特 集 記 事

イネにおける葉の分化パターンの分子遺伝学的研究

伊藤純一

東京大学大学院農学生命科学研究科, 東京都文京区, 〒113-8657

Molecular genetics of leaf initiation pattern in rice

Jun-ichi Itoh

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

キーワード

イネ, 葉の分化パターン, 葉間期, 葉序, *plastochron* 変異体, *decussate* 変異体

1. はじめに

栄養生長期における植物の地上部は、葉の集合体である。従って、地上部の形は、葉の枚数、配置、形などの形質に大きく依存する。特に葉の分化パターン、すなわち葉の枚数や配置は植物の地上部の形を決める最も重要な要素である。葉の分化パターンは、葉の源である茎頂分裂組織 (Shoot Apical Meristem: SAM) において、葉原基が分化する時間と位置によって規定される。葉が分化する時間は葉間期 (plastochron) と呼ばれ、ある葉が分化してから次の葉原基が分化するまでの時間を指す。葉が分化する位置は葉序 (phyllotaxis) として記述可能であり、様々なパターンを示す葉序が知られている (後述)。

葉間期と葉序は異なる形質であり、それぞれ独立の制御機構が存在する。葉序については、その規則性を生み出す機構についての研究が、古くから多様な観点においてなされてきた。一方で、葉間期の制御機構に関しては発生学的、遺伝学的な知見はほとんど蓄積していなかった。このような背景のもと、本研究ではイネの変異体を用いて葉の分化パターン、すなわち葉間期と葉序の分子遺伝学的制御機構を明らかとすることを目的として解析を行った。

2. イネの葉間期を制御する *PLASTOCHRON* 遺伝子

古くから葉が多く分化するイネ変異体の存在は知られていた。葉の枚数は葉間期と直結する形質であり、これらの変異体は葉間期に異常を持った変異体と考えられるが、これらの詳しい発生遺伝学的研究は行われてこなかった。私たちは栄養生長期に葉が多く分化する特徴を持つ変異体を改めて収集し、これらを *plastochron* (*pla*) 変異

体と名付け、解析を行うこととした (図 1)。*pla* の表現型を発現する変異は後の研究から 3 つの独立な遺伝子座に由来することが明らかとなり、それぞれを *PLA1*, *PLA2*, *PLA3* とした。

最初に解析を行ったのは *pla1* 変異体である。*pla1* 変異体は栄養生長期を通じて短い葉を分化したが、生殖生長期に入るまでに分化した葉の数は、野生型の倍以上であった。このことから *pla1* 変異体は葉間期が短くなった変異体であり、*PLA1* 遺伝子は栄養生長過程で葉の分化を時間的に抑制している因子であると考えられた。葉が分化する場合は SAM であることから、まず SAM の形状、分裂活性を調査した。その結果 *pla1* の SAM は、栄養生長期のいずれのステージにおいても野生型よりも大きく、細胞分裂も活性化していた。このことから、葉間期制御には SAM の大きさや分裂活性の制御が重要であること

図 1. *plastochron* 変異体の栄養生長期の表現型
発芽後 3 週間目の表現型。左から、野生型, *pla1-4*, *pla2-1*, *pla3-1*。いずれの変異体も野生型に比べて多くの短い葉が分化している。

が明らかとなった (Itoh *et al.* 1998).

葉間期以外にも *pla1* 変異体ではユニークな表現型が観察される。それは生殖生長期において穂の代わりにシュートが形成することである。この異常は幼穂形成時に1次枝梗の原基がシュートの原基にホメオティックに転換した結果であることがわかった。従って *pla1* 変異体は、生殖生長期に栄養生長期の形質を発現する、ヘテロクローニクな変異体であると考えられた (Itoh *et al.* 1998)。

その後、*pla1* 変異体の原因遺伝子がマップベースクローニングによって単離され、植物に特有のチトクロム P450 ファミリーの一員をコードしていることがわかった。しかし、PLA1 に近縁なタンパクで機能がわかっているものではなく、どのような物質を基質としているかの情報は未だ得られていない。PLA1 遺伝子の発現を *in situ* hybridization で調査したところ、PLA1 遺伝子は SAM そのものではなく、若い葉原基の胚軸側で強く発現していることが明らかとなった。このことから、PLA1 は葉において機能し、SAM における葉間期の制御は細胞非自立的であることが示唆された (Miyoshi *et al.* 2004)。

