

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440131

研究課題名(和文) 非典型Aux/IAAタンパク質を介した種子成熟プログラムの解明

研究課題名(英文) Investigation of seed maturation programs mediated by noncanonical Aux/IAA proteins

研究代表者

加賀谷 安章 (KAGAYA, Yasuaki)

三重大学・生命科学研究支援センター・准教授

研究者番号：20335152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：非典型Aux/IAAタンパク質はオーキシン応答性転写抑制因子Aux/IAAファミリーのうちオーキシン依存的分解に関わるドメインIIを欠失したグループであり、オーキシン応答性転写を構成的に抑制する因子と予想される。しかしながら、これらタンパク質の生理的機能の多くは不明である。本研究では、非典型Aux/IAAタンパク質の種子成熟過程での機能解析を行った。その結果、IAA30が種子成熟後期の胚の成長停止応答に関わり、IAA32が一次休眠の獲得に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The noncanonical Aux/IAA proteins are a group of members in the Aux/IAA family, which lack of domain II required for auxin-dependent degradation and hence are likely constitutive negative regulators of auxin-induced transcription. However, the physiological roles of the noncanonical Aux/IAA proteins remain unclear. Here, we analyzed function of these proteins in seed maturation program. We show that IAA30 is involved in the regulation of embryo growth arrest during seed maturation while IAA32 functions in acquisition of primary seed dormancy.

研究分野：生物学

キーワード：種子成熟 種子休眠 アブシジン酸 オーキシン 転写因子 細胞分裂 シロイヌナズナ 一次休眠

## 1. 研究開始当初の背景

種子は成熟過程で、貯蔵物質の蓄積、乾燥耐性、種子休眠の獲得などの特徴が胚に付加され種子発生が完結する。このような種子成熟プログラムに関わる FUS3 および ABI3 などのマスター転写因子や植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) の関与は知られている。しかしながら、それらの下流で種々の形質獲得に関わる調節因子の実態はよく分かっていない。これらの事象の獲得のうち、種子休眠の獲得に関しては、特に知見が少ない。*fus3* および *abi3* 変異体は、それぞれ著しい休眠の低下が生じる。さらに、*fus3 abi3* 二重変異体では、それぞれの単独変異ではほとんど観察されない穂発芽が生じる。これらの報告は、FUS3 および ABI3 の下流でそれぞれ異なるメカニズムで休眠獲得が行われることを示唆するが、それぞれに特有の制御カスケードならびに最終調節因子に関しては全く解明されていない。さらに、種子成熟過程で獲得される休眠と完熟した種子の持つ一次休眠が同一の事象により獲得されているか否かについてもよく解っていない。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、これまでに、FUS3 がオーキシシグナル伝達を抑制する作用を持つことを見出している。エストロゲンで FUS3 を人為的に異所発現できる形質転換植物 (*iFUS3*) の実生での FUS3 発現により重力屈性が乱れることをきっかけに、FUS3 とオーキシシグナル伝達の関連を調べた。*iFUS3* にオーキシン応答性レポーター DR5::GUS を導入すると FUS3 発現により、外から与えたオーキシンに対する DR5 レポーターの応答が阻害されることを明らかにした。また、*fus3* 変異体でのマイクロアレイ解析により、オーキシン応答性転写抑制因子 Aux/IAA ファミリーのうちオーキシン依存的分解に関わるドメイン II を欠失した非典型 Aux/IAA の一群の種子での発現が FUS3 の制御下にあ

ることを見出した。さらに *fus3* 変異体では、サイクリン B1::GUS レポーターの観察より、種子成熟期でも、特に根の分裂帯で細胞分裂活性の停止応答が生じないことを見出した。これらの研究結果をもとに、FUS3 による非典型 Aux/IAA の発現誘導が、オーキシシグナル伝達を遮断して細胞分裂活性を阻害することが種子休眠獲得の最終事象の一つではないかと仮説をたて、その実証を研究目的とした。

## 3. 研究の方法

種子の休眠の深さの詳細な解析は困難のため、まず *iFUS3* 形質転換植物を用いた系で FUS3 の下流での成長停止・休眠獲得に関わる非典型 Aux/IAA の候補を選抜した。*iFUS3* 形質転換植物を播種時よりエストロゲンで FUS3 を誘導して培養すると、ABI3 の発現誘導を含む多くの種子特異的遺伝子の発現が誘導され、胚の成長は停止する。そこで、この系が種子成熟過程を模倣していると考え、*iFUS3* に非典型 Aux/IAA の *IAA30*, *31*, *32*, *33* の機能欠失変異体を導入した。この解析を起点として、種子休眠獲得に関わると予想される非典型 Aux/IAA を見出し、その変異体種子の休眠の深さと作用時期の解析、遺伝子発現制御メカニズムの解析、さらにエンハンサースクリーニングによる協調的に作用する制御カスケードの解析を試みた。

## 4. 研究成果

1) *IAA30* は FUS3 の下流で胚成長停止および休眠の獲得に関わる

*iFUS3* に非典型 Aux/IAA の機能欠失変異体を導入したところ、*iaa30* 変異体で最も成長停止が緩和された表現型が観察された。茎頂および根端メリステムの活性化による根の伸長と本葉の発生が生じ、*proIAA30::IAA30-GUS* レポーターの発現は、FUS3 発現依存的に茎頂および根端メリステムでも観察された。*iFUS3 DR5 reve GFP* 系

統に *iaa30* 変異を導入すると、FUS3 発現による外から与えたオーキシンに対する DR5 *reve GFP* レポーターの発現が回復したことより、IAA30 が FUS3 の下流でオーキシンシグナル伝達を阻止して胚の成長停止応答を付与する鍵因子であることが示された。さらに、*iaa30* 変異体の登熟期の未熟種子および完熟種子の休眠の深さを調べたところ、登熟期の未熟種子では休眠性の低下が観察されたが完熟種子の持つ一次休眠の深さは変化が観察されなかった。したがって、IAA30 は FUS3 の下流で登熟期の胚成長停止および休眠の獲得に関わることが示された。

## 2 ) IAA30 の発現制御メカニズム

*proIAA30::IAA30-GUS* レポーターの発現は、*fus3* 変異体中では静止中心とコルメラ細胞に限定されることより、茎頂および根端メリステムなどでの発現は FUS3 の制御下にあることが示された。しかしながら、IAA30 遺伝子プロモーター中には FUS3 の標的配列 RY エレメントが見出されないことより、IAA30 の発現は、FUS3 による中間制御因子の制御を受けて生じると予想された。FUS3 は ABA 以外にもオーキシンの生合成を促進する働きが見出され、*fus3* 変異体中での *proIAA30::IAA30-GUS* レポーターの発現は、ABA とオーキシン処理により誘導されることが見出された。シロイヌナズナの IAA30 とハクサイ、ナタネの IAA30 オルソローグのゲノム情報より、IAA30 プロモーター中に 4 つの保存領域を見出し、変異プロモーターを用いた解析より、保存領域 4 が ABA とオーキシンの両方に依存した転写に必須であることを明らかにした。これまでに、種子休眠での ABA による発芽抑制効果がオーキシンにより増強される報告があるが、その分子メカニズムは不明のままである。今回の我々の結果は、両植物ホルモンの協調的作用は IAA30 の発現レベルの上昇による可能性を

示唆する。

## 3 ) IAA32 は ABI3 の下流で一次休眠の獲得に関わる

*iFUS3* に非典型 Aux/IAA の一つ IAA32 の機能欠失変異体を導入したところ、成長停止の緩和が観察された。そこで、*iaa32* 変異体の登熟期の未熟種子および完熟種子の休眠の深さを調べたところ、*iaa30* 変異体とは異なり、登熟期の未熟種子では休眠性の低下は生じず、完熟種子の持つ一次休眠の著しい低下が観察された。*iaa32* 変異体は、発芽時の ABA 感受性の低下が観察され、IAA32 の mRNA の発現は、*abi3* 変異体の登熟中の種子で著しい発現低下が観察された。したがって、IAA32 は ABI3 の下流で ABA 感受性を付与し、一次休眠獲得に関わる鍵因子であることが示唆された。

## 4 ) *iaa32* 変異体のエンハンサースクリーニングによる穂発芽の発生原因の解明

穂発芽が生じる原因を調べるために *iaa32* 変異体の種子、約 60,000 を EMS で突然変を誘起した集団より穂発芽を生じる変異体をスクリーニングして 16 系統を分離した。原因遺伝子の解析の結果、いずれも *fus3* 変異体のアレルであることが判明した。*fus3 abi3* 二重変異体では、それぞれの単独変異ではほとんど観察されない穂発芽が生じる。したがって、ABI3 の下流での休眠獲得の主要な因子は IAA32 であることが強く示唆された。さらに、*iaa30 abi3* 二重変異体を作成したところ、著しい穂発芽が観察された。したがって、FUS3 の下流での休眠獲得の主要な因子は IAA30 であることが強く示唆された。さらに、登熟中の胚の生長停止・休眠獲得と完熟種子の一次休眠獲得は IAA30 と IAA32 の独立した経路で制御され、その両方の遺伝的欠損が穂発芽をもたらすと示唆された。

## 5) IAA32 の転写後制御

IAA32 mRNA は登熟期の未熟種子でも発現するが、*iaa32* 変異体の表現型はこの時期には観察されないこと、ならびに IAA32 の過剰発現体は、採種直後の種子の一次休眠を増強させるが、湿低温処理で打破されることより、IAA32 の転写後制御の重要性が示唆された。p35S::IAA32::GUS 形質転換植物を作出して解析を行い、IAA32 のタンパク質レベルでの安定化の制御が重要であることを確認している。そのメカニズムの解明より、種子休眠の獲得と覚醒に関する新知見が得られると期待される。

## 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 3件)

Yoshii, M., Yamamoto A., Kagaya, Y., Takeda, S. and Hattori, T. The Arabidopsis transcription factor NAI1 is required for enhancing the active histone mark but not for removing the repressive mark on PYK10, a seedling-specific gene upon embryonic-to-postgerminative developmental phase transition. *Plant Signaling & Behavior*, 10 (2015) (査読有)  
[DOI:10.1080/15592324.2015.1105418]

Hara, T., Katoh, H., Ogawa, D., Kagaya, Y., Sato, Y., Kitano, H., Nagato, Y., Ishikawa, R., Ono, A., Kinoshita, T., Takeda, S. and Hattori, T. Rice SNF2 family helicase ENL1 is essential for syncytial endosperm development. *The Plant Journal*, 81: 1-12 (2015) (査読有)  
[DOI:10.1111/tpj.12705]

Yamamoto, A., Yoshii, M., Murase, S., Fujita, M., Kurata, N., Hobo, T., Kagaya, Y., Takeda, S. and Hattori, T. Cell-by-cell developmental transition from embryo to postgermination phase revealed by heterochronic gene expression and ER-body formation in Arabidopsis *leafy cotyledon* mutants.

*Plant & Cell Physiology*, 55: 2112-2125 (2014)  
(査読有) [DOI:10.1093/pcp/pcu139]

[学会発表](計 5件)

加賀谷安章、山口裕子、脇坂恵、加賀谷道子、山本章子、竹林裕美子、瀬尾光範、服部束穂、非典型型Aux/IAAタンパク質IAA30はFUS3によるABAとIAAレベルの上昇を介して種子休眠獲得に関わる、第56回日本植物生理学会年会、2015年3月18日、東京都(東京農業大学世田谷キャンパス)

加賀谷安章、脇坂恵、福田志穂、山口裕子、加賀谷道子、山本章子、服部束穂、非典型型Aux/IAAタンパク質を介した胚成長停止と休眠獲得、第35回種子生理生化学研究会年会、2014年11月14日、新潟県新潟市(岩室温泉ほてる大橋間の湯)

山口裕子、脇坂恵、加賀谷道子、竹林裕美子、瀬尾光範、服部束穂、加賀谷安章、IAA30を介した種子休眠獲得メカニズム、第35回種子生理生化学研究会年会、2014年11月14日、新潟県新潟市(岩室温泉ほてる大橋間の湯)

脇坂恵、加賀谷道子、山本章子、竹林裕美子、瀬尾光範、服部束穂、加賀谷安章、非典型型Aux/IAAタンパク質IAA30は種子休眠の獲得に関わる、第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18日 富山県富山市(富山大学)

加賀谷安章、脇坂恵、加賀谷道子、岩田昇悟、加藤大和、山本章子、武田真、服部束穂、種子休眠と発芽—胚成長の停止と再開という視点から、第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18日 富山県富山市(富山大学)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

加賀谷 安章 (KAGAYA, Yasuaki)

三重大学・生命科学研究支援センター・准教授

研究者番号：20335152