

2007年11月26日
独立行政法人 理化学研究所

植物の花粉成熟の初期に働くマスター遺伝子を発見

- 花粉を作れない作物、寒さ暑さに強い作物の開発へ -

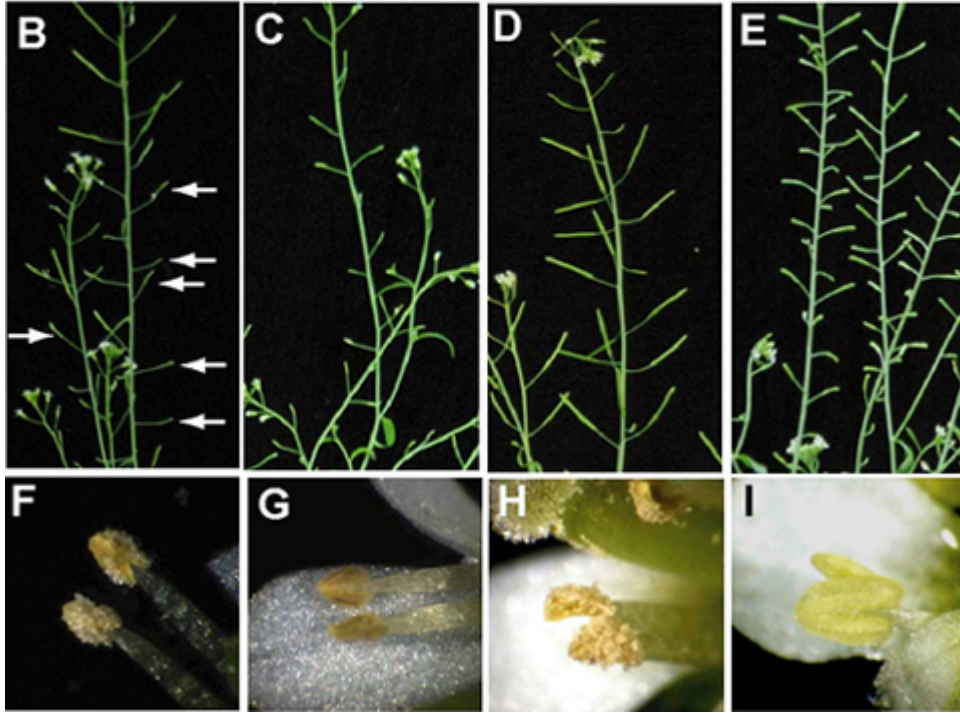
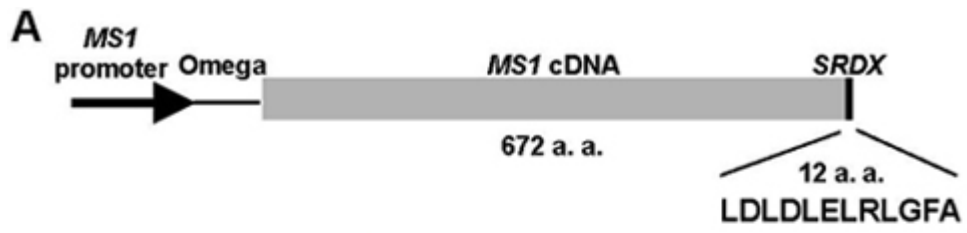
柿やみかん、りんごをはじめとする果実は、受粉で実を結び、食生活を豊かにしてくれます。その花粉の成熟から受精までの過程は、環境ストレスにとっても敏感です。北海道・東北地方では、冷害により花粉が成熟せずに稔実率が下がり、深刻な被害をもたらします。

花粉を作ることができない雄性不稔形質は、環境ストレスに強い作物の開発に道をつけるだけでなく、遺伝子組み換え作物の拡散を防いだり、ハイブリッド種子を作るために自家受粉を防いだりと、様々な目的で応用される重要な形質です。

理研植物科学研究センターの機能開発研究チームは、米国ペンシルバニア州立大学などと協力し、モデル植物であるシロイヌナズナで、花粉成熟の初期司令塔として機能するマスター遺伝子「MS1」を発見しました。発見した遺伝子は、花粉母細胞の減数分裂後に花粉成熟過程が異常となる変異体から、すでに単離していた遺伝子です。

