

植物の花序形成を制御する遺伝子メカニズムの解析

小林 薫

植物の花序形成を制御する遺伝子メカニズムの解析

東京大学大学院農学生命科学研究科

生産・環境生物学専攻

平成 20 年度博士課程進学 小林 薫

指導教官 東京大学大学院 准教授 経塚淳子

目次

緒言	1
第1章 イネ小穂メリステム形成を決定する遺伝子の単離	6
緒言	6
材料と方法	9
結果	12
考察	24
第2章 小穂構造の決定へのイネ科植物 <i>SEP</i> 遺伝子の多様性の寄与	30
緒言	30
材料と方法	32
結果	34
考察	41
第3章 生殖成長への相転換を制御する <i>PAP2</i> と <i>OsFULs</i> 遺伝子	47
緒言	47
材料と方法	48
結果	53
考察	70
総合考察	76
要旨	81
謝辞	85
引用文献	86

緒言

生物の形態形成において、細胞や組織のある状態から別の状態への転換は器官分化が正しく行なわれるために重要な要素である。たとえば、植物の茎頂分裂組織（メリステム）のように未分化な組織から葉が分化するときには、未分化な細胞から葉原基の細胞へ分化するという状態変化が起こる。根端メリステムでも、未分化な領域にある細胞がいくつかの異なる細胞に分化することで、性質の異なる複数の細胞からなる根が構成される。また、分枝形成では葉腋に形成された側生メリステムは休眠状態になるが、植物ホルモンなどの作用により休眠が解けることで伸長成長が始まる。このように、細胞や組織をある状態から別の状態へ転換させるメカニズムを解明することは、生物の形態形成の仕組みを明らかにすることに繋がる。生物の形態形成を制御する遺伝子メカニズムに迫るために、その足がかりとして植物の花序形成に着目した。

われわれの身の回りに数多く存在する多種多様な高等植物は、いずれも種の生存のために花を付けるが、種によって異なる花序の形態を示す。このような地球上に溢れる多様な植物の花序形成の制御に共通する原理は存在するだろうか。植物の多様性を生み出した花序形成の遺伝子メカニズムは存在するだろうか。本研究論文では、植物の花序形成を制御する遺伝子メカニズムについて紐解くこととした。

植物の地上部の形態は、茎頂メリステムの機能により形成される。茎頂メリステムでは先端部に未分化な細胞からなる領域があり、そこで分裂した細胞が周縁部に供給され、メリステムの周縁部で器官が分化する。茎頂メリステムが植物の生育段階に応じて器官を分化し続けることで、植物の複雑な形態が決定される。栄養成長相の茎頂メリステムからは葉が形成され、その腋部には新たにメリステム（側生メリステム）が形成される。側生メリステムは、成長して元の茎頂メリステムと同様に振舞う。このようにして、植物は器官形成を繰り返し、枝葉を伸ばす。

茎頂メリステムは、日長や温度などの環境的要因や内在の自律的な調節により、栄養成長相から生殖成長相へ転換する。生殖成長相の茎頂メリステムは花序メリステムと呼ばれ、側生器官として分枝と花メリステムを生み出す。花メリステムからは、花器官が形成される。植物は生育過程でさまざまな段階を経るため、各段階への転換が正しく制御されることは植物の正常な形態形成にとって重要である。植物メリステムのアイデンティティの転換は、つねに新しいメリステムが形成され成長するたびに起こる。このことによって、植物は繰り返し枝葉や花芽をつくり続け、無限成長を示す。

植物の花序の形態は、繰り返し起こるメリステムのアイデンティティ転換の集大成である。生殖成長相の茎頂で花メリステムが形成される位置とタイミングの制御が重要である。花メリステムがつくられるとそこから花器官が分化する。花器官が形成されると、花メリステムの活性が消失するため、花メリステムは有限成長を示す。一方、花メリステムがつくられないと枝が形成され無限成長する。高等植物の多様な花序の形態は3つのグループに大別される。第1は総状花序 (Raceme) である。これは、1本の軸に柄をもった多数の花が付き、下方ほど柄が長くなるものを指し、無限成長を示す。第2は円錐花序 (Panicle) である。これは、短く総状花序をなした枝が全体としてさらに総状に並んで着生するものを指し、有限成長を示す。第3は集散花序 (Cyme) である。これは仮軸分枝による花序の形態である。1つの軸の成長は先端が花芽に転換することで終結し、そのすぐ下の節から分枝が成長しその先端が花芽となる。さらにその花芽の下節からさらなる分枝が伸長することで、繰り返し花芽が形成される。この様式を集散花序といい、無限成長を示す (図 0-1)。このような高等植物の多様な花序の形態は、花メリステムアイデンティティを決定する遺伝子メカニズムが種ごとに異なることによってもたらされている。それは、花メリステムアイデンティティ獲得の促進と抑制のバランスの違いである。双子葉植物で総状花序のシロイヌナズナとキンギョソウや集散花序のトマトとペチュニアをモデルとした研究は進んでいる。その一方で円錐花序に関する理解は進んでいない。すなわち、植物の花序形成の制御メカニズムを理解するためには、円錐花序の植物の花序メリステムでつくられる側生メリステムの花への転換を制御する因子の同定と、その機能解明が必要である。

主要な穀物であるイネ、コムギ、トウモロコシなどはいずれもイネ科植物である。すなわち、イネ科植物の花序形態は穀物の収量に影響する重要な要素である。イネ科植物では、栄養成長相の茎頂メリステムから葉が分化し、その腋部に側生メリステムが形成される。これが発達して分げつとなる。また、環境的要因により花成が誘導されて花序形成が開始される。つまり、茎頂メリステムの状態の転換に伴い、異なる器官が分化する (図 0-2A)。このような形態形成の仕組み自体はイネ科植物でも他の植物と共通であるが、イネ科植物は独特の花序の構造を示す。他の植物では花序の軸に直接花が着生するのに対し、イネ科植物では、花序の軸形成と花器官分化の間の段階に小穂と呼ばれる枝分かれ構造の形成がある。小穂とは苞穎の内側に複数の花 (小花) を含む枝分かれのことである。小穂に形成される小花の数や形態は、種によって異なる。イネ科植物では小穂は花序の軸の末端に形成されるため、小穂の着き方を花序の形態ととらえている。イネ科植物の花序形成には、栄養成長から生殖成長への相転換、小穂メリステムアイデンティティの獲得、小花メリステムアイデンティティの獲得、花器官分化という成長の状態変化がある。これらのメリス

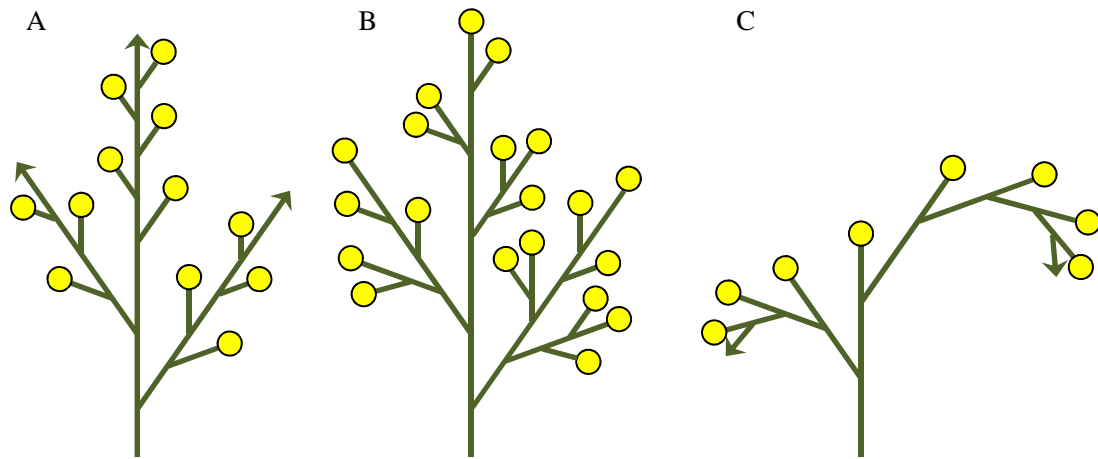


図0-1 植物の代表的な花序の形態の模式図

(A) 総状花序 (Raceme). 1本の軸に柄をもった多数の花が着き，下方ほど柄が長くなるものを指し，無限成長を示す．

(B) 円錐花序 (Panicle). 短く総状花序をなした枝が全体としてさらに総状に並んで着生するものを指し，有限成長を示す．

(C) 集散花序 (Cyme). 仮軸分枝による花序の形態で，1つの軸の成長は先端が花に転換することで終結する．その花のすぐ下の節からさらなる分枝が伸長することで，繰り返し花芽が形成される．無限成長を示す．

矢印は花序メリステムを表し，丸印は花を表す．



図0-2 イネの穂の形態とメリステムアイデンティティの変化

(A) イネのメリステムは、栄養成長相では葉やその腋部に分げつを形成する。生殖成長相に転換すると花序メリステムとして1次枝梗を分化し、最後の1次枝梗を分化したあとと消失する。1次枝梗のメリステムでは、2次枝梗や側生小穂が分化する。枝梗メリステムが小穂アイデンティティを獲得することで、副護穎がつくられ小穂構造の形成が始まる。小穂メリステムが次に小花アイデンティティを獲得することで、副護穎や外穎が形成される。最後に花器官が分化してイネの花序と花(小穂)の形態形成が終結する。

(B) イネの穂の形態。中心に穂軸があり、そこから1次枝梗が分枝する。穂軸の先端には花序メリステムが活性を失ってできた退化痕が認められる。1次枝梗にはさらなる枝分かれとして2次枝梗と側生小穂が形成される。

テムアイデンティティの変化を制御する遺伝子の解明は、イネ科植物の花序形成を制御するメカニズムの理解に繋がると期待される。

円錐花序であるイネの穂には、いくつかの 1 次枝梗が形成される。また、1 次枝梗にはさらなる枝分かれとして、2 次枝梗や側生小穂がつくられる。枝分かれを繰り返すことで、イネの穂の形態が決定される (図 0-2B)。イネの穂形成をメリステムの挙動でとらえなおすと、花序メリステムは数個の 1 次枝梗メリステムが分化したあと消失する。その痕跡が穂軸の最先端部の退化痕となる。1 次枝梗メリステムからは、基部側に 2 次枝梗メリステム、先端側に側生小穂メリステムが分化し、先端が頂端小穂メリステムに転換する。2 次枝梗メリステムは、2~3 個の小穂を分化し頂端小穂に転換する。イネの穂形成では、すべての側生メリステムが最終的に小穂アイデンティティを獲得する。このため、イネの穂の形態を決定する大きな要因は、小穂メリステムへの転換の制御である。つまり、小穂メリステムアイデンティティの獲得が早いほど枝梗の少ない穂が形成され、タイミングが遅れるほど枝梗の多い穂が形成される。

これまでの研究により個々の発達段階に関与する遺伝子が明らかにされてきたが、花序形成を幅広く捉えて全体的な制御メカニズムを明らかにする試みはほとんどなされてこなかった。本研究論文ではモデル植物であるイネを用いて、イネ科植物の花序形成を制御する遺伝子メカニズムを明らかにすることで、イネ科植物と双子葉植物の花序形成に共通する原理と、種の違いを生じさせる遺伝子メカニズムの解明に貢献することを目的とした。そのため、第 1 にイネで小穂メリステムアイデンティティを決定する遺伝子として *PANICLE PHYTOMER 2 (PAP2)* を同定した。第 2 に、*PAP2* と高い相同性を示す遺伝子の機能解析により、イネ科植物の小穂構造の決定に寄与する遺伝子メカニズムに関して示唆が得られた。最後に、*PAP2* 遺伝子の発現解析を発端として、栄養成長から生殖成長への相転換を制御する遺伝子メカニズムに関する新たな知見を得た。

第1章 イネ小穂メリステム形成を決定する遺伝子の単離

緒言

植物の花序の形態は、花序メリステムから形成される側生メリステムに花アイデンティティが付与されるパターンによって決定される。このパターンを制御するメカニズムの違いが、高等植物の花序形態の多様性を生み出す。花序の形態形成を制御する遺伝子メカニズムの解明は、高等植物の成長プログラムに共通する原理と、植物の多様性をもたらす要因の理解に繋がる。

花序の基本形態とは、花の配置パターンであり、花メリステムの形成パターンである。花メリステムは、新たに形成されるメリステムが花メリステムとしてのアイデンティティをもつ、あるいは花序メリステムが花メリステムに転換することにより形成される。いずれの場合も、メリステムが有限メリステムである花メリステムとしてのアイデンティティを獲得することが鍵となる。

高等植物の花序は3つの基本的なパターンに分類できる。花メリステムアイデンティティの決定メカニズムについては、1990年頃からシロイヌナズナで分子遺伝学的解析が進められてきた。シロイヌナズナの花序は総状花序 (Raceme) であり、また先端の花序メリステムが花メリステムに転換せずに花メリステムをつくり続ける無限花序である。主にシロイヌナズナを用いた研究から、花メリステム形成、すなわち花メリステムとしてのアイデンティティの決定は少数の遺伝子が中心的な役割を果たすことによって制御されることが明らかとされた (for reviews; Liu et al., 2009; Irish, 2010)。LEAFY (LFY) 遺伝子は、その機能が欠損すると花メリステムが形成されず葉状器官を形成し続けるため、花メリステム形成を決定する「花メリステムアイデンティティ遺伝子」である (Weigel et al., 1992; Wagner et al., 1999)。MADS box 転写因子をコードする APETALLA 1 (API) も花メリステムアイデンティティ遺伝子であり、*lfy* との二重変異体では花メリステムがまったく形成されない (Mandel et al., 1992; Bowman et al., 1993)。MADS box 転写因子ファミリーの中で API と同じグループに分類される CAULIFLOWER (CAL) と FRUITFULL (FUL) は、花メリステム形成において API と冗長的に機能する (Ferrándiz et al., 2000)。また、SEPALLATA (SEP) グループの MADS box 転写因子も、花メリステム形成に寄与する (Ditta et al., 2004)。これらの花メリステムアイデンティティ獲得を促進する遺伝子だけでなく、抑制する方向に機能する遺伝子も知られている。TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) 遺伝子は、機能欠損によって花序メ

リシステムが花メリステムに転換し、先端に頂端花をもつ有限花序が形成される (Bradley et al., 1997). *TFL1* は *LFY* や *API* の発現抑制を介して、花アイデンティティの獲得を抑制する (Ratcliffe et al., 1998). これに対し、*LFY* や *API* は *TFL1* を抑制することで花メリステムの形成を促進する (Liljegren et al., 1999; Ratcliffe et al., 1999). すなわち、シロイヌナズナでは *LFY*, *API*, *TFL1* が相互に制御しあうことによって無限花序を形成するためのプログラムが実行される. *LFY* と *TFL1* の作用力や発現のタイミングをシミュレーションすることにより、3つの代表的な花序が仮想的に再現された (Prusinkiewicz et al., 2007). このモデリングでは、シロイヌナズナでの実験データが用いられたが、*LFY* や *TFL1* のはたらきは、集散花序 (Cyme) を形成するペチュニアとトマトでも保存されているため、モデルは汎用的であると考えられている (Pnueli et al., 1998; Molinero-Rosales et al., 1999; Souer et al., 1999). このように、これまでの分子遺伝学的な解析により、花メリステムアイデンティティの獲得を促進する遺伝子と抑制する遺伝子の作用力のバランスによって、花序の形態が決定されることが示された.

イネ、コムギおよびトウモロコシなどの主要な穀物が含まれるイネ科植物では、花序形成メカニズムは作物生産という観点からも重要である. ほとんどの植物種では個々の花は枝上に形成されるのに対して、イネ科植物では花は小穂の中に形成される. そのため、イネ科植物では個々の花ではなく小穂の着生パターンから花序の形態を記述する. 小穂は、それ自体が枝分かれ構造であり、内部に複数の花 (小花) を含む. 小穂に形成される小花数は、イネのように1つであるものから無限のものまで多様である. イネ科植物で小穂メリステム形成と小花メリステム形成を決定するメカニズムがどのように進化し、使い分けられているかは興味深い問題である.

イネ穂の形成過程では、側生メリステムが繰り返し形成される. 形成された側生メリステムが枝梗となって枝分かれを伸ばすか小穂となって終結するかは、そのメリステムが形成される位置やタイミングに支配される. 枝梗として成長した場合は同じ成長パターンが繰り返され、枝梗メリステムは新たな側生メリステムを生み出す. イネの枝梗メリステムはやがて小穂メリステムに転換する. この転換のタイミングにより、枝梗の長さ (枝梗上の側生器官数) が決定される. イネ穂のような円錐花序 (Panicle) では、分枝の程度が花序の形態と大きさを決定する. つまり、小穂アイデンティティの獲得が早いと枝分かれの少ない穂が形成され、小穂アイデンティティの獲得が遅いと枝分かれの多い穂が形成される.

イネでは、遺伝学的解析から小穂アイデンティティの獲得を制御する要因や遺伝子がいくつか報告されている. シロイヌナズナで花アイデンティティを抑制する *TFL1* のイネオースログである *RICE CENTRORADIALIS (RCN)* を過剰発現させると穂の分枝が増加した

ことから、*RCN* は小穂形成の抑制因子として機能することが明らかとなった (Nakagawa et al., 2002). したがって、*TFL1* の機能はイネでも保存されていると考えられる. 小穂形成が促進されて小さな穂が形成される *aberrant panicle organization 2 (apo2)* 変異体の原因遺伝子が *LFY* オーソログであることが報告された (Ikeda-Kawakatsu et al., 2011). 逆遺伝学的解析によっても、*LFY* オーソログとして単離された *RFL* 遺伝子の発現抑制によって小穂形成が早まり、小さな穂が形成されることが報告されている (Rao et al., 2008). したがって、*APO2/RFL* はイネでは小穂アイデンティティの抑制因子であると解釈できる. これはシロイヌナズナ *LFY* の機能とは反対である. シロイヌナズナでは、*LFY* は *UNUSUAL FLORAL ORGAN (UFO)* と複合体を形成して協調的に機能する (Lee et al., 1997; Parcy et al., 1998; Chae et al., 2008). *apo2* とよく似た異常を示す *aberrant panicle organization 1 (apo1)* 変異体の原因遺伝子は *UFO* のオーソログであり、*APO2/RFL* と *APO1* は分子間相互作用する (Ikeda-Kawakatsu et al., 2009, 2011). さらに、シロイヌナズナで *LFY* の上流で機能する *SQUAMOSA BINDING PROTEIN (SPL)* のホモログ遺伝子が、小穂形成を抑制して分枝形成を促進する QTL として報告された (Jiao et al., 2010; Miura et al., 2010). したがって、イネでは *SPL/LFY/UFO* モジュールが全体としてシロイヌナズナとは逆の方向に作用すると考えられる. QTL 解析からは、他にも小穂アイデンティティの獲得を制御する遺伝子が明らかとなった. サイトカイニン分解酵素の 1 つである *OsCKX2* をコードする *GRAIN NUMBER 1 (GNI)* の機能が欠損すると、活性サイトカイニンが増加し小穂数が増加する (Ashikari et al., 2005). このため、サイトカイニンは小穂形成を抑制すると考えられる. また、機能未知のタンパク質をコードする *DENCE AND ERECT PANICLE 1 (DEP1)* は小穂形成を促進する遺伝子である. 粒数の多い多収品種 Shennong 265 では機能的でない *dep1* タンパク質のはたらきにより正常な *DEP1* の機能が阻害され、1 次枝梗、2 次枝梗および小穂の数が増加する. しかし、機能的な *DEP1* を過剰発現しても穂の形態に変化は認められなかったことから (Huang et al., 2009), *DEP1* は小穂形成を促進する遺伝子ではあるが、小穂決定に十分な因子であるとはいえない. *PANICLE PHYTOMER 1 (PAP1)* は、劣性変異体で分枝が増加した穂が形成されるため、小穂形成を促進する遺伝子であると考えられるが、原因遺伝子が同定されていないため、分子機能は不明である (Takahashi et al., 1998). トウモロコシでは、*REVERSED GERM ORIENTATION 1 (RGO1)*, *INDETERMINATE FLORAL APEX 1 (IFAI)* および *RAMOSA 1/2/3 (RA1/2/3)* が小穂アイデンティティの獲得を促進する (Laudencia-Chincuanco and Hake, 2002; Kaplinsky et al., 2003; Vollbrecht et al., 2005; Bortiri et al., 2006; Satoh-Nagasawa et al., 2006). しかし、イネではこれらのオーソログ遺伝子の機能は知られていない.

これまでに行なわれたイネ穂の形態形成を制御する遺伝子メカニズムに関する研究では、主に小穂アイデンティティを抑制する因子が研究されてきた。しかしながら、イネの穂形成においても小穂アイデンティティの促進と抑制のバランスが全体としての穂の形態を制御すると考えられることから、小穂形成を促進する因子、すなわちイネ小穂アイデンティティ遺伝子の同定がイネの花序形成機構を理解するうえで不可欠である。そこで、本章では小穂メリステムのアイデンティティを決定する遺伝子を同定することを目的として、穂の分枝が増加する劣性突然変異体 *panicle phytomer 2-1 (pap2-1)* を解析した。

材料と方法

植物材料と育成

本研究で用いた *pap2-1* 変異体は、ジャポニカ品種日本晴のイネ組織培養から再分化した個体によって作られた変異集団（ミュータントパネル）をスクリーニングすることにより得られた。この変異集団では、イネの内在性レトロトランスポゾン *Tos17* が高頻度で転移していることが知られている (Hirochika 2001)。

pap2-1 とインディカ品種カサラスの交配第 2 世代 (F2) をマップベースドクローニングに用いた。*pap2-1* とカサラスの F1 種子は、前川雅彦教授 (岡山大学) より提供された。

pap2-1 変異体の表現型解析とマップベースドクローニング、走査型電子顕微鏡観察には、東京大学農学部弥生キャンパス内の温室で育成した植物を用いた。

promoter::GUS を用いた遺伝子発現解析には、発芽後 7 日間長日条件 (14 hrs light 28°C, 10 hrs dark 24°C) で育成し、その後、短日条件 (12 hrs light 28°C, 12 hrs dark 24°C) に設定した人工気象器で育成した植物を用いた。

走査型電子顕微鏡観察

サンプルを 2.5% グルタルアルデヒド固定液 [2.5% Glutaraldehyde, 50 mM NaPO₄ buffer (pH 7.0)] に浸漬し、4°C にてオーバーナイトで固定した。その後、エタノールシリーズ [25%, 60%, 80%, 100%, 100%] で 2 時間ずつ処理して脱水し、酢酸イソアミルに置換した。臨界点乾燥 (CO₂, 35°C, 72.8 atm) と白金蒸着の後、走査型電子顕微鏡 S-4000 (日立製作所) を用いて、加速電圧 10 kV で観察した。

PAP2 遺伝子の同定

PAP2 遺伝子のラフマッピングを, *pap2-1* (ジャポニカ品種日本晴) と野生型 (インディカ品種カサラス) の交雑第 2 世代を材料として, SSR (simple sequence repeat) マーカーを用いて実施した. ファインマッピングには, 日本晴とカサラスの間にあるゲノム DNA の一塩基多型を基にした CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) マーカーを利用した.

相補性検定のためのベクター構築では, まず日本晴のゲノム DNA を鋳型として *OsMADS34* のプロモーター1.5 kb を増幅した. この断片を pTA2 ベクター (東洋紡) にサブクローニングした. 次に, BAC クローン (OSJNBa0047E24) を制限酵素 *Bgl*III と *Eco*RV で切り出してできた *OsMADS34* 遺伝子を含む 6,420 bp の断片をこれに繋ぎ, pBS_*OsMADS34* とした. また, OSJNBa0047E24 を *Hind*III で切断してできた PAP2 の 3'UTR とターミネーターを含む 2,504 bp の断片を pBluescript にサブクローニングし, これを pBS_*OsMADS34*Term とした. pBS_*OsMADS34* プラスミドから制限酵素 *Bam*HI と *Eco*RV で 7.8 kbp の断片を切り出し, pBS_*OsMADS34*Term に繋いだ. このようにして得た全長 *OsMADS34* を含む 10.3 kbp の断片を *Apa*I で切り出し, pPZP2H-lac ベクターに組み込んだ (Fuse et al., 2001). 完成したベクターを導入したアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, EHA105) を, *pap2-1* 由来のカルスに感染させることで形質転換を行なった.

RNAi による PAP2/*OsMADS34* 遺伝子の発現抑制

OsMADS34 の転写抑制を行なうため, コーディング領域の一部をトリガーとした RNAi を行なった. トリガー領域を下記のプライマーセットで増幅し, pENTR/D-TOPO (Invitrogen, USA) にサブクローニングした. これを LR 反応により, pANDA ベクター (Miki et al., 2005; Miki and Shimamoto, 2004) へ入れ替えた. 完成したベクターをアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, EHA105) に導入した後, 野生型イネ (日本晴) のカルスに感染させて形質転換を行なった.

Primer name	5' - 3'
<i>OsMADS34</i> -RNAi-F	CACCAAGGCCTACGAGCTCTCCAT
<i>OsMADS34</i> -RNAi-R	AGGTCGCAGAGTTCATCAAG

PAP2 過剰発現体の作成

野生型イネ (日本晴) の生殖成長相の茎頂を含む部位に由来する cDNA サンプルを鋳型

として、次のプライマーセットを用いて *PAP2* の全長 cDNA を増幅した．これを pTA2 ベクター（東洋紡）にサブクローニングした．次に、この領域を *EcoRV* と *XbaI* で切り出し、*SmaI* と *XbaI* であらかじめ処理しておいた pACTIN ベクターに繋ぎ換えて (Sentoku et al., 2000), *PAP2* 過剰発現用のベクターを構築した (pACT::PAP2). pACT::PAP2 を導入したアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, EHA105) を野生型イネ（日本晴）のカルスに感染させることにより、形質転換を行なった．

Primer name	5' - 3'
PAP2-137F	TGCTGCATGGATGAGAAGAG
PAP2-1282R	ACGCAAAAAGGATGGTTGTC

GUS 染色

PAP2 の遺伝子発現を解析するため、プロモーター領域として *PAP2* の翻訳開始点から 2.2 kbp 上流までを用いた．野生型イネ（日本晴）のゲノム DNA を鋳型として、2.2 kbp の断片を次のプライマーセットにより PCR で増幅し、pENTR/D-TOPO (Invitrogen, USA) にクローニングした．これを pGWB3 (own promoter::GUS) に、LR 反応によって組み替え、完成したものを pPAP2::GUS とした (Nakagawa et al., 2007). pPAP2::GUS をアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, EHA105) に導入し、野生型イネ（日本晴）のカルスに感染させてイネへの形質転換を行なった．

Primer name	5' - 3'
PAP2-Prom2k-F	CACCGTTTGAAGAAAAAAGTTGG
PAP2-ATG-R	CCGCCGCTTGGCGAACGTC

GUS 染色を行なうため、形質転換イネの茎頂メリステムをサンプリングした．このとき、茎頂メリステムを覆っている葉をすべて取り除いた．サンプルを氷冷したアセトンに 15 分間浸漬した．次に 100 mM NaPO₄ で洗浄し、GUS 染色液 [100 mM NaPO₄ buffer (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 0.1% Triton X-100, 0.5 mg/mL X-Gluc] に浸漬して 37°C 暗所で発色反応を行なった．

結果

pap2-1 はイネ穂の枝分かれが増加する変異体である

イネの穂には、いくつかの 1 次枝梗が形成される。また、1 次枝梗にはさらなる枝分かれとして、2 次枝梗や側生小穂がつくられる。1 次枝梗は花序メリステムから分化する。花序メリステムは、数個の 1 次枝梗メリステムを分化したあと、活性を失って消失する。その消失した痕跡が、穂の最上部に形成された 1 次枝梗の基部に退化痕として観察される。1 次枝梗メリステムからは、側生器官として基部側に 2 次枝梗メリステム、先端側に側生小穂メリステムが分化する。1 次枝梗メリステムが頂端小穂メリステムに転換することで、1 次枝梗の成長が終了する。2 次枝梗メリステムは 2~3 個の小穂メリステムを分化し、頂端小穂に転換する。

pap2-1 変異体は、図 1-1 に示したように穂の分枝パターンに異常を呈し、密穂を形成する劣性突然変異体として、日本晴の培養細胞から再分化した植物集団（ミュータントパネル）から単離された。野生型では 1 つずつの小穂が枝梗に整然と着生するのに対し、*pap2-1* 変異体では 1 箇所にとまって着生するのが特徴的であった（図 1-1A）。また、*pap2-1* では穂軸や 1 次枝梗の基部に白い塊が頻繁に観察された（図 1-1B, C）。*pap2-1* 変異体の穂を実体顕微鏡下で観察したところ、白い塊は分化したものの成長が停止した枝梗や小穂であった（図 1-1D）。*pap2-1* 変異体の穂は野生型と比べて小さく見えるが、これは節間伸長が抑制されたためであり、実際に形成される分枝の数は増加していた。

そこで、*pap2-1* 変異体の表現型をさらに詳細に記載するために、野生型と *pap2-1* 変異体とで、穂に形成された枝梗と小穂の数を測定した。1 次枝梗数は、野生型では 9.50 ± 0.21 本 ($n=10$)、*pap2-1* 変異体では 13.30 ± 0.79 本 ($n=10$) であり、*pap2-1* で増加した（図 1-1E）。1 次枝梗に形成される側生器官（2 次枝梗と側生小穂）の数は、野生型では 6.62 ± 0.13 個であったのに対し、*pap2-1* 変異体では 5.61 ± 0.24 個であり、*pap2-1* でやや減少する傾向がみられた（図 1-1F）。一方、1 次枝梗当たりの 2 次枝梗数は、野生型で 2.05 ± 0.08 個（対 1 次枝梗側生器官総数比 31.0%）であるのに対し、*pap2-1* 変異体では 3.97 ± 0.20 個（同 70.8%）と増加した（図 1-1F）。枝分かれが増加する性質は 2 次枝梗以降の枝分かれでも顕著であったため、*pap2-1* 変異体では 3 次枝梗も形成された（図 1-1G）。野生型では 3 次枝梗の形成は観察されなかった。このように、*pap2-1* 変異体では高次の枝梗形成が促進されるため、穂あたりの小穂総数は 304.6 ± 19.2 個となり、野生型の 109.6 ± 3.18 個と比べて小穂が 2.78 倍多く形成された（図 1-1H）。この観察結果より、*pap2-1* 変異体では小穂アイデンティティの決定が遅れると解釈され、*PAP2* は小穂形成を促進する遺伝子であると考えた。

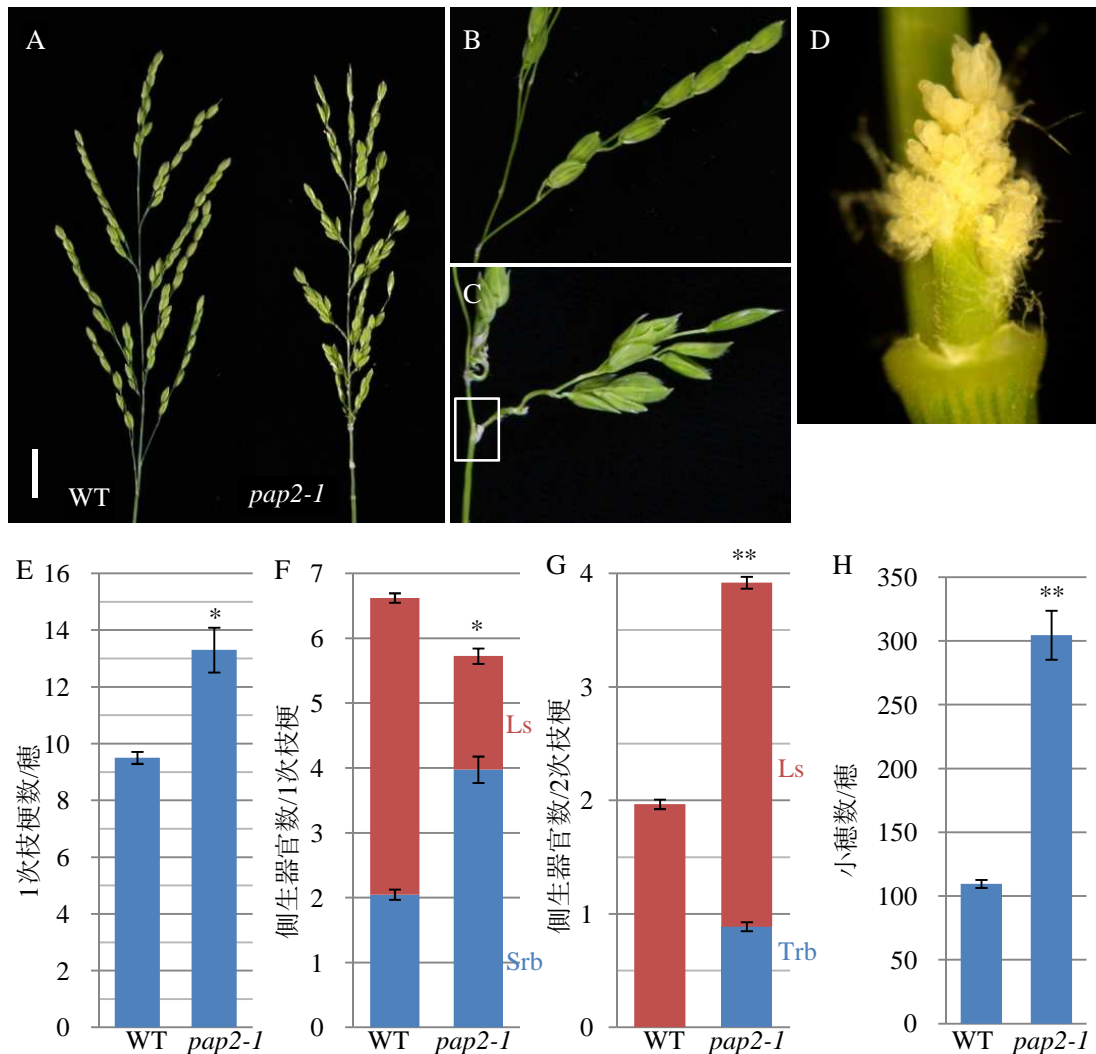


図1-1 *pap2-1*変異体の穂における表現型

(A) 野生型 (左) と *pap2-1* 変異体 (右) の穂の形態. Scale Bar: 2 cm.

(B, C) 1次枝梗に着生した小穂. 野生型 (B) と *pap2-1* 変異体 (C).

(D) (C) の白四角枠で囲まれた部分の拡大図.

(E) 1穂あたり1次枝梗数. $n = 10$.

(F) 1次枝梗あたり側生器官数. Srb: 2次枝梗, Ls: 側生小穂. $n = 10$.

(G) 2次枝梗あたり側生器官数. Trb: 3次枝梗, Ls: 側生小穂. $n = 10$.

