

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011年度～2012年度

課題番号：23770042

研究課題名（和文） 植物の有限成長と無限成長を切り替える分子機構の解析

研究課題名（英文） Study on the determinant and indeterminate growth regulation during leaf development in plants.

研究代表者 小山 知嗣 (KOYAMA TOMOTSUGU)
京都大学大学院・生命科学研究科・研究員

研究者番号：90450668

研究成果の概要（和文）：

高等植物の体制構築において、有限成長と無限成長を適切に制御することは重要である。本課題では、これまで示されてきたように、TCP 転写因子が葉の形態を制御するだけでなく、有限成長の最終段階である老化に至るまでの過程を包括的に制御することと、その制御下で ERF 転写抑制因子が老化進行を促進することを明らかにした。特に、ERF 転写抑制因子がプロテアソームタンパク質分解系による活性調節を受けることを示すとともに、ERF 転写抑制因子の直接的な標的遺伝子を同定し、ERF 転写抑制因子による老化進行制御の詳細を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This work clarified a role of TCP transcription factors in the progression of leaf senescence in plants. The control of transcriptional activation of class II ERF transcriptional repressor genes by TCPs suggests a link between these TCPs and ERFs. It also characterized a regulatory cascade involving class II ERFs in the progression leaf senescence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000 円	1,050,000 円	4,550,000 円

研究分野：植物分子生物学・生理学

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：葉、形態形成、TCP 転写因子、ERF 転写因子、老化

1. 研究開始当初の背景

高等植物の発生では、メリステムのような無限成長する組織から、葉や花などの有限成長する器官が生じ、最終的に老化する。また、刺激に応じて、有限成長する器官から無限成長を示すカルスを経て、個体を再生することができる。つまり、有限成長と無限成長を適切に使い分けることが高等植物の体制維持

機構の根幹である。

このような重要性から、国内外で精力的な研究が行われ、有限成長と無限成長を制御する遺伝子がいくつか同定されているものの、その分子基盤の全容は明らかでない。

2. 研究の目的

本課題では、有限成長と無限成長の分子基盤とそれら2つの成長の転換機構を解明することを目的とし、遺伝子工学的な制御系構築のための基礎的知見とする。

研究代表者らの過去の研究から、種子植物のモデルであるシロイヌナズナでTCP転写因子ファミリーがメリステム形成遺伝子の発現を抑制することにより、葉の形成を制御することを明らかにしている。それゆえ、TCP転写因子ファミリーとそれらの下流で機能する遺伝子群が葉の成長制御に重要な役割を果たすと考えられていた。

TCP転写因子の下流で機能する遺伝子制御ネットワーク解析と、機能が似た5つのTCP転写因子遺伝子が欠失した *tcp* 五重変異体の表現系解析の過程で、TCP転写因子が葉の老化進行を制御することが見いだされた。老化は有限成長の最終段階における成長制御であるので、本課題では、葉の老化進行の制御に着目した詳細な解析を行うこととした。具体的には、TCP転写因子の制御系下流で、葉の老化進行の制御因子を同定するとともに、その機能調節機構の解析を行うことである。これらの解析から、TCP転写因子を起点として、葉の発生初期から老化に至る過程の遺伝子制御系の全容を解明することを研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 植物材料はタバコ培養細胞 XD6S とシロイヌナズナを用い、シロイヌナズナ T-DNA タグ遺伝子破壊株の確立のために、ゲノムDNAを鋳型としたPCRによる遺伝子型解析と、RT-PCR法による遺伝子発現解析を行った。

(2) シロイヌナズナの6番目の葉の形態およびクロロフィル含量、老化マーカー遺伝子 SAG12 の発現を指標にして、老化の表現系を評価した。

(3) DNA コンストラクション、タンパク質蓄積量解析、遺伝子発現量解析は定法に従って行った。

(4) マイクロアレイは Agilent Arabidopsis V3 (4x44k) を用い、データは National Center for Biotechnology Information に登録した (アクセッション番号 GSE41053)。

(5) クロマチン免疫沈降は、Koyama et al. (2010) Plant Cell 22 3574-3588 に記載の方法に従って行った。

4. 研究成果

(1) *tcp* 五重変異体の表現系解析と老化マーカー遺伝子の発現解析から、TCP 遺伝子群が葉の老化進行を制御することを明らかにした。



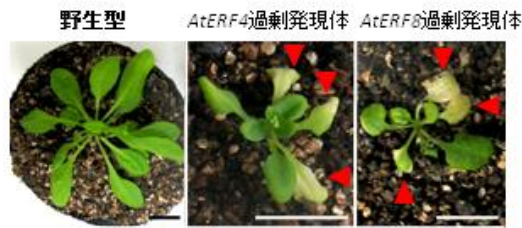
(2) 葉の老化進行に伴って、転写抑制型 ERF 転写因子 *AtERF4* と *AtERF8* 遺伝子の発現量が増加する一方、老化遅延の表現系を示す *tcp* 五重変異体では、その発現増加の遅延を認め、*AtERF4* と *AtERF8* の年齢依存的な制御と TCP 転写因子の関与を明らかにした。

