

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770045

研究課題名(和文) エンハンセオソーム転写因子複合体の形成による植物細胞死の誘導の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism for the induction of plant cell death by forming enhanceosome transcription factor protein complex

研究代表者

上中 弘典(KAMINAKA, Hironori)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：40397849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：植物の細胞死誘導機構の解明のために、シロイヌナズナの細胞死制御因子LSD1、及びLSD1と相互作用するAtbZIP10の機能解析を行ってきた。本研究では、細胞死誘導に関わるAtbZIP10がAtbZIP53、ABI3と共に強い転写活性化能をもつ転写因子複合体エンハンセオソームを形成するという知見を基に、AtbZIP10を含むエンハンセオソーム転写因子複合体による細胞死誘導における転写活性化メカニズムを解明することを目的とした。その結果、AtbZIP10は他の転写因子とエンハンセオソーム転写因子複合体を形成することで、細胞死誘導に直接関与する遺伝子群の転写活性化を行っていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism for induction of cell death in plants, we have analyzed the function of cell death regulator LSD1 and its interacting bZIP transcription factor AtbZIP10 in Arabidopsis so far. Recently it has been reported that the seed maturation genes are transcriptionally regulated by a protein complex of transcription factors with strong transcription activity termed enhanceosome, formed by AtbZIP10, AtbZIP53 and ABI3. Here, we examined the possibility that this enhanceosome participates in transcriptional regulation for induction of cell death. Taken all our results, we suggested that AtbZIP10 activates transcription for the genes directly involved in induction of cell death by forming enhanceosome with other transcription factors.

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・生理学

キーワード：転写因子 細胞死 シロイヌナズナ エンハンセオソーム タンパク質間相互作用 転写制御

1. 研究開始当初の背景

プログラム細胞死は生物に利益をもたらす遺伝的に制御された積極的な細胞レベルでの死である。植物において、細胞死が病害抵抗性を始めとする防御応答や器官形成等の高次機能の制御に幅広く関与することが明らかになってきているが、細胞死の誘導に直接関わる転写制御メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。

(1)モデル植物であるシロイヌナズナの細胞死の負の制御因子 *LSD1* タンパク質と相互作用する *AtbZIP10* の核-細胞質間移行が、細胞死の誘導機構に密接に関わることを見いだした(Kaminaka et al., EMBO J., 2006)。また *IAA8* などの複数の細胞死の誘導に関わる転写因子と *LSD1* が相互作用することも明らかにしている。

(2)*AtbZIP10* の標的遺伝子や転写制御機構に関する詳細な知見はこれまでに得られていないが、別の研究グループにより、*AtbZIP10* は *AtbZIP53*、*ABI3* と共に「エンハンセオソーム」という転写活性化能が非常に強い転写因子複合体を形成することで、貯蔵タンパク質の蓄積や浸透圧調節などに関わる遺伝子群の転写制御を行っていることが報告されている(Alonso et al., Plant Cell, 2009)。

(3)共発現解析、シス配列の解析等により、細胞死誘導に関わる γ *VPE* と *LSD1* が *AtbZIP10* の直接の標的遺伝子である可能性が強く示された。

2. 研究の目的

AtbZIP10 を含むエンハンセオソームに注目し、シロイヌナズナにおいてエンハンセオソームによる細胞死誘導遺伝子の転写制御に関する研究を行うことで、植物細胞死の誘導の転写制御の分子機構の全体像を明らかにすることを目的とする。

(1)ノックアウト変異体を用いた発現解析や表現型解析により、*AtbZIP10*、*AtbZIP53* とエンハンセオソームを形成する *ABI/VP1* 転写因子を同定する。また、これら3種類のタンパク質間の相互作用と細胞内局在性を詳細に明らかにする。

(2)*AtbZIP10* の直接の標的遺伝子の候補である γ *VPE* と *LSD1* が実際にエンハンセオソームにより転写活性化を受けていることを、遺伝子の一過的発現系を用いたレポーターアッセイによる解析や、クロマチン免疫沈降(Ch-IP)法を用いた解析により明らかにする。

3. 研究の方法

(1)シロイヌナズナの11種類の *ABI3/VP1* 転写因子について、全ての遺伝子の T-DNA 挿入機能欠損変異体について、ヒートショック等の細胞死誘導処理による表現型を解析することで、細胞死の誘導に関わるエンハンセオソームの形成に関わる *ABI3/VP1* 転写因子