続いて、*pla2* 変異体の解析と原因遺伝子の単離が行われた。*pla2* 変異体は、葉間期の短縮と1次枝梗のシュートへの転換という *pla1* 変異体と類似した表現型が見られる。マップベースクローニングの結果、PLA2 遺伝子は MEI2 様の RNA 結合タンパク質をコードしていることが明らかとなった (Kawakatsu *et al.* 2006)。MEI2 は分裂酵母でその機能が明らかとなったタンパクで、酵母細胞内で非コード RNA に結合することによって核内に移行し、減数分裂を制御している因子である (Watanabe and Yamamoto 1994)。植物では、PLA2 のオルソログである *terminal ear1 (tel)* 変異体がトウモロコシにおいて報告されている (Veit *et al.* 1998)。tel 変異体は元々、葉序に関わる変異体として報告されたが、葉の枚数の増加や節間の短縮など、*pla2* 変異体と共通の表現型が認められる。一方でいくつかの表現型の差異や発現パターンの相違なども観察されることから、植物種によってこの遺伝子の表現型に与える効果は異なっていると考えられる。

PLA2 遺伝子の発現は PLA1 と同様に、SAM ではなく葉原基において認められた。*pla1* や *pla2* 変異体は共に、野生型に比べ速い速度で葉原基を分化するが、葉の長さは野生型より短い。そこで、PLA2 遺伝子の葉における機能を明らかにするため、変異体における葉の伸長パターンを調査した。その結果、*pla2* 変異体では葉の伸長が停止するまでの期間が短縮していることが明らかとなった。しかし、葉の全ての発生イベントが速いタイミングで、正常に完了していたことから、*pla2* 変異体の葉では成熟が早まっていることが示唆された。従って、PLA1 や PLA2 の葉における機能は、葉の成熟を抑制することであると考えられた (Kawakatsu *et al.* 2006)。

PLA1 と PLA2 は共に葉間期の制御、葉の成熟、1次枝梗の identity に関わる因子であることが明らかとなった

図2. 代表的な葉序

左から、パイナップル (らせん葉序)、キンランジソの一種 (対生葉序)、オウギバショウ (互生葉序)

が、これら2つの遺伝子の遺伝学的な関係に興味を持たれる。そこで *pla1*, *pla2* の2重変異体を作成したところ、表現型はそれぞれの単独変異体より強いものとなった。また、両者の遺伝子発現は互いの変異体背景においても変化しなかったことから、PLA2 遺伝子は PLA1 とは独立な経路でこれらの形質を制御していることが明らかとなった (Kawakatsu *et al.* 2006)。

最後の変異体は *pla3* 変異体である。*pla3* 変異体は *pla1* や *pla2* 変異体とは異なり、葉間期や1次枝梗の identity の異常に加えて、多面的な表現型を示した。例えば、*pla3* 変異体の胚のサイズは大きく、SAM の形態にも大きな異常が認められ、極度の形態異常により枯死してしまう個体も出現する。また、穂発芽性を示すのも大きな特徴である。*pla3* の原因遺伝子をマップベースクローニングによって単離したところ、PLA3 はグルタミン酸カルボキシペプチダーゼという、小さなペプチドからグルタミン酸を解離させる酵素のホモログをコードしていた (Kawakatsu *et al.* 2009)。この酵素の基質は動物においては知られているが、植物における基質は明らかになっていない。

pla3 は前述のように穂発芽性を示すことから、アブシシン酸 (ABA) との関わりを調査した。その結果、*pla3* における ABA の感受性は野生型より弱く、ABA 含量も減少していることが明らかとなった。このことから PLA3 は ABA 経路に何らかの関わりを持っていると考えられたが、葉間期や他の表現型との関連は不明である。

このように、葉間期の短縮を示す3つの変異体から原因遺伝子を単離し、葉間期制御の分子メカニズムを明らかにするべく解析を行った。その結果、葉における PLA 遺伝子の新しい機能の発見や、細胞非自立的な葉間期の決定機構など、興味深い知見を得ることができた。

