

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570052

研究課題名(和文)植物の生殖器官発達に働く小胞輸送因子の機能解析

研究課題名(英文)Functional Analysis of vesicle transport system for plant reproductive organs

研究代表者

中川 強 (Nakagawa, Tsuyoshi)

島根大学・総合科学研究支援センター・教授

研究者番号：30202211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：生殖器官の形成は生物種の保存に必須な重要イベントである。我々は植物の生殖器官の形成を制御する分子メカニズムの解明を目指して突然変異体を用いた研究を進めた。その結果、花粉できずに花粉が死んでしまう変異体が見つかり、小胞輸送に必要な遺伝子の働きが示された。小胞輸送は細胞内の様々な物質の輸送・分泌に働いている。今回の研究により、植物の生殖器官が正しく発達するためには小胞輸送の機能により物質が正しく輸送される必要があることが示された。

研究成果の概要(英文)：The formation of reproductive organ is important event for maintenance of species. In this study, we analyze molecular mechanism regulating development of reproductive organ in higher plant by molecular genetic approach. As the results, we isolated the mutant failure in formation of pollens and found the phenotype caused by the mutation in factors controlling vesicle transport. Transport of many molecules in cells are controlled by vesicle transport including the event of secretion and transport of molecules into organelle. From this study, importance of function of vesicle transport is revealed for development of reproductive organs in plants.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：植物 生殖器官 花粉 小胞輸送 オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

生殖器官の形成は生物種の存続に必須な重要イベントである。植物において生殖器官のコントロールは育種の鍵となっており、重要な研究課題となっている。近年モデル植物シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的解析により、生殖器官、特に雄性生殖器官である雄しべ、花粉の発達に働く遺伝子が単離されてきている。それらの中には植物ホルモンに関する因子、受容体型キナーゼ、転写因子など、さまざまなレベルでの調節に関わるタンパク質が含まれている。しかしながら花粉発達という複雑な生命現象を分子レベルで理解するためには花粉の発達に直接関与する因子の同定が必要不可欠である。花粉の表面はスポロポレニンという物質が蓄積して規則的な2次細胞壁パターンを形成している。この構造は非常に強固であり、また雌しべ柱頭での受粉にも必要である。そこで本研究では花粉の発達、特に表面構造の発達に関与する新たな遺伝子を探索し、植物の生殖器官形成の理解を深めることとした。

2. 研究の目的

(1) 植物の花粉は雄しべの葯の中(葯室)で、花粉母細胞-四分子-花粉と発達する。この過程で減数分裂がおり、成熟花粉では精細胞(雄核)、栄養細胞が形成されている。同時に花粉表面にはスポロポレニンが蓄積し、柱と天井の構造を持つエキシンが形成される。実験材料として用いたシロイヌナズナの花粉エキシンは走査型電子顕微鏡により網目の構造として観察される。花粉はめしべの柱頭に付着し受粉すると花粉管を発芽する。花粉管は柱頭内を伸長し胚珠に到達する。2つの精子(雄核)は花粉管内を移動して胚嚢に達し、1つが卵核と融合して受精卵に、1つが極核と融合して胚乳となって行く。本研究では花粉の機能が低下し、稔性が異常になった変異体を探索することで花粉の発達に関わる新たな因子を見出すこと、それらの機能解析を行うことを目的とした。

(2) 生殖器官、花粉発達には多くの因子が働いていることが予測され、機能解析、相互作用解析、共局在解析のため新たな複数遺伝子クローニングシステムを開発することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナを材料とし、稔性が低下した変異体(種子ができにくく、果実が大きにならない)を探索した。得られた変異体について透過型電子顕微鏡による花粉発達の詳細な解析を行った。次いで原因遺伝子を同定し、RT-PCR、プロモーター:レポーターなどの発現解析、GFP融合体を用いた局在解析などを進めた。さらに、原因遺伝子と複合体を形成する因子に着目し、それらの破壊株を単離して花粉発達の解析を行った。遺伝学

的解析のため四分子が分離しないqrt-1変異体を利用し、共焦点レーザー顕微鏡により非分離四分子の核の様相を解析した。また自家蛍光を利用した共焦点レーザー顕微鏡観察により胚嚢の解析も行った。

(2) 新しい複数遺伝子クローニングシステム構築のためGatewayクローニング技術を取り入れた。

4. 研究成果

(1-1) シロイヌナズナ変異体について稔性低下を指標にした選抜を行い、種子が殆どできず果実が大きにならないものを見出した。花器官の観察を行ったところ、葯の裂開がおこらず、花粉が放出されていないことがわかった。葯内の花粉を透過型電子顕微鏡で調べたところ、野生株花粉のような柱と天井のエキシンが形成されておらず、不定な塊が表層に蓄積していることがわかった(図1)。

