

令和元年5月25日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07393

研究課題名(和文) 転写制御因子群による光合成装置形成のオン・オフ制御の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Studies on Functions of Transcription Factors That Regulate Assembly of Photosynthesis Machinery

研究代表者

増田 建 (Masuda, Tatsuru)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00242305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、葉緑体分化において、光合成遺伝子の協調的な転写調節に関わる転写制御因子群による光合成装置形成のオン・オフ制御の分子メカニズムの解明を目的として解析を行った。その結果、GARP型転写因子GLKとGATA型転写因子GNC/CGAが異なる標的遺伝子の発現を活性化することで、光化学系の構築に異なる役割を果たすことを明らかにした。さらに新たなGLK結合配列を予測することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、葉緑体分化および光合成装置形成の制御機構を明らかにする上で重要な学術的意義を持つだけでなく、植物に新たな光合成組織を創出する技術にも繋がり、将来における農学的な応用にも発展させることが期待できる。実際、葉緑体分化を促進させた植物体では、その光合成能力が向上するだけでなく、病虫害に対する抵抗性が高まるのが最近明らかとなっており、その応用価値は非常に高い。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of coordinate transcriptional regulation of photosynthesis-associated nuclear genes (PhANGs) by multiple transcription factors, here we studied the functions of transcription factors that regulate the assembly of photosynthesis machinery. In summary, we demonstrated that GARP-type GLK and GATA-type GNC/CGA induce distinct PhANGs sets, suggesting both transcription factors distinctly regulate the assembly of photosystems. Furthermore, we have succeeded in prediction of novel GLK binding sequence.

研究分野：植物生理学

キーワード：葉緑体 クロロフィル 転写因子 核コード光合成関連遺伝子 共発現

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体はシアノバクテリアの細胞内共生によって植物細胞にもたらされ、単細胞緑藻から高等植物に至るまで、光合成反応の場として光エネルギー変換を一手に担っている。陸上植物へと進化する過程で、植物は葉緑体を様々な機能を持つ色素体へと分化させ、多様な環境条件に適応していった。実際、高等植物では、発芽初期には未分化な原色素体から、葉肉細胞では細胞全体に葉緑体が発達する一方、根や花弁では葉緑体形成は抑制され、色素体はアミロプラストやクロモプラストに分化している(図1)。

我々は、これまでに葉緑体分化において、複数の転写制御因子が共同して光合成装置形成に関わる遺伝子群を協調的に転写調節するメカニズムが存在することを明らかにしてきた(Masuda & Fujita 2008 PPS, Kobayashi *et al.* 2012 Plant Cell)。実際、20以上の光合成遺伝子が共発現しており、これらのプロモーター領域には共通したシス配列が保存されていることを見出した(表1)(Kobayashi *et al.* 2012 Plant Signal Behavior)。更なる解析の結果、光合成装置形成を調節する転写制御因子として、光シグナル下流のbZIP型転写因子HY5とサイトカイニンおよびオーキシシグナルの下流にあるGARP型転写因子GLK(GLK1及びGLK2)が機能していることを明らかにした(Kobayashi *et al.* 2012 Plant Cell)。実際、サイトカイニンとオーキシンはGLKの発現を介して、光合成装置形成をそれぞれオンとオフに制御している。さらにGLKの過剰発現株では非光合成組織である根において、顕著な光合成装置の形成が促進され、光合成による光独立栄養成長が可能になることを明らかにした(Kobayashi *et al.* 2013 Plant Cell Physiol)。また近年、GATA型転写因子(GNC、CGA)が光合成装置形成をオンにすることが示された。以上のことから、光合成装置の形成は複数の転写制御因子群がお互いに相互作用しながら、そのオン・オフを制御していることが次第に明らかとなってきた(図2)。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、上記の研究をさらに発展させるため、転写因子群による転写調節機構を解明し、実際にこれらの転写制御因子群を改変した植物体における光合成能力の評価を行う。以上の研究を通して、転写制御因子群による光合成装置形成のオン・オフ制御の分子メカニズムの解明に取り組むことを目的とした。

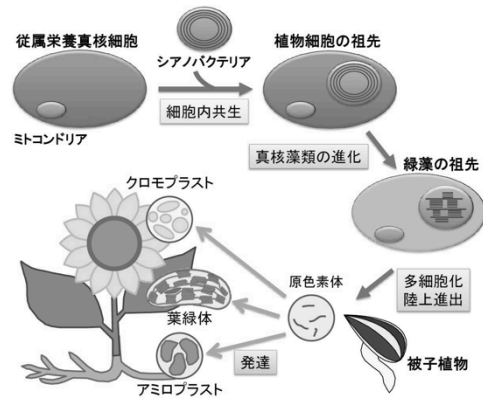


図1 植物進化における葉緑体獲得と、多細胞化に伴う色素体分化制御

表1 共発現する光合成関連遺伝子のプロモーター領域に保存されているシス配列。GHMはモチーフを持つ遺伝子数を表す。共発現する遺伝子にはG-boxとGLK認識配列が高い確率で共存している。

Motif	GHM/co-expressed genes <sup>a</sup>	GHM/all genes <sup>b</sup>	p-value <sup>c</sup>
CCACGT (G-box)	12/20	3351/31374	8.6E-09
CCAATC (GLK recognition)	12/20	6206/31374	1.3E-05
CCACGT and CCAATC	10/20	701/31374	9.0E-14

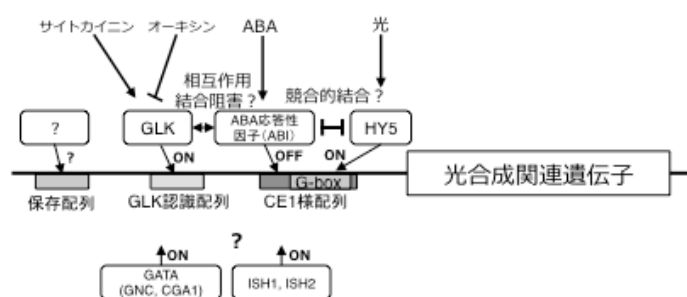


図2 複数の転写制御因子群による光合成装置形成のオン・オフ制御のモデル図

### 3. 研究の方法

#### (1) 光合成関連遺伝子のプロモーター領域に対する転写因子の結合および転写調節機構の解析

本研究では、サイトカイニンおよび GLK1/2 および GNC/CGA により活性化される遺伝子を包括的に調べるために、次世代シーケンサーを用いた RNAseq 解析を行った。

#### (2) 転写制御因子群を改変した植物体における光合成能力の評価

上記の解析により同定された転写制御因子については、過剰発現株についての表現型解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 光合成関連遺伝子のプロモーター領域に対する転写因子の結合および転写調節機構の解析

サイトカイニン (BA) および GLK1、GLK2、GNC および CGA の過剰発現体(ox)において発現が変化する遺伝子について網羅的に調査を行った (図3)。それぞれの条件において、遺伝子発現が上昇する遺伝子、抑制される遺伝子を同定した。クラスター解析 (図4) により、GNCox と CGAox 間では、同じ遺伝子変化を示していることが明らかになったが、GLK1ox と GLK2ox 間では有意な差が認められた。また BA 処理と GLK2ox は同じ階層であったが、GLK1ox は異なる階層となることが分かった。以上のことから、GATA 転写因子である GNC と CGA はほぼ同じ機能を有し、共通した遺伝子を標的とするのに対して、GLK1 と GLK2 は異なる遺伝子を標的とすることが明らかとなった。さらに GLK により発現が誘導される遺伝子群について、プロモーター領域の解析を行った結果、新たな配列 (GATAAG) が有意に保存されていることを見出した (図5)。この配列は、以前、共発現する光合成遺伝子のプロモーター領域に有意に保存されていた配列 (Kobayashi *et al.* 2012 Plant Signal Behavior) と一致したことから、新たな GLK 結合配列である可能性が高いと考えられる。今後、レポーター解析により詳細な研究を行っていく予定である。

また、GLK および GNC/CGA の変異体および過剰発現体における光化学系の構築について、クロロフィル蛍光による解析を行った (図6)。その結果、GNCox および CGAox では、光化学系 II の実効量子収率 (YII) の向上が認められたのに対して、GLK1ox は野生株と変わらない結果が得られた (図6

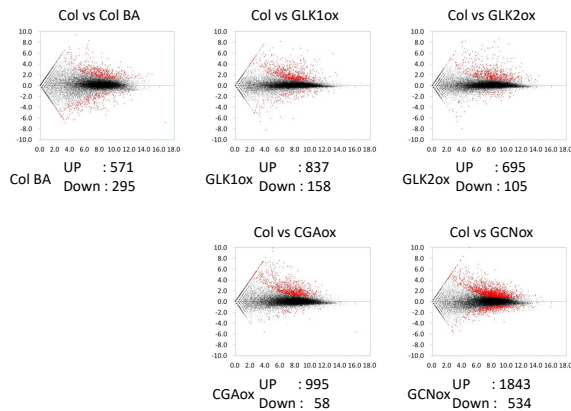


図3 RNAseq 解析の MA plot。UP は発現が上昇している遺伝子、DOWN は抑制している遺伝子を示す。

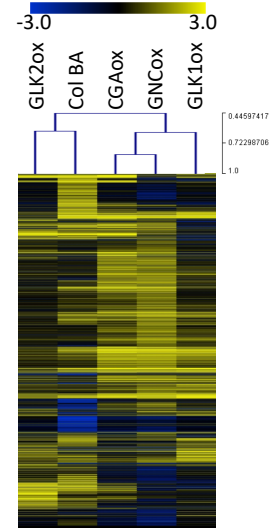


図4 遺伝子発現のクラスター解析の結果

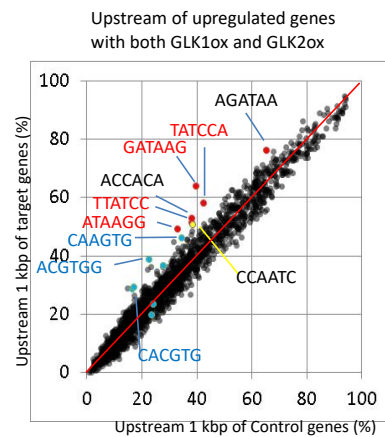


図5 GLK により誘導される遺伝子のプロモーター領域解析の結果

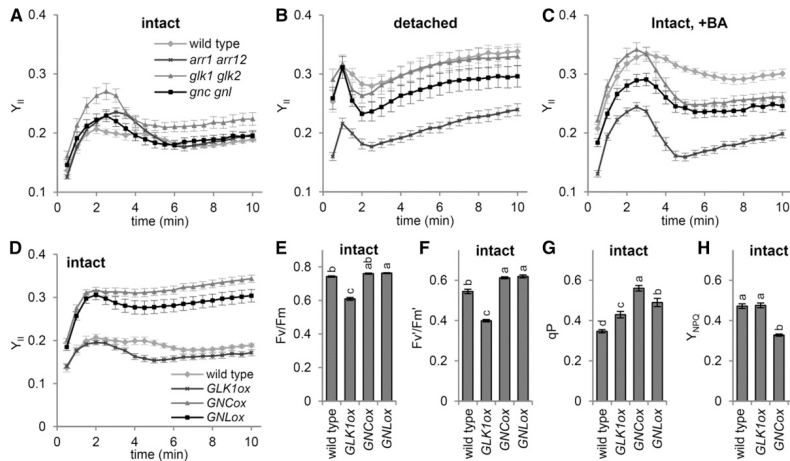


図6 GLK および GNC/CGA 変異体および過剰発現体におけるクロロフィル蛍光のパラメーターの変化。

異なる標的遺伝子の発現を活性化することで、光化学系の構築に異なる役割を果たすことが明らかになった。さらに新たな GLK 結合配列を予測することに成功した。従って、研究期間内に当初の想定以上の成果を治めることに成功したと考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Fujii S, Nagata N, Masuda T, Wada H, Kobayashi K (2019) Galactolipids are essential for internal membrane transformation during etioplast-to-chloroplast differentiation. *Plant Cell Physiol.* 印刷中. doi: 10.1093/pcp/pcz041. (査読有)
- ② 藤井祥、永田典子、増田建、和田元、小林康一 (2018) エチオプラストの発達と葉緑体への分化過程におけるガラクト脂質の役割. *光合成研究.* 28: 139-147. (査読有)
- ③ Fujii S, Kobayashi K, Nagata N, Masuda T, Wada H (2018) Digalactosyldiacylglycerol is essential for organization of the membrane structure in etioplasts. *Plant Physiol.* 177(4): 1487-1497. doi: 10.1104/pp.18.00227. (査読有)
- ④ Kobayashi K, Ohnishi A, Sasaki D, Fujii S, Iwase A, Sugimoto K, Masuda T, Wada H (2017) Shoot removal induces chloroplast development in roots via cytokinin signaling. *Plant Physiol.* 173: 2340-2355. doi: 10.1104/pp.16.01368. (査読有)
- ⑤ Fujii S, Kobayashi K, Nagata N, Masuda T, Wada H (2017) Monogalactosyldiacylglycerol facilitates synthesis of photoactive protochlorophyllide in etioplasts. *Plant Physiol.* 174: 2183-2198. doi: 10.1104/pp.17.00304. (査読有)
- ⑥ Espinas NA, Kobayashi K, Sato Y, Mochizuki N, Takahashi K, Tanaka R, Masuda T (2016) Allocation of Heme is Differentially Regulated by Ferrochelatase Isoforms in *Arabidopsis* Cells. *Front. Plant Sci.* 7: Article 1326. doi: 10.3389/fpls.2016.01326. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Masuda T, Shimizu T, Mochizuki N, Nagatani A, Watanabe S, Kacprzak S, Okamoto H, Terry MJ (2019) GUN1 regulates tetrapyrrole biosynthesis in *Arabidopsis*. 第 60 回日本植物生理学会年会. 名古屋大学.

D)。また他のパラメーターも、GLKox と GNCox/CGAox の間で有意な差が認められた。この結果は、光化学系の構築において、GLK が主に光捕集複合体の形成に機能するのに対して、GNC/CGA は反応中心の構築に機能することを示している。

以上の結果から、本研究により GARP 型転写因子 GLK と GATA 型転写因子 GNC/CGA は

- ② Shimizu T, Mochizuki N, Watanabe S, Shimada T, Tanaka K, Hayashi Y, Arai M, Masuda T (2018) Biochemical characterization of GUN1 in Arabidopsis. Conference Jacques-Monod: Retrograde signalling from endosymbiotic organelles. France.
- ③ Shimizu T, Shimada T, Tanaka K, Mochizuki N, Watanabe S, Masuda T (2018) Tetrapyrrole-binding properties of GUN1 in Arabidopsis. Gordon Research Conference: Chemistry and Biology of Tetrapyrroles. USA.
- ④ Shimizu T, Awasthi S, Shimada T, Tanaka K, Mochizuki N, Watanabe S, Masuda T (2018) Biochemical characterization of GUN1 protein in Arabidopsis. CSLS 国際フォーラム. 東京工業大学.
- ⑤ Listiawan DW, Obayashi T, Kobayashi K, Masuda T (2018) Cytokinin enhances photosystem assembly in Arabidopsis roots via transcriptional regulation. 第59回日本植物生理学会年会. 札幌コンベンションセンター.
- ⑥ 増田 建 (2017) 可塑的な葉緑体分化における光合成系の構築. 光合成科学:エネルギーとバイオマス. 東京工業大学.
- ⑦ Awasthi S, Shimada T, Tanaka K, Mochizuki N, Watanabe S, Masuda T (2017) Biochemical characterization of tetrapyrrole-binding pentatricopeptide-repeat (PPR) proteins in plastids. 第58回日本植物生理学会年会. 鹿児島大学.

[図書] (計3件)

- ① 池内昌彦、伊藤元己、箸本春樹、道上達男監訳 (2018) キャンベル生物学 第11版. 丸善出版. (分担翻訳)
- ② 東京大学生命科学教科書編集委員会 (2018) 理系総合のための生命科学 第4版. 羊土社. (分担執筆)
- ③ 増田建、坂口菊恵 (2017) 科学の技法. 東京大学出版会.

[産業財産権] (計0件)

[その他]

増田研究室ホームページ <http://webpark1435.sakura.ne.jp/wp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：清水 隆之

ローマ字氏名：(SHIMIZU, Takayuki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。