

「植物の機能と制御」

平成14年度採択研究代表者

高木 優

(産業技術総合研究所 研究チーム長)

「植物特異的な転写因子機能ネットワーク」

1. 研究実施の概要

本研究は、ドミナントリプレッサーを用いた新規サイレンシング技術（CRES-T法）を利用して、個々の転写因子が制御する形質と標的遺伝子の解析をおこない、転写因子間の相互ネットワークを明らかにすることにある。研究対象は双子葉、単子葉植物のモデル実験植物であるシロイヌナズナとイネを用い、植物特異的な転写因子を対象として解析をおこなう。

本研究課題は、以下の3課題からなる。

1) シロイヌナズナ転写因子研究

シロイヌナズナ転写因子群から主に植物特異的な転写因子の主要なファミリーをCRES-T法を用いて網羅的に解析する。同時に、本研究で用いるリプレッサードメインを介した、転写抑制機構の解明も同時におこなう。

2) イネ転写因子研究

イネ転写因子の機能解析をCRES-T法を用いておこなう。特にイネの特性向上に有益であると考えられる有用形質遺伝子を制御する転写因子に注目し解析をおこなう。また、シロイヌナズナと比較解析することにより、単子葉と双子葉間における転写因子機能の違いについても調査する。

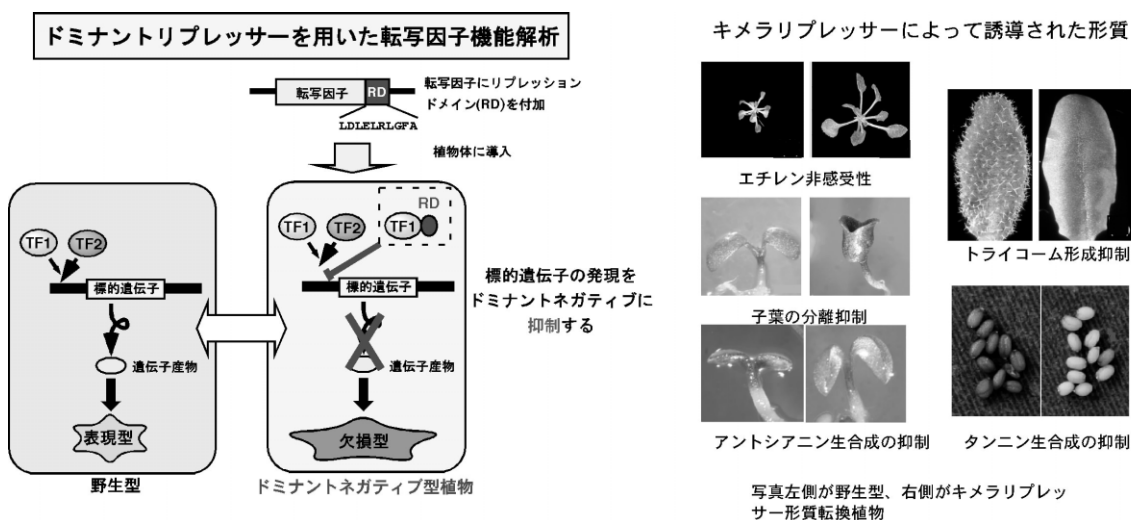
3) 遺伝子発現研究

マイクロアレイを用いた転写因子が制御する標的遺伝子の解析を行なう。また、ゲノム情報やインフォーマティクスをもちいてシロイヌナズナおよびイネの転写因子アレイを作成し、ゲノムベースでの網羅的な転写因子の発現プロファイリングをおこなう。

2. 研究実施内容

モデル植物であるシロイヌナズナ、イネにおいて全ゲノムの配列が決定され、現在ポストシーケンスにおける植物科学の課題は、個々の遺伝子の機能解析にある。特に植物では、転写因子が、植物の機能調節に他の因子以上に重要な役割を果たしていることから、転写因子の機能解析が、最優先の課題となってきた。これまでに、転写因子の網羅的な解析のため、遺伝子破壊型、アンチセンス株、過剰発現型形質転換体が作製されている。