3. 葉序の規則性に関わる研究

葉序には様々な種類が存在するが、大きく分けて、らせん、対生、互生、輪生の4つに分類されるのが普通である。最も一般的な葉序はらせん葉序であり、一枚の葉がおおよそ 138° の角度で茎に着生する (図2)。モデル植物のシロイヌナズナをはじめ、様々な植物種でこの葉序が観察される。対生葉序は2枚の葉が対になって分化す

る葉序であり、対となった葉は前出の2枚の葉に対して90°の角度で茎に着生する。上からシュートを眺めると、十字に葉が配置することから、十字対生葉序と呼ばれ、アジサイやシソなどがこの葉序を示す(図2)。互生葉序はイネ科植物などに多く見られる葉序であり、茎を中心に、180°ごとに1枚の葉が分化する(図2)。輪生葉序は複数の葉(一般的には3枚以上)が茎を取り囲むように分化するタイプであり、ヤエムグラなどがそれに当たるが、他の植物においても、花卉や雄蕊など花器官の配置は輪生葉序を示すことが多い。いずれの葉序も原基間の相対的な位置は極めて規則的であり、らせん葉序に現れる規則性には、フィボナッチ級数や黄金分割に関連する値が出現すると言われている。

葉序に関する研究は、その規則性と見た目の美しさから、様々な観点からの研究が古くから行われてきた。特に、葉原基分化の規則性を説明するモデルは、これまでいくつか提唱されている。近年、最も受け入れられているのは、茎頂におけるオーキシンの極性輸送によって規則的な葉原基分化を説明するモデルである(Reinhardt *et al.* 2003)。このモデルでは既存の葉原基におけるオーキシンの流入と、葉原基分化予定領域におけるオーキシンの局所的な蓄積が繰り返すことによって、葉原基分化の空間的規則性を説明する。このモデルは分子遺伝学的な実験結果に基づいて打ち立てられたモデルであるが、その後、このモデルをベースとしたコンピューターシミュレーションによっても葉序の規則性が再現されている(Jonsson *et al.* 2006, Smith *et al.* 2006)。

4. イネの葉序を制御するDECUSSATE遺伝子

このように、葉序の規則性に関してはオーキシンの極性輸送によって説明可能である一方、前述の様々な葉序パターン(らせん、対生、互生、輪生など)がどのようにして決定されているのは未だ明らかになっていない。例えば葉序パターンは生育相によっても変化する。イネにおいても、栄養生長期は互生葉序であるが、生殖生長期に入ると、1次枝梗の原基はらせん葉序で分化する。しかし、前述のコンピューターシミュレーションでは、オーキシンの関わる単一のパラメーターの変化では葉序パターンの変化を再現できなかった(Smith *et al.* 2006)。このことから、オーキシン単独の効果では葉序パターンは変化しないと考えられる。葉序パターンの決定に関わる遺伝的制御機構の解析には、葉序パターンが変化する変異体が必要である。しかしながら、これまで葉序が乱れる変異体は多数報告されているが、葉序パターンが変化する変異体はほとんど得られていない。

本研究において、栄養生長期初期に互生葉序から対生葉序に変換する変異体を見いだした(図3)。この変異体はこれまで報告の少なかった葉序パターンが変化する変異体であり、イネには見られない十字対生葉序(decussate)

図3. *dec* 変異体の表現型

A. 野生型のシュートの横断切片, B. *dec* 変異体のシュートの横断切片, C. 野生型の植物体, D. *dec* 変異体の植物体。野生型では、葉は180°の角度で分化している(A, C矢印)。*dec* 変異体では、2枚の葉が対になり、90°の角度で分化している(B, D矢印)。

