

助細胞で機能する遺伝子を発現させる暗号を解読

【本研究のポイント】

- ・助細胞で発現する花粉管誘引に必要な遺伝子、*MYB98* 遺伝子を発現させるための暗号である 16 塩基配列 (*SaeM*) を解読した。
- ・*SaeM* を含むたった 84 塩基で助細胞遺伝子が発現することが判明した。
- ・今回試験したシロイヌナズナ以外の全てのアブラナ科植物で *SaeM* が同定され、*SaeM* は種を超えて助細胞遺伝子を発現させるのに必要な暗号であることがわかった。
- ・*SaeM* を他の植物で活用し、異種の植物との花粉管誘引の障壁を打破することで広範囲の交雑育種が可能になる。

【研究概要】

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学生物機能開発利用研究センターの笠原竜四郎 特任准教授の研究グループは、植物の花粉管誘引に必要な助細胞で機能している遺伝子を発現させる暗号 (*SaeM* cis-element^{注1)}) を解読しました。

植物の助細胞で働く遺伝子である *MYB98* は、花粉管誘引に必須であることが笠原らによって 2005 年に報告されていましたが (Kasahara *et al.*, 2005)、この *MYB98* を発現させる暗号は解読できていませんでした。

そこで、笠原らは 2005 年頃より *MYB98* 遺伝子上流のプロモーター領域^{注2)} に着目し、解析を続けてきました。18 年の歳月を費やし解析を続けた結果、*MYB98* を発現させるのに重要な 16 ヌクレオチド塩基配列を同定し (CATTTCACACATTAAAA)、*SaeM* (*SC-specific activation element of MYB98*) と名づけました。次にこの 16 塩基配列を含む 84 塩基のみで助細胞にて遺伝子を発現させることができました。さらに、シロイヌナズナ以外の植物種でも *SaeM* が保存されていて、*SaeM* は種を超えて助細胞遺伝子を発現させるのに必要な暗号であることもわかりました。

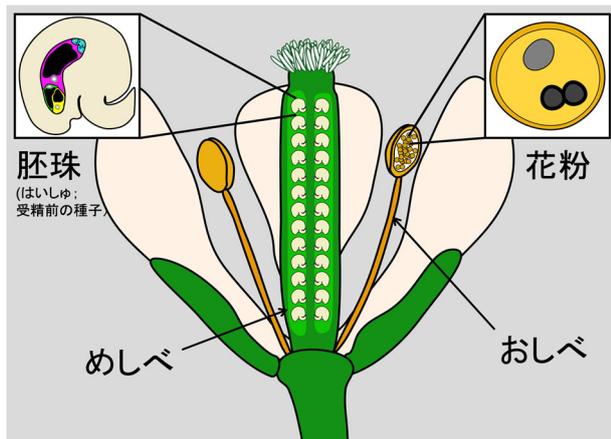
被子植物の場合、植物種が変われば花粉管誘引に生殖隔離が生じ、種子形成不全をもたらすことが知られていますが、*SaeM* を調整することによりこの生殖隔離を打破して有用な雑種を交雑育種で獲得するなど、今後の作物の品種改良に大きく貢献することが期待されます。

本研究成果は、2023 年 5 月 8 日付国際学術雑誌「Frontiers in Plant Biology」に掲載されました。

【研究背景と内容】

被子植物の雌しべには胚珠(将来種子になる部分)があり(図 1 左)、さらにその胚珠の中には雌性配偶体があります(図 1 右)。この雌性配偶体の中には、減数分裂を経て形成された卵細胞、中央細胞、助細胞があり、それぞれ種子を形成するために重要な機能を持っています。その中で特に助細胞は、花粉管誘引や受容に関して重要な役割を果たしています。一方、雄しべの葯(雄しべの先の、花粉が入った袋。)で作られた花粉は、雌しべの柱頭と呼ばれる先端の部分に受粉すると、花粉管を伸ばし雌しべの中を通り、胚珠へとたどり着きます(図 2)。この時、助細胞で特異的に発現する *MYB98* 遺伝子は、下流の花粉管誘引物質である LURE タンパク質を助細胞で発現させることで、花粉管を最終目的地である胚珠へと誘引します(図 3)。このように、*MYB98* 遺伝子は花粉管誘引に不可欠な役割を果たしています。現在までに、この *MYB98* の下流にある LURE タンパク質を含む、助細胞機能に必要な因子に関する報告はいくつか存在しますが、*MYB98* の発見から 18 年経った現在も、*MYB98* 遺伝子自体を発現させるプロモーター領域、つまり *MYB98* 遺伝子上流の制御機構は謎のままでした(図 3)。

花の構造



胚珠(♀)と花粉(♂)

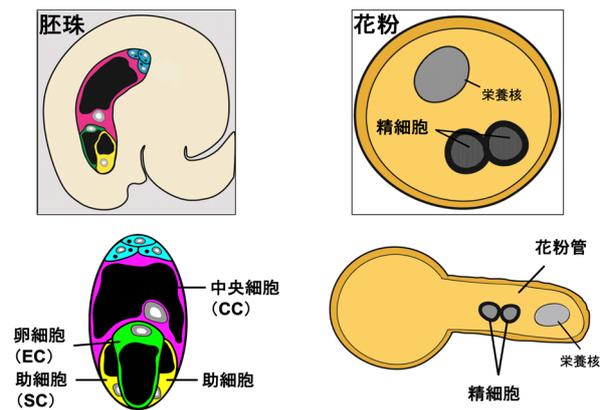


図 1 被子植物の花の構造(左)と配偶体(右)

胚珠へと向かう花粉管

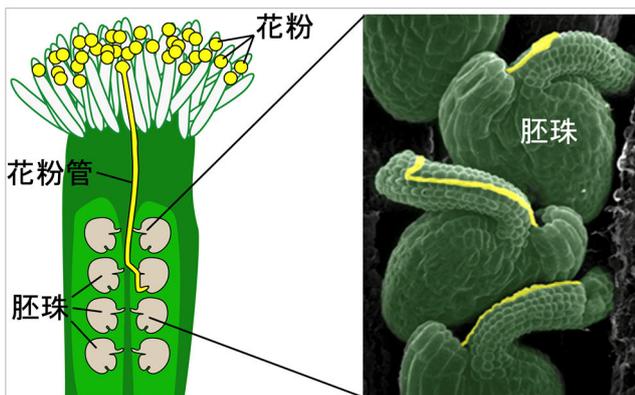


図 2 胚珠へと向かう花粉管

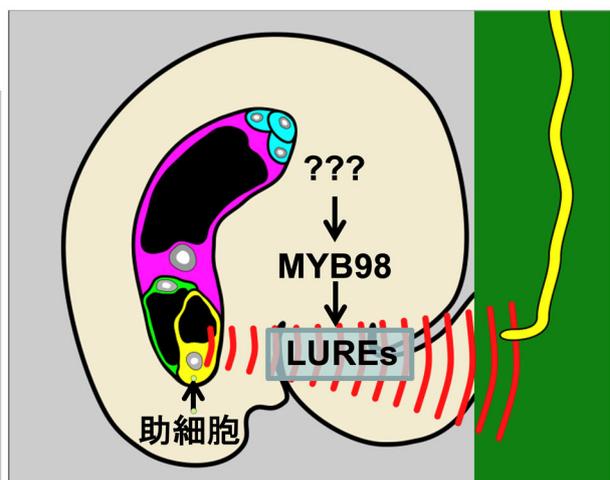


図 3 *MYB98* の下流にある LUREs

そこで当研究グループは、2005 年より、助細胞特異的に機能する *MYB98* の発現に決定的な役割を果たしている、プロモーター領域上の特定の暗号(cis-element)の解読に着手しました。まず初めに、翻訳開始点から上流 1634 塩基の位置(-1634bp)から *MYB98* プロモーターを GFP に繋いで(*pMYB98::GFP*)その発現を観察し、-194bpまでの7地点でGFPの発現を比較しました(図4)。その結果、GFPは-702bpから-512bpに配列を制限した場合に、劇的にその発現量が失われました。更に、-350bpから-194bpに配列を制限した場合に、その発現が完全に失われました(図4)。次に、これらの領域だけで *MYB98* を発現させることができるか調査したところ、-615bp から -487 bp および -251 から -121bp の 2 つの領域は、*MYB98* を発現させるのに十分であることが分かりました。この実験の結果より、これら 2 つのプロモーター領域には、*MYB98* を発現させるのに重要な配列が含まれていることが示唆されました。そこで次に、-702bp ~ -512bp 部位内の 191bp 領域を 4 つの断片に分割し、それらの断片を連続で連結したり、それぞれの断片を組み合わせたりにして *MYB98* 遺伝子の発現を確認したところ、この領域の中央に位置する 84bp の領域は助細胞で発現を駆動するのに十分であることが分かりました。さらに、84 bp 領域内の 16 bp の塩基を置換する実験を行ったところ、その領域内の変異が、助細胞の GFP 発現の喪失につながることを明らかにしました。この重要な要素を *SaeM* (*SC-specific activation element of MYB98*) と名付けました(図5)。

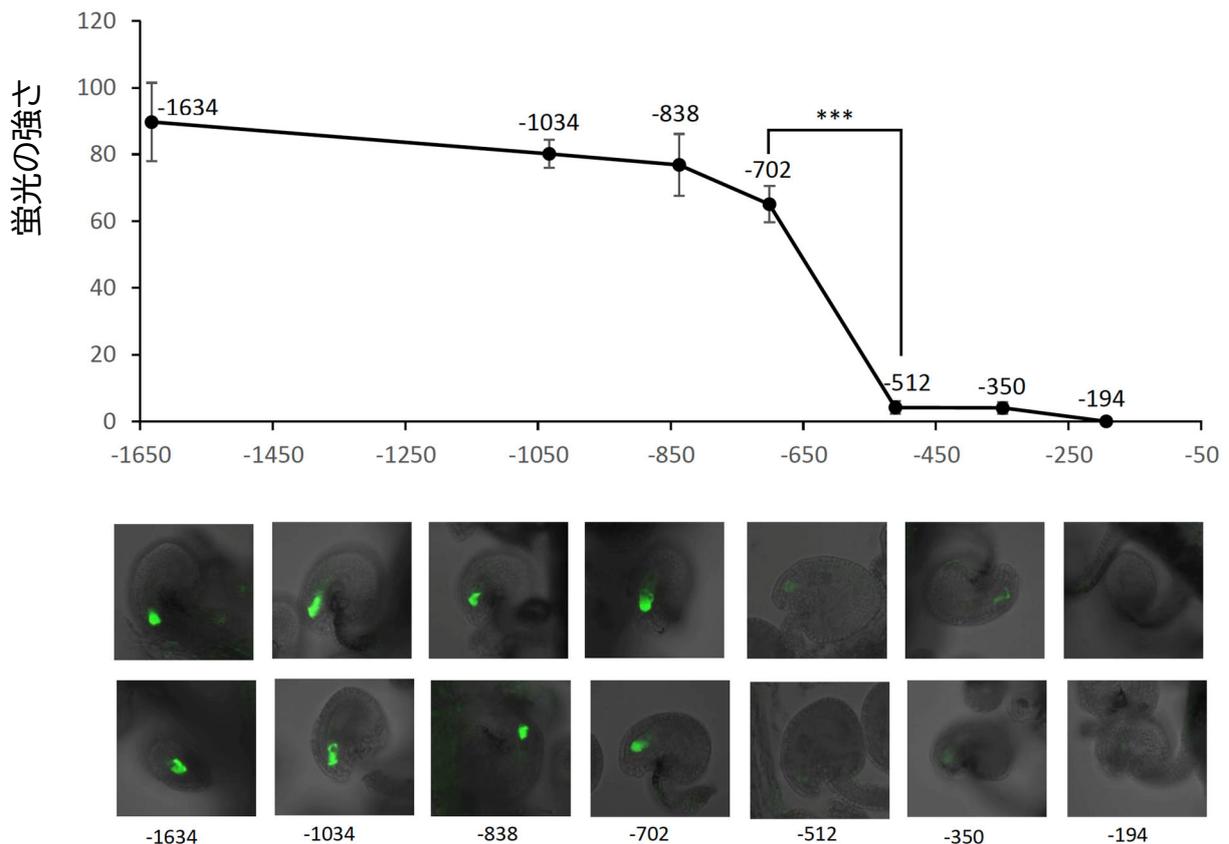


図4 *MYB98* プロモーター領域制限下での GFP 発現

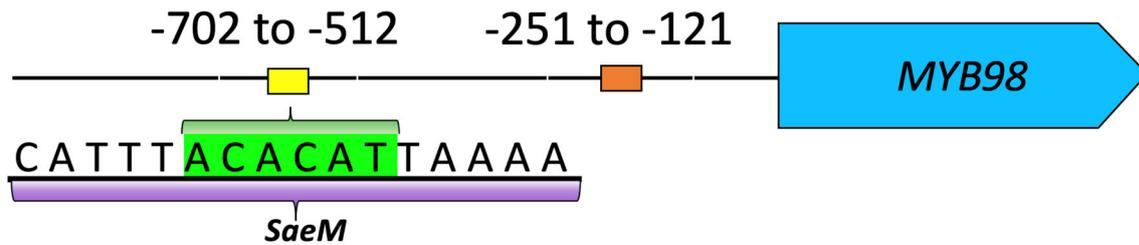


図5 *MYB98* を発現させるために重要な2つの領域と *SaeM* 暗号配列

また興味深いことに、アブラナ科の他の植物の *MYB98* のプロモーター領域を比較したところ、今回試験したシロイヌナズナ以外の全てのアブラナ科植物で *SaeM* が同定され、*SaeM* は種を超えて助細胞遺伝子を発現させるのに必要な暗号であることもわかりました。

また、Yeast-one-hybrid アッセイ^{注3)}により、*SaeM* を含む領域に結合するタンパク質をスクリーニングしたところ、ホメオドメインタンパク質^{注4)}である ANL2 と強く結合していることが明らかになりました。更に、DAP-seq データ^{注5)}を解析したところ、*SaeM* が実際にその下流域に ANL2 認識部位を保有していることも明らかになりました。つまり、この暗号を認識して発現駆動のスイッチを入れるタンパク質も同定することができたという訳です。

【成果の意義】

本成果では *MYB98* 遺伝子を発現させるための暗号である16塩基配列(*SaeM*)を解読することができ、*SaeM* を含むたった84塩基で助細胞遺伝子が発現することが判明しました。また、今回試験したシロイヌナズナ以外の全てのアブラナ科植物で *SaeM* が同定され、*SaeM* は種を超えて助細胞遺伝子を発現させるのに必要な暗号であることがわかりました。これらのことは *SaeM* を他の植物で活用し、異種の植物との花粉管誘引の障壁を打破することで広範囲の交雑が可能になるなど、将来の植物育種に大きく貢献できる可能性を示唆しています。

この研究は、科学研究費助成事業(22K21366)の支援のもとで行われたものです。

【用語説明】

注1) cis-element:

プロモーター領域にある、特定の遺伝子を発現させるために必要な塩基配列を指す。本研究ではこの配列が *MYB98* 遺伝子上流702-512bps領域内で同定された。

注2) プロモーター領域:

真核生物の全てにあるDNA上の領域。大半の遺伝子のコーディング領域の直前の上流1000bp程度の領域である。本研究の *MYB98* 遺伝子も直前にこの領域が存在す

る。

注 3)Yeast-one-hybrid アッセイ:

プロモーター領域に結合してその遺伝子を発現させる、タンパク質をスクリーニングする方法である。このタンパク質が同定されると、そのタンパク質をコードする遺伝子が上流遺伝子であることがわかる。各組織、各細胞の遺伝子制御ネットワーク構築に必須のアッセイ法である。

注 4)ホメオドメインタンパク質:

主に器官形成に関与する遺伝子に共通に見られる領域と、相同性の高いアミノ酸配列を持つタンパク質であり、DNA に結合して遺伝子の発現調節を司る。

注 5)DAP-seq データ:

ある DNA シークエンスに結合するタンパク質が、どの程度その DNA 配列と親和性があるのかを調べるためのデータである。これにより、あらゆる結合タンパク質の結合親和性が予測できる。今回見つかった ANL2 は *SaeM* との結合親和性が高かった。

【論文情報】

雑誌名:Frontiers in Plant Science

論文タイトル:Discovery of a cis-regulatory element *SaeM* involved in dynamic regulation of synergid-specific *MYB98*

(助細胞特異的遺伝子 *MYB98* の動的制御に関わるシス因子 *SaeM* の発見)

著者:Prakash Babu Adhikari[†], Shaowei Zhu, Xiaoyan Liu, Chen Huang, Liyang Xie, Xiaoyan Wu, Jiale He, Nobutaka Mitsuda, Benjamin Peters, Lynette Brownfield, Shingo Nagawa and Ryushiro Dora Kasahara[†]

(パラカッシュ バブ アドヒカリ[†]、シャオウェイ ズー、シャオエン リュウ、チェン ファン、リーヤン シエ、シャオエン ウー、ジャー ルー、光田展隆、ベンジャミン ピーター、リネット ブラウンフィールド、名川 信吾、笠原 竜四郎[†])

[†]共同責任著者 (本学関係者は下線)

DOI: 10.3389/fpls.2023.1177058

URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2023.1177058/full>