

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370021

研究課題名（和文） レスポンスレギュレーターARR1によるサイトカイニンシグナル伝達機構

研究課題名（英文） Mechanism for cytokinin signal transduction by the response regulator ARR1

研究代表者

青山 卓史（AOYAMA TAKASHI）

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：80202498

研究成果の概要（和文）：シロイヌナズナ *ARR1* はサイトカイニン初発応答遺伝子の転写活性化を行なうレスポンスレギュレーターである。染色体免疫沈降解析において、*ARR1* 融合タンパク質が *ARR1* 標的遺伝子である *ARR6* のプロモーター領域に結合することが確認された。この結合は植物体のサイトカイニン処理により強められた。また、*ARR1* は染色体上で広範な DNA 領域に結合する可能性が示された。これに加えて、サイトカイニン応答性人工プロモーターを作出し、細胞ごとのサイトカイニンシグナルの強さを観察できるモニター系を開発した。

研究成果の概要（英文）： *Arabidopsis* *ARR1* is a response regulator which activates the transcription of primary responsive genes to cytokinin. In chromosome immunoprecipitation analysis, it was confirmed that an *ARR1* fusion protein was bound to the promoter region of an *ARR1*-direct-target gene, *ARR6*. The binding was enhanced by the treatment of plants with cytokinin. It was suggested that *ARR1* widely covers the chromosome DNA. In addition to the *ARR1* study, a monitoring system was developed, by which the intensity of cytokinin signals in individual cells is visualized taking advantage of an artificial cytokinin-responsive promoter.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：植物ホルモン・転写因子・シグナル伝達・細胞分化

1. 研究開始当初の背景

サイトカイニンは、シュート形成の促進、黄化の遅延、葉緑体の分化・増殖など、多くの植物固有の現象に関わる植物ホルモンである。サイトカイニンは細胞膜上の受容体

His キナーゼによって感知された後、そのシグナルが多段階の His-Asp リン酸リレーを介して *ARR1* を含む転写因子型レスポンスレギュレーター（type-B *ARR*）へと伝わり、その結果様々な分子機能をコードする初発応

答遺伝子の転写が活性化される。リン酸リレーシグナルは非転写因子型レスポンスレギュレーター (type-A ARR) にも伝達されるが、type-B ARR 遺伝子の多重変異体の表現型などから、殆どのサイトカイニン応答現象へのシグナル伝達は type-B ARR を介しているものと考えられた。しかし、type-B ARR の標的遺伝子の全容、type-B ARR によるシグナル応答性転写活性化の分子機構、および標的遺伝子下流の過程などについては不明な点が多く、サイトカイニンシグナルがどのような経路で植物固体・器官レベルの応答現象へとつながるのかに関しては殆ど理解されていなかった。

研究代表者の研究グループでは、これまでに ARR1 の転写因子としての基本的な分子機能を明らかにするとともに、ARR1 遺伝子の機能欠失型変異体や人為的に転写活性化能が誘導できる ARR1ΔDDK-GR を用いて、ARR1 がサイトカイニンシグナルに反応して初発応答遺伝子を直接転写活性化すること証明した。また、ARR1 が大部分のサイトカイニン初発応答遺伝子の転写活性化に関わることを明らかにし、サイトカイニン応答の初期過程において中心的な役割を果たすことを示した。さらに下流のサイトカイニン応答現象に関しては、ARR1 が標的遺伝子の一つ SHY2/LAA3 を介して、根端メリステム細胞の分化におけるオーキシン・サイトカイニンの拮抗的制御に関わっていることを明らかにした。

2. 研究の目的

これまでの ARR1ΔDDK-GR を用いた解析、および ARR1-GFP を用いた初歩的な染色体免疫沈降 (ChIP) 解析などから、転写量が大きく上昇するサイトカイニン初発応答遺伝子に関しては、それらの殆どのものが ARR1 の標的遺伝子であることが示されている。しかし、それらの解析における検出感度は低く、ARR1 標的遺伝子が網羅的に同定されている訳ではない。そこで、感度の高い ChIP 解析系を新たに開発し、ARR1 が上流領域に結合する遺伝子を網羅的に同定し、ARR1 標的遺伝子の全容を解明することを目的とした。

type-B ARR のシグナル受容によって引き起こされる分子機能の変化については、サイトカイニンシグナル伝達機構を理解する上で重要であるにも拘らず、全く解析されてこなかった。そこで、ChIP 解析系を利用し、ARR1 の標的 DNA に対する結合が受容体 His キナーゼからのシグナルに依存するのか、もしくは転写活性化能のみがシグナル依存なのか、また、ARR1 が転写活性化だけでなく転写抑制化にも関わっているのかなどを明らかにしようとした。

