

令和元年6月13日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07094

研究課題名(和文) NACドメイン転写因子ヘテロ複合体の生物学的役割

研究課題名(英文) Biological roles of protein complexes of NAC domain transcription factors

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：NACドメイン転写因子ファミリーは植物の成長過程において様々な制御プロセスに関与することが知られている。本研究では、道管分化マスター因子VND7と結合し、その機能を阻害するVNI2に着目し、他のNACドメイン転写因子とのタンパク質複合体の生物学的意義について解析を行った。その結果、ATAF2と結合すること、ATAF2は老化の進行を促進する働きを有すること、さらにVNI2はATAF2と結合することで老化の進行を抑制する働きを有することを明らかにした。これらの成果は、NACドメイン転写因子は、異なるNACドメイン転写因子とヘテロ複合体を形成することで、様々な生理現象を制御していることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の成長は、生育環境を回避することができないので、刻々と変化する環境に柔軟に対応しながら成長することが求められている。このような柔軟な成長様式は、様々な制御機構が互いに影響を及ぼし合うことで成立すると考えられる。今回私たちは、NACドメイン転写因子は結合するターゲットが変わることで、異なる制御機構に関与することを明らかにした。このことは、NACドメイン転写因子は、様々な組み合わせで複合体を形成することで、より多面的な機能を発揮していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：NAC domain transcription factor is known to be involved in various biological processes. In this study, to understand the protein complexes of NAC domain transcription factors, we focused on VNI2, isolated as an interacting protein with a key regulator of xylem vessel differentiation, VND7. We found that ATAF2 forms complex with VNI2, ATAF2 plays roles in promotion of senescence, and VNI2 inhibits ATAF2 function, resulting in repressing senescence. These findings provide an insight that NAC domain transcription factors are able to play roles in various physiological events by forming hetero-dimer complexes with other different NAC domain transcription factors.

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 植物 タンパク質複合体 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 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、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なりつつある。NAC ドメイン転写因子である VNI2 は、道管分化マスター因子である VND7 と相互作用する因子として同定された。詳細な解析の結果、VNI2 は VND7 の機能を阻害することで、道管分化を抑制する働きを有することが明らかとなった(参考文献)。さらに VNI2 の発現パターンの解析より、道管形成以外の様々な制御にも関与することが示唆された。そこで、VNI2 と相互作用する因子を探索した結果、30 もの NAC ドメイン転写因子が同定された。

(2) これまでに阻害剤を用いた解析より、VNI2 タンパク質はプロテアソームによる分解制御を受けていることが明らかとなっている。また VNI2 タンパク質の C 末端領域にはタンパク質分解の標的配列として知られる PEST モチーフが存在している。実際にこの PEST モチーフを含む C 末端領域を欠失させた VNI2 タンパク質は、安定性が高まり、転写抑制活性も亢進される(参考文献)。しかしながら、どのような分子機構で VNI2 タンパク質が分解制御を受けるかは不明であった。その中で、VNI2 と相互作用する因子の一つとして、ユビキチン E3 ライゲースが単離された。

2. 研究の目的

(1) VNI2 と相互作用する NAC ドメイン転写因子に着目し、それらの生理機能を明らかにすると同時に、VNI2 との作用機構を生化学的、および遺伝学的に解析する。それらを通じて、NAC ドメイン転写因子のヘテロ複合体の役割について明らかにする。

(2) 相互作用因子であるユビキチン E3 ライゲースが VNI2 のタンパク質分解を制御するかを検証する。また、VNI2 タンパク質の分制御の生物学的な重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) まず、VNI2 との相互作用因子である NAC ドメイン転写因子の過剰発現体、および T-DNA 欠損体を作成し、表現型を解析することで、相互作用因子の機能を明らかにする。特に、相互作用因子が制御するターゲット遺伝子を同定する。その上で、VNI2 が相互作用因子の転写活性をどのように制御するか検証する。さらに、VNI2 と相互作用因子との多重変異体を作成し、遺伝学的な解析を行うことで生理的な役割についても明らかにする。

(2) まず、結合解析によりユビキチン E3 ライゲースが結合する VNI2 タンパク質の領域を特定する。また、ユビキチン E3 ライゲースの機能が低下した変異体を作成し、VNI2 タンパク質の安定性に影響が生じるか検証する。さらにユビキチン E3 ライゲースの機能が低下した変異体の表現型を解析することで、VNI2 タンパク質の分解制御の生物学的意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1) VNI2 との相互作用因子である ATAF2 は、生物学的ストレス応答に関与することが知られていた。これまでに ATAF2 が発現を制御することが報告されているターゲット遺伝子を用いて、一過的発現解析を行ったところ、発現量を上昇させる遺伝子は見出せなかった。一方、ATAF2 と相同性が高い ATAF1 のターゲット遺伝子である *ORE1* のプロモーターに対して、ATAF2 は転写活性を有していることが明らかとなった。*ORE1* は老化の進行を制御する働きを持つ。そこで、ATAF2 が老化の制御に関与するか過剰発現体、および変異体を用いて検証したところ、ATAF2 は *ORE1* だけでなく様々な転写因子の発現を促すことで老化を促進する働きを有することが明らかとなった。一方、VNI2 は ATAF2 とは異なり、これまでに老化を抑制する働きを持つことが報告されていた(参考文献)。そこで、VNI2 と ATAF2 との作用機構を解析したところ、VNI2 は ATAF2 の転写活性を阻害することが明らかとなった。また、変異体を用いた遺伝学的な解析より、VNI2 は ATAF2 の老化を促進する働きを抑制する役割を持つことが明らかとなった。これらの結果より VNI2 は、道管分化や老化といった、2 つの異なる不可逆的な運命決定機構に対し、それぞれ抑制する働きをもつことが示された。

(2) VNI2 と相互作用するユビキチン E3 ライゲースの結合領域の絞り込みを行った。その結果、このユビキチン E3 ライゲースは、PEST モチーフを含む VNI2 の C 末端領域に結合することが明らかとなった。また、野生型、およびユビキチン E3 ライゲースの機能を低下させた変異体に *VNI2pro::VNI2-GUS* を導入した形質転換体を作成した。その結果、根や茎頂付近において、核に局在した GUS の染色が、変異体背景の形質転換体でより多く観察された。さらに、このユビキチン E3 ライゲースの機能を低下させた変異体の子葉を観察したところ、野生型よりも高頻度で道管の途切れが観察された。この高頻度で道管が途切れる表現型は、*vni2* 変異体と掛け合わせることで抑圧されたことから、VNI2 依存的であることが確認された。以上の結果は、VNI2 はこのユビキチン E3 ライゲースによりタンパク質安定性が制御されていることを強く示唆している。

<引用文献>

Yamaguchi M, Ohtani M, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Fukuda H, Demura T (2010) VND-INTERACTING2, NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in Arabidopsis. *Plant Cell* 22: 1249-1263

Yang SD, Seo SD, Yoon HK, Park CM (2011) The Arabidopsis NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the *COR/RD* genes. *Plant Cell* 23: 2155-2168

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Ishikawa Y, Miyagi A, Ishikawa T, Nagano M, Yamaguchi M, Hihara Y, Kaneko Y, Kawai-Yamada M (2019) One of the NAD kinases, *sll1415*, is required for the glucose metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J.* 98: 654 - 666 (査読あり) DOI: 10.1111/tpj.14262

Saelim L, Akiyoshi N, Tan TT, Ihara A, Yamaguchi M, Hirano K, Matsuoka M, Demura T, Ohtani M (2019) Arabidopsis Group III d ERF proteins positively regulate primary cell wall-type *CESA* genes. *J. Plant Res.* 132: 117 - 129 (査読あり) DOI: 10.1007/s10265-018-1074-1

Nagahage ISP, Sakamoto S, Nagano M, Ishikawa T, Kawai-Yamada M, Mitsuda N, Yamaguchi M (2018) An NAC domain transcription factor ATAF2 acts as transcriptional activator or repressor dependent on promoter context. *Plant Biotechnol.* 35: 285-289 (査読あり) DOI: 10.5511/plantbiotechnology.18.0507a

Okada T, Yamane S, Yamaguchi M, Kato K, Shinmyo A, Tsunemitsu Y, Iwasaki K, Ueno D, Demura T (2018) Characterization of rice KT/HAK/KUP potassium transporters and K⁺ uptake by HAK1 from *Oryza sativa*. *Plant Biotechnol.* 35: 101-111 (査読あり) DOI: 10.5511/plantbiotechnology.18.0308a

Tan TT, Endo H, Sano R, Kurata T, Yamaguchi M, Ohtani M, Demura T (2018) Transcription factors VND1-VND3 contribute to cotyledon xylem vessel formation. *Plant Physiol.* 176: 773-789 (査読あり) DOI: 10.1104/pp.17.00461

Miyagi A, Kitano S, Oono Y, Hase Y, Narumi I, Yamaguchi M, Uchimiya H, Kawai-Yamada M (2018) Evaluation of metabolic changes in oxalate-rich plant *Rumex obtusifolius* L. caused by ion beam irradiation. *Plant Physiol. Biochem.* 122: 40-45 (査読あり) DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.11.001

Imaizumi C, Tomatsu H, Kitazawa K, Yoshimi Y, Shibano S, Kikuchi K, Yamaguchi M, Kaneko Y, Tsumuraya Y, Kotake T (2017) Heterologous expression and characterization of an Arabidopsis -L-arabinopyranosidase and -D-galactosidases acting on -L-arabinopyranosyl residues. *J. Exp. Bot.* 68: 4651-4661 (査読あり) DOI: 10.1093/jxb/erx279

Ishikawa Y, Miyagi A, Haishima Y, Ishikawa T, Nagano M, Yamaguchi M, Hihara Y, Uchimiya H, Kawai-Yamada M (2016) Metabolomic analysis of NAD kinase-deficient mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Plant Physiol.* 205: 105-112 (査読あり) DOI: 10.1016/j.jplph.2016.09.002

Noda S, Koshiba T, Hattori T, Yamaguchi M, Suzuki S, Umezawa T (2015) The expression of a rice secondary wall-specific cellulose synthase gene, *OsCesA7*, is directly regulated by a rice transcription factor, OsMYB56/83. *Planta* 242: 589 - 600 (査読あり) DOI: 10.1007/s00425-015-2343-z

Nakano Y, Yamaguchi M, Endo H, Rejab NA, Ohtani M (2015) NAC-MYB based transcription regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Front. Plant Sci.* 6: 288 (査読あり) DOI: 10.3389/fpls.2015.00288

[学会発表](計 14 件)

山田拓矢、北川純子、松田浩平、長野稔、石川寿樹、川合真紀、出村拓、山口雅利「相互作用因子による道管形成抑制制御因子 VNI2 のタンパク質分解制御」第 36 回日本植物細胞分子生物学会、2018 年

伊藤敦也、久保稔、大谷美紗都、石川寿樹、川合真紀、出村拓、山口雅利「シロイヌナズナ VND 遺伝子群の遺伝学的解析」第 36 回日本植物細胞分子生物学会、2018 年

Isura Nagahage、松田浩平、坂本真吾、石川寿樹、長野稔、光田展隆、川合真紀、出村拓、山口雅利「NAC domain transcription factor VNI2 regulates senescence by forming protein complexes」第 59 回日本植物生理学会、2018 年

山田拓矢、北川純子、松田浩平、長野稔、石川寿樹、川合真紀、出村拓、山口雅利「道管形成を負に制御する転写因子 VNI2 のタンパク質制御機構」第 35 回日本植物細胞分子生物学会、2017 年

Nagahage I, Matsuda K, Sakamoto S, Nagano M, Ishikawa T, Mitsuda N, Kawai-Yamada M, Demura T, Yamaguchi M 「NAC domain transcription factors, VNI2 and ATAF2 form a protein complex」第35回日本植物細胞分子生物学会、2017年

山口雅利、坂本真吾、川合真紀、光田展隆「転写抑制因子 VNI2 は繊維細胞マスター因子 NST1, NST3 の機能を抑制する」第81回日本植物学会、2017年

Yamaguchi M 「Transcription factors regulating secondary cell wall formation」Workshop on Plant Glycobiology、2017年

山口雅利、坂本真吾、川合真紀、出村拓、内宮博文、光田展隆「転写抑制因子 VNI2 を活用した木質バイオマスの量的改変」第34回日本植物細胞分子生物学会、2016年

山口雅利、Isura Nagahage、松田浩平、山田拓矢、北川純子、坂本真吾、光田展隆、長野稔、石川寿樹、内宮博文、川合真紀、出村拓「NAC ドメイン転写因子 VNI2 とその相互作用因子の機能解析」第80回日本植物学会、2016年

Yamaguchi M, Sakamoto S, Kawai-Yamada M, Demura T, Uchimiya H, Mitsuda N 「Ectopic expression of transcription factor modulates secondary cell wall content in fiber cells」XIV Cell Wall Meeting、2016年

Yamaguchi M, Kitagawa J, Uchimiya H, Kawai-Yamada M, Demura T 「Stability of VNI2 protein is regulated by an interacting protein」The Canadian Society of Plant Biologists Eastern Regional Meeting、2015年

Yamaguchi M, Sakamoto S, Kawai-Yamada M, Demura T, Uchimiya H, Mitsuda N 「A transcription factor, VNI2, modulates secondary cell wall content」11th International Congress of Plant Molecular Biology、2015年

Yamaguchi M, Nagahage I, Ohtani M, Ishikawa T, Uchimiya H, Fukuda H, Kawai-Yamada M, Demura T 「NAC domain transcription factors interacting with VND7, a key regulator of xylem vessel differentiation」Botany 2015, Science and Plants for People、2015年

Yamaguchi M, Kitagawa J, Matsuda K, Uchimiya H, Kawai-Yamada M, Demura T 「Stability of VNI2 protein is regulated by RING finger proteins」The 26th International Conference on Arabidopsis Research、2015年

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.saitama-u.ac.jp/~myamaguchi/index.html>

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。