

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 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770064

研究課題名（和文） 木質形成過程における転写制御ネットワークの解明

研究課題名（英文） Unraveling regulatory network in wood formation

研究代表者

光田 展隆（MITSUDA NOBUTAKA）

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号：80450667

研究成果の概要（和文）：植物の様々な現象に関わる遺伝子制御ネットワークを解明するために、モデル植物であるシロイヌナズナの制御因子だけからなる人工遺伝子ライブラリーを作成し、それを利用して高効率な制御因子の同定を可能とする改良酵母ワンハイブリッド法を開発した。本法を利用して、木質形成に関わる遺伝子の制御領域に結合する制御因子を新規に多数同定し、遺伝子制御ネットワークの全体像がおぼろげながら見えてきた。また、木質を形成しない変異体の表現型を回復できる制御因子を複数同定し、それらの機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：New efficient improved yeast one-/two-hybrid screening system has been developed in which the artificial library containing only Arabidopsis genes for transcription factor (TF) is employed. This new system lets me identify TF binding to specific DNA or protein in very efficient manner. I screened TF binding to the regulatory region of genes involving to wood formation and identified many TFs as candidates. This result gradually makes me to draw entire picture of transcriptional regulatory network. Furthermore, I found some TFs rescuing phenotype of wood-less mutant in Arabidopsis and am analyzing their biological functions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：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

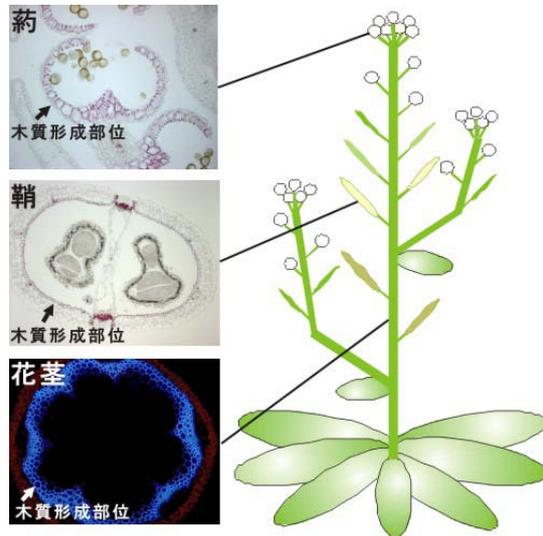
キーワード：植物、ゲノム、発現制御、遺伝子、バイオマス

1. 研究開始当初の背景

木質は地上における最大のバイオマスであり、地球温暖化の原因とされる二酸化炭素の巨大な吸収源であるだけでなく、建築材料、製紙原料として用いられるほか、バイオ燃料の原料としても近年注目を集めている。木質は草本植物においても形成され、植物種にもよるがおおむね植物の乾燥重量の半分近くを占める巨大代謝産物である。木質は主にセ

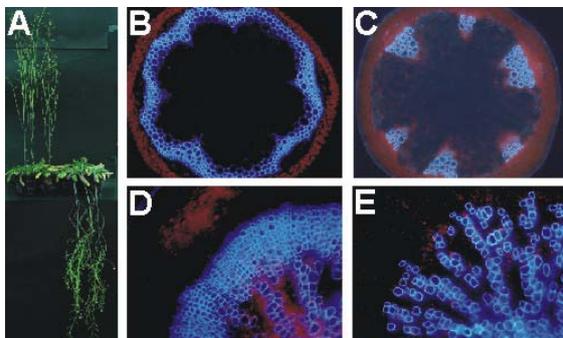
ルロースやリグニンによって構成されるが、紙やバイオ燃料の原料となるのはセルロースのみである。製紙過程では高温、強アルカリ性液中で処理してリグニンを除去するため有害副生物が多く発生するなど環境負荷やコストが大きいことが知られている。これらのことから製紙原料としての木材には低リグニン化が求められている。またバイオエタノール化にあたってはリグニンを減らし、

セルロースを低分子化した、より糖化しやすく発酵しやすい植物の開発が求められている。これらの目標を達成するためには木質の形成過程全体をシステムとして理解することが欠かせない。草本植物における木質の形成部位は、茎や胚軸、道管、葯、果実鞘などであり、植物体の支持や水の運搬、葯や果実鞘の自然開裂に重要な役割を果たすことが知られている(図1)。



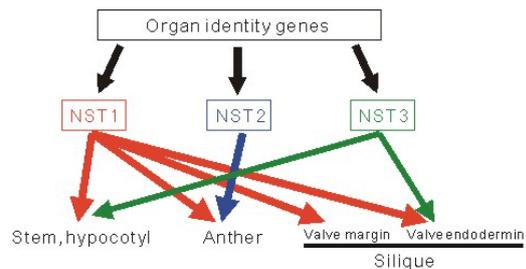
(図1) 木質形成部位。木質は胚軸や花茎(青色蛍光部位)だけでなく、葯や果実鞘の内皮層(赤色着色部位)にも形成され、それらの自然開裂に重要な役割を果たす。

木質形成を制御する遺伝子は、長年明らかではなかったが、近年筆者らの研究によってシロイヌナズナから、非常に重要な役割を果たす転写因子群 NST1、NST2、NST3 が同定された。NST 転写因子は植物特異的な転写因子ファミリーである NAC ファミリーに属する転写因子で、NST1 の単独変異体は果実鞘のバルブマージンと呼ばれる領域での二次壁形成が起こらなくなり果実鞘の自然開裂が著しく抑制される(Mitsuda and Ohme-Takagi, 2008)。



(図2) A. 左側が野生株、右側が NST1、NST3 二重変異体。B-E. 茎(B.C.)および胚軸(D.E.)の横断切片でリグニンを蛍光検出した。B.D. が野生株。C.E. が NST1、NST3 二重変異体。

NST1、NST2 の二重変異体は葯の内被細胞層における二次壁形成が起こらなくなり葯が自然開裂できなくなる(Mitsuda et al., 2005)。また、NST1、NST3 の二重変異体は茎や胚軸における道管以外の部位での二次壁形成が起こらなくなり直立することができなくなる(図2、Mitsuda et al., 2007)ほか、果実鞘においても道管以外の部位での二次壁形成が起こらなくなり果実鞘が自然開裂できなくなる(Mitsuda and Ohme-Takagi, 2008)。しかしいずれの変異体においても二次壁形成が起こる組織自体は正常に形成されている(Mitsuda et al., 2005, 2007, 2008)。一方でこれら NST 転写因子を過剰に発現させると地上部の様々な部位で異所的な二次壁(=木質)形成が観察され、セルロースやリグニンの生合成にかかわる遺伝子群の発現が上昇していることがわかった(Mitsuda et al., 2005, 2007)。これらのことから筆者らは NST 転写因子が、組織のアイデンティティ決定を担う転写因子の下で、道管以外の組織における二次壁(=木質)形成の大部分を制御するキーファクターであると結論づけた(図3)。



(図3) NST 転写因子は多重に機能重複した木質形成のマスター転写因子である。

しかし、木質形成過程において明らかになったのは NST を含む一部の転写因子群と、リグニンやセルロースの合成にかかわる酵素遺伝子の一部に過ぎず、それらの有機的なつながりはいまだ明らかではない。

2. 研究の目的

二次壁(=木質)形成を制御する NST 転写因子群が、いつどのようにして発現誘導されるのか、また、どのようなカスケードを経て末端の酵素類の遺伝子発現を制御しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では筆者が独自に単離した木質形成のキーファクター NST1-3 転写因子の上流、下流を探索し、植物における木質形成過程の全容を明らかにする。上流因子の探索は、組織アイデンティティの確立メカニズムがよく理解されている果実鞘を中心に行い、組織アイデンティティが確立した後どのようにして NST 転写因子が発現誘導されるのかを

解明する。下流因子の探索は、最たる木質形成部位である花茎、胚軸を中心に行い、下流で働く可能性がある有望転写因子の探索、検証および、木質の構成要素の合成を司る酵素類の遺伝子群を直接制御する転写因子の探索を行う。具体的には以下のような研究計画により研究を行う。

(1) NST 転写因子の上流因子の探索

マイクロアレイ実験や酵母ワンハイブリッド法などにより、NST 転写因子の上流で機能する因子を探索する。

(2) NST 転写因子の下流因子の探索

マイクロアレイ解析結果等をもとに、*nst1 nst3* 二重変異体の表現形を部分的にでも回復させる遺伝子を探索する。また、酵母ワンハイブリッド法により、木質形成に関連する酵素遺伝子を直接制御する転写因子の探索を行う。

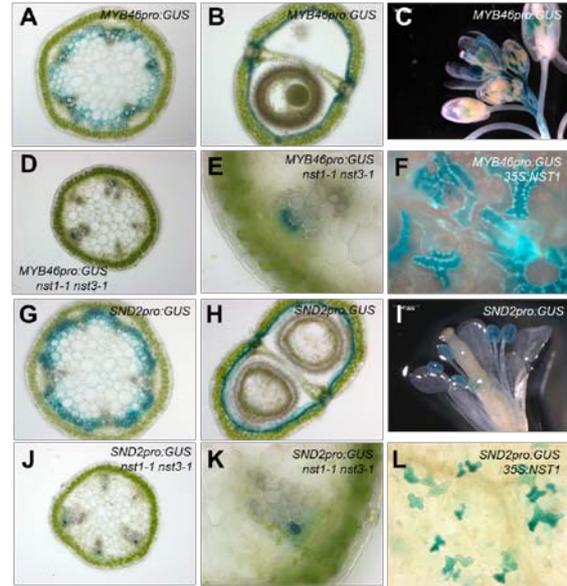
4. 研究成果

(1) NST 転写因子の下流因子の探索

木質形成過程を制御するマスター転写因子 NST1, NST3 の下流で働いている転写制御因子を同定するため、NST3 プロモーターで発現させたときに *nst1-1 nst3-1* 二重変異体の表現型を回復させることができる因子の探索を行い、MYB46 転写因子および、SND2 転写因子 (NAC ファミリー) を候補として同定した。

① MYB46 転写因子について

MYB46 転写因子の機能を推定するため過剰発現植物を作成したところ、NST1 などの過剰発現と同様に異所的な二次壁形成を引き起こした。また、この異所的な二次壁形成は *nst1-1 nst3-1* 変異体下においても観察されたことから、MYB46 は NST 非依存的に二次壁形成を引き起こせることがわかった。次に発現部位を推定するため、*promoter:GUS* コンストラクトを作成し、GUS 発現部位を調査したところ、NST1 転写因子のそれと非常に近い発現パターンを示した (図 4) が、MYB46 転写因子は道管でも強く発現しているであろうことが NST1 とは大きく異なった。この GUS 活性は *nst1-1 nst3-1* 二重変異体下では道管における発現を残して、完全に消失した。また、NST1 の過剰発現下では異所的に形成された二次細胞壁を有する細胞においてこの GUS 活性が顕著に検出された (図 4)。これらの結果は MYB46 転写因子が NST 転写因子の下流で働いていることを強く示唆している。次に MYB46 と近縁の MYB83 転写因子について調査したところ、*Promoter:GUS* 実験の結果では MYB46 発現部位と近いものの、道管での発現がより強く、繊維細胞での発現がより弱いであろうことがわかった。また、過剰発現植物を作成したところ、MYB46 転写因子と同様に異所的な二次壁形成を誘導した。これらの二重変異体を作成したところ、道管が正常に形成できず、



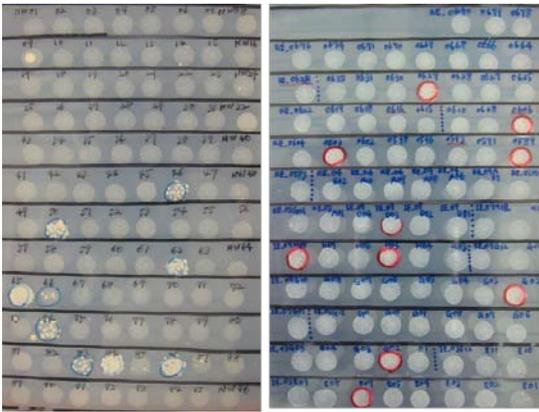
(図 4) MYB46 および SND2 は NST 転写因子の下流で働き NST 転写因子と類似した発現パターンを示す。(A-C) *MYB46pro:GUS* で示唆される *MYB46* 発現部位。(D, E) *MYB46pro:GUS nst1-1 nst3-1* 植物における *MYB46* 推定発現部位。(F) *MYB46pro:GUS 35S:NST1* 植物における *MYB46* 推定発現部位。(G-I) *SND2pro:GUS* で示唆される *SND2* 発現部位。(J, K) *SND2pro:GUS nst1-1 nst3-1* 植物における *SND2* 推定発現部位 (F) *SND2pro:GUS 35S:NST1* 植物における *SND2* 推定発現部位。

ほとんど成長できなかつたので、花茎や胚軸における形質を確認できていない。しかし、筆者らは両者の *Promoter:GUS* のパターンなどから、花茎や胚軸においては別の転写因子も関与している可能性もあると考え現在候補因子について解析中である。

② SND2 転写因子について

SND2 転写因子は NST 転写因子と同じ NAC ファミリーに属する転写因子であるが、その配列類似性はきわめて低い。筆者らは特定の条件下で *SND2* 転写因子が *nst1-1 nst3-1* 二重変異体の表現型を回復させられることを見出した。*SND2* 転写因子の発現部位を推定するために *Promoter:GUS* コンストラクトを作成して GUS 活性部位を観察したところ、MYB46 のそれときわめて類似したパターンが観察された (図 4)。この GUS 活性は *nst1-1 nst3-1* 二重変異体下においては道管における活性を残して完全に失われる一方で、NST1 過剰発現下においては異所的二次壁を形成する細胞において顕著に発現が見られた (図 4)。また、近縁の NAC 型転写因子に関しては師部での発現が示唆され、変異体において早咲きの表現型を示すことがわかった。現在この表現型と木質繊維形成との関連性について検証中である。

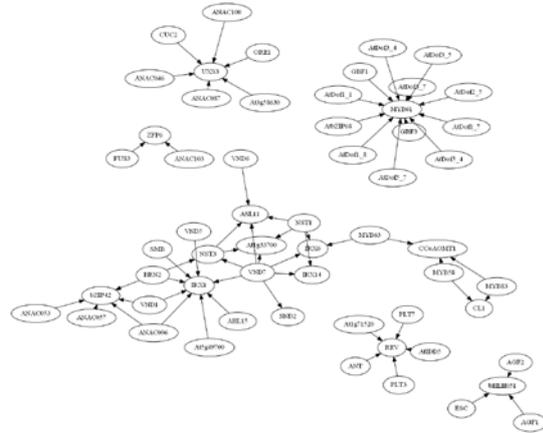
(2)改良酵母ワンハイブリッド法の開発
植物における転写制御ネットワークを解明するために、シロイヌナズナの転写因子だけ(約 1600 種類)から成るライブラリーを用いて行う改良酵母ワンハイブリッド法を開発した。RD29A プロモーターを例にテスト実験を行ったところ、プロモーター領域 500bp をそのまま利用しても、RD29A プロモーター中の DRE シスエレメントに結合する DREB 転写因子が多数同定され、その効率は従来法の 500 倍にも達した。また、本ライブラリーは転写因子を対象とした酵母ツーハイブリッド法にも転用可能であることを示した(Mitsuda et al., 2010)。発表文献では 1 本のチューブにすべてのライブラリーを集約して用いたが(マスマスクリーニング)、その後の改良により、現在は 16 種類の転写因子を 1 つのプールにまとめ、全 96 プールを 96 穴プレートを用いて個別にスクリーニングする方法(セミワンバイワンスクリーニング)を採用している(図 5)。この方法はマスマスク



