

令和 2 年 4 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21626

研究課題名（和文）乾燥・高温誘導性転写因子DREB2Aの時空間特異的な機能とその制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of spatio-temporal functions and regulatory mechanisms of DREB2A, a drought- and heat-inducible transcription factor in Arabidopsis thaliana

研究代表者

佐藤 輝 (SATO, Hikaru)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：90756058

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：シロイヌナズナのDREB2Aという転写因子は、周囲の環境に応じて乾燥と高温の両方のストレスに対する植物のストレス応答を制御していることが知られているが、どのようにストレスの種類に応じた制御を行うかは分かっていなかった。今回、我々は乾燥と高温のストレス時にそれぞれ特別な因子がDREB2Aに作用して、それぞれのストレスに応じたDREB2Aの機能を発揮させていることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シロイヌナズナにおいてDREB2Aという因子は乾燥と高温ストレスの両方の応答を制御している。この因子に着目することで、乾燥と高温ストレスの2つの環境ストレスが細胞内でどのように別々に認識され、その応答が制御されているかという新たな知見を得られた。また、地球温暖化で引き起こされる干ばつや高温などの異常気象に対しても高い耐性を持つ作物の育種に役立つ情報を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：A transcription factor DREB2A that is induced by drought and heat stress specifically regulates its target genes according to environmental conditions, however it remains unclear how the transcription factor specifically functions under drought and heat stress conditions. In the present study, we have identified two novel proteins that regulate DREB2A-target genes specifically under drought and heat stress conditions. They are specifically induced by drought or heat stress, respectively. They are suggested to form drought or heat stress-specific transcriptional complexes with DREB2A and activate DREB2A-target genes specifically under drought or heat stress conditions.

研究分野：植物の環境ストレス応答に関わる転写制御ネットワークと転写複合体解析

キーワード：植物 シロイヌナズナ 環境ストレス 乾燥 高温 転写因子 転写複合体 トランスクリプトーム解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

(1) シロイヌナズナの転写因子 DREB2A は乾燥と高温ストレスに誘導され、多くの標的遺伝子を制御する重要な転写因子である。DREB2A は乾燥と高温ストレス条件下において、それぞれ特異的な標的遺伝子の発現を誘導する。しかし、どのようにして単一の転写因子が外部環境に応じて、それぞれ別の標的遺伝子群を制御することができるのか、その詳細な分子機構は明らかにされていない。

(2) DREB2A は乾燥と高温のストレス条件だけではなく、組織、細胞種特異的な機能を持つ可能性が示唆されていた。しかし、乾燥や高温ストレス条件下において、組織や細胞種特異的に遺伝子発現解析を行うための実験系が確立されていない。

2. 研究の目的

(1) 転写制御因子 NF-YA2、NF-YB3、NF-YC10 の3つのタンパク質が三量体を形成して、高温ストレス特異的な DREB2A のコアクティベーターであることが示唆されていたことから、これらの中、高温ストレス誘導性を持ち、機能解析がなされていない NF-YB3 について解析を行うこと。さらに乾燥ストレス特異的な DREB2A のコアクティベーターを単離し、その機能解析を行うこと。

(2) 組織、細胞種特異的な遺伝子発現解析方法として知られている INTACT (isolation of nuclei tagged in specific cell types) 法や TRAP (translating ribosome affinity immunopurification) 法を行うために、地上部および地下部において、表皮、維管束、葉肉細胞など細胞種特異的な発現パターンを示し、さらに乾燥および高温ストレスへの応答性が低く、発現量の高いプロモーターを単離して、実験系を確立すること。

3. 研究の方法

(1) NF-YB ファミリー遺伝子について乾燥および高温ストレス時の発現を地上部および地下部で調べて、乾燥ストレス特異的な DREB2A の制御因子の候補を単離する。また、上記で単離された候補の NF-YB および NF-YB3 の過剰発現体およびノックアウト変異体を単離して、DREB2A 標的遺伝子の発現の変化や、ストレス耐性の変化を調べる。また、タグ付きの NF-YB タンパク質を発現した植物を作出し、DREB2A 標的遺伝子プロモーターへのストレス時の結合性を調べる。

(2) 様々なプロモーターを GUS および GFP レポーターに繋いで植物中で発現し、目的の組

織、細胞種特異的な発現パターンを示すプロモーターを単離する。プロモーターの候補として、既知のマーカー遺伝子のプロモーターや、それ以外に過去の論文で細胞種特異的な発現パターンを持つことが報告されたプロモーターが考えられる。また、公共のデータベースを探索し、さらに候補となるプロモーターを単離する。

4. 研究成果

(1) まず NF-YB ファミリー遺伝子の乾燥および高温ストレス環境下における遺伝子発現解析を行った。その結果、地上部において NF-YB3 が高温ストレスで誘導され、乾燥ストレスで抑制される一方で、NF-YB3 に最も相同性の高い NF-YB2 が乾燥ストレスで発現誘導され、高温ストレスで抑制されることが明らかになった。このことから、NF-YB2 が乾燥ストレス条件下に特異的な DREB2A のコアクティベーターである可能性が示唆された。一方で、地下部では NF-YB3 の高温ストレス条件下における発現誘導性が見られなかったことから、NF-YB3 の高温ストレス条件下における役割が地上部と地下部で異なる可能性が示唆された。

(2) 候補として単離された NF-YB2 および NF-YB3 を過剰発現するシロイヌナズナを作出し、機能解析を行った。まず、乾燥および高温ストレス環境下における DREB2A 標的遺伝子の発現を調べた所、NF-YB2 過剰発現体では乾燥ストレス誘導性遺伝子の発現が乾燥ストレス条件下で向上している一方で、高温ストレス誘導性遺伝子の発現は高温ストレス条件下で変化がなかった。NF-YB3 過剰発現体では高温ストレス誘導性の遺伝子の発現が高温ストレス条件下で向上している一方で、乾燥ストレス誘導性遺伝子の発現は乾燥ストレス時に変化が見られなかった。また、同様に、NF-YB2 過剰発現体は乾燥ストレス耐性が上昇している一方で、高温ストレス耐性には変化がなく、NF-YB3 過剰発現体では高温ストレス耐性が上昇している一方で乾燥ストレス耐性には変化がなかった。これらの結果から、NF-YB2 は乾燥ストレスに特異的な、NF-YB3 は高温ストレスに特異的な DREB2A のコアクティベーターであることが示唆された。

(3) RNA-seq 法により、NF-YB2 および NF-YB3 過剰発現体におけるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、NF-YB2 過剰発現体では、NF-YB3 過剰発現体よりも多くの乾燥ストレス誘導性遺伝子の発現が上昇しており、一方で NF-YB3 過剰発現体では、NF-YB2 過剰発現体よりも多くの高温ストレス誘導性の遺伝子の発現が上昇していることが確認された。このことから、NF-YB2 および NF-YB3 は、それぞれ乾燥および高温ストレス条件下

における植物のトランスクリプトームの変化に影響を与える因子であることが示唆された。

(4) *NF-YB2*, *NF-YB3* についてそれぞれのノックアウト変異体に、それぞれのプロモーターで GFP 融合タンパク質を相補的に発現する植物を作出した (*NF-YB2pro: GFP-NF-YB2/nf-yb2* および *NF-YB3pro: GFP-NF-YB3/nf-yb3*)。これらの植物を用いて、*NF-YB2* および *NF-YB3* が乾燥および高温ストレス条件下において DREB2A 標的遺伝子プロモーターに結合するかを ChIP (chromatin immunoprecipitation) assay によって調べた。その結果、*NF-YB2* タンパク質は、乾燥ストレス条件下において乾燥ストレス誘導性を持つ DREB2A 標的遺伝子プロモーターへの結合量が上昇し、*NF-YB3* タンパク質は、高温ストレス条件下において高温ストレス誘導性を持つ DREB2A 標的遺伝子プロモーターへの結合量が上昇することが明らかになった。このことから、予想されたように *NF-YB2*, *NF-YB3* はそれぞれ乾燥および高温ストレス条件下において DREB2A と協調して標的遺伝子の発現を制御することが示唆された。興味深いことに、高温ストレス条件下では、乾燥ストレス誘導性プロモーターに対する *NF-YB2* の結合量が低下する一方で、乾燥ストレス条件下では、乾燥および高温ストレス誘導性遺伝子プロモーター双方に対する *NF-YB3* の結合が著しく低下することが明らかになった。このことから *NF-YB3* が乾燥ストレス条件下における乾燥ストレス誘導性遺伝子に対して影響を持つ可能性が示唆された。

(5) また *NF-YB2*, *NF-YB3* のノックアウト変異体 (それぞれ *nf-yb2*, *nf-yb3*) およびそれらの二重変異体 (*nf-yb2 nf-yb3*) を単離し機能解析を行った。乾燥および高温ストレス条件下における DREB2A 標的遺伝子の発現変化を調べた所、過剰発現体の場合とは反対に、*nf-yb2* 変異体では乾燥ストレス条件下において乾燥ストレス誘導性遺伝子の発現が低下している一方で、*nf-yb3* 変異体では高温ストレス条件下において高温ストレス誘導性遺伝子の発現が低下していた。そして興味深いことに、*nf-yb2* 変異体では高温ストレス条件下において高温ストレス誘導性遺伝子の発現に変化は見られなかったが、*nf-yb3* 変異体では乾燥ストレス条件下における乾燥ストレス誘導性遺伝子の発現が、野生型植物を比較してさらに向上していることが明らかとなった。このことは、*NF-YB3* が乾燥ストレス条件下において、乾燥ストレス誘導性の DREB2A 標的遺伝子の発現に抑制的に寄与していることを示唆しており、また ChIP assay によって示されたように、乾燥ストレス条件下において、乾燥ストレス誘導性遺伝子のプロモーターに対する *NF-Y3* の結合が低下するという結果とも整合している。また、*nf-yb2*

nf-yb3 二重変異体では、遺伝子発現の傾向は *nf-yb3* 変異体と同様で、高温ストレス条件下において高温ストレス誘導性遺伝子の発現が低下している一方で、乾燥ストレス条件下においては乾燥ストレス誘導性遺伝子の発現は向上していた。このことは *NF-YB2* の変異よりも、*NF-YB3* の変異の方が乾燥ストレス応答に対する影響が大きいことを示唆している。また、乾燥および高温ストレス耐性試験を行った所、遺伝子発現の変化と整合して、*nf-yb2* 変異体では乾燥ストレス耐性が低下しており、*nf-yb3* 変異体および *nf-yb2 nf-yb3* 二重変異体では高温ストレス耐性が低下していた。これらの結果から、*NF-YB2*, *NF-YB3* はそれぞれ乾燥および高温ストレス特異的な DREB2A のコアクティベーターである、ということに加え、さらに *NF-YB3* は乾燥ストレス条件下における乾燥ストレス誘導性 DREB2A 標的遺伝子の抑制因子であるということが示唆された。

(6) プロモーターの探索では、マーカーとされているいくつかのプロモーターにおいてストレス条件下での発現の変動が見られることが明らかとなった。そのため、それらの細胞種特異的なプロモーターと同様の発現パターンを示すプロモーターについて、公共のデータベース (GENEVESTIGATOR: <https://genevestigator.com/gv/>) や、細胞種特異的な発現パターンを示すプロモーターを報告している過去の論文から探索した。その結果、細胞種特異的な発現パターンを示し、ストレスに対する応答性の低いプロモーターを複数単離することに成功した。

< 引用文献 >

Hikaru Sato, Junya Mizoi, Hidenori Tanaka, Kyonoshin Maruyama, Feng Qin, Yuriko Osakabe, Kyoko Morimoto, Teppei Ohori, Kazuya Kusakabe, Maika Nagata, Kazuo Shinozaki, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. Arabidopsis DPB3-1, a DREB2A interactor, specifically enhances heat stress-induced gene expression by forming a heat stress-specific transcriptional complex with NF-Y subunits. *Plant Cell*, 26, 4954-4973, 2014. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132928>.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Hikaru Sato, Takamasa Suzuki, Fuminori Takahashi, Shinozaki Kazuo and Yamaguchi-Shinozaki Kazuko. *NF-YB2 and NF-YB3 Have Functionally Diverged and Differentially Induce Drought and Heat Stress-Specific Genes*. *Plant Physiology*.

査読有り、180(3), 2019, 1677-1690,
<https://doi.org/10.1104/pp.19.00391>.

Kyoko Morimoto, Naohiko Ohama, Satoshi Kidokoro, Junya Mizoi, Fuminori Takahashi, Daisuke Todaka, Junro Mogami, Hikaru Sato, Feng Qin, June-Sik Kim, Yoichiro Fukao, Masayuki Fujiwara, Kazuo Shinozaki and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 査読有り、114 (40), 2017, E8528-E8536, <https://doi.org/10.1073/pnas.1704189114>.

Naohiko Ohama*, Hikaru Sato*(*: equal contribution), Kazuo Shinozaki, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response. Trends in Plant Science. 総説 (査読有り)、22, 2017, 53-65 pp, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.015>.

〔学会発表〕(計2件)

Hikaru Sato, Takamasa Suzuki, Kazuo Shinozaki, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. NF-YB2 and NF-YB3 have specific functions in response to drought and heat stress in cooperation with DREB2A in *Arabidopsis thaliana*. Plant Genome Evolution, 1st to 3rd October, 2017, Sitges, Spain.

Hikaru Sato, Daisuke Todaka, Madoka Kudo, Junya Mizoi, Satoshi Kidokoro, Yu Zhao, Kazuo Shinozaki and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. Enhancement of heat stress tolerance in rice by overexpressing *Arabidopsis* transcriptional regulator *DPB3-1/NF-YC10*. 27th International Conference on Arabidopsis Research, 29th June to 3rd July, 2016, Gyeongju, Korea.

〔図書〕(計1件)

Fuminori Takahashi, Takashi Kuromori, Hikaru Sato and Kazuo Shinozaki. Springer. Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation (Chapter 12: Regulatory Gene Networks in Drought Stress Responses and Resistance in Plants), 2018 (印刷中)

〔その他〕

ホームページ等
<http://genediscovery.riken.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 輝 (SATO, Hikaru)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学
学研究センター・特別研究員

研究者番号：90756058