

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20248001

研究課題名(和文) シュートメリステムの機能に着目したイネの葉の分化機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the mechanisms of leaf formation from the viewpoint of shoot meristem function

研究代表者

長戸 康郎 (NAGATO YASUO) 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：10143413

研究成果の概要(和文)：

本研究はイネにおける葉の分化機構をシュートメリステムとの関係で明らかにしようとしたものである。シュートメリステムの維持と葉の形態形成に関わる *WAF1* を同定した。*WAF1* は小分子 RNA の制御に関わるものであった。葉原基分化の時間的制御に関し、*PLA3* 遺伝子を同定した。*PLA1*, *PLA2* と同様に葉の成熟速度を制御するもので、葉原基の分化には既存の葉原基からのシグナルが重要であることを明らかにした。葉の背腹軸、左右軸、頂部-基部軸それぞれのパターン形成の変異体を同定し、原因遺伝子を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

This research project has been carried out to reveal the mechanisms of leaf formation in relation to shoot meristem. We identified *WAF1* gene that was associated with shoot meristem maintenance and leaf morphogenesis. *WAF1* functions in the regulation of small RNAs. As for temporal regulation of leaf primordium formation, we newly identified *PLA3* gene. Together with the results of *PLA1* and *PLA2*, it is indicated that signals from preexisting leaf primordia play important role on the formation of new leaf primordium. We also identified genes that regulate adaxial-abaxial, central-lateral and basal-apical patterns of leaves.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	16,700,000	5,010,000	21,710,000
2009年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2010年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
総計	36,200,000	10,860,000	47,060,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：シュートメリステム、イネ、突然変異、葉パターン、葉間期

### 1. 研究開始当初の背景

本研究課題を提案するに至った背景として大きく2つの点がある。第1は、植物の形態形成、特にシュートの構築機構の解明に対する学術的重要性にある。この点に関する研究はモデル植物であるシロイヌナズナを用いて精力的に行われてきた。一方、単子葉植物、特にイネについては、変異体も少なく、メリステムの維持機構、葉原基の分化機構に関する情報はほとんどなかった。そこで、我々の研究室では、変異原処理した大規模な

集団から、シュートメリステムの維持や葉の分化に異常を示す変異体を多数同定し、蓄積してきた。申請者らはイネでシュート構築に欠損がある変異体の解析を通して小分子 RNA がシュート構築に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、葉原基の分化速度(葉間期)の制御は植物の形作りに非常に重要であるが、他植物種では全く解析されてこなかった、葉間期に関わる *plastochron (pla)* 変異体を解析し、葉原基からのシグナルが新たな葉原基の分化に重要であること

を示した。更に、葉の分化に関わる遺伝子も徐々に明らかにされてきたが、シュートの構築全体のプログラムについては不明な点が多かった。第2点目の背景としては、本研究の穀物育種に対する潜在的な重要性にある。穀物の農業的利用の効率性は栄養成長期のシュートの形質に依存している。従来、最終的な農業形質の解析は行われてきたが、その農業形質をもたらす発生過程の理解はなされてこなかった。しかし、形質の発生過程を理解することにより、その人為的制御の新たな展開を期待することができる。シュートメリステムの機能と葉の形態形成の制御機構を理解し、人為的にシュート部を強化・改変することは、将来的に有用形質を蓄積させていくにあたり極めて重要な課題であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究はイネ変異体を材料とし、遺伝学・分子生物学的手法を駆使してイネの地上部の形を規定する遺伝的基盤を、シュートメリステムの機能と葉の形態形成に着目することによって明らかにするとともに、将来の地上部の形態改変による穀物の育種に対する基礎的知見を得ることを目的として行ったものである。具体的には、葉の分化パターン、葉の形態形成をシュートメリステムの機能と関連付けて明らかにし、一方ではシュートメリステムの維持機構と側性器官の分化との関連を明らかにすることである。まず、葉間期の制御機構および葉の成熟機構を明らかにするために、*PLA* 遺伝子群の機能解析を進めるとともに、マイクロアレイ解析などにより遺伝子間ネットワークを明らかにする。また、葉原基はシュートメリステムから分化するため、*wavy leaf 1 (waf1)*, *flattened shoot meristem (fsm)*変異体や新たに同定する変異体を用い、シュートメリステムの維持機構の解明と葉の形成との関係を明らかにする。更に、葉のパターン形成機構を明らかにするために、*adaxialized leaf 1 (adl1)*, *adl2*などの向軸-背軸パターン、中央-側方パターンの変異体の解析と、原因遺伝子の単離を行なう。以上の解析を通して、葉の分化を巡る発生プログラムを解読する。

## 3. 研究の方法

(1) 変異体の収集：日本型品種台中 65 号、金南風の子実体から MNUU 処理した後代から、胚でのシュートの分化、幼苗の形態異常を示す変異体を同定した。本研究で用いたものは全て劣性変異体である。  
(2) 表現型解析：変異体の特徴に応じて、形態的、生理的解析、組織切片観察を行った。また、*in situ hybridization* 法により、マーカー遺伝子発現を観察し、変異体の機能を

推定した。

(3) 原因遺伝子のポジショナルクローニング：インド型品種 *Kasalath* との F2 個体を用いてポジショナルクローニングを行い、遺伝子を単離した。

(4) 機能解析：*in situ hybridization* 法により、発現領域を特定した。GFP などを利用し、細胞内力存在を明らかにした RT-PCR, *real-time PCR* により、時間的、組織別の発現パターンを明らかにした。

その他、当該遺伝子の関連変異体での発現、関連遺伝子の当該変異体での発現、関連変異体との 2 重変異体の解析等により、遺伝子間ネットワークを明らかにした。

## 4. 研究成果

(1) 葉の極性に関与する変異体の遺伝子単離と解析

*adl1* 変異体は葉が逆巻きになるものとして同定された。*adl1* では、通常、葉の向軸側表皮にのみ形成される機動細胞が葉の背軸側にも形成され、マーカー変異体を用いた解析により、葉肉組織も向軸側化していることが明らかになり、*ADL1* 遺伝子は葉の向軸側のアイデンティティ確立に必要であると推定された。ポジショナルクローニングにより、葉の向背軸性に関わる *ADL1* 遺伝子が *calpain-like cysteine proteinase* をコードすることを明らかにした。さらに、*ADL1* 遺伝子の強いアレルを見だし、変異体では球状胚致死や胚の頂部領域が欠失し、シュートレスになったり、胚乳の糊粉層の欠落も見られた。*ADL1* は胚でのシュートの分化、胚乳の糊粉層の分化も制御していることを明らかにし、多面的な機能を持っていることが判明した。*adl1* と類似の葉の表現型を示す *adl2* 変異体の解析も終了し、原因遺伝子も特定できた。ただし、*adl2* のヌルアレルでも葉以外の異常は観察されないため、*ADL2* は葉でのみ機能すると思われる。なお、*ADL1* と *ADL2* は相互作用することを明らかにしている。

葉身が形成されず、葉鞘のみとなる *needle 1 (ndl1)* 変異体を同定した。この遺伝子は葉の頂部-基部パターンに関わるものであろう。これは第3葉くらいまで葉身のない葉を分化した後、葉身のある葉を分化するが、やがて枯死するものである。このような葉の基部-頂部パターンに異常を示す変異体はこれまで報告されていないので、葉のパターン制御機構を明らかにする上で非常に重要な変異体である。*Kasalath* との F2 集団を用いてポジショナルクローニングを進めた結果、*NDL1* 遺伝子は転写因子をコードしていることが明らかになった。

葉の左右相称性に関わる変異体として、*leaf lateral symmetry (lsy)* 変異体を同定した。*lsy* 変異体は、葉の半分が欠けた葉、

中肋が2本ある葉、先端が2又になる葉などを形成した。発生過程の観察により、*Isy*では、本来の中肋以外に葉原基の左(右)半分に異所的な中肋が形成されたり、葉原基の半分が発生停止するなどの異常が見られた。すなわち、*Isy*では、葉原基の成長の左右同調性が失われ、それぞれが独立して発生することがあると考えられる。ポジショナルクロニング法により遺伝子を単離したところ、転写因子をコードしていた。

発芽後シュートメリステムが扁平になり、やがて消失し、幼苗致死となる *fsm* 変異体の原因遺伝子は chromatin assembly factor-1 (CAF-1) の p150 subunit をコードしていた。多重蛍光 in situ hybridization 法をイネで確立することにより、*FSM* 遺伝子が G2 期の細胞で発現し、変異体では細胞周期 (S 期、G2 期) が長くなっていることを明らかにした。しかも、細胞周期の延長によりメリステムへの細胞の供給が減少するにもかかわらず、葉原基の分化速度は変わらないため、シュートメリステムの未分化細胞が消費され、シュートメリステムが消失すると考えられた。すなわち、シュートメリステムにおける細胞分裂と葉原基の分化は独立に制御されていると考えられる。

## (2) シュートメリステムと葉原基発生の遺伝的制御機構の解明

*pla3* は、葉間期が短くなるだけでなく、葉やシュートメリステムの形態異常、穂発芽、胚の巨大化など、*pla1* や *pla2* では見られない多面的な表現型を示した。品種 Kasalath との F2 個体を用いて *pla3* 変異体の原因遺伝子をクロニングしたところ、glutamate carboxypeptidase をコードしていた。In situ hybridization により、*PLA3* 遺伝子はシュートメリステムを含むほとんど全ての組織で発現するところが明らかになった。*PLA1*, *PLA2* 遺伝子はシュートメリステムでは発現せず、葉原基のみで発現することにより葉原基の分化抑制に関わっていると推定したが、*PLA3* タンパクは、シュートメリステムで直接葉原基の分化抑制を行っている可能性がある。*pla3* 変異体は、葉間期以外にもシュートメリステムの維持の異常などを示すので、多面的な機能を持っていると考えられる。*pla1*, *pla2*, *pla3* についてホルモン含量を測定したところ、複数のホルモン含量が野生型と異なっていた。更にホルモン添加培地で生育させたところ、複数のホルモンに対する感受性も変動していた。

*pla1*, *pla2*, *pla3* についてマイクロアレイ解析を行ったところ、3 変異体で共通して発現が上昇する遺伝子、逆に発現が低下する遺伝子が見いだされた。現在詳細な解析を行っている。

*PLA2* に関して、野生型にゲノム遺伝子を導入したハイコピー変異体を作成したところ、葉間期が長くなるとともに、葉も長くなり、葉の変形である穎(外穎、内穎)も長くなり(大きくなり)、結果として種子も大きくなった。このことは、*PLA* 遺伝子の発現量を調節することにより、器官のサイズを制御できる可能性を示唆している。

*wavy leaf 1 (waf1)* は、発芽後、波打つような異常な葉を形成するが、約半数の個体はやがて枯死する変異体である。シュートメリステムは扁平になり、*OSHI* を発現する細胞数も減少した。また、冠根数も減少し、獅子根、冠根ともに、短くなった。*WAF1* はシュートメリステムだけでなく、根のメリステムの発生にも関与していると考えられる。*WAF1* 遺伝子はシロイヌナズナの *HEN1* のオソログで、小分子 RNA の制御に関わっていることを明らかにし、論文として公表した。

胚のパターン変異体として同定した、*aberrant regionalization of embryo 2 (are2)* 変異体は、葉の形態形成、シュートメリステムの維持にも関わるものであった。*are2* 変異体は、胚に複数のシュートや幼根を分化するものであるが、発芽後葉鞘に切れ込みが入り、葉の生長は抑制された。生殖成長には転換せず、やがて枯死した。原因遺伝子は、シキミ酸経路の酵素遺伝子をコードしていた。2 次代謝産物が胚のパターン、葉の形態形成、メリステムの維持に関係するという点で、興味深い。

## 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 17 件)

1. Yamaki, S., Nagato, Y., Kurata, N. and Nonomura, K-I. (2011) Ovule is a lateral organ finally differentiated from the terminating floral meristem in rice. *Dev. Biol.* 351,208-216. 査読有り
2. Abe, M., Yoshikawa, T., Nosaka, M., Sakakibara, H., Sato, Y., Nagato, Y. and Itoh, J.-I. (2010) *WAYLEAF 1*, an ortholog of *Arabidopsis HEN1*, regulates shoot development by maintaining microRNA and trans-acting siRNA accumulation in rice. *Plant Physiol.* 154: 1335-1346 査読有り
3. Ohmor, S., Kimizu, M., Sugita, M., Miyao, A., Hirochika, H., Uchida, E., Nagato, Y. and Yohida, H. (2009) *MOSAIC FLORAL ORGANS1*, an *AGL6*-Like MADS-Box gene, controls floral organ identity and meristem fate in rice. *Plant Cell* 21:3008-3025. 査読有り
4. Sazuka, T., Kamiya, N., Nushimura, T., Ashikari, M., Ohmae, K., Imamura, K.,

- Nagato, Y., Koshiba, T., Kitano, H. and Matsuoka, M. (2009) A rice tryptophan deficient dwarf 1 mutant, *tdl1*, contains a reduced level of Indole acetic acid and develops abnormal flowers and organless embryos. *Plant J.* 60:227-241. 査読有り
5. Hibara, K., Obara, M., E. Hayashida, Ishimaru, T., Abe, M., Satoh, H., Itoh, J.-I. and Nagato, Y. (2009) *The ADAXIALIZED LEAF1* gene functions in leaf and embryonic pattern formation in rice. *Dev. Biol.* 334: 345-354. 査読有り
6. Kawakatsu, T., Taramino, G., Itoh, J.-I., Allen, J., Sato, Y., Hng S.-K., Nagasawa, N., Kojima, M., Kusaba, M., Sakakibara, H., Sakai, H. and Nagato, Y. (2009). *PLASTOCHRON3/GOLOATH* encodes a glutamate carboxypeptidase required for proper development in rice. *Plant J.* 58: 1028-1040. 査読有り
7. Horigome, A., Nagasawa, N., Ikeda, K., Ito, M., Itoh, J.-I. and Nagato, Y. (2009) *OPEN BEAK* is a negative regulator of class 1 *knox* genes and a positive regulator of class B floral homeotic gene in rice. *Plant J.* 58: 724-736. 87-95 査読有り
8. Itoh, J.-I., Sato, Y. and Nagato, Y. (2008) *SHOOT ORGANIZATION2* gene coordinates leaf domain development along the central-marginal axis in rice. *Plant Cell Physiol.* 49: 1226-1236. 査読有り
9. Itoh, J.-I., Hibara, K., Sato, Y. and Nagato, Y. (2008) Developmental role and auxin responsibility of class III HD-ZIP gene family members in rice. *Plant Physiol.* 147: 1960-1975. 査読有り
10. Abe, M., Kuroshita, H., Umeda, M., Itoh, J.-I. and Nagato, Y. (2008) The rice *FLATTENED SHOOT MERISTEM*, encoding chromatin assembly factor-1 p150 subunit, is required for meristem maintenance by regulating cell-cycle period. *Dev. Biol.* 319: 384-393. 査読有り

[学会発表] (計 17 件)

1. 三村真生・伊藤純一・長戸康郎 (2010) *plastochron* 変異体のホルモン応答性と原因遺伝子の過剰発現 日本育種学会第 118 回講演会, 秋田県立大学 (秋田県) 9 月 25 日
2. 吉川貴徳・伊藤純一・長戸康郎 (2010) イネ *SLENDER LEAF1* 遺伝子の解析. 日本育種学会第 118 回講演会, 秋田県立大学 (秋田県) 9 月 25 日
3. 高階泰宗・伊藤純一・長戸康郎 (2010) イネのメバロン酸経路の遺伝子 *SEGMENTED EMBRYO* は胚の分割を抑制する. 日本育種学会第 117 回講演会, 京都大学 (京都府)

