

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

植物は適した環境で生長するために、不適当な条件では防御を固めて生長を止める。一般に全ての生物で、生長調節はストレス耐性や一次代謝と密接に関わり合って調節されていることが知られている。休眠器官は固有の代謝調節やストレス耐性能を獲得する。ハス種子のように千年も眠っていたと思われる例も知られている。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生長制御のメカニズムを研究している。特に、種子休眠において、植物ホルモンのアブジシン酸 (ABA) は重要な役割を担っていることが知られており、ホルモンの代謝レベルの調節とシグナル伝達のメカニズムに焦点を絞って遺伝学的かつゲノム科学的手法を用いて研究している。これら遺伝子は、種子固有の代謝調節や有用物質生産、ならびに、ストレス耐性植物作成のための有用な情報を提供してくれるであろう。

1. ABA 生合成・代謝とその調節に関する研究 (岡本^{*1}, 篠田, 瀬尾^{*2}, 久城, 小柴^{*3}, 南原)

ABA の不活性化は酸化経路と配糖化経路に大別され、これらの中で ABA 8' 水酸化反応が引き金となる経路は ABA 量を調節する主要な ABA 不活性化経路であることが知られていた。当研究チームでは、未同定であった主要な ABA 代謝酵素である ABA 8' 水酸化酵素遺伝子 (CYP707A) をシロイヌナズナからゲノム情報を元に同定した (昨年度年報)。データベースの配列情報から、イネ、コムギ、トマト、大豆、ヒメツリカネゴケなどで CYP707A 様配列が存在する。また、共同研究によってレタス、大麦にも同様に存在することを確認しており、CYP707A 遺伝子は植物界に広く保存されている。シロイヌナズナのゲノムには4つの CYP707A 遺伝子があり、発芽時に一過的に活性化される CYP707A2 遺伝子が休眠打破において重要である。それ以外の器官では、複数の CYP707A 遺伝子が発現しており、これら遺伝子の突然変異株を解析しても顕著な形質を示さないことが多い。

CYP707A はチトクロム P450 (P450) 型酵素であり、既知の P450 阻害剤を用いて発現タンパク質の酵素活性の阻害効果を検討した。ABA 8' 水酸化活性は Methylapone では活性が阻害されなかったが、Tetacyclacis によって阻害された。そこで、市販の阻害剤を用いて調べたところ、ジベレリン (GA) やブラシノライドの生合成を阻害することが知られている Uniconazole-P が最も効率的に in vitro で CYP707A の活性を阻害することが分かった。そこで、Uniconazole-P がシロイヌナズナ植物体でも活性を阻害することができるか調べるために、Uniconazole-P 処理した植物の ABA 量および主要な代謝物であるファゼイン酸 (PA) 量を測定した。Uniconazole-P 処理した乾燥植物では対照区と比べて顕著な ABA 量の増加と PA 量の減少が見られた。このことから、Uniconazole-P を短時間処理した場合に見られる ABA の増加は CYP707A の活性の阻害によるものであると結論付けた。また、Uniconazole-P 処理した植物は、ABA 量の増加と共に乾燥耐性を示したことから、選択的な CYP707A の阻害剤は植物にストレス耐性を付与できることを裏付けた。

ABA はカロテノイドの酸化的開裂後に、short-chain アルコールデヒドロゲナーゼ、アルデヒド酸化酵素 (AO) によって ABA に変換される。シロイヌナズナでは4つの AO 遺伝子が知られており、植物体が乾燥に曝されたときにはその中の1つである AAO3 が ABA 合成に関与することが知られていた。それに対して、*ao3* 変異株種子における ABA 量の減少は他の ABA 生合成酵素の欠損変異株と比べてわずかであったことから、別の AO 遺伝子も種子 ABA 生合成に関与している可能性が示唆されていた。二重変異株を用いた解析では、実際、*ao3* 変異株種子では他の AO 遺伝子も ABA 合成の最終段階を触媒することが示唆された。しかしながら、生化学的解析などから他の AO 遺伝子は生理的条件では ABA 合成に積極的には関与していなく、AAO3 遺伝子が種子においても主要な ABA 合成に関与する AO であると考えられた。

