

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658293

研究課題名(和文) イネの分げつ数を決める糖代謝遺伝子の解析と分げつ制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of a gene for sugar metabolism, which is involved in outgrowth of the second tillers

研究代表者

島田 浩章 (Shimada, Hiroaki)

東京理科大学・基礎工学部・教授

研究者番号：70281748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：分げつの欠如の表現型を示すイネのmoc2変異の原因遺伝子は糖代謝の重要な酵素であるフラクトース・ビスリン酸化酵素遺伝子の変異であった。植物体内の糖代謝は植物バイオマス生産性に大きく関与すると考えられたため、糖代謝に関わるその他の遺伝子発現と分げつとの関連を調べた。糖代謝に関わる重要な酵素であるショ糖合成酵素やこの活性を制御するプロテインキナーゼ遺伝子の発現を抑制した場合には分げつ数には影響が現れず、貯蔵デンプンの合成が抑制された。この結果から、ショ糖合成酵素の活性は植物のシンク機能に大きく関わるが、分げつには影響を与えないことがわかった。

研究成果の概要(英文)：We characterized a rice monoculm mutant moc2, which showed significantly reduced tiller numbers, pale-green leaves, a reduced growth rate, and a consequent dwarf phenotype. The gene responsible for the moc2 mutant was mapped to a locus encoding cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase 1 (FBP1). Reverse-transcription PCR for the FBP1 gene amplified a shorter transcript from the moc2 mutant than from the wild-type plant. The moc2 mutant showed a very low level of FBPase activity, suggesting that it involves a loss-of-function mutation of FBP1. Cytosolic FBPase is considered a key enzyme in the sucrose biosynthesis pathway. Defective FBPase activity is anticipated to lead a shortage of sucrose supply, which probably causes the inhibition of tiller bud outgrowth in the moc2 mutant. The monoculm phenotype of the moc2 mutant supports the idea that sucrose supply may be an important cue to outgrow tiller buds.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：糖代謝 分げつ 果糖リン酸化酵素 イネ

1. 研究開始当初の背景

単子葉植物は通常分げつによって形成された多くの茎を持つ。単子葉植物であるイネは、熱帯から温帯アジアを中心に栽培されている世界で最も重要な穀物の一つである。イネの茎は基部の節間にある分げつ芽から分岐する。イネの分げつは栄養成長期に起こり、最終的には 10 本を越える茎ができる。それぞれの分げつが穂を持つため、分げつ数は一般的に穀物の生産量を決定する農業形質の一つである。

イネの分げつの形成過程は以下の 2 段階に分かれる。葉腋における腋芽の形成とその後の分げつ芽の成長がある。腋芽の成長は、多くの遺伝子や環境要因によってコントロールされている。これまでに、分げつが抑制された多くの突然変異体が見つかっておりこれらについて詳しく調べられている。イネの *MONOCULM1* (*moc1*) 変異体は、分げつ芽の形成が欠損しているため主稈のみで分げつが生じない。この原因遺伝子は、GRAS ファミリー核タンパク質をコードする転写因子で、腋芽で主に発現し、腋芽の形成とその成長に関わる。

ストリゴラクトンは、イネの腋芽の成長を抑制する働きがあることが示されている。ストリゴラクトン生合成の変異体では、分げつ数に変化が生じる。*FINE CULM1* (*FC1*) は、ストリゴラクトンの下流の転写因子として作用する。分げつが減少するイネの突然変異体の原因遺伝子である *RCN1* は ATP 結合型 G タンパク質で、ストリゴラクトンのシグナル経路として知られている *D3* と無関係に分げつ制御に作用することが知られている。小麦の分げつ減少変異体 *tin* は、初期の分げつ芽の成長を抑制する。*tin* 変異体の分げつ芽におけるショ糖量は減少することが知られている。分げつ芽の成長とショ糖量が関連することが示唆されている。

分げつに関わる遺伝子は、いくつも発見されている。しかし、分げつの分子機構には *MOC1* やストリゴラクトンだけでは説明できない未解明な部分が多く残っている。

2. 研究の目的

「分げつの欠如」の表現型を示すイネの *moc2* 変異の原因遺伝子は、糖代謝の重要な酵素である fructose bis-phosphatase 1 の変異であった。糖代謝の異常が分げつの欠如をもたらしたと考えられるため、この変異体で起こっている事象を詳細に解析し、分げつに関わる代謝経路を明らかにする。さらに、この変異体で発現量が変化している形態形成や転写制御等の関連遺伝子を抽出し、その機能を調べることで「分げつの制御の分子機構」を明らかにする。

3. 研究の方法

イネは「分げつ」することにより茎数が増える。「分げつ数」は穂数を決定する重要な要素であり、イネの生産性に関わる重要な形質である。イネの *moc2* (*mono-culm 2*) 変異体は分げつ数が極端に減少する変異体である。この変異体は分げつせず 1 本の主茎のみで成熟する。この変異体は出穂期が野生型より数日間遅れるが正常な形態の種子が得られる。

この変異の原因遺伝子をマップベース・クローニング法により単離・同定したところ、細胞質 fructose bis-phosphatase 1 遺伝子 (*FBP1*) にレトロトランスポゾンである *Tos17* が挿入していることが明らかとなった。*FBP1* 遺伝子に関する変異体は *moc2* の他に複数の *Tos17* 挿入変異体が存在するが、*moc2* 変異体を含め、これらの変異体では *FBPase* の機能が失われていることが示唆された。

ところが、*moc2* 以外の *FBP1* 変異体は、いずれの場合でも劣性ホモ個体は致死となる。しかし *moc2* だけが致死とならず、分げつ数が減少する表現型を示す。*FBPase* は糖代謝における中軸的な役割を果たす重要な酵素である。なぜこの遺伝子の変異体である *moc2* 変異体だけが致死とならず、分げつ数が減少するのかを詳しく解析したい。また、この遺伝子と相互作用する因子を解析することで「分げつ制御」の分子機構を明らかにしたい。

4. 研究成果

1. *moc2* 変異体の表現型

moc2 変異体は、イネ培養変異によって生じた変異体から単離した。*moc2* 変異体は、高温条件 (明期 33 暗期 28) の下で育成すると、分げつする個体があった。しかしながら、通常の条件 (明期 28 暗期 24) での *moc2* 変異体は、分げつ数が減少し主稈のみが成長した (図 1)。

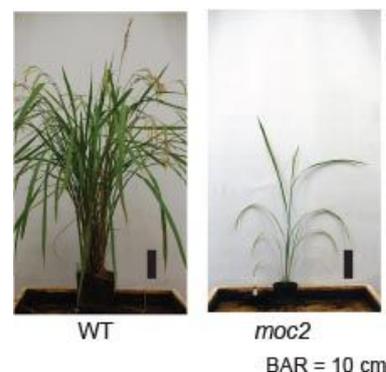


図 1 . *moc2* 変異体の形態

野生型イネである日本晴と *moc2* 変異体の分げつに関する表現型の比較を行った。分げつ数の測定は、日本晴および *moc2* 変異体のそ

それぞれ 10 個体について開花後約 2 週間目頃の穂数の平均値を調べた。その結果、*moc2* 変異体は、調べた 10 個体のうち 1 個体のみ分けつが見られたが、残りの 9 個体は分けつが認められず、大幅に分けつ数が減少することが分かった。日本晴では、平均分けつ数は 8.4 本、*moc2* 変異体は 1.1 本であった。野生型イネに比べて *moc2* 変異体の草丈は低くなった。播種後 30 日目までの栄養成長期には草丈の差は約 15 cm に広がった。しかし、開花日数には変化は認められなかった。*moc2* 変異体は、自家受粉によって正常な形態の種子を突らせた。しかしながら、*moc2* 変異体の穂は、野生型イネよりも小さな穂をしていた。*moc2* 変異体は、稔実率や発芽率はほぼ 100% であった。*moc2* 変異体で起きている分けつ抑制が発達段階のどこの異常により生じているかを調べるために、基部節間部の分けつ芽付近の組織切片を観察した。その結果、*moc2* 変異体でも日本晴と同様の分けつ芽の形成が起こっていた。これらのことから *moc2* 変異体は、分けつ芽は形成されるが、その伸長が抑制された変異体であることが示唆された。

2. *moc2* 遺伝子のマッピング

moc2 の遺伝子座を同定するために、ゲノムのマッピングを行った。*moc2* 変異体 (日本晴) とインディカ種のカサラスと掛け合わせて F1 個体を得た。F1 では全て野生型の表現型を示した。次に自家受粉により F2 個体を得、さらにこれらを自殖して約 6000 個体の F3 種子を得た。これらを栽培したところ、F3 では野生型の表現型と *moc2* の表現型を示す個体が 3:1 に分離した。このことから、この変異は 1 遺伝子座の変異であることが示唆された。