(H) 1穂あたり小穂数. $n = 10$. アスタリスクは有意水準を示す. *1%, **0.1%

***pap2-1* では小穂の器官形成にも異常を呈する**

イネ科植物の小穂メリステムは、互生の葉序で側生器官を形成する。最初に形成される2枚の苞葉を苞穎と呼ぶ。次に形成される苞葉は外穎と呼ばれ、外穎の腋部に花メリステムが形成される。花メリステムからは鱗被や雄蕊、雌蕊などの花器官が分化する。外穎と花器官を総称して小花と呼ぶ。1つの小穂に形成される小花の数や花器官の数ならびに形態は、種によって異なる。

イネの小穂では、苞穎は痕跡的な器官であり副護穎と呼ばれる。副護穎の内側に、2枚の護穎と1つの小花が形成される。小花には外穎と内穎、2つの鱗被、6本の雄蕊、1つの雌蕊が形成される。イネの小穂には小花が1つだけ形成される。これについて、イネの祖先種では元来3つの小花が形成されていたものが進化の過程で2つの小花が消失して外穎のみが残ったと考えられている (Arber, 1934; Yoshida et al., 2009)。護穎はその退化した小花の外穎であり、副護穎が苞穎に相当する (Komatsu et al., 2003; Bommert et al., 2005)。

pap2-1 変異体では小穂の器官形成にも異常が観察された。*pap2-1* 変異体に見られたもっとも顕著な小穂の異常は、副護穎と護穎の伸長であった (図 1-2A-F)。*pap2-1* 変異体の60%の小穂で副護穎にも異常な伸長が観察され、そのうち40%では腋部に異所的にひも状の組織が形成された (図 1-2B, E, G)。また、護穎の伸長はすべての小穂で観察された。*pap2-1* 変異体の小穂の13%では護穎が外穎の半分程度まで伸長し、65%では外穎と同程度まで伸長した。さらに、23%の小穂では外穎よりも護穎が長かった (図 1-2B, C, E, F, H)。*pap2-1* 変異体の護穎を走査型電子顕微鏡で観察したところ、表面の形態的特徴は野生型と比べて差がなかった (図 1-2I, J)。*pap2-1* 変異体では、外穎と内穎を含めてすべての花器官で、異常は観察されなかった (図 1-2K, L)。このため、*PAP2* 遺伝子は、小穂構造に特徴的な副護穎や護穎の伸長を抑制すると同時に、副護穎の腋部での器官形成を抑制することが明らかとなった (図 1-2M)。一方、*PAP2* 遺伝子は花器官の形成には関与しないと考えられた。

***pap2-1* では栄養成長相の器官形成に異常はみられない**

pap2-1 変異が栄養成長相の茎頂メリステムにも影響を及ぼすかを観察した。その結果、栄養成長相の *pap2-1* 変異体には、草丈や分げつ性などの外見上の異常は認められなかった (図 1-3A)。さらに、出葉速度、出葉枚数を計測したところ、*pap2-1* 変異体と野生型との間に差は認められなかった (図 1-3B, C)。止葉が展開するタイミングは *pap2-1* 変異体と野生型植物の間で差が認められなかったが (野生型: 15.50 ± 0.14 枚, *pap2-1* 変異体: 15.90 ± 0.09 枚; 図 1-3C), 出穂のタイミングは *pap2-1* 変異体では5日程度遅れた (野生型: 82.6 ± 0.7 日, *pap2-1* 変異体: 87.5 ± 0.7 日; 図 1-3D)。これは、節間伸長が遅れたためである可能性が高い。

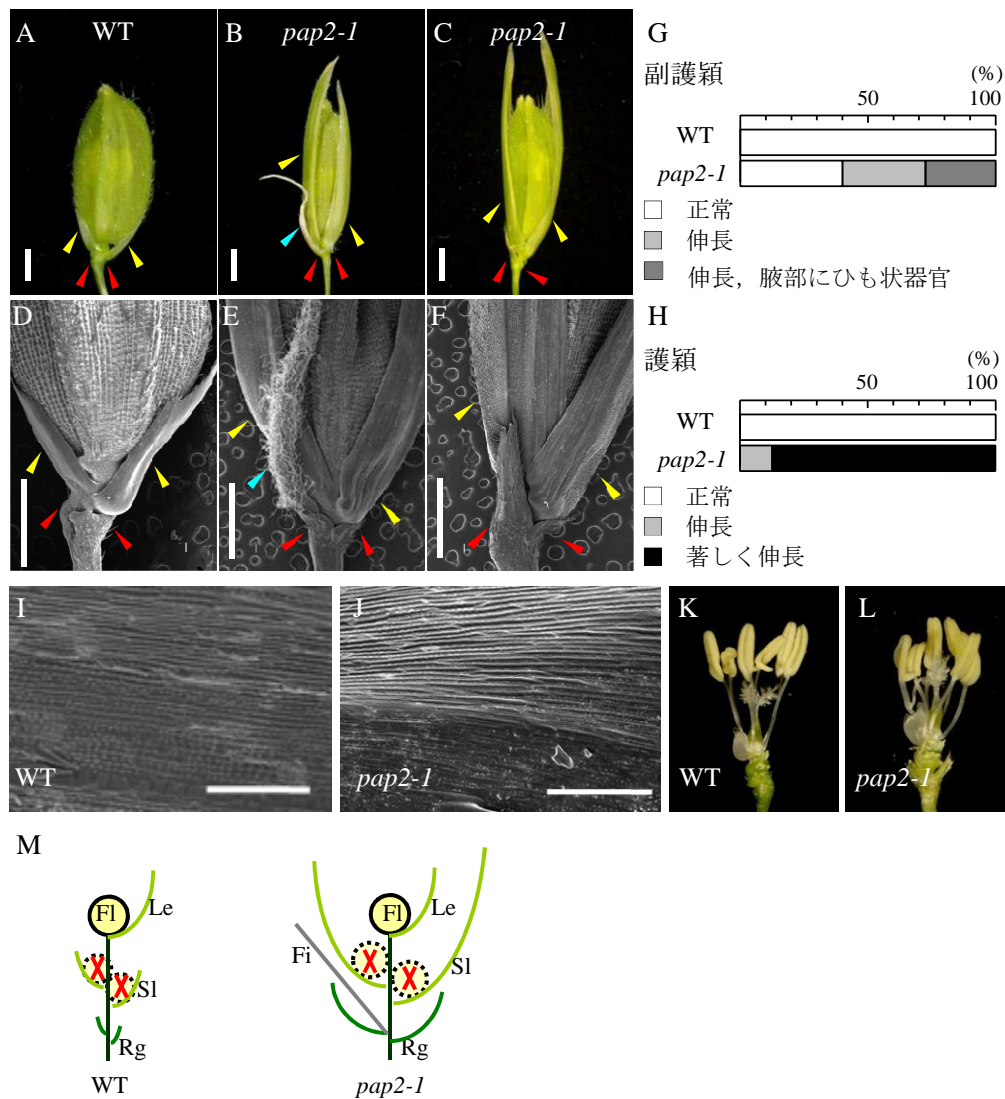


図1-2 *pap2-1*変異体の小穂における表現型

(A-C) 小穂の外観. 野生型 (A), *pap2-1*変異体 (B, C). 副護穎 (赤鏽), 護穎 (黄鏽), 異所的器官 (青鏽). Scale Bar: 1 mm.

(D-F) 小穂の基部の走査型電子顕微鏡観察. 野生型 (D), *pap2-1*変異体 (E, F). 副護穎 (赤鏽), 護穎 (黄鏽), 異所的器官 (青鏽). Scale Bar: 500 μ m.

(G, H) 副護穎 (G) と護穎 (H) にみられた過剰な伸長. $n = 40$.

(I, J) 護穎の表面の走査型顕微鏡観察. 野生型 (I), *pap2-1*変異体 (J). Scale Bar: 100 μ m

(K, L) 花器官. 野生型 (K), *pap2-1*変異体 (L).

(M) *pap2-1*変異体の小穂の模式図. Rg: 副護穎 (Rudimentary Glume), Sl: 護穎 (Sterile Lemma), Le: 外穎 (Lemma), Fl: 花器官 (Floral organs), Fi: ひも状器官 (Filamentous organ)

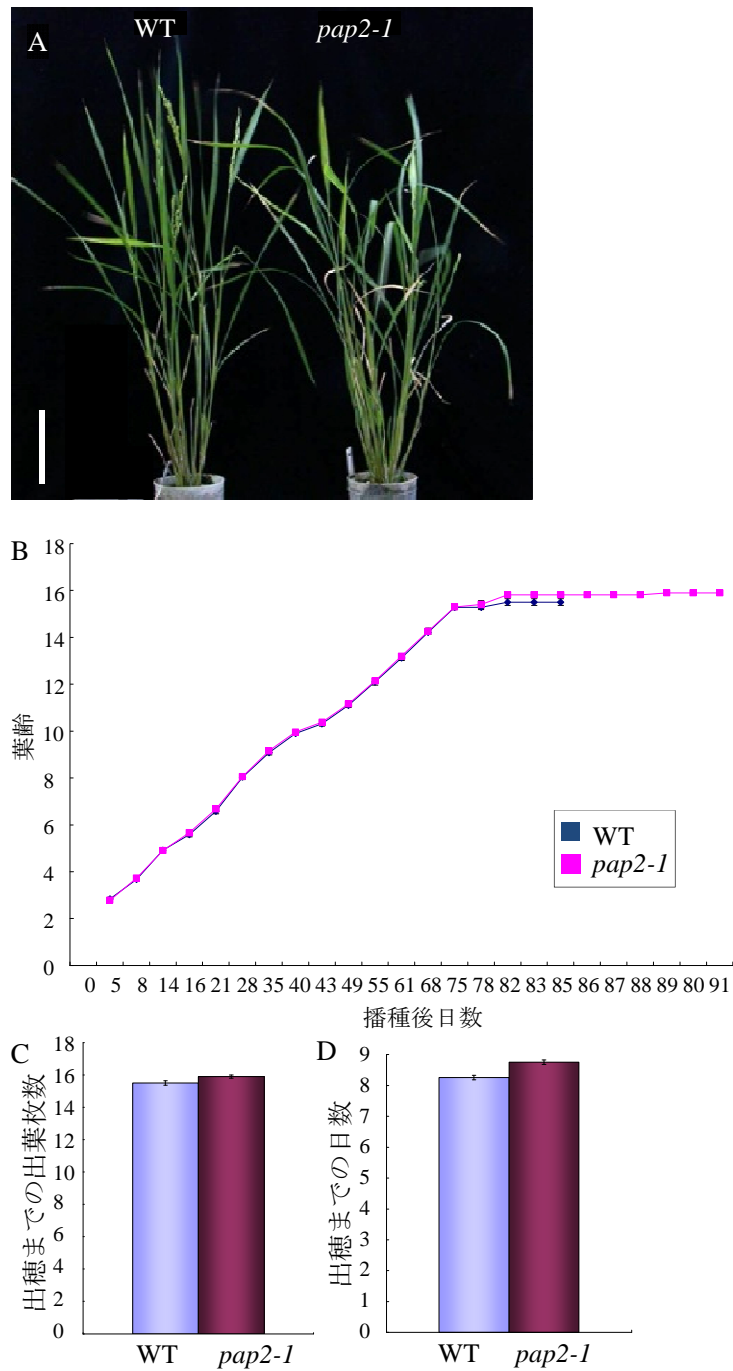


図1-3 *pap2-1*変異体の栄養成長における表現型

(A) 野生型 (左) と *pap2-1* 変異体 (右) の植物の形態. Scale Bar: 10 cm.

(B) *pap2-1* 変異体の出葉速度. $n = 10$.

(C) *pap2-1* 変異体の出穂までに展開した葉の数. $n = 10$.

(D) *pap2-1* 変異体の出穂までの日数. $n = 10$.

以上の結果から、解析した限りでは *PAP2* 遺伝子が栄養成長相の器官形成に寄与する可能性は低いと考えられた。

PAP2 遺伝子は SEPALLATA グループの MADS box 転写因子をコードする

PAP2 遺伝子を同定するため、*pap2-1* 変異体 (日本晴) と野生型 (カサラス) の F2 世代を用いてマップベースドクローニングを行なった。まず、*pap2-1* 変異体様の穂の形態異常を示した 9 個体を用いたラフマッピングにより、*PAP2* 遺伝子座を第 3 染色体上の SSR マーカー RM55 と RM227 の間にある約 26 cM の領域に定めた。さらに 405 個体を用いて RM5813 と RM15948 の間の約 340 kbp に限定した。この領域では組換え頻度が小さかったため、これ以降のマッピングには FIRE 法 (Fast Identification Recombinants; 高田ら, 2001) を用いた。この手法は、あらかじめ F2 集団の遺伝子型を調査しておいて、この領域内に組換えのある個体の表現型を調べることにより、遺伝子の領域を特定する方法である。この結果、2,832 個体の F2 植物の調査から、*PAP2* 遺伝子座が座乗する領域を第 3 染色体上の 140 cM 付近の 10 kbp に絞り込んだ。RAP-DB (The Rice Annotation Project Database) でこの領域に予測された遺伝子は、*OsMADS34* (Os03g0753100) ただ 1 つであった (図 1-4A)。*OsMADS34* は、転写開始点から転写終結点まで 6,667 bp からなり、8 つのエキソンをもち、239 アミノ酸のタンパク質をコードすると予測された遺伝子である (図 1-4B)。

OsMADS34 は、MADS box 転写因子ファミリーに属するタンパク質である。植物の MADS box 転写因子は、植物の成長や器官形成のさまざまな段階の制御に寄与するファミリー遺伝子である (Kaufmann et al., 2005; Gramzow and Theissen, 2010)。植物に特異的な Type II MADS box タンパク質は、N 末端の MADS ドメインとよばれる DNA への結合に必要な保存性の特に高い領域と、それに続く I ドメイン、K ドメインというタンパク質間相互作用に寄与する保存性の高い領域、C 末端にある転写因子としての活性に寄与する保存性の低い領域からなる。また、MADS box 転写因子は、二量体もしくは四量体を形成して標的遺伝子の転写調節を行なうと考えられている (Kaufmann et al., 2005; 図 1-5A)。

シーケンス解析の結果、*pap2-1* 変異体では、イネの内在性トランスポゾン *Tos17* が *OsMADS34* の第 4 エキソンに挿入されていることが明らかとなった (図 1-4B; 図 1-5B)。この挿入により *OsMADS34* タンパク質の K ドメインに異所的な終止コドンが出現する。このことから、*pap2-1* 変異体がコードする変異型 *OsMADS34* タンパク質は、タンパク質間相互作用ができず MADS box 転写因子として作用するために必要な複合体形成ができないため、機能的でないと推測される (図 1-5B)。また、*OsMADS34* の転写レベルは、*pap2-1* 変異体では検出されなかった (図 1-6A)。これらのことから、*pap2-1* 変異体は *OsMADS34*

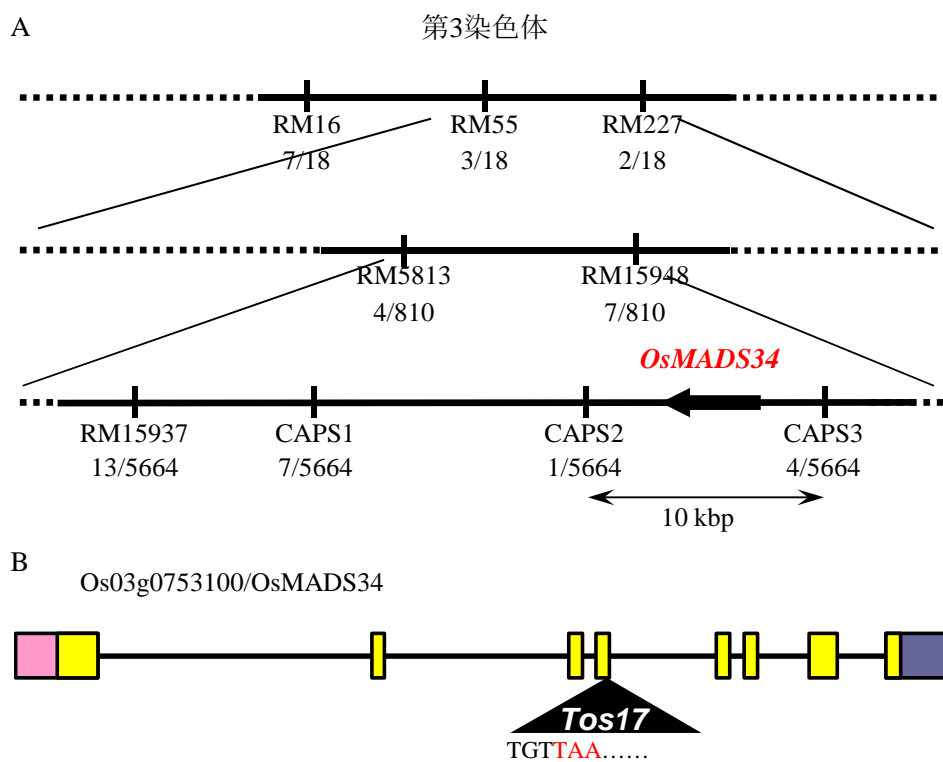


図1-4 *PAP2*遺伝子の同定

(A) 第3染色体上の*PAP2*遺伝子座の位置．組換え頻度をマーカーの下に示した．

(B) *PAP2/OsMADS34*の遺伝子構造．箱型はエキソン，線はイントロン，三角形は*Tos17*の挿入を示す．箱型の桃色は5' UTR，黄色はコーディング領域，紺色は3' UTRを表す．*Tos17*の挿入によって出現した配列を三角形の下に示した．赤字の部分で異所的な終止コドンが出現する．

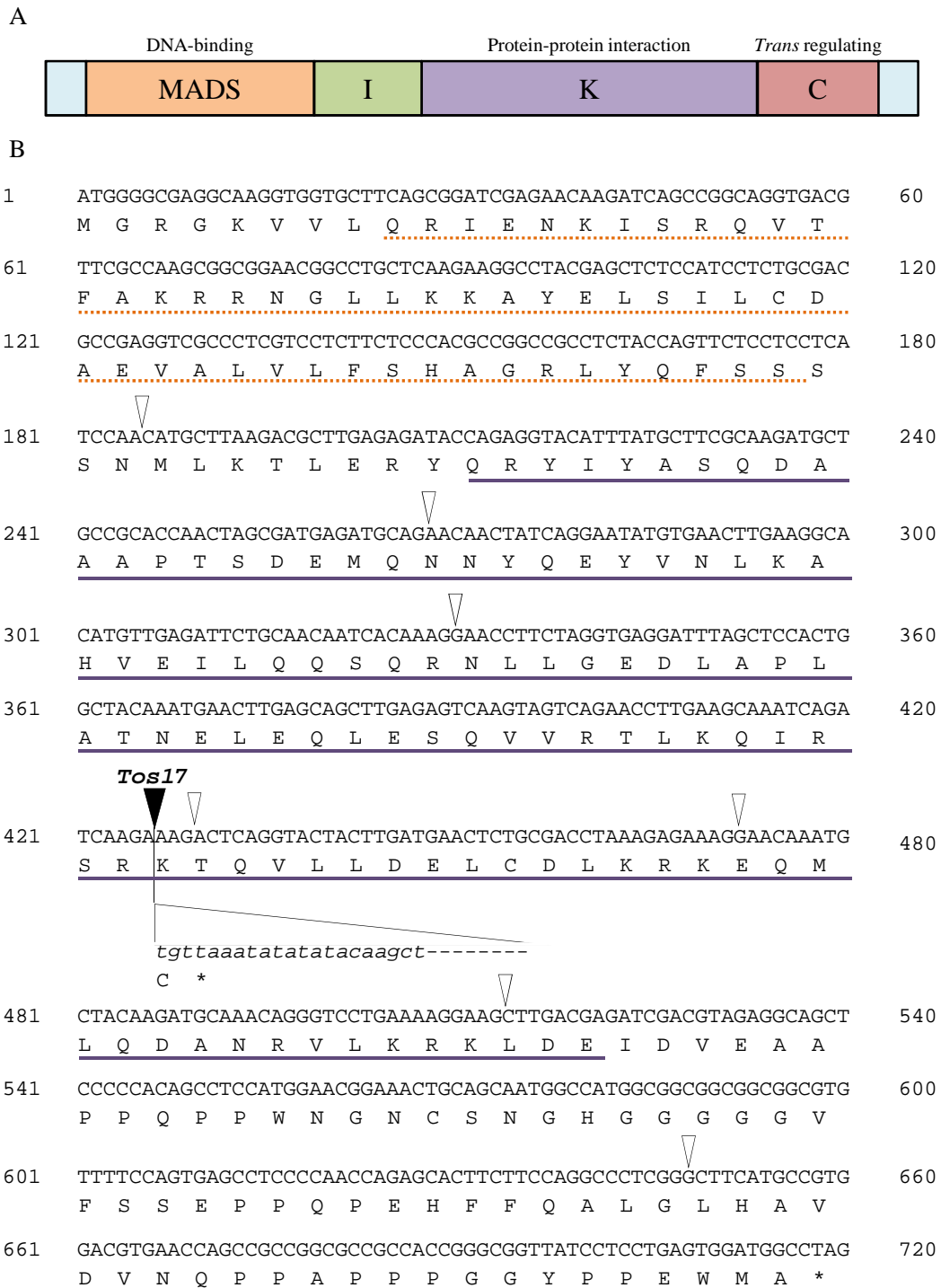


図1-5 *pap2-1*変異体でのPAP2/OsMADS34遺伝子へのTos17の挿入

(A) MICK型のMADS box転写因子の構造。N末端側にDNA結合に必要なMADSドメインがある。その後ろに、タンパク質間相互作用に必要なKドメインがある。C末端のCドメインは、標的遺伝子の転写制御に必要であると考えられている (Kaufmann et al., 2005)。

(B) PAP2遺伝子の塩基配列と、コードされるアミノ酸配列を示した。白三角形はイントロンの位置、黒三角形はTos17の挿入部位を示す。Tos17の配列を斜体で示した。破線部はMADSドメイン、実線部はKドメインを表している。*pap2-1*では、Tos17の挿入によって、Kドメインの途中に終止コドンが出現する。

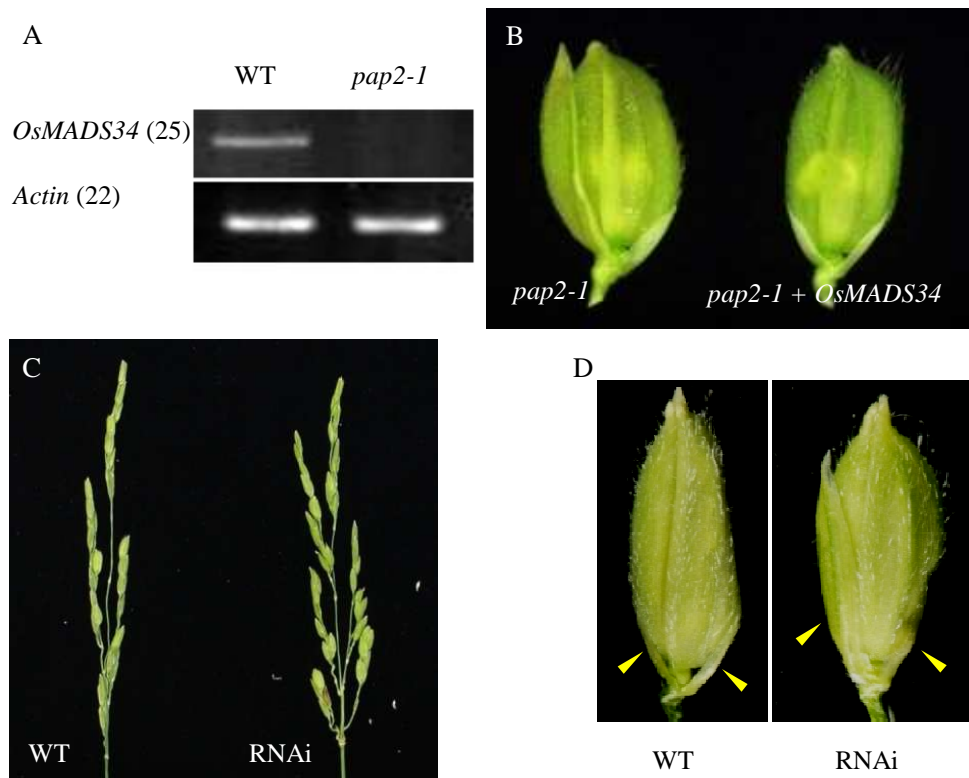


図1-6 *OsMADS34*が*PAP2*遺伝子であることの証明

(A) 野生型と*pap2-1*変異体の茎頂における*OsMADS34*の転写レベル. カッコ内はRT-PCRのサイクル数を表す.

(B) *OsMADS34*遺伝子による*pap2-1*変異体の相補実験. *pap2-1*変異体 (左) でみられた護穎の伸長が回復した (右).

(C, D) *OsMADS34*のRNAiによる*pap2-1*の再現. 穂の分枝が*pap2-1*様になった (C). また, 護穎も伸長した (D). 黄鋏は護穎を指す.

遺伝子が機能しない完全な機能欠失変異体であると考えた。 *OsMADS34* が *PAP2* 遺伝子であることをさらに証明するため、野生型の *PAP2* を含む 10.3 kbp のゲノム断片を *pap2-1* 変異体に導入した。この結果、*pap2-1* 変異体にみられた穂の枝分かれが増加したり、小穂の護穎が伸長する異常が回復した (図 1-6B)。さらに、RNAi 法を用いて *OsMADS34* の転写抑制を行なったところ、*pap2-1* 変異体の穂の枝分かれの増加や小穂の護穎の伸長という表現型が再現された (図 1-6C,D)。以上の結果より、*PAP2* 遺伝子は *OsMADS34* (Os03g0753100) という MADS box 転写因子をコードすると結論した。

PAP2 は、Type II MADS box 転写因子のなかでも AGL2-like (*SEPALLATA: SEP*) グループの遺伝子と高い相同性を示す (Arora et al., 2007; 図 1-7)。 *SEP* グループ遺伝子は、花器官アイデンティティの決定や果実の成熟など生殖成長のさまざまな段階の制御に寄与する (Malcomber and Kellogg, 2005)。このため、*PAP2* が *SEP* グループに含まれることは、*PAP2* の小穂アイデンティティ獲得の促進や小穂の器官形成の制御という機能から妥当である。

***PAP2* 過剰発現により小穂形成が促進される**

PAP2 遺伝子の機能欠損により、側生メリステムの小穂アイデンティティの獲得が阻害されることから、*PAP2* 遺伝子は小穂アイデンティティを促進する遺伝子であると考えられる。この考えを裏付けるため、イネの *ACTIN* 遺伝子のプロモーターを用いて *PAP2* の過剰発現体を作出した。10 系統の形質転換体を作出したところ、4 系統で共通の顕著な異常が認められた (図 1-8A-D)。これら 4 系統では、系統ごとのばらつきが認められたが、いずれの系統でも *PAP2* の転写レベルが顕著に上昇していた (図 1-8E)。 *PAP2* 過剰発現体では、栄養成長相では非形質転換体との間に差が認められなかったが、止葉が展開すると止葉の基部が波打った形状を示した (図 1-8A-C)。また、*PAP2* 過剰発現体では、野生型に比べて小さな穂が形成された (図 1-8D)。これらの穂では、節間伸長が抑えられているだけでなく、1 次枝梗数がわずかに減少していた (図 1-8F)。さらに、1 次枝梗に形成される側生器官の数が減少し、側生器官に占める 2 次枝梗の割合も減少した (図 1-8G)。このため、*PAP2* 過剰発現体では穂あたり総小穂数が野生型と比べて減少した (図 1-8H)。穂の構造に対する影響の強さと、*PAP2* の転写レベルの上昇との間には正の相関関係がみられた。つまり、*PAP2* の転写レベルの高かった ox9 と ox13 系統では、枝梗や小穂の減少が著しかった。これらの結果から、*PAP2* 遺伝子の発現を増加することにより小穂形成が促進されることが示された。なお、この結果は *ACTIN* 遺伝子のプロモーターを用いたため、転写レベルの大小ではなく本来発現しない部位で *PAP2* が発現した結果である可能性もある。一方、小穂や花の器官形成および栄養成長相の形態については、*PAP2* 過剰発現体でも異常は観察されなかった。

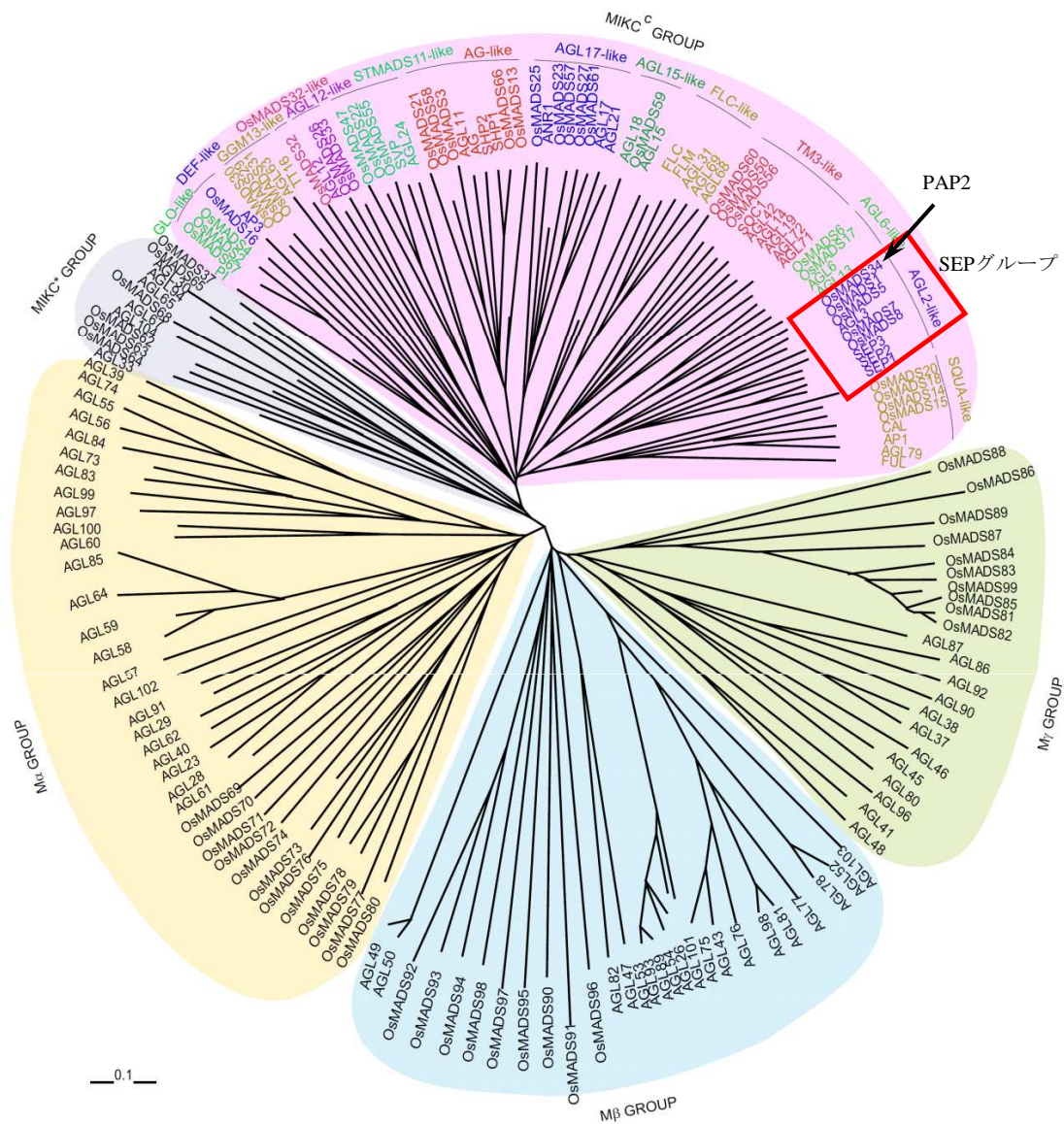


図1-7 PAP2/OsMADS34タンパク質の系統学的特徴

イネとシロイヌナズナのMADS box 転写因子の系統樹 (Arora et al., 2007より引用). 赤の四角で囲ったところが, PAP2 を含むAGL2-like (SEP) グループのクレードである.

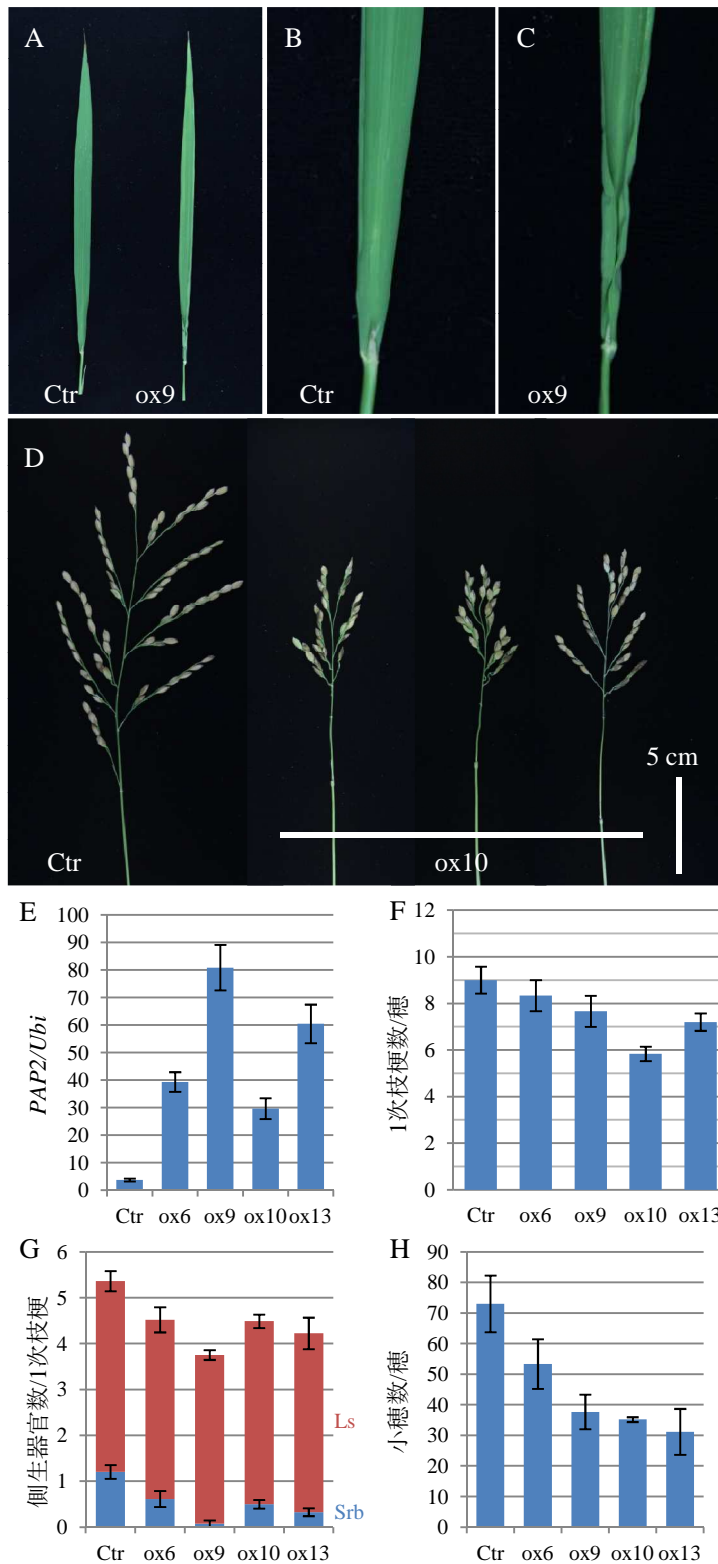


図1-8 *PAP2*遺伝子の過剰発現

(A-C) 止葉の形態. 止葉の葉身の全体像 (A). 葉身の基部の拡大図, 野生型 (B), *PAP2* 過剰発現体 (C).

