

「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

本研究の目的は、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、植物特異的な転写因子の機能を解析するとともに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。すなわち、これまで重複遺伝子が存在することから変異株での解析が難しく、機能が未知であった転写因子にCRES-T法を適用して、制御する形質並びに標的遺伝子を解析した。研究対象として、双子葉、単子葉植物のそれぞれ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の解析を行った。

本研究課題は、以下の4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、本研究のコアとなるリプレッションドメインの転写抑制機構の解明もおこなう。

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、イネの特性向上に有益であると考えられる環境ストレス耐性を制御する転写因子であるOsDREB1FやOsPIL5等に注目し解析をおこなう。また、シロイヌナズナ中で機能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類似や相違点についても解析する。

3) 遺伝子発現研究グループ

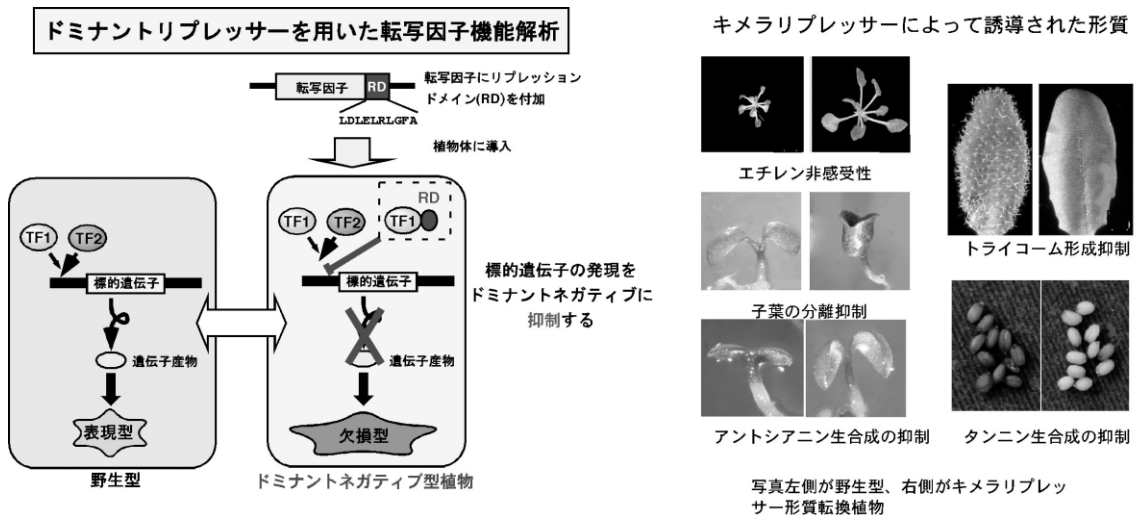
ゲノム情報やインフォマティクスを用いてシロイヌナズナの全転写因子アレイを作製し、ゲノムベースでの網羅的な転写因子の発現プロファイルを行う。また、各種マイクロアレイを用いて転写因子が制御する標的遺伝子群の同定・解析を行い、転写因子機能ネットワークの解明を行う。

4) 有用遺伝子探索グループ

キメラリプレッサー発現形質転換シロイヌナズナ植物体を作製する。形態形成、ストレス、代謝関連など、有用形質に関与する転写因子遺伝子の探索研究を行う。また、遺伝子導入の環境整備と効率的な導入実験の確立をおこなう。

2. 研究実施内容

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、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。また、種々のデータベースが充実されてきたことからバイオインフォマティック手法による遺伝子機能の推察等が可能になり、遺伝子解析においてその質と効率化（速度）が求められている。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いため転写因子の機能解析が困難であった。このようなことから、従来の方法とは異なる新たな解析法の開発が待たれていた。そこで我々は、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を可能にした新規ジーンサイレンシング技術、CRES-T (chimeric repressor silencing technology) 法を開発し、それらを用いて植物特異的転写因子の解析をおこなった。さらにそれらの研究結果から植物特異的な転写因子機能ネットワークの構築を試みた。CRES-Tシステムの基本概念を下図に示す。



