

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18570043
 研究課題名（和文） 14-3-3を介した*roIB*遺伝子の発根および多面発現効果機構の
 解明
 研究課題名（英文） Elucidation of mechanisms mediated by 14-3-3 on rooting and
 pleiotropic effects of *roIB* gene
 研究代表者
 田中 伸和（TANAKA NOBUKAZU）
 広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授
 研究者番号：50263744

研究成果の概要：RoIB タンパク質と相互作用する植物因子である 14-3-3 と結合するタバコ植物タンパク質の候補であるキナーゼ NtSPAK および転写因子 RSG が関連する遺伝子群の転写解析を行い、これらのタンパク質の機能がそれぞれ細胞周期およびジベレリン合成の制御と関係することが推定された。また、*roIB* 遺伝子によるタバコ BY-2 細胞のデンプン蓄積メカニズムは 14-3-3 が関与する α -アミラーゼ遺伝子の転写抑制によるものと推定された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,000,000	0	1,000,000
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	750,000	4,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：キナーゼ、転写、ノックダウン、細胞周期、形態異常、形態形成、矮化

1. 研究開始当初の背景

植物に感染すると発根させる植物病原細菌アグロバクテリウム・リゾゲネスが保有する *roIB* 遺伝子は、その明確な発根とは裏腹に、機能は不明である。我々は、RoIB タンパク質は植物タンパク質である 14-3-3 と相互作用することを明らかにしており、さらに 14-3-3 と相互作用する因子の候補として数種の植物タンパク質の cDNA を取得している。これらの遺伝子産物が *roIB* による発根ならびに形質転換植物上に見られる特徴的な形態と関係しているかどうかを検証する必要があった。

一方、茎葉や根などの植物の器官分化の

イッチがどのように入るのは当初はもちろん現在もまだ十分に解明されていない。このスイッチングはオーキシンやサイトカイニンを始めとする植物ホルモンの効果によるものであることは間違いない。これらの植物ホルモンシグナルの下流に存在する因子は、アラビドプシスなどの変異体を用いた研究によって少しずつ解明されていたが、類似効果を持つ遺伝子のリダンダンシーの問題などから解明が容易ではなかった。アグロバクテリウム属細菌の発根遺伝子 *roIB* が導入された細胞は不定根だけでなく、高度の器官分化能が付与されるという報告がある。したがって、*roIB* 導入による逆遺伝学的手法による

って、器官分化メカニズム解明における変異体の解析による正遺伝学で解明が容易でない部分を補完することができると考えられた。

2. 研究の目的

アグロバクテリウム属細菌の発根遺伝子 *rolB* および本遺伝子産物と相互作用する植物 14-3-3 タンパク質の発根ならびに多面発現効果のメカニズムを解明する。すなわち、*rolB* が植物上に発根ならびにトランスジェニック植物の矮化、器官の小型化や奇形などの多面発現効果を現すためには、植物タンパク質 14-3-3 との相互作用が必須である。*rolB* は 14-3-3 の本来の機能あるいは調節機構に直接作用していると考えており、それによって 14-3-3 と相互作用する第三の因子の働きが促進もしくは阻害されているかを推測するために、それらの遺伝子の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は、アグロバクテリウムのオンコジーンによる腫瘍形成においては植物因子との相互作用が重要であり、相互作用因子の本来の機能あるいは調節機構にオンコジーン産物が影響することによって、腫瘍形成あるいは器官分化するという作業仮説に基づいている (図 1)。

研究の具体的な方法としては、*RoIB* タンパク質と相互作用する 14-3-3 と結合する数種の植物 (タバコ) タンパク質遺伝子の発現部位を RT-PCR およびウェスタン解析で確認する。次に、これらの遺伝子を過剰発現もしくはノックダウンする形質転換タバコ植物および BY-2 培養細胞を作製し、形態の観察および器官分化、形態形成および細胞周期に関連する遺伝子の発現の変化を調べる。

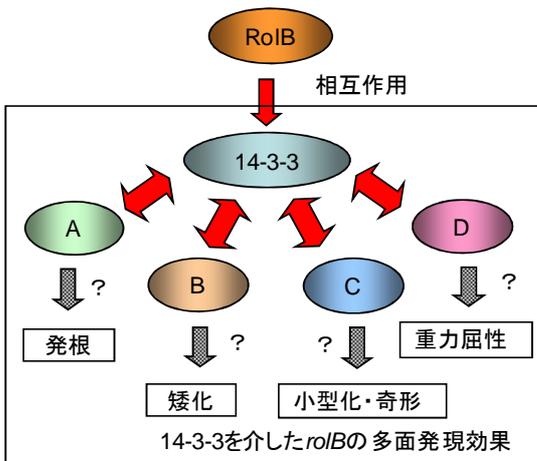


図 1. 14-3-3 を介した *RoIB* の多面発現効果の仮説

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

発根遺伝子 *rolB* が示す発根および多面発現効果は植物 14-3-3 タンパク質を介していると考えられ、さらに当該 14-3-3 がターゲットとする植物 (タバコ) タンパク質の候補として 1 種のキナーゼおよび 4 種の転写因子などの cDNA を取得している。始めに、これらの遺伝子の発現部位を RT-PCR 法で解析した (図 2)。その結果、NIMA キナーゼホモログおよび転写因子 GBF4 が根で発現が高いことが明らかになった。

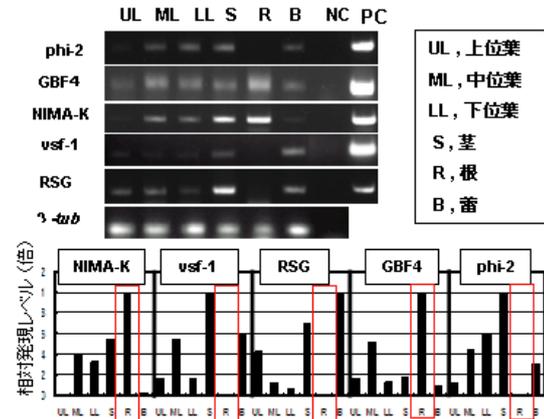


図 2. 14-3-3 ω II と相互作用の可能性がある遺伝子の植物器官別の転写レベル

この結果をもとに、本研究では、特に発根に関与する可能性のある因子として NIMA キナーゼホモログ (SPAK) の機能、すでにジベレリン生合成酵素 (*ent-kauren* 酸化酵素および GA_{20} 酸化酵素) 遺伝子の転写活性化因子として機能が分かっている RSG のホモログ (RGS2) の機能、ならびに 14-3-3 が関与すると考えられるデンプン蓄積のメカニズムという 3 つを対象として重点的に解析することにした。

① NIMA キナーゼホモログ NtSPAK

NIMA キナーゼホモログが発根に関与する可能性があると考え、その機能を明らかにすることをを行った。本キナーゼはトマトの SP タンパク質をリン酸化する SPAK のホモログで、NtSPAK と命名した。NtSPAK は NIMA/Nek キナーゼファミリーに属すると考えられ、細胞増殖、器官分化と密接な関連があると思われる。はじめに、タバコ植物で *NtSPAK* 遺伝子を過剰発現および転写抑制する系統を作製した。35S プロモーターで *NtSPAK* を過剰発現する植物体は取得が大変困難で、5 系統しか取得できなかった。これらのうち、表現型が *rolB* 形質転換植物体に類似する系統があり、矮化、葉の形態と葉脈の配置の異常、花の形態異常と花粉形成異常などが見られた。これらの形態に異常を示す植物体の *NtSPAK* の転写量を RT-PCR で確認したが、コントロール植物のそれよりわずかに上昇している

のみであった。一方、ウェスタン解析による NtSPAK タンパク質の検出は困難であり、発現量が非常に低いことが示唆された。また、培養細胞 BY-2 の系でも同様な結果が示された。以上のことから、NtSPAK は本来発現量が非常に低く、僅かな発現増加でも形態異常を示すことが推定され、器官の形態形成に重要な役割を果たすことが推測された。

