

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25440057

研究課題名(和文) 転写因子の制御機構解析による植物の環境刺激応答能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of environmental response with analyzing the regulatory system of transcription factors

研究代表者

柳川 由紀 (YANAGAWA, YUKI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・特別研究員

研究者番号：90432591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物は様々な環境刺激を受けており、それぞれにどう反応するか、どのような機構になっているかを目的として本研究を行った。研究成果としては、研究のためのツール作りとして、転写因子を過剰発現する植物の整備、制御因子の機能解析等に役立つ植物細胞への生体高分子導入技術の開発、を行った。さらに、環境刺激における機能解析に関しては、光刺激、オゾン刺激、等との関わりから研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Plants are subjected to various environmental stimuli. We performed this study with the aim of elucidation of environmental responses mechanisms in plants. As research results, we developed two kinds of research tools such as an overexpression library of each transcription factor and a new technique to introduce macromolecules into plant cells. Furthermore, we showed several research results regarding environmental stimuli at the points of light, ozone and so on.

研究分野：植物生理学、生化学、分子生物学、生物工学

キーワード：植物 環境刺激 ツール開発 機能解明 ユビキチン・プロテアソーム 転写因子 生体高分子導入
プラズマ

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物は動くことができないので、激しい環境変化に常にさらされている。そのため、植物は環境変化に適応するための技を持っている。シロイヌナズナゲノムには膨大な数の転写因子が存在しており、さらにそれらの多くが環境応答とかかわりがあると推測された。また、それら転写因子の多くが Ub・プロテアソーム系に関わっている可能性が高かった。

(2) 膨大な数の植物の転写因子、さらに Ub・プロテアソーム系の研究をやみくもに進めたのでは非効率である。そこで、これらの研究に必要なツール作りをする必要があった。

2. 研究の目的

(1) 植物の刺激応答能に着目し、植物の各種環境ストレスにおける制御機構を解明する。特に転写因子及び Ub・プロテアソーム系との関連について研究を進める。

(2) (1)の研究を進める上で必要なツール作りを行う。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナあるいはタバコに各種環境ストレス(光、オゾン等)を与え、生理機能に及ぼす影響について調べた。なお、ここでは適宜形質転換体を作成し、使用した。

(2) 転写因子解析ツール作りとして、シロイヌナズナの転写因子をクローニングし、野生型のシロイヌナズナ(CoI-0)に導入して転写因子を過剰発現する植物の作出を行った。

(3) 制御因子の機能解析等に役立つツールとして、プラズマを用いて DNA やタンパク質などの生体高分子を直接植物細胞に導入する技術の開発を行った。CO₂あるいは N₂ ガスで生成したプラズマを植物体に照射した後、生体高分子を含む溶液に植物体を浸した。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの転写因子を過剰発現させた形質転換体を 500 以上作出することができた。

(2) (1)で作出した転写因子の過剰発現体を用いて、各種単色光(赤、青、遠赤)への応答能を調べた。播種後 6-7 日目の芽生えを観察したところ、野生型とは異なる表現型を示す植物体を見つけることができた。

(3) MAP キナーゼは Ub・プロテアソーム系と関わりがある。本研究では、タバコの MAP キ

ナーゼの一種(MPK4-like)に着目して解析を行った。形質転換体を用いて解析したところ、MPK4-like がオゾン耐性、乾燥応答に関わることを明らかにした。

(4) CO₂あるいは N₂ ガスで生成したプラズマを照射したタバコ葉では、細胞に GFP 融合タンパク質を導入できた。また、シロイヌナズナの葉及びイネの根でも同様の結果が得られた。さらに、同様の方法で、タバコ葉の細胞にプラスミド DNA を導入することにも成功した。

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 7 件)

柳川由紀、沖野晃俊、光原一郎、プラズマ照射で植物細胞にたんぱく質を導入、化学と生物、56 巻、2017、15-17

柳川由紀、沖野晃俊、光原一郎、大気圧プラズマを用いた植物細胞へのタンパク質導入、バイオサイエンスとインダストリー、75 巻、2017、512-513

Y. Yanagawa, H. Kawano, T. Kobayashi, H. Miyahara, A. Okino, I. Mitsuhashi, Direct protein introduction into plant cells using a multi-gas plasma jet. PLoS ONE, 12, 2017, e0171942.

JP Hong, E. Adams, Y. Yanagawa, M. Matsui, R. Shin, AtSKIP18 and AtSKIP31, F-box subunits of the SCF E3 ubiquitin ligase complex, mediated the degradation of 14-3-3 proteins in Arabidopsis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 485, 2017, 174-180.

Y. Yanagawa, Yoda H, Osaki K, Amano Y, Aono M, Seo S, Kuchitsu K, Mitsuhashi I, Mitogen-activated protein kinase 4-like carrying an MEY motif instead of a TXY motif is involved in ozone tolerance and regulation of stomatal closure in tobacco. J. Exp. Bot. 64, 2016, 3471-3479.

K. Sako, Y. Yanagawa, T. Kanai, T. Sato, M. Seki, M. Fujiwara, Y. Fukao, J. Yamaguchi, Proteomic analysis of the 26S proteasome reveals its direct interaction with transit peptides of plastid protein precursors for their degradation. J. Proteome Res. 13, 2014, 3223-3230.