これまでに、二次代謝生合成系で働く転写因子をキメラリプレッサーに変換させることで二次代謝生合成系を能動的に制御することが可能であることを示し、花器器官形成の制御をおこなう転写因子のキメラリプレッサーを発現させることにより、雄性不稔、完全不稔をシロイヌナズナのみならずイネにおいても高効率で誘導することに成功した。これらの結果はCRES-T法が単子葉であるイネにおいても利用できることが示された。また、不稔の誘導は遺伝子操作植物の花粉飛散防止、さらに国民病とまで言われている花粉症の阻止

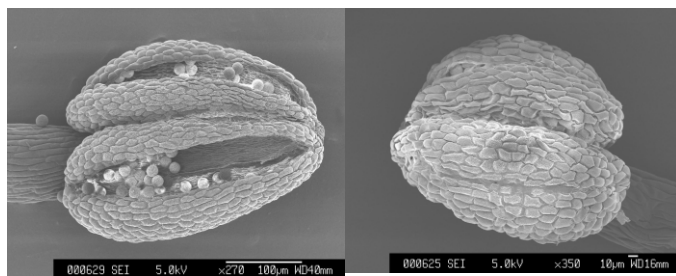
法として応用分野でも期待される手法である。この様に、植物特異的な転写因子にCRES-T法を用いることで、新規の機能を同定することを可能にし、さらにその知見を基に応用研究への方向性を提案することが可能になってきた。

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、約2000個に近い転写因子をコードする遺伝子が存在すると推定されている。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、これらを発現する形質転換植物体の解析を進めてきた。当該年度は、植物特異的な転写因子であり、器官形成に関与すると考えられているTCP転写因子、ファミリーの大部分が機能未知であるNAC転写因子、およびMYB転写因子のなかでも植物特異的であるR2R3タイプのMYB転写因子に関しても機能解析を行った。

TCP転写因子ファミリーに属する個々の遺伝子に対するキメラリプレッサーを作製し、これらを発現する形質転換植物を作製してその表現型を解析した。その結果、TCPキメラリプレッサーを発現する植物体では、器官の表皮細胞の分化の異常、並びに局所的に細胞分裂が起こっていると考えられる領域があることを明らかにした。これらの結果からTCP転写因子は芽生えや葉のパターン形成に関与し、それらの形態維持に必要であると結論された。

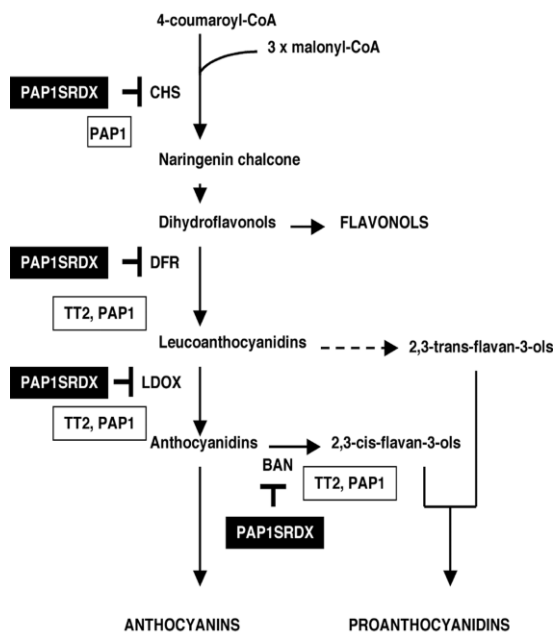
シロイヌナズナNACファミリーの大部分の遺伝子は機能が未知のままである。そこでNAC転写因子の機能解明をCRES-T法を用いて行った。シロイヌナズナNACファミリーは6個のサブファミリーに分類されるが、子葉の分離や茎頂分裂組織の形成に関与するCUC1, 2を含むサブファミリーに属する遺伝子は基本的に同じ分子機能を有していることが分かった。また、機能が未知のサブファミリーに属するNST1, NST2は、CRES-T法の適用により葯の開裂が阻害されるものがみつかった。この葯の開裂阻害は葯内被細胞における二次壁の肥厚不全が原因であることがわかったほか、この遺伝子を逆に過剰発現させると葯やロゼット葉の表皮細胞などで異所的な二次壁肥厚が起こることがわかった。これらの結果からこれらの遺伝子は二次壁の肥厚を促進するのに必要かつ十分な転写因子であることが示された。さらに、マイクロアレイ解析により下流遺伝子のプロファイリングを行った。



葯の電子顕微鏡写真（SEM）。左側は野生株、右側はCRES-T適用株。CRES-T適用株では成熟した葯においてもその開裂がほとんど起きない。

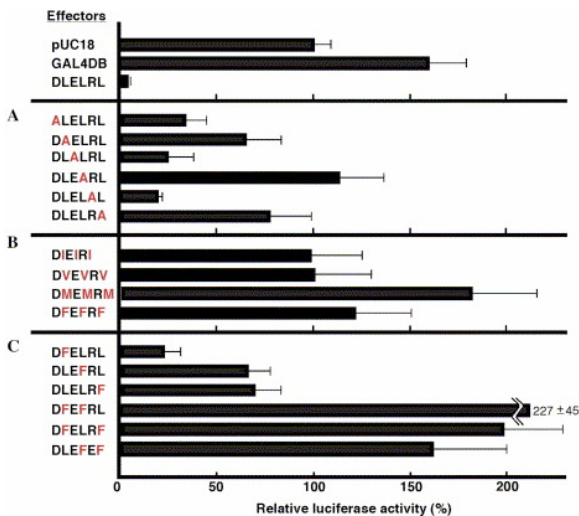
次にCRES-T法を用いて二次代謝系の制御を試みた。フェニルプロパノイド生合成系に関与するMYB転写因子であるPRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENTATION (PAP1)にCRES-T法を

用いた結果、ストレス存在下で認められるアントシアニンの蓄積が抑制された。加えてタンニン含量の顕著な低下による種子の淡黄色化が観察された。



これらの変化はPAP1キメラリプレッサーがフラボノイド生合成系酵素、CHS、DFR、LDOX、BANをコードする遺伝子の発現を抑制したことによるものであった。CRES-T法を用いることで、アントシアニン並びにタンニンの生合成系を同時に且つ効果的に抑制できたことから、CRES-T法が植物の二次代謝制御およびmetabolic engineeringの手法として有効であることを示すことができた。

リプレッションドメインの転写抑制機構解明の一端として、リプレッション活性を有する最小単位のアミノ酸配列の同定をおこなった。



A Reporter

| | | | | | | |
|-----------------------|----------|----------|--------|-----|-----|--------|
| GAL4-35S-TATA-LUC-NOS | 5XGAL4 | CaMV35S' | TATA | Ω | LUC | NOS |
| 35S-GAL4-TATA-LUC-NOS | CaMV35S' | 5XGAL4 | TATA | Ω | LUC | NOS |
| 35S-TATA-GAL4-LUC-NOS | CaMV35S' | TATA | 5XGAL4 | Ω | LUC | NOS |
| 35S-TATA-LUC-NOS-GAL4 | CaMV35S' | TATA | Ω | LUC | NOS | 5XGAL4 |

Effector

| | | | | | |
|-------------------|---------|---|--------|--------|-----|
| 35S-GAL4DB-DLELRL | CaMV35S | Ω | GAL4DB | DLELRL | NOS |
| 35S-GAL4DB-VP16 | CaMV35S | Ω | GAL4DB | VP16 | NOS |

B

| Reporter | Effector | GAL4-35S-TATA-LUC-NOS | 35S-GAL4-TATA-LUC-NOS | 35S-TATA-GAL4-LUC-NOS | 35S-TATA-LUC-NOS-GAL4 |
|----------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| pUC18 | | 100 (%) | 100 | 100 | 100 |
| GAL4DB | | 92 ± 13 | 97 ± 8 | 81 ± 5 | 59 ± 23 |
| DLELRL | | 58 ± 15 | 8 ± 2 | 55 ± 8 | 84 ± 7 |
| VP16 | | 55 ± 6 | 325 ± 12 | 45 ± 6 | 86 ± 12 |

