

機関番号：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780310

研究課題名（和文）膜結合型NAC転写因子（ANAC078）の標的遺伝子の同定と活性化機構の解明

研究課題名（英文）Identification of membrane-bound NAC transcription factor (ANAC078) target genes and investigation of its activation system

研究代表者

藪田 行哲 (YABUTA YUKINORI)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00379562

研究成果の概要（和文）：

ANAC078 過剰発現株を用い、野生株に比べ強光ストレス条件下で顕著に誘導されている遺伝子をマイクロアレイ解析により探索した結果、166 遺伝子が誘導されていた。これらの遺伝子のプロモータ領域中に ANAC078 の認識配列を検索したところ、52 遺伝子に存在していた。これら遺伝子の解析により、ANAC078 は強光条件下でのフラボノイド合成の制御およびプロテアソームの発現制御に関わっていることが明らかとなった。また ANAC078 の転写活性化は C 末端側の膜貫通領域を介して制御されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To identify the genes targeted by ANAC078, we generated transgenic Arabidopsis plants overexpressing ANAC078 (Ox-ANAC078), and then conducted a DNA microarray analysis of Ox-ANAC078 and wild-type plants. In Ox-ANAC078 plants, the transcription of 166 genes was up-regulated compared with the levels in wild-type plants under high-light. The ANAC078-recognition sequence was detected in the promoter region of 52 up-regulated genes. These findings suggest that ANAC078 protein is associated with the induction of genes related to flavonoid biosynthesis and the regulation of proteasomes levels in response to HL stress. Furthermore, our findings suggest that the transcriptional activity of ANAC078 is regulated by cytoplasmic sequestration via transmembrane domain of C-terminal region of its protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物生理学、分子生物学、生化学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：分子情報、転写因子、環境ストレス

1. 研究開始当初の背景

植物は動物や酵母に比べ多くの転写因子

が存在する。実際、シロイヌナズナは 1533 個の転写因子が存在するのに対して、線虫で

は 669 個、ショウジョウバエでは 635 個存在すると見積もられており、全遺伝子に対して転写因子が占める割合もそれぞれ 5.9%, 3.5%, 4.5%となっている (表 1; Riechmann et al., Science, 2000)。さらに他の生物には認められない植物に特有の転写因子 (NAC, DREB, Dof など) が存在する。以上の事実は、移動の自由を持たない植物が時々刻々と変化する、強光、乾燥、塩、低 (高) 温など複合的な環境変化 (ストレスと呼ぶ) に応答 (馴化)、対応し、その場で生長・繁殖しなければならないため、植物は動物などに比べ、複雑な遺伝子発現調節機構を持つことを反映しているものと考えられる。

表 1 真核生物における転写因子の数

生物種	総遺伝子数	転写因子数	総遺伝子数に対する転写因子の割合 (%)
シロイヌナズナ	~26,000	1533	5.9
酵母	~6,000	209	3.5
線虫	~1,9000	669	3.5
ショウジョウバエ	~14,000	635	4.5

2. 研究の目的

NAC はシロイヌナズナ中に 100 以上存在している植物特異的な転写因子のファミリーである。これまで NAC は形態形成に関与すると考えられてきたが、近年の解析により、乾燥や障害など種々のストレス応答にも機能していることが報告されている (Collinge and Boller, Plant Mol. Biol., 2001, Tran et al., Plant Cell, 2006)。我々はこれまでに植物の複合的ストレスに対する応答機構を明らかにする目的で、シロイヌナズナより強光・高温ストレスに応答性を示す遺伝子群を単離したところ、ANAC078 と命名されている NAC が含まれていた (Nishizawa et al., Plant J., 2006)。ANAC078 は C 末端側に膜貫通領域を持つ特徴的な構造を持っており、ストレス下では膜から解離し、核へ移行することで機能していることが示唆された (図 1)。また、ANAC078 は強光・高温ストレスだけでなく、パラコート処理による酸化的ストレスや高温、低温ストレスにも応答性を示すことから、様々なストレス応答のシグナル伝達経路で機能すること考えられる。従って、本遺伝子の標的遺伝子には種々のストレスに共通した応答・適応機構に関与するものが存在すると推測される。そこで本研究では

