

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770029

研究課題名 (和文) 維管束分化における転写制御ネットワークの解析

研究課題名 (英文) Analysis of transcriptional regulatory network governing vascular differentiation

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・助教

研究者番号：90451830

研究成果の概要 (和文)：維管束分化における転写制御ネットワークを明らかにするために、シロイヌナズナの転写因子の過剰発現ベクターライブラリーを作成し、2つのクリーニング系を構築した。新規に作成した系を用い、道管細胞分化のマスター転写因子 VND7 を発現制御する因子の単離を行った。その結果、LBD/ASL ファミリー遺伝子の単離に成功し、LBD15/ASL11 が VND7 プロモーターに直接結合することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：To reveal the transcriptional regulatory network governing vascular differentiation, I established novel screening systems for isolation of regulatory factors. I cloned coding sequences of transcription factors into binary vectors for overexpression. A novel regulator of VND7 that was a master regulator of protoxylem vessels was isolated using them. The novel regulator, LBD15/ASL11, directly bound to VND7 promoter.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：維管束、木部分化、転写制御

1. 研究開始当初の背景

維管束は通道組織としてのみならず、植物体の物理的な支持や、地球上のバイオマスとしても非常に重要な組織である。そのた

め、その形成の分子機構は精力的に研究されている。近年、マイクロアレイを用いた大規模なトランスクリプトーム解析がシロイヌナズナ、ヒヤクニチソウ、ポプラな

どを材料として木部分化過程および二次維管束分化過程に対して行われている (Demura et al. 2002, Kubo et al. 2005, Schrader et al. 2004, Zhao et al. 2005, Ehlting et al. 2005)。これらの解析により、維管束あるいは木部分化に関わる遺伝子が多数明らかになった。また、個々の遺伝子解析により、シロイヌナズナにおいて道管形成に関わる 2 つのマスター遺伝子 *VND6*, *VND7* や、道管や繊維の二次壁形成を制御する因子 *SND1*, *SND2*, *NST1*, *NST2* など複数明らかになった (Kubo et al. 2005, Mitsuda et al. 2007)。しかしながら、上記のように木部分化に関わる遺伝子は多数明らかになっているものの、それらがどのような転写ネットワークを構築しているのかということは未だ明らかになっていない。細胞の分化を引き起す実体はタンパク質であり、それは様々な過程で調節をされているが、いずれのタンパク質、調節因子もまず初めにゲノムの転写によってスタートすると考えられる。したがって、転写制御ネットワークを理解することが分子機構理解の基であるといえる。そこで、転写因子にフォーカスした解析を行うことを考えた。維管束分化に関わるものが明らかになっている転写因子は上記の因子に加え、申請者が解析を行った **HD-Zip III** ホメオボックス遺伝子群がある (Ohashi-Ito and Fukuda 2003)。当然、維管束分化過程で機能する転写因子はこれらだけでなく他に多数存在すると考えられる。実際、維管束間繊維の分化過程を扱ったマイクロアレイデータでは 200 個ほどの転写因子の関与が示唆されている (Ehlting et al. 2005)。そこで、申請者は、維管束分化過程の転写制御のネットワークの構築およびこれまでに明らかにされていない分化を制御する新奇転写因子の単離を目的とした。

2. 研究の目的

維管束は水分や栄養分、シグナル分子を植物体全体に運搬する植物に必須な通道組織である。維管束のなかでも特に木部は、分化に関わる遺伝子群が多数明らかにされているものの、それらがどのような転写ネットワークにより発現制御されるのかということは未だ明らかになっていない。そこで、木部分化の分子機構を理解しそれを応用へと発展させていくために木部分化関連遺伝子群の遺伝子間の関係、発現制御ネットワークを明らかにすることを目的とした。まず、転写制御を効率よく解析するために網羅的にシロイヌナズナの全転写因子約 2000 個を整備し、様々な解析に利用可能にする。特に、各転写因子を過剰発現するライブラリーを作成し、

これを用いてあるプロモーターの上流制御因子の単離という作業を繰り返し行うことで、ネットワークを構築することを目的とする。また同時に維管束分化の新奇制御因子の単離も試みる。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ転写因子の網羅的整備

ゲノム配列よりシロイヌナズナには約 2000 個の転写因子が存在すると予測されている。この転写因子全ての CDS を、相同組換えによりいろいろなベクター系へ簡単に導入ができ、その後の利便性が良い gateway system の entry vector へクローニングする。このうち約 1100 個に関してはすでに Gong らによりクローニングされているため (Gong, et al. 2004)、リソースセンターよりこれらを取り寄せプラスミドの増幅、精製を行う。残りの転写因子については cDNA を鋳型として RT-PCR を行い同様に entry vector へとクローニングする。

(2) 過剰発現ベクターライブラリーの作製

各転写因子を過剰発現させるために、35S プロモーターをもつ Destination vector へそれぞれの転写因子を組み換える。また、薬剤による発現誘導が可能なベクターへも同様に組み換えを行う。約 25 遺伝子ずつをプールとして一度に組み換えを行うことで、時間的・経済的な効率化をはかる。

(3) 上流制御因子の単離スクリーニング

(2) で整備した転写因子の過剰発現ベクタープールを用いて、維管束で重要な働きをする因子の制御因子を探索する。原生木部道管の分化のマスター転写因子 *VND7* (Kubo et al. 2005) を対象とする。*VND7* のプロモーター領域に結合して *VND7* の発現制御を行う転写因子を単離するために、まずこれら遺伝子のプロモーター::レポーターラインを形質転換した植物体を整備する。出来上がったプロモーター::レポーターをもつ植物体に対して、転写因子を過剰発現させるベクタープールをアグロバクテリアを介して導入し、各々のレポーターを過剰にあるいは異所的に発現するものを選抜することで制御因子の単離を試みる。

