

令和 6 年 9 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05833

研究課題名(和文)植物のクチクラ形成を調節する乾燥応答ネットワークの解析

研究課題名(英文)A transcription factor EDTF gene family regulate cuticular wax accumulation under drought conditions

研究代表者

浦野 薫 (Urano, Kaoru)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・研究員

研究者番号：30391882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は乾燥ストレス下でクチクラ形成関連遺伝子を制御するEDTFファミリーの機能をその変異体や過剰発現植物を用いて明らかにするとともに、植物の乾燥ストレスに応答したクチクラ形成の分子機構におけるEDTFファミリーの役割を解明することを目的としている。乾燥ストレスの初期過程に一過的に発現する転写因子遺伝子のEDTF1,2,3は乾燥ストレス下でCER1の活性化を直接的且つSHN3を介した間接的の2つの形で制御することで、乾燥初期のアルカン合成を上昇させ、クチクラ形成を調節し、植物の乾燥ストレス応答に関与することを明らかにした。またその制御は他の転写因子と協調的に制御することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究はこれまで解析が詳細に行われてこなかった乾燥ストレス時のクチクラ形成促進に関与する因子の解析であり、これまで重点的に行われてきたアブシシン酸(ABA)や気孔閉鎖に関する乾燥応答の研究とは異なる乾燥応答の分子機構を明らかにできた。今後はEDTFの上流・下流因子の解析を通して、植物の乾燥感受メカニズムの新たな知見が得られると考えている。また、EDTFを用いてクチクラ成分の量的・質的な変化に着目して解析を進めたことで、環境耐性作物を作出するための代謝エンジニアリングに重要な知見が得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：We identified transcription factors (EDTF family) that mediates a key regulatory pathway that links cuticular wax formation in response to dehydration stress. Transmission electron microscopy observation of leaves of the EDTF1 over-expressing transgenic plants (EDTF10X) revealed thicker cuticle. By contrast, leaves of the transgenic plants that express the EDTF1 fused to the SRDX repression domain (EDTF1SR) showed thinner cuticle. Expressions of genes involved in cuticular wax formation were increased in the EDTF10X plants and reduced in the EDTF1SR plants. Measurements of cuticular wax amounts and composition showed that the total wax amount of the EDTF10X leaves was increased and that of the EDTF1SR leaves were decreased. When confronted with dehydration stress, the EDTF10X plants reduced water loss while the EDTF1SR plants increased water loss. The triple mutant for EDTF1, EDTF2 and EDTF3 (edtf123) plants showed growth delay and decreased leaf water content under drought conditions.

