

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440158

研究課題名(和文) TCP転写因子を介した新しい植物の形態・機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Roles of TCP transcription factors in plant development

研究代表者

小山 知嗣 (Tomotsugu, koyama)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・研究員

研究者番号：90450668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、シロイヌナズナを用いて、葉の形態形成機構を明らかにするために、重複して働くTCP転写因子遺伝子の機能解析を行った。CINサブファミリーのTCP遺伝子では、マイクロRNA319の制御が重要となることから、miR319変異体を作成したところ、TCP遺伝子が活性化されるとともに葉の鋸歯形成が阻害された。一方、TCP遺伝子の変異体では葉の形態が複雑化した。さらに、クラスIサブファミリーのTCP遺伝子について5重変異体を作成したところ、葉の形態形成が阻害され、これらTCP転写因子の新たな機能を見出した。

研究成果の概要(英文)：This work investigated the gene regulatory mechanism of leaf development in *Arabidopsis thaliana*. The genetic analysis of miR319 and its target TCP gene families demonstrated the roles of these genes in the formation of leaf serrations and cotyledon boundary. Mutations in MIR319 genes inhibited the formation of leaf serrations and the cotyledon boundary in association with regulator genes of the boundary morphogenesis. In contrast, loss-of-function mutations in these TCP genes induced the formation of serrated leaves in addition to changes in the levels of their downstream gene expression. This work also found that quintuple mutant for class I TCP genes induced irregularity in its leaf form. Overall, combinations of mutations in TCP transcription factor genes in *Arabidopsis thaliana* generate various leaf forms.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物 葉 シロイヌナズナ TCP 転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

植物特異的 TCP 転写因子はシロイヌナズナゲノムに 24 個存在し、植物の形態形成と生長制御に重要であるとともに、穀物や園芸植物では有益な農業形質を発現させる有用遺伝子でもある。それらの変異体の表現型は、葉の形態形成のほかに、発芽阻害、腋芽休眠、根の伸長、サイトカニン応答、概日リズム、茎伸長、花粉の成熟等、多岐にわたるために、従来の研究では断片的な理解に留まっている。このような重要性にも関わらず包括的な理解が得られていない原因として、TCP 遺伝子がしばしば冗長性を示し、その変異体解析では、表現型は一部しか現れないためと考えられた。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では、シロイヌナズナ TCP 遺伝子の中で、キンギョソウ CINCINNATA に相同性が高い CIN like TCP の 8 遺伝子と、イネ PCF に相同性が高い class I TCP の 7 遺伝子の 2 つのサブファミリーに焦点を絞り、それら変異体の葉の形態や生理応答などの表現型解析を行うこととした。さらに、マイクロ RNA を含む TCP 遺伝子の発現調節と、TCP 転写因子の下流で働く遺伝子の発現解析を行い、葉の発生における TCP 転写因子ネットワークの解明を行うこととした。

### 3. 研究の方法

シロイヌナズナ変異体の多重変体の作成を行い、遺伝型の確認には、遺伝子特異的プライマーと T-DNA タグプライマーを適切に組み合わせ PCR を行った。遺伝子破壊株の場合は、RT-PCR による遺伝子発現の消失を確認した。

表現型の光学観察には実体顕微鏡 M205 stereomicroscope (Leica) を用い、サイズの定量は LAS AF software (Leica) を用いた。葉の老化指標であるクロロフィル含量の測定には、SPAD 502-devised (Konica-Minolta) を用いた。

遺伝子発現解析では、逆転写産物をリアルタイム PCR 装置 CFX96 real-time PCR system (Biorad) を用いて検出し、スタンダードカーブに対する相対値をハウスキープング遺伝子の値で補正した。

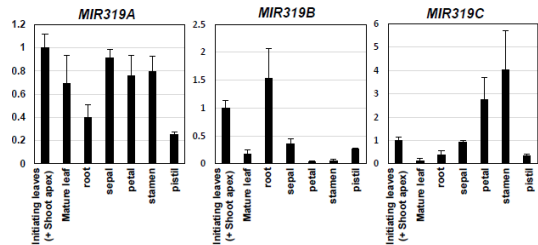
### 4. 研究成果

CIN like TCP 遺伝子の発現調節を行う miR319 の葉の形態制御における役割

シロイヌナズナゲノムに存在する 3 つの miR319 遺伝子の発現を RT-PCR 法を用いて解析した。その結果、MIR319A 遺伝子は各組織で比較的一様に発現し、MIR319B 遺伝子は栄養器官で発現量が高かった。一方、MIR319C 遺伝子は生殖器官で発現が高かつ

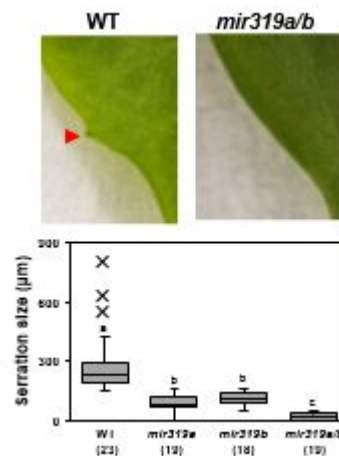
た (図 1)。よって、葉では MIR319A と MIR319B が主体となって働くと考えられた。

