

令和元年6月10日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18577

研究課題名(和文) アブシジン酸の蓄積が引き起こす生殖組織の形態異常と不稔のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism between sterility and morphological defect in reproductive tissues caused by ABA accumulation

研究代表者

妻鹿 良亮 (MEGA, Ryosuke)

鳥取大学・乾燥地研究センター・プロジェクト研究員

研究者番号：80738526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナのアブシジン酸(ABA)分解酵素遺伝子を欠失した植物の花を顕微鏡で観察することにより、ABA分解酵素遺伝子の欠失によっておしべの長さが正常な植物よりも短くなることが明らかになった。そのため、おしべ先端の花粉の入った葯がめしべに届きにくくなり、受粉の成功率が下がっていることを示した。また、花粉自体にも何か問題があるか確かめるために人工的に欠失植物の花粉を正常な植物にかけても、欠失植物にかけても受粉が成功することから、花粉自体には問題はなく、花粉がめしべにかかっていないことが主因であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アブシジン酸(ABA)分解酵素遺伝子を欠失した植物では、極端に種がつかないことに注目し、ABAが関与する種の形成を妨げるメカニズムの解明のため研究を行った。ABAは乾燥や低温などの環境に適応する際に重要な役割を果たす植物ホルモンであるが、花の形成期においてはABAの蓄積が以後の種子収量に悪影響を及ぼすことが知られている。しかし、その逆説的なメカニズムはわかっておらず、本研究は植物ホルモンの適切な分泌時期の重要性の理解につながるだけでなく、植物の環境適応能力が種の形成に悪影響を及ぼす可能性を明らかにすることは、砂漠などの過酷な環境に適応した作物の育種や開発により役立つ情報となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Microscopic observation of the plant flower from which the abscisic acid (ABA) degrading enzyme gene of Arabidopsis thaliana has been deleted revealed that the deletion resulted in a shorter stamen length than in a normal plant. As a result, it became difficult to reach the stamens with pollen containing stamen tips, indicating that the success rate of pollination has decreased. In addition, there is no problem in the pollen itself because pollination is successful even if the pollen of the deficient plant is applied to the normal plant and the deficient plant in order to confirm whether there is any problem in the pollen itself. The main cause was suggested that pollen could not access on the surface of stamen.

研究分野：植物生理学

キーワード：アブシジン酸 植物ホルモン 不稔 ABA代謝酵素遺伝子 形態形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乾燥、低温、高温、高塩といった環境ストレスが植物の不稔を引き起こし、作物収量の低下を招くことは世界的に問題になっている。生殖成長期におけるこれらのストレスが、不稔の大きな要因の一つであることは明らかにされているが、そのメカニズムについては未解決な部分が多く残っている。例えば、植物のストレスホルモンの一つである ABA は上述の環境ストレスによって誘導され、ストレス抵抗性を発現する際に重要な役割を果たす。しかし、近年、イネにおいて幼苗期の ABA 量を低く抑えることで低温下での幼苗の成長が促進することや、生殖成長期における低温ストレスによる ABA 量の上昇が不稔を招き、ABA 分解酵素を薬で過剰発現することで不稔を回復させることに成功した事例もあり、ABA が正常な生育を阻害する因子として働くことが示されつつある。

申請者はストレス条件下における ABA の過剰蓄積が植物の成長を過度に妨げているのではないかと考え、シロイヌナズナの ABA 代謝酵素遺伝子(cyp707a1, cyp707a2, cyp707a3, cyp707a4) の四重変異体 (以下、四重変異体) が極端な不稔形質を示すことに注目した。cyp707a の三重変異体は顕著な不稔形質を示さないが、野生型と比べると非常に多量の ABA が蓄積しており、乾燥ストレスにも強い耐性を示す。四重変異体は三重変異体よりもはるかに強い乾燥耐性を保持していることから、三重変異体よりも過剰に ABA が蓄積していることが予想される。

そこで、四重変異体で cyp707a4 を恒常的に過剰発現した植物を作製し、種の付き具合を比較したところ、不稔を回復させることに成功した (図 1)。このことから ABA の過剰蓄積が不稔の原因となっていることは明らかである。また、図 2,3 に示すように、花粉を生産、保持する葯の裂開が野生型に比べて悪く、花粉が飛び出しにくいことや、葯を支える花糸の長さが野生型に比べて短く、葯がめしべの柱頭に届いていないことが観察された。このような形態的特徴が及ぼす不稔の原因について実験を行った。

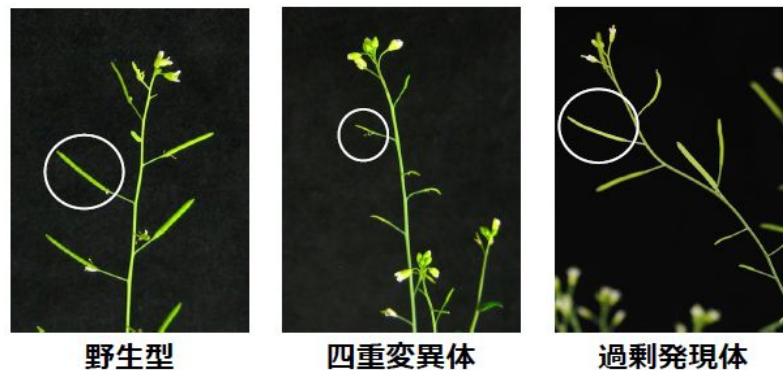


図1. 野生型、四重変異体および過剰発現体のさやの大きさの比較。四重変異体のさやは野生型に比べて明らかに小さく、形成する種子の数も圧倒的に少ない。Cyp707a4を四重変異体で過剰発現すると、さやが野生型並みに大きくなり、稔性が回復する。

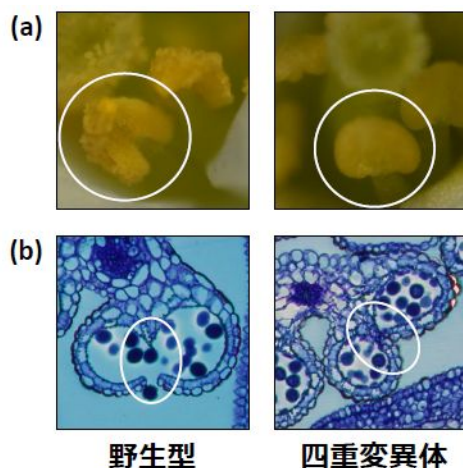


図2. (a) 野生型と四重変異体の開花した花における葯の比較。四重変異体は野生型に比べて葯に付着している花粉の量が明らかに少ない。(b) 野生型と四重変異体の葯組織切片。野生型でのみ葯の裂開が観察され、花粉粒が外に飛び出している。

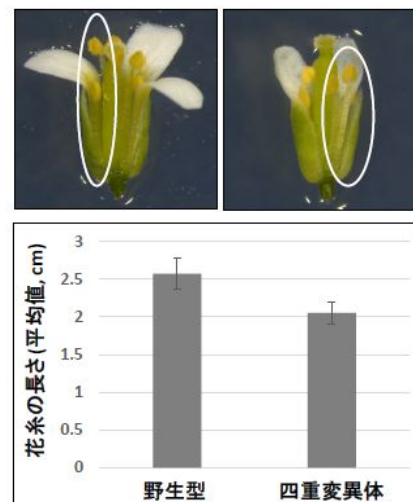


図3. (a) 野生型と四重変異体の花糸の長さの比較。四重変異体は野生型に比べて花糸の長さが短く、柱頭に葯が届いていないものが多く見られる。

2. 研究の目的

これまで ABA は環境ストレス耐性には不可欠なホルモンとして扱われてきたが、近年、ABA の過剰な蓄積が植物の成長を必要以上に妨げていることが明らかになりつつある。しかし、環境ストレスによる ABA の蓄積が、種子の成熟に悪影響を及ぼすことを直接示した論文は少なく、その詳細なメカニズムについては全く明らかにされていない。そこで、申請者は ABA 分解酵素遺伝子の四重変異体の形態観察と次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析および植物ホルモンの定量を行うことで、これまで明らかにされなかった ABA によって支配される不稔の原因遺伝子を解明する。さらに原因となる候補に挙げられた遺伝子の過剰発現体を作製し、ABA と不稔原因遺伝子の関係性の解明を試みる。

本研究では当初、以下の 4 つの到達目標を設定し、研究に取り組んだ。

- (1) 形態観察による不稔の原因の解明 (葯、花粉の形態、受精後の花粉管伸長など)
- (2) 四重変異体において不稔の原因となる遺伝子の RNA-seq による同定
- (3) 野生型、四重変異体、過剰発現体の内生 ABA およびその他植物ホルモンの定量
- (4) RNA-seq により同定された花粉形成に関わる遺伝子の過剰発現体の作製および解析

3. 研究の方法

(1) 形態観察による不稔原因の解明

四重変異体においていくつかの生殖に不利になるような形質が確認されており、これらの形質が複合的に作用して不稔の原因を引き起こしていると考えている。例えば、葯の裂開が野生型に比べて起こりにくく、葯表面の花粉の数が明らかに少ないことや、四重変異体の葯の花糸が野生型に比べて短く、柱頭に花粉が付きにくい構造をしていることなどがわかった。そこで、その他の形態的に不利な形質についても議論する必要があるとあり、まずは、四重変異体の花粉とめしべのどちらに問題があるのかを調べるため、野生型の花粉を四重変異体のめしべに、四重変異体の花粉を野生型のめしべにかけて種の付き具合を比較した。

(2) 不稔の原因となる遺伝子候補の選定

野生型、四重変異体および過剰発現体の遺伝子発現を比較することで、ABA の蓄積によって抑制されている遺伝子の解明を試みた。シロイヌナズナの野生型、四重変異体および過剰発現体のおしべもしくはめしべから RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行った。

(3) 植物ホルモンの定量

四重変異体と野生型でアブシジン酸以外の植物ホルモンの蓄積量に影響がないかを調べるために理研環境資源科学研究センターの瀬尾光範博士に依頼して植物ホルモンの定量を行った。

(4) 候補遺伝子の過剰発現体の作製

候補に挙げられた遺伝子領域を 35S プロモーターで制御するベクターを作製し、アグロバクテリウム法により、シロイヌナズナでの過剰発現体を作製する。しかし、当該期間では候補遺伝子の確認実験を完了できなかったため、作製には至っていない。

4. 研究成果

(1) 四重変異体において花の組織を観察したところ、花糸の長さが明らかに野生型と比べて短いことを過去の観察結果から見出し、葯がめしべと接することができていない形態的異常が四重変異体に存在することが明らかであった。そこで、四重変異体と野生型の間で花粉をお互いのめしべにかけると交配実験を繰り返し行ったところ、四重変異体の花粉を自身のめしべに自殖しても不稔が解消することがわかり、めしべや花粉自体の問題よりも花糸の長さが大きく関連していることが証明された。このことから、受精の段階よりも花粉がめしべに付く段階の異常が主因であることが示唆された。

ABA 代謝酵素遺伝子の一つである *cyp707a4* の過剰発現した四重変異体についても同様に、花糸の長さの計測および種子収量の計測を行ったところ、種子の収量は 4 つの過剰発現体で回復度合いが異なる結果が得られた。また、サーモグラフィによる葉表面温度を比較したところ、種子収量の最も回復度合いが高い系統で葉表面温度が野生型に最も近いことが示された。これらの結果は *cyp707a4* の発現が高い系統ほど、ABA の蓄積が抑えられ、気孔が開くことによって光合成活性が回復し、さらに収量が回復したことを示唆している。

(2) 花糸が短くなる原因を遺伝子レベルで探るために、野生型と四重変異体の花を採取し、RNA-seq による遺伝子発現解析を行った。その結果、野生型と比較して四重変異体で発現が 2 倍以上増加した遺伝子は 671、減少した遺伝子は 149 であった。これらの目立った発現パターンの変化を示したのものの中には、自家不和合性に関わる自家受粉を阻害する遺伝子が不稔に関わるものとして見られたものの、花糸の長さに関わるような細胞分裂や伸長に関わる遺伝子は見いだせなかった。このことから、開花後の花の遺伝子発現ではなく、開花前のつぼみや花糸の遺伝子発現解析を試す必要があると示唆された。また、ジャスモン酸応答性遺伝子の一つである *JAZ10* の発現が低下していたことから、ジャスモン酸シグナル伝達が阻害されている可能

性が考えられた。

(3) 同様の組織で植物ホルモンの定量を行ったところ、四重変異体でジベレリン、ジャスモン酸、オーキシシン、サリチル酸の量が低下していた。特に、活性型のジャスモン酸である JA-IIIe は葯の裂開にかかわる植物ホルモンであり、また、上述の JAZ10 の発現低下によるジャスモン酸応答性の低下と併せて、四重変異体の葯が裂開しにくい傾向にあることの原因になっている可能性が示唆された。

以上の結果から、cyp707a 四重変異体の不稔の原因は重要度の高い順に以下の3つに絞り込むことに成功した。

- (1) 花糸が野生型に比べて短いために、葯がめしべに届かず、受粉の効率が低下する。また、四重変異体で cyp707a4 を過剰発現させると、花糸の長さが回復し、種子収量も野生型レベルには至らないまでも回復する。
- (2) JAZ10 の発現の低下および JA-IIIe の量が四重変異体で低下していること、そして、葯の裂開が起こりにくいことから、ジャスモン酸応答性の低下と JA-IIIe の合成が抑制されることによる葯の裂開阻害が不稔の一因である可能性がある。
- (3) 自家不和合性遺伝子が自家受精を妨げている可能性もわずかに残されており、本遺伝子の機能の同定および花粉管伸長の比較実験を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者
該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: KIM June-sik

ローマ字氏名: (KIM, june-sik)

研究協力者氏名: 岡本 昌憲

ローマ字氏名: (OKAMOTO, masanori)

研究協力者氏名: 瀬尾 光範

ローマ字氏名: (SEO, mitsunori)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。