

# イネ「双極葉」突然変異体を用いた植物地上部の分枝様式の進化機構の解明

## Elucidation of evolutionary mechanism of shoot branching pattern Using the adaxial-abaxial bipolar leaf mutants in rice

(日本植物生理学会推薦)

代表研究者	秋田県立大学	佐藤 (永澤) 奈美子	Akita Prefectural University	Namiko Satoh-Nagasawa
協同研究者	東京大学	伊藤 純一	The University of Tokyo	Jun-ichi Itoh
	秋田県立大学	永澤 信洋	Akita Prefectural University	Nobuhiro Nagasawa
	熊本大学	春原 英彦	Kumamoto University	Hidehiko Sunohara

The branching pattern found in the oldest plant fossils is bifurcated branching, which produces meristems equivalent to each other. On the other hand, the main angiosperm branching mode is uniaxial branching in which the main axis meristem and the lateral meristem have different identities. This suggests that plants, which were originally composed only of qualitatively equivalent meristems, have evolved to have qualitatively different meristems.

Applicants have initially focused on and analyzed rice *axial-abaxial bipolar leaf (abl)* mutants as mutants with an abnormal pattern formation in the shoot apical meristem. As a result, it has become clear that "bipolar leaves" are caused by two adjacent and equivalent meristems formed during rice development. Thus, the *ABL* gene may be a key gene that contributed to the diversification of meristem identities that occurred during plant evolution.

In this study, we first identify multiple rice *ABL* genes, analyze their functions, and elucidate their interactions to clarify the molecular genetic mechanism of "bipolar leaf" formation in rice. Furthermore, in order to consider the evolutionary roles of the *ABL* genes, we analyzed the function of the ortholog of the *ABL* gene in *Marchantia polymorpha* which have different body plan from rice.

### 研究目的

最古の植物化石にみられる分枝様式は、互いに同等な分裂組織が生じる二叉分枝である。一方、主な被子植物の分枝様式は、主軸の分裂組織と側芽の分裂組織が異なるアイデンティティを持つ単軸分枝である。これは、元来質的に同等な分裂組織のみで構成されていた植物が、進化の過程で、質的に互いに異なる分裂組織を持つようになったことを示唆している。

申請者らは、*adaxial-abaxial bipolar leaf (abl)* 突然変異体について、当初、茎頂分裂組織のパターン形成機構に異常のある突然変異体として注目し、解析してきた。その結果、「双極葉」は、発生の途中

に形成される 2 つの隣り合った同等な分裂組織によって生じることが明らかになってきた。つまり、*ABL* 遺伝子は、植物進化の過程で起こった、分裂組織のアイデンティティの多様化に寄与した鍵遺伝子の可能性がある。

本研究では、まず、イネ *ABL* 遺伝子を複数同定し機能解析、相互作用の解明を行うことで、イネにおける「双極葉」形成の分子遺伝学的メカニズムを明らかにする。さらに、イネと体制の異なる植物種において、*ABL* 遺伝子のオルソログの機能解析を行い、その進化上の役割について考察することを目的とする。

## 研究経過

まず、表1に本奨学寄付金申請時に明らかになっていた「双極葉」突然変異体の特徴について示す。ここで明らかのように、*abl4*~*abl6*変異体の原因遺伝子が明らかになっていなかったため、申請者らは、まず、*ABL4*~*ABL6*遺伝子の同定を試みた(下記項目1)。次に、*ABL*遺伝子間の相互関係を明らかにするため、各変異体の形態観察を行って対照をとりつつ二重突然変異体における「双極葉」の形成頻度や形態、SAMの形態観察を行った(下記項目2)。さらに、*ABL2*遺伝子に関しては、下流あるいは協同で機能する遺伝子を明らかにするため、サプレッサー/エンハンサースクリーニングを行った(下記項目3)。最後に、イネと体制の異なる植物としてゼニゴケを選択し、*ABL*遺伝子のオルソログの有無を調査し、変異体や過剰発現個体を作成した(下記項目4)。

Table1 Characteristics of *ABL* genes

変異体名	「双極葉」の分化時期と数	遺伝性/アレルの有無	<i>ABL</i> 遺伝子がコードするタンパク質
<i>Abf1</i>	第4葉	優性/有	ヒスチジンカイネース
<i>abl2</i>	第4葉 (まれに第1~3葉)	劣性/無	クラスIII HD-ZIP
<i>abl3</i>	栄養生長初期、複数枚	劣性/無	LSMタンパク質
<i>abl4</i>	栄養生長初期、複数枚	劣性/有	遺伝子未単離
<i>abl5</i>	栄養生長初期、複数枚	劣性/無	遺伝子未単離
<i>abl6</i>	生殖生長期、複数枚	劣性/無	遺伝子未単離

### 1. 遺伝子未単離の *ABL* 遺伝子の同定と mRNA 発現解析、タンパクの細胞内局在性の調査

*ABL* 遺伝子の分子レベルでの機能を推測するため、従来の DNA マーカーを用いた遺伝子マッピングとともに、次世代シーケンシングデータを利用して *ABL4*~*ABL6* 遺伝子の同定を試みた。

ラフマッピングの結果、*ABL4* 遺伝子は、第3染色体の 71cM~100cM に、*ABL5* 遺伝子は、第12染色体の 12.3cM~47.2cM に、*ABL6* 遺伝子は、第6染色体の 5.1cM~51cM に座乗していることが明らかになった。上記領域について、*abl4* 変異体オリジナルアレルホモ個体ゲノムの次世代シーケンシングデータを確認したところ、*ABL4* 遺伝子座乗候補領域内にあ

る、SCARECROW transcription factor family protein と Mps One Binder Kinase Activator-like 1A をコードする遺伝子のそれぞれエキソンあるいはエキソン/イントロンの境界領域にアミノ酸置換につながる塩基置換が起こっていた。

さて、*abl4* 変異体オリジナルアレルは 2016 年に同定されたが、2018 年には、別のアレルが発見された。後者のアレルでは、Mps One Binder Kinase Activator-like 1A の開始コドン直前の位置に塩基置換が起こっていた。そのため、*ABL4* 遺伝子の発現調節に異常が出るのではないかと考え、野生型とこのアレルにおける *ABL4* 遺伝子の発現を real-time PCR 法を用いて比較した。その結果、該当アレルでは、SCARECROW transcription factor family protein をコードする遺伝子の発現量は野生型と変わりがなく、Mps One Binder Kinase Activator-like 1A をコードする遺伝子の発現が野生型より有意に低いことが明らかになった。また、興味深いことに、Mps One Binder Kinase Activator-like 1A をコードする遺伝子は、植物体の分裂組織以外の部分でより高い発現が見られた。この遺伝子がどのようなしくみで茎頂分裂組織から分化する葉のパターン形成に関わっているのか、さらなる解析が必要である。なお、*abl3* 変異体の原因遺伝子である *LSMI* 遺伝子も、分裂組織よりも葉身において高い発現が見られた。

*in situ hybridization* 法による発現解析が成功したのは、*ABL1* および *ABL2* 遺伝子であった。*ABL1* 遺伝子は茎頂分裂組織から分化したばかりの葉の先端や伸長、抽出した葉の表皮細胞でパッチ状に、発現していた。*ABL2* 遺伝子は茎頂分裂組織内および新しい葉の向軸側表皮細胞、分げつの分裂組織での発現が見られた。*ABL3* および *ABL4* 遺伝子は組織特異的発現をしていないためである可能性が高いと考えているが、*in situ hybridization* 法では発現解析できなかった。したがって、*ABL3* タンパク質および *ABL4* タンパク質と蛍光タンパク質 sGFP との融合タンパク質を形質転換体につくらせるためのコンストラクションを行った。

### 2. *ABL* 遺伝子同士の二重突然変異体の解析や *abl* 突然変異体内での他の *ABL* 遺伝子の発現解析

*ABL* 遺伝子間の相互関係を明らかにするため、二重突然変異体における「双極葉」の形成頻度や形態、SAMの形態観察を行い、各突然変異体の形態と比較

した。

*abl2*、*abl3*、*abl4* 変異についての3種類の二重変異体について外観観察や内部構造観察を行ったところ、それぞれ、*abl2 abl3* 二重変異体は矮性で栄養生長初期に複数枚の双極葉を形成する *abl3* 変異体と、*abl2 abl4* 二重変異体は矮性で栄養生長初期に複数枚の双極葉を形成するのに加えて、不規則な位置に分裂組織を形成する *abl4* 変異体と、*abl3 abl4* 二重変異体は *abl4* 変異体と区別がつかなかった。したがって、イネの体制を制御する際、*ABL2*、*ABL3* および *ABL4* 遺伝子は、*ABL4*→*ABL3*→*ABL2* の順に上位/下位の関係性を持ちながら機能していることが明らかになった。

今後、各突然変異体内での他の *ABL* 遺伝子の発現を調査することで、この知見を確認する。また、*Ab11*、*abl5* および *abl6* 変異を含む二重変異体の作出と解析を行う。

### 3. サプレッサー／エンハンサーの単離 (*abl2*)

*ABL2* 遺伝子の下流あるいは協同で機能する遺伝子を同定するため、サプレッサー／エンハンサースクリーニングを行った。*abl2* 突然変異体は劣性ホモ個体に稔性があるため、劣性ホモ個体に変異源処理を行い、その後代で「双極葉」表現型が消失する表現型回復系を探索した。

2018年には約300系統、2019年に約200系統の  $M_2$  をスクリーニングした。通常は *abl2* 変異体の約50%で双極葉や葉序異常といった異常が見られる。スクリーニングでは、異常の見られる確率が25%以下になっていたものをサプレッサー候補、90%以上になっていたものをエンハンサー候補としてスクリーニングした。その結果、前者の  $M_2$  約300系統からは、2系統のサプレッサー候補に加え、2系統のエンハンサー候補が得られた。これらの系統は後代の表現型分離比についても確認済みであり、今後は、すでに交配済みの材料の後代のスクリーニングとDNA抽出、後代の分離調査などを行い、次世代シーケンサーでゲノム配列を読むことで遺伝子同定を行う。後者の  $M_2$  約200系統からも6系統のサプレッサー候補が得られた。それらについては、2021年に後代の分離比を確認したり、遺伝子同定のために必要な交配を行ったりする。

### 4. イネと体制の異なる植物（ゼニゴケ）における *ABL* 遺伝子オルソログの機能解析

イネと体制が異なり、かつ、形質転換などが可能な実験植物であるゼニゴケについて、*ABL* 遺伝子のオルソログの機能を調査することとした。

*ABL1* は植物のヒスチジンカイネースタンパク質、*ABL2* はクラスIII HDZIP タンパク質、*ABL3* は LSM タンパク質のアミノ酸配列情報を入手し、系統樹を描いた。その結果、*ABL1*～*ABL3* については、ゼニゴケにおいてオルソログがそれぞれ2、1、1個存在することが明らかになった。

遺伝子の機能を知るため、解析方法の常套手段である CRISPR-Cas9 システムを用いて上記4遺伝子の変異体作成を行った。また、ゼニゴケが二叉分枝する植物であることから、上記4遺伝子の過剰発現個体が二叉分枝しなくなるといった表現型を取る可能性があると考え、35S プロモーターおよび Elongation Factor プロモーターを用いて作成した。

こちらについては、現在解析中であり、ここに結果を載せることができない。

### 考察

*ABL* 遺伝子は、茎頂分裂組織内で発現し、葉の分化パターンに関わっていると予想していたが、実際に茎頂分裂組織内で発現していることが明らかになったのは、*ABL2* 遺伝子のみであった。このことは、茎頂分裂組織と葉原基の間では情報のやり取りが行われており、それが乱れることで双極葉が生じると考えられた。つまり、その情報のやり取りは、イネの茎頂分裂組織付近で余分な分裂組織が分化することを防ぐのに必須なものであるということになる。

その他の実験項目に関しては、解析が道半ばのため考察は難しい。

### 研究の発表

口頭発表

1. 菊地美希・岡本理沙・山崎荘・春原英彦・永澤信洋・我彦廣悦・佐藤(永澤)奈美子、イネの葉分化パターン制御における *Oryza sativa* *Smith-like1* 遺伝子の機能推定、東北植物学会、R1.12.15
2. 佐藤理絵・春原英彦・我彦廣悦・永澤信洋・佐藤(永澤)奈美子、なぜ *adaxial-abaxial*

*bipolar leaf 2* 変異体で双極葉が形成されるのか?、東北植物学会、R1. 12. 15

本育種学会、R2.3.28

3. 菊地美希・岡本理沙・山崎荘・春原英彦・我彦廣悦・永澤信洋・佐藤（永澤）奈美子、イネのシュート形成における *Oryza sativa Smith-like 1* 遺伝子機能の解析、日本育種学会、R2.3.28
4. 佐藤理絵・春原英彦・伊藤純一・我彦廣悦・永澤信洋・佐藤（永澤）奈美子、イネ *adaxial-abaxial bipolar leaf 2* 変異体を用いた異所的メリステム分化抑制機構についての分子遺伝学的解析、日

ポスター発表

1. 山崎荘・菊地美希・春原英彦・我彦廣悦・永澤信洋・佐藤(永澤)奈美子、極性異常の葉を形成するイネ *adaxial-abaxial bipolar leaf 4* 変異体の解析、東北植物学会、R1. 12. 15