

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19370016
 研究課題名（和文）高等植物の環境ストレス応答における遺伝子発現制御とネットワークの
 解明
 研究課題名（英文）Analysis of transcriptional regulatory networks in response to abiotic
 stress in plants
 研究代表者
 篠崎 和子（YAMAGUCHI SHINOZAKI KAZUKO）
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
 研究者番号：30221295

研究成果の概要：

植物は、温度や水分環境の変化に応答して自らの生育や生理状態を変化させることにより、厳しい生育環境にも耐えることができるようになる。本研究課題では、高温・水分ストレス応答で働く転写因子DREB2Aについて、それを活性化させる仕組みについて明らかにするとともに、高温・水分ストレス応答における標的遺伝子を探索し、ストレス耐性遺伝子の発現制御ネットワークを分子レベルで明らかにする。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：転写因子、水分ストレス、高温ストレス、遺伝子発現制御、シグナル伝達系

1. 研究開始当初の背景

移動の自由のない植物は、温度変化や乾燥などの環境ストレスを絶えず受け、その生存を脅かされている。植物はこれらの環境の変化をいち早く感じ取り、環境に適応する応答機構を進化の過程で獲得してきたものと考えられる。植物の持つ環境ストレス応答機構に関しては、米国やフランス、スペイン、ドイツ等多くの国々で遺伝子レベルの解明を目指した研究が進められている。また、近年の地球環境の悪化により、今後、環境耐性作物の開発の必要性が高まるとの考えから、モンサント等の多国籍企業によって耐性作物の開発を目指した研究が盛んに行われてい

る。一方、最近では韓国や中国等においても、環境耐性作物の分子育種を目指した植物遺伝子の研究論文が多数発表されている。

私たちはこれまでに環境因子として主に乾燥を取り上げ、乾燥ストレスによって誘導される植物の遺伝子群の機能や発現制御を解析してきた。その結果、乾燥や低温ストレスによる遺伝子発現を制御するシス因子はA/GCCGACをコアとするDRE配列であることを明らかにした（Plant Cell 6, 251-264, 1994）。また、このDREに結合して転写を活性化する転写因子の遺伝子DREBを単離したが、DREBにはDREB1とDREB2の2種の遺伝子ファミリーがあり、DREB1は主に低

温ストレス応答で働き、*DREB2* は乾燥や塩などの水分ストレス応答で働くことを示した (Plant Cell 10, 1391-1406, 1998)。 *DREB1* 遺伝子に関しては、私たちと米国のグループにより低温時における分子レベルの機能解析が詳細に進み、多数の論文を報告している。また、*DREB1* 遺伝子を高発現することで、植物に高いレベルのストレス耐性を付与することも示された (Plant Cell 10, 1391-1406, 1998; Science 280, 104-106, 1998; Nature Biotech. 17, 287-291, 1999)。

一方、水分ストレス応答で働く *DREB2A* に関しては、*DREB2A* タンパク質の活性化に翻訳後の修飾を必要とするため、その機能解析が遅れていた。私たちはこれまでに、*DREB2A* の活性化には翻訳後の修飾を介したタンパク質の安定化が関与していることを明らかにした (Plant Cell 18, 1292-1309, 2006)。また、*DREB2A* は水分ストレス応答ばかりでなく高温ストレス応答でも重要な機能を果していることも示した (PNAS 103, 18828-18833, 2006)。そこで、本研究課題では、高温や水分ストレス応答で働く *DREB2A* の活性化に重要なストレス時のタンパク質の安定化の機構について明らかにするとともに、*DREB2A* が重要な機能を示す高温や水分ストレスによる遺伝子発現の制御ネットワークを分子レベルで解明する。

2. 研究の目的

本研究では2年間の研究期間中に、高温や水分ストレス時の *DREB2A* タンパク質の安定化の機構について解析して、*DREB2A* の活性化の分子機構を明らかにする。また、転写因子 *DREB2A* を起点として、高温と水分ストレス応答における標的遺伝子を明らかにするとともに、それぞれのストレス応答で働く上流因子の同定を試みることにより、*DREB2A* を中心とした環境ストレス応答の転写制御ネットワークの全貌を明らかにする。