ML. Irigoyen, E. Iniesto, L. Rodriguez, MI. Puga, Y. Yanagawa, E. Pick, E. Stickland, J. Paz-Ares, N. Wei, G. De Jaeger, PL. Rodriguez, XW. Deng, V. Rubio, Targeted degradation of abscisic acid receptors is mediated by the ubiquitin ligase substrate adaptor DDA1 in Arabidopsis. Plant Cell, 26,

2014, 712-728.

〔学会発表〕(計 16 件)

Y. Yanagawa, H. Kawano, T. Kobayashi, H. Miyahara, A. Okino, I. Mitsuahara, Introduction of protein and DNA into plant cells by plasma toward application to breeding techniques. 2nd international workshop on plasma agriculture (IWOPA2), 2018

Y. Yanagawa, H. Kawano, T. Kobayashi, H. Miyahara, A. Okino, I. Mitsuahara, Direct introduction of macromolecules into plant cells using a multi-gas plasma jet. The 10th EU-Japan Joint Symposium on Plasma Processing (JSPP2017), 2017

柳川由紀, 川野浩明, 小林智裕, 宮原秀一, 沖野晃俊, 光原一郎, プラズマを用いた植物細胞への生体高分子導入および農業への利用可能性, Plasma Conference 2017, 2017

Y. Yanagawa, H. Kawano, T. Kobayashi, H. Miyahara, A. Okino, I. Mitsuahara, Protein introduction into plant cells by the irradiation of temperature-controlled atmospheric CO₂/N₂ plasma. Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 2017

柳川由紀, 光原一郎, プラズマ照射による植物細胞へのタンパク質導入 ~ 品種改良や開花コントロールへの応用へむけて ~, 第 19 回大気圧プラズマプロセッシング研究会講演・見学会, 2017

柳川由紀, 川野浩明, 小林智裕, 宮原秀一, 沖野晃俊, 光原一郎, マルチガスプラズマジェットを用いた植物細胞への生体高分子導入, 第 78 回応用物理学会秋季学術講演会, 2017

Y. Yanagawa, H. Kawano, T. Kobayashi, H. Miyahara, A. Okino, I. Mitsuahara, Direct introduction of macromolecules into plant cells using a multi-gas plasma jet. The 2nd International Symposium on Biomedical Engineering, 2017

柳川由紀, 川野浩明, 小林智裕, 宮原秀一, 沖野晃俊, 光原一郎, 大気圧プラズマを用いた植物細胞への直接タンパク質導入法の開発, 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017

柳川由紀, 川野浩明, 小林智裕, 宮原秀一, 沖野晃俊, 光原一郎, マルチガスプラズマジェットによる植物細胞へのタンパク質導入法, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会, 2017

Y. Yanagawa, H. Kawano, T. Kobayashi, H. Miyahara, A. Okino, I. Mitsuahara, Direct protein introduction into plant cells using a multi-gas plasma jet. The

1st International Symposium on Biomedical Engineering, 2016

嶋田勢津子, 近藤陽一, 吉積毅, 柳川由紀, 堀井陽子, 栗山朋子, 川島美香, 松井南, 機能誘導型転写因子過剰発現系統の作出とバイオマスの生産性向上に有用な遺伝子探索のための変異体探索, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016

柳川由紀, 川野浩明, 小林智裕, 宮原秀一, 沖野晃俊, 光原一郎, マルチガスプラズマジェットを用いた植物細胞への直接タンパク質導入法, 第 34 回日本植物細胞分子生物学会大会, 2016

柳川由紀, 佐古香織, 金井知行, 佐藤長緒, 藤原正幸, 深尾陽一郎, 山口淳二, シロイヌナズナ 26S プロテアソームはプラスチックタンパク質前駆体のトランジットペプチドと相互作用する, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015), 2015

柳川由紀, 依田寛, 大崎康平, 天野裕太, 青野光子, 瀬尾茂美, 朽津和幸, 光原一郎, タバコ、イネ、トマトには存在するが、シロイヌナズナには存在しない MEYモチーフを有する MAP kinase 4-like の解析, 第 33 回日本植物細胞分子生物学会大会, 2015

Y. Yanagawa, H. Kuroda, N. Takahashi, Y. Horii, M. Matsui, Comprehensive analysis of the interaction between F-Box and Arabidopsis SKP1-LIKE (ASK) proteins, their localization and their gene expression giving helpful information for predicting the function of SCF complexes in plants. 第 35 回内藤コンファレンス「ユビキチン-プロテアソームシステム;メカニズムから病態まで」, 2013

柳川由紀, 松井南, シロイヌナズナ F-Box タンパク質の網羅的解析と植物の機能解析で利用可能なツール紹介, 第 31 回日本植物細胞分子生物学会大会, 2013

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: プラズマを用いて植物細胞内に物質を導入する方法

発明者: 光原一郎 (10%), 柳川由紀 (40%), 沖野晃俊 (22%), 宮原秀一 (7%), 川野浩明 (7%), 小林智裕 (7%), 渡辺洋輔 (7%)

権利者: 農業・食品産業技術総合研究機構, 東京工業大学

種類: 特許

番号: WO2018016217A1, 特願 2016-141638

出願年月日: 2016 年 7 月 19 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳川 由紀 (YANAGAWA, Yuki)
農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・特別研究員
研究者番号：90432591

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

松井 南 (MATSUI, Minami)
理化学研究所・環境資源科学研究センター・グループディレクター
研究者番号：80190396

(4) 研究協力者

()