が多い。

イネも含めて植物の多くは、花芽をつけるまで茎の先端にある茎頂分裂組織(Shoot apical meristem, SAM)から規則的なタイミングで葉を分化する。ある葉が分化してから次の葉が分化するまでの時間的間隔は葉間期(plastochron)と呼ばれ、遺伝的に制御される形質である。葉間期の長さは最終的な葉の枚数に影響し、葉間期が短いと一定期間に分化する葉の枚数が多くなり、逆に長いと葉の枚数は少なくなる。従って、葉間期は植物体地上部の形づくりに非常に重要な形質であり、その分子制御機構を明らかにすることは葉の枚数の改変による植物体地上部の形態制御、さらには光合成能強化およびバイオマス量向上等の形質改善につながる可能性を秘めている。

研究代表者はこれまでにイネの葉間期制御に重要な異なる二つの遺伝子 *PLASTOCHRON1(PLA1)* と *PLA2* 遺伝子の解析を行ってきた。*PLA1*、*PLA2* 遺伝子はそれぞれ機能未知のシトクロム P450 水酸化酵素、RNA 結合タンパク質をコードしており、これらの機能欠損変異体は葉間期が短縮し、小さい葉を多く分化する。*PLA* 遺伝子は SAM から分化した若い葉(葉原基)で転写産物が発現していることから、細胞非自律的に SAM における次の葉原基分化を制御すると考えられるが、これらがコードするタンパク質の分子機能や、下流制御遺伝子に関する情報はいまだに少なく、これらの遺伝子がどのように葉原基の分化タイミングを決定するのかはほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、*PLA* 遺伝子を中心とした解析を通じて、イネをモデルとした植物の葉の分化するタイミング、葉間期を制御する分子機構の一端を明らかにすることを目的に研究を進めた。具体的には、*PLA* 遺伝子がコードするタンパク質の機能解析や共通の下流制御因子の探索、そして葉原基分化に関わりが深い植物ホルモンと *PLA* 遺伝子との関連性を調査することで *PLA* 遺伝子による葉間期制御メカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 網羅的遺伝子発現解析による *PLA1*、*PLA2* 遺伝子の下流因子の探索

PLA1、*PLA2* 遺伝子の機能欠損変異体および過剰発現体を材料に mRNA-seq 解析を行い、共通して発現が変動している遺伝子を抽出した。得られた遺伝子について、ゲノム編集による機能欠損変異体や *pla* 変異体との多重変異体を作成し、葉間期などの表現型と遺伝的相互作用を解析した。

(2) *PLA2* タンパク質と結合する RNA の探索と *PLA2* の機能解析

pla2 変異体に *PLA2* プロモーター下で *PLA2*-GFP 発現させて表現型が回復した植物体を材料に、抗 GFP 抗体を用いた CLIP-seq (Cross-Linking Immunoprecipitation sequencing) を行い、*PLA2* と結合する RNA を探索した。また、得られた標的 RNA に対して、*PLA2* がどのような機能を持つのか、*in vitro* の実験系で調査した。

(3) 葉間期と植物ホルモンとの関連性の解析

SAM における葉原基分化にはオーキシシンやサイトカイニンなどの植物ホルモンが重要な役割を果たしていることが知られているので、それらホルモン応答性マーカーを *pla* 変異体に導入し、SAM 付近における葉原基分化との関連性を抗体染色法により調査することを試みた。

4. 研究成果

(1) *PLA* 遺伝子の機能欠損変異体と過剰発現体の網羅的発現解析

mRNA-seq の結果、野生型と比較して両方の機能欠損変異体で発現量が増加しているものを 354 個、減少しているものを 48 個同定した。また、*pla1* 変異体で発現が変動していた遺伝子の約 80% が *pla2* 変異体でも発現変動していることが判明した。このことは *PLA1* と *PLA2* 経路が部分的に重複する可能性を示唆している。これら発現変動遺伝子には葉間期制御の関与が知られている *OsSPL* 転写因子をコードする遺伝子や、植物ホルモンの生合成および信号伝達に関わる遺伝子が含まれていた。一方で、過剰発現体の mRNA-seq では共通して増加している遺伝子が 10 個、減少している遺伝子が 33 個と少なく、ほとんどが機能未知の遺伝子であった。変異体で発現が減少していた *OsSPL* 遺伝子に着目して、*PLA* 遺伝子の過剰発現体背景で、その遺伝子と複数のパラログを欠損した変異体をゲノム編集により作成したところ、*PLA* 過剰発現体の表現型がやや抑えられた。従って、遺伝学的にも *OsSPL* 遺伝子は *PLA* 遺伝子の下流で部分的に関わっていることが示された。

