

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：植物特異的な転写因子機能ネットワーク

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

高木 優 ((独)産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門 研究グループ長)

主たる共同研究者

篠崎 和子 ((独)国際農林水産業研究センター生物資源領域 特定研究主査)

篠崎 一雄 ((独)理化学研究所植物科学研究センター センター長)

我彦 広悦 (秋田県立大学大学院生物資源研究科 教授)(平成16年9月~)

出村 拓 ((独)理化学研究所植物科学研究センター チームリーダー)(平成18年12月~)

3. 研究内容及び成果

3-1. 研究内容

植物の多様な機能は、個々の遺伝子の発現調節によって制御されている。また、植物では転写レベルの制御が、遺伝子発現制御に中心的な役割を果たしていることが示されている。すなわち、転写因子が制御する形質と標的遺伝子群を解明することは、植物の機能制御と遺伝子発現制御との関係を明確にしていく上で有効な方法である。転写因子を含め遺伝子の機能解析を行うには、対象とする遺伝子の欠損株を解析することが端的な方法であるが、植物の転写因子遺伝子は、大きなファミリーを形成し重複遺伝子が数多く存在することから、遺伝破壊や相補的なRNA導入等の従来の方法では、植物の転写因子の機能解析が容易ではない。そこで、本課題では、新たに開発した転写抑制因子を用いた遺伝子サイレンシングシステム(CRES-T法)を用いて、シロイヌナズナ、イネにおいて個々の転写因子が制御する形質と遺伝子を明らかにし、転写因子の機能解析を行うことによって、転写因子機能ネットワークを解明することが本プロジェクトの目的である。また、応用的展開を見据えた本木植物における転写因子の操作についても研究を進めた。以下本研究により得られた主要成果を述べる。

3-2. 研究成果

3-2-1. シロイヌナズナ転写因子の機能解析(高木グループ)

シロイヌナズナゲノムに存在すると考えられている2,000個転写因子の内、1,800個のcDNAを入手・単離した。これら収集したcDNAとCRES-T法を用いてシロイヌナズナ転写因子の機能解析を進めた。

最初に、キメラリプレッサー(CRES-Tシステム)が該当する転写因子の欠損株と同様な表現型を誘導出来ること、および、重複遺伝子に対しても優勢で機能することを示すため、欠損株で表現型が出る事が報告されていたEIN3転写因子に12アミノ酸からなるSRDXリプレッションドメインを付与しCaMV 35Sプロモーターで誘導するキメラリプレッサー遺伝子(35S:EIN3SRDX)を作製し、シロイヌナズナを形質転換した。その結果、35S:EIN3SRDX植物体は、変異体であるein3株と同様にエチレンホルモン非感受性を示し、キメラリプレッサーが欠損株と同様な表現型を誘導できることを示した。同様に欠損すると雄ずいと花弁の形成が抑制するAP3遺伝子に対するキメラリプレッサー(35S:AP3SRDX)を発現させたところ同様の抑制が発現した。

次に遺伝学的に機能重複が示されているCUC1とCUC2転写因子遺伝子に対する効果を調べるため、CUC1キメラリプレッサー発現体を作製した。その結果これらの形質転換体は、CUC1とCUC2遺伝子の二重変異体のみ現れる表現型と同様な子葉が融合する表現型を示した。同様にPAP1転写因子、MYB23転写因子においても確認した。

収集したシロイヌナズナ転写因子cDNAから、植物特異的な転写因子ファミリーであるERF, NAC, TCP, SPLフ

ファミリーおよび一部のMADSファミリーに属する転写因子に対するキメラリプレッサー遺伝子を作製し、それぞれキメラ遺伝子が発現する形質転換体を作製した。

NACドメイン転写因子は、植物特異的な転写因子であり、シロイヌナズナゲノムには109個存在する。NACファミリーの一つであるCUC遺伝子群が頂芽分裂組織を制御する因子であることが知られていたが、その他については、機能が不明であった。

解析の結果、形態形成からストレス応答まで多様な機能を担う転写因子ことが本CREST研究で明らかになった。その中で、NAC Secondary wall Thickening promoting factor (NST)と名付けたNST1, NST2, NST3転写因子は、植物の二次木部の形成を制御するマスター因子であることをCRES-T法から見出した。また、この転写因子を操作することにより、木質の糖化率を飛躍的に高めることが出来ることを見出した。

TCP転写因子は、植物特異的な転写因子ファミリーであり、シロイヌナズナには28個の遺伝子が存在する。これまでに5個のTCP遺伝子を標的とするマイクロRNAJAWを過剰発現させた形質転換体では、ロゼット葉が波打つ形状を示すことが報告されているが、それらの機能については、未知であった。これらの遺伝子に対するT-DNAタグラインは何れも明瞭な表現型が無く、TCPファミリーは、重複した遺伝子から構成されていると考えられる。