これまでに、*DREB2A* の転写活性化阻害ドメインをベイトとして、E3 リガーゼをコードする遺伝子が単離されている。この E3 リガーゼの *DREB2A* の分解における役割を明らかにして、ストレスによる *DREB2A* タンパク質の安定化の機構を解明する。また、*DREB2A* 転写活性化阻害ドメインはセリンやスレオニンに富んだ領域であるため、この領域のリン酸化によって *DREB2A* の構造の変化を引き起こすことにより、活性化を調節していることが考えられる。そこで、この転写活性化阻害ドメインのリン酸化について検討して、活性化との関係を明らかにする。また、リン酸化に関与するタンパク質キナーゼの同定を試みる。さらに、マイクロアレイ法によって *DREB2A* 遺伝子の欠損変異体や

活性型 *DREB2A* を過剰発現した植物体を解析することにより、高温または水分ストレス時に *DREB2A* によって制御される標的遺伝子を明らかにする。それぞれのストレスによって誘導される標的遺伝子を選びそのプロモーター領域を解析することにより、高温ストレスと水分ストレスによる遺伝子発現における *DREB2A* 遺伝子の役割の相違点と類似点を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *DREB2A* タンパク質の活性化機構の探索
相互作用するタンパク質の機能同定：これまで酵母のツーハイブリッド法を用いて、*DREB2A* の活性化を阻害するドメインと相互作用するタンパク質として E3 リガーゼをコードする遺伝子を単離した。この E3 リガーゼ遺伝子の発現をノーザン法や定量 PCR 法を用いて解析する。さらに、*GUS* や *GFP* 等のリポーター遺伝子を用いて組織特異性や細胞内の発現の特異性を明らかにする。また、大腸菌や酵母を用いて *DREB2A* とこの E3 リガーゼタンパク質を合成して、プルダウン解析によって結合性を確かめる。さらに、これらの合成タンパク質を用いて *in vitro* のユビキチン化実験を行い、*DREB2A* のユビキチン化を確かめる。一方、この E3 リガーゼ遺伝子を植物内で過剰発現したり、RNAi により発現を抑えた組換え植物を作出してその表現型を解析する。また、この E3 リガーゼ遺伝子に関して T-DNA 等によってタグされた遺伝子破壊株を収集してその表現型を解析する。

E3 リガーゼ遺伝子を導入して表現型が見られた組換え体や遺伝子破壊株中で発現が変化している遺伝子群を同定するため、マイクロアレイ解析を行う。特に高温や水分ストレス誘導性遺伝子の発現の変化に注目して解析を行い、*DREB2A* タンパク質の安定化におけるこの E3 リガーゼの働きを明らかにする。一方、*DREB2A* のストレス時の修飾を確かめるために、前年度に作製した標識された *DREB2A* を過剰発現する植物体をストレス処理した後、*DREB2A* タンパク質を精製してその分子量をストレス処理前と比較する。トランジェント発現系またはツーハイブリッド法で単離され、*DREB2A* の活性化と関連が認められた遺伝子に関して、形質転換体を用いて過剰発現したり、RNAi 法を用いて逆に発現を抑えた植物体を作製する。得られた形質転換体に関して、その形態やストレスに対する応答性、*DREB2A* の標的遺伝子の発現などを解析して、*DREB2A* の活性化との関係を明らかにする。

