

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380057

研究課題名(和文) 植物油貯蔵制御因子の全自動生物発光連続モニタリングを使った網羅的な遺伝学的同定

研究課題名(英文) High-Throughput Genetic Identification of Regulatory Factors Involved in the Regulation of Seed Oil Storage Using Bioluminescence Automatic Monitoring System

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)： 植物の油脂の合成や貯蔵に重要な役割の担う遺伝子の発現をLUCレポーターの発光でモニターできるシロイヌナズナ植物を作り、自動連続発光モニター装置を使って数十万の植物をスクリーニングした。これらレポーターの発現が異常になった多数の突然変異株を分離し、T-DNAタグや次世代DNAシーケンサーによるゲノム解析を使って突然変異の原因遺伝子の同定を進めた。その結果、油脂合成酵素遺伝子の発現を活性化する因子に加え、種子での油脂貯蔵に関わる遺伝子の発芽後の発現抑制に関わるこれまで知られていなかった因子を見出すことが出来た。

研究成果の概要(英文)： We prepared Arabidopsis plants that express LUC reporter gene under the control of promoters from genes important in the biosynthesis and storage of seed oil. By using automatic bioluminescence monitoring system, we screened several hundred thousands of plants for mutants with altered expression patterns of LUC reporter gene. In addition to AOTA1, a novel factor involved in the activation of DGAT1 gene for the final step of seed oil synthesis, we could identify several additional candidate genes potentially involved in the activation of DGAT1. Furthermore, we could identify a novel gene DROL1 coding for a factor potentially involved in the repression of OleS3 gene for seed oil storage after seed germination.

研究分野：植物生化学・分子生物学

キーワード：種子成熟 種子発芽 油脂貯蔵 突然変異株 発光レポーター 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナの種子形成初期に、炭素は一過的にデンプンとして蓄えられた後にプラスチドでの脂肪酸合成に配分され、アシル CoA が小胞体に運ばれて長鎖化や不飽和化を受けてグリセロールに転移されて TAG が合成される。種子形成後期には小胞体膜で TAG と共にオレオシンが合成されてオイルボディを形成する。細胞に大量のオイルボディとプロテインボディを蓄えた種子は休眠に入る。貯蔵タンパク質に注目した研究から、一連の種子形成過程は LEC マスター因子群とその下流で働く因子による転写の複雑なカスケードとネットワークによって統御されていることが示されている。しかし、油脂の合成・貯蔵に関わる多くの遺伝子の活性化機構や、種子発芽過程で油脂貯蔵遺伝子が不活性化されて分解系遺伝子が活性化される転換機構の詳細は不明である。油脂の合成と貯蔵の制御の詳細な分子機構の解明は、種子における油脂生産性向上のみならず種子以外の組織での油脂生産などに利用可能な新技術シーズをもたらすと期待される。

2. 研究の目的

植物種子の油脂貯蔵に関する遺伝学的解析は、油脂に着目した突然変異株スクリーニングが難しいため、デンプンや貯蔵タンパク質に注目した研究に比べ少なく、その制御機構の詳細には未だ不明な点が多い。本研究では、油脂の合成と貯蔵に関わる鍵遺伝子のプロモーターとルシフェラーゼ (LUC) の融合遺伝子をレポーターとし、一度に 2 万個もの芽生えの LUC 発光を 1 週間に渡って連続モニターできるハイスループット装置と次世代高速 DNA シーケンサを使い、油脂貯蔵に関わる突然変異株の大量選別と原因遺伝子の迅速同定を進める。特に、種子成熟後期の細胞の小胞体での油脂合成と発芽後の油脂貯蔵関連遺伝子のサイレンシングに焦点を当て、油脂生産性向上や種子以外の非食用部位での油脂生産を目指す新規基盤技術を獲得する。

3. 研究の方法

種子が成熟する時の油脂関連遺伝子の活性化と、発芽する時のこれら遺伝子の不活性化に関わる制御因子を新しい遺伝学的手法によって網羅的に同定し、種子特異的な油脂貯蔵の統御ネットワークを明らかにする。そのために、プロモーターとルシフェラーゼ (LUC) の融合遺伝子を導入したシロイヌナズナを使い、油脂の合成と貯蔵に関わる鍵遺伝子の発現を LUC 発光でモニターする。一度に 2 万個の変異誘発剤処理した種子の芽生えの LUC 発光をハイスループット生物発光連続モ

ニター装置を使ってモニターし、LUC 発光が変化した突然変異株を大量に取得して次世代で確認する。多数の突然変異株を種々の表現型でグループ化し、類似した特徴を示す突然変異株の DNA に配列タグを付けてプールし、次世代高速シーケンサで全ゲノムを同時に解読する。変異が高頻度で見られる遺伝子は鍵遺伝子の発現制御に関わると推定される。その他の突然変異株は戻し交配後の変異株の DNA をプールし、全ゲノム同時解読によって変異の原因遺伝子を推定する。変異の推定原因遺伝子を相補実験で確認し、同定した多数の制御因子の機能などから制御システムの全体像を把握し、制御の要となる遺伝子の改変が油脂生産に及ぼす効果を検証する。

4. 研究成果

種子成熟過程の小胞体で起こるトリアシルグリセロール (TAG) 合成系酵素の遺伝子と小胞体からのオイルボディ形成に関わるオレオシン (oleosin) の遺伝子の発現パターンは類似しており、どちらも転写因子 WR11 によって一斉に活性化されるプラスチドで働く脂肪酸合成系遺伝子群よりも後の種子成熟後期に起こる。しかし、TAG 合成系の最終段階酵素をコードする *DGAT1* などの遺伝子が発芽後の栄養組織でも体内時計や糖による制御を受けて弱く発現するのに対し、種子で TAG を貯蔵するオイルボディの主要構成タンパク質のオレオシンをコードする *OleS3* 遺伝子は発芽後には不活性化とサイレンシングを受けてヘテロクロマチン領域に組込まれる。これら種子成熟遺伝子の発現制御に関わる因子の探索のために、*DGAT1* 遺伝子と *OleS3* 遺伝子のプロモーター領域とウミホタルルシフェラーゼ (LUC) のコード領域との融合遺伝子を導入したシロイヌナズナを作成した。

DGAT1p::LUC 導入株種子をルシフェリン入りの培地に播種して発芽させると、約 20 時間のラグを経て LUC 発光が観察できるようになり、約 36 時間後にひとつのピークを迎え、その後 LUC 発光は次第に強くなり、かつ 24 時間の日周リズムを示すようになる。*OleS3p::LUC* 導入植物の種子をルシフェリン入りの培地に播種した時にも、約 20 時間のラグを経て LUC 発光が現れ、約 36 時間後にピークを迎える。しかし、その後は *DGAT1p::LUC* 導入株と異なり LUC 発光は次第に減衰して約 80 時間後には消失し、*OleS3* 遺伝子の発芽後の発現抑制をモニターすることができない。また、*OleS3p::LUC* を *OleS3* を始めとする種子成熟遺伝子の発芽後の抑制に異常を示す *hsi2* 変異株に導入すると LUC 発光の 36 時間目以降の抑制が見られず、*OleS3p::LUC* 導入植物は種子成熟遺伝子

の発芽後の発現抑制機構を解析する優れたツールとなることを示している。*DGAT1p::LUC* 導入植物の中から、導入遺伝子が1コピーで、発光強度が強いラインと弱いラインの適切な株を選抜し、多くの自殖種子を得て標準株とした。同様に *OleS3p::LUC* 導入植物の中から、導入遺伝子が1コピーで、発光強度が比較的強いラインを選抜して標準株とした。これら標準株をもとに突然変異株を作成しスクリーニングを行った。

DGAT1p::LUC 導入植物のうちで、発現レベルの比較的弱い標準株を更に 35S プロモーターのエンハンサーを4コピーもつ T-DNA で形質転換してアクティベーションタグラインを作成し、ハイスループット生物発光連続モニター装置を使って約 29 万の T2 幼植物体のスクリーニングを行い、発光の強い一次変異株候補 258 ラインを得た。その 46 ラインのうち 17 ラインは果実での発光も強く、さらにその中の 6 ラインは果実当たりの油脂含量も高かった。それぞれのラインの自殖 T3 世代種子 32 個の発芽幼植物体の LUC 発光を標準株と統計的に比較し、明らかに発現レベルの高くなったラインを幾つか得た。その一つのライン #14 については原因遺伝子を同定し、そのコードする機能未知タンパク質を AOTA1 と命名した。AOTA1 遺伝子の 35S プロモーターを使った過剰発現株では種子油脂含量が野生型株にくらべ約 15% 程度増加し、一方で AOTA1 遺伝子の T-DNA 挿入破壊株では種子油脂含量の低下が見られた。

#14 に加えて他の 2 ラインについて、tail PCR によってエンハンサー-T-DNA が挿入された染色体部位を同定した。挿入されたエンハンサー近傍の遺伝子の発現を解析し、その発現が標準株に比べて高くなっている遺伝子について 35S プロモーターのエンハンサーによる過剰発現が *DGAT1* 遺伝子の発現を増加させ、ひいては種子の油脂含量の増加をもたらすか否かを検討したが、期待される効果をもたらす遺伝子を見いだすことができなかった。

DGAT1p::LUC 導入植物のうちで、発現レベルの高い標準株の種子を変異誘起剤の EMS で処理し、その M2 世代幼植物体 2 万個体の LUC 発光をハイスループットモニター装置でスクリーニングし、元株よりも発光強度の弱い一次候補 115 ラインを得た。各ラインの自殖種子を 1 ライン当たり約 40 個体づつの発光をモニターし、後代でも発光レベルの有意に低い変異株候補を 17 ライン得た。その殆どは果実での発光も低く、種子油脂含量も低下していた。それら次世代でも種子登熟期の LUC 発光のみならず種子油脂含量の低下も認められた変異株の中の、10-2D12 と 1-9B7

の 2 つのラインについて低 LUC 発光株のゲノム DNA を高速シーケンサにかけて研究協力者の鈴木孝征博士が改良した解析ソフト MITSUCAL で解析した。しかし、ノイズが高く原因遺伝子候補の絞り込みに至らなかったため、マッピングによる原因遺伝子の推定作業を継続して進め、10-2D12 については 2 番染色体の AT2G45380 近傍に原因遺伝子が位置することまで明らかになっている。

野性型株では *OleS3p::LUC* 遺伝子の発現は発芽直後に一過的な発現の後に消失するが、*hsi2* 変異株や *hsi2 hsi1* 二重変異株では発芽後に発光が増加し、発芽後の *OleS3* の発現抑制に関わる変異株スクリーニングに優れた系であることを確認した。次いで、EMS 処理した *OleS3p::LUC* 導入株種子から、種子発芽後に *OleS3p::LUC* が脱抑制を受けて発現が継続する突然変異株の大量スクリーニングを行い、約 12 万株の植物から、発芽後の LUC 発光の経時変化に異常を示す約 50 株を選抜した。こうした芽ばえでの LUC 発光が野性型株よりも長く持続する変異株候補には、生育の遅延を示して稔性の低下したものが多く、種子成熟遺伝子の発芽後の発現抑制は栄養成長への転換とリンクしていることを示唆している。その中の OL8#42-167 株は、次世代でも発芽後の LUC 発光が長く継続するだけでなく、内在 *OleS3* mRNA のレベルも高い劣性の変異であることが確認された。OL8#42-167 株のゲノム DNA の高速シーケンサと MITSUCAL ソフトウェアによる解析から、intron-exon 境界の一塩基置換によってミスプライシングが起こっている遺伝子を変異の原因遺伝子と推定して DR0L1 と名付けた。OL8#42-167 株に野性型 DR0L1 遺伝子を導入すると変異は相補され、また DR0L1 遺伝子への T-DNA 挿入破壊株は OL8#42-167 株と類似した表現型を示した。DR0L1 遺伝子は詳細な機能は不明だが U5 スプライセオソーム因子と推定されるタンパク質をコードしている。RNA-Seq 解析の結果、*drol1* 変異株の芽生えでヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 遺伝子の一つで特定イントロンのスプライシングにエラーが生じていることが見いだされ、現在その表現型との関連を解析している。

OleS3p::LUC を導入した *hsi2-2* 変異株の中で見られる発芽後の LUC レポーター遺伝子の脱抑制が回復する復帰変異株候補の大量スクリーニングもを行い、約 2 万個の植物をスクリーニングして、*hsi2-2* 変異株の中では見られなくなった *OleS3p::LUC* の発芽後の一過性発現のピークが一部回復した変異株候補を得て、解析を継続している。

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 4 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* **26**: 1330-1344 (2014). 査読有
2. Ruduś, I., Terai, H., Shimizu, T., Kojima, H., Hattori, K., Nishimori, Y., Tsukagoshi, H., Kamiya, Y., Seo, M., Nakamura, K., Kępczyński, J. and Ishiguro, S.: Wound-induced expression of DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1 and DAD1-like lipase genes is mediated by both CORONATINE INSENSITIVE1-dependent and independent pathways in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Rep.*, 33: 849- 860 (2014). 査読有
3. Suzuki, T., Tsunekawa, S., Koizuka, C., Yamamoto, K., Imamura, J., Nakamura, K. and Ishiguro, S.: Development and disintegration of tapetum-specific lipid-accumulating organelles, elaioplasts and tapetosomes, in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Plant Sci.*, **207**: 25-36 (2013). 査読有
4. Muramoto, N., Tanaka, T., Shimamura, T., Mitsukawa, N., Hori, E., Koda, K., Otani, M., Hirai, M., Nakamura, K. and Imaeda, T.: Transgenic sweet potato expressing thionin from barley gives resistance to black rot disease caused by *Ceratosystis fimbriata* in leaves and storage roots. *Plant Cell Rep.* **31**: 987-997 (2012). 査読有

[学会発表](計 14 件)

1. 河合都妙、鈴木孝征、小内清、前尾健一郎、石浦正寛、東山哲也、中村研三：「種子成熟遺伝子の発芽後の発現抑制に関わる新規因子の解析」、第 56 回日本植物生理学会年会(東京農業大学) 2015 年 3 月 16 日
2. 河合都妙、伊藤節嗣、橋本実佳、前尾健一郎、中村研三：「シロイヌナズナ種子油脂合成遺伝子 *AtDGAT1* の発現活性化に関わる因子の解析」、第 27 回植物脂質シンポジウム(静岡市産学交流センター)、2014 年 11 月 28 日
3. 河合都妙、鈴木孝征、小内清、前尾健一

郎、石浦正寛、東山哲也、中村研三：「種子成熟遺伝子の発芽後の発現抑制を制御する因子の網羅的スクリーニング」、第 37 回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜) 2014 年 11 月 26 日

4. 河合都妙、鶴飼聖子、御堂育子、塚越啓央、前尾健一郎、小内清、石浦正寛、中村研三：「種子成熟遺伝子の発現における B3 転写因子 HSI2 と HSL1 の機能」、第 55 回日本植物生理学会年会(富山大学) 2014 年 3 月 18 日
5. 河合都妙、棚橋亮弥、小内清、前尾健一郎、石浦正寛、中村研三：「発光レポーターを使った種子成熟遺伝子の発芽後抑制に異常を示すシロイヌナズナ変異株の網羅的スクリーニング」、第 55 回日本植物生理学会年会(富山大学) 2014 年 3 月 18 日
6. 河合都妙、鶴飼聖子、御堂育子、近藤有里、前尾健一郎、小内清、石浦正寛、中村研三：「発光レポーターを使用した種子成熟フロクラム抑制機構の解析」、第 54 回日本植物生理学会年会(岡山大学) 2013 年 3 月 23 日
7. 鈴木孝征、西脇万理恵、鈴木俊哉、中川繭、河合都妙、速水彩子、中村研三、石黒澄衛、東山哲也：「高速シーケンサーを用いたシロイヌナズナ変異株の原因遺伝子同定システム Mitsucal の開発」、第 54 回日本植物生理学会年会(岡山大学) 2013 年 3 月 21 日
8. Nakamura, K. "Transcriptional control of seed oil accumulation in Arabidopsis thaliana.", Invited Speaker, International Symposium on Recent Advances in Plant Biotechnology, Ton Duc Thang University (Ho Chi Minh City), Viet Nam., Dec. 28, 2012.
9. Nakamura, K. "Transcriptional repression of seed maturation genes after seed germination in Arabidopsis thaliana." Invited Speaker, The 4th NIBB-MPIPZ-TLL Symposium., National Institute of Basic Biology (Okazaki), Nov. 21, 2012.
10. Nakamura, K. "Transcriptional control of seed oil accumulation in Arabidopsis.", Invited Lecture, Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica (Taipei), Taiwan, Jun. 16, 2012.
11. 橋本美佳、河合都妙、前尾健一郎、小内清、石浦正寛、中村研三：「シロイヌナズナ種子油脂合成系遺伝子の新奇活性化因子の遺伝学的同定」、第 53 回日本植物生理学会年会、京都産業大学(京都) 2012 年 3 月 16 日
12. 鶴飼聖子、河合都妙、近藤有里、前尾健一郎、小内清、石浦正寛、中村研三：「シロイヌナズナ B3 因子 HSI2、HSL1 に

よる種子成熟プログラムの抑制機構」、
第 53 回日本植物生理学会年会、京都産
業大学（京都）2012 年 3 月 16 日

13. Kawai, T., Onai, K., Hashimoto, M.,
Maeo, K., Ishiura, M. and Nakamura, K.
“Large scale screenings of *Arabidopsis*
seed oil mutant by using
bioluminescence monitoring system.
The 4th Asian Symposium on Plant
Lipids, Univ. Hong Kong (Hong Kong),
Dec. 3, 2011.
14. Nakamura, K. “Repression of genes
involved in seed oil accumulation after
seed germination.” The 4th Asian
Symposium on Plant Lipids, Univ.
Hong Kong (Hong Kong), Dec. 3, 2011.

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：80164292

(2)研究分担者

石浦正寛 (ISHIURA, Masahiro)
名古屋大学・遺伝子実験施設・教授
研究者番号：20132730