ANAC078 を介したストレス応答機構を明らかにするため、ANAC078 の標的遺伝子の同定と活性化機構の解明を行う。

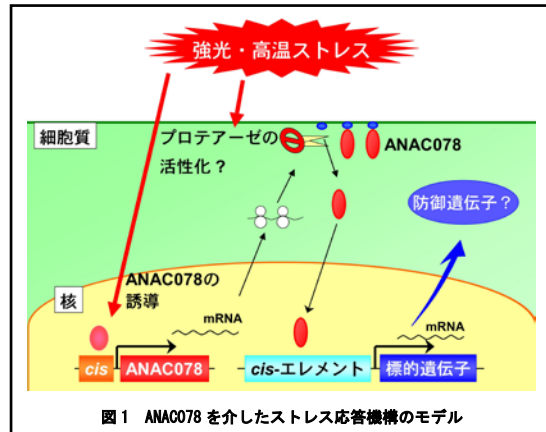


図 1 ANAC078 を介したストレス応答機構のモデル

3. 研究の方法

(1) ANAC078 の標的遺伝子の同定

ANAC078 過剰発現シロイヌナズナ (Ox-ANAC078) を作成した。また ANAC078 遺伝子破壊株シロイヌナズナ (KO-ANAC078) を ABRC より入手した。Ox-ANAC078 を使い、マイクロアレイ解析を行い、ANAC078 標的遺伝子の探索を行い、遺伝子の発現が Ox-ANAC078 で誘導されていた遺伝子に関して Ox-ANAC078 および KO-ANAC078 を用いて、リアルタイム PCR により詳細な発現解析をおこなった。

一方、ANAC078 リコンビナント酵素を作成し、Cycle Amplification and Selection of Target (CASTing) 法と呼ばれる方法により、ANAC078 の認識配列を決定した。

次にこの ANAC078 認識配列がマイクロアレイで同定された標的遺伝子のプロモーター領域中に ANAC078 認識配列の有無を確認し、ANAC078 に直接制御されている遺伝子の検索を行った。

最終的に、ANAC078 標的遺伝子の機能解析から植物の ANAC078 を介したストレス応答機構について考察を行った。

(2) ANAC078 の活性化機構の解明

A ANAC078 の N あるいは C 末端に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を連結した遺伝子をシロイヌナズナプロトプラスト、タバコ培養細胞、あるいはタマネギ表皮細胞に導入し、蛍光顕微鏡により、通常条件あるいはストレス条件下での ANAC078 タンパク質の細胞内局在を観察した。

4. 研究成果

(1) ANAC078 の標的遺伝子の同定

まず、強光条件 (HL; 1200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 30 $^{\circ}\text{C}$) において野生株と比較して、OX-ANAC078 で発現が誘導されている遺伝子の探索を行った。その結果、166 遺伝子が誘導されていた。それらの中にはフラボノイド合成の制御に関わる転写因子やプロテアソームのサブユニットをコードする遺伝子が含まれていた。

また CASTing 法により ANAC078 の認識配列を決定したところ、T[A/T/C][A/T/G/C]C[T/G]TG[T/G]G の配列を認識していることが明らかとなった。そこで、先の 166 遺伝子中のプロモーター領域に ANAC078 認識配列をもつ遺伝子を検索したところ、52 遺伝子に存在していた。このことからこれら 52 遺伝子は ANAC078 により直接制御を受けている事が示唆された。

次に、ANAC078 の標的遺伝子にフラボノイド合成の制御に関わる転写因子が含まれていたことから、HL 下での ANAC078 を介したフラボノイド合成の制御について解析を行った。

Ox-ANAC078 においてフラボノイド合成の制御に関わる転写因子である PAP1、TT1、TT2、AtMYB12 および AtMYB4 が強光条件下で発現レベルが誘導されていたことから、これら遺伝子の強光応答をリアルタイム PCR により、Ox-ANAC078 と野生株との比較を行った。

その結果、TT1 の発現は通常条件下および HL 条件下で認められず、AtMYB12 の発現は両条件下において野生株と Ox-ANAC078 間で差は認められなかった。マイクロアレイ解析とリアルタイム PCR による結果の相違はどちらの遺伝子も発現レベルが非常に低い事に起因すると考えられた。一方、TT2 の発現レベルは通常条件および HL 条件下どちらでも野生株と比較して Ox-ANAC078 で高く、PAP1 および AtMYB4 の発現レベルは HL 条件下 Ox-ANAC078 で高くなっていた。そこで通常条件および HL 条件下における TT2、PAP1 および AtMYB4 の発現レベルを KO-ANAC078 を用い解析した。KO-ANAC078 において TT2 の発現は通常条件では認められなかったが、HL 条件下では発現が認められた。しかしその発現レベルや野生株と比較して低かった。また、PAP1 および AtMYB4 の発現レベルは通常条件下では野生株と KO-ANAC078 間で差は認められなかったが、HL 条件下では KO-ANAC078 では低くなっていた。以上のことから ANAC078 は強光条件下でフラボノイド合成の制御に関与している事が強く示唆されたことから、フラボノイド合成に関与する酵素をコードする遺伝子群の転写レベルについて解析を行ったところ、HL 条件下でこれらの転写レベルは Ox-ANAC078 で野生株と比較して高いレベルにまで誘導されており、逆に KO-ANAC078 では低くなっていた。またフラボノイドの一つ

であるアントシアニンレベルについて測定したところ、HL 条件下で Ox-ANAC078 で野生株と比較して蓄積が認められ、KO-ANAC078 ではその蓄積は低いものであった。以上の結果より、HL 条件下におけるフラボノイド合成の制御に ANAC078 が関与している事が明らかとなった。

次に、ANAC078 によるプロテアソームレベルの制御について解析を行った。先のマイクロアレイ解析により 13 のプロテアソームのサブユニットをコードする遺伝子が含まれていたことから、これら発現を OX-ANAC078、KO-ANAC078 を用いて解析を行った結果、OX-ANAC078 では通常条件下においても野生株に比べ高いレベルで発現しており、HL 条件下でも同様であった。一方 KO-ANAC078 では HL 条件下でのこれらの遺伝子の発現誘導は抑制されていた。次にプロテアソームのサブユニットをコードする遺伝子の一つである PBF1 に対する抗体を作成し、20S および 26S プロテアソームのタンパク質レベルについて解析を行った。その結果、20S および 26S プロテアソームは野生株と比較して OX-ANAC078 ではどちらの条件においても、顕著に蓄積していた。また 26S プロテアソームの活性の測定を行ったところ、同様の結果であった。以上の結果より強光条件下でのプロテアソームタンパク質の蓄積に ANAC078 が関与している事が明らかになったことから、次に PSII 活性について測定を行った。その結果、HL 条件下における PSII 活性は野生株と比較して高く維持されていたことから、ANAC078 はプロテアソームタンパク質の制御に関与しており、HL 応答・適応に重要な働きをしている事が示唆された。

(2) ANAC078 の活性化機構の解明

ANAC078 タンパク質の活性化に関わるプロテアーゼの同定するため、まず全長および膜貫通領域を欠失させた ANAC078 と GFP の融合タンパク質をシロイヌナズナプロトプラストおよびタバコ培養細胞を用いて解析を行ったが、明確なシグナルが認められなかった。そこで次にタマネギ表皮細胞で一過的に発現させたところ、膜貫通領域を欠失させたものでは核のみに蛍光が観察されたのに対し、全長では細胞質画分にも蛍光が認められた。このことから通常条件下では ANAC078 は C 末端側の膜貫通領域により核外に局在し、HL 条件下では解離して核内に移行することによる活性調節を受けていることが明らかとなった。そこで次にタマネギ表皮細胞の系を用いて ANAC078 の膜貫通領域の切断に関わるプロテアーゼの探索を種々のプロテアーゼ阻害剤を用いて解析をおこなったが、明確な GFP のシグナルを観察することができなかった。このことはプロテアーゼ阻害剤による細

胞へのダメージが大きい事に起因すると考えられ、今後更なる解析が必要である。

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2件)

- ① Yabuta, Y., Morishita, T., Kojima, Y., Maruta, T., Nishizawa-Yokoi, A. and Shigeoka, S. Identification of recognition sequence of ANAC078 protein by the cyclic amplification and selection of targets technique. Plant Signal Behav., 5, 695-697, 2010, 査読有
- ② Morishita, T., Kojima, Y., Maruta, T., Nishizawa-Yokoi, A., Yabuta, Y. and Shigeoka, S. Arabidopsis NAC transcription factor, ANAC078, regulates flavonoids biosynthesis under high-light. Plant Cell Physiol., 50, 2210-2222, 2009, 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 長田龍治、吉岡慧介、森下輝之、丸田隆典、西澤(横井)彩子、田茂井政宏、藪田行哲、重岡成、NAC転写因子ANAC078を介したプロテアソーム制御機構の解明、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月26日、京都女子大学
- ② 藪田行哲、長田龍治、吉岡慧介、森下輝之、丸田隆典、西澤(横井)彩子、田茂井政宏、重岡成、20Sおよび26SプロテアソームレベルはNAC転写因子ANAC078により制御を受ける、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月20日、東北大学
- ③ 長田龍治、吉岡慧介、森下輝之、丸田隆典、西澤(横井)彩子、田茂井政宏、藪田行哲、重岡成、転写因子ANAC078によるプロテアソーム制御機構の解明、日本農芸化学会関西支部大会(第466回講演会)、2010年10月3日、近畿大学
- ④ Yabuta, Y., Morishita, T., Kojima, Y., Maruta, T., Nishizawa-Yokoi, A. and Shigeoka, S. Arabidopsis ANAC078 transcription factor regulates flavonoids biosynthesis under high-light. International conference on Arabidopsis Research, 2010年6月8日、パシフィコ横浜
- ⑤ 長田龍治、小島雄介、森下輝之、野田明日香、西澤(横井)彩子、藪田行哲、重岡成、シロイヌナズナNAC転写因子の活性化機構と標的遺伝子の同定、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月28日、東京大学

- ⑥ 森下輝之、小島雄介、長田龍治、松田峻、丸田隆典、横井(西澤)彩子、藪田行哲、重岡成、強光ストレス下におけるシロイヌナズナANAC078によるフラボノイド生合成系の制御、2010年3月20日、熊本大学

[その他]

ホームページ等

<http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/yabuta/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藪田 行哲 (YABUTA YUKINORI)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00379562