3 月 26 日

4. 吉川貴徳・小野絵里・伊藤純一・長戸康郎 (2010) イネ細葉変異体 *slender leaf* の解析. 日本育種学会第 117 回講演会, 京都大学 (京都府) 3 月 27 日
5. Yew, C., J.-I. Itoh, Y. Nagato (2010) *NARUTOMAKI* gene affects the leaf rolling and viability in rice. 117th Annual Meeting of Japanese Society of Breeding, 京都大学 (京都府) 3 月 27 日
6. 荒川理恵, 吉川貴徳, 伊藤純一・長戸康郎 (2010) イネの *japonica-indica* における juvenile-adult 相転換時期の分化. 日本育種学会第 117 回講演会, 京都大学 (京都府) 3 月 26 日
7. 藤井宏樹, 伊藤純一, 長戸康郎 (2010) 栄養成長初期に主稈が枯死するイネの *main culm lethal* 変異体の解析. 日本育種学会第 117 回講演会, 京都大学 (京都府) 3 月 26 日
8. Ikeda-Kawakatsu, K., Sato, H., Izawa, T., Maekawa, M., and Nagato, Y. (2010) Identification and characterization of rice *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 2* gene. 第 51 回日本植物生理学会年会、熊本大学 (熊本県) 3 月 18 日
9. 伊藤純一, 榊原均, 長戸康郎 (2009) 葉序を規定するイネ *DEC* 遺伝子の単離. 日本育種学会第 116 回講演会, 北海道大学 (北海道) 9 月 25 日
10. 細木渉, 伊藤純一, 長戸康郎 (2009) イネの初期生育に異常を示す *asy* 変異体の解析. 日本育種学会第 116 回講演会, 北海道大学 (北海道) 9 月 25 日
11. 田附博, 伊藤純一, 草場信, 北野英己, 長戸康郎 (2009) イネの胚の器官分化パターンを維持できない *msp1* 変異体の解析. 日本育種学会第 115 回講演会、エポカルつくば (茨城県) 3 月 28 日
12. 田中伸裕, 伊藤純一, 千徳直樹, 長戸康郎 (2009) イネの *PETER PAN SYNDROME* 遺伝子は juvenile-adult 相転換と光形態形成を制御する. 日本育種学会第 115 回講演会、エポカルつくば (茨城県) 3 月 28 日
13. 大森伸之介, 佐藤光, 長戸康郎, 吉田均 (2009) イネ *spw1-cl5* 変異体の閉花受粉性に対する温度の影響. 日本育種学会第 115 回講演会、エポカルつくば (茨城県) 3 月 28 日
14. 桧原健一郎, 小原真理, 林田恵美, 阿部匡, 伊藤純一, 長戸康郎 (2008) イネ *ADAXIALIZED LEAF* 遺伝子は葉や胚のパターン形成に作用する. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (兵庫県)

12月11日

15. 田附博、伊藤百代、伊藤純一、長戸康郎  
(2008) イネ胚パターン形成変異体 *are2*  
の同定と解析。日本育種学会第114回講  
演会，滋賀県立大学（滋賀県）10月11日
16. 松井三可子、佐藤亜依、伊藤純一、長戸  
康郎 (2008) 細胞間接着を負に制御す  
る *LEAF ADHESION* 遺伝子の解析。日本育種  
学会第114回講演会，滋賀県立大学（滋賀  
県）10月11日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長戸 康郎 (NAGATO YASUO) 東京大学・  
大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：10143413

### (2) 研究分担者

伊藤 純一 (ITO JUN-ICHI) 東京大学・  
大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：30345186