これまでに様々な遺伝子発現解析が行われた結果、数百を越す遺伝子の発現がサイトカイニン処理に伴って変化することが示されている。また、植物個体および細胞レベルで起こる多様な現象の殆どがサイトカイニンシグナルの影響下にあると考えられる。しかし、これら現象に対してサイトカイニンシグナルがどのように関わっているのかについて、系統的に解析されることはなかった。そこで、そのような解析の手始めとして、個々の細胞におけるサイトカイニンシグナルの強度をリアルタイムでモニターできる系の開発を行なった。

3. 研究の方法

検出感度の高い ChIP 解析系を構築するために、まず、プロモーター領域からタンパク質コード領域の末端までを含む ARR1 遺伝子 DNA 断片をクローニングし、その下流にフレームを合わせる形で YFP および myc タグをタンデムにコードする DNA 断片をつなぎ、融合遺伝子 (ARR1g-YFPmyc) を作成した。この融合遺伝子を野生型シロイヌナズナに導入し、YFP 融合タンパク質を内在性 ARR1 と同様のパターンで安定的に発現する形質転換体株を選抜した。この形質転換体を寒天培地上で生育し、サイトカイニンの一種であるベンジルアデニン (BA) 処理または無処理の後に根の部分を集め、抗 YFP 抗体を用いた ChIP 解析に供した。ChIP 解析に関しては、今後全ゲノムを対象にした大規模解析へと発展させる計画であるため、理化学研究所の金鍾明博士と関原明博士に指導と協力を依頼した。

サイトカイニンシグナルのモニター系に関しては、研究代表者の研究グループが明らかにした ARR1 結合配列 (5'-AGATT-3') を 6 コピー有する人工プロモーターの下流にヒストン H2B-YFP 融合タンパク質をコードする DNA 断片をつないだレポーター遺伝子 (TCS6-nYFP) を作成し、シロイヌナズナに導入した。また、オーキシンシグナルのモニター系として用いられている DR5 プロモーターとヒストン H2B-tdTOMATO コード DNA を組み合わせたレポーター遺伝子 (DR5-ntdTOMATO) も同時に作成し、シロイヌナズナに導入した。これらを掛け合わせ、両レポーター遺伝子を有するシロイヌナズナ株を得た。

4. 研究成果

(1) 融合遺伝子 ARR1g-YFPmyc が導入された形質転換シロイヌナズナを複数作成し、それらの中から、ARR1-YFPmyc 融合タンパク質を内在性 ARR1 と同様のパターンで安定

的に発現する形質転換体株を樹立した。図1にその YFP 蛍光パターンを示す。(左: 形質転換株の根の明視野像を示す。右: ARR1-YFPmyc 融合タンパク質の蛍光パターンを緑色で示す。)

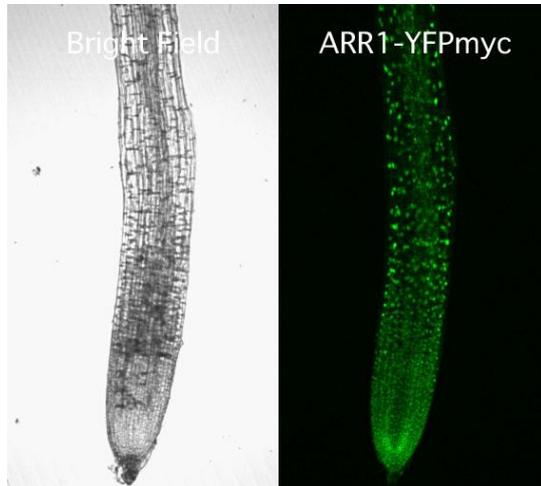


図 1

そのシロイヌナズナ株を用いた染色体免疫沈降解析において、ARR1-YFPmyc が ARR1 標的遺伝子である *ARR6* のプロモーター領域に結合することを確認した。また、この結合は植物体への BA 処理により強められることが判った。これまで ARR1 はサイトカニンシグナルにより直接標的遺伝子の転写を活性化することが示されていたが、今回、ARR1 の DNA 結合がサイトカニンシグナルに応答することが初めて示された。

また、ARR1 はこれまでに知られている典型的なサイトカニン応答遺伝子以外にも、アクチン遺伝子など構成的に発現される遺伝子のプロモーター領域にも結合することが示された。このことから、ARR1 は染色体 DNA 上で予想以上に広範な領域に結合し、多くの遺伝子の転写制御に対して直接影響を与えるという可能性が示された。

なお、これらの成果は ARR1 の分子機能解析の論文として現在投稿準備中である。

(2) ARR1 結合配列である 5'-AGATT-3' を 6 コピー持つ人工プロモーターの下流にヒストン H2B-YFP 融合タンパク質をコードする DNA 断片をつないだレポーター遺伝子 (*TCS6-nYFP*) を作成した。また、DR5 プロモーターとヒストン H2B-tdTOMATO コード DNA 断片を組み合わせたレポーター遺伝子 (*DR5-ntdTOMATO*) を作成した。これらのレポーター遺伝子をシロイヌナズナに導入し、それら形質転換体の中からそれぞれ蛍光シグナルが標準的である株を選抜した。そして、それら形質転換体を掛け合わせるにより、両レポーター遺伝子をホモに

有するシロイヌナ株を作成した。その株の根におけるそれぞれのレポーター蛍光のパターンを図 2 に示す。(左: 形質転換株の根の明視野像を示す。中: *DR5-ntdTOMATO* によるオーキシシグナルのパターンを赤で示す。右: *TCS6-nYFP* によるサイトカニンシグナルのパターンを緑で示す。)

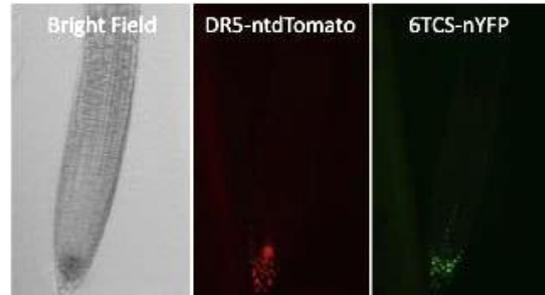


図 2

このモニター系では、tdTOMATO および YFP の蛍光が比較的自家蛍光の少ない核に局在するので、細胞ごとのシグナルが低バックグラウンドおよび高コントラストで得られる。このことにより、それぞれのシグナルの検出感度が飛躍的に向上すると考えられる。また、オーキシシグナルとサイトカニンシグナルの経時的な変化を同じ植物個体を用いてリアルタイムで観察することができる。

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 5 件)

- ① Aki, S., Nakai, H., Aoyama, T., Oka, A., and Tsuge, T. (2011) *AtSap130/AtSF3b-3* function is required for reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52:1330-1339. doi: 10.1093/pcp/pcr077 (査読有り)
- ② Luo, Y., Qin, G., Zhang, J., Liang, Y., Song, Y., Zhao, M., Tsuge, T., Aoyama, T., Liu, J., Gu, H., and Qu, L.-J. (2011) D-myo-inositol-3-phosphate affects phosphatidylinositol-mediated endomembrane function in *Arabidopsis* and is essential for auxin-regulated embryogenesis. *Plant Cell* 23:1352-1372. doi: 10.1105/tpc.111 (査読有り)
- ③ She, K.-C., Kusano, H., Koizumi, K., Yamakawa, H., Hakata, M., Imamura, T., Fukuda, M., Naito, N., Tsurumaki, Y., Yaeshima, M., Tsuge, T., Matsumoto, K., Kudoh, M., Itoh, E., Kikuchi, S.,

Kishimoto, N., Yazaki, J., Ando, T., Yano, M., Aoyama, T., Sasaki, T., Satoh, H., and Shimada, H. (2010) A novel factor *FLOURY ENDOSPERM2* is involved in regulation of rice grain size and starch quality. *Plant Cell* 22:3280-3294. doi: 10.1105/tpc.109 (査読有り)

- ④ Sato, K., Maki, Y., Imai, K.K., Aoyama, T., Goto, D.B., and Yamaguchi, J. (2010) Control of endoreduplication of trichome by RPT2a, a subunit of the 19S proteasome in *Arabidopsis*. *J. Plant Res.* 123: 701-706. doi: 10.1007/s10265-010-0321-x (査読有り)
- ⑤ Taniguchi, Y.Y., Taniguchi, M., Tsuge, T., Oka, A., and Aoyama, T. (2010) Involvement of *Arabidopsis thaliana* phospholipase D ζ 2 in root hydrotropism through the suppression of root gravitropism. *Planta* 231:491-497. doi: 10.1007/s10425-009-1052-x (査読有り)

[学会発表] (計 25 件)