研究分野：植物分子生物学

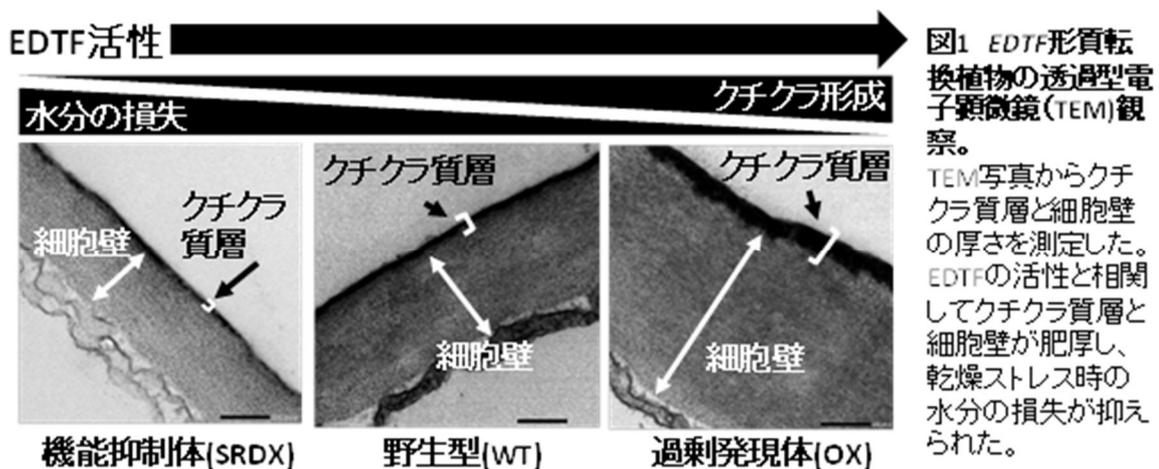
キーワード：環境ストレス応答 クチクラ形成 代謝 転写制御

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

乾燥環境下において、植物は水分の低下を感知すると、さまざまな形態的变化を通じて適応を図る。気孔の閉鎖は乾燥初期における重要な応答の一つであるが、これ以外の形態的变化に関する研究はあまり進んでいなかった。その理由の一つとして、従来の乾燥処理方法では、植物が急激に水分を失いやすく、形態的な変化に関連する因子の解析が困難であったことが挙げられる。我々は、土壤水分の減少を緩やかに進行させる乾燥処理法を開発し、2017年に報告した (Urano et al., 2017)。この方法を用いたシロイヌナズナのトランスクリプトーム解析により、乾燥初期に機能する転写因子である Early Dehydration Responsive Transcription Factor 1 (EDTF1) を同定した。

EDTF1 遺伝子を形質転換したシロイヌナズナを用いた機能解析の結果、過剰発現体 (OX) では葉や茎が肥厚し、機能抑制体 (SRDX) では葉や茎の厚みが減少することが確認された (図1)。さらに、乾燥処理を行った結果、SRDX 植物では葉からの水分損失が増加し、OX 植物では水分損失が減少することが分かった。これにより、乾燥環境下において EDTF1 がクチクラ層の形成に関与し、葉からの水分損失に影響を与えることが示唆された。EDTF1 に注目した解析は、従来のアブシシン酸 (ABA) や気孔閉鎖に関連する乾燥応答の研究とは異なる視点で進められ、EDTF1 の上流および下流因子の解析を通じて、植物の乾燥応答メカニズムに関する新たな知見が得られると期待される。



## 2. 研究の目的

本研究では、乾燥初期に応答する AP2/ERF 転写因子である EDTF に注目し、その機能解析を通じて、植物が乾燥ストレスに応答してクチクラ形成を促進するメカニズムを解明することを目的とする。具体的な研究課題は、EDTF が制御するワックス合成経路の解析、

組織特異的プロモーターを用いた EDTF 活性化によるクチクラ強化植物の作成と乾燥耐性の評価、EDTF タンパク質の相互作用因子の解析である。

## 3. 研究の方法

トランスクリプトーム解析と転写活性化解析による EDTF が制御するワックス合成経路の解析

EDTF1 の過剰発現体および機能抑制植物を用いて、クチクラ形成に関連する遺伝子の発現解析を行い、EDTF1 の下流に位置する遺伝子を特定した。トランスクリプトーム解析で単離された EDTF1 の下流遺伝子に対し、一過的転写活性化実験を実施し、EDTF1 の直接的な標的遺伝子を同定した。また、シロイヌナズナに存在する EDTF ファミリー遺伝子

(EDTF1, EDTF2, EDTF3) の3重変異体である edtf-tri をゲノム編集法を用いて作成し、下流因子の発現パターンを解析した。さらに、GC/MSによるワックス成分の分析や乾燥応答性の評価を行った。

組織特異的プロモーターを用いた EDTF 活性化によるクチクラ強化植物の作成と乾燥耐性評価

クチクラ強化植物の乾燥耐性への影響を調べるため、クチン合成遺伝子 CYP77A6 プロモーターの下で EDTF1 を発現させたシロイヌナズナを作成し、EDTF1 の発現量が増加するラインを取得した。しかし、詳細な機能解析は の解析に優先的に取り組んだため、期間内に完了させることができなかった。

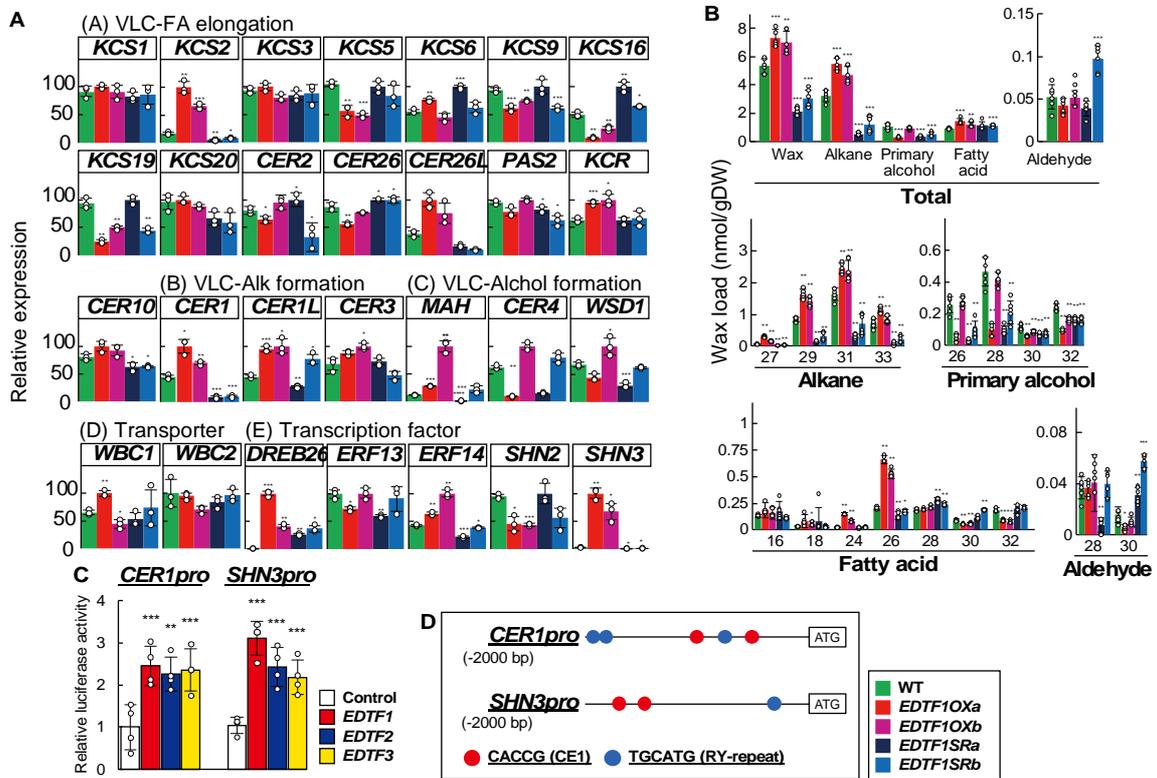
EDTF タンパク質の相互作用因子の解析

EDTF タンパク質の細胞内局在を調べるため、edtf-tri 多重変異体に GFP と融合した EDTF1 を導入した形質転換シロイヌナズナを作成した。解析の結果、EDTF1 は葉の表皮細胞の核および細胞質に局在することが示された。クチクラ形成に関わるワックス合成過程は表皮細胞で行われることが報告されており、この結果は EDTF1 がクチクラ形成に関与していることを支持するものであった。LC/MS を用いたタンパク質相互作用因子の解析を予定していたが、担当スタッフの異動により、期間内に相互作用因子を同定するには至らなかった。

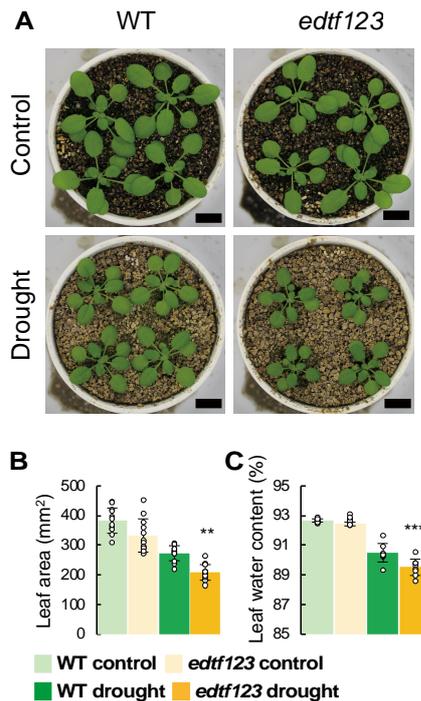
#### 4. 研究成果

トランスクリプトーム解析と転写活性化解析による EDTF が制御するワックス合成経路の解析

EDTF1 過剰発現体 (OX) および機能抑制体 (SR) を用いて、クチクラ層の構成に関与するワックス合成関連遺伝子の発現を Q-PCR で解析した (図 2A)。その結果、極長鎖脂肪酸の合成に関与する KCS2 や DER26L、アルカン合成に関与する CER1、そしてクチクラ形成を制御する転写因子 SHN3 の発現が、EDTF1OX では増加し、EDTF1SR では減少していることが確認された。これにより、これらの遺伝子が EDTF1 によって正に制御されていることが示唆された。また、クチクラワックスの量と組成の測定結果では、ワックス総量の大部分を占めるアルカン量が EDTF1OX で増加し、EDTF1SR では減少していることが分かった (図 2B)。さらに、プロトプラストを用いた一過的転写活性化実験の結果 (図 2C) では、EDTF1 およびそのファミリー遺伝子である EDTF2、EDTF3 を導入することで、CER1 プロモーターと SHN3 プロモーターのレポーター活性が上昇した。これらのプロモーター上には、EDTF1 ファミリーがコードする AP2/ERF タンパク質が結合する CE1 モチーフが存在していた。これらの結果から、EDTF1 およびそのファミリーは CER1 遺伝子を介してアルカン合成経路を直接的に制御し、SHN3 を介して間接的にも制御する可能性が示唆された。EDTF1、EDTF2、EDTF3 の三重変異体 (edtf123) 植物では、低水分条件下で成長が遅れ (図 3A, 3B)、葉の水分含量が減少した (図 3C)。さらに、乾燥誘導性アルカンの蓄積が edtf123 植物で減少し、ワックス成分の組成比が野生型と比較して乱れていた。これらの結果から、EDTF1 ファミリーは乾燥ストレスに応じたクチクラワックス形成経路においてアルカン量の調節に深く関与し、乾燥ストレス下での水分損失を防ぐ役割を持つことが示唆された。



(図2) EDTF10X と EDTF1SR におけるワックス合成関連遺伝子の発現解析 (A) とワックス量(B)の変化。EDTF1,2,3 導入による CER1 プロモーターと SHN3 プロモーターのレポーター活性の変化 (C) と CER1 プロモーターと SHN3 プロモーター上の既存のシス配列の解析。



(図3) 低水分条件下で栽培した *edtf123* 変異体の写真(A)、葉面積変化 (B) と葉の水分含量変化 (C)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Urano Kaoru, Maruyama Kyonoshin, Koyama Tomotsugu, Gonzalez Nathalie, Inz? Dirk, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko, Shinozaki Kazuo	4. 巻 108
2. 論文標題 CIN-like TCP13 is essential for plant growth regulation under dehydration stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 257 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-021-01238-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kim June-Sik, Sakamoto Yuki, Takahashi Fuminori, Shibata Michitaro, Urano Kaoru, Matsunaga Sachihiro, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko, Shinozaki Kazuo	4. 巻 119
2. 論文標題 <i>Arabidopsis</i> TBP-ASSOCIATED FACTOR 12 ortholog NOBIR06 controls root elongation with unfolded protein response cofactor activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2120219119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Fuminori, Kuromori Takashi, Urano Kaoru, Yamaguchi-Shinozaki Kazuko, Shinozaki Kazuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Drought Stress Responses and Resistance in Plants: From Cellular Responses to Long-Distance Intercellular Communication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.556972	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大島 良美, 浦野 薫, 藤田 美紀, Frederic Domergue, 菅野 茂夫, 篠崎 一雄, 光田 展隆
2. 発表標題 クチクラ形成を制御するMYB 転写因子による水利用効率の向上
3. 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー学会 (つくば大会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦野 薫 , 圓山 恭之進 , 大島 良美 , 坂本 真吾 , 石川 寿樹 , 川合 真紀 , 佐藤 繭子 , 豊岡 公德 , 篠崎 和子 , 篠崎 一雄
2. 発表標題 Analyses of transcriptional regulation of cuticular wax accumulation in response to dehydration
3. 学会等名 2021年度日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦野 薫 , 圓山 恭之進 , 大島 良美 , 坂本 真吾 , 石川 寿樹 , 川合 真紀 , 佐藤 繭子 , 豊岡 公德 , 篠崎 和子 , 篠崎 一雄
2. 発表標題 植物のクチクラ形成を調節する乾燥応答ネットワークの解析
3. 学会等名 2020年度日本植物学会
4. 発表年 2020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
---------	---------