

平成23年 5月 27日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21770061

研究課題名(和文)

シロイヌナズナ種子における内生アブシジン酸量調節機構の解析

研究課題名(英文) Studies on the regulation of endogenous abscisic acid levels in Arabidopsis seeds

研究代表者

瀬尾 光範 (SEO MITSUNORI)

独立行政法人理化学研究所・適応制御研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号： 00512435

研究成果の概要(和文)：アブシジン酸(ABA)は、種子休眠、種子発芽の制御に重要な役割を果たす植物ホルモンである。質量分析器を用いた内生ABA量の定量解析により、シロイヌナズナの種子形成過程においてABAは母体由来組織および配偶子由来組織で生合成され、母体由来組織で合成されたABAが胚へと輸送される事を明らかにした。また、組織特異的にABAによって発現が制御される遺伝子群を同定し、異なる組織で生合成されたABAが異なる生理作用を持つ事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Abscisic acid (ABA) is a plant hormone that plays important roles on the regulation of seed dormancy and germination. By using mass spectrometry, we revealed that ABA is synthesized both in maternal and zygotic tissues, and ABA synthesized in maternal tissues is transported to the embryos during Arabidopsis seed development. We identified genes regulated by ABA in tissue specific manners by microarray analysis, and showed that ABA synthesized in different tissues has different physiological functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：アブシジン酸(ABA)、植物ホルモン、種子形成、種子休眠、種子発芽、生合成、輸送

1. 研究開始当初の背景

種子は乾燥、高温、低温などの過酷な環境を、時には数百年もの長期間乗り越えることが可能である。種子は休眠すること、もしくは発芽しないことでその形質を保っている。

陸上を自由に動き回る事のできない植物にとって、種子の休眠と発芽の制御は生存のために非常に重である。受精後に種子が形成されると胚の生長が一度停止し、休眠状態に入る。休眠によって生育に不適切な環境下での発芽が抑制され、休眠が解

除されると生育に適した環境下で発芽する。このように種子休眠と発芽は、種子発達過程の内的要因と、環境などの外的要因によって制御されている。アブシジン酸 (ABA) は種子休眠と発芽の制御に重要な役割を果たしている植物ホルモンであり、ABA の生合成もしくは情報伝達に欠陥を持つ突然変異体は、穂発芽や休眠性の低下などの表現型を示す。ABA の生理作用は内生量との相関を示す事が多く、ABA 内生量制御機構の解明は ABA の生理作用機構を理解するために不可欠である。しかしながら、ABA の生合成および分解に関しては、関与する主要な酵素・遺伝子がモデル実験植物であるシロイヌナズナを中心として同定されているが、内生 ABA 量の制御機構については未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 種子における ABA 生合成部位を明らかにし、組織特異的な ABA の生理作用を明らかにすること、(2) ABA 生合成調節因子を特定することにより、シロイヌナズナ種子における ABA 内生量調節機構の解明を目的とする。これらにより、ABA を介した種子休眠および種子発芽の制御機構に関する理解を深め、さらには ABA 輸送機構の解明に向けた研究の基盤を築く。

3. 研究の方法

(1) 種子における ABA 生合成部位の検討

シロイヌナズナの種子においては *AtNCED6* および *AtNCED9* によってコードされる 9-シス-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ (NCED) が、ABA 生合成の鍵酵素であることが明らかになっている。*AtNCED6* は種子形成過程の前期から中期にかけての胚乳において発現量が高く、*AtNCED9* は種子形成過程中期の種皮および中期から後期にかけての胚において発現している。このため、*AtNCED6* の機能を欠質した突然変異体 (*nced6*) は胚乳における ABA 生合成に特異的に欠陥を持つことが予想され、*AtNCED9* の機能を欠質した突然変異体 (*nced9*) は種皮および胚における ABA 生合成に欠陥を持つことが予想される。また、*nced9* 変異体において正常な *AtNCED9* 遺伝子を種皮もしくは胚においてのみ発現させる事で、それぞれ胚もしくは種皮においてのみ ABA 欠損となる変異体を得る事が可能である。一方で、シロイヌナズナ *aba1*, *aba2*, *aba3* などの典型的な ABA 欠損突然変異体においては、1 遺伝子の機能欠質で植物体および種子などのあらゆる器官における内生 ABA 量が極端に減少する。これらの ABA 欠損変異体の雌しべと野生型の花粉を掛け合わせた F₁ 種子においては、母体由来組織 (種皮) が ABA 欠損となり、配偶子由来組織 (胚、胚乳) が野生型 (ヘテロ接合体) となる。また、ABA 欠損突然変異体と野生型を掛け合わせた F₂

世代種子においては、母体由来組織は全ての個体で野生型 (ヘテロ接合体) となるが、配偶子由来組織においては ABA 欠損型と野生型が 1:3 に分離する。このような各種変異体における内生 ABA 量を LC-MS/MS を用いて定量する事により、それぞれの組織で合成される ABA 量を比較した。さらに、これらの変異体における遺伝子発現をマイクロアレイによって比較する事で、それぞれの組織で合成される ABA の生理機能を検討した。

(2) ABA 生合成調節因子の特定

AtNCED6 と *AtNCED9* が種子における ABA 生合成に主要な役割を果たす事から、これらの遺伝子発現を調節する因子を特定することにより、ABA 生合成の調節因子が特定されると期待できる。これまでに *AtNCED6* および *AtNCED9* のプロモーター解析により、*AtNCED6* の胚乳に発現に必要な領域、*AtNCED9* の種皮および胚における発現に必要な領域を同定してきている。*AtNCED9* の種皮における発現に必要な領域には、ホメオドメイン-ロイジンジッパー (HD-ZIP) タンパク質である ATHB6 および MADS ボックスタンパク質である AGL15 による認識配列が含まれる。この予想結合配列に変異を導入すると種皮におけるプロモーター活性は消失した。また、ゲルシフトアッセイによりリコンビナント ATHB6 タンパク質がこの配列に直接結合することを明らかにした。この事から、少なくとも ATHB6 が *AtNCED9* の発現制御に関与する可能性が考えられる。しかしながら、HD-ZIP タンパク質はファミリーを形成することから、ファミリー内での機能重複性が予想されるため、実際に生体内で *AtNCED9* の発現調節に関与する ATHB タンパク質の特定が必要となる。種子内の組織特異的な発現パターンから候補を絞り込み、変異体における *AtNCED9* 発現量および内生 ABA 量の測定より、*AtNCED9* の発現調節への関与を検討した。また、*AtNCED6* の胚乳および *AtNCED9* の胚における発現に関しては、変異を導入したプロモーター活性の比較によりシス配列の同定を試みると同時に、酵母 one-hybrid 系による発現調節因子候補のスクリーニングをおこなった。

4. 研究成果

(1) 種子における ABA 生合成部位の検討

シロイヌナズナ発達種子における ABA の蓄積量を詳細に解析した。受粉後のサヤ全体における ABA 量は、9 日目 (21 日で種子が完熟) にピークとなり、12 日目に一度減少した後に再び上昇した。サヤを種子とそれ以外の部位 (主に果皮) に分離して ABA 量を測定した結果、種子形成中期 (9 日目) の ABA は主に種子に分布し、後期 (12 日目以降) の ABA 量上昇は主に果皮によることが明らかになった。

野生型と ABA 欠損突然変異体 (*aba2*) の掛け合わせによる F₂ 種子の種皮は母体植物 (*ABA2/aba2*) に由来するため野生型になるが、配偶子由来の胚および胚乳は野生型と ABA 欠損型が 3:1 に分離する。F₂ 種子における ABA 量を 1 個体ずつ分析する

ことで、種子中に蓄積する ABA が母体由来であるか、胚もしくは胚乳に由来するものかを区別することが可能になる。種子中の ABA 量がピークとなる受粉後 9 日目においては、ABA の蓄積量に関して F₂ 種子集団内で野生型と ABA 欠損型を区別することができなかった。すなわち胚および胚乳が ABA 欠損型となっても種子に蓄積する ABA 量は野生型と同等である。これに対し、種子形成後期にあたる 15 日目の F₂ 種子集団内では野生型に比べて明らかに内生 ABA 量の減少した個体が全体のおおよそ 1/4 の頻度で存在することが明らかになった。これらのことから、ABA は種子形成中期には主に母体由来の組織（種皮もしくは母体植物からの移動）で合成され、後期には主に胚もしくは胚乳において合成されていることが予想された。受粉後 9 日目の種子内に蓄積する ABA は母体由来であることが示されたが、種子を胚とそれ以外（種皮および胚乳）に分離して ABA 量を分析したところ、ABA は主に胚に分布していることが明らかになった。このことから種子形成中期においては母体由来組織で合成された ABA が胚に移動していることが考えられた。

一方で、ABA 欠損突然変異体 (*aba2*) の雌しべと野生型の花粉を掛け合わせた F₁ 種子においては、母体由来組織（種皮）が ABA 欠損となり、配偶子由来組織（胚、胚乳）が野生型となる。この F₁ 種子においては種子形成中期および後期において野生型と同レベルの ABA が蓄積していたことから、上記の F₂ 種子における解析結果に反して、胚または胚乳も条件的に ABA 生合成能を有する事が明らかになった。

上記の F₁ 種子の休眠性は野生型と同等であったが、F₂ 種子の休眠性は野生型に比べて明らかに低下していた。このことから、種子形成後期に胚または胚乳で合成された ABA が休眠性の誘導に必要であることが明らかになった。また、*nced9* 変異体において正常な *AtNCED9* 遺伝子を胚のみで発現させるコンストラクトを導入した結果、種子における ABA の蓄積量は回復しなかったが、発芽時のジベレリン生合成阻害剤（パクロブトラゾール）に対する耐性は野生型と同等に相補された。このことから、*AtNCED9* を介して種皮で合成される ABA は胚で合成される ABA に比べて量的には多いが、種子発芽の制御には胚で合成される ABA が重要である事が示された。

野生型と典型的な ABA 欠損変異体 *aba2* の発達種子におけるトランスクリプトーム解析をおこなった。種子形成中期においては、ペクチンエステル化酵素やエクспанシンなどの細胞壁修飾に関わるタンパク質や、リボソームタンパク質をコードする遺伝子群の発現が *aba2* 変異体において上昇している（つまり野生型においては ABA によって発現が抑制される）ことが明らかになった。これ

に対し種子形成後期においては、細胞壁修飾関連タンパク質およびリボソームタンパク質に加え、プロテアーゼやペプチダーゼなどのタンパク質分解酵素をコードする遺伝子群の発現が、*aba2* 変異体において上昇していた。興味深い事に、これらの遺伝子群の多くが種子形成過程においてジベレリン (GA) によって発現が誘導される遺伝子として報告されていた。研究代表者らは、これまでに種子形成過程において ABA が GA の生合成を抑制している事を明らかにしてきたが、今回の結果はこれを支持するものである。また、種子形成過程後期においては、熱ショックタンパク質をコードする遺伝子群の発現が、*aba2* において減少している（つまり野生型では ABA によって発現が誘導される）事が明らかになった。これまで ABA は種子形成過程において種々の貯蔵物質の蓄積に関与していると言われてきたが、今回の結果はそれを支持するものではなかった。今後、今回明らかになった ABA 応答性遺伝子群の種子形成過程での機能を明らかにしていく必要がある。また、前述の野生型と ABA 欠損突然変異体を掛け合わせた F₁ および F₂ 種子を用いた実験から、種子形成後期に胚もしくは胚乳で合成される ABA が休眠性の誘導に必要であると考えられるが、今回同定された ABA 応答性遺伝子が休眠性の制御に関与しているかは明らかでない。リボソームタンパク質や熱ショックタンパク質など、これまで休眠性との関連があまり議論されていなかったタンパク質群の機能解析により、新たな制御機構の解明が期待される。

種子形成過程中期においては *aba2* 変異体種子における ABA 量は野生型の 1/2 程度であるのに対し、*nced6 nced9* 二重変異体種子における ABA 量は野生型の 1/10 程度に減少していた。この時期の *aba2* 種子においては *AtNCED6* の発現量が野生型に比べ有意に上昇しており、これにより内生 ABA 量に関してある程度の補償作用が働いたと考えられる。一方で、種子形成過程後期においては *aba2* 変異体種子における ABA 量は野生型の 1/10 程度まで減少しているのに対し、*nced6 nced9* 二重変異体種子における ABA 量は野生型の 1/2 程度である。このことから、この時期の *nced6 nced9* においては他の *AtNCED* 遺伝子による補償作用が働いた可能性が考えられる。上記の ABA 応答性遺伝子群の発現量を *aba2* と *nced6 nced9* 変異体の間で比較したところ、その発現量が必ずしも内生 ABA 量との相関を示さない事が明らかになった。つまり種子形成過程中期においては、野生型と *aba2* における発現量の差が、野生型と *nced6 nced9* における発現量の差よりも顕著な遺伝子群と、野生型と *nced6 nced9* における発現量の差が野生型と *aba2* における発現量の差よりも顕著な遺伝子群とに分類された。この原因として、*aba2* と *nced6 nced9* においては ABA 欠損の度合いが組織によって異なっていることが予想される。つまり、異なる組織で合成された ABA が異なる遺伝子の発現を制御していると考えられる。組織特異的に合成される ABA の生理機能を明らかにする事が、今後の重要な課題である。