(3) 過去の研究で、タバコの転写抑制型 ERF 転写因子である NtERF3 がユビキチン・プロテアソーム系のタンパク質と相互作用することを示したので (Koyama et al. 2003 J. Exp. Bot. 54 1175-1181)、NtERF3 のタンパク質安定性の評価を行った。NtERF3 を大腸菌で発現し、精製した後、タバコ培養細胞抽出液と混合することにより、試験管内で NtERF3 のタンパク質安定性を比較し、83-190 のアミノ酸領域が不安定化に重要で、DNA 結合領域や転写抑制領域とは独立した領域であることを明らかにした。

(4) NtERF3 と GFP との融合遺伝子を発現した形質転換タバコカサの GFP 蛍光観察とウエスタン解析を用いて、NtERF3 の細胞内における蓄積量を評価し、83-190 のアミノ酸領域が不安定化に重要であり、上記の試験管内実験と一致する結果を得た。

(5) NtERF3-GFP、および、*AtERF4*、*AtERF8* と HA タグとの融合遺伝子を発現する形質転換シロイヌナズナを作製し、プロテアソーム阻害剤による処理を行った後に、ウエスタン解析し、これら ERF が植物内でプロテアソームによるタンパク質安定性制御を受けることを明らかにした。

(6) 上記の形質転換シロイヌナズナを用いて、加齢に伴う *AtERF4* と *AtERF8* の蓄積量の増加を認めるとともに、それら植物の葉が、早期に老化の兆候を示すことを認めた。



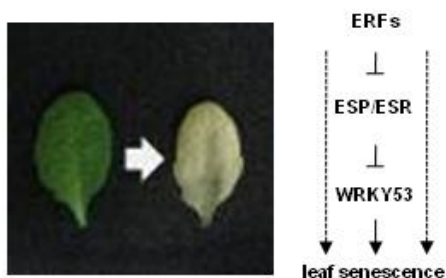
(7) *AtERF4* を過剰発現する形質転換シロイヌナズナのマイクロアレイおよび RT-PCR 解析を行い、*AtERF4* の下流遺伝子の発現プロファイルを明らかにした。特に、WRKY 転写因子遺伝子ファミリーなどの老化進行の促進遺伝子の発現量が上昇すること、逆に、*EPITHIOSPECIFIER PROTEIN/EPITHIOSPECIFYING SENESCENCE REGULATOR (ESP/ESR)* などの老化進行の阻害遺伝子の発現量が減少することを認めた。

(8) *aterf4 aterf8* 二重変異体を作製し、葉の老化進行が遅延する表現系を示すことと、老化制御遺伝子の発現変動を認めた。



(9) クロマチン免疫沈降法により、*AtERF4* と *AtERF8* が直接的に結合する標的遺伝子として、*ESP/ESR* を同定した。

(10) これらの解析から、葉の老化進行を制御する遺伝子発現制御系の中で、TCP 転写因子の下流で働く ERF 転写因子の位置づけを明らかにした。ERF 転写因子は老化進行阻害因子 *ESP/ESR* 遺伝子の発現を直接的に抑制する制御系を発見するとともに、*ESP/ESR* が WRKY 転写因子の機能を阻害するこれまでの知見と合わせて、下図に示すような ERF による老化進行の制御機構のモデルを提案した。



(11) 本課題から、TCP 転写因子を起点とし、葉の初期発生から老化に至る過程を制御する分子基盤を明らかにした。特に、複数の鍵制御因子間との機能的相互作用の重要性を示すことができ、成長転換を遺伝子工学的に制御するための基礎的な知見を得ることができた。さらにこれらの成果と合わせて、さまざまな組み合わせの *tcp* 遺伝子多重変異体の作製を構築しているため、今後は、TCP 転写因子、ならびに他の制御因子の機能を同時に、増強、あるいは阻害することにより、葉の発生における成長制御を遺伝子工学的に操作できると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

(1) *Koyama T, Nii H, Mitsuda N, Ohta M, Kitajima S, Ohme-Takagi M, Sato F.

A regulatory cascade involving class II ETHYLENE RESPONSE FACTOR transcriptional repressors operates in the progression of leaf senescence.

Plant Physiology (2013) in press

DOI: 10.1104/pp.113.218115

査読有

(2) Ono M, Hiyama S, Higuchi Y, Kamada H, Nitasaka E, Koyama T, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Sage-Ono K

Morphological changes in *Ipomoea nil* using chimeric repressors of *Arabidopsis* TCP3 and TCP5.