これらの F3 のうちで、*moc2* の表現型を示す劣性ホモ系統を選抜し、得られた 1289 個体からゲノム DNA を抽出した。この DNA を用いて、既存の分子マーカーを用いて PCR による網羅的な連鎖分析を行った。DNA マーカーによる解析の結果、*moc2* 変異体の原因遺伝子は第 1 染色体の 140cM から 160cM 付近に座乗することが分かった。

さらに、DNA マーカーを用いて詳細なマッピングを行った結果、*moc2* 変異体の原因遺伝子は、P0505D12-58k と P0505D12-3 の DNA マーカーの間約 82kbp にあることが判明した。そこで、*moc2* 予想領域内であると予想される日本晴の遺伝子を検索したところ 11 個の遺伝子の存在が予想された。そこでこれらの遺伝子の発現量について解析を行った。

moc2 変異体と野生型イネにおけるこれらの遺伝子の発現量を調べたところ両者の間で Os01g0866400 遺伝子 (細胞質型フルクトース 1,6 ビスフォスファターゼ (*FBP1*)) の転写産物に明白な違いを発見した。

3. *moc2* 突然変異体の原因遺伝子の決定

moc2 変異体の Os01g0866400 遺伝子 (*FBP1*) の塩基配列を決定したところ、この遺伝子に、Tos17 レトロトランスポゾンの挿入が見つかった。*FBP1* に対応する完全長 cDNA は GenBank に AK119536 として登録されていた。この遺伝子は、12 エキソンから構成されていた。*moc2* 変異体では、第 4 エキソンに Tos17 の挿入があった (図 2)。そこでこの Tos17 の挿入の有無と表現型との連鎖を調べたところ、*moc2* の表現型を示す F3 個体の全ての *FBP1* にレトロトランスポゾンの挿入があった。一方、*moc2* の表現型を示さない個体の *FBP1* は、レトロトランスポゾンの挿入が認められないか、片方の遺伝子のみで挿入があるヘテロ接合体であることが分かった。この結果は、突然変異体遺伝子と変異型の表現型が連鎖していることを示し、この遺伝子が *moc2* 変異体の原因であることを強く示唆した。また、*FBP1* が *moc2* 変異の原因遺伝子かどうかを同定するために、日本晴より *FBP1* の cDNA を取得し、これを CaMV 35S プロモーターにつないで *moc2* 変異体に導入した。その結果、得られた形質転換体イネでは分けつ数が増加することが見出された。このことから、*FBP1* を導入することにより *moc2* 変異が相補されることが明らかになった。

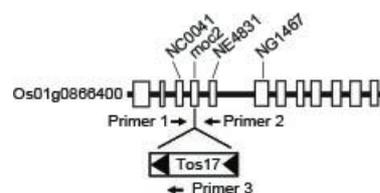


図 2 . *moc2* 変異体における Tos17 挿入部位

4. *moc2* 変異体の転写産物

moc2 変異体における *FBP1* の転写産物を調べたところ、レトロトランスポゾンが挿入された遺伝子では第 4 エキソンが抜ける異常なスプライシングが起こり、第 3 エキシソンの次に第 5 エキソンが結合されていた。これにより、*moc2* 変異体では野生型よりも 62 塩基短い *FBP1* の転写産物が生成されていることが分かった (図 3)。また、これにより、第 5 エキソンとの結合部位でフレームシフトが起こり、第 5 エキソン領域内で新たな終止コドンが生じた。この変異により *FBP1* の機能に障害を生じていることが強く示唆された。

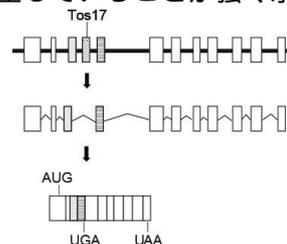


図 3 . *moc2* 変異体におけるスプライシング異常

5. *FBP1* 遺伝子の突然変異体の解析

すでに報告されている *FBP1* 遺伝子の変異体では激しい成長遅延が生じる。他の *FBP1* 遺伝子突然変異体を調べたところ、これらは第3エクソン、第5エクソン、第6エクソンに *Tos17* が挿入されていた。これらの変異体は不稔であった。これらの変異体は、激しい成長遅延を示し、栄養成長期初期で致死性を示した。 *moc2* 変異体とこれらの変異体の *FBP1* 遺伝子の転写産物を調べたところ、 *moc2* 変異体では野生型より短い転写産物を示したが、他の変異体では転写産物は検知されなかった。葉における *FBPase* 活性を調べたところ、これらの変異体は低い *FBPase* 活性を示した。しかし *moc2* 変異体は、NC0041 の約2倍の *FBPase* 活性を示した。

6. *moc2* 変異体におけるショ糖の解析

分けつ数が減少する小麦の *tin* 変異体では、分けつ芽のショ糖量が減少し、ショ糖により誘導される遺伝子の発現量は抑制され、ショ糖欠乏により誘導される遺伝子の発現量が上昇する。 *moc2* 変異体におけるショ糖合成への影響を調べるために、これらの変異体のイネのホモログ遺伝子の発現量を測定した。その結果、 *moc2* 変異体におけるショ糖により誘導される遺伝子 (*Os06g0265000*) は、野生型の5分の1ほどの発現量だった。葉における糖とデンプン量を測定したところ、 *moc2* 変異体のショ糖量は野生型に比べ著しく減少していた。これらの結果から、ショ糖の不足が *moc2* 変異体に生じていることが示唆された。

7. 分けつ関連遺伝子の発現量

FBP1 遺伝子の突然変異による既知の分けつ関連遺伝子への影響を調べた。 *MOC1* 遺伝子は、 *moc2* 変異体において野生型より高い発現量が見られた。ストリゴラクトンに関係する *HTD1*、*D10* および *D3* について調べたところ、 *moc2* 変異体では *HTD1* の発現量が野生型に比べ高かった。しかし、他の遺伝子の発現量に違いは見られなかった。さらに、*RCN1* と *TB1* の遺伝子の発現量を測定したが、これらの発現量の変化は野生型に比べ大きく変化していなかった。一方、*HTD1* が大きく変動していることが分かった。

8. 考察

イネの分けつ欠損変異体である *moc2* 変異体は、黄緑色の葉、矮性の特徴をもっていた。これらの特徴は *moc1* 変異体と同様であった。しかし、 *moc2* 変異体は、 *moc1* 変異体と異なり分けつ芽を形成した。 *moc2* 変異体は、 *MOC1* 遺伝子の発現も確認された。これらのことは、 *moc2* 変異体の分けつ芽の成長抑制が分けつ欠損変異の原因であることを示唆する。 *moc2* 変異体の原因遺伝子は、 *FBP1* 遺伝子であった。 *moc2* 変異体の *FBP1* 遺伝子

子は、第4エクソンに *Tos17* が挿入されていた。この挿入により、ミスプライミングが起こり、正常な *FBP1* が生成されないことが予想された。イネの *FBPase* には3つのアイソザイムがあり、主として *FBP1* が機能している。 *moc2* 変異体の微量な *FBPase* 活性はこれらのアイソザイムによるものと考えられた。

細胞質型の *FBPase* は、トリオースリン酸からショ糖への最初の不可逆反応を触媒しているショ糖合成経路の重要な酵素である。細胞質型の *FBPase* 活性の減退により、ショ糖合成系の抑制、リン酸中間体の蓄積、光合成の抑制などの影響があると報告されている。 *moc2* 変異体では、ショ糖により誘導される遺伝子の発現量が著しく減少していた。また、ショ糖の著しい減少も検知された。このことから、不完全な *FBPase* 活性がショ糖不足につながることを示す。したがって、 *moc2* 変異体は、不完全な *FBPase* 活性によるショ糖低下が分けつ芽の成長を抑制していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

1. T. Koumoto, H. Shimada et al. Rice monoculm mutation *moc2*, which inhibits outgrowth of the second tillers, is ascribed to lack of a fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Biotechnol.* 30, 47-56 (2013). (査読あり) DOI: 10.5511/plantbiotechnology. 12. 1210a

〔学会発表〕(計 4件)

1. 藤巻秀、島田浩章他。ポジトロンイメージング技術を用いたシロイヌナズナのソース・シンク能力の可視化。日本土壌肥料学会2014年度大会。2014.9. 東京農工大
2. 中島惇、島田浩章他。イネ胚乳の品質管理に関わる因子の解明。第36回日本分子生物学会年会。2013.12. 神戸国際会議場
3. T. Sasaki, H. Shimada et al. Expression analysis of Brachypodium genes involved in the sucrose metabolic pathway. 1st Intl. Brachypodium Conference, 2013.7, Modena, Italy
4. 弘中文字子、島田浩章他。ブラキポディウムを用いた糖代謝の初期反応を触媒する酵素遺伝子の発現解析。理研・若手研究会「新規材料創製を目指した合成生物学」。2012. 11. 理研 (和光)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 浩章 (SHIMADA Hiroaki)
東京理科大学・基礎工学部・教授
研究者番号: 70281748