(2) PLA2 の結合 RNA の同定と機能解析

CLIP-seq 解析により、PLA2 と結合する候補 RNA を約 700 個同定した。この中には葉間期や葉のサイズに関与する遺伝子が存在しており、(1) で同定したものと異なる OsSPL 転写因子も含まれていた。さらに、PLA2 が結合する部位を調査したところ、mRNA 上の 3' UTR に優先的に結合していることが判明し(図 1A, B)、結合部位周辺に頻繁に現れる RNA 配列を複数個同定した。このうちの一つは、ゲルシフトアッセイにより *in vitro* で PLA2 との結合性も確認ができた。

次に、これら PLA2 結合候補 RNA について(1)で行った mRNA-seq の解析結果と照合した結果、結合候補 RNA の多くは *pla2* 変異体や過剰発現体で発現量が変動していなかった。従って、PLA2 はこれら RNA の量には影響せず、転写後の翻訳制御に関与する可能性が考えられる。そこで、葉間期制御に関わりの深い遺伝子の 3' UTR を選び、プロトプラストを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ系により、PLA2 の 3' UTR 結合配列に対する効果を調査した。その結果、PLA2 を導入しない場合と比較して、PLA2 存在下でルシフェラーゼ活性が上昇したため、PLA2 はこの標的 RNA の翻訳効率を上げる機能があることが示唆された(図 1C)。

上記の結果が実際の植物体でも反映されるか検証するために、*pla2* 変異体背景で標的 RNA の過剰発現体や 3' UTR を欠損もしくは変異を導入したものを作成した。現在も解析を進めているが、予備実験の段階では標的 RNA を過剰発現させた場合や、3' UTR を欠損させたものを導入した場合に *pla2* 変異体の表現型を回復させる傾向が見られており、今後標的 RNA がコードするタンパク質量を調査することで実際の植物体内で PLA2 が標的 RNA の翻訳に対して与える影響を明らかにできると考えている。

(3) *pla* 変異体の茎頂付近における植物ホルモン応答

オーキシンやサイトカニン応答性レポーターを *pla* 変異体に導入し、野生型と比較して SAM 付近における挙動に変化がないか抗体染色により調査した。しかし、実験ごとに結果にばらつきがあり、今のところ野生型と比較して明確な違いは見出せていない。今後、条件検討や他の実験手法を用いて解析を進める必要がある。

以上の研究から *PLA1* と *PLA2* 遺伝子を中心としてそれらの下流制御因子を同定し、PLA2 に関しては標的 RNA に対してどのような機能を持つのか明らかになった。PLA2 の解析結果は、遺伝子の転写後制御がイネの葉間期を調節する上で重要な役割を果たす可能性を示しており、本成果から葉の枚数の制御を介した植物体地上部の人為的改変につながりうる分子基盤情報が得られたと考える。また、*PLA1*、*PLA2* 遺伝子は他作物にも保存されている遺伝子であることから、本成果はイネ以外の作物への波及効果も期待できる。一方で、植物ホルモンとの関係や *SPL* 遺伝子の解析など、当初予定していたほどの進展が得られなかった実験もある。今後、変異体の茎頂における植物ホルモン動態と表現型との関連や下流遺伝子の機能解析を行うことで、実際に *PLA* 遺伝子がどのようにして SAM における葉原基分化のタイミングを決めているのか明らかにしていく必要がある。

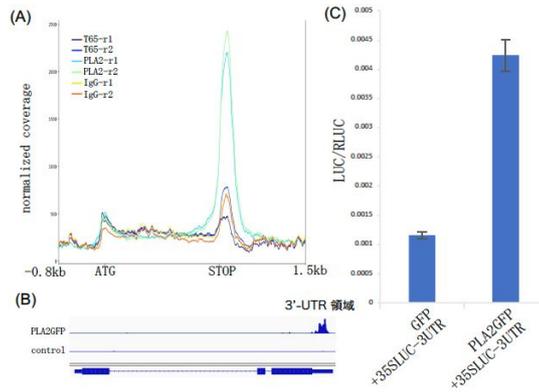


図1. PLA2の機能解析

(A) PLA2のCLIP-seqから得られたリードの遺伝子上の分布。
(B) CLIP-seqの結果の一例。3' UTR領域にピークが見られる。
(C) レポーターアッセイの結果。ルシフェラーゼ配列にPLA2の結合候補3' UTRをつなげ、GFPもしくはPLA2GFPとともにプロトプラストで発現させた。PLA2とともに発現させることでルシフェラーゼの活性が上昇した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hibara KI, Miya M, Benvenuto SA, Hibara-Matsuo N, Mimura M, Yoshikawa T, Suzuki M, Kusaba M, Taketa S, Itoh JI	4. 巻 17(5)
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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松原 健一郎, 味谷 雅之, ベン ヴェヌート アキラ, 松原(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 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三村真生
2. 発表標題 イネの葉間期制御因子の遺伝的相互作用と機能解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三村真生、小野聖二郎、野々村賢一
2. 発表標題 イネの減数分裂移行を制御する細胞質 RNA 顆粒因子 MEL2 の機能ドメイン及びターゲット RNA の探索
3. 学会等名 日本育種学会第135回講演会
4. 発表年 2019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
---------	---------