

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880027

研究課題名(和文) 発熱植物のミトコンドリア動態を支える転写制御機構の解明

研究課題名(英文) Transcriptional regulatory mechanisms of the genes controlling cellular respiration or mitochondrial function in thermogenic skunk cabbage

研究代表者

稲葉 靖子 (Yasuko, Ito-Inaba)

宮崎大学・テニユアトラック推進機構・助教

研究者番号：80400191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：発熱植物ザゼンソウは、氷点下を含む寒冷環境下でも安定した発熱を長期間維持できる。活発に発熱する花はミトコンドリアを豊富に含み、ミトコンドリア機能に関わる複数遺伝子の発現が発熱開始とともに上昇することから、活発なミトコンドリア生合成を支える転写制御機構の存在に興味を持たれた。そこで本研究では、発熱期に発現が上昇する複数の遺伝子の中から発熱への関与が示唆されたものについて、その上流配列の解析を行った。その結果、解析した複数遺伝子に共通して含まれるシス配列候補が複数見出されたことから、発熱期におけるこれら遺伝子の発現上昇は、当該シス配列を介した共通の機構により複雑に制御されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*) can keep the spadix temperature at around 20 degrees Celsius even if the air temperature falls below freezing. In the thermogenic spadix, a large amount of mitochondria was observed and the genes involved in cellular respiration or mitochondrial function were highly expressed. These results suggest that transcriptional regulation systems may exist to activate mitochondrial biogenesis during the thermogenic stage in skunk cabbage. To elucidate the transcriptional mechanisms, we examined 5' flanking regions of several genes which may play a role directly or indirectly in floral thermogenesis and was highly expressed in the thermogenic-stage spadices. As a result, we identified several consensus sequences conserved in all promoter regions in the genes examined here. These cis-regulatory elements may play a role in regulating the expression of the genes, and lead to massive floral thermogenesis through increased mitochondrial function.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：植物 遺伝子 発現制御 呼吸 ミトコンドリア 発熱

1. 研究開始当初の背景

現在、50種類以上の植物が発熱植物として知られており、申請者はこれまで、サトイモ科の発熱植物ザゼンソウを用いて研究を行ってきた。その過程で、活発に発熱するザゼンソウの花はミトコンドリアを豊富に含むことに加えて、発熱前駆組織から発熱組織へと成長する際に、ミトコンドリア機能に関わる複数遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。したがって、発熱組織における活発なミトコンドリア生合成は転写レベルで制御されることが示唆されていたが、その制御機構については多くが不明であった。

2. 研究の目的

哺乳類の非ふるえ熱産生を誘導する褐色脂肪組織では、PGC-1が寒冷によりミトコンドリアを増やす因子として発見され、他の転写因子と共同してミトコンドリア機能に関わる遺伝子の発現を促すことが知られているのに対して、植物の発熱組織では、そのような転写制御機構については全く不明である。そこで本研究では、ミトコンドリアを豊富に含む発熱植物のミトコンドリア動態に着目して、それを支える転写制御機構の解明に取り組むことを目的とした。

3. 研究の方法

ザゼンソウの発熱器官である花ではミトコンドリア生合成が活発であり、ミトコンドリア機能に関わる複数遺伝子の発現が発熱期特異的に誘導される。本研究ではまず、こうした発現が誘導される遺伝子の5'上流配列を決定するために、Straight Walk法により解析を行った。上流配列が決定した遺伝子については、これら遺伝子群に共通して含まれるシス配列候補の特定を行った。また、当該遺伝子群のオルソログ遺伝子の5'上流配列をシロイヌナズナのゲノム配列上から取得して、両配列間の比較解析を行った。

(1) Straight Walk法による5'上流域の増幅
Straight Walk法を行うに際して、まず、解析する遺伝子群のCDS配列を決定後、以下8種類の制限酵素(*Bam*HI, *Bgl*II, *Bcl*II, *Sau*3AI, *Spe*I, *Nhe*I, *Xba*I, *Bln*I)の中から設計した既知配列特異的プライマー(SP1プライマー)より上流配列を切断しないような制限酵素を選択しておく。当該制限酵素を用いて、ザゼンソウの葉から抽出したゲノミックDNAに対して制限酵素処理を行い、dGTP或いはdCTPのいずれかによる一塩基伸長反応を行った後、アダプターを結合させる反応を16℃で一晩行った。その後、SP1プライマーとアダプター配列に特異的に結合するWP1プライマーを用いた1st PCRを行い、続いて、SP1およびWP1プライマーよりも各々内側の配列に対して設計されたSP2およびWP2プライマーを用いた2nd PCRを行った。

(2) 増幅した5'上流配列の解析

増幅した5'上流配列をゲル抽出法により精製後、pZeroベクターに挿入して、大腸菌DH5αの形質転換を行った。Direct PCRによりインサート挿入を確認後、プラスミドを抽出して、M13 forward primer, M13 reverse primer, SP2プライマーを用いたシーケンス解析を行った。

(3) Genetyx_Ver 10による配列解析

解析する遺伝子のCDS配列ファイルを開き、(2)で解析した当該遺伝子の5'上流配列の全てのシーケンス結果(.fasta)に対してホモロジー検索を実行した。逆向きのファイルを順向きに修正して、各ファイルをGenetyxファイルとして保存後、Parallel Editor機能を用いてアライメント解析を行い、2本以上のシーケンスで保存されている配列を以降の解析で用いる5'上流配列とした。

(4) MEME(Multiple Em for Motif Elicitation Ver. 4.9)によるコンセンサス配列の解析

解析する遺伝子群の5'上流配列のリストをFasta形式で作成して、MEMEによる解析を行った。

(5) PLACE(A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements)によるプロモーター解析

解析する遺伝子群の5'上流配列をクエリとして、grouped by signalのオプションを選択して解析を行った。解析結果をMicrosoft Excel 2010で開き、フィルタリング機能等により、解析により得られたモチーフ配列の種類等の解析を詳細に行った。

(6) シロイヌナズナオルソログ遺伝子上流配列との比較解析

TAIR(The Arabidopsis Information Resource)のサイト上で、(1)-(5)で解析したザゼンソウの遺伝子群に対するシロイヌナズナのオルソログ遺伝子を同定後、当該遺伝子の5'上流配列を取得して、解析を行った。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア機能に関わる遺伝子の5'上流配列の決定

まず、網羅的な遺伝子発現解析とcDNAデータベースの解析により、発熱期特異的に発現する遺伝子の中からミトコンドリア機能に関わる複数の遺伝子のCDS配列を決定した。その後、Straight Walk法により5'上流域の増幅を行い、pZeroベクターにクローニングして、インサート配列を決定した。ただ、上流域を増幅した遺伝子の中で、各遺伝子に対応する上流域がきちんと得られたものは、半数に留まった。各遺伝子の内部配列に特異的なSP1およびSP2プライマーを作成したにもかかわらず、全く異なる部分にアニールシ

て別の遺伝子或いは遺伝子間の配列が増幅されていたものが複数存在した。また、理由は不明であるが、シーケンスプライマーとして使用したベクタープライマーで複数回トライしたにもかかわらず、全く読めない配列も存在した。

(2) 各種ソフトウェアを用いた 5' 上流域の解析

既知シス配列の解析「TCP」

一般の高等植物においてミトコンドリア合成の一端を担うと考えられている転写因子 TCP は、ミトコンドリアタンパク質をコードする複数遺伝子の 5' 上流の site II (TGGGC(C/T)) 配列に結合することが知られているため、本研究では、当該 site の有無について配列を決定した 5' 上流領域内で検索した。その結果、一塩基を除いて全一致した site は複数見出されたが、全ての配列が一致したものは見出されなかった。

既知シス配列の解析「ABI4」

ABI4 は、アブシジン酸のシグナル伝達経路に關与する転写因子として知られているが、最近の研究により、ミトコンドリアタンパク質をコードするある遺伝子プロモーター上に結合することが示された。ABI4 結合サイトの有無について配列を決定した 5' 上流領域内で検索したところ、ABI4 binding site として知られる CACCG 或いは CCAC の配列が、複数遺伝子の 5' 上流で見出された。

PLACE でヒットしたシス配列の解析

5 つの遺伝子 (遺伝子名 : 01-05) の 5' 上流領域配列を PLACE で解析したところ、全ての遺伝子において大量の既知のシス配列が見出されたため、+鎖のみに絞って解析した。まず、5 つの遺伝子の 5' 上流領域において見出された全てのシス配列の数は 115 個であった。次に、5 つの遺伝子の 5' 上流領域において共通して保存されているシス配列を解析したところ、8 個の共通したコンセンサス配列が見出された (表 1)。解析した各遺伝子 5' 上流 1 kb における各コンセンサス配列の出現回数を求めたところ、gene01 は、全てのコンセンサス配列において出現頻度が高かった。また、NGATT, CAAT, AAAG のコンセンサス配列は、解析した遺伝子の 5' 上流領域で出現頻度が高い傾向にあった。

MEME による解析

5 つの遺伝子 (遺伝子名 : 01-05) の 5' 上流領域配列を MEME で解析したところ、TOP3 として抽出されたモチーフは以下の通りであった。

Motif 1:

[CT][ATC][CGT]C[CT][CAGT][CG][GAT][ACGT][TG][CA][TC]C[TA]C[TACG][CAT][TC][CG][TG]C[TC]C[TA]C[ACGT][CAG][GAC

T][CAT][TG][CTA][TC][TC][TG][CAG][TC][CG][CAGT][CT]C

Motif 2:

G[GTC][CGT][GC]GT[GTC]GG[CGA][GT][GT][GCT]GG[CGT]G[GA]

Motif 3:

A[GA][AG][TG][AGT]A[AG][AG]A[AT][AT][TAG][GA][GTA]A[AT][GT][TAG][AT]A[TG][AT][AGT][AC][AC][AG][AT][GA][AGT]GA[ACG][AG][AC][GC]A[GA]

各モチーフの e-value は motif1: 3.9e-001, motif2: 1.1e+001, motif3: 1.2e+002 であった。

表 1 : 解析したプロモーター上のシス配列

| Sequence | シス配列の出現回数 (in 1 kb) | | | | |
|----------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|
| | Gene 01 | Gene 02 | Gene 03 | Gene 04 | Gene 05 |
| ACGT | 1.0 | 3.2 | 3.1 | 1.6 | 2.9 |
| NGATT | 8.0 | 3.2 | 7.6 | 0.8 | 7.2 |
| CAAT | 3.0 | 4.8 | 6.1 | 5.6 | 5.8 |
| AAAG | 11.0 | 7.9 | 6.1 | 10.3 | 1.4 |
| CANNTG | 5.0 | 6.3 | 3.1 | 3.2 | 4.3 |
| GRWAAW | 5.0 | 4.8 | 3.1 | 4.8 | 4.3 |
| CTCTT | 3.0 | 1.6 | 3.1 | 4.8 | 4.3 |
| AGAAA | 4.0 | 3.2 | 3.1 | 3.2 | 1.4 |

(3) 今後の展望

今後は、本研究で同定されたシス配列候補に特異的に結合する転写因子の探索を行い、最終的にはレポーターアッセイ等の詳細な解析により、真のシス配列および転写因子の同定を目指す。一連の研究により、ザゼンソウの花での活発なミトコンドリア合成を支える機構の一端が明らかになると考えている。近年の高等植物における研究で、気孔や葉緑体の密度やその動態を制御する重要因子の発見が相次いでいるため、本研究における知見は植物オルガネラの研究分野にとどまらず、こうした研究と相まって植物の環境適応機構の統合的理解にも貢献するものと考えている。

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 1 件)

Ito-Inaba, Y., Masuko, H., Watanabe, M. and Inaba, T. Isolation and gene expression analysis of a papain-type cysteine protease in thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76, 1990-1992, Oct. 2012. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

稲葉靖子、増子潤美、片山陽子、渡辺正夫、稲葉丈人、「ザゼンソウの花成ホル

モン(SrFT)が熟産生に及ぼす影響の検討」
2014 年度日本植物生理学会、2014 年 3
月 18-20 日、富山

Kumiko Okawa, Hitoshi Inoue, Fumi
Adachi, Katsuhiro Nakayama, Yasuko
Ito-Inaba, Danny J. Schnell, Susumu
Uehara and Takehito Inaba. Targeting
of a polytopic membrane protein to the
inner envelope membrane of
chloroplasts involves multiple
transmembrane segments. 2014 年度日本
植物生理学会、2014 年 3 月 18-20 日、富
山

稲葉 丈人、井上 仁志、大川 久美子、
安達 ふみ、中山 克大、稲葉 靖子、
Danny J. Schnell、「ポリトピック型膜
タンパク質の葉緑体内包膜への輸送機
構」第 37 回 蛋白質と酵素の構造と機
能に関する九州シンポジウム、2014 年 9
月 26-28 日、長崎

〔その他〕

朝日新聞（朝刊）平成 26 年 3 月 29 日（
『be』 e5 面）掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 靖子（INABA, Yasuko）

宮崎大学・テニユアトラック推進機構・助
教

研究者番号：80400191