

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05447

研究課題名(和文)クチクラ強化による種子の長寿命化メカニズムの解明と応用

研究課題名(英文)Elucidation and application of mechanisms for increased seed longevity by cuticle thickening

研究代表者

大島 良美(Oshima, Yoshimi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：00722951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：種子寿命は種子が発芽能力を維持する期間であり、高効率で健全な発芽は植物の生産性向上と農業の効率化のために重要である。本研究では、種皮の表面を覆うクチクラが種子の劣化耐性に果たす役割、どのようなクチクラが種子劣化耐性を付与するのかを解析した。主に、種皮、花弁、葉タイプのクチクラ形成を制御する3つ転写因子について解析した結果、3つ転写因子はクチクラ高蓄積と種子劣化耐性を付与すること、さらに共通して発現誘導する遺伝子群があることを見出した。さらに、種皮クチクラ形成制御因子と相互作用する転写因子を新たに同定した。これらの解析が進めば新たな種皮クチクラ改変技術の開発につながることを期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種皮の種子寿命における役割は研究されてきたが、寿命延長に関する研究例は少ない。最近、胚乳のクチクラが種子寿命延長に重要であることが報告されたが、種皮のクチクラが果たす役割については世界的に報告がない。本研究で明らかにした種子劣化耐性を付与する転写因子及びクチクラの特徴に関する知見は種子劣化耐性の仕組みを明らかにする上で学術的に重要な知見である。種子劣化耐性の仕組みが明らかになれば短寿命種子の寿命改良、種子作物の品質向上にむけた新たな技術開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Seed longevity allows for high germination rate and healthy shoots which are important for productivity and efficiency of agriculture. This study investigated a role of cuticle covering seed coat surface in the seed deterioration tolerance and the features of cuticle giving seed deterioration tolerance. Three transcription factors regulating seed coat, petal and leaf type cuticle formation were mainly focused. They commonly induced accumulation of thick cuticle and seed deterioration tolerance and the expression of a cluster of genes. We also identified some transcription factors interacting with the transcription factor regulating seed coat cuticle formation. Further study about these genes and transcription factors may lead to develop new technologies for modification of seed coat cuticle.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：種子 クチクラ 転写因子 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

種子寿命は種子が発芽能力を維持する期間である。高効率で健全な発芽は、植物の生産性向上と農業の効率化のために重要である。多くの植物では保存条件や農薬の使用により種子の品質が管理されているものの、発芽能維持の仕組みの複雑さと種皮研究の難しさから、短命種子の寿命改良技術の開発はほとんど進んでいない。我々はこれまでに、種皮の表面を覆うクチクラの形成を制御する転写因子 LATE MERISTEM IDENTITY2 (LMI2) を同定し、その機能を強化すると種子の劣化が抑制されることを見出した。本研究では、劣化耐性における種皮クチクラの作用機作とそれに重要なクチクラ組成、種子クチクラの形成メカニズムを明らかにする。

代表的な短命種子にニンジンとダイズがあり、発芽率の低下、発芽のばらつき、発芽後の生育不良が農業上の問題となっている。ニンジンとダイズにおいて、クチクラが水分含量維持、劣化耐性に寄与するかどうかを明らかにする。クチクラ強化による劣化に強い種子の作出を目指す。

2. 研究の目的

(1) 種子劣化耐性におけるクチクラの作用機作、種子劣化耐性強化(長寿命化)に必要なクチクラ組成の変化を明らかにする。

(2) 種皮クチクラの形成制御メカニズムを明らかにする。

(3) 短寿命種子の寿命改良を試みる。

3. 研究の方法

(1) LMI2 と近縁なクチクラ制御因子 MYB106 と MYB16 はそれぞれ、花器官と葉のクチクラ形成に重要な因子であり、種皮ではほとんど発現しない。これらの種子で発現しない転写因子が種子劣化を抑制できるか検証するため、MYB106、MYB16 にそれぞれ強力な転写活性化ドメイン VP16 を融合しクチン合成酵素プロモーター下で発現するシロイヌナズナを作成した。加えて、クチクラ欠損を引き起こすため、MYB106 に強力な転写抑制ドメイン SRDX を融合し、恒常的に発現させた。T2 種子を用いて、種子の電子顕微鏡観察、劣化試験、撥水性試験、クチン、ワックスの分析、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

