

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15413

研究課題名(和文)植物の低温初期における遺伝子発現誘導機構の解明とその応用

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of cold-inducible gene expression in plant

研究代表者

城所 聡(Kidokoro, Satoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：70588368

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文): DREB1遺伝子は植物の低温馴化・耐性獲得において中心的な役割を持つ転写因子をコードしている。本研究では、急速な温度低下に反応してDREB1の転写を活性化するCAMTA転写因子の活性制御機構を解析した。急速な低温ストレスによって起こる細胞質内Ca²⁺濃度の増加とDREB1の発現との関係を調べるために、シロイヌナズナの野生型植物体にCa²⁺チャネル阻害剤存在下で低温処理を行なったが、DREB1の発現量において対照区との変化は見られなかった。次に、CAMTA転写因子の相互作用因子を探索した。その結果、カルモジュリンを含む複数のタンパク質が相互作用因子候補として同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAMTA転写因子は通常生育時から発現することから、DREB1の遺伝子発現を誘導するためには低温ストレス特異的な活性化が必要であると考えられた。CAMTA転写因子はCa²⁺結合タンパク質であるカルモジュリンとの相互作用ドメインを持つことから、その活性化にはカルシウムシグナルが関わりと予想された。しかし、その実態は不明であった。本研究結果により同定された相互作用因子の解析を進めてCAMTA転写因子を介したDREB1の発現制御機構が解明されることで、低温に反応したカルシウムシグナルからCAMTA転写因子の活性化へとつながるシグナル伝達系全体の理解が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文): In plants, DRE-binding protein 1/C-repeat binding factors (DREB1/CBFs) function as master switches in cold stress-responsive gene expression. The expression of the DREB1 genes is strongly induced in the early stage of the cold stress responses. CAMTA3 and CAMTA5 transcription factors activate the DREB1 expression by a rapid temperature decrease. We tried to elucidate activation mechanisms of CAMTA proteins for inducing the DREB1 expression in response to the cold stress. We pre-treated Arabidopsis seedling to calcium channel inhibitors and then treated them to the cold stress. But the DREB1 expression was not altered between the mock and pre-treated seedlings. Because CAMTA proteins contain conserved domains for interacting calmodulins (CaMs) that can bind to Ca²⁺. We screened proteins that can interact with CAMTAs with co-immunoprecipitation and LC-MS/MS analysis. We obtained several proteins including CaMs and CaM-like as candidates of the interacting proteins.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：植物 低温ストレス応答 転写制御

1. 研究開始当初の背景

地球レベルの環境劣化が進み、異常気象による農業被害が深刻になっている。環境ストレスに高い耐性を持つ作物の育種のためには、植物がストレスに応答して耐性を獲得する機構の理解が重要である。植物は、環境ストレスを受けると、さまざまな遺伝子の発現を変化させることにより耐性や馴化を獲得する機構を持つ。*DREB1* 遺伝子は、植物の低温馴化・耐性獲得において中心的な役割を持つ転写因子をコードしている (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, Annu Rev Plant Biol. 2006)。*DREB1* は、環境ストレス耐性の獲得に機能する 100 以上の下流遺伝子の転写を活性化させる。*DREB1* を高発現させた植物体は低温や凍結を含むさまざまな環境ストレスに対して高い耐性能を獲得する (Kasuga et al., Nat Biotechnol. 1999)。*DREB1* 遺伝子の発現は、植物が低温にさらされると急速に誘導される。したがって、*DREB1* 遺伝子の低温誘導は、植物が低温に応答して耐性を獲得するための最初のステップであり、その機構の解明は植物の低温ストレスの感知機構の解明につながると推測される。

これまでに、低温ストレス応答の初期の遺伝子発現誘導の制御機構を明らかにするため、モデル植物のシロイヌナズナを用いて *DREB1* 遺伝子のプロモーター中の発現制御に関わるシス領域を同定し、それに結合する転写因子を単離してその機能に着目して解析をおこなってきた (Kidokoro et al., Plant Physiol. 2009)。その結果、植物の *DREB1* を介した低温応答には 2 つの感知経路があることを示した (図 1. Kidokoro et al., Plant Cell, 2017)。1 つは悪天候などによる急速な温度の低下によって活性化され、もう 1 つは季節の変化などによる穏やかな気温の低下によっても活性化される。前者は昼夜を問わず活性化されるのに対して、後者は概日時計の制御によって日中のみ活性化される。この機構により植物は効率的に低温ストレスに適応していると考えられる。シロイヌナズナに 6 個存在する CAMTA 転写因子のうち CAMTA3 と CAMTA5 が *DREB1* の転写を活性化する (Kidokoro et al., Plant Cell, 2017)。CAMTA3 と CAMTA5 の遺伝子発現は低温応答性を持たないことから、急速な温度低下に応答した CAMTA3/CAMTA5 タンパク質の活性化が *DREB1* の発現誘導を制御していると考えられた。急速な温度低下では、細胞質内のカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度が増加することが知られている、CAMTA タンパク質は Ca^{2+} 結合タンパク質であるカルモジュリンとの相互作用ドメインを持つことから、CAMTA タンパク質の活性化にはカルシウムシグナルが関わりと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、急速な温度低下に応答して *DREB1* の転写を活性化する CAMTA 転写因子に着目し、その活性制御機構を解析することで、低温に応答したカルシウムシグナルから CAMTA 転写因子の活性化へとつながるシグナル伝達系全体の解明を目指した。植物では、さまざまなストレス時に細胞質内のカルシウム濃度が増加することが知られているが、それぞれのストレス時にどのようなカルシウムシグナルが活性化され、各ストレスに応じた遺伝子発現につながるのかは明らかにされていない。本研究により *DREB1* の発現制御機構が解明されるこ

とで、植物の低温ストレスに対する感知機構の理解が進むことが期待された。

3. 研究の方法

本研究計画では、CAMTA 転写因子が *DREB1* 遺伝子の低温誘導性を制御する機構の解明を目指し、CAMTA3/5 が活性化されるカルシウムシグナルを同定するために、様々なカルシウムシグナルの阻害剤存在下での *DREB1* 遺伝子の低温ストレス誘導性発現の解析を行なった。また、共免疫沈降と質量分析装置を用いた相互作用因子の網羅的探索法を用いて、CAMTA 転写因子の転写複合体に含まれる相互作用因子や修飾酵素の候補を同定し、それらの機能解析を行なった。

4. 研究成果

急速な温度低下にตอบสนองして *DREB1* の転写を活性化する CAMTA 転写因子に着目し、その活性制御機構を解析することで、低温にตอบสนองしたカルシウムシグナルから CAMTA 転写因子の活性化へとつながる制御機構の解明を目指した。

DREB1 遺伝子の低温誘導性発現と急速な低温ストレスによって起こる細胞質内 Ca^{2+} 濃度の増加との関係を調べるために、シロイヌナズナの野生型植物体に Ca^{2+} チャンネル阻害剤である Ruthenium Red や塩化ランタンの存在下で低温処理を行なった。この時の *DREB1* の発現量を測定したが、対照区と比較して発現量の変化は見られなかった。今後、阻害剤の種類や前処理方法を見直して、さらに発現解析を行なう必要があると考えられた。

急速な温度低下による低温ストレス時の *DREB1* 遺伝子の発現誘導を制御する転写因子 CAMTA3 および CAMTA5 の相互作用因子を探索した。T-DNA 挿入変異体 *camta5* 内に CAMTA5 自身のプロモーターによって GFP-CAMTA5 を発現させた相補シロイヌナズナや CAMTA5-sGFP を恒常的に高発現する形質転換シロイヌナズナを用いて共免疫沈降をおこない、質量分析装置によって共精製されたタンパク質を同定した。その結果、カルシウムイオン結合タンパク質の 1 つであるカルモジュリン(CaM)とカルモジュリン様タンパク質の一つ (CML α)、特定のタンパク質相互作用においてリンカーとなる 14-3-3 タンパク質の一つ GRF α 、他の CAMTA タンパク質が検出された。同定された相互作用因子候補について、タバコへの一過的発現系を用いた split-Luciferase 法によって CAMTA5 との相互作用を解析した。その結果、CAMTA 同士の二量体形成と CAMTA5-CML α 、CAMTA5-GRF α の相互作用が確認された。酵母 two-hybrid 法によって、CML α 近傍の 5 種類の CML と CAMTA5 の C 末端(カルモジュリンとの相互作用に必要な IQ モチーフおよび CaMB ドメインを含む領域)との相互作用を確認した。その結果、CAMTA5 と相互作用したのは CML α のみであった。また、シロイヌナズナは 7 つの CaM を持つが、LC-MS/MS で検出されたペプチドからは固有の配列は見つからなかったことから、植物体内での遺伝子発現量の高い CAM3 と CAM1 について酵母ツーハイブリッド法で解析した結果、どちらも CAMTA5 の C 末端と相互作用することが確認された。次に、RNA シークエンスデータを元に、相互作用因子候補の遺伝子発現における低温ストレス応答性を解析した結果、顕著なストレス応答性を示すものは見られなかった。また、相互作

用因子候補の細胞内局在を解析するため、GFP と融合した *CMLα*、*CAM1*、*GRFα* を過剰発現する形質転換シロイヌナズナを作出した。これらの植物体を用いて蛍光観察をおこなった結果、全ての植物体で通常生育時および低温ストレス処理時の両方において核と細胞質に蛍光が見られた。そこで、植物体内でこれらのタンパク質が実際に *CAMTA5* と相互作用するのを確認するために、*CAMTA5*-GFP を発現する植物体に 3×FLAG タグを融合した各遺伝子を導入した二重高発現シロイヌナズナを作出し、イムノブロット法により両方のタンパク質が高発現しているラインを選抜した。さらに、*CMLα*、*GRFα* の T-DNA 挿入変異シロイヌナズナ *cmlα*、*grfa* を単離し、これらの植物体でそれぞれの遺伝子の発現が失われている事を確認した。これらの変異植物体を用いて低温ストレス時の *DREB1B* の発現量を解析した結果、急速な温度低下が起こる土植え植物体での処理では野生型植物体と比較して変化は見られなかったが、緩やかな温度低下が起こる寒天培地プレートで生育した植物体を用いた処理では野生型植物体と比較して *DREB1B* の発現が増加する傾向が見られた。今後は、*CaM* の多重変異シロイヌナズナの作出を行なうとともに、*cmlα* と *grfa* 変異体も含めて低温ストレス時の *DREB1* の発現を測定するとともに凍結ストレス耐性を解析することで、これらの因子が *CAMTA* 転写因子を介して、低温・凍結ストレス耐性を制御するのかを解析していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kidokoro Satoshi, Kim June-Sik, Ishikawa Tomona, Suzuki Takamasa, Shinozaki Kazuo, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko	4. 巻 32
2. 論文標題 DREB1A/CBF3 is repressed by transgene-induced DNA methylation in the Arabidopsis ice1-1 mutant	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1035-1048
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1105/tpc.19.00532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 城所聡、篠崎和子	4. 巻 64
2. 論文標題 シロイヌナズナにおけるCAMTA転写因子による低温誘導性遺伝子の発現制御	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 61-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kudo Madoka, Kidokoro Satoshi, Yoshida Takuya, Mizoi Junya, Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Sakakibara Hitoshi, Fernie Alisdair R., Shinozaki Kazuo, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko	4. 巻 97
2. 論文標題 A gene-stacking approach to overcome the trade-off between drought stress tolerance and growth in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 240 ~ 256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.14110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mizoi Junya, Kanazawa Natsumi, Kidokoro Satoshi, Takahashi Fuminori, Qin Feng, Morimoto Kyoko, Shinozaki Kazuo, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko	4. 巻 294
2. 論文標題 Heat-induced inhibition of phosphorylation of the stress-protective transcription factor DREB2A promotes thermotolerance of Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 902-917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.002662.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kidokoro Satoshi, Yoneda Koshi, Takasaki Hironori, Takahashi Fuminori, Shinozaki Kazuo, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko	4. 巻 29
2. 論文標題 Different Cold-Signaling Pathways Function in the Responses to Rapid and Gradual Decreases in Temperature	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 760 ~ 774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1105/tpc.16.00669	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 城所聡, 林健太郎, 原口裕基, 石川朋奈, 戸田智美, 鈴木孝征, 篠崎一雄, 篠崎和子
2. 発表標題 概日時計を介したシロイヌナズナ DREB1遺伝子の低温誘導性発現制御の解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Kidokoro, Fuminori Takahashi, Kazuo Shinozaki, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki
2. 発表標題 Different cold-signaling pathways in the responses to rapid and gradual decreases in temperature
3. 学会等名 The 11th International Plant Cold Hardiness Seminar Importance of Cold Hardiness in a Warming Climate (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城所聡, 橋本紫光, 高橋史憲, 篠崎一雄, 篠崎和子
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるCAMTA転写因子による低温誘導性遺伝子の発現制御
3. 学会等名 第63回低温生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城所聡, 原口裕基, 石川朋奈, 戸田智美, 篠崎一雄, 篠崎和子
2. 発表標題 概日時計を介したシロイヌナズナDREB1遺伝子の低温誘導性発現制御
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口萌子, 大濱直彦, 戸高大輔, 城所聡, 篠崎一雄, 篠崎和子
2. 発表標題 イネにおける転写因子HsfA1 の高温ストレス応答における機能解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asad Jan, Huimei Zhao, Naohiko Ohama, Shinya Koizumi, Kazuya Kusakabe, Junya Mizoi, Satoshi Kidokoro, Kazuo Shinozaki, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki
2. 発表標題 Functional Analysis of 70 kDa Heat Shock Proteins in the Regulation of Heat Stress Responsive Gene Expression in Arabidopsis
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------