

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870034

研究課題名（和文） 種子特異的なストレス耐性機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of seed-specific stress tolerance

研究代表者

金井 雅武（KANAI MASATAKE）

基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・特別協力研究員

研究者番号：30611488

研究成果の概要（和文）：植物（親）は次世代を残すために種子（子）を作る。発達中の種子はストレスに弱く、親である植物体が種子を守りながら健全に発達させることが必要不可欠であるものの、その機構はほとんど明らかになっていない。本研究は種子特異的なストレス耐性機構に関わる *DPS* 遺伝子を同定し、*DPS* 遺伝子の 1 つである *DPS1* は種子の乾燥耐性を担うことを明らかにした。この研究は、砂漠など乾燥地帯でも種子を生産できる作物の作出につながる。

研究成果の概要（英文）：Plants produce seeds for the next generation. Developing seeds are more sensitive to environmental stresses than plant (e. g., roots, leaves, stem). It is essential for developing seeds to be protected from environmental stresses, the protection system is largely unknown. The aim of this study was to identify genes that regulated seed-specific stress tolerance and *DPS* genes were identified. It was also shown that *DPS1*, one of the *DPS* genes, involved in seed-specific drought stress. This study leads to an improvement of crop yield in arid area.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：種子・ストレス・貯蔵脂質・貯蔵タンパク質

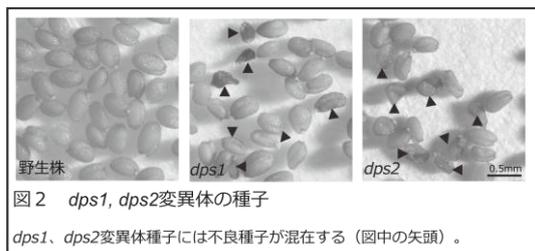
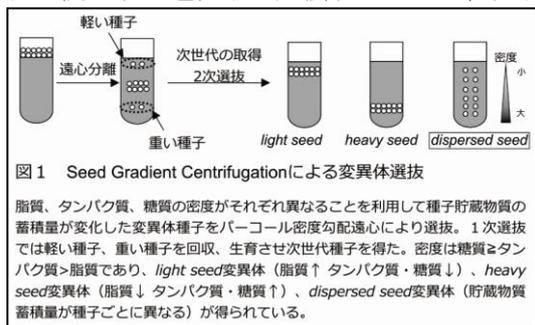
1. 研究開始当初の背景

（1）植物種子は食糧生産の基礎であり、人間の生活を支えている。種子は種子貯蔵物質として炭水化物、脂質、タンパク質を多量に蓄積し、人間の食糧である穀物、油脂の原料

である油糧種子、さらには乳や肉を生産する家畜の飼料として利用されている。近年の人口増加、クリーンエネルギーとしてバイオエタノールやバイオディーゼルの利用増加により作物種子の需要は増加し続けている。し

かし世界の耕地面積は 1960 年代からほぼ横ばいで推移しているため、不良土壌での種子生産または限られた土地での効率的な生産が必要である。

(2) 種子の効率的な生産を実現するためには種子形成に関わる分子機構の理解が必要不可欠であり、国内外で盛んに研究されている。モデル植物であるシロイヌナズナを用いた遺伝学的解析は非常に有効な手段であり、欠損すると種子が致死となる遺伝子(胚性致死遺伝子)に関して数多く報告されている。一方、種子の品質そのものである種子貯蔵物質の健全な蓄積に必要な遺伝子の報告は少なく、未解明な部分が多く残されている。申請者はこれまでシロイヌナズナを用いて種子貯蔵物質の蓄積が不全となる変異体を Seed Gradient Centrifugation (図1)により選抜している。選抜した変異体は野生株と比べて低密度の *light seed (ls)*、高密度の *heavy seed (hs)*、種子密度に大きなばらつきが生じる *dispersed seed (dps)* に分類される。得られた *dps* 変異体 *dps1*、*dps2* は共に収穫した種子の中に野生株と比べて高い割合で貯蔵脂質や貯蔵タンパク質含量が大きく低下した不良種子が混在する(図2)。さらに *dps1* 変異体では乾燥条件下、*dps2* 変異体では低窒素条件下での生育により特異的に不良種子の割合が増加することを確認している。しかし *dps1*、*dps2* 変異体の植物体本体では乾燥ストレス耐性、低窒素ストレス耐性の低下は観察されない。以上の結果より種子には植物体本体とは別の種子特異的なストレス耐性機構が存在することが示唆され、*dps1*、*dps2* 変異体はそれぞれ種子特異的な乾燥ストレス耐性、低窒素ストレス耐性に関与する遺伝子が欠損することで、種子



がストレスに弱くなっているものと思われる。

2. 研究の目的

種子がさまざまなストレスにより発達不良となり、その品質を低下させることは数多く報告されている。植物体本体のストレス耐性に関する研究は盛んに行われているが、種子特異的なストレス耐性に関する研究はほとんど進んでいない。本申請では *dps1*、*dps2* 変異体の詳細な解析による種子特異的なストレス耐性機構の解明を推進する。

(1) 第一に *dps1*、*dps2* 変異体の原因遺伝子の同定を行い、どのような種類の遺伝子が欠損することで種子が乾燥ストレスおよび低窒素ストレスに対して感受性になってしまうのかを明らかにする。

(2) 次に発達中の野生株種子、*dps* 変異体種子を用いた比較トランスクリプトーム解析を行い、*dps* 変異体で発現が変動している遺伝子の網羅的な探索を行う。これにより種子の乾燥ストレス、低窒素ストレス耐性に関わる遺伝子群を決定し、*dps* 変異体の原因遺伝子の欠損が引き起こす遺伝子発現の変化を明らかにする。

(3) プロテオーム解析により *dps* 変異体の原因遺伝子がコードするタンパク質と相互作用するタンパク質を同定することで *dps* の原因遺伝子の機能、および作用機構を明らかにする。本申請では原因遺伝子の同定、変異体のトランスクリプトーム解析による遺伝子発現レベルでの影響、プロテオーム解析により相互作用するタンパク質の同定を行い、*dps* 変異体の原因遺伝子がどのように機能し、乾燥ストレスおよび低窒素ストレス耐性に関与しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *dps1*、*dps2* 変異体における原因遺伝子の同定

dps 変異体は米国の Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から購入した T-DNA 挿入変異体種子プールから選抜された。TAIL-PCR を用いた T-DNA の近傍配列を決定することで T-DNA 挿入によって欠損した遺伝子を同定する。TAIL-PCR による遺伝子同定がうまくいかなかった場合はマップベースクローニングにより原因遺伝子を同定する。

(2) ① *DPS1*、*DPS2* 過剰発現体の作成

変異体の原因遺伝子である *DPS1*、*DPS2* の機能を明らかにするためにシロイヌナズナにおいて恒常的な発現プロモーターとして

働く *CaMV 35S* プロモーターを用いた *DPS1*、*DPS2* 過剰発現体の作成を行う。加えて *DPS1*、*DPS2* タンパク質と相互作用するタンパク質を同定するために *myc* タグ、*FLAG* タグ融合 *DPS1*、*DPS2* タンパク質を発現する形質転換体を作成する。タグの位置についても N 末端、C 末端付加それぞれを作成し、本来の細胞内局在を示すことを確認した後、以降の実験に使用する。

(2) ② *DPS1*、*DPS2* により発現制御される遺伝子の探索

野生株と *dps1*、*dps2* 変異体、*DPS1*、*DPS2* 過剰発現体から発達中の種子をサンプリングし、RNA を抽出、マイクロアレイにより比較トランスクリプトーム解析を行う。野生株、欠損変異体、過剰発現体の遺伝子発現プロファイルを比較することで *DPS1*、*DPS2* により発現が変動する遺伝子群を絞りこむ。また既知のストレス耐性遺伝子の発現変動の確認を行う。さらに *DPS1*、*DPS2* の欠損または過剰発現により変動する代謝系を同定することで *DPS1*、*DPS2* の機能を明らかにする。

(3) *DPS2* と相互作用する因子の同定

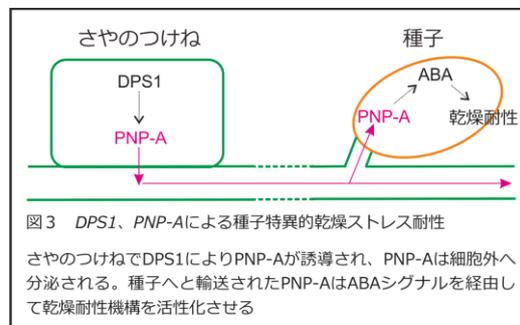
DPS2 は葉緑体、ミトコンドリアに局在する RNA 結合タンパク質をコードしているため、タグ融合 *DPS2* タンパク質を発現する形質転換体を用いて、*DPS2* と相互作用する RNA を同定する。免疫沈降法により、*DPS2*-RNA 複合体を精製する。定量 Q-PCR 法により *DPS2* と結合する RNA を同定する。

4. 研究成果

(1) *DPS1* が制御する種子特異的な乾燥耐性の解明

dps1 変異体の原因遺伝子とその機能解析を行った。*dps1* 変異体は通常条件下で生育させたにも関わらず、その種子には異常種子が混在した。さらに *dps1* 変異体を様々なストレス条件下で生育させたところ、乾燥ストレス条件下において特徴的な表現型を示した。弱い乾燥ストレスである 10 mM PEG 添加水耕液で生育させると、植物体の生育は野生株と同程度であるものの、種子の大部分が異常になり、種子収量が野生株の 30% 程度まで減少した。これより *dps1* 変異体は種子特異的な乾燥ストレス耐性に関わる因子が欠損していると考えられる。*dps1* 変異体の原因遺伝子 *DPS1* は機能未知の新規遺伝子であり、核膜に局在した。野生株における *DPS1* の発現はさやのつけねで特に強く、意外なことに種子では発現していなかった。これより、さやの

つけねで種子の乾燥耐性に関わる因子が作られ、その因子が種子に輸送されて種子に乾燥耐性を付与する機構が存在し、*DPS1* はさやのつけねで種子に輸送される因子の合成、分泌、または輸送に関わると考えられた。そこでこの因子を同定するために *DPS1* 過剰発現株を作成し、比較トランスクリプトーム解析により *DPS1* によって発現誘導される遺伝子を探索した。*DPS1* 過剰発現株において有意に発現が上昇している遺伝子の中に、細胞外に分泌されるペプチドをコードする *PNP-A* があった。*PNP-A* も *DPS1* と同様にさやのつけねで強く発現し、種子では発現が確認できなかった。また *PNP-A* は細胞外に分泌され、移動した先の器官で ABA シグナル伝達に関わることを示唆されているものの、その生理的意義について不明な点が多い。種子特異的な乾燥耐性と *PNP-A* との関係を明らかにするために *PNP-A* 発現抑制株を作成し、種子の表現型を観察した。その結果、*PNP-A* 発現抑制株では *dps1* 変異体と同様に異常種子が混在した。また *dps1* 変異体で *PNP-A* を過剰発現させると異常種子の割合が大幅に低下したことから、*PNP-A* は *DPS1* の下流で機能し、種子特異的な乾燥耐性を担う因子であることが明らかになった。この結果等から、*DPS1* は、さやのつけねで *PNP-A* の合成を誘導し、その *PNP-A* が種子に輸送されて ABA シグナルを ON にすることで乾燥耐性機構を活性化させるという、種子特異的な乾燥ストレス応答・耐性機構が明らかになった (図 3)。これは、植物体と種子が、分泌型のペプチドを用いたコミュニケーションを行っていることを示す新規な例であり、植物において種子のストレス応答・耐性機構の ON/OFF を植物体側が制御していることを示している。この機構により、植物体が外部環境と直に接していない種子に対して、ペプチドを利用して環境の変化を知らせることができると考えられる。この仕組みは、



申請者が解明を目指している種子特異的な乾燥ストレス応答・耐性機構の基盤部分である。

(2) *DPS2* が制御する葉緑体、ミトコンドリア内の RNA 制御

dps2 変異体の原因遺伝子とその機能解析を行った。*dps2* 欠損変異体種子には通常種子、異常種子、致死種子が混在する。レシプロカルクロスの結果から、雌性配偶子が *dps2* 欠損変異を持つヘテロ種子は異常な形態を示し、その一部は致死に、*dps2* 欠損変異を雌性、雄性配偶子ともに持つホモ種子は致死となることを明らかにした (図 4)。*dps2* 変異体の原因遺伝子 *DPS2* は葉緑体、ミトコンドリアに局在する新規な RNA 結合タンパク質であり、*DPS2*-RNA 複合体を精製し、結合している RNA を定量 Q-PCR 方により同定を試みた。*DPS2* は葉緑体内においては NDH コンプレックスの J サブユニットをコードする RNA と結合することを明らかにした。さらにミトコンドリアにおいても NDH コンプレックスをコードする複数の RNA と結合する可能性が示唆されている。これより葉緑体、ミトコンドリアの RNA 制御は配偶子の正常な機能発現に必須であり、その欠損は配偶子機能および種子の形態に影響を与えることが明らかとなった。*dps2* 変異体が低窒素ストレス感受性であることから、植物の低窒素ストレス耐性機構には葉緑体やミトコンドリアの RNA 制御が関わるということが示唆され、植物細胞が持つ 3 つのゲノムが協調することで低窒素ストレス耐性を実現している可能性が示された。今後のさらなる解析により、種子における窒素代謝と葉緑体、ミトコンドリア

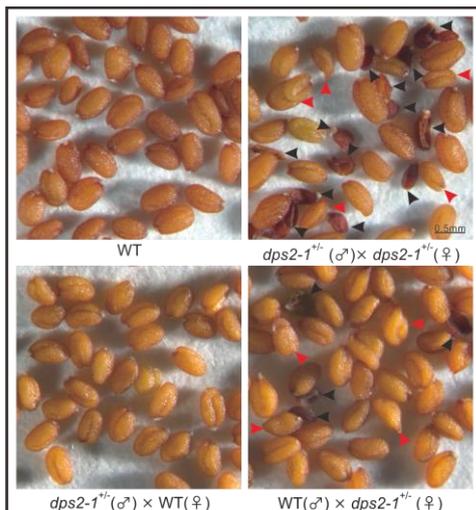


図 4 *dps2* 変異体のレシプロカルクロス
dps2 変異を σ 側に持つ場合、異常な種子は観察されないが、*dps2* 変異を ρ 側に持つ場合は異常種子 (◀) 致死種子 (◄) が観察される。これは *DPS2* が雌性配偶子において重要な機能を持つことを示唆している。

の関係が明らかになり、新規耐性機構の全

容解明につながる。

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 2 件)

① 金井 雅武、林 誠、西村 幹夫
 種子特異的な乾燥耐性を担う遺伝子 *DPS1* の同定とその機能解析、第 54 回日本植物生理学会、2013 年 3 月 21 日、岡山大学 (岡山県)

② 金井 雅武
 種子形成に関わる新規因子 *DPS1* の解析、植物の環境感覚：刺激受容から細胞応答まで 若手ワークショップ 2012 年 10 月 15 日、浜名湖カリアック (静岡県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 雅武 (KANAI MASATAKE)
 基礎生物学研究所・高次細胞機構研究部門・特別協力研究員
 研究者番号：30611488

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：