

令和元年6月12日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07644

研究課題名(和文)植物の根毛形成に関わるMYB転写因子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of MYB transcription factors involved in root hair formation

研究代表者

富永 るみ (Tominaga, Rumi)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：20373334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの根毛細胞分化は、R3型MYB転写因子をコードするCPC遺伝子によって決定される。CPCは、TRY、ETC1、ETC2、とCPL3を含むホモログを有する。TRYとETC2を導入したトランスジェニック植物は、CPC、ETC1、CPL3導入植物のような根毛増加を示さなかった。TRYとETC2は特異的なC末端領域を有するので、それぞれのC末端を欠失させたところ、他のホモログと類似の機能を示すことがわかった。これは、いくつかのアミノ酸の置換により再現された。さらに、これらのアミノ酸置換がTRYおよびETC2タンパク質の安定性に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モデル植物であるシロイヌナズナの表皮細胞に着目した細胞分化の研究により、植物細胞の形態形成制御機構の理解に大きく貢献できる。植物に特異的なR3 MYB転写因子の解析により、MYBを中心とした転写因子複合体の制御メカニズムの一端を明らかにできた。根毛形成を制御することで、水分や養分の不足しがちな過酷な環境で生育できる作物育種への応用が期待できる。トライコームは、病害虫から植物体を守る器官であると同時に、種によっては、二次代謝産物を蓄積する器官である。将来的には、植物の産生する有用物質の利用を含む応用展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The Arabidopsis root hair cell fate is decided by an R3-type MYB transcription factor, CPC. CPC has additional homologs, including TRY, ETC1, ETC2, and CPL3. The transgenic plants expressing CPC, ETC1, and CPL3 showed a significant increase in the number of root hairs. In contrast, TRY and ETC2 transgenic plants did not show any obvious induction of additional root hairs. TRY and ETC2 have an extended C-terminal region. Therefore, we deleted the C-termini of TRY and ETC2, respectively, and observed that these deletions resulted in TRY and ETC2 having functions similar to those of CPC, ETC1, and CPL3. We also demonstrated that the substitution of amino acids in the C-terminal of TRY and ETC2 conferred them the ability to induce root hair formation. Furthermore, we confirmed that these mutations enhanced the stability of the TRY and ETC2 proteins.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：シロイヌナズナ 根毛 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は根の形態や生理機能を介して地中環境に適応する。シロイヌナズナの根毛は、根の表皮細胞の一部が突出した器官であり、トライコームは葉の表皮細胞が突出して形成された器官である。植物の細胞分化研究のモデルとして、これら表皮細胞をターゲットとした転写因子研究が進められてきた。R2R3 タイプの MYB 転写因子 WEREWOLF (WER) (Lee and Schiefelbein 1999) と bHLH 型転写因子 GLABRA3 (GL3)/ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) (Bernhardt et al., 2003) が複合体を形成し、下流のホメオドメイン転写因子 GLABRA2 (GL2) (Masucci et al., 1996) の発現を促進することで、根毛形成を抑制する。CAPRICE (CPC) は WER の結合を妨げる形で GL3/EGL3 と複合体を形成し、GL2 の発現を抑制することで根毛細胞形成を促す (Wada et al., Development 2002; Tominaga et al., PLANT CELL 2007)。

申請者の研究グループは、上記の転写因子の中で根毛形成を促進する唯一の因子として CPC 遺伝子を発見した (Wada et al., Science 1997)。根毛の形成を促進し、トライコームの形成を阻害する R3 MYB 転写因子をコードする CAPRICE (CPC) 遺伝子と、似た配列を持つ 5 つの CPC ファミリー遺伝子の機能に着目し、解析を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、根毛形成を制御する MYB 転写因子 CPC ファミリーの機能を解析し、根毛機能強化を目指した基礎研究を展開する。CPC ファミリーには、タンパク質分解が早いものとそうでないものがあるので、タンパク質分解に重要なアミノ酸モチーフの特定により分解機構を解明し、CPC の機能強化へと繋げる。また、リン酸欠乏応答による根毛増加への CPC ファミリー遺伝子の関与を検証し、根毛発生制御モデルを構築する。さらに、シロイヌナズナとトマトの根毛形成制御の共通点と相違点を明らかにし、分子進化的な考察を図ることを研究の目的とした。

