

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570057

研究課題名(和文) シロイヌナズナの表皮細胞分化を制御する転写因子の機能解析とトマトへの応用

研究課題名(英文) Functional analyses of transcriptional factors for the epidermal cell differentiation in Arabidopsis and tomato

研究代表者

富永 るみ (Tominaga, Rumi)

広島大学・生物圏科学研究科・講師

研究者番号：20373334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、植物の表皮細胞分化制御機構を、根毛、トライコーム形成を制御するCPCファミリー遺伝子の機能解析を中心に明らかにしようとするものである。栽培植物への応用を目指し、トマトでのCPCファミリー遺伝子の機能及びオーソログの機能解析を行った。その結果、CPCファミリー遺伝子に配列の似た、トマトのオーソログ遺伝子を見出し、SITRYと命名した。このトマトSITRY遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナ形質転換体を解析したところ、CPCと同様の表皮細胞分化制御機能があることがわかった。さらにSITRY遺伝子は、表皮細胞に蓄積するアントシアニンを負に制御することもわかった。

研究成果の概要(英文)：The CPC family genes regulate root hair and trichome cell differentiation in Arabidopsis. We identified CPC homologous gene from the tomato genome and named it SITRY. After transformation into Arabidopsis, SITRY induced root hair differentiation and inhibited trichome formation as observed in 35S:CPC plants. In addition we show that anthocyanin accumulation was repressed in CPC::SITRY transgenic plants.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物学・生理学

キーワード：植物 発現制御 バイオテクノロジー 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナの根毛は、根の表皮細胞の一部が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て形成された器官です。植物の細胞分化研究のモデルとして、これら表皮細胞をターゲットとした転写因子研究が、これまで多くのグループにより進められてきました。

申請者の研究グループは、根毛の形成を促進する唯一の因子である CAPRICE (CPC) 遺伝子と、5つの CPC ファミリー遺伝子についての解析を進めています。

2. 研究の目的

本研究は、植物の表皮細胞分化制御機構を、転写因子の機能解析を中心に明らかにしようとするものです。シロイヌナズナの根毛、トライコーム形成を制御する CPC ファミリー遺伝子が、どのような働きによって形態形成を調節しているのか、その機構の解明を目指します。また、栽培植物への応用を目指し、トマトでの CPC ファミリー遺伝子の機能及びオーソログの機能解析を行います。計画している具体的な研究項目は、1、CPC ファミリー遺伝子のアミノ酸置換による細胞間移行モチーフの決定。2、根毛形成過程における細胞間移行機能の果たす役割の解明。3、トマトにおける表皮細胞分化遺伝子 (CPC オーソログ) の機能解析、です。申請者はこれまで、シロイヌナズナの表皮細胞分化を制御する CPC ファミリー遺伝子の機能解析を行ってきました。本研究では、CPC ファミリーが進化の過程で獲得した役割分担の機能を、アミノ酸置換により明らかにしたいと考えました。また、栽培植物への応用を目指し、トマトにおける CPC ファミリーの機能解析及びトマトオーソログの解析も予定しました。

3. 研究の方法

(1) CPC の細胞間移行に必須なアミノ酸残基の決定。

CPCとホモロジーの高いETC1のアミノ酸配列を比較し、異なる部分を入れ換えたコンストラクトを作製します。N 末側に2カ所、MYB領域内に2カ所に大きな配列の違いを既に見いだしていますので、4種類のコンストラクト作製を予定しています。

(2) 移行に必須な S1 配列中の、重要な残基の特定。

S1 モチーフの9アミノ酸を1つずつアラニンに置換した CPC::CPC:GFP コンストラクトを9種類作製します。

(3) トマトの CPC オーソログ遺伝子の機能解析。

CPC ファミリー遺伝子に配列の似た、トマト

のオーソログ遺伝子の候補を既にピックアップします。このオーソログ遺伝子の配列を手掛かりに、マイクロトムの cDNA ライブラリーから増幅し、バイナリーベクターである pCHF3 プラスミドの 35S プロモーターの下流にクローニングします。また、既に作製してある 35S::CPC コンストラクトのマイクロトムへの形質転換を試みます。

4. 研究成果

本研究は、植物の表皮細胞分化制御機構を、転写因子の機能解析を中心に明らかにしようとするものである。得られた研究成果は以下のとおりである。

(1) CPCの細胞間移行に必須なアミノ酸残基の決定。

シロイヌナズナのCPCとホモロジーの高いETC1のアミノ酸配列を比較し、一部を入れ換えたコンストラクトを作製、シロイヌナズナに形質転換した。今後は、作出した4種類の形質転換体を解析し、細胞間移行に必須なアミノ酸残基の決定を目指す。

(2) 移行に必須なS1配列中の、重要な残基の特定。

S1モチーフの9アミノ酸をETC1に付加したCPC::S1:ETC1:GFP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。今後、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行い、S1配列による細胞間移行への寄与を明らかにする。

(3) トマトのCPCオーソログ遺伝子の機能解析。

CPCファミリー遺伝子に配列の似た、トマトのオーソログ遺伝子の候補をピックアップし (SITRYと命名)、配列を手掛かりに、マイクロトムのcDNAライブラリーから増幅し、バイナリーベクターであるpCHF3プラスミドの35Sプロモーターの下流にクローニングした。このトマトSITRY遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナ形質転換体を作成した。作成したシロイヌナズナ形質転換体の表現型を解析した結果、CPCと同様の根毛を増やし、トライコームを無くす機能があることを明らかにした。また、SITRY過剰発現体のアントシアニン量を測定したところ、野生型よりもアントシアニンの蓄積が減っていることがわかった。そこで、SITRY遺伝子は、アントシアニンの蓄積にも関与していると結論した。

(4) cpc cpl3, try cpl3 二突然変異体の解析。cpc cpl3あるいはtry cpl3 に重変異体の bolting までの日数を測定したところ、cpl3 突然変異による早咲きの表現型は、cpc

あるいは try 遺伝子の突然変異により打ち消されることがわかった。

以上の結果を利用することで、将来、根毛やトライコーム、アントシアニン量の改変による養分吸収や耐病虫害性に優れた作物作出が期待できる。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 12件)

R. Tominaga-Wada, T. Wada
Regulation of root hair cell differentiation by R3 MYB transcription factor in tomato and Arabidopsis
Frontiers in Plant Science
2013, 5, 1-5 (査読有)
10.3389/fpls.2014.00091

R. Tominaga-Wada, Y. Nukumizu, T. Wada
Flowering is delayed by mutations in homologous genes CAPRICE and TRYPTICHON in the early flowering Arabidopsis cpl3 mutant
J. Plant Physiol.
2013, 170, 1466-1468 (査読有)
10.1016/j.jplph.2013.05.013

R. Tominaga-Wada, Y. Nukumizu, T. Wada, T. Sawa, T. Tetsumura
CLAVATA3-like genes are differentially expressed in Grape Vine (*Vitis vinifera*) tissues
J. Plant Physiol.
2013, 170, 1379-1383 (査読有)
10.1016/j.jplph.2013.04.013

R. Tominaga-Wada, Y. Nukumizu, T. Wada
Tomato (*Solanum lycopersicum*) Homologs of TRIPTYCHON (SITRY) and GLABRA3 (SIGL3) are Involved in Anthocyanin Accumulation
Plant Signal. Behav.
2013, 8, e24575 (査読有)
10.4161/psb.24575

R. Tominaga-Wada, Y. Nukumizu, S. Sato, T. Wada
Control of plant trichome and root-hair development by a tomato (*Solanum lycopersicum*) R3 MYB transcription factor
PLOS ONE
2013, 8, e54019 (査読有)
10.1371/journal.pone.0054019

R. Tominaga-Wada, Y. Nukumizu
The CAPRICE-LIKE MYB gene family cooperatively controls trichome branching and clustering in Arabidopsis
Plant Biotechnology
2012, 29, 407-410 (査読有)

10.5511/plantbiotechnology.12.0601a

R. Tominaga-Wada, Y. Nukumizu, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, T. Wada
Functional divergence of MYB-related genes, WEREWOLF and AtMYB23 in Arabidopsis
Biosci. Biotechnol. Biochem.
2012, 76, 883-887 (査読有)
10.1271/bbb.110811

R. Tominaga-Wada, Y. Nukumizu
Expression analysis of an R3-Type MYB transcription factor CPC-like MYB4 (TRICHOMELESS2) and CPL4-related transcripts in Arabidopsis
Int. J. Mol. Sci.
2012, 13, 3478-3491 (査読有)
10.3390/ijms13033478

R. Tominaga-Wada, M. Iwata, Y. Nukumizu, R. Sano, T. Wada
A full-length R-like basic-helix-loop-helix transcription factor is required for anthocyanin upregulation whereas the N-terminal region regulates epidermal hair formation
Plant Science
2012, 183, 115-122 (査読有)
10.1016/j.plantsci.2011.11.010

Rumi Tominaga-Wada, Yuka Nukumizu, Takuji Wada
Amino acid substitution converts WEREWOLF function from an activator to a repressor of Arabidopsis non-hair cell development
Plant Science
2012, 183, 37-42 (査読有)
10.1016/j.plantsci.2011.11.001

Rumi Tominaga-Wada, Tetsuya Ishida, Takuji Wada
New insights into the mechanism of development of Arabidopsis root hairs and trichomes
2011, 286, 67-106 (査読有)
10.1016/B978-0-12-385859-7.00002-1

Rumi Tominaga-Wada, Mineko Iwata, Yuka Nukumizu, Takuji Wada
Analysis of IIIId, IIIe and IVa group basic-helix-loop-helix proteins expressed in Arabidopsis root epidermis
Plant Science
2011, 181, 471-478 (査読有)
10.1016/B978-0-12-385859-7.00002-1

〔学会発表〕(計 1件)

富永 るみ

シロイヌナズナの表皮細胞分化に関わる
R-like bHLH 転写因子の機能
日本植物生理学会年会,
平成24年3月18日, 京都産業大学

〔図書〕(計 1件)

富永 るみ

植物細胞壁 第7章解析法
7.1.4 顕微フーリエ変換赤外分光分析
講談社 2013,264-265

6. 研究組織

(1)研究代表者

富永 るみ (TOMINAGA RUMI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・講師

研究者番号: 20373334