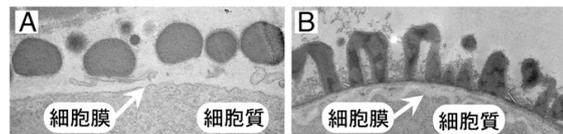


図1 花粉表面の透過型電子顕微鏡観察. A, 変異体花粉の表面。細胞膜の外側に不定形の塊が蓄積。B, 野生株花粉の表面。細胞膜の外側に柱と天井から成るエキシン構造が存在。

この塊はオーラミン染色の結果スポロポレニンであることがわかり、変異体ではスポロポレニンが正常に蓄積せずエキシンが形成されないため葯内で花粉が崩壊していくことが考えられた。葯の最内層にはタペート細胞が存在し、花粉にスポロポレニンを供給している。変異体のタペート細胞を透過型電子顕微鏡で観察したところ、野生株では見られない顆粒が観察されタペート細胞内における物質輸送が異常になっていることが考えられた。

(1-2) 上記変異体の原因遺伝子を探索したところ、小胞出芽に関わるSec31のホモログ(ATSEC31A)であることがわかった。細胞内では小胞輸送によって様々なオルガネラ、分泌経路への物質輸送が行われている。小胞体からの小胞出芽はその初発部位であり、コートプロテインII(COPII)小胞が担っている。小胞体膜上の活性化されたSar1をめぐってSec23/Sec24複合体がリクルートされ、さらにSec13/31複合体がSec23/24複合体を重合することによって小胞が形成され出芽する。上記変異体ではATSEC31が働かなくなることで小胞出芽の効率が低下し、花粉表層形成に必要な物質輸送が異常になっていることが考えられた。遺伝学的解析の結果ATSEC31A変異は孢子体型(親植物における変異の影響により表現型が出現)であることがわかり、またATSEC31Aの発現がタペート細胞で強いことから、タペート細胞がスポロポレニンを

花粉表層に供給する機能に ATSEC31A が必要であることが示された。

(1-3) シロイヌナズナには Sec31 のホモログが 2 種存在している。そのうち変異体の原因遺伝子であった ATSEC31A は植物体全身で発現し、もうひとつの ATSEC31B は殆ど発現が見られなかった。このことから小胞出芽を担っているのは ATSEC31A であることが考えられたが、破壊しても致死にならないため、その原因が調べられた。その結果 ATSEC31A 変異体では ATSEC31B 遺伝子の発現量が 500 倍上昇していることがわかり、ATSEC31B タンパク質が小胞出芽の役割を代替していることが考えられた。このようなホモログ間での発現制御機構に興味を持たれたためマイクロアレイ解析を行った。その結果 ATSEC31A 破壊株ではいくつかの転写因子の発現量が上昇していた。これらが ATSEC31B 発現に関連しているか興味を持たれた。

(1-4) ATSEC31A の変異により花粉発達に異常が見られたため、Sec31 と複合体を形成して COPII 小胞を出芽させる Sec23、Sec24 のシロイヌナズナホモログについても解析を行った。シロイヌナズナには Sec24 ホモログが 3 種存在し、ATSEC24A 変異では花粉管発芽や小胞体の形態が異常になることが報告されていたが、ATSEC24B、ATSEC24C については機能が不明であった。そこで破壊株を単離して解析を行ったところ、ATSEC24B 変異では花粉発芽率が低下していることがあきらかとなった。ATSEC24B と ATSEC24C の 2 重変異体を得ることができなかつたため雄性配偶体、雌性配偶体の解析を行った。雄性配偶体の解析においては四分子が分離しない *qrt1* 変異を利用し、1 つの花粉母細胞から生じる 4 つの花粉の表現型をそれぞれ調べた (図 2)。

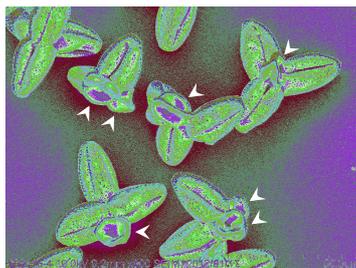


図 2 ATSEC24B、24C ダブルヘテロ株の花粉 (*qrt1* バックグラウンド)。同じ花粉母細胞に由来する 4 個の花粉がつながっている。つづれた花粉を矢尻で示した。

その結果、4 個つながった花粉のうち、1 個がつづれたもの、2 個がつづれたものが生じており、統計的解析の結果、ATSEC24B と 24C の 2 重変異花粉がつづれていることが示された。次いで核を染色して花粉発達ステージごとの観察を行った結果、ATSEC24B と 24C の 2 重変異花粉は 2 核期で発達が停止することがわかり、ATSEC24B と 24C が花粉発達の特異段階で機能していることが示された。雌性配

偶体についても解析を行い、ATSEC24B と 24C の 2 重変異で雌性配偶体の発達がさまざまな発達段階で停止することがわかった。以上のことから ATSEC24B と 24C が冗長的に雄性、雌性配偶体の発達に必須であることが示された。

(1-5) Sec23 についても機能解析を行った。シロイヌナズナには Sec23 ホモログが 7 種存在している。それらの単独変異では表現型が観察されなかつたため、2 重変異を作製して調べたところ、ATSEC23F と ATSEC23G の 2 重変異で花粉表面構造の異常が観察された。このことより ATSEC23F と 23G が冗長的に ATSEC31A と協調して花粉表層エキシン構造の形成に働いていることが示された。また ATSEC23F と 23G の 2 重変異体では花器官の異常も観察された (図 3)。



図 3 ATSEC23F、23G の 2 重変異体で出現する表現型。

花では花弁が欠損し、柱頭毛を持つ萼片の出現、異常な位置での雄蕊形成が観察された。また、茎生葉の周縁部に胚珠の出現が観察された。このことより ATSEC23F と 23G が冗長的に花器官の正常な発達に機能していることが示された。

今回の ATSEC31、ATSEC24、ATSEC23 の解析により植物の雄性配偶体、雌性配偶体、花器官の発達にこれら小胞出芽因子が重要な機能を果たしていることがあきらかとなった。これらは細胞内の物質輸送に関与する因子であるため、形態構築の信号伝達に関わる因子や形態構築の材料の輸送に関わっていることが考えられた。今後、これら因子が形成する COPII の積荷について解析を進めることで、生殖器官発達の分子メカニズムの理解が深まると期待できる。

(2) Gateway クローニングの技術を利用して、簡便な LR 反応の繰り返しで遺伝子を順次組み込むことができるリサイクリングクローニングシステムを開発した。モデル実験として本システムを利用し 5 レポーター遺伝子を組み込んだバイナリベクターを構築し、植物に導入して発現解析を行った。その結果、シロイヌナズナ、タバコ、トマトで全導入遺伝子の発現が観察され、本システムを用いることにより、容易に植物での複数遺伝子発現が可能であることが示された。本システムをベースにして、複数遺伝子レポーター融合リサイクリングクローニングシステム、相互作用解析 BiFC 用リサイクリングクローニングシ

システムの開発も行った。これらのシステムにより植物への多彩な遺伝子導入が可能となることが期待される。

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 3 件)

- ① Tanaka, Y., Nishimura, K., Kawamukai, M., Ohshima, A. and Nakagawa, T.: Redundant function of two Arabidopsis COPII components, AtSec24B and AtSec24C, is essential for male and female gametogenesis. *Planta* **238**: 561-575 (2013)
DOI: 10.1007/s00425-013-1913-1
- ② Tanaka, Y., Shibahara, K. and Nakagawa, T.: Development of Gateway binary vectors R4L1pGWB possessing the bialaphos resistance gene (*bar*) and the tunicamycin resistance gene as markers for promoter analysis in plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **77**: 1795-1797 (2013)
DOI: 10.1271/bbb.130405
- ③ Kimura T., Nakao A., Murata S., Kobayashi Y., Tanaka Y., Shibahara K., Kawazu T., and Nakagawa T.: Development of the Gateway Recycling Cloning System for Multiple Linking of Expressing Cassettes in a Defined Order, and Direction on Gateway Compatible Binary Vectors. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **77**: 430-434 (2013)
DOI: 10.1271/bbb.120877

[学会発表] (計 19 件)

- ① 中川強, 税所利基, 芝原健太, 木村哲哉: 複数遺伝子クローニングを用いた種々植物への多重遺伝子導入と発現解析. 日本農芸化学会 2015 年度大会. 2015 年 3 月 26~29 日 (岡山大学)
- ② 西村浩二, 松波絵理香, 石川翔太, 地阪光生, 長屋敦, 横田一成, 中川強, BiFC 法による植物クラスリン輸送経路のタンパク質選別機構の解析. 日本農芸化学会 2015 年度大会. 2015 年 3 月 26~29 日 (岡山大学)
- ③ Aboulela Mostafa and Nakagawa Tsuyoshi. Development of Dual Site Gateway Binary Vector System Driven by a Constitutive Promoter (Nopaline Synthase) for Plant Transformation and Protein-Protein Interaction Analysis. 日本農芸化学会 2015 年度大会. 2015 年 3 月 26~29 日 (岡山大学)
- ④ Nakagawa Tsuyoshi, Saisho Toshiki, Shibahara Kenta and Kimura Tetsuya: Expression Analysis of Multi-gene

Constructs in Various Plants. 第 56 回日本植物生理学会年会. 2015 年 3 月 16~18 日 (東京農業大学世田谷キャンパス)

- ⑤ 松波絵理香, 中川強, 地阪光生, 長屋敦, 横田一成, 西村浩二: シロイヌナズナ液胞輸送経路におけるクラスリン輸送系の解析. 第 56 回日本植物生理学会年会. 2015 年 3 月 16~18 日 (東京農業大学世田谷キャンパス)
- ⑥ 中川強, 芝原健太, 税所利基, 木村哲哉: 植物用複数遺伝子クローニングシステムの開発と種々植物における発現解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25~27 日 (パシフィコ横浜)
- ⑦ 西村浩二, 石川翔太, 松波絵理香, 山内淳司, 本間圭一, 中川強, 地阪光生, 長屋敦, 横田一成: BiFC 法によるシロイヌナズナクラスリン重鎖と軽鎖の相互作用に関わる点変異解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25~27 日 (パシフィコ横浜)
- ⑧ 芝原健太, 田中優史, 木村哲哉, 中川強: 複数遺伝子の発現が可能な植物形質転換用リサイクルベクターシステムの開発. 日本農芸化学会 2014 年度大会. 2014 年 3 月 27~30 日 (明治大学, 川崎)
- ⑨ 安川大喜, 松波絵理香, 地阪光生, 長屋敦, 横田一成, 中川強, 西村浩二: シロイヌナズナキチン受容体の細胞内動態の解析. 日本農芸化学会 2014 年度大会. 2014 年 3 月 27~30 日 (明治大学, 川崎)
- ⑩ 田中優史, 重信秀治, 中川強: シロイヌナズナの COPII 構成因子 Sec23 の遺伝子破壊に見られる花の形態異常に対するマイクロアレイ解析. 第 55 回日本植物生理学会年会. 2014 年 3 月 18~20 日 (富山大学)
- ⑪ 松波絵理香, 中川強, 地阪光生, 長屋敦, 横田一成, 西村浩二: シロイヌナズナクラスリン輸送における AP 複合体と積荷タンパク質との相互作用の解析. 第 55 回日本植物生理学会年会. 2014 年 3 月 18~20 日 (富山大学)
- ⑫ Aboulela Mostafa and Nakagawa Tsuyoshi: Development of R4 dual site Gateway binary vector system driven by any desirable promoter for plant transformation. 日本農芸化学科中四国支部 2013 年度合同大会. 2013 年 9 月 5~6 日 (広島県立大学)
- ⑬ 中川強, Aboulela Mostafa, 芝原健太, 田中優史, 木村哲哉: プロモーター交換が可能な 2 種類の植物用複数遺伝子クローニングシステム (2 遺伝子クローニング, 多重遺伝子クローニング) の開発と植物での発現解析. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 3~6 日 (神戸国際会議場)
- ⑭ 小川拓也, 領木智哉, 中川強, 木村哲哉: Gateway binary vector を利用した白色腐朽菌のリグニン分解酵素遺伝子の植物での発現解析. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12

- 月 3～6 日 (神戸国際会議場)
- ⑮中口翔太、中村歩、天野晃彰、高林賢吾、中川強、上中弘典：植物の SSD1 ホモログ遺伝子の分子進化と機能解析. 第 54 回日本植物生理学会年会. 2013 年 3 月 21～23 日 (岡山大学)
- ⑯林巧貴、明渡絵理朱、橋詰恵丞、高木佑子、中川強、谷口光隆、松倉千昭、江面浩、秋田求、泉井桂：C4 ミニサイクルの C3 植物(トマト) への導入による光合成能の増強を目指して. 第 54 回日本植物生理学会年会. 2013 年 3 月 21～23 日 (岡山大学)
- ⑰松波絵理香、石川翔太、山内淳司、中川強、地阪光生、長屋敦、横田一成、西村浩二：シロイヌナズナのクラスリン AP 複合体と積荷タンパク質との相互作用の解析. 第 54 回日本植物生理学会年会. 2013 年 3 月 21～23 日 (岡山大学)
- ⑱田中優史、川向誠、中川強：COPII 構成因子 Sec24 の遺伝子破壊がシロイヌナズナの配偶体発達に与える影響. 第 54 回日本植物生理学会年会. 2013 年 3 月 21～23 日 (岡山大学)
- ⑲芝原健太、井岡正昂、田中優史、木村哲哉、中川強：任意のプロモーターと cDNA を組み合わせた複数遺伝子コンストラクトが構築可能な植物形質転換用リサイクルベクターシステムの開発. 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012 年 12 月 11～14 日 (福岡高きさい会議場)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://shimane-u.org/nakagawa/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 強 (NAKAGAWA, Tsuyoshi)
島根大学・総合科学研究支援センター・教授
研究者番号：30202211

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：