

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780001

研究課題名 (和文) 葉序の制御過程に関わる発生遺伝学的機構の解析

研究課題名 (英文) Developmental genetics on regulatory pathway of phyllotaxy

研究代表者

伊藤 純一 (JUNICHI ITO)

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

研究成果の概要 (和文)：植物の地上部の形は、葉がどのように茎頂分裂組織から分化してくるかによって大きく左右される。葉の空間的分化パターンは葉序と呼ばれるが、葉序のパターンが変化する変異体 (*dec*) をイネで同定した。*DEC* 遺伝子の単離や、変異体の遺伝学的、生理学的解析により、*DEC* 遺伝子はこれまで知られていなかったサイトカイニンの情報伝達経路に関わることによって、葉序のパターンを制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：Shoot architecture largely depends on leaf initiation pattern at shoot apical meristem (phyllotaxy). I identified recessive mutants, decussate (*dec*), affecting phyllotactic pattern in rice. Map-based cloning of *DEC*, genetic and physiological studies of *dec* mutants revealed that *DEC* regulates phyllotactic pattern by a novel cytokinin signaling pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物・発生遺伝・葉序・イネ

1. 研究開始当初の背景

植物のシュートの形は葉の空間的な配置によって大きく影響を受ける。植物の茎に対する葉の着生パターンは葉序と呼ばれる。葉序は種や生育相特異的であり、例えば主要穀物を含むイネ科植物の栄養成長期の葉序は葉がシュート軸に対して 180° ごとに茎に着生する 1/2 互生葉序を示す。またモデル植物で

あるシロイヌナズナに見られるらせん葉序をはじめ、対生葉序、輪生葉序といった様々なパターンの葉序が高等植物には認められている。葉序がどのようにして決定されるのかは、器官形成のオーガナイザーである茎頂分裂組織と呼ばれる細胞群から葉原基がどのような空間的な配置で分化するかにかかっている。従って、葉序の制御機構を明らか

にする場合、茎頂分裂組織の機能に関する理解が不可欠となる。葉序研究はそのパターンの美しさと正確さから、古くから生物学者の興味を引く研究分野の一つであり、多くの研究報告がある。しかしながら、茎頂分裂組織の機能と分子生物学的な基盤に基づいて葉序を説明する研究はまだ少ない。近年、葉序の制御と植物ホルモンの関与が示唆されている。しかしながら種や生育相特異的な葉序がどのように確立されているのかは未だ不明な点が多い。申請者は長年にわたるスクリーニングにより、葉序のパターンが互生から対生に変換する *decussate(dec)* 変異体を同定した。*dec* 変異体のシュートにおける表現型は詳細に解析されており、*DEC* 遺伝子は茎頂分裂組織と茎の細胞の維持を通して葉序を制御する遺伝子であることが明らかとなっている。この遺伝子はこれまでに報告のない新規なタンパクをコードしていたことから、イネの茎頂分裂組織の維持を通じた葉序の決定には、これまで明らかにされていない新しい因子が関与している可能性が高いと考えられた。

一方で、*dec* 変異体の表現型解析を通して、茎頂分裂組織における葉原基の分化位置とそこから分化する葉の形態形成が密接な発生的制御を受けていることが示唆されていた。葉の形態形成はシュートの形を決定する大きな要因の一つであり、また葉原基の分化位置と葉の形態形成との関係に関する知見は他の植物種においても得られていない。これらのことから、*DEC* 遺伝子と *dec* 変異体の解析、葉序と葉の形態形成に関わる変異体の解析は、今後明らかにすべき分子遺伝的、発生学的な様々な課題を含んでいると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではイネの葉序が異常となる変異体 *decussate(dec)* の原因遺伝子の単離と機能解析を通して、新たな葉序の制御機構についての理解を深める。また、茎頂分裂組織における葉原基の分化位置とそこから分化する葉の形態形成に関する知見をいくつかのイネ変異体を用いて得る。本研究は葉序を決定する発生遺伝学的機構を明らかにすると共に、葉序と葉の形態形成との関係を理解し、シュートの形の制御を通じた作物育種に対する発生遺伝学的基礎を構築することを目的として行なう。

3. 研究の方法

dec 変異体のシュートにおける表現型の詳細な解析は終了し、更に相補性検定により候補遺伝子が真に *DEC* 遺伝子であることを確認した。また、発現解析により *DEC* 遺伝子は様々な器官で様に発現し、特異的な発現を示さ

ないことが明らかとなった。*DEC* の候補遺伝子は既知のタンパクとは相同性を示さない全く新しい因子をコードしているため、遺伝学的、生理学的、分子生物学的な様々な手法により、どのような制御過程で働く遺伝子なのかを明らかにしていく。マイクロアレイやホルモンの定量などによって得た情報から、*DEC* 遺伝子が関わっている制御過程について絞り込みを行なう。また、これらの解析で得られた制御過程に関わる遺伝子の発現解析を行ない、*DEC* 遺伝子の作用点に対する情報を得る。

一方、*dec* 変異体以外にも葉序と葉の形態形成に関与する変異体を用いて解析を行う。葉の左右が非対称となる *leaf lateral symmetry 1(lsy1)* 変異体を同定しているが、*lsy1* 変異体の原因遺伝子はまだ同定されていない。インド稲 *kasalath* との交配を行なったので、これらの集団を用いてマッピングを行い、原因遺伝子の単離を行う。また葉序、葉の形態形成に関わる関連遺伝子、新規遺伝子を探索するため、*dec* 変異体に対する変異原処理や新たなスクリーニングを行う。

4. 研究成果

DEC 遺伝子は既知のタンパクとは相同性を示さない全く新しい因子をコードしている。*DEC* 遺伝子は植物体において様々な器官で様に発現しており、過剰発現体を作成したところ、表現型に特に異常は認められなかった。また、つぎに *DEC* タンパクの細胞内局在を明らかにする為に蛍光タンパク GFP との融合タンパクを作るベクターを作成し、タマネギの表皮細胞に導入した。蛍光は主に細胞質に観察されたことから、*DEC* タンパクは細胞質で機能することが明らかとなった。次に *DEC* 遺伝子がどのような制御機構に関わる遺伝子であるかを推察する為に、野生型と変異体との間でマイクロアレイ解析を行った。多くの遺伝子群に変動が観察されたが、特に形態形成に関わる転写因子等に際だった変動は認められなかった。

dec 変異体はシュート部に大きな異常が認められ、葉序の転換と茎頂分裂組織の肥大が特徴的である。しかし、根にも異常が観察される。そこで根の表現型について詳しく解析を行った。まず根は野生型に比べて短く、細い外観を示した。内部形態の観察により、根端分裂組織はシュートとは逆に、野生型に比べ小さいことが明らかとなった。しかしながら、根の特定の細胞層で発現する分子マーカーを用いて根の細胞層のパターンについて解析を行ったところ、異常は観察されなかった。茎頂分裂組織ではサイズが大きくなると共に、細胞分裂活性が上昇することが知られている。そこで根端分裂組織においても細胞分裂活性を分子マーカーを用いて調査した。

その結果、根端分裂組織においては分裂活性は低下していた。このことから、dec 変異体ではシュートと根で全く逆の表現型が見られることが明らかとなった。

分裂組織の活性に関わり、シュートと根で異なる作用を及ぼす植物ホルモンとしてサイトカイニンが知られている。DEC 遺伝子がサイトカイニンの経路と関わっている可能性が考えられたので、マイクロアレイのデータからサイトカイニンの生合成、分解/不活性化、情報伝達に関わる全ての遺伝子の発現データを抽出した。その結果、生合成に関わる遺伝子については多くが減少、分解/不活性化に関わる遺伝子については上昇傾向が認められた。情報伝達経路に関わる遺伝子については、複数の Type-A レスポンスレギュレーター遺伝子の発現が dec 変異体では低下していることが明らかとなった。これらのことから、DEC 遺伝子は何らかの形でサイトカイニンの経路と関わっていることが考えられた。そこで、dec 変異体のサイトカイニンへの反応を調査するために、サイトカイニンの添加実験を行った。その結果、シュート、根ともに、dec 変異体ではサイトカイニンに対する反応性が低下していることが明らかとなった (図 1)。

