

氏 名 金井 雅武

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1352 号

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 種子貯蔵物質の蓄積と発芽の分子機構の解明

論文審査委員 主 査 教授 川口 正代司
教授 長谷部 光泰
教授 山口 淳二（北海道大学）

種子植物は種子を形成し、それを散布することで生息範囲を広げていく。種子は初期成長のために大量の貯蔵物質を蓄積し、光合成によるエネルギー産生が可能となる時期までの成長を助ける。種子の貯蔵物質蓄積、分解の制御機構は精妙であり、いまだその大部分が明らかになっていない。彼は種子貯蔵脂質分解を担うペルオキシソーム膜上の脂肪酸輸送体である *PED3* が制御する種子休眠、及び種子貯蔵物質の蓄積制御の分子機構を研究した。

(*PED3* が制御する種子休眠) モデル植物であるシロイヌナズナは脂肪性種子植物であり、貯蔵物質として主に脂質を蓄積する。発芽初期の貯蔵脂質は発芽初期の脂質分解に特化したペルオキシソームであるグリオキシソーム内に局在する β 酸化系により分解される。 β 酸化系酵素を欠損した変異体は初期生育にスクロースを要求することが報告されている。ペルオキシソーム膜に局在し、内部に脂肪酸を輸送することが報告されている *PED3* の欠損変異体は貯蔵脂質の分解が不全であることが報告されている。しかしながら、*ped3* 変異体は培地にスクロースを添加しても、その発芽率は 5%以下であること、種皮を切ってやることにより発芽可能となることから、*PED3* が種皮の開裂及び発芽に関与することが示唆されているが、その分子機構はほとんど明らかになっていない。彼は *ped3* 変異体種子を用いて 24 時間吸水させた種子のトランスクリプトーム解析を行った。*ped3* では ABA シグナリングに関与する転写制御因子 *ABI5* の発現が高く維持されていた。*ped3* 種子の休眠維持における *ABI5* の関与を検討するため、*ped3abi5* 二重変異体を作成したところ、*ped3abi5* の発芽率は約 80%であることから、*ped3* の発芽不全には *ABI5* が関与することが示された。種皮の開裂を制御する因子を探索するため、*ped3* と *ped3abi5* を用いて再度トランスクリプトーム解析を行った。*ped3* と *ped3abi5* 間で発現が変化している遺伝子の中から細胞壁に関与する遺伝子を探索したところ、ペクチン分解を阻害するタンパク質をコードする遺伝子 *PGIP1*、*PGIP2* の発現が *ped3* において大きく上昇し、*ped3abi5* では野生株と同程度であったことを示した。*PGIP1,2* の発現は、野生株、*ped3abi5* において吸水により低下するものの、*ped3* では逆に上昇することが示された。さらにペクチン分解阻害活性を測定したところ、野生株、*ped3abi5* では吸水により活性が低下し、*ped3* では逆に上昇することが示された。この結果は *ped3* 種子において *PGIP* が過剰に蓄積し、ペクチン分解を阻害すること、*PGIP1, 2* の発現は *ABI5* 制御下にあることを示した。さらに発芽における *PGIP1* の機能を評価するため、*pgip1* 欠損変異株、*PGIP1* 過剰発現株の解析を行った。*PGIP1* 欠損変異株である *pgip1-1*、*pgip1-2* は野生株に比べ早く発芽した、また *PGIP1* 過剰発現株は野生株に比べ発芽が遅れた。この結果は *PGIP1* が発芽時期を制御することを示している。しかし *PGIP1* 過剰発現株の発芽は遅れるものの、大部分の種子が発芽することから、*ped3* の発芽不全における *PGIP* の関与は限定的であることを示した。種皮のペクチン分解と発芽との関係を明らかにするために、ペクチナーゼ処理及び低 pH 処理により外部から種皮のペクチンを除去したところ、*ped3* の発芽率を回復させた。これは *ped3* において種皮のペクチンが発芽を阻害することを示している。

以上より *ped3* における発芽不全は *ABI5* を経由したシグナルの攪乱による発芽時のペ

クチン分解不全によることが示された。種皮開裂にペクチン分解が必要であることは新しい知見であり、種皮の開裂機構の一端を明らかにした。

(種子貯蔵物質の蓄積制御の分子機構) 種子の貯蔵物質は植物種によってさまざまであり、同じ科に属する植物であってもその種子の貯蔵物質組成は大きく異なっている。植物種子は主に脂肪性種子とデンプン性種子に大別され、ダイズなど一部の植物はタンパク質を最も多く蓄積する。貯蔵脂質、デンプン、タンパク質蓄積の系は概ね共通しており、全ての種子は多かれ少なかれ脂質、デンプン、タンパク質を蓄積する。しかしながら貯蔵物質の量比を制御する因子は分かっていない。