しかしながら、転写因子の機能解析については、期待ほど進展していないのが現状である。これは、植物ゲノムの特徴である重複遺伝子の存在によるものが大きく、そのため、ある転写因子に対する遺伝子破壊株やアンチセンス形質転換体を単離しても、その転写因子の機能欠損を反映した表現型が現れない場合が多く、これらのことが転写因子の機能解析を困難なものにしてきた。このようなことから、従来とは異なる新たな解析法の開発が待たれていた。そのため、キメラリプレッサーによる遺伝子のサイレンシング（CRES-T法）の開発を行った。これまでの研究で、植物特異的な転写因子群であるERFファミリーの一群と、SUPERMANを含むTF-IIIAタイプのジンクフィンガー転写因子の一群が、転写抑制因子（リプレッサー）であることを見出し、さらに、EARモチーフと名付けた配列を含む非常に短いペプチドが強力なリプレッション効果を有するリプレッションドメインであることを見出した。そこで、このペプチドを任意の転写因子に融合させたキメラリプレッサーを作製し、これを植物体内で発現させたところ、内在性の転写因子だけでなく機能重複する転写因子の転写活性に優先して標的遺伝子の発現を抑制し、結果としてそのキメラリプレッサーを発現する植物体は、目的とする転写因子の欠損株(Loss-of-function allele)と同様の表現型をドミナントで示すことを見出した。この発見によって、遺伝子破壊やアンチセンスなど、従来の遺伝子サイレンシングシステム方法では困難であった重複遺伝子の機能解析が可能になった。この新規に開発したジーンサイレンシング技術をCRES-T (chimeric repressor silencing technology)法と命名した。そのシステムの基本概念を下図に示す。



このシステムは、本来植物ゲノムに存在する遺伝子を用い植物に内在する機能を利用した遺伝子サイレンシング法である。従来の解析方法である遺伝子破壊、アンチセンス法、RNAi等の従来のサイレンシングシステムに比べ、多くの利点がある。このシステムを応用し、シロイヌナズナ、イネにおいて転写因子の機能解析をおこなっている。

シロイヌナズナ転写因子研究グループ

シロイヌナズナゲノムには、1500個以上の転写因子をコードする遺伝子が存在する。これまでに植物特異的な転写因子ファミリーであるERF/AP2/DREBとNACファミリーの属する転写因子をリプレッサーに機能変換し、形質転換した植物体を作成した。得られた植物体の表現型を詳細に解析し、NACドメインを有する転写因子は、胚発生ばかりではなく、葉脈の形成、葯の開裂を制御する因子であることを明らかにした。ERF/AP2/DREBは、ストレスシグナルの制御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、MADS-box関連遺伝子をリプレッサーに変換し、発現させ、人為的に雄性不稔、完全不稔を誘導した植物体の作成に成功した。これらの植物は、産業的な応用が期待できる。



野生型 35S::AP3-

APETALA3キメラリプレッサーを発現させた植物

表現型：雄性不稔

イネ転写因子研究グループ

イネのERF/AP2/DREB, NAC, WRKY等の転写因子遺伝子群の発現をマイクロアレイやリアルタイムPCR法により解析し、イネの特性向上に有益であると考えられる乾燥、塩害、低温、病傷害などのストレス耐性の獲得、伸長成長や種子形成などの器官形成に関与すると推定される転写因子遺伝子を選抜した。これらの遺伝子の完全長cDNAを用いてCRES-Tシステムによるドミナントネガティブ型植物と過剰発現型植物を作成し、得られた形質転換体の解析を行った。また、シロイヌナズナへの遺伝子導入も行い、比較解析することにより、単子葉と双子葉植物での機能の違いについても解析を行っている。一方、イネ中での解析においてこれまでアクチンプロモーターを用いてきたが、十分な発現量を確保するためユビキチンプロモーターを用いたコンストラクトも作成し、イネへの導入に用いている。これまでにリプレッションドメイン(RD)を用いたOsNAC2のドミナントネガティブ型シロイヌナズナがカップ状の子葉を形成することを示し、イネのOsNAC2がシロイヌナズナのCUCと同様の機能を持つことを明らかにした。また、花のABCモデルにおけるクラスB遺伝子として機能しているSPW1にRDを付加させたキメラ遺伝子を導入したイネの花では、葯が発達すべき部位に雌蕊のような器官が形成され、雄性不稔となることを示した。さらに、選抜した遺伝子群に関してドミナントネガティブ型植物と過剰発現型植物の作成を継続すると共に、得られた形質転換体の形質の解析やマイクロアレイやメタボローム解析を行いイネの転写因子群の機能を明らかにする。

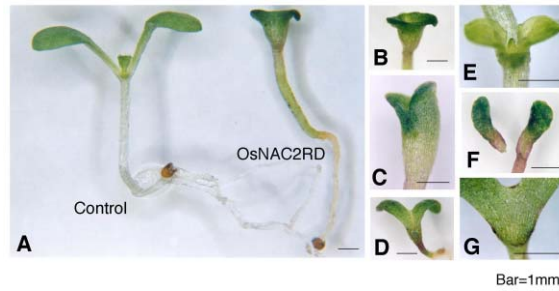


図1. OsNAC2-RD導入シロイヌナズナで観察されたカップ型子葉
 A: 野生型 (Control) とOsNAC2RD導入シロイヌナズナT1世代。B-D: OsNAC2RD導入シロイヌナズナで見られた子葉の融合。E: 野生型シロイヌナズナの子葉の付け根に見られる茎頂分裂組織。F-G: OsNAC2RD導入シロイヌナズナでは茎頂分裂組織が見られない。



図 2. A: SPW1 の C 末端にリプレッションドメインを付加したキメラ遺伝子形質転換イネの表現型。B: 形質転換イネにおける SPW1 遺伝子と導入遺伝子の RT-PCR による発現解析。
 変異の生じた花の出現頻度は、line#1, #4, #5, #6, #7 では 100%、line#16,#17 では約 50%であった。

遺伝子発現研究グループ

植物特異的ERF/AP2/DREB, NAC, WRKY転写因子、ストレス誘導性転写因子の機能、および転写因子の標的遺伝子を含めた機能ネットワークを解析するために、下記の研究を分担した。

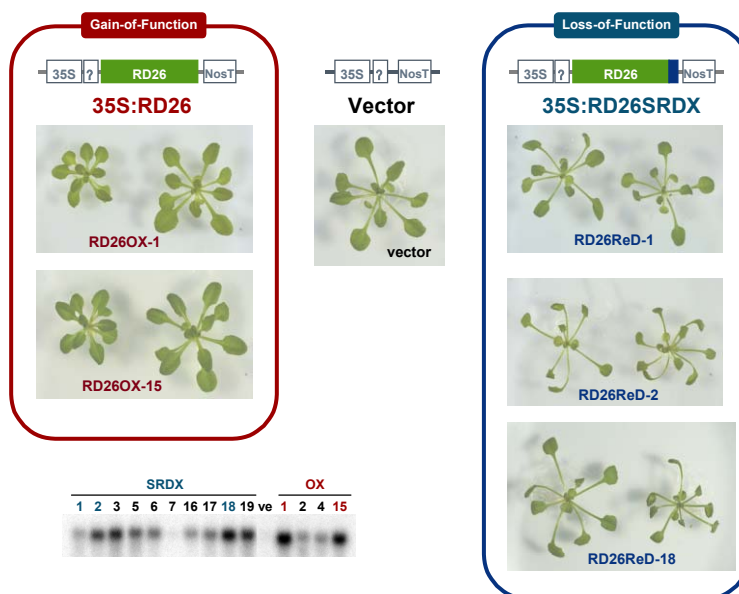
a. シロイヌナズナ転写因子オリゴアレイの作製：ゲノム情報やインフォマティクスを用いてシロイヌナズナ転写因子遺伝子をリストアップした。各遺伝子特異的な3‘非コード領域を用いてオリゴヌクレオチドを設計し、アレイを作製した。このアレイを用いて発現

解析を開始した。

b. ストレス誘導性転写因子の強発現型、および、ドミナントネガティブ型トランスジェニックシロイヌナズナの作製：シロイヌナズナ完全長cDNAマイクロアレイを用いて乾燥・低温・塩・植物ホルモンアブシジン酸誘導性転写因子のトランスジェニックシロイヌナズナを系統的に作製した。また、産総研高木グループのトランスジェニックシロイヌナズナ作製を一部分担し、102系統の形質転換を行った。

c. bで作製されたトランスジェニックシロイヌナズナのマイクロアレイによる発現解析：乾燥誘導性NAC遺伝子(RD26)の強発現型、および、ドミナントネガティブ型トランスジェニックシロイヌナズナについて表現型解析を行った。その結果、野生型植物と比較して強発現型では、葉柄の長さが短くなり、葉身の大きさが大きくなるのに対し、ドミナントネガティブ型では逆の表現型が認められ、リプレッションドメインの効果が示唆された。

Morphological Changes in *RD26* Transgenic Plants



3. 研究実施体制

シロイヌナズナ転写因子研究グループ

- ①研究分担グループ長：高木 優（産業技術総合研究所、研究チーム長）
- ②研究項目：シロイヌナズナ転写因子機能解析、および転写抑制機構の研究

イネ転写因子研究グループ

- ①研究分担グループ長：篠崎和子（国際農林水産業研究センター、特定研究主査）
- ②研究項目：イネ転写因子の機能解析

遺伝子発現研究グループ

①研究分担グループ長：篠崎一雄（理化学研究所、主任研究員）

②研究項目：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

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

シロイヌナズナ転写因子研究グループ

- Sugano S., Kaminaka H., Rybka Z., Catala R., Salinas J., Matsui K., Ohme-Takagi M. and Takatsuji H. (2003) Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia. *Plant J.* 36, 830-841.
- Hiratsu K., Matsui K., Koyama T. and Ohme-Takagi M. (2003) Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. *Plant J.* 34, 733-739.
- Koyama T., Okada, T., Kitajima, S., Ohme-Takagi, M., Shinshi, H. and Sato, F. (2003) Isolation of tobacco ubiquitin-conjugating enzyme cDNA in a yeast two-hybrid system with tobacco ERF3 as bait and its characterization of specific interaction. *J. Exp Bot.* 54, 1175-1181.
- Hao, D., Ohme-Takagi, M., Yamasaki, K. (2003) A modified sensor chip for surface plasmon resonance enables a rapid determination of sequence specificity of DNA-binding proteins. *FEBS Lett.* 536, 151-156.

イネ転写因子研究グループ

- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari Z.K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H., Narusaka, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Interaction between two *cis*-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J.* **34**, 137-148.
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2003) Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr. Opin. Biotech.* **14**, 194-199.
- Motohashi, R., Ito, T., Kobayashi, M., Taji, T., Nagata, N., Asami, T., Yoshida, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2003) Functional analysis of the 37 kDa inner envelope membrane polypeptide in chloroplast biogenesis using a *Ds*-tagged *Arabidopsis* pale-green mutant. *Plant J.* **34**, 719-731.
- Oono, Y., Seki, M., Nanjo, T., Narusaka, M., Fujita, M., Satoh, R., Satou,

- M., Sakurai, T., Ishida, J., Akiyama, K., Iida, K., Maruyama, K., Satoh, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2003) Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using *ca.* 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J.* **34**, 868–887.
- Seki, M., Kamei, A., Satou, M., Sakurai, T., Fujita, M., Oono, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2003). Transcriptome analysis in abiotic stress conditions in higher plants. *Topics in Current Genetics: Plant Responses to Abiotic Stress* edited by H. Hirt and K. Shinozaki, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 271–295.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Seki, M. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 410–417.
- Urano, K., Yoshiba, Y., Nanjo, T., Igarashi, Y., Seki, M., Sekiguchi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2003) Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ.* **26**, 1917–1926.
- Rabbani, M.A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M.A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Monitoring expression profiles of rice (*Oryza sativa* L.) genes under cold, drought and high-salinity stresses, and ABA application using both cDNA microarray and RNA gel blot analyses. *Plant Physiol.* **133**, 1755–1767.
- Urano, K., Yoshiba, Y., Nanjo, T., Ito, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2004) *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 369–375.
- Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Akiyama, K., Iida, K., Ishida, J., Nakajima, M., Enju, A., Narusaka, M., Fujita, M., Oono, Y., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2004) RIKEN *Arabidopsis* full-length (RAFL) cDNA and its applications for expression profiling under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot.* **55**(395), 213–223.
- Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Akiyama, K., Iida, K., Ishida, J., Nakajima, M., Enju, A., Narusaka, M., Fujita, M., Oono, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. (2003) Full-length cDNAs for the discovery and annotation of genes in *A. thaliana*, *Plant Functional Genomics*, Edited by Dario Leister, Haworth's Food Products Press, Binghamton. New York, in press.

- Kasuga, M., Miura, S., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) A combination of the *Arabidopsis DREB1A* gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol.* 45(3), 346-350.
- Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 45(3), 309-317.
- Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., Shimada, Y., Yoshida, S., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis DREB1A/CBF3* transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J.* 38, 982-993.

遺伝子発現研究グループ

- Oono, Y., Seki, M., Nanjo, T., Narusaka, M., Fujita, M., Satoh, R., Satou, M., Sakurai, T., Ishida, J., Akiyama, K., Iida, K., Maruyama, K., Satoh, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2003) Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using *ca.* 7000 full-length cDNA microarray, *Plant J.*, 34, 868-887.
- Nishiyama, T., Fujita, T., Tadasu, S., Seki, M., Nishide, H., Uchimiya, I., Kamiya, A., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., Kohara, Y. and Hasebe, M. (2003) Comparative genomics of the *Physcomitrella* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis* genome: implication for the land plant evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 8007-8012.
- Urano, K., Yoshida, Y., Nanjo, T., Igarashi, Y., Seki, M., Sekiguchi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.: Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages, *Plant Cell Environ.*, 26, 1917-1926 (2003).
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Fujita, M., Ishida, J., Nakashima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Kamiya, A., Park, P., Tosa, Y., Kobayashi, M. and Shinozaki, K. (2003) Expression profiles of *Arabidopsis phospholipase A IIA* gene in response to biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiol.*, 44, 1246-1252
- Yamada, K., Lim, J., Dale, J.M., Chen, H., Shinn, P., Palm, C.J., Southwick, A.M., Wu, H.C., Kim, C., Nguyen, M., Pham, P., Cheuk, R., Karlin-Newmann,

G., Liu, S.X., Lam, B., Sakano, H., Wu, T., Yu, G., Miranda, M., Quach, H.L., Tripp, M., Chang, C.H., Lee, J.M., Toriumi, M., Chan, M.M.H., Tang, C.C., Onodera, C.S., Deng, J.M., Akiyama, K., Ansari, Y., Arakawa, T., Banh, J., Banno, F., Bowser, L., Brooks, S., Carninci, P., Chao, Q., Choy, N., Enju, A., Goldsmith, A.D., Gurjal, M., Hansen, N.F., Hayashizaki, Y., Johnson-Hopson, C., Hsuan, V.W., Iida, K., Karnes, M., Khan, S., Koesema, E., Ishida, J., Jiang, P.X., Jones, T., Kawai, J., Kamiya, A., Meyers, C., Nakajima, M., Narusaka, M., Seki, M., Sakurai, T., Satou, M., Tamse, R., Vaysberg, M., Wallender, E.K., Wong, C., Yamamura, Y., Yuan, S., Shinozaki, K., Davis, R.W., Theologis, A. and Ecker, J.R. (2003) Empirical Analysis of Transcriptional Activity in the Arabidopsis Genome, *Science*, 302, 842-846.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：10件（CREST研究期間累積件数：10件）