

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18075007

研究課題名（和文）

高等植物の胚成熟制御ネットワークの解明

研究課題名（英文）

Elucidation of Regulatory Networks of Embryo Maturation

研究代表者

服部 束穂 (HATTORI TSUKAHO)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：10164865

研究成果の概要（和文）：

高等植物の種間・属間雑種では、発芽可能な種子が形成できないことが多い。これは、種子形成の段階にゲノム障壁が存在すること意味する。本研究では、イネおよびシロイヌナズナを用いて種子形成の制御機構を解析した。これらの研究を通して、イネの胚乳形成（＝生存）に必須な遺伝子 *ENL1* を単離しその機能を解明した。また、正および負の種子特異的遺伝子制御におけるエピジェネティック制御の関与などを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Inter-specific/generic crosses in higher plants often fail to produce germinatable seeds. This means the presence of genome barriers in seed development. Thus, we explored regulatory mechanisms of seed formation in various aspects. Through these studies, we identified and characterized *ENL1* gene, which was found essential exceptionally to rice (or cereal) endosperm development at early stages. We also revealed the involvement of epigenetic mechanisms in both positive and negative seed-specific gene regulations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	16,600,000	0	16,600,000
2007年度	16,600,000	0	16,600,000
2008年度	16,600,000	0	16,600,000
2009年度	16,600,000	0	16,600,000
2010年度	16,600,000	0	16,600,000
総計	83,000,000	0	83,000,000

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：種子形成 シロイヌナズナ イネ 染色体 転写因子 胚 胚乳 発芽 エピジェネティック制御

1. 研究開始当初の背景

高等植物の種間・属間雑種では、発芽可能な胚を含む種子が形成できないことが多い。すこれは、種子形成の段階にゲノム障壁が存在すること意味する。種子形成におけるゲノム障壁の主因の一つは、胚成長の停止、貯蔵

物質の蓄積、乾燥耐性のならびに休眠性の獲得とう事象を含む種子成熟過程にあることが予想される。シロイヌナズナにおいて転写因子をコードする *LEC1*、*LEC2*、*FUS3* および *ABI3* 遺伝子（前者3つは総称して *LEC* 遺伝子（群）と呼ぶ）の変異体は、いずれの

場合にも4つの事象すべてが正常に進行しないことから、これらは強く共役した遺伝的プログラムの支配下にあることが明らかになっていった。

2. 研究の目的

高等植物の胚成長過程、および成長を停止しながら最終的に乾燥種子を完成させる成熟過程には、転写因子と植物ホルモンのネットワークが複雑に関与している。本研究は、胚形成、特にパターン形成以降に起きる事象の制御因子とそれらの相互関係に関する知見を蓄積し、そのネットワークの全体像に迫ることにより、生殖過程におけるゲノム障壁の理解に資することを目的とする。また、胚と胚乳の相互作用という点からもゲノム障壁の解明に知見を与えることも目指す。

3. 研究の方法

fus3-imposed growth arrest 変異体の単離

FUS3 cDNA を pER8 ベクターを用いてシロイヌナズナを形質転換し、FUS3 をエストロゲンにより誘導しうる植物を作製した。このトランスジェニック植物の種子を EMS 処理し、変異体のスクリーニングに用いた。

変異体のマッピングと原因遺伝子の特定: 上記トランスジーンを持つ親系統 (Columbia) を Landsberg erecta 株 (Ler) に戻し交配を繰り返したものをマッピング用交配系統として用いた。イネ *en1* 変異体 (親品種フクニシキ) 原因遺伝子の特定は、品種 Kasalath との交配集団を用いたマッピングと候補遺伝子の形質転換による相補実験によって行った。

共焦点レーザー顕微鏡観察: オリンパス FV-1000 (倒立型) を用いた。

その他: 通常の植物分子生物学・分子遺伝学の手法を駆使した。

4. 研究成果

FUS3 による胚成長抑制メカニズムの解析

FUS3 は種子成熟過程で胚の成長停止反応を正に制御する。実生においてエストロゲンにより FUS3 を異所発現させたところ、細胞分裂活性と成長の著しい抑制が観察された。したがって、この FUS3 異所発現の効果は本来種子で生じる胚成長停止反応を模倣していると考えられる。このような実生での FUS3 による成長抑制効果が低下した変異体 *fus3-imposed growth arrest* (*fga*) を複数単離した。そのうち *fga2* 変異体は、種子休眠性が低下しており、発芽時には強い GA 生合成阻害剤耐性を示した。*fga2* 原因遺伝子のポジショナルクローニングを行ったところ、molybdenum cofactor sulfurase をコードする *ABA3* のアレルであることがわかった。*aba3* は、*aba1* や *aba2* とともに、ABA 欠損変

異体として知られる。*aba2* 変異体において FUS3 を異所発現させたところやはり、成長抑制が緩和されていた。これらの結果は、FUS3 による ABA 生合成制御が胚の成長停止機構に重要な働きをしていることを示している。

そのほか、4つのことなる *fga* 変異体についてその原因遺伝子を特定した。

LEC による発芽後プログラム抑制メカニズムの解析

Iec 変異体に関する初期の報告では、子葉が本葉化することから、ホメオティック変異体であると主張する論文もあったが、種子としての重要な形質を失うと同時に、*Iec* 変異体胚の示すこのような形態的表現型は、発芽後の植物に見られる性質であることから、ヘテロクロニック変異体としても性格づけられる。しかし、なぜ、変異体において子葉の本葉化をはじめとする発芽後の性質を示すのかについて追求する研究は、多くは行われてこなかった。そこで本研究では、LEC および ABI3 による遺伝子発現抑制機構に着目して、これら変異体がヘテロクロニックな性質を示すメカニズムについて解析した。マイクロアレイデータをもとにした *in silico* 解析により、*Iec* 変異体の種子で野生型に比べて発現が増加している遺伝子の多くは、種子における発現は抑制されており、発芽から発芽以降の芽生えの様々な器官で発現する遺伝子であることなど、変異体のヘテロクロニックな性質が遺伝子発現レベルで明確になった。また、*AtEm1* をはじめとする一群の胚発生後期遺伝子の発現が胚発生過程において時間的に前倒しされるという、種子形成過程内の異時的遺伝子発現も明らかになった。

また本研究では、野生型に比べて *Iec1* 変異体で発現が増加している遺伝子のうち、発現比が特に大きい、*PYK10* および *AtEm1* に着目した。胚発生期には強く抑制されおり発芽後成長において発現が始まる *PYK10*、および胚発生後期において始めて発現がみられる *AtEm1*、両遺伝子のプロモーターに EGFP あるいは CFP をつないで *Iec* および *abi3* 変異体に導入し、胚発生過程における発現パターンを解析した。これらの解析から、胚発生過程において *PYK10* および *AtEm1* は、その発現が必要になるまでエピジェネティックなメカニズムにより抑制されていることや、LEC タンパク質および ABI3 タンパク質はその抑制状態の維持に必要であることが示唆された。

イネ無胚乳変異体 *endospermless1* (*en1*) の解析

種子植物特異的に見られる胚乳は、胚が生育するための栄養貯蔵や物理的保護といった胚の補助組織であるが、両親のゲノム支配の元で形成される。胚乳の発生過程は他の植

物組織のそれとは大きく異なっている。重複受精によって生じた胚乳核は、細胞質分裂を伴わない急速な核分裂を繰り返す。その後、細胞化が起き、さらに細胞分裂を繰り返すことにより胚乳組織が形成される。しかし、胚乳初期発生に関する分子遺伝学的知見は、胚発生に関するそれらに比べ圧倒的に少ない。本研究では、イネにおける胚乳初期発生メカニズムを明らかにする目的で、イネ無胚乳変異体 *endospermless1* (*enl1*) の解析を行った。

開花後各時間の胚乳をホルマウントでPI染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、*enl1*には極端に巨大化し複数の核小体を持つ胚乳核が形成されることがわかった(図1)。

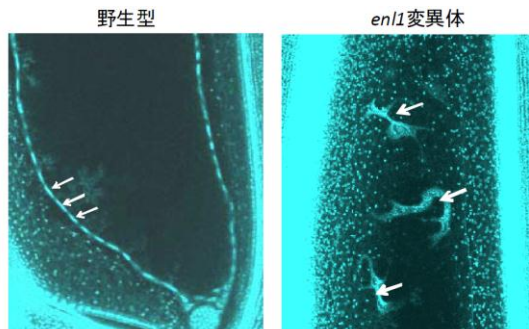


図1. 野生型(左)および*enl1*変異体における受粉後60時間目の胚乳核。野生型では矢印の様な扁平な多数の核が中央液胞の周囲に規則正しく並んだ多核体(Syncytium)となるが、*enl1*変異体では多数の核が融合して不定形(川のように見える)の巨大な核が生じる。

さらに詳細な観察を行ったところ、染色体数の増加や、染色体の分離異常が起こっていた。このことから、ENL1は胚乳核分裂時の娘染色体間の分離に関わっていると考えられた。さらに*enl1*原因遺伝子が、SNF2ファミリーDNAヘリカーゼ様タンパク質で、ヒトの細胞分裂後期における娘染色体同士の解離や染色体凝集構造のリモデリングに関わっているとされているPICHのオルソログをコードすることを明らかにした(図2)。ENL1タンパク質は間期には細胞質に存在するが、分裂期に染色体上、また特に後期にはanaphase DNA Bridge様の構造上にも局在しており、その様子がPICHの報告と一致していることから、ENL1はPICHと同様な機能を果たしていると考えられた。

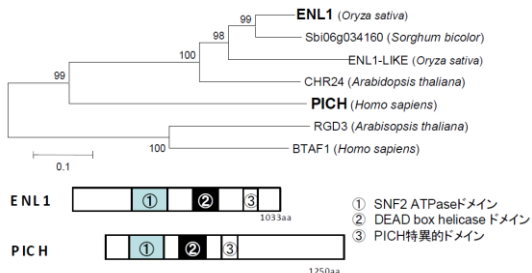


図2. イネENL1遺伝子はヒトのPICHタンパク質オルソログをコードする。(A) イネENL1とPICHの進化系統関係 (B) ENL1とPICHのドメイン構造

さらに、ENL1は胚乳以外の細胞分裂においても機能していることも明らかになった。変異体の根端細胞でも、ある頻度で核分裂異常が生じている事が分かった。しかし、胚乳においては組織が崩壊する程の重篤な影響を及ぼすのに対し、根では、植物の成長を維持できる程度の組織形成は可能である。これらの結果からENL1は、胚乳の急速かつ細胞質分裂を伴わない特殊な核分裂において、染色体分離を確実に進行させるために特段に重要なタンパク質であると考えられた。

LEC 因子遺伝子のエピジェネティック制御

本研究および他の研究から、LEC因子制御下にある遺伝子の正および負の種子特異性に関するエピジェネティック制御の関与が明らかになったが、LEC因子自身の制御についても検討を加えた。ヒストンシャペロンであるCAF1とともにDNA修復やエピジェネティック制御などのクロマチン代謝に関わるBRU1の変異体におけるFUS3の発現を解析した結果、葉などの植物体組織において、FUS3の発現がストカスティックに起こることが明らかとなった。このことから、LEC因子制御下にある遺伝子のみならず、これらのマスターレギュレーターもエピジェネティック制御を受けているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Ohno, Y., Jarunya Narangajavana, J., Yamamoto, A., Hattori, T., Kagaya, Y., Paszkowski, J., Grissem, W., Hennig, L. and Takeda, S. (2011) Ectopic gene expression and organogenesis in Arabidopsis mutants missing Brul required for genome maintenance. Genetics. 189, 83-95. (査読有り)
- ② Sugimoto, K., Takeuchi, Y., Ebana, K., Miyao, A., Hirochika, H., Hara, N., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Ban, Y., Hattori, T. and Yano, M. (2010) Molecular cloning of Sdr4, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107, 5792-5797. (査読有り)
- ③ Yamamoto, A., Kagaya, Y., Usui, H., Hobo, T., Takeda, S. and Hattori, T. (2010) Diverse roles and mechanisms of gene regulation by the Arabidopsis seed maturation master regulator FUS3 revealed by microarray analysis. Plant Cell Physiol. 51, 2031-2046. (査読有り)

り)

- ④ Yamamoto, A., Kagaya, Y., Toyoshima, R., Kagaya, M., Takeda, S. and Hattori, T. (2009) Arabidopsis NF-YB subunits LEC1 and LEC1-LIKE activate transcription by interacting with seed-specific ABRE-binding factors. *Plant J.* 58, 843-856. (査読有り)
- ⑤ Kagaya, Y. and Hattori, T. (2009) Arabidopsis transcription factors, RAV1 and RAV2, are regulated by touch-related stimuli in a dose-dependent and biphasic manner. *Genes Genet Syst.* 84, 95-99.
- ⑥ Rahman, Md H., Tsuchiya, T., Suwabe, K., Kohori, J., Tomita, R.N., Kagaya, Y., Kobayashii, I., Kakeda, K. and *Koyama, Y. (2007) Physical span size of the S locus region defined by genetic recombination and genome sequences in *Ipomoea trifida*, Convolvulaceae. *Plant Sexual Reproduction* 20, 73-85. (査読有り)
- ⑦ Rahman, Md H., Uchiyama, M., Kuno, M., Hirashima, N., Suwabe, K., Tsuchiya, T., Kagaya, Y., Kobayashi, I., Kakeda, K. and *Koyama, Y. (2007) Expression of stigma- and anther-specific genes located in the S locus region of *Ipomoea trifida*. *Plant Sexual Reproduction* 20, 63-72. (査読有り)

[学会発表] (計 33 件)

- ① 服部東穂: 種子発芽における遺伝子発現プログラムの転換。第 53 回日本植物生理学会年会、平成 24 年 3 月、京都。
- ② Kagaya, Y.: Exosome is an endogenous gene silencing suppressor in Arabidopsis. 第 34 回日本分子生物学会年会、平成 23 年 12 月、横浜。
- ③ Tsukahō Hattori: Modulation of auxin signaling during seed development in Arabidopsis. International Plant Growth Substances Association 19th Meeting. 2007. 6. , Puerto Vallarta, Mexico.
- ④ 加賀谷安章: シロイヌナズナ種子成熟過程におけるオーキシシグナル伝達の変化に関する解析。第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、平成 19 年 12 月、横浜。

[図書] (計 1 件)

- ① 服部東穂 (2008) 種子貯蔵タンパク質遺伝子の制御ネットワーク。「種子のバイオサイエンス (改訂版)」原田久也他編 学会出版センター pp. 127-130.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 東穂 (HATTORI TSUKAHO)
名古屋大学生物機能開発利用研究センター・教授
研究者番号: 10164865

(2) 研究分担者

武田 真 (TAKEDA SHIN)
名古屋大学生物機能開発利用研究センター・准教授
研究者番号: 00432253

加賀谷 安章 (KAGAYA YASUAKI)
三重大学生命科学研究支援センター・助教
研究者番号: 20335152