

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24日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580015

研究課題名（和文） サツマイモの転写因子 WRKY によるデンプン合成及び塊根形成の制御に関する研究

研究課題名（英文） Regulation of starch synthesis and tuberous root formation by a transcription factor WRKY in sweet potato

研究代表者

斉藤 和幸（SAITOU KAZUYUKI）

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：00215534

研究成果の概要（和文）：ADP-グルコースピロホスホリラーゼ（AGPase）はデンプン合成を律速する重要な酵素である。本研究ではシロイヌナズナより WRKY 転写因子の cDNA、*AtWRKY20* を単離し、AGPase 遺伝子の直接的な転写活性化因子であることを明らかにした。さらに、*AtWRKY20* はサツマイモの AGPase 遺伝子のプロモーターに結合すること、サツマイモに導入すると AGPase 遺伝子の転写を活性化することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) catalyzes the first limiting step in starch biosynthesis. In this study, a WRKY transcription factor cDNA, *AtWRKY20*, has been isolated from *Arabidopsis thaliana* and *AtWRKY20* was a direct transcriptional activator of the AGPase gene. *AtWRKY20* interacted with the promoter of sweet potato AGPase gene and the expression of AGPase gene was enhanced by introduction of *AtWRKY20* into sweet potato.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、作物学・雑草学

キーワード：食用作物、サツマイモ、転写因子、WRKY、転写制御、ADP-グルコースピロホスホリラーゼ

1. 研究開始当初の背景

サツマイモの生産性を改良するため、塊根

のデンプン合成能力を高めることは重要な育種目標である。ADP-グルコースピロホス

ホリラーゼ (AGPase) はグルコース-1-リン酸から ADP-グルコースへの変換を触媒し、デンプン合成を律速する重要な酵素である。高等植物の AGPase は二個の大サブユニットと二個の小サブユニットから成るヘテロ四量体で、それぞれのサブユニットは異なった遺伝子にコードされている。サツマイモでは *ibAGP1* と *ibAGP2* と名付けられた二つの小サブユニット遺伝子が報告されており、*ibAGP1* はスクロースによって遺伝子発現が誘導されるが、*ibAGP2* はスクロースによって遺伝子発現が抑制される (Bae と Liu、1997)。シロイヌナズナでは核ゲノムに四コピーの大サブユニット遺伝子が存在し (*ApL1* から *ApL4*)、スクロースによって *ApL3* と *ApL4* 遺伝子の発現が誘導される。しかし、これらの遺伝子の転写を制御しているメカニズムは明らかにされていなかった。

遺伝子の転写はプロモーターに作用する転写因子によって制御されている。転写因子 WRKY は N 末端側にアミノ酸配列 WRKYGQK を含む 60 アミノ酸残基から成る WRKY ドメインとジンクフィンガー様モチーフを持ち、W-ボックスと名付けられた DNA 塩基配列モチーフ 5'-(T)TGAC(C/T)-3' に結合する。スクロース誘導性遺伝子である *ibAGP1* および *ApL3* のプロモーター中にはいずれも W-ボックスが存在した。したがって、これらの遺伝子の転写は転写因子 WRKY によって制御されていることが考えられ、転写因子 WRKY はサツマイモの生産性を高めるための重要なターゲットとなることが期待された。

2. 研究の目的

(1) 核ゲノムのサイズが顕花植物の中で最も小さく、遺伝情報のデータベースが整備されているシロイヌナズナについてスクロースに反応して *ApL3* 遺伝子の発現を制御している WRKY 転写因子を明らかにする。

(2) サツマイモにおいてシロイヌナズナの WRKY 転写因子を用いた *ibAGP1* の転写制御について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 植物材料

シロイヌナズナ (生態型コロンビア) は、水耕液をしみ込ませたロックウール上に播種し、日長 12 時間、光強度 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、室温 20°C 、湿度 60% に設定した培養室で栽培した。サツマイモ (品種コガネセンガン) は、日長 12 時間、光強度 $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、室温 25°C 、湿度 70% に設定した培養室でバーミキュライトを詰めたポットを用いて栽

培した。

(2) プロモーターの転写活性

エフェクターコンストラクトとして、pBE2113- GUS (Mitsuhara ら、1996) のプロモーター (*E12Q*) とシロイヌナズナの WRKY (*At4g26640; AtWRKY20*) の cDNA とを連結したプラスミドを作成した。レポーターコンストラクトとして、*ApL3* あるいは *ibAGP1* 遺伝子のプロモーターとルシフェラーゼ遺伝子とを連結したプラスミドを作成し、エフェクターコンストラクトとともにパーティクルガンを用いてシロイヌナズナあるいはサツマイモの細胞へ導入した。

(3) ゲルシフトアッセイ

AtWRKY20 の cDNA をプラスミド pGEX KG ori-Hisx6 (Nagata ら、2012) に挿入し、大腸菌 BL21 に導入した。大腸菌を培養して *AtWRKY20* タンパク質を生産させ、グルタチオンセファロース 4B と TALON metal affinity resin を用いて精製した。Second-Generation DIG Gel Shift キットを用いて精製した *AtWRKY20* タンパク質と *ApL3* プロモーターあるいは *ibAGP1* プロモーターとの結合を検討した。

4. 研究成果

(!) *ApL3* 遺伝子の発現におよぼす糖の影響
ApL3 遺伝子の発現は 100 mM スクロースによって約 4 倍に高まり、100 mM マンニトールによって約 1.5 倍に高まった。マンニトールは植物体内で代謝されにくい糖であるため、マンニトールによる *ApL3* 遺伝子の発現レベルの上昇は、溶液中の浸透圧が高まったためであると考えられる。したがって、*ApL3* 遺伝子はスクロース自体と浸透圧の両方の効果により発現が誘導されるが、スクロース自体の効果が大きいことが明らかになった。

(2) *ApL3* 遺伝子の転写活性におよぼすスクロースの影響

100 mM スクロースによって *ApL3* 遺伝子の転写活性は約 3 倍高まった。これは、スクロースによる *ApL3* 遺伝子の発現レベルの上昇と良く一致した。したがって、スクロースによる *ApL3* 遺伝子の発現レベルの上昇は、主に転写活性が高まったためであると考えられる。

(3) *AtWRKY20* 遺伝子の発現に及ぼす糖の影響

AtWRKY20 遺伝子の発現レベルは 100 mM スクロースによって大きく高まり、100 mM マンニトールによっても発現レベルの上昇

が認められた。この結果は *ApL3* 遺伝子の発現パターンとよく一致していた。

(4) *ApL3* プロモーターと *AtWRKY20* との相互作用

AtWRKY20 により *ApL3* 遺伝子プロモーターの転写活性が約3倍に上昇した。また、*AtWRKY20* は *ApL3* 遺伝子プロモーターと結合した。したがって、*AtWRKY20* は *ApL3* 遺伝子の直接的な転写活性化因子であり、スクロースによる *ApL3* 遺伝子の発現は *AtWRKY20* により制御されていることが示唆された。

(5) サツマイモにおける *ibAGP1* プロモーターの発現

塊根形成過程における *ibAGP1* プロモーターの発現を調べるため、*ibAGP1* プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結し、発達中の塊根における3つの異なる部位（部位1、一次形成層および周辺数ミリメートルの細胞；部位2、木部柔細胞；部位3、中心柱細胞および周辺の木部柔細胞）で一過的に発現させた。最大直径が10 mmの塊根ではルシフェラーゼ活性が部位3より部位1で低かったのに対し、最大直径が30 mmの塊根では部位1での活性が、直径が小さい時に比べて明らかに高くなり、部位2での活性が最も高かった。部位3におけるルシフェラーゼ活性は最大直径が10 mmと30 mmの塊根との間で有意な差が認められなかった。Yatomiら(1996)はAGPase活性が塊根の一次形成層周辺で高いことを報告していることから、塊根形成過程におけるAGPase活性を高めるには転写レベルでの調節が重要であることが示唆された。

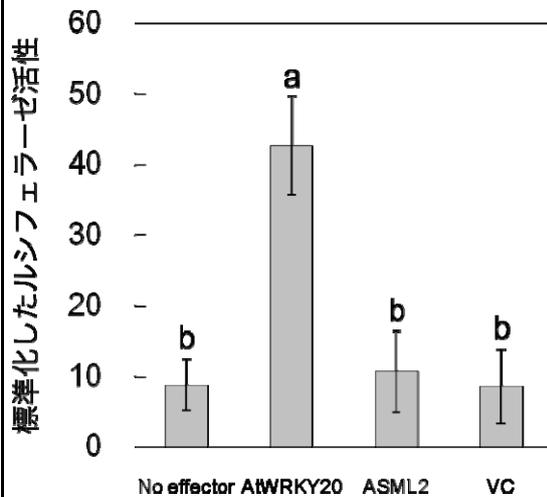
(6) サツマイモにおける *ibAGP1* プロモーターの転写活性に及ぼす *AtWRKY20* および *ASML2* の影響

