

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440130

研究課題名(和文)植物における新規な配偶子品質管理機構の解析

研究課題名(英文)Quality control for plant gametogenesis

研究代表者

上口 智治 (UEGUCHI, CHIHARU)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：20232738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：一回結実性の植物においては成熟種子の形成が植物個体全体の生長停止や器官の老化を引き起こすことが知られており、global proliferative arrest (GPA)と呼ばれる。本研究ではGPAに関わる遺伝子の同定を目指し、生殖生長のごく初期に植物個体全体の生長停止が早まって起きるシロイヌナズナ変異体の原因遺伝子の同定と表現型の解析を試みた。その結果、環状ヌクレオチド感受性陽イオンチャネルをコードする遺伝子がGPAに関与することを見出した。この事実は細胞内イオンホメオスタシスが老化現象に深く関わっていることを示す。

研究成果の概要(英文)：In monocarpic plants, it is observed that developing reproductive structures control whole-plant senescence, so-called global proliferative arrest (GPA). To identify genes involved in this process, we isolated and analyzed a mutant showing premature cessation of inflorescence growth in Arabidopsis. The mutant, named premature aging 1 (pma1), plants exhibited earlier cessation of floral bud formation and stem growth. In addition, pma1 showed premature cessation of leaf growth and earlier senescence. Map-based cloning revealed that pma1 is a missense allele of the CNGC20 gene encoding a cyclic nucleotide-gated cation channel. These results suggest that the maintenance of intracellular ionic homeostasis is important for the process of whole-plant senescence.

研究分野：Molecular Biology

キーワード：plant senescence ionic homeostasis cation channel

1. 研究開始当初の背景

老化は植物の生活環の最後に起こる生命現象であり、世代交代の観点から重要な意味を持っている。生殖生長に移行して一定の数の花(すなわち一定の数の種子)を形成すると、個体の生長は停止する。また栄養生長器官である葉では細胞内容物の分解が始まり、それによって生み出された栄養分は成熟しつつある種子などの生殖組織へと転流・利用される。こうした一連のプロセスは発芽可能な健康な種子を最大限産生するための積極的なプロセスであると考えられる。

植物個体の老化において、果実の成熟・分裂組織の機能停止・葉の老化といった異なる器官や組織で起こる現象は密接に関連して引き起こされるため、古くから生理的な研究がなされてきた。マメ科植物を用いた研究から、花や果実といった生殖器官が老化を制御していることが示されている。例えば成熟途上の果実を除去することで個体生長の停止は解除され、葉の老化もストップする。シロイヌナズナにおいても果実の除去によって個体生長の停止は解除される。また雄性不稔変異体では個体の生長が長く継続し、花の数や個体の大きさが野生型よりも著しく増加することが観察されている(。このような観察結果から成熟しつつある種子が個体の生長停止を促すことが示唆され、global proliferative arrest (GPA)と呼ばれることが提唱されている。GPAは植物の異なる組織間での何らかの情報伝達の存在を示唆するが、分子生物学的な研究はまだ始まったばかりである。

申請者はこれまで *premature aging1 (pma1)* と名付けたシロイヌナズナ変異体を解析してきた。*pma1* は劣性一遺伝子座の変異で、ロゼット葉の早期老化開始や茎頂分裂組織の早期機能停止といった表現型を示す。この表現型は GPA が早まって起こる表現型であると見なせる。本研究では、*pma1* 変異体の解析と共に、*pma1* 様の表現型を示す *fireworks (fiw)* 変異体(以前 Nakamura らによって報告された)の原因遺伝子を同定することによって、これまで全く未知であった GPA の分子機構の解明に向けた研究を行う。

2. 研究の目的

植物個体の老化は次世代種子の効率的生産を支える大変重要な生命現象である。生殖生長に移行して一定の数の花を形成すると、分裂組織の機能が停止して個体の生長は止まる。この現象は種子の成熟に伴って起きるもので、global proliferative arrest (GPA) と呼ばれており、異なる組織間での何らかの情報伝達の存在を示唆する。本申請では、GPA が早まって起こる2種類のシロイヌナズナ変異体の解析を行うことによって、未だ全く理解されていない GPA の分子機構解明の糸口を得ようとする研究を

提案する。

3. 研究の方法

pma1 変異体の解析においては、本葉の生長過程と茎頂分裂組織の機能の老化過程について深く検討する。本葉においては生長パラメータの測定や老化関連遺伝子の発現動向を野生型と比較して、早期生長抑制ならびに早期老化の現象を遺伝子レベルで追求する。茎頂分裂組織においては花茎伸長や花芽形成速度についての測定を行うと共に分裂組織の活性維持に関わる遺伝子の発現状態を調査する。染色体マッピングと塩基配列決定によって *pma1* 変異の原因遺伝子として環状ヌクレオチド感受性陽イオンチャネルをコードする *CNGC20* を候補として得ているが、相補性試験による検証が必要である。

fiw 変異については詳細なマッピングと次世代シーケンサー解析を組み合わせて変異原因遺伝子の同定に取り組む。

4. 研究成果

pma1 変異体の解析

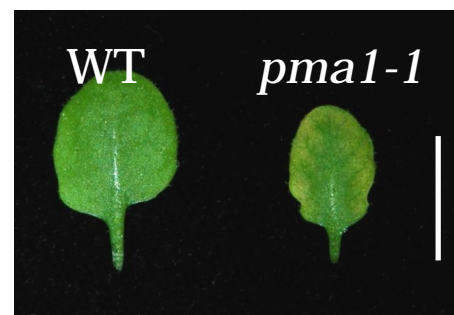
(1) *pma1* 変異体は極端に矮化した外観を示す(図1)。

図1 発芽後5週の野生型(左)と *pma1* (右) 植物体地上部



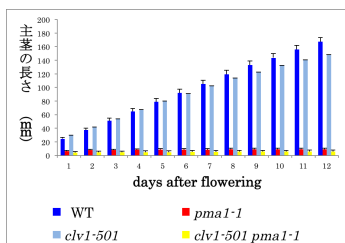
第6葉の生長過程の経時的観察および遺伝子発現解析から、野生型に比べて *pma1* 変異では早期に生長が鈍化・停止して(図2)、光合成関連遺伝子等の生長・成熟期に高発現する遺伝子の転写が早期に低下すること、相反して老化期に発現誘導される一群の遺伝子が早期から誘導を受けていることを明らかにした。

図2 発芽後28日目の第6葉



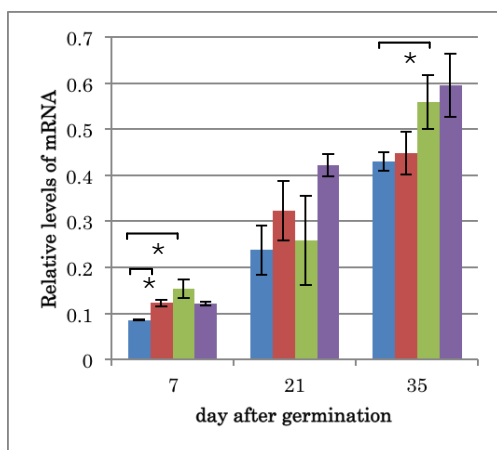
(2) 花茎の伸長ならびに主茎に形成される花芽数を経時的に計測することにより、生殖生長期に移行した後に直ちに茎頂分裂組織の機能が停止していることを見出した。またこの表現型は分裂組織内の幹細胞数を増加させると期待される *clavata1(clv1)* 変異を導入しても抑圧されないことを示した(図3)。この事実は *pma1* 表現型は幹細胞数の減少によるものではないことを示唆する。

図3 開花後の主茎の伸長



(3) 茎頂分裂組織維持に関わるいくつかの遺伝子 (*STM*, *CLV3*, *WUS*) の発現をリアルタイム RT-PCR によって調べた。その結果、これら遺伝子の発現量は *pma1* 変異によって低下しているとは考えがたく(図4)。 *pma1* においても幹細胞自体は健全に維持されていると考えられる。

図4 *STM* 遺伝子の発現

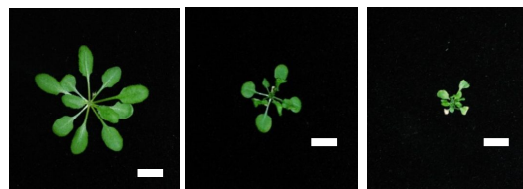


(4) *pma1* 変異体に野生型 *CNGC20* ゲノムを導入することで、表現型は野生型に復帰した。よって *pma1* 表現型は *CNGC20* に起きた一アミノ酸置換によって引き起こされたものと考えられる。

(5) *CNGC20* の T-DNA ノックアウト変異である *cngc20-1* はホモ接合型であっても野生型と変わらない表現型を示す。一方、*pma1/cngc20-1* ヘテロ接合は野生型と *pma1* の中間的な表現型を示す。この結果は *pma1* アリルが dose-dependent な dominant negative アリルであることを示唆する。野生型背景において *pma1* アリルを強制発現したところ、発現量の高い形質転換体において *pma1* 様の

表現型を示すことがわかった(図5)。この結果は上記の推測が正しいことを示唆する。

図5 野生型(左)、*pma1*(中)、野生型背景で *pma1* アリルを強制発現させた個体(右)



(6) 以上の結果から、植物の老化過程の開始において細胞内イオンホメオスタシスが重要な役割を果たすことが示唆される。

fiw 変異体の解析

(1) 詳細なマッピングから、*fiw* が第4染色体南端付近の約260kbの範囲内に存在することを明らかにした。

(2) *fiw* および親株である *Ler* の全ゲノムを次世代シーケンサーによって解析し、マッピングによって絞り込んだ260kbのゲノム配列を比較検討し、複数の候補遺伝子を見出した。現在塩基配列を再度確認することで候補遺伝子の同定に取り組んでいる。

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)

〔学会発表〕(計 1件)

1. 廣澤ひかる、谷弘太、上口智治「環状ヌクレオチド感受性カチオンチャンネルをコードする *CNGC20* 遺伝子のミスセンスアリルは本葉生長や茎頂分裂組織の幹細胞機能に影響を与える」第57回日本植物生理学会年会2016年3月(盛岡)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bbc.agr.nagoya-u.ac.jp/~gaikan/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上口 智治 (UEGUCHI CHIHARU)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：20232738

(2) 研究分担者なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者なし
()

研究者番号：

(4)研究協力者なし
()