

学位申請論文

シロイヌナズナ *FLO2* 遺伝子の機能解析

平成 29 年 3 月

紀平 望帆

目次

目次	1
要旨	3
第一章 序論	7
第二章 シロイヌナズナ <i>FLO2</i> 遺伝子の同定	12
シロイヌナズナ <i>FLO2</i> 遺伝子の同定と発現	12
シロイヌナズナ <i>FLO2</i> の T-DNA 挿入変異体の同定	13
まとめ	14
図 1~11	15
第三章 栄養成長期におけるシロイヌナズナ <i>flo2</i> 変異体の形態解析	26
ロゼット葉の比較	26
ロゼット葉の詳細な解析	26
強光条件下での育成	27
抽苔時期の解析	27
まとめ	27
図 12~15	29
第四章 生殖成長期におけるシロイヌナズナ <i>flo2</i> 変異体の表現型	33
長角果と種子の観察	33
種子貯蔵物質の解析	34
Real-time RT-PCR による貯蔵物質合成に関与する遺伝子群の発現量の解析	34
まとめ	35
図 16~21	36
第五章 光合成産物の分配効率についての解析	42
ルゴール染色による光合成産物の蓄積場所の解析	42
PETIS による同化産物のライブイメージング	42
まとめ	43
図 22~23	44
第六章 総合考察	46
第七章 方法	49
植物の生育条件	49
ホモザイゴート変異系統の確立	49
遺伝子型の解析	49
バイオインフォマティクス分析	50
組織学的解析	50

走査型電子顕微鏡による分析	51
タンパク質抽出と SDS-PAGE	51
RNA 抽出と逆転写 PCR(RT-PCR)とリアルタイム定量 RT-PCR	51
PETIS による測定	52
参考文献	54
謝辞	58

要旨

種子は植物が次世代を残すための重要な組織である。種子には発芽のためのエネルギー源として大量にデンプンやタンパク質・脂質などが貯蔵される。これらの貯蔵物質は、胚乳や子葉など種子中の特定の組織に蓄積されるが、蓄積部位や蓄積される貯蔵物質の種類は植物種により異なる。イネなどの穀類では主に種子の胚乳に貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質が蓄積されるが、ダイズなどは、子葉に貯蔵脂質や貯蔵タンパク質が蓄積される。

光合成の場(ソース器官)と貯蔵の場(シンク器官)の間の同化産物の移送は篩管を介して行われる。緑葉などのソース器官において光合成で得られた同化産物は、ショ糖にまで変換され、維管束組織を介した物質の移行が起こる。種子などのシンク器官では、転流されてきた物質を受け取り、さまざまな酵素反応を経て貯蔵物質が生合成される。

貯蔵物質は、種子の登熟期の2週間ほどで生合成されるため、貯蔵物質の生産性は同化産物の転流の効率に大きく影響される。また、貯蔵物質の生合成には様々な因子が関わっており、これらが協調的に発現し、かつ、様々な機能制御を受けている。しかしながら、これらの制御機構については研究例が少なく、未解明の部分が多く残っている。

*FLO2(FLOURY ENDOSPERM2)*遺伝子はイネの *floury 2* 変異の原因因子として同定された。この遺伝子の変異体 (*flo2*) では、胚乳の白濁、矮小化、粉質化などの表現型が現れ、この結果、穀粒の品質が著しく低下する。この変異体では、デンプン生合成や、貯蔵タンパク質合成、エネルギー生産に関する遺伝子群の発現が低下する。これらのことから、*FLO2* 遺伝子は種子の物質貯蔵の生合成を制御する上位の制御因子であると考えられている。*FLO2* はタンパク質と相互作用する TPR モチーフを持ち、*FLL1*, *FLL2* と共にファミリーを形成する。この遺伝子群は、高等植物で高度に保存された遺伝子である。一方、真菌類や動物には存在せず、植物固有の機能に関わる因子であると考えられる。しかしながら、その役割は未解明である。

被子植物の種子は胚、胚乳、種皮からなる。種子の構造は植物種により大きく異なり、例えば、イネなどでは胚乳が発達し、胚乳に貯蔵物質を蓄積する。一方、大豆などでは、発生の過程で胚乳が減縮し、胚組織である子葉に貯蔵物質を貯蔵する。モデル植物であるシロイヌナズナの種子は後者の種子形態をと

る。シロイヌナズナの種子は発生過程で胚乳が一時的に形成されるが発達せず、最終的には最外層に1層の胚乳を残すのみである。この種子では貯蔵物質は胚に蓄積される。

本研究ではイネとは構造的に異なる種子を形成する種子植物であるシロイヌナズナを用いて、種子植物に保存された *FLO2* 遺伝子の生理機能の解析を行った。

シロイヌナズナはアブラナ科のモデル生物である。すでに全ゲノム配列が明らかになっており、ゲノム中に 25000 個の遺伝子がコードされる。また、変異体ソースも充実している。シロイヌナズナの *FLO2* 遺伝子 (At1g15290) は、イネの *FLO2* 遺伝子と高い相同性を示すことがわかった。この遺伝子に関する変異体を検索したところ、T-DNA 挿入変異体として SALK_138275 が見つかった。この変異体系統はヘテロ接合体であったため、自殖後代植物から変異体のホモ個体を選抜し、さらに、野生型シロイヌナズナと戻し交配を行って、F2 植物より At1g15290 遺伝子の変異のホモ個体を選抜した。これらの F2 個体は同じ表現型を示したため、これを *flo2* 変異体として以後の研究に用いた。

シロイヌナズナ *flo2* 変異体は正常に発芽し、花序形成、花の形態には変化が認められなかったが、栄養成長期のロゼット葉と生殖成長期の長角果の形態に顕著な表現型が認められた。

ロゼット葉は野生型よりも 30% 程度大きく、新鮮重量は 40% 程度大きかった。しかし、葉の枚数には大きな差が認められなかった。多くの葉は野生型より早く老化し、緑葉が黄緑色を示す様子が観察された。葉の横断面を観察したところ、*flo2* 変異体は葉肉細胞のサイズが大きくなる一方で細胞内の葉緑体の数が減少していた。また、植物の芽生えを強光条件下に置いて生育させた場合、*flo2* 変異体は葉が著しく黄化した。

これまでに、イネの *flo2* 変異体は種子の登熟期に表現型が現れることが報告されているが、栄養成長期での表現型は報告されていない。今回の結果から、シロイヌナズナの *flo2* 変異体では栄養成長期でも顕著な表現型が現れることが明らかになった。この結果から、シロイヌナズナの *FLO2* 遺伝子には葉の成長制御に関わる可能性が強く示唆された。

シロイヌナズナは、栄養成長期から生殖成長期に移行する時に花茎を抽苔する。*flo2* 変異体は野生型よりも抽苔の開始時期がわずかに早かった。一方、花

の形態には変化が認められなかった。花の数も野生型と差は認められなかった。しかし、*flo2*変異体の個々の長角果(莢)の大きさに差が認められた。変異体ではそれぞれの長角果の長さが短く、中に含まれる種子数は野生型の60%程度に減少していた。個々の種子の大きさや重さに大きな変化がなかったが、構造的にもろく、壊れやすい表現型を示した。種子の構造を詳細に調べるため、ヘマトキシリン・エオジン染色を行ったところ、*flo2*変異体の種子の胚乳層細胞では、細胞中に占める核様体の割合が減少していた。また、胚乳層が野生型種子よりも薄かった。

シロイヌナズナの種子は、貯蔵物質として主に油脂、タンパク質を蓄える。イネ *flo2* 変異体では胚乳の貯蔵物質に質的な変化が起こっていることから、シロイヌナズナの種子においても同様の変化が起こっているかどうかを調べた。得られた変異体の完熟種子について、ヨウ素染色、ナイルブルー染色を実施し、貯蔵デンプンと貯蔵脂質の解析を行った。その結果、ヨウ素染色では *flo2* 変異体、野生型ともにほとんど染色されなかった。ナイルブルー染色では、*flo2* 変異体は野生型よりも染色の度合いが低下した。これらのことから、*flo2* 変異体では、貯蔵デンプンの量的質的な変化はなく、貯蔵油脂に質的な変化が生じていることが示唆された。また、種子のタンパク質粗抽出物を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析したところ、種子貯蔵タンパク質の量は *flo2* 変異体と野生型の間に差が認められなかった。

種子貯蔵物質生合成への影響を詳細に調べるために、貯蔵物質の生合成系に関与する遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR により解析した。その結果、*flo2* 変異体は脂肪酸生合成のキー遺伝子である *3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I* 遺伝子と *fatA acyl-ACP thioesterase* 遺伝子の発現量の減少が認められた。一方、デンプン生合成系のキー酵素である *ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit 1* 遺伝子と *starch branching enzyme 1* 遺伝子および、デンプン分解に関与する酵素 *β-amylase* 遺伝子、*starch debranching enzyme 1* 遺伝子の発現量には変化が認められなかった。また、種子貯蔵タンパク質である *12S storage protein* 遺伝子の発現量は増加していたが *2S storage protein* 遺伝子の発現量は減少していた。スクローストランスポーターの遺伝子群の発現量を調べたところ、*SWEET11* と *SWEET12* 遺伝子の発現量には変化していなかったが、種皮特異的な発現をする *SWEET15* 遺伝

子の発現量の減少が認められた。

これらの結果から、シロイヌナズナの *FLO2* 遺伝子への変異は花の形態形成には関与しないが、種子の構造やその収量・貯蔵物質の品質には大きく影響することが示唆された。

FLO2 遺伝子の光合成産物の転流・分配への影響について解析するために、栄養成長期のロゼット葉をヨウ素染色して同化デンプンの検出を試みた。その結果、野生型植物では植物体の中心部分（根およびメリステム部位）にデンプンの蓄積が認められたが、*flo2* 変異体ではほとんどデンプンの蓄積が認められなかった。このことから、*flo2* 変異体では光合成産物の物質移行に異常がある可能性が示唆された。

この仮説を検証するために、 ^{14}C を利用したポジトロンエミティングトレーサーイメージングシステム(PETIS)を用いて、シロイヌナズナの個体が固定する CO_2 の動態を解析した。その結果、*flo2* 変異体は、通常の光強度の条件 ($300 \mu\text{M}^2\text{sec}^{-1}$) では野生型よりもシンク器官への同化産物の移動量が減少した。この傾向は、より強い光条件 ($1000 \mu\text{M}^2\text{sec}^{-1}$) で顕著になった。*flo2* 変異体はシンク器官に転流する ^{14}C の量が著しく減少し、葉で固定された ^{14}C も野生型よりも早く消失した。これらの結果から、*flo2* 変異体は、固定した炭素のシンク器官への転流能力が減少していること、このため、緑葉で過剰となった同化産物が激しく消費されていることが示唆された。これにより植物体の老化が誘発されるのであろうと推察される。

本研究では、高等植物に保存された *FLO2* 遺伝子の生理機能を明らかにするために、イネとは構造的に異なる種子を形成するシロイヌナズナの *flo2* 変異体を用いてこの表現型を詳細に解析した。シロイヌナズナ *flo2* 変異体は、葉のバイオマス量の増加と種子の収量減少を起し、さらに、ソース器官からシンク器官への同化産物の転流能力の低下が認められた。また、種子の構造や貯蔵物質合成にも変化が現れた。これらの結果より、シロイヌナズナの *FLO2* は同化産物の分配に関与することが強く示唆された。以上から、*FLO2* は葉の成長制御と種子の収量・貯蔵物質の品質維持に関わる基軸的な制御因子であることが明らかになった。

第一章 序論

種子は次世代の発芽・成長のためのエネルギー源として大量の物質を蓄積する代表的な貯蔵器官である(図 1)。被子植物の種子は、基本的には胚、胚乳、種皮からなるが、その構造は植物種により大きく異なる。例えば、イネの種子は、その発生過程で、胚は基本的な形態形成を行う一方で、胚乳を発達・肥大化させ大量の貯蔵デンプンなど貯蔵物質を蓄積する(図 2)。一方、大豆などでは、発生の過程で胚乳が減縮し、胚の組織である子葉を肥大化させ、その中に貯蔵物質を貯蔵する。モデル植物であるシロイヌナズナは胚に貯蔵物質を蓄積する後者の種子形態をとる。シロイヌナズナの種子では受粉後の発生過程で胚乳が形成されるが発達せず、胚の成長の過程でこの中に大量の貯蔵物質が蓄積される(図 2)。これに伴って胚乳の減縮がおこり、最終的には種子の最外層に 1 層の胚乳層を残すのみとなる(Olsen 2004)。

種子の貯蔵物質は発芽のためのエネルギー源となる。このためにデンプンやタンパク質・脂質などが貯蔵される。これらの貯蔵物質は、胚乳や子葉などの種子中の特定の組織に蓄積されるが、蓄積部位や蓄積される貯蔵物質の種類は植物種により異なる。これらの貯蔵物質の生合成経路は詳しく調べられており、それぞれが貯蔵組織の適切な細胞小器官で様々な酵素反応によるいくつかの段階を経て合成される。種子における貯蔵物質は、ソース器官より転流されてきた物質が原料となり、これがさまざまな酵素反応を経て貯蔵物質に変換される(井出 ほか 2009)。

イネなどの穀類では、種子の胚乳に貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質が大量に蓄積される。貯蔵デンプンは、胚乳に存在するデンプン貯蔵を担うプラスチドであるアミロプラストと呼ばれる細胞小器官で合成される(Martin and Smith 1995)。植物のデンプン合成は ADP-グルコースから始まる。ADP-グルコースピロホスホリラーゼ(ADG)はデンプン合成系の主要な酵素であり、2 つの大サブユニットと 2 つの小サブユニットからなる。合成されたデンプンは顆粒となって組織に集積される。そのサイズは、植物種によって異なる。デンプンは直鎖上のアミロースと分岐構造があるアミロペクチンから構成され、これらの合成にはデンプンシンターゼやデンプンブランチングエンザイム (BE) が大きく関与する (Dennis et al. 2005)。また、デンプンデブランチングエンザイム (DBR) はアミロペクチン合成において、デンプン顆粒のクラスター構造のトリ

ミングに関与すると考えられている(Kubo et al. 2005 中村 2009)。大量のデンプンが合成されるためには、これらの酵素が協調的に働くことが必要である(Dennis et al. 2005)。

ダイズやシロイヌナズナの種子では、種子の貯蔵物質として脂質やタンパク質を子葉に貯蔵する(Li-Beisson et al. 2013)。貯蔵脂質はプラスチド(脂質合成の場合はエライオブラスト)で合成された脂肪酸をもとに生合成される。脂肪酸はアセチル CoA を出発物質とし、アセチル CoA カルボキシラーゼ、脂肪酸合成酵素による一連の反応によって炭素鎖数 16~18 の脂肪酸が生合成される。この反応では、アシルキャリアータンパク質(ACP)などが補因子として関与する。プラスチドで合成された脂肪酸はいくつかの段階を経て、遊離脂肪酸に変換されたのち、小胞体に輸送される。この反応はチオエステラーゼなどが関与する。小胞体に移動した脂肪酸はアシル CoA、ホスファチジルコリン、ジアシルグリセロール等を経て貯蔵脂質に変換され、オイルボディと呼ばれる細胞小器官に貯蔵される(Somerville et al. 2005)。

貯蔵タンパク質は、種子の発芽時や初期の成長時期に分解されて、アミノ酸を供給する(山内ほか 1995)。シロイヌナズナの種子には主な種子貯蔵タンパク質として 12S タンパク質と 2S タンパク質が含まれており、これらは、胚発生の最終ステージで大量に合成されて蓄積される(Heath et al. 1986)。その結果、種子の乾燥重量の 3 分の 1 程度を占めるに至る(Kroji et al. 2013)。

ところで、種子の貯蔵物質の原料は光合成によって固定された炭水化物である。炭酸固定はソース器官でおこなわれる。緑葉は表皮組織・基本組織・維管束組織に大別される組織が含まれる(鈴木孝仁ほか 2016)。基本組織には柵状組織と海綿状組織が存在し、これらには光合成の場である葉肉細胞が含まれる。成熟した葉肉細胞には多数の葉緑体が存在し、光合成はこの細胞小器官で行われる。光合成によって固定された二酸化炭素はトリオースリン酸まで変換されて細胞質に移送され、葉の細胞のエネルギー源として用いられるほか、細胞質でのショ糖リン酸合成酵素等によりスクロースに変換されて、維管束組織を介してほかの組織へと運ばれる(Dennis et al. 2005)。

緑葉の発生過程では、葉の原基から成熟した葉になるまでに 2 つのフェーズが存在する。フェーズ 1 では、葉の原基では細胞のサイズは変わらずに、細胞分裂が盛んにおこり、細胞の数が増加する。フェーズ 2 でこれらの細胞が大き

くなることで葉のサイズが大きくなる (Gonzalez et al. 2012)。また、葉の細胞の伸長は葉緑体の増加を促すことが知られている (Larkin et al. 2016)。葉のサイズや葉緑体の数は光合成効率に強く関与する。貯蔵物質の原料は葉などで固定された炭水化物であることから、貯蔵物質生合成の制御機構を理解するためには、植物のソース能力を無視できない。

葉肉細胞で作られたスクロースは、原形質連絡を介して、維管束まで移動する (図 1)。原形質連絡で結ばれている細胞群では、膨圧差により溶質の蓄積部位から溶質の利用部位へ向かう溶液の流れが引き起こされる (Fisher 2005)。これはシンプラスト輸送とよばれる。緑葉では、維管束鞘細胞の間に膨圧差が生まれ、葉肉細胞から維管束鞘細胞へスクロースが流される (Fisher 2005)。この流れによって、スクロースは葉脈の維管束鞘細胞まで移動する。一方、篩部/伴細胞複合体は、その周囲を取り囲む柔組織細胞の間に原形質連絡が存在しない。このため、ここでの物質移送は別の機構による (Fisher 2005)。シロイヌナズナの篩管の柔細胞では細胞膜にスクローストランスポーターである SWEET11、SWEET12 が存在し、細胞間隙へのスクロース供給に関与している (Chen et al. 2012)。また伴細胞の膜には SUT2-H⁺(スクロース-プロトン・コ・トランスポーター) が存在し、細胞間隙のスクロースの細胞内への取り込みに関与することが知られている (Gottwald et al. 2000)。

篩管は、維管束組織にあって、炭酸同化産物やアミノ酸糖の輸送に関与する器官である。篩管は縦に連なった複数の篩管細胞によって構成され、縦方向に連続した篩管細胞の間には篩板と呼ばれる多数の孔がある特殊な細胞壁が存在する。この孔を介して篩管細胞は原形質連絡でつながっている。前述のように、原形質連絡によってつながった篩管では細胞間の膨圧差により、溶質の蓄積部位から利用部位への溶液の流れが生じる。

緑葉の篩部組織は周囲の葉肉細胞からスクロースが積み込まれる溶質の蓄積部位である。一方、登熟中の種子などの貯蔵器官は、物質のスクロースが積み下ろされて大量に利用される場である。このためにソース器官からシンク器官へ向かう圧流が生まれ、大量にスクロースがソース器官からシンク器官へと輸送される。この経路での溶液の流れは低い抵抗を持つ細胞群で結ばれていればより効率的に溶液が流れることになる (Fisher 2005)。

シロイヌナズナでは、登熟中の種子で、十分量の貯蔵物質が合成される。完

熟するためには多くのスクロースが供給される必要がある。このために、登熟中の種子の種皮で時期特異的に発現するスクローストランスポーターである SWEET11、SWEET12、SWEET15 が重要な役割を担う。これらを介した充分量のスクロースの輸送が必要である(Chen et al. 2015)。とくに SWEET15 は種皮のみで発現する特異的なトランスポーターであり、種皮から胚へのスクロース供給に関与することが報告されている(Chen et al. 2015)。

植物体においては光合成産物の分配は精密な制御を受けている。光合成をおこなう緑葉などのソース器官から、メリステム・根・花・種子などの栄養従属的なシンク器官へのスクロースの輸送は様々な機構により調節されていると考えられている(Fisher 2005)。ソース器官からの光合成産物の運搬が不十分となった変異体では、緑葉に糖が蓄積されることが知られている(Chen et al. 2012)。一方、登熟中の種子への転流が抑制されると、種子に「しわくちゃ(Wrinkled)」な形態が現れ、胚発達の遅延や、種子重量の低下、貯蔵デンプン、貯蔵油脂の減少などがおこる(Chen et al. 2015)。ソース器官への転流は種子の発達とともに、増加することが報告されている(Shimada et al. 2004)。

FLO2 (FLOURY ENDOSPERM2) 遺伝子はイネの *floury 2* 変異(*flo2*)の原因因子として同定された。イネの *flo2* 変異体では、胚乳の白濁、矮小化、粉質化などの表現型が現れ、その結果、穀粒の品質が著しく低下する。また、この変異体では、貯蔵デンプン生合成や、貯蔵タンパク質合成、エネルギー生産に関する遺伝子群の発現が低下する。これらのことから、*FLO2* 遺伝子は種子の物質貯蔵の生合成を制御する上位の制御因子であると考えられている(She et al. 2010)。

FLO2 はタンパク質と相互作用する TPR モチーフを持ち、*FLL1*、*FLL2* とともにファミリーを形成する。この遺伝子群は、高等植物で高度に保存された遺伝子である。一方、これらの遺伝子は真菌類や動物ゲノムには存在しないため、植物固有の機能に関わる因子であると考えられる。これらの遺伝子はいずれも緑葉で強く発現し、これらの3つの遺伝子の中で、*FLO2* のみは未熟種子で発現することがわかっている(She et al. 2010)。しかしながら、*FLO2* 遺伝子の機能については未解明な部分が多い。

本研究では、イネとは構造的に異なる種子を形成する種子植物であるシロイヌナズナの *flo2* 変異体を用いて、この生活環を通じた表現型を詳細に解析し、

種子植物に保存された *FLO2* 遺伝子の生理機能を明らかにすることを目指した。

第二章 シロイヌナズナ *FLO2* 遺伝子の同定

イネとシロイヌナズナは異なる種子の構造を持つ (図 2)。シロイヌナズナはアブラナ科のモデル生物である。すでに全ゲノム配列が明らかになっており、ゲノム中に 25000 個のタンパク質をコードしている遺伝子が含まれていることが明らかとなっている。多くの変異体が作出されており、これらは T-DNA tag line などとして公開されており、研究のために入手することが可能である。シロイヌナズナ *FLO2* 遺伝子の機能を調べるために、シロイヌナズナ *FLO2* 遺伝子の同定と、*flo2* 変異体の取得を行った。

シロイヌナズナ *FLO2* 遺伝子の同定と発現

FLO2 遺伝子は、イネ *floury 2* (*flo2*) 変異体の原因遺伝子として同定された遺伝子である。この遺伝子のイネ *flo2* 変異体の種子は胚乳が白濁し、粉質の穀粒となる。また、粒重の減少と貯蔵デンプンや貯蔵タンパクの質的な変化が生じることから、*FLO2* 遺伝子は、種子の発達過程において貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質の生産性に関わる制御因子であると考えられている (She et al. 2010)。シロイヌナズナも、イネと同じく *FLO2*、*FLL1*、*FLL2* からなるファミリーを有していた (図 3)。

BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) と TAIR

(<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) のデータベースを用いてシロイヌナズナの *FLO2* 遺伝子を検索したところ、この遺伝子は 1 番染色体に座乗する *At1g15290* 遺伝子が候補遺伝子として見つかった。この遺伝子は 21 個のエキソンと 20 個のイントロンからなり、中心付近に TPR モチーフを持つ 1608 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが予測された (図 4)。なお、この遺伝子がコードするタンパク質とイネの *FLO2* 遺伝子がコードするタンパク質を比較したところ、両者は高い類似性 (similarity: 70.8%) を示した (図 5)。そこでこの遺伝子を *AtFLO2* と命名した。

シロイヌナズナの遺伝子発現をまとめた eFP サイト

(<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) を用いて、*AtFLO2* 遺伝子の発現部位を調べたところ、この遺伝子は根と乾燥種子を除く植物体全体に発現していることが示された。特に、この遺伝子は抽苔前のロゼット葉と未熟種子

で強く発現していることがわかった (図 6)。このことから、*AtFLO2* 遺伝子は栄養成長期と生殖成長期で発現する遺伝子であることが示唆された。

シロイヌナズナ *FLO2* の T-DNA 挿入変異体の同定

この遺伝子の変異体を T-DNA express サイト (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) を用いて検索した。その結果、SALK_138275 と SALK_208556 の 2 つの T-DNA 挿入変異体が見つかった。このうち、SALK_138275 変異体は 14 番目のイントロンに、SALK_208556 は 18 番目のイントロンに T-DNA が挿入されていた (図 7)。

これらの変異体系統を入手し、これらのジェノタイピングを行った。SALK_138275 変異体系統を栽培し、ジェノタイピングを行ったところ、この変異体は *AtFLO2* 遺伝子の変異をヘテロ接合型で持つ植物体であることがわかった。そこで、この植物を自殖し、得られた後代の植物から変異体型の遺伝子ホモ接合型で持つ個体を選抜した。この SALK_138275 由来の *AtFLO2* 遺伝子変異をホモ接合型で持つ植物 (以後、138275_ *flo2* 変異体) を栽培したところ、栄養成長期のロゼット葉に特徴的な表現型が現れた。138275_ *flo2* 変異体は野生型の植物体よりも、ロゼット葉が大きくなることが明らかとなった (図 8A)。また、長角果の長さに違いが認められ、138275_ *flo2* 変異体は野生型よりも顕著に短くなることが観察された (図 8B、C9)。一方、SALK_208556 変異体系統も同様に栽培して得られた、後代の植物体の中で変異型の遺伝子型を有する個体を選抜した。これを栽培し表現型を調べた。SALK_208556 由来の *AtFLO2* 遺伝子変異をホモ接合型で持つ植物体 (以後 208556_ *flo2* 変異体) も 138275_ *flo2* 変異体と同様にロゼット葉が大型化することが示された (図 9)。この変異体植物の緑葉より RNA を抽出し、RT-PCR により *AtFLO2* の転写産物の検出を試みたところ、全長に近いサイズの *AtFLO2* の転写産物は検出されなかった (図 11)。

次に、138275_ *flo2* 変異体にほかの遺伝子の変異が含まれることによる表現型への影響を取り除くために、138275_ *flo2* ホモ変異体を野生型シロイヌナズナと掛け合わせることで、戻し交配を行った (図 10 A)。得られた 16 個体の F1 個体を栽培したところ、これらには上記の表現型は認められなかった。F1 個体をジェノタイピングした結果、すべての個体は *flo2* 変異のヘテロ接合体であ

った。次に、これらの植物体を自殖して得られた F2 の植物を栽培した。62 個体の F2 植物を栽培し、これらのジェノタイプングを行ったところ、これらは *flo2* ホモ変異体が 12 個体、*flo2* ヘテロ型変異体が 24 個体、野生型の個体が 22 個体に分離した。この中から *flo2* 変異ホモ接合型となった個体を選択し、その次世代を栽培した。得られた表現型を確認した結果、これらの *flo2* 変異体はいずれも野生型植物よりもロゼット葉が大きくなる表現型を示した (図 10 B)。また、これらでは *AtFLO2* の転写産物が検出されなかったため (図 11 C)、これらの個体を *flo2* 変異体として、以後の実験に用いた。

まとめ

イネ *FLO2* のオーソログであるシロイヌナズナ *FLO2* を同定し、*FLO2* 遺伝子に *FLO2* 遺伝子のイントロンに T-DNA が挿入された変異体を 2 系統取得した。この変異をホモ接合型で持つ個体では、シロイヌナズナ *FLO2* 遺伝子の全長の転写産物が検出されないため、全長 *FLO2* 遺伝子の発現が欠損した変異体であると考えられた。これらの変異体では、緑葉が大きくなる表現型が現れた。138275_ *flo2* 変異体を戻し交配し、得られたホモ接合体となった変異体を *flo2* 変異体として以後の実験に用いることにした。

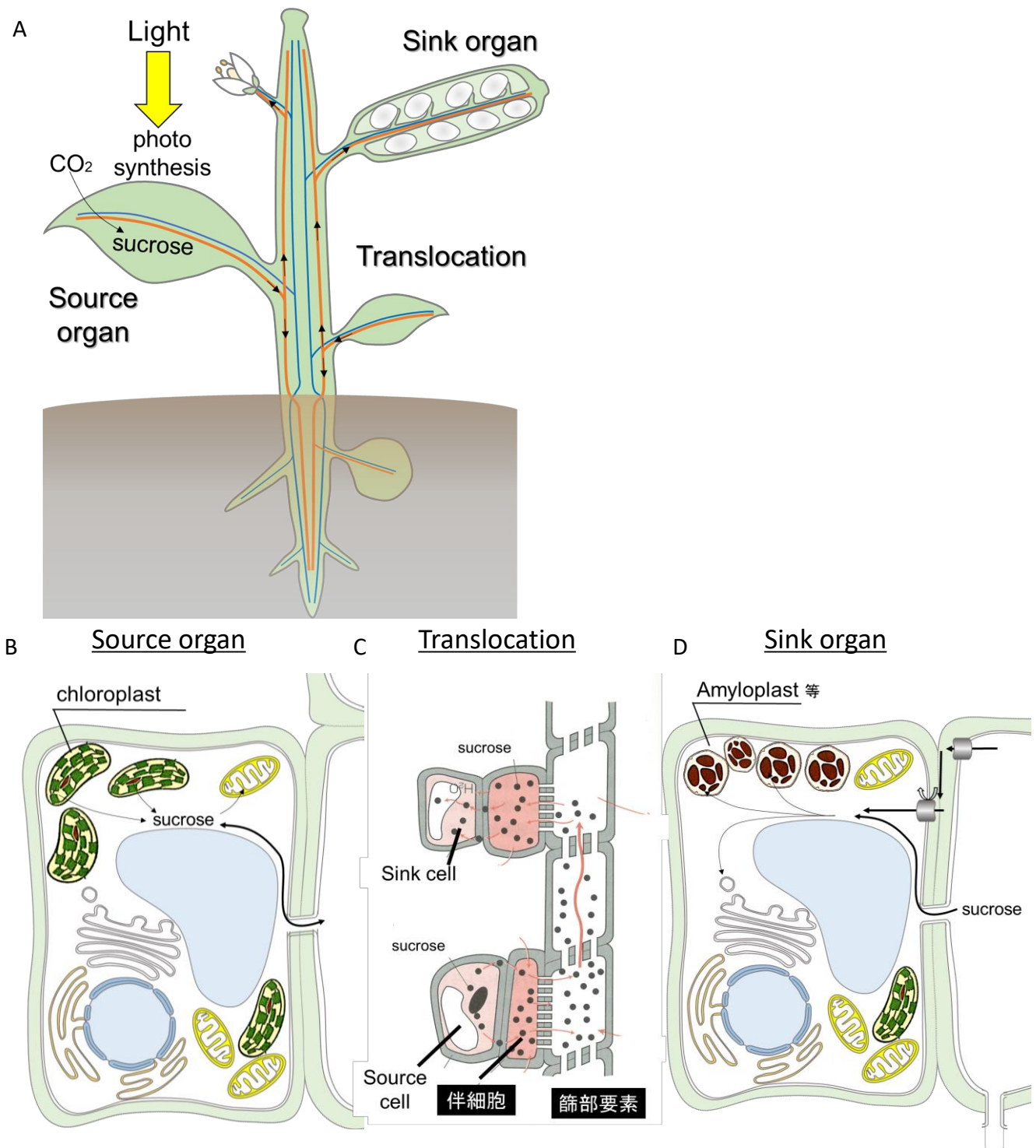
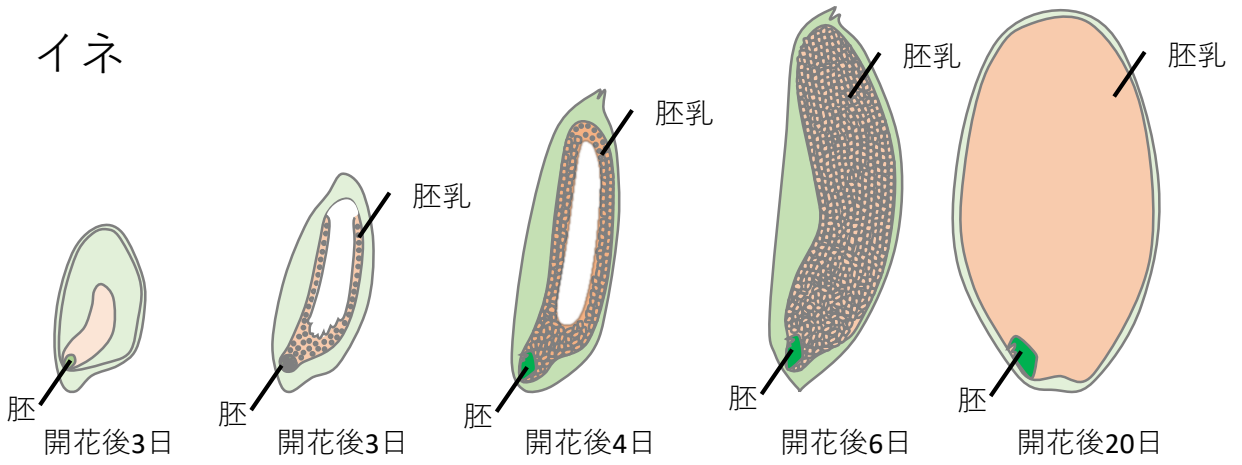


図1, 植物の構造 ソース器官・転流・シンク器官

A) 植物のソース組織からシンク組織への物質輸送のモデル 植物は光合成をおこなうことで大気中の二酸化炭素を固定しスクロースへ変換し、維管束の篩管を介してシンク器官へと同化産物を輸送する。

下段は各器官における細胞の模式図。B) ソース器官の細胞では光合成が葉緑体で行われることでスクロースが生産される。その糖は原形質連絡などを介して隣接する細胞へ移動し、維管束のほうへ輸送される。C) 転流の場である維管束では糖が伴細胞に輸送されると、篩部要素へと糖が輸送され、濃度勾配に従ってシンク器官へと輸送されると考えられている。D) シンク器官の細胞では、輸送されてきたスクロースを基質としてアミロプラストなどの小器官で貯蔵物質が合成される。

イネ



シロイヌナズナ

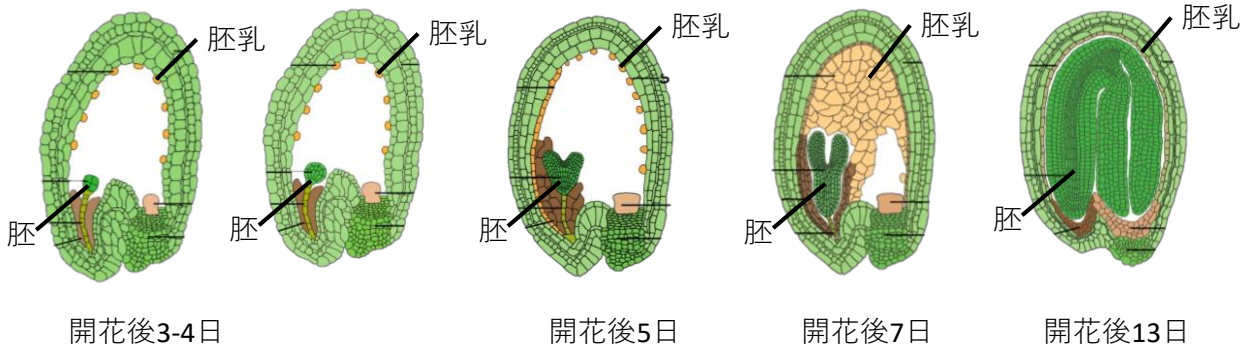


図2, 種子植物における代表的な種子の形態とその発達過程

上段はイネの種子発生を、下段はシロイヌナズナの種子発生の模式図である。
イネの種子の発生は「イネの生長」をシロイヌナズナの種子発生は
<http://seedgenenetwork.net/arabidopsis>より改変した。

