

生殖制御研究チーム

Laboratory for Reproductive Growth Regulation

チームリーダー 南原英司

NAMBARA, Eiji

当研究チームでは、休眠器官である種子と側芽に着目して、植物が自己の生長を積極的に止めるメカニズムを研究している。植物は自己の生長をただ止めるわけではなく、休眠器官は環境に対する適応能力を最大限に発揮することができる。さらに、このような器官は様々な植物ホルモンの活躍の場でもあり、植物ホルモンの協調的作用を理解する上で格好のターゲットでもある。当研究チームでは、アブシジン酸 (ABA) の量と感受性の調節メカニズムを軸として、突然変異と分子マーカーとなるプロモーターを網羅的に収集することによって、休眠の遺伝メカニズムを理解することを目的としている。これら遺伝因子は、種子寿命の調節や種子における有用物質生産のための有用遺伝子を提供してくれるであろう。

1. シロイヌナズナ種子の新規 ABA-insensitive mutant の分離 (南原, 篠田)

ABA は種子休眠を誘導し、発芽を阻害する。シロイヌナズナの野生株種子も同様で ABA を含む培地では発芽することができない。この ABA の発芽阻害作用を指標にこれまで、シロイヌナズナで 5 つの ABA 非感受性 (*abi*) 遺伝子座と 3 つの ABA 高感受性遺伝子座が分離されている。しかし、これら遺伝子だけでは ABA の種子での作用を分子レベルで理解することは困難であり、さらなる ABI 遺伝子の検索を行った。ABI 遺伝子座のスクリーニングは (1) ABA アナログである (-)-ABA を併用すること, (2) 基本培地の条件を検討すること, (3) 複数のエコタイプから変異株を選抜することによってこれまでのスクリーニングとは違うターゲット集団が得られるように配慮した。さらに、EMS を変異原とした M2 種子を中心にスクリーニングを行うことによって、遺伝子欠損のみならず特定のドメインのみに欠損を起こす変異や機能獲得型変異も得られるように配慮した。スクリーニングの結果、約 50 株の独立な *abi* 変異を同定し、24 株について遺伝解析を終えた。

2. 種子の ABA 応答に関わる新規変異の解析 (南原, 山岸, 中林, 北村, 篠田)

現在までに明らかになった変異は 5 つの遺伝子内に存在し、既知の 3 つの転写因子をコードしている ABI 遺伝子 (*ABI3*, *ABI4*, *ABI5*) と 2 つの新規の遺伝子 (*CHO1*, *CHO2*) に分けられた。*ABI3*, *ABI4*, *ABI5* 遺伝子内の変異は、ナンセンス変異とミスセンス変異に分けられ、ミスセンス変異は全て相同遺伝子間で極めて保存されたアミノ酸残基質に生じていることが明らかとなった。一方、2 つの新規遺伝子 (*CHO1*, *CHO2*) については、map-based クローニング法によって遺伝子および変異の同定を行った。*CHO1* 遺伝子については第 5 染色体上の 60 kb の領域に絞

り込み、AP2 ドメイン転写因子をコードしていると考えられる遺伝子内に独立な 3 alleles からそれぞれ変異を同定し、全コード領域を含む cDNA を得た。一方、*CHO2* 遺伝子については現在第 4 染色体の 100 kb の領域に絞り込んでいる。

今回、*ABI3* 遺伝子内に同定した新規ミスセンス変異の同定から、保存された B1 ドメインに生じた変異と、B2 および B3 に生じた変異とは異なった形質を示したことから、B1 ドメインと B2 および B3 ドメインは機能上分けられることが示唆された。さらに、DNA 結合ドメインである B3 ドメインを失った *ABI3* の欠損は極めて弱いものであったことから、B3 ドメインを介さない *ABI3* タンパク質の機能があることを遺伝学的に裏付けた。一方、*ABI4* 遺伝子内の新規ミスセンス変異は保存された領域である AP2 ドメイン内の保存性の高いアミノ酸残基に限定されたこと、また独立な変異株が定性的な違いを示した *ABI3* と異なり、10 以上の独立な *abi4* 変異の形質が定量的なレベルで説明できることから、*ABI4* タンパク質を介した種子での ABA 感受性獲得は比較的シンプルな機能によることが示唆された。また、*abi5* 変異の 1 つはリン酸化される可能性が指摘されているスレオニン残基を破壊していることから、このアミノ酸残基が機能獲得の上で重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、これら ABI タンパク質の機能とタンパク質の量との相関を調べるために、それぞれに対する抗体を作製し、これら抗体が目的タンパク質を認識できることを確認した。

3. トマト ABA 欠損変異株 *sitiens* の原因変異の同定 (中林, 岡本*)

東京都立大学の小柴教授との共同研究により、ABA 生合成経路の最終段階の abscisic aldehyde (ABAld) から ABA への反応を触媒するトマトのアルデヒド酸化酵素 (AO) 遺伝子の同定を試みている。*sitiens* 遺伝子座はトマトで知られている 4 つの ABA 生合成欠損遺伝子座の 1 つで、AO の構造遺伝子に変異が生じている可能性が指摘されていた。まず、*sitiens* 変異株では ABAld から ABA への合成ステップに欠損があるかを生化学的に証明するために、粗抽出液を用いた酵素活性の測定を行ったところ、野生型で見られる ABAld 酸化活性が *sitiens* では検出されなかった。次に、様々なアルデヒド化合物を基質に用いた活性染色から、*sitiens* では ABAld に対する特異性が高い AO に欠損が生じていることが分かった。さらに、ABAld 特異的なシロイヌナズナ AO 遺伝子を *sitiens* に形質転換したところ、*sitiens* の顕著な形質全て (萎れ, 成長異常, わい化, 種子休眠の低下) が野生型並みに回復した。これらの結果から、*sitiens* の欠損は ABAld 酸化酵素に極めて限定されること

が明らかとなった。これまでに、トマトでは3つのAO遺伝子(TAO1, TAO2, TAO3)が知られている。これらTAO遺伝子の発現を調べたところ、TAO3遺伝子の発現のみが乾燥もしくはABA投与によって誘導されることが明らかとなった。現在、TAO3がSITIENS原因遺伝子であるか調べるためにシークエンスを行っている。

4. 側芽休眠に連動して動くプロモーターの同定と解析 (立松, 森)

側芽は主茎の芽が生長しているときは、休眠状態にある。この休眠芽で発現している遺伝子群の発現パターンを網羅的に理解するために、Affimatrix社のGene Chipを用いて芽の休眠に連動した発現パターンを示す遺伝子群を検索した。休眠解除によって発現が増える、もしくは、減る遺伝子群をそれぞれ約150個得た。これらの中で発現が比較的強い遺伝子5つをもとにプロモーター:GUS融合遺伝子の形質転換植物を作成してその発現パターンを解析し、休眠芽と主茎の連結部で発現を誘導するプロモーター、休眠芽を取り巻く包葉で強く発現するプロモーターを得た。さらに、これら形質転換植物の中のいくつかは乾燥種子でも強く発現していることが明らかとなり、種子と芽の休眠は少なくとも部分的に共通する遺伝子発現調節系を有していることが示唆された。

また、最小プロモーター:GUS遺伝子を導入した形質転換植物集団をスクリーニングして約10個の側芽でGUSを強く発現するラインを得た。これらには、休眠芽で強くGUSを発現しているラインと、休眠解除に伴って強くGUSを発現しているラインを得た。

* 研修生

Research Subjects and Members of Laboratory for Reproductive Growth Regulation

1. Study on Seed Dormancy in Arabidopsis
2. Study on Bud Dormancy in Arabidopsis
3. Study on Metabolic Regulation in Seeds
4. Study on Seed Longevity

Laboratory Head

Dr. Eiji NAMBARA

Research Scientists

Dr. Kazutoshi YAMAGISHI
Dr. Kazumi NAKABAYASHI
Dr. Kiyoshi TATEMATSU

Technical Staffs

Dr. Sayaka KITAMURA
Ms. Shoko SHINODA

Ms. Yoko MORI

Visiting Members

Dr. Tomokazu KOSHIBA (Tokyo Metrop. Univ.)

Trainees

Mr. Masanori OKAMOTO (Tokyo Metrop. Univ.)

誌上発表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Kushiro M., Nakano T., Sato K., Yamagishi K., Asami T., Nakano A., Takatsuto S., Fujioka S., Ebizuka Y., and Yoshida S.: "Obtusifoliol 14 α -demethylase (CYP51) antisense *Arabidopsis* shows slow growth and long life", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 98-104 (2001). *

Kanamaru K., Nagashima A., Fujiwara M., Shimada H., Shirano Y., Nakabayashi K., Shibata D., Tanaka K., and Takahashi H.: "An arabidopsis sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts", *Plant Cell Physiol.* **42**, 1034-1043 (2001). *

(総説)

神谷勇治, 山口信次郎, 南原英司: "ジベレリンと光種子発芽", *日本農芸化学会誌* **76**, 32-34 (2002).

(その他)

Eckardt N. A., Araki T., Benning C., Cubas P., Goodrich J., Jacobsen S. E., Masson P., Nambara E., Simon R., Somerville., and Wasteneys.: "Arabidopsis research 2001", *Plant Cell* **13**, 1973-1982 (2001).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Nambara E., Abrams S., and McCourt P.: "Identification of new mutations that alter seed ABA responsiveness in *Arabidopsis* using a stereoisomer of abscisic acid", 12th Int. Conf. on Arabidopsis Research, Madison, USA, June (2001).

(国内会議)

南原英司, 神谷勇治, McCourt P.: "シロイヌナズナ(-)-ABA非感受性変異株の分離と解析", 植物化学調節学会第36回大会, 富山, 10月(2001).

岡本昌憲, Min X., 瀬尾光範, 中林一美, 神谷勇治, 南原英司, 小柴共一: "Sitiensにおけるシロイヌナズナのアルデヒド酸化酵素遺伝子AAO3導入によるABAの回復", 日本植物生理学会2002年度年会, 岡山, 3月(2002).

立松圭, 神谷勇治, 南原英司: "シロイヌナズナ側芽での休眠機構に関与する遺伝子群の発現解析", 日本植物生理学会2002年度年会, 岡山, 3月(2002).