2. シロイヌナズナ種子の新規 ABA-insensitive mutant の分離と解析 (中林, 北村, Preston^{*3}, 立松, 岡本, 南原)

(1) ABA-insensitive 変異株における種子の遺伝子発現プロファイル

植物種子には多様で大量な mRNA が蓄積されており、これらは貯蔵型 mRNA と言われている。貯蔵型 mRNA は種子登熟期に機能する型と吸水後に機能する型が混在しており、吸水初期の生理に関与していると考えられている。我々は約 23,000 個のシロイヌナズナ遺伝子の発現を解析できる Affymetrix 社の GeneChip を用いて種子吸水時の遺伝子発現プロファイルのゲノムレベルでの解析を行った。

GeneChip による発現解析の結果、乾燥種子から 10,000 種類以上の mRNA が検出された。これら遺伝子の吸水時の経時的発現パターンは、吸水後に mRNA 量が減少するものと増加するものに大別された。発芽は吸水後約 30 時間後に起こるが、種子吸水 6 時間後には既にゲノムレベルの遺伝子発現プロファイルが乾燥種子と比べて大きく変化していた。このことから、吸水時の遺伝子発現の変化は比較的早い段階から起こっていることが示された。

乾燥種子で検出された mRNA 遺伝子は染色体上でランダムに分布しているわけではなく、通常、発現遺伝子は3~5個染色体上で隣接していた。また、吸水後に mRNA が増加および減少する場合も同様に隣接遺伝子は同じ発現パターンを示す場合が多かった。

多量に乾燥種子で mRNA を蓄積している遺伝子にはその上流域に ABA 応答配列 (ABRE) が高頻度に存在していた。種子における ABRE を介した遺伝子発現の活性化は bZIP 型転写因子である ABI5 によって仲介される。abi5 変異株の乾燥種子を用いて同様に GeneChip による発現解析を行ったところ、abi5 変異株で mRNA 量が減少している遺伝子群は ABRE を高頻度に有するのに対して、増加している遺伝子群にはその傾向が見られなかった。このことから、ABI5 は主に ABRE を介した転写活性化に関わるが、抑制機構には ABRE を必要としないことが示唆された。さらに、abi5 変異株で野生型種子と比べて発現が変化している遺伝子群は染色体で隣接している頻度が高かったことから、ABI5 による遺伝子の活性化は個別の遺伝子レベルのみならず、隣接した遺伝子も一緒に制御していると考えられた。

(2) ABA-insensitive 遺伝子の同定と機能解析

当研究チームでは、これまで天然型の (+)-S-ABA と天然には存在しない ABA アナログである (-)-R-ABA を用いて、種子の ABA 感受性が変化したシロイヌナズナの突然変異株を分離・解析してきた。これまで、既知の ABI3, ABI4, ABI5 遺伝子の変異に加えて、(-)-R-ABA-insensitive loci として CHO1, CHO2 の2つの新規遺伝子座を、また、(+)-S-ABA-insensitive loci として SAB1, SAB2 の2つの新規遺伝子座を同定した。CHO1 遺伝子および CHO2 遺伝子の機能を解析するために、遺伝学的解析、GeneChip を用いた遺伝子発現プロファイルの解析を行った。CHO1 遺伝子は新規の転写因子をコードすると考えられる。遺伝子発現プロファイルの解析から CHO1 と CHO2 は種子休眠から発芽に移行する過程で一次代謝とその情報伝達経路を調節していることが示唆された。また、(+)-S-ABA-insensitive 遺伝子である SAB1 遺伝子および SAB2 遺伝子を Positional cloning 法により遺伝子を同定し、発現解析を現在行っている。

3. 側芽休眠時の遺伝子発現プロファイルの解析 (立松, 南原)

植物の側芽の生長は頂芽によって抑制されており、頂芽を切除することによって休眠中の側芽の生長が活性化される (頂芽優勢)。休眠側芽では、休眠中に強く発現している遺伝子や休眠打破後に活性化される遺伝子がいくつか報告されているが、それら生長と連動した遺伝子発現の調節機構は分子レベルではほとんど理解されていない。

シロイヌナズナの茎頂除去前後 (0 および 24 時間後) に側芽を用いて、側芽休眠解除時の遺伝子発現プロファイルを解析した。茎頂除去後に発現が低下する遺伝子群のプロモーターには糖抑制配列 (SRE) 様のエレメントが高頻度に見られた。それに対して、発現が増加する遺伝子群の上流域には ribosomal protein 遺伝子の発現に関わることが知られている site II モチーフと telo box が高頻度に見られた。Site II モチーフは TCP 転写因子の標的配列であり、

telo box は AtPerea 転写因子の標的配列である。個々のエレメントを並列に繋げた合成プロモーター：レポーター遺伝子 (GUS) を用いてこれらエレメントの評価を行った。SRE は糖添加によってレポーター遺伝子の発現を低下させたが、茎頂除去に応答した遺伝子発現の低下は見られなかった。それに対して、site II モチーフは茎頂除去に応答したレポーターの活性化を誘導した。telo box は、site II モチーフと共に用いると site II 単独の場合よりも茎頂除去に応答したレポーター遺伝子の活性化を強めた。以上の結果から、site II と telo box は協調的に茎頂除去に応答した遺伝子発現の活性化に関わるシス配列であると結論付けた。

従来の研究では側芽休眠解除に連動した遺伝子発現を示すマーカー遺伝子として ribosomal protein 遺伝子やサイクリン遺伝子などが報告されていた。Site II モチーフと telo box を上流域に有する遺伝子群は、タンパク質合成や細胞周期に関する遺伝子を高頻度に含んでおり、従来の側芽休眠解除マーカーとして遺伝子群の調節にはこれらモチーフを標的配列とする TCP 転写因子等を介した遺伝子発現調節が関与していることが強く示唆された。それに対して、休眠時の発現に関与することが示唆された SRE 配列を有する遺伝子群には顕著に代謝関連遺伝子が多く存在した。このことから、SRE は側芽休眠時の器官特異的な代謝調節に関与していることが示唆された。

*1 ジュニア・リサーチ・アソシエイト, *2 基礎科学特別研究員, *3 訪問研究員

This team studies the molecular mechanism of plant growth regulation, especially seed dormancy. The goal of our research is to elucidate the molecular basis of the developmental and metabolic regulation in the seed for the finer genetic manipulation of seeds. Our current research is focused on studying the regulatory mechanisms of ABA metabolism and response in Arabidopsis. We have conducted forward and reverse genetic approaches to identify Arabidopsis genes that regulate ABA action. In addition, we have performed comparative study on gene expression profiles in seeds and buds.

Research Subjects

1. Study on the regulation of ABA metabolism
2. Study on the mechanisms by which defines ABA sensitivity in Arabidopsis seed
3. Comparative study on regulatory mechanisms underlying seed dormancy and bud dormancy

Staff

Laboratory Head

Dr. Eiji NAMBARA

Research Scientist

Dr. Tetsuo KUSHIRO

Dr. Kazumi NAKABAYASHI
Dr. Kiyoshi TATEMATSU
Dr. Sayaka KITAMURA

Technical Staff

Ms. Sachiyo HARADA
Ms. Shoko SHINODA

Special Postdoctoral Researcher

Dr. Mitsunori SEO

Junior Research Associate

Mr. Masanori OKAMOTO

in collaboration with

Dr. Hideki TAKAHASHI (Lab. Metab. Compartmentation, PSC)
Dr. Shinjiro YAMAGUCHI (Lab. Cell. Growth Dev., PSC)

Visiting Members

Dr. Naoto KAWAKAMI (Fac. Agric., Meiji Univ.)
Dr. Tomokazu KOSHIBA (Fac. Sci., Tokyo Metrop. Univ.)
Dr. Ottoline LEYSER (York Univ., UK)
Dr. Peter MCCOURT (Univ. Toronto, Canada)
Dr. Masaharu MIZUTANI (Fac. Agric., Kyoto Univ.)
Dr. Jeremy PRESTON

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

- Gazzarrini S., Tsuchiya Y., Lumba S., Okamoto M., and McCourt P.: "The Transcription Factor *FUSCA3* Controls Developmental Timing in *Arabidopsis* through the Hormones Gibberellin and Absciscic Acid", *Dev. Cell* **7**, 373–385 (2004). *
- Kushiro T., Okamoto M., Nakabayashi K., Yamagishi K., Kitamura S., Asami T., Hirai N., Koshiba T., Kamiya Y., and Nambara E.: "The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism", *EMBO J.* **23**, 1647–1656 (2004). *
- Seo M., Aoki H., Koiwai H., Kamiya Y., Nambara E., and Koshiba T.: "Comparative studies on the *Arabidopsis* aldehyde oxidase (*AAO*) gene family revealed a major role of *AAO3* in ABA biosynthesis in seeds", *Plant Cell Physiol.* **45**, 1694–1703 (2004). *
- Tsuchiya Y., Nambara E., Naito S., and McCourt P.: "The *FUS3* transcription factor functions through the epidermal regulator *TTG1* during embryogenesis in *Arabidopsis*", *Plant J.* **37**, 73–81 (2004). *
- Tian C., Muto H., Higuchi K., Matamura T., Tatematsu K., Koshiba T., and Yamamoto K. T.: "Disruption and

overexpression of *auxin response factor 8* gene of *Arabidopsis* affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in right condition", *Plant J.* **40**, 333–343 (2004).

*

Koiwai H., Nakaminami K., Seo M., Mitsuhashi W., Toyomasu T., and Koshiba T.: "Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, *AAO3*, in *Arabidopsis*", *Plant Physiol.* **134**, 1697–1707 (2004).

*

Nakabayashi K., Okamoto M., Koshiba T., Kamiya Y., and Nambara E.: "Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed", *Plant J.* **41**, 697–709 (2005). *

(総説)

Nambara E. and Marion-Poll A.: "Absciscic acid biosynthesis and catabolism", *Ann. Rev. Plant Biol.* **56**, 165–185 (2005).

南原英司, 岡本昌憲, 久城哲夫: "ABA 不活性化酵素 CYP707 遺伝子の同定と機能解析: 種子休眠の覚醒遺伝子", *ブレインテクノニュース* **104**, 26–29 (2004).

南原英司, 岡本昌憲: "アブシジン酸とジベレリンのクロストーク", *細胞工学別冊: 植物細胞工学シリーズ 20 「植物ホルモンのシグナル伝達」*, pp. 125–132 (2004).

(その他)

久城哲夫, 南原英司: "ABA の代謝に関わるシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ", *細胞工学別冊: 植物細胞工学シリーズ 20 「植物ホルモンのシグナル伝達」*, pp. 133–136 (2004).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Toh S., Yoshida T., Imamura A., Nakabayashi K., Okamoto M., Hanada A., Yamaguchi S., Kamiya Y., Nambara E., and Kawakami N.: "Expression of ABA and GA related genes in thermoinhibited *Arabidopsis* seeds", 3rd Int. Symp. on Plant Dormancy, Wageningen, The Netherlands, May (2004).
- Tatematsu K., Kamiya Y., and Nambara E.: "Gene expression profile in bud dormancy in *Arabidopsis thaliana*", 3rd Int. Symp. on Plant Dormancy, (International Society for Seed Science), Wageningen, The Netherlands, May (2004).
- Nambara E.: "ABA-mediated seed dormancy in *Arabidopsis*", Workshop on Molecular Aspects of Seed Germination and Dormancy, (International Society for Seed Science), Wageningen, The Netherlands, May (2004).
- Nambara E.: "ABA action during seed dormancy and germination in *Arabidopsis*", 18th Int. Conf. on Plant Growth Substances (IPGSA Conf. 2004), Canberra, Australia, Sept. (2004).
- Nomura T., Bishop G. J., Kushiro T., Yokota T., Kamiya Y., and Yamaguchi S.: "Cytochrome P450 enzymes responsible for brassinolide biosynthesis", 18th Int. Conf. on Plant Growth Substances (IPGSA Conf. 2004), Can-

- berra, Australia, Sept. (2004).
- Kushiro T., Okamoto M., Nakabayashi K., Hirai N., Asami T., Kamiya Y., and Nambara E.: "Identification of *Arabidopsis* cytochrome P450 gene responsible for ABA catabolism", 18th Int. Conf. on Plant Growth Substances (IPGSA Conf. 2004), Canberra, Australia, Sept. (2004).
- Preston J., Nakabayashi K., Tatematsu K., Kamiya Y., and Nambara E.: "Transcriptional profiling of *arabidopsis* seed germination", 18th Int. Conf. on Plant Growth Substances (IPGSA Conf. 2004), Canberra, Australia, Sept. (2004).
- (国内会議)
- 久城哲夫, 岡本昌憲, 中林一美, 平井伸博, 浅見忠男, 小柴共一, 神谷勇治, 南原英司: "ABA の代謝に関わるシロイヌナズナ ABA8'-水酸化酵素遺伝子の同定", 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 中林一美, 神谷勇治, 南原英司: "シロイヌナズナ野生型および *abi5* 突然変異体の種子での発現プロファイリング", 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 立松圭, 神谷勇治, 南原英司: "シロイヌナズナ腋芽休眠に関わる遺伝子発現を制御するシス因子の解析", 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 南原英司: "休眠器官の遺伝子発現プロファイルを規定する因子", 日本植物生理学会 2004 年度年会および第 44 回シンポジウム, 八王子, 3 月 (2004).
- 安田美智子, 浅見忠男, 瀬尾光範, 久城哲夫, 南原英司, 神谷勇治, 吉田茂男, 仲下英雄: "環境ストレスによる全身獲得抵抗性誘導の抑制機構の解析", 第 22 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 秋田, 8 月 (2004).
- 南原英司, 山岸和敏, 北村さやか, 中林一美, 神谷勇治: "シロイヌナズナ種子発芽時のアブシジン酸を介した炭素系化合物代謝の調節", 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 立松圭, 中林一美, 神谷勇治, 南原英司: "休眠打破後の生長制御に関わる *cis* 因子の解析", 日本植物学会第 68 回大会, 藤沢, 9 月 (2004).
- 野村崇人, Bishop G. J., 久城哲夫, 横田孝雄, 神谷勇治, 山口信次郎: "トマトのブラシノライド生合成酵素の同定", 植物化学調節学会第 39 回大会, 秋田, 10 月 (2004).
- 川島明子, 安田美智子, 浅見忠男, 梅澤泰史, 篠崎一雄, 瀬尾光範, 久城哲夫, 南原英司, 神谷勇治, 野尻秀昭, 山根久和, 吉田茂男, 仲下英雄: "ABA 内生量が全身獲得抵抗性に及ぼす影響の解析", 植物化学調節学会第 39 回大会, 秋田, 10 月 (2004).
- 篠田祥子, 岡本昌憲, 久城哲夫, 神谷勇治, 南原英司: "シロイヌナズナ ABA8'-水酸化酵素 CYP707A2 の生化学的解析: 種子生理における役割", 植物化学調節学会第 39 回大会, 秋田, 10 月 (2004).
- 青木美紀, 岩田修, 納富美穂, 三橋渉, 井上康則, 久城哲夫, 南原英司, 神谷勇治, 豊増知伸: "光発芽レタス種子におけるアブシジン酸代謝酵素遺伝子のクローニングと発現解析", 植物化学調節学会第 39 回大会, 秋田, 10 月 (2004).
- 蝶野真喜子, 本多一郎, 中村信吾, 安倍史高, 篠田祥子, 神谷勇治, 南原英司, 川上直人, 金子成延, 渡邊好昭: "種子成熟過程におけるオオムギ未熟胚の内生 ABA 量の調節", 植物化学調節学会第 39 回大会, 秋田, 10 月 (2004).