

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25年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22780161

研究課題名（和文） 樹木の木部細胞壁形成における遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of regulatory mechanism of gene expression in wood formation in trees

研究代表者

鈴木 史朗 (SUZUKI SHIRO)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：70437268

研究成果の概要（和文）：

ポプラの二次木部で顕著に発現する新規転写因子の機能解析と、新規転写因子を活用した細胞壁改変を行った。新規転写因子は弱い転写抑制化因子であったが、転写活性化ドメインのVP16とのキメラ転写因子は、転写活性化因子となり、転写抑制化ドメインであるSRDXとのキメラ転写因子は、より強い転写抑制因子となった。交雑ポプラにおけるこれらのキメラ転写因子の過剰発現は、いずれも葉の形態を変化させた。VP16とのキメラ転写因子の過剰発現は、細胞壁成分生合成の顕著な変化を引き起こした。

研究成果の概要（英文）：

The author characterized a newly identified transcription factor gene from poplar genome. The gene is preferentially expressed in a secondary developing xylem in poplar. Fusing the transcription factor with a VP16 transcriptional activation domain and with a SRDX transcriptional repression domain changed the transcriptional activity. The overexpression of the chimeric transcription factors changed leaf morphology. In addition, the overexpression significantly up-regulated lignocellulose biosynthetic genes, and caused significant change of cell wall components in the transgenic aspen leaves.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：転写因子、遺伝子発現、二次木部、樹木バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

木質は、セルロース、ヘミセルロース、リグニン、抽出成分といった木質成分から構成されており、これらの木質成分の生合成は木質形成における重要なステップである。また、木質成分の化学構造や量は、重要な材質の一つであり、その改良は林木育種の重要なターゲットである。そのため、木質成分の生合成に関する研究が、これまで精力的に行われてきた。その結果、過去十数年間で当該分野は大きく進展し、これまでに、セルロース、ヘミセルロース、リグニン生合成の酵素遺伝子は、ほぼ同定されており、その成果の応用として、例えば、リグニンの化学構造や量を制御する分子育種が報告されている(Li et al., PNAS 100:4939-4944, 2003)。

(2) 本研究の着想に至った経緯

研究代表者らは、これまで様々な木質成分生合成の酵素遺伝子の同定と機能解析の研究に従事してきた。例えば、抽出成分の一種であるノルリグナンの合成酵素遺伝子の機能解析 (Suzuki et al., PNAS 104:21008-21013, 2007)、ポプラのセルロース、ヘミセルロース、およびリグニン合成酵素遺伝子の発現解析や機能解析 (Suzuki et al., Plant Physiol 142, 1233-1245, 2006; 鶴巻ら、第 57 回日本木材学会大会、2007) などである。研究代表者はまた、上記のような個々の遺伝子の機能解析だけでなく、熱帯早生樹アカシア・マンギウムの木部で発現する遺伝子の網羅的配列解析 (鈴木ら、第 59 回日本木材学会大会、2009) といった、網羅的解析も行ってきた。

これまでの樹木の分子育種では、一回につき 1、2 種類の遺伝子を発現制御の対象とすることで、材質を変化させることにある程度成功している。しかし、実際の樹木の二次木部形成過程では、細胞壁形成に関わる多数の遺伝子の発現が、複雑かつ協調的に制御されていることが示唆されており (Schrader et al., Plant Cell 16:2278-92, 2004)、その制御機構は未解明の点が多い。従って、現時点では、多数の遺伝子の中から、発現制御の対象遺伝子をいわば手探りで選んでいる状況であり、分子育種によって効果的かつ精緻な材質制御を行うためには限界がある。つまり、まず、この複雑な遺伝子発現制御機構を解明しなければならない必要性が生じている。

ここで、転写因子は、遺伝子発現における時間空間的な特異性を与えるという面で、中心的な役割を果たしている DNA 結合性タンパク質の一種である。これまでに、草本植物のシロイヌナズナより、セルロース、ヘミセル