(D) 穂の形態. Scale Bar: 5 cm

(E) 止葉における*PAP2*の転写レベル. Ctr: コントロール植物, ox6, 9, 10, 13: *PAP2*過剰発現系統.

(F) 1穂あたり1次枝梗数.

(G) 1次枝梗あたり側生器官数. Srb: 2次枝梗, Ls: 側生小穂.

(H) 1穂あたり小穂数. 系統ごとに3個体以上を解析した.

pap2-1 変異体と *PAP2* 過剰発現体の解析によって、*PAP2* の機能が欠損すると小穂メリステムとしてのアイデンティティの獲得が遅れて穂の分枝が多くなり、*PAP2* の機能が高まると小穂の形成が早まり分枝の少ない穂が形成されることが明らかとなった。したがって、*PAP2* 遺伝子は小穂アイデンティティの獲得を促進する遺伝子、すなわち小穂メリステムアイデンティティ遺伝子であると結論した。

PAP2 の発現部位

PAP2 の機能のさらなる理解のために、発現部位を解析した。解析には、*PAP2* のプロモーター領域として上流 2.2 kbp のゲノム断片に *GUS* (β -glucuronidase) 遺伝子をレポーターとして繋いだコンストラクト (p*PAP2::GUS*) を用いた。栄養成長相の茎頂部では、p*PAP2::GUS* による *GUS* 活性シグナルは認められなかった。生殖成長相に転換すると、*GUS* 活性シグナルが茎頂メリステム全体で観察された (図 1-9A)。幼穂形成が進行するとメリステムの先端部ではシグナルが検出されなくなり、小穂分化期では新しく側生メリステムが形成される部位に *GUS* シグナルが認められた (図 1-9B, C)。さらに、p*PAP2::GUS* のシグナルは、小穂の副護穎の先端で観察された (図 1-9D)。このことは、*pap2-1* 変異体で 1 次枝梗などの穂の枝分かれが増加することや小穂の副護穎や護穎が伸長することとよく合致する。*PAP2* の発現パターンは、*PAP2* 遺伝子が小穂アイデンティティの決定や副護穎の伸長抑制の機能をもつという考えを支持するものであった。

考察

本章では、イネの穂形成においてメリステムに小穂としての属性を付与する「小穂メリステムアイデンティティ遺伝子」として *PANICLE PHYTOMER 2 (PAP2)* を同定した。

pap2-1 変異体では、2 次枝梗や 3 次枝梗が増加した (図 1-1F, G)。これは、野生型植物であれば小穂となるメリステムが枝梗として成長したためである。このことから、*PAP2* は 1 次枝梗や 2 次枝梗のメリステムから形成される側生メリステムへの小穂アイデンティティの付与に必要な遺伝子であると考えられる。一方、*PAP2* 過剰発現体では、1 次枝梗の側生器官数と 2 次枝梗の数が少ない穂が形成された (図 1-8G)。これらの結果から、*PAP2* はイネの穂形成で小穂形成を促進する遺伝子であり、*PAP2* 遺伝子の発現レベルに応じて小穂アイデンティティの付与がコントロールされることが明らかとなった (図 1-10)。また、*PAP2* 遺伝子は小穂メリステム予定領域で発現する (図 1-9B, C)。したがって、*PAP2* はイネの小

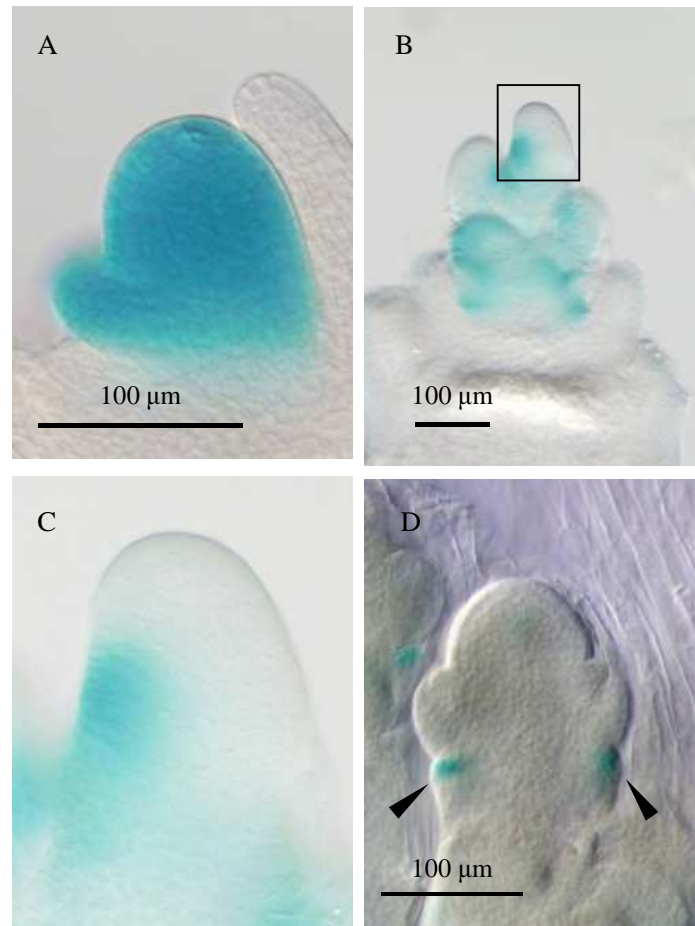


図1-9 *PAP2*の発現パターン

*pPAP2::GUS*の発現パターンを観察した。

(A) 転換直後の茎頂メリステム。メリステム全体で*GUS*シグナルがみとめられた。

(B, C) 小穂分化期のメリステム。先端部ではシグナルはみられず、新しくメリステムが出現する部位にシグナルがみとめられた。(C) 小穂メリステムでのシグナルの拡大図。

(D) 小穂形成時の*GUS*活性。副護穎の先端にシグナルがみとめられた(鏃)。

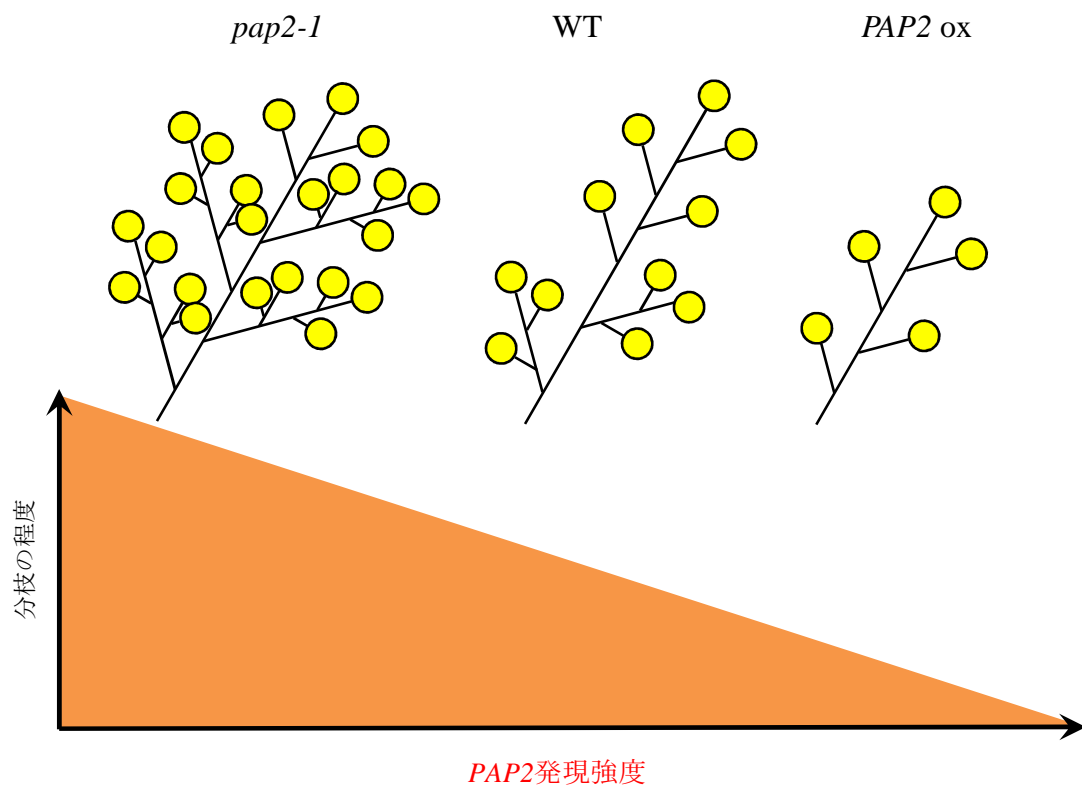


図1-10 *PAP2*遺伝子の機能に関する模式図

*PAP2*遺伝子は小穂の分化を促進する遺伝子である。*PAP2*遺伝子の機能が損なわれると (*pap2-1*変異体), 小穂アイデンティティの獲得が抑制される。その結果, 分枝 (枝梗) が多く形成される。一方, *PAP2*遺伝子の機能が亢進すると (*PAP2*過剰発現体), 小穂形成が促進されるため, 結果として分枝 (枝梗) が少なくなる。上図では, 1次枝梗の分枝パターンを例示した。下図では, *PAP2*発現強度と穂の分枝の程度の相関関係を模式的にグラフ表示した。

穂メリステムアイデンティティ遺伝子であると結論した。

イネ穂の形成において、側生メリステムに小穂アイデンティティが付与されてできる側生小穂と、枝梗メリステムが小穂メリステムに転換してできる頂端小穂の2通りの過程で小穂が形成される。*pap2-1* 変異体では側生メリステムの小穂アイデンティティ獲得は著しく遅れたが、枝梗メリステムの小穂への転換のタイミングは影響を受けなかった。したがって、枝梗メリステムから小穂メリステムへの転換に必要な遺伝子は *PAP2* の他にもあると考えられる。小穂メリステムへの転換に必要な遺伝子が *PAP2* 以外にも存在する可能性は、*PAP2* の機能が完全に失われる *pap2-1* 変異体においても最終的には小穂が形成されることや、*PAP2* 過剰発現体で小穂が再分化したり異所的な小穂が形成されるわけではないことから支持される。

マップベースドクローニングにより *PAP2* 遺伝子が *OsMADS34* をコードすることを明らかにした (図 1-4~7)。*MADS box* 転写因子は、植物の形態形成のさまざまなステージを制御する転写因子ファミリーであり、イネには 75 の遺伝子が存在する (Arora et al., 2007; Gramzow and Theissen, 2010)。*MADS box* 転写因子はアミノ酸配列によってグループに分類され、*PAP2* は *AGL2 (SEPALLATA: SEP)* グループに分類される (図 1-7)。シロイヌナズナの *SEP1/2/3/4* 遺伝子は花器官形成に関わるクラス A, B, C 遺伝子が機能するために必要なクラス E 遺伝子としての機能と、花メリステムアイデンティティ遺伝子としての機能をもつことが実験的に示されている (Pelaz et al., 2000; Goto et al., 2001; Ditta et al., 2004)。一方、進化系統学的解析から、*SEP* 遺伝子の獲得が種子植物の花形成に重要であることが示唆されている (Theissen et al., 2000)。また、イネ科植物の進化の初期にも遺伝子重複が起こり、*SEP* グループ遺伝子の機能の多様化が起こったと考えられている (Malcomber and Kellog, 2005; Zahn, et al., 2005)。*PAP2* は *SEP* グループのなかでもっともイネ科植物に特異的なクレードに属する。さらに、本研究により *PAP2* が小穂アイデンティティの獲得に必要な遺伝子であることが明らかとなった。小穂がイネ科植物に特徴的な構造であることを考え合わせると、イネ科植物の進化において小穂構造が確立されたとき、重複した *SEP* グループ遺伝子のうち、*PAP2* 遺伝子の祖先が小穂メリステムアイデンティティを決定する機能を担うように進化したことが推測される。この考えを確かめるためには、まず他のイネ科植物における *PAP2* オースログの機能を明らかにする必要がある。

イネの穂では、穂軸先端で花序メリステムが退化することで1次枝梗の分化が終了するため、1次枝梗数は花序メリステムの退化のタイミングで決定される。*pap2-1* では野生型植物と比較して1次枝梗数が増加した (図 1-1E)。また、*PAP2* 過剰発現体では逆に野生型と比べて1次枝梗数が減少した (図 1-8F)。*PAP2* 過剰発現体の穂軸の先端には、花序メリ

ステムの退化痕が認められることから、*PAP2* 過剰発現体では花序メリステムが退化するタイミングが早まったと解釈できる。これらの結果から、*PAP2* は花序メリステムの退化を早める機能をもつと考えられる。小穂アイデンティティを抑制する *AP01*, *AP02* 遺伝子の機能が失われた *apo1* および *apo2* 変異体では、小穂形成が促進された結果、花序メリステムが退化する前に小穂に転換するため、穂軸の先端に小穂が形成される (Ikeda et al., 2005; Ikeda-Kawakatsu et al., 2011)。 *apo1* や *apo2* の表現型から、イネの花序メリステムの退化と花序メリステムの小穂への転換は独立に制御されることが示唆される。*PAP2* を過剰発現しても花序メリステムが小穂に転換するわけではないため、*PAP2* 遺伝子は花序メリステムの退化のタイミングの制御にのみ関わると考えられる。あるいは、*PAP2* の過剰発現では花序メリステムを小穂に転換させるには不十分である可能性は否定できない。イネの花序メリステムの退化については、その過程や制御メカニズムに関する解析は行なわれていない。本研究で得られた結果は、*PAP2* が花序メリステムの退化を促進する遺伝子であることを示しており、この現象を解析する糸口となると期待される。

pap2-1 変異体では、小穂形成にも異常が認められた。それは、副護穎および護穎の伸長と、副護穎の腋部での異所的なひも状器官の形成である (図 1-2)。このことは、*pap2-1* では小穂形成まで成育ステージが進んでも、小穂メリステムから栄養成長相のように器官分化がなされることを示している。この表現型によって、*PAP2* 遺伝子は副護穎や護穎の伸長抑制ならびに副護穎の腋部における器官形成の抑制をすることが明らかとなった。一般に、生殖成長相では葉の成長などの栄養成長的な形質が抑制される。イネ科植物の花序形成においても、小穂形成と密接に関連して苞葉の発達抑制が起こる。シロイヌナズナでは、花メリステムを腋部に形成する苞葉は痕跡的な器官 (Cryptic bract) である (Long and Barton, 2000)。 *BLADE ON PETIOLE 1/2 (BOP1/2)* や *PUCHI* は苞葉の伸長を抑制する遺伝子である。さらに、*BOP1/2* は *LFY* と冗長的に *API* や *CAL* の発現を誘導し、*PUCHI* は *BOP1/2* とともに *LFY* や *API* の発現を誘導することで、花メリステム形成を促進する機能をもつ (Karim et al., 2009; Xu et al., 2010)。また、イネの *NECK LEAF 1* やトウモロコシオーソログである *TASSEL SHEATH 1* も苞穎の伸長を抑制し、それによって小穂形成が制御される (Whipple et al., 2010; Wang et al., 2009)。すなわち、苞穎の伸長抑制と小穂メリステム (花メリステム) アイデンティティの確立は密接に関連している。つまり、*PAP2* 遺伝子は小穂メリステムアイデンティティの確立に関連した現象として副護穎と護穎の伸長を抑制すると考えられる。

Gao et al. (2010) も、*OsMADS34* の機能欠損変異体について解析した結果を報告している。その解析に用いられた変異体 (*osmads34-1*) では、ジャポニカ品種 9522 を背景としており、第 5 イントロンと第 6 エキソンの境界部分に塩基置換が生じた結果、ミスプライスが起

こり翻訳時の読み枠がずれて、K ドメインの途中で停止コドンが出現するため、機能的なタンパク質はコードされていない。また、*osmads34-2* 変異体では、*OsMADS34* の塩基配列に変異はないが、mRNA の転写が検出されない。このため、どちらの変異体も完全な機能欠損変異であると考えられている。Gao らの報告では、*OsMADS34* の欠損によって 1 次枝梗が増加したり小穂が密に着生するという穂の形態や、護穎が伸長するという小穂の形態について *pap2-1* 変異体と同じ表現型が示されている。しかし、2 次枝梗数や 1 穂あたりの総小穂数については減少が示されている。このことから、Gao らは、*PAP2* が花序メリステムからの 1 次枝梗の分化を抑制し、1 次枝梗上の側生メリステムに対しては小穂への転換を抑制すると考えた。すなわち、同じ遺伝子の突然変異体を解析したにもかかわらず、1 次枝梗上の側生メリステムについて逆の表現型が報告された。Gao らの報告では、この相違を用いた変異体の遺伝的背景の違いによるものだと考察している。しかし、本研究論文では両者の結果の違いを引き起こした最大の原因は、未発達のまま成長が停止した小穂を測定の対象としたかどうかであると考ええる。穂形成における小穂の分化と、分化した小穂の発達は異なる現象であり、それぞれ異なるメカニズムによって制御される。そのため、穂形成における小穂アイデンティティ獲得の制御という観点で *PAP2/OsMADS34* 遺伝子の機能を正しく評価するためには、発達したかどうかに関わらず形成した小穂を可能な限りすべて計測する必要がある。

第2章 小穂構造の決定へのイネ科植物 *SEP* 遺伝子の多様性の寄与

緒言

小穂構造はイネ科植物を特徴付ける形態的要因の1つである。小穂はイネ科植物の花序を構成する1つの単位であり、その内部にいくつかの花(小花)を含む枝分かれ構造である。イネ科植物の小穂には、基部に2枚の苞葉(苞穎)がある。苞穎の内側には、苞葉(外穎)とその腋部につくられる花器官からなる小花が形成される。1つの小穂に形成される小花の数や形態は、植物種によって異なる。イネ科植物として共通するのは、苞穎の内側にいくつかの小花を持つ枝分かれとしての小穂構造を花序の基本単位とみなせることである。小穂はイネ科植物に独特の構造であるため、小穂構造を決定する遺伝子メカニズムの解明により、イネ科植物の進化を考える上で重要な知見が得られると期待される。

イネの小穂メリステムアイデンティティ遺伝子である *PANICLE PHYTOMER 2 (PAP2)* は、シロイヌナズナの *SEPALLATA (SEP)* の相同遺伝子である(第1章)。*SEP* グループの遺伝子は、生殖成長相の器官形成を制御する(Malcomber and Kellogg, 2005)。イネには5つの *SEP* 遺伝子(*PAP2*, *OsMADS1*, *OsMADS5*, *OsMADS7*, *OsMADS8*)が存在する。*LEAFY HULL STERILE 1 (LHS1)/OsMADS1* は、機能欠損変異体で外穎や内穎が決定されず薄い護穎状の器官が繰り返し形成されることと、外穎と内穎原基で発現することから、外穎と内穎の決定や小花の有限性を決定する遺伝子である(Jeon et al, 2000; Agrawal et al 2005; Prasad et al., 2005)。*OsMADS7* と *OsMADS8* の機能は報告されていないが、鱗被より内側の器官形成時に小花メリステムや花器官原基で発現するという発現パターンから、これら2つの遺伝子は鱗被より内側の花器官形成に関わると予想されている(Pelucci et al., 2002)。すなわち、イネ *SEP* 遺伝子は異なる段階で機能して小穂形成を制御する可能性が考えられる。これは、シロイヌナズナの *SEPI/2/3/4* が冗長的に花器官形成を制御することとは異なる(Pelaz et al., 2000; Ditta et al., 2004)。そこで、イネに存在する *SEP* 遺伝子の機能を総合的に理解することは、小穂形成を制御する遺伝子メカニズムの解明に繋がると期待される。

イネやトウモロコシの小穂形成に関する分子遺伝学的解析から、小穂構造の決定における *SEP* 以外の遺伝子の関与が報告されている。イネでは、*AP2 (APETALLA 2)* 転写因子をコードする *SUPERNUMERARY BRACT (SNB)* とパラログである *OsINDETERMINATE SPIKELET 1 (OsIDS1)* は、機能欠損により副護穎が繰り返し形成されるため、小花の決定に必要な遺伝子である(Lee et al., 2006; Lee and An, 2011)。また、*AP2* 転写因子の発現を抑

制する microRNA の 1 つである *miR172* を過剰発現させると, *snb* や *osids1* 変異体と同様の異常を示す (Zhu et al., 2009). ERF (ethylene responsive element binding factor) 転写因子をコードするイネの *FRIZZY PANICLE (FZP)* とトウモロコシオーソログである *BRANCHED SILKLESS 1 (BD1)* も小花メリステムの決定に必要な遺伝子である (Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2003). トウモロコシでも, AP2 転写因子をコードする *INDETERMINATE SPIKELET 1/TASSELSEED6 (IDS1/TS6)* と *SISTER OF INDETRMINATE SPIKELET 1 (SID1)* が小花メリステムの決定に必要である (Chuck et al., 1998, 2008). また, *miR172* をコードする *TASSELSEED4 (TS4)* は, *IDS1/TS6* の発現調節を介して小花メリステムの決定を制御する (Chuck et al., 2007). したがって, *miR172* と AP2 転写因子による小花アイデンティティの制御はイネとトウモロコシで保存されている.

BD1 がトウモロコシの苞穎の腋部で発現し, *FZP* がイネの副護穎の腋部で発現するため, イネの副護穎はトウモロコシの苞穎に相当することが明らかとなった (Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2003). *FZP* は護穎では発現しないため, イネの護穎は苞穎とは異なる器官であると考えられる. さらに, イネの長護穎変異体 *long sterile lemma (gl)* の解析から, イネの祖先種では小穂に 3 つ形成されていた小花のうち基部側 2 つが進化の過程で退化し, *G1* 遺伝子の機能獲得によって不稔小花の外穎の発達が抑制され, 現在のイネの護穎になったという考えが支持された (Arber, 1934; Yoshida et al., 2009).

小花の器官形成においては, イネ科植物一般に *LHS1/OsMADS1* 相同遺伝子の発現パターンと外穎の形成に強い関連があることが報告されている (Malcomber and Kellogg, 2004). また, 内穎の分化には, イネでは *MOSAIC FLORAL ORGANS 1 (MFO1/OsMADS6)* が必要である (Ohmori et al., 2009). 機能解析は行なわれていないが, 他の植物でも *MFO1* と相同性の高い *AGAMOUS LIKE 6 (AGL6)* が内穎の決定に重要であることが発現パターンから類推されている (Reinheimer and Kellogg, 2009). さらに, 外穎と内穎の分化には *APETALLA 1/FRUITFULL (API/FUL)* 遺伝子が関わる可能性が示唆されており, *LHS1*, *FUL1*, *FUL2* 遺伝子の発現パターンの重なり方の種による違いが, 小穂のなかでの小花のパターニングに関与すると推測されている (Preston and Kellogg, 2007). 花器官形成では, シロイヌナズナなどを用いた研究から提唱された ABCE モデルと同様の制御メカニズムがはたらく (Kater et al., 2006; Yamaguchi and Hirano, 2006). 最終的に花器官が分化したあと小花メリステムの活性が失われることで, 小花の有限性が決定する.

本章では, 小穂構造の決定におけるイネ *SEP* 遺伝子の機能の解明を目指して解析を行なった.

材料と方法

植物材料と育成

lhs1/osmads1 と *osmads5* 変異体として、独立行政法人農業生物資源研究所の *Tos17* ミュータントパネルの NG7558 と NC5003 を用いた (Agrawal et al., 2005). これらの系統を交配することで, *lhs1/osmads1 osmads5* 二重変異体を作出した. これらの植物を, 東京大学農学部弥生キャンパス内の温室で育成し, 観察に用いた. なお, ミュータントパネルの変異体の遺伝子型の決定には以下のプライマーセットを用いた. NG7558 では, 増幅した領域に 39 bp の欠失があるため多型が検出される. NC5003 では, 野生型のゲノムと *Tos17* が挿入されているゲノムから異なる大きさの DNA 断片が増幅されるため, 多型を検出することができる.

Primer name	5' - 3'
NG7558-F	GTGCACATATGACAAACACT
NG7558-R	CGTGAAACATTTTAGCAGCC
NC5003-F	GTGGGATCTTCTCAGAAAGC
NC5003-R	GTGTCAAGCGGGAATCAAGC
Tos17-Left	ATTGTTAGGTTGCAAGTTAGTTAAGA

系統解析

MADS box 転写因子のアミノ酸配列を, National Center of Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より取得した. MADS box 転写因子の MADS ドメインと I ドメイン, K ドメインを用いて, DNA Data Bank of Japan (DDBJ; <http://vip05.nig.ac.jp/>) の Clustal W によって系統解析を行ない, 近隣結合法によって系統樹を作成した.

遺伝子発現解析

野生型イネ (日本晴) の茎頂を実体顕微鏡下で採取し, そこから総 RNA を Plant RNA Isolation Mini Kit (Agilent) を用いて抽出した. RNA サンプルを DNase I 処理した後, SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) を用いて first-strand cDNA を合成した. この cDNA を鋳型にして, 下記のプライマーセットで RT-PCR を行なった. LightCycler 480 system (Roche Applied Science, Germany) を用いて, mRNA の相対的蓄積量を測定した. こ

のとき *ACTIN* 遺伝子の転写レベルを内部標準とした.

Target	5' - 3'
<i>PAP2</i>	AGCTCCACTGGCTACAAATGA
	AGGTCGCAGAGTTCATCAAG
<i>LHS1/OsMADS1</i>	GTGACCATTCCCTGCAGATT
	GTCTGCTGCTTCATTGCTCA
<i>OsMADS5</i>	TTGCAACTACAACCTTAACTCATGT
	GCAGCATTCATCAATCAAACC
<i>OsMADS7</i>	GTGGCAACGGATTCTTCC
	CGCATGAGTTGTTCATCTGC
<i>OsMADS8</i>	ACGGAGCTTCAGAGAAAGGA
	CCTGCTCCCACACTTGCT
<i>ACTIN</i>	GCCGTCCTCTCTCTGTATGC
	GGGGACAGTGTGGCTGAC

In situ ハイブリダイゼーション

野生型イネ (日本晴) の生殖成長相の茎頂部分を, 外側の硬い葉を取り除き, 3~4 枚程度若い葉が残るようにしてサンプリングし, FAA 固定液 [5% Formaldehyde, 5% Acetate, 45% Ethanol] で固定した後, エタノールシリーズ (50%, 40%, 25%) で脱水すると同時に, t-ブチルアルコールに置換した. これをパラフィン (Paraplast Plus, McCormick Scientific/Leica) に置換, 包埋したものをサンプルブロックとして, 8~10 μm の厚さの切片を作成した.

また, ディゴキシングニン (Digoxigenin) 標識された *LHS1/OsMADS1* と *OsMADS5* のアンチセンス鎖 RNA プロブは, それぞれ cDNA クローン AK070981 と AK064184 を鋳型として, *in vitro* 転写により合成された.

これらを用いて, *in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫学的検出を, Kyoizuka et al., (1998) に準拠して実施した.

RNAi による *OsMADS7* と *OsMADS8* の遺伝子抑制

OsMADS7 と *OsMADS8* の転写抑制を行なうため, コーディング領域や 3'UTR をトリガーとした RNAi を行なった. トリガー領域を下記のプライマーセットで増幅し,

pENTR/D-TOPO (Invitrogen, USA) にサブクローニングした. この断片を, LR 反応により pANDA ベクター (Miki et al., 2005; Miki and Shimamoto, 2004) へ入れ替えた. 完成したベクターをアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, EHA105) に導入した後, 野生型イネ (日本晴) のカルスに感染させて形質転換を行なった.

Primer name	5' - 3'
OsMADS7-F+CACC	CACCGTGAAGATCTTGATTCATTAG
OsMADS7-R	CTCCAATTAAGTAGCTAGCC
OsMADS8-F+CACC	CACCGGCACATTAGATCCACAAGG
OsMADS8-R	GGTAATTAAACCTCGAC

結果

イネ科植物の *SEP* 遺伝子は 3 つのサブグループに分類される

PAP2 のシロイヌナズナ相同遺伝子である *SEP* 遺伝子群 (*SEP1/2/3/4*) は, 花器官アイデンティティの決定に必要であると同時に, 花メリステムの決定に寄与する (Pelaz et al., 2000; Ditta et al., 2004). また, シロイヌナズナ以外の植物種でも, *SEP* グループ遺伝子は, 花器官アイデンティティの決定, 果実の成熟, 花序の形態形成など生殖成長の制御に重要である (Malcomber and Kellogg, 2005). *SEP* 遺伝子は系統解析により, *SEP3* サブグループ (図 2-1, 青網掛) と *LOFSEP* サブグループ (図 2-1, 赤網掛) に大別される (Zahn et al., 2005; Malcomber and Kellogg, 2005; 図 2-1). *LOFSEP* サブグループの遺伝子は, さらに双子葉植物の遺伝子群とイネ科植物の遺伝子群に二分される. イネには 5 つの *SEP* 遺伝子が存在しており, *OsMADS7* と *OsMADS8* が *SEP3* サブグループに属する. また, *LOFSEP* サブグループには *PAP2* と *LHS1/OsMADS1*, *OsMADS5* が属する. *LHS1/OsMADS1* と *OsMADS5* は同じクレードに分類されるが, *PAP2* は異なるクレード上にある.

シロイヌナズナの 4 つの *SEP* 遺伝子は冗長的に機能する (Pelaz et al., 2001; Ditta et al., 2004). しかし, イネの 5 つの *SEP* 遺伝子については, *pap2-1* や *lhs1/osmads1* が単独の変異体でそれぞれ異なった表現型を示すことから (本研究第 1 章; Jeon et al., 2000; Agrawal et al., 2005; Prasad et al., 2005), 互いに独立した機能をもつことが推測される.

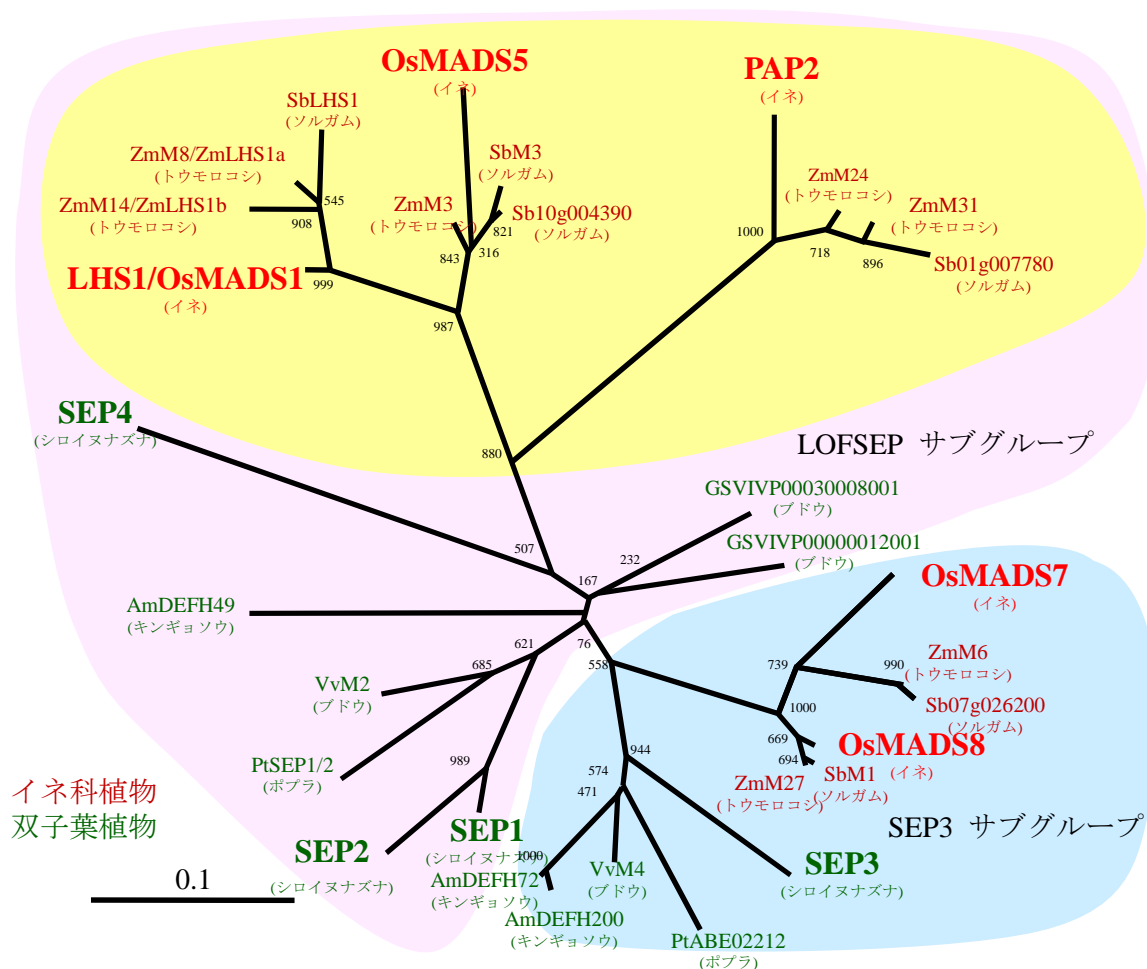


図2-1 SEP遺伝子の系統樹

イネ科植物と双子葉植物のSEP遺伝子について、MADSドメイン、IドメインとKドメインのアミノ酸配列を用いて、Clustal Wを用いて隣接結合法で系統樹を作成した。各節には1,000反復のブートストラップ値を示した。赤字はイネ科植物の遺伝子、緑字は双子葉植物の遺伝子を表し、太字はイネ(赤)とシロイヌナズナ(緑)を表す。

SEPグループのMADS box転写因子は、2つのサブグループに分かれる。OsMADS7とOsMADS8が含まれるSEP3サブグループと、PAP2とLHS1/OsMADS1、OsMADS5が含まれるLOFSEPサブグループである (Zahn et al., 2005; Malcomber and Kellogg, 2005)

イネ *SEP* 遺伝子の発現

イネの穂形成における *SEP* 遺伝子の機能を総合的に理解するために、5 つの *SEP* 遺伝子の転写レベルを解析した。すでに Arora et al. (2007) により、イネの幼穂の発達段階別の MADS box 転写因子の発現解析がなされているが、その報告では 0-3 cm の発達段階の幼穂が解析に用いられた。しかし、小穂や花器官分化の重要なステップは幼穂が長さ 2 mm に発達するまでに終了し、その後は成熟と器官の伸長成長が起こる。このため、器官分化における遺伝子発現を解析するには、より早い生育段階での遺伝子発現を解析する必要があると考えた。そこで、Furutani et al. (2006) にしたがって、0.1-1 mm の幼穂を発達段階別に 5 つのステージに分けて解析した (図 2-2A)。

その結果、*PAP2* に関してはステージ 1 (1 次枝梗分化期初期) では低いレベルの発現が検出された。ステージ 2 (1 次枝梗分化期後期) からステージ 3 (2 次枝梗分化期) にかけて *PAP2* の低い発現が続き、ステージ 4 (小穂分化期) 以降で転写レベルが上昇することが明らかとなった。*LHS1/OsMADS1* は、*PAP2* が早期に発現開始することとは対照的に、ステージ 4 から発現シグナルが検出された。また、ステージ 5 (花器官分化期) では高い転写レベルを呈していた。*OsMADS5* は、*PAP2/OsMADS34* と同様の発現パターンを示していたが、転写レベルは極めて低かった。*OsMADS7* と *OsMADS8* は、どちらも Pelucchi et al. (2002) の報告と一致して穂形成の初期には発現が検出されず、ステージ 4 でわずかなシグナルが検出され、ステージ 5 で発現レベルが顕著に増加した。

