

機関番号：17601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570048

研究課題名 (和文) シロイヌナズナの表皮細胞分化における CPC LIKE MYB 遺伝子の解析

研究課題名 (英文) Analysis of CPC LIKE MYB genes in epidermal cells differentiation of *Arabidopsis*

研究代表者

富永 るみ (TOMINAGA RUMI)

宮崎大学・IR 推進機構・助教

研究者番号：20373334

研究成果の概要 (和文)：高等植物のモデル植物であるシロイヌナズナの根毛形成を誘導する CPC 遺伝子と、似た配列を持つ4つの遺伝子 (TRY, ETC1, ETC2, CPL3 遺伝子) の機能解析を行った。細胞間移行できる CPC や、タンパク質分解の早い TRY や ETC2 と他の遺伝子の配列をそれぞれ比較することにより、細胞間移行に関わるアミノ酸配列や、タンパク質分解を制御する可能性のあるアミノ酸配列を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：To understand the mechanism of root hair differentiation, I analyzed CPC and four CPC-homologous genes (TRY, ETC1, ETC2, and CPL3). The amino acids that contribute to CPC cell-to-cell movement and the amino acid motif that controls the degradation of proteins were clarified by analyzing the transgenic plants which have the chimera genes among CPC and CPC-homologous genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：植物分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物生理学

キーワード：植物、遺伝子、タンパク質、発現制御、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

細胞分化は、植物の形態形成において重要なステップであり、細胞分化の過程には数多くの転写因子が関与している。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の表皮細胞分化を制御する転写因子については、根毛やトライコーム等をターゲットにした研究がいくつかの研究グループにより進められてきた。根毛は根の表皮細胞が外側に向かって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た器官である。

Michigan 大学の John Schiefelbein 教授ら

が WER 遺伝子を中心とした根毛の研究を、Minnesota 大学の David Marks 博士らが GL1 (GLABRA1) 遺伝子を中心としたトライコームの研究を、Köln 大学の Hulskamp 教授らが TRY (TRIPTYCHON) 遺伝子を中心としたトライコームの分化の研究をおこなってきた。根毛の分化を正に制御する唯一の因子として、和田らが CPC を発見し、その特異な細胞間移行機構についても明らかにした (Wada et al., Science 1997; Wada et al., Development 2002)。CPC は R3 タイプの Myb 遺伝子であり、シロイヌナズナのゲノム上に4つのホモロ

グが存在している (TRY, ETC1, ETC2, At4g01060)。これらのCPCホモログの突然変異体にはcpc突然変異体のような根毛の減少する顕著な表現型はみられないが、根毛形成においてCPCとリダンダントな機能を持つことが明らかにされている (Schellmann et al., *Embo J* 2002; Kirik et al., *Dev Biol* 2004; Kirik et al., *Plant Mol Biol* 2004; Esch et al., *Plant J* 2004; Tominaga et al., unpublished data)。研究代表者は、R3タイプの小さなMybであるCPC Like Mybファミリーが、R2R3タイプのMybであるWERから進化の過程でできたことを明らかにした (Tominaga et al., *Plant cell* 2007)。またCPC Like MybファミリーのメンバーのうちAt4g01060 (CPL3 遺伝子と命名) が、他のホモログと異なり、植物体の大きさや開花時期の制御にも強く関与していることを示唆するデータを得た (Tominaga et al., *Development* 2008)。研究代表者は、以上のような研究開始当初の背景の下、CPC Like Mybファミリーによる表皮細胞分化の制御機構の解明を目指して研究を行った。

2. 研究の目的

(1), CPC特異的な細胞間移行の機能について、移行しない他のホモログとの比較により詳細な解析を行う。

①、CPCの細胞間移行の研究で明らかになった細胞間移行に必要なN末端の9アミノ酸から成る細胞間移行モチーフをCPC Like Mybに付加し、移行能が獲得されるかどうかを検証する。

②、アミノ酸置換により、細胞間移行に必須な残基を詳細に調べ、確定する。

(2), TRYとETC2の分解について明らかにする。

①、どのような機構による分解であるかを明らかにする。

②、TRYとETC2にとって、分解されやすいことがどのような意味を持つのか明らかにする。

3. 研究の方法

(1), 細胞間移行モチーフの解析

①、倉田らにより決定されたCPCの細胞間移行モチーフ (Kurata et al., *Development* 2005) をTRY, ETC1, ETC2, CPL3のN末端に付加したコンストラクトを作成し、シロイヌナズナに形質転換する。T3植物にて、それぞれのホモのラインを確立する。これらの形質転換体の表現型についても詳細に観察する。
②、CPCの細胞間移行モチーフである9アミノ酸を1つずつ置換しETC1に付加した形質転換体シリーズを作出する。