次に、タバコ培養細胞 BY-2 で NtSPAK 遺伝子の過剰発現および RNAi による常時ノックダウンの系統を取得した。コントロール細胞に比べ、NtSPAK の過剰発現およびノックダウン形質転換 BY-2 細胞は双方とも細胞が肥大する傾向にあったが、ノックダウン系統は十分な NtSPAK のノックダウンが見られなかった。そこで、デキサメタゾン投与による誘導的な RNAi で NtSPAK 遺伝子のノックダウンが行える BY-2 形質転換株を作製した。この NtSPAK ノックダウン株は増殖率が低下したので、さらにアフィディコリンによる同調培養によって細胞周期関連遺伝子の転写状況を調べた。その結果、ノックダウン株では細胞周期、特に G2/M 期移行が遅延することが分かり、その原因はサイクリン D2 および D3 遺伝子 (*cycD2*, *D3*) の転写時期が遅延するためであることが分かった (図 3)。*cycD2*, *D3* はサイトカニン投与によって転写促進されることが知られている。そこで、サイトカニンによる *cycD2*, *D3* の転写促進に NtSPAK が介在するかを調べるために、サイトカニン投与による NtSPAK の転写状況を調べた。その結果、NtSPAK の転写はサイトカニン投与によって促進されることが分かった。すなわち、サイトカニンシグナルは NtSPAK を介して *cycD2*, *D3* の転写促進に働いていることが推測された。

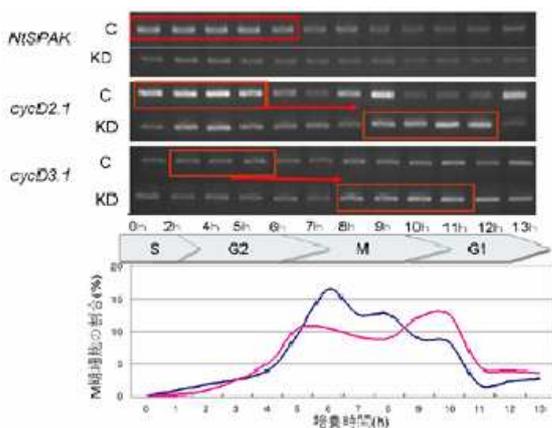


図 3. NtSPAK のノックダウン BY-2 細胞の *cycD2.1* および *cycD3.1* 遺伝子転写の遅延が及ぼす細胞周期の遅延 (C: 対照, KD: ノックダウン). 上: RT-PCR, 下: M 期細胞の割合.

Ro1B と NtSPAK の関係をさらに明らかにするため *rolB* 形質転換 BY-2 細胞における

NtSPAK の転写を調べたところ、促進が見られた。NtSPAK はサイトカニンによって転写促進されるので、Ro1B はサイトカニンシグナル伝達系に関与する可能性が示唆されたが、*rolB* の発根機能から考えると矛盾が生じる。*rolB* 形質転換 BY-2 細胞でのみで見られる現象である可能性もあり、今後は *rolB* 形質転換植物体での検証を行う必要がある。

② 転写因子 RSG ホモログ RSG2

本タンパク質のホモログ RSG は、タバコではジベレリン (GA) 生合成経路の律速酵素である *ent-kaurene* 酸化酵素および GA₂₀ 酸化酵素の遺伝子の転写を活性化することが知られており、14-3-3 タンパク質と相互作用する。一方、*rolB* 形質転換植物は草丈が低くなる形質 (矮化) が見られ、Ro1B タンパク質がジベレリンの感受性もしくは生合成に影響している可能性が考えられた。そこで、はじめに *rolB* 形質転換タバコ植物体のジベレリン感受性の変化の有無を調べたが、非形質転換体と相違なかった。

次に我々が取得した RSG ホモログ (RSG2) も前述の酵素遺伝子の転写に関与するかを定量 RT-PCR 法で調べた。*rolB* 形質転換 BY-2 細胞では、*ent-kaurene* 酸化酵素遺伝子の転写産物量の減少が見出されたので、Ro1B は 14-3-3 を介して RSG2 による *ent-kaurene* 酸化酵素遺伝子の転写に影響していることが示唆された。さらに活性ジベレリン濃度が増加すると転写レベルでフィードバック阻害を受ける GA₃ 酸化酵素遺伝子の転写産物量が増加していることもわかり、内在ジベレリン量が低下していることが示唆された。Ro1B は 14-3-3 を介して RSG2 に作用し、*ent-kaurene* 酸化酵素遺伝子の転写を抑制していることが考えられた。

