山田財団長期間派遣（途中）成果報告

種子形成過程における糖シグナリングの役割

岡崎国立共同研究機構　　大藤雅章
派遣期間　　平成１３年４月１６日～平成１４年３月３１日
研究機関　　Section of Plant Biology, Division of Biological Sciences,
University of California, Davis,
One Shields Avenue, Davis, CA　95616、U.S.A.
研究指導者　　**Dr. John J. Harada,**

(1) 研究の背景

シロイヌナズナやマメ科植物などの種子形成過程は 2 期に大別される。(1) 種子形成初期の形態形成期：胚が細胞分裂を繰り返して形態形成が進む。（2）種子形成の中・後期の登熟期：胚の細胞分裂活性が低下し貯蔵物質蓄積が進行するとともに細胞の肥大が進み、その後乾燥耐性を会得し休眠に入る。一方、胚発生過程を別の視点で考えると、糖を主に細胞構築の原材料として利用する「利用シンク」から、糖をデンプンや脂肪として貯蔵する「貯蔵シンク」への転換がおこる。糖は個体の発生と成長を制御するシグナル因子の一つとしても働くことが近年明らかになり、糖シグナリングはこの発生モードの転換にも関わると推定される。

種子形成過程における糖代謝研究はデンプン性種子であるソラマメで先におこなわれた。維管束を通じて母親組織である種皮に輸送されたショ糖は種皮で細胞外へ放出され、細胞壁結合性インベルターゼ(cwINV) によって単糖に分解されるか、ショ糖のまま子組織の胚に輸送され細胞に取り込まれる（Fig. 1）。形態形成期の胚ではヘキソース含量が高く、登熟期ではショ糖の含量が高い。種皮の cwINV の他に胚の液胞局在型インベルターゼ(vacINV)とショ糖合成酵素によるショ糖分解活性とショ糖リン酸合成酵素活性によるショ糖合成活性とのバランスによって胚組織中の単糖/ショ糖比(Hexose/Sucrose ratio; H/S と略す)が決定される。形態形成期では、高い H/S が胚の細胞分裂活性を促進または維持し、低 H/S (=高 S/H) は細胞が貯蔵型細胞へ転換するのを促進すると推定されている。大きな種子をつけるソラマメの品種では胚の細胞数が多いが、これは高 H/S から低 H/S への変化が遅延することで細胞分裂活性が長く持続したためと推定されている。このように胚の発生過程で、単糖とショ糖という質の違いが胚の細胞の分化方向を決定する重要な要因であると考えられている。しかし、種子における糖代謝遺伝子の制御機構、H/S による細胞の分化方向を決定する分子機構など、明らかにされていない。

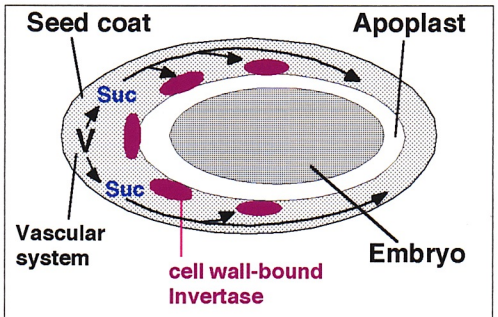

Figure 1. Transport and metabolism of sugar in developing seeds. Sucrose (Suc) from vascular tissue is transported to the most inner tissue of seed coat through cell to cell connection (plasmadesmata). Sucrose is hydrolyzed by cell wall-bound invertase there or transported directly to embryo through apoplast.

申請者は、ショ糖応答性変異株 *unusual sugar response 30 (uns30)* を見出し、大きな種子をつけることを見出した。種子サイズは胚や胚乳の細胞数と細胞サイズで決定されるが、*uns30* 株はこの種子サイズ決定機構に糖がどのような役割を果たす下を明らかにする重要な手がかりを与えるものと期待された。そこで本研究では *UNS30* 遺伝子の構造と機能を明らかにするため、*UNS30* の単離と *uns30* 変異株の表現型

の解析を行った。

(2) 本研究に関するこれまでの研究成果

(A) *UNS30/AP2* 遺伝子の単離： *uns30* 変異は、花ホメオティック遺伝子として知られる *APETALA2* (*AP2*)の DNA 結合部位 (AP2 domain) のコード領域に起きた 11bp の欠失によりひきおこされることが明らかとなった。*uns30* 変異は *ap2-11* 変異と改名した。*ap2-11* は null 変異と推定される。

(B) *ap2* 変異の母性効果が種子サイズに影響する：強い *ap2* 変異株では花のがくが雌ずい化し、雄ずい数が減少するなどして稔性が極端に低下する。このような *ap2* 変異株では種皮が異常な形態を示し種子サイズが顕著に増加する。野性株(Col-0), *ap2-6, ap2-7, ap2-11* で乾燥種子重量を比較するとそれぞれ野性株の 1.5 倍(*ap2-6*)から 1.7 倍(*ap2-7, ap2-11*)であった。稔性の程度は *ap2-6* が一番高く、*ap2-7* と *ap2-11* は同程度で *ap2-6* より低い。稔性が低いことは、母親株からの栄養が一部の種子に集中し、これが種子の巨大化を引き起こすことも考えられる。しかし、雄性不稔変異株に野性株花粉を受粉した F1 種子の解析から、*ap2* での稔性の低下は種子サイズの増大には影響が少ないことが明らかとなった。これら *ap2* 巨大種子でのタンパク質蓄積は、各タンパク質のレベルが一様に増加しており特定の貯蔵タンパク質の蓄積レベルだけが影響を受けることはなく、発芽も正常であった。正逆交配実験では *ap2* を母親株とした場合のみ F1 種子が *ap2* ホモ種子と同じサイズを示し、花粉の遺伝型による影響は全く見られなかった。種子は種皮が母親由来の組織である。一方、子組織である胚と胚乳は、それぞれゲノムが２ｎと３ｎであり、胚のゲノムは父母双方から１ハプロイドづつ遺伝するのに対し、胚乳は２ｎのゲノムを母親から遺伝する。また父親由来の遺伝子の中には、胚乳でインプリントされるものが知られている。従って、以上の結果は、種子サイズの決定のプロセスには、AP2 遺伝子の働きが種皮や胚乳で低下したことが原因である可能性が示唆される。

(C) *ap2*胚の巨大化はtorpedo胚以後の胚の成長によりおこり、これを可能にしているのが胚乳組織の異常発達である。：*ap2*株での種子形成過程を形態レベルで解析した（Fig.2）。Torpedo embryoまでの胚のサイズに野性株との間に顕著な差はない。しかしTorpedo embryo後の胚の成長が*ap2*株では著しく、bent cotyledon embryoでは面積として野性株より2倍近いサイズになる。このような胚サイズの顕著な差にしては乾燥種子になるまでに要する受粉後の日数は、*ap2-7*株で約19 日と野性株より僅か２日間長いのみであった。*ap2-7*乾燥種子の成熟胚の子葉部分の細胞数と細胞サイズ（面積）はともに約1.4倍となり子葉の面積では2倍の大きさとなる。成熟胚での細胞数の増加は、bent cotyledon-stageに野性株では細胞分裂活性が低下する時期にもなお*ap2*胚が高い細胞分裂活性を有していることによるものであることが明らかとなった。一方*ap2*変異

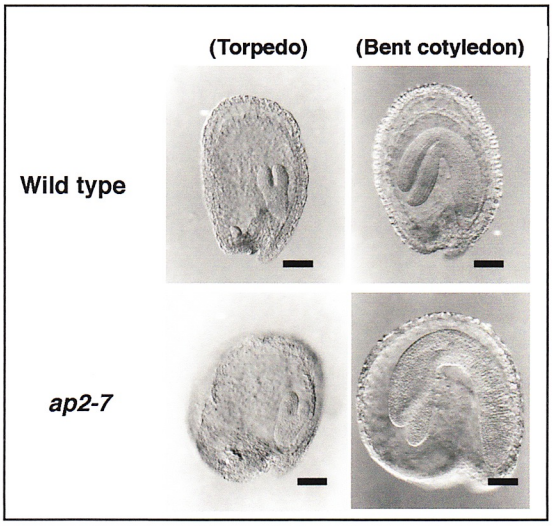

Figure 2. Ap2 embryos grow bigger than wild type embryos after torpedo-stage.（Bar = 100 mm）

はもう一つの子組織である胚乳組織の形成にも影響する。野性株、*ap2*株ともにbent cotyledon-stageまで胚乳組織の成長が続き、胚乳組織は種子空間のかなりの容積をしめる。この時、*ap2*株の胚乳サイズは野性株のそれと比べて著しく大きい。胚の成長が完了しmature green-embryoとなるのは胚乳組織の肥大が完了した数日後のことで、胚の成長は胚乳組織の空間を胚が取って変わるまで進行する。従って、種子サイズは胚乳サイズによって決定されると言える。このように、*ap2*株の肥大した胚乳組織が*ap2*胚の巨大成長を可能にしていると考えられる。

(D) *ap2* 変異は葉での糖代謝か糖応答性遺伝子発現、あるいはその両方に影響する：シロイヌナズナの切断葉の切り口より糖溶液を供給し、葉をソースからシンクへ転換させると、多量のデンプンやアントシアニン、β-アミラーゼ活性などの蓄積が誘導される。この誘導はショ糖、グルコース、フルクトースなど代謝可能な糖によって引き起こされる。*ap2* 切断葉を糖処理しアミラーゼ活性とアントシアニンの蓄積を解析したところ、*ap2* 株での蓄積レベルはショ糖を用いたときのみ野性株より高く、単糖を用いた場合には、野性株との差がなかった。このことは、*ap2* 株でのインベルターゼ活性が高い可能性を示唆する。また、ショ糖を与えた切断葉における H/S が *ap2* 株では野性株より高いという予備的な知見も得られている。

(E) *ap2* 変異は種子形成過程で糖代謝に影響する：発達中の *ap2* 種子では、野性株に比べ単糖の蓄積レベルや H/S が高く、胚発生の進行に伴って起こる両レベルの低下が遅延していた（Fig.3）。H/S の変化は形態変化とも良くリンクしており、野性株と *ap2* 株が完全な Mature green-embryo となる、それぞれ 10 DAP と 13~14 DAP に顕著に低いレベルになった。シロイヌナズナでは種子のインベルターゼ活性は、発生を通じて可溶性画分には検出されず沈殿画分にのみ検出された。種子当たりの沈殿画分のインベルターゼ活性は *ap2* 株で野性株の最大 2 倍近い値となった。従って *ap2* 種子での高い単糖レベルと高 H/S の一因は cwINV 活性にあると推定される。

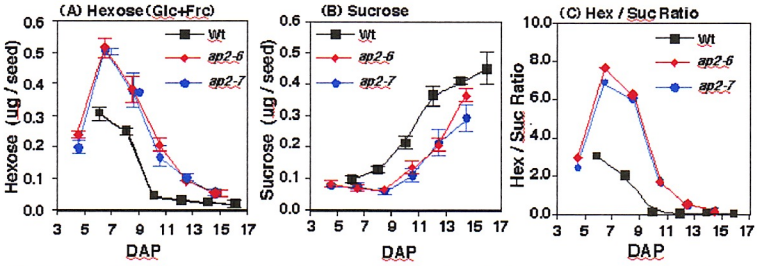

Figure 3. *ap2* mutation affects hexose to sucrose ratios during seed developement.
Time courses of hexose (Hex; glucose and fructose) (A) and sucrose (Suc) accumulation (B) and the ratio of hexose/sucrose (C) in developinng seeds of wild type (Col-0), *ap2-6* and *ap2-7* plants. Developing siliques with at 8 mm long were marked as 2 days-old siliques after pollination. Later, seeds were harvested from those siliques at 5, 7, 9, 11, 13, 15 DAP for wild type and 4.5, 6.5. 8.5, 10.5, 12.5 and 14.5 DAP for *ap2*. Error bars represent standard errors.

(F) 貯蔵タンパク質遺伝子プロモーターによるインベルターゼ活性の調節と影響：登熟期に胚特異的発現を示す貯蔵タンパク質遺伝子 2S4 遺伝子のプロモーターと植物のシグナルペプチド、酵母のインベルターゼで構成されるキメラ遺伝子（*2S4::SP:SUC2*）を持つ形質転換株を作製し、登熟期の胚で分泌型インベルターゼ活性を高め胚に輸送されるショ糖を単糖に変える試みを行った。同一の ORF をもつ同サイズの別のベクターに比べると floral dip 法による形質転換効率は 2S4::SP:SUC2 ベクターでは 8 割低下した。独立した系統の T2 株を 6 株ずつ育て T3 乾燥種子重量を測定した。T2 株によっては最大 4 割の T3 種子重量の低下が見られた。これら T3 種子の発芽は正常であったが、高い H/S が胚の登熟プログラムの進

行を阻害し、貯蔵物質蓄積低下による種子重量低下と、T1 種子によっては胚致死を引き起こした結果、形質転換効率の低下が起きた可能性が示唆される。

（３）まとめ

UNS30/AP2 遺伝子は花のホメオティック遺伝子として有名である。しかし、花のホメオティック遺伝子の中では唯一花器官特異的発現を示さず、殆どの器官で発現が見られるなど、その機能には未知の部分が多い。しかし本研究での成果から、葉を始めとした全ての器官において直接または間接的なインベルターゼ遺伝子の発現制御による糖代謝のコントロールを通じて、個体の成長制御に関与するという新規の役割が推定される。

種子形成過程では、*AP2* は少なくとも２種の役割を果たすと推定される。第１は胚乳組織形成の制御である。胚乳組織の成長は胚の成長に先立って終了する。この胚乳組織が退化し胚が胚乳組織の空間を充填するので、胚乳組織のサイズが種子サイズを決定すると結論できる。この際、その胚乳に由来する栄養は胚に吸収される。このように胚サイズ(＝種子サイズ)の決定には胚乳組織の形成がきわめて重要な役割を果たす。しかしどのようなメカニズムで胚乳形成に関わるのかは不明であり、今後の課題である。第２は、糖代謝のコントロールである。ソラマメで明らかにされた種皮における細胞壁結合型インベルターゼ(cwINV)の役割と本研究での結果を考察すると、*AP2* 遺伝子は、種皮に局在する cwINV 遺伝子の発現を負に制御している可能性が推定される。おそらくこの制御を通じて胚発生過程での糖レベル、特に H/S 比のコントロールを行い、胚の細胞の分化方向、すなわち細胞分裂活性を維持するか貯蔵型細胞へと転換するかの分化方向、の決定に *AP2* 遺伝子が間接的に関与するのではないかと考えられる。