その結果、6アミノ酸、DLELRLがシロイヌナズナの転写抑制に必要且つ十分であることをトランジェント実験系を用いて明らかにした。この最小モチーフは32個のTFIIIAタイプのZinc finger転写因子に存在することがデータ検索から明らかとなった。また、転写開始点とリプレッションドメインと位置関係がリプレッション活性に影響を与えることが判明し、リプレッションの作用機序を考察する上で重要な知見を得ることができた。

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法等により解析し、イネの特性向上に有益であると考えられる乾燥、塩害、低温などのストレス耐性の獲得や伸長成長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製し、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した。一方、イネ中での解析においては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をイネに導入した。

イネのAP2遺伝子では主に3種の遺伝子に関して解析を進めているが、これらの遺伝子のうちOsDREB1FはシロイヌナズナのDREB1EやDREB1Fに類似したDNA結合ドメインを持っている。この遺伝子を過剰発現したシロイヌナズナではDREB1EやDREB1Fの標的遺伝子が過剰発現していた。RDを付加したキメラ遺伝子を導入したシロイヌナズナではこれらの遺伝子の発現が押さえられていることも示された。また、凍結耐性試験において、過剰発現体ではストレス耐性の向上が見られ、RDで機能を押さえた植物ではストレス耐性の減少が示された。OsDREB1Fはシロイヌナズナ中でDREB1Eと類似した機能を持つと考えられた。一方、OsDREB1Fをイネ中で過剰発現した植物では生育阻害が見られ、マイクロアレイ解析により標的遺伝子を探索すると、OsDREB1A遺伝子とは異なる遺伝子群が標的となっていることが示された。また、RDを付加したキメラ遺伝子の導入体では、アクチンプロモーターが十分機能していないと考えられ、ユビキチンプロモーターに替えた植物体を解析する予定である。

イネ22kオリゴマイクロアレイ解析により、イネにおいて乾燥ストレスによって発現量が著しく減少するbHLHモチーフを有する遺伝子を同定している。このイネ遺伝子は、シロイヌナズナのbHLH型転写因子PIF3-like5 (PIL5)と相同性が極めて高く、またN末端にPILモチーフが保存されていたため、OsPIL5と名付けた。このOsPIL5の機能を明らかにするため、OsPIL5遺伝子をシロイヌナズナに導入しその表現型を観察したところ、生育の促進と乾燥ストレス耐性の低下が見られた(図1)。一方、RDを利用したOsPIL5機能欠損シロイヌナズナを作製し表現型を観察したところ、生育遅延と大幅な乾燥ストレス耐性の向上が認められた(図1)。また、OsPIL5遺伝子を過剰発現させた形質転換イネにおいては、節間伸長が増大し、背丈の高い表現型となった。RDによる機能欠損イネでは、逆に節間伸長が抑

制され背丈の低い矮性の表現型を示した。過剰発現イネ、機能欠損イネのストレス耐性について解析中である。

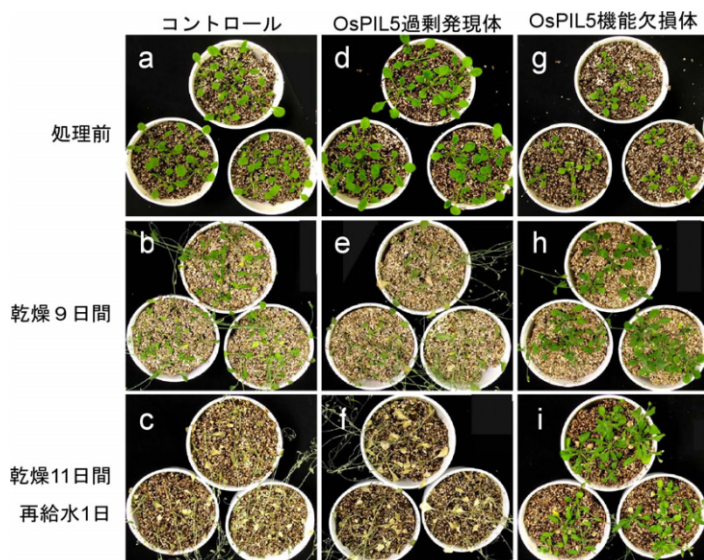


図1. OsPIL5過剰発現体、OsPIL5機能欠損体における乾燥ストレス耐性
a-c: ベクターコントロール、d-f: OsPIL5過剰発現シロイヌナズナ、g-i: OsPIL5機能欠損シロイヌナズナ、a, d, g: ストレス処理前の植物体、b, e, h: 乾燥ストレス処理を9日間行った植物体、c, f, i: 乾燥ストレス処理を11日間行った後、再給水1日経過した植物

遺伝子発現研究グループ

植物特異的ERF/AP2/DREB, NAC, WRKY転写因子およびストレス誘導性転写因子等の標的遺伝子群を、遺伝子抑制植物体(CRES-T法)・過剰発現植物体とマイクロアレイ技術を用いて同定し、転写因子機能ネットワークを明らかにする目的で、下記の研究を行った。

a) ストレス誘導性転写因子の発現プロファイル解析:

昨年度に作製した全転写因子オリゴアレイや、完全長cDNAマイクロアレイ、アジレントゲノムアレイを用いて、種々のストレス、ホルモン処理また植物組織における発現プロファイル解析を行った。これまでに30種類のストレス等応答実験を行い、各種ストレス誘導性転写因子群を多数同定した。

b) シロイヌナズナのストレス誘導性NAC転写因子の機能ネットワーク解析:

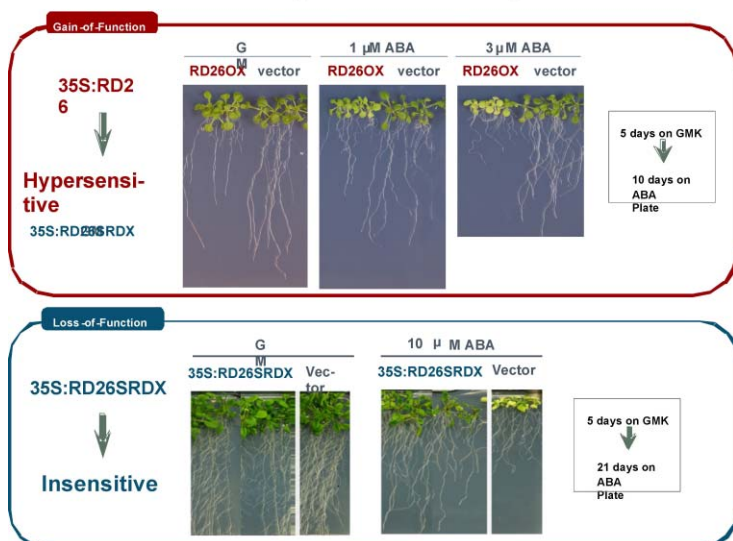
これまでに乾燥応答性NAC遺伝子RD26が核移行能を持つ転写因子であることを証明してきた。今回はRD26にリプレッションドメイン(SRDX)を付加したキメラ遺伝子を高発現する形質転換植物を作製し、その表現型を解析した結果、葉柄の伸長、葉身の縮小など、野生型のRD26高発現植物と逆の形態的特徴を示した。さらに、RD26-SRDX植物はABAに対する感受性が低下していた。マイクロアレイ解析により、RD26-SRDXではストレスおよびABA応答性遺伝子の発現誘導が抑制されていることを示した。これらの結果から、RD26がABAを介したストレスシグナル伝達経路において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

c) 雄性不稔植物作製の試み：

シロイヌナズナ雄性不稔変異体の一つである*ms1*の原因遺伝子*MS1*（転写因子）と遺伝子サイレンシング技術（CRES-T法）を用いて、雄性不稔シロイヌナズナの作製を試みた。*35S*プロモーターの代わりに*MS1*プロモーターを用い、*MS1-SRDX*を発現させた。このコンストラクト（*MS1-SRDX*）を野生型シロイヌナズナへ導入したところ、*ms1*変異体と同様な表現型変異を示す形質転換体が多数得られ、CRES-T法の効果が示された。

なお、本年度の研究計画として予定していた「イネ転写因子オリゴアレイの作製」は、イネゲノム情報が不十分なため延期した。

ABA Sensitivity of *RD26* Transgenic Plants



有用遺伝子探索グループ

転写因子キメラリプレッサー遺伝子をシロイヌナズナへ導入するために必要な実験設備、施設の整備を行った。恒温室の温度制御系の設備、培養だなの購入など。これと平行して産業技術総合研究所でシロイヌナズナの栽培、遺伝子導入法の研修を受けた。これらに基づき6種類の遺伝子について遺伝子導入実験を行った。そのうち一つの転写因子遺伝子導入後の芽生えについて葉柄やメリステムに形態変化が見られた。遺伝子導入そのものは成功したといえる。しかしながら、導入頻度が低く（予想の約十分の一）、網羅的な導入計画としては問題を残している。現在安定した形質転換頻度を得るために再度導入を試みている。当初より、導入する遺伝数を徐々に増やし、現在は一週あたり5遺伝子導入のペースを確立した。現在その結果を検討中である。

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

有用遺伝子探索グループ

- ①研究分担グループ長：我彦広悦（秋田県立大学、教授）
- ②研究項目：キメラリプレッサー発現形質転換シロイヌナズナ植物体種子の作製

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

- Hiratsu K., Mitsuda N., Matsui K. and Ohme-Takagi M. Identification of the minimal repression domain of SUPERMAN shows that the DLELRL hexapeptide is both necessary and sufficient for repression of transcription in Arabidopsis. Biochemical and Biophysical Research Communications 2004 Aug;321(1):172-8
- Matsui K., Tanaka H. and Ohme-Takagi M. Suppression of the biosynthesis of proanthocyanidin in Arabidopsis by a chimeric PAP1 repressor. Plant Biotech J. 2004 Nov;2(6):487-494
- Matsui K., Hiratsu K., Koyama T., Tanaka H. and Ohme-Takagi M. A chimeric AtMYB23 repressor induces hairy roots, elongation of leaves and stems, and inhibition of the deposition of mucilage on seed coats in Arabidopsis. Plant and Cell Physiology 2005 Jan;46(1):147-55.
- Tohge T, Matsui K, Ohme-Takagi M, Yamazaki M, Saito K. Enhanced radical scavenging activity of genetically modified Arabidopsis seeds. Biotechnol Lett. 2005 Mar;27(5):297-303.
- Charlton W., Matsui K, Johnson B., Graham I., Ohme-Takagi M. and Baker A. Salt-induced expression of peroxisome-associated genes requires

components of the ethylene, jasmonate and abscisic acid signalling pathways. *Plant, Cell & Environment* 2005 Apr;28(4):513.

イネ転写因子研究グループ

- Osakabe, Y., Maruyama, K., Seki, M., Satou, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005) An LRR receptor kinase, RPK1, is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 1105-1119.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2005) Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 10, 88-94.
- Sakamoto, H., Maruyama, K., Meshi, T., Iwabuchi, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) Arabidopsis Cys2/His2-type Zinc-finger Proteins Function as Transcription Repressors under Drought-, Cold-, and High-salinity-stress Conditions. *Plant Physiol.* 136, 2734-2746.
- Tran, L.-S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) Functional analysis of Arabidopsis NAC transcription factors controlling expression of *erd1* gene under drought stress. *Plant Cell* 16, 2482-2498.
- Qin, F., Sakuma, Y., Li, J., Liu, Q., Li, Y.-Q., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol.* 45, 1042-1052.
- 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

- 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.: RIKEN Arabidopsis full-length (RAFL) cDNA and its applications for expression profiling under abiotic stress conditions, *J. Exp. Bot.*, 55, 213-223 (2004).
- Fujita M., Fujita Y., Maruyama K., Seki M., Hiratsu K., Ohme-Takagi M.,

Tran L-S. P., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K.: A dehydration-induced NAC protein, RD26 is involved in ABA-dependent stress signaling pathway, Plant J. 39, 863-876 (2004).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：15件（CREST研究期間累積件数：25件）