リン酸化による活性化の可能性の検討：
T87 培養細胞のプロトプラストを用いたトランジェント発現系で明らかにされた

DREB2Aの活性化ドメインはC末端側の酸性アミノ酸よりなる領域で、活性化を阻害するドメインはN末端側のセリンやスレオニンに富んだ領域であることが示されている。このため、リン酸化によってDREB2Aの構造の変化を引き起こすことにより、活性化ドメインの働きを調節していることが考えられる。そこで、DREB2Aタンパク質のセリンやスレオニンに富んだ領域にアミノ酸の置換変異を加えたコンストラクトを作製して、T87培養細胞によるトランジェント発現系を用いて転写活性化を測定する。また、この時ツーハイブリッド法によって単離したE3リガゼ遺伝子を同時に加えリポーター遺伝子の活性を測定することにより、DREB2Aタンパク質の安定化と活性化の関係を明らかにする。また、大腸菌や網状赤血球の抽出液系で合成したDREB2Aタンパク質を用いて、ストレス処理したシロイヌナズナの抽出液やストレスで活性化される種々のタンパク質キナーゼとゲル内リン酸化実験や試験管内のリン酸化実験を行いリン酸化によるDREB2Aの転写活性化の制御の可能性を検討する。さらに、GST等で標識したDREB2Aをシロイヌナズナ中で過剰発現する。次年度はこの植物を用いて、DREB2Aのストレス時の修飾に関して解析する。

DREB2Aと相互作用する新規タンパク質の同定:酵母のツーハイブリッド法を用いて、DREB2Aの活性化阻害ドメインと相互作用するタンパク質を単離する。DREB2Aの活性化阻害ドメインをベイトして、ストレス処理していないコントロールのシロイヌナズナや乾燥や塩や高温ストレス処理したシロイヌナズナから調整したcDNAライブラリーを酵母のツーハイブリッド法でスクリーニングする。得られたクローンをT87細胞のプロトプラストを用いたトランジェント発現系で解析することで、DREB2Aの活性化への関与を明らかにする。

(2) 活性型DREB2A形質転換体やDREB2A破壊株を用いた標的遺伝子の解析

これまでに、DREB2Aの活性化阻害ドメインを欠失した活性型のDREB2Aをシロイヌナズナ中で過剰発現するとDREB2Aの標的遺伝子の発現が見られ、乾燥や高温ストレスに対して高い耐性が得られることを示した。また、DREB2A遺伝子のコード領域にT-DNAが挿入された欠失変異体を2ライン得ている。そこで、シロイヌナズナの22kのオリゴマイクロアレイを用いて、DREB2Aの過剰発現体や欠失変異体で発現が変化する遺伝子群を探索し、ノーザン法や定量PCR法によりこれらの発現の変化を確認する。一方、同様に生育させた野生株のシロイヌナズナを

用いてマイクロアレイ解析を行い、乾燥や高温ストレスによって発現が変化する遺伝子群を探索する。これらの遺伝子群を比較することでDREB2Aの直接の標的遺伝子群を明らかにする。これらの直接の標的と考えられる遺伝子群から、典型的な乾燥ストレスによって誘導される遺伝子と高温ストレスによって誘導される遺伝子を選び出しプロモーター領域を単離する。

シロイヌナズナの形質点転換体を用いて、前年度同定されたDREB2Aの直接の標的遺伝子群から選抜された乾燥誘導性遺伝子と高温誘導性遺伝子のプロモーター解析を行う。これらのプロモーター中に存在するDRE配列とさらにそれと強調して働く他のシス因子が存在するのか明らかにする。また、DRE配列の周辺配列の特異性についても検討する。

(3) イネとトウモロコシのDREB2A相同性遺伝子の機能解析

イネとトウモロコシから単離しているDREB2A相同性遺伝子を用いて、その転写活性化の制御機構を解析する。シロイヌナズナやイネの培養細胞のプロトプラストを用いたトランジェント発現系を利用して、イネとトウモロコシから得られているDREB2A相同性遺伝子の転写活性化の制御機構を解析して、シロイヌナズナのDREB2Aと比較する。また、得られた活性型のDREB2A遺伝子をシロイヌナズナやイネに導入する。次年度は、その形態を観察するとともに、マイクロアレイを用いてターゲット遺伝子を解析して、シロイヌナズナのDREB2Aと比較する。また、シロイヌナズナで得られているDREB2Aの乾燥や高温ストレスによる活性化機構が植物に普遍的であるかどうか調べることによりその重要性を明らかにする。

