

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650102

研究課題名(和文)種子からの花芽分化抑制シグナルの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms on inhibition of flower initiation in shoot apical meristems controlled by developing seeds

研究代表者

金井 雅武(KANAI, Masatake)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・特別協力研究員

研究者番号：30611488

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)：花の数と種子生産量には正の相関があり、花の数を増大させることで作物の種子生産性の増大に貢献する。本研究は未解明である、種子形成の開始を茎頂分裂組織へ伝え、花原基分化を抑制する仕組みに着目した。変異体スクリーニングにより、側枝の花の数が増大している変異体を選抜し、その原因遺伝子を同定した。同定された3つの原因遺伝子は葉緑体分解に関わるものであり、これら遺伝子の欠損は野生株よりも葉の老化が遅れる表現型を示した。この結果から、花の数と個体の老化が密接に関係することを示す新規な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Plants produce flowers for seed formation. Increase of flower number improves seed yields of crop plants. This study focuses on the molecular mechanisms on inhibitory mechanisms of flower initiation in shoot apical meristems controlled by developing seeds. We screened three mutants increased flower number of lateral branches. These mutants were deficient in chloroplast degradation and showed a stay green phenotype. These results indicate that flower number is closely related to leaf senescence.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：花芽形成 種子 シグナル伝達 シロイヌナズナ 老化

1. 研究開始当初の背景

世界的な人口増加およびバイオ燃料の需要増大により、穀物の収穫量増大が求められている。穀物は植物の種子であり、種子生産に関わる研究から植物 1 個体あたりの花の数と種子生産量の間に強い相関があることが報告されている。これは花という種子を作る器官の数が最終的な種子の量を決定することを示唆している。花成制御に関する研究は盛んであり、茎頂分裂組織が葉原基を分化させて葉を茂らせる栄養成長期から花原基を分化させて花を作る生殖成長期への転換系が解明されつつある。一方、花の原基は生殖成長の茎頂分裂組織で作られるため、花の数は茎頂分裂組織で作られる花原基の数によって決まるが、花原基の数を制御する仕組みはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は植物における花の数を制御する機構の解明である。花は茎頂分裂組織で分化した花原基から作られるため、花原基の数により花の数が決定される。申請者はシロイヌナズナの不稔変異体を用いた解析から、受粉が成功して種子形成が開始されることを茎頂分裂組織に知らせるシグナルが存在すること、またそのシグナルが生殖成長期の茎頂分裂組織において花原基分化を抑制する機能を持つことを見出した(図1)。本研究では全くの未解明である、種子形成の開始を茎頂分裂組織へ伝え、花原基分化を抑制するシグナル(花芽分化抑制シグナル)の伝達系を解明する(図2)。これは植物における花の数を制御する仕組みの解明であり、また花の数を増大させることで植物 1 個体あたりの種子収穫量を増大させる植物の作出に貢献する。

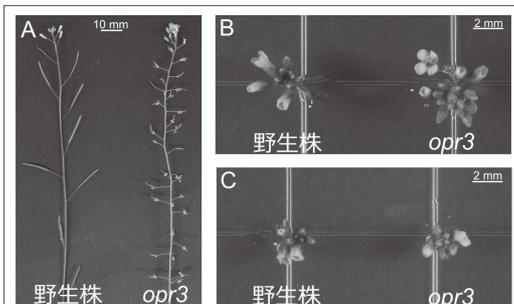


図1 雄性不稔であるopr3変異体における花原基の数  
A: 側枝、B: 側枝の茎頂分裂組織、C: 主茎の稔性を回復させた後に形成された側枝の茎頂分裂組織

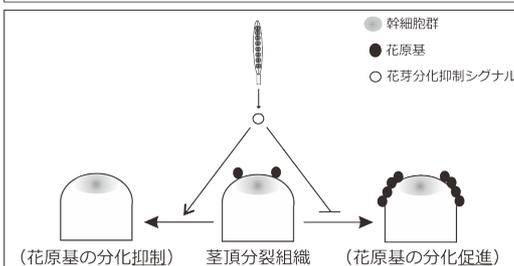


図2 花原基の数を制御する分子機構の予測モデル  
種子から未知の花芽分化抑制シグナル(O)が出され、生殖成長期の茎頂分裂組織での花原基分化を抑制する

3. 研究の方法

本研究の最終的な目標は生殖成長期の茎頂分裂組織における花原基の数を制御する機構の解明であり、これは種子から茎頂分裂組織への花芽分化抑制シグナル経路を明らかにすることである。そのために(1)花芽分化抑制シグナル経路に関わる遺伝子の網羅的検索、および(2)同定した遺伝子の機能を明らかにし、花芽分化抑制シグナルの経路解明することが必須である。

