

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440142

研究課題名(和文) 種子の糊粉層と表皮の発達・維持に関わる新たな遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a gene that is involved in seed aleurone and epidermis development

研究代表者

川上 直人 (Kawakami, Naoto)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：10211179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 種子胚乳の最外層である糊粉層は、穀類では貯蔵栄養の可動化に、双子葉植物では主に発芽のバリアとして働く。シロイヌナズナの糊粉層が消失した突然変異体の解析から、TRG2A遺伝子が糊粉層の分化・維持に働くことを発見した。TRG2Aタンパク質は細胞質に局在し、小胞を介した物質輸送に働くアダプチンと結合することを明らかにした。また、TRG2Aはゴルジ体からの小胞輸送に関わる可能性を示唆した。さらに、小胞輸送に働くCHMP1遺伝子も糊粉層形成に関わることを明らかにした。したがって、糊粉層の分化・維持には、小胞輸送が重要な役割を持つと考えられた。

研究成果の概要(英文)： Outermost cell layer of endosperm, aleurone, works for mobilization of storage materials in cereal grains. In contrast, aleurone works mainly as a barrier of germination in dicot seeds. In this study, we found TRG2A gene as an important factor for aleurone layer development and/or maintenance by using Arabidopsis mutant that lost all the endosperm cells during seed development. TRG2A protein was found to be localized in cytoplasm and interact with adaptin subunits. We found that CHMP1 is also involved in aleurone development in Arabidopsis. Our findings indicate that vesicle transport system has critical role on aleurone development.

研究分野：植物生理学

キーワード：種子 胚乳 糊粉層 発芽 小胞輸送 細胞分化 植物生理学 形態形成

## 1. 研究開始当初の背景

種子胚乳の最外層を構成する糊粉層は、穀類では内側の胚乳に蓄えた貯蔵物質を可動化して芽生えの初期成長を支える役割を持つが、双子葉植物では主に発芽の物理的バリア(抑止力)として機能すると考えられている(文献1、2)。穀類の突然変異の解析から、糊粉層の発達・維持は細胞間相互作用を介した制御を受けることが示唆されている(文献3、4)。糊粉層は胚乳の最外層であるが、糊粉層関連遺伝子の多くは胚の前表皮や芽生えの表皮の発達にも働く。この中には、細胞間相互作用に関わると考えられる膜局在性プロテアーゼのDEK1と受容体キナーゼのCR4、小胞輸送に関わるSAL1などがある(文献5、6)。トウモロコシのDEK1とCR4は細胞膜で働き、その局在と機能には、SAL1が関わる小胞輸送によるリサイクル・分解が重要な役割を持つことが示唆されている(文献5)。表皮の形成において、これらのシロイヌナズナのオソログ(*AtDEK1*, *ACR4*, *CHMP1*)はトウモロコシと類似の機能を持つが、糊粉層の発達・維持における機能や、糊粉層細胞の分化・発達メカニズムの全貌は未解明である。

申請者が単離したシロイヌナズナの高温耐性発芽突然変異、*trg2*では、野生型では完熟種子に存在する糊粉層細胞が種子形成過程でほぼ完全に消失するなど、既知の胚乳・糊粉層関連突然変異体にはない、ユニークな形質を示した。また、*trg2*突然変異体の芽生えは、茎の帯化、頂芽優勢の低下、葉の形態異常、速い水分喪失速度など、表皮の異常が原因と思われる多様な変異形質を示した。分子マーカーを用いたマッピングから、変異遺伝子の候補は39に絞られた。この中には、既知の胚乳・糊粉層形成に関わる遺伝子は存在せず、新たな糊粉層関連遺伝子の単離が期待された。

## 2. 研究の目的

PCR解析から、*trg2*変異領域に連続した10遺伝子の欠失が見出された。欠失した遺伝子のうち、2遺伝子が胚乳で強く発現しており、このうち1つ(*TRG2A*)を*trg2*突然変異体に導入したところ、糊粉層と発芽形質が回復し、芽生えの形態もほぼ回復した。もう1つの遺伝子(*TRG2B*)のT-DNA挿入突然変異系統では、種皮の表皮細胞が*trg2*と同様な乱れを示した。そこで、本研究では以下の3点を目的として、*trg2*突然変異体を中心に解析を行った。

(1) *TRG2* 遺伝子の同定と、糊粉層・表皮形成における役割：本研究では、まず *trg2* 突然変異の形質が *TRG2A* 遺伝子のみで説明できるか否かを明らかにし、糊粉層の形成に関わる新たな遺伝子を同定する。また、表皮の異常に由来すると思われる様々な形態形質と原因遺伝子の対応を明らかにする。

(2) *TRG2* タンパク質の分子機能、小胞輸送との関わり：*TRG2A* は機能未知の低分子GTPase様タンパク質、*TRG2B* は小胞輸送に関わるGRIPタンパク質をコードする遺伝子である(文献8)。そこで、*TRG2* 遺伝子の発現の時期・組織特異性、*TRG2* タンパク質の細胞内局在性、タンパク質間相互作用(結合能)を調べ、小胞輸送との関わりを明らかにする。

(3) 既知の糊粉層・表皮関連遺伝子との関係：トウモロコシから見出された糊粉層形成関連遺伝子のうち、シロイヌナズナにおける糊粉層形成との役割が明らかにされていない *CR4* ホモログの *ACR4* と *CCR*、および *SAL1* ホモログの *CHMP1* の機能喪失突然変異体を単離し、糊粉層の異常を確認する。また、*TRG2* 遺伝子と既知の糊粉層・表皮関連遺伝子、細胞間相互作用との関わりを明らかにするため、*TRG2* タンパク質と *AtDEK1*、*ACR4*、*CHMP1* タンパク質の共局在を調べる。また、*AtDEK1*、*ACR4*、*CHMP1* タンパク質の細胞内局在性に対する *trg2* 突然変異の影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 変異の原因遺伝子の同定

*trg2* 変異の候補遺伝子が糊粉層と芽生えの表皮形質を支配することを確認するため、野生型遺伝子を導入した *trg2* 突然変異体における形質の回復を調べた(相補性検定)。また、各遺伝子の機能喪失突然変異体における *trg2* 突然変異形質の発現を確認した。糊粉層の存在はテトラゾリウム染色と実体顕微鏡で確認し、芽生えの形質(茎の帯化、頂芽優勢、葉のサイズと形、花器官の形態)は肉眼および実体顕微鏡で観察した。

### (2) 形態観察

種子の形態形質は、発達過程および成熟種子の胚乳(糊粉層を含む)、胚、種皮の組織構造を微分干渉顕微鏡(組織は透明化)、共焦点レーザー顕微鏡(ヨウ化プロピジウム染色)および光学顕微鏡(組織切片)で観察した。また、種子と芽生えの表皮の表面構造を走査型電子顕微鏡で解析した。

### (3) *TRG2A* タンパク質の分子機能解析；小胞輸送との関連解析

*TRG2A* タンパク質の細胞内局在性を明らかにするため、アグロバクテリウム法により *TRG2A* と GFP の融合タンパク質を発現する形質転換体を作成した。根における蛍光の観察には、蛍光顕微鏡およびレーザー共焦点顕微鏡を利用した。

*TRG2A* タンパク質とアダプチンの相互作用については、酵母のツーハイブリッド系を用いて解析した。また、*trg2* 突然変異体および *trg2a* 突然変異体を用い、エンドソームに関わる小胞輸送の一つとして、エンドサイトーシスの異常を FM4-64 染色法を用いて観察し

た。

#### (4) トウモロコシ糊粉層関連遺伝子のシロイヌナズナにおける機能解析

CR4 ホモログの *ACR4* と *CCR*、および *SAL1* ホモログの *CHMP1* の T-DNA 挿入系統をストックセンターから入手し、各遺伝子の機能喪失突然変異体を単離した。シロイヌナズナにおいて、*CHMP1* は 2 遺伝子存在するため、交配により二重変異体を作成した。

### 4. 研究成果

#### (1) 種子発芽における糊粉層の役割

申請者が単離した *trg2* 突然変異は胚性致死とならず、完熟種子に残るべき糊粉層（周縁胚乳）が消失する極めてユニークな表現型を示した。双子葉植物において、胚乳は種子発達過程で胚に栄養を供給してその発達を支え、成熟種子では発芽を物理的に抑制する働きを持つことが示唆されている（文献 2）。*trg2* 突然変異体の種子は休眠性を大きく低下させ、後熟種子では高温耐性発芽形質を示し、発芽におけるアブジン酸感受性も低下させていたが、成熟した胚は野生型と同様なアブジン酸感受性を示した。このことは、*trg2* 突然変異体種子の発芽形質は胚の性質に依らず、胚乳（糊粉層）が消失したことに由来することを示唆している。このため、本研究の成果は種子発芽における糊粉層の生理的役割を遺伝学的に証明するものである。糊粉層の有無や細胞層の数は種によって異なるため、本研究の成果は胚乳組織分化の進化メカニズムの理解や、穀類種子の収穫前穂発芽防止・醸造におけるモルト品質の向上などの育種分野にも寄与すると期待される。

#### (2) *trg2* 突然変異の原因遺伝子の同定

種子糊粉層の消失と芽生えの形態異常をもたらす *trg2* 突然変異の原因遺伝子を同定するため、まず欠失した 10 遺伝子のうち *TRG2I* を除く 9 遺伝子の T-DNA 挿入系統の形質を調べたが、糊粉層および芽生えに明確な異常形質は認められなかった。ただし、当初解析していた *TRG2A* の変異系統はプロモーター領域に T-DNA 挿入を持ち、発現低下ではなく、過剰発現をもたらしていることが確認された。

次に、欠失した 10 遺伝子のうち、胚乳で発現する 2 遺伝子（*TRG2A* と *TRG2B*）に注目し、正常遺伝子の導入による変異の相補を確認した。正常な *TRG2B* 遺伝子で *trg2* 突然変異体を形質転換したが、表現型は回復しなかった。一方、*TRG2A* 遺伝子で *trg2* を形質転換するとすべての変異形質がほぼ正常に回復した。さらに、*TRG2A* 遺伝子にトランスポゾンが挿入された機能喪失突然変異体（*trg2a*）を単離したところ、成熟種子には糊粉層が認められず、また芽生えの段階で致死となることがわかった。*TRG2A* 遺伝子の役割を明確にするため、*trg2* と *TRG2A/trg2a*（ヘテロ個体）

を交配し、遺伝型が *trg2/trg2a* となった個体を選抜したところ、*trg2* と同様な形質を示した。これらの結果から、糊粉層細胞と芽生えの形態は *TRG2A* 遺伝子のみ支配されると判断した。

*trg2* 突然変異体において、初期の胚乳形成に明確な異常は認められないが、糊粉層細胞に特徴的な細胞壁の肥厚が認められずに消失することから、*TRG2A* は糊粉層細胞の分化に働くことを示唆した。また、走査型電子顕微鏡観察とトルイジンブルー染色により、*trg2* の葉の表面には気孔以外の間隙があること、クチクラ層形成に異常を持つことが示された。芽生えの段階で致死となる *trg2a* 突然変異体は寒天培地上で数週間生育し、その後枯死した。*trg2a* のシュートは明確な葉や茎の形態が分化せず、トライコームを持たず、トルイジンブルーで強く染色されることから、表皮が分化していない可能性が考えられた。根の伸長も抑制されており、短い根毛を付けるなど、野生型とは異なる異常形質を示した。*TRG2A* は穀類の糊粉層関連遺伝子と同様、表皮の形成にも重要な役割を持つと考えられた。

#### (3) *trg2* 突然変異遺伝子座の分子構造と表現型の関連

*trg2* 遺伝子座では *TRG2A* 遺伝子の最終エクソンの C 末端側の配列が失われ、*TRG2J* 遺伝子の第 2 イントロン以降が融合していた。また cDNA の塩基配列から、*TRG2A* の N 末端側と *TRG2J* の C 末端が融合した異常タンパク質が発現している可能性が示された。したがって、C 末端領域に異常を持つ *trg2* タンパク質が比較的穏やかな変異形質、すなわち糊粉層の喪失および芽生えの形態異常の原因であり、*TRG2A* 遺伝子が完全に機能を失うと糊粉層が失われるとともに、芽生えにおける致死形質をもたらすと考えられた。

#### (4) *TRG2A* の生理機能と分子機能の解析

*TRG2A* タンパク質の細胞内局在性を明らかにするため、*TRG2A* と GFP の融合タンパク質を発現する形質転換植物を作成して蛍光を確認したところ、*TRG2* タンパク質は細胞質で働くことが示された。*TRG2A* タンパク質のヒトのホモログは皮膚病の原因遺伝子であり、細胞質に局在してクラスリン被覆小胞を構成するアダプチンに結合することが示された（文献 9）。そこで、*TRG2A* タンパク質とシロイヌナズナのアダプチンが相互作用する可能性を検討するため、*TRG2A* とクラスリン被覆小胞タンパク質を導入した酵母ツーハイブリッド系（Y2H）を構築した。その結果、*TRG2A* タンパク質は、ヒトや酵母のアダプチン結合タンパク質と同様、およびアダプチンと結合することが明らかになった。

アダプチンは AP2 複合体を構成するサブユニットであり、細胞膜におけるクラスリン小胞形成を介してエンドサイトーシスに寄

与する。また、アダプチンは AP1 複合体を構成し、トランスゴルジネットワーク (TGN) とエンドソーム間の小胞輸送、ないしは TGN やエンドソームから細胞膜への小胞輸送に寄与することが示唆されている (文献 10)。そこで、*trg2* および *trg2a* 機能喪失突然変異体の根をエンドサイトーシス追跡マーカーである FM4-64 で染色し、経時的に観察したが、明確なエンドサイトーシスの異常は認められなかった。酵母においても、アダプチン結合タンパク質はエンドサイトーシスには寄与せず、TGN とエンドソーム間の小胞輸送に関わることが示唆されている (文献 11)。したがって、TRG2A は主に TGN やエンドソームからの膜輸送に関わる可能性が示唆された。本研究の結果は、小胞輸送が胚乳の最外層である糊粉層および表皮の分化・維持に必要な役割を持つことを強く示唆している。

#### (5) トウモロコシ糊粉層関連遺伝子のシロイヌナズナにおける機能解析

穀類から見出された糊粉層形成関連遺伝子のシロイヌナズナにおける機能を明らかにするため、*AtDEK1*, *ACR4* の機能喪失突然変異体を単離した。いずれの変異体でも糊粉層に明確な異常は認められなかったが、*ACR4* およびそのパラログである *CCR2* の機能喪失突然変異体種子は高温耐性発芽形質を示した。トウモロコシ *SAL1* のシロイヌナズナホモログ、*CHMP1A* と *CHMP1B* の二重変異体はトウモロコシと同様に糊粉層形成が過剰になることを明らかにした。*SAL1/CHMP1* はエンドソームにおける多胞体形成を介して膜タンパク質の分解に働くことが示唆されている。したがって、糊粉層の形成・維持には小胞を介した膜タンパク質や細胞壁成分の物質輸送が重要な役割を持ち、この小胞輸送に TRG2A や *SAL1/CHMP1* が関わると考えられた。

#### <引用文献>

- Penfield, S., Rylott, E. L., Gilday, A. D., Graham, S., Larson, T. R., & Graham, I. A. (2004). Reserve mobilization in the Arabidopsis endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1. *The Plant Cell*, 16, 2705–2718.
- Müller, K., Tintelnot, S., & Leubner-Metzger, G. (2006). Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and Arabidopsis thaliana. *Plant & Cell Physiology*, 47, 864–877.
- Olsen, O.-A. (2004). Nuclear endosperm development in cereals and Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, 16, S214–27.
- Becraft, P. W., & Yi, G. (2011). Regulation of aleurone development in cereal grains. *Journal of Experimental Botany*, 62,

1669–1675.

Tian, Q., Olsen, L., Sun, B., Lid, S. E., Brown, R. C., Lemmon, B. E., et al. (2007). Subcellular localization and functional domain studies of DEFECTIVE KERNEL1 in maize and Arabidopsis suggest a model for aleurone cell fate specification involving CRINKLY4 and SUPERNUMERARY ALEURONE LAYER1. *The Plant Cell*, 19, 3127–3145.

Spitzer, C., Reyes, F. C., Buono, R., Sliwinski, M. K., Haas, T. J., & Otegui, M. S. (2009). The ESCRT-Related CHMP1A and B Proteins Mediate Multivesicular Body Sorting of Auxin Carriers in Arabidopsis and Are Required for Plant Development. *The Plant Cell*, 21, 749–766.

Tamura, N., Yoshida, T., Tanaka, A., Sasaki, R., Bando, A., Toh, S., et al. (2006). Isolation and characterization of high temperature-resistant germination mutants of Arabidopsis thaliana. *Plant & Cell Physiology*, 47, 1081–1094.

Latijnhouwers, M., Hawes, C., Carvalho, C., Oparka, K., Gillingham, A. K., & Boevink, P. (2005). An Arabidopsis GRIP domain protein locates to the trans-Golgi and binds the small GTPase ARL1. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*, 44, 459–470.

Pohler, E., Mamai, O., Hirst, J., Zamiri, M., Horn, H., Nomura, T., et al. (2012). Haploinsufficiency for AAGAB causes clinically heterogeneous forms of punctate palmoplantar keratoderma. *Nature Genetics*, 44, 1272–1276.

Canagarajah, B. J., Ren, X., Bonifacio, J. S., & Hurley, J. H. (2013). The clathrin adaptor complexes as a paradigm for membrane-associated allostery. *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, 22, 517–529.

Gorynia, S., Lorenz, T. C., Costaguta, G., Daboussi, L., Cascio, D., & Payne, G. S. (2012). Yeast Irc6p is a novel type of conserved clathrin coat accessory factor related to small G proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 23, 4416–4429.

#### 5 . 主な発表論文等

[学会発表] (計 9 件)

Yuki Uchida, Kazutaka Akahori, Reo Sugiyama, Yukinori Yoshino, Michio Sato, Kiminori Toyooka, and Naoto Kawakami: Functional analysis of TRG2A gene which is involved in the development of endosperm aleurone in Arabidopsis seed. 5th Workshop on the Molecular Aspects of Seed Dormancy and Germination. May 31-June 3, 2016, Vancouver, Canada  
赤堀一貴, 杉山礼央, 内田悠稀, 吉野幸則, 佐藤道夫, 豊岡公徳, 川上真人: 種子  
の糊粉層の形成・維持に関わるシロイヌ  
ナズナの TRG2A タンパク質の解析. 第 57 回  
日本植物生理学会年会, 2016 年 3 月 18 日,

岩手大学上田キャンパス(岩手県・岩手市)  
杉山礼央、吉野幸則、赤堀一貴、内田悠  
稀、川上直人: アダプチン結合領域を持つ  
TRG2 タンパク質の機能解析 .日本植物学  
会第 79 回大会、2015 年 9 月 7 日、朱鷺メ  
ッセ(新潟県・新潟市)

吉野幸則、赤堀一貴、杉山礼央、鴨志田  
葵、内田悠輝、田中新太、五味淵苑子、佐  
藤道夫、川上直人: 胚乳最外層の消失と植  
物体の形態異常をもたらすシロイヌナズ  
ナ *trg2* 突然変異の解析 .第 56 回日本植物  
生理学会年会、2015 年 3 月 17 日、東京農  
業大学世田谷キャンパス(東京都・世田谷  
区)

Yukinori Yoshino, Arata Tanaka, Sonoko  
Gomibuchi, Kazutaka Akahori, Reo  
Sugiyama, Aoi Kamoshita and Naoto  
Kawakami: Analysis of *Arabidopsis*  
*thermoinsensitive germination 2* that  
has defect in aleurone layer and epidermis.  
XII France-Japan Workshop on Plant Science  
2014 -Plant Responses to Environment-,  
October 27-29, 2014, Yayoi Auditorium, The  
University of Tokyo (第 12 回日仏植物科学  
ワークショップ「植物の環境応答」2014  
年 10 月 27 日~29 日、東大・弥生講堂、  
東京都・文京区)

赤堀一貴、吉野幸則、五味淵苑子、杉山  
礼央、鴨志田葵、川上直人: 種子の糊粉層  
形成に異常を持つシロイヌナズナの突然  
変異体 *trg2* の解析 .日本植物学会第 78 回  
大会、2014 年 9 月 13 日、明治大学生田キ  
ャンパス(神奈川県・川崎市)

吉野 幸則, 五味淵 苑子, 赤堀 一貴, 杉  
山 礼央, 鴨志田 葵, 川上 直人: 種子糊  
粉層の消失をもたらすシロイヌナズナ  
*trg2* 突然変異遺伝子の解析 .第 55 回日本  
植物生理学会年会、2014 年 3 月 20 日、富  
山大学五福キャンパス(富山県・富山市)  
吉野幸則、五味淵苑子、赤堀一貴、笹本  
真語、田中新太、山下結、川上直人: 種子  
の糊粉層形成に異常を持つシロイヌナズ  
ナの突然変異体 *trg2* の解析 .第34回種子  
生理生化学研究会年会、2013年12月7日、  
箱根高原ホテル(神奈川県箱根市)

Sonoko Gomibuchi, Kazutaka Akahori, Arata  
Tanaka and Naoto Kawakami: Identification  
of *TRG2* as a novel gene that is involved in  
development and/or maintenance of aleurone  
layer cells of *Arabidopsis* seeds. 4th  
Workshop on the Molecular Aspects of Seed  
Dormancy and Germination, July 9-12, 2013,  
Paris VI University, Paris, France

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

川上 直人(Kawakami Naoto)  
明治大学・農学部・教授  
研究者番号: 10211179

### (3)連携研究者

豊岡 公德(Toyooka Kiminori)  
理化学研究所・環境資源科学研究センタ  
ー・上級研究員  
研究者番号: 10360596