

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15827

研究課題名(和文) 転写因子GTL1の機能調節機構の解明

研究課題名(英文) post-translational modification of a transcription factor GTL1

研究代表者

柴田 美智太郎 (Shibata, Michitaro)

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・研究員

研究者番号：20734817

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)：根毛は根の表面積を増やすことで、土壌からの効率的な栄養吸収に寄与する。本研究ではシロイヌナズナを用い、栄養が豊富に存在する環境下で植物が根毛の成長を強く抑制することを発見した。さらにその強い成長抑制の分子機構として、転写因子GTL1およびDF1が根毛の成長促進因子RSL4を転写抑制することを明らかにした。本研究の結果は、植物が根毛の成長抑制を通じて必要以上の栄養を吸収しない仕組みを有することを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで植物の栄養応答は「特定」の栄養素が「不足」した条件で研究が進められてきた。一方、本研究は「複数」の栄養素が「過剰」に存在する条件での応答に着目し、転写因子GTL1が栄養過剰条件において根毛の成長を適切に抑制するために必要な因子であることを明らかとした。昨今、過剰量の肥料が施されたことに由来する湖川の富栄養化や大気汚染などは大きな問題となっており、栄養過剰条件における植物の応答とその分子機構に切り込んだ本研究の成果は社会的にも学術的にも意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：Root hair growth is tuned in response to the surrounding environment. While most previous studies focused on the enhancement of root hair growth during nutrient starvation, few studies investigated the root hair response in the presence of excess nutrients. I found that root hair growth of wild-type Arabidopsis plants is strongly suppressed with increasing nutrient availability. We further used gene expression profiling to analyze how excess nutrient availability affects root hair growth, and found that RHD6 subfamily genes, which are positive regulators of root hair growth, are down-regulated in this condition. On the other hand, defects in GTL1 and DF1, which are negative regulators of root hair growth, cause frail and swollen root hairs when excess nutrients are supplied. In conclusion, our data suggest that GTL1 and DF1 prevent unnecessary root hair formation under excess nutrient conditions.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：根毛 シロイヌナズナ 転写制御 栄養応答

1. 研究開始当初の背景

植物は生存戦略として、外部環境に応答した成長制御を行う。特に根の表皮細胞から分化した根毛細胞は、土壌中の無機栄養素に応じてその長さが変わることがよく知られている。例えばリン酸が欠乏した土壌で生育する植物は、根毛の成長を促進して根の表面積を増やし土壌からのリン酸の吸収効率を増大させる。分子レベルでは、根毛成長の正のマスター制御因子である *RSL4* は転写レベルで土壌(培地)中のリン酸に応答し、例えばリン酸飢餓条件でその遺伝子発現が上昇し、その結果として根毛の伸長成長が促進される。一方、負のマスター制御因子として単離された *GTL1* は、遺伝子発現やタンパク質レベルでの環境による変動を示さない。つまり *GTL1* の転写因子としての活性は、主として相互作用因子やタンパク質修飾による翻訳後制御によって調節されると示唆された。そしてその具体的な分子機構は未解明であった。さらにこれまで栄養飢餓条件での根毛成長の促進のメカニズムとその生理的意義については数多く研究されてきた。一方、成長抑制因子による抑制のメカニズムと、その成長抑制の意義、すなわち「植物が何のために成長を抑制するのか」という生理的意義、について十分な議論がなされてはいなかった。

2. 研究の目的

本研究では、まずどのような条件で何のために根毛の成長を抑制するのか? という生理的意義の解明を目的とした。そして、その根毛成長抑制のマスターレギュレーターとして考えられている転写因子 *GTL1* の翻訳後制御機構の解明を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 根毛の成長を抑制する環境条件の探索 -過剰栄養条件の作出

栄養飢餓条件で根毛の成長が促進されることが知られているので、根毛の成長抑制条件として、栄養を豊富に含む生育条件を作出し、植物(シロイヌナズナ)を生育させた。そして根毛の長さを定量することで、栄養条件と根毛の成長抑制の関係を調べた。

(2) 翻訳後制御の解析

根毛の成長抑制因子である *GTL1* に対する翻訳後制御機構として、リン酸化修飾、SUMO 化修飾、そして相互作用因子との結合、という3つの様式が予想された。そこで、リン酸化就職、SUMO 化修飾については、*GTL1* 遺伝子上の修飾予測部位遺伝子に変異を加えたものを作製し、レポーターアッセイによって下流制御因子に対する活性の強弱で判定した。また、相互作用因子については候補タンパク質との結合を共免疫沈降法によって判定した。

4. 研究成果

(1) 植物の生育培地として広く使われているムラシゲ-スクーグ培地(MS培地)^[1]を半分に希釈した培地(1/2xMS)を通常の生育条件として、その濃度を順々に濃くした培地を作製

し植物を生育させた。すると、たったの2倍濃度(2xMS、1/2xMSから比較すると4倍)で野生株のシロイヌナズナ(Col)は根毛をほとんど形成しなくなることを発見した(図1左側)。

MS培地は14種類の化合物が混ぜられている。そこで、MS培地に含まれている化合物の溶液を1つずつ用意し、特定の栄養素だけが2xMS濃度に含まれる培地を14種類作製した。しかしながら、「特定」の化合物だけが4倍濃度で含まれていてもすべての化合物が4倍濃度で含まれる2xMSのように、根毛成長の強い抑制は引き起こされなかった。これらの結果は、まず栄養が豊富に存在すると植物は根毛の成長を強く抑制しうることを示す。さらに、その抑制は特定の栄養素が引き起こすのではなく、複数の栄養素の組み合わせによって引き起こされることを示す。

また、2xMS培地で引き起こされる根毛成長の強い抑制に転写因子GTL1が関与するかどうかの検証を行った。GTL1および冗長的に機能するDF1の二重欠損変異株*gtl1 df1*変異株を野生株と同様に2xMS培地で生育させて根毛の観察を行った。すると、*gtl1 df1*変異株では野生株では見られないバルーン状の根毛が形成されることを見出した(図1右側)。そこで、原子間力顕微鏡でバルーン状の根毛の物理的特性を測定したところ、*gtl1 df1*変異株の根毛は、野生株の根毛と比較して「固さ」を失った脆弱な構造であること、すなわち「異常」な根毛であることがわかった。これらの結果は、転写因子GTL1とよびそのホモログであるDF1が、栄養抱負条件における根毛の成長抑制に機能することを示唆する。

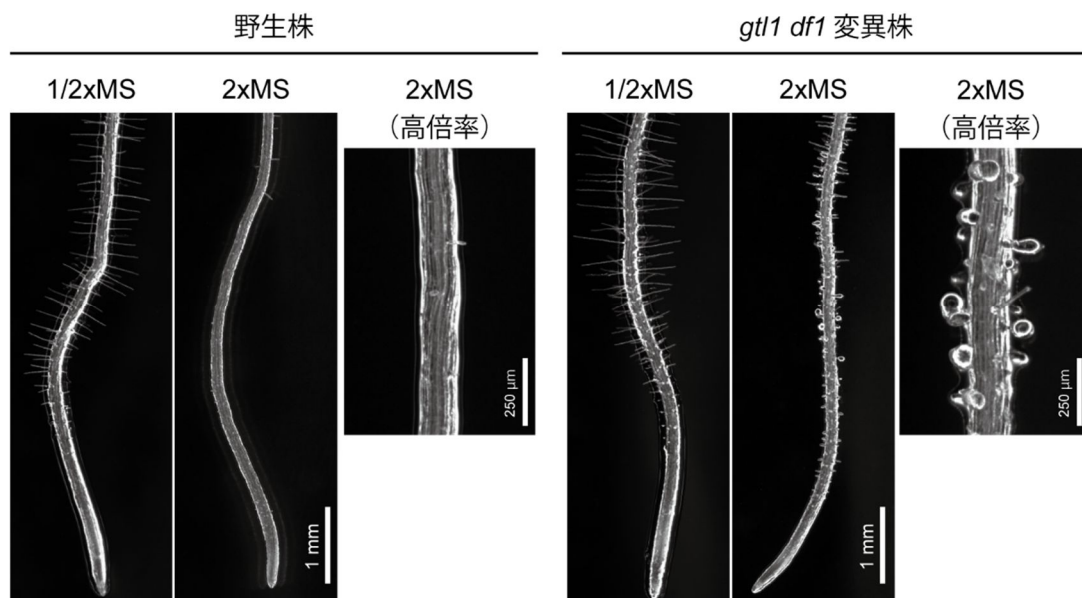


図1 生育培地の違いによるシロイヌナズナの根毛の変化

シロイヌナズナの野生株は、1/2xMS培地で生育させると通常通り根の表面に根毛を形成した。

一方、2xMS培地で生育させた場合は、ほとんど根毛を形成しなかった。

*gtl1df1*変異株は、1/2xMS培地で生育させると野生株同様に根の表面に根毛を形成したが、2xMS培地で生育させた場合は、野生株では見られないバルーン状の根毛を形成した。

(2) GTL1の翻訳後制御に関して、まずGTL1上のリン酸化修飾予測部位、SUMO化修飾予測部位に変異を入れたコンストラクトを用いて、培養細胞を用いたレポーターアッセイを行った。レポーター遺伝子には、GTL1が直接制御する遺伝子であることが示されている

RSL4 遺伝子のプロモーター領域を用いた。野生型の GTL1 は RSL4 遺伝子の転写を抑制するが、本実験で用いたリン酸化修飾予測部位、SUMO 化予測部位は GTL1 の機能に影響はなく、いずれも RSL4 遺伝子の転写を抑制した。したがって、GTL1 の転写抑制機構に関して翻訳後修飾機構が存在するかどうかはいまだに明確に答えることができない。

一方、GTL1 の相互作用因子に関して、逆遺伝学的なアプローチから根毛の成長促進因子 RHD6 と結合することを見出した。これまでに RHD6 は RSL1 という別の転写因子とダイマーを形成して根毛成長の活性化因子として機能することが知られていた。そして本研究では、RHD6 と GTL1 がダイマーを形成することを共免疫沈降法により明らかとした。レポーターアッセイにより、RHD6-GTL1 ダイマーは抑制型因子として機能することが示唆されたことから、RHD6 は相互作用因子によって同じ標的遺伝子に対して活性化因子とも抑制化因子ともなるというモデルが提唱される (図 2)。

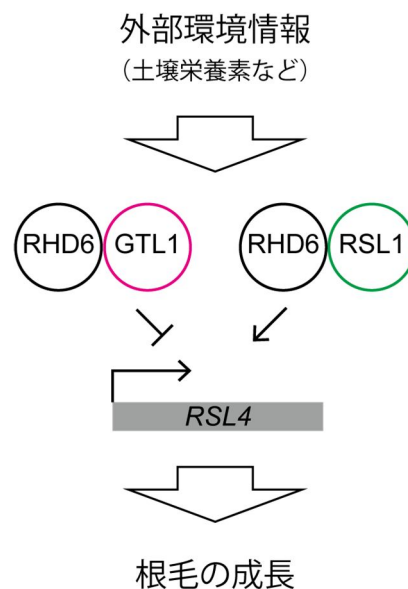


図 2 本研究から示唆される外部環境依存的な根毛の成長をコントロールする機構
外部環境に応じて RHD6 は抑制型の複合体 RHD6-GTL1 や活性化型の複合体 RHD6-RSL1 と変化する。その結果、下流の RSL4 遺伝子の発現量を調整され、根毛の成長がコントロールされる。

本研究では、研究計画開始時の目標であった転写因子 GTL1 が受ける翻訳後修飾に関してはその分子機構を明らかにすることができなかった。一方、根毛の成長を抑制する環境とその生理的意義、そして GTL1 が別の活性化型転写因子と相互作用することで抑制型転写因子へと機能転換させるという新たな分子機構を提唱することができた。結果として当初の期待以上の研究成果が得られたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Kim June-Sik, Sakamoto Yuki, Takahashi Fuminori, Shibata Michitaro, Urano Kaoru, Matsunaga Sachihiro, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko, Shinozaki Kazuo | 4. 巻 119 |
| 2. 論文標題 <i>Arabidopsis</i> TBP-ASSOCIATED FACTOR 12 ortholog NOBIR06 controls root elongation with unfolded protein response cofactor activity | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 e2120219119 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2120219119 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Michitaro Shibata, David S. Favero, Ryu Takebayashi, Arika Takebayashi, Ayako Kawamura, Bart Rymen, Yoichiro Hosokawa, Keiko Sugimoto | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Trihelix transcription factors GTL1 and DF1 prevent aberrant root hair formation in an excess nutrient condition | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 New Phytologist | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.18255 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 柴田美智太郎、河村彩子、杉本慶子 |
| 2. 発表標題 栄養過剰条件下における シロイヌナズナ根毛の成長抑制機構 |
| 3. 学会等名 日本植物学会 第84回大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Michitaro Shibata, Ayako Kawamura, Keiko Sugimoto |
| 2. 発表標題 Excess nutrition suppresses Arabidopsis root hair growth |
| 3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Michitaro Shibata, Ayako Kawamura, Keiko Sugimoto |
| 2. 発表標題 An environmental response on root hairs under phosphate starvation in Arabidopsis |
| 3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 理化学研究所 細胞機能研究チームのホームページ http://cellfunction.riken.jp/ |
|--|

| 6. 研究組織 | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|