TCP3をリプレッサーに機能変換し、シロイヌナズナで発現させると、TCP3はCUC遺伝子の発現を抑え、つまり茎頂分裂組織を制御する遺伝子の発現を抑制し、植物が正常な形態を保つために必要なパターンニングを制御している因子であることを発見した。

EARモチーフ名付けた6アミノ酸からなる短いペプチドは、転写因子に結合することによって転写活性化因子を強力な転写抑制因子に機能変換する。EARモチーフを介した転写抑制機構を解明するため、酵母two-hybridシステムを用いてEARモチーフと相互作用する因子のスクリーニングを行い、21種類の候補遺伝子を単離した。

これらの候補遺伝子の中で、スクリーニングの際に最も多く陽性コロニーが得られた因子であるWD40遺伝子について解析を行った。その結果、このWD40タンパク質はEARモチーフだけでなく、植物の転写抑制因子に保存されているEARモチーフとも相互作用することが確認された。したがって、このWD40遺伝子はEARモチーフを介した転写抑制に共通して関与していることが考えられる。

しかし、このWD40遺伝子自身は転写抑制活性を示さなかったことから、このWD40遺伝子がさらに転写に関わる他の因子と相互作用し、複雑な複合体を形成して標的遺伝子の転写を抑制するものと推測された。現在WD40遺伝子と転写抑制機構との関連について解析を進めている。

本プロジェクトでは、転写因子遺伝子を中心に、シロイヌナズナに関わるあらゆる遺伝子情報を検索、解析、保存するデータベースシステム(ゲットくん)の開発も行った。今後プロジェクトから得られた成果に基づく、転写因子機能に関する情報を公開することにより、植物研究の発展に貢献できると考えている。

### 3 - 2 - 2 . イネの転写因子の機能解析(篠崎和子グループ)

双子葉のモデル植物であるシロイヌナズナばかりでなく、単子葉のモデルであるイネも研究対象とし、イネにおける機能未知の転写因子の機能解析をCRES-T法を用いて行った。イネゲノムに存在するERF/AP2/DREB, NAC, WRKY, bHLH, bZIP転写因子群から、乾燥・塩害などに対するストレス応答、伸長生長などに関与しイネの特性向上に有益であると推定される転写因子遺伝子をマイクロアレイを用いた発現解析により選抜し、それらをキメラリプレッサーに変換して形質転換体の作製を行った。

イネAP3オーソログのSPW1にSRDXを付与したキメラ遺伝子をイネで発現させたところ、高頻度でSPW1欠損株の表現型である雄性不稔を誘導し、CRES-Tシステムがイネに於いても有効な解析方法であることを示した。

### 3 - 2 - 3 . マイクロアレイを用いた転写因子および標的遺伝子の解析(篠崎一雄)

転写リプレッサー(SRDX)を用いた遺伝子サイレンシング技術(CRES-Tシステム)に加え、ゲノム情報やインフォマティクス、マイクロアレイ技術などを利用して、植物特異的及びストレス誘導性転写因子が制御する形質及び

標的遺伝子群を網羅的に解析することにより、それらの機能ネットワークの解明を行うことを目的とした。

シロイヌナズナゲノムに存在する1,978個の転写因子をPSI-Blastにより高精度・高感度に同定した。1,978個の転写因子のうち、リソースセンターなどからcDNAが入手できないものが700個存在したため、PCRによる単離作業を行い、約400個のcDNAの単離に成功した。うち15遺伝子に関して新規スプライシング異性体を発見した。

ストレス誘導性のNACタイプの転写因子であるRD26の解析では、この遺伝子が植物ホルモンアブシジン酸(ABA)を介したストレス応答シグナル伝達経路において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

小胞体ストレスに関与すると考えられているbZIP転写因子bZIP60が、塩ストレス耐性に関与することを明らかにした。

植物特異的なファミリーを形成し、PHDタイプの核内因子であるMS1の解析では、この因子が転写因子として花粉及びタペート層形成を制御していることを明らかにした。

### 3-2-4. シロイヌナズナキメラリプレッサー形質転換体を用いた有用遺伝子の探索研究(我彦グループ)

本研究の中心課題である転写機能ネットワークを解明するために必要な、転写因子の機能、相互のネットワークを明らかにするためには全ての転写因子を網羅するキメラリプレッサー発現体を作製することが望ましい。それはライブラリーとしての有用なリソースになり、これを用いて特定の形質に関わる転写因子の探索に利用できると考えられる。

高木グループで作製されたキメラリプレッサー型転写因子遺伝子を順次にシロイヌナズナに導入し第一世代の種子を得、検定を行った。ランダムに抽出した20系統について導入頻度を調べた結果、種子200μL当たり平均70(6~171)の遺伝子導入種子が得られ、安定した形質転換頻度が得られた。平均して約3分の1の系統に可視で確認できる形態変化が見られた。これまで1,100以上のキメラ遺伝子導入を終えた。

### 3-2-5. 木質制御関連転写因子研究(出村グループ)

NAC転写因子であるNSTが二次木部形成を制御し、糖化率の高い木質成分を有する植物体が作出出来ることをシロイヌナズナ植物で明らかにした。木本のモデル植物であるポプラを用い、二次木部形成にマスター因子として機能するNST転写因子の機能について調べ、効率的なバイオエタノール生産開発研究に対する基盤研究を開始した。

シロイヌナズナで植物の木質形成への関与が示された転写因子(NST1、NST3)のポプラでの機能を解析するために、形質転換を行ったポプラの育成と増殖を進め、現在カルス28ライン、シュート16ラインを作製した。

## 4. 事後評価結果

### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表		招待・口頭・ポスター		報道	特許	
国内	国外	国内	国外		国内	海外
22	61	143	138	24	27	5

論文数や学会発表数はかなり多くなっているが、分担が5グループであるので、ある意味では当然かもしれない。論文の質的レベルも高いものとなっている、分担者の分も含めどこまでがCRESTでの成果なのか明確でないものも見られ、また、代表者の成果となっている論文の全体に占める割合が少ないのは些か残念である。

特許の出願数(国内25件、海外3件)は非常に多く、その点では高く評価できる。特に、この研究の特色でもあるが基盤技術に関するものが多くなっている。しかし、これら全ての特許がどの程度の有効性を持つかについては疑問視する向きもあり、この点については今後の検証課題である。

### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

総合的には、一応の成果は順調に挙げられたと思われる。ただ、当初のCRES-T法による転写因子機能の網羅的解析というふれこみに対する期待は大きかったが、この解析系が必ずしも万能ではなく転写因子によっては期待した成果が得られなかったこともある。例えば、キク、トレニアなどではシロイヌナズナやイネとは同じ結果が出ないなど、今後課題を残した。また、この研究の最終ゴールは転写因子の機能ネットワークの解明ということではあったが、終わってみれば、機能データベース(ゲットくん)の構築はできつつはあるものの、この課題の困難さや複雑さがあらためて浮き彫りとなった。しかし、優れた具体的な成果も出ており、このことはそのような事情の中にあっても特筆してよいものとなっている。例えば、NAC, TCP, SPL, ERF, WRKYなどの転写因子の解析をした中のNAC familyについてのCERE-T法の解析では、いろいろな形質に変異が起きていることが示されていた。特に、NST1とNST3が二次木部形成に関する転写因子であることを発見している。また、NST2についても器官特異性が示されている。TCP family についての機能解析でも、これに属する24個の遺伝子うち、メリステムではエクトピクな発現をして、CUC 転写因子をネガティブに制御していることを明らかにしている。その他、イネの転写因子OsPIF1の機能解析から、この因子が乾燥耐性に関っていることが示された(篠崎和子グループ)。シロイヌナズナ転写因子のマイクロアレイ化をすることでターゲット遺伝子の解明につなげる試みがなされた(篠崎一雄グループ)。以上、このような研究成果が、近い将来において農業など実用面に応用できることを期待している。

科学技術への貢献に関しては、この研究課題で解析手法として使っているCRES-T法はこのCRESTプロジェクト以前に代表者らによって開発されたものであった。このプロジェクトは、この解析システムを活用した転写因子機能の網羅的解析というものであったが、個別の研究は生物学的背景に一貫性がなく、そのために科学的インパクトのある成果が大きいというレベルには至っていないように思える。また、技術的な面においてもCRES-T法の改良・改善面で特筆できるものはみられていない。しかし、NAC familyやTCP familyの機能解析に関しては一定の評価は与えられて良いであろう。

今後の展開としては、CRES-T法そのものについては、転写因子機能を抑制するという点で特徴的な解析法である。特に、多重遺伝子となっているものに関しては効果的な解析法となっているので、この解析技術の活用により一定の展開は見込まれる。ここでの研究成果として、個別の話題が進展しているので、それらについては今後により一定の期待を持って良いと思う。応用面への展開としては、雄性不稔、ストレス耐性、短稈化と従来の育種目標への一定の貢献は期待できるが、新局面の開拓という点では物足りなさが残る。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

Science(2003)1件。

第14回つくば賞:篠崎一雄・篠崎和子(2003)。

第12回化学・バイオつくば賞:高木 優(2004)。

日本植物学会奨励賞:関原 明(2005)。

文部科学大臣表彰科学技術賞:篠崎一雄(2006)。

The 1<sup>st</sup> Place of the most cited researchers in Plant & Animal Science.