本研究ではモデル植物であるシロイヌナズナを用いて、種子貯蔵物質の組成を制御する因子の同定を試みた。貯蔵物質の密度が デンプン>タンパク質>脂質であることから、T-DNA 挿入変異体の種子プールに対して遠心分離法により、密度が大きい種子、密度が小さい種子を単離した。単離された密度が大きい種子をつける変異体 *hs1-1* は種子中の脂質含量が減少し、タンパク質含量が増加した。この変異体は植物にのみ保存された機能未知のドメインをもつ転写因子と思われる遺伝子が欠損していた。この遺伝子 *HS1* の発現は種子形成過程の前期に特異的であり、シロイヌナズナ種子において脂質合成とタンパク質合成が入れ替わる時期と一致した。シロイヌナズナ種子に蓄積するタンパク質の大部分は 12S グロブリンと 2S アルブミンであることから、*hs1-1* の種子を種子形成開始から 5、7、9、11 日後に収穫し、その量を SDS-PAGE により検討したところ、*hs1-1* ではタンパク質蓄積の時期が野生株に比べ早いことが確認された。さらに貯蔵タンパク質の遺伝子発現も野生株に比べ早まっており、*HS1* が転写レベルで貯蔵タンパク質を制御していることが示された。

以上より、植物特異的なタンパク質 *HS1* は種子形成過程において貯蔵タンパク質の蓄積時期を転写レベルで制御することにより、種子貯蔵物質の組成を制御することが示唆された。これは最終的な貯蔵物質の組成を決定する要因の 1 つに蓄積の開始時期が重要であることを示している。今後、この遺伝子の改変のみならず、目的の貯蔵物質を早めの時期から蓄積させるような育種を行うことで種子貯蔵物質の組成が変化した作物の作出につながると考えられる。

本研究は種子の貯蔵物質蓄積、分解の制御機構において未解明である種子貯蔵脂質分解を担うペルオキシソーム膜上の脂肪酸輸送体である *PED3* が制御する種子休眠、及び種子貯蔵物質の蓄積制御の分子機構に関する研究を行った。

PED3 が制御する種子休眠に関する研究では、ペルオキシソーム膜に局在し、内部に脂肪酸を輸送するトランスポーターの欠損株 *ped3* が発芽不全に陥る原因を探った。*ped3* 種子では野生株に比べ、吸水後も休眠ホルモンである ABA のシグナルに関与する転写因子の一つである *ABI5* の発現が亢進していることを示した。*ped3abi5* 二重変異体を作成し、その発芽が回復することから、*ped3* の発芽不全の原因が *ABI5* の高発現であること、また *ABI5* により種皮のペクチン分解が制御されていることを示し、種皮のペクチン分解を阻害する因子として PGIP1、2 が関与していることを示した。以上よりシロイヌナズナ種子における発芽時の *PED3* は *ABI5* の発現を抑制することで発芽制御を行っており、*ABI5* の発現抑制は種皮のペクチン分解を促進して種皮の開裂を促し、発芽に至ることを明らかにした。発芽において未解明であった種皮の開裂を制御する因子を明らかにした点、及び種皮のペクチン分解が休眠ホルモンである ABA のシグナルに関与する *ABI5* によって制御されていることを示した点は、発芽における ABA の役割に新たな知見を加えたもので特筆に値する。

種子貯蔵物質の蓄積制御の分子機構に関する研究では、種子貯蔵物質の量比を制御する因子の同定を行った。貯蔵物質の密度はタンパク質が脂質より大きいことを利用して、遠心分離法により密度が大きい種子を単離した。高密度変異体 *hs1-1* は種子中の脂質含量が減少し、タンパク質含量が増加していた。この変異体は植物にのみ保存された機能未知のドメインをもつ転写因子と思われる遺伝子が欠損しており、この遺伝子 *HS1* の発現は種子形成過程の前期に特異的であることを示した。主要な種子貯蔵タンパク質である 12S グロブリンと 2S アルブミンの遺伝子が、*hs1-1* 種子では野生株よりも早い時期から高発現していること、また、タンパク質レベルでも、*hs1-1* では種子貯蔵タンパク質蓄積の開始時期が野生株に比べ早いことを明らかにした。これらのことから植物特異的なタンパク質 *HS1* は種子形成過程において貯蔵タンパク質の蓄積時期を転写レベルで制御することにより、種子貯蔵物質の組成を制御することが示された。種子中の貯蔵物質の量比を制御する上で、貯蔵物質の蓄積開始時期を制御する機構が存在することは、種子貯蔵物質の種類や量の改変を目的とした育種に新しい方向性を示したものである。

本論文は種子発芽に関与する新たな因子を同定するとともに、種子形成において蓄積開

始時期を制御するという全く新しい制御機構が存在することを明らかにしたもので、オリジナリティが高く、植物科学に大きく貢献するものである。従って審査委員会は本論文が学位論文として十分な内容をもつものであると判断した。また本論文の一部は既に国際誌 Plant J. に発表されている。