を示すことから、*decussate* (*dec*) 変異体と名付け、その詳しい表現型解析と原因遺伝子の単離を行った。

栄養生長期初期において、*dec* 変異体の約半数が対生葉序を示した(図3)。葉序の異常はSAMの異常を伴うことが知られていることから、まずSAMの形状を観察した。*dec* 変異体のSAMは野生型に比べて横方向に肥大し、扁平な形状を示した。この時の細胞分裂活性を調査する為に、histone *H4* の発現を *in situ* hybridization を用いて調査したところ、野生型のSAMより多くの細胞でhistone *H4* の発現が認められた。このことからSAMの肥大と分裂の活性化が葉序の変換の一因となっていることが示唆された。一方、*dec* 変異体では根にも異常が認められた。興味深いことに、根ではシュートとは異なり根端分裂組織(RAM)が小さくなり、細胞分裂活性は低下していた。このことからDEC遺伝子はSAMにおいては分裂組織のサイズの増大と分裂の活性化、RAMにおいては分裂組織のサイズの減少と分裂の不活性化という、逆の作用を持つことが明らかとなった。

DEC遺伝子をマップベースクローニングで単離したところ、DEC遺伝子はこれまで報告のない新奇的なタンパク

をコードしており、タンパク質の配列情報からは *DEC* 遺伝子の分子機能は予想できなかった。しかしながら、*SAM* と *RAM* で逆の作用を持つという *dec* 変異体の特徴的な表現型は、植物ホルモンのサイトカイニンとの関わりを疑わせるものであった。サイトカイニンはシュートにおいては *SAM* を肥大させる一方で、根では *RAM* を小さくすることが知られている。シロイヌナズナのサイトカイニン分解酵素の過剰発現体では、*SAM* が小さくなり、逆に *RAM* は大きくなることから、このことは支持される (Werner *et al.* 2001, 2003)。また、葉序の転換が認められるトウモロコシの *abphyll* 変異体の原因遺伝子は、サイトカイニンの情報伝達経路に関わるタンパクをコードしている (Giulini *et al.* 2004)。これらのことから、*DEC* 遺伝子はサイトカイニン経路に関わる遺伝子であることが推察された。そこでサイトカイニンの情報伝達に関わる遺伝子の発現を *dec* 変異体の背景で調べたところ、有意にそれらの発現が低下していた。また *dec* 変異体では、サイトカイニン添加に対する反応性が、野生型に比べて劣っていることも明らかとなった。このことから、*DEC* 遺伝子はサイトカイニンの情報伝達系に何らかの関わりを持っていることが示唆された。

5. おわりに

葉間期の制御機構に関する研究の歴史は浅い。シロイヌナズナにおいても葉間期に注目した研究は、*PLA1* の報告がなされるまでほとんど見受けられなかった。しかし、最近では *PLA1* のホモログである *KLUH* 遺伝子が、シロイヌナズナにおいても葉間期制御や器官サイズに重要であることが示された (Anastasiou *et al.* 2007)。また、マイクロ RNA である *miR156* やそのターゲット遺伝子が葉間期制御に関わっていることが明らかになるなど (Wang *et al.* 2008)、葉間期制御の遺伝的制御機構についての研究は現在盛んに行われている。一方、葉序の制御機構に関しては、古くからの多くの研究報告とともに、オーキシンがその制御に重要であることが明らかとなっているが、最近になって細胞壁の構成成分であるペクチンが葉序の制御に重要であることが示されたり (Peaucelle *et al.* 2008)、オーキシンの極性輸送を制御する転写因子が発見されたりするなど (Prasad *et al.* 2011)、未だに活発な研究がなされている。このように葉原基の分化パターンの制御機構の研究は未だ発展途上であり、多くの研究者がその全容解明に取り組んでいる。本研究においても、様々な解明すべき課題が残された。例えば、葉間期の制御に関して、*PLA1* や *PLA3* の基質となる物質は何なのか、*PLA2* タンパクはどのような RNA と結合するのか、そして *PLA1*, *PLA2* は細胞非自立的にどのようにして葉間期を制御できるのだろうか? *DEC* 遺伝子の葉序の制御機構に関して、葉序パターンとサイトカイニン、そしてオーキシンとの関係など、明らかにすべき課題は多い。

最初に述べたように、葉原基の分化パターンは植物の形を大きく変えうる要因である。従って、葉の分化パターンの分子遺伝学的機構の理解は、基礎的研究の観点からはもちろん、農学的にも有用な知見を与えうる。今後の更なる研究により、その分子機構の解明に迫ると共に、農学的な利用に関わる基礎的知見の蓄積に貢献していきたいと考えている。

