

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840098

研究課題名(和文) NAC転写因子複合体の作用機構と生物学的な役割

研究課題名(英文) Study on protein complexes of NAC transcription factor family

## 研究代表者

山口 雅利 (YAMAGUCHI, Masatoshi)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：20373376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：NAC転写因子ファミリーは、生物個体の成長や維持に重要な様々な制御に関わっていることが明らかになっている。本研究では、まずVNI1、および高い相同性を有するANAC103がVND7だけでなく様々なNAC転写因子と複合体を形成することを明らかにした。また、転写因子ライブラリーを用いてVNI2と相互作用する因子を探索したところ、30ものNAC転写因子が同定された。単離されたNAC転写因子には、これまで知られている二次細胞壁形成だけでなく、ストレス応答や、老化、さらに機能が解明されていないものが含まれており、NAC転写因子複合体が様々な制御機構において機能していることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：NAC transcription factor family has been known to be involved in various biological regulations during plant development. Previously, we isolated NAC transcription factors, VNI1 and VNI2, as interacting factors with another NAC transcription factor VND7, a key regulator of xylem vessel formation. Here, we demonstrated that NAC domain transcription factors VNI1 and its closest homolog, ANAC103, are able to form protein complexes with several NAC domain transcription factors. In addition, by using a cDNA library for yeast two-hybrid screening containing full-length transcription factors, we succeeded in isolation of 30 members of NAC transcription factors as interacting factors with VNI2. Some of them are known to be involved in stress responses or senescence, suggesting that protein complexes of NAC transcription factor may play pivotal roles in various biological events as well as xylem vessel formation.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：NACドメイン転写因子 タンパク質相互作用 道管分化

## 1. 研究開始当初の背景

NAC ドメイン転写因子は植物特有の転写因子ファミリーの一つであり、シロイヌナズナゲノム中には約 100 遺伝子存在する。これまでに、NAC ドメイン転写因子は、植物の成長過程に関わる様々な分子機構に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。

研究代表者らはこれまでに、維管束、特に道管形成の制御機構を理解することを目的として研究を行い、シロイヌナズナの培養細胞を用いた道管分化誘導系において一過的な発現誘導を示す NAC ドメイン転写因子をコードする *VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7* (*VND7*) を同定した。この *VND7* は、過剰発現させることで様々な細胞を道管細胞へと分化転換させることを見だし、道管分化のマスター因子であることを突き止めた (Kubo et al. *Genes Dev.* 2005)。さらに申請者はこの *VND7* はホモダイマーを形成することで (Yamaguchi et al. *Plant J.* 2008)、下流遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を促すことを明らかにした (Yamaguchi et al. *Plant J.* 2011)。その一方で、*VND7* と相互作用する新規因子の探索を行ったところ、NAC ドメイン転写因子である *VND-INTERACTING1* (*VNI1*)、および *VNI2* を単離した。特に *VNI2* は、詳細な機能解析の結果、*VND7* と結合することで、*VND7* が持つ転写活性を抑制することが明らかとなった。また、*VNI2* 過剰発現体を作成したところ、道管形成が異常になることから、*VNI2* は道管形成を負に制御する NAC ドメイン転写因子であることが明らかとなった (Yamaguchi et al. *Plant Cell*, 2010)。しかし、なぜ *VNI2* と複合体を形成することで、*VND7* が持つ強力な転写活性は阻害されるのか、その分子機構については不明なままであった。

これまでの研究により、*VNI2* は、分化過程の道管以外の様々な組織や細胞において発現することを明らかにしている。また、別のグループより、*VNI2* は環境ストレスや老化などの制御にも関与することが報告されている。これらの結果は、道管分化以外の制御にも関与していること、またそれらの制御機構において *VNI2* は、*VND7* 以外の NAC ドメイン転写因子と複合体を形成していることが示唆された。

## 2. 研究の目的

(1) *VND7* は、ホモダイマーを形成することで転写活性化活性を獲得するのに対し、*VNI2* とヘテロダイマーを形成することで転写活性化活性が失われる。本研究では、まず *VNI2* がどのようにして *VND7* が持つ強力な転写活性化活性を阻害するのか、複合体形成に必要な領域の特定や、作用機構などについて、生化学的手法を通じて明らかにする。

(2) *VNI1* は維管束では発現が観察されなかったことから、植物細胞内では *VND7* とは結

合していないと推測され、詳細な解析はなされていなかった。そこで、本研究では、この *VNI1* について、その分子機能に迫ることを目的とした。

(3) これまでの成果より、*VNI2* が道管以外の器官や組織で発現していることを明らかにしている。このことは、*VNI2* が他の NAC ドメイン転写因子とも複合体を形成し、類似した作用機構で転写を制御することを示唆している。近年、シロイヌナズナ転写因子の全長コーディング領域を集めた cDNA ライブラリーが開発されている (Mitsuda et al. *Plant Cell Physiol.* 2011)。そこで本研究ではこの転写因子ライブラリーを用いて、新規相互作用因子の探索を行う。相互作用因子についてそれらの分子機能を詳細に解析することで、得られた NAC ドメイン転写因子複合体の生物学的役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) これまでの研究により、*VNI2* が *VND7* の転写活性を阻害する分子機構として、2つの可能性が示唆されている。この2つの可能性を検証するために、ヘルペスウイルスの VP16 の転写活性化ドメインを用いた。一般的に、このドメインを転写抑制因子に付加すると、ドミナントに転写活性化因子になることが知られている。そこで、*VNI2*-VP16 融合タンパク質を作成し、*VND7* の転写活性の影響を検証した。また、組換えタンパク質を用いて *VNI2* が及ぼす *VND7* の DNA 結合能への影響についても解析を行なった。

(2) *VNI1* および最も相同性が高い ANAC103 に着目し、組換えタンパク質を用いた結合解析や転写活性の評価、プロモーター解析等を行い、得られた結果をもとに、それらの分子機能や生物学的な役割について考察した。

(3) これまでの研究で *VNI2* の相互作用因子として、3つの転写因子とユビキチン E3 ライゲースを同定している。さらに、シロイヌナズナ転写因子の全長コーディング領域を集めた cDNA ライブラリーを用いて *VNI2* と相互作用する新規転写因子の探索を行なった。さらに、生化学的、遺伝学的手法により、作用機構についても解析を行なった。

## 4. 研究成果

(1) *VNI2* にヘルペスウイルスの VP16 転写活性化ドメインを連結した *VNI2*-VP16 を作成し、*VND7* への阻害効果を検証した。*VNI2* タンパク質と比較して、*VNI2*-VP16 は有為に転写活性化能を有することが確認された。にも関わらず、この *VNI2*-VP16 は *VNI2* 同様、*VND7* の転写活性を強く阻害した。一方、FCS 解析により、*VNI2* は *VND7* の *XCP1* プロモーターへの結合は阻害しないことが示唆された。これらの結果は、*VNI2* による阻害作用は *VND7* の

DNA 結合に依存しないことを示しており、何らかの転写抑制因子をリクルートする可能性を示唆している。

(2) 酵母 two-hybrid 法や in vitro pull-down 法による結合解析の結果、VNI1 や VNI2 と最も相溶性が高い ANAC103 は VND7 だけでなく、様々な NAC 転写因子と相互作用することが明らかとなった。また、一過的発現解析の結果、VNI2 は転写抑制活性を有していたのに対し、VNI1、および ANAC103 は転写活性化活性を有していることが、明らかとなった(図1)。さらに、ANAC103 は維管束や孔辺細胞など様々な組織で発現していることから、VND7 や他の NAC 転写因子と相互作用することで、多くの制御機構に関与することが示唆された。

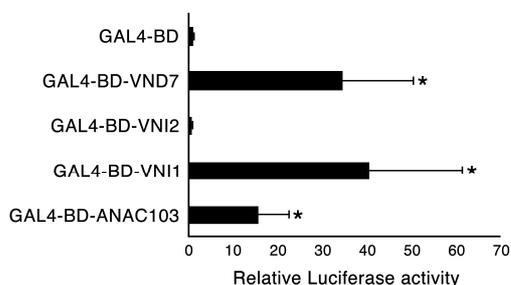


図1 一過的発現解析による転写活性の評価 VNI1および、ANAC103は、レポーター遺伝子の発現を亢進していることから、転写活性化因子であることが明らかとなった。

(3) 完全長 cDNA で構成された転写因子ライブラリーを用いて、VNI2 と相互作用する新規転写因子の探索を酵母 2 ハイブリッド法により行った。その結果、30 もの NAC ドメイン転写因子が単離された。得られた相互作用因子は、いくつかのクラスターに偏在する傾向が見られたことから、VNI2 との相互作用にはある程度の親和性を有していることが示唆された。

次に、得られた NAC 転写因子について、転写活性を持つか評価するため、相互作用因子として単離された NAC 転写因子に GAL4-BD を融合させたコンストラクトを作製し、シロイヌナズナ培養細胞より調整したプロトプラスト細胞を用いて一過的発現解析を行なった。25 個の転写因子について解析を行なった結果、転写活性を持つものが 10 個、転写抑制能を持つものが 5 個、有為な転写活性を持たないものが 10 個存在することが明らかとなった。次に転写活性を有しており、かつこれまでに研究報告がある NAC 転写因子について、下流遺伝子のプロモーターをクローニングし、それらをレポーターとして一過的発現を行なった。その結果、少なくとも 2 つの NAC 転写因子について用いたレポーターに対する転写活性を有することが確認された。そこで、このレポーターを用いて、VNI2 による影響を解析したところ、VNI2 を同時に

導入することで、2 つの NAC 転写因子の転写活性は有意に抑えられることが明らかとなった。

(4) VNI2 と相互作用する因子として単離されたユビキチン E3 ライゲースについて機能解析を行なった。その結果、まずこの E3 ライゲースはタンパク質分解の標的配列として知られる PEST モチーフを含む VNI2 の C 末端領域約 40 アミノ酸残基に結合することが明らかとなった。また、E3 ライゲースの機能が低下した変異体では、野生型と比較して、VNI2 タンパク質がより蓄積していることが確認された。以上の結果は、この E3 ライゲースが VNI2 タンパク質の安定性を制御している可能性を強く示唆している。

## 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 8 件)

Yamaguchi M, Nagahage ISP, Ohtani M, Ishikawa T, Uchimiya H, Kawai-Yamada M, Demura T, Arabidopsis NAC domain proteins VND-INTERACTING1 and ANAC103 interact with multiple NAC domain proteins., *Plant Biotechnology*, 査読有、2015、印刷中 DOI: 10.5511/plantbiotechnology.15.0208a

Endo H, Yamaguchi M, Tamura T, Nakano Y, Nishikubo N, Yoneda A, Kato K, Kubo M, Kajita S, Katayama Y, Ohtani M, Demura T, Multiple classes of transcription factors regulate the expression of VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7, a master switch of xylem vessel differentiation., *Plant Cell Physiology*, 査読有、Vol.56、2015、242-254 DOI: 10.1093/pcp/pcu134

Kitano S, Miyagi A, Oono Y, Hase Y, Narumi I, Yamaguchi M, Uchimiya H, Kawai-Yamada M, Metabolic alterations in leaves of oxalate-rich plant *Rumex obtusifolius* L. irradiated by gamma rays., *Metabolomics*, 査読有、Vol.11、2015、134-142 DOI: 10.1007/s11306-014-0684-4

Xu B, Ohtani M, Yamaguchi M, Toyooka K, Wakazaki M, Sato M, Kubo M, Nakano Y, Sano R, Hiwatahi Y, Murata T, Kurata T, Yoneda A, Kato K, Hasebe M, Demura T, Contribution of NAC transcription factors to plant adaptation to land., *Science*, 査読有、Vol.343、2014、1505-1508 DOI: 10.1126/science.1248417

Kakimoto M, Ishikawa T, Miyagi A, Saito

K, Miyazaki M, Asaeda T, Yamaguchi M, Uchimiya H, Kawai-Yamada M、 Culture temperature affects gene expression and metabolic pathways in the 2-methylisoborneol-producing cyanobacterium *Psuedanabaena galeata*.、 Journal of Plant Physiology、 査読有、 Vol.171、 2014、 292-300  
DOI: 10.1016/j.jplph.2013.09.005

Noda S, Yamaguchi M, Tsurumaki Y, Takahashi Y, Nishikubo N, Hattori T, Demura T, Suzuki S, Umezawa T、 ATL54, a ubiquitin ligase gene related to secondary cell wall formation, is transcriptionally regulated by MYB46.、 Plant Biotechnology、 査読有、 Vol.30、 2014、 503-509  
DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.0905b

Noda S, Takahashi Y, Tsurumaki Y, Yamamura M, Nishikubo N, Yamaguchi M, Sakurai N, Hattori T, Suzuki H, Demura T, Shibata D, Suzuki S, Umezawa T、 ATL54, a RING-H2 domain protein selected by a gene co-expression analysis, is associated with secondary cell wall formation in Arabidopsis.、 Plant Biotechnology、 査読有、 Vol.30、 2014、 169-177  
DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.0304a

Matsuura H, Takenami S, Kubo Y, Ueda K, Ueda A, Yamaguchi M, Hirata K, Demura T, Kanaya S, Kato K、 A computational and experimental approach reveals that the 5' -proximal region of the 5' -UTR has a cis-regulatory signature responsible for heat stress-regulated mRNA translation in Arabidopsis.、 Plant Cell Physiology、 査読有、 Vol.54、 2014、 474-483  
DOI: 10.1093/pcp/pcs189

〔学会発表〕(計 6 件)

Yamaguchi M、 RING finger proteins regulate protein stability of VNI2  
Front Lines of Plant Cell Wall Research、 2015 年 3 月 20 日-21 日、 Todaiji temple (Nara, Nara Japan)

北川純子、松田浩平、加藤晃、川合真紀、出村拓、山口雅利、道管形成を負に制御する転写抑制因子 VNI2 のタンパク質制御機構、日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16 日-18 日、東京農業大学(東京都世田谷区)

Yamaguchi M, Sato A, Yoshimura M, Kurata T, Kawai-Yamada M, Kawasaki S, Tsumuraya Y, Kotake T、 BRITTLE CULM 4 mutant decreases in secondary cell wall formation in rice.、 5<sup>th</sup> International

Conference Plant Cell Wall Biology、 2014 年 7 月 27 日-31 日、 Hotel Grand Chancellor Palm Cove ( Palm Cove, Queensland, Australia)

山口 雅利、道管分化を制御する遺伝子転写ネットワークの解析、日本植物細胞分子生物学会(招待講演) 2013 年 9 月 10 日-12 日、北海道大学(北海道札幌市)

Yamaguchi M、 Transcriptional regulation of secondary cell wall synthesis.、 UK-Japan Joint Meeting on Plant Cell Biology(招待講演) 2013 年 7 月 16 日、 Cambridge University(Cambridge, UK)

Yamaguchi M, Matsuda K, Kato K, Demura T、 VND-INTERACTING2 is controlled by ubiquitin-mediated proteolysis.、 13<sup>th</sup> Cell Wall Meeting、 2013 年 7 月 7 日-12 日、 La Cité Nantes Events Center (Nantes, France)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://park.saitama-u.ac.jp/~myamaguchi/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

山口 雅利 (YAMAGUCHI, Masatoshi)  
埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号： 2 0 3 7 3 3 7 6