活性型のイネとトウモロコシのDREB2A相同性遺伝子を導入して得られたシロイヌナズナの形質転換体を用いて、その形態の変化と導入遺伝子の発現レベルの関係を明らかにする。また、乾燥や高温や低温ストレスに対する耐性を試験する。さらに、マイクロアレイ法によりこの形質転換体中で発現の変化した遺伝子を解析して、シロイヌナズナのDREB2Aの標的遺伝子との関連性を明らかにする。これらの結果から、イネやトウモロコシのDREB2A相同性遺伝子がシロイヌナズナのDREB2Aと同様に機能するかどうかを明らかにする。高温や水分ストレスによるDREB2Aを介した遺伝子発現制御やシグナル伝達系の植物種間での相同性や相違点を示して、ストレス応答でのDREB2Aの重要性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) DREB2A タンパク質の活性化機構の探索では、これまでに単離した E3 リガーゼをコードする遺伝子に関して解析を行い、DRIP1 と名付けた。DRIP1 タンパク質は特異的に DREB2A タンパク質を認識してユビキチン化することを *in vitro* の系を用いて示した。また、DRIP1 遺伝子はシロイヌナズナの葉や根等の植物体中で構成的に発現すること、タンパク質は核中に存在することを GUS や GFP 等のリポーター遺伝子を用いて示した。さらに高発現体を用いて DREB2A の標的遺伝子の発現に変化があることを見いだした。一方、活性型 DREB2A 形質転換体や DREB2A 破壊株を用いて DREB2A の標的遺伝子群の解析を行い、過剰発現体で強く発現し破壊株で弱く抑えられる遺伝子群をマイクロアレイや定量 PCR 法で同定した。これらの遺伝子はプロモーター中に DREB2A の結合配列である DRE を持っており、直接の標的遺伝子と考えられた。

DREB2A を不安定化していると考えられる E3 リガーゼの遺伝子を過剰発現あるいは破壊したシロイヌナズナを用い、乾燥誘導性遺伝子の発現を解析した。遺伝子破壊株では、ストレスのないときにも乾燥誘導性遺伝子が発現していた。乾燥にตอบสนองした遺伝子発現は、過剰発現株では遅延したが、逆に遺伝子破壊株では強くなっていたことから (図 1)、この E3 リガーゼは、乾燥応答性遺伝子の発現を負に制御していることが明らかになった。この機構は、乾燥ストレスへの迅速な応答を可能にしていると考えられる (図 2)。

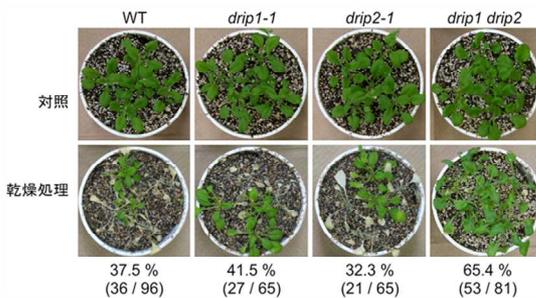


図 1 DRIP の機能欠損による乾燥耐性の獲得。2つの DRIP 遺伝子の機能が欠損した *drip1 drip2* 変異株 (右端) は、野生型株 (左端) と比較して、乾燥処理 1 週間後の生存率が高かった。乾燥処理は、2 週間灌水を停止することで行った。

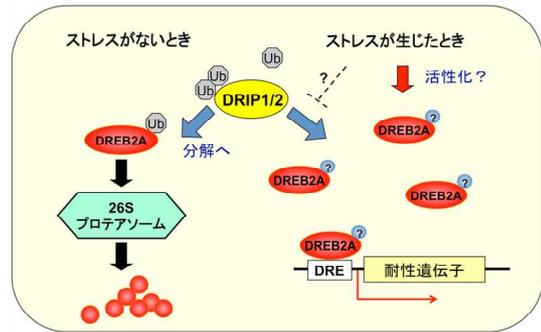


図 2 DRIP が乾燥ストレス応答を負に制御するしくみのモデル。DREB2A タンパク質は乾燥ストレスがないときでも合成されているが、DRIP が DREB2A に分解経路に向かう標識 (ubi) を付加し、分解装置 (26S プロテアソーム) における分解を促進することで、ストレス応答とそれに伴う生育阻害が抑制される。一方、ストレスが生じたときは、未知の機構により活性化された DREB2A がただちに蓄積して標的遺伝子を発現させることで、ストレス応答が引き起こされる。シロイヌナズナはこの機構により、急激な環境変化に対する素早い応答と、通常条件におけるストレス応答経路の抑制を両立していると考えられる。

(2) DREB2A 下流遺伝子の発現調節機構を調べるため、DREB2A の標的遺伝子から乾燥または高温特異的に発現する遺伝子を選抜し、プロモーターに特異性を決める配列が存在するかどうか検討した。レポーター遺伝子を用いた解析の結果、DREB2A の結合配列である DRE を含む 50 塩基対程度の断片内に特異性を決める配列が存在していることがわかった。

(3) トウモロコシから単離した DREB2A 相同性遺伝子である *ZmDREB2A* を用いて、その転写活性化の制御機構を解析した。*ZmDREB2A* は DREB2A と異なり、完全長の cDNA をシロイヌナズナ中に導入することで転写活性を示した。トウモロコシ中での発現を詳細に解析すると、ストレスのない状態ではスプライシングされていない mRNA が蓄積していること、ストレス時には成熟した mRNA が増加することが示され、ストレス時のスプライシングが遺伝子発現に重要な機能を果たしていることが示された。

イネやトウモロコシの DREB2A 相同遺伝子は、シロイヌナズナの DREB2A とは対照的に、プロトプラスト-過剰発現系では活性型であった。これらの遺伝子をシロイヌナズナで過剰発現させたところ、シロイヌナズナの活性型

DREB2A の場合と同様に、導入遺伝子の発現レベルに相関して生育が遅延し、乾燥あるいは高温誘導性遺伝子の発現が認められた。これらのことからシロイヌナズナとイネ科植物では DREB2A 相同遺伝子の活性調節機構は違っているが、標的の決定機構は共通である可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Qin, F., Sakuma, Y., Tran, L.-S. P., Maruyama, K., Kidokoro, S., Fujita, Y., Fujita, M., Umezawa, T., Sawano, Y., Miyazono, K., Tanokura, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2008) *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 20: 1693-1707. 査読有

Yoshida, T., Sakuma, Y., Todaka, D., Maruyama, K., Qin, F., Mizoi, J., Kidokoro, S., Fujita, Y., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2008) Functional analysis of an *Arabidopsis* heat shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress regulatory system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 515-521. 査読有

Qin, F., Kakimoto, M., Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Tran, L.-S. P., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *Plant J.* 50, 54-69. 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

Qin, F., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Posttranscriptional modification study on an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A involved in drought- and heat-inducible gene expression. 第50回日本植物生理学会年会, 3月21~24日, 名古屋.

Fu, C., Qin, F., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2008) Functional analysis of a *DRIP1* (*DREB2A* Interacting Protein 1) homolog *DRIP3* using overexpressors and RNAi silencing

approaches under drought stress condition. Plant Genomics in China IX, Jul 17-20, Guangzhou, China.

Yoshida, T., Sakuma, Y., Todaka, D., Osakabe, Y., Maruyama, K., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Functional analysis of *Arabidopsis HsfA3* controlled by *DREB2A* regulatory system under heat stress. 7th APSRC International Symposium: Abiotic Stress and Plant Growth and Development, Nov 8, Gwangju, Korea.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2007) Regulatory networks of gene expression in abiotic stress responses in *Arabidopsis* and rice. 2007 International Symposium on Plant Stress and Metabolism & Annual Meeting of the KSABC, Oct 11-13, Gyeongju, Korea.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2007) Improving abiotic stress tolerance in crops. Danforth Center Fall Symposium "Frontiers in Transgenesis", Sep 26-28, St. Louis, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/pmp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

篠崎 和子 (YAMAGUCHI-SHINOZAKI KAZUKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号 : 3 0 2 2 1 2 9 5

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし