

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650100

研究課題名(和文) 高等植物の胚発生における配偶子効果の解析

研究課題名(英文) Parental effects on embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*

研究代表者

古谷 将彦 (FURUTANI, MASAHIKO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：10432593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： 初期胚の体軸形成における配偶子効果を調べるために、父性効果を示すSSP1と母性効果を示すAtMAGO遺伝子に着目し、それらの機能および関係性について分子生物学的解析を行った。その結果、AtMAGOが受精卵におけるSSP1タンパク質の極性を持った局在化に関与し、MAPキナーゼを局所的に活性化することを明らかにした。また、RNA結合タンパク質であるAtMAGOタンパク質も卵細胞内で極性を持って局在化することを見出し、mRNAの局在化を介した体軸形成の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)： I analyzed the function of the paternal-effect gene SSP1 and maternal-effect gene AtMAGO in apical-basal axis formation of *Arabidopsis* embryo to uncover the molecular mechanisms of parental effects on plant embryogenesis. I found that AtMAGO is required for the proper polarized-localization of SSP1 in the zygote and that AtMAGO is also involved in SSP1-driven MAPKKK signaling cascade. Besides, RNA-binding protein AtMAGO was localized in the periphery of egg cell with polarity, suggesting apical-basal axis formation in early embryogenesis via polar-localized SSP1 mRNA.

研究分野：植物発生学

キーワード：植物胚発生 配偶子効果 卵細胞 受精卵

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナの初期胚は受精卵の不等分裂に由来する頂端-基部軸に基づいた体制を示し、受精卵内の細胞極性が初期胚の体軸形成に重要な役割を示すことが示唆されている。MAPKKKカスケードが受精卵の不等分裂に関与することがこれまでの研究から明らかとなってきたが、カスケードの上流で受精卵内の極性を決定する分子実体については未だ謎である。ショウジョウバエでは、卵母細胞におけるmRNAの局在化が受精卵の体軸決定に重要な要素となっている。*Bicoid*や*Oskar*など軸形成の鍵となるホメオボックス遺伝子(母性効果遺伝子)のmRNAは卵母細胞内では翻訳されずに極性を持って局在化する。受精に伴ってこれらのmRNAの翻訳が開始され、受精卵の局所において転写因子としての機能を発揮することで軸の決定に関わる。卵母細胞内におけるmRNAの局在化に複数のRNA結合タンパク質が関与することが明らかとなっている。一方で、シロイヌナズナのゲノム上にはショウジョウバエの母性効果遺伝子のオルソログは存在せず、異なる体軸形成機構が存在すると考えられてきた。しかし、研究代表者はショウジョウバエ母性効果遺伝子のmRNAの局在化に関与するRNA結合タンパク質Magooのオルソログをコードする*AtMAGO*がシロイヌナズナゲノム上に一つ存在することを見出している。*AtMAGO*の機能欠失変異体を単離しその表現型を解析したところ、*atmago*変異は母性効果を示し受精卵の不等分裂に異常をもたらすことを見出し、ショウジョウバエ同様シロイヌナズナ*MAGO*が特定のmRNAの局在化に関与し受精卵の軸形成に関与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、*AtMAGO*遺伝子に着目し、シロイヌナズナ初期胚の軸形成における母性効果の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。また、近年父性効果を示し受精卵の不等分裂が異常になる*short suspensor1 (ssp1)*

変異が同定されており、父性効果遺伝子*SSP1*と母性効果遺伝子*AtMAGO*の機能と関係性を明らかにし、植物の配偶子効果の分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)*AtMAGO*遺伝子の機能解析

初期胚の軸形成過程における*AtMAGO*遺伝子の機能を明らかにするために、機能欠失変異体*atmago*の表現型解析、*AtMAGO*の発現解析および*AtMAGO*タンパク質の局在解析を行う。また、*ssp1*との多重変異体を作成し、*AtMAGO*と*SSP1*の遺伝学的関係を調べる。初期胚における*SSP1*タンパク質の局在を調べ、その局在性に*atmago*変異が影響を与えるか調べる。*AtMAGO*遺伝子がRNA結合タンパク質をコードすることから、*SSP1* mRNAに結合する可能性が考えられ、その仮説を検証するために*AtMAGO*タンパク質が*SSP1* mRNAに結合するか確認する。また、初期胚における*SSP1* mRNAに*atmago*変異が影響を与えるかも調べる。

(2)配偶子効果遺伝子の網羅的探索

初期胚において配偶子効果を示す配偶子効果遺伝子の候補を網羅的に同定するために、網羅的遺伝子発現およびタンパク質発現解析を行う。雌性および雄性配偶子、受精卵の3種類の細胞を用いてオーム解析を行い、各配偶子で転写されるものの翻訳されず、受精後に初めて翻訳される遺伝子を候補とする。

4. 研究成果

(1)*AtMAGO*遺伝子の機能解析

*atmago*変異は受精卵の不等分裂の他に雌性配偶子形成にも重篤な異常を引き起こし、一部致死性を示した。雌性配偶子形成が比較的正常に進行した変異体が、受精卵の不等分裂に表現型を示した。重篤なものは受精卵の分裂自体が停止し、多くは不等分裂に異常を示した。野生型は受精卵は小さな頂端細胞と大きな基部細胞に分裂するが、*atmago*変異体の受

精卵はともに小さな娘細胞を生じた。頂端細胞および基部細胞のマーカー遺伝子の発現解析を行ったところ、*atmago*変異体の初期胚では基部細胞のマーカー遺伝子の発現が失われていた。一方で、頂端細胞のマーカー遺伝子の発現は野生型同様に正常に発現が確認されたことから、*atmago*変異は受精卵の不等分裂、特に基部細胞の形成に影響を与えることが明らかとなった。また、*AtMAGO*遺伝子のプロモーター領域の制御下でレポーター遺伝子を発現させプロモーター活性を調べたところ、地上部のすべての組織で発現が確認された。各配偶子および受精卵においても*AtMAGO*遺伝子のプロモーター活性が検出された。一方、*AtMAGO*タンパク質の局在を調べるために、*AtMAGO*-GFP融合遺伝子を自身のプロモーター制御下で*atmago*変異体背景で発現させたところ、表現型を相補することができず、機能的なGFP融合タンパク質を発現する形質転換体を得ることができなかった。*AtMAGO*のC末端やN末端など、幾つかの場所にGFPを導入しても結果は同じであった。そこで、卵細胞特異的に*AtMAGO*-3xGFPを発現させたところ、部分的に表現型を相補することができたため、その植物体においてGFPのシグナルの観察を行った。卵細胞において*AtMAGO*-3xGFPタンパク質は核内と基部側の細胞膜近傍に極性を持って局在した。次に、*ssp1 atmago*二重変異体を作成し表現型を観察したところ、*atmago*単独変異体と同様であった。*SSP1*タンパク質の局在を解析するために*SSP1*-3xYFPを自身のプロモーター制御下で発現させた植物体の受精卵においてYFPシグナルを観察した。*SSP1*-3xYFPも*ssp1*変異体の表現型を部分的にしか相補できておらず、現在も機能的な*AtMAGO*および*SSP1*とGFP融合タンパク質を発現する形質転換体の作成を行っている。受精卵において*SSP1*-3xYFPの局在解析を行ったところ、受精卵の基部側の細胞膜近傍に強いシグナルが検出された。*atmago*変異体の受精卵においても*SSP1*-3xYFPの局在を調べたところ、YFPは細胞膜近傍に局在せず、細胞質中で大きな塊上のシグナルが検出された。これらのことか

ら、*AtMAGO*は受精卵の基部側の細胞膜上に*SSP1*タンパク質を局在化させる機能を持つことが明らかとなった。次に、*SSP1* mRNAの局在を解析するために動物で確立している様々な手法で挑戦したが、残念ながら植物においてはうまく働かなかった。

(2)配偶子効果遺伝子の網羅的探索

各配偶子と受精卵をセルソーティングで回収するため、それぞれに特異的なマーカー遺伝子のプロモーター制御下でGFPを発現する植物体の作成を目指した。雌性配偶子と雄性配偶子については良好なマーカー遺伝子を見つけマーカーラインの確立に成功したが、受精卵に特異的なマーカーラインを作成することがどうしてもできず、その後の網羅的探索を行うことができなかった。

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 4件)

(1) Auxin-dependent compositional change in Mediator in ARF7- and ARF19-mediated transcription.

Ito J., Fukaki H., Onoda M., Li L., Li C., Tasaka M., and Furutani M.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 6562-6567, doi/10.1073/pnas.1600739113 (2016)査読有

(2) Auxin transport sites are visualized in planta using fluorescent auxin analogs.

Hayashi K., Nakamura S., Fukunaga S., Nishimura T., Jenness M.K., Murphy A.S., Motose H., Nozaki H., Furutani M., and Aoyama T.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 11557-11562, doi: 10.1073/pnas.1408960111 (2014)査読有

(3) The *CUC1* and *CUC2* genes promote carpel margin meristem formation during *Arabidopsis* gynoecium development.

Kamiuchi Y., Yamamoto K., Furutani M., Tasaka M., and Aida M.

Front Plant Sci. 165, doi: 10.3389/fpls.2014.00165 (2014)査読有

(4) MAB4-induced auxin sink generates local auxin gradients in *Arabidopsis* organ formation.
Furutani M., Nakano Y., and Tasaka M.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 1198-1203, doi: 10.1073/pnas.1316109111 (2014)査読有

〔学会発表〕 (計 9件)

(1) **Furutani M.** and Tasaka M.
Mitochondria-derived reactive oxygen species are required for polar auxin transport in *Arabidopsis* organ formation.
9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology, 2015年5月17-22日, Wroclaw (Poland)

(2) 古谷 将彦, 田坂 昌生
The MAB4-PID signaling complex controls PIN dynamics in the plasma membrane
第56回日本植物生理学会年会, 2015年3月16-18日, 東京農業大 (東京都世田谷区)

(3) **Furutani M.** and Tasaka M.
The MAB4-PID signaling complex controls PIN dynamics on the plasma membrane.
Plant Organ Growth Symposium, 2015年3月10-12日, Ghent (Belgium)

(4) **Furutani M.** and Tasaka M. (2014)
The MAB4-PID signaling complex controls PIN dynamics on the plasma membrane.
The 5th NIBB-MPIPZ-TLL symposium “Horizons in Plant Biology”, 2014年11月24-26日, Cologne (Germany)

(5) **Furutani M.** and Tasaka M. (2014)
The MAB4-PID signaling complex controls PIN dynamics on the plasma membrane.
Naito Conference “Molecular-based biological systems”, 2014年10月7-10日, CHATERAISE Gateaux Kingdom SAPPORO (Sapporo, Hokkaido)

(6) 古谷 将彦, 田坂 昌生
PINタンパク質の細胞内局在を制御するPID-MAB4複合体の解析

日本植物学会第78回大会, 2014年9月12-14日, 明治大学 (神奈川県川崎市)

(7) 古谷 将彦, 中野 泰一, 田坂 昌生
Auxin response links two types of PIN1 polarization in phyllotactic organogenesis
第55回日本植物生理学会年会, 2014年3月18-20日, 富山大学 (富山県富山市)

(8) 古谷 将彦, 中野 泰一, 田坂 昌生
器官発生過程におけるオーキシン極性輸送制御機構
日本植物学会第77回大会, 2013年9月13-15日, 北海道大学 (北海道札幌市)

(9) 古谷 将彦, 阪本 展仁, 田坂 昌生
PINタンパク質の細胞膜近傍の動態制御
日本植物学会第77回大会, 2013年9月13-15日, 北海道大学 (北海道札幌市)

〔図書〕 (計 0件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

古谷 将彦 (FURUTANI, Masahiko)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・准教授
研究者番号：10432593

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：