③ デンプン蓄積

我々は、タバコ培養細胞 BY-2 に *rolB* 遺伝子を導入するとデンプン粒が蓄積することを見出している。オーキシンを添加した通常の培養条件では BY-2 細胞へのデンプン粒蓄積は見られないが、オーキシン無添加もしくはそこにサイトカニンを添加するとデンプン粒が蓄積するという報告はある。これは、通常はデンプン生合成経路の酵素遺伝子の転写はオーキシンによって抑制されているが、オーキシンが除去されることにより転写活性化され、さらにサイトカニンによって促進されることによって起こると説明されている。一方、本研究では定量 RT-PCR 法によって *rolB* 形質転換 BY-2 細胞のデンプン合成酵素遺伝子の転写活性化は生じていないことを明らかにした。しかし、デンプン分解系の酵素として α -アミラーゼ遺伝子の転写が抑制されており、その細胞内での活性も

低下し *rolB* の発現量と逆の相関を示した (図 4、左上、左下および右下のグラフ)。また、デンプン粒の蓄積量は *rolB* の転写量と正の相関を示した (図 4、左上および右上のグラフ)。さらに、14-3-3 と相互作用が低下もしくは結合しないようなアミノ酸置換を持つ変異 *rolB* 遺伝子導入 BY-2 細胞では、デンプン蓄積量が減少しており、*rolB* 形質転換 BY-2 細胞におけるデンプン蓄積は 14-3-3 を介していることが推測された。

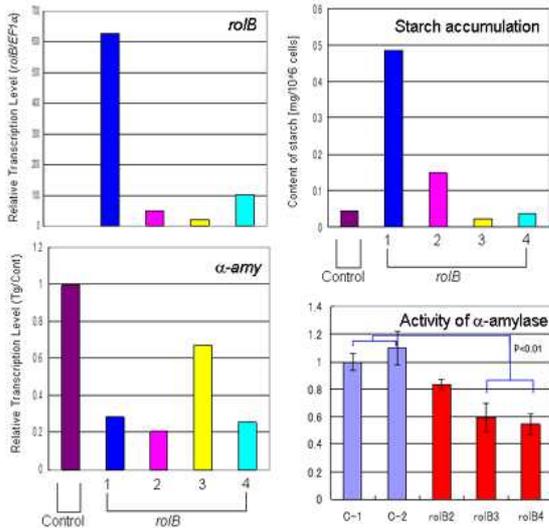


図 4. *rolB* と α -アミラーゼ遺伝子の転写 (左上と左下) およびデンプン蓄積と α -アミラーゼ活性 (右上と右下) の関係

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究は、植物のオンコジーンである *rolB* の機能を相互作用因子である 14-3-3 が結合するタンパク質の機能から推測するものであり、逆遺伝学的手法からのユニークなアプローチである。これまでに本遺伝子の機能についていくつかの推測があったが、いずれもその機能の実態を明らかにしていない。

本研究により、Ro1B タンパク質は 14-3-3 から NtSPAK を介して細胞周期の制御機構に影響し、細胞増殖が遅延することが推測された。また、NtSPAK はサイトカニンシグナル伝達系に位置することが推定され、まだあまりよく理解されていないサイトカニンと細胞周期制御の間の経路を解明する糸口になると考えられる。

一方、すでに RSG がジベレリン生合成経路の *ent-kaurene* 酸化酵素遺伝子および GA₂₀ 酸化酵素遺伝子の転写を活性化することが報告されているので、本研究においては RSG ホモログ RSG2 について、従来の知見を基に Ro1B とジベレリン生合成経路の酵素遺伝子との関連を調べた。その結果、*ent-kaurene* 酸化酵素遺伝子の転写制御との関連が示唆され

たので、Ro1B は 14-3-3 を介して RSG2 に作用し、*ent-kaurene* 酸化酵素遺伝子の転写を抑制することでジベレリン量が低下し、最終的に *rolB* 形質転換植物体特有の矮化が起こると考えられ、Ro1B の機能の一端が推定できる状況となった。これは、アグロバクテリウム由来の植物オンコジーン機能を明らかにする初めての例となると思われる。

rolB 形質転換 BY-2 細胞で見られるデンプン蓄積は、 α -アミラーゼ遺伝子の転写抑制である可能性が示された。一方、植物組織培養でサイトカニンあるいはオーキシンを添加することによって茎葉あるいは根の生長点形成が生じる。この生長点形成直前にその形成位置にデンプン粒が蓄積されることが報告されており、その蓄積は α -アミラーゼ活性の低下によるものと推測されている。*rolB* 形質転換細胞は生長点形成能が向上していることが報告されており、*rolB* 形質転換 BY-2 細胞では生長点形成の初期段階に類似した現象が起こっている可能性が示唆された。*rolB* 形質転換 BY-2 細胞は植物組織培養における器官分化の初期段階の解析が可能な系として有用であると思われる。

(3) 今後の展望

NtSPAK がサイトカニンで転写促進され、Ro1B 形質転換 BY-2 細胞では NtSPAK の転写量が増加していることから、Ro1B がサイトカニンシグナルと関係することが示唆された。一方、Ro1B はその発根作用からオーキニンシグナル伝達との関連があると考えられているので、これらの相反する働きを持つホルモンとの関係がどのようにになっているかを今後 *rolB* 形質転換植物体で検証する。

14-3-3 を介した Ro1B の RSG への影響は *rolB* の機能を最も明快に説明できる系であると考えられる。今後はこれによる RSG への Ro1B の関与を Ro1B-14-3-3-RSG のタンパク質間相互作用によって証明する。

デンプン粒蓄積と Ro1B との関係については、 α -アミラーゼ遺伝子の過剰発現とノックダウンによってデンプン粒蓄積が減少もしくは増加するか確認することを通して証明し、 α -アミラーゼ遺伝子発現を制御する因子の探索を行っていくことで、生長点形成のメカニズムに迫る。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. A. A. Badejo, N. Tanaka, M. Esaka, Analysis of GDP-D-mannose pyrophosphorylase gene promoter from

Acerola (*Malpighia glabra*) and increase in ascorbate content of transgenic tobacco expressing the acerola gene, *Plant Cell Physiol*, 49: 126-132, 2007. (査読あり)

2. R. E. A. Moghaieb, N. Tanaka, H. Saneoka, 他7名, Characterization of salt tolerance in ectoine-transformed tobacco plants (*Nicotiana tabacum*): photosynthesis, osmotic adjustment, and nitrogen partitioning, *Plant Cell, Environment*, 29: 173-182, 2006. (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

1. 田中伸和, 外来異種遺伝子を発現する新機能植物—創出と製造, 日本生物環境工学会 2008 年大会, 2008 年 9 月 10 日, 松山

2. N. Tanaka, Characteristics of cultured tobacco BY-2 cells transformed with the rooting locus B (*ro1B*) gene of *Agrobacterium rhizogenes*. International Symposium on Adventitious Root Formation 2008 年 6 月 19 日, Madrid (Spain).

3. 田中伸和, 腫瘍化遺伝子 *ro1B* 形質転換 BY-2 細胞のデンプン粒蓄積機構, 第 49 回日本植物生理学会年会, 2008 年 3 月 20 日, 札幌

4. 田中伸和, ジベレリン生合成への *ro1B* 遺伝子の影響, 第 30 回日本分子生物学会, 2007 年 12 月 12 日, 横浜

5. 田中伸和, *NtSPAK* 遺伝子の細胞レベルでの機能解析, 第 30 回日本分子生物学会, 2007 年 12 月 12 日, 横浜

6. 田中伸和, *ro1B* 形質転換 BY-2 細胞のデンプン蓄積機構, 第 59 回日本生物工学会大会, 2007 年 9 月 27 日, 広島

7. 田中伸和, *ro1B* による発根に関与する Nt14-3-3 ω II と相互作用する NtSPAK の性状, 日本分子生物学会 2006 フォーラム, 2006 年 12 月 8 日, 名古屋.

[図書] (計 1 件)

1. N. Tanaka, Springer, Horizontal gene transfer. Contribution of *Agrobacterium* to plant evolution. In “*Agrobacterium*, -From Biology to Biotechnology (eds. By Tzfira, T. and Citovsky, V.), 2008, 750 (623-647).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 伸和 (TANAKA NOBUKAZU)
広島大学・自然科学研究支援開発センター・
教授

研究者番号 : 5 0 2 6 3 7 4 4

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者