

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14433

研究課題名（和文）種子肥大化技術開発のための植物細胞伸長機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of plant cell elongation mechanism for seed enlargement technology development

研究代表者

高崎 寛則（Takasaki, Hironori）

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：50612157

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 600,000 円

研究成果の概要（和文）：多細胞生物の細胞分裂から伸長に至るまでの分子機構は未だ不明な点が多い。これまでにイネで植物ホルモンジベレリンによる葉の伸長過程で誘導される転写因子をコードする遺伝子を単離した。一方、シロイヌナズナの4つの相同遺伝子が葉の細胞の分裂期から細胞伸長期への移行期で発現誘導されることが示されている。本研究では、4転写因子の機能欠失変異体の解析から、これら因子が植物体の大きさに関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジベレリンによる植物の成長の分子メカニズムの解明によって、シグナル伝達因子の機能を明らかにし、植物の成長制御分野の発展に貢献できる。さらに、国内外の複数のグループによって、この4つの遺伝子が栄養素としての鉄の吸収に関わっていることが示されている。そのため、本研究の遂行により、成長制御分野だけでなく、根圏のミネラル吸収促進などによる土壌肥料分野への波及が期待できる。本研究により、種子の肥大化だけでなく、成長部位の選択、成長速度の制御などにより高効率な農産物の生産技術開発に繋がり、世界の食糧問題の解決に貢献できる。また、植物の栄養応答の解明により、農作物の増産技術への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanism from cell division to cell elongation of multicellular organisms remains unclear. It has been isolated a gene encoding a transcription factor induced during leaf elongation by plant hormone Gibberellin in rice. On the other hand, it has been shown that the expression of four homologous genes of *Arabidopsis thaliana* is induced at the transition tissue from the cell division to the cell elongation of leaf cells. In this study, it was clarified that these factors are involved in the size of the plant by analyzing quadruple mutant of these transcription factors.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：転写因子 発生 種子 細胞伸長 シロイヌナズナ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の細胞分裂から伸長に至るまでの分子機構は未だ不明な点が多い。これまでにイネで植物ホルモンジベレリンによる葉の伸長過程で誘導される bHLH 転写因子(GA 誘導性 bHLH)をコードする遺伝子を単離した。一方、Dirk Inze らによって、シロイヌナズナにおいても、GA 誘導性 bHLH をコードする遺伝子の4つの相同遺伝子が、葉の分裂期から伸長期への移行期で発現誘導されることが示された。このことから、GA 誘導性 bHLH が細胞伸長の制御に関わっていると考えた。しかし、個々の遺伝子破壊株では個体の大きさに顕著な差を示さないことから、これらの遺伝子は機能重複していることが示唆されており、各遺伝子の役割を調べるためには、多重変異体の作成が必要であった。4つの遺伝子の多重機能欠損変異体は得られていない。原因として、4遺伝子のうち2遺伝子が3番染色体の近傍で連鎖していることが挙げられ、このことが T-DNA 挿入変異体の掛け合わせによる4重変異体の作成を困難にしていた。そこで、ゲノム編集技術を用いて4重変異体の作成に着手した。また、4つの遺伝子それぞれの詳細な発現組織とタンパク質の局在は不明であった。さらに、これまでに作成した種子特異的プロモーターとこの4遺伝子の細胞伸長へ及ぼす役割を組み合わせることで、人為的に種子の大きさを改変することを着想した。

## 2. 研究の目的

GA 誘導性 bHLH の機能を調べ、細胞伸長の制御のメカニズムを解明することを目的とする。さらに、細胞伸長制御メカニズムを利用して、作物収量の主な構成要素である種子のサイズを大きくする「種子肥大化技術」の開発を目指す

## 3. 研究の方法

### a. 細胞の分裂期から伸長期への移行時に発現する GA 誘導性 bHLH の機能解明

4つの遺伝子の機能を明らかにするために、多重変異体の作成を試みた。得られた植物を用いて葉のサイズを測定した。また、機能重複した4つの遺伝子の働きを調べるために、転写活性の抑制ドメインを付与したキメラリプレッサーを植物に導入した植物を得た。さらに、4遺伝子が本来発現している組織を明らかにするために、4遺伝子それぞれの遺伝子上流配列(プロモーター)と蛍光タンパク質遺伝子を組み合わせたコンストラクトを作成し、植物へ導入後、蛍光を観察した。

### b. 種子肥大化技術開発

種子で高発現するプロモーターに GA 誘導性 bHLH を融合したコンストラクトを作成し、植物へ導入後、種子の重さ、大きさを測定した。

## 4. 研究成果

a. シロイヌナズナの4つの GA 誘導性 bHLH 遺伝子のうち、研究協力者より譲り受けた3つの遺伝子の破壊株に、ゲノム編集技術を用いて4つ目の遺伝子変異を誘発した。得られた4

重変異体から、CAS9とガイドRNAを含まない個体を選抜した。遺伝型を固定した4重変異体の植物体の大きさを、野生型、それぞれの単遺伝子変異、2重、3重変異体と比較したところ、4重変異体は顕著に植物体の大きさが異なる可能性が示された。さらに、植物体の大きさ以外に形態に異常の出る個体が現れた。これらの結果から、4つのGA誘導性bHLH遺伝子が植物体の大きさに加えて、条件依存的な生存に関わる機能を持つ可能性が示唆された。これらの現象が4つの遺伝子の機能であることを、相補試験によって確認する必要がある。転写活性の抑制ドメインを付与したキメラリプレッサーを導入した植物では植物体の大きさについて、野生型と比較して顕著な違いを示さないことから、これら遺伝子は転写活性によらない制御によって植物の大きさに影響を与える可能性や、高発現する植物が致死である可能性が示唆された。4遺伝子が本来発現している組織の詳細を明らかにするために、4遺伝子それぞれの遺伝子上流配列(プロモーター)と蛍光タンパク質遺伝子を組み合わせたコンストラクトを作成し、植物へ導入した。それら植物について共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。4種類の***bHLHpro:bHLH***-蛍光タンパク質導入植物のうち、1種類について根、葉の分裂組織から伸長組織の間で蛍光が観察された(図1)。この結果から、分裂組織と伸長組織の移行器官で機能することが示唆される。

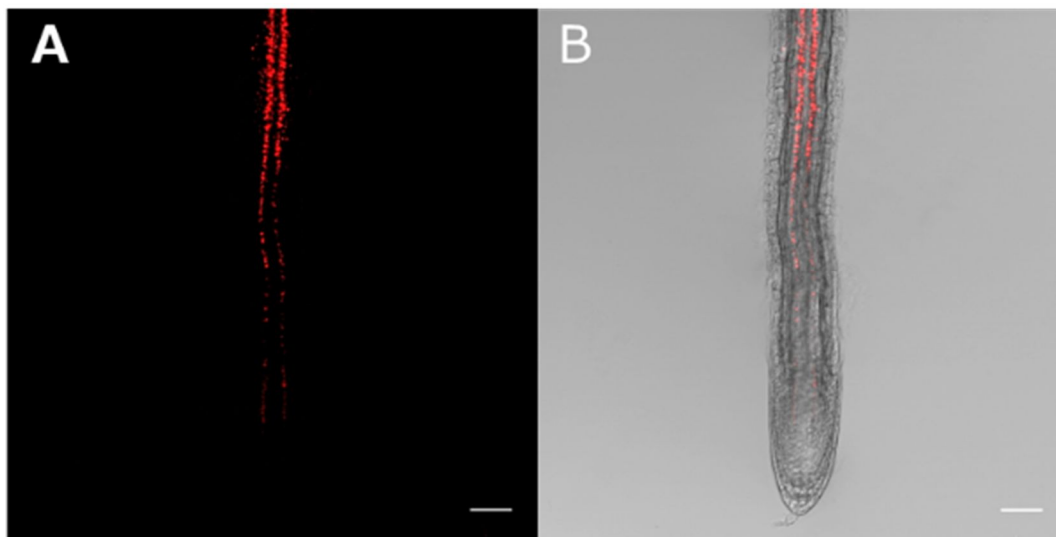


図1. 根における ***bHLH***-蛍光タンパク質の発現組織 A: 赤色蛍光タンパク質の蛍光像 B: 明視野像と蛍光画像の重ね合わせ Bar=50  $\mu$  m

b. 種子で高発現するプロモーターに ***bHLH*** 遺伝子を融合したコンストラクトを導入した種子の重さ、大きさの測定結果から、遺伝子が種子の重さ、大きさに影響を与える可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	Dirk Inze  (Dirk Inze)	VIB	