

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22580103

研究課題名(和文) 植物の栄養貯蔵過程において遺伝子発現を協調的に活性化する転写因子の機能解明

研究課題名(英文) The functional analysis of transcription factors that coordinately activate gene expression in plant storage process.

研究代表者

前尾 健一郎 (Maeo, Kenichiro)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：00343210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)： WRI1 の種子登熟過程における発現に必要な 100bp のプロモーター領域と、10bp のシス配列を明らかにした。WAT1, 2 とともに WRI1 と同じ標的遺伝子を持ち、結合コンセンサス配列もよく似ていた。変異株では花器官が合着し、クチン構造が消失していたが、ワックスやクチン合成系遺伝子に変化はなく、脂肪酸合成系遺伝子の発現が減少していた。

WRI1サブファミリーはいずれも脂肪酸合成系遺伝子群の発現を制御しており、それぞれの発現部位の違いなどにより脂肪酸合成を制御していると考えられる。

研究成果の概要(英文)： We have elucidated the 100bp promoter region and a cis element, responsible for expression of WRI1 during seed maturation and that WAT1, 2 has the same target genes and consensus binding sequence as WRI1. In the mutant, especially wat1, flower organs were adhesion and nano-ridge structures of surface had disappeared and the expression of fatty acid synthesis genes was repressed, but no change in expression levels of cutin and wax synthesis genes was observed. These results suggest that WRI1 subfamily control the expression of fatty acid synthesis genes, and the fatty acid synthesis due to differences in expression pattern.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：植物 遺伝子 発現制御 転写因子 栄養貯蔵

1. 研究開始当初の背景

植物の栄養貯蔵時に働く遺伝子の発現制御の分子機構を明らかにするために、糖誘導性遺伝子の発現を指標に同定した WR11/ASML1 は、種子成熟過程において糖からの油脂合成経路において、脂肪酸合成系遺伝子の発現の正の制御因子として機能していることを明らかにしていた。脂肪酸は種子油脂以外でも必要であり、WR11 と同じサブファミリーには WAT1, 2 が存在した。脂肪酸合成における、このサブファミリーの作用機構が同じであるか否か、また、生理的機能の違いについて興味を持たれた。

2. 研究の目的

植物の主たる栄養貯蔵組織である種子において、その成熟過程で多くの脂肪酸合成系遺伝子プロモーターに結合して協調的活性化に関わる植物固有の AP2 型転写因子を介した、脂肪酸・油脂合成系遺伝子の制御機構について、自身の発現制御とともに、転写活性化の作用機構を詳細に解析することを通して、これら AP2 型転写因子の植物体における生理機能を明らかにする。植物の栄養貯蔵機能の調節機構を分子レベルで理解するとともに、栄養貯蔵能の向上に向けた分子育種に利用できる新たな手法を見いだすことを目的とする。

3. 研究の方法

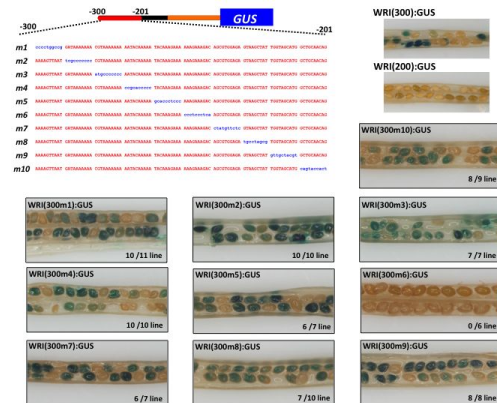
WR11 サブファミリーによる脂肪酸合成系遺伝子の活性化機構を介して、これら因子の植物の脂肪酸や油脂合成における生理機能を理解するために、まず、これら因子間の作用機構の違いに重点を置き、その違いがどのように制御されているかを明らかにする。具体的には、形質転換植物におけるプロモーター解析およびプロトプラストを用いた一過発現系により、(A) WR11 サブファミリー遺伝子の発現制御機構を解析し、マイクロアレイやゲルシフトなどにより、(B) WR11 あるいは (C) WAT1, 2 による遺伝子発現の制御機構を解析する。また、(D) WR11 サブファミリーの植物における生理機能について、破壊株や過剰発現体における遺伝子発現の変化や脂肪酸・油脂の組成や蓄積量変化などを詳細に解析する。