図 1、MIR319 遺伝子の発現解析



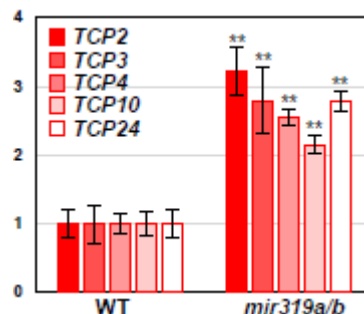
そこで、葉における miR319 の役割を明らかにするために *mir319a* と *mir319b* のシングルおよびダブル変異体 (*mir319a/b*) を確立した。その結果、シングル変異体ではそれぞれ葉の鋸歯形成が阻害され、ダブル変異体では縁形態がほぼ平滑化することが明らかとなった。(図 2)

図 2、miR319 変異体における葉の鋸歯形成の阻害 (上) と鋸歯サイズの定量 (下)



さらに、遺伝子発現解析から、*mir319a/b* 変異体では、その標的となる 5 個の TCP 遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。(図 3)

図 3、TCP 遺伝子の発現解析



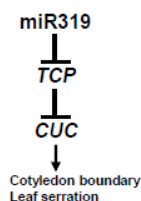
そこで、これまでに明らかとなっている TCP 転写因子の下流遺伝子の発現解析を行ったところ、*mir319a/b* 変異体では遺伝子発現変動を認め、標的遺伝子の活性化が認められた。逆に、間接的な標的である *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* 遺伝子群の発現の抑制も認められ、TCP 転写因子による *CUC* 遺伝子の発現制御という、従来の知見と一致する結果を得た。

*CUC* 遺伝子は鋸歯や子葉の間の「くびれ」形態を形成することが報告されているので、*miR319* と *CUC* 遺伝子の機能相関を明らかにするために、各シングル変異体を交配し、ダブル変異体を作成し、その「くびれ」形態について、表現型を解析した。その結果、*mir319a* と *mir319b* 変異体は *cuc* 変異体の作用を強め、子葉の間と鋸歯の「くびれ」形態形成を著しく阻害することを明らかにした。

これらの知見を発展させ、*miR319* による制御を受けない機能獲得型 *tcp-d* 変異体を用いて、TCP 遺伝子の過剰発現型の表現型解析を行ったところ、葉の鋸歯と子葉の間の「くびれ」形態形成が阻害された。さらに、*cuc* 変異体とのダブル変異体を作成したところ、*cuc* 変異体の異常を強調することが明らかとなった。

これらの解析から、*miR319* による制御が解除された場合に TCP 遺伝子が活性化されることが遺伝学的に示され、*miR319* は TCP 遺伝子の発現調節を行い、それら下流遺伝子の機能を介して、葉の形態形成を制御することが明らかとなった。さらにその制御系は *CUC* 遺伝子を抑制することにより、縁の平滑な構造を形成すると考えられる(図4)。

図4、本研究で明らかにした制御系



CIN-like TCP の多重変異体の解析  
 本研究で、新規に同定した CIN-like TCP 遺伝子変異体である *tcp17* 変異体、その二重変異体 *tcp13/17* および三重変異体 *tcp5/13/17* のいずれも、表現型の変化が認められなかった。重複遺伝子の作用のためと考えて、これまでに作成している CIN-like TCP 遺伝子の多重変体と適切に組み合わせて交配して、*tcp* 六重変異体を作成した。その結果、これまで構築してきた *tcp* 変異体シリーズの中で最も強く葉の形態が複雑に縮れることを明

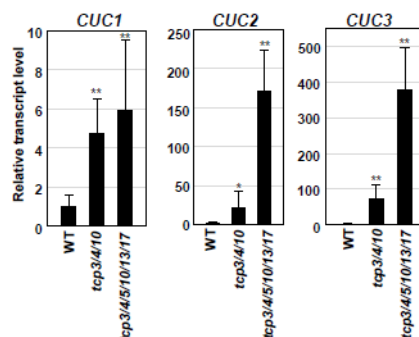
らかにした。(図4)つまり、これら TCP 遺伝子は平滑な葉を形成する機能があることが明らかとなった。

図4、*tcp* 六重変体の表現型



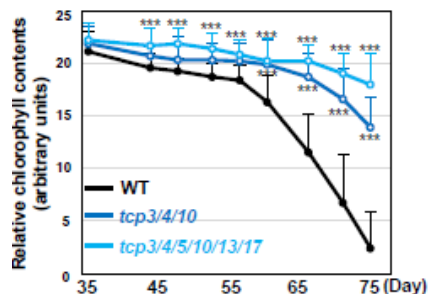
次に TCP 転写因子の下流遺伝子発現解析を行ったところ、*tcp* 六重変異体では、*CUC* 遺伝子群の発現が上昇することを明らかにし、期待通りに *mir319a/b* 変異体と逆の現象が認められた。葉の形態の複雑さは *CUC* 遺伝子の過剰発現によるものと考えられた。

図5、野生型と *tcp* 三重変異体、*tcp* 六重変異体の葉における *CUC* 遺伝子群の発現解析



さらに、葉の形態に認められるような TCP/*miR319* ファミリーによる段階的な制御が、葉の老化にも認められることを明らかにした。つまり、*tcp* 六重変異体では野生型と比較して、葉の老化遅延が認められ(図5)、逆に *mir319a/b* 変異体では、老化の促進が認められた。

図5、クロロフィル量を指標とした *tcp* 変異体における葉の老化遅延



これらの解析から、TCP 遺伝子は miR319 の制御を受け、葉の縁形態や老化など、葉の発生を制御することを遺伝学的に実証することができた。特に、遺伝子重複とマイクロ RNA を含む多層的な制御を活用して、段階的に葉の縁形態と老化を精密に制御する特徴を見出した。

#### Class I TCP 転写因子の解析

シロイヌナズナ class I TCP 遺伝子は葉で発現するものが多いが、従来報告されている遺伝子破壊株の表現型が弱いために、葉における役割は不明であった。この原因は、重複遺伝子が存在するために葉に大きな形態変化が現れないのではないかと考えた。この仮説と一致することとして、予備的な解析から、class I TCP 転写因子の機能を転写抑制ドメインによりドミナントに阻害した形質転換シロイヌナズナでは、葉や根に大きな形態異常が認められた。

そこで、遺伝学的な確証を得るために、シロイヌナズナ遺伝子破壊株の表現型解析を行ったところ、いずれの class I *tcp* 変異体も葉に大きな形態変化が認められなかった。さらに、class I *tcp* の多重変異体の構築を推進したところ、四重変異体までは正常な形態を示したが、五重変異体を作成した場合に、進展した葉で、平面構造を維持できない結果として特徴的な曲面構造を示すことが明らかとなった。また、この変異体の遺伝子発現解析を行ったところ、CIN-like TCP 遺伝子の発現量は野生型と似たレベルであることが明らかになった。つまり、この表現型は class I TCP 遺伝子群に特異的な異常であると考えられ、遺伝子重複のために従来は解析不能であった新規な形態変化を発見することができた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

・ Koyama T.

葉の凹凸形態形成の制御機構

BSJ review 6, 112-125. (2015)  
[http://bsj.or.jp/jpn/general/BSJ\\_Review6B\\_112-125.pdf](http://bsj.or.jp/jpn/general/BSJ_Review6B_112-125.pdf)

De Martinis D, Koyama T. Chang C,

Ethylene is all around.

Frontiers in Plant Science 6, 76 (2015)

doi: 10.3389/fpls.2015.00076

Koyama T.,

Roles of ethylene and transcription factors in the regulation of onset of leaf senescence.

Frontiers in Plant Science 5, 650 (2014)

doi: 10.3389/fpls.2014.00650

〔学会発表〕(計7件)

小山知嗣

Genetic analysis of miR319 and its target TCP transcription factors in leaf development of *Arabidopsis thaliana*

日本植物生理学会 2017 年 3 月 18 日

(鹿児島市・鹿児島大学)

久保田茜, 伊藤照悟, Shim Jae Sung, Johnson Richard, Song Yong Hun, Breton Ghislain, 小山知嗣, 高木 優, Pruneda-Paz Jose, Kay Steve, MacCoss Michael, 今泉 貴登

TCP4 は光周性花成経路において GIGANTEA 依存的に CONSTANS の転写を制御する

日本植物生理学会 2017 年 3 月 18 日

(鹿児島市・鹿児島大学)

Koyama T.,

A regulatory cascade involving transcription factors during leaf senescence.

The 8th International Symposium on Plant Senescence (招待講演、国際学会)

2016 年 11 月 1 日 (韓国・テジユ)

小山知嗣

miR319 とその標的である TCP 転写因子による器官形成の解析

日本植物細胞分子生物学会 2016 年 9 月 1 日

(長野県・上田市・信州大学)

Koyama T.,

Roles of ethylene and transcription factors in the regulation of leaf senescence

第 57 回日本植物生理学会シンポジウム (招待講演) 2016 年 3 月 19 日

(岩手県・盛岡市・岩手大学)

小山知嗣

葉の成長過程における凹凸の形成とその制御

第 78 回日本植物学会シンポジウム (招待講演)

2015 年 9 月 13 日 (神奈川県・川崎市・明治大学)

小山知嗣

TCP 転写因子による形態形成と機能制御機構の解析

日本植物細胞分子生物学会

2014 年 8 月 22 日 (岩手県・盛岡市・岩手県  
民情報交流センター)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.sunbor.or.jp/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

小山 知嗣 (KOYAMA Tomotsugu)  
公益財団法人サントリー生命科学財団・生物  
有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・  
研究員

研究者番号：90450668

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

佐藤文彦 (Fumihiko Sato)  
高木優 (Masaru Ohme-Takagi)