Plant Biotechnology 29 457-463 (2012).

DOI: 10.5511/plantbiotechnology.12.1010a

査読有

(3) *Koyama T, Sato F, Ohme-Takagi M

CRES-T for the functional analysis of transcription factors and modification of morphological traits in plants.

Current Biotechnology 1 23-32 (2012)

DOI: 10.2174/2211550111201010023

査読有

(4) Yamada Y, Koyama T, Sato F.
Basic Helix-Loop-Helix transcription
factors and regulation of alkaloids
biosynthesis
Plant Signaling Behavior 6 11 1627-1630
(2011).

DOI: 10.4161/psb.6.11.17599

査読有

(5) Yamada Y, Kokabu Y, Chaki K, Yoshimoto
T, Ohgaki M, Yoshida S, Kato N, Koyama T,
Sato F
Isoquinoline alkaloid biosynthesis is
regulated by a unique bHLH-type
transcription factor in *Coptis japonica*.
Plant Cell Physiology 52 1131-1141 (2011).

DOI: 10.1093/pcp/pcr062

査読有

(6) Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, Hiratsu
K, Kojima M, Arai T, Inoue Y, Seki M,
Sakakibara H, Sugimoto K, Ohme-Takagi M.
The AP2/ERF transcription factor WIND1
controls cell dedifferentiation in
Arabidopsis.

Current Biology 22 508-514 (2011).

DOI: 10.1016/j.cub.2011.02.020

査読有

(7) 小山知嗣
平らな葉を縮れ葉にしてわかったこと
~葉の形を決める新たな遺伝子ネットワーク
の発見~
「生物の科学 遺伝」第 65 巻 5 号 レビュー
2011 年 9 月号

査読無

[学会発表] (計 10 件)

(1) 招待講演 (計 4 件)

① 小山知嗣
植物特異的な転写因子の機能解析と葉の発
生分化における遺伝子発現制御に関する研
究
—日本植物細胞分子生物学会奨励賞受賞講
演—
第 30 回日本植物分子細胞生物学会 (生駒)
2012 年 8 月 2 日

② 小山知嗣
Regulation of leaf development by TCP
transcription factors
第 53 回日本植物生理学会 2012 年 3 月 17 日
(京都)

③ 小山知嗣
葉の形態の複雑さを決める TCP 転写因子の制
御ネットワーク
第 21 回植物バイオテクシンポジウム (京都) 2011
年 12 月 8 日

④ 小山知嗣
平らな葉を縮れ葉にしてわかったこと
京都産業大学生命科学セミナー (京都) 2011
年 5 月 13 日

(2) 一般講演 (計 6 件)

① 小山知嗣、新居遙、光田展隆、太田賢、
北島佐紀人、高木優、佐藤文彦
ERF 転写抑制因子の老化における役割とプロ
テアソームによる調節
第 54 回日本植物生理学会 (岡山) 2013 年 3
月 20 日

② 小山知嗣、新居遙、光田展隆、北島佐紀
人、高木優、佐藤文彦
ERF リプレッサーの安定性を介した細胞死の
制御
第 30 回日本植物分子細胞生物学会 (生駒)
2012 年 8 月 3 日

③ 小山知嗣、新居遙、光田展隆、北島佐紀
人、高木優、佐藤文彦
INVOLVEMENT OF AP2/ERF TRANSCRIPTIONAL
REPRESSORS IN CELL DEATH RESPONSES IN
ARABIDOPSIS
23TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON
ARABIDOPSIS RESEARCH (ウィーン市、オース
トリア) 2012 年 7 月 2 日

④ 小山知嗣、新居遙、北島佐紀人、高木優、
佐藤文彦
植物特異的 ERF 転写抑制因子のプロテアゾームによる制御とその機能の解析
日本農芸化学会 2012 年 3 月 25 日（京都）

⑤ 小山知嗣、新居遙、北島佐紀人、高木優、
佐藤文彦
リプレッサー型 ERF ドメイン転写因子の量的制御における植物のストレス応答と発生の制御
第 84 回日本生化学会（京都）2011 年 9 月 23 日

⑥ 小山知嗣、高木優、佐藤文彦
TCP 転写因子による器官形成の制御
第 29 回日本植物分子細胞生物学会（福岡）
2011 年 9 月 6 日

〔その他〕

小山知嗣
日本植物細胞分子生物学会奨励賞受賞
「植物特異的な転写因子の機能解析と葉の発生分化における遺伝子発現制御に関する研究」
2012 年 8 月 2 日

5. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 知嗣 (KOYAMA TOMOTSUGU)
京都大学大学院・生命科学研究科・研究員
研究者番号：90450668

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし