

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22770062

研究課題名(和文)高等植物の光シグナルによる個体サイズ制御機構の解明

研究課題名(英文)Study on light signal-dependent regulation of plant size and architecture

研究代表者

中川 繭 (NAKAGAWA, Mayu)

弘前大学・男女共同参画推進室・特任助教

研究者番号：10375438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：暗黒下で光形態形成し、光照射下で矮化するシロイヌナズナのcop1変異体は、茎細胞の伸長と茎頂分裂組織の細胞増殖が抑制されていた。cop1変異体の矮化を抑制するサプレッサー変異体emc1,2,3の解析により、cop1変異による暗黒下での光形態形成と光照射下での矮化が独立した遺伝的経路で制御されていること、emc1,2,3変異はcop1変異による茎頂分裂組織の細胞分裂の停止を抑制することで花茎を伸長させることがわかった。emc1の原因遺伝子はインポーチン様タンパク質をコードしており、核膜孔を介した核と細胞質間の分子輸送に働く輸送レセプターであるカリオフィリンとして働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Plants use environmental light as an informational signal to control their development. The Arabidopsis cop1 mutants show photomorphogenic development when grown in darkness. Under light conditions, cop1 mutants in turn show dwarfing and decreased apical dominance. I found that in the cop1-6 stems, both longitudinal cell elongation and cell number were reduced. I have screened for mutants that suppress the dwarf phenotype of cop1-6, designated "eat me cake" (emc). The emc1, 2 and 3 mutants have increased plant height. Meanwhile, the longitudinal cell sizes of primary stems of these emc mutants were similar to those of cop1-6 plants. Thus, the emc mutations inhibit the arrest of cell proliferation of inflorescence stems in cop1-6. The emc1, 2 and 3 mutants showed photomorphogenesis in darkness, indicating that the emc mutations promoted inflorescence stem elongation pathways are independent of scotomorphogenesis pathways. The EMC1 gene encodes an importin-beta like protein.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 形態・構造

キーワード：花序形成 光応答 光形態形成 発生・分化 伸長成長 伸長生長 環境応答 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナでは、暗黒下で芽生えの子葉が展開し胚軸が短くなる“光形態形成変異体”が多数単離されているが、その多くが光照射下では矮性形質を示し、頂芽優勢を喪失する。E3リガゼをコードするCOP1は、暗黒下で光形態形成する変異体の原因遺伝子として最初に単離された。COP1の完全欠損体は致死だが、弱い表現型を示す変異体アリルは、光照射下で矮化し、頂芽優勢の喪失、日長非依存的な花成促進、アントシアニンの蓄積、側根の減少といった多面的な形質を示す。したがって、COP1は植物の生活環を通して発生に関わる制御因子と考えられる。

COP1タンパク質は、光受容体CRY1, CRY2, PHYA, PHYBと直接的に相互作用し、活性の抑制や細胞内局在変化などの制御を受ける。芽生えの光形態形成において、COP1の標的タンパク質は3つの独立した経路に分かれることがわかっている。また、長日による花成の誘導に働くCOは、COP1のコピキチン化標的タンパク質である。

研究代表者は、光照射下でのCOP1の働きを明らかにすることが、光シグナルによる植物の発生制御機構の解明につながると考え、cop1変異体の日長非依存的な花成促進に注目して、COP1の花成における役割について研究してきた。その解析の過程で、cop1変異体の矮性形質及び頂芽優勢の喪失が日長非依存的事であることや、cop1変異体の矮化が花成促進と別経路で制御されている可能性が明らかになった。

2. 研究の目的

植物は外的環境に応じて柔軟に発生を制御する機構を持っている。特に光は、様々な応答を引き起こす重要な環境シグナルとして、植物の発生に大きく作用する。

シロイヌナズナの暗黒下でも光形態形成する変異体cop1は、光照射下では矮性形質を示し、頂芽優勢を喪失する。本研究は、cop1変異体の矮化機構を解析することで、光シグナルによる植物の個体サイズの制御機構を明らかにすることを目的とする。

具体的には、cop1変異体から花茎伸長を指標に矮化サプレッサー変異体を単離し、表現型解析と原因遺伝子の単離と解析をすることで、COP1を介した光シグナルによる茎の伸長・枝分かれ(花茎・花序形成)の制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) cop1変異体の矮性形質の原因解析

cop1変異体の矮化は、変異体単離当時から知られているにもかかわらず、組織細胞学的な解析が全く成されていない。そこで、花茎の細胞サイズや細胞数などの組織細胞学的な解析を行い、光シグナルによる花茎伸長制御機構について知見を得る。

(2) cop1の矮化が抑制されたサプレッサー変異体の単離

弱い表現型を示すcop1-6の変異体種子にEMSによる変異原処理を行い、主茎の高さを指標に矮化サプレッサー変異体を単離する。組織細胞学的な解析により、サプレッサー変異体の矮化抑制原因を解析する。

(3) 矮化サプレッサー変異体emcの原因遺伝子の単離と解析

cop1の矮化を抑制するサプレッサー変異体emcの原因遺伝子をポジショナルクローニング法でラフマッピングした後、次世代シーケンサーを用いて同定する。単離した原因遺伝子の機能解析を行うことで、COP1による花茎伸長の制御機構に迫る。

4. 研究成果

(1) 植物の矮化は細胞の伸長抑制と茎頂分裂組織の細胞分裂抑制のどちらかまたは両方に起因する。cop1-6変異体は、野生型(Col)の約1/5の高さで花茎の伸長が停止する。そこで、その矮化原因を探るため、走査型電顕を用いて花茎の細胞長を調べたところ、cop1-6変異体では細胞の縦方向(長軸側)の長さが野生型の約6割程度に減少していた。一方、横方向(短軸側)の細胞長は野生型とあまり差が見られなかった。また、野生型が1つの枝に約20個の花をつけるのに対して、cop1-6変異体の花茎は1つの枝に4-5個の花をつけると先端に小さな花様器官または頂端花を形成し伸長を停止する。したがって、cop1-6変異体では茎細胞の伸長と細胞分裂(増殖)の両方が抑制されていること、つまりCOP1は細胞の伸長と茎頂分裂組織の分裂能の維持の両方に働いていることがわかった。

(2) cop1-6変異体の種子にEMS処理を行い、M2およびM3世代にて主茎の長さを指標に約30系統の矮化サプレッサー変異体を選抜し、eat me cake (emc)と名付けた。次世代で形質の再現性を確認し、花茎がcop1変異体の2倍以上に伸長し、稔性が高く独立した変異由来と推測される3系統(emc1, emc2, emc3)について解析を進めることにした。遺伝解析の結果、emc1, 2, 3変異体はそれぞれ1遺伝子座由来の劣性変異であることがわかった。

emc1, 2, 3変異体は、暗黒下での光形態形成や光照射下でのアントシアニンの蓄積、葉が小さくなるといったcop1変異によって引き起こされる表現型を維持していたことから、これらの表現型に関わる遺伝的経路とは独立した経路がcop1の矮化に働いている可能性が示唆された。

emc1, 2, 3変異体の花茎細胞は、縦方向の長さがcop1とほとんど変わらなかったことから、これらのemc変異はcop1変異による茎頂分裂組織の細胞分裂の停止を抑制することで花茎を伸長させることがわかった。したがって、EMC1, 2, 3による茎伸長制御経路は、暗黒下や

弱光下での細胞伸長に由来する節間伸長(徒長)や胚軸伸長とは独立した新規のCOP1カスケードであると推測された。

(3) *cop1-6*に*Ler*の戻し交雑を5回行った*cop1/Ler*系統を用いた染色体マッピングにより、*emc1*変異が第1染色体上腕部の約2.1Mbの領域に存在することがわかった。そこで、*emc1*変異体に*cop1-6*変異体を1回戻し交雑したF2/F3植物を用いて、EMS変異をマーカーとして次世代シーケンサーによる*emc1*の原因遺伝子の同定を行った。

*emc1*の原因遺伝子はインポーチンファミリー様タンパク質をコードしていた。インポーチンファミリーは核膜孔を介した核と細胞質間の分子輸送に働く輸送レセプターであるカリオフェリンとして働くことが推測されている。カリオフェリンによる核内外への輸送機構は酵母やヒトで解析が進められているが、積荷と呼ばれる輸送対象の同定や核内輸送に働くのか、格外輸送に働くのかの同定は難しく、植物ではほとんど研究がされていない。ヒトゲノムとの相同解析により、EMC1はtRNAやSUMOタンパク質などの核内外への輸送に働く可能性が示唆された。

シロイヌナズナには、EMC1と同じインポーチンファミリーに属する遺伝子が17個存在する。これまでに報告されているシロイヌナズナのインポーチンファミリー遺伝子の欠損体の中に発生に異常を示すものがあることやEMC1の相同遺伝子が幅広い植物種で保存されていることから、EMC1タンパク質は植物の発生、特に細胞分裂の制御に働く重要な物質の核内外輸送に働いていると考えられる。

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9件)

中川 藤、「どこまでも大きくなりたい!」動けない植物の戦略—植物の地上部の器官形成について—、数研出版サイエンスネット、第44号 pp.10-13(2012) 査読無

<http://www.chart.co.jp/subject/rika/scnet/44/Snet44-3.pdf>

Mayu Nakagawa, Shinya Takahashi, Issay Narumi, Ayako N. Sakamoto. Role of AtPol₁, AtRev1 and AtPol₂ in γ -ray induced mutagenesis. *Plant signaling & behavior*, Vol.6 pp.728-731(2011) 査読有 DOI:10.4161/psb.6.5.15124

Rim Nefissi, Yu Natsui, Kana Miyata, Atsushi Oda, Yoshihiro Hase, Mayu Nakagawa, Abdelwahed Ghorbel, Tsuyoshi Mizoguchi. Double loss-of-function mutation in *EARLY FLOWERING 3* and *CRYPTOCHROME 2* genes delays flowering under continuous light but accelerates it under long days and short days: an

important role for *Arabidopsis* CRY2 to accelerate flowering time in continuous light. *Journal of Experimental Botany*, Vol.62 pp.2731-2744 (2011) 査読有

DOI:10.1093/jxb/erq450

Mayu Nakagawa, Shinya Takahashi, Atsushi Tanaka, Issay Narumi, Ayako N. Sakamoto. Role of AtPol₁, AtRev1 and AtPol₂ in UV-induced mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, Vol.155 pp. 414-420(2011) 査読有

DOI:10.1104/pp.110.166082

Yu Natsui, Rim Nefissi, Kana Miyata, Atsushi Oda, Yoshihiro Hase, Mayu Nakagawa, Tsuyoshi Mizoguchi.

Isolation and characterization of suppressors of the *early flowering 3* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* Vol.27 pp.463-468 (2010) 査読有

DOI:10.5511/plantbiotechnology.10.0722a

Sumire Fujiwara, Mayu Nakagawa, Atsushi Oda, Kazuhisa Kato, Tsuyoshi Mizoguchi. Photoperiod pathway regulates

expression of *MAF5* and *FLC* that encode MADS-box transcription factors of the FLC family in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*, Vol.27 pp.447-454(2010) 査読有

DOI:10.5511/plantbiotechnology.10.0823b

中川 藤、坂本綾子、高橋真哉、田中淳、鳴海一成、シロイヌナズナの損傷乗り越え複製欠損は突然変異誘発に影響する、若手研究者が語る 21世紀の遺伝学(VI) p.7 (2010) 査読無

<http://gsj3.jp/pdf-bp/81bp.pdf>

Kiyoshi Nishihara, Yusuke Kazama, Mayu Nakagawa, Tomoya Hirano, Sumie Ohbu, Shigeyuki Kawano, Tomoko Abe.

C-ion-induced DNA mutations in variegated mutant *Arabidopsis*. *RIKEN Accelerator Progress Report*, Vol.43 p.285(2010) 査読有

http://www.rarf.riken.jp/researcher/APR/Document/ProgressReport_vol_43.pdf

Mayu Nakagawa, Hinako Takehisa, Yoriko Hayashi, Hideo Tokairin, Tadashi Sato, Tomoko Abe. Characterization of temperature-sensitive chlorotic mutant induced by ion beam irradiation. *RIKEN Accelerator Progress Report*, Vol.43 p.281 (2010) 査読有

http://www.rarf.riken.jp/researcher/APR/Document/ProgressReport_vol_43.pdf

[学会発表](計8件)

Saki Ikegai1, Miki Yadake, Masumi Otsuru, Mayu Nakagawa, Yuki Fujiki,

Ikuo Nishida. Characterization of axillary bud formation in *Arabidopsis pect1-4* mutants. 第55回植物生理学会大会、2014年03月20日、富山大学(富山市)
矢竹美樹、生貝咲貴、大鶴真寿美、中川繭、藤木友紀、西田生郎、シロイヌナズナ *pect1-4*変異体が示す早期花成の誘導メカニズム、第55回植物生理学会大会、2014年03月18日、富山大学(富山市)
中川繭、佐藤由紀夫、鎌田博、小野道之、シロイヌナズナABCモデル変異体を用いたメンデル遺伝と分子生物学をつなぐ実験教材の開発、日本生物教育学会第96年全国大会、2014年1月12日、筑波大学(つくば市)
生貝咲貴、矢竹美樹、大鶴真寿美、中川繭、藤木友紀、西田生郎、シロイヌナズナ *pect1-4*変異は自律的経路を介して早期花成を誘導する、第26回日本植物脂質シンポジウム、2013年9月15日、北海道大学(札幌)
鈴木孝征、西脇万理恵、鈴木俊哉、中川繭、河合都妙、中村研三、石黒澄衛、東山哲也、高速シーケンサーを用いたシロイヌナズナ変異株の原因遺伝子同定システム Mitsucalの開発、第54回日本植物生理学会年会、2013年3月21日、岡山大学(岡山市)
中川繭、鈴木孝征、東山哲也、石黒澄衛、*cop1*の矮化抑制変異体 *emc*の解析、第54回日本植物生理学会年会、2013年3月21日、岡山大学(岡山市)
Mayu Nakagawa, Takamasa Suzuki, Tetsuya Higashiyama, Sumie Ishiguro. The role of *COP1* in regulation of plant size and architecture in *Arabidopsis*. The 23rd International Conference on Arabidopsis Research. 2012年7月3-7日、Hofburg Imperial Palace(Vienna)
中川繭、石黒澄衛、光形態形成変異体 *cop1*の花茎伸長制御機構の解析、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16日、京都産業大学(京都府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 繭 (NAKAGAWA, Mayu)
弘前大学・男女共同参画推進室・特任助教
研究者番号：10375438

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし