

長期間派遣成果報告

「高等植物の胚発生プログラムを制御する
シロイヌナズナ *LEAFY COTYLEDON2* 遺伝子の解析」

東京大学 本瀬 宏康

派遣期間 2004年4月10日～2005年4月9日

研究機関 University of California, Davis

研究指導者 Dr. John J. Harada

種子形成は高等植物の生活環において不可欠な過程である。種子は、過酷な環境から胚を保護・保存し、発芽後の栄養分を提供するため、精巧にデザインされている。種子形成は、形態形成過程と成熟過程の2つに大きく分けられ、形態形成と成熟過程が協調して進行することにより、正常な種子形成が行われる。形態形成と成熟過程の協調機構についてはほとんどわかっていないが、モデル植物であるシロイヌナズナを用いた分子遺伝学的解析により、3つの転写制御因子 LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)、LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)、FUSCA3 (FUS3) が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。これらの遺伝子の変異体では、形態形成と成熟過程の双方に欠損があり、胚としての性質・機能が低下し、成熟過程をスキップして種子の中で発芽後の成長プログラムが進行する。具体的には、子葉の本葉化・種子貯蔵物質の蓄積低下・休眠性と乾燥耐性の低下が起こる。LEC1 は CCAAT 結合因子の HAP3 サブユニット、LEC2 と FUS3 は植物固有の B3 ドメイン型転写制御因子であり、転写を制御していると考えられているが、標的遺伝子や下流の経路についてはほとんどわかっていない。また、LEC1、LEC2、FUS3 がお互いにどのような関係で働くか、他の遺伝子とどのように相互作用しているかについても不明な点が多く残されている。本研究では、LEC2 に着目し、*lec2* 変異体の表現型を回復させるサプレッサー変異の単離、および LEC2 の下流遺伝子の探索を試みた。

1. *lec2* サプレッサー変異体の単離と解析

LEC2 と関連して働く遺伝子・経路を明らかにするため、*lec2-1* のサプレッサー変異体の単離を試みた。*lec2-1* は、LEC2 遺伝子のプロモーターから第2イントロンの途中までが欠失したヌルアレルであり、extragenic なサプレッサーのみが単離されると考えられる。*lec2-1* の種子をエチルメタンスルホン酸 (EMS) で処理し、寒天培地に播種して M1 世代を育成した。変異処理を最適化するため、EMS 濃度について検討したところ、0.10% から 0.15% の EMS 濃度で *lec2-1* の種子を処理するのが最適であることがわかった。

M1 植物体を約 5000 個体育成し、M2 種子を回収した。1 週間ほど室温で乾燥させた約 100000 の M2 種子を寒天培地に播種し、子葉の表現型を指標にサプレッサー変異体のスクリーニングを行った。登熟乾燥後の種子から発芽した *lec2-1* 個体では、乾燥耐性の低下により子葉の全体が消失したり、先端部が欠けてノッチ型の子葉を呈する。スクリーニングでは、2 枚の子葉が丸く、野生型

と同様な個体を選抜した。

lec2-1 では個体差があり、10-20%以下の個体が野生型に近い表現型を示すため、サプレッサーにおける表現型の回復の程度を定量化する必要がある。サプレッサー候補として選抜した各 M2 個体から、M3 種子を回収し、寒天培地上に播種して、50%以上の個体が野生型の表現型を示す 92 の M2 系統を選抜した。92 の M2 系統を PCR により遺伝子型診断したところ、71 系統が *lec2-1* ホモ接合体であり、真のサプレッサー変異体であることが判明した。また、15 系統は *LEC2/lec2-1* であり、野生型の花粉が受粉したものであること、2 系統は *LEC2/LEC2* であり、野生型の種子が混入したものであることがわかった。

サプレッサー変異体と考えられる M2 の 71 系統のうち 27 系統は、比較的強いサプレッサー系統であり、70-100%の個体が野生型の表現型を示した。そこで、これら 27 系統について各 M3 個体から M4 種子を回収し、各 M3 系統における発芽率と子葉の表現型の回復率をプロットして、表現型の回復の度合いを評価した。*lec2-1* では約 20-40%の種子が発芽し、発芽した実生のうち 20%以下のものが野生型に近い子葉を持つ。M2 の 27 系統のうち、3 系統(#1-20, #1-27, #5-17) は 70%以上の発芽率と子葉の回復率を、3 系統(#1-18, #1-29, #5-10) は 60%以上の発芽率と子葉の回復率を、3 系統(#7-6, #12-11, #12-15) は 50%以上の発芽率と子葉の回復率を示した。発芽率と子葉の回復率には正の相関が認められたが、1 系統(#1-23)では、子葉の表現型が 80%以上回復したが、発芽率は 30%以下と低く、発芽率と子葉の回復率に相関がない唯一の系統だった。

サプレッサーのスクリーニングにおいては、野生型の種子の混入や野生型花粉の受粉が問題となる。そこで、*lec2-1 ilr1-1* 二重変異体を用いて、*lec2-1* のサプレッサーをスクリーニングすることにした。ILR1 はロイシン型インドール酢酸 (IAA-Leu) をインドール酢酸 (IAA) とロイシンに分解する酵素であり、野生型の個体を IAA-Leu 存在下で生育すると、ILR1 の作用により IAA-Leu から IAA が生じ、根の伸長が阻害される。*ilr1-1* 変異体では IAA-Leu 分解活性がないため、IAA-Leu 存在下でも IAA が生成されず、根が伸長する。*lec2-1 ilr1-1* に野生型の種子や花粉が混入すると、IAA-Leu 存在下で根の伸長が阻害される個体として識別できる。

lec2-1 ilr1-1 の種子を EMS で処理し、40 μ M の IAA-Leu を含む寒天培地に播種して M1 世代を育成した。IAA-Leu に対して耐性を示す 3300 の M1 個体から M2 種子を回収した。20000 の M2 個体をスクリーニングし、約 1000 の M2 個体をサ

プレッサー候補として選抜した。これらサプレッサー候補は IAA-Leu に対して耐性を示し、野生型と同様の子葉を持っていた。各 M2 個体から M3 種子を回収し、子葉の表現型の回復率と発芽率を測定した。これまでに、約 300 の M2 系統について検討し、50%以上の個体が野生型の表現型を示す 25 系統をサプレッサー候補として選抜した。

lec2 変異体では、種子としての性質が低下しており、種子形成中に発芽後の発生プログラムが開始され、子葉の本葉化・乾燥耐性の低下・種子貯蔵物質の蓄積低下・休眠性の低下といった多面的な表現型を示す。今回単離された *lec2* サプレッサー系統のほとんどにおいて、これらの多面的な欠損が回復することから、サプレッサー変異体の原因遺伝子は、LEC2 により制御される根本的な機構に関与していると考えられる。特に、胚の形態形成と種子成熟機構の協調に関与している可能性が高い。今後は、サプレッサー変異体のより詳細な特徴付けと原因遺伝子の同定により、未知の種子形成機構の一端が解明されると思われる。

2. 培養細胞を用いた LEC2 の解析

培養細胞は個体を用いる解析よりも時間がかからず、細胞を大量に得ることができるため、生化学的・分子生物学的解析に適しているが、シロイヌナズナではあまり用いられておらず、培養系を遺伝学やゲノミクスと関連させた研究も少ない。本研究では、LEC2 と哺乳類のグルココルチコイドレセプターの融合タンパク質 (LEC2-GR) を発現する培養細胞を用いて、LEC2 の下流で起こる現象について解析した。この培養細胞では、哺乳類のステロイドホルモンであるデキサメタゾン添加により、LEC2-GR が細胞質から核へ移行し、LEC2 の転写制御因子としての活性が誘導される。

カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (35S) の下流で LEC2-GR を発現する形質転換体 (*35S:LEC2-GR*) の根外植片、又は、胚をカルス誘導培地で培養し、培養細胞を作成した。同様に、野生型 (非形質転換体) の根と胚からも同様に培養細胞を作成した。

35S:LEC2-GR 培養細胞にデキサメタゾンを添加すると、約 3-4 週間後にカルスの表面から不定胚が形成された。野生型培養細胞や、デキサメタゾン処理しなかった *35S:LEC2-GR* 培養細胞では、通常の細胞増殖が観察されるものの、不定胚形成は見られなかった。また、根由来の培養細胞と胚由来の培養細胞で、

不定胚形成率に差はなかった。

次に、種子特異的な遺伝子の発現を解析した。35S:LEC2-GR培養細胞では、デキサメタゾン添加24時間後に、種子貯蔵タンパク質をコードする2S3アルブミン、12Sグロブリン、オレオシン、クルシフェリンA遺伝子が誘導された。野生型培養細胞や、デキサメタゾン処理しなかった35S:LEC2-GR培養細胞では、これらの遺伝子は発現しなかった。

次に、種子貯蔵タンパク質以外の遺伝子の発現を解析した。胚発生においてLEC2と協調して働くと考えられるTANMEI遺伝子は恒常的に発現しており、デキサメタゾン添加によるLEC2活性の誘導の影響を受けなかった。また、FUS3により発現が抑制されるジベレリン合成酵素(GA3オキシダーゼ、GA20オキシダーゼ)もLEC2活性誘導と関連がないことがわかった。

以上の結果から、LEC2は胚発生プログラムを誘導すること、胚発生誘導に先駆けて、種子特異的な遺伝子発現を誘導することが判明した。また、FUS3はLEC2によく似た転写制御因子であり、種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現を誘導するが、ジベレリン合成系などにおいてLEC2とは異なる役割を果たすことが示唆された。今後の興味深い課題として、LEC2による不定胚誘導と種子特異的な遺伝子の誘導が、共通の因子を介して起こるのか、または、別々の経路で誘導されるかという問題が挙げられる。今後は、培養細胞を用いた解析により、LEC2と他の遺伝子との相互関係や、LEC2の下流で働く遺伝子の同定が容易になると考えられる。

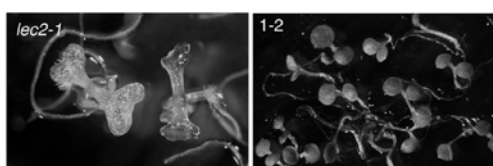


Fig. 1. Cotyledon phenotype of *lec2-1* and a suppressor line #2-1.

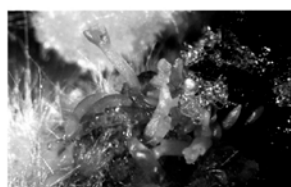


Fig. 3. Somatic embryogenesis of 35S:LEC2-GR cells treated with dexametazon.

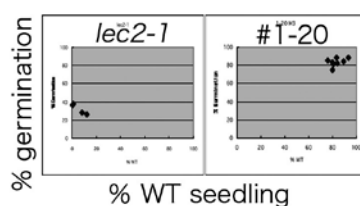


Fig. 2. %WT seedling and %germination of *lec2-1* and a suppressor line #1-20.