(2), TRY, ETC2の分解機構の解析

①、TRY, ETC2タンパク質の根での早い分解が、ユビキチン化を経由したプロテアソームによる分解なのか、エンドサイトーシスやリゾソームでの分化によるものかを明らかにするために様々な阻害剤による実験を行う。ERからゴルジへの輸送阻害剤であるBFA (Kong et al., *Plant J* 2006; Takano et al., *PNAS* 2005)、プロテアーゼ阻害剤であるE-64d (Inoue et al., *Plant Cell Physiol* 2006) プロテアソーム阻害剤であるMG132, MG115等を加えた培地でCPC::TRY::GFPまたはCPC::ETC2::GFP形質転換体を育て、融合タンパク質の分解が抑えられるかどうかを調べる。

②、TRY及びETC2の長いC末端配列がタンパク質分解シグナルであるPEST配列と関係するかどうか等検討する。

③、TRY及びETC2の長いC末端アミノ酸をCPCやETC1のC末端に付加した形質転換体の観察により、これらの配列の分解への関与を明らかにする。

4. 研究成果

(1), CPCの細胞間移行機構の解析

倉田らによるCPCの細胞間移行モチーフ9アミノ酸 (Kurata et al., *Development* 2005) をETC1のN末端に付加したコンストラクトを作成し、シロイヌナズナに形質転換した。この、CPC::S1::ETC1::GFP形質転換体のGFP蛍光を観察したところ、細胞間移行機能は付加されていないことが明らかになった (図1)。

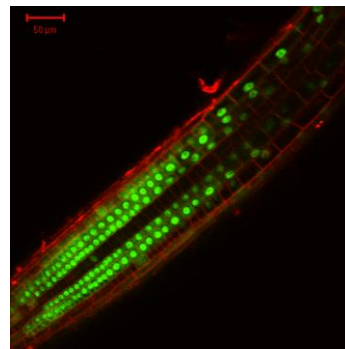


図1

この結果から、CPCの細胞間移行に必要なとされる9アミノ酸だけでは、ETC1の移行には不十分であることが示唆された。

(2), TRY, ETC2の分解機構の解析

①、TRY, ETC2タンパク質の根での早い分解が、ユビキチン化を経由したプロテアソームによる分解なのか、エンドサイトーシスやリゾソームでの分化によるものかを明らかにするために様々な阻害剤による実験を行った。

TRY, ETC2タンパク質の根での分解について、ERからゴルジへの輸送阻害剤であるBFA、プロテアーゼ阻害剤であるE-64dプロテアソ

ーム阻害剤である MG132, MG115 等を加えた培地で CPC::TRY:GFP または CPC::ETC2:GFP 形質転換体を育て、融合タンパク質の分解が抑えられるかどうかを調べた。その結果、どの阻害剤によっても分解の抑制は観察されなかった。これらのことから、TRY, ETC2 の分解はプロテアーゼやプロテアソームには依存しないものである可能性が考えられた。

②、TRY 及び ETC2 の長い C 末端アミノ酸を CPC や ETC1 の C 末端に付加した形質転換体の観察により、これらの配列の分解への関与について解析した。

CPC プロモーターの下流に、ETC1 遺伝子と TRY 遺伝子の C 末端部位 (約 20 アミノ酸に相当) を並列に繋いだコンストラクトを作成し、シロイヌナズナの *cpc-2* 突然変異体に形質転換した。カナマイシン耐性により選抜した形質転換体 T3 世代のうち、ホモラインについて根の表現型を観察した。その結果、根毛数が野生型 (*col*) に比べてかなり増加していることを明らかにした (図 2)。

また、CPC プロモーターの下流に、TRY 遺伝子の C 末端部位 (約 20 アミノ酸に相当) を取り除いた配列を繋いだコンストラクトをシロイヌナズナの *cpc-2* 突然変異体に形質転換し、カナマイシン耐性により選抜した。形質転換体 T3 世代のうち、ホモラインについて根の表現型を観察した。その結果、C 末端部位を除いた TRY タンパク質にも、強い根毛形成促進作用があることを明らかにした

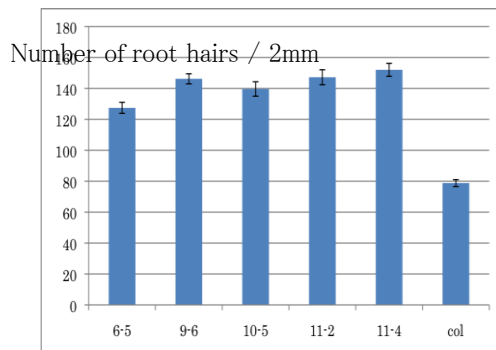


図2 CPC::ETC1:C in *cpc-2*

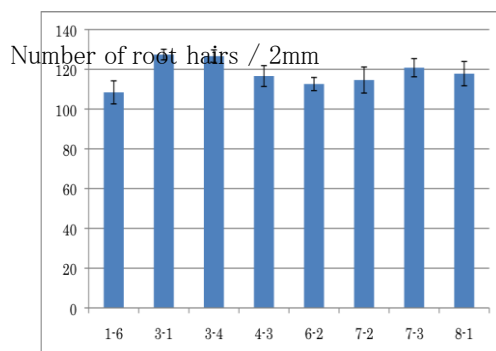


図3 CPC::TRY-C in *cpc-2*

(図 3)。

以上のように、TRY の C 末端配列に、期待したような根毛形成阻害作用見られなかったが、TRY の機能やタンパク質の寿命に影響していることを示唆するデータを得た。今後はさらに、改変した ETC1 タンパク質の安定性を他の CPC-like MYB 形質転換体表現型との比較や GFP の蛍光局在の観察により検討する必要があると考える。CPC::TRY-C in *cpc-2* についても、根毛形成促進機能を持つ事が今回の表現型の観察により確認できたが、詳細な改変 TRY タンパク質の機能について、さらに GFP の局在を調べる等の解析が必要であると考える。

将来的にはこれらの結果を、根毛数の増加や形態変化により作物の収量増加に役立てたい。

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 7 件)

① R. Tominaga-Wada, T. Ishida, T. Wada, New Insights into the Mechanism of Development of Arabidopsis Root Hairs and Trichomes, International Review of Cell and Molecular Biology, 査読有, 286, 2011, 67-106,

② M. Yuguchi, T. Yokouchi, R. Tominaga-Wada, T. Kuromori, K. Shinozaki, K. Okada, T. Wada, Phenome analysis of root development in Arabidopsis, Plant Biotechnology, 査読有, 27, 2010, 345-347,

③ Rumi Tominaga-Wada, Mineko Iwata, Junji Sugiyama, Toshihisa Kotake, Tetsuya Ishida, Ryusuke Yokoyama, Kazuhiko Nishitani, Kiyotaka Okada and Takuji Wada, The GLABRA2 homeodomain protein directly regulates CESA5 and XTH17 gene expression in Arabidopsis roots, The Plant Journal, 査読有, 60, 2009, 564-574,

④ Christian Breuer, Ayako Kawamura, Takanari Ichikawa, Rumi Tominaga-Wada, Takuji Wada, Youichi Kondou, Shu Muto, Minami Matsui, and Keiko Sugimoto, The Trihelix Transcription Factor GTL1 Regulates Ploidy-Dependent Cell Growth in the Arabidopsis Trichome, THE PLANT CELL, 査読有, 21, 2009, 2307-2322,

⑤ Rumi Tominaga-Wada, Mineko Iwata, Ryusuke Sano, Kayoko Inoue, Kiyotaka Okada and Takuji Wada, Arabidopsis CAPRICE-LIKE MYB 3 (CPL3) controls endoreduplication and flowering development in addition to

trichome and root hair formation, Development, 査読有, 135, 2008, 1335-1345,
⑥ Hiroyasu Motose, Rumi Tominaga, Takuji Wada, Munetaka Sugiyama, Yuichiro Watanabe, A NIMA-related protein kinase suppresses ectopic outgrowth of epidermal cells through its kinase activity and the association with microtubules, The Plant Journal, 査読有, 54, 2008, 829-844, 査読有
⑦ Shimpei Hayashi, Tadashi Ishii, Toshiro Matsunaga, Rumi Tominaga, Takashi Kuromori, Takuji Wada, Kazuo Shinozaki and Takashi Hirayama, The Glycerophosphoryl Diester Phosphodiesterase-Like Proteins SHV3 and its Homologs Play Important Roles in Cell Wall Organization, Plant Cell Physiology, 査読有, 9, 2008, 1522-1535,

〔学会発表〕(計1件)

①日本動物・植物・生態学会宮崎例会、植物の表皮細胞を形づくる遺伝子、2010年11月13日、宮崎

〔図書〕(計1件)

①富永るみ 和田拓治、植物の生長・開花調整機構の解明とその応用-根毛をつくる遺伝子が、生長・開花にも関与-、シーエムシー出版月刊バイオインダストリー、2008、11月号、88-94

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/~rtomina>

ga/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富永 るみ (TOMINAGA RUMI)
宮崎大学・IR推進機構・助教
研究者番号：20373334

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

研究者番号：