

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 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：33910

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2013

課題番号：19060011

研究課題名（和文）

胚性メリステムから栄養メリステムへの転換の統御系

研究課題名（英文）

Regulatory mechanisms involved in the transition from embryonic meristem to vegetative meristem

研究代表者

中村 研三 (NAKAMURA KENZO)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：80164292

研究成果の概要（和文）：

B3 ドメイン転写抑制因子、HSI2 と HSL1、は発芽 1～2 日後の短い時間帯に起こるメリステムの相転換に必要で、特に HSI2 は RY モチーフを持つ種子成熟遺伝子群の発現を直接抑制し、栄養成長期での H3K27me3 不活性ヒストン修飾に必要である。LUC レポーター遺伝子を使い、種子成熟遺伝子の発芽初期の発現抑制過程のリアルタイム・ライブモニタリングと突然変異株の網羅的スクリーニングを実施し、多くの新しい知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

Two B3 domain repressors, HSI2 and HSL1, are essential for the transition of dormant embryonic meristem into vegetative meristem. HSI2 directly represses the expression of seed maturation genes containing RY motif and it is essential for the chromatin histone modification with the H3K27me3 inactive mark. Plants with LUC reporter genes were used for the real-time live monitoring of the repression of seed maturation genes during the early stage of germination and for the large scale screening of mutants defective in the repression of seed maturation gene after germination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	19,500,000	0	19,500,000
2008年度	19,500,000	0	19,500,000
2009年度	19,500,000	0	19,500,000
2010年度	19,500,000	0	19,500,000
2011年度	19,500,000	0	19,500,000
2012年度	19,500,000	0	19,500,000
総計	117,000,000	0	117,000,000

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：胚発生／メリステム転換／種子発芽／クロマチン制御／ゲノム維持

1. 研究開始当初の背景

種子の成熟から発芽、栄養生長のプロセスは、ステージ特異的転写因子、植物ホルモンや栄養シグナルによって複雑に制御されている。胚発生から種子成熟の過程を上位で制御する LEC 遺伝子群の働きが良く知られるが、発芽後の種子成熟プログラムの終止、胚性から栄養メリステムへの転換の制御機構の多くは不明であった。

2. 研究の目的

胚発生で作られる茎頂と根端のメリステムは、種子成熟過程で休眠状態に入り、発芽後に栄養メリステムとして活動を開始する。この間の、種子成熟プログラムの終止、胚性から栄養メリステムへの転換に関わる転写制御の実体は不明である。本研究では、B3 転写抑制因子 HSI2 と HSL1 の作用の解析を通して、種子成熟プログラム抑制に関わる転写制御と植物ホルモンや栄養シグナルの情報統御を解明する。

3. 研究の方法

種子成熟過程で重要な役割を担う遺伝子のプロモーターと LUC 発光レポーターとの融合遺伝子を導入したシロイヌナズナを用い、遺伝学的方法で種子成熟遺伝子の発芽後の抑制やヘテロクロマチン化などに関わる突然変異株をスクリーニングすると共に、発芽後のレポーター遺伝子の発現抑制の時間経緯や各種薬剤の効果などをライブモニタリングによって解析した。

4. 研究成果

(1) 発芽に伴う種子成熟遺伝子の発現抑制と栄養生長への転換における HSI2 と HSL1 の役割

① HSI2, HSL1 の C 末端 EAR モチーフの役割
HSI2 と HSL1 の二重 T-DNA 挿入破壊株 (*hsi2-2 hsl1-1*; KK 変異株)は、種子発芽4日目以降に *LEC1*, *LEC2* などの本来は種子形成過程特異的なマスターレギュレーターや種子成熟遺伝子群を強く発現して胚軸に種子貯蔵タンパク質や油脂を蓄積し、7日目には成長が停止する。*hsl1-1* に HSI2 の B3 ドメイン後ろのナンセンス変異株 (*hsi2-1*) を交配して得た *hsi2-1 hsl1-1* 二重変異株は、KK 変異株が見せる種子貯蔵物質の蓄積や生長停止といった強い表現型を示さず、発芽後の種子成熟プログラムの抑制と栄養生長への転換に HSI2 と HSL1 の C 末端 EAR 転写抑制モチーフは必須でないことが強く示唆された。