(4) 上流制御因子の解析

(3) のスクリーニングにより得られた候補制御因子が *LBD12/ASL5* であった。そこで次に、*LBD/ASL* ファミリー遺伝子の詳細な発現解析および機能解析を進める。*LBD/ASL* ファミリーのうち *LBD12* に近接した *LBD1*, *LBD3*, *LBD4*, *LBD13*, *LBD15*, *LBD23*, *LBD24* について解析を行う。

(5) 新規スクリーニング系の構築

各転写因子の上流にある制御因子の単離するために上記とは異なるスクリーニング系を確立する。*N. benthamiana* にエフェクターおよびレポーターをもつアグロバクテリウムをインジェクションする transient assay によりスクリーニングを進める。このスクリーニングを維管束分化に関わる複数の遺伝子に対して行うことで、転写ネットワークを明らかにしていく。

4. 研究成果

まず、シロイヌナズナの転写因子のうち約 1000 個を Gateway system の ENTR ベクターとして収集・作成した。それらを薬剤誘導により過剰発現させることのできる Destination vector へと組換えた。この転写因子の過剰発現ベクタープールを用いて、原生木部の分化に必須な転写因子 VND7 (Kubo et al. 2005) の制御因子の探索を個体レベルで行った。VND7 を発現制御する転写因子を単離するために、VND7 プロモーター::レポーターをもつ植物体に対して、転写因子を過剰発現させるベクタープールをアグロバクテリアを介して導入し、VND7 レポーターを過剰にあるいは異所的に発現するものを選抜した。このスクリーニングにより複数の候補制御因子が得られた。そのうちのひとつ LBD12/ASL5 に着目し、LBD12/ASL5 の過剰発現が VND7 レポーターの異所的誘導を起こすことを確認した(図 1)。

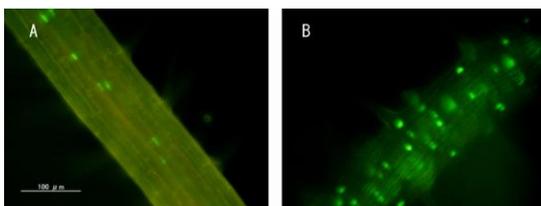


図 1 LBD12/ASL15 による VND7 : YFP-NSL の異所的発現
A:根における VND7:YFP-NSL のシグナル
B:LBD12/ASL15 過剰発現時の VND7:YFP-NSL のシグナル

次に、8 つの LBD/ASL ファミリー遺伝子 (LBD1, LBD3, LBD4, LBD11, LBD12, LBD15, LBD23, LBD24) の詳細な発現解析を行った結果、その内の一つ、LBD15/ASL11 の発現領域が VND7 の発現領域と重なっており、VND7 の制御因子であることがわかった(図 2)。

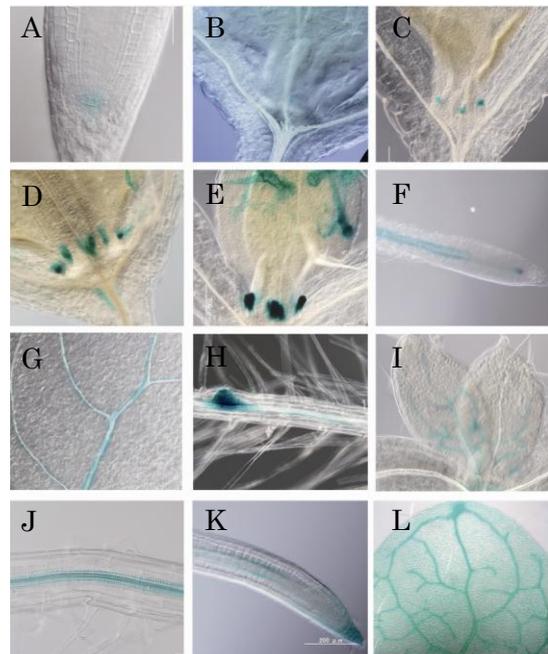


図 2 LBD/ASL ファミリー遺伝子の発現解析
プロモーターGUS ラインの染色像
A:LBD12, B:LBD23, C:LBD24, D:LBD1,
E:LBD13, F-G:LBD3, H-I:LBD4, J-L: LBD15

さらに、LBD15/ASL11 は VND7 プロモーターのあるシス領域に直接結合することがわかった。また、VND7 は LBD15/ASL11 の転写を正に制御していることも明らかとなった。以上の結果から、LBD15/ASL11 は VND7 と正のフィードバックループを形成し VND7 の発現を増幅する機能を持つことが示唆された。

また、この転写因子過剰発現ベクタープールを用いていくつかの転写因子の上流にある制御因子の単離を異なる方法で試みた。*Nicotiana benthamiana* の葉にベクタープールとスクリーニング対象遺伝子のプロモーターレポーターを同時にインジェクションする方法である。その結果、木部道管分化に関わる bHLH 遺伝子の上流制御候補因子を単離することができた。

以上の結果より、今回作成した転写因子を過剰発現させるプールを用いたスクリーニング方法が転写ネットワークを明らかにするためのツールとして有効であることが明らかになった。今後は、このスクリーニング法を用いて、新規の上流制御因子の単離が可能となり、転写ネットワークの全体像を明らかにすることができるかと期待される。

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)

[学会発表] (計 1 件)

伊藤 (大橋) 恭子、福田裕穂、道管分化実行因子 VND7 の発現を制御する LBD/ASL 遺伝子の解析、日本植物学会、2009 年 9 月 18 日、山形

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 恭子 (Ito Kyoko)

東京大学大学院理学系研究科・助教

研究者番号 : 90451830

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :