

機関番号：13901

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18075006

研究課題名（和文） 生殖過程におけるジベレリン生合成と信号伝達に関する分子遺伝学的解析

研究課題名（英文） Molecular analysis on gibberellin biosynthesis and signaling during the flower development.

研究代表者：

松岡 信 (MATSUOKA MAKOTO)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：00270992

研究成果の概要（和文）：ジベレリン（GA）シグナル伝達の転写因子 GAMYB は花、特に葯の発達に必須であり、GAMYB は花粉発達に必要な脂肪酸やフェニルプロパノイド代謝関連遺伝子の発現を制御する。さらに、GAMYB は花粉表面のエキシン形成に関与する CYP703A3 のプロモーター領域に結合し、本遺伝子の発現を正に制御していることが明らかになった。この GA 信号下流での GAMYB- CYP703A の発現制御はシダ植物のイヌカタヒバの胞子形成においても成立しており、GAMYB を介するエキシン形成の GA 信号伝達が、植物進化のかなり初期の段階から成立していたことが予想された。

研究成果の概要（英文）：GAMYB has been isolated as a positive transfactor working in the GA signaling pathway in cereal grains. Defects in anther development of rice gamyb mutants show that GAMYB is also important for that process. Molecular analyses of GAMYB function in anther revealed that it transactivates some genes involved in exine biosynthesis, including CYP703A. Such regulation mechanism regulated by GAMYB is conserved in lower plants, *S. moellendorffii*, a kind of fern.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	16,800,000	0	16,800,000
2007年度	16,800,000	0	16,800,000
2008年度	16,800,000	0	16,800,000
2009年度	16,800,000	0	16,800,000
2010年度	16,800,000	0	16,800,000
総計	84,000,000	0	84,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：遺伝子、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

これまでジベレリン（GA）が生殖過程において重要な役割を果たすことは予想されていたが、実際に生殖にどのように関与しているかの分子レベルでの解析はほとんどなされていなかった。我々はイネの GA 関連変異体を数多く選抜し、その変異体を解析する過程で、GA がイネの雄性生殖器官の発達と受粉能力に必須であることを見いだした。

我々のこれまでの実験から、雄性不稔現象において GA が関与するポイントは2点存在すると予想されていた。一つは、タペータム細胞の成熟・崩壊過程におけるプログラム細胞死、もう一つは受精過程、である。さらに、雄性器官における GA 信号伝達は、栄養成長期におけるそれとは大きく異なることを示唆する結果が変異体の解析から得られた。すなわち、GA 受容体機能欠損変異体の花粉は

受精可能であるにも関わらず、合成変異体の花粉は受精能力を持たない。この信号伝達の実態については、本研究開始時には全く不明であったが、この予想が事実だとすると、これまで想定されていなかった新規の研究が展開できることが期待された。

我々は、これまで栄養成長期における GA 信号伝達の研究を行い、新規な信号伝達に関わる必須な因子を複数同定・解析してきた。今回の研究は、この実績やこれまで蓄積していた GA 関連変異体や遺伝子を利用して、新しい信号系が期待される器官（有性生殖器官）を素材に、GA 信号伝達や合成に関するさらなる発展を図るものである。

## 2. 研究の目的

植物生長ホルモンである GA が生殖にも重要な役割を果たしていることは古くから指摘されており、実際に、種なしブドウの作出などに用いられていることは広く知られている。にもかかわらず、GA が生殖にどのように関与しているかの分子レベルでの解析はほとんどなされていない。我々はイネの GA 関連変異体を数多く選抜し、その変異に関与する遺伝子の機能を解析することにより、イネにおける GA の生合成や信号伝達の研究を行った。この過程で、我々は GA がイネの雄性生殖器官の発達と受粉能力に必須であることを見いだした。本研究はこの現象に着目して、「GA が雄性生殖器官の発達と受粉能力にどのように関与するか」を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) *gamyb* 変異体雄性生殖器官の発達過程における形態について電子顕微鏡などを用いて微細な形態観察を行った。ターネルアッセイを用いて、プログラム細胞死による葯タペータム細胞の崩壊に関して野生型と *gamyb* 変異体との違いを検討した。GAMYB 遺伝子により発現制御される遺伝子について、その転写調節様式を検討する目的で、その変異体において GAMYB タンパク質を誘導的に発現させ標的遺伝子の発現誘導の有無を検討した。

GAMYB 遺伝子により発現制御される遺伝子について、その機能破壊株を作出しその形質について解析した。さらに、標的遺伝子プロモーターに存在する GAMYB 標的配列の破壊により標的遺伝子の発現誘導の変化を検討した。(2) GA 合成酵素遺伝子変異体および GA 信号伝達関連変異体について、レシプロカルに交配した F1 および F2 植物個体に関して遺伝解析を行った。さらに、GA 合成酵素遺伝子変異体の花を用いて、各種条件における花粉管伸長の有無について解析した。

(3) 雄性生殖細胞発達過程において、GID1/DELLA による GA 受容を経て、どのよう

な機構により実際の転写制御を司る GAMYB 転写因子に信号が伝達されるかについて、生化学的・分子生物学的・分子遺伝学的手法を用いて解析した。

(4) イネ雄性生殖細胞発達過程における GID1/DELLA による GA 受容機構が、現在確認されている GA 受容機構を有する最古の生物と考えられるシダ植物の一つであるシラジェニラにおいても保存されているかについて、関連する類似関連遺伝子の単離やその機能解明を通して解析した。

## 4. 研究成果

(1) これまでのイネ GA 欠損変異体や GA 非感受性変異体の遺伝解析の結果から、GA 非感受性変異体の遺伝はメンデルの法則に適合する一方、GA 欠損変異体の遺伝浸透性は極めて低く、メンデルの法則に適合しないことを見出した。この原因を明らかにするため、本研究においては、半稔性を示す新たな GA 欠損 *rpe1* (*reduced pollen elongation1*) と非感受性変異体 *Slr1-d3* の 2 系統を単離し、花粉形成と花粉管伸長について調べた。信号伝達に異常を来した *Slr1-d3* 変異体の後代分離は通常の 3:1 だが、*rpe1* 合成変異体は分離比が異常となった。さらに詳細な観察を行った結果、*rpe1* の花器官や花粉は正常に発達するが、花粉発芽や伸長が阻害され稔性が低下する。これは GA を添加すると緩和されるので、GA は花粉発芽や伸長に必須であることが確認された。一方、非感受性変異体 *Slr1-d3* は成熟花粉の形成の異常が観察された。

さらに各発達段階の野生型の葯を用いて GA 生合成遺伝子とシグナル伝達に関連する遺伝子について発現解析を行った。その結果、生合成遺伝子は花粉母細胞の減数分裂期以降に強く発現が見られたが、減数分裂期より早い時期では、その発現は殆ど検出できなかった。逆にシグナル伝達因子遺伝子は、減数分裂前の発達ステージで強く発現する一方、減数分裂期以降は発現が低下した。これらの結果から、GA 欠損変異体の配偶体型遺伝様式は、小孢子形成後、小孢子が持つ遺伝子に依存した GA 合成が花粉の発芽や伸長に必要である一方、GA 受容に関連する遺伝子は減数分裂以前に花粉母細胞に発現し、そのタンパク質産物が減数分裂以降の花粉にも持ち込まれることにより使われることが解った。

これらの結果から、花粉発達過程における合成と信号伝達遺伝子の発現様式の違いが生殖現象に異なった影響を与えることが確認された。

(2) これまでの研究より、GA シグナル伝達の転写因子 GAMYB は、イネ科の胚乳において加水分解酵素の発現誘導を引き起こす転写因子として知られていた。一方、我々の以前研究から、GAMYB の機能欠損変異体 *gamyb* は

花、特に葯の発達が異常となることが発見され、GAMYB を介した GA 信号伝達が葯の発達に重要である可能性が考えられた。この異常は GA 関連変異体の葯における形態異常に類似していた。葯における遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した結果、gamyb 変異体と GA 関連変異体間での遺伝子発現様式は非常に類似していることが確認された。GAMYB の標的遺伝子と期待された脂肪酸やフェニルプロパノイド代謝関連遺伝子について、その発現制御機構を解析した結果、これらの遺伝子は GAMYB により直接制御されると予想された。

これらの GAMYB により直接制御される遺伝子のうち、花粉表面のエキシン形成に関与することが明らかにされている脂肪酸代謝酵素 CYP703A3 について詳細に研究を行った。その結果、GAMYB は CYP703A3 のプロモーター領域に結合しこの遺伝子の発現を正に制御していることが明らかになった。

### (3) GA 受容システムの確立と進化

上述のように、イネの花粉壁の構成成分であるエキシンの形成が GAMYB により制御されることが明らかにされた。また、最近の研究によって、エキシンは高等植物だけでなくコケやシダを含んだ維管束植物間で保存されていることが明らかにされた。そこで、GAMYB によるエキシン形成の制御機構が下等植物である小葉類イヌカタヒバ (*S. moellendorffii*) についても共通しているかについて検討した。

まず単離したイヌカタヒバの GAMYB (SmGAMYB) と SmCYP703A 遺伝子 (SmCYP703A) の発現パターンを調べたところ、両者はタペータムと雄性孢子でのみ発現していた。また SmGAMYB が SmCYP703A 遺伝子のプロモーター領域に *in vitro* で結合すること、イネの gamyb と cyp703a3 変異体を用いた相補性検定の結果から、SmGAMYB と SmCYP703A がイネと同等の機能を有することを確認した。さらに GA 生合成阻害剤を処理した個体ではエキシン形成異常が見られ、且つこの異常が GA 処理により回復した。これらの結果は、少なくとも維管束植物の発生後には GA がエキシン形成過程に関与していたことを示唆していた。

次に、維管束植物の中で最も初期に分化したコケ植物についても同様の実験を行った。我々は、GA 受容システムは維管束植物 (シダ以降) の発生後に誕生したことを明らかにしたが、不思議なことに、高等植物の GAMYB に類似した遺伝子がコケ植物にも存在することを見いだした。GA 信号伝達系が存在しないにもかかわらず、その制御下で機能する GAMYB 類似遺伝子が存在する理由を明らかにするために、ヒメツリガネゴケ GAMYB 様遺伝子をイネ gamyb 変異体に導入したところ、そ

の変異形質を部分的に緩和した。さらに、ヒメツリガネゴケ GAMYB 様遺伝子はイネと同様、コケ内で CYP703 遺伝子を正に制御していることを見いだした。これらのことは、コケ植物には GA 受容システムは確立されていないが、その下流で機能する GAMYB 及びその標的である CYP703 遺伝子の制御システムは存在していることを示している。

## 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 32 件)

- ① Yamagata, Y., Yamamoto, E., Aya, K., Win, K.T., Doi, K., Sobrizal, Ito, T., Kanamori, H., Wu, J., Matsumoto, T., Matsuoka, M., Ashikari, M. and Yoshimura, A. (2010) Mitochondrial gene in the nuclear genome induces reproductive barrier in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, (4) 1494-1499. (査読有)
- ② Yamamoto, E., Takashi, T., Morinaka, Y., Lin, S., Wu, J., Matsumoto, T., Kitano, H., Matsuoka, M. and Ashikari, M. (2010) Gain of deleterious function causes an autoimmune response and Bateson-Dobzhansky-Muller incompatibility in rice. *Mol Genet Genomics*. 283, (4) 305-315. (査読有)
- ③ Miura, K., Agetsuma, M., Kitano, H., Yoshimura, A., Matsuoka, M., Jacobsen, S. E. and Ashikari, M. (2009) A metastable DWARF1 epigenetic mutant affecting plant stature in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, (27) 11218-11223. (査読有)
- ④ Miura, K., Yamamoto, E., Morinaka, Y., Takashi, T., Kitano, H., Matsuoka, M. and Ashikari, M. (2008) The hybrid breakdown 1 (t) locus induces interspecific hybrid breakdown between rice *Oryza sativa* cv. Koshihikari and its wild relative *O. nivara*. *Breeding Science* 58, (2) 99-105. (査読有)
- ⑤ Hirano, K., Aya, K., Hobo, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Shim, R. A., Hasegawa, Y., Ueguchi-Tanaka, M. and Matsuoka M. (2008) Comprehensive

- transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice. *Plant Cell Physiol.* 49, (10) 1429-1450. (査読有)
- ⑥ Takeda, S. and Matsuoka, M. (2008) Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nat. Rev. Genet.* 9, (6) 444-457. (査読無)
- ⑦ Hirano, K., Ueguchi-Tanaka, M. and Matsuoka, M. (2008) GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends Plant Sci.* 13, (4) 192-199. (査読無)
- ⑧ Yamamoto, Y., Kamiya, N., Morinaka, Y., Matsuoka, M., Sazuka, T. (2007) Auxin Biosynthesis by the YUCCA Genes in Rice. *Plant Physiol.* 143, (3) 1362-1371. (査読有)
- ⑨ Asano, K., Takashi, T., Miura, K., Qian, Q., Kitano, H., Matsuoka, M. and Ashikari, M. (2007) Genetic and molecular analysis of utility of sd1 alleles in rice breeding. *Breeding Science* 57, (1) 53-58. (査読有)
- ⑩ Yamamoto, E., Takashi, T., Morinaka, Y., Lin, S., Kitano, H., Matsuoka, M. and Ashikari, M. (2007) Interaction of two recessive genes, hbd2 and hbd3, induces hybrid breakdown in rice. *Theoretical and applied genetics* 115, (2) 187-194. (査読有)
- ⑪ Hirano, K., Nakajima, M., Asano, K., Nishiyama, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Katoh, E., Xiang, H., Tana hashi, T., Hasebe, M., Banks, JA., Ashikari, M., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M. and Matsuoka, M. (2007) The GID1-Mediated Gibberellin Perception Mechanism Is Conserved in the Lycophyte *Selaginella moellendorffii* but Not in the Bryophyte *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 19, (10) 3058-3079. (査読有)
- ⑫ Tory, C., Aya, K., Asano, K., Yamamoto, E., Morinaka, Y., Watanabe, M., Kitano, H., Ashikari, M., Matsuoka, M. and Ueguchi-Tanaka, M. (2007) Gibberellin regulates pollen viability and pollen tube growth in rice. *Plant Cell* 19, (12) 3876-3888. (査読有)
- ⑬ Nagasaki, H., Itoh, J., Hayashi, K., Hibara, K., Satoh-Nagasawa, N., Nosaka, M., Mukouhata, M., Ashikari, M., Kitano, H., Matsuoka, M., Nagato, Y. and Sato, Y. (2007) The small interfering RNA production pathway is required for shoot meristem initiation in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, (37) 14867-14871. (査読有)
- ⑭ Tsuji, H., Aya, K., Ueguchi-Tanaka, M., Shimada, Y., Nakazono, M., Watanabe, R., Nishizawa, N-K., Gomi, K., Shimada, A., Kitano, H., Ashikari, M. and Matsuoka, M. (2006) GAMYB controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. *Plant J.* 47, (3) 427-444. (査読有)
- ⑮ Nakamura, A., Fujioka, S., Sunohara, H., Kamiya, N., Hong, Z., Inukai, Y., Miura, K., Takatsuto, S., Yoshida, S., Ueguchi-Tanaka, M., Hasegawa, Y., Kitano, H. and Matsuoka, M. (2006) The role of OsBRI1 and its homologous genes, OsBRL1 and OsBRL3, in rice. *Plant Physiol.* 140, (2) 580-590. (査読有)
- ⑯ Morinaka, Y., Sakamoto, T., Inukai, Y., Agetsuma, M., Kitano, H., Ashikari, M. and Matsuoka, M. (2006) Morphological Alteration Caused by Brassinosteroid Insensitivity Increases the Biomass and Grain Production of Rice. *Plant Physiol.* 141, (3) 924-931 (査読有)
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Matsuoka, M. 「GA signaling pathways for yield traits in rice.」 6th International Rice Genetics Symposium. 2009.11.17 (Manila, Philipins)
- ② 上口 (田中) 美弥子: 「ジベレリン (GA) 情報伝達系におけるユビキチン依存的タンパク分解機構と GID1 受容体」 第 51 回日本植物生理学会年会 2010. 3. 21 (熊本)
- ③ 平野恒: 「イネ半優性矮性変異体 Slr1-d の解析」 第 51 回日本植物生理学会年会 2010. 3. 18 (熊本)

- ④ Matsuoka, M. 「Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1.」 The 6th International Symposium of Rice Functional Genomics. 2008. 11. 10-12 (Jeju, Korea)
- ⑤ 平野恒：「イネの小孢子／花粉およびタペータムにおける植物ホルモン関連遺伝子の網羅的な発現解析」第50回日本植物生理学会年会 2009. 3. 21-24 (名古屋)
- ⑥ 保浦徳昇：「イネの雄性配偶子とタペータム細胞でのトランスクリプトーム解析」第50回日本植物生理学会年会 2009. 3. 21-24 (名古屋)
- ⑦ 安益公一郎：「MYB型転写因子GAMYBによるエキシン形成制御機構はいつ誕生したか？」第50回日本植物生理学会年会 2009. 3. 21-24 (名古屋)
- ⑧ Aya, K. 「GAMYB plays the important role in pollen development as a member of GA signaling」9th IPGSA Meeting 2007. 7. 21-25 (Puerto Vallarta, Mexico)

〔図書〕 (計1件)

- ① Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M. and Matsuoka M. Molecular biology of gibberellins signaling in higher plants. Int Rev Cell Mol Biol. 268, (2008) 191-221.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松岡 信 (MATSUOKA MAKOTO)  
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授  
研究者番号：00270992

### (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：