(1) タンパク質分解に寄与するアミノ酸モチーフの探索

- ・ 他の CPC ホモログに比べてタンパク質分解が早い TRY と ETC2 に特徴的な C 末端配列を除去すると、分解が抑えられるかどうか明らかにする。
- ・ TRY と ETC2 に特徴的な C 末端配列を CPC や ETC1 に付加すると、タンパク質分解が促進されるかどうか明らかにする。
- ・ 阻害剤実験等により、TRY、ETC2 のタンパク質分解機構について検討する。

(2) リン酸欠乏応答への CPC ファミリーの関与についての解析

- ・ リン酸欠乏培地で育てたシロイヌナズナにおける CPC ファミリーおよび関連遺伝子群 (WER, GL3, EGL3, GL2 等) の発現を、Real-Time PCR により解析し、リン酸シグナルへの関与を明らかにする。
- ・ リン酸欠乏培地で育てた CPC ファミリー-promoter::GUS 植物を光学顕微鏡で詳細に観察し、リン酸欠乏による組織特異的な影響を明らかにする。
- ・ cpc 突然変異体あるいは過剰発現体 (35S::CPC) のリン酸欠乏応答を解析し、CPC による根毛形成機構がリン酸シグナルの下流に位置するかどうかさらに確認する。

(3) トマトの CPC オーソログの探索と機能解析

- ・ トマトの CPC オーソログ SITRY 過剰発現トマト形質転換体を作成し、SITRY のトマト自身の機能を明らかにする。
- ・ SITRY 以外のトマトの CPC オーソログを引き続き探索し、機能を解析する。

3. 研究の方法

本研究では CPC ファミリー転写因子の根毛形成機能に関わるタンパク質分解とリン酸欠乏応答について明らかにすると同時に、栽培植物への応用展開を目指した、トマトオーソログの解析を試みた。

(1) アミノ酸置換の手法により、TRY や ETC2 に特異的な C 末端配列を除去、あるいは付加し、この配列がタンパク質の安定性や分解速度に影響するかどうか調べた。

アミノ酸配列の比較により、タンパク質分解が早い TRY と ETC2 は、他のホモログ (CPC, ETC1, CPL3) に比べて長い C 末端配列を持つことがわかった。この長い C 末端配列がタンパク質分解に関与しているかどうかを検証するために、TRY 及び ETC2 の C 末端配列を取り除いた DNA コンストラクト、あるいは CPC や ETC1 にこの C 末端配列を付加した DNA コンストラクトを作製した。すでに CPC::TRY C::GFP, CPC::ETC2 C::GFP, CPC::CPC::CTRY::GFP, CPC::ETC1::CTRY::GFP の DNA コンストラクトを作製、シロイヌナズナに形質転換済みであったため、各 10 ラインのホモライン確立を目指し、根毛形成への影響及び GFP 融合タンパク質の安定性を解析した。

CPC ホモログのタンパク質分解は、ユビキチン化を経由したプロテアソーム分解によるものなのか、エンドサイトーシスやリソゾームでの分解によるものかを明らかにするために、様々な阻害剤を用いた実験を行った。プロテアソーム阻害剤処理した上記の植物体からタンパク質を抽出し、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより分解抑制の効果を検討した。

(2) リン酸欠乏による根毛増加に CPC ファミリーが関与しているかどうか検証した。

リン酸欠乏培地で育て、根毛数が増加したシロイヌナズナにおける、CPC ファミリー (CPC, TRY, ETC1, ETC2, CPL3) および根毛形成制御関連遺伝子群 (WER, GL3, EGL3, GL2 等) の発現を、Real-Time PCR により解析した。

(3) トマト新規 CPC オーソログの探索と機能解析を行う。

申請者らはこれまでにトマトの CPC オーソログ SITRY を単離し、シロイヌナズナ中では CPC と同様の機能を示す事を明らかにしている (Tominaga PLoS ONE 2013; Pant Signal. Behav. 2013)。シロイヌナズナのゲノム上には現在 7 つの CPC ホモログの存在が報告されている (Tominaga IRCMB 2011) が、トマトには上記で単離した SITRY のみしか見つかっていない。そこでトマトの CPC オーソログをさらに探索し、SITRY と同様にシロイヌナズナに導入することで根毛形成に関与する同様の機能があるかどうかを明らかにすることを目指した。

申請者らが CPC を過剰発現したトマト形質転換体を作出したところ、シロイヌナズナに見られたような根毛数の増加は観察されなかった (Tominaga PLoS ONE 2014; Pant Signal. Behav. 2015)。シロイヌナズナの遺伝子は、トマトの根毛形成に関しては機能しない可能性がある。そこで、SITRY および上記で単離したトマト新規遺伝子をトマト自身に形質転換し、実際にトマトではどのような機能を持つかの解明を目指した。

4. 研究成果

(1) GFP を付加した CPC, TRY, ETC1, ETC2, CPL3 遺伝子をシロイヌナズナに導入したトランスジェニック植物を作出した。

TRY と ETC2 をシロイヌナズナに導入したトランスジェニック植物は、CPC, ETC1, CPL3 導入植物のように根毛が増加しないことがわかった。TRY と ETC2 は特異的な C 末端領域を有するので、それぞれの C 末端を欠失させたところ、他のホモログと類似の根毛形成促進機能を示すようになることがわかった。この根毛形成促進機能の回復は、いくつかのアミノ酸の置換によって再現されることが明らかになった。これらのアミノ酸置換が、TRY および ETC2 タンパク質の安定性に関与することを明らかにした。

CPC ホモログのタンパク質分解は、ユビキチン化を経由したプロテアソーム分解によるものなのか、エンドサイトーシスやリソゾームでの分解によるものかを明らかにするために、様々な阻害剤を用いた実験を行った。ER からゴルジ体への輸送阻害剤である BFA やプロテアーゼ阻害剤である E-64d による阻害効果は見られず、ユビキチン・プロテアソーム系による分解の可能性が高いことが示唆された。しかし、GFP 融合タンパク質を持つ形質転換体の蛍光局在観察では、プロテアソーム阻害剤 (MG132, MG115 等) 処理によるはっきりした実験結果は得られなかった。そこで、長時間プロテアソーム阻害剤処理した上記の植物体からタンパク質を抽出し、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより分解抑制の効果を確認した。その結果、CPC ファミリータンパク質には、ユビキチン・プロテアソーム系による分解を受けているものがあることが明らかになった。また、分解機構に関与する、TRY 及び ETC2 タンパク質の C 末端アミノ酸のリン酸化の機構についても解析を進めている。TRY 及び ETC2 タンパク質の C 末端配列から、リン酸化される可能性の高い候補アミノ酸 (セリンまたはスレオニン) を特定し、そのアミノ酸をアラニン置換した。アミノ酸置換した TRY または ETC2 のタンパク質分解が抑えられたことから、リン酸化機構の関与が強く示唆された。今後は、さらに TRY 及び ETC2 タンパク質のリン酸化機構との関わり合いを明らかにしたい。

(2) リン酸欠乏培地で育て、根毛数が増加したシロイヌナズナにおける、CPC ファミリー (CPC, TRY, ETC1, ETC2, CPL3) および根毛形成制御関連遺伝子群 (WER, GL3, EGL3, GL2 等) の発現の、Real-Time PCR による解析を試みた。

その結果、リン酸欠乏による根毛増加に、CPC ファミリーのうち ETC1 が関与していることを確認した。さらに、ETC1 だけでなく、CPL3 もリン酸欠乏による根毛増加に関与していることを、本研究により明らかにした。CPC はリン酸欠乏条件でも発現量に変化は無く、リン酸欠乏反応における、CPC ファミリー遺伝子の役割分担があることが示唆された。今後は CPC ファミリー promoter::GUS 発現 (CPC::GUS, TRY::GUS, ETC1::GUS, ETC2::GUS, CPL3::GUS 形質転換体は既に作出) を詳細に観察し、組織特異的な影響についても解析することで、リン酸欠乏と根毛形成との関係を明らかにしたいと考える。

(3) トマトの CPC オーソログ SITRY が、シロイヌナズナにおいて CPC と同様の根毛形成促進機能を示すことを明らかにした。

トマトの CPC オーソログである SITRY をシロイヌナズナに導入すると、CPC を導入した場合と同様に、根毛形成が促進されることを明らかにした。また、トマトの GL3 オーソログ SIGL3 は、リン酸欠乏条件下において、発現が抑えられることを明らかにした。今後は、これまでにシロイヌナズナで解析が進んできた表皮細胞分化関連遺伝子群が、トマトにおいてどのような働きをしているのかを明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14件)

Koh Yamada, Michiko Sasabe, Yukichi Fujikawa, Takuji Wada and Rumi Tominaga-Wada. Amino acid substitutions in CPC-LIKE MYB reveal residues important for protein stability in Arabidopsis roots. PLoS ONE, 13, e0205522, 2018. 査読有

T. Tetsumura*, Y. Osako, S. Ishimura, C. Honsho, S. Sawa, T. Wada, and R. Tominaga-Wada,. Effect of CLE peptides on growth of in vitro roots and shoots of persimmon. Acta Hort., 1195: 93-97, 2018. 査読有

R. Tominaga-Wada*, A. Masakane, and T. Wada. Effect of phosphate deficiency-induced anthocyanin accumulation on the expression of Solanum lycopersicum GLABRA3 (SIGL3) in tomato. Plant Signal. Behav., 13, NO. 6, e1477907, 2018. 査読有

R. Tominaga-Wada*, and T. Wada. CPC-ETC1 chimeric protein localization data in Arabidopsis root epidermis. Data in Brief, 18: 1773-1776, 2018. 査読有

N. Hayashi, T. Tetsumura, T. Sawa, T. Wada and R. Tominaga-Wada*. CLE14 peptide signaling in Arabidopsis root hair cell fate determination. Plant Biotechnol., 35: 17-22, 2018. 査読有

R. Tominaga-Wada*, and T. Wada. Effect of amino acid substitution of CAPRICE on cell-to-cell movement ability in Arabidopsis root epidermis. Dev. Biol., 435: 1-5, 2018. 査読有

R. Tominaga-Wada*, and T. Wada. Deletion of C-terminus of ETC2 confers partial protein stability in Arabidopsis root epidermal cells. Acad. J. Agr. Res., 5: 306-311, 2017. 査読有

R. Tominaga-Wada*, T. Kurata, and T. Wada. Localization of the CAPRICE-ENHANCER OF TRY AND CPC1 chimera protein in Arabidopsis root epidermis. Biosci. Biotechnol. Biochem., 81: 1762-1767, 2017. 査読有

R. Tominaga-Wada*, and T. Wada. Extended C-termini of CPC-LIKE MYB proteins confer functional diversity in Arabidopsis epidermal cell differentiation. Development, 144: 2375-2380, 2017. 査読有

R. Tominaga-Wada*, K. Ota, N. Hayashi, K. Yamada, R. Sano, and T. Wada. Expression and protein localization analyses of Arabidopsis GLABRA3 (GL3) in tomato (Solanum lycopersicum) root epidermis. Plant Biotechnol., 34: 1-3, 2017. 査読有

R. Tominaga-Wada*, T. Kurata, and T. Wada. Localization of ENHANCER OF TRY AND CPC1 protein in Arabidopsis root epidermis. J. Plant Physiol., 214: 48-52, 2017. 査読有

S. Cui, T. Suzuki, R. Tominaga-Wada, and S. Yoshida*. Regulation and functional diversification of root hairs. Semin. Cell. Dev. Biol., <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.10.003>, 2017. 査読有

R. Tominaga-Wada*, and T. Wada. Analysis of TTG1 and CPC-like MYB genes during Arabidopsis epidermal cell differentiation. Plant Biotechnol., 33: 201-206, 2016. 査読有

R. Tominaga-Wada*, and T. Wada. The ectopic localization of CAPRICE LIKE MYB3 protein in Arabidopsis root epidermis. J. Plant Physiol., 199: 111-115, 2016. 査読有