(2) ABA 生合成調節因子の特定

前述のとおり、*AtNCED6* は種子形成前期から中期にかけての胚乳で発現しており、*AtNCED9* は種子形成中期の種皮および中期から後期にかけての胚において発現している。*AtNCED9* の種皮における発現に関しては、ATHB6 タンパク質の結合配列を同定し、この配列に変異を導入すると *AtNCED9* の種皮における発現が消失すること、またこの配列に ATHB6 タンパク質が結合する事をゲルシフトアッセイによって明らかにしていた。クラス I に分類される HD-ZIP ファミリーには ATHB6 を含む 17 種のメンバーが存在し、それぞれ類似した配列を認識すると考えられる。実際に ATHB6 に類似した 3 種の ATHB に関してはリコンビナントタンパク質が同じシス配列を認識することが確認された。さらにクラス II に分類される 10 種の ATHB タンパク質もクラス I と類似した配列を認識することが報告されている。このため、*AtNCED9* の発現制御に関与する ATHB タンパク質の同定には更なる検討が必要である。*AtNCED9* プロモーター領域の ATHB タンパク質認識配列は、*AtNCED9* の種皮における発現にのみ必要とされる事から、この配列を認識する制御因子も種皮に特異的に発現していると予想される。組織特異的に調整した RNA を用いた定量的 RT-PCR 解析により、種皮特異的に発現する *ATHB* 遺伝子 2 種を *AtNCED9* の発現調節因子候補として絞り込んだ。しかしながら、これらの遺伝子に関する機能欠質型突然変異体の発達種子において、内生 ABA 量および *AtNCED9* の発現量に変化が見られず、さらに二重変異体を作成しても同様に内生 ABA 量および *AtNCED9* の発現量に変化が見られなかった。このことから、*ATHB* ファミリー内での機能重複性がとても高い可能性、また、他の制御因子の関与している可能性が考えられた。

AtNCED9 プロモーター領域の ATHB タンパク質認識配列とオーバーラップする形で MADS ボックスタンパク質である AGL15 の認識配列が存在するため、AGL15 の *AtNCED9* 発現調節への関与を検討した。しかしながら、AGL15 は *AtNCED9* のプロモーター領域には結合せず、また *agl15* 変異体において内生 ABA 量の変化を確認する事はできなかったことから、AGL15 の ABA 生合成制御への関与は否定的である。

AtNCED6 の胚乳における発現および *AtNCED9* の胚における発現に必要とされる遺伝子上流域に存在する既知のシス配列をデータベースから検索し、それぞれの配列に変異を導入したプロモーター・レポーターコンストラクトを導入した形質転換体を作成した。得られた形質転換体におけるプロモーター活性の解析をおこなったが、*AtNCED6* の胚乳における発現、および *AtNCED9* の胚におけ

る発現に必要とされる配列の同定には至らなかった。さらに、*AtNCED6* の胚乳における発現、および *AtNCED9* の胚における発現に必要とされる遺伝子上流域に結合するタンパク質のスクリーニングを酵母 one-hybrid 系を用いておこなったが、現時点で転写制御因子をコードすると考えられる有力な候補遺伝子は同定できていない。新たな one-hybrid 用プロモーターコンストラクトおよびスクリーニング用 cDNA ライブラリーの作成に検討を加えている。

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 2 件)

- ① Seo, M. and Koshiba, T. (2011) Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action, *J. Plant Res.*, (in press). 査読有
- ② Kanno, Y., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nambara, E., Abrams, S.R., Kamiya, Y. and Seo, M. (2010) Comprehensive hormone profiling in developing Arabidopsis seeds: examination of the site of abscisic acid biosynthesis, abscisic acid transport and hormone interactions, *Plant Cell Physiol.*, 51, 1988-2001. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Seo, M., Hormone profiling in Arabidopsis developing seeds: examination of the site of abscisic acid (ABA) biosynthesis and hormone interactions, 20th International Conference on Plant Growth Substances, 2010 年 7 月 30 日、タラゴナ (スペイン)
- ② Seo, M., Maternal synthesis of ABA and transport of ABA into the embryo during Arabidopsis seed development, 21st International Conference on Arabidopsis Research, 2010 年 6 月 7 日、横浜
- ③ 瀬尾光範, 異なる組織で合成されるアブシジン酸はシロイヌナズナ発達種子において異なる遺伝子の発現を制御する, 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010 年 3 月 20 日、熊本
- ④ 瀬尾光範, シロイヌナズナ発達種子におけるホルモン代謝、植物化学調節学会第 4 回大会, 2009 年 10 月 30 日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬尾 光範 (SEO MITSUNORI)

独立行政法人理化学研究所・適応制御研究ユニット・ユニットリーダー
00512435

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者