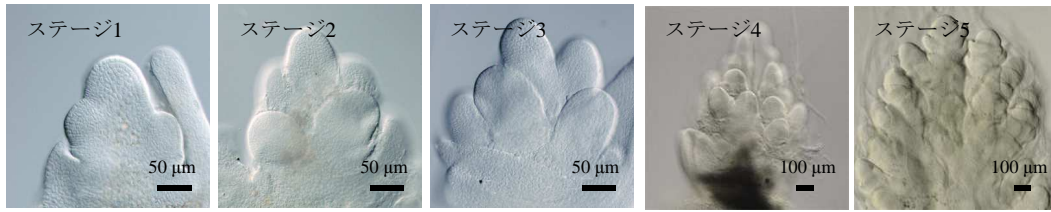
次に、*LHS1/OsMADS1* と *OsMADS5* の詳細な発現部位を特定するために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行なった。*LHS1/OsMADS1* のシグナルは、枝梗メリステムでは検出されず、小花メリステム全域で観察された (図 2-3A-C)。*LHS1/OsMADS1* の発現は、生育段階が進むとメリステム領域では検出されず、外穎と内穎に限定された (Prasad et al., 2005; 図 2-3D, E)。*OsMADS5* は、*LHS1/OsMADS1* より早く発現を開始するが、発現部位は小花メリステムに限られており、内穎原基でもシグナルが観察された (図 2-3F-J)。*PAP2* については、p*PAP2::GUS* の解析結果より、生殖成長相への転換後のメリステム全体と小穂メリステムおよび副護穎の先端で発現することが明らかとなった (図 1-9)。

以上の結果より、イネの 5 つの *SEP* 遺伝子は異なるタイミングと領域で発現しており、それぞれ小穂形成では異なる機能をもつという予想が支持された。

LOFSEP 遺伝子は小穂構造の形成を制御する

イネの 3 つの *LOFSEP* 遺伝子のうち、*PAP2* は小穂アイデンティティの決定に必要であることが明らかとなった (第 1 章)。*LHS1/OsMADS1* は外穎と内穎の決定ならびに小花メリ

A



B

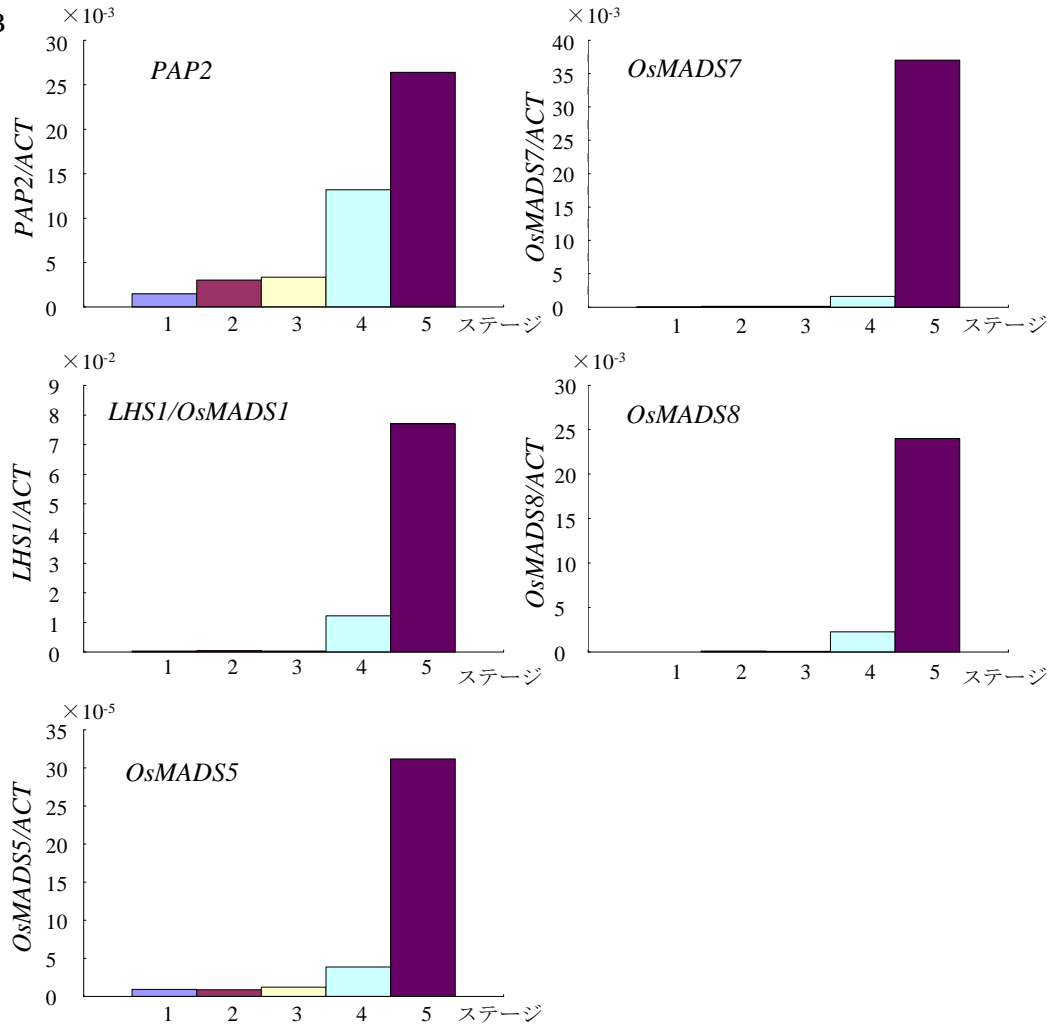


図2-2 5つのイネSEP遺伝子の穂の発達段階別の発現パターン

(A) Furutani et al. (2006) によるイネ穂の発達段階の分類.

(B) 穂の発達段階別に遺伝子の転写レベルを定量的RT-PCRで測定した. 5つの発達段階は, Furutani et al. (2006) にしたがって分類した. カッコ内にはIkeda et al. (2004) による穂の発達段階の分類との対応を示す.

ステージ1: 転換後, 花序メリステム~1次枝梗分化期初期 (In1 ~ In2)

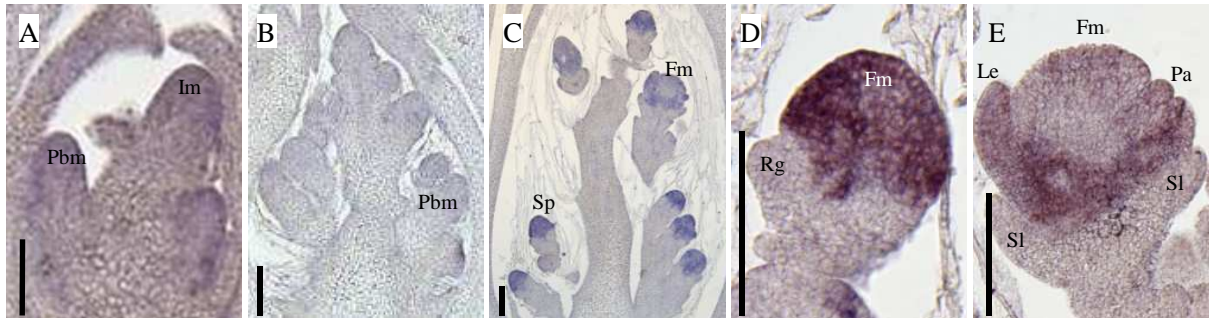
ステージ2: 1次枝梗分化期後期~2次枝梗分化期初期 (In3 ~ In4)

ステージ3: 2次枝梗分化期 (In5)

ステージ4: 小穂分化期 (In6)

ステージ5: 花器官分化期 (In7)

LHS1/OsMADS1



OsMADS5

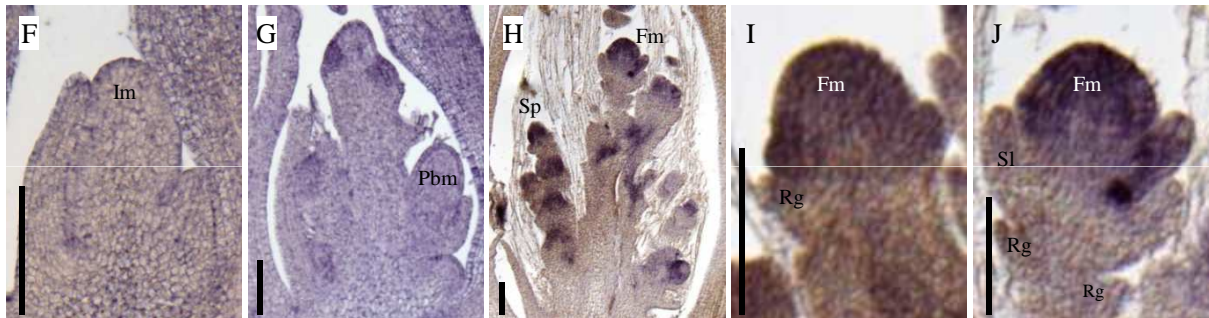


図2-3 LOFSEP遺伝子の茎頂での発現パターン

(A-E) *LHS1/OsMADS1*の転写部位. (A) ステージ2, (B) ステージ3, (C) ステージ5, (D) 小穂メリステム, (E) 小花メリステム.

(F-J) *OsMADS5*の転写部位. (F) ステージ1, (G) ステージ3, (H) ステージ4, (I, J) 花メリステム.

Im: 花序メリステム, Pbm: 1次枝梗メリステム, Sp: 小穂メリステム, Fm: 小花メリステム, Rg: 副護穎, Sl: 護穎, Le: 外穎, Pa: 内穎. Scale Bar: 100 μm

ステムの有限性に寄与することがすでに報告されている (Jeon et al., 2000; Agrawal et al., 2005; Prasad et al., 2005; Ohmori et al., 2009). 一方, *LHS1/OsMADS1* のパラログである *OsMADS5* については, 変異体が異常を示さないため機能は知られていなかった (Agrawal et al., 2005). そこで, *osmads5* 単独変異体が異常を示さなかったのは, *OsMADS5* が *LHS1/OsMADS1* と冗長的に機能しているためであると推測し, *lhs1/osmads1* と *osmads5* の二重変異体を作成した. ここでは, *lhs1/osmads1* と *osmads5* 変異体として, *Tos17* ミュータントパネルの NG7558 と NC5003 を用いた. NG7558 は, *LHS1/OsMADS1* 遺伝子の第 6 エキソンと第 6 エキシソンの境界部をまたぐように 39 bp (エキソンに 20 bp, イントロンに 19 bp) の欠失があり, *lhs1/osmads1* 変異体の強い異常を示す系統である. また, NC5003 は, *OsMADS5* の第 4 エキシソンに *Tos17* が挿入され, *OsMADS5* の転写レベルが検出されない系統である (Agrawal et al., 2005).

lhs1/osmads1, *osmads5* および二重変異体のいずれも, 1 次枝梗や 2 次枝梗などの穂の分枝パターンに異常はみられなかった (図 2-4A, B). *lhs1/osmads1* 単独変異体では, 過去に報告されているように, 外穎や内穎, 花器官が正常に形成されなかった (図 2-4C). 多くの場合, 護穎状の器官の反復した形成や, 外穎ほど硬化していない葉状器官 (図 2-4C, 赤鏽) の形成などの異常が認められた. また, *osmads5* 単独変異体においても, すでに報告されているとおり異常はみられなかった. 二重変異体では, *lhs1/osmads1* で形成された葉状器官は形成されず, 護穎状の薄い器官が繰り返し形成されており, 有限性が失われた (図 2-4C, 黄鏽). また, 1 つの小穂に, 小花様のまとまりが複数形成される場合もあり, 二重変異体では *lhs1/osmads1* の異常が亢進された (図 2-4C 白鏽). この結果から, これまで機能していないと考えられてきた *OsMADS5* は, *LHS1/OsMADS1* と冗長的に機能することが明らかとなった. また, *lhs1/osmads1* 単独変異体と二重変異体のいずれの場合も, 副護穎については異常が認められなかった. 以上の解析結果から, *LHS1/OsMADS1* と *OsMADS5* はどちらも小穂アイデンティティの決定には関与せず, 小花アイデンティティの決定, 外穎と内穎の決定ならびに小花メリステムの有限性を制御することが明らかとなった.

イネ *SEP3* 遺伝子は花器官形成に寄与する

SEP3 サブクレードに含まれる *OsMADS7* と *OsMADS8* は, 花器官分化期に小花メリステムと花器官原基で発現することが知られていた (Pelucchi et al. 2002). 本研究においても, 花器官分化期に発現が開始することを確認した (図 2-2). そのため, これら 2 つの遺伝子は花器官形成に寄与すると推測し, RNAi 法を用いて遺伝子発現を抑制して表現型を観察した. *OsMADS7* と *OsMADS8* を同時に遺伝子抑制するために, *OsMADS7* と *OsMADS8* 個々



図2-4 *OsMADS5*の変異による*lhs1/osmads1*の異常の亢進

(A) 穂の形態.

(B) 1次枝梗への小穂の着生パターン.

(C) 小穂の形態. *osmads5*には異常はみられなかった. *lhs/osmads1*では, 外穎や内穎は形成されず, やや厚い穎状の器官 (赤鏃) や, 護穎のような器官が繰り返し形成された. 二重変異体では, 緑色の厚い穎状の器官は形成されず, 護穎のような薄い器官が繰り返し形成された (黄鏃). また, 1つの小穂の中に小花様のまとまり (白鏃) が複数形成されることもあった.

の RNAi ベクターをもつアグロバクテリウムを混合して形質転換に用いた。得られた再分化個体から、どちらか一方のベクターが導入された系統と両方のベクターが導入された系統を選抜して解析に供した。

OsMADS7 のみが抑制された形質転換体を 15 系統選抜した。15 系統とも鱗被と雌蕊の数は正常であった (図 2-5A, D)。1 系統 (7-8) では、27.2%の小花で野生型では 6 本形成される雄蕊が 2 本に減少した (図 2-5B)。また、別の 1 系統 (7-20) では、9.1%の小花で野生型では 2 本形成される柱頭が 3 本に増加した (図 2-5D)。*OsMADS8* のみを抑制した形質転換体が 15 系統選抜された。15 系統とも鱗被と雄蕊の器官数は正常であった (図 2-5A, B)。しかし、3 系統 (8-2/3/4) では野生型で 1 つ形成される雌蕊の数が 2~3 つに増加し、5 系統 (8-2/3/4/13/15) で柱頭の数が 3~7 本に増加した (図 2-5C, D)。これに対し、*OsMADS7* と *OsMADS8* の両方の遺伝子発現を同時に抑制した 4 系統の形質転換体では、花器官形成に顕著な異常が認められた (図 2-5; 図 2-6)。二重抑制体の 1 系統 (double-2) では、野生型では 2 つ形成される鱗被が 3~4 個に増加した (図 2-5A)。同じ系統 (double-2) で、雄蕊が 7 本に増加する場合と 3~4 本に減少する場合とどちらも観察された (図 2-5B)。また、雄蕊の基部が鱗被状に膨らむことも観察された (図 2-6B, 鏟)。3 系統 (double-1/2/3) で雌蕊は顕著に 2~3 個に増加しており、柱頭の数でも 3~8 本の増加を示した (図 2-6C, D)。二重抑制体における雌蕊の増加においては、ひとつの円周上に複数の雌蕊が分化するのではなく、形成された雌蕊の内側で新たな雌蕊の分化が繰り返されており、有限性が失われた状態であった。すなわち、*OsMADS7* と *OsMADS8* のどちらか一方のみの発現を抑制した場合には花器官にわずかな異常がみられたが、両方の発現を同時に抑制した場合には鱗被より内側のすべての花器官で著しい異常が現れた。また、二重抑制体はすべて不稔であった。もっとも強い異常を示した二重抑制体においても、副護穎、護穎、外穎および内穎には異常は認められなかった (図 2-6A)。このため、*OsMADS7* と *OsMADS8* は、冗長的に花器官形成を制御する遺伝子であることが明らかとなった。

考察

本章では、*PAP2* を含むイネの *SEP* 遺伝子群の機能を総合的に理解するために、いまだに明らかでない *OsMADS5*, *OsMADS7*, *OsMADS8* の機能を解析した。そのために、*SEP* 遺伝子の発現パターンを特定し、サブグループごとに遺伝子の機能抑制を行なった。

LOFSEP サブグループに属する *OsMADS5* については、単独変異体が異常を示さないこ

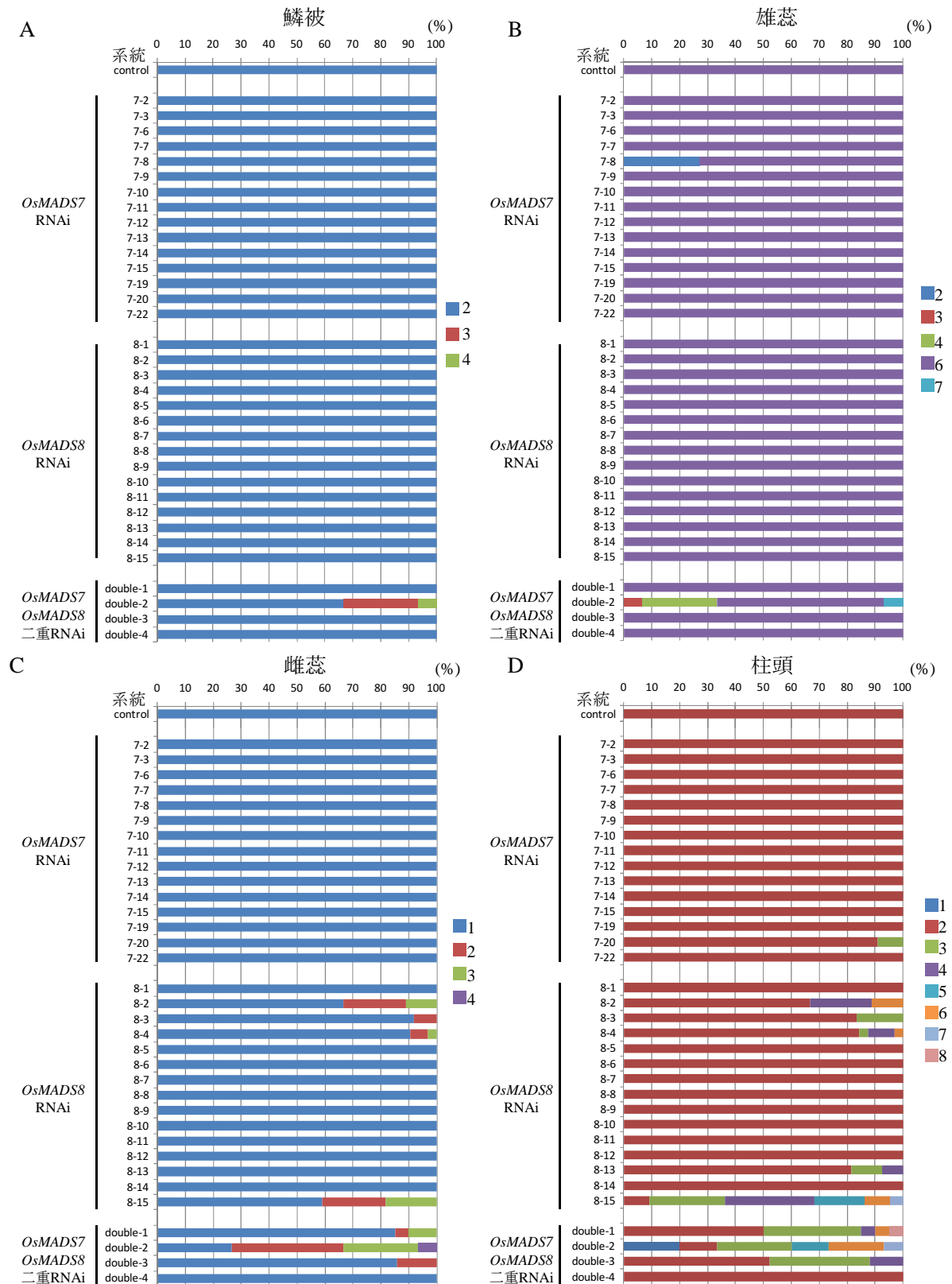


図2-5 *SEP3*遺伝子による花器官の制御

(A-D) RNAi系統における花器官数の測定. (A) 鱗被, (B) 雄蕊, (C) 雌蕊, (D) 柱頭について, 形質転換系統ごとに頻度を示した. 各系統10個以上の小花を観察した.

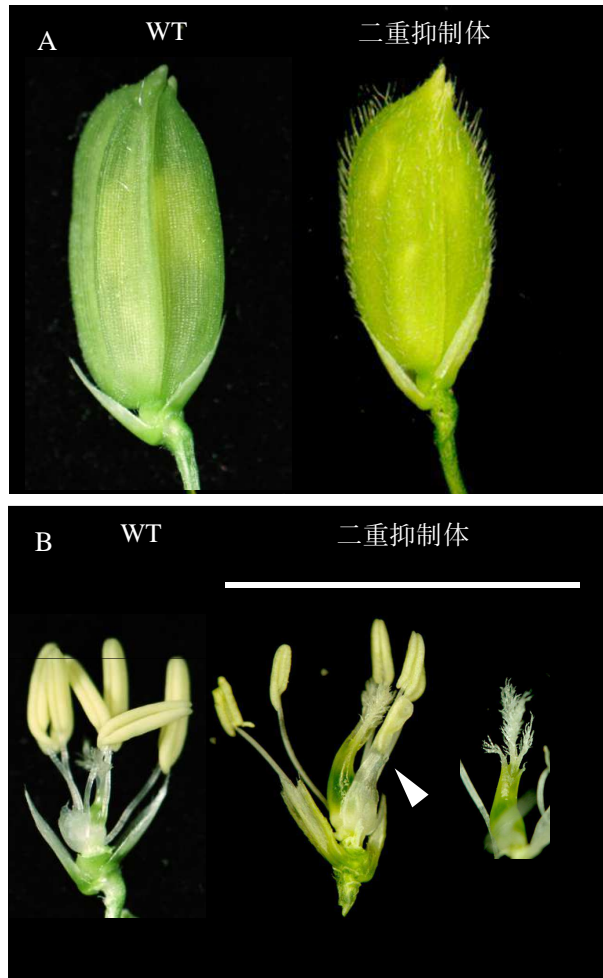


図2-6 *SEP3*遺伝子による花器官の制御

(A) 野生型と*OsMADS7 OsMADS8*二重抑制体の小穂の外観.

(B) 野生型と*OsMADS7 OsMADS8*二重抑制体の花器官の形態. 外穎と内穎を取り除いた. 鋸は鱗被様に膨らんだ雄蕊の基部を指す.

とから、これまでその機能は明らかでなかった。その原因については、*OsMADS5* が機能していない偽遺伝子であるか、相同性の高い *LHS1/OsMADS1* によって欠損した *OsMADS5* の機能が相補されるという 2 つの可能性が考えられる。本章で発現パターンを解析したところ、*OsMADS5* は小花メリステムや内穎原基で発現することが明らかとなった (図 2-4)。また、*lhs1/osmads1 osmads5* 二重変異体を作出したところ、*lhs1/osmads1* の異常が亢進して薄い穎状器官が繰り返し形成され、小花メリステムの有限性が喪失した (図 2-4)。これらの結果から、*OsMADS5* 遺伝子は *LHS1/OsMADS1* と冗長的に小花アイデンティティを制御することが明らかとなった。*lhs1/osmads1* が単独変異体で異常を示すのに対し、*osmads5* は単独では異常を示さないことから、*LHS1/OsMADS1* の寄与は大きい *OsMADS5* の寄与は小さいといえる。SEP3 サブグループ遺伝子である *OsMADS7* と *OsMADS8* が、鱗被より内側の器官形成時に小花メリステムや花器官原基で発現することが報告されている (Pelucci et al., 2002)。機能は報告されていなかったが、この発現パターンからこれら 2 つの遺伝子は鱗被より内側の花器官形成に関わると予想されていた。*OsMADS7* と *OsMADS8* の遺伝子発現を同時に抑制した解析によって、これら 2 つの遺伝子は小穂や小花アイデンティティの決定ではなく、花器官アイデンティティを制御することが明らかとなった (図 2-5; 図 2-6)。以上より、イネでは、異なるグループの *SEP* 遺伝子がそれぞれ異なる領域で発現して機能することで、小穂構造が決定されと考えられる。すなわち、*PAP2* が作用して小穂メリステムが決定された後、*LHS1/OsMADS1* と *OsMADS5* の機能によって小花メリステムが決定する。小花メリステムで *OsMADS7* と *OsMADS8* が機能して花器官が形成される (図 2-7)。特に、イネ科植物に特異的な LOFSEP グループに属する *PAP2*、*LHS1/OsMADS1*、*OsMADS5* が小穂アイデンティティの決定、小花アイデンティティの決定というイネ科植物に特徴的な成育過程を制御することが明らかとなった。これは、イネ科植物における *SEP* 遺伝子の機能の多様化が、イネ科植物に特徴的な小穂構造の成立に貢献したことを示唆する。

Cui et al., (2010) によって、RNAi 法を用いたイネの *SEP* 遺伝子の発現抑制が行われた。この報告では、*OsMADS7* と *OsMADS8* の二重発現抑制体とともに、*OsMADS7* と *OsMADS8*、*LHS1/OsMADS1*、*OsMADS5* の四重発現抑制体が作出された。しかし、*LHS1/OsMADS1* と *OsMADS5* の二重抑制体は作出されなかった。このため、*LHS1/OsMADS1* と *OsMADS5* の機能と他の *SEP* 遺伝子の違いは明らかにされていない。*OsMADS7*、*OsMADS8* の二重抑制体では、本研究と同様の花器官形成の異常を呈した。また、四重抑制体では花器官が分化せず、薄い穎状の構造や、小穂の内部に異所的な小穂が繰り返し形成された。これは、本研究で *lhs1/osmads1 osmads5* 二重変異体の小穂で、小花様のまとまりが複数形成される場合

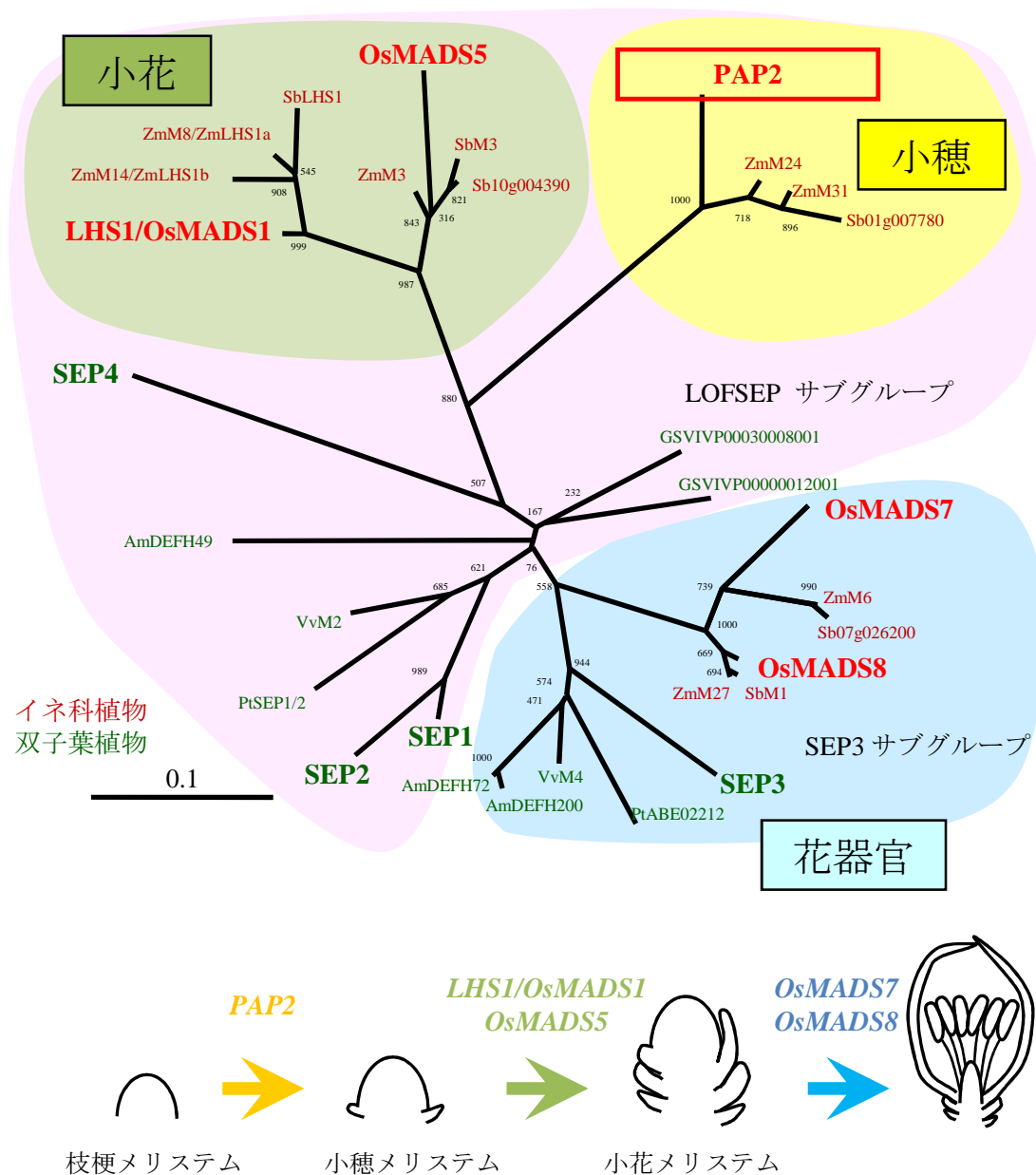


図2-7 イネの*SEP*遺伝子の小穂形成における機能

イネには3つのサブグループの*SEP*遺伝子があり、LOFSEP遺伝子である*PAP2*、*LHS1/OsMADS1*、*OsMADS5*は系統的にイネ科植物特異的な遺伝子である。生殖成長への相転換後、3つの段階を経て小穂形成にいたる。このとき、3つのグループの*SEP*遺伝子が、各段階の進行を制御する。まず、小穂メリステムアイデンティティの獲得に*PAP2*が作用し、次に小花メリステムアイデンティティの決定には*LHS1/OsMADS*と*OsMADS5*が作用する。最後に花器官の分化には*OsMADS7*と*OsMADS8*が機能する。

があったのと一致する (図 2-4). Cui et al., (2010) は、イネの 4 つの *SEP* 遺伝子が花器官形成に対して冗長的に機能すると述べており、二重抑制体と四重抑制体の表現型の違いを *SEP* 遺伝子の発現の総量の違いによるものだと説明している。その結果を本研究論文に沿ってとらえると、四重抑制体では小花を決定する機能が失われると同時に花器官の決定も阻害されたため、最後に決定された穎状器官と小穂様の構造が反復して形成されたと考えることができる。

小花アイデンティティの決定には、*FZP*, *SNB* および *OsIDS1* が必要である (Komatsu et al., 2003; Lee et al., 2006; Lee and An, 2011). これらの遺伝子の機能が損なわれると、小穂では副護穎が繰り返し形成される。このことは、*fzp* や *snb*, *osids1* 変異体では、小穂形成プログラムの中で小穂アイデンティティを獲得して副護穎が分化する段階から、護穎が分化する段階へ転換しないことを示している。護穎は不稔小花の外穎に相当する器官である (Arber, 1934; Yoshida et al., 2009). このため、*FZP* や *SNB* によって決定される護穎を分化する段階は、不稔小花を分化する段階である。これに対し、*LHS1/OsMADS1* と *OsMADS5* が決定するのは、小穂先端に形成される完全な小花を分化する段階である。それは、*LHS1/OsMADS1* や *OsMADS5* の機能が欠損しても、護穎は形成されるからである。すなわち、イネの小穂形成には、小穂アイデンティティの獲得 (副護穎の分化) のあと、不稔小花の分化 (護穎の分化) と小花の分化 (外穎の分化) という段階があり、それぞれ異なる遺伝子によって制御されることが明らかとなった。

野生型のイネでは、小穂アイデンティティの獲得以降、副護穎や護穎の形成、小花アイデンティティの決定、花器官の分化が連続的に起こる。この小穂形成プログラムのなかのある段階を制御する遺伝子の機能が失われたとき、失われた遺伝子が決定する成育段階より 1 つ手前の段階が繰り返されることが観察されている。その例として、*lhs1/osmads1* や *lhs1/osmads1 osmads5* 二重変異体の小穂で護穎状の器官が形成され続けることや、*fzp* や *snb* 変異体で副護穎が繰り返し形成されることが挙げられる (Komatsu et al., 2003; Lee et al., 2006; 図 2-4). 野生型植物では、花器官分化の過程でメリステム活性が消失することによって、花メリステムは有限成長を示す。しかし、ここで述べた変異体では、花器官分化まで生育が進まず、メリステム活性が保たれることが原因となって、最後に決定された器官を反復して形成する異常を示すものと考えられる。これに関して、シロイヌナズナでは、*KNUCKLES* 遺伝子が花器官のホメオティック遺伝子 *AGAMOUS* によって誘導され、その作用によりメリステム活性に必要な *WUSCHEL* 遺伝子の発現が抑制されることにより、花メリステムは有限成長を示す (Sun et al., 2009). イネではこのような因子は同定されていないが、同様のメカニズムが作用すると思われる。

第3章 生殖成長への相転換を制御する *PAP2* と *OsFULs* 遺伝子

緒言

植物の形態形成において成長相の転換は重要な要素である。それは、成長相の変化によって分化する器官が変化し、植物の形態の複雑さを生み出すからである。栄養成長から生殖成長への相転換は花成と呼ばれ、植物の生殖を成功させる上で重要なできごとである。花成は、日長や温度などの環境的要因や植物の成長に応答して誘導される。花成を起こす条件が整うと複数の花成誘導シグナルが茎頂メリステムに集約されることで、茎頂メリステムは生殖成長相へ転換する。生殖成長を開始した茎頂メリステムは花序メリステムとなり、栄養成長のメリステムとは異なるはたらきを行なうようになる。

イネ科植物における生殖成長への相転換では、植物の形態に特徴的な変化がみられる。それは、葉序の変化や葉の大きさの変化、稈の節間伸長の開始などである。最初に観察される顕著な形態的变化は、茎頂メリステムの縦方向への伸長成長である。縦方向に伸長した茎頂メリステムは花序メリステムとして穂の形態形成を開始し、イネでは葉序は 1/2 互生から 2/5 螺旋生へと変化する (Itoh et al., 2005)。このような茎頂メリステムの性質に変化をもたらす因子の解明は、穂形成の遺伝子メカニズムを理解する上で 1 つの課題である。

花成の制御は、主にシロイヌナズナを用いた研究によって過去 20 年の間に急速に研究が進んだ分野である。特に、日長に反応して花成を引き起こすフロリゲンの実体が FT タンパク質であることの解明は、さらなる研究の突破口となった。FT は葉で転写、翻訳され、FT タンパク質が葉から茎頂メリステムまで長距離移動する (Corbesier et al., 2007)。茎頂メリステムで FT は、b-ZIP 型の転写因子である FD タンパク質と相互作用して、下流因子である *APETALLA 1* (*API*) や *FRUITFULL* (*FUL*) の遺伝子発現を誘導する (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005)。API や FUL は花メリステムの決定に必要な「花メリステムアイデンティティ遺伝子」である (Bowman et al., 1993; Ferrández et al., 2000)。 *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) は、生殖成長への相転換に伴って茎頂メリステムで発現誘導される遺伝子で、花成を促進する (Lee et al., 2000; Borner et al., 2000)。 *SOC1* は、 *LEAFY* (*LFY*) や *API* の発現を促進して花メリステムの決定を促進する (Liu et al., 2008; Lee et al., 2008)。すなわち、FT と *SOC1* が生殖成長への相転換の促進に中心的役割を果たし、その下流で *API/FUL* や *LFY* の機能が誘導されることで花メリステムが決定される。

イネ *Hd3a* および *RFT1* 遺伝子は FT のオーソログであり、葉で誘導された *Hd3a/RFT1*

タンパク質が茎頂メリステムまで移動することで花成が誘導される (Tamaki et al., 2007; Komiya et al., 2008, 2009). Hd3a タンパク質は茎頂メリステムで 14-3-3 タンパク質と相互作用し, この複合体が FD のイネオーソログである OsFD と結合して下流の遺伝子を制御することが明らかとなった (Taoka et al., 2011). OsFD の下流で機能する遺伝子は, イネ茎頂メリステムで栄養成長から生殖成長への相転換を促進する遺伝子である. そのような遺伝子を同定して機能を解明することが, イネ穂形成の分子メカニズムの理解に必要である. *API/FUL* 遺伝子と高い相同性を示す *OsMADS14* と *OsMADS15* は, Hd3a/OsFD 複合体によって誘導される遺伝子であると考えられている. それは, *Hd3a/RFT1* の発現抑制体でこれらの遺伝子発現が抑制されるからである (Komiya et al., 2008, 2009). また, *OsMADS15* は *Hd3a* 存在下で OsFD によって発現誘導される (Taoka et al., 2011). このため, *OsMADS14* や *OsMADS15* は, イネで茎頂メリステムのアイデンティティを生殖成長へ転換させる上で重要な遺伝子であると推測される. しかし, *OsMADS14* については変異体が知られておらず, 機能は不明である. また, 内穎形成に異常を示す *degenerative palea (dep)* 変異体の原因遺伝子が *OsMADS15* であることが報告されたが, 相転換への機能は明らかにされていない (Wang et al., 2010). すなわち, フロリゲンである Hd3a/RFT1 シグナルによって茎頂メリステムを生殖成長へ相転換させる遺伝子ネットワークの全容は知られていない. そこで, 茎頂メリステムで生殖成長相への転換を制御する遺伝子の同定と機能解明が, イネの茎頂メリステムの相転換と穂形成の制御メカニズムを理解するために重要である.