謝 辞

これらの研究は様々な方々との共同研究、そして多大な協力と支援を頂いたことによって得られた成果です。特に東京大学育種学研究室の長戸康郎先生、当時大学院生であった川勝泰二さん、当時ポスドクであった現農業生物資源研究所の佐藤豊さん、材料を提供して頂いた名古屋大学の北野英己先生、*PLA1* の遺伝子単離を行った倉田のり先生をはじめとする国立遺伝学研究所の皆さんにはこの場を借りて深くお礼を申し上げます。

引用文献

- Anastasiou, E., S. Kenz, M. Gerstung, D. Maclean, J. Timmer, C. Fleck and M. Lenhard (2007) Control of plant organ size by *KLUH/CYP78A5*-dependent intercellular signaling. *Dev. Cell* 13: 843–856.
- Giulini, A., J. Wang and D. Jackson (2004) Control of phyllotaxy by the cytokinin-inducible response regulator homologue *ABPHYL1*. *Nature* 430: 1031–1034.
- Itoh, J.I., A. Hasegawa, H. Kitano and Y. Nagato (1998) A recessive heterochronic mutation, *plastochron1*, shortens the plastochron and elongates the vegetative phase in rice. *Plant Cell* 10: 1511–1522.
- Jonsson, H., M.G. Heisler, B.E. Shapiro, E.M. Meyerowitz and E. Mjolsness (2006) An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 1633–1638.
- Kawakatsu, T., G. Taramino, J.-I. Itoh, J. Allen, Y. Sato, S.-K. Hong, N. Nagasawa, M. Kojima, M. Kusaba, H. Sakakibara, H. Sakai and Y. Nagato (2009) *PLASTOCHRON3/GOLOATH* encodes a glutamate carboxypeptidase required for proper development in rice. *Plant J.* 58: 1028–1040.
- Kawakatsu, T., J. Itoh, K. Miyoshi, N. Kurata, N. Alvarez, B. Veit and Y. Nagato (2006) *PLASTOCHRON2* regulates leaf initiation and maturation in rice. *Plant Cell* 18: 612–625.
- Miyoshi, K., B.O. Ahn, T. Kawakatsu, Y. Ito, J. Itoh, Y. Nagato and N. Kurata (2004) *PLASTOCHRON1*, a timekeeper of leaf initiation in rice, encodes cytochrome P450. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 875–880.
- Reinhardt, D., E.R. Pesce, P. Stieger, T. Mandel, K. Baltensperger, M. Bennett, J. Traas, J. Friml and C. Kuhlemeier (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426: 255–260.
- Peaucelle, A., R. Louvet, J. N. Johansen, H. Hofte, P. Laufs, J. Pelloux and G. Mouille (2008) Arabidopsis phyllotaxis is controlled by the methylesterification status of cell-wall pectins. *Curr. Biol.* 18: 1943–1948.

- Prasad, K. *et al.* (2011) Arabidopsis PLETHORA transcription factors control phyllotaxis. *Curr. Biol.* 21: 1123–1128.
- Smith, R.S., S. Guyomarc'h, T. Mandel, D. Reinhardt, C. Kuhlemeier and P. Prusinkiewicz (2006) A plausible model of phyllotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 1301–1306.
- Wang, J.W., R. Schwab, B. Czech, E. Mica and D. Weigel (2008) Dual effects of miR156-targeted *SPL* genes and *CYP78A5/KLUH* on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 1231–1243.
- Watanabe, Y. and M. Yamamoto (1994) *S. pombe mei2+* encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA. *Cell* 78: 487–498.
- Werner, T., V. Motyka, V. Laucou, R. Smets, H. Van Onckelen and T. Schmülling (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15: 2532–2550.
- Werner, T., V. Motyka, M. Strnad and T. Schmülling (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10487–10492.
- Veit, B., S.P. Briggs, R.J. Schmidt, M.F. Yanofsky and S. Hake (1998) Regulation of leaf initiation by the *terminal ear 1* gene of maize. *Nature* 393: 166–168.