研究チームは、このMS1遺伝子を改変し、花粉ができない雄性不稔のシロイヌナズナを生み出すことに成功しました。さらに、MS1遺伝子が花粉壁の形成に関わる遺伝子群を制御していることを突き止めました。

花粉成熟機構が解明できれば、花粉を作ることができない作物や、寒さ暑さに強い作物の開発に大きく貢献すると期待されます。



(写真)MS1 と転写抑制ドメインとの融合遺伝子導入で野生型を雄性不稔に改変

2007年11月26日
独立行政法人 理化学研究所

植物の花粉成熟の初期に働くマスター遺伝子を発見

- 花粉を作れない作物、寒さ暑さに強い作物の開発へ -

◇ポイント◇

- ・ 減数分裂後の花粉成熟初期に司令塔として働くマスター遺伝子は *MS1*
- ・ *MS1* と転写抑制ペプチドとの融合遺伝子導入でシロイヌナズナを雄性不稔に改変
- ・ *MS1* が制御する遺伝子に花粉壁形成の候補遺伝子が含まれる

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、植物の花粉成熟過程の初期に、*MS1*（エムエスワン）遺伝子が遺伝子発現の司令塔として機能するマスター因子であることを明らかにしました。理研植物科学研究センター（篠崎一雄センター長）機能開発研究チームの篠崎一雄チームリーダー、理研中央研究所（茅幸二所長）長田抗生物質研究室の伊藤卓也前任研究員と、米国ペンシルバニア州立大学のHong Ma（ホン・マ）教授、日本女子大学の永田典子准教授、株式会社日立製作所中央研究所の吉羽洋周主任研究員、独立行政法人産業技術総合研究所の高木優研究チーム長との共同研究による成果です。

花粉を作ることができない雄性不稔形質は、遺伝子組換え作物の花粉が環境中に拡散するのを防ぐ目的や、作物のハイブリッド種子^{*1}を作製する目的など、様々な応用技術に利用されている重要な形質です。一方、ある作物では、花粉の成熟から受精までの間、低温・高温など、環境ストレスに対してとても敏感になります。例えば、イネの穂ばらみ期障害性冷害^{*2}が北海道・東北地方でよく発生しますが、これは、イネが花粉成熟初期過程に低温感受性が高くなるため、成熟花粉が十分形成されずに最終的に収穫量が下がり、深刻な被害をもたらします。研究チームは、これら応用面での利用に向けて、モデル植物であるシロイヌナズナ^{*3}を用いて減数分裂後の花粉成熟機構の基礎研究を行ってきました。

研究チームは、これまでに、花粉母細胞の減数分裂後の花粉成熟過程が異常な *ms1* 突然変異体から、原因遺伝子 *MS1* を単離していました。この *MS1* 遺伝子に転写抑制ペプチド^{*4}の遺伝子を付加した改変遺伝子を野生型シロイヌナズナに導入すると、花粉形成だけが異常な *ms1* 突然変異体と似た表現型を示す植物ができることから、*MS1* タンパク質が遺伝子発現の司令塔として働く「転写制御因子^{*5}」であることを突き止めました。また、*ms1* 突然変異体を示す表現型異常と、マスター因子 *MS1* 遺伝子が制御する多数の遺伝子群の一次構造を比較した結果、花粉壁の主成分であるスポロポレニン^{*6}生合成に関与すると思われる遺伝子候補を見つけました。

今回の研究で、*MS1* 遺伝子を改変・導入して、雄性不稔シロイヌナズナの作出に成功したことにより、今後はこの原理を有用作物へ応用することで、花粉をつくることのできない作物や暑さや寒さに強い作物の開発へつながることが期待されます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『*The Plant Cell*』（11月号）に掲載されます。

1. 背景

植物の花粉成熟過程初期では、葯（雄しべ）内の花粉母細胞から減数分裂により生じた小孢子（将来の花粉）が、エキシン^{*6}と呼ばれる特殊な構造が並んだ花粉壁を持ちます（図 1）。この過程で、タペート層^{*7}が花粉成熟に必要な物質の供給を行います。その後、タペート層はプログラム細胞死を引き起こし、タペート層内の脂質を主成分とした物質が、ポーレンコートとしてエキシン間隙に蓄積します。同時に、シロイヌナズナの小孢子は 2 回細胞分裂して、1 つの花粉管細胞と 2 つの精細胞を持つ成熟花粉となり受粉、発芽に備えます。

研究チームは、花粉成熟過程の分子メカニズムを解明する目的で、花粉母細胞の減数分裂後の花粉成熟初期過程が異常なため、花粉を形成できない *ms1* 突然変異体から、原因遺伝子 *MS1* 遺伝子を既に単離していました (Ito and Shinozaki, 2002, *Plant and Cell Physiology*, 43, 1285-1292)。これまでの研究で、この遺伝子は、花粉母細胞が減数分裂直後に一過的にタペート層でのみ発現しており、コードするタンパク質 *MS1* が核移行シグナルを持つことから、核内で何らかの転写制御に関与していることが推測されました。しかし、このタンパク質は、PHDフィンガーモチーフ^{*8}と呼ばれる核に局在するタンパク質に特徴的な配列を持つものの、既知の転写制御因子に見られる DNA 結合ドメインは持っていませんでした。一方、光学顕微鏡レベルでの *ms1* 突然変異体の表現型解析では、*ms1* 変異体の初期小孢子では花粉壁が観察されませんでした。これら結果から、*MS1* タンパク質は核内で働く転写制御因子として、花粉壁形成など花粉成熟に必要な下流遺伝子群を制御するのではないかと、という作業仮説を構築しました。

2. 研究手法と成果

(1) タンパク質 *MS1* が転写制御因子として働く

MS1 タンパク質が転写制御因子であることを示すため、転写活性化因子を強力な転写抑制因子に機能変換する遺伝子サイレンシング技術 (CRES-T法)^{*4} を利用しました。もし、*MS1* タンパク質が転写活性化因子として機能するならば、*MS1* 遺伝子と転写抑制ペプチドとの融合遺伝子を野生型シロイヌナズナに導入すると、*ms1* 突然変異体と似た表現型を示すはずですが、実際に、予想したとおり、*ms1* 突然変異体と似た、花粉壁の形成が阻害され、小孢子とタペート細胞が空胞化するという形質を示したことから、*MS1* タンパク質は転写制御因子として花粉成熟過程を制御していることが示されました。これにより、*MS1* 遺伝子と CRES-T法を用いて、花粉形成能力だけを欠損している植物体の作製技術の開発に成功したことになります (図 2)。

(2) *MS1* 支配下の遺伝子群の機能

転写制御因子は、下流の遺伝子群の発現を制御するマスター因子です。したがって、*ms1* 突然変異体の表現型異常と *MS1* 遺伝子支配下にある遺伝子群の一次構造との比較から、これら遺伝子群の機能を類推することができます。*ms1* 変異体では、特徴的なエキシン構造が見られませんでした (図 3)。エキシンの主成分は、分子構造が未知のスポロポレニンと呼ばれる分子の重合体であるとされています。近年、スポロポレニンは、脂質とフェノール酸誘導体から成る

ことが明らかになってきました。しかし、詳細な分子構造や生合成経路は依然として謎のままです。

一方、*MS1* 遺伝子により制御される遺伝子群を、網羅的発現解析であるマイクロアレイ解析から同定したところ、フェノール酸骨格を持つリグニン単量体の生合成遺伝子群との類似遺伝子が4種類ありました。また、3種類の脂質合成・代謝系遺伝子も見つかりました。*ms1* 変異体ではリグニン形成は正常なので、これら遺伝子は花粉壁形成に欠かせないスポロポレニン生合成に関与する遺伝子の候補であると考えています。

3. 今後の期待

本研究により、マスター遺伝子 *MS1* を CRES-T 法で改変、野生型に導入して、雄性不稔シロイヌナズナを作出することができました。今後は、この原理を有用作物へ応用し、花粉形成能力のみ欠損した作物を作出することが期待できます。研究チームは、この改変したシロイヌナズナ遺伝子を花卉（かき）園芸植物であるペチュニアに導入しました。この遺伝子組換えしたペチュニアの花粉は形態が異常になり、花粉の成熟も一部不完全なものが認められました。このことは、この遺伝子がペチュニアの雄性不稔性にも重要であり、この原理を利用すれば有用植物への応用が可能であることを示しています。有用植物に完全な雄性不稔性を付与するには、植物種に合わせた導入遺伝子の改良が、今後の課題です。また、本研究でスポロポレニン生合成経路解析への道が開かれました。候補遺伝子群が本当に生合成に関与するかどうか、解析が待たれます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

植物科学研究センター 機能開発研究チーム

チームリーダー 篠崎 一雄 (しのぎ かずお)

中央研究所 長田抗生物質研究室

前任研究員 伊藤 卓也 (いとう たくや)

Tel : 029-836-4359 / Fax : 029-836-9060

横浜研究推進部 企画課

Tel : 045-503-9117 / Fax : 045-503-9113

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 ハイブリッド種子

交配した第1世代のF1と同義。異なる特性を有する近交系を交配した雑種第1代(F1)は、雑種強勢(ヘテロシス)のため純系の両親より生育、生産力、耐病性などの特性が優れたものになる。ハイブリッド種子作製のためには交配する必要があるため、その省力化のため雄性不稔が利用される。

※2 イネの穂ばらみ期障害性冷害

熱帯原産のイネを温帯域で栽培しようとする、冷害による被害を受けやすい。穂ばらみ期障害性冷害はそのうちのひとつで、花粉母細胞の減数分裂期あたりに相当する穂ばらみ期に気温が20℃を下回る日が続くと、花粉成熟が低温阻害を受け、稔実率が低下し減収する損害を受ける。北海道から東北地方にかけての太平洋側では、梅雨期から盛夏にかけて吹く、オホーツク高気圧からの冷たい北東風は「やませ」と呼ばれ、イネの穂ばらみ期障害性冷害の原因となっている。

※3 シロイヌナズナ

学名は *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.。全長約30~40 cmのアブラナ科一年生草本植物。食用でも観賞用でもない、いわゆる雑草である。北半球のほぼ全域の冷温帯にかけて広く分布している。自家和合性を持ち、基本的に自家受粉で次世代の種子をつくるが、人工交配による他家受粉も可能である。通常、秋に発芽して冬を越した後、春から夏にかけて日が長くなると花が咲く長日植物である。広大な圃場を必要とせず、実験室内の蛍光灯で育成可能である。実験室内では約2ヶ月で次世代の種子をつける。2倍体で、5対の染色体を持つ。ゲノムプロジェクトにより、ゲノムサイズは約130 Mb、全遺伝子数は約26,000個であることが判明した。(シロイヌナズナゲノムの機能解析、松井南、伊藤卓也、関原明、篠崎一雄(2001)『ポストシーケンズのゲノム科学4：ゲノムから個体へー生命システムの理解に向けて』榎佳之・小原雄治編、中山書店、pp 43-56より引用、改変)

※4 転写抑制ペプチド、遺伝子サイレンシング技術(CRES-T法)

独立行政法人産業技術総合研究所 高木優研究チーム長らが発見した、植物特異的な転写抑制ペプチドを用いて転写制御因子の機能を明らかにする手法。具体的には、このペプチドを機能未知の転写制御因子に付加し、リプレッサーに機能転換した dominant negative に働くキメラリプレッサーを植物体に導入する。キメラリプレッサーは、内在性の転写制御因子だけでなく、機能重複する転写制御因子の転写活性化能に優先して標的遺伝子の発現を抑制することから、その転写制御因子の欠損株と同様な表現型が現れる。その結果、その転写制御因子の機能を知ることができる。(産総研ウェブサイトより引用、改変)

※5 転写制御因子

遺伝子発現制御は、セントラルドグマで言うところのDNA→RNA→タンパク質の様々なレベルで行われるが、とりわけ転写開始レベルでの制御が詳しく解析されて

いる。転写制御因子の構造は、DNA 結合ドメインと転写量の調節ドメインとに分けられる。DNA 結合ドメインが、各遺伝子近傍領域に存在する「シスエレメント」に DNA 塩基配列特異的に結合して遺伝子を選別し、調節ドメインが転写活性化、抑制化シグナルを基本転写装置に伝える、というのが基本モデルである。植物で見られる DNA 結合ドメインは、アミノ酸配列の類似性、立体構造の違いから NAC、WRKY、AP2/ERF/DREB、bZIP、bHLH、MYB など、多数のタイプが知られている。しかし、MS1 タンパク質にはこれら既知のタイプは認められない。

※6 スポロポレニン、エキシン

花粉壁最外層で植物種に特徴的な模様を持つ構造体がエキシン。エキシンを構成する主要な物質がスポロポレニン。近年の研究によりスポロポレニンは、主成分の脂質と副成分のフェノール酸誘導体から成るポリマーであることがわかってきたが、詳細な分子構造は未だ不明である。非酸化的分解に対して極めて安定なため、エキシンは土中で数百万年も分解されずに残る。古代の植生・考古学研究に用いられる花粉分析では、地層から強酸、強アルカリなど様々な試薬を用いてエキシンが分離され、その模様により植物種が特定される。邪馬台国の有力候補地である奈良県桜井市の纏向（まきむく）遺跡で大量のベニバナ花粉が見つかり、卑弥呼が魏に赤や青の織物を献上したという魏志倭人伝の記述を裏付ける証拠ではないかと話題になったことは記憶に新しい（2007年10月3日付読売、朝日、毎日、産経、東京など、朝刊各紙）。

※7 タペート層

花粉（小孢子）を含む葯室を取り囲む一層の細胞層。花粉成熟に必要な物質を供給する。動物で例えると、胎児に対する胎盤の關係に類似している。花粉成熟がある程度進み不要になると、プログラム細胞死を引き起こす。

※8 PHD フィンガーモチーフ

Cys4-His-Cys3（Cys はシステイン残基、His はヒスチジン残基）の共通アミノ酸配列を持つタンパク質内の領域。これらアミノ酸側鎖と亜鉛イオン 2 個が配位結合して立体構造を安定化させる。PHD フィンガーモチーフを持つタンパク質には細胞核に局在するものが多く、クロマチン結合活性、ヒストンアセチル化、メチル化など、多種多様な活性が報告されているので、何らかの形で核内での転写制御に関わっているとされる。

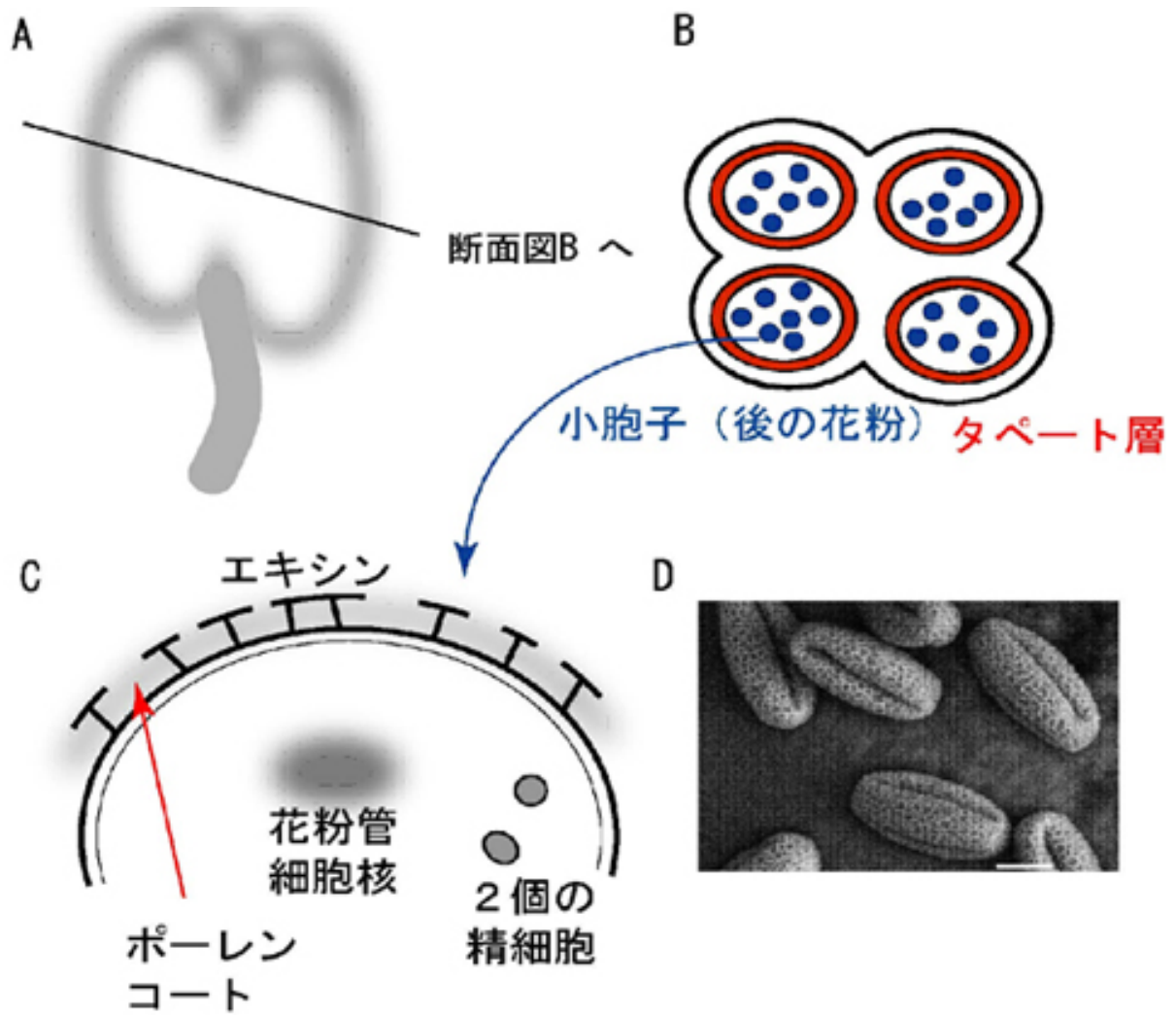


図1 シロイヌナズナの花粉成熟過程

- (A) 花粉成熟途中の葯（雄しべ）。
- (B) 葯 A の横断面図。減数分裂により生じた小孢子をタペート層が取り囲む。
- (C) さらに発生が進んだ成熟花粉断面。花粉壁は、特徴的な T 字型のエキシン構造と、その間隙を埋めるポーレンコートから成る。シロイヌナズナでは 1 個の花粉管細胞と 2 個の精細胞の状態を受粉を待つ。
- (D) 成熟花粉の走査電子顕微鏡写真。花粉表層に網目状のエキシン構造が観察される。

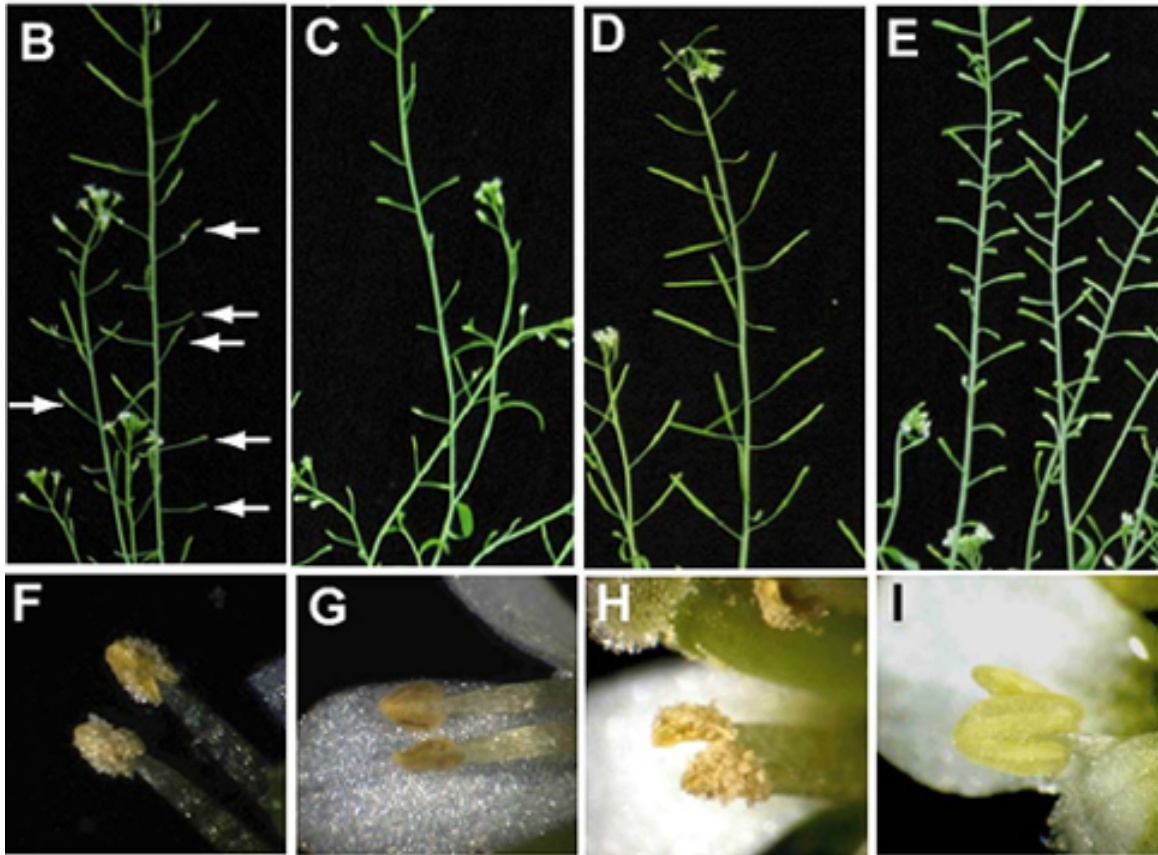
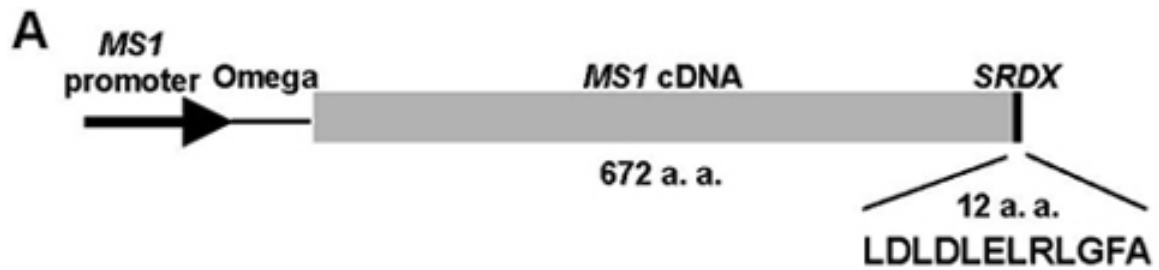


図2 *MS1* と転写抑制ドメインとの融合遺伝子導入で野生型を雄性不稔に改変

- (A) *MS1* 遺伝子と転写抑制ペプチド (SRDX) との融合遺伝子の発現コンストラクトの模式図。遺伝子サイレンシング技術 (CRES-T 法) を *MS1* 遺伝子に応用した。
- (B, F) 半雄性不稔を示す形質転換体。結実しない短い鞘 (さや) (果実の一種) を矢印で示す。
野生型の黄色い花粉と比べて白っぽい花粉が観察される。
- (C, G) 強い雄性不稔を示す形質転換体。すべての鞘は短く、葯内には茶色い花粉粒が少数観察される。

これらは、野生型植物 (D, H) と、全く花粉ができない *ms1* 突然変異体 (E, I) の中間の表現型である。

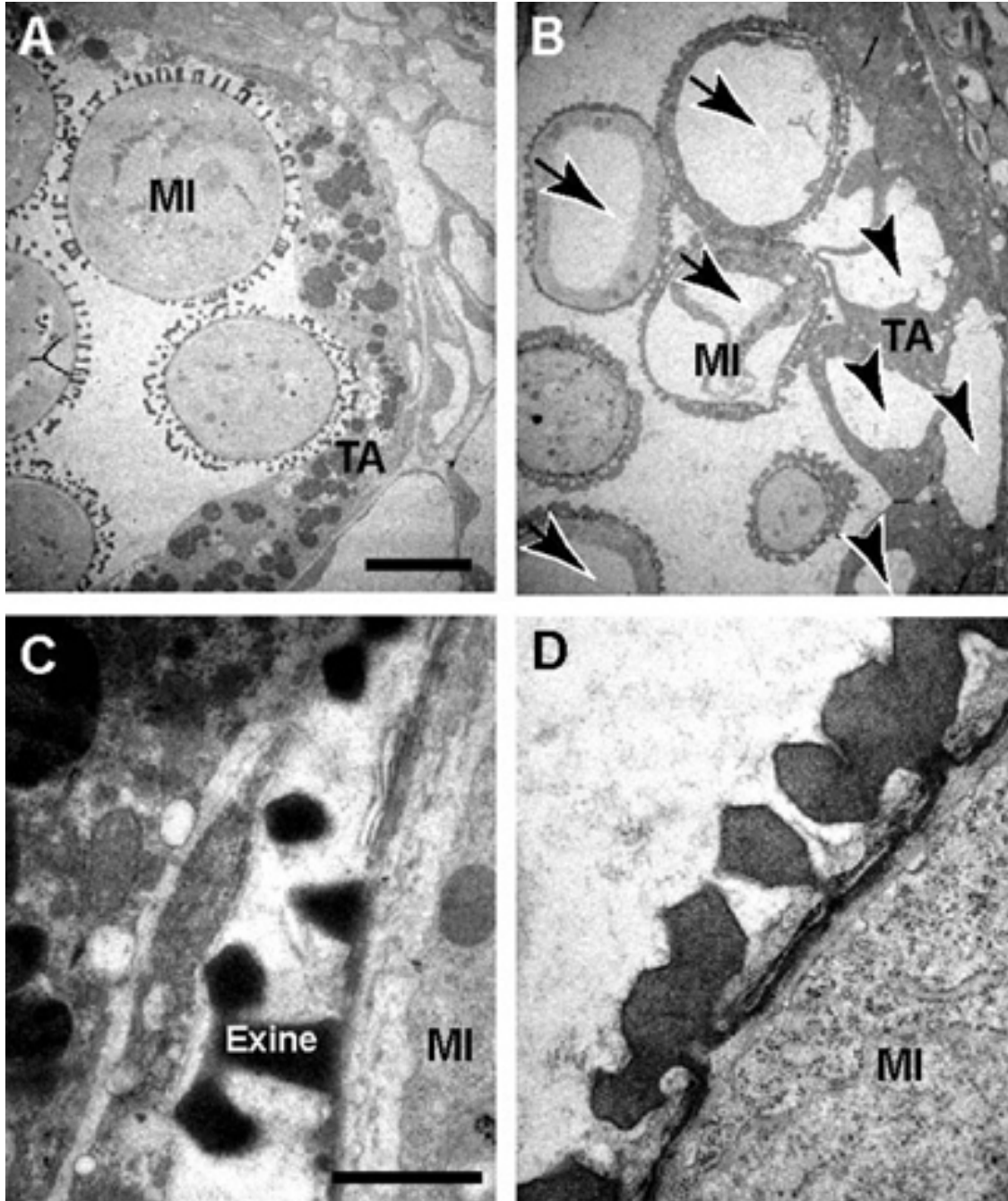


図3 シロイヌナズナの成熟途中の花粉と葯の透過電子顕微鏡写真

MI: 小孢子 TA: タペート層 Exine: エキシン

(A, C) 野生型 (B, D) *ms1* 突然変異体

(AとBを比較) *ms1* 突然変異体では、小孢子 (矢印) とタペート層 (矢じり) が空胞化して、最終的には成熟花粉が全くできない。

(CとDを比較) *ms1* 変異体では、野生型で見られる特徴的なエキシン構造が見られない。