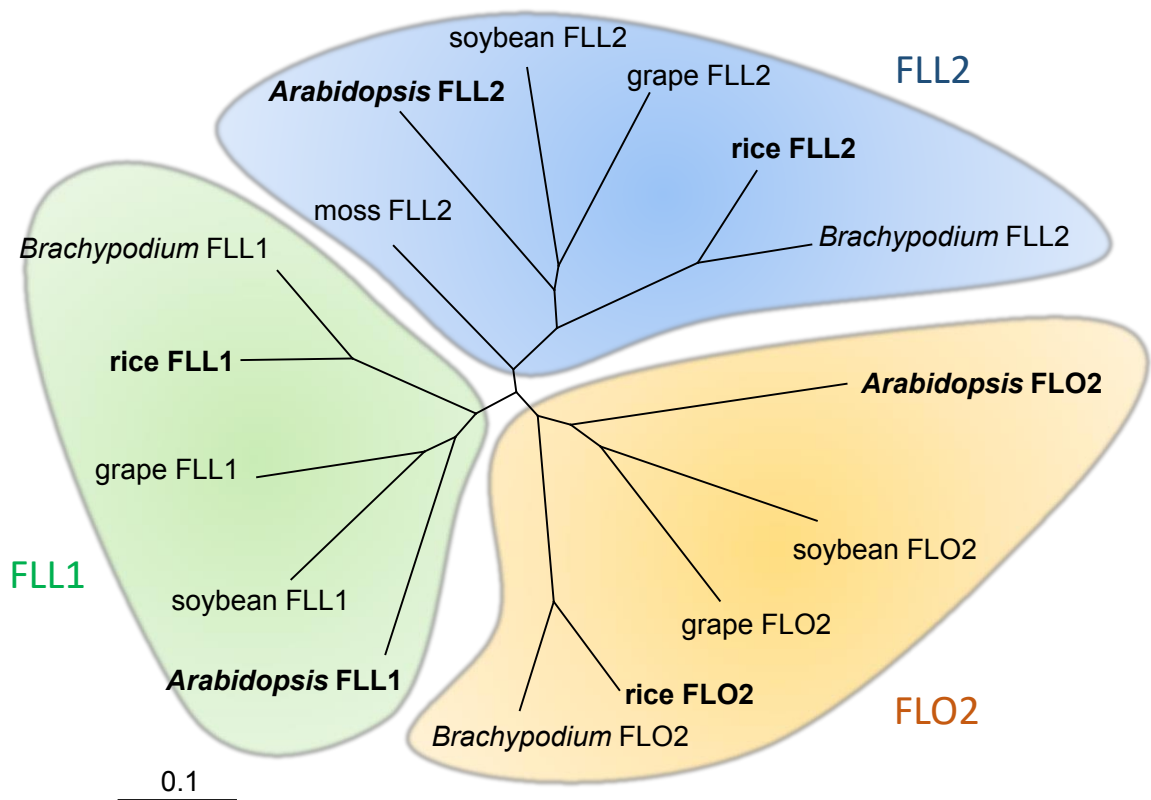


図3, FLO2ファミリー遺伝子の系統樹

FLO2およびホモログの系統発生解析。タンパク質は、植物種の名前として図に示されており、対応するアクセッション番号はタンパク質データベースに登録されている (<http://www.ncbi.nih.gov/>および<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>)。FLO2、FLL1およびFLL2を含むサブファミリーが示される。シロイヌナズナは太文字で示した。スケールはシーケンス間の差の数を表す。個々のタンパク質の受託番号は以下の通りである：**Arabidopsis** FLO2 (NP_172981.3), FLL1 (NP_194537.7), FLL2 (NP_001184884.1), Rice FLO2 (XP_015635737.1), FLL1 (XP_015626109.1), FLL2 (XP_015646988.1), *Brachypodium* FLO2 (XP_003580679.1), FLL1 (XP_003570287.1), FLL2 (XP_003563202.1), soybean FLO2 (XP_006583118.1), FLL1 (XP_003522940.1), FLL2 (XP_006583230.1), grape FLO2 (XP_003632816.1), FLL1 (XP_003633167.1), FLL2 (XP_002278370.2), moss (*Physcomitrella patens*) FLL (XP_001765054.1)

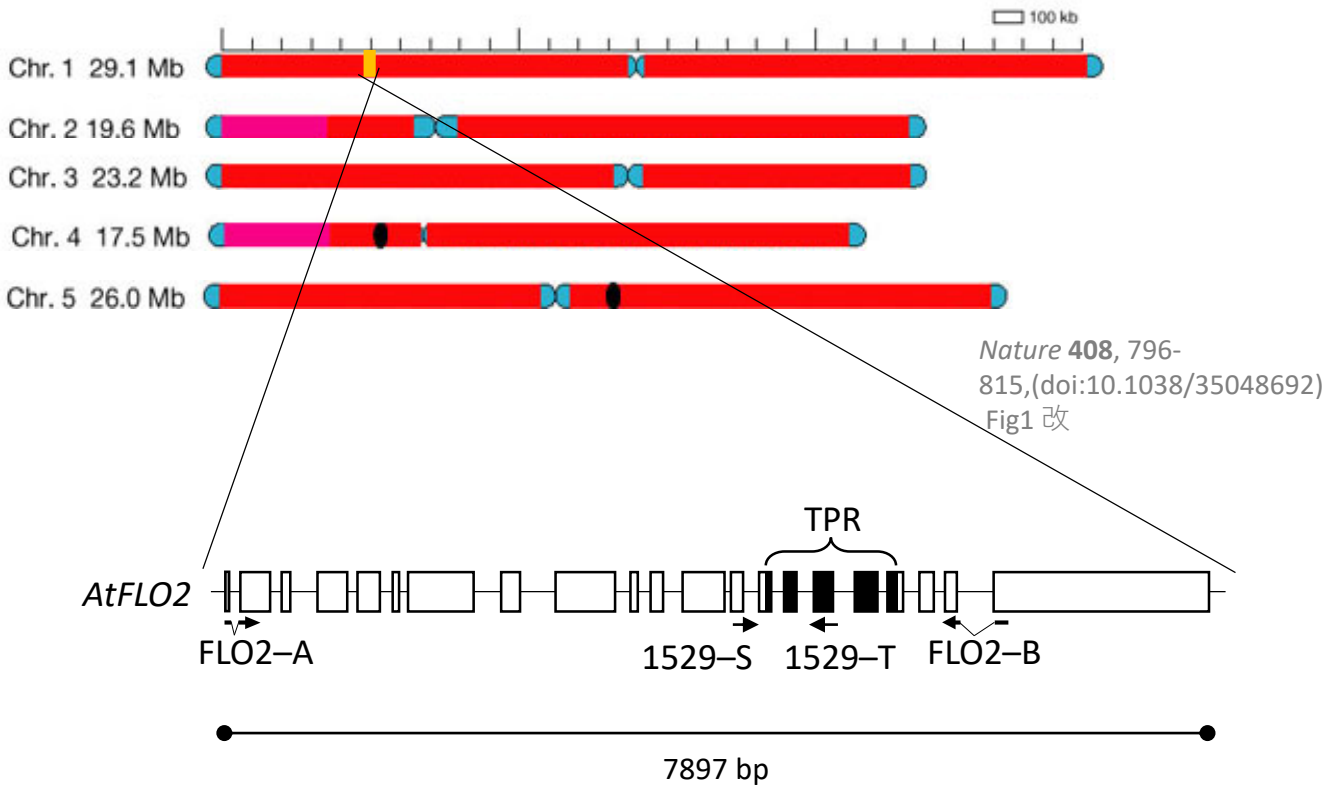


図4, シロイヌナズナFLO2遺伝子の概要とその染色体上の位置

シロイヌナズナは5本の染色体を有しており、*AtFLO2*は1番染色体上の逆相補鎖に存在する。上記の図では染色体上のおおよその位置を示した。*AtFLO2*は21個のエキソンと21個のイントロンによって構成される。この図ではエキソンを白いボックスで示した。また、この遺伝子にはTPRモチーフが存在し、黒いボックスで示した。

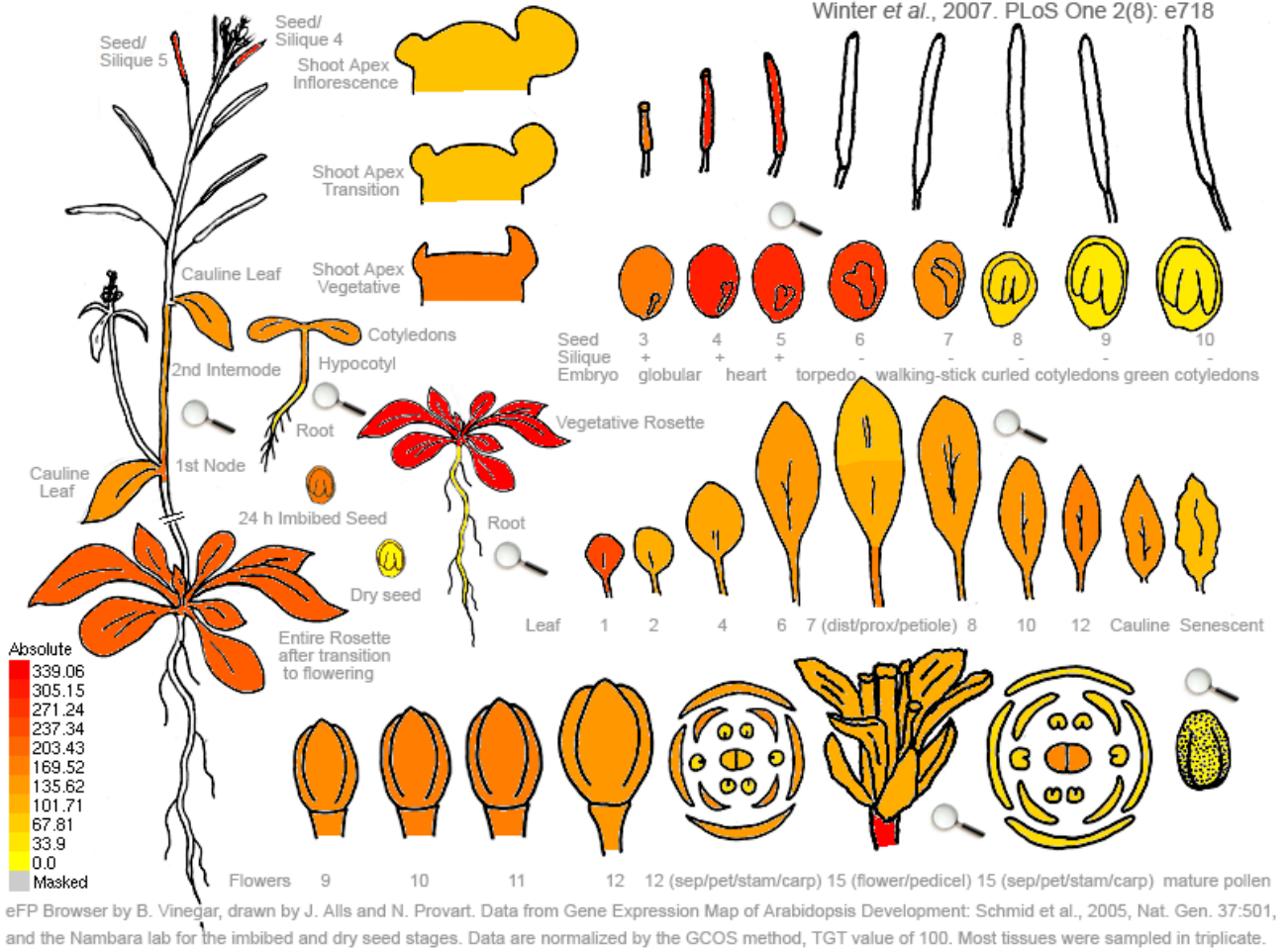
```

AtFLO2 1' MAPRSSKGS NNGKGGDKK KRDKLLAPS LVEITVTPY ETQVILKGS TDKIIDVRR LASHVETCHF TNYSLSHVK GHKLNNDIQV LSLKPCFLRM
OsFLO2 4' KGAGRGKGR GGGGKGDKR KKEEKVV-PS AIDVTVTPY ESQVTLKGIS TDRVLDVRKL LGSNVETCHL TNYSLSHVTR GQRLEDGVEI VSLKPCSLTI
AtFLO2 101' IPEEYLEESQ ALTQVRRVID IVACTTRFFS KSPNKSVIAG NANPTPADPG LDMVAIHPT KLSQFYEFFS IHHLSPPIILH LKKVDGEEAG EKRGDYDFGL
OsFLO2 103' VEEEYATEAA AAAQVRRLLD IVACTTAFVN KPRDGAKIHS SKHARPATPP SPPALAASPD -AHGAGAAQA PPISAEADMA AIRPPPRLGE FYDFLSFAHL
AtFLO2 201' KVKICNGKVI HVIASVKGFF AVGKQLSHCH SIVDLLQVNS NAFKAYESL MKAFTDRNKF GNLPGFLRSN TWLVPS---P VSESASPLPT EDEHWGGNGG
OsFLO2 202' TPPVHFIRRK ESNASQ--E GDYFIEVKV CNGKLLHIVA SVKGFSYAGK PHTVSHSLVD LLQLSSAFA NAYDALMKAF LDHKNFGNLP YGFRANTWLI
AtFLO2 298' GQGRNGEYDH RPWAAEFSVL ATLPCKTEEE RVIRDKKAFL LHSQFIDTSS QRAVRAICNV MDTNQQTSGT TDLPAGSILL EDHVGDLISV VKRIDIASLDS
OsFLO2 300' PPIYLDSATK CPALPVEDEN WGGNGGGNGR DGKYDRRWA KEFSTLARMP CKTEEGRVIR DRKAFLLHNL FVDTAIFRAA STIQRLLDLS GNSTSQAGL
AtFLO2 398' KPEATFQND -FVLSSEELA ERNLLKGIT DESVIHDTPL ALGKVIYRQC GYTAVVNKG QT----QKA MSDFRDIL-- ----IDDL DGGANALNLN
OsFLO2 400' DGLATEIERV GLLITVKRD QADASKLED KVDGVALYQT GMSDISQRNL LKGLTSDSEV VVKDTSILGV VIVKHCGYTA TVKVSGRTKD GNGGKQSDI
AtFLO2 485' SLRVEFHRPH SVGTSVENQP TQLDWDLES YRCIIQELVK INLTKEETR VSSVRPIRWE LGSTWVQHLQ KKETDVC--G KPATNDETEL SVKGLGKQFK
OsFLO2 500' CDHLGDISNV DVDDLPGGS NALNINSLRI SLPKIVNSDI ASTQCPTQS HVDNHA-RKL VRKILEDSL KLENMPANNP RTIRWELGSS WLQNLQKSDS
AtFLO2 583' DLKSKSKSE NI-SAVNEKD TRLHELNEED DLGQKSDGL FTELKE----- -LLSEEAFSR LKETGTGLHL KSKEELNMA
OsFLO2 599' PASEDKKNAG HVEKETTIG LGKHFEQLK IKKKECHVEG AMSEKEDSDS NCSVINGMEE SENTKETDIS KLMSEDDFCR LKDLGAGLHQ KSEELTMMMA
AtFLO2 657' YGYYDEIALP RLVADFGSLE LSPVDGRTLT DFMHIRGLQM RSLGHVAKLA EKLPHIQSLC IHEMITRAFK HLLRAVIASV NNMAELPVAV AASLNFMLGR
OsFLO2 699' HKFYDDTALP KLVADFASLE LSPVDGRTMT DFMHTRGLNM CSLGRVVELA EKLPHIQSIC IHEMVIRSFK HIVRAVIAAV DDMQNMSAAI AETLNILLGC
AtFLO2 757' RELE-GCDRI PGEEYCLRLQ WLQKFLSRKF GWIQKDEFHH LKKFSTLRGL CQKVGLLVS RFDL-DSPNP FMSSDIIGLV PVCKHVLCS SDKRTLESS
OsFLO2 799' PRLESGTETD AHSEHNLRFR WVERFLSKRY NWKLKDEFAH LRFKIIIRGL CSKVGLLVA RYDMNSPNP FDKSDIVNII PVCKHVYSS IDGRNLLSS
AtFLO2 856' KLALDKGKLD DAVSYGKAL VKMIAVCGPY HRNTACAYSL LAVVLYHTGD FNQATIIYQQ ALDINERELG LDHPDTMKS YGDLVFFYRL QHFELALKYV
OsFLO2 899' KMALDKGKLD DAVNFGKAL SKIVAVCGPY HRLTANAYSL LAVVLYHTGD FNQATIIYQQ ALDINERELG LDHPETMKS YGDLVFFYRL QHIEMALKYV
AtFLO2 956' NRALFLLHFT CGLSHNTAA TYINVAMMEK EVGNHDLALR YLHEALSKNK RLLGADHIQT AASYHATAVA LSFMEASHLS VQHEQTTLQI LTA KLGADDL
OsFLO2 999' NRALYLLQFS CGLSHPNAAA TYINVAMMEE GMGNVHVALR YLHEALCKNK RLLGADHIQT AASYHATAIA LSMMDAYSLS VQHEQTTLQI LQEKLGQDDL
AtFLO2 1056' RTQDAAWLE YFESRAIEQQ EAGRNGIPKP DASIASKGLH SVSDLLDYIS SDPDTKGNVA HRKHRRARIL QVNDKVASAD DDAHRVASQI DIVTWNVAE
OsFLO2 1099' RTQDAAWLE YFESKALEQQ EAARRGIPKP DSSIASKGLH SVSDLLDYIS PDQERKERDT QRKGRRAKNN IRAHQGELVE EKESFEHDIG SPHEANKEEF
AtFLO2 1156' ADV
OsFLO2 1199' QQX

```

図5, シロイヌナズナFLO2とイネFLO2のアミノ酸配列の比較

シロイヌナズナFLO2とイネFLO2のアミノ酸配列の比較。上段がシロイヌナズナFLO2 (At)、下段がイネFLO2 (Os) のアミノ酸配列を示す。*は両者で相同なアミノ酸、・は類似なアミノ酸を示している。TPRモチーフの部分を中心に高い相同性を持つことが示されている。



eFP Browser by B. Vinegar, drawn by J. Alls and N. Provar. Data from Gene Expression Map of Arabidopsis Development: Schmid et al., 2005, Nat. Gen. 37:501, and the Nambara lab for the imbibed and dry seed stages. Data are normalized by the GCOS method, TGT value of 100. Most tissues were sampled in triplicate.

図6, eFPブラウザーが示すシロイヌナズナ*FLO2*遺伝子の発現部位と時期

*AtFLO2*転写産物は根を除く植物全体で発現している。特に、抽苔前のロゼット葉と未熟種子、花のがくで強く発現している。<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>

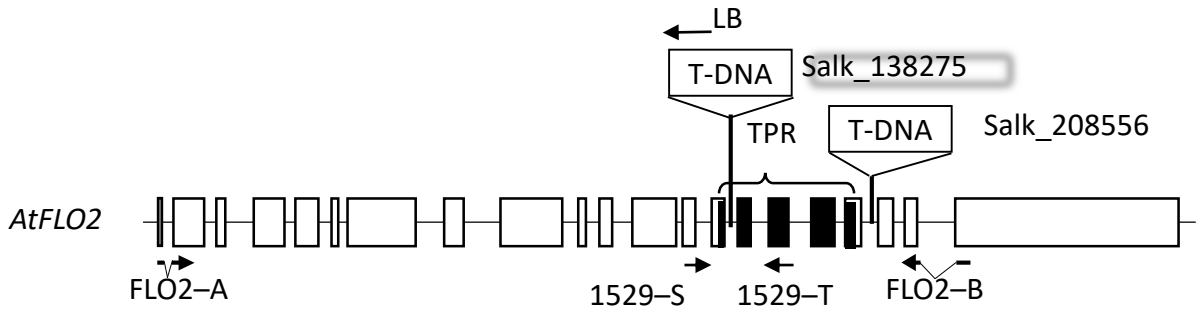


図7,変異体における T-DNA 挿入部位の概要図

SALK_138275およびSALK_208556における*AtFLO2*遺伝子の構造およびT-DNA挿入の位置の概略図。エクソンは四角いboxで示した。TPRモチーフの領域は、黒く塗りつぶしたボックスで示されている。ジェノタイピングはエクソン13および16の周辺の1529-Sおよび1529-T、T-DNAのLBを用いて、*AtFLO2*の転写産物の検出はFLO2-AおよびFLO2-Bのプライマーを用いて行った。それぞれの場所を矢印で示した。

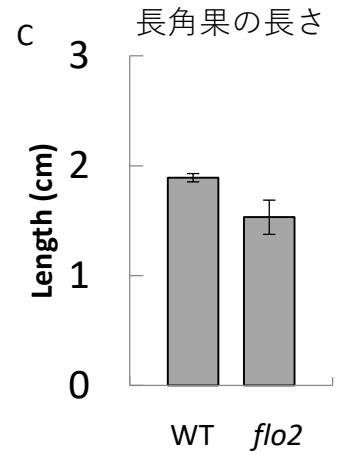


図8, SALK_138275ホモ接合植物の表現型

- A) MS培地で育てた3週間育てたシロイヌナズナのロゼット葉。左側は個体右側は葉を一枚一枚分離して並べたものである。スケールバーは1cmを示す。
- B) 野生型とSALK_138275ホモの長角果の表現型 C) 長角果の長さを測定した平均値 (n=20) エラーバーは標準誤差を示す。

A WT



SALK_208556



B

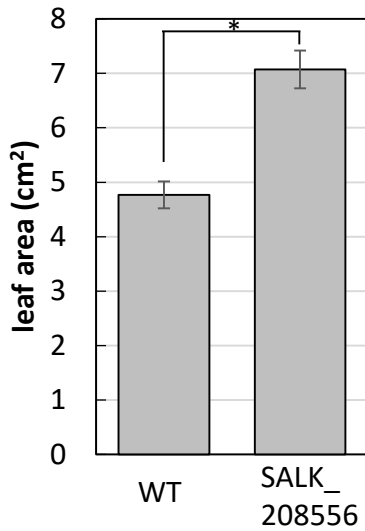


図9, SALK_208556ホモ接合植物の表現型

A) 野生型(上段)とSALK_208556のホモ個体の播種後4週間のロゼット葉の形態。B)野生型植物(WT)とSALK_208556のロゼット葉の面積の平均 (n=4) エラーバーは標準偏差を示す。t検定を行った。*: $p < 0.05$

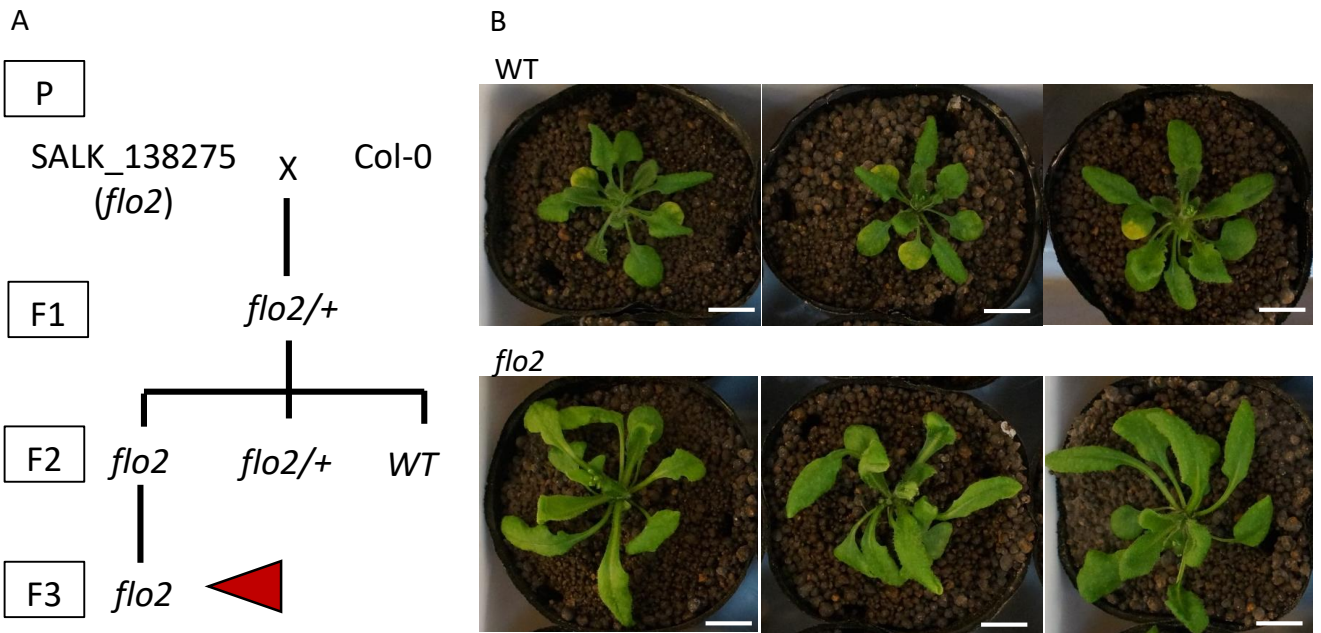


図10, 戻し交配した*flo2*変異体とその表現型

A)戻し交配個体の系譜。SALK_138275のホモ個体と野生型であるCol-0を掛け合わせ、F1を取得。その後、F1を自家受粉させF2世代を取得した。今後の実験には、*flo2*ホモの後代(赤矢印)を使用した。B) F2世代をジェノタイプング、野生型の遺伝型と*flo2*ホモの遺伝型を示した個体のロゼット葉の表現型を比較した。スケールバーは1cmを示す。

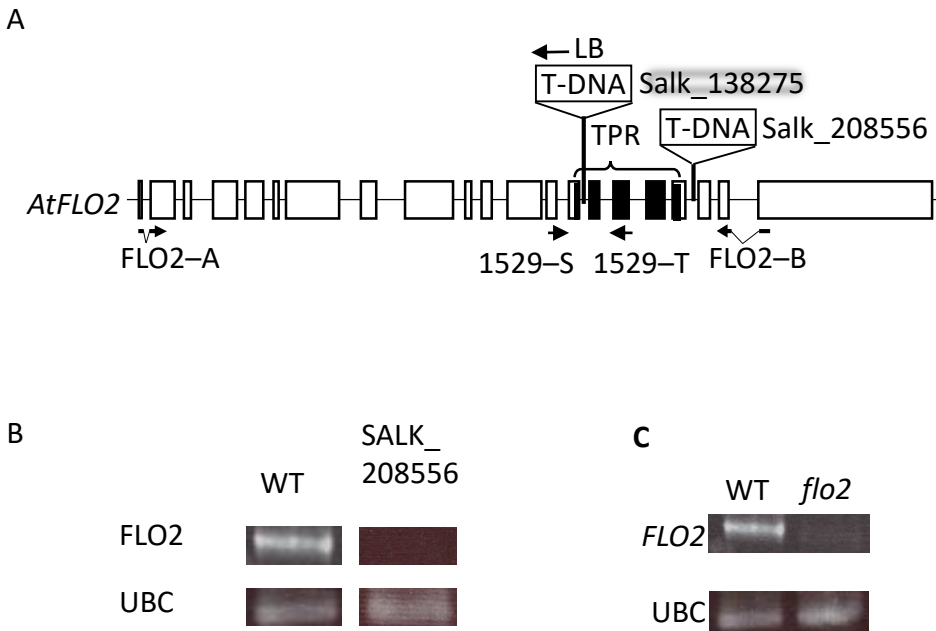


図11, SALK_138275変異体のバッククロス個体のFLO2 mRNAの発現

変異体および野生型植物における*AtFLO2*遺伝子の転写物の検出。*AtFLO2*遺伝子の転写物に対するRT-PCRの結果を示し、下のパネルは、構成的に発現される対照としてのUBCのものを示す (Czechowski et al. 2005) a)は各変異体のT-DNA挿入位置を示す。B)はSALK_208556の*AtFLO2*の発現をC)はSALK_138275をバッククロスしたホモ個体の発現を示す。

第三章 栄養成長期におけるシロイヌナズナ *flo2* 変異体の形態解析

イネ *FLO2* 遺伝子は葉や未熟種子で発現するが、イネの葉では顕著な表現型が現れない (She et al. 2010)。シロイヌナズナ *FLO2* もイネ *FLO2* と同じような発現パターンを示すため、本章では、シロイヌナズナ *FLO2* の緑葉における機能を調べるために、栄養成長期における *flo2* 変異体の表現型を詳しく調べた。

ロゼット葉の比較

シロイヌナズナ *flo2* 変異体の種子は正常に発芽した。ほぼすべての種子が発芽し、発芽率は野生型とほぼ同じであった。また子葉や芽生えには形態的な変化は認められなかった。本葉に関しては、シロイヌナズナ *flo2* 変異体では、葉のサイズが野生型よりも明らかに大きくなっていた (図 12 A)。播種後 14 日目と 21 日目の緑葉の総面積を比較すると、*flo2* 変異体は野生型の植物よりも平均で 30% 程度大きくなった (図 12 B)。緑葉の新鮮重量は野生型のシロイヌナズナよりも 40% 程度大きくなった (図 12 C)。また、*flo2* 変異体の緑葉は野生型よりも緑色が弱く、全体的に淡緑色を示した。これらの葉は成長の早い段階で黄化が始まった (図 12 A)。播種後 20 日目 (20 DAS) のロゼット葉の数を調べたところ、*flo2* 変異体では野生型よりもわずかに少なくなった (図 12 E)。また、葉の裏にある気孔の数を調べたところ、*flo2* 変異体と野生型の間で単位面積当たりの数に差が認められなかった (図 12 E)。

ロゼット葉の詳細な解析

緑葉が大きくなった原因を探るために、葉の薄切切片を作成し、顕微鏡で観察した。維管束や表皮細胞の形態には差が認められなかったが、葉肉細胞の形と色に違いが認められた (図 13 A)。*flo2* 変異体の柵状細胞や葉肉細胞は野生型よりも淡緑色を呈し、さらに、細胞内の葉緑体数の減少が認められた (図 13 A)。また、それぞれの細胞サイズを測定したところ、野生型の柵状細胞よりも、1.3 倍程度大きくなっていることがわかった (図 13 B)。電子顕微鏡を用いて表皮細胞を撮影したところ、表皮細胞やトライコームの形態に違いが認められなかった (図 13 C)。

強光条件下での育成

シロイヌナズナ *flo2* 変異体を発芽後すぐに光条件を変えて栽培した。*flo2* 変異体も野生型植物も強光条件下 ($440 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) で栽培すると通常条件下 ($117 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) で育成した植物体よりもロゼット葉が小さくなった (図 14 G、H)。野生型植物は、通常の光条件と強光条件どちらの条件で育てた場合も葉は緑色が保たれたが (図 14 E、G)、強光条件下で栽培した *flo2* 変異体は早い段階でロゼット葉が著しく黄化した (図 14 H)。

抽苔時期の解析

シロイヌナズナは花形成の時期に、ロゼット葉の中心部領域から花芽を抽苔する。これにより、栄養成長期から生殖成長期へと移行する。*flo2* 変異体と野生型植物の成長速度を比較するために、抽苔する時期を調べた。その結果、*flo2* 変異体の抽苔時期は野生型よりも、1~2 日早く抽苔が起こった。野生型植物では播種後 24 日目ですべての植物体が抽苔したのに対し、*flo2* 変異体では播種後 22 日目ですべての植物体の抽苔が完了した (図 15 B)。しかし、*flo2* 変異体と野生型の間には、抽苔後、花が咲くタイミングや花の形態には差異が認められなかった (図 15 A)。

まとめ

この章では栄養成長期における *flo2* 変異体の表現型を調べた。これまでに、イネの *flo2* 変異体は種子の生殖成長期の胚乳に表現型が現れることが知られているが、栄養成長期での表現型は報告されていない。そこで、シロイヌナズナ *flo2* 変異体の栄養成長期に着目して、主にロゼット葉の表現型を調べた。その結果、*flo2* 変異体は (1) ロゼット葉が大きくなり、葉の色が淡緑色を呈す。(2) 細胞のサイズが大きくなり、細胞中の葉緑体数が減る。(3) 強光条件下で栽培すると葉の黄化が誘発される。(4) 抽苔時期が少し早いことなどが示された。今回の結果から、シロイヌナズナの *flo2* 変異体は、栄養成長期で顕著な表現型が現れることが明らかになった。これらの結果から、シロイヌナズナの *FLO2* 遺伝子は、栄養成長期において様々な事象に関与することが示唆された。*FLO2* 遺伝子は緑葉の成長制御や光合成に関与する可能性が示唆される。また、抽苔時期が早

まり、ロゼット葉の枚数が少ないことから、*flo2*変異体では成長促進や老化の誘発が起こることが示唆された。

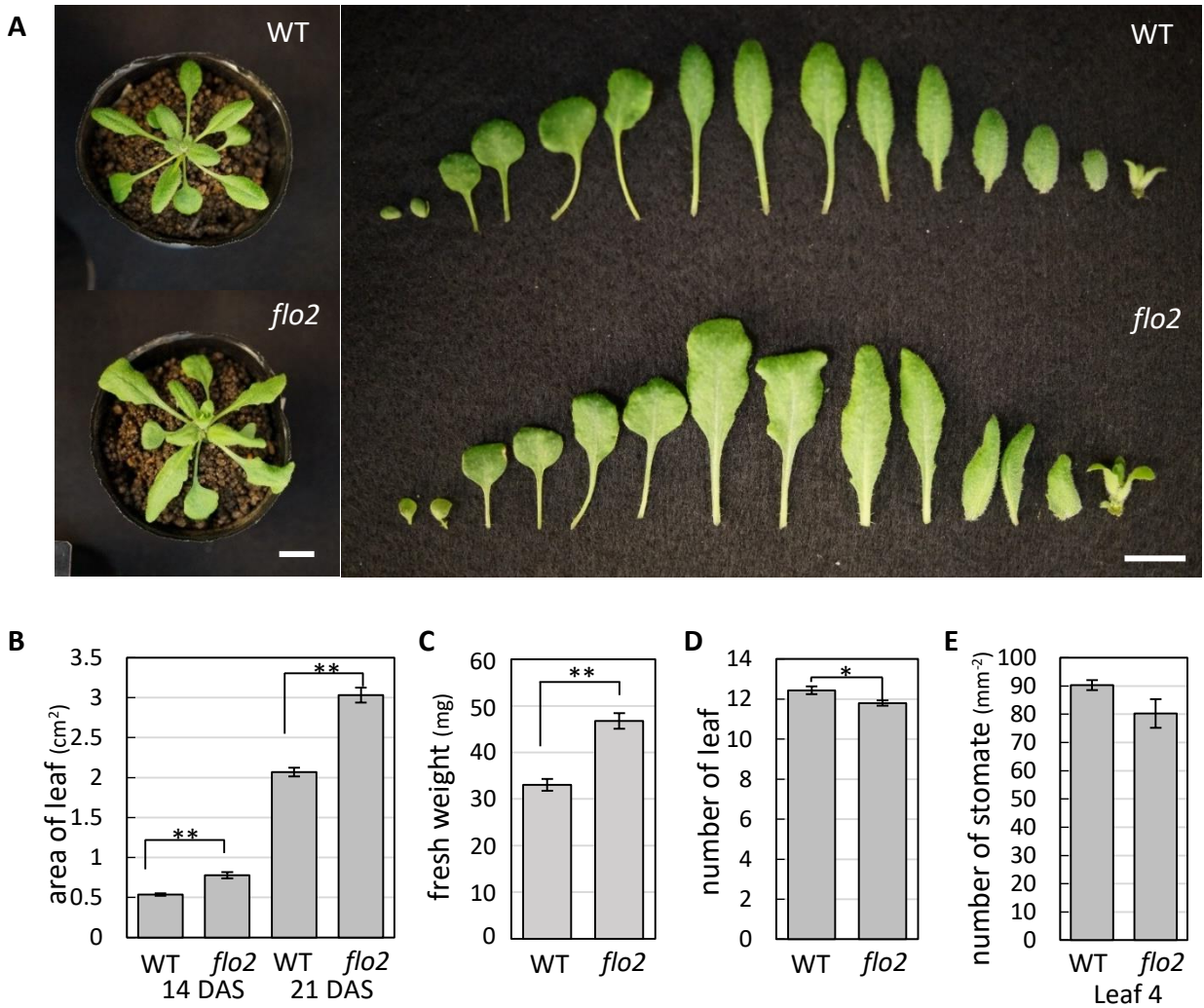


図12, *flo2*変異体の栄養成長期における表現型

A) 播種後20日目の野生型植物体(上段)と*flo2*変異体(下段)のロゼット葉の表現型を示す。葉は一枚一枚茎から切り離し、順番に並べた。スケールバーは1 cmを示す。
 B) 播種後14日目と21日目のロゼット葉の平均的な面積。エラーバーは標準誤差を示す(n=20) C) 植物体の新鮮重量(n=15)を示す。エラーバーは標準誤差を示す D) 平均的な葉の枚数(n=39) エラーバーは標準誤差を示す E) 4枚目の葉の裏にある単位面積当たりの気孔の数の平均を示す。エラーバーは標準誤差を示す。t検定を行った。 **は $p < 0.01$, *は $p < 0.05$ を示す。

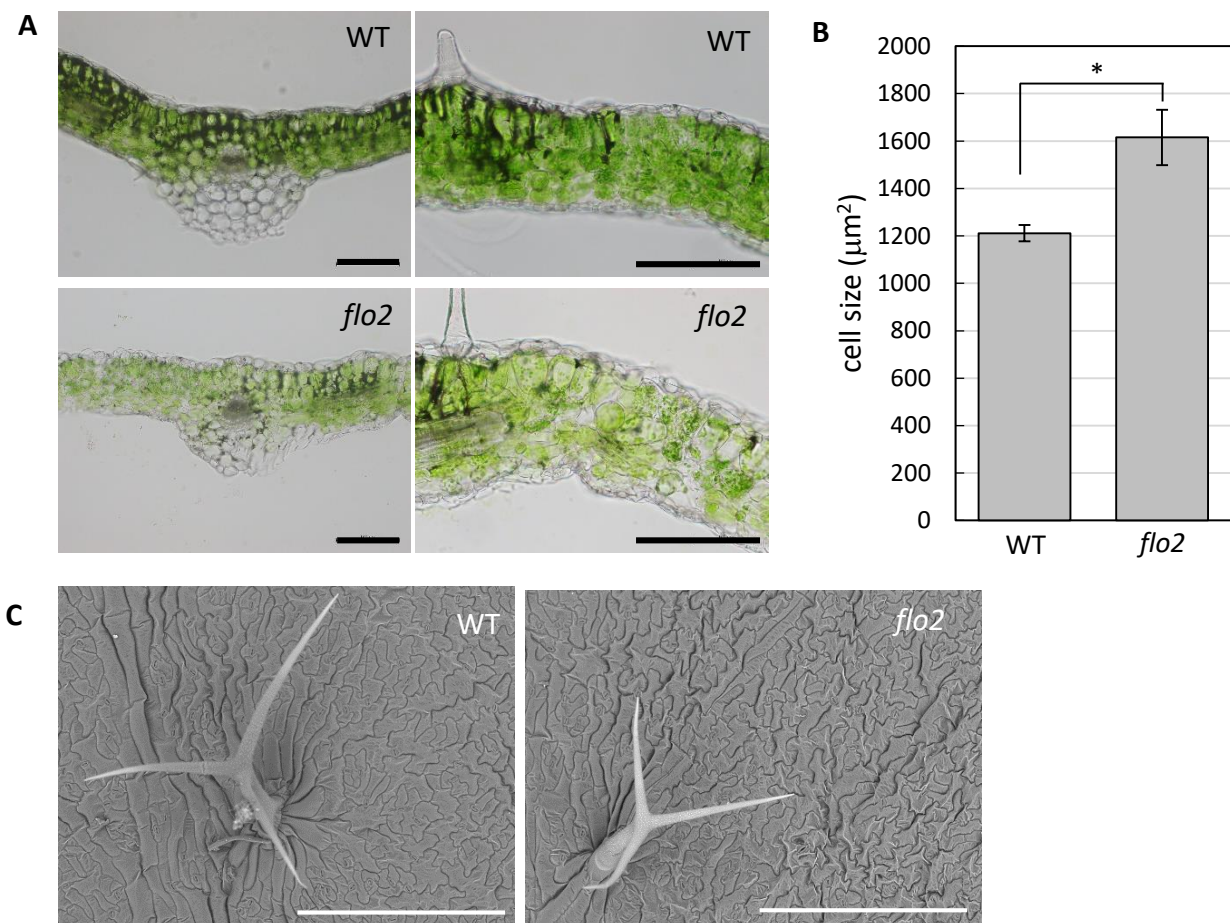


図13, *flo2*変異体の葉の横断面と葉肉細胞サイズ

A)野生型植物(WT)と*flo2*変異体(*flo2*)のロゼット葉の切断面の顕微鏡写真 右の写真は左の写真の拡大図である。スケールバーはそれぞれ200 μm を示す。B)葉肉細胞の面積を測定した平均値を示す。エラーバーは標準誤差。t検定を行った。*は $p < 0.05$ を示す。C)野生型(WT)と*flo2*変異体(*flo2*)の葉の電子顕微鏡写真 スケールバーは500 μm を示す。

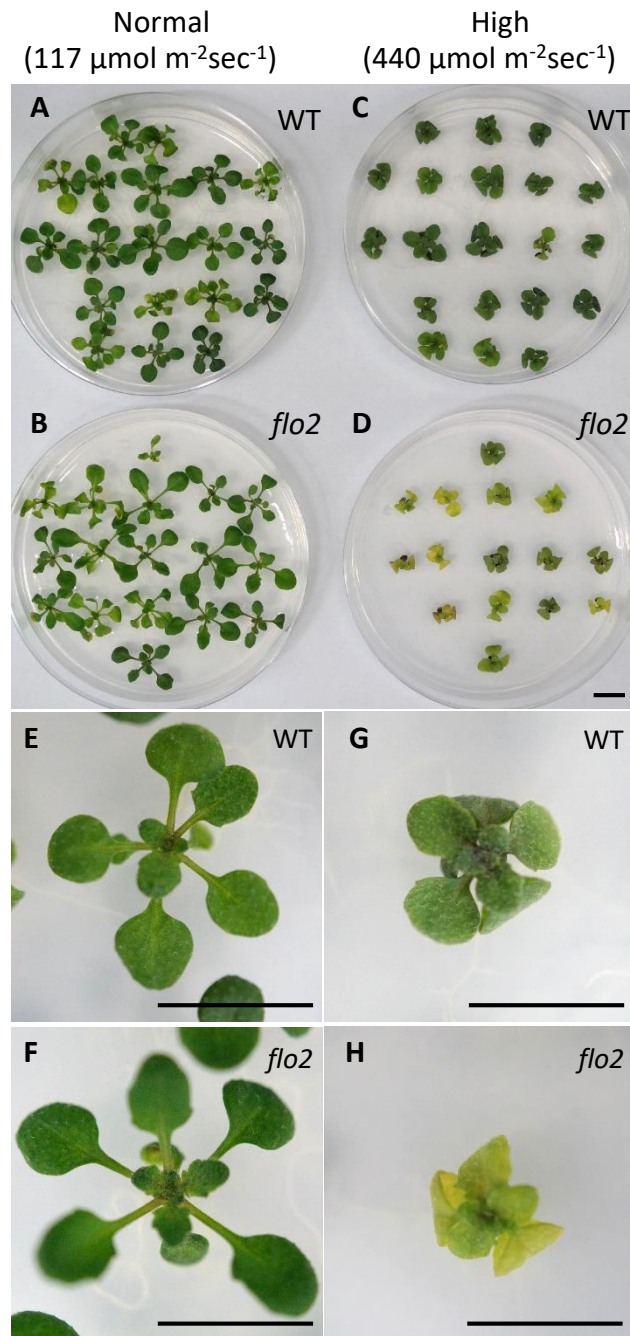


図14, *flo2*変異体と野生型の強光条件下での表現型

通常光量下($117 \mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$)で生育したA)野生型植物とB)*flo2*変異体と、強光条件下($440 \mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$)で生育したC)野生型植物とD) *flo2*変異体の表現型。これらの植物体は2週間グロースチャンバーの中で生育した。E)-H)は上の写真の拡大図である。スケールバーは1cmを示す。

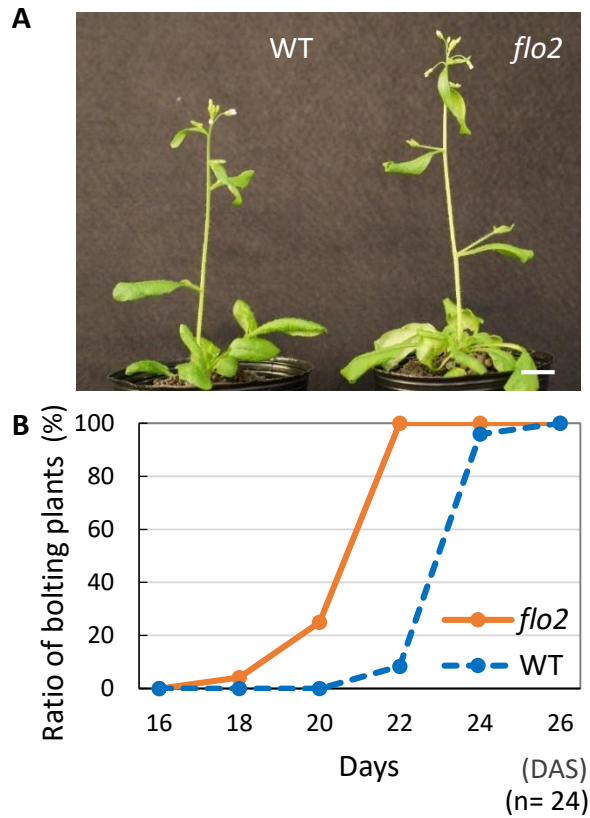


図15, *flo2*変異体と野生型の抽苔時期

A) 抽苔後の野生型(WT)と*flo2*変異体(*flo2*)の表現型。B) 抽苔のタイミングを解析した結果。青色：野生型 橙色：*flo2*変異体の抽苔率を示す。縦軸は抽苔した植物の割合を横軸は播種後の日数を示す。(n=24)

第四章 生殖成長期におけるシロイヌナズナ *flo2* 変異体の表現型

イネ *flo2* 変異体は種子の胚乳で顕著な表現型を示し、イネ *FLO2* 遺伝子は物質貯蔵に関わる遺伝子である (She et al. 2010)。イネの種子とシロイヌナズナの種子は構造的に大きく異なる。シロイヌナズナは胚に物質を貯蔵し、胚乳は発生過程で消失することから、胚乳の機能はイネほど重要でないと考えられる。一方、シロイヌナズナ *FLO2* 遺伝子は未熟種子で発現している (図 6) このことから、*FLO2* 遺伝子は生殖成長期においても何らかの機能を持っていると考えられる。そこで、シロイヌナズナにおける生殖成長期における *flo2* 変異体の種子における表現型を調べた。

長角果と種子の観察

成熟した植物体の花序を比較したところ、植物 1 個体あたりの長角果の数は *flo2* 変異体と野生型植物の間に大きな差異は認められなかった (図 16 A)。しかし、*flo2* 変異体の長角果の形態に明らかな差異が観察された (図 16 B)。*flo2* 変異体と野生型の長角果のサイズを測定したところ、この幅には違いが認められなかったが、長さは野生型植物よりも *flo2* 変異体の方が明らかに短かった (図 16 C、D)。また、*flo2* 変異体の一つの長角果に含まれる種子の数は野生型植物よりも少なく、この結果、収量は野生型の 60%程度に減少した (図 16 E)。個々の種子の形態には大きな違いが認められなかったが (図 17 A)、*flo2* 変異体の種子は野生型の種子に比べて崩れやすく、構造的に脆い傾向が認められた。種子の重さおよびサイズを解析したところ、それぞれの重さおよび横幅には違いは認められなかったが、長辺はわずかに長くなった (図 17 B、C、D)。さらに種子の構造を詳細に観察するために、走査型電子顕微鏡で種子の表面と断面を観察した。その結果、*flo2* 変異体と野生型の種子には大きな違いは認められなかった (図 18)。

次に、種子のパラフィン薄切切片を作成し、ヘマトキシリン/エオジン染色を行い、細胞内の核酸成分の検出を試みた。その結果、*flo2* 変異体の種子は細胞内で染色されている領域の面積が少なくなっていた (図 19)。これは細胞内の核様細胞小器官が減少していることを示唆している。また、種皮の内側にある胚乳層の細胞は *flo2* 変異体では薄くなっていた。また、これらの細胞では、胚と同様

に細胞内の小器官が占める割合が減少していた (図 19 下段)。

種子貯蔵物質の解析

イネ *flo2* 変異体の種子では、種子の貯蔵物質の蓄積量が減少することが報告されている (She et al. 2010)。そこでシロイヌナズナ *flo2* 変異体でも同様の現象が起こっているかどうかを明らかにするために、種子の貯蔵物質の蓄積を調べた。

シロイヌナズナの種子では貯蔵タンパク質として主に 12S タンパク質と 2S タンパク質を蓄積する。そこで、種子のタンパク質粗抽出物を SDS-PAGE により解析した。その結果、*flo2* 変異体と野生型の種子はタンパク質の組成および蓄積量にほとんど差が認められなかった (図 20 A)。一方、貯蔵脂質と貯蔵デンプンの蓄積を調べるために、種子の凍結薄切切片にニールブルー染色およびルゴール染色を行った。ニールブルー染色では、油滴が赤色に染色される。また、脂質の構造の違いによって色合いが変化する。シロイヌナズナの胚をニールブルー染色したところ、野生型の種子よりも *flo2* 変異体の種子の方が染色される度合いが弱く、また、赤色の度合いが強いことが観察された (図 20 B)。この結果から、シロイヌナズナ *flo2* 変異体の種子では油脂の貯蔵量が野生型よりも減少していること、また、貯蔵脂質の質的な変化があることが示唆された。

一方、ルゴール染色ではデンプンを青色に染色する。また貯蔵デンプンの構造的な違いによって色合いが変化する。胚をルゴール染色したところ、*flo2* 変異体と野生型の種子は両者ともほとんど染色されなかった (図 20 C)。この結果から、シロイヌナズナの胚にはほとんどデンプンは貯蔵されないことが示唆された。

Real-time RT-PCR による貯蔵物質合成に関与する遺伝子群の発現量の解析

貯蔵物質生産や転流に関与する代表的な遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR によって解析した。この解析では、開花後 5 日目の未熟な長角果から抽出された RNA を使用した。この結果、脂肪酸合成系に含まれる *3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (KAS)* と *fatA acyl-ACP thioesterase (FaTA)* 遺伝子の発現は未熟種子では低下していることが示された (図 21)。

貯蔵デンプン合成系に含まれる *ADP-glucosepyrophosphorylase small subunit 1 (ADG)* と *starch branching enzyme 1 (BE1)* 遺伝子や、デンプン分解系に含まれる *starch debranching enzyme 1 (DBR)* 遺伝子の転写産物の量には差が認められなかった。デンプン分解系に含まれる *β -amylase (BMY1)* 遺伝子の発現はわずかに増加していることが認められた (図 21)。

12S 貯蔵タンパク質遺伝子の発現には変化が認められなかった。一方、*2S* タンパク質遺伝子の発現は増加していた (図 21)。スクローストランスポーターである *SWEET11*、*SWEET12* 遺伝子の転写産物の量には差が認められなかったが、種皮特異的に発現するスクローストランスポーターである *SWEET15* 遺伝子の転写産物の発現量は減少していた (図 21)。

これらの結果から、シロイヌナズナ *flo2* 変異体では、貯蔵物質生合成に関連する遺伝子群のうち、脂肪酸合成系の遺伝子群の発現量は低下した。このことからシロイヌナズナ *FLO2* が脂肪酸合成系に関与することが示唆された。デンプン合成系・分解系の遺伝子発現には大きな変化が認められないことから、シロイヌナズナ *FLO2* はイネ *FLO2* とは異なることが示唆された。また、貯蔵タンパク質遺伝子の発現は有意差が認められないものの、*2S* タンパク質の遺伝子発現量が増加していた。完熟種子の *2S* タンパク質の量に大きな変化がなく、また、*2S* タンパク質遺伝子は特に胚発生の後期に発現することから、*flo2* 変異体の種子発生は野生型よりもわずかに早くなる可能性が考えられる。また、シロイヌナズナ *flo2* はスクロースのトランスポートへの関与が示唆された。

まとめ

この章では、*flo2* 変異の貯蔵器官である種子での表現型を調べた。*flo2* 変異体では花の形態形成や種子の形態には変化が認められなかった、*FLO2* 遺伝子は花や種子の形態形成には関与していないことが示唆された。一方、種子の収量の減少、貯蔵油脂の変化や脂肪酸合成に関与する遺伝子の発現低下等が認められたことから、イネと同様に *FLO2* 遺伝子は種子の貯蔵物質生合成に関与していることが示唆された。また、種子の構造やその収量・貯蔵物質の品質に大きく影響することが示唆された。

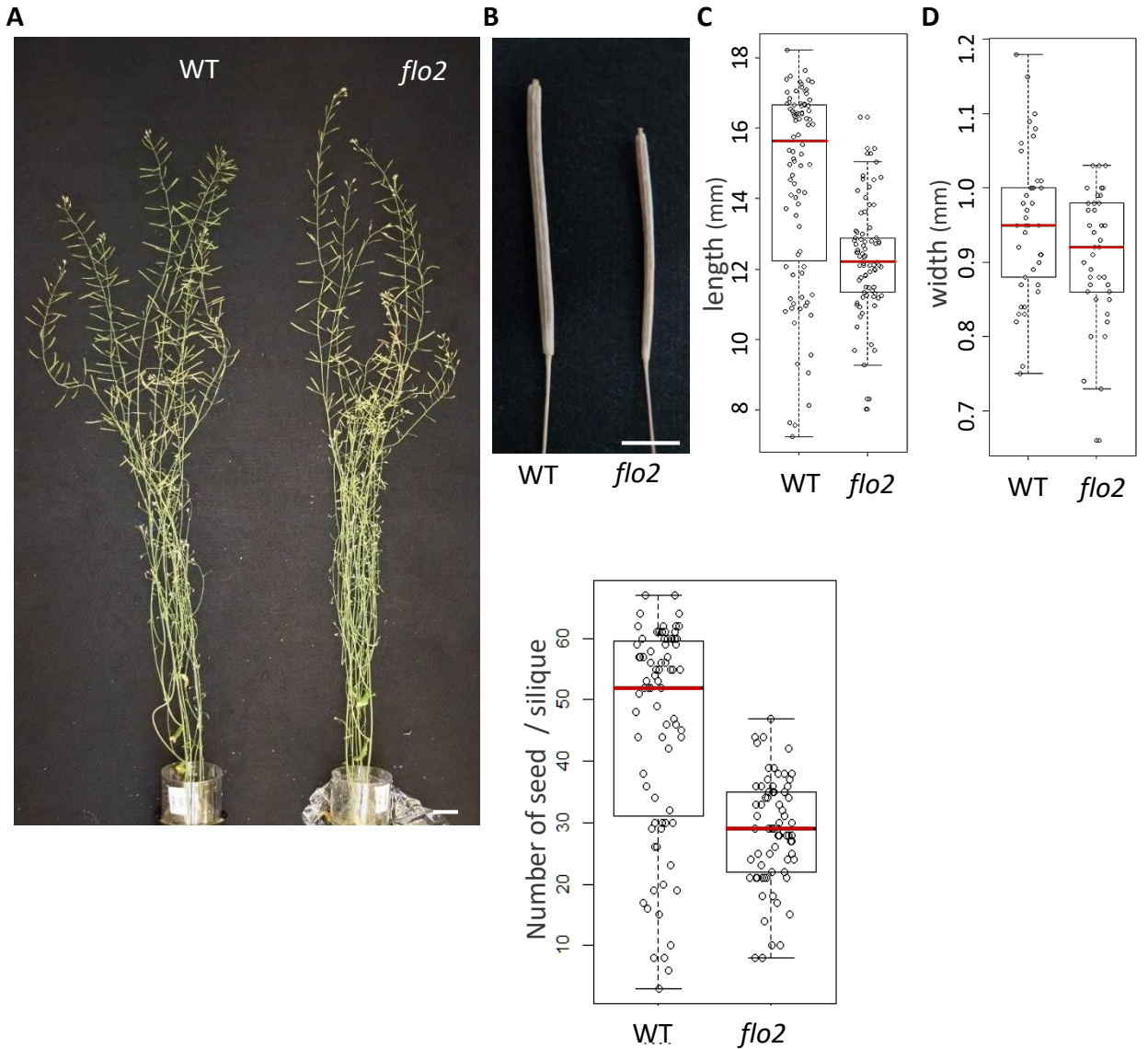


図16, *flo2*変異体と野生型の長角果

A) 播種後40日目の成熟した野生型植物(右側)と*flo2*変異体(左側)の全体像 スケールバーは2 cmを示す B) 野生型(右)と*flo2*変異体(左)の長角果の表現型 C) 長角果の長さの分布 D) 長角果の幅の分布 E) 野生型と*flo2*変異体の長角果に含まれる種子数の比較 C-Dの赤線は中央値を示す。

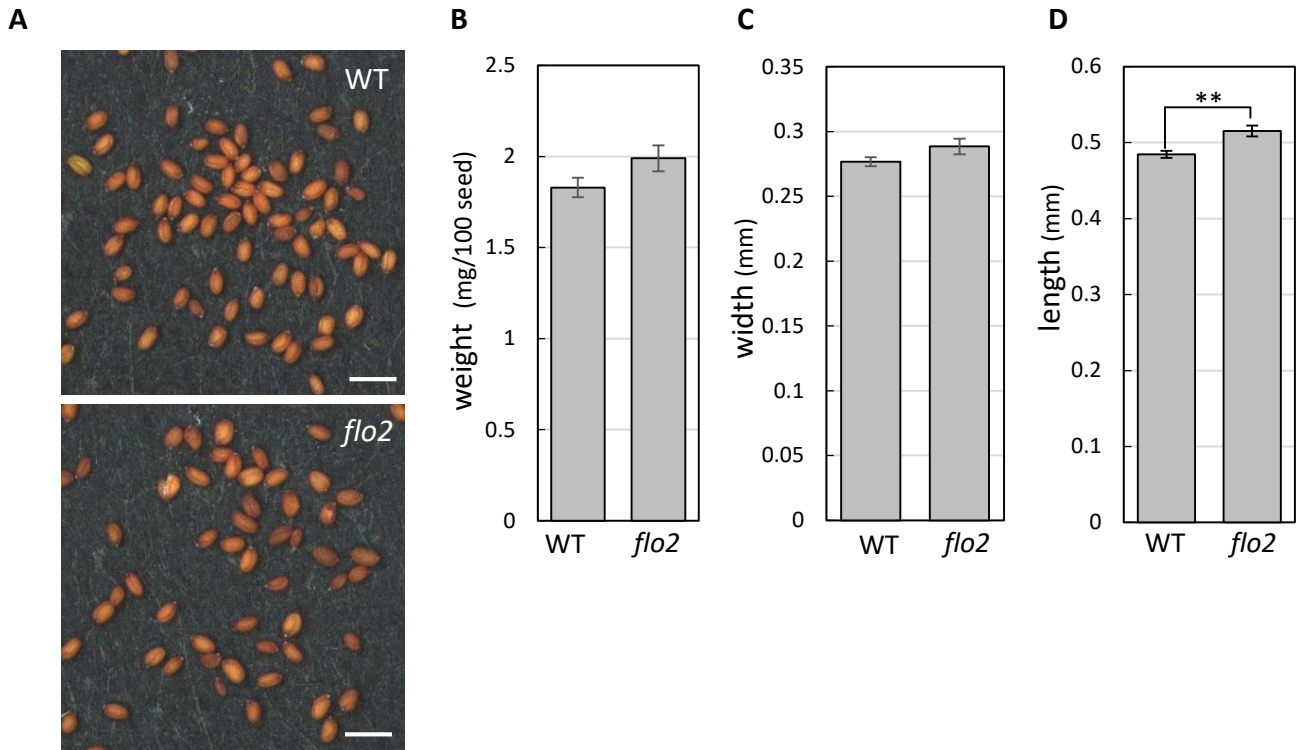


図17, *flo2*変異体と野生型の種子の形態

A) 野生型(WT)と*flo2*変異体(*flo2*)の完熟種子 スケールバーは1 mmを示す B) 野生型(WT)と*flo2*変異体の完熟種子の100種子あたりの重量の平均 エラーバーは標準誤差を示す C) 野生型と*flo2*変異体の種子の幅, D)種子の長さの平均 エラーバーは標準誤差を示す。t検定を行った。 **: $P < 0.01$ ($n = 60$)

WT

flo2

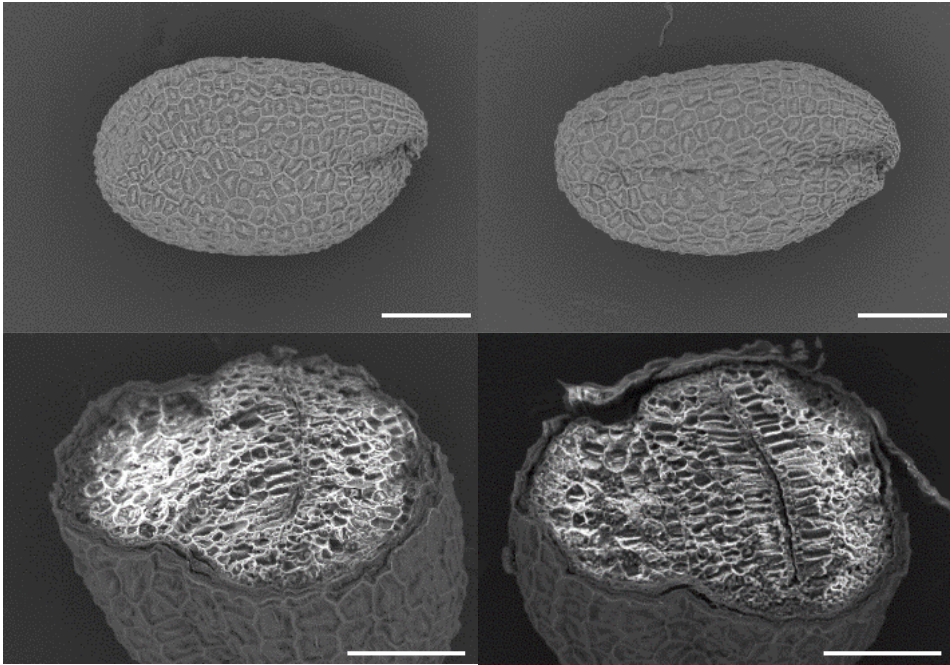


図18, 走働型電子顕微鏡で観察した種子の形態

野生型(WT)と*flo2*変異体(*flo2*)の完熟種子の電子顕微鏡写真 上段は種子の全体を下段は横断面を示す。スケールバーは100 μm を示す。

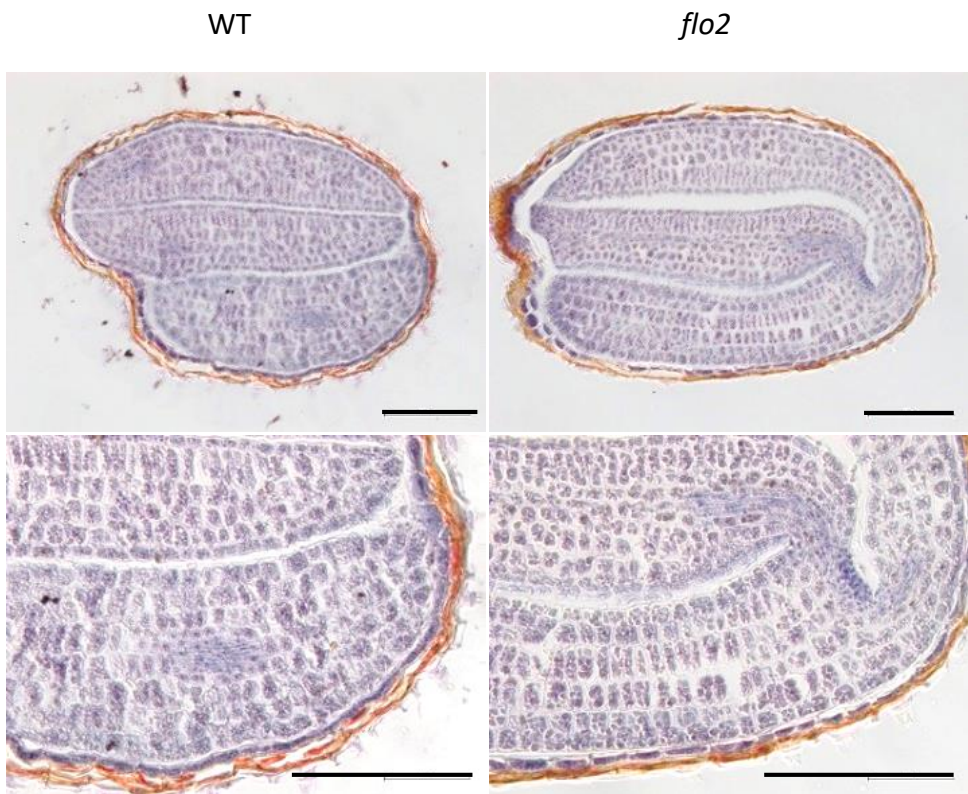


図19, 種子薄切切片のエオジン ヘマトキシリン染色

野生型(WT)と*flo2*変異体(*flo2*)の完熟種子の縦断切片の顕微鏡写真 下段は上段の拡大図 スケールバーは100 μ mを示す。

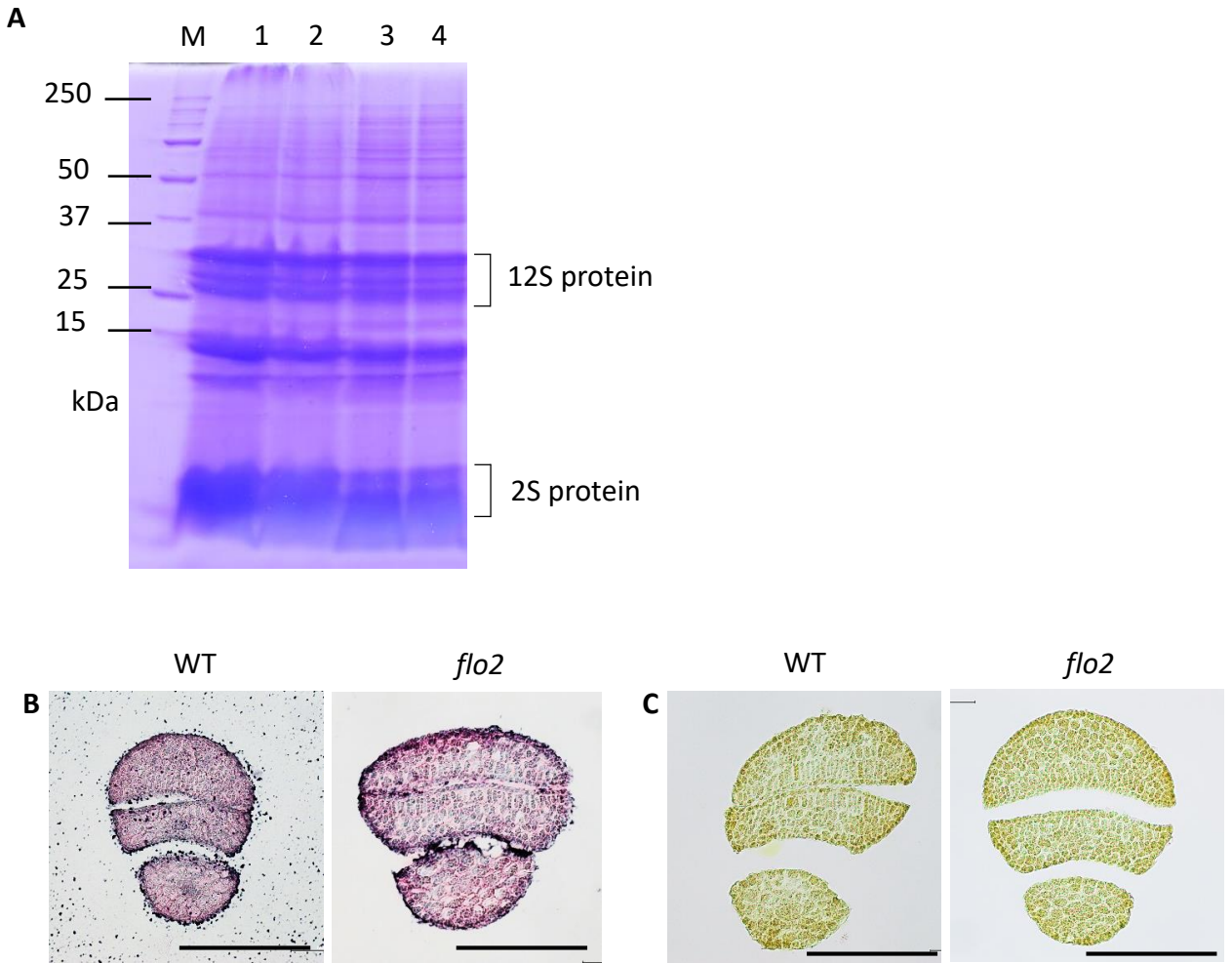


図20, 種子貯蔵物質の解析

A) 種子のタンパク質粗抽出物のSDS-PAGE レーン1-2は野生型と*flo2*変異体の種子粗抽出物の沈殿を, レーン3-4は野生型と*flo2*変異体の種子粗抽出物の上清を示す。 B) 完熟種子のニールブルー染色 スケールバーは100 μm を示す C)完熟種子のルゴール染色 スケールバーは100 μm を示す。

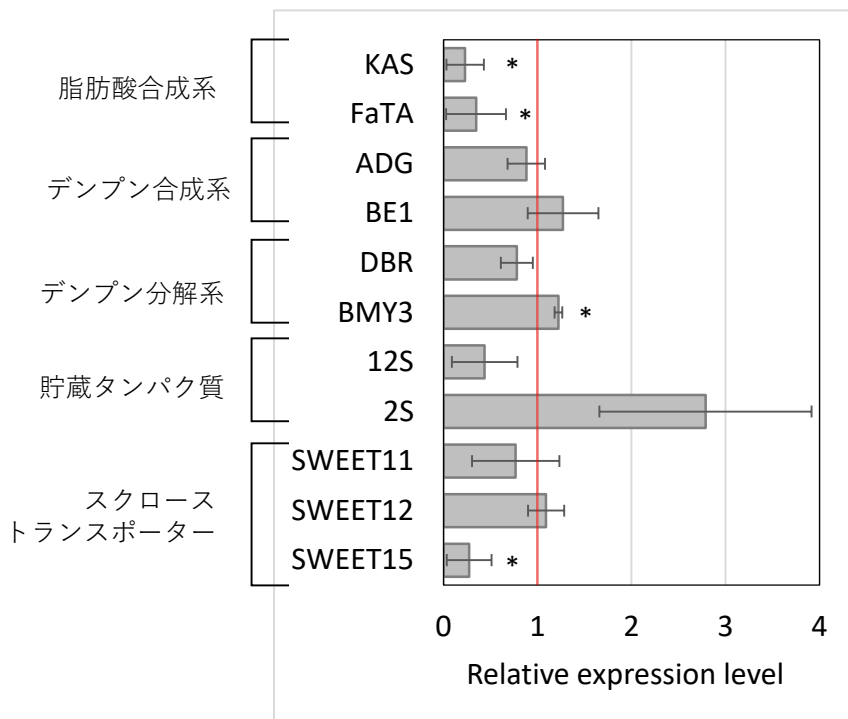


図21, 未熟種子における種子貯蔵物質合成に関する遺伝子およびスクローストランスポーター遺伝子の発現

トータルRNAは開花後5日後の長角果から抽出したものをを使用した。リアルタイムRT-PCRを用いた。野生型の発現量を1とした時、*flo2*変異体の各遺伝子の発現量を示した。赤線は野生型の発現量を示す (n=3) t検定を行った。*;P<0.07 各遺伝子は以下の通りKAS:3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (At5g46290), FaTA: FatA acyl-ACP thioesterase (At3g25110), ADG1:ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit 1 (At5g48300), BE1: starch branching enzyme 1(At3g20440), BMY1: β -amylase (At4g17090), DBR1: starch debranching enzyme 1 (At4g31770), 12S: 12S seed storage protein (At4g28520), 2S: 2S seed storage protein (At3g22600), SWEET11 (At3g48740),SWEET12 (At5g23660), and SWEET15 (At5g13170): members of sugar transporter. Ubiquitin conjugating enzyme 21 (UBC, AT5g25760)を内在性コントロールとして使用した。

第五章 光合成産物の分配効率についての解析

種子などのシンク器官は葉などのソース器官で生産された炭酸同化産物を利用して貯蔵物質を合成する。効率的に物質を貯蔵するためには炭酸同化産物が効率よくソース器官からシンク器官へ転流されることが重要である。そこで、*FLO2* 遺伝子と炭酸同化産物の転流との関係を明らかにするために、シロイヌナズナ *flo2* 変異体の転流能力を調べた。

ルゴール染色による光合成産物の蓄積場所の解析

栄養成長期におけるデンプンの蓄積と転流を解析した。まず、ロゼット葉の同化デンプンを検出するため緑葉のルゴール染色を行った。明期開始後、3-4 時経過したロゼット葉を用いてルゴール染色を行った。その結果、*flo2* 変異体、野生型ともにロゼット葉にはデンプンがほとんど蓄積されていないことが示された (図 22)。一方、野生型植物ではメリステム領域が強く染色された (図 22)。このことから、野生型植物ではメリステム領域にデンプンが蓄積されていることが示唆された。一方、*flo2* 変異体ではこの部分の染色が非常に弱かった。このため、この部分にデンプンがほとんど蓄積されないことが示唆された (図 22)。

PETIS による同化産物のライブイメージング

炭素の吸収・固定・輸送・蓄積を評価するために、量研機構 高崎研究所で開発された、ポジトロン-エミッティング トレーサーシステム (PETIS) を用いて炭酸同化と同化産物の動態についてのライブイメージングを行った。PETIS は半減期が 20.39 分の β^+ 崩壊性放射性同位体元素である ^{11}C を放射性トレーサーとして利用した植物用のライブイメージング技術である。このシステムでは非侵襲的に植物の内部に取り込まれた放射性同位体の二次元的な分布を経時的にデータを取得することができる (Kawachi et al. 2011)。このシステムを用いて、同化された炭素の動態を植物体全体で経時的に観察した。放射性同位体 $^{11}\text{CO}_2$ を短時間かつ均一にパルスチェイスで投与した播種後 21 日目の *flo2* 変異体と野生型植物を PETIS 内に設置し、植物の同化炭素の動態を経時的に観察した。

300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の光条件で測定を行った場合、*flo2* 変異体、野生型植物ともに、測定開始から 10 分でロゼット葉に ^{11}C が取り込まれ、メリステムや根を

含む中心領域で強い放射能が検出された (図 23 A)。どちらの植物体も時間が経過するにつれて、放射線が強く検出される中心領域が広がっていく様子が認められた (図 23 A)。*flo2* 変異体と野生型植物体との間に、同化炭素の消費量に大きな差異は認められず、60 分経過後も ^{14}C が葉から検出された (図 23 A)。このことから、葉で固定された同化炭素すべてが貯蔵器官に転流されるわけではなく、一部は葉にとどまることが示唆された。

1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ の光条件で測定した場合、*flo2* 変異体、野生型植物ともに 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ と同様に 10 分でロゼット葉に ^{14}C が存在し、メリステムや根を含む中心領域で強い放射能が検出された (図 23 B)。時間が経過するにつれて野生型植物は放射線の強く検出される中心領域が広がっていく様子が認められたのに対し、*flo2* 変異体は中心領域があまり広がらず、小さく維持されていた (図 23 B)。加えて、*flo2* 変異体はロゼット葉領域の放射線量が急速に減少する様子が観察された (図 21 B)。これらの結果から、1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ の光条件では *flo2* 変異体では転流効率が低下し、しかもロゼット葉での同化炭素の消費量が増大したことが示唆された。

まとめ

この章では、*flo2* 変異体と野生型植物の炭素固定と転流について調べた。ルゴール染色により、*flo2* 変異体は野生型植物よりもメリステム領域へのデンプン蓄積量が少ないことが明らかとなった。また、PETIS による ^{14}C のライブイメージングより、強光条件では *flo2* 変異体は貯蔵器官への同化産物の転流が少なく、葉での消費量が多くなる様子が認められた。これらの結果から、*flo2* 変異体は転流に異常をきたしていることが示唆され、*FLO2* 遺伝子は転流制御に関与していることが示唆された。

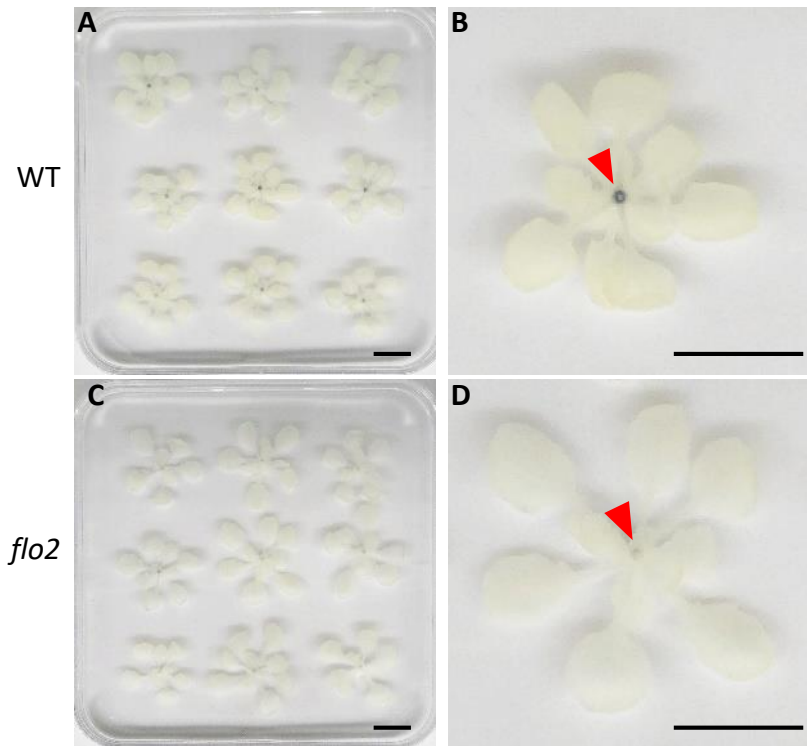


図22, *flo2*変異体と野生型植物のロゼット葉のヨウ素デンプン染色

野生型A)と*flo2*変異体 C) のロゼット葉のヨウ素デンプン反応による染色 B)とD)はその拡大図を示す 赤矢印:メリステムを含むシンク組織を示す スケールバーは1 cmを示す。

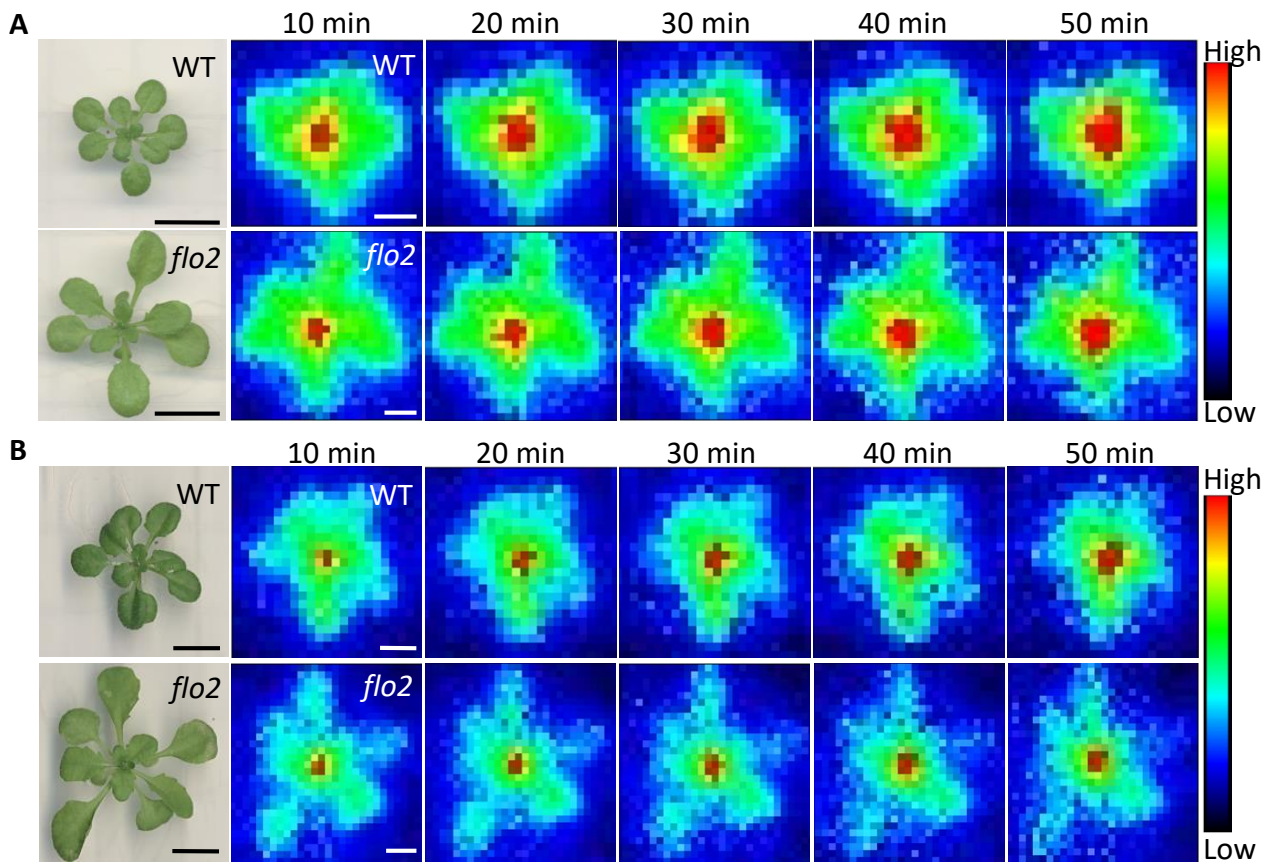


図23, PETISを用いた*flo2*変異体と野生型植物の同化産物のライブイメージング

A) 通常条件(300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), B) 強光条件(1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)における野生型 (WT)と*flo2*変異体(*flo2*)のPETIS解析画像。60分間ライブイメージングしたデータをもとに、10分間の積算を示した。放射線の検出量を赤から青のグラデーションで示している。右側の写真は使用した植物体の画像。播種後21日目の植物を使用した。スケールバーは0.5 cmを示す。

第六章 総合考察

本研究ではシロイヌナズナ *FLO2* 遺伝子を同定し、その機能を明らかにすることを旨とした。そのために、T-DNA 挿入 *flo2* 変異体を選抜し、その表現型を詳細に観察した。シロイヌナズナ *flo2* 変異体は 2 系統が見つかったが、いずれの *flo2* 変異のホモ接合型の変異体はロゼット葉が大きくなった。

戻し交配を経て未知の遺伝子による効果を取り除いた *flo2* 変異体はロゼット葉が大型化するだけでなく、栄養成長期における成長促進と早い老化が生じ、生殖成長期では長角果が顕著に短くなり、その結果、種子の収量が減少した。さらに、種子内に貯蔵される貯蔵物質の質的な変化が生じた。これに加えて、*flo2* 変異体ではソース器官からシンク器官への同化産物の転流量が減少した。これらの結果より、シロイヌナズナ *flo2* 変異は栄養成長期・生殖成長期どちらにも重要な働きを持つことが示唆された。

FLO2 遺伝子は *FLO2*、*FLL1*、*FLL2* を含む多重遺伝子群を構成する。これらはいずれも、高等陸上植物のみに存在しいずれも高度に保存されている遺伝子群である。これらの遺伝子動物などには存在しないため、植物固有の機能に関するものと考えられる。これまでに、イネの *FLO2* 遺伝子について詳しく調べられている。イネの *FLO2* 遺伝子は 3 つの遺伝子のうちで唯一、未熟種子でも発現する。*FLO2* は胚乳中の貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質の生合成の総括的な調節を行い、種子の成熟に重要な役割を果たすものと予想されている (She et al. 2010)。シロイヌナズナのゲノムにも *FLO2*、*FLL1*、*FLL2* に対応する 3 つの遺伝子が存在した (図 2)。シロイヌナズナの *FLO2* 遺伝子の発現パターンはイネの *FLO2* 遺伝子と類似しており、緑葉と未熟種子で強く発現していた (図 6)。これに対し、イネ、シロイヌナズナともに *FLL1* と *FLL2* は緑葉のみで発現する。このことから、*FLO2* は *FLL1* や *FLL2* とは異なる種子特異的な役割を持っているものと考えられる。

シロイヌナズナの種子は胚に大量の油脂や貯蔵タンパク質を蓄積する。一方、胚乳は退化し細胞 1 層のみが残る (Bewley et al. 2000 図 3)。このため、胚乳は、物質の蓄積の場として機能しないものと考えられている。このように、イネとシロイヌナズナの種子は構造が大きく異なる。それにも関わらず、両者に *FLO2* 遺伝子が保存されていた。

シロイヌナズナにおける *FLO2* 遺伝子の働きを調べるために、*flo2* 変異体の

生殖成長期における表現型を観察した。その結果、長角果が短くなり、種子の数が減少することがわかった (図 16)。このことは、モミの形成や種子数に変化が生じないイネの *flo2* 変異体と大きく異なる。さらに、脂肪酸合成に関与する酵素の発現量が減少し、脂質を貯蔵する細胞小器官であるオイルボディーへの輸送に関与する酵素の発現量が減少し (図 21)、その結果胚における貯蔵脂質に質的な変化が認められた (図 20)。しかし、貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質には大きな変化がなかった (図 20、21)。これらの結果から、シロイヌナズナ *FLO2* は胚における貯蔵脂質生合成にも関与することが示唆される。

イネ *FLO2* は胚乳中の貯蔵デンプンや貯蔵タンパク質の生合成に関与する (She et al. 2010)。これに対し、シロイヌナズナ *FLO2* は胚における貯蔵脂質の生合成に関与していたことから、機能する場が異なる。このことから、シロイヌナズナの種子での貯蔵物質の生産及び蓄積に関する *FLO2* を含む制御メカニズムは、イネの場合とは異なる制御系が存在する可能性が示唆される。

イネでは *FLO2* 遺伝子は緑葉で発現しているにもかかわらず、*flo2* 変異体の葉での形態的な表現型の変化は認められていない (She et al. 2010)。一方、シロイヌナズナでの、*flo2* 変異体には明らかな表現型が認められた。*flo2* 変異体はロゼット葉が大型化し (図 12)、葉肉細胞が大型化していた (図 13)。葉の大型化と細胞の大型化はほぼ相関することから、葉の大型化が葉肉細胞の大型化に連動したものであると考えられる。このことから、緑葉ではシロイヌナズナ *FLO2* 遺伝子は葉の細胞サイズの調節に関わるのではないかと考えられる。これを介して葉の成長制御に関与していることが推察される。イネとシロイヌナズナでは葉の構造が異なることから、細胞のサイズ調節の機構が異なることが推察される。

シロイヌナズナ *REC1* 遺伝子 (*REDUCED CHLOROPLAST COVERAGE gene*) 変異体は葉緑体の数が減少し、細胞が小型化することが報告されている (Larkin et al. 2016)。私はこの *REC1* が *FLO2* のホモログである *FLL2* と一致していることを見出した。シロイヌナズナ *flo2* 変異体は、葉肉細胞の葉緑体が減少する (図 13)。このことから *FLO2* 遺伝子も葉緑体の制御に関与していることが予想される。一方、*flo2* 変異体では細胞は大型化し、バイオマスが増えていた (図 12)。これは *fl12* (*rec1*) 変異体とは異なる表現型である。このことから、*FLO2* 遺伝子は *REC1* 遺伝子とは異なる働きを持つことが推察される。

flo2 変異体の緑葉は淡緑色を示し (図 12A)、葉緑体が減少した(図 13A)。一方、ロゼット葉の炭酸同化能力に大きな差は認められなかった(図 23A)。これらの結果から、*flo2* 変異体は葉緑体の炭酸同化能力を亢進していることが予測された。また、興味深いことに、*flo2* 変異体を強光条件で育成したところ、葉が著しく黄化した (図 14)。この結果から、葉緑体の老化が促されていることが推察され、*FLO2* 遺伝子は葉緑体の調節に関与することが予想された。

種子が登熟するためには、ソース器官で固定された炭酸同化産物がシンク組織へ効率よく移送されることが重要である。栄養成長期のロゼット葉のルゴール染色により、シンク組織である頂端分裂組織へのデンプンの蓄積量が低下していることが明らかとなった (図 22)。PETIS による経時的な炭素の動態解析より、*flo2* 変異体は野生型より、シンク組織への炭酸同化産物の移動が少ないことが認められた (図 23)。これらことから、シロイヌナズナ *FLO2* が転流に強く関与していることが示唆された。また、*flo2* 変異体は、特に強光条件下で、葉で固定された炭酸同化産物の消費が早い傾向にあった (図 23)。また、*flo2* 変異体はロゼット葉が大型化することから (図 12)、野生型植物体よりも炭酸同化産物が多く消費されていると考えられる。緑葉で合成されたスクロースはソース器官とシンク器官の膨圧差によって生じる圧流にのって、維管束を介してほかの組織へと輸送される (Fisher 2005)。*flo2* 変異体は葉での炭酸同化産物の消費量が増加することで、ソースとシンク器官の膨圧差が小さくなり、スクロースの転流量が減少したと考えられる。

また、シロイヌナズナ *flo2* 変異体では種皮から胚にスクロースを供給するトランスporterである *SWEET15* の発現量が低下していた (図 21)。経路の抵抗が低いほど、ソースからシンク器官への物質輸送は効率が高まる (Fisher 2005)。*SWEET15* の発現量が低下することにより、輸送経路の抵抗が高まり、炭酸同化産物の転流に障害が生じたと考えられる。その結果、種子の数の減少や、種子の貯蔵物質に質的な変化を及ぼしたと考えられる。

本研究によって、*FLO2* は葉の成長制御と種子の収量・貯蔵物質の品質維持に関わる基軸的な制御因子であることが明らかになった。シロイヌナズナ *FLO2* 遺伝子は同化産物の転流と輸送に関連している鍵の因子であり、物質供給や輸送など、さまざまな過程に関与し、光合成や老化、種子の収量、貯蔵物質の蓄積等その品質の調節に深く影響することが示唆された。

第七章 方法

植物の生育条件

シロイヌナズナの種子は *A. thaliana* 種子を 70%エタノール中で 1 分間洗浄しその後、5%次亜塩素酸ナトリウム (v/v) 0.1% Tween を含有する溶液で 15 分間洗浄、脱イオン水で 3 回すすぐことにより滅菌した。種子を 4°Cの暗所に 3 日間静置した後、0.8% (w/v) タイプ-M 寒天 (WAKO Pure Chemicals, Inc., Tokyo, Japan) を含む MS-寒天プレート (Murashige and Skoog 1962) 0.05% 2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES)、pH5.8 および 0.1%B5 ビタミン混合物 (0.3%塩酸チアミン、0.05%塩酸ピリドキシンおよび 0.5%ニコチン酸) に播種した。植物は、22°Cで構成的に明るい条件下でグロースチャンバー (トミー精工、東京、日本) で育成した。植物に高い光度を与えるために、追加の LED 光をグロースチャンバーにセットした。種子を 70 DAS で植物の長角果から収穫した。

ホモザイゴート変異系統の確立

突然変異株を T-DNA タグラインで T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) を用いて検索した。T-DNA 挿入ラインの種子、AtFLO2 と命名された At1g15290 遺伝子の 13 番目のイントロンに挿入された SALK_138275 は、オハイオ大学の Arabidopsis Biological Resource Center (<http://www.arabidopsis.org/>) から入手した。SALK_138275 植物と野生型 (Col-0) 植物との間のバッククロスによって得られ、*flo2* 変異株として確立された子孫の中から AtFLO2 上のホモ接合変異体植物を選抜した。

遺伝子型の解析

突然変異体植物系統の子孫の遺伝子型は、以下のプライマーセットを用いた PCR によって決定した。1529-S (5'-gtgtcgggatggtcgagaccaagttc-3') および

1529-T (5'-tggattggtacctgtgtgcaagggttc-3') のプライマーを野生型 *AtFLO2* 遺伝子の検出に用いた。プライマーセット 1529-S および LB (5'-tggaccgcttgctgcaactct-3') を *AtFLO2* 遺伝子中の T-DNA の挿入の決定に用いた。プライマー1529-S および 1529-T は、それぞれ At1g15290 遺伝子の 13 番目のエクソンおよび 13 番目のイントロンおよび 16 番目のエクソンの領域のヌクレオチド配列に対応し、LB は T-DNA の左の境界領域に対応した。これらのプライマーの位置を図 7 に示す。CTAB 法 (Ausubel et al., 1987) によりゲノム DNA を調製した。PCR は、Blend Taq DNA ポリメラーゼ (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて行った。

バイオインフォマティクス分析

イネ FLO2 の相同体を、Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org>) のウェブサイトを用いて BLASTN および BLASTP によって検索した。ClustalX2.1 プログラム (<http://clustalx.software.informer.com/2.1/>) を配列の二次分析のために使用した。系統発生解析の構築のために、Clustal ウェブサイト (<http://www.clustal.org/>) の ClustalX プログラムを使用して、FLO2 タンパク質およびその同族体のアミノ酸配列をアライメントした。系統樹は Phylip 隣接法 (Felsenstein 2005) を用いて、隣接する 1000 個のブートストラップ複製物からのブートストラップ値を用いて構築した。系統樹はプログラム tree view (Page, 1996) を使用して視覚化した。

組織学的解析

ヘマトキシリン染色およびエオジン染色のために、確立された方法 (Ausubel et al., 1987) に従って、成熟種子をパラフィンブロックに固定した。切片 (5 μ m) を RM2145 ミクロトーム (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて切断した。それらは、Nakao et al. によるヘマトキシリン (Wako pure chemicals, Osaka, Japan) およびエオジン (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 溶液で染色した。

(2007)、Axio imager A1 顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて観察した。ナイルブルー染色およびヨウ素染色のために、成熟した種子を3時間水に浸し、それらの種皮を手で取り除いた。次いで、胚をリン酸カリウム生理食塩水 (pH7.2) 中の4%パラホルムアルデヒド中で固定した。種子を一連の異なる濃度のスクロース溶液で浸漬した。次いで、Tissue-Tek OCT 化合物溶液 (Sakura-Finetek, Torrance, CA, USA) に包埋した。これらの標本は急速凍結され、その後、凍結切片法 (Ausubel et al., 1987) によって切片化された。ナイルブルー染色およびヨウ素染色を、シグマ・アルドリッチ (Sigma-Aldrich) によって提供された手順に従って、20 μm の凍結法を用いて実施した。

走査型電子顕微鏡による分析

走査型電子顕微鏡観察は、Imai et al. (2006)の方法に従って行った。成熟種子をナイフで横方向に切断し、HITACHI S-3500N 走査電子顕微鏡 (日立製作所、東京、日本) のステージ上に置いて画像を撮影した。全ての手順は、製造業者のプロトコルに従った。

タンパク質抽出と SDS-PAGE

Asano et al. 2002 の方法に従って、粉末種子からタンパク質を抽出した。SDS-PAGE およびタンパク質ゲルブロット分析は、Ausubel et al. (1987) に従った。この実験では、100 個の種子を用いて、総タンパク質の調製に使用した。

RNA 抽出と逆転写 PCR(RT-PCR)とリアルタイム定量 RT-PCR

RNA 調製のために、2 週齢の第3葉と、受粉後5日目の未熟種子を使用した。RNA quouse-micro キット (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて、各組織から全 RNA を抽出した。一本鎖 cDNA は、オリゴ dT (20) プライマーを用いて、ReverTra-Ace cDNA 合成キット (Toyobo) を用いて 0.2 μg の全 RNA から合成した。SYBR Green リアルタイム PCR 混合物

(Toyobo) を用いて QuantStudio3 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いてリアルタイム定量PCRを実施した。ユビキチン結合酵素 21 (UBC, At5g25760) の値を、対照としてのデータ標準化のために使用した。PCRのためのプライマー対は、補足表 S1 を参照。

PETIS による測定

PETIS 測定は (Yamazaki et al. 2014) に記載されているように行った。 $^{11}\text{CO}_2$ ガスは、核反応 $^{14}\text{N}(\text{p}, \alpha)^{11}\text{C}$ 高崎イオン加速器 (量子放射線科学技術研究所) の AVF サイクロトロンから約 10 MeV のエネルギーで陽子線で純窒素ガスターゲットを衝突させることにより、得られた $^{11}\text{CO}_2$ の約 100 MBq (約 0.12~0.18 ピコモルに相当) を、液体窒素で冷却したステンレス鋼製パイプからなるトラップに集め、その放射能を測定した。シロイヌナズナの植物体への $^{11}\text{CO}_2$ の暴露は専用のケースを用いて行った。植物体が播種されたプレートがケースに設置し、密閉したのちに、 $^{11}\text{CO}_2$ を投与し、1 分間ケースの中の空気を循環させた。ケース内の $^{11}\text{CO}_2$ が均一になったところで、シャーレの蓋を同時に開けることで植物体を $^{11}\text{CO}_2$ に一斉に暴露させた。10 分間暴露させたのちに、ケース内の放射線同位体を取り除いた後、ケースを解体し、シャーレのみを PETIS (PPIS-4800; 浜松ホトニクス、浜松、改造型) に設置した。PETIS 装置の対向する 2 つの検出器は、互いに 20 cm 離して設置し、その間にシャーレを設置した。レーザーから放出された電子の反粒子である陽電子は、植物組織内の隣接する原子の電子との衝突によって消滅し、一対の γ 線がその点から反対方向に放出される。PETIS の位置感受性エテクターは、同じ瞬間に一組の消滅 γ 線を検出することで、発光点を 2 つの入射点の中間点として決定した。放出点の測定を繰り返し、放射性レーザー分布の 1 つの静止画像を再構成した。実験中、試験植物のために連続的かつ一定の光が与えられた。PETIS による画像取得により 10 秒間、1 枚の ^{11}C 分布の静止画像が提供された。画像データは ^{11}C の減衰に対して自動的に補正され、PETIS からエクスポートされた。したがって、示されたすべての画像は、全炭素量を表し、唯一の ^{11}C は、もともと一緒に植物に供給されたものである。1 時間の測定を行い、合計で 360 の連続画像を得た。このデータをもとに、10 分間の積算画像を得た。NIH Image J ソフトウェア (<http://imagej.nih.gov/ij/>) を画像解析に用いた。

補足表 S1. RT-PCR とリアルタイム RT-PCR のプライマー配列と遺伝子のアクセシオンナンバー

accession No.	name	abbreviated name		Prime sequence (5' to 3')
AT1g15290	FLOURY ENDOSPERM 2	FLO2	Fw	CTCCAAGGGGATCAATGGCACC
			Rv	ACCCACTTATCAGATCATGCAC
At5g46290	3-ketoacyl ACP synthase 1	KAS1	Fw	GAAGGAGCTGGTGTCTGGTG
			Rv	ACCAGCATCTTCCAGGCATCTTTC
At3g25110	fatA acyl-ACP thioesterase A	FaTA	Fw	ACAGGAGGTGGGATGTAATCATGC
			Rv	ATAGAGACTTGGTGTCTCAGAGTGAAGGAAG
At5g48300	ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit1	ADG1	Fw	GGTGCCACTTCCCTTGGACTGAG
			Rv	CGGAGCAGAACGGTCATAGAAAC
AT3g20440	Branching enzyme 1	BE1	Fw	CACCAAGAGGTCTGCCAGCATCC
			Rv	ATTCACCAGCTTCCTCTACACCGAC
AT4g17090	BETA-amylase 3	BMY3	Fw	TGCGGAAATTCAAGTAGGAATG
			Rv	TCATATACTTGTCTAGCACTGG
AT4g31770	Starch debranching enzyme 1	DBR1	Fw	GAGATACACAAACGTCAGCAC
			Rv	TCTGCGGGATCTCAGGAATGG
AT4g28520	Cruciferin 3 (12S storage protein)	12S	Fw	CAGGGTAATGCGATGGTGCTTC
			Rv	GATCCTTCCTTGTCTCCAG
AT3g22600	Seed storage 2S albumin superfamily protein	2S	Fw	CCACAGACTCCTCCTGTCTCAGTCG
			Rv	CCTGGTCCTGAAGAGTTTGGTG
AT3g48740	Bidirectional sugar transporter SWEET11	SWEET11	Fw	CACCGGACGGTAATAAAGACAAGAAGTG
			Rv	AAGCACATTCGGGAAAGCAACATAG
AT5g23660	Bidirectional sugar transporter SWEET12	SWEET12	Fw	TCTGTGTCGGATTCTCTGTCTGC
			Rv	AGCTAAACGGCATGTACTCCACAC
AT5g13170	Bidirectional sugar transporter SWEET15	SWEET15	Fw	GTATTCCTCGCTCCAGTGCCAAC
			Rv	AATGCGTAGTAGAGCCATAGC
At5g25760	Ubiquitin-conjugation enzyme 21	UBC	Fw	CTGCGACTCAGGGAATCTTCTAA
			Rv	TTGTGCCATTGAATTGAACCC

参考文献

- Asano, T., Kunieda, N., Omura, Y., Ibe, H., Kawasaki, T., Takano, M., et al. (2002) Rice SPK, a Calmodulin-like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development: phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor. *Plant Cell* 14: 619–628.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. M., Seidman, J. G., Smith, J. A., et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Bewley, J. D., Hempel, F. D., McCormick, S. and Zambryski, P. (2000) Reproductive development. *In Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. chapter 19, Edited by Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. pp. 1026. American Society of Plant Physiologists,
- Belmonte F. M., Kirkbride C. R., Sandra L. S., Pelletier M. J., Bui Q. A., Yeung C. E., et al., (2012) Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the Arabidopsis seed. *PNAS* E435-E444
- Rockville Bonilla, E. and Prella, A. (1987) Application of Nile blue and Nile red, two fluorescent probes, for detection of lipid droplets in human skeletal muscle. *J. Histochem. Cytochem.* 35: 619–621.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K. and Scheible, W.-R. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139: 5–17.
- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Ferine, A. R. and Frommer W. B. (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335: 207–211.
- Chen, L.-Q., Lin, I. W., Qu, X.-Q., Sosso, D., McFarlane, H. E., Londoño, A., Samuels, A. L., et al. (2015) A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *Plant Cell*
- David T. Dennis, Stephen D. Brankeley (2005) 植物の生化学・分子生物学, 13章 糖質代謝, Edited by Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. pp.

567. American Society of Plant Physiologists

- Felsenstein, J. (2005) PHYLIP.
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
- Fisher, B.D.(2005) 植物の生化学・分子生物学, 15章 長距離輸送, Edited by Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. pp. 567. American Society of Plant Physiologists
- Gonzalez, N., Vanhaeren, H. and Inzé, D. (2012) Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends Plant Sci.* 17: 332–340.
- Gottwald R. J., Krysan J. P., Young C. J., Evert F. R., Sussman R. M.,(2000) Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13979
- Heath, J. D, Weldon, R., Monnot C. and Meinke D. W. (1986) Analysis of storage proteins in normal and aborted seed from embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 169: 304–312.
- Imai, K. K., Ohashi, Y., Tsuge, T., Yoshizumi, T., Matsui, M., Oka, A. and Aoyama, T. (2006) The A-type cyclin CYCA2;3 is a key regulator of ploidy levels in *Arabidopsis* endoreduplication. *Plant Cell* 18: 382–396.
- Kawachi, N., Suzui, N., Ishii, S., Ito, S., Ishikawa, N. S., Yamazaki, H., Iwasaki, A. H., et al. (2011) Real-time whole-plant imaging of ¹¹C translocation using positron-emitting tracer imaging system. *Nucl. Instr. Phys. Res. Sect. A* 648:S317–S320.
- Kawasaki, T., Mizuno, K., Shimada, H., Satoh, H., Kishimoto, N., Okumura, S., Ichikawa, N. and Baba, T. (1996) Coordinated regulation of the genes partitioning in starch biosynthesis by the rice *floury-2* locus. *Plant Physiol.* 110: 89–96.
- Kroj, T., Savino, G., Valon, C., Giraudat, J. and Parcy, F. (2003) Regulation of storage protein gene expression in *Arabidopsis*. *Development* 130: 6065–6073.
- Kubo A., Rahman S., Utsumi Y., Li Z., Mukai Y., Yamamoto M., Ugaki M., et al. (2005) Complementation of sugary-1 Phenotype in Rice Endosperm with the Wheat Isoamylase1 Gene Supports a Direct Role for Isoamylase1 in

Amylopectin Biosynthesis. *Plant physiol.* 137:43-56

- Larkin, R. M., Stefano, G., Ruckle, M. E., Stavoe, A., K., Sinkler, C. A., Brandizzi, F., et al. (2016) *REDUCED CHLOROPLAST COVERAGE* genes from *Arabidopsis thaliana* help to establish the size of the chloroplast compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113: E1116–E1125.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., et al. (2013) Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis Book*, 2013:e0161. doi:Martin, C. and Smith, A. (1995) Starch biosynthesis. *Plant Cell* 7: 971–985.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 476–497.
- Nakao, K., Morita, R., Saji, Y., Ishida, K., Tomita, Y., Ogawa, M., et al. (2007) The development of a bioengineered organ germ method. *Nat. Method* 4: 227-230.
- Olsen, Odd-Arne (2004) Nuclear Endosperm Development in Cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: S214-S227.
- Page, R. D. M. (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Compt. Appl. Biosci.* 12: 357–358.
- She, K.-C., Kusano, H., Koizumi, K., Yamakawa, H., Hakata, M., Imamura, et al. (2010) A novel factor *FLOURY ENDOSPERM2* is involved in regulation of rice grain size and starch quality. *Plant Cell* 22: 3280–3294.
- Shimada, H., Koishihara, H., Saito, Y., Arashima, Y., Furukawa, T. and Hayashi, H. (2004) A rice antisense SPK transformant that lacks the accumulation of seed storage substances shows no correlation between sucrose concentration in phloem sap and demand for carbon sources in the sink organs. *Plant Cell Physiol.* 45: 1105–1109.
- Somerville Chris, Browse John, Jaworski G. Jan, Ohrlodge B. John, (2005) 植物の生化学・分子生物学, 10章 脂質, Edited by Buchanan, B., Grissem, W. and Jones, R. pp. 567. American Society of Plant Physiologists
- Staehelen L. Andrew, Newcomb H. Eldon, (2005) 植物の生化学・分子生物学, 1章 生体膜の構造と細胞小器官, Edited by Buchanan, B., Grissem, W.

- and Jones, R. pp. 567. American Society of Plant Physiologists
- Thalmann M., Pazmino D., Seung D., Horrer D., Nigro A., Meier T., et al. (2016) Regulation of leaf starch degradation by abscisic acid is important for osmotic stress tolerance in plants. *Plant Cell* 28: 1860-1878
 - Wada, M., Kagawa T., Sato Y., (2003) Chloroplast movement. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:455-68
 - Weraduwaga, S. M., Chen, J., Anozie, F. C., Morales, A., Weise, S. E. and Sharkey, T. D. (2015) The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers Plant Sci.* 6: article 167
 - Yamazaki, H., Suzui, N., Yin, Y-G., Kawachi, N., Ishii, S., Shimada, H., et al. (2014) Live-imaging evaluation of the efficiency of elevated CO₂ concentration in a closed cultivation system for the improvement of bioproduction in tomato fruits. *Plant Biotechnol.* 32, 31–37.
 - 山内大輔, 南川隆雄 (1995) 種子のバイオサイエンス, 3章 種子タンパク質の分解, 種子生理生化学研究会 編, p71, 学会出版センター
 - 井出曜子, 藤原徹 (2009) 種子の科学とバイオテクノロジー, 第2章4節 種子貯蔵物質の生理, 種子生理生化学研究会 編, p33, 学会出版センター
 - 中村保典 (2009) 種子の科学とバイオテクノロジー, 第3章4節 種子デンプンの生合成, 種子生理生化学研究会 編, p81, 学会出版センター

謝辞

本研究をおこなうにあたり、終始ご指導・ご鞭撻を賜りました、東京理科大学基礎工学部生物工学科 島田浩章 教授に深く感謝いたします。

PETIS を用いた解析を行うにあたり、量研機構の藤巻秀 博士、河地有木 博士、鈴木伸郎 博士、尹永根博士に大変お世話になりました。また、多くのご助言をいただきました島田研究室の草野博彰 博士、今村智弘 博士、青木裕美 博士、シロイヌナズナの表現型解析をともに行った、谷ロー至 氏、石井陽平 氏、金子千紘 氏、小柳淳 氏に深く感謝いたします。研究室の皆様にも大変お世話になりました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

また、長い期間学業を支援してくださいました両親に深く感謝いたします。