

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370014

研究課題名（和文） 植物の低温ストレス応答の分子機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the molecular mechanism of cold stress responses in plants

研究代表者

篠崎 和子（KAZUKO YAMAGUCHI-SHINOZAKI）

東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30221295

研究成果の概要（和文）：

高等植物の低温ストレス応答で重要な機能を果たす転写因子をコードする遺伝子 *DREB1* の上流の制御機構を解明することを目指して研究を行った。これまでに *DREB1C* 遺伝子のプロモーター中の低温ストレス誘導に関わるシス配列を決定し、これに結合する転写因子として CAMTA ファミリーを単離している。そこで、形質転換体や欠失変異体、トランジェント発現系等を用いて、これらの遺伝子の機能解析を進めた結果、CAMTA3 や CAMTA5 が *DREB1C* や *DREB1B* 遺伝子の発現を制御している転写活性化因子であると考えられた。*DREB1A* 遺伝子の低温誘導性では、CAMTA 以外の転写因子が転写活性化を制御していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate molecular mechanisms of plant cold responses we analyzed upstream regulation of the *DREB1* genes encoding transcription factors that play important roles in the cold stress responsive gene expression in plants. Previously we isolated the CAMTA family proteins as transcription factors that bind the cis-element in the *DREB1C* promoter that are involved in its cold stress responsive expression. We analyzed function of the CAMTA family proteins using T-DNA insertion mutants, transient transactivation system and transgenic plants expressing the GFP-fused CAMTA proteins, and found that CAMTA5 and CAMTA3 function as transcriptional activators in the expression of *DREB1B* and *DREB1C*. We thought that the cold-responsive induction of *DREB1A* was regulated by transcription factors other than the CAMTA proteins as transcriptional activators.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子・生理科学

キーワード：環境応答、低温ストレス、発現制御、植物、シス因子

## 1. 研究開始当初の背景

移動の自由のない植物は、温度変化や乾燥などの環境ストレスに適応する応答機構を進化の過程で獲得してきたものと考えられる。これまで、環境因子として主に低温や乾燥を取り上げ、シロイヌナズナを用いてこれらのストレスによって誘導される遺伝子群の機能や発現制御を解析してきた。その結果、乾燥や低温ストレスによる遺伝子発現を制御するシス因子はA/GCCGACをコアとするDRE配列であることを示した (Plant Cell 6, 251-264, 1994)。また、このDRE配列に結合して転写を活性化する転写因子をコードする遺伝子として、低温ストレス応答で働く*DREB1A*と乾燥や塩ストレス応答で働く*DREB2A*を単離した。

*DREB1*は低温耐性遺伝子の発現を誘導する転写活性化因子であり、*DREB1A*、*DREB1B*、*DREB1C*の3つの相同遺伝子から構成されている。*DREB1*を高発現することで、50種以上の標的遺伝子が高発現し、植物に高いレベルの低温や乾燥ストレス耐性を付与することも示され、分子育種への応用が図られている。一方、*DREB1*遺伝子の発現は概日性発現を示すことから概日時計によっても制御されていると考えられる。*DREB1*を起点とした下流のストレス耐性の獲得機構は、詳しく研究されてきたが、*DREB1*の上流の制御機構はほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、*DREB1*遺伝子の低温ストレスや概日時計による発現誘導機構を解明し、さらにシグナル伝達系を溯ることにより、低温ストレスの受容や概日時計による制御から*DREB1*の機能発現に至るシグナル伝達の制御機構を明らかにすることを旨とする。

## 2. 研究の目的

高等植物の低温ストレス応答で重要な働きを示すAP2/ERFタイプの転写因子*DREB1*に関する下流の標的遺伝子群やこ

れらの遺伝子によるストレス耐性の獲得機構はこれまで詳しく研究されてきたが、*DREB1*の上流の制御機構はほとんど明らかになっていない。本研究では、*DREB1*遺伝子の低温ストレスや概日時計による発現誘導機構を解明し、これらの発現誘導で働く因子を起点としてシグナル伝達系を溯ることにより、低温ストレスの受容や概日時計による制御から*DREB1*の機能発現に至るシグナル伝達の制御機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

多数の低温ストレス誘導性遺伝子の発現を制御する重要な転写因子の遺伝子である*DREB1*ファミリーは低温ストレスや概日時計によって発現が制御されている。このうち*DREB1C*遺伝子の発現誘導はプロモーター中の領域1~3の3つの短い領域が発現を制御している。本研究では、シロイヌナズナの形質転換体や多重欠失変異体、プロトプラスを用いたトランジェント発現系、GFPをリポーターとして用いたタンパク質の細胞局在性の解析など多様な解析法を駆使して、*DREB1C*遺伝子の発現を制御するシス領域に結合して発現を制御する因子を同定して機能を明らかにするとともにこれらの因子を起点として溯ることにより、上流のシグナル伝達の制御機構に関わる因子をあきらかにする。

## 4. 研究成果

高等植物の低温ストレス応答で重要な機能を果たすAP2/ERFタイプの転写因子をコードする遺伝子*DREB1*の上流の制御機構を解明することを目指して研究を行った。*DREB1*遺伝子自身が低温ストレスによって特異的に誘導されるので、*DREB1*遺伝子の低温時の発現制御機構の解析を行った。これまでに*DREB1C*遺伝子のプロモーター中の低温ストレス誘導と概日リズムによる発現に関わる両方のシス配列を決定した。また、この領域(転写開始点から上流-113から-47までの配列)に結合する転写因子としてCAMTAファミリー(CAMTA1からCAMTA6)遺伝子が単離された。そこで、これらの遺伝子の機能解析を進め

た。

6種類のCAMTAファミリーに関して系統解析を行うと、CAMTA1~3, CAMTA4, CAMTA5と6の3つのサブグループに分けられた。それぞれのサブグループ内で重複性が存在する可能性が考えられるので、多重変異体の作製を行った。一方、シロイヌナズナのプロトプラストを用いて、*DREB1C*プロモーターのシス領域および*DREB1A*, *DREB1B*プロモーターの相同領域をつないだレポーター遺伝子の転写活性化能を解析した結果、CAMTA3およびCAMTA5は、*DREB1C*プロモーターのシス領域配列および*DREB1B*プロモーターの相同領域に対して高い転写活性化能を示した。また、CAMTA2もレベルは低いが転写活性化能が認められた。一方、どのCAMTAを用いた場合も*DREB1A*プロモーターを介した転写活性化は検出されなかった(図1)。

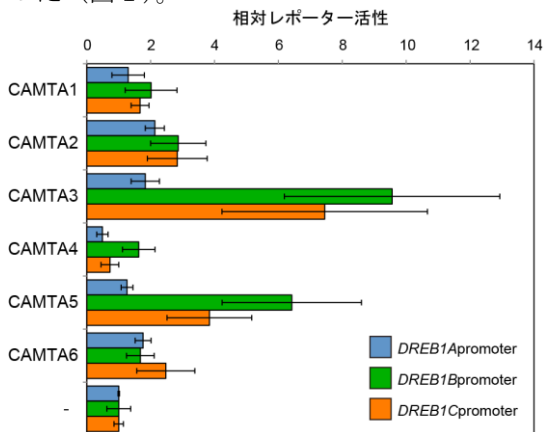


図1. プロトプラストを用いたCAMTAファミリーの転写活性化能の解析

CAMTAファミリータンパク質は、CGCG-boxに特異的に結合するドメインであるCG-1、非特異的なDNA結合ドメインであるTIG、タンパク質間相互作用に関わるドメインであるANK repeat, カルモジュリンとの相互作用に関わるIQドメインからなっている(図2)。

CAMTA3を用いて、これらのドメインを含む領域を欠失した種々のコンストラクトを作製して、シロイヌナズナのプロトプラストで一過的転写活性化実験を行うと、ANK repeatを欠失したコンストラクトを用いた場合に、転写活性が失われた(図3)。この領域がCAMTA

の転写活性化に関与していると考えられ、ANK repeatを介した相互作用因子が重要と考えられた。



図2. CAMTAファミリータンパク質の構造の概要図

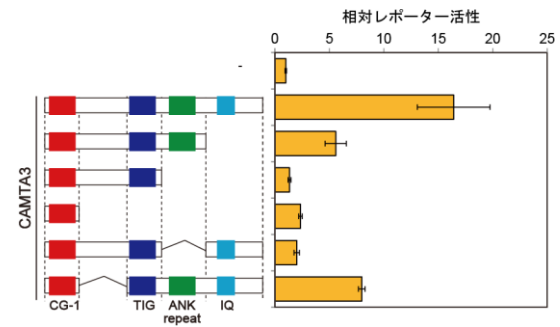


図3. CAMTA3の部分欠損断片を用いたシロイヌナズナのプロトプラストでの転写活性化能の解析

次に、CAMTAファミリーの細胞内局在を解析するため、GFP融合型のCAMTAを過剰発現する形質転換シロイヌナズナを作成し、GFP蛍光を観察した結果、CAMTA2-sGFP、CAMTA3-sGFPおよびCAMTA5-sGFPを導入した形質転換体でGFP蛍光が細胞質や核において観察された。一方、低温ストレス条件下では、主に孔辺細胞においてこれら3種類のCAMTA-sGFPが、細胞質から核に移行することが観察された(図4)。

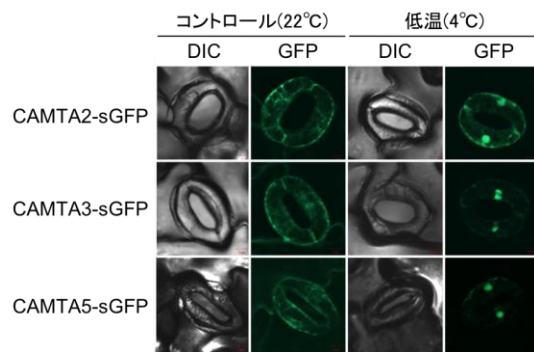


図4. CAMTA-sGFP形質転換シロイヌナズナにお

ける GFP 蛍光

さらに、シロイヌナズナの T-DNA 挿入変異体を用いて作製した CAMTA の多重変異体を用いて、標的と考えられる *DREB1* 遺伝子の発現を解析した。現在までに作製した 2 重変異体では、*CAMTA3* および *CAMTA5* 遺伝子を欠損した *camta3camta5* 変異体のみが鉢植えにした場合において、4°C、3 時間の低温条件下において *DREB1B* 遺伝子の発現量が顕著に減少していた。

以上の結果から、CAMTA3 および CAMTA5 は、*DREB1B* および *DREB1C* 遺伝子の低温誘導性の発現の転写活性化因子であると考えられた。さらにこれらの転写因子の活性化には細胞内局在の変化が関与している可能性が考えられた。

今後は CAMTA タンパク質の低温による転写活性化の機構を明らかにするため、CAMTA2、CAMTA3、CAMTA5 を欠損した変異体を作製して、*DREB1* 遺伝子や下流の低温誘導性遺伝子の発現を解析する。また CAMTA タンパク質の低温時の核移行に関しても、Ca イオンやカルモジュリン等の影響を解析して、活性化との関係を明らかにする。一方、CAMTA 以外の転写因子によって成著されると考えられる *DREB1A* 遺伝子の低温誘導性に関してもシス因子を同定して、転写活性化因子を単離する。これらの解析の結果を得ることで、植物の低温ストレス応答の全貌を明らかにすることを目指す。

#### 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 6 件)

- ① Asad J, Maruyama K, Todaka D, Kidokoro S, Abo M, Yoshimura E, Shinozaki K, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K.、OsTZF1, a CCCH-tandem zinc finger protein, confers delayed senescence and stress tolerance in rice by regulating stress-related genes.、*Plant Physiol.*、査読有、161(3)、2013、1202-16、[DOI: 10.1104/pp.112.205385](https://doi.org/10.1104/pp.112.205385).
- ② Ishizaki, T., Maruyama, K., Obara, M.,

Fukutani, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ito, Y., Kumashiro, T. Expression of Arabidopsis DREB1C improves survival, growth, and yield of upland New Rice for Africa (NERICA) under drought. *Mol. Breeding*, 査読有, 2012, Online, [DOI: 10.1007/s11032-012-9785-9](https://doi.org/10.1007/s11032-012-9785-9)

- ③ Datta, K., Baisakh, N., Ganguly, M., Krishnan, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Datta, S.K. Overexpression of Arabidopsis and Rice stress genes' inducible transcription factor confers drought and salinity tolerance to rice. *Plant Biotech. J.*、査読有、10(5)、2012、579-86.[DOI: 10.1111/j.1467-7652.2012.00688.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00688.x).
- ④ Maruyama, K., Todaka, D., Mizoi, J., Yoshida, T., Kidokoro, S., Matsukura, S., Takasaki, H., Sakurai, T., Yamamoto, Y.Y., Yoshiwara, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.、Identification of cis-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in Arabidopsis, rice and soybean.、*DNA Res.*、査読有、19(1)、2012、37-49、[DOI: 10.1093/dnares/dsr040](https://doi.org/10.1093/dnares/dsr040)
- ⑤ Nakamura, R., Satoh, R., Nakamura, R., Shimazaki, T., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kikuchi, A., Watanabe, K.N., Teshima, R.、Immunoproteomic and 2D-DIGE analysis of Arabidopsis DREB1A-transgenic potato.、*Biol. Pharm. Bull.*、査読有、33(8)、2010、1418-1425、[DOI:10.1248/bpb.33.1418](https://doi.org/10.1248/bpb.33.1418)
- ⑥ Yamamoto, Y.Y., Yoshioka, Y., Hyakumachi, M., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tokizawa, M., Koyama, H.、Prediction of transcriptional regulatory elements for plant hormone responses based on microarray data.、*BMC Plant Biol.*、査読有、11(1)、2011、39、[DOI: 10.1186/1471-2229-11-39](https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-39)

[学会発表] (計 13 件)

- ① S. Kidokoro, M.J. Seok, D. Todaka, S. Igusa, J. Mizoi, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki Transcriptional regulation of PIF family genes down-regulated under drought stress conditions in Arabidopsis, 10th International Congress on Plant Molecular Biology, 2012年10月21~26日、Jeju, Korea
- ② Kidokoro, S., Maruyama, K., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.、Transcriptional regulation of the cold-inducible *DREB1* by CAMTA family in *Arabidopsis*. XXIV SPPS Congress, 2011年8月21~25日、Stavanger, Norway.

- ③ Kanai, M., Maruyama, K., Yamada, K., Kidokoro, S., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. Functional analysis of novel membrane protein family, COR413 controlled by an *Arabidopsis* transcription factor DREB1A., XXIV SPPS Congress, 2011年8月21～25日, Stavanger, Norway.
- ④ Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Regulatory networks of gene expression in abiotic stress response in *Arabidopsis*, ICAR 2010, 2010年6月6～10日, パシフィコ横浜 (神奈川県) .
- ⑤ Maruyama, K., Mizoi, J., Kidokoro, S., Takasaki, H., Yoshida, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. The cis-acting elements in cold and dehydration inducible promoters of *Arabidopsis* and rice, ICAR 2010, 2010年6月6～10日, パシフィコ横浜 (神奈川県) .
- ⑥ Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakashima, K., Imura, Y., Osakabe, Y., Fujita, Y., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. PIF7 negatively regulates *DREB1* expression under circadian control in *Arabidopsis*. ICAR 2010, 2010年6月6～10日, パシフィコ横浜 (神奈川県) .
- ⑦ Yamaguchi-Shinozaki, K. Improving abiotic stress tolerance in crops, Workshop Japan-Egypt “Pharmacognosy and Traditional Medicine”, 2010年7月20～23日, 日本科学未来館 (東京) .
- ⑧ Maruyama, K., Mizoi, J., Kidokoro, S., Takasaki, H., Yoshida, T., Matsukura, S., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. Analysis of dehydration- and cold-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice and soybean via identification of *cis*-acting promoter elements. Cold Spring Harbor Asia Conference:

From Plant Biology to Crop Biotechnology, 2010年10月25-29日, Suzhou, China.

- ⑨ Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakashima, K., Imura, Y., Osakabe, Y., Fujita, Y., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. PIF7 negatively regulates *DREB1* expression under circadian control in *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Asia Conference: From Plant Biology to Crop Biotechnology, 2010年10月25-29日, Suzhou, China.
- ⑩ Kanai, M., Maruyama, K., Yamada, K., Kidokoro, S., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. Analysis of a novel membrane protein family, COR413 controlled by an *Arabidopsis* transcription factor DREB1A., 2010年10月25-29日, Suzhou, China.
- ⑪ 篠崎和子, 環境ストレス耐性作物の開発について、日本学術会議公開シンポジウム「遺伝子組換え作物とその利用に向けて」、2010年8月6日、東京
- ⑫ 城所聡、圓山恭之進、光田展隆、高木優、篠崎一雄、篠崎和子、シロイヌナズナの低温誘導性転写因子遺伝子 *DREB1* の転写制御解析、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月20～22日、仙台
- ⑬ 金井要樹、圓山恭之進、山田晃嗣、城所聡、篠崎一雄、篠崎和子、ロイヌナズナの転写因子 *DREB1A* が制御する *COR413* ファミリータンパク質の機能解析、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月20～22日、仙台

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

篠崎 和子

(KAZUKO YAMAGUCHI-SHINOZAKI)

東京大学大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：30221295