

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07098

研究課題名(和文)HD-ZIP 遺伝子群による発生制御の分子機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanisms underlying HD-ZIP III genes

研究代表者

伊藤 恭子(大橋恭子)(Ohashi-Ito, Kyoko)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：90451830

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文):HD-ZIP 遺伝子群は、植物発生の複数の過程で重要な役割を果たす転写因子群であるが、機能の分子実体が十分には理解されていない。そこで本研究では、HD-ZIP 遺伝子群の標的遺伝子の網羅的な単離と解析を行った。シロイヌナズナに5つあるHD-ZIP III遺伝子のうちの4つについて過剰発現時のトランスクリプトーム解析を行い、各下流遺伝子群を単離した。さらに、HDZIP III遺伝子間での機能の冗長性と独自性を明らかにした。

研究成果の概要(英文):Class III homeobox leucine zipper genes (HD-ZIP III) play essential roles in plant development. To understand the molecular mechanism underlying HD-ZIP III, we performed transcriptome analyses and revealed downstream genes of each HD-ZIP III genes, such as ATHB-8, ATHB-15, PHB and REV. These downstream genes were highly overlapped, but there were genes specifically regulated by one of HD-ZIP III. We showed that the similarity and commonality among HD-ZIP III genes based on the data.

研究分野：植物発生

キーワード：植物 発生

1. 研究開始当初の背景

植物の発生過程では、様々な局面で転写因子による制御が非常に重要となっている。特に、植物の基本的な body plan を決める際には、ホメオボックス遺伝子のファミリーの一つである、ホメオドメイン・ロイシンジッパークラス (HD-ZIP) ファミリーの遺伝子群が重要な役割を果たす。例えば、初期胚発生において、HD-ZIP 遺伝子は胚の上側で発現しているが、これらを異所的に胚の下側で発現させると、本来根になる部分がシュートとなることから、胚発生において HD-ZIP 遺伝子はシュートの発生運命を決めていることが明らかになっている。また、葉の発生の際の、表裏の決定にも HD-ZIP 遺伝子が大きな役割を果たしており、HD-ZIP 遺伝子が葉の表側のアイデンティティを与えることがわかっている。さらに、HD-ZIP 遺伝子は維管束の発生においても、木部のアイデンティティを与える因子として重要である。このように複数の発生局面で HD-ZIP 遺伝子群は複数の細胞種の運命決定に関与している。しかし、HD-ZIP 遺伝子の様々な機能が明らかになりつつあるが、HD-ZIP 遺伝子の分子レベルでははたらくべきには不明な点が多い。

HD-ZIP 遺伝子群に関する一つ目の疑問は、同一の遺伝子群がどのようにして異なる発生過程の細胞運命決定を制御しているのか、という点である。シロイヌナズナには、HD-ZIP 遺伝子は 5 つあるが、それぞれが異なる機能を持ち、異なる細胞運命決定を制御している訳ではない。むしろ、5 つの HD-ZIP 遺伝子の発現場所はかなりの部分で重なっており、また、その機能も重複していることが明らかになっている。例えば、胚発生におけるシュートの運命決定には少なくとも 3 つの HD-ZIP が冗長的に機能している。また、葉の表側の運命決定には 4 つの HD-ZIP 遺伝子が関与している。加えて、5 つの HD-ZIP の内、4 つの遺伝子では、そのシングルノックアウト変異体で際立った表現型はみられない。これらのことから、HD-ZIP 遺伝子の機能は、かなりの部分が重複していることが示唆されている。しかしながら、それらの機能は、完全に同一ではなく、個々に特有の機能があることも示唆されている。ここで二つ目の疑問として、HD-ZIP 遺伝子は、どのような遺伝子群を冗長的に制御しているか、またどのような遺伝子群を各 HD-ZIP 遺伝子が固有の標的遺伝子として制御しているのか、ということがある。こういった疑問に答えるためには、HD-ZIP 遺伝子群に相互作用する因子を明らかにすることや、各々の HD-ZIP 遺伝子が制御する標的遺伝子群を明らかにすることが有効であると思われる。

2. 研究の目的

ホメオボックス遺伝子ファミリーの一つである HD-ZIP 遺伝子群は、植物の発生過程で非常に重要な役割を果たす転写因子群である。しかしながら、HD-ZIP 遺伝子群はその機能の重要性にもかかわらず、制御の仕組み・標的遺伝子群など、機能の分子実体の多くは明らかになっていない。そこで本研究では、これまでの個体レベルの解析では困難であった HD-ZIP 遺伝子群の標的遺伝子の単離を、培養細胞を用いることにより試みる。これらの解析を通し、HD-ZIP 遺伝子がはたらく分子機構を解明し、ひいては植物発生の複数の過程 (胚・葉・維管束形成) の分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

HD-ZIP 遺伝子の機能の分子実体を明らかにするために、まず、シロイヌナズナに 5 つある HD-ZIP 遺伝子【ATHB8、ATHB15、PHABULOSA (PHB)、PHAVOLUTA (PHV)、REVOLUTA (REV)】について、一つ一つの標的遺伝子群を明らかにする。そのために、各 HD-ZIP 遺伝子を薬剤添加により過剰発現させるように形質転換したシロイヌナズナの懸濁培養細胞株を作出する。この形質転換細胞株を材料として、マイクロアレイにより網羅的な遺伝子発現変動を解析し、HD-ZIP 遺伝子が制御する標的遺伝子群を明らかにする。HD-ZIP により制御される遺伝子群の中で、HD-ZIP 遺伝子群により冗長的に制御されている遺伝子は、HD-ZIP 機能の中心を担う遺伝子であると考えられる。そこで、これらの遺伝子の機能解析を進める。変異体の解析・発現解析等、その機能を理解するための様々な解析を行う。また一方で、特定の HD-ZIP 遺伝子にのみ制御されている遺伝子についても解析を行う。それらは、個々の HD-ZIP 遺伝子機能の特徴を示す遺伝子であると考えられるため、それらの遺伝子の機能を明らかにするための解析を進める。

以上の解析を通し、HD-ZIP の機能が発揮される分子実体を解明する。

4. 研究成果

まず、シロイヌナズナに 5 つある HD-ZIP 遺伝子【ATHB8、ATHB15、PHABULOSA (PHB)、PHAVOLUTA (PHV)、REVOLUTA (REV)】それぞれのタンパク質を、エストロジェンを添加することにより過剰発現させることのできるプラスミドを作製した。その際、HD-ZIP 遺伝子内にある micro RNA165/166 のターゲット配列に、塩基置換を施し (この際、アミノ酸置換は引き起こさないようにした) micro RNA165/166 耐性型の HD-ZIP 遺伝子

を誘導できるようにした。

次に、シロイヌナズナの懸濁培養細胞に、作製したコンストラクトを導入したアグロバクテリアを介して形質転換を行った。4つの遺伝子 (ATHB8、ATHB15、PHB、REV) について形質転換培養細胞株が確立できた。PHV については、形質転換培養細胞株を作出することができなかった。

さらに、確立した4つの形質転換培養細胞を用いて、各 HD-ZIP 遺伝子を過剰発現させた際の遺伝子の発現変動を、マイクロアレイを用いて取得した。これにより得られたデータには、ZPR1、ZPR3 といったこれまでに報告がなされている HD-ZIP の標的遺伝子が複数含まれていた。そのため、今回用いた培養細胞による解析データが個体レベルでの解析データと大きくは異なること、および、得られたデータの有用性が示唆された。

そこで次に、それぞれの HD-ZIP 遺伝子を過剰発現した際に2倍以上発現レベルが上昇する遺伝子を下流遺伝子として選抜し、以下の解析を行った。まず、遺伝子機能の冗長性と特異性を検討した。ATHB15、PHB、REV の下流遺伝子は、いずれも ATHB8 の下流遺伝子と最も重なりが大きく、それぞれ機能としては ATHB8 に最も近いことが推察された(表1)。

表1 . HD-ZIP 各下流遺伝子群の重なり程度

	ATHB8	ATHB15	PHB	REV
ATHB8	-	21.2	34.5	40.0
ATHB15	61.4	-	50.9	41.2
PHB	63.0	32.0	-	56.9
REV	36.1	12.8	28.2	-

各 HD-ZIP 遺伝子を過剰発現させた際に2倍以上発現上昇する遺伝子群の重なり具合を示した。最左列の遺伝子の下流遺伝子数を最上行に記載された遺伝子の下流遺伝子数で割った値(%)。

また、それぞれの下流遺伝子群を用いたジェーン・オントロジー (GO) 解析では、ATHB8、PHB、REV の3つの遺伝子間で下流遺伝子の機能に高い共通性が見られた。これら3つの遺伝子間では、シュートの形態形成、細胞壁の制御、木部分化、オーキシン応答などの機能が共通していることが明らかとなった。一方で、ATHB15 の下流遺伝子にはこれらの機能をもつ遺伝子群が有意に蓄積していることはなかった。また、REV には、特異的な機能として二次代謝物の制御があった。そこで次に、各 HD-ZIP の下流遺伝子群の中で、他の

HD-ZIP 遺伝子には制御されていない特異的な遺伝子の割合を調べた(表2)。その割合は、REV が53%と高くなっており、REV がより特異的な機能を持つことが示唆された。これらのことから、ATHB8、ATHB15、PHB、REV はある程度の割合で共通した下流遺伝子を制御しているものの、REV はより特異的な機能を有していることが明らかになった。

表2 単離した下流遺伝子数と独自の下流遺伝子数およびその割合

	ATHB8	ATHB15	PHB	REV
特異的な遺伝子数	143	32	196	29
発現上昇遺伝子総数	330	114	181	365
割合 (%)	43	28	16	53

また、ATHB8、ATHB15、PHB、REV のいずれの遺伝子によっても制御されている共通の遺伝子には ZPR 遺伝子など HD-ZIP 遺伝子機能を制御すると考えられる因子が複数含まれていた。

トランスクリプトーム解析により見出された HD-ZIP の下流遺伝子について発現解析・機能解析を進めた。まず、7つの下流遺伝子について、プロモーター：レポーターラインを作成し、発現部位を調べた。各遺伝子の発現パターンは様々であり、発現する組織も様々であったことから、本研究のトランスクリプトーム解析ではある特定の組織での HD-ZIP 下流遺伝子ではなく、植物体の様々な組織・時期における HD-ZIP の下流遺伝子を抽出できたことが示唆された。さらに、これらの遺伝子の機能欠損変異体、あるいは過剰発現体の表現型を解析した。それらの中には、維管束形成に異常を示すもの、茎頂分裂組織が肥大するもの、細胞分裂活性に異常を示すものなどがあつた。これらの結果から、今回明らかにした下流遺伝子には HD-ZIP 機能を発揮する重要な遺伝子が含まれていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Ohashi-Ito, Kyoko and Fukuda, Hiroo
Functional mechanism of bHLH complexes during early vascular development.
Curr. Opin. Plant Biol. (2016) 33, 42-27.
DOI: 10.1016/j.pbi.2016.06.003
査読有

〔学会発表〕(計 1件)

伊藤(大橋)恭子、福田裕穂

HD-ZIP 遺伝子により制御される遺伝子群
の解明

日本植物学会第 79 回大会、朱鷺メッセ(新潟)
2015 年 9 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 恭子(大橋恭子)(Ohashi-Ito,
Kyoko)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号: 90451830

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

岩本 訓知(Iwamoto, Kuninori)

東京大学・大学院理学系研究科・技術専門職
員