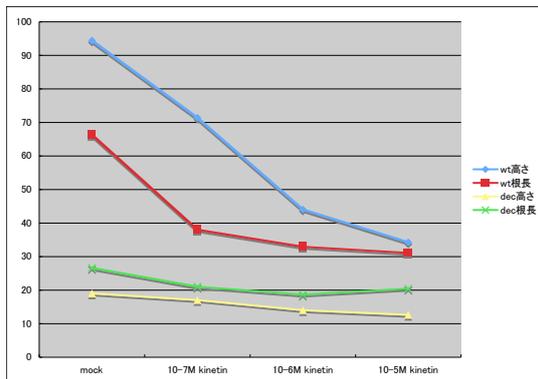


図 1 サイトカイニン処理による dec 変異体の形態変化

次にサイトカイニンの内生量を調査する為に、dec 変異体におけるサイトカイニン代謝物の定量を行った。しかしながら、サイトカイニンの代謝産物に大きな変化は見られなかった。これらのことから、DEC 遺伝子はサイトカイニンの情報伝達を介して、葉序パターンを制御していると考えられる。トウモロコシの Type-A レスポンスレギュレーター機能喪失変異体として abphy11 変異体が知られており、dec 変異体と同様に葉序の転換が認められることから、イネ科ではサイトカイニンシグナリングが葉序パターンの決定に重要な役割を果たしていると考えられる。

また、dec 以外にも葉序が異常となり葉の左右が非対称となる leaf lateral symmetry1 変異体の解析を行い、いくつかの候補遺伝子

を絞り込んだ。その中には葉の形態形成に関わると考えられる重要な転写因子が含まれており、この遺伝子が最も有力な候補遺伝子であると考えられる。この遺伝子が真の原因遺伝子だとすると、葉の形態形成と葉序の制御が密接に関わっていることを更に強く指示するものであり、この変異体の更なる解析は、イネにおける葉序の制御機構や葉の形態形成との関わりを明らかにしていく上で有用であると考えられた。

以上、本研究においてイネの葉序の制御において、植物ホルモンであるサイトカイニンの情報伝達を介した新しい制御過程を同定し、葉の形態形成と葉序の間の密接な関わりを示唆する変異体を同定した。

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 6 件)

- ① K Hibara, M Obara, E Hayashida, M Abe, T Ishimaru, H Satoh, J-I Itoh, Y Nagato. The ADAXIALIZED LEAF1 gene functions in leaf and embryonic pattern formation in rice. *Developmental Biology*, 査読有, Vol. 334, 2009, pp345-354.
- ② A Horigome, N Nagasawa, K Ikeda, M Ito, J-I Itoh, Y Nagato. Rice open beak is a negative regulator of class I knox genes and a positive regulator of class B floral homeotic gene. *Plant Journal*, 査読有, Vol. 58, 2009, pp724-736.
- ③ T Kawakatsu, G Taramino, J-I Itoh, J Allen, Y Sato, S-K Hong, R Yule, N Nagasawa, M Kojima, M Kusaba, H Sakakibara, H Sakai, Y Nagato. *Plant Journal*, 査読有, Vol. 58, 2009, pp1028-1040.
- ④ Itoh, JI., Sato, Y., Nagato, Y. The SHOOT ORGANIZATION2 gene coordinates leaf domain development along the central-marginal axis in rice. *Plant & Cell Physiology*, 査読有, Vol. 49, 2008, pp1226-1236.
- ⑤ Itoh, JI., Hibara, K., Sato, Y., Nagato, Y. Developmental Role and Auxin Responsiveness of Class III HD-Zip Gene Family Members in Rice. *Plant Physiology*, 査読有, Vol. 147, 2008, pp1960-1975.
- ⑥ Abe, M., Kuroshita, H., Umeda, M., Itoh, JI. and Nagato Y. The rice FLATTENED SHOOT MERISTEM, encoding CAF-1 p150 subunit, is required for meristem maintenance by regulating the cell-cycle period. *Developmental Biology*, 査読有, Vol. 319, 2008, pp384-393.

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① Jun-ichi Itoh, Identification of a novel gene regulating phyllotaxy in rice. The 6th International Rice Genetics Symposium, 16-19 November 2009, Philippines, Manila.
- ② 伊藤 純一、葉序を変更する dec 変異体からの遺伝子単離、イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ、2008.7.4、九州大学

〔図書〕（計 1 件）

佐藤 豊・野坂実鈴・伊藤純一、秀潤社、small RNA による茎頂分裂組織形成制御 植物のエピジェネティクス、細胞工学別冊 24、2008、169 ページ

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 純一 (JUNICHI ITO)

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者