サツマイモに *AtWRKY20* を導入すると *ibAGP1* プロモーターの転写活性が約4倍に高まった（第1図）。しかし、シロイヌナズナにおいて *ApL3* 遺伝子の発現を高めることが報告されている転写制御因子 *ASML2* はサツマイモに導入しても *ibAGP1* プロモーターの転写活性に影響を及ぼさなかった。

(7) *ibAGP1* プロモーターの機能解析

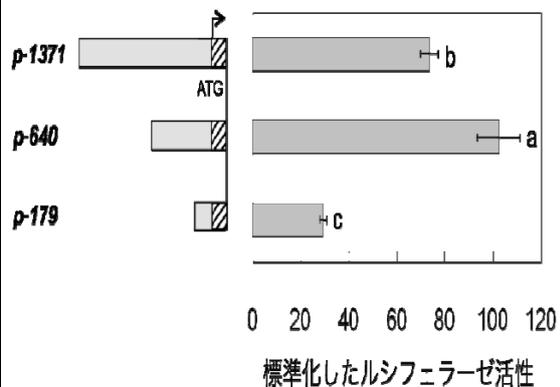
シスエレメントを検討するため、*ibAGP1* プロモーターの5'上流の領域を順次削除したものをレポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子に連結し、葉柄に導入した。*ibAGP1* プロモーターの転写開始点より-641から-1371の位置を削除するとルシフェラーゼ活性が高まったことから、-641から-1371の領域に負のシスエレメントが存

在することが示唆された（第2図）。さらに



第1図 *ibAGP1* のプロモーター活性に及ぼす *AtWRKY20* および *ASML1* の影響

No effector, エフェクター無し; VC, ベクターコントロール。図中の同じアルファベットは5%水準で有意差が無いことを示し、バーは標準偏差 (n=3) を示す。



第2図 *ibAGP1* プロモーターの5'末端からの削除が活性に及ぼす影響

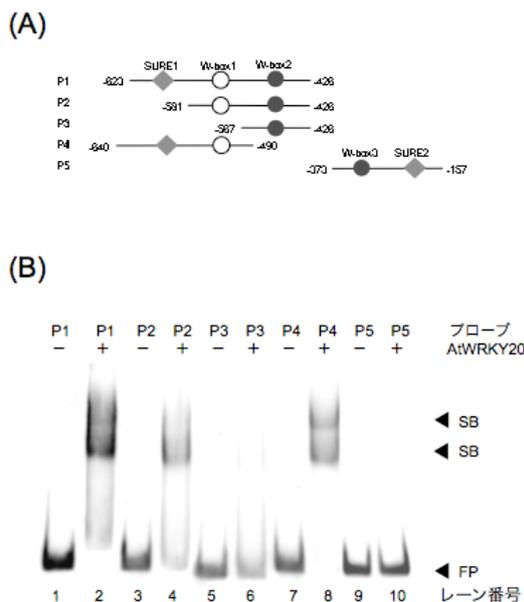
コンストラク名の中の数字は転写開始点からのプロモーターのサイズを示す。図中のアルファベットが同じ時は5%水準で有意差が無いことを示し、バーは標準偏差 (n=3) を示す。

-180の位置まで削除すると、-640 bp プロモーターと比較してルシフェラーゼ活性が大きく減少した。このことから-640から-180の位置に正のシスエレメントが存在し、このエレメントが *ibAGP1* 遺伝子の発現に重要であることが示された。-1371から-640の *ibAGP1* プロモーター上には二つの SURE 様配列 (5'-AATATAAAA-3'および 5'-

AATAAAAAA-3') が存在することが報告されていたが、その領域には正のシスエレメントが認められなかったことから、これらの SURE 様配列は SURE シスエレメントとしての機能を持たないことが示唆された。

(8) AtWRKY20 の *ibAGP1* プロモーターへの結合

AtWRKY20 が SURE 様配列や W-ボックスを介して *ibAGP1* プロモーターと直接結合するのか検討するため、大腸菌内で AtWRKY20 と His タグとの融合タンパク質を生産し、精製した後ゲルシフトアッセイを行った。*ibAGP1* プロモーターの-640 から-180 の位置に正のシスエレメントの存在が示されたので、-623 から-426 の領域をジゴキシゲニンでラベルし、プローブ P1 とした。P1 プローブには一つの SURE-様配列(SURE1、-607 から-601) と、二つの W-ボックスコア配列(W-box1、-575 から-572; W-box2、-483 から-480) が存在した(第3図)。AtWRKY20 タンパク質を加えると P1 プローブの移動



第3図 AtWRKY20 の *ibAGP1* プロモーターと AtWRKY20 との結合

(A) プローブとして使われた *ibAGP1* プロモーターの領域 菱形は SURE 様配列、白抜きのは W ボックス、黒塗りの円は転写方向に対して逆向きの挿入された W ボックスを示す。(B) 組換え AtWRKY タンパク質を用いた *ibAGP1* プロモーターのゲルシフトアッセイ 矢じり印は二つのシフトしたバンド (SB) とフリーのプローブ (FP) の位置を示す。

が遅れ、二本のバンドが認められた(第3図 レーン 2)。P1 プローブから SURE1 を削除した P2 プローブは AtWRKY20 と結合し、一本のバンドとして検出された(レーン 4)。P1 プローブから SURE1 と W-box1 を削除した P3 プローブは AtWRKY20 と結合しなかった(レーン 6)。一方、SURE1 と W-box1 を含む P4 プローブは 2 本のバンドとして検出された(レーン 8)。-373 から-157 の領域から成る P5 プローブには結合しなかった。これらの結果から、AtWRKY20 は SURE1 と W-box1 を介してコガネセンガン *ibAGP1* プロモーターと直接結合し、コガネセンガン *ibAGP1* プロモーターの転写を活性化することが示唆された。

(9) まとめ

シロイヌナズナにおいて転写因子 AtWRKY20 は AGPase 遺伝子 *ApL3* の転写活性化因子であり、スクロース濃度および浸透圧の上昇による *ApL3* の発現誘導は AtWRKY20 を介して行われることが明らかとなった。また、サツマイモに AtWRKY20 遺伝子を導入することによって AGPase 遺伝子 *ibAGP1* の転写活性を高めることが可能であり、今後サツマイモの生産性を高めるための有望な遺伝子であることが示された。

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 Takafumi Nagata, Kazuyuki Saitou, Regulation of expression of D3-type cyclins and ADP-glucose pyrophosphorylase genes by sugar, cytokinin and ABA in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.), Plant Production Science, 査読有, Vol.12, No.4, 2009, pp.434-442
- ② 原大道、永田敬文、児嶋健吾、湯浅高志、齋藤和幸、上野修、シロイヌナズナの転写因子 AtWRKY20 は ADP-グルコースピロホスホリラーゼ大サブユニット遺伝子 *ApL3* の転写活性を高める、日本作物学会紀事、査読無、第 78 巻、別号 2、2009、pp. 136-137
- ③ 永田敬文、原大道、齋藤和幸、上野修、サツマイモにおける ADP-グルコースピロホスホリラーゼ小サブユニット遺伝子 *ibAGP1* の転写活性はシロイヌナズナ AtWRKY20 転写因子により高まる、日本作物学会紀事、査読無、第 78 巻、別号 2、2009、pp. 138-139
- ④ Takafumi Nagata, Hiromich Hara, Kazuyuki Saitou, Akiko Kobashi, Kengo Kojima, Takashi Yuasa, Osamu Ueno, Activation of

ADP-glucose pyrophosphorylase gene promoters by a WRKY transcription factor, AtWRKY20, in *Arabidopsis thaliana* L. and sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.), Plant Production Science, 査読有, Vol.15, No.1, 2012, pp.10-18

[学会発表] (計7件)

- ① 原大道ら、シロイヌナズナの転写因子 AtWRKY20 は ADP-グルコースピロホスホリラーゼ大サブユニット遺伝子 *ApL3* の転写活性を高める、日本作物学会、2009年9月30日、静岡県コンベンションアーツセンター (グランシップ)
- ② 永田敬文ら、サツマイモにおける ADP-グルコースピロホスホリラーゼ小サブユニット遺伝子 *ibAGP1* の転写活性はシロイヌナズナ AtWRKY20 転写因子により高まる、日本作物学会、2009年9月30日、静岡県コンベンションアーツセンター (グランシップ)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/shokusei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 和幸 (SAITOU KAZUYUKI)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：00215534

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：