(2) 種皮クチクラ形成メカニズムを明らかにするため、シロイヌナズナの種皮クチクラ形成の新規制御因子を探索した。既知の種皮クチクラ制御因子 LMI2 と相互作用する転写因子を転写因子のみのライブラリを用いた酵母ツーハイブリッド法により探索した。

(3) ダイズとニンジンの種子のクチクラを強化するため、種皮表面クチクラ合成酵素遺伝子のプロモーター下でクチクラ形成を制御する転写因子を発現するコンストラクトを作成した。ニンジンはシロイヌナズナ遺伝子のプロモーターを用いた。しかし、ニンジンの形質転換を担当するスタッフが交代したため、形質転換がうまくいかず、研究期間内に形質転換を終えることができなかった。ダイズ用にはダイズから相同遺伝子のプロモーターをクローニングした。ベクターをダイズ用に改変したことなどからコンストラクト作成に遅れが出たため、形質転換体作出には至らなかった。

4. 研究成果

(1) MYB106-VP16 と MYB16-VP16 種皮のクチクラは野生型と比較して厚くなっていた(図1)。

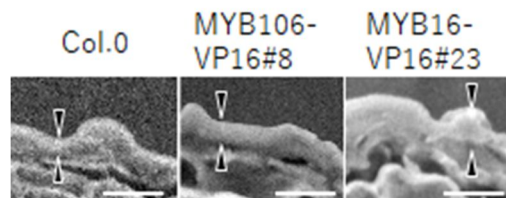


図1. 種皮表面クチクラの電子顕微鏡観察
走査型電子顕微鏡による種子断面の反射電子像。矢頭で挟まれた部分はクチクラを示す。

これらを用いて、40%、相対湿度 100%下で人工的な種子劣化試験を行った結果、MYB106-VP16、MYB16-VP16 発現種子は、LMI2-VP16 と同様に、野生型と比較して発芽率の低下が抑えられていた(図2)。したがって、花器官タイプや葉タイプのクチクラを優先的に蓄積させる転写因子を用いた場合でも種子劣化を抑制するのに必要なクチクラの性質を付与できることが明らかになった。

LMI2-VP16、MYB106-VP16、MYB16-VP16、MYB106-SRDX 植物の撥水性を調べた結果、水滴の接触角は転写因子の機能強化によって低下し、転写因子の機能欠損によって上昇した。つまり、撥水性の向上が種子劣化耐性の原因ではないと考えられる。撥水性は表面の疎水性以外に表面形状も影響することから、これらの転写因子が表面形状を変化させたことが原因だと考えられる。種子劣化の抑制には撥水より水分透過等の性質が重要であることが示唆された。

種子劣化の抑制に寄与したクチクラ組成を明らかにするため、MYB106-VP16、MYB16-VP16、LMI2-VP16 発現植物からワックスとクチンを抽出し、クチクラ組成を比較した。MYB106-VP16、

MYB16-VP16 植物のクチンの総量は野生型に比べて 2~4 倍に増加し、この増加は主に各種カルボン酸とポリヒドロキシ酸の増加によるものであった。MYB106-VP16 と MYB16-VP16 植物の間で顕著な違いは見られなかった。さらに RNA-Seq で発現誘導された遺伝子を比較したところ、発現上昇したワックスとクチン関連遺伝子の多くは MYB16-VP16 と MYB106-VP16 でのみ高発現したが、一部の遺伝子は MYB17-VP16 も含めた 3 種で共通して発現誘導されていた。共通して発現する遺伝子はワックス、クチン、スベリン合成酵素、スベリントランスポーター、転写因子、lipid transfer protein 等をコードしており、これらは種子劣化耐性を付与するのに必要な遺伝子群であることが示唆された。今後は、種皮発生において、これらの下流遺伝子がいつどこでどのように働くかを明らかにすることで、種子の劣化耐性獲得メカニズム解明を目指す。目的(3)のニンジン形質転換は引き続き進行中であるため、成功すれば、種子劣化試験を行い、シロイヌナズナ以外にも劣化耐性を付与できるか検証する。種子の劣化耐性に必要なクチクラの特徴を明らかにすることにより、劣化に強い種子の作出につながることを期待できる。

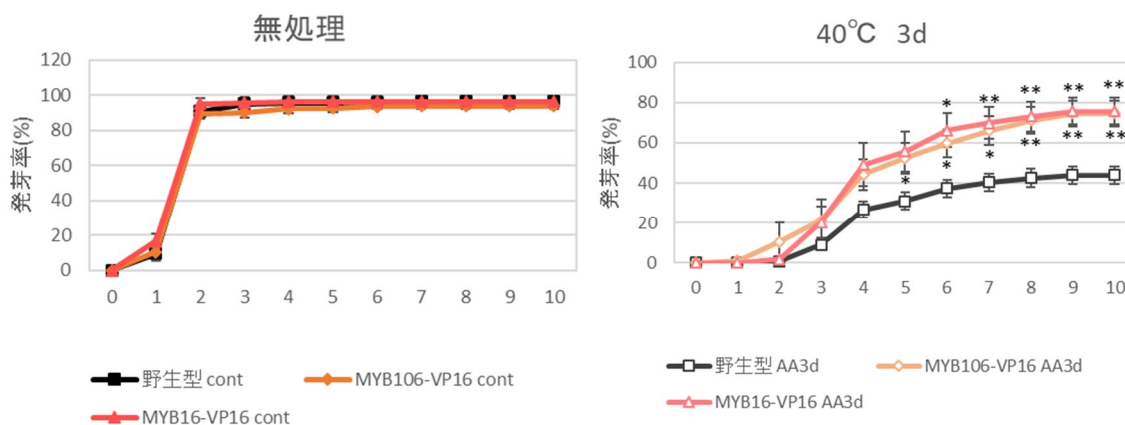


図 2 . 種子の劣化処理後の発芽率

* t -test p value < 0.05, ** t -test p value < 0.01, $n=6$

エラーバーは標準誤差を示す。

(2) 酵母ツーハイブリッド 2 次スクリーニングまで行った結果、約 1900 種類の転写因子の中から LMI2 と相互作用する因子として 7 転写因子を同定した。それらが種皮のクチクラ形成を制御するかどうかを調べるため、転写活性化因子についてはキメラリプレッサー発現植物を、転写抑制因子については過剰発現とキメラアクチベーター発現植物を作成した。今後は T2 種子が癒着するかどうか、また電子顕微鏡を用いて表面構造が変化しているかどうかを観察し種皮クチクラ形成に関与する転写因子を同定する。種皮クチクラ形成を制御する転写制御機構が明らかになれば、種皮のクチクラのみを制御する因子の同定と改変、転写抑制因子のゲノム編集によるクチクラ高蓄積など、新たな種皮クチクラ改変技術の開発につながるものと期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大島 良美、鳴海貴子、金子康子、石川寿樹、川合真紀、高木 優、光田 展隆
2. 発表標題 クチクラ形成を制御する転写因子による種子保存性の改変
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大島 良美、鳴海貴子、金子康子、石川寿樹、川合真紀、高木 優、光田 展隆
2. 発表標題 クチクラ形成制御因子による種子保存性の改変
3. 学会等名 第32回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大島 良美、鳴海貴子、金子康子、石川寿樹、川合真紀、高木 優、光田 展隆
2. 発表標題 LATE MERISTEM IDENTITY2 は種子のクチクラ形成と保存性を制御する
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会（金沢）大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大島 良美、鳴海貴子、金子康子、石川寿樹、川合真紀、高木 優、光田 展隆
2. 発表標題 転写因子LATE MERISTEM IDENTITY2によるクチクラ形成と種子保存性の制御
3. 学会等名 第31回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大島 良美、鳴海貴子、金子康子、石川寿樹、川合真紀、高木 優、光田 展隆
2. 発表標題 The transcription factor regulating seed coat cuticle is involved in seed longevity
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大島 良美、鳴海貴子、金子康子、石川寿樹、川合真紀、高木 優、光田 展隆
2. 発表標題 LATE MERISTEM IDENTITY2 regulates cuticle formation on the seed surface and participates in maintaining seed longevity
3. 学会等名 The 23rd International Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshimi Oshima, Kaoru Urano, Miki Fujita, Frederic Domergue, Kazuo Shinozaki, Nobutaka Mitsuda
2. 発表標題 The effect of MYB transcription factors regulating cuticle accumulation on water use efficiency.
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 種子の劣化を抑制する方法	発明者 大島良美、光田展隆	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-504592	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	光田 展隆 (Mitsuda Nobutaka) (80450667)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長 (82626)	
研究協力者	石川 寿樹 (Ishikawa Toshiki) (20598247)	埼玉大学・理工学研究科・准教授 (12401)	
研究協力者	市川 裕章 (Ichikawa Hiroaki) (30355755)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・再雇用職員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
フランス	Bordeaux Univ.	CNRS	