(図 5)セミワンバイワンスクリーニングによる改良酵母ワンハイブリッド法。左側が一次スクリーニング、右側が二次スクリーニングの様子。

リーニングよりも感度が高く、かつ労力の増大も最小限に抑えた優れた手法である。
(3)改良酵母ワンハイブリッド法による木質形成転写制御ネットワークの解明
木質形成に関与することが想定される約 100 遺伝子をアノテーションや発現パターンによって絞り込み、そのうち 63 遺伝子について、プロモーター領域 1000bp をクローニングし、前項で開発した改良酵母ワンハイブリッド法を適用して結合する転写因子をスクリーニングした。現段階では 3-AT 濃度を固定して実施した。その結果、適性にスクリーニングできたと考えられる 59 プロモーターのうち、15 プロモーターに関してなんらかの転写因子の結合が認められ、のべ 61 相互作用が観測された。網羅的な転写制御ネットワークを明らかにするには十分とは言えないが、この中において NST 転写因子や VND 転写因子などの

いわゆるマスター転写因子が直接酵素遺伝子の発現を制御しているであろう例が多く認められ、おぼろげながら転写制御ネットワークの全体像が明らかになってきた(図 6)。



(図 6)現在までに描けた木質形成過程における転写制御ネットワーク像。

現在その妥当性についてインビトロ実験や植物体内での実験により検証を行っている。

(3) NST 上流因子の探索

マイクロアレイ解析などの結果からは芳しい結果が得られなかったが、改良酵母ワンハイブリッド法によるスクリーニングの結果、NST3 遺伝子のプロモーター領域に VND7 や BRN2 などの NST 近縁遺伝子が結合することがわかった。この結果は NST 遺伝子の発現が自己制御されている可能性を示唆するものであるが、現在この生物学的妥当性について検証を進めている。

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 4 件)

- ① Ohtani, M., Nishikubo, N., Xu B., Yamaguchi, M., Mitsuda, N., and Goue, N., Shi, F., Ohme-Takagi, M., and Demura, T. (2011). A NAC domain protein family contributing to the regulation of wood formation in poplar. *Plant J.* 67, 499-512. 査読有 DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04614.x
- ② Yamaguchi, M., Mitsuda, N., Ohtani, M., Ohme-Takagi, M., Kato, K., and Demura, T. (2011). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel formation. *Plant J.* 66, 579-590. 査読有 DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04514.x
- ③ Yamaguchi, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Kubo, M., Ohme-Takagi, M., Fukuda, H., and Demura, T. (2010).

VND-INTERACTING2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in Arabidopsis. Plant Cell 22, 1249-1263. 査読有 DOI: 10.1105/tpc.108.064048

- ④ Mitsuda, N., Ikeda, M., Takada, S., Takiguchi, Y., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Fujita, M., Shinozaki, K., Matsui, M., and Ohme-Takagi, M. (2010). Efficient yeast one-/two-hybrid screening using a library composed only of transcription factors in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol. 51, 2145-2151. 査読有 DOI: 10.1093/pcp/pcq161

[学会発表] (計 6 件)

- ① 光田展隆ほか、改良酵母ワンハイブリッド法を活用したシロイヌナズナとイネの転写制御ネットワーク解明の試み、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16日、京都産業大学(京都府)
- ② Nobutaka Mitsuda et al., Comprehensive study of plant transcription factors, 22nd International Conference on Arabidopsis Research, 2011年6月22日、University of Wisconsin (米国マディソン市)
- ③ 光田展隆ほか、改良酵母ワンハイブリッド法により転写制御ネットワークを明らかにしようとする試み、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月21日、東北大学(仙台市)
- ④ Nobutaka Mitsuda et al., Comprehensive study of plant transcription factors, Plant & Animal Genomes XIX Conference, 2011年1月18日、米国サンディエゴ市
- ⑤ Nobutaka Mitsuda et al., Development of new methods to identify transcription factors that interact with promoter region, 21st International Conference on Arabidopsis Research, 2010年6月8日、パシフィコ横浜(横浜市)
- ⑥ 光田展隆ほか、上流転写制御因子を同定する新技術の開発、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月20日、熊本大学(熊本市)

[図書] (計 1 件)

- ① Nobutaka Mitsuda et al., WILEY, Biomass to biofuels, strategies for global industries. 2011, 468-471.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光田 展隆 (MITSUDA NOBUTAKA)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員
研究者番号：80450667