本章では, *PANICLE PHYTOMER 2 (PAP2)* 遺伝子の発現解析によって, *PAP2* 遺伝子が生殖成長への相転換に寄与する可能性を見出した. これに引き続き, *Hd3a* の誘導に始まる生殖成長相への転換制御メカニズムと, その後の穂形成の制御メカニズムの解明を目指した. このため, 生殖成長への相転換に伴って茎頂メリステムで発現する遺伝子を同定し, その機能や *PAP2* との相互関係を解析した.

材料と方法

植物材料と育成

promoter::GUS を用いた遺伝子発現解析には, 発芽後 7 日間長日条件 (14 hrs light 28°C, 10 hrs dark 24°C) で育成した後, 短日条件 (12 hrs light 28°C, 12 hrs dark 24°C) に設定した人工気象器で育成した植物を用いた.

三重抑制体の穂の形態観察および四重抑制体の茎頂の観察と切片作成, 走査型電子顕微

鏡観察には、東京大学農学部弥生キャンパス内の P1P レベル人工気象室で自然日長で育成した植物を用いた。

成長相の転換時期を測る調査では、第 8 葉が抽出するまで長日条件 (14 hrs light 28°C, 10 hrs dark 24°C) で育成し、その後、短日条件 (12 hrs light 28°C, 12 hrs dark 24°C) に設定した人工気象器で育成した植物を用いた。

GUS 染色

第 1 章に記した方法と同様の方法により実施した。

Laser Micro Dissection (LMD) マイクロアレイ解析

LMD マイクロアレイ解析は、独立行政法人農業生物資源研究所の長村吉晃博士と佐藤豊博士により実施された。以下に、参考までに解析の方法を記す。

LMD マイクロアレイに供された植物は、2008 年に筑波の水田で育成された。生育段階別に茎頂がサンプリングされた。サンプルは、Takahashi et al (2010) の方法に従って固定液 [75% Ethanol, 25% Acetate] で固定された後、microwave processor (Energy Beam Sciences) を用いてパラフィンに包埋された。パラフィンに包埋されたサンプルから、ミクロトーム (Leica, RM2255) で厚さ 10 µm の切片が作成された後、Verita Laser Microdissection System LCC1704 (Arcturus) を用いて LMD が実施された。

総 RNA は、Pico-PureTM RNA isolation kit (Arcturus) を用いて抽出された後、One-color spike-mix を加えることで標識反応に供された (Quick Amp Labeling Kit, One-color, Agilent Technologies)。Cyanine-3 (Cy3) 標識された cRNA サンプルを断片化した後、イネの 4x44K マイクロアレイスライド (Agilent; G2519F#15241) に 65°C で 17 時間ハイブリダイズされた。スライドは洗浄後に Agilent G2505B DNA マイクロアレイスキャナで読み取られ、Cy3 シグナルが検出された。読み取られたシグナル強度データは標準化を経て、遺伝子転写プロファイルとして供された。

系統解析

第 2 章に記した方法と同様の方法により実施した。

RNAi 法による *OsMADS14*, *OsMADS15*, *OsMADS18* 遺伝子の発現抑制

OsMADS14 のコーディング領域で、*OsMADS15* や *OsMADS18* と高い相同性を示す 520 bp の断片を、*OsMADS14/15/18i* のトリガー領域として用いた。この断片は、次のプライマー

セットを用いて増幅され、pZH2Bi KXB SpeBam ベクター (Kuroda et al., 2010) に *rice aspartic protease* 遺伝子のイントロンをはさんで、尾尾方向 (tail-to-tail direction) に導入されるようにクローニングされた。以上により作成されたベクターは、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所の吉田均博士より分与された。

Primer name	5' - 3'
OM14i-110XbaF	GCTCTAGAAAGGTGCAGCTGAAGCGGA
OM14i-630XbaR	GCTCTAGAACTTTCTGCTTCTCCACCAG

このベクターを導入したアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, EHA105) を野生型イネ (日本晴) カルスに感染させることで OsMADS14/15/18i 三重抑制体を作出し、*pap2-1* カルスに感染させることで四重抑制体を作出した。

遺伝子発現解析

植物の総 RNA を若い葉から Plant RNA Isolation Mini Kit (Agilent) を用いて抽出した。RNA サンプルを DNase I 処理した後、SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) を用いて first-strand cDNA を合成した。この cDNA を鋳型にして下記のプライマーセットで RT-PCR を行なった。Light Cycler 480 system (Roche Applied Science, Germany) を用いて mRNA の相対的蓄積量を測定した。このとき *UBQ* 遺伝子の転写レベルを内部標準とした。

Target	5' - 3'
<i>PAP2</i>	AGCTCCACTGGCTACAAATGA
	AGGTCGCAGAGTTCATCAAG
<i>OsMADS14</i>	TGAGCGCTACTCCTATGCAG
	GCCTTCAGTTTCCTATATTCGTG
<i>OsMADS15</i>	TGAGTCCATTTCCGAGCTG
	TCTTCTGCCTCTCCACCAGT
<i>OsMADS18</i>	ACCAAGGGCAAGCTCTACG
	CGCTGGTAGCGTTCAAGG
<i>Hd3a</i>	GCTCACTATCATCATCCAGCATG
	CCTTGCTCAGCTATTTAATTGCATAA

<i>RFT1</i>	TGACCTAGATTCAAAGTCTAATCCTT
	TGCCGGCCATGTCAAATTAATAAC
<i>UBQ</i>	AGAAGGAGTCCACCCTCCACC
	GCATCCAGCACAGTAAAACACG

走査型電子顕微鏡観察

第 1 章に記した方法と同様の方法により実施した。

In situ ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現解析

第 2 章に記した方法と同様の方法により実施した。

なお、ディゴキシゲニン (Digoxigenin) 標識された *APO1* のアンチセンス鎖 RNA プローブを, Ikeda et al. (2007) にしたがって, 全長 cDNA を鋳型として合成した。

酵母ツーハイブリッド

PAP2, *OsMADS14*, *OsMADS15* および *OsMADS18* のコーディング領域を, 以下のプライマーセットを用いて増幅した。次に, 得られた DNA 断片を pTA2 ベクター (東洋紡) と pBluescript にサブクローニングした。さらに, これらの DNA 領域を pGADT7 ならびに pGBKT7 に導入し, 酵母で発現させるベクターとした。各組み合わせのプラスミドを, MATCHMAKER™ Two-Hybrid System (CLONTECH) を用いて, 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, AH109) に共形質転換を行なった, CLONTECH 社が推奨する手順に従って, 分子間相互作用を検出した。

Primer name	5' - 3'
PAP2_ATG+NdeI	CATATGATGGGGCGAGGCAAGG
PAP2_TAG+EcoRI	GAATTCCTAGGCCATCCACTC
OsMADS14_ATG_NdeI	CATATGATGGGGCGGGGCAAGGTGCA
OsMADS14_1040R	TCTGAAGCCTCCTTAGCCGT
OsMADS15_ATG_EcoRI	GAATTCATGGGGCGGGGAAGGTGCA
OsMADS15_940R	ACGATGATCATCTTAAGCAT
OsMADS18-ATG-NdeI	CATATGATGGGGAGAGGGCCGGTG

OsMADS18-TGA-EcoRI GAATTCTCATGTGTGACTTGTCGG

遺伝子の一過的発現と共免疫沈降

エピトープタグ融合タンパク質を発現させるため、*PAP2*, *OsMADS14* および *OsMADS15* のコーディング領域を以下のプライマーセットで増幅し、pENTR/D-TOPO (Invitrogen, USA) にサブクローニングした。つぎに、LR クロナーゼミックス (Invitrogen, USA) を用いて、LR 反応によって pGWB11 (35S promoter, C-FLAG) ならびに pGWB17 (35S promoter, C-4xMyc) 組み換えた (Nakagawa et al., 2007)。

Primer name	5' - 3'
PAP2_ATG_CACC	CACCATGGGGCGAGGCAAGGTGGT
PAP2_1001R	GGCCATCCACTCAGGAGGAT
OsMADS14_ATG_CACC	CACCATGGGGCGGGGCAAGGTGCA
OsMADS14_1025R	GCCGTTGATGTGGCTCAGCA
OsMADS15_ATG_CACC	CACCATGGGGCGGGGGAAGGTGCA
OsMADS15_925R	AGCATTGAGGTGGCTCAGCA

これらのベクターを導入したアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, EHA105) を 2xYT 培地で一晚培養した後、室温で 3,000 g, 15 分の遠心によって集菌し、インフィルトレーションバッファー [10 mM MES (pH 5.7), 10 mM MgCl₂, 150 μM acetosyringone] に懸濁した。菌液の濃度を OD600 = 0.5 になるように調整し、暗所室温で一晩培養した。各組み合わせに応じて等量ずつ混合した菌液を、播種後 3～4 週のタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の葉に接種した。2 日後に接種葉を回収した。

アグロバクテリウム接種葉からのタンパク質抽出法は、以下に示すとおりである。まず、接種葉を液体窒素により凍結し、乳鉢乳棒で粉碎した。ここに抽出バッファーI [0.4 M Sucrose, 10 mM Tris (pH 8.0), 5 mM β-mercaptoethanol, protease inhibitor] を加えて練りつぶし、41 μm のナイロンフィルターで残渣を濾し取ったあと、1,900 g で 20 分間遠心した。上清を除き、抽出バッファーII [0.25 M Sucrose, 10 mM Tris (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 5 mM β-mercaptoethanol, protease inhibitor] を加えて沈殿を懸濁し、13,000 rpm で 10 分間遠心した。上清を除き、抽出バッファーII に懸濁した後、新しいチューブで抽出バッファーIII [1.7 M Sucrose, 10 mM Tris (pH 8.0), 2 mM MgCl₂, 0.15% Triton X-100, 5 mM

[β -mercaptoethanol, protease inhibitor] の上に重層し 13,000 rpm で 10 分間遠心した. 上清を取り除き, 沈殿に核溶解バッファー [50 mM Tris (pH 8.0), 1% SDS, 10 mM EDTA, protease inhibitor] を加えて懸濁し, 氷上で 20 分間静置した. これを 13,000 rpm で 10 分間遠心し, 上清を核タンパク質のサンプルとした.

核タンパク質を希釈バッファー [50 mM Tris (pH 8.0), 0.167 M NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% SDS] で 10 倍に希釈したところに, Anti-DYKDDDDK アフィニティーゲル (以下 anti FLAG ビーズ, 和光純薬, 012-22781) を加えて 4°C で一晩インキュベートし, anti FLAG ビーズにタグ融合タンパク質を吸着させた. これを洗浄バッファー [50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 10% Glycerol] で 4 回洗浄した後, 4xSDS 化バッファー [240 mM Tris (pH 6.8), 40% Glycerol, 8% SDS, 24% β -mercaptoethanol, 0.02% BPB] を加えて 95°C で 3 分間処理したものを, 精製サンプルとした.

タンパク質サンプルを, 12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE した後, PVDF 膜 (Hi-bond P, GE healthcare) に転写した. anti ECS (DDDDK) (anti FLAG) 抗体 (Goat 由来, Bethyl, A190-101A) ならびに anti c-Myc 抗体 (Goat 由来, Bethyl, A190-104A) を一次抗体として, Goat IgG Horseradish Peroxidase-conjugated antibody (R & D systems, HAF017) を二次抗体として抗体反応を行なった. ECL prime (GE healthcare) を検出試薬として, LAS-4000 を用いてシグナルを検出した.

***Hd3a* の過剰発現**

奈良先端科学技術大学院大学の島本功教授より提供された *rolC::Hd3a-GFP* ベクター (Tamaki et al., 2007) をアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*, EHA105) に導入し, これを野生型イネ (日本晴) カルスおよび *pap2-1* カルスに感染させることで, 形質転換を実施した.

結果

***PAP2* 遺伝子は生殖成長相への転換期の茎頂メリステムで発現を開始する**

図 1-9 で示したように, 生殖成長相への転換期には, 茎頂メリステム全体で *pPAP2::GUS* のシグナルが観察される. しかし, 栄養成長相の茎頂メリステムでは, *pPAP2::GUS* の活性は認められなかった (図 3-1A). 茎頂メリステムで *PAP2* 遺伝子の転写が誘導されるタイミングを決定するため, メリステムの成長段階との相関関係を調査した (図 3-1B). イネ科

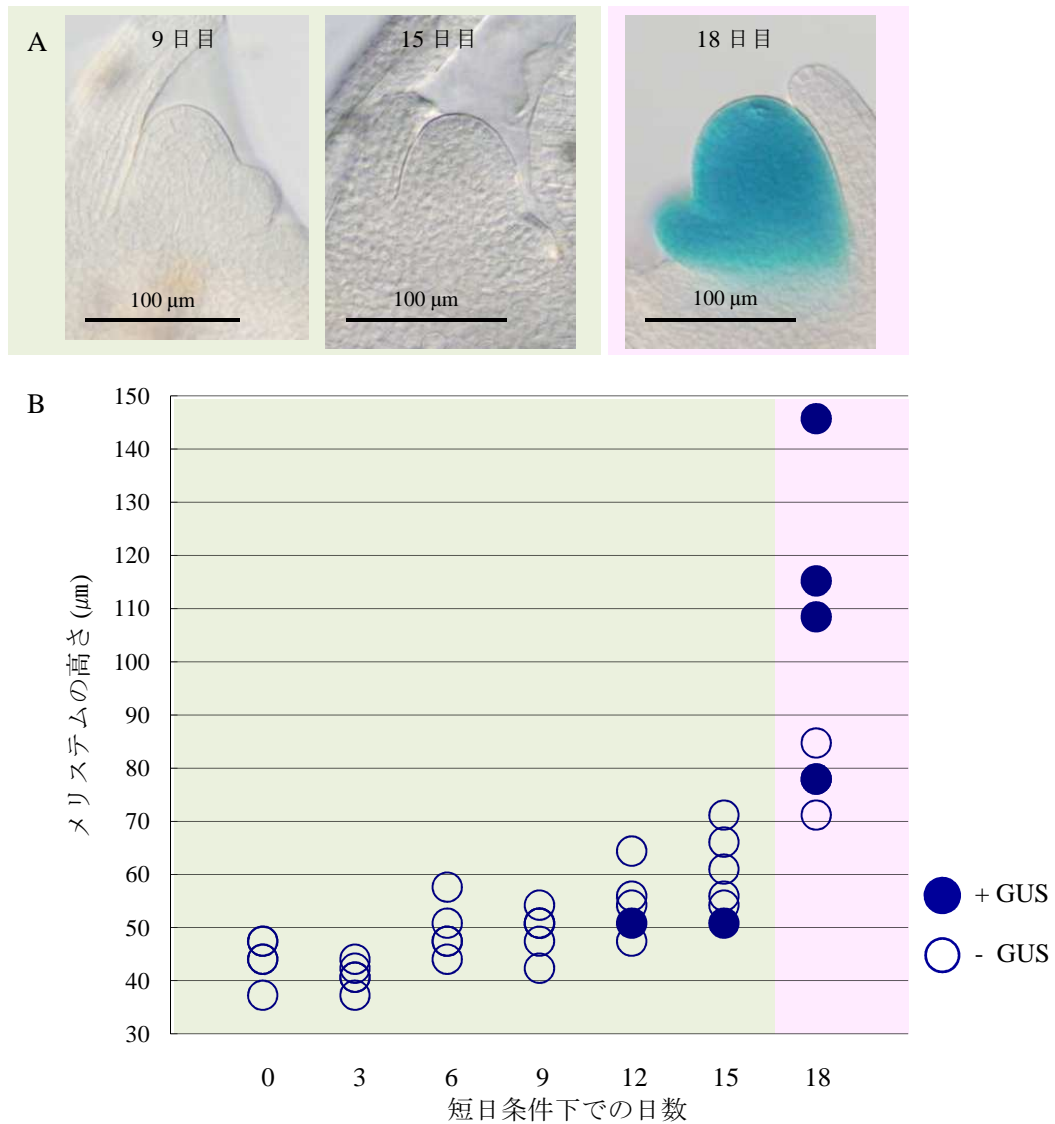


図3-1 *PAP2*遺伝子の発現パターン

(A) pPAP2::GUS植物の茎頂のGUS染色. 短日条件下9日目, 15日目, 18日目の茎頂を示す.

(B) メリステムの成長とGUSシグナルの相関関係

植物では、生殖成長相に転換すると茎頂メリステムが縦方向に急激に伸長する。そこで、茎頂メリステムの伸長を指標として、生殖成長相への転換と *PAP2* 遺伝子の発現開始の関連を調査した。このため、*pPAP2::GUS* を導入した形質転換体の後代 (T2) をあらかじめ長日条件下で7日間育成し、その後短日条件に移すことで生殖成長への相転換を誘導し、茎頂メリステムの大きさと *pPAP2::GUS* のシグナルを観察した。その結果、メリステムは短日条件に移してから18日目に顕著に縦方向へ伸長成長したため、このとき生殖成長相へ転換したと考えた。伸長成長を開始した茎頂メリステムで *GUS* 活性が観察されるという明瞭な傾向が認められ (図 3-1B), *PAP2* 遺伝子は生殖成長相への転換に伴って転写誘導されることが明らかとなった。この結果から、*PAP2* 遺伝子は、生殖成長相への転換についても機能をもつのではないかと推測した。しかし、*pap2-1* 変異体での止葉までの出葉枚数とそのタイミングに関して野生型と比べて差が認められないことから (図 1-3B, C), 栄養成長から生殖成長への相転換においては、*PAP2* は他の遺伝子と協調的に関与すると考えられた。

***PAP2* と *OsFULs* 遺伝子は転換期の茎頂メリステムで発現する**

イネの穂形成に関わる遺伝子を明らかにすることを目的に、東京大学栽培学研究室と独立行政法人農業生物資源研究所の共同研究として、栄養成長相から生殖成長相への転換期に茎頂メリステムで発現する遺伝子の LMD マイクロアレイ解析が行われた。この遺伝子発現解析では、栄養成長相前期 (V1) の茎頂メリステムは、圃場で育成された植物体の葉で *RFT1* が発現を開始する以前にサンプリングされた。*RFT1* は *Hd3a* のパラログであり、長日条件下で生殖成長への相転換を誘導する鍵遺伝子である (Komiya et al., 2009)。栄養成長相後期 (V2) のメリステムは、*RFT1* が発現を開始した数日後にサンプリングされた。生殖成長早期のメリステムは形状と大きさから、転換期 (V/R) と伸長期 (R1) に分けてサンプリングされた。次に、1次枝梗分化期 (R2) と2次枝梗分化期 (R3)、小穂分化期 (R4) のメリステムがサンプリングされた (図 3-2A)。

LMD マイクロアレイ解析の結果、V2 期から V/R 期にかけて *PAP2* 遺伝子の転写が誘導されることが明らかとなった (図 3-2B, C)。これは、*pPAP2::GUS* の結果と一致する。解析に用いられたマイクロアレイ上には、32 個の MADS box 転写因子に対応するプローブが搭載されている。それら 32 個の MADS box 転写因子のうち、*OsMADS14*, *OsMADS15* および *OsMADS18* の3つの遺伝子は、*PAP2* と同様の時期に強く転写誘導されることが明らかとなった (図 3-2B, C)。これら3つの遺伝子の発現誘導パターンはやや異なっており、*OsMADS14* と *OsMADS18* は V1 から V2 にかけて発現が誘導され、*OsMADS15* は *PAP2* と同様に V2 から V/R にかけて誘導された。これら3つの遺伝子は、シロイヌナズナの *API1/FUL* と同じ

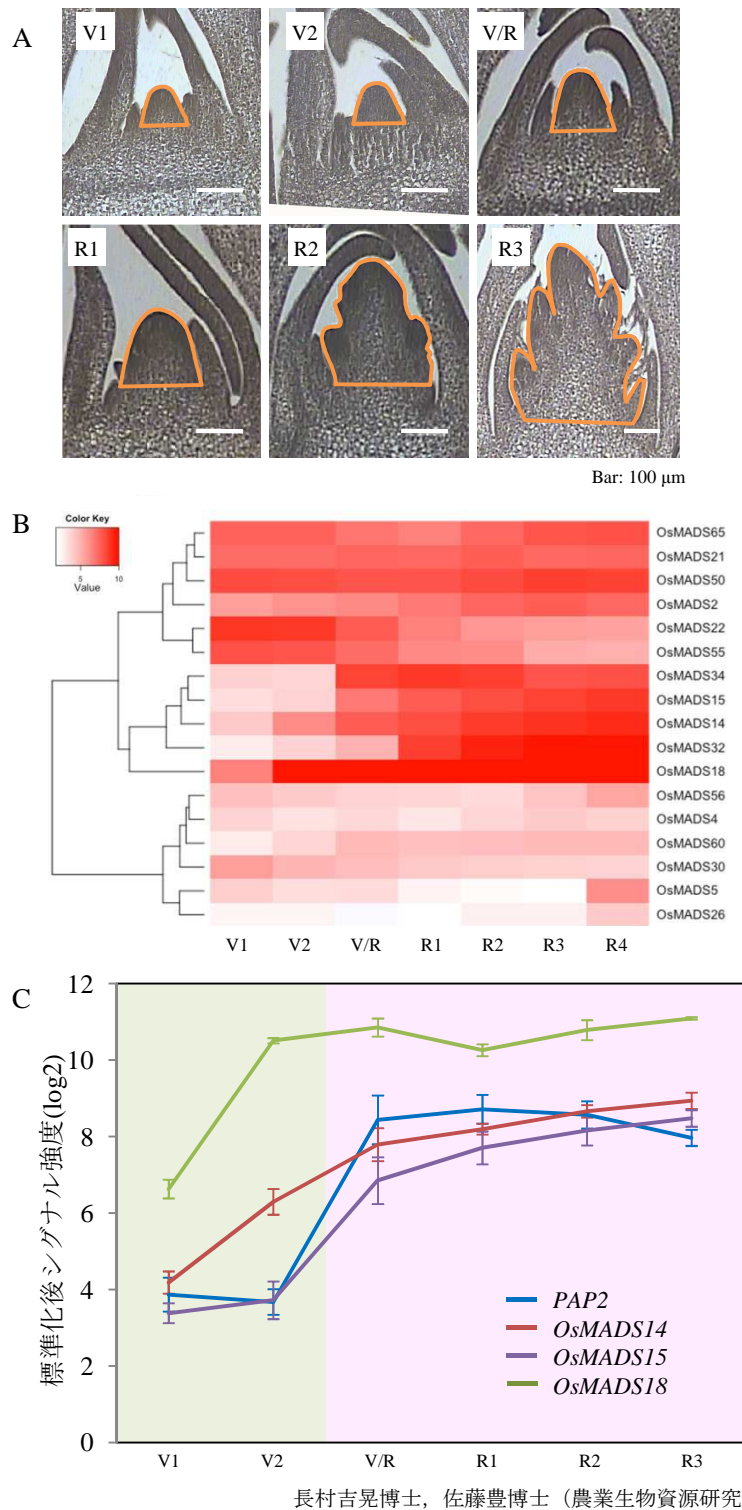


図3-2 LMDマイクロアレイによる生殖成長への転換における茎頂メリステムでの遺伝子発現解析

(A) 解析に用いられた茎頂メリステムの発達段階. V1, V2: 転換前 (栄養成長), V/R: 転換期, R1: メリステムの伸長時, R2: 1次枝梗分化期, R3: 2次枝梗分化期.

(B) イネのMADS box転写因子の花序形成初期における発現変動. いずれかのステージで有意なレベルの発現が認められた遺伝子が示されている.

(C) *PAP2*と*OsFULs*の発現変化. この4つの遺伝子が転換に伴って顕著に発現誘導されていた.

グループに属する (Litt and Irish, 2003; Preston and Kellogg, 2007; 図 3-3). *API/FUL* は、シロイヌナズナの生殖成長相への転換や、花メリステムの決定に重要な遺伝子である (Bowman et al., 1993; Ferrándiz et al., 2000). 3 つのイネ *API/FUL* 遺伝子と *PAP2* が生殖成長への転換期に茎頂メリステムで発現することから、これら 4 つの遺伝子が茎頂メリステムの栄養成長から生殖成長への相転換にとって重要な役割を果たす可能性があると考えた.

***PAP2* と *OsFULs* は茎頂メリステムの生殖成長への相転換に寄与する**

OsMADS14 と *OsMADS15* はフロリゲン遺伝子である *Hd3a* および *RFT1* の下流ではたらくことが示されており (Komiya et al., 2008, 2009), *OsMADS18* は過剰発現による機能解析が過去に報告されている (Fornara et al., 2004). また, *OsFULs* (*OsMADS14*, *OsMADS15* および *OsMADS18*) はメリステムで発現する他に, 相転換に伴って葉身でも発現することが知られている (Rice XPro; <http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>). しかしながら, これらの遺伝子の機能欠損変異体の解析による相転換制御への機能については報告されていない. そこで, *PAP2* と *OsFULs* が生殖成長への相転換と穂形成において果たす機能を明らかにするため, *OsFULs* の発現を RNAi 法で抑制した. 単独抑制体では, 止葉を展開するまでの出葉枚数や穂の形態に異常は認められなかった. このため, 3 つの *OsFULs* に共通する配列をトリガーとした RNAi ベクター (*OsMADS14/15/18i*) を用いて, 3 つの *OsFULs* の遺伝子発現を同時に抑制する形質転換体を作出した (図 3-4A-D). まず, *OsMADS14/15/18i* を野生型背景 (日本晴) と *pap2-1/+* に導入した三重抑制体の花成のタイミングを決定した. 再分化した形質転換植物 (T0) を長日条件で育成し, 8 枚目の葉の展開後 (9 枚目の葉が観察できた段階) に短日条件に移し, その後出穂までに形成された葉の枚数を測定した (図 3-5A). その結果, 7 個体の野生型植物では 4~5 枚, 6 個体の *pap2-1* 変異体では 4~6 枚の葉が短日条件下で展開した. また, 野生型背景 (+/+) で *OsMADS14/15/18i* を導入した 6 系統では 5~9 枚, *pap2-1* ヘテロ背景 (*pap2-1/+*) で *OsMADS14/15/18i* を導入した 7 系統では 5~8 枚の葉が展開した. すなわち, 三重抑制体ではコントロール植物と比べて止葉を展開するまでの出葉枚数に増加が認められ, *PAP2* の遺伝子型 (+/+, *pap2-1/+*) による差はみられなかった (図 3-5A). この解析によって, *OsFULs* が栄養成長から生殖成長への相転換を制御することが示唆された. FT タンパク質は花成誘導ホルモンであるフロリゲンの分子の実体である (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005; Coubesier et al., 2007). イネでは *Hd3a* と *RFT1* 遺伝子が FT タンパク質をコードしており, 生殖成長への相転換の主要な制御因子として機能する (Tamaki et al., 2007; Komiya et al., 2008, 2009). そこで, 生殖成長への相転換の遅れが観察された三重抑制体の葉で, *Hd3a* と *RFT1* の発現を解析した. 三重抑制体では, 止葉における *Hd3a* の

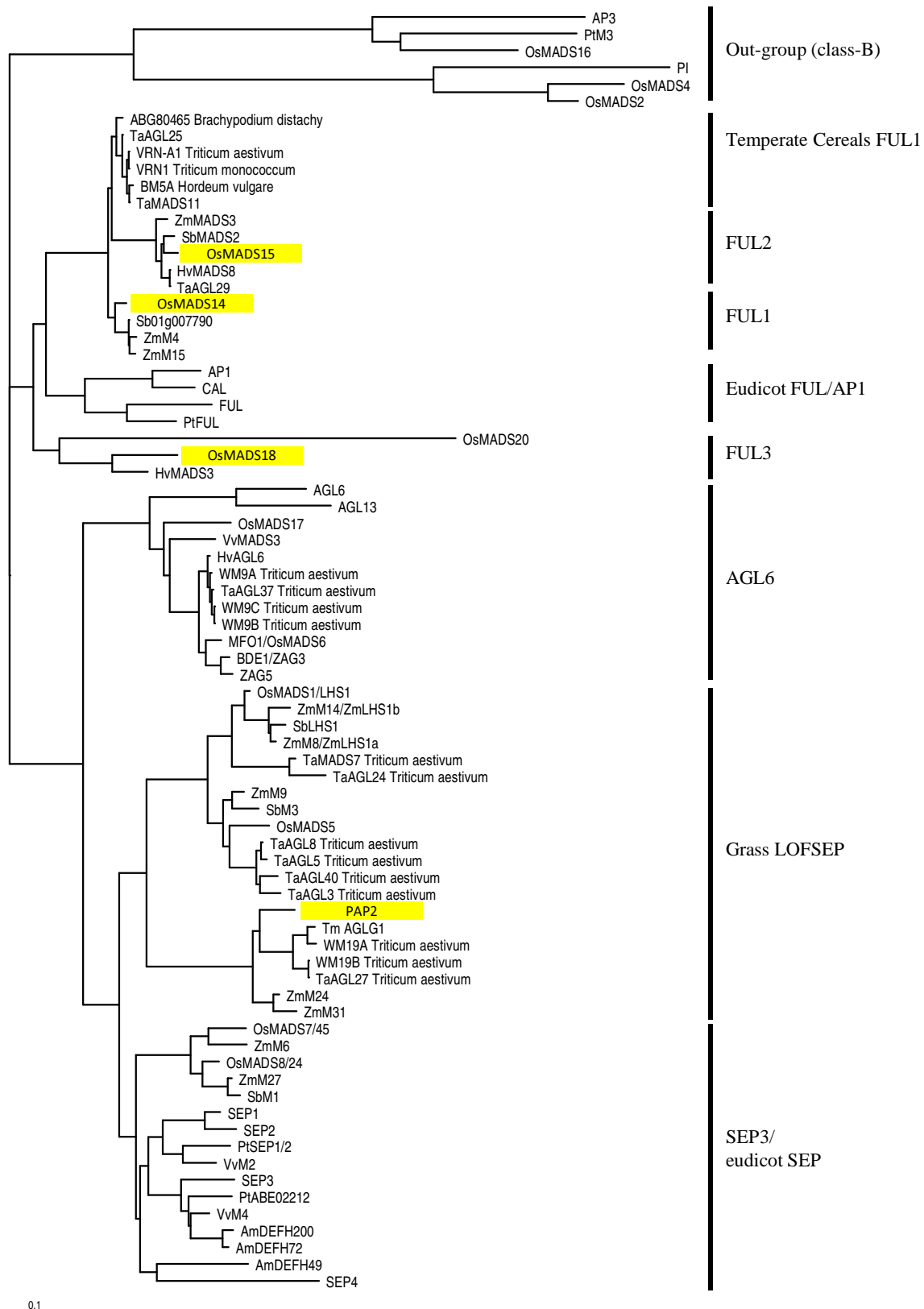


図3-3 *SEP*, *API/FUL*および*AGL6*遺伝子の系統樹

イネ科植物と双子葉植物の遺伝子から、*MADS*ドメインと*K*ドメインのアミノ酸配列を用いた。Clustal Wを用いて、隣接結合法で系統樹を作成した。

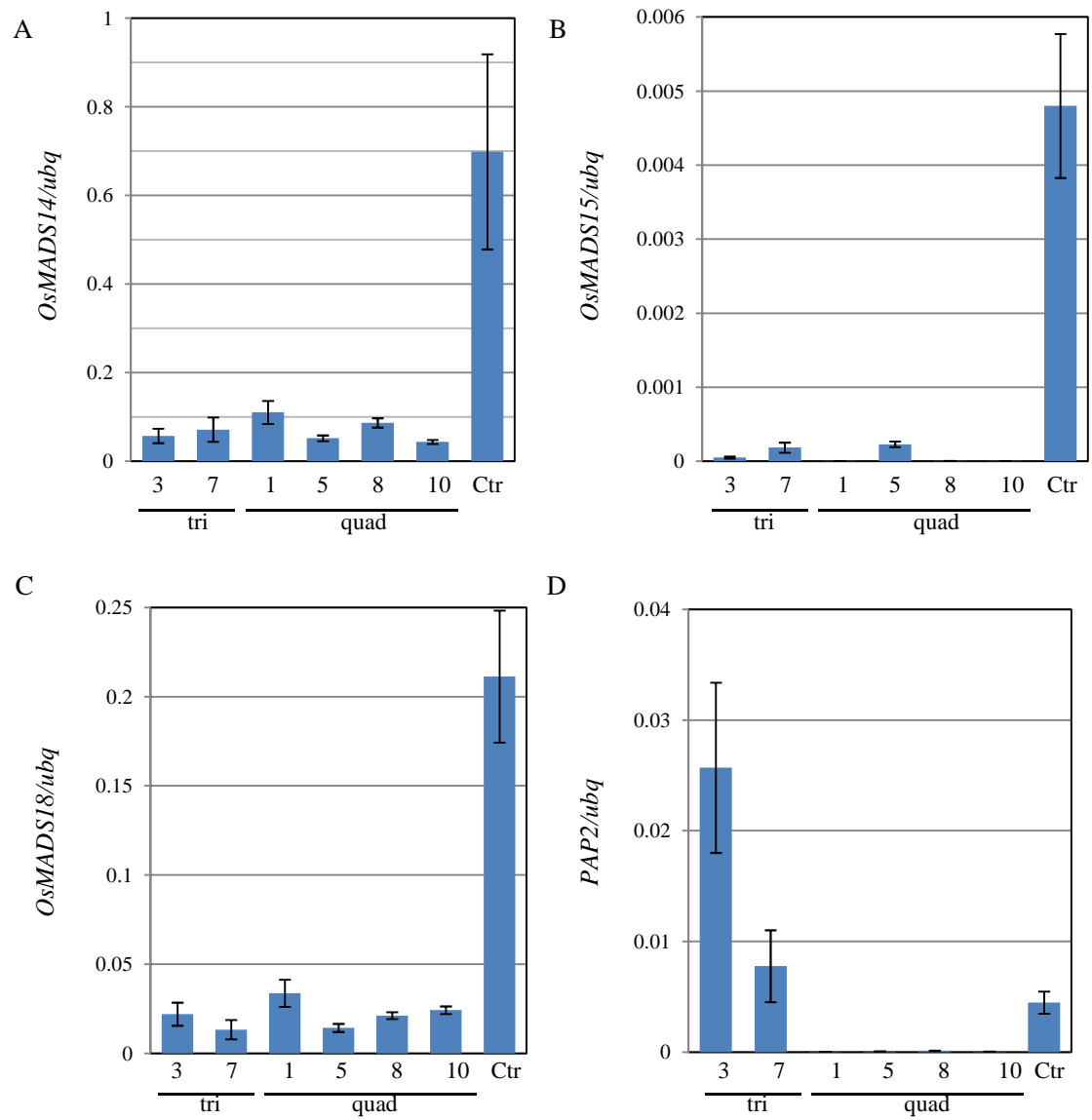


図3-4 *OsFULs*の発現抑制

(A-D) 止葉における遺伝子発現. (A) *OsMADS14*, (B) *OsMADS15*, (C) *OsMADS18*, (D) *PAP2*. tri: *OsFULs*三重抑制体 (*OsMADS14/15/18i* +/+), quad: *PAP2*と*OsFULs*四重抑制体 (*OsMADS14/15/18i pap2-1/pap2-1*), Ctr: コントロール (非形質転換体).