ロース、リグニンの生合成を協調的に制御する転写因子 (MYB46) が報告されているが (Zhong et al., Plant Cell 19:2776-2792, 2007)、木質が草本と比べ高度に発達した樹木では、このような転写因子が多数分化している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、樹木の二次木部の細胞壁形成過程における遺伝子発現制御機構の概略を明らかにすることを目標とした。その目標を達成するため、具体的には、木質成分のうち、二次木部の細胞壁成分 (セルロース、ヘミセルロース、リグニン) の生合成に焦点を絞り、これらの生合成を協調的に制御する転写因子を同定し、転写因子を介した遺伝子発現制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、実験材料として、分子生物学的研究に必須の各種リソース、実験技術が整備されており、樹木のモデル植物といわれるポプラを用いた。上記の研究の目的を達成するため、(1) 転写因子遺伝子の候補の選定、(2) 転写因子遺伝子発現量の定量、(3) 転写因子遺伝子の全長 cDNA のクローニング、(4) 全長 cDNA を過剰発現および発現抑制させた形質転換体の作出、(5) 表現型解析、(6) 形質転換体の細胞壁成分の解析、(7) 転写因子が制御する下流遺伝子の同定および定量、(8) トランスアクティベーションアッセイによる転写因子の活性評価、を行った。

4. 研究成果

(1) 転写因子遺伝子の候補の選定

ポプラの MYB 転写因子遺伝子の中から、既知のシロイヌナズナの二次壁形成転写因子との相同性に基つき 20 遺伝子を選抜した。

(2) 転写因子遺伝子発現量の定量

ポプラの二次木部、二次師部、展開葉、成葉の各部位からトータル RNA を抽出した。続いて、定量 RT-PCR 解析を行うことにより、各部位における MYB 遺伝子の発現量を定量した。その結果、*MYB14*、*MYB16*、*MYB17* と命名した 3 遺伝子が二次木部において顕著に発現していることが見出された。以上より、この 3 遺伝子を今後の解析対象とした。

(3) 転写因子遺伝子の全長 cDNA のクローニング

MYB14、*MYB16*、*MYB17* の全長遺伝子を逆転写 PCR によりクローニングした。*MYB14*、*MYB16*、*MYB17* はそれぞれシロイヌナズナの *MYB46*、*MYB103* および *MYB61* との相動性が最も高かった。*MYB46* はシロイヌナズナの二次壁形成を制御するマスター転写因子として同定され

ており、MYB103はセルロース合成を制御する転写因子としての役割が提案されている。一方、MYB61はシロイヌナズナの種子表皮の多糖蓄積の制御因子であるとともに、過剰発現すると異所的にリグニンを蓄積することが知られている。しかしながら、木質形成への関与はよく分かっていない。そこで、*MYB17*に着目して詳細な解析を行うこととした。

(4) 全長 cDNA を過剰発現させた形質転換体の作出

転写因子遺伝子は、一般に単独に過剰発現または RNAi による発現抑制を行っても、顕著な表現型の変化が現れないことが多い。そこで、本研究では、*MYB17*のC末端に強力な転写活性化ドメインである VP16 を接続したキメラ転写因子 (MYB17-VP16) を過剰発現するコンストラクトと、*MYB17*のC末端に強力な転写抑制化ドメインである SRDX を接続したキメラ転写因子 (MYB17-SRDX) を過剰発現するコンストラクトを作製し、表現型の変化を観察することにした。常法に従い、ポプラを形質転換し、組換え個体を得た。

(5) 表現型解析

(4) で作成した形質転換体について、表現型を観察した。MYB17-VP16 過剰発現体では、茎および根の伸長が抑制され、葉の展開も抑制された。一方、MYB17-SRDX 過剰発現体では、茎の伸長が促進されるとともに、葉の形態が心形から披針形へと変化した。葉の遺伝子発現を定量 RT-PCR により調べると、MYB17-VP16 過剰発現体では、セルロース合成酵素遺伝子、グルコマンナン合成酵素遺伝子、キシラン合成酵素遺伝子の一部、リグニン合成酵素遺伝子の一部は、野生型と比べ顕著に発現誘導されていた。しかしながら、MYB17-SRDX 過剰発現体ではほとんど変化がなかった。

(6) 形質転換体の細胞壁成分の解析

(5) の結果から、MYB17-VP16 過剰発現体において葉の形態変化と、二次細胞壁合成関連遺伝子の発現変化が観察されたため、葉の細胞壁を分析した。その結果、セルロース量およびリグニン量が増加していた。一方、ヘミセルロース量は変化していなかった。しかし、メチル化分析およびキシラン抗体を用いた免疫標識観察を行ったところ、MYB17-VP16 過剰発現体においてキシランが顕著に増加している一方で、キシログルカンが減少していることが明らかとなった。

(7) 転写因子が制御する下流遺伝子の同定および定量

MYB17-VP16 過剰発現によって誘導される遺伝子を網羅的に解析するために、MYB17-VP16 のC末端にエストロゲンレセプターを接続したキメラ転写因子

(MYB17-VP16-hER) を作製し、ポプラで過剰発現させた。再生個体の葉をエストラジオール処理およびエストラジオール+シクロヘキシミド処理に供した。一定時間処理後、これらの葉からトータル RNA を抽出した。これらの RNA を RNA-seq 解析に供し、エストラジオール添加によって発現が誘導される遺伝子を網羅的に解析した。その結果、キシラン合成酵素遺伝子およびグルコマンナン合成酵素遺伝子は、MYB17-VP16 によって直接誘導を受けるが、セルロース合成酵素遺伝子は、他のタンパク性因子を介して、間接的に誘導を受けることが明らかとなった。

(8) トランスアクティベーションアッセイによる転写因子の活性評価

シロイヌナズナの葉を用いたトランスアクティベーションアッセイにより、ネイティブの MYB17 は弱い転写抑制因子であることが見出されたが、VP16 を接続すると転写活性化因子となった。一方、転写抑制ドメインの SRDX を接続すると転写抑制の程度が増加することが明らかとなった。

以上より、本研究では新規の転写因子 MYB17 を見出した。ネイティブの MYB17 は、弱い転写抑制因子であった。しかし、強い転写活性化ドメインである VP16 とのキメラ転写因子は、転写活性化因子として機能することが示された。このキメラ転写因子の過剰発現は、葉の形態を変化させるとともに、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの合成酵素遺伝子の発現を変化させ、細胞壁成分合成の顕著な変化を引き起こすことが明らかとなった。

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1件)

- ① Soichiro Noda, Yoshinori Takahashi, Yuta Tsurumaki, Masaomi Yamamura, Nobuyuki Nishikubo, Masatoshi Yamaguchi, Nozomu Sakurai, Takefumi Hattori, Hideyuki Suzuki, Taku Demura, Daisuke Shibata, Shiro Suzuki, Toshiaki Umezawa : ATL54, a RING-H2 domain protein selected by a gene co-expression network analysis, is associated with secondary cell wall formation in Arabidopsis. *Plant Biotechnology*, 査読有, 印刷中.

[学会発表] (計6件)

- ① 鈴木史朗, 鶴巻勇太, 池谷仁里, 栗野達也, 大谷美沙都, 鈴木秀幸, 服部武文,

出村拓, 梅澤俊明: キメラ MYB 転写因子の過剰発現による二次壁成分生合成の変化. 第 63 回日本木材学会大会, 岩手大学, 盛岡市, 2013 年 3 月 27~29 日.

- ② Shiro Suzuki, Yuta Tsurumaki, Hisato Ikegaya, Tatsuya Awano, Soichiro Noda, Takefumi Hattori, Taku Demura, Toshiaki Umezawa: Alteration of hemicellulose biosynthesis in poplar by overexpression of engineered MYB transcription factors. Lignobiotech II Symposium, アクロス福岡, 福岡市, 2012 年 10 月 24~17 日.
- ③ 鈴木史朗: 樹木のヘミセルロース生合成を制御する転写因子. 第 6 回京大植物縦横無尽の会ワークショップ~ゲノム解析とイメージング最先端から見えてきたこと~, 京都大学, 京都市, 2011 年 11 月 25 日.
- ④ 野田壮一郎, 鈴木史朗, 山口雅利, 西窪伸之, 櫻井望, 服部武文, 鈴木秀幸, 出村拓, 柴田大輔, 梅澤俊明: RING finger タンパク質 ATL54 の機能解析. 第 29 回日本植物細胞分子生物学会 (福岡) 大会・シンポジウム, 九州大学, 福岡市, 2011 年 9 月 6~8 日.
- ⑤ 鈴木史朗, 鶴巻勇太, 服部武文, Vincent L. Chiang, 梅澤俊明: ポプラ二次木部において高発現する MYB 転写因子の機能解析. 第 28 回日本植物細胞分子生物学会 (仙台) 大会・シンポジウム, 東北大学, 仙台市, 2010 年 9 月 2~3 日.
- ⑥ Shiro Suzuki, Yuta Tsurumaki, Takefumi Hattori, Vincent L. Chiang, Toshiaki Umezawa: A transcription factor involved in lignin biosynthesis in secondary xylem of poplar. Banff International Conference on Plant Metabolism, Banff, Canada, June 24-28, 2010.

[図書] (計 1 件)

- ① 鈴木史朗, 「ヘミセルロース生合成の分子生物学」, 木質の形成・第 2 版 (福島和彦, 高部圭司, 船田良, 梅澤俊明, 杉山淳司, 山本浩之 編), 海青社, 2011 年 10 月.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/W/LMSFPM/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 史朗 (SUZUKI SHIRO)
京都大学・生存圏研究所・助教
研究者番号: 70437268