4. 研究成果

(A) WR11 遺伝子のプロモーター解析

種々の欠失を持つ WR11 プロモーターと GUS との融合遺伝子の種子登熟過程における発現を解析した結果、RY 配列を持たない翻訳開始点上流 300 bp までの領域でも種子登熟過程において発現が見られ、200 bp までの領域では発現が見られなくなったことから、WR11 の種子における発現に必要なシス配列は翻訳開始点から 300 から 200 bp の領域中に存在することが明らかになった。この

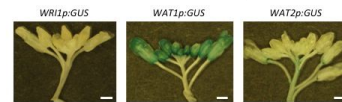
100bp の領域中に 10bp ごとに塩基置換を導入したプロモーターと GUS との融合遺伝子について同様に登熟種子における発現を解析した。その結果、250bp から 241bp までの領域に塩基置換を導入した場合のみ、登熟種子における発現が見られなくなった。この 10bp の領域に WR11 の種子での発現を制御する転写因子が作用すると考えられる。



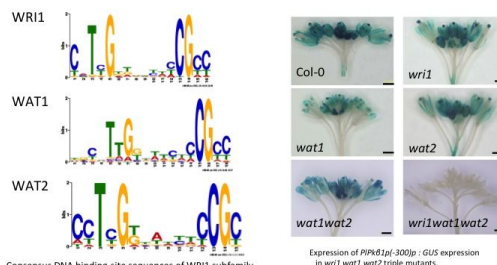
(B) WAT1, 2 による遺伝子の発現制御機構

WAT1, 2 それぞれの過剰発現株を作製し、マイクロアレイ解析をおこなった結果、WAT1, 2 とともに WR11 に比べて影響は小さかったが、WR11 過剰発現株と同様にいくつかの脂肪酸合成系遺伝子の発現量が増加していた。また、WAT2 に関して、大腸菌で発現させた組み替え GST 融合タンパク質を用いたランダムオリゴセレクションアッセイにより結合コンセンサス配列を調べたところ、WAT2 は WR11 や WAT1 とよく似た結合コンセンサス配列を持つことが明らかになった。さらに、標的遺伝子の一つである葉緑体ピルビン酸キナーゼの WR11 サブファミリーの変異体における発現を調べた結果、WR11 サブファミリーそれぞれの発現が見られる部位において弱くなり、*wri1 wat1 wat2* 三重変異株では完全に見られなくなった。

以上のことから、WR11 サブファミリーは結合配列と標的遺伝子は共通しており、それぞれの発現部位の違いなどにより脂肪酸合成を制御していると考えられる。



Expression of WRI1p:GUS, WAT1p:GUS and WAT2p:GUS in flower

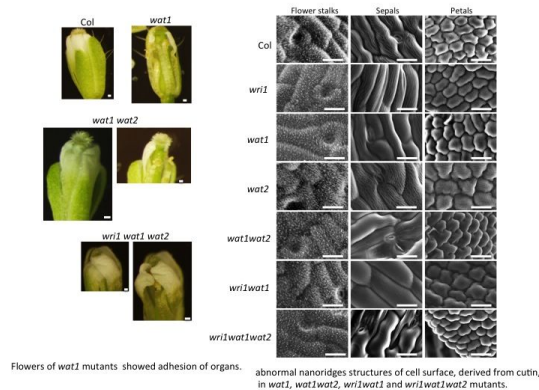


Consensus DNA binding-site sequences of WR11 subfamily.

Expression of PRK8[1p:300bp]-GUS expression in wri1 wat1 wat2 triple mutants.

(C) WR11 サブファミリーの変異株の解析

wat1 変異株は花器官が合着する表現型が見られ、表面のクチクラワックスが減少していることが明らかになった。さらに詳細に走査型顕微鏡観察により観察した結果、ワックスの結晶構造に異常は見られなかったが、クチンに特徴的なナノリッジ構造が消失しているといった異常が観察された。また、変異株において、脂肪酸合成系、ワックス合成系、クチン合成系遺伝子の発現量を調べた結果、ワックスおよびクチン合成系遺伝子の発現には変化は見られなかったが、脂肪酸合成系の一部の遺伝子の発現が顕著に減少していた。WAT1 は花器官における脂肪酸合成を調節しており、これらが欠失すると脂肪酸から作られるワックスが減少して、花器官の合着が起こっていると考えられる。



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) Muramoto, N., Tanaka, T., Shimamura, T., Mitsukawa, N., Hori, E., Koda, K., Otani, M., Hirai, M., Nakamura, K. and Imaeda, T.: Transgenic sweet potato expressing thionin from barley gives resistance to black rot disease caused by *Ceratostyxis fimbriata* in leaves and storage roots. *Plant Cell Rep.* 31: 987-997 (2012) 査読あり

(2) Haga, N., Kobayashi, K., Suzuki, T., Maeo, K., Kubo, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Demura, T., Nakamura, K., Jürgens, G. and Ito, M.: Mutations in MYB3R1 and MYB3R4 cause pleiotropic developmental defects and preferential down-regulation of multiple G2/M-specific genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 157: 706-717 (2011) 査読あり

(3) Rodor, J., Jobet, E., Bizarro, J., Vignols, F., Carles, C., Suzuki, T., Nakamura, K. and Echeverria, M.: AtNUFIP,

an essential protein for plant development, reveals the impact of snoRNA gene organisation on the assembly of snoRNPs and rRNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 65:807-819 (2011) 査読あり

(4) Ishiguro, S., Nishimori, Y., Yamada, M., Saito, H., Suzuki, T., Nakagawa, T., Miyake, H., Okada, K. and Nakamura, K.: The *Arabidopsis* FLAKY POLLEN1 gene encodes a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase required for development of tapetum-specific organelles and fertility of pollen grains. *Plant Cell Physiol.* 51: 896-911 (2010) 査読あり

(5) Tabata, R., Ikezaki, M., Fujibe, T., Aida, M., Tian, C.-E., Ueno, Y., Yamamoto, K.T., Machida, Y., Nakamura, K. and Ishiguro, S.: *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 KNOX genes. *Plant Cell Physiol.* 51: 164-175 (2010) 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 米野瑠璃子、永井李奈、石黒澄衛、中村研三、前尾健一郎: WR11 の種子登熟過程における発現制御機構の解析 第 54 回日本植物生理学会年会 2013 年 3 月 22 日 岡山大学

(2) 浅野翔一、西雅知、徳田剛史、河合都妙、前尾健一郎、石黒澄衛、中村研三: WR11 サブファミリーデュアル AP2 ドメイン転写因子の脂肪酸合成制御における役割分担 第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 13 日 福岡国際会議場

(3) 橋本実佳、河合都妙、前尾健一郎、小内清、石浦正寛、中村研三: シロイヌナズナ種子油脂合成系遺伝子の新奇活性化因子の遺伝学的同定 第 53 回日本植物生理学会年会 2012 年 3 月 18 日 京都産業大学

(4) 西雅知、河合都妙、徳田剛史、前尾健一郎、中村研三: WR11 サブファミリーダブル AP2 ドメイン転写因子の脂肪酸合成制御における役割分担 第 52 回日本植物生理学会年会 2011 年 3 月 11 日 要旨

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 2 件）

(1) 名称：植物の油脂生産性を増大させる遺伝子及びその利用方法
発明者：中村研三、河合都妙、前尾健一郎、松本貴幸、伊藤節詞、松田雅敏
権利者：同上
種類：特許
番号：2012-187046
取得年月日：2012 年 10 月 4 日
国内外の別：国内

(2) 名称：植物の油脂生産性を増大させる遺伝子及びその利用方法
発明者：中村研三、河合都妙、橋本実佳、石浦正寛、松田雅敏、小内清
権利者：同上
種類：特許
番号：2011-182759
取得年月日：2011 年 9 月 22 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前尾 健一郎 (MAEO, Kenichiro)
名古屋大学・生命農学研究科・助教
研究者番号：00343210

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

中村 研三 (NAKAMURA, Kenzo)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号：80164292