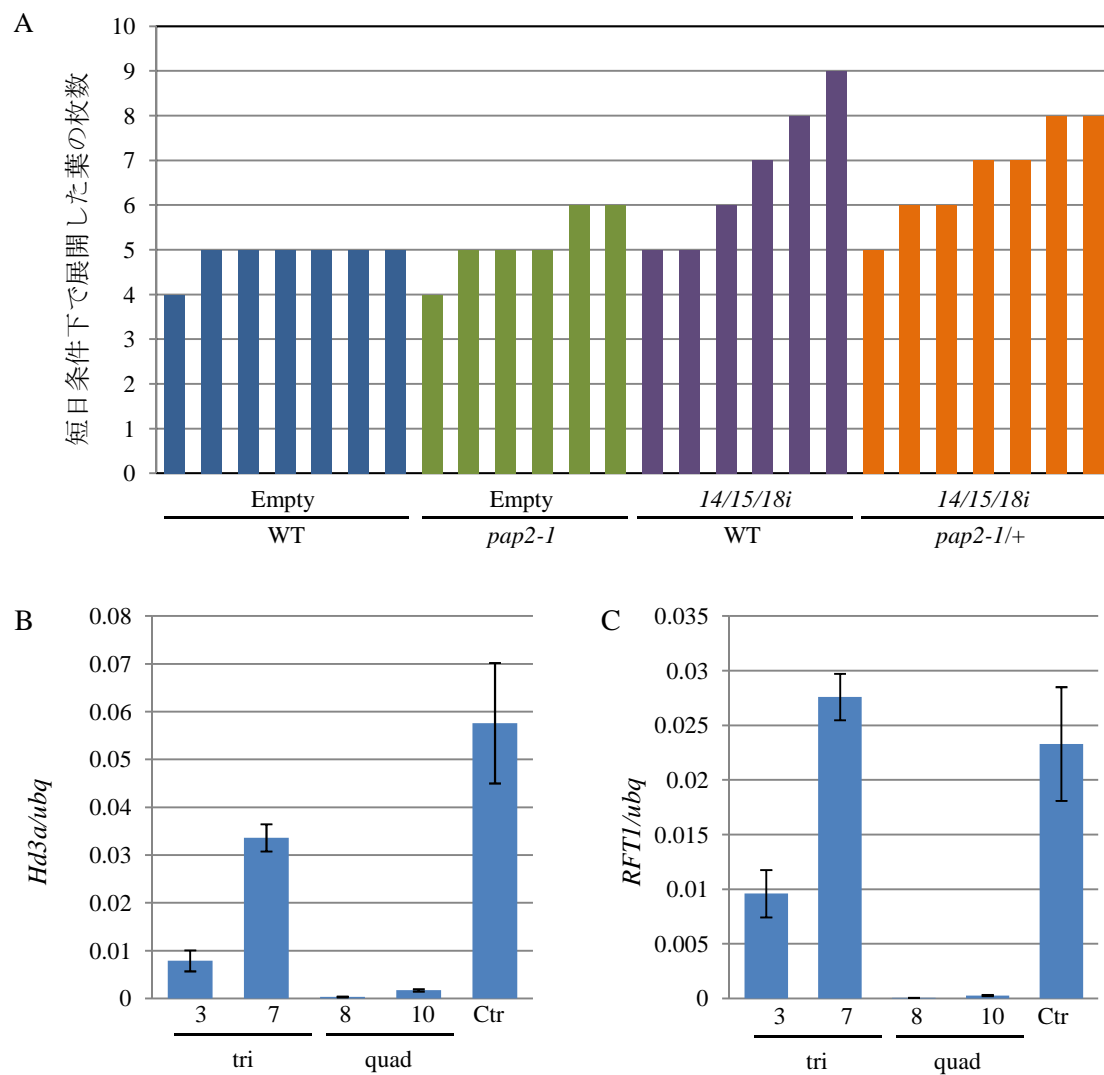


図3-5 *OsFULs*の発現抑制による花成への影響

(A) 各系統が短日条件下で止葉の抽出までに展開した葉の枚数. 形質転換当代 (T0) の植物を第8葉が展開するまで長日条件で育成した後, 短日条件に移した.

(B, C) 止葉における遺伝子発現. (B) *Hd3a*, (C) *RFT1*. tri: *OsFULs* 三重抑制体 (*OsMADS14/15/18i* +/+), quad: *PAP2* と *OsFULs* 四重抑制体 (*OsMADS14/15/18i pap2-1/pap2-1*), Ctr: コントロール (非形質転換体).

転写レベルが対照より減少したが、*RFT1* の遺伝子発現については差が認められなかった (図 3-5B, C). したがって、*PAP2* と *OsFULs* は葉で *Hd3a* の転写を活性化することによって生殖成長への相転換を促進する可能性が示唆された. 一方、三重抑制体では穂の形態や小穂と花器官形成に異常はみられなかった (図 3-6).

次に、*pap2-1* 変異体背景で *OsFULs* の遺伝子発現を抑制した四重抑制体の表現型を解析した. 解析には、*OsMADS14*、*OsMADS15* および *OsMADS18* のすべての発現が強く抑制されている系統 (#8, #10) を用いた (図 3-4A-D). 野生型では転換後に節間伸長が起こり出穂するのに対して、四重抑制体では緩やかに節間伸長するものの出穂せず葉が抽出し続けた (図 3-7A-C). そこで、表現型をさらに詳細に解析するために、透明化法と走査型電子顕微鏡、切片作成により茎頂を観察した. 野生型では生殖成長への転換後、1 次枝梗や 2 次枝梗、小穂が形成される (図 3-7D-F, 矢印). しかし、四重抑制体では、止葉様の葉が展開して節間伸長が開始したあとでも繰り返し葉原基が形成された (図 3-7G-J). このことは、電子顕微鏡観察や切片観察の結果からも明らかとなった (図 3-8; 図 3-9). 野生型植物の生殖成長相では、止葉の葉原基が茎頂メリステムを包んでいるが (図 3-8A, B, 鏝), その後の葉原基は発達せず痕跡的な器官の苞葉となる (図 3-8A-C; 図 3-9A-D). これに対し、四重抑制体でも、まずは止葉の葉原基が茎頂メリステムを包んでいるが (図 3-8G, 鏝), その後も葉原基の発達が停止せず伸長し続けた (図 3-8G-N; 図 3-9E-H, 鏝). また、野生型植物の茎頂メリステムは、生殖成長への相転換によって縦方向へ伸長成長する (図 3-9A). しかし、四重抑制体の茎頂メリステムは、生育が進んでも扁平なままであった (図 3-9E, F, H). さらに、野生型植物では幼穂の発達が進むにつれて全体が苞毛で覆われるのに対し (図 3-8C-F, 矢印), 四重抑制体では苞毛の出現が抑制された (図 3-8I-L). 四重抑制体では、異所的な葉原基の腋部に側生メリステムが分化し (図 3-8I-J), 側生メリステムからはさらに葉原基が分化し、分枝として成長した. これらの分枝は栄養成長のシュート同様に発達した (図 3-7G-J, 矢印; 図 3-9F). 野生型で小穂が形成される発達段階でも、四重抑制体では引き続き葉原基とシュートが形成された (図 3-8L-N; 図 3-9G, H). 生殖成長への転換に伴う葉序の 1/2 互生から 2/5 螺旋生への変化は、四重抑制体でも観察された (図 3-8H). なお、四重抑制体の葉では、*Hd3a*、*RFT1* どちらの発現も認められなかった (図 3-5B, C).

四重抑制体で異所的に形成される側生メリステムが生殖成長相に移行しているかを、*APO1* 遺伝子の発現を指標とした *in situ* ハイブリダイゼーションで解析した. *APO1* は、栄養成長相の茎頂メリステムでは発現がみられず、花序メリステム、枝梗メリステムおよび小穂メリステムで発現する (Ikeda-Kawakatsu et al., 2009). 本解析でも、野生型では転換後の花序メリステムと枝梗メリステムで *APO1* の転写が認められた (図 3-10A). これに対

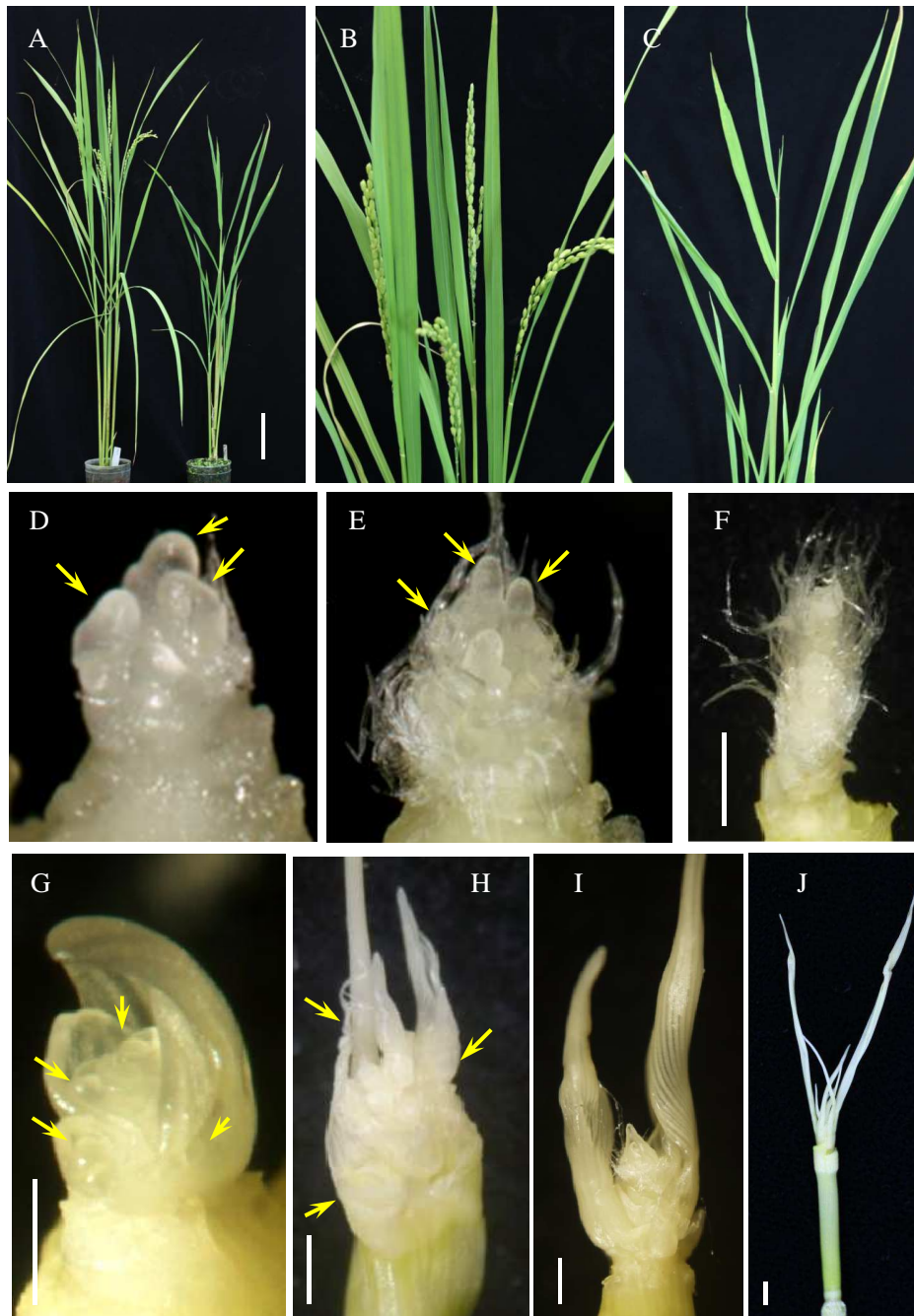


図3-6 *OsFULs*の三重抑制体の穂の形態

(A) 野生型 (左) と *OsFULs* 三重抑制体 (右) の穂の形態.

(B, C) 小穂の形態. 野生型 (B), *OsFULs* 三重抑制体 (C).

(D, E) 花器官の形態. 野生型 (D), *OsFULs* 三重抑制体 (E). 外穎と内穎を取り除いた.



Bar=10 cm (A), 1 mm (F, J), 0.5 mm (G-I)

図3-7 *PAP2*と*OsFULs*の四重抑制体の表現型

(A) 植物の形態. 野生型(左), 四重抑制体(右).

(B) 野生型では止葉が展開したあと出穂した.

(C) 四重抑制体では止葉様の葉が展開したあとも葉が抽出し続けた.

(D-F) 野生型の幼穂形成. (D) 2次枝梗分化期 (矢印は1次枝梗を指す), (E) 小穂分化期 (矢印は小穂メリステムを指す), (F) 花器官分化期. ステージが進むにつれて苞毛に覆われる.

(G-J) 四重抑制体の茎頂. 止葉様の葉を展開したあとも, 茎頂では葉原基形成が繰り返された. (G) 葉原基 (矢印) とともにシュートメリステムが形成された. (H) 発達が進むと複数のシュートから葉が形成される (矢印).

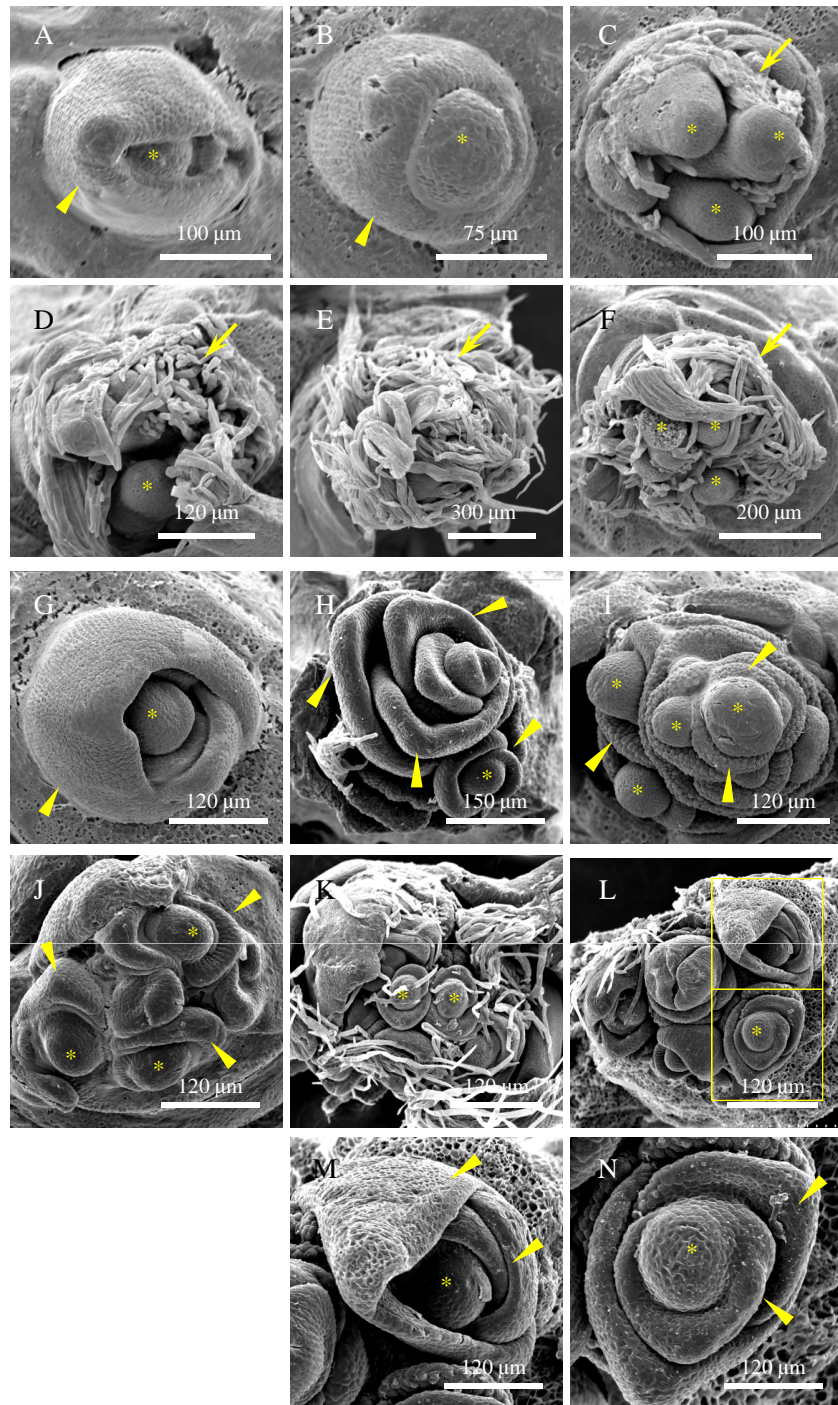


図3-8 四重抑制体の茎頂の走査型電子顕微鏡観察

(A-F) 野生型の茎頂. (A, B) 転換直後. ドーム状のメリステムが止葉に覆われている. (C) 1次枝梗分化期. 分枝形成が始まるとともに, 苞毛が生じ始める. (D-F) 2次枝梗分化期. このころになると幼穂は苞毛に覆われる.

(G-N) 四重抑制体の茎頂. (G) 最初はドーム状のメリステムが葉原基に覆われていた. (H) 螺旋葉序で葉原基が発達していた. (I) 側生メリステムが発達した場合でも葉原基は抑制されなかった. (J-L) 発達段階が進んでも, 苞毛はほとんど発生せず, ひとつひとつ栄養成長メリステムのようにシュート形成をした. (M, N) (L) の拡大図.

アスタリスクはメリステムを指す. 矢印は苞毛, 鋸は葉原基を指す.

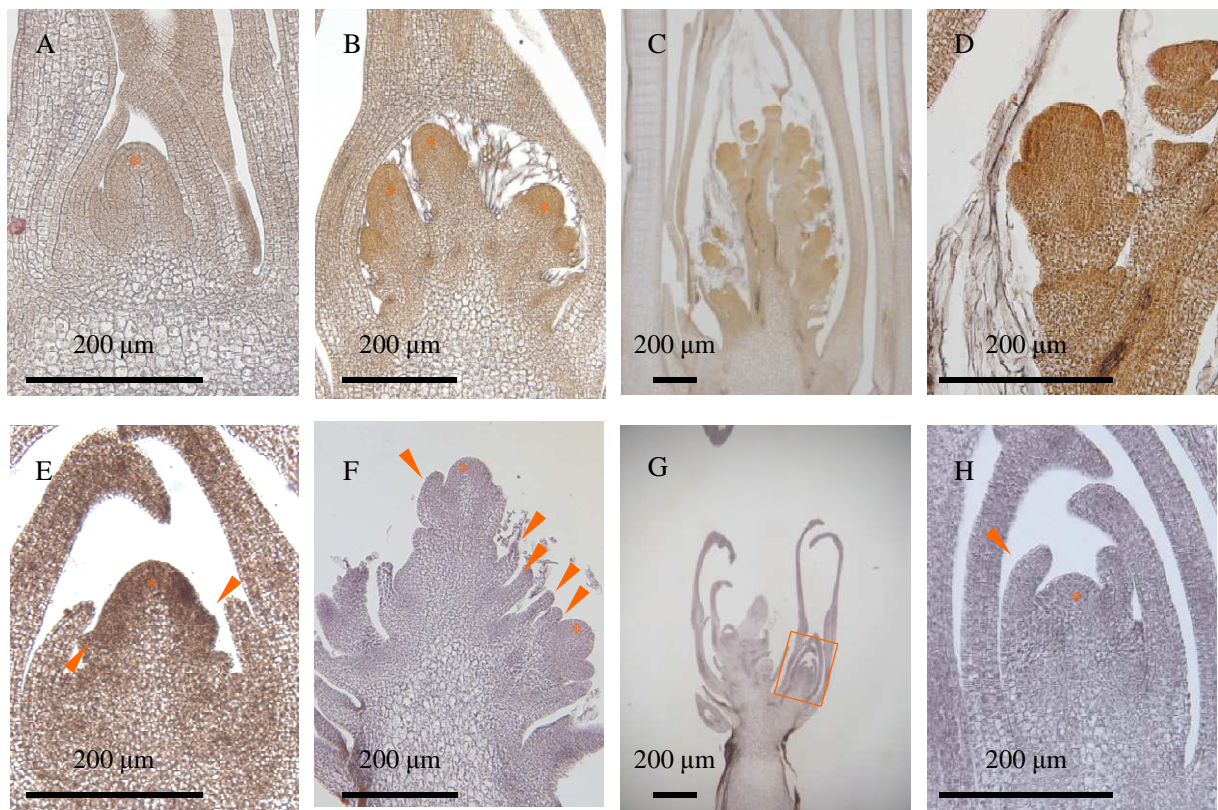


図3-9 四重抑制体の切片観察

(A-D) 野生型の茎頂. (A) 転換後. 茎頂メリステムは縦方向に伸長成長する. (B) 2次枝梗分化期~小穂分化期. (C) 花器官分化期. (D) (C) における小穂の拡大図.

(E-H) 四重抑制体の茎頂. (E) 苞葉ができたあとも葉原基の発達が抑制されなかった. (F) 葉原基の発達とともに腋生メリステムが発達した. (G) 複数のシュート様の構造が形成された. (H) (G) で四角枠で囲った部分の拡大図. 異所的メリステムは, 葉原基を形成し続けた.

アスタリスクはメリステム, 鋸は葉原基を指す.

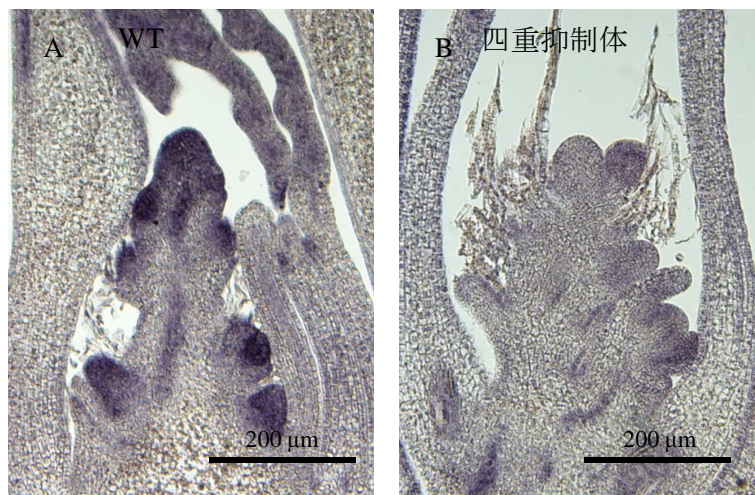


図3-10 四重抑制体における*APOI*遺伝子の発現

野生型 (A) と四重抑制体 (B) の茎頂で，生殖成長相への転換の指標として*APOI*遺伝子の発現を解析した．野生型ではメリステムでシグナルが認められるのに対し，四重抑制体ではシグナルがみられない．

し、四重抑制体では *APO1* 遺伝子の mRNA シグナルは検出されなかった (図 3-10B). したがって、四重抑制体では茎頂メリステムが生殖成長相へ転換していないことが明らかとなった. 以上の結果より、*PAP2* と *OsFULs* の 4 つの遺伝子は、茎頂メリステムが生殖成長相としてのアイデンティティを保って、花序形成を進行するために必要な遺伝子であり、冗長的に機能することが示唆された.

PAP2 と OsFULs は分子間相互作用する

植物の MADS box 転写因子は、二量体もしくは四量体を形成して機能すると考えられている (Kaufmann et al., 2005). そこで、*PAP2* と *OsFULs* が分子間相互作用して機能する可能性があると考え、これを検証した. まず、酵母ツーハイブリッド法により 4 つのタンパク質の相互作用の検出を試みた. そのために、転写活性化ドメイン (AD) や DNA 結合ドメイン (BD) を融合した MADS box タンパク質を発現させるベクターを作成した. それぞれの組み合わせにしたがって、2 つのプラスミドを酵母に共形質転換した. 試験する 2 つのタンパク質が相互作用する場合、標的タンパク質に融合した AD と BD が相互作用することにより、レポーター遺伝子の転写が活性化される. このことを利用して、形質転換酵母の栄養要求性で相互作用の検出を行なうために、選択培地で培養した. その結果、共形質転換がなされていることを示す選択培地 (-LT) では、いずれの組み合わせでも形質転換酵母が成育した. 次に、*OsMADS14* と *OsMADS15* の組み合わせの場合のみ、強く相互作用を示すことを示す選択培地 (-LTHA) で酵母の成育が認められた (図 3-10). *PAP2* 同士のホモ結合と *PAP2*-*OsMADS14*, *PAP2*-*OsMADS15* のヘテロ結合については、-LTHA 培地では成育せず、弱い相互作用を検出する選択培地 (-LTH) で酵母の成育が認められた (図 3-11). しかし、*OsMADS18* はいずれとも相互作用を示さなかった.

次に、酵母で相互作用が検出された *PAP2*, *OsMADS14* および *OsMADS15* について、共免疫沈降法を用いて植物細胞内での相互作用の検出を試みた. まず、エピトープタグ (FLAG タグ, 4xMyc タグ) を融合した MADS box タンパク質を、アグロインフィルトレーション法を用いてタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の葉で一過的に発現させた. このタンパク質について FLAG タグを利用して α -FLAG 抗体による免疫沈降を行ない、得られたサンプルを α -Myc 抗体でウェスタンブロッティングによる検出を行なった. この結果、 α -FLAG による免疫沈降後サンプルでは、FLAG タグ融合タンパク質を発現させていないときには、 α -Myc 抗体によるシグナルは得られなかった. 一方、FLAG タグ融合タンパク質と Myc タグ融合タンパク質を同時に発現させたときには、*OsMADS14*-*OsMADS15* ならびに *PAP2*-*OsMADS14*, *PAP2*-*OsMADS15* 間での相互作用が検出された (図 3-12). 以上より、

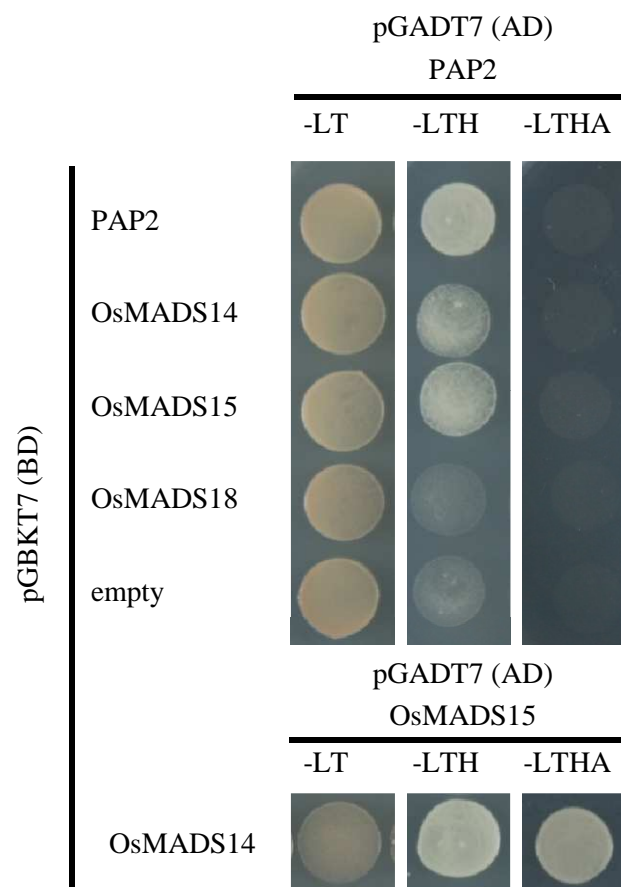


図3-11 PAP2とOsFULsの酵母における分子間相互作用

*PAP2*と*OsMADS14*, *OsMADS15*, *OsMADS18*の全長コーディング領域をpGBKT7 (BD)に導入し, *PAP2*と*OsMADS15*はpGADT7 (AD)にも導入した. 各組み合わせのプラスミドを共形質転換した酵母を-LT (形質転換のコントロール), -LTH (弱い相互作用), -LTHA (強い相互作用)の選択培地で培養した.

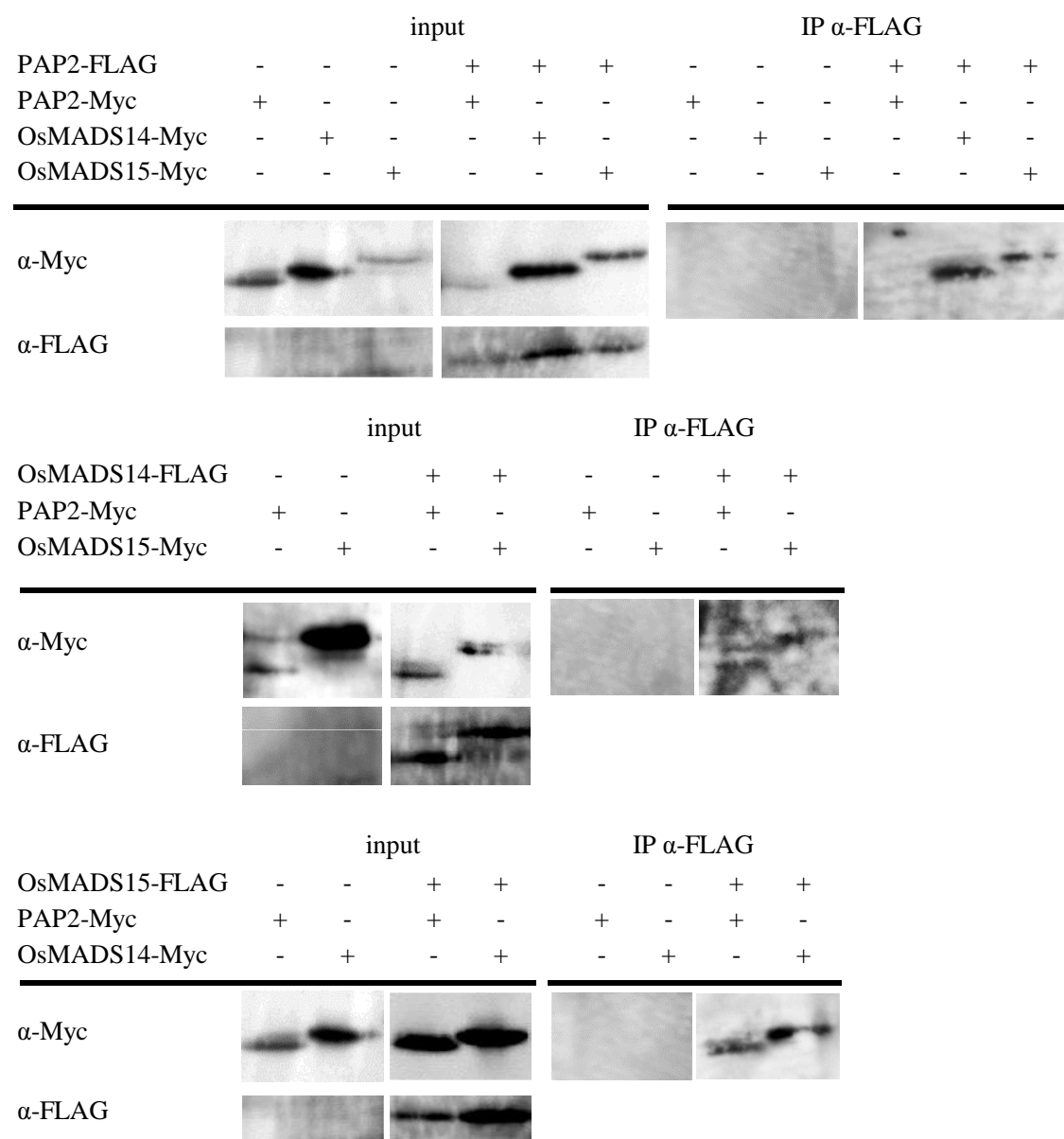


図3-12 PAP2とOsFULsの植物細胞における相互作用

FLAGタグおよび4xMycタグを融合したMADS boxタンパク質を*N. benthamiana* で一過的に発現させ、共免疫沈降を行なった。FLAG融合タンパク質とMyc融合タンパク質がともに発現しているサンプルでは、FLAG抗体での免疫沈降後、Myc抗体によるウェスタンブロッティングでシグナルが検出された。

植物細胞内で OsMADS14-OsMADS15 ならびに PAP2-OsMADS14, PAP2-OsMADS15 のヘテロ結合で相互作用することが明らかとなった。

PAP2 は *Hd3a* の下流で機能する

Hd3a は、イネのフロリゲン遺伝子として生殖成長への転換を促進することが知られている (Tamaki et al., 2007)。*Hd3a* は短日条件下の葉で強く発現が誘導される。葉で産生された *Hd3a* タンパク質は茎頂へ移動して、茎頂メリステムの生殖成長相への転換を促進する。これまで述べたように、生殖成長への相転換に伴って茎頂メリステムで *PAP2* 遺伝子の発現が誘導される。このことから、茎頂メリステムでは *PAP2* が *Hd3a* シグナルの下流ではたらい、茎頂メリステムの栄養成長から生殖成長への相転換を促進すると予想した。そこで、生殖成長への相転換における *PAP2* 遺伝子の機能と *Hd3a* の関係を明らかにするため、*pap2-1* 変異体に rolC::*Hd3a*-GFP を導入した。rolC は、維管束特異的に機能するプロモーターであり、野生型植物に rolC::*Hd3a*-GFP を導入すると生殖成長への相転換が著しく促進され、出穂が早まる。顕著な場合には形質転換後のカルスから小穂が再分化する (Tamaki et al., 2007; 図 3-13A, B)。本解析でも、野生型背景の 75%の系統で再分化培地に移した後 30 日以内に出穂が認められた (図 3-13D)。一方、*pap2-1* 変異体に rolC::*Hd3a*-GFP を導入しても、調査した 16 系統では穂の形成が起こらなかった (図 3-13D)。しかし、節間伸長が起こり各分げつが伸長するとともに、各節の冠根が伸長するという特徴的な表現型が観察された (図 3-13C)。*pap2-1* 背景でも野生型背景よりやや遅れて小穂が形成された。しかし、野生型背景では数個の正常な外見の小穂が形成されたのに対し、*pap2-1* 背景では伸長した穎状器官が繰り返し形成された (図 3-13E, F)。さらに、切片観察を行なったところ、野生型植物で *Hd3a* を発現させると小さな穂が形成されたのに対して、*pap2-1* 背景では栄養成長相の茎頂メリステムの形状を示すものや、苞穎の内側で葉原基形成と分枝形成を繰り返すものが観察された (図 3-13G-I)。このようにして、*pap2-1* 変異体では *Hd3a* の過剰発現による小穂形成の誘導の効果が野生型と比較して弱いことが明らかとなった (図 3-13D)。このため、*Hd3a* 遺伝子が作用するためには、*PAP2* 遺伝子が機能的である必要がある。すなわち、*PAP2* 遺伝子は *Hd3a* の下流で機能すると結論した。

考察

本章では、*SEPALLATA* (*SEP*) グループの MADS box 転写因子である *PAP2* と、*API/FUL*

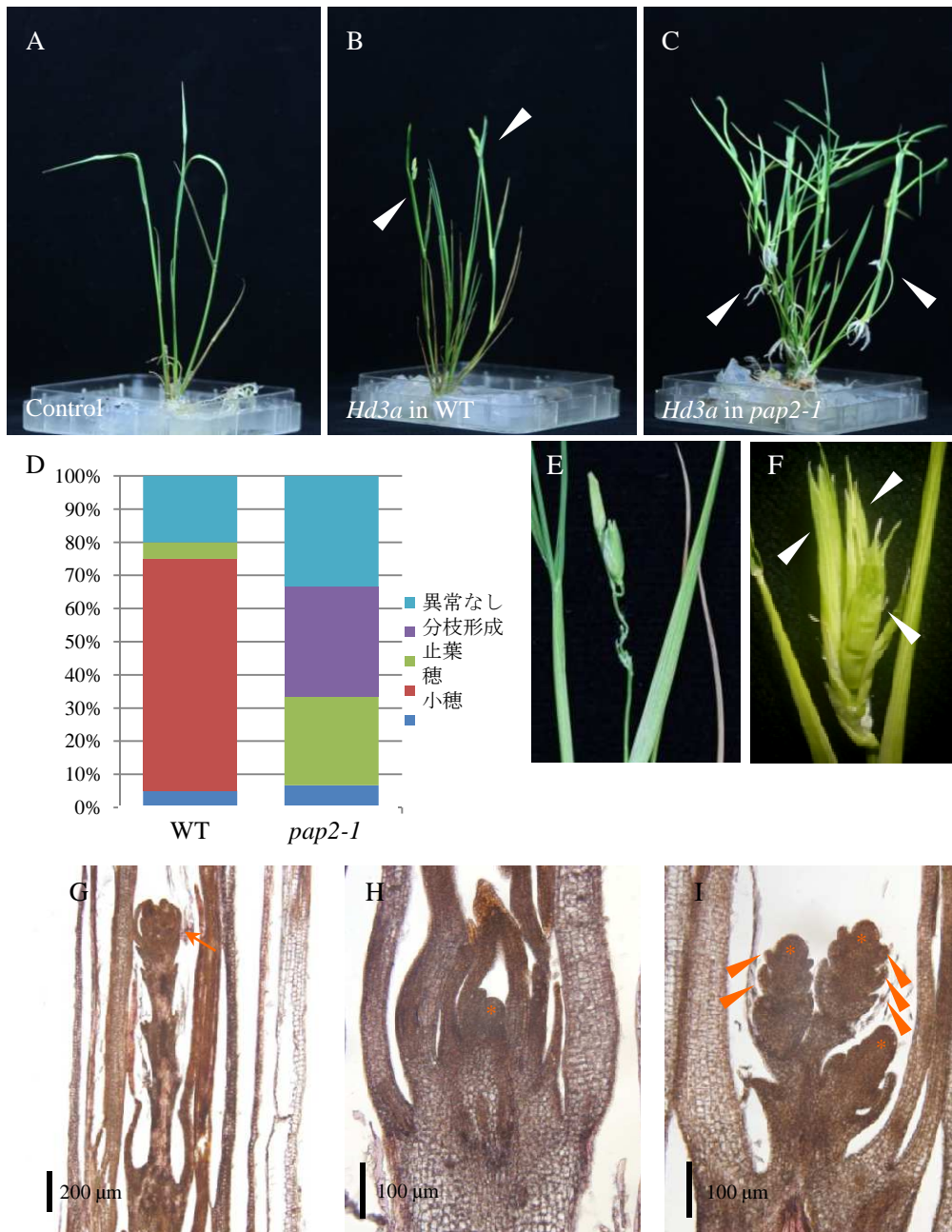


図3-13 *pap2-1* 変異体での*Hd3a*過剰発現

(A) 非形質転換体のカルスからの再分化個体.

(B) 野生型背景での*rolC::Hd3a-GFP*の再分化個体.

(C) *pap2-1*変異体背景での*rolC::Hd3a-GFP*の再分化個体. 花序形成を経ずに稈が節間伸長した.

(D) 表現型の頻度. 野生型背景 ($n = 20$) と *pap2-1*変異体背景 ($n = 16$) で*rolC::Hd3a-GFP*を導入した形質転換カルスを再分化培地で培養して30日以内に観察された表現型を記す.

(E) 野生型背景での*rolC::Hd3a-GFP*の導入により形成された穂. 少ないながらも正常な小穂が形成された.

(F) *pap2-1*変異体背景での*rolC::Hd3a-GFP*の導入により形成された花序. 小穂には伸長した穎が繰り返し形成された.

(G-I) 切片観察. (G) 野生型背景では穂が形成された (矢印). (H) *pap2-1*背景では, 栄養成長のメリステムと同様の形状を示した. (I) *pap2-1*変異体背景では, 葉原基や穎が繰り返し形成されることもよく観察された. アスタリスクはメリステム, 鋸は葉原基を指す.

グループの MADS box 転写因子に分類される *OsMADS14*, *OsMADS15* および *OsMADS18* (*OsFULs*) が栄養成長から生殖成長への相転換期の茎頂メリステムで発現誘導され、茎頂メリステムの花序メリステムへの転換を制御することを明らかにした。

生殖成長への相転換は、葉で産生された花成誘導因子フロリゲンが茎頂メリステムに輸送され、下流遺伝子の発現が誘導されることによって茎頂メリステムの状態が変化して起こる。フロリゲンの分子の実体は、FT タンパク質である (Wigge, 2011; Turck et al., 2008; for reviews). *OsMADS14* と *OsMADS15* は、イネのフロリゲンである *Hd3a* および *RFT1* のシグナルの下流で機能すると考えられている (Komiya et al., 2008, 2009). さらに、培養細胞を用いた解析から、*Hd3a*, *OsFD* および 14-3-3 タンパク質からなる複合体が、*OsMADS15* の転写を直接制御することが明らかとなった (Taoka et al., 2011). しかし、*OsMADS14* と *OsMADS15* が穂形成の初期に発現することは報告されていたが、茎頂メリステムの転換期における機能や発現パターンは明確には示されていなかった。本章では、*OsMADS14* と *OsMADS15* だけでなく *OsMADS18* と *PAP2* もまた、茎頂メリステムの顕著な形態的变化が起こる以前に発現が誘導されることを突き止めた (図 3-2). さらに、*PAP2* と *OsMADS14*, *OsMADS15* タンパク質は植物細胞内で相互作用する (図 3-11; 図 3-12). *Hd3a* を過剰発現させると通常は花成や小穂形成が即座に誘導されるが、*pap2-1* 変異体背景で過剰発現させた場合はその作用が弱まった (図 3-13). これらのことから、*PAP2* 遺伝子が *Hd3a* の下流で機能することが示された。以上の結果を統合して、*PAP2* と *OsFULs* の 4 つの MADS box 転写因子が、茎頂メリステムにおいてフロリゲンシグナルの下流で機能し、茎頂メリステムを花序メリステムへ転換させると考えた。*PAP2* と *OsMADS14*, *OsMADS15* は複合体形成し、*OsMADS18* はいずれとも相互作用をしないため、*OsMADS18* は *Hd3a* の下流にある *PAP2* とは異なる分子経路で機能する可能性が考えられる。

Hd3a と *RFT1* の遺伝子発現を抑制すると生殖成長への相転換が完全に抑えられるが (Komiya et al., 2009), *PAP2* と *OsFULs* の四重抑制体では節間伸長の開始や葉序の 1/2 互生から 2/5 螺旋生への変化など部分的な相転換が観察された。この違いが生じる理由として、*Hd3a/RFT1* の下流で機能する花序メリステムへの転換を促進する因子が 4 つの MADS box 転写因子のほかにもある可能性は考えられるが、RNAi による *OsFULs* の発現抑制が完全でないためである可能性も排除できない。

OsFULs は、植物の成長ステージの進行に伴って葉身でも発現が誘導される (Rice XPro; <http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>). このため、三重抑制体での花成遅滞の原因が、葉身での *OsFULs* の機能が抑制されたことなのか、茎頂メリステムでの *OsFULs* の機能が抑制されたことなのかは、断定することができない。しかし、四重抑制体の止葉で *Hd3a* と *RFT1*

の転写レベルが顕著に低下したことから (図 3-5), *OsFULs* と *PAP2* には葉身で *Hd3a/RFT1* の転写を誘導する作用があることが明らかとなった。そこで, この研究論文では次の可能性を提示する。日長や温度などの環境シグナルを受けて葉で発現した *OsFULs* と *PAP2* は, 葉で *Hd3a/RFT1* の転写を誘導する。葉で発現した *Hd3a/RFT1* は, そのタンパク質が葉から茎頂メリステムへと長距離を移動する。茎頂メリステムで *Hd3a/RFT1* は *OsFD* や 14-3-3 タンパク質と複合体を形成して, 標的遺伝子である *PAP2* や *OsFULs* の転写を誘導する。これによって茎頂メリステムが花序メリステムへ転換する。すなわち, 葉では **MADS box** 転写因子がフロリゲン遺伝子の発現を促進し, 茎頂メリステムではフロリゲンが **MADS box** 転写因子の発現を促進するというように, フロリゲンと **MADS box** 転写因子は葉と茎頂メリステムで上下関係を変える 2 段階の発現制御で機能する (図 3-14)。

API/FUL グループの **MADS box** 転写因子が生殖成長相への転換を促進することは他のイネ科植物でも報告されている。コムギやオオムギ, ペレニアルライグラスのような温帯イネ科植物では, 生殖成長相へ転換するために低温に遭遇することが必要である。これらの植物種での低温により誘導される花成には *VERNALIZATION 1 (VRN1)* 遺伝子の発現が重要な機能を果たす (Danyluk et al., 2003; Yan et al., 2003; Trevaskis et al., 2003, 2007; Petersen et al., 2006; Preston and Kellogg, 2008; Greenup et al., 2009; Oliver et al., 2009)。 *VRN1* は, *API/FUL* グループの **MADS box** 転写因子である。植物が低温に遭遇すると葉での *VRN1* の発現が誘導される。 *VRN1* は *FT* の発現を抑制している *VRN2* を抑制する (Trevaskis et al., 2006)。その結果, *VRN2* による抑制が外れて *FT* の発現が誘導されるため, 花成が促進される。つまり, コムギやオオムギでは *VRN1* は葉で *FT* の上流で機能する (Hemming et al., 2008; Shimada et al., 2009)。したがって, *API/FUL* 遺伝子による葉での *FT* の転写誘導は, 花成誘導に低温が必要かどうかに関わらず, イネ科植物で保存されている制御機構である可能性が示された。

シロイヌナズナのゲノム上には, 3 つの *API/FUL* 遺伝子 (*API*, *CAL*, *FUL*) が存在する。この 3 つの遺伝子は, 双子葉植物が分化した後に遺伝子重複によって出現したと推測されるため, イネ科植物の *API/FUL* 遺伝子とはそれぞれ独自に進化した遺伝子である (Litt and Irish, 2003; 図 3-3)。シロイヌナズナの 3 つの *API/FUL* 遺伝子のうち, *API* と *CAL* は, 花メリステムアイデンティティを決定する遺伝子であり, 花メリステムが形成されるときに発現する (Bowman et al., 1993; Ferrándiz et al., 2000)。これに対し, *FUL* は生殖成長相への転換時に茎頂メリステムで強く発現誘導される (Hempel et al., 1997)。また, *FUL* は生殖成長相への転換にも関わる。したがって, *OsFULs* は 3 つのシロイヌナズナ *API/FUL* 遺伝子のうち *FUL* 遺伝子と発現パターンと機能が共通する。しかし, *OsFULs* 三重抑制体の穂の

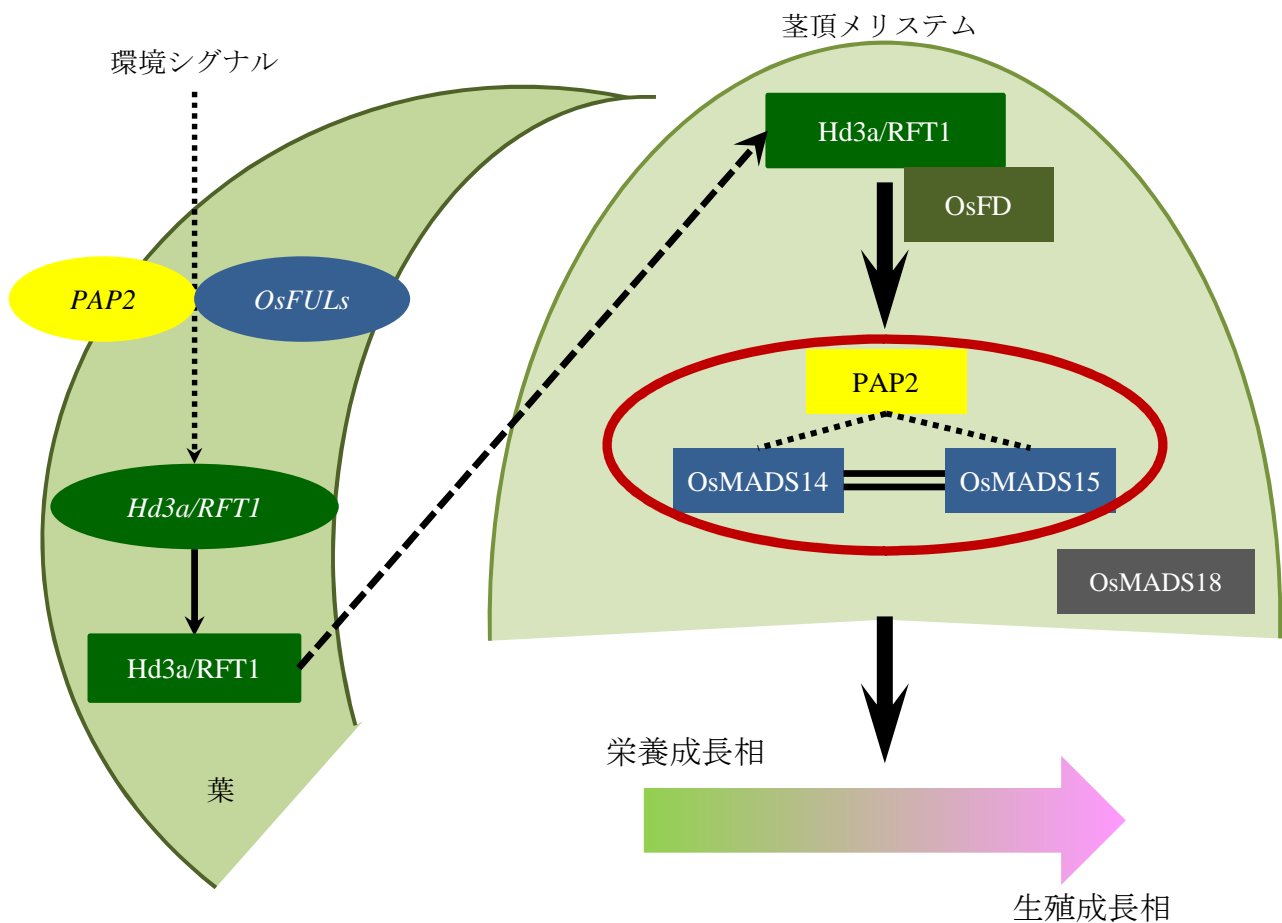


図3-14 花序形成におけるMADS box転写因子の機能に関する模式図

葉で環境シグナル（日長や温度など）を受けてPAP2とOsFULsの転写が誘導される。PAP2とOsFULsがHd3a/RFT1の転写を促進する。Hd3a/RFT1は葉で翻訳され、タンパク質が茎頂メリステムまで移動する。茎頂メリステムでHd3a/RFT1はOsFDと相互作用し、下流遺伝子としてPAP2とOsFULsの発現を誘導する。PAP2とOsFULsタンパク質は、OsMADS14とOsMADS15が強く結合し（二重実線）、PAP2とOsMADS14、PAP2とOsMADS15は弱く相互作用することで（破線）、3種類のMADS box転写因子からなる複合体を形成する（赤楕円で囲った部分）。このPAP2、OsMADS14およびOsMADS15の複合体の機能によって、茎頂メリステムは栄養成長から生殖成長への相転換（花序メリステムへの転換）が完了する。

図中の楕円形は遺伝子の転写 (mRNA)、四角形は翻訳 (タンパク質) を表す。

形態に異常はみられず (図 3-6), *PAP2* の機能が欠損してはじめて成長相の転換が阻害された (図 3-7~10). この結果は, 異なるグループの MADS box 転写因子であるにもかかわらず, *OsFULs* と *PAP2* が協調的に機能することを意味する. このように *SEP* 遺伝子であるイネの *PAP2* がシロイヌナズナの *API* や *FUL* のように振舞うことが, イネの穂形成に特徴的である. *PAP2* が花序メリステムでも発現・機能することも, シロイヌナズナ *SEP* 遺伝子が花メリステムで機能することと異なる. すなわち, *PAP2* は系統的にはイネ科植物の *SEP* 遺伝子に分類されるが, 機能的には *API/FUL* 遺伝子として作用することで穂形成を制御するという独特の進化を遂げたと考えた.

総合考察

本研究論文では、生物の形態形成を理解する上で細胞や組織のアイデンティティの転換が重要であるという観点から、植物の花序形成を制御する遺伝子メカニズムの解明に挑戦した。花序の形態形成を制御する要因は、花アイデンティティの獲得である。花アイデンティティを促進する遺伝子と抑制する遺伝子の作用力のバランスが植物種に固有の花序の形態を決定する。これまでに双子葉のモデル植物で総状花序のシロイヌナズナを用いた研究から、中心的な役割を果たす「花メリステムアイデンティティ遺伝子」や、花アイデンティティを抑制する遺伝子が同定された。本研究論文では単子葉のモデル植物で円錐花序を示すイネを解析の材料とし、高等植物に共通する花序形成メカニズムと種の多様性を生み出す遺伝的差異を見出すことを期待した。

本研究では、*PAP2* が小穂アイデンティティ決定遺伝子であることを同定し、それがイネ科植物で独自に進化した *SEP* グループ遺伝子であることを明らかにした。引き続き、イネの他の *SEP* 遺伝子の穂形成への機能を解析し、イネ *SEP* 遺伝子がサブグループごとに異なる機能と発現パターンを示して小穂構造の決定に寄与することを明らかにした。*PAP2* の発現解析によって、*PAP2* の相転換への関与が示された。また、遺伝子発現抑制と分子間相互作用試験によって、*PAP2* は *OsFULs* と相互作用して *Hd3a* の下流で機能して相転換を制御することを明らかにした。以上の結果から、*PAP2* はイネの穂形成プログラム全体に関わる主要な遺伝子であることが示された。以下に、*PAP2* と *OsFULs* によるイネの穂形成プログラムを振り返り、*SEP* と *FUL* 遺伝子の機能の多様化がイネとシロイヌナズナで異なる花序形成の原因であることについて検討する。

API/FUL グループの *MADS box* 転写因子は被子植物にのみ存在し、双子葉植物における進化の過程で遺伝子重複と機能獲得によって *API* と *CAL* が分類されるサブグループが花メリステムならびに花器官の形態、数および配置の決定に関与し、*FUL* サブグループが生殖成長相の性質を決定するように分化したと考えられている。双子葉植物以外の植物には *FUL* 遺伝子のみが存在する (Litt and Irish, 2003)。 *SEP* は種子植物の分化に伴って出現し、花を獲得する上で重要な遺伝子であると考えられており (Theissen et al., 2000)、イネ科植物の進化の初期に起きた遺伝子重複によって *SEP* の機能が多様化したと推測されている (Malcomber and Kellogg, 2005)。 *PAP2* は *SEP* グループのなかでもっともイネ科植物に特異的なクレードに属する。本研究によって、*PAP2* は生殖成長への相転換の制御に関与することが示された (第 3 章)。これらのことから、*PAP2* はイネ科植物で独自の進化を遂げた結

果, *FUL* のように振舞うことで穂形成の最初の段階, すなわち花序メリステムへの転換を制御する機能を獲得した可能性が考えられる. *PAP2* のオーソログとして, トウモロコシの *ZmM24*, *ZmM31* やコムギの *AGLG1* が知られており, これらも *PAP2* と同様に生殖成長相初期で発現するため (Yan et al., 2003; Danilevskaya et al., 2008), *PAP2* が生殖成長相への転換に機能することはイネ科植物に保存された制御メカニズムであると考えられる. また, *PAP2* が小穂アイデンティティ遺伝子であること, *PAP2* がイネ科植物特異的な遺伝子であること (第 1 章), 小穂がイネ科植物に特徴的な構造であることを考え合わせると, *PAP2* 遺伝子はイネ科植物で独自に進化を遂げた結果, *API* のように振舞い小穂メリステムのアイデンティティを決定する機能をも獲得したと推測される. すなわち, *SEP* グループ遺伝子である *PAP2* がイネ科植物の進化の過程で *API* と *FUL* に類似した 2 つの機能を獲得したことによって, イネ科植物の花序形成が *PAP2* 遺伝子によって全般的に制御されるようになった可能性が考えられる. この可能性を検証するためには, 他のイネ科植物における *PAP2* オーソログの発現パターンならびに *PAP2* オーソログの相転換と小穂形成への機能を明らかにすることが課題である.

イネにおいては, *LHS1/OsMADS1* と *OsMADS14*, *OsMADS15* は分子間相互作用し, *LHS1/OsMADS1* は小花アイデンティティと外穎形成を制御する (Jeon et al., 2000; Lim et al., 2000; 第 2 章). さらに, *PAP2* と *OsMADS14*, *OsMADS15* が相互作用して花序メリステムへの転換を制御することが示された (第 3 章). シロイヌナズナでは *SEP3* と *API1* は相互作用して, 花メリステムアイデンティティを決定し, 花器官 (萼, 花弁) のアイデンティティを制御する (Honma and Goto, 2001; Pelaz et al., 2001). すなわち, イネとシロイヌナズナでは *SEP* グループの *MADS box* 転写因子と *API1/FUL* グループの *MADS box* 転写因子からなる複合体が, 生殖成長相のメリステムアイデンティティの制御に関与すると考えられる. さらに, 以下に述べる理由により, *SEP* と *API1/FUL* の組合せの多様化が植物種によって異なる花序形成の原因である可能性が考えられる. まず, イネでは *FUL* 遺伝子である *OsMADS14* と *OsMADS15* は生殖成長への相転換を冗長的に促進する (第 3 章). *SEP* グループでは *PAP2* が茎頂メリステムの相転換と小穂アイデンティティの決定, *LHS1/OsMADS1* と *OsMADS5* が小花アイデンティティの決定, *OsMADS7* と *OsMADS8* が花器官の分化を制御する. *LOFSEP* がメリステムアイデンティティの制御に特化したと推測される (第 2 章). これに対し, シロイヌナズナ *SEP* は冗長的に機能する (Pelaz et al., 2000). しかし, *API* と *CAL* は花メリステムの決定に作用し, *FUL* は生殖成長相全般で発現し特異的な作用点がない (Bowman et al., 1993; Hempel et al., 1997; Ferrandiz et al., 2000). すなわち, シロイヌナズナでは *SEP/API1* 複合体と *SEP/FUL* 複体の使い分けによって花メリステムが決定される

可能性がある。イネとシロイヌナズナではどちらも *SEP* と *AP1/FUL* からなる複合体がメリステムアイデンティティを制御し、その構成要素が変化することで異なるアイデンティティが決定される。しかし、*SEP* と *AP1/FUL* からなる複合体の機能を多様化させる要因は、イネでは *SEP* 遺伝子の多様性であり、シロイヌナズナでは *AP1* と *FUL* の特殊化であるという違いが見出される。特に、イネ科植物における *SEP* グループ遺伝子の機能の多様化は、イネ科植物に特徴的な花序構成単位である小穂構造の獲得に貢献したと考えられ、なかでも *LOFSEP* サブグループ遺伝子のイネ科植物における独自の進化が、小穂形成に大きく寄与したことが示された (第 2 章)。したがって、植物では種の進化とともに遺伝子重複と新機能の獲得が起こり、その際 *SEP* と *AP1/FUL* からなる複合体を用いるという枠組みを残したまま構成要素の多様化と機能分化が生じたため、花序メリステムと花メリステムアイデンティティの制御メカニズムが植物種ごとに多様化した可能性が考えられる。

花メリステムアイデンティティを決定する *LFY* の機能は、シロイヌナズナ、キンギョソウ、トマト、ペチュニアおよびトウモロコシでは保存されているが、イネでは小穂アイデンティティの抑制に作用する (Coen et al., 1990; Souer et al., 1998; Molinero-Rosales et al., 1999; Bomblies et al., 2003; Rao et al., 2008; Ikeda-Kawakatsu et al., 2011)。このため、イネでは小穂決定にはたらく遺伝子は *RFL* 以外にあると考えられる。その小穂アイデンティティ決定遺伝子が *PAP2* であることが本研究の解析によって明らかになった (第 1 章)。また、*PAP2* と *OsFULs* の四重抑制体では花序形成は起こらないが、止葉様の葉の展開、葉序の変化および稈の節間伸長が起こることから、部分的には生殖成長への相転換が起こると考えた。この表現型はシロイヌナズナ *lfy* 変異体に類似している。*lfy* 変異体では、花メリステムアイデンティティが決定されず、花がつくられるべき部位にシュートや葉状器官が形成されるが、花茎は伸長する (Weigel et al., 1992; Moyroud et al., 2010)。つまり、*lfy* 変異体でも部分的な相転換は起こる。したがって、イネでは *PAP2* と *OsFULs* が相互作用して機能することで、シロイヌナズナで *LFY* が行なうように小穂メリステムアイデンティティを決定すると予想できる。しかし、*OsFULs* やそのオーソログには *AP1* と相同な機能は知られていない。すなわち、他のイネ科植物においても *FUL* 遺伝子 (*VRN1*, *ZmM4*, *ZmM15*) は、花序メリステムで発現し生殖成長への相転換を制御することが報告されている (Yan et al., 2003; Danilevskaya et al., 2008)。したがって、*PAP2* が 1 つの遺伝子で小穂アイデンティティを決定する *LFY* や *AP1* に似た機能と、花序メリステムへの転換を制御する *FUL* 様の 2 つの機能を併せ持つことで、イネの穂形成が制御されると考えられる。*OsFULs* は *PAP2* と分子間相互作用して相転換に関しては遺伝学的に冗長な機能を示すが (第 3 章)、*PAP2/OsFULs* 複合体として機能するのであれば、*OsFULs* は *PAP2* と協調的に小穂アイデン

ティティの決定に関与する可能性が考えられる。しかし、*OsFULs* が小穂メリステムアイデンティティ遺伝子であることを示す実験的根拠がないため、*OsFULs* の小穂アイデンティティへの寄与については結論に至らない。このため、*OsFULs* の発現パターンを決定することと *PAP2/OsFULs* 複合体の小穂アイデンティティ制御への機能を解析することは、*OsFULs* が *Hd3a* の下流因子として小穂アイデンティティの決定に関わる可能性を吟味する上で重要な課題である。

シロイヌナズナでは *FT* が花メリステムアイデンティティ遺伝子の発現誘導に機能する (Turck et al., 2003; Wigge, 2010)。このため、*Hd3a/RFT1* は小穂アイデンティティ遺伝子である *PAP2* の発現を誘導することで、小穂メリステムアイデンティティの決定にも関与する可能性が考えられる。本研究では、*pap2-1* 変異体背景で *Hd3a* を過剰発現させ、形質転換カルスの再分化に伴って表現型観察を行なうことにより、生殖成長への相転換に対する作用を検証することができた (第3章)。しかし、花序メリステムに転換した後の小穂メリステムの決定に対する *Hd3a* の作用については、*pap2-1* 変異体でも生殖成長に転換し小穂形成がなされること、ならびに *pap2-1* 背景で *Hd3a* を過剰発現させたとき野生型背景よりは遅れるがそれでも小穂が形成されることから、*PAP2* の他にも *Hd3a* のシグナルによって小穂形成を促進する遺伝子が存在する可能性が考えられる。このため、小穂アイデンティティ決定時に *Hd3a/RFT1* によって発現制御を受ける遺伝子の解析が待たれる。

本研究によって、生殖成長相への転換においては *Hd3a* の下流で *PAP2* と *OsFULs* が協調的に機能することが示された。*OsFULs* のうち *OsMADS14*, *OsMADS15* は *Hd3a* の下流遺伝子であると考えられているため、同時に機能する *PAP2* についても *Hd3a/OsFD* 複合体によって転写が直接制御される可能性が考えられる。したがって、*PAP2* と *Hd3a* の直接的な発現の制御関係を解明することは、イネにおける生殖成長への相転換制御メカニズムを理解する上でも重要である。また、*PAP2* が *OsFULs* と分子間相互作用して生殖成長相への転換を制御することが示されたため (第3章)、茎頂メリステムが生殖成長へ相転換するとき転写因子である *PAP2/OsFULs* 複合体の機能によって発現が促進される遺伝子を同定することは、イネ茎頂メリステムの相転換メカニズムをさらに深く解明するための足がかりとなる。また、*Hd3a/RFT1* の発現抑制ではまったく生殖成長へ転換しないのに対し、四重抑制体でも部分的な相転換がみられることから、茎頂メリステムの生殖成長への相転換を制御する遺伝子は *PAP2*, *OsFULs* の他にも存在すると思われる。このような未知の遺伝子を同定することもイネにおける成長相転換メカニズムを解明するには必要である。

本研究により、イネでは *PAP2* が小穂アイデンティティ決定遺伝子として初めて同定された。一方、トウモロコシにおいては *RAMOSA1/2/3* など、いくつかの遺伝子が小穂アイ

デンティティ決定に寄与することが知られている (Vollbrecht et al., 2005; Bortiri et al., 2006; Satoh-Nagasawa et al., 2006). しかし、それらのイネオーソログは知られておらず、他のイネ科植物における *PAP2* オーソログも知られていない。したがって、イネ科植物の穂形成を総合的に理解するためには、このように知られていない数々の因子を同定し、相互関係を明らかにすることが必要である。本研究によってイネ科植物に独特の遺伝子として *PAP2* を単離したことで、今後のイネ科植物の穂形成に関する研究の発展への貢献が期待される。

次に小穂アイデンティティを抑制する機能と *PAP2*, *OsFULs* との関係を考える。シロイヌナズナでは花成誘導遺伝子 *FT* が *LFY* の機能を促進する一方で、花アイデンティティの抑制遺伝子 *TFL1* は *LFY* の発現を抑制する (Liu et al., 2009)。FT と TFL1 は相同性の高いタンパク質で、その拮抗的な作用は 1 アミノ酸残基の違いに起因する (Hanzawa et al., 2005)。また、FD との相互作用に関して FT と TFL1 は競合し、FT には下流遺伝子の発現誘導機能、TFL1 には抑制機能がある。このため、FT の標的である花アイデンティティ遺伝子の発現が TFL1 によって抑制される (Hanano and Goto, 2011)。TFL1 相同遺伝子である *RCN* は小穂アイデンティティの抑制遺伝子である (Nakagawa et al., 2002)。Hd3a/RFT1 と RCN が拮抗的な作用を示す原因が、FT と TFL1 が拮抗することと同じメカニズムによるのだろうか。つまり、RCN が OsFD との相互作用に関して Hd3a と競合する可能性や、標的遺伝子として *PAP2* や *OsFULs* の転写抑制に関わることが推測できる。反対に *PAP2* や *OsFULs* によって *RCN* の発現が抑制される可能性も考えられる。このため、これら遺伝子の制御関係を明らかにすることによって、イネの小穂アイデンティティを制御する遺伝子ネットワークを理解する手がかりが得られると期待される。さらに、小穂アイデンティティを抑制する *RFL* や *APO1*, 小穂アイデンティティ遺伝子である *PAP2* および *PAP2* と相互作用して機能する *OsFULs* の遺伝学的関係や分子間相互作用の解明によって、小穂メリステムの決定においてイネとシロイヌナズナで *RFL/LFY* の機能する方向が反対であることの原因に迫れるかもしれない。特に、これまでは小穂メリステムの決定を抑制する遺伝子のみが知られていたため、*PAP2* とそのような遺伝子との関係を明らかにすることは、全体のネットワークを理解するために重要である。

以上、本研究でイネ穂形成におけるメリステムアイデンティティ制御ネットワークを構成する一要因として *PAP2* を同定したことによって、今後のイネ穂形成制御メカニズムの全貌解明に向けた研究への貢献が確信される。

要旨

生物の形態形成の正しい進行には、細胞や組織の状態変化の適切な制御が重要である。組織の状態変化を制御する遺伝子メカニズムを解明する足がかりとして、本研究では植物の花序形成に着目した。花序の基本構造は、メリステムが花としてのアイデンティティを獲得するパターンによって決定され、その制御メカニズムの相違が種ごとに異なる花序の形態をつくり出す。シロイヌナズナを用いた解析によって、花メリステム形成を決定する「花アイデンティティ遺伝子」が明らかになった。シロイヌナズナは総状花序を形成するが、集散花序の植物でも花アイデンティティ遺伝子の機能は保存されており、花序形成制御における共通原理が示唆された。イネの穂は円錐花序であり、分枝上に花（小穂）を形成するという特徴がある。円錐花序では分枝形成から花形成への切替えが花序形態を決定する。イネ科植物に特徴的な構造である小穂の進化も興味深い問題である。さらに、イネ科植物の花序形態の制御は穀物生産上も重要である。本研究では、植物の花序形成を制御する共通原理と、多様性を生み出す原因を理解するため、イネの穂形成を制御する遺伝子メカニズムの解明を目指した。

第1章 イネ小穂メリステム形成を決定する遺伝子の単離

イネ科植物では、花序形成の単位は小穂である。したがって、メリステムが小穂メリステムとしてのアイデンティティを獲得し、小穂が形成されることが穂の形態を決定する最大の要因である。小穂形成を制御する分子メカニズムを理解するために、第1章では、小穂形成が抑制される劣性突然変異体 *panicle phytomer 2-1* (*pap2-1*) を解析した。

pap2-1 変異体のもっとも顕著な異常は枝梗の増加である。特に2次枝梗が増加し、さらに野生型にみられない3次枝梗形成も認められた。このため、*pap2-1* では小穂アイデンティティの決定が遅れると解釈し、*PAP2* が小穂形成を促進する遺伝子であると考えた。また、*pap2-1* 変異体では1次枝梗数の増加や副護穎と護穎の過伸長が観察された。

PAP2 遺伝子をマップベースクローニングで単離した結果、*PAP2* は *OsMADS34* をコードすることが明らかとなった。植物の *MADS box* 転写因子は植物の成長や器官形成を制御するファミリー遺伝子である。*PAP2* は *SEPALLATA (SEP)* グループに分類され、そのなかでもイネ科植物に特異的なサブグループに属する。*PAP2* を過剰発現すると、変異体の表現型とは逆に、2次枝梗数が減少し、1次枝梗の側生器官数も減少した。この表現型から、*PAP2* 遺伝子の発現を増加することで小穂形成が促進されることが考えられた。また、過剰発現体で

は1次枝梗がわずかに減少した。レポーターとしてGUS遺伝子を用いてPAP2遺伝子の発現部位を解析したところ、発現シグナルは生殖成長相の茎頂メリステム、小穂メリステム予定領域および副護穎の先端で検出された。

第1章の解析により、PAP2がイネの穂形成においてメリステムに小穂としての属性を付与する小穂アイデンティティ遺伝子であると結論した。

第2章 小穂構造の決定へのイネ科植物SEP遺伝子の多様性の寄与

PAP2はSEPグループのMADS box 転写因子である。SEPグループはさらにLOFSEPとSEP3サブグループに分けられ、イネの5つのSEP遺伝子のうち、PAP2、OsMADS1、OsMADS5がLOFSEP、OsMADS7とOsMADS8がSEP3サブグループに分類される。先行研究によりOsMADS1の機能は報告されていたが、それ以外の3遺伝子の機能は不明であった。そこで、イネSEP遺伝子の機能を総合的に理解することは小穂形成を制御するメカニズムの解明に繋がると考え、解析を行なった。

まず、SEP遺伝子の発現のタイミングと部位を調べた。その結果、PAP2は小穂メリステム、OsMADS1とOsMADS5は小花メリステム、OsMADS7とOsMADS8は分化中の花器官で発現していた。一連の小穂形成過程において5つのSEP遺伝子が少しずつタイミングをずらして発現することが示された。

機能の知られていなかったOsMADS5について、OsMADS1との二重変異体を作成して表現型観察を行なった。その結果、osmads1 osmads5二重変異体ではosmads1の異常が亢進され、護穎状器官の形成が反復された。このため、OsMADS5はOsMADS1と冗長的に小花アイデンティティ、外穎と内穎の成長、小穂の有限性を制御することが明らかとなった。OsMADS7とOsMADS8の遺伝子発現を抑制したところ、どちらか一方のみを発現抑制した場合には花器官にわずかな異常が生じた。しかし、2つの遺伝子を同時に発現抑制すると、鱗被より内側のすべての花器官において顕著な異常が生じ、雌蕊分化の反復も観察された。したがって、OsMADS7とOsMADS8は冗長的に花器官形成を制御することが示された。

第2章では、イネの5つのSEP遺伝子がサブグループごとに異なるタイミングと領域で発現、機能することで小穂の成長を制御することを明らかにした。特に、イネ科植物に特異的なサブグループに属するPAP2、OsMADS1、OsMADS5が小穂アイデンティティや小穂器官の形成というイネ科植物に特徴的な過程を制御することが明らかとなった。

第3章 生殖成長への相転換を制御するPAP2とOsFULs遺伝子

植物の花序形成の最初の段階は、茎頂メリステムの栄養成長から生殖成長への相転換で

ある。日長応答性の相転換には、葉で産生される花成誘導因子フロリゲンが関わるが、フロリゲンが茎頂メリステムの相転換を起こす遺伝子ネットワークの全貌は知られていない。第3章では、イネフロリゲンである *Hd3a* の下流で機能する遺伝子を同定し、生殖成長への相転換と穂形成における機能を解析した。

GUS レポーターを用いた発現解析によって、*PAP2* は茎頂メリステムの栄養成長から生殖成長への相転換に伴って茎頂メリステム全体で発現を開始することが明らかとなり、*PAP2* の相転換への関与が示唆された。しかし、*pap2-1* 変異体は相転換に異常を示さないため、*PAP2* は他の遺伝子と協調的に機能する可能性が考えられた。転換期の茎頂メリステムにおける遺伝子発現のマイクロアレイ解析によって、*OsFULs* (*OsMADS14*, *OsMADS15*, *OsMADS18*) が *PAP2* と同じ時期に発現することが明らかとなったため、*OsFULs* が *PAP2* と協調的に機能する遺伝子の候補であると考えた。

pap2-1 背景で *OsFULs* の発現を抑制したところ、四重抑制体では茎頂メリステムの相転換が阻害され、止葉様の葉が展開した後も繰り返し葉が形成された。四重抑制体の茎頂で形成される葉原基の腋部には側生メリステムが形成され、シュート様に発達することが観察された。マーカー遺伝子の発現解析、SEM 解析、組織観察を行なったところ、これらの側生メリステムでは栄養成長相のメリステムの性質が維持されていた。以上の結果から、*PAP2* は *OsFULs* と協調して茎頂メリステムを生殖成長へ相転換させることが明らかとなった。葉から茎頂へ輸送された *Hd3a* の下流で *PAP2* と *OsFULs* が機能する可能性を考え、これらの遺伝学的関係を調べた。*Hd3a* を *pap2-1* 背景で過剰発現させたところ、*Hd3a* の花成促進効果が緩和された。このため、*Hd3a* の作用には *PAP2* の機能が必要であると結論した。

MADS box 転写因子は二量体あるいは四量体を形成して機能することから、*PAP2* と *OsFULs* は分子間相互作用して機能する可能性があると考えた。酵母ツーハイブリッド法による解析では、*OsMADS14* と *OsMADS15* の強い相互作用、*PAP2* と *OsMADS14*、*PAP2* と *OsMADS15* の弱い相互作用が検出された。また、タバコを用いた一過的発現系での共免疫沈降法により、これらのタンパク質が植物細胞内でも相互作用することを確認した。

第3章の解析によって、*PAP2* が異なるグループの3つの MADS box 転写因子、*OsFULs* と協調的に茎頂メリステムの相転換を制御することを明らかにした。また、この作用は茎頂に輸送されたフロリゲンにより引き起こされることを示した。

本研究では、*PAP2* が小穂アイデンティティ遺伝子であることを同定し、それがイネ科植物で独自に進化したことを明らかにした。次に、イネの5つの *SEP* 遺伝子の機能を解析し、イネ *SEP* 遺伝子がサブグループごとに異なる機能と発現パターンを示して小穂構造を決定

することを明らかにした。 *PAP2* の発現解析により *PAP2* の相転換への関与が示され、遺伝子発現抑制と相互作用試験によって *PAP2* は *OsFULs* と相互作用して *Hd3a* の下流で機能することが明らかとなった。以上より、 *PAP2* はイネの穂形成プログラム全般に関わる主要遺伝子であることが示された。

本研究の結果、 *SEP* 遺伝子と *FUL* 遺伝子はイネの穂形成過程でのメリステムアイデンティティ制御において中心的な役割を果たすことが明らかとなった。 *SEP* も *FUL* もイネ科植物で独自に進化を遂げた。その結果生じた機能や発現パターンの多様化や特殊化が、イネ科植物に特異的な形態を生み出す要因になったと考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、長年にわたり数多くのご指導とご鞭撻を賜りました指導教官/主査である経塚淳子准教授に篤く御礼を申し上げます。

独立行政法人農業生物資源研究所の廣近洋彦博士と宮尾安藝雄博士に、*pap2-1* と *lhs1/osm1*, *osm5* の種子を分与していただきました。独立行政法人農業生物資源研究所の長村吉晃博士と佐藤豊博士に、LMD マイクロアレイの解析データを供与していただきました。岡山大学資源植物科学研究所の前川雅彦教授に、*pap2-1* とカサラスの交雑種子を譲渡していただきました。独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所の吉田均博士と同機構中央農業総合研究センター・北陸研究センターの木水真由美さんからは、OsMADS14/15/18i の遺伝子発現抑制のためのベクターを供与していただきました。奈良先端科学技術大学院大学の島本功教授と辻寛之博士に、*rolC::Hd3a-GFP* のベクターを分与していただきました。本研究科・植物医科学研究室の橋本将典博士にはアグロインフィルトレーション法の助言をいただきました。名古屋大学大学院生命農学研究科の佐藤豊准教授からは共免疫沈降法やウェスタンブロッティングについて助言をいただきました。理化学研究所の柳川由紀博士にも共免疫沈降法とウェスタンブロッティングについてご相談させていただきました。本研究科・植物栄養肥料科学研究室の藤原徹教授と神谷岳洋博士にはウェスタンブロッティング検出のために測定機器を使わせていただきました。みなさまに、心より感謝申し上げます。

本研究論文の審査を行なってくださいました、栽培学研究室の根本圭介教授、育種学研究室の長戸康郎教授、伊藤純一准教授、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所の吉田均博士に重ねて御礼申し上げます。

栽培学研究室の根本圭介教授、阿部淳博士と研究グループの皆さんには、学業・研究を行なう環境の整備で、数多くのご尽力を賜りました。

研究グループの仲間である及川鉄男博士、安野奈緒子博士、石川伸二博士、北郷悠博士、吉田明希子博士、李偉強博士ならびに、森章恵さん、邊見真生さん、伊丹順さん、小松契史博士、倉川尚さん、助川慎さん、森田ゆたかさん、有手友嗣さん、岩田広隆さん、大島健司さん、笹尾真史さん、佐々木恵理加さん、北口善教さん、陳蘂紅さん、駱楽さん、亀岡啓さん、水口皓介さん、依田勝寛さん、丁承強さん、高橋徳さん、山崎諒さんたちからは、研究遂行の上で多くの助言や気づき、実験の手ほどきなどをいただきました。

ここまで長年にわたってわたくしの学業・研究生活を支えてくださった母・紀子と父・克容、妹・真理に心からの感謝の気持ちを表します。

引用文献

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K. and Araki, T. (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, **309**, 1052-1056.
- Agrawal, G.K., Abe, K., Yamazaki, M., Miyao, A. and Hirochika, H. (2005) Conservation of the E-function for floral organ identity in rice revealed by the analysis of tissue culture-induced loss-of-function mutants of the *OsMADS1* gene. *Plant Mol. Biol.*, **59**, 125-135.
- Arber, A. (1934) The gramineae: A study of cereal, bamboo, and grass. Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Singh, A.K., Singh, V.P., Tyagi, A.K. and Kapoor, S. (2007) MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and steress. *BMC Genomics*, **8**, 242.
- Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, A., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Angeles, E.R., Qian, Q., Kitano, H. and Matsuoka, M. (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, **309**, 741-745.
- Bomblies, K., Wang, R-L., Ambrose, B.A., Schmidt, R.J., Meeley, R.B. and Doebley, J. (2003) Duplicate *FLORICAULA/LEAFY* homologs *zfl1* and *zfl2* control inflorescence architecture and flower patterning in maize. *Development*, **130**, 2385-2395.
- Bommert, P., Satoh-Nagasawa, N., Jackson, D. and Hirano, H.Y. (2005) Genetics and evolution of inflorescence and flower development in grasses. *Plant Cell Physiol.*, **46** (1), 69-78.
- Borner, R., Kampmann, G., Chandler, J., Gleissner, R., Wisman, E., Apel, K. and Melzer, S. (2000) A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **24** (5), 591-599.
- Bortiri, E., Chuck, G., Vollbrecht, E., Rocheford, T., Martienssen, R. and Hake, S. (2006) *ramosa2* encodes a LATERAL ORGAN BOUNDARY domain protein that determines the fate of stem cells in branch meristems of maize. *Plant Cell*, **18**, 574-585.
- Bowman, J.L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E.M. and Smyth, D.R. (1993) Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development*, **119**, 721-743.
- Bradley, D., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R. and Coen, E. (1997) Inflorescence

- commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science*, **275**, 80-83.
- Chae, E., Tan, Q.K-G., Hill, T.A. and Irish, V.F.** (2008) An *Arabidopsis* F-box protein acts as a transcriptional co-factor to regulate floral development. *Development*, **135**, 1235-1245.
- Chuck, G., Meeley, R. and Hake, S.** (2008) Floral meristem identity initiation and meristem cell fate are regulated by the maize *AP2* genes *ids1* and *sid1*. *Development*, **135**, 3013-3019.
- Chuck, G., Meeley, R., Irish, E., Sakai, H. and Hake, S.** (2007) The maize *tasselseed4* microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting *Tasselseed6/indeterminate spikelet 1*. *Nat. Genet.*, **39** (12), 1517-1521.
- Chuck, G., Meeley, R. and Hake, S.** (1998) The control of maize spikelet meristem fate by the *APETALA2*-like gene *indeterminate spikelet 1*. *Genes Dev.*, **12**, 1145-1154.
- Chuck, G., Muszynski, M., Kellogg, E., Hake, S. and Schmid, R.J.** (2002) The control of spikelet meristem identity by *branched silkless 1* gene in maize. *Science*, **298**, 1238-1241.
- Coen, E.S., Romero, J.M., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G. and Carpenter, R.** (1990) *floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell*, **63**, 1311-1322.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakontis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C. and Coupland, G.** (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, **316**, 1030-1033.
- Cui, R., Han, J., Zhao, S., Su, K., Wu, F., Du, X., Xu, Q., Chong, K., Theissen, G. and Meng, Z.** (2010) Functional conservation and diversification of class E floral homeotic genes in rice (*Oryza sativa*). *Plant J.*, **61** (5), 767-781.
- Danilevskaya, O.N., Meng, X., Seilinger, D.A., Deschamps, S., Hermon, P., Vansant, G., Gupta, R., Ananiev, E.V. and Muszynski, M.G.** (2008) Involvement of the MADS-box gene *ZMM4* in floral induction and inflorescence development in maize. *Plant Physiol.*, **147**, 2054-2069.
- Danyluk, J., Kane, N.A., Breton, G., Limin, A.E., Fowler, D.B. and Sarhan, F.** (2003) TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals. *Plant J.*, **132**, 1849-1860.
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S. and Yanofsky, M.F.** (2004) The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Curr. Biol.*, **14**, 1935-1940.
- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R. and Yanofsky, M.F.** (2000) Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development*, **127**, 725-734.

- Fornara, F., Pařenicová, G., Pelucchi, N., Masiero, S., Ciannamea, S., Lopez-Dee, Z., Altamura, M.M., Colombo, L. and Kater, M.M.** (2004) Functional characterization of *OsMADS18*, a member of the *API/SQUA* subfamily of MADS box genes. *Plant Physiol.*, **135**, 2207-2219.
- Furutani, I., Sukegawa, S. and Kyozyuka, J.** (2006) Genome-wide analysis of spatial and temporal gene expression in rice panicle development. *Plant J.*, **46**, 503-511.
- Fuse, T., Sasaki, T. and Yano, M.** (2001) Ti-plasmid vectors useful for functional analysis of rice genes. *Plant Biotechnol.*, **18**, 219-222.
- Gao, X., Liang, W., Yin, C., Ji, S., Wang, H., Su, X., Guo, C., Kong, H., Xue, H. and Zhang, D.** (2010) The *SEPALLATA*-like gene *OsMADS34* is required for rice inflorescence and spikelet development. *Plant Physiol.*, **153**, 728-740.
- Goto, K., Kyozyuka, J. and Bowman, J.L.** (2001) Turning floral organs into leaves, leaves into floral organs. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **11**, 449-456.
- Gramzow, L., and Theissen, G.** (2010) A hitchhiker's guide to the MADS world of plants. *Genome Biol.*, **11**, 214.
- Greenup, A., Peacock, W.J., Dennis, E.S. and Trevaskis, B.** (2009) The molecular biology of seasonal flowering-responses in *Arabidopsis* and the cereals. *Ann. Bot.*, **103** (8), 1165-1172.
- Hanano, S. and Goto, K.** (2011) *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER 1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *Plant Cell*, **23** (9), 3172-3184.
- Hanzawa, Y., Money, T. and Bradley, D.** (2005) A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **102** (21), 7748-7753.
- Hemming, M.N., Peacock, W.J., Dennis, E.S. and Trevaskis, B.** (2008) Low-temperature and daylength cues are integrated to regulate *FLOWERING LOCUS T* in barley. *Plant Physiol.*, **147**, 355-366.
- Hempel, F.D., Weigel, D., Mandel, M.A., Ditta, G., Zambryski, P.C., Feldman, L.J. and Yanofsky, M.F.** (1997) Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development*, **124**, 3845-3853.
- Hepworth, S.R., Klenz, J.E. and Haug, G.W.** (2006) UFO in the *Arabidopsis* inflorescence apex is required for floral-meristem identity and bract suppression. *Planta*, **223** (4), 769-778.
- Hirochika, H.** (2001) Contribution of the *Tos17* retrotransposon to rice functional genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 118-122.

- Honma, T. and Goto, K.** (2001) Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*, **409**, 525-529.
- Huang, X., Qian, Q., Liu, Z., Sun, H., He, S., Luo, D., Xia, G., Chu, C., Li, J. and Fu, X.** (2009) Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice. *Nat. Genet.*, **41** (1), 494-497.
- Ikeda, K., Ito, M., Nagasawa, N., Kyojuka, J. and Nagato, Y.** (2007) Rice *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1*, encoding an F-box protein, regulates meristem fate. *Plant J.*, **51** (6), 1030-1040.
- Ikeda, K., Nagasawa, N. and Nagato, Y.** (2005) *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1* temporally regulates meristem identity in rice. *Dev. Biol.*, **282**, 349-360.
- Ikeda, K., Sunohara, H. and Nagato, Y.** (2004) Developmental course of inflorescence and spikelet in rice. *Breed. Sci.*, **54**, 147-156.
- Ikeda-Kawakatsu, K., Maekawa, M., Izawa, T., Itoh, J. and Nagato, Y.** (2011) *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 2/RFL*, the rice ortholog of Arabidopsis *LEAFY*, suppresses the transition from inflorescence meristem to floral meristem through interaction with *APO1*. *Plant J.*, in press.
- Ikeda-Kawakatsu, K., Yasuno, N., Oikawa, T., Iida, S., Nagato, Y., Maekawa, M. and Kyojuka, J.** (2009) Expression level of *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1* determines rice inflorescence form through control of cell proliferation in the meristem. *Plant Physiol.*, **150**, 736-747.
- Irish, V.F.** (2010) The flowering of Arabidopsis flower development. *Plant J.*, **61**, 1014-1028.
- Itoh, J., Nonomura, K., Ikeda, K., Yamaki, S., Inukai, Y., Yamagishi, H., Kitano, H. and Nagato, Y.** (2005) Rice plant development: from zygote to spikelet. *Plant Cell Physiol.*, **46** (1), 23-47.
- Jeon, J-S., Jang, S., Lee, S., Nam, J., Kim, C., Lee, S-HH., Chung, Y-Y., Kim, S-R., Lee, Y.H., Cho, Y-G. and An, G.** (2000) *leafy hull sterile 1* is a homeotic mutation in a rice MADS box gene affecting rice flower development. *Plant Cell*, **12**, 871-884.
- Jiao, Y., Wang, Y., Xue, D., Wang, J., Yan, M., Liu, G., Dong, G., Zeng, D., Lu, Z., Zhu, X., Qian, Q. and Li, J.** (2010) Regulation of *OsSPL14* by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. *Nat. Genet.*, **42** (6), 541-544.
- Kaplinsky, N.J. and Freeling, M.** (2003) Combinatorial control of meristem identity in maize inflorescence. *Development*, **130**, 1149-1158.

- Karim, M.R., Hirota, A., Kwiatkowska, D., Tasaka, M. and Aida, M.** (2009) A role for *Arabidopsis* PUCHI in floral meristem identity and bract suppression. *Plant Cell*, **21**, 1360-1372.
- Kater, M.M., Dreni, L. and Colombo, L.** (2006) Functional conservation of MADS-box factors controlling floral organ identity in rice and *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, **57** (13), 3433-3444.
- Kaufmann, K., Melzer, R. and Theissen, G.** (2005) MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene*, **347**, 183-198.
- Komatsu, M., Chujo, A., Nagato, Y., Shimamoto, K. and Kyojuka, J.** (2003) *FRIZZY PANICLE* is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets. *Development*, **130** 3841-3850.
- Komiya, R., Ikegami, A., Tamaki, S., Yokoi, S. and Shimamoto, K.** (2008) *Hd3a* and *RFT1* are essential for flowering in rice. *Development*, **135**, 767-774.
- Komiya, R., Yokoi, S. and Shimamoto, K.** (2009) A gene network for long-day flowering activates *RFT1* encoding a mobile flowering signal in rice. *Development*, **136**, 3443-3450.
- Kuroda, M., Kimizu, M. and Mikami, C.** (2010) A simple set of plasmids for the production of transgenic plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74** (11), 2348-2351.
- Kyojuka, J., Konishi, S., Nemoto, K., Izawa, T. and Shimamoto, K.** (1998) Down-regulation of *RFL*, the *FLO/LFY* homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **95**, 1979-1982.
- Laudencia-Chingcuanco, D. and Hake, S.** The *indeterminate floral apex 1* gene regulates meristem determinacy and identity in the maize inflorescence. *Development*, **129**, 2629-2638.
- Lee, D-Y. and An, G.** (2011) Two AP2 family genes, *SUPERNUMERARY BRACT* (*SNB*) and *OsINDETERMINATE SPIKELET 1* (*OsIDS1*), synergistically control inflorescence architecture and floral meristem establishment in rice. *Plant J.*, in press.
- Lee, D-Y., Lee, J., Moon, S., Park, S.Y. and An, G.** (2006) The rice heterochronic gene *SUPERNUMERARY BRACT* regulates the transition from spikelet meristem to floral meristem. *Plant J.*, **49**, 64-78.
- Lee, H., Suh, S-S., Park, E., Cho, E., Ahn, J.H., Kim, S-G., Lee, J.S., Kwon, Y.M. and Lee, I.** (2000) The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, **14**, 2366-2376.
- Lee, I., Wolfe, D.S., Nilsson, O. and Weigel, D.** (1997) A *LEAFY* co-regulator encoded by *UNUSUAL FLORAL ORGANS*. *Curr. Biol.*, **7**, 95-104.

- Lee, J., Oh, M., Park, H. and Lee, I.** (2008) SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates *LEAFY*. *Plant J.*, **55** (5), 832-843.
- Liljegren, S.J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G.S. and Yanofsky, M.F.** (1999) Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *Plant Cell*, **11**, 1007-1018.
- Lim, J., Moon, Y-H., An, G. and Jang, S.K.** (2000) Two rice MADS domain proteins interact with *OsMADS1*. *Plant Mol. Biol.*, **44**, 513-527.
- Litt, A. and Irish, V.F.** (2003) Duplication and diversification in the *APETALA1/FRUITFULL* floral homeotic gene lineage: implications for the evolution of floral development. *Genetics*, **165**, 821-833.
- Liu, C., Chen, H., Er, H.L., Soo, H.M., Kumar, P.P., Han, J-H., Liou, Y.C. and Yu, H.** (2008) Direct interaction of *AGL24* and *SOC1* integrates flowering signals in Arabidopsis. *Development*, **135**, 1481-1491.
- Liu, C., Thong, Z. and Yu, H.** (2009) Coming into bloom: the specification of floral meristems. *Development*, **136**, 3379-3391.
- Long, J. and Barton, M.K.** (2000) Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Dev. Biol.*, **218**, 341-353.
- Malcomber, S. and Kellogg, E.A.** (2004) Heterogeneous expression patterns and separate roles of the *SEPALLATA* gene *LEAFY HULL STERILE 1* in grasses. *Plant Cell*, **16**, 1692-1706.
- Malcomber, S. and Kellogg, E.A.** (2005) *SEPALLATA* gene diversification: brave new whorls. *TRENDS Plant Sci.*, **10** (9), 1360-1385.
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. and yanofsky, M.F.** (1992) Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA 1*. *Nature*, **360**, 273-277.
- Miki, D. and Shimamoto, K.** (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 490-495.
- Miki, D., Itoh, R. and Shimamoto, K.** (2005) RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiol.*, **138**, 1903-1913.
- Miura, K., Ikeda, M., Matsubara, A., Song, X-J., Ito, M., Asano, K., Matsuoka, M., Kitano, H. and Ashikari, M.** (2010) *OsSPL14* promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. *Nat. Genet.*, **42** (6), 545-549.
- Molinero-Rosales, N., Jamilena, M., Zurita, S., Gómez, P., Capel, J. and Lozano, R.** (1999) *FALSIFLORA*, the tomato orthologue of *FLORICAULA* and *LEAFY*, controls flowering time and

- floral meristem identity. *Plant J.*, **20** (6), 685-693.
- Moyroud, E., Kusters, E., Monniaux, M., Koes, R. and Parcy, F.** (2010) LEAFY blossoms. *TRENDS Plant Sci.*, **15**, 346-352.
- Nakagawa, M., Shimamoto, K. and Kyojuka, J.** (2002) Overexpression of *RCN1* and *RCN2*, rice *TERMINAL FLOWER 1/CENTRORADIALIS* homologs, confers delay of phase transition and altered panicle morphology in rice. *Plant J.*, **29** (6), 743-750.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. and Kimura, T.** (2007) Development of series of Gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.*, **104** (1), 34-41.
- Ohmori, S., Kimizu, M., Sugita, M., Miyao, A., Hirochika, H., Uchida, E., Nagato, Y. and Yoshida, H.** (2009) *MOSAIC FLORAL ORGANS 1*, an *AGL6*-like MADS box gene, regulates floral organ identity and meristem fate in rice. *Plant Cell*, **21**, 3008-3025.
- Oliver, S.N., Finnegan, E.J., Dennis, E.S., Peacock, W.J. and Trevaskis, B.** (2009) Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the *VERNALIZATION 1* gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **106** (20), 8386-8391.
- Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I. and Weigel, D.** (1998) A genetic framework for floral patterning. *Nature*, **395**, 561-566.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E. and Yanofsky, M.F.** (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*, **405**, 200-203.
- Pelaz, S., Gustagson-Brown, C., Kohalmi, S.E., Crosby, W.L. and Yanofsky, M.F.** (2001a) *APETALA1* and *SEPALLATA3* interact to promote flower development. *Plant J.*, **26** (4), 385-394.
- Pelaz, S., Tapia-López, R., Alvarez-Buylla, E.R. and Yanofsky, M.F.** (2001b) Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.*, **11**, 182-184.
- Pelucchi, N., Fornara, F., Favalli, C., Masiero, S., Lago, C., Pè, M.E., Colombo, L. and Kater, M.M.** (2002) Comparative analysis of rice MADS-box genes expressed during flower development. *Sex Plant Reprod.*, **15**, 113-122.
- Petersen K., Kolmos, E., Folling, M., Salchart, K., Storgaard, M., Jensen, C.S., Didion, T. and Nielsen, K.K.** (2006) Two MADS-box genes from perennial ryegrass are regulated by vernalization and involved in the floral transition. *Physiol. Plant.*, **126**, 268-278.
- Pnueli, L., Carnel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganai, M., Zamir, D. and Lifschitz, E.** (1998) The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive

- switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development*, **125**, 1979-1989.
- Prasad, K., Paramenswaran, S. and Vijayraghavan, U.** (2005) *OsMADS1*, a rice MADS-box factor, controls differentiation of specific cell types in the lemma and palea and is an early-acting regulator of inner floral organs. *Plant J.*, **43**, 915-928.
- Preston, J.C. and Kellogg, E.A.** (2007) Conservation and divergence of *APETALA1/FRUITFULL*-like gene function in grasses: evidence from gene expression analysis. *Plant J.*, **52**, 69-81.
- Preston, J.C. and Kellogg, E.A.** (2008) Discrete developmental roles for temperate cereal grass *VERNALIZATION 1/FRUITFULL*-like genes in flowering competency and the transition to flowering. *Plant Physiol.*, **146**, 265-276.
- Prusinkiewicz, P., Erasmus, Y., Lane, B., Harder, L.D. and Coen, E.** (2007) Evolution and development of inflorescence architectures. *Science*, **316**, 1452-1456.
- Rao, N.N., Prasad, K., Kumar, P.R. and Vijayraghavan, U.** (2008) Distinct regulatory role for *RFL*, the rice *LFY* homolog, in determining flowering time and plant architecture. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **105** (9), 3646-3651.
- Ratcliffe, O., Amaya, I., Vincent, C.A., Rothstein, S., Carpentaer, R., Coen, E.S. and Bradley, D.J.** (1998) A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development*, **125**, 1609-1615.
- Ratcliffe, O.J., Bradley, D.J. and Coen, E.S.** (1999) Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. *Development*, **126**, 1109-1120.
- Reinheimer, R. and Kellogg, E.A.** (2009) Evolution of *AGL6*-like MADS box genes in grasses (Poaceae): ovule expression is ancient and palea expression is new. *Plant Cell*, **21**, 2591-2605.
- Satoh-Nagasawa, N., Hagasawa, N., Malcomber, S., Sakai, H. and Jackson, D.** (2006) A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize. *Nature*, **441**, 227-230.
- Sentoku, N., Sato, Y. and Matsuoka, M.** (2000) Overexpression of rice *OSH* genes induces ectopic shoots on leaf sheaths of transgenic rice plants. *Dev. Biol.*, **220**, 358-364.
- Shimada, S., Ogawa, T., Kitagawa, S., Suzuki, T., Ikari, C., Shitsukawa, N., Abe, T., Kawahigashi, H., Kikuchi, R., Handa, H. and Murai, K.** (2009) A genetic network of flowering-time genes in wheat leaves, in which an *APETALA1/FRUITFULL*-like gene, *VRN1*, is upstream of *FLOWERING LOCUS T*. *Plant J.*, **58**, 668-681.
- Souer, E., van der Krol, A., Kloos, D., Spelt, C., Bliet, M., Mol, J. and Koes, R.** (1998) Genetic

- control of branching pattern and floral identity during *Petunia* inflorescence development. *Development*, **125**, 733-742.
- Sun, B., Xu, Y., Ng, K.-H. and Ito, T.** (2009) A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the Arabidopsis floral meristem. *Genes Dev.*, **23**, 1791-1804.
- Takahashi, H., Kamakura, H., Sato, Y., Shiono, K., Abiko, T., Tsutsumi, N., Nagamura, Y., Nishizawa, N.K. and Nakazono, M.** (2010) A method for obtaining high quality RNA from paraffin sections of plant tissues by laser microdissection. *J. Plant Res.*, **123**, 807-813.
- Takahashi, M., Nagasawa, N., Kitano, H. and Nagato, Y.** (1998) *panicle phytochrome 1* mutations affect the panicle architecture of rice. *Theor. Appl. Genet.*, **96**, 1050-1056.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H.L., Yokoi, S. and Shimamoto, K.** (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science*, **316**, 1033-1036.
- Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Furuta, K., Hayashi, K., Yanase, T., Yamaguchi, M., Nakashima, C., Purwestri, Y.A., Tamaki, S., Ogaki, Y., Shimada, C., Nakagawa, A., Kojima, C. and Shimamoto, K.** (2011) 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature*, **476**, 332-332.
- Theissen, G., Becker, A., Rosa, A.D., Kanno, A., Kim, J.T., Münster, T., Winter, K.-U. and Saedler, H.** (2000) A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol. Biol.*, **42**, 115-149.
- Trevaskis, B., Bagnall, D.J., Ellis, M.H., Peacock, W.J. and Dennis, E.S.** (2003) MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **100** (22), 13099-13104.
- Trevaskis, B., Hemming, M.N., Dennis, E.S. and Peacock, W.J.** (2007) The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *TRENDS Plant Sci.*, **12** (8), 352-357.
- Trevaskis, B., Hemming, M.N., Peacock, W.J. and Dennis, E.S.** (2006) *HvVRN2* responds to daylength, whereas *HvVRN1* is regulated by vernalization and developmental status. *Plant Physiol.*, **140**, 1397-1405.
- Turck, F., Fornara, F. and Coupland, G.** (2008) Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Ann. Rev. Plant Biol.*, **59**, 573-94.
- Vollbrecht, E., Springer, P.S., Goh, L., Bucker, E.S. and Martienssen, R.** (2005) Architecture of floral branch systems in maize and related grasses. *Nature*, **436**, 1119-1126.
- Wagner, D., Sablowski, R.W.M. and Meyerowitz, E.M.** (1999) transcriptional activation of APETALA 1 by LEAFY. *Science*, **285**, 582-584.
- Wang, K., Tang, D., Hong, L., Xu, W., Huang, J., Li, M., Gu, M., Xue, Y. and Cheng, Z.** (2010)

- DEP* and *AFO* regulate reproductive habit in rice. *PLoS Genet.*, **6** (1), e100818.
- Wang, L., Yin, H., Qian, Q., Yang, J., Huang, C., Hu, X. and Luo, D.** (2009) *NECK LEAF 1*, a GATA type transcription factor, modulates organogenesis by regulating the expression of multiple regulatory genes during reproductive development in rice. *Cell Res.*, **19** (5), 598-611.
- Weigel, D., Alvearez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F. and Meyerowitz, E.M.** (1992) *LEAFY* controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell*, **69**, 843-859.
- Whipple, C.J., Hall, D.H., DeBlasio, S., Taguchi-Shiobara, F., Schimdt, R.J. and Jackson, D.** (2010) A conserved mechanism of bract suppression in the grass family. *Plant Cell*, **22** (3), 565-578.
- Wigge, P.A.** (2011) FT, a mobile developmental signal in plants. *Curr. Biol.*, **21**, R374-R378.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schumid, M., Lohmann, J.U. and Weigel, D.** (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in Arabidopsis. *Science*, **309**, 1056-1059.
- Xu, M., Hu, T., McKim, S.M., Murmu, J., Haughn, G.W. and Hepworth, S.R.** (2010) Arabidopsis BLADE-ON-PETIOLE1 and 2 promote floralmeristem fate and determinacy in a previously undefined pathway targeting *APETALA1* and *AGAMOUS-LIKE24*. *Plant J.*, **63**, 974-989.
- Yamaguchi, T. and Hirano, H.Y.** (2006) Function and diversification of MADS-box genes in rice. *TSW Dev. Embryol.*, **1**, 99-108.
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T. and Dubcovsky, J.** (2003) Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **100** (10), 6263-6268.
- Yoshida, A., Suzaki, T., Tanaka, W. and Hirano, H.Y.** (2009) The homeotic gene long sterile lemma (G1) specifies sterile lemma identity in the rice spikelet. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **106** (47), 20103-20108.
- Zahn, L.M., Kong, H., Leebens-Mack, J.H., Kim, S., Soltis, P.S., Landherr, L.L., Soltis, D.E., dePamphilis, C.W. and Ma, H.** (2005) The evolution of the *SEPALLATA* subfamily of MADS-box genes: a preangiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history. *Genetics*, **169**, 2209-2223.
- Zhu, Q-H., Upadhyaya, N.U., Gubler, F. and Helliwell, C.A.** (2009) Over-expression of miR172 causes loss of spikelet determinacy and floral organ abnormalities in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biol.*, **9**, 149.

高田忍，加藤壮英，田坂昌生 (2001) 植物細胞工学シリーズ 14, 植物のゲノム研究プロトコール (佐々木卓治，田畑哲之，島本功監修 (秀潤社)), pp. 95-103.