の候補の同定を試みた。

(2)酵母ツーハイブリット(Y2H)法を利用して、*AtbZIP10*-*AtbZIP53* 間の相互作用を調べた。

(3) *AtbZIP10*、*AtbZIP53*、及び *ABI3* の細胞内局在部位を、これらタンパク質に GFP を付加したタンパク質をシロイヌナズナの葉肉プロトプラストで一過的に発現させることにより調査した。

(4)*AtbZIP10* の過剰発現体、機能欠損変異体における標的候補遺伝子群の発現量を RT-PCR 法を用いて解析した。

(5) γ *VPE* と *LSD1* のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に融合したコンストラクトを作成し、*AtbZIP10*、*AtbZIP53*、*ABI3/VP1* によるこれらの遺伝子の転写活性化について、植物細胞における遺伝子の一過的発現系を用いたルシフェラーゼアッセイによるプロモーター活性の測定結果を指標に詳細に調査した。

(6) *AtbZIP10* 過剰発現植物を用い、ChIP-PCR 法により γ *VPE* と *LSD1* のプロモーター領域上に *AtbZIP10* が直接結合していることを検証した。

4. 研究成果

(1)11種類の *ABI3/VP1* 転写因子の機能欠損変異体にヒートショック処理等を行うことで、細胞死を誘導したが、野生型植物と比較して有為な差は観察されなかった。細胞死関連処理により遺伝子発現が誘導される遺伝子が複数存在していたので、機能の冗長性等により、単一遺伝子の変異体では表現型の変化が観察できなかった可能性が示唆される。

(2)Y2H法により *AtbZIP10*-*AtbZIP53* 間の相互作用を詳細に調べた結果、これらタンパク質は DNA に結合する bZIP ドメインを介して結合していることが明らかになった(図1)。本結果から、*AtbZIP10* と *AtbZIP53* はヘテロダイマーを形成して標的遺伝子に直接結合していると考えられる。

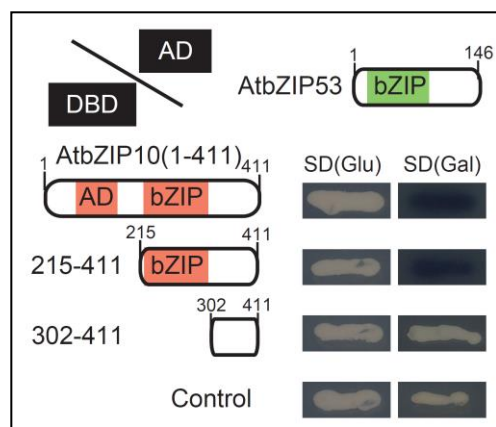


図1 酵母のツーハイブリット法を用いた *AtbZIP10*-*AtbZIP53* 間の相互作用解析

(3) GFP 蛍光を指標に AtbZIP10、AtbZIP53、及び ABI3 の細胞内局在部位を調べた結果、AtZIP53 と (At)ABI3 は核のみに局在しているのに対し、AtbZIP10 はこれまでの報告 (Kaminaka et al., EMBO J., 2006) 通り、核と細胞質の両方に局在していた (図 2)。これらの結果から、細胞質から核へ移行することにより AtbZIP10 がトリガーとして機能する可能性が示唆された。

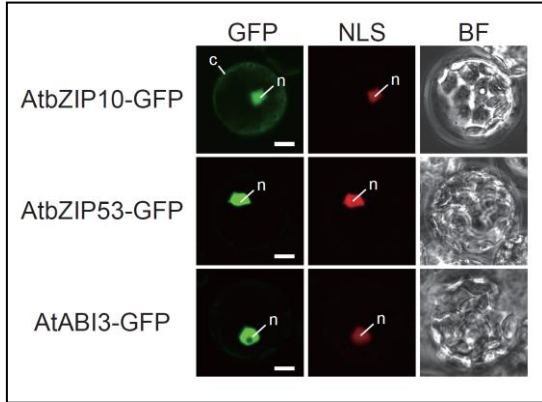


図 2 GFP 蛍光を指標にした AtbZIP10、AtbZIP53、ABI3 の細胞内局在性の解析

(4) RT-PCR 法を用いて AtbZIP10 の過剰発現体である *35Sp::AtbZIP10-GFP* と、機能欠損変異体 *atbzip10-1* における標的候補遺伝子群の発現量を解析した結果、既にエンハンセオソームにより転写活性化を受けると報告されている *ProDH* (Alonso et al., Plant Cell, 2009) と同様に、過剰発現体における γ VPE と *LSD1* の発現量の劇的な増加は観察されなかった (図 3)。本結果から、これらの遺伝子の劇的な転写活性化には AtbZIP10 だけでなく、AtbZIP53 や ABI3 といったエンハンセオソームを構成する転写因子の機能が必須であることが示された。

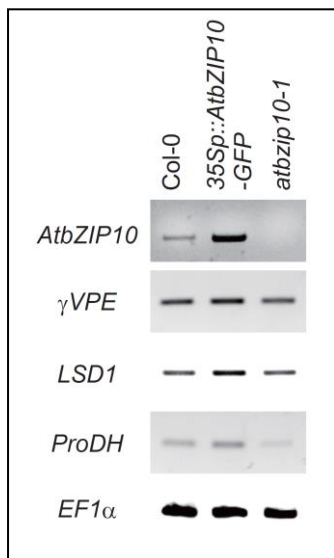


図 3 AtbZIP10 過剰発現体、機能欠損変異体における標的候補遺伝子群の発現解析

(5) γ VPE と *LSD1* について、AtbZIP10 を中心としたエンハンセオソームによる転写

活性化を調査したところ、AtbZIP10、AtbZIP53、ABI3 を同時に発現させた場合のみ両遺伝子が強く転写活性化された (図 4)。本結果から、これらの遺伝子が AtbZIP10 を含むエンハンセオソームの標的遺伝子であり、エンハンセオソームの形成により強く転写活性化されることが明らかになった。

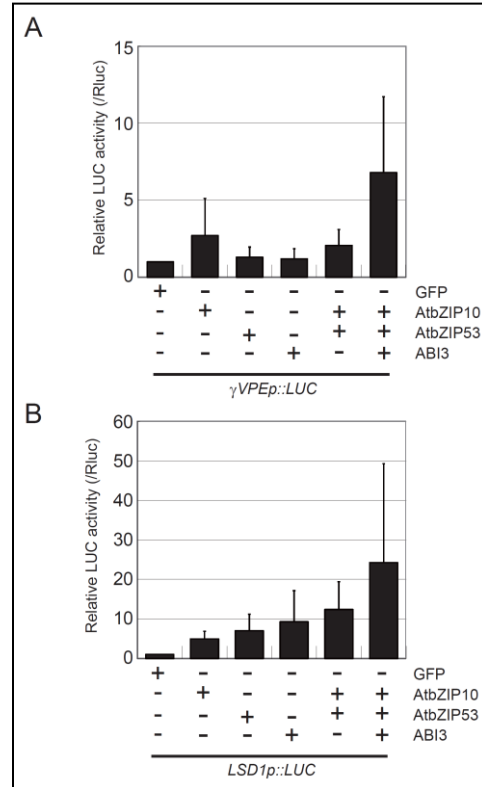


図 4 エンハンセオソームによる (A) γ VPE と (B) *LSD1* の転写活性化レベルの解析

(6) AtbZIP10 の過剰発現体を用いた ChIP-PCR 法による解析の結果、AtbZIP10 の標的遺伝子として報告されている *ProDH* (Alonso et al., Plant Cell, 2009) と同様に、 γ VPE と *LSD1* のプロモーター領域に AtZIP10 が直接結合していることが明らかになった (図 5)。

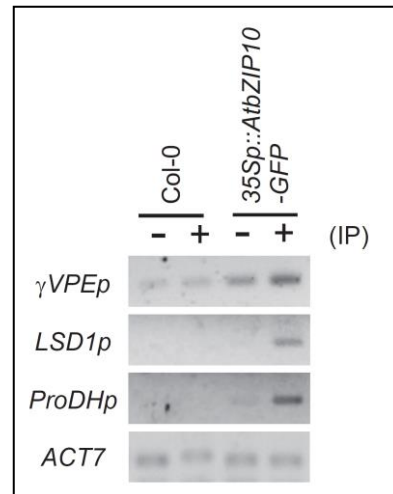


図 5 クロマチン免疫沈降法を用いた AtbZIP10 と標的遺伝子のプロモーター領域との結合解析

これらの結果から、AtbZIP10 は他の転写因子とエンハンセオソーム転写因子複合体を形成することで、 γ VPEや LSD1 といった細胞死誘導に直接関与する遺伝子の転写活性化を行っているという、植物細胞死の誘導の転写制御の分子機構に関する新しい知見が得られた。

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 Ifuku, S., Ikuta, A., Egusa, M., Kaminaka, H., Izawa, H., Morimoto, M. and Saimoto, H.: Preparation of high-strength and transparent chitosan film reinforced with surface deacetylated chitin nanofibers. Carbohydr. Polym., 98, 1198-1202, 2013, 査読有
- ② Mase, K., Ishihama, N., Mori, H., Takahashi, H., Kaminaka, H., Kodama, M. and Yoshioka, H.: Ethylene-responsive AP2/ERF transcription factor MACD1 participates in phytotoxin-triggered programmed cell death. Mol. Plant Microbe Interact., 26, 868-879, 2013, 査読有
- ③ Egusa, M., Miwa, T., Kaminaka, H., Takano, Y. and Kodama, M.: Nonhost resistance of Arabidopsis thaliana against Alternaria alternata involves both pre- and post invasive defenses but is collapsed by AAL-toxin in the absence of LOH2. Phytopathology, 103, 733-740, 2013, 査読有
- ④ Kim, M-H., Sonoda, Y., Sasaki, K., Kaminaka, H. and Imai, R.: Interactome analysis reveals versatile functions of Arabidopsis COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 in RNA processing within the nucleus and cytoplasm. Cell Stress and Chaperones, 18, 517-525, 2013, 査読有
- ⑤ Arase, F., Nishitani, H., Egusa, M., Nishimoto, N., Sakurai, S., Sakamoto, N. and Kaminaka, H.: IAA8 involved in lateral root formation interacts with the TIR1 auxin receptor and ARF transcription factors in Arabidopsis. PLoS ONE, 7, e43414, 2012, 査読有
- ⑥ Morita, S., Tsukamoto, S., Sakamoto, A., Makino, H., Nakauji, E., Kaminaka, H., Masumura, T., Ogihara, Y., Satoh, S. and Tanaka, K.: Differences in intron-mediated enhancement of gene expression by the first intron of cytosolic superoxide dismutase gene from rice in monocot and dicot plants. Plant Biotech., 29, 115-111, 2012, 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ①荒瀬文、西本奈未、柴田至、天野晃彰、上中弘典: シロイヌナズナの細胞死制御因子 LSD1 は Aux/IAA との相互作用を介してオーキシン応答を制御する、富山大学、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 日
- ②土井彩加、小泉陽平、上中弘典: エンハンセオソーム転写因子複合体による細胞死誘導関連遺伝子群の転写活性化メカニズムの解明北海道大学、日本植物学会第 77 回大会、2013 年 9 月 14 日
- ③荒瀬文、西本奈未、天野晃彰、上中弘典: シロイヌナズナの細胞死制御因子 LSD1 は Aux/IAA との相互作用を介してオーキシン応答を活性化する、北海道大学、日本植物学会第 77 回大会、2013 年 9 月 13 日
- ④中口翔太、中村歩、天野晃彰、高林賢吾、中川強、上中弘典: 植物の LSD1 ホモログ遺伝子群の分子進化と機能解析、岡山大学、第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 22 日
- ⑤土井彩加、小泉陽平、上中弘典: エンハンセオソーム転写因子複合体による細胞死誘導関連遺伝子群の転写活性化、岡山大学、第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 22 日
- ⑥長田翔太郎、山本優香、三賀森浩紀、東出真樹子、万庭哲也、柴田哲平、江草真由美、児玉基一朗、上中弘典: シロイヌナズナの微小管プラス端集積因子 AtEB1 は細胞死の誘導と Alternaria brassicicola に対する抵抗性に関与する、とりぎん文化会館、平成 24 年度日本植物病理学会関西西部会、2012 年 9 月 28 日
- ⑦Hironori Kaminaka, Nami Nishimoto, Fumi Arase, Kengo Takabayashi, Keita Nishide, Nuria Sanchez Coll, Petra Epple, Ben F. Holt III, Jeffery L. Dangl: Involvement of auxin transcriptional repressor IAA8 on the regulation of programmed cell death via direct interaction with LSD1 in Arabidopsis, XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions、国立京都国際会館、2012 年 8 月 2 日
- ⑧Mayumi Egusa, Takuya Miwa, Hironori Kaminaka, Atsushi Ishikawa, Yoshitaka Takano, Motoichiro Kodama: PEN and jasmonic acid mediate resistance in Arabidopsis against Alternaria alternata infection, XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions、国立京都国際会館、2012 年 8 月 2 日
- ⑨Keisuke Mase, Nobuaki Ishihama, Hitoshi Mori, Hideki Takahashi, Hironori Kaminaka, Motoichiro Kodama, Hirofumi Yoshioka: Ethylene responsive AP2/ERF transcription factor MACD1 participates in phytotoxin triggered programmed cell death, XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions、国立

京都国際会館、2012年8月2日

⑩江草真由美、三輪琢也、上中弘典、石川敦司、高野義孝、児玉基一郎：Alternaria alternata 感染に対するシロイヌナズナの非宿主抵抗性におけるサリチル酸 (SA) およびジャスモン酸 (JA) シグナル経路の関与平成24年度日本植物病理学会大会、福岡国際会議場、2012年3月28日

⑪Mayumi Egusa, Takuya Miwa, Hironori Kaminaka, Yoshitaka Takano, Motoichiro Kodama : PEN2 and PEN3 are involved in pre-invasion resistance of Arabidopsis thaliana against Alternaria alternata, the 2nd Korea and Japan Joint Symposium, 福岡国際会議場、2012年3月27日

⑫間瀬圭介、石濱伸明、森 仁志、高橋英樹、上中弘典、児玉基一郎、吉岡博文：毒素細胞死に関与する AP2/ERF 型転写因子である AtMACD1 の機能解析平成24年度日本植物病理学会大会、福岡国際会議場、2012年3月28日

⑬中口翔太、栗林祥子、西本奈未、上中弘典：シロイヌナズナの翻訳伸長因子 eEF1 α は基礎抵抗性の誘導に関与する、第53回日本植物生理学会年会、京都産業大学、2012年3月16日

⑭間瀬圭介、石濱伸明、森 仁志、上中弘典、児玉基一郎、吉岡博文：AP2/ERF 型転写因子である AtMACD1 は毒素細胞死に関与する、第53回日本植物生理学会年会、京都産業大学、2012年3月16日

⑮栗林祥子、西本奈未、上中弘典：細胞死を誘導する lsd1 変異体のマイクロアレイ解析によるシロイヌナズナの新奇病害抵抗性関連遺伝子の探索：翻訳伸長因子 eEF1 α は基礎抵抗性の誘導に関与する、平成23年度日本植物病理学会関西支部会、サンポート高松、2011年10月2日

⑯江草真由美、上中弘典、高野義孝、児玉基一郎：Alternaria alternata 感染に対するシロイヌナズナの非宿主抵抗性には PEN2 および PEN3 が関与する、平成23年度日本植物病理学会関西支部会、サンポート高松、2011年10月

⑰間瀬圭介、石濱伸明、森 仁志、上中弘典、児玉基一郎、吉岡博文：Fumonisin B1 毒素細胞死に関与する AtMACD1 によって制御される遺伝子の探索、平成23年度日本植物病理学会関西支部会、サンポート高松、2011年10月1日

⑱荒瀬 文、西本奈未、石原 亨、上中弘典：シロイヌナズナのオーキシン応答における細胞死制御因子 LSD1 の機能解析、日本植物学会第75回大会、東京大学、2011年9月19日

[その他]

アウトリーチ活動情報：

「植物の遺伝子組換えについてもっと知ろう！！～DNA と光る細胞の植物観察を体験

～」：日本学術振興会・ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI (平成23年8月10日～平成23年8月11日、平成24年8月7日～平成24年8月8日、平成25年8月6日～平成25年8月7日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

上中 弘典 (KAMINAKA, Hironori)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：40397849