② HSI2 と HSL1 の標的遺伝子

種子成熟過程を制御する B3 ドメイン因子である LEC2 や FUS3 は *LEC1*, *WR11* など種子成熟に関わる転写因子や種子貯蔵タンパク質などの遺伝子のプロモーターに存在する RY 配列 (CATGCA) に結合し、一方 ABI3 は RY 配列への作用に加えて種子成熟後期に発現して ABRE に結合する bZIP 因子群と相互作用する。AP2-型転写因子に関して確立した簡易 random-sequence oligonucleotide selection (RSOS) を使い、FUS3, HSI2 と HSL1 が *in vitro* で結合するコンセンサス配列を比較した。HSI2 と FUS3 の結合コンセンサス配列はどちらも RY 配列で一致したが、HSL1 は重複した RY 配列に選択的に結合し、HSI2 と HSL1 の標的は必ずしも重複しない可能性が示唆された。この結果は、種々変異株のマイクロアレイ解析結果と矛盾しない。*hsi2 hsl1* 二重変異株芽生えでは強く脱抑制されるが、DEX-誘導型の *HSL1-RNAi/hsi2* や *HSI2-RNAi/hsl1* の芽生えを DEX 処理して二重変異を誘導した場合には脱抑制を受けない遺伝子があり、種子成熟途上での抑制の重要性が示唆された。

③ 栄養生長への転換における HSI2 と HSL1 の機能が必要な時期

KK 変異株は *hsi2* か *hsl1* のどちらかの変異がヘテロの株の種子を播種して得られる。*hsi2-1* または *hsl1-1* 破壊株に、DEX 誘導性の HSL1 または HSI2 の RNAi を導入した。いずれの形転換体も、DEX を含む培地で発芽すると KK 変異株程ではないか胚か肥大化して油脂を蓄積したか、DEX を含まない培地ではこうした表現型を示さなかった。これら形質転換体種子の発芽後に DEX 添加培地に移す実験から、HSI2 と HSL1 の機能が必要とされるのは、発芽後約 36 時間を中心とする狭い時間帯と推定された。

④ 種子成熟遺伝子クロマチンの栄養生長期の H3K27me3 不活性マーク修飾と HSI2, HSL1 の役割

クロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析から、Col-0 株では発芽後に *OleS3* や *At2S3* 遺伝子領域のクロマチンは H3K27me3 不活性マーク修飾を受けるが、その修飾はこれら遺伝子の mRNA が消失する発芽後数日より遅れて発芽後 1 週目以降に顕著になった。*OleS3* や *At2S3* 遺伝子領域クロマチンの H3K27me3 不活性マーク修飾は、*hsl1-1* 破壊株でも Col-0 株と同程度に見られたが、*hsi2-2* と *hsl1-1* の二重破壊株 (KK 変異株) のみならず *hsi2-2* 単独破壊株でも著しく減少した。しかし、*LEC1* 遺伝子領域クロマチンでは、Col-0 株と同程度の H3K27me3 不活性マーク修飾が

hsi2-2 と *hsi1-1* のいずれの破壊株でも見られた。これらの結果から、*OleS3* と *At2S3* の発現抑制とクロマチンの H3K27me3 修飾には HSI2 が必須の役割を担う一方で、*LEC1* クロマチンの H3K27me3 修飾には HSI2 と HSL1 の両者が関与することが示唆される。

(2) *OleS3::LUC* を使った種子成熟遺伝子の発現抑制のモニタリングと突然変異株スクリーニング

OleS3p::LUC を導入した Col-0 株種子の多数をルシフェリン入りシヨ糖培地で発芽させ、その LUC 発光を名古屋大学遺伝子実験施設の石浦正寛教授グループの開発した全自動生物発光測定装置を使って連続的にモニタリングすると、平均して発芽後 36 時間目をピークとする一過的な LUC 発光を示した。この LUC 発光は、培地中にタンパク質合成阻害剤や転写阻害剤を添加すると著しく抑制され、少なくとも一部は *LUC* 遺伝子の新奇の転写・翻訳に依存した発光であり、発芽初期に *OleS3* は転写可能な状態にあると考えられる。この発芽後 36 時間をピークとする *OleS3p::LUC* の一過性発現は *hsi1-1* バックグラウンドでも見られた。しかし、*hsi2-2*、あるいは *hsi2-2 hsi1-1* 二重破壊バックグラウンドでは発芽後の *OleS3p::LUC* の発光は一過性のピークを示さずに継続的に増加し、その強度は *hsi2-2 hsi1-1* 二重破壊株の方が強くなった。これらの結果は、*OleS3* 遺伝子領域では種子発芽後 36 時間前後に HSI2 が関与する何らかの質的変換が起こることを示唆している。この HSI2 が関与する質的変換の実体に迫るために、全自動生物発光測定装置を使って種子発芽後の *OleS3p::LUC* 発光の経時的パターンに異常を示す突然変異株の大量スクリーニングを行った。EMS 処理した *OleS3p::LUC* 導入植物種子から得た約 2 万個体のスクリーニングから、M3 世代でも発芽後の LUC 発光パターンに異常を示す突然変異株候補が 7 株得られた。生育に著しい異常を示す変異株も多いなか、次世代でも表現型が再現された変異株候補を表現型によって分類し、次世代シーケンサのシーケンス情報解析ソフトの改良をして解析をすすめたが、まだ変異原因遺伝子の特定には至っていない。また、*hsi2-2* 変異による発芽後の LUC レポーター遺伝子の脱抑制が回復する復帰変異株の候補を得ることもでき、解析を継続している。

(3) ゲノム維持に関わる TSK, TEB のメリステム維持機構

DNA 損傷修復に関与すると推定される DNA

ポリメラーゼとヘリカーゼのドメインを併せ持つ TEB の変異体は、茎頂、根端両分裂組織の構造に異常を示す。*teb* が示す G2 から M への細胞周期進行の抑制は、DNA 複製チェックポイント欠損 *atr* との二重変異で低下したが、*teb* の発生異常は *atr* との二重変異によって亢進し、しばしば背腹性を失った葉が出現した。マイクロアレイ解析から、*teb* 変異株ではゲノムの約 2% を占めるトランスポゾン Helitron に隣接した *ETTIN*, *ARF4* などの遺伝子やタンDEM重複遺伝子といった、DNA 複製中に相同組換えによって損傷修復を受けやすいと推定される領域の遺伝子の発現が選択的に上昇していることが分かった。TEB は損傷遺伝子の相同組み換えによる修復に関与してその遺伝子領域のクロマチン構造維持に必要と推定された。*tsk* ではヒストン H4 アセチル化レベルが上昇しており、*tsk* のサブレッサー変異株候補を単離した。

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 16 件)

- ① Durut, N., Abou-Ellail, M., Pontvianne, F., Comella, P., Chandra Das., S., Kojima, H., Ukai, S., DeBures, A., Echeverria, M., Bouvet, P., Nakamura, K. and Saez-Vasquez, J.: A duplicated NUCLEOLIN gene in Arabidopsis (AtNUC2) is required for rDNA methylation and organization of silent 45S rRNA genes. *Plant Cell* in press (2014) 査読あり
- ② Rodor, J., Jobet, E., Bizarro, J., Vignols, F., Carles, C., Suzuki, T., Nakamura, K. and Echeverria, M.: AtNUFIP, an essential protein for plant development, reveals the impact of snoRNA gene organisation on the assembly of snoRNPs and rRNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **65**:807-819 (2011) 査読あり
- ③ Tabata, R., Ikezaki, M., Fujibe, T., Aida, M., Tian, C.-E., Ueno, Y., Yamamoto, K.T., Machida, Y., Nakamura, K. and Ishiguro, S.: Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 *KNOX* genes. *Plant Cell Physiol.* **51**: 164-175 (2010) 査読あり
- ④ Inagaki, S., Nakamura, K. and Morikami, A.: A link between DNA replication, recombination, and gene expression

revealed by genetic and genomic analysis of TEBICHI gene of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **5**: e1000613 (2009) 査読あり

- ⑤ Maeo, K., Tokuda, T., Ayame, A., Mitsui, N., Kawai, T., Tsukagoshi, H., Ishiguro, S. and Nakamura, K.: An AP2-type transcription factor WRINKLED1 of *Arabidopsis thaliana* binds to AW-box sequence conserved among proximal upstream regions of genes involved in fatty acid synthesis. *Plant J.* **60**: 476-487 (2009) 査読あり
- ⑥ Terakura, S., Tagami, H., Kitakura, S., Ueno, Y., Machida, C., Wabiko, H., Aiba, H., Otten, L., Tsukagoshi, H., Nakamura, K. and Machida, Y.: An oncoprotein from the plant pathogen *Agrobacterium* has histone-chaperone-like activity. *Plant Cell* **19**: 2855-2865 (2007) 査読あり
- ⑦ Tsukagoshi, H., Morikami, A. and Nakamura, K.: Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 2543-2547 (2007) 査読あり

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 2 件)
- ①名称: 植物の油脂生産性を増大させる遺伝子及びその利用方法。
発明者: 中村研三、河合都妙、前尾健一郎、松本貴幸、伊藤節嗣、松田雅俊
権利者: 名古屋大学、トヨタ自動車
種類: 特許
番号: 特願 2011-053361.
出願年月日: 2011 年 3 月 10 日
国内外の別: 国内
- ②名称: 植物の油脂生産性を増大させる遺伝子及びその利用方法。
発明者: 中村研三、河合都妙、橋本実佳、小内清、石浦正寛、松田雅俊
権利者: 名古屋大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-054484.
出願年月日: 2010 年 3 月 11 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
中村 研三 (NAKAMURA KENZO)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号: 8 0 1 6 4 2 9 2
- (2) 研究分担者
森上 敦 (MORIKAMI ATSUSHI)
名城大学・農学部・教授
研究者番号: 1 0 2 1 1 6 0 8
前尾 健一郎 (MAEO KENICHIRO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号: 0 0 3 4 3 2 1 0