(1) 花芽分化抑制シグナル経路に関わる遺伝子の網羅的検索

花芽分化抑制シグナル経路は未知の機構であり、手掛かりとなる情報がほとんど存在しない。そのため網羅的な探索が可能な変異体スクリーニングが最も近道であると考え(図3)。不稔性変異体であるopr3欠損変異体の種子に変異原処理を行い、ジャスモン酸塗布により稔性を回復させることで次世代種子を得る。これらはopr3の欠損に加え、他の遺伝子にランダムに変異が導入されたM2種子となる。このM2変異体種子を播種して、主茎が伸長するまで生育させる。生育した植物はすべてopr3の欠損を持つため不稔である。主茎にジャスモン酸を塗布することで主茎の稔性を回復させて種子からの花芽分化抑制シグナルを側枝の茎頂分裂組織に伝達させることで大多数の植物の側枝は花の数が少なくなる(図3B タイプ1)。しかし花芽分化抑制シグナルに関与する遺伝子に変異を持つ植物体ではシグナルが側枝の茎頂分裂組織に入力されず、側枝の花の数は多いまま維持される(図3B タイプ2)。このタイプ2の表現型を示す変異体を選抜し、その原因遺伝子を決定することで花芽分化抑制シグナル経路に関わる遺伝子の網羅的な同定が可能になる。

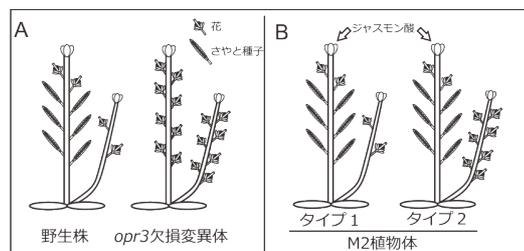


図3 花芽分化抑制シグナル欠損変異体のスクリーニング方法

A: 通常条件下で生育させた野生株とopr3欠損変異体  
通常条件下で野生株とopr3欠損変異体を生育させた場合、野生株の主茎には種子が形成され、種子から花芽分化抑制シグナルが出されるため側枝の花の数が少ない(A)。一方、opr3欠損変異体では受粉できないため種子が形成されず花芽分化抑制シグナルが出されないため花の数が多(A)。  
B: 選抜すべきM2植物体の表現型  
Aで示した表現型を利用して花芽分化抑制シグナルが欠損した変異体を選抜する。opr3欠損変異体種子を変異原処理して得たM2種子を播種し、主茎が伸長する直前まで生育させる。生育した植物の主茎にジャスモン酸塗布を行うことで稔性を回復させて種子を形成させる。主茎に種子を形成したM2植物の大部分は側枝の花の数が野生株と同程度まで減少するが(B、タイプ1)、花芽分化抑制シグナルに関与する遺伝子に変異をもつ植物体は主茎で種子形成されているにも関わらず側枝の花の数が多いため(B、タイプ2)。このタイプ2の表現型を示す植物体を選抜し、原因遺伝子を決定する。

## (2) 同定した遺伝子の機能

花芽分化抑制シグナルによって誘導される茎頂分裂組織での花芽分化抑制機構を明らかにする。このシグナル経路に必須と思われる、(1)で同定した遺伝子の機能解析を行うことで、花芽分化抑制シグナルの分子実体を解明し、植物はどのような仕組みで自らの花の数をコントロールしているかを明らかにする。

## 4. 研究成果

本研究は、花芽分化抑制シグナル経路に関わる遺伝子の同定(1)と同定した遺伝子の機能解析(2)により、未解明である花芽分化抑制シグナルの解明を目指すものである。

### (1) 花芽分化抑制シグナル経路に関わる遺伝子の同定

変異体スクリーニングにより、主幹に種子が形成された後も側枝の花芽の数が減少しない変異体を選抜した。約12000ラインから3つの変異体を選抜した。これらを *mfb* 変異体 (*many flowers in lateral branches*) とし、*mfb1*, *mfb2*, *mfb3* の原因遺伝子を決定したところ、*mfb1* の原因遺伝子は葉緑体に局在するタンパク質分解酵素をコードする遺伝子、*mfb2* では葉緑体に局在するクロロフィル分解酵素をコードする遺伝子、*mfb3* では葉緑体の発達を制御する転写制御因子をコードする遺伝子であった。

### (2) *MFB* 遺伝子の機能解析

側枝の花の数と *MFB* 遺伝子との関係を明らかにするために、*mfb1*, *mfb2*, *mfb3* 変異体の詳細な表現型解析を行った。同一条件下で生育させた野生株と、これら *mfb* 変異体の側枝の数、各側枝ごとの花の数を測定した。その結果、*mfb* 変異体では側枝の数が野生株と比べて有意に増加していた。

続いて、各側枝の花の数を数えたところ、野生株では後から形成された側枝ほど花の数が減少したのに対し、*mfb* 変異体では後から形成された側枝でも花の数が多いたことが確

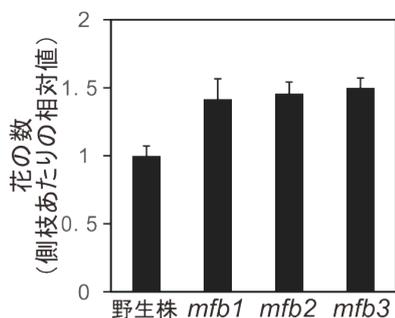


図4 *mfb*変異体における側枝の花の数

野生株と*mfb*変異体において、茎の基部付近に形成された側枝の第3番目の側枝の花の数を比較した。野生株を1としたときの相対値を示す。

認された。茎の基部付近から形成された第3側枝の花の数は野生株に比べて、1.5倍程度であった(図4)。

さらに、*mfb*変異体では1個体あたりの種子生産量が増加することも確認した(図5)。

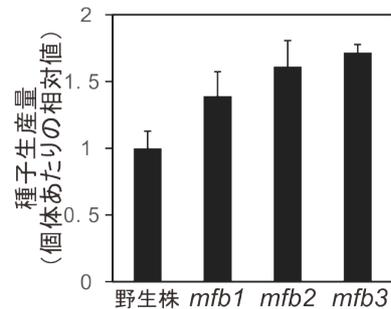


図5 *mfb*変異体における種子生産量

野生株と*mfb*変異体における1個体あたりの種子生産量を比較した。野生株を1としたときの相対値を示す。

加えて、この表現型解析の過程で *mfb1*, *mfb2*, *mfb3* 変異体はいずれも野生株と比べて老化が遅くなる Stay-green 表現型を示すことを見出した。野生株と *mfb* 変異体の発芽から枯死するまでの日数は、野生株では40日ほどであるのに対し、*mfb1*, *mfb2* 変異体では55日ほど、*mfb3* 変異体では65日ほどであった(図6)。

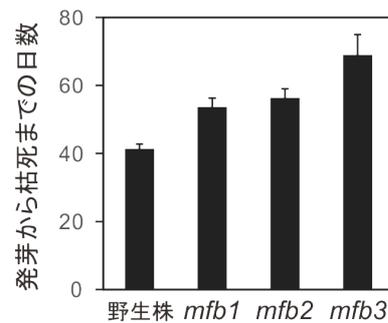


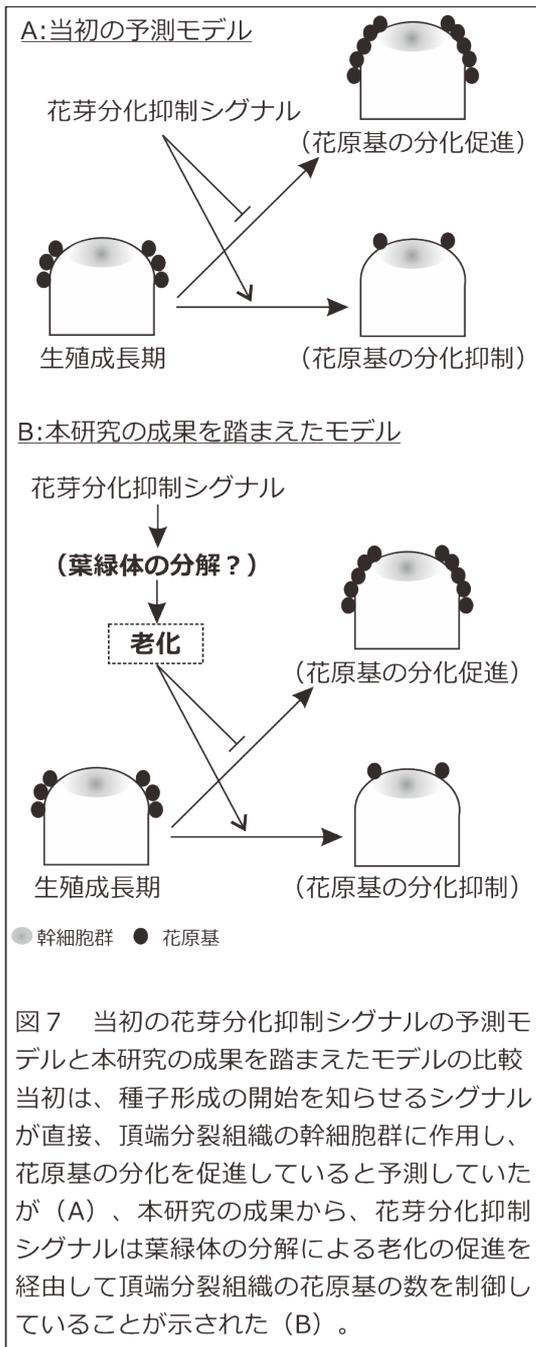
図6 *mfb*変異体における寿命

野生株と*mfb*変異体における発芽から枯死までの日数を比較した。

### (3) 考察

以上の結果から、*MFB* 遺伝子は個体の老化を正に制御する遺伝子であり、その欠損株である *mfb* 変異体は野生株よりも老化が抑制されることで、より長い期間緑色を維持することが可能となり、それに伴って側枝の本数および花の数が多くなっていることが示唆される。これは、側枝の花の数を制御する要因の1つが個体の老化状態であることを示している。一方で、これまでの研究から、種子が形成されない不稔変異体や、受粉直後に花を切除させることで種子の形成を阻害した野生株では、個体の老化が抑制されることを確認している。これは、個体に種子が形成されることがシグナルとなり、その個体の老

化を促進させることを示唆している。当初考えていた花芽分化抑制シグナルは種子形成が開始されたことを知らせるシグナルが直接、頂端分裂組織に作用し、花芽分化を抑制していると考えていたが(図7A)、本研究の成果から、シグナルは直接、分裂組織に作用するのではなく、緑葉の葉緑体分解を促進することで個体の老化を促進し、老化により花芽分化を抑制することを明らかにした(図7B)。これは、植物にとって子供である種子を形成することと、自身の寿命の長さが密接な関係にあることを示しており、当初予測しなかった非常に興味深い結果を得た。



今回同定された *MFB* 遺伝子の欠損は老化を抑制し、植物を長い期間生育させることで、結果として種子生産性を高めていることが明らかとなった。植物における物質生産の源となるエネルギーは光合成からもたらされ

るものであり、光合成スピードを強化させて作物の生産性を高める試みは盛んに行われている。一方、本研究で初めて見出された葉緑体タンパク質である *MFB* の欠損による老化遅延とそれに伴う種子生産量の増大は、光合成スピードの強化ではなく、老化を抑制することで、光合成することのできる期間を延長させる。これは、作物の生産性を高めることを目指した新たな戦略の1つであり、応用研究につながる有用な知見となる。

## 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)

[学会発表](計 2件)

金井雅武、「シロイヌナズナ種子によるタンパク質製剤生産の検討」日本分子生物学会、2015年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

金井雅武、「シロイヌナズナ種子を用いた組換えタンパク質生産」日本分子生物学会、2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[図書](計 1件)

Masatake Kanai, Shoji Mano, Makoto Hayashi, and Mikio Nishimura, INTECH, "New Challenges in Seed Biology - Basic and Translational Research Driving Seed Technology", 2016年、印刷中。

[その他]

ホームページ情報:

<http://www.nibb.ac.jp/plantorganelles/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

金井 雅武 (KANAI, Masatake)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・特別協力研究員

研究者番号: 30611488