

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380005

研究課題名(和文)葉原基分化を時間的に調節する分子遺伝学的機構に関する研究

研究課題名(英文)Molecular genetics of temporal regulation of leaf initiation in rice

研究代表者

伊藤 純一 (Jun-ichi, Itoh)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：30345186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：葉の分化の時間的な制御機構の解明は、シュートの形質改変による育種に重要な知見を与えうる。本研究によりイネにおける葉間期制御の遺伝的ネットワークの一端を明らかにした。イネのPLA1、PLA2遺伝子は植物ホルモンのジベレリンによって発現が誘導され、そして下流のOsSPL遺伝子の発現をそれぞれ異なる経路で制御することによって葉間期を調節していることを明らかにした。また、PLA遺伝子とAPO遺伝子は独立に葉間期を制御することも明らかにした。過剰発現体の解析からは、PLA遺伝子は器官サイズや数の決定に関与しており、その発現量を制御することによって、植物の形態形質を改変できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is important to understand temporal regulation of leaf initiation for improving shoot architecture of plants in the future breeding program. This study revealed a part of the genetic network of plastochron regulation in rice. Both of the expression of PLA1 and PLA2 are induced by a plant hormone, gibberellin. PLA1 and PLA2 affect the expression level of OsSPLs that are regulatory genes for leaf initiation, in independent pathways. In addition, this study uncovered that APO1 and APO2 genes also control plastochron independent of PLA1 and PLA2. Over-expression of PLA1 and PLA2 affect the length of plastochron and organ size, indicating a modulation of PLA1 and PLA2 expression could be useful to improve morphological traits.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：イネ 発生 葉原基 葉間期

1. 研究開始当初の背景

形態的有用形質の利用を目的としたイネの遺伝育種学的解析においては、既に矮性や出穂期に関して多くの遺伝子が単離され、分子メカニズムも明らかにされている。また、近年ではイネの多収性や栽培化に関する遺伝子やその制御機構に関わる知見も報告されている。これらの形質の制御機構の解明は将来のより効率的な農業生産にとって基盤をなすものといえる。一方で、新たな視点に立ったイネの地上部農業形質改善の試みを行う必要があると考えられる。

その一つの例が、葉やシュートの形の制御による農業形質の改善であろう。植物のシュートの形に大きな影響を及ぼす因子として葉原基の分化パターンと葉の形態形成がある。これら二つの因子は植物種や生育相に特異的であり、厳密な遺伝的制御下にあると考えられる。近年、葉の形態形成を制御する遺伝的制御機構の研究がシロイヌナズナを中心に盛んになされているものの、葉原基の分化パターンに関しては、シロイヌナズナにおいてもほとんどわかっていないのが現状である。

このような状況の中、申請者らはこれまで葉の分化するタイミング(葉間期)の制御の鍵となる *PLASTOCHRON(PLA)* 遺伝子の解析を行ってきた。*PLA* 遺伝子は葉原基の分化速度を制御する鍵遺伝子であるのと同時に、葉の成熟をコントロールし、その結果、器官サイズの制御も担っている。これらの知見は、*PLA* 遺伝子がシュートの形を制御する上で極めて重要な役割を果たしており、これらの遺伝子の更なる発現制御機構や関連遺伝子との相互作用の解明が強く望まれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、葉の分化速度に注目し、その鍵となるイネ *PLA* 遺伝子の機能解析を通じて、葉原基の時間的調節機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、*PLA* 遺伝子における植物ホルモンの関与機構の解明、*PLA1* 遺伝子経路に関わる新たな遺伝子の単離と解析、*PLA* 遺伝子の作用機構の解明、*PLA* 関連遺伝子を利用した植物の形の改変、などの解析によって、機能的なイネの地上部が構築される仕組みを解明し、シュートの形を人為的に制御するための知識的基盤を充実させると共に、実際に *PLA* 遺伝子の発現制御の改変を行なうことによって、*PLA* 遺伝子の育種利用の可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *PLA* 遺伝子と植物ホルモンとの相互作用の解析

pla 変異体に様々な植物ホルモンの添加処理を行ない、その時の反応を調査すると共に、各変異体内の植物ホルモン量を定量する。また植物ホルモン処理時における遺伝子発現

の変化を調査する。

(2) *PLA* 遺伝子経路に関わる遺伝子の解析と作用機構の解明

pla 変異体と逆の表現型を示す *pre* 変異体の遺伝子単離と詳細な発現解析を行う。また、*pre* 変異体での葉間期関連遺伝子の発現解析を行なう。これまで葉間期制御に関わっていると考えられている遺伝子 (*AP01*, *AP02*, *OsSPL*, *miR156*) における変異体との遺伝学的解析を行ない、*PLA* 遺伝子経路における役割を明らかにする。

(3) *PLA* 遺伝子の発現改変による形態変化の解析

PLA1、*PLA2* 遺伝子のコピー数を増やすことによって、それぞれの過剰発現体を作成し、表現型を観察する。また二重過剰発現個体も作成し、その効果を検証する。

4. 研究成果

(1) *PLA* 遺伝子とジベレリンとの相互作用の解析

pla 変異体では葉間期の短縮以外にも、草丈や葉の短縮など植物ホルモンとの関係が示唆される表現型を示す。また、各種植物ホルモンを定量したところ、複数の植物ホルモン量に変動が見られた。そこで、各種の植物ホルモンに対する *pla* 変異体の応答性を調べた。その結果、*pla* 変異体ではジベレリンに対する応答性が弱まっており、*PLA* 遺伝子とジベレリンとの関連性が示唆された(図1)。

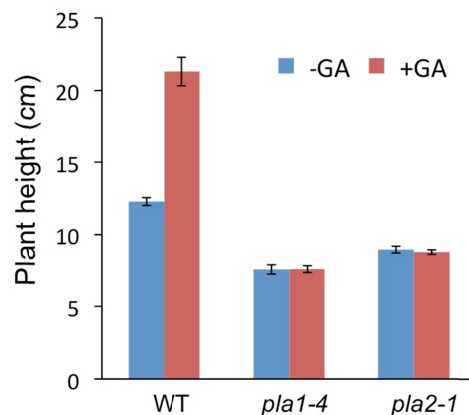


図1 ジベレリン処理による *pla* 変異体の草丈の変化

ジベレリンは野生型では茎や葉の伸長が促進されるが、*pla* 変異体ではジベレリン処理による葉の伸長が抑えられた。さらに、ジベレリン処理によって *PLA1* と *PLA2* の発現量は上昇し、ジベレリンの合成阻害剤処理では低下することが明らかとなった(図2)。

また、葉が過伸長するジベレリン恒常的応答性変異体 *slender rice 1 (slr1)* では、*PLA1* と *PLA2* の発現が上昇し、矮性の表現型を示すジベレリン低感受性変異体では *PLA1* と *PLA2* の発現レベルが低下した。これらの結果から、ジベレリンの情報伝達経路の下流で *PLA* 遺伝子の発現が制御されていることが示

唆され、このことは *slr1* 変異体と *pla* 変異体の二重変異体による遺伝学的解析によっても裏付けられた。これらの解析から、ジベレリンによる葉の伸長には *PLA* 遺伝子が部分的に必要であり、ジベレリンの情報伝達の下流で *PLA* 遺伝子が機能していることが明らかとなった。

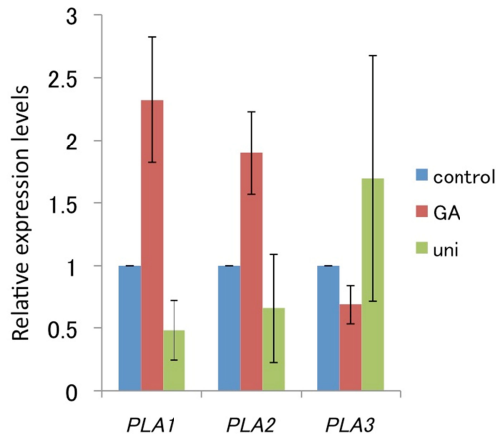


図2 ジベレリン、ウニコナゾール処理による *PLA* 遺伝子の発現変化

(2) *PLA* 遺伝子の過剰発現体の解析

PLA 遺伝子の機能をさらに詳細に明らかにするため、遺伝子コピー数を増やした *PLA1*、*PLA2* の過剰発現体 *PLA1* High-Copy (*PLA1HC*) と *PLA2HC* を作成した。栄養成長期におけるこれらの表現型を調査したところ、*PLA1HC*、*PLA2HC* とともに葉のサイズが大きくなると同時に、葉間期が長くなり、葉の枚数は少なくなった。また、*PLAHC* における第3葉の生長過程を調べたところ、野生型と比べて生长期間が長くなっていった。したがって、*PLAHC* では葉が成熟するまでの期間が長くなっており、それに伴い葉のサイズが増大すると考えられた。これらの結果から、栄養成長期における *PLA* の過剰発現は *pla* 変異体と逆の効果を示すことが明らかになった (図3)。



図3 *PLA1*、*PLA2* 過剰発現体の葉のサイズ、葉間期への影響

PLAHC の生殖成長期における表現型を調査

したところ、一次枝梗数と籾数が野生型と比べて減少していたが、稈長、穂長、種子サイズ、20粒重は野生型と比較して大きくなっていった。このことは、*PLA* 遺伝子の発現量の制御することによって、種子などの器官サイズの改変が可能であることが示された。

更に *PLA1HC* と *PLA2HC* を交配した二重過剰発現体を作成し、両方の遺伝子発現の増大が植物体に与える影響を調べたところ、葉のサイズの更なる増大と葉間期の延長が認められた。従って、*PLA1*、*PLA2* の発現量の増大により、葉のサイズが相加的に増大することが判明した。

(3) 葉間期制御に関わる遺伝子の同定と遺伝的相互作用

イネでは *pla* 変異体の他にも葉間期に異常が見られる変異体が複数同定されている。転写因子をコードする *OsSPL14* 遺伝子の過剰発現体は葉間期が延長する表現型を示し、*OsSPL14* を抑制するマイクロRNAの一つ *miR156* の過剰発現体では逆に葉間期が短縮する。また *aberrant panicle organization1* (*apo1*)、*apo2* 変異体は *pla* 変異体と同様に葉間期が短縮する。しかし、これまで葉間期が延長する変異体は同定されていない。

本研究で新たに葉間期が延長する *precocious* (*pre*) 変異体を同定した。*pre* 変異体は栄養生长期で葉間期が長くなり、葉のサイズが大きくなった。このことから *PRE* 遺伝子は *PLA* 遺伝子とは逆の機能を持っていると考えられた。マップベースクローニングにより *PRE* 遺伝子は植物ホルモンであるジャスモン酸の合成に関わる遺伝子であることが明らかとなった。このことからイネにおいてジャスモン酸が葉間期、葉のサイズの制御に関わることが新たに示唆された。

続いて、*PLA1*、*PLA2* 遺伝子と *SPL*/*miR156* 遺伝子との関係を調べるために、*OsSPL14* と *miR156* の発現量を *pla* 変異体で調査した。その結果、*pla1*、*pla2* 単独の変異体では *OsSPL14* の発現量はやや減少していたが、*pla1/pla2* 二重変異体の発現量は相加的にそれぞれ単独の変異体よりも減少していた (図4)。

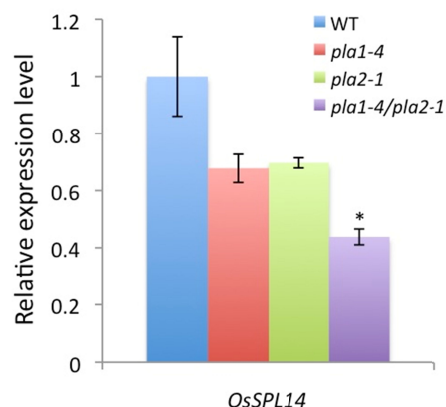


図4 *pla1*、*pla2*、*pla1/pla2* 変異体における *OsSPL14* 遺伝子の発現

一方で、*miR156* の発現量の増加は、*pla2* 変異体と *pla1/pla2* の二重変異体間で変化がなかった。これらの結果から、*PLA1* は *miR156* とは独立に、*PLA2* は *miR156* を介して *OsSPL14* の発現制御に関わっていることが推測された。

これらの解析から *OsSPL14* が *PLA1* と *PLA2* の下流因子であることが示唆されたため、*pla1*、*pla2* 変異体と *OsSPL14* 遺伝子の過剰発現体の二重変異体を作成した。これらの二重変異体では、*pla* 変異体の表現型を完全に回復させることはなかったが、葉のサイズや葉間期などの *pla* 変異体の表現型を部分的に回復させた。また、*OsSPL14* 以外の *OsSPL* 遺伝子も *pla* 変異体で発現が減少しており、*OsSPL14* の過剰発現の効果が部分的になった原因は、他の *OsSPL* 遺伝子の発現が低下しているためだと考えられた。以上の結果から、イネの葉間期制御において *OsSPL14/miR156* が *PLA1* と *PLA2* の下流で部分的に関わっていることが示された。

更に、*PLA* 遺伝子と *APO* 遺伝子の遺伝的相互作用を解析した。*apo* 変異体は *pla* 変異体と同様に葉間期が短くなることが知られている。*pla1/apo1*、*pla2/apo1*、*pla1/apo2*、*pla2/apo2* の4種類の二重変異体を作成したところ、いずれの二重変異体も単独の変異体より葉の長さが短く、葉の枚数は多くなる相加的な表現型がみられた(図5)。これらのことから、*APO* 遺伝子は *PLA* 遺伝子とは独立の経路で葉間期を制御していることが示唆された。



図5 *pla1/apo1* 二重突然変異体の表現型

これらの研究によって、イネにおける葉間期制御の遺伝的ネットワークの一端を明らかにした。イネ葉間期制御には *PLA1*、*PLA2*、*APO* 等の遺伝子が関与することが知られていたが、更にジャスモン酸の生合成経路に関わる *PRE* 遺伝子がイネの葉間期を負に制御することが明らかとなった。また、*PLA1*、*PLA2* 遺

伝子はジベレリンによって発現が誘導され、そして下流の *OsSPL* 遺伝子の発現をそれぞれ異なる経路で制御することによって葉間期を調節していると考えられた。さらに、*APO* 遺伝子は *PLA* 遺伝子とは独立に葉間期を制御することも明らかになった。過剰発現体の解析からは、*PLA* 遺伝子は器官サイズや数の決定に関与しており、その発現量を制御することによって、葉や種子のサイズ、数といった植物の形態形質を改変できる可能性が示唆された。

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10件)

. Mimura M and Itoh J (2014) Genetic interaction between rice PLASTOCHRON genes and the gibberellin pathway in leaf development. RICE 7:25. 査読有 doi:10.1186/s12284-014-0025-2

. Yoshikawa T, Ito M, Sumikura T, Nakayama A, Nishimura T, Kitano H, Yamaguchi I, Koshiba T, Hibara K, Nagato Y, and Itoh J (2014) The rice FISH BONE gene encodes a tryptophan aminotransferase, which affects pleiotropic auxin-related processes. Plant J. 78: 927-936. 査読有

. Akiba T, Hibara KI, Kimura F, Tsuda T, Shibata K, Ishibashi M, Moriya C, Nakagawa K, Kurata N, Itoh JI, Ito Y (2013) Organ fusion and defective shoot development in oni3 mutants of rice. Plant & Cell Physiol. 55: 42-51. 査読有

. Sato Y, Namiki N, Takehisa H, Kamatsuki K, Minami H, Ikawa H, Ohyanagi H, Sugimoto K, Itoh J, Antonio BA, Nagamura Y. (2013) RiceFRIEND: a platform for retrieving coexpressed gene networks in rice. Nucleic Acids Res. 41: 1214-1221. 査読有

. Yoshikawa T, Ozawa S, Sentoku N, Itoh JI, Nagato Y, Yokoi S (2013) Change of shoot architecture during juvenile-to-adult phase transition in soybean. Planta, 238, 229-237. 査読有

. Hibara, K-I., Hosoki, W., Hakoyama, T., Ohmori, Y., Fujiwara, T., Itoh, J-I. and Nagato, Y. (2013). ABNORMAL SHOOT IN YOUTH, a homolog of molybdate transporter gene, regulates early shoot development in rice. Amer. J. Plant Sci. 4:1-9. 査読有

. Yoshikawa T, Eiguchi M, Hibara KI, Itoh JI, Nagato Y. (2013) Rice SLENDER LEAF 1 gene encodes cellulose synthase-like D4 and is specifically expressed in M-phase cells to regulate cell proliferation. J Exp Bot. 64: 2049-2061. 査読有

. Itoh, J.I., Hibara, K., Kojima, M., Sakakibara, H., and Y. Nagato. (2012) Rice DECUSSATE controls phyllotaxy by affecting the cytokinin signaling pathway. Plant J. 72, 869-881. 査読有

. Nosaka, M., Itoh, J.-I., Nagato, Y., Ono, A., Isiwata, A. and Sato, Y. (2012) Role of transposon-derived small RNAs in the interplay between genomes and parasitic DNA in rice. Plos Genet 8, e1002953. 査読有

. Mimura M, Nagato Y, Itoh J. (2012) Rice PLASTOCHRON genes regulate leaf maturation downstream of the gibberellin signal transduction pathway. Planta. 235:1081-9. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

. 伊藤純一、イネの発生における凹凸形成の生物学的意義、日本植物学会シンポジウム、日本植物学会第 78 回大会、東京、2014 年 9 月 13 日

. 小林 久美子、桧原 健一郎、伊藤純一、長戸 康郎、頂端分裂組織の形態に異常を生じるイネ突然変異体 camel の表現型解析と遺伝子同定、日本育種学会、第 126 回大会、宮崎、2014 年 9 月 27 日

. DECHKRONG Punyavee, 伊藤 純一、Molecular dissection of rice leaf development in wild type and various morphogenetic mutants、日本育種学会、第 126 回大会、宮崎、2014 年 9 月 27 日

. 水野 泉、三村 真生、伊藤 純一、桧原 健一郎、葉や胚のサイズを制御する CYP78 の基質同定を目指して、日本育種学会、第 126 回大会、宮崎、2014 年 9 月 27 日

. 島野 里美、桧原 健一郎、伊藤 純一、地上部に多面的な異常を示すイネ mkb3 変異体の解析、日本育種学会、第 126 回大会、宮崎、2014 年 9 月 27 日

. 三村真生、長戸康郎、伊藤純一 イネの葉間期制御に関わる遺伝子の遺伝的相互作用 日本育種学会 第 125 回講演会 東北大学 2014 年 3 月 21-22 日

. M.Mimura, Y. Nagato, J. Itoh. Rice PLASTOCHRON genes regulate organ size and act downstream of the gibberellin signaling pathway. 7th International Rice Genetics Symposium, Manila, Philippines, 2013/11/05-08

. 三村真生、Luo Le、経塚淳子、長戸康郎、伊藤純一 イネの葉間期制御における PLASTOCHRON 遺伝子と OsSPL 遺伝子との関係 日本育種学会第 123 回講演会 東京農業大学 2013 年 3 月 27-28 日

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/pbg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：