- ① 和田悠貴香、安田敬子、柘植知彦、青山卓史、「リン酸欠乏に応答した根毛伸長における *PIP5K* の機能」、日本植物生理学会・2012 年度年会、2012 年 3 月 16-18 日 (京都産業大学、京都府)
- ② 安藤和紀、青山卓史、山篠貴史、水野 猛、野崎 浩、林謙一郎、「光標識によるサイトカイニン受容体の結合部位の同定」、植物化学調節学会第 46 回大会、2011 年 11 月 1-2 日 (宇都宮大学、栃木県)
- ③ 福永紫穂、青山卓史、野崎 浩、林 謙一郎、「細胞内オーキシン分布の可視化に関する研究-IAA のリアルタイムイメージング」、植物化学調節学会第 46 回大会、2011 年 11 月 1-2 日 (宇都宮大学、栃木県)
- ④ 草野博彰、和田悠貴香、安斎尚子、島田浩章、松井 南、青山卓史、「細胞の極性を決めるタンパク質間相互作用」、第 24 回植物脂質シンポジウム、2011 年 9 月 19-20 日 (東京大学、東京都)
- ⑤ 青山卓史、「植物細胞形態形成におけるリン脂質シグナルの役割」、静岡大学・若手グローバル研究リーダー育成プログラムシンポジウム、2011 年 9 月 15 日 (静岡大学、静岡県)
- ⑥ 安斎尚子、大橋洋平、谷口雅俊、柘植知彦、青山卓史、「シロイヌナズナ・ホスホリパーゼ D ζ 1 遺伝子の遺伝学的解析」、日本植物生理学会・2011 年度年会、2011 年 3 月 11 日 (日本植物生理学会ホームページ上)
- ⑦ 和田悠貴香、草野博彰、安田敬子、柘植知彦、青山卓史、「環境刺激に応答した *PIP5K* 遺伝子の機能」、第 23 回植物脂質シ

ンポジウム、2010 年 11 月 26-27 日 (京都大学、京都府)

- ⑧ 安斎尚子、大橋洋平、谷口雅俊、柘植知彦、青山卓史、「シロイヌナズナ・ホスホリパーゼ D ζ 1 遺伝子の遺伝学的解析」、第 23 回植物脂質シンポジウム、2010 年 11 月 26-27 日 (京都大学、京都府)
- ⑨ 草野博彰、和田悠貴香、安斎尚子、島田浩章、松井 南、青山卓史、「植物細胞の形態形成における位置情報のシグナル」、第 23 回植物脂質シンポジウム、2010 年 11 月 26-27 日 (京都大学、京都府)
- ⑩ 安藤和紀、日下直之、青山卓史、野崎浩、林謙一郎、「ケージドサイトカイニンの設計と生理活性」、植物化学調節学会第 45 回大会、2010 年 11 月 5 日 (神戸大学、兵庫県)
- ⑪ Naoko Anzai, Yohei Ohashi, Masatoshi Taniguchi, Tomohiko Tsuge, and Takashi Aoyama, "Genetic analysis of an *Arabidopsis thaliana* PX-PH-type phospholipase D gene, *PLD ζ 1*.", Cold Spring Harbor Asia Conference "From Plant Biology to Crop Biotechnology", October 25-29, 2010 (Suzhou China)
- ⑫ Takashi Aoyama, Yukika Wada, Naoko Anzai, and Hiroaki Kusano, "Regulatory mechanism for shaping plant cells.", International Symposium on Young Researcher Global Leader Training Program, Shizuoka University, October 7-8, 2010 (Hamamatsu Japan)
- ⑬ Yukika Wada, Hiroaki Kusano, Keiko Yasuda, Tomohiko Tsuge, and Takashi Aoyama, "Function of *PIP5K* genes in the root hair elongation responsive to environmental stimuli.", The 19th International Symposium on Plant Lipids, July 11-16, 2010 (Cairns, Australia)
- ⑭ 和田悠貴香、草野博彰、安田敬子、柘植知彦、青山卓史、「環境刺激に応答した根毛伸長における *PIP5K* 遺伝子の機能」、日本植物生理学会・2010 年度年会、2010 年 3 月 18-21 日 (熊本大学、熊本県)
- ⑮ Yukimi Y. Taniguchi, Masatoshi Taniguchi, Naoko Anzai, Yukika Wada, Yohei Ohashi, Tomohiko Tsuge, and Takashi Aoyama, "Biological function of the *Arabidopsis* PX-PH-type phospholipase Ds, *PLD ζ 1* and *PLD ζ 2*.", The 3rd Asian Symposium on Plant Lipids and The 22nd Japanese Symposium on Plant Lipids, November 27-29, 2009 (Yokohama, Japan)
- ⑯ 青山卓史、「植物細胞の極性制御に関わるリン脂質シグナル」、静岡大学・若手グロ

ーバル研究リーダー育成プログラムシンポジウム、2009年11月11日（静岡大学、静岡県）

〔図書〕（計2件）

① Aoyama, T. (2009) Phospholipid signaling in root hair development. *in* “*Root Hairs, Excellent Tools for the Study of Plant Molecular Cell Biology*” (eds., Emons, A.M.C. and Ketelaar, T. Springer, Berlin Heidelberg New York) pp171-189.

〔その他〕

ホームページ等

<http://rdb.kuicr.kyoto-u.ac.jp/researchers/view/aoyama+takashi>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 卓史 (AOYAMA TAKASHI)
京都大学・化学研究所・教授
研究者番号：80202498

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし