

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25251031

研究課題名(和文)環境ストレス応答と生長制御ネットワークのクロストークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the crosstalk between environmental stress responses and regulation of plant growth

研究代表者

篠崎 和子 (Yamaguchi-Shinozaki, Kazuko)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30221295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,400,000円

研究成果の概要(和文)：乾燥ストレス時に植物の生育を抑える転写ネットワークを解明するために、乾燥によって負に制御される二つ転写因子(PIF4, GLK)に着目した。光形態形成を制御するPIF4の遺伝子発現は乾燥ストレス条件下で抑制される。PIF4遺伝子のプロモーター解析を行い、転写活性化領域及び乾燥による転写抑制領域を同定した。また、活性化領域に結合して転写を活性化する転写因子PBP1を同定した。一方、光合成関連遺伝子プロモーターを解析して、転写を活性化するシス領域としてGLK結合サイトを同定した。GLK遺伝子は乾燥によってその発現が抑制されたことから、光合成関連遺伝子の発現抑制の制御に関わっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the transcriptional network to suppress the plant growth under drought stress conditions, we analyzed transcriptional regulation of two genes for transcription factors (PIF4, GLK) that function on the crosstalk between stress responses and regulation of plant growth. Down-regulation of the PIF4 gene was confirmed and its promoter region was analyzed to identify cis-acting elements that regulate its expression under both circadian and drought conditions. The DNA-binding protein interacting with the identified cis-acting element was isolated and designated PBP1. PBP1 functioned as a transcriptional activator for the expression of PIF4. We also analyzed promoter regions of photosynthesis-related genes and identified GLK binding sites as positive cis-acting elements. The expression of GLK was reduced under drought condition indicating that reduction of the GLK expression may be important for the reduced expression of photosynthesis-related genes under drought conditions.

研究分野：植物の環境ストレス応答と耐性獲得の分子生理学

キーワード：環境応答 植物 生長制御 細胞伸長 光合成

1. 研究開始当初の背景

移動の自由のない植物は、干ばつや塩害、凍結などの環境ストレスに適応する応答機構を進化の過程で獲得してきた。植物ではこれらの環境ストレスによって多くの遺伝子が誘導され、これらの遺伝子産物の働きでストレス耐性が獲得されている。一方、植物はこれらのストレス下では、生育が抑制され、十分な収穫を得ることができない。環境ストレスは植物の生長発達に制約を与え、その収穫量の低下をもたらす。しかし、ストレス下での植物の生育抑制の分子機構に関しては、ほとんど解明されていない。ストレス時の生長阻害は多面的に引き起こされ、多くの遺伝子群の発現制御が関与していると考えられる。

ストレス耐性の獲得と生長制御の転写ネットワークのクロストークを明らかにすることにより、植物の環境ストレス時の生長制御機構を解明する。

2. 研究の目的

植物の乾燥などの環境ストレス耐性の獲得機構では、重要な機能を示す転写因子群が同定され、転写制御ネットワークの全容が明らかにされようとしている。しかし、ストレス下での植物の生育抑制の分子機構に関しては、ほとんど解明されていない。申請者は、環境ストレス応答と生長制御の接点に位置すると考えられる転写因子の探索を進め、植物の伸長を制御するPIFと光合成遺伝子群を制御するGLKの二つの重要な転写因子を見出した。これらの因子を手がかりに、ストレス耐性の獲得と生長制御の転写制御ネットワークのクロストークを明らかにすることにより、植物の環境ストレス時の生長制御機構を総合的に解明する。

3. 研究の方法

ストレス時に植物の生育を抑える転写ネットワークの総合的解明を目指し、通常時には植物の生育を促進するが、環境ストレスによってその機能が負に制御される二つ転写因子群に着目して、その制御機構を解析する。光形態形成を制御するPIF転写因子群の遺伝子発現が乾燥や低温ストレス条件下で抑制される現象に着目し、シロイヌナズナやイネのPIF遺伝子群のストレス時の発現を制御する機構を解析する(図1)。また、環境ストレス耐性の獲得に機能する転写因子とPIFを共発現させることにより、生長とストレス耐性の獲得の制御機構の相互作用を解明するとともに、より効率的な制御が行われるような植物の作出を目指す。一方、ストレスによって光合成関連遺伝子の発現量が低下する現象に着目し、その制御機構を解析する。シロイヌナズナの近縁種のゲノム配列の比較解析を行い、乾燥時に発現が抑制される光合成関連遺伝子のプ

ロモーター配列を比較解析することにより、鍵となるシス配列を探索する。さらに、これらの光合成関連遺伝子の発現を制御するGLK転写因子群について、ストレス下での転写および翻訳後レベルでの活性制御機構の解析を行う。

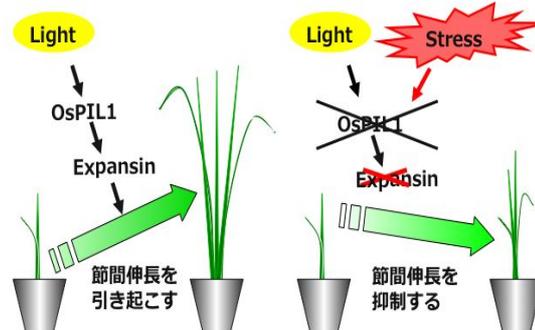


図1 PIFタイプの転写因子であるOsPIL1によるイネの成長のモデル。乾燥等のストレス下では発現が抑制され、標的の細胞伸長を行うために機能するExpansin等の遺伝子が抑制されることで節間伸長が抑制される。

4. 研究成果

(1)シロイヌナズナの細胞伸長を制御する転写因子PIFによる成長制御機構の解明

PIF4遺伝子の発現に関して定量PCR法で詳細に解析した。PIF4遺伝子は、昼に発現が強まり夜は低下する概日リズムを示した。また、シロイヌナズナに乾燥ストレスと低温ストレスを加えるとPIF4遺伝子の発現は、ほとんど見られないレベルまで低下した。しかし、高濃度の塩やマンニトール、ABAによる処理では発現の低下は観察されなかった。これらの発現制御は、相同性遺伝子であるPIF5でも同様の傾向が観察された。

そこで、これらの遺伝子発現を制御するシス因子の同定を目指し、PIF4遺伝子のプロモーター解析を行った。様々な長さのPIF4プロモーター断片を結合したGUS遺伝子を発現する形質転換シロイヌナズナを作出し、概日リズムや乾燥による応答性を定量RT-PCR法で解析した。その結果、PIF4及びPIF5のプロモーターで共通に保存している領域が、概日リズムに従った遺伝子発現及び乾燥や低温ストレスによる発現抑制を制御するシス因子を含むと考えられた。そこで、この領域をベイトとして、酵母のワンハイブリッドスクリーニング法により、転写因子をコードするcDNAを単離した。

これらの候補転写因子の遺伝子に関して、酵母ツーハイブリッド法を用いて結合を確認

した結果、*PIF4*遺伝子の発現を正に制御する転写因子の候補として一つの転写因子を単離してPPB1と名付けた。*PPB1*遺伝子は概日リズムに従った発現は示さなかったが、乾燥ストレス条件下では発現の抑制が観察された。また、ゲルシフト法を用いて大腸菌で合成したPPB1タンパク質が*PIF4*のプロモーター中の発現を正に制御するシス領域に特異的に結合することを確認した。プロトプラストを用いた一過的遺伝子発現系を用いて*PIF4*プロモーターを介した転写活性化能を解析すると、強くリポーター遺伝子の転写を活性化することが示された。

そこで、*PPB1*遺伝子を過剰発現するシロイヌナズナ形質転換体を作製したり、T-DNA挿入やRNAiにより発現が抑制された形質転換シロイヌナズナを作出したが、得られた形質転換体には大きな変化は見られなかった。シロイヌナズナゲノム中には2種のPPB1の相同遺伝子があることから、PPB1にリプレッションドメインを結合して植物に導入することでドミナントにPPB1の機能を抑制する植物を作製した。この形質転換体では、*PIF4*遺伝子の発現が減少していることを明らかにした。以上の結果からPPB1は*PIF4*遺伝子の発現を正に制御する転写活性化因子であると考えられた。本研究成果に関して、現在論文作成中である。

(2) DREBとPIFを共発現する植物の解析

ストレス耐性獲得に働く転写因子であるDREB1Aと植物細胞の伸長に働くOsPIL1の両方を発現する形質転換シロイヌナズナを作出した。それぞれの転写因子の遺伝子発現量を解析し、十分な発現を示す形質転換体を数ライン選抜した。これらの形質転換体の生育を観察するとDREB1Aのみを過剰発現した植物と比較して、胚軸伸長や花茎の伸長が改善していることが示された。また、DREB1A形質転換体では遅れていた花成が、共発現体では早まる傾向が観察された。一方、乾燥耐性試験の結果、DREB1A形質転換体と同程度に乾燥耐性が向上していることが明らかになった。さらに、導入した二つの転写因子の下流で機能している生育や耐性の獲得に関わる数種の遺伝子の発現を定量RT-PCR法によって測定した結果、多くの遺伝子の発現が上昇していることが確かめられた。

そこで、メタボローム解析及びマイクロアレイ解析を行い、共発現する過剰発現体で変化した代謝産物や遺伝子発現を網羅的に解析した。共発現体ではDREB1A過剰発現体と同様に糖やアミノ酸等の適合溶質が増加していることが示された。また、トランスクリプトーム解析から、共発現体では乾燥ストレス耐性の獲得に働く遺伝子群や細胞伸長に働く遺伝子群が高発現していることが明らかになった。このように、DREB1A

過剰発現体とOsPIL1過剰発現体で変化している代謝産物や転写産物は、共発現体においても変化を示した。共発現体において、2つの転写因子は独立に機能していると考えられることから、複数の制御遺伝子を重ねて導入することで環境ストレス下の植物の生長と耐性を同時に改変できる可能性が示された。本研究に関して論文としてまとめ、現在投稿中である。

(3) 光合成関連遺伝子の発現を制御する転写因子GLKによる成長制御機構の解明

GLK転写因子の関与が予想される乾燥ストレスによる光合成関連遺伝子の転写抑制機構の解明を進めるため、シロイヌナズナを用いてこれまでに行ったマイクロアレイ解析のデータから、乾燥時に発現が抑制される光合成関連遺伝子群を選抜した。これらの遺伝子の発現をRNAゲルプロット法や定量PCR法で検証した。乾燥ストレスによって転写が抑制されることを確認した光合成関連遺伝子のプロモーター領域をGUSリポーター遺伝子と繋いでシロイヌナズナに導入して、リポーター遺伝子の発現を解析した。その結果、乾燥ストレス下で発現が減少することが確認された。このプロモーター領域に欠失を導入することで乾燥ストレスによる発現抑制に関与するシス領域を同定した。さらに、プロトプラストの一過的発現解析法を用いて、これらのシス領域を含むGUSリポーター遺伝子の発現が、GLKによって活性化することを明らかにした。

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15件)

Sato H, Todaka D, Kudo M, Mizoi J, Kidokoro S, Zhao Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2016) The *Arabidopsis* transcriptional regulator DPB3-1 enhances heat stress tolerance without growth retardation in rice, *Plant Biotechnology Journal*, 2016 Feb 3, doi: 10.1111/pbi.12535. 査読有

Ohama N, Kusakabe K, Mizoi J, Zhao H, Kidokoro S, Koizumi S, Takahashi F, Ishida T, Yanagisawa S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2016) The transcriptional cascade in the heat stress

response of Arabidopsis is strictly regulated at the expression levels of transcription factors, *Plant Cell*, 28(1): 181-201, doi: 10.1105/tpc.15.00435. 査読有

Takasaki H, Maruyama K, Takahashi F, Fujita M, Yoshida T, Nakashima K, Myouga F, Toyooka K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2015) SNAC-As, stress-responsive NAC transcription factors, mediate ABA-inducible leaf senescence, *Plant J.*, 84(6): 1114-1123, doi: 10.1111/tpj.13067. 査読有

佐藤輝、篠崎和子 (2015) 植物の乾燥・高温応答の解明と再生作物の開発に向けて, *Bio Industry*, 32(12): 25-31

Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K (2015) Omics Approaches Toward Defining the Comprehensive Abscisic Acid Signaling Network in Plants, *Plant and Cell Physiology*, 56(6): 1043-1052, doi: 10.1093/pcp/pcv060. 査読有

大濱直彦、篠崎和子 (2015) 高温環境を生き抜くための植物の転写制御機構, *化学と生物* 53(10): 696-702

Mogami J, Fujita Y, Yoshida T, Tsukiori Y, Nakagami H, Nomura Y, Fujiwara T, Nishida S, Yanagisawa S, Ishida T, Takahashi F, Morimoto K, Kidokoro S, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2015) Two Distinct Families of Protein Kinases Are Required for Plant Growth under High External Mg²⁺ Concentrations in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, 167(3): 1039-57, doi: 10.1104/pp.114.249870. 査読有

Kidokoro S, Watanabe K, Ohori T, Moriwaki T, Maruyama K, Mizoi J, Nang Myint Phyu Sin Htwe, Fujita Y, Sekita S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2015) Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression, *Plant J.*, 81(3): 505-18, doi: 10.1111/tpj.12746. 査読有

Sato H, Mizoi J, Tanaka H, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Morimoto K, Ohori T, Kusakabe K, Nagata M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2014) Arabidopsis Dpb3-1, a DREB2A interactor, specifically enhances heat stress-induced gene expression by forming a heat stress-specific transcriptional complex with NF-Y subunits, *Plant Cell*, 26(12): 4954-73, doi: 10.1105/tpc.114.132928. 査読有

Koizumi S, Ohama N, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2014) Functional analysis of the Hikesi-like protein that interacts with HSP70 in Arabidopsis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 450(1): 396-400, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.128. 査読有

Yoshida T, Fujita Y, Maruyama K, Mogami J, Todaka D,

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2015) Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic-acid signaling in response to osmotic stress, *Plant Cell and Environment*, 38(1), 35-49, doi: 10.1111/pce.12351. 査読有

Maruyama K, Urano K, Yoshiwara K, Morishita Y, Sakurai N, Suzuki H, Kojima M, Sakakibara H, Shibata D, Saito K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2014) Integrated analysis of the effects of cold and dehydration on rice metabolites, phytohormones, and transcripts. *Plant Physiol.*, 164(4):1759-71, doi: 10.1104/pp.113.231720, 査読有

Todaka D, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2015) Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants, *Front Plant Sci.*, 2015 Feb. 18; 6:84, doi: 10.3389/fpls.2015.00084. 査読有

Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2014) The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Front Plant Sci.*, May 16; 5:170, doi: 10.3389/fpls.2014.00170. 査読有

Yoshida, T., Mogami, J., Yamaguchi-Shinozaki, K (2014) ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 21: 133-139, doi: 10.1016/j.pbi.2014.07.009. 査読有

[学会発表](計15件)

戸高大輔、趙宇、吉田拓也、工藤まどか、Alisdair R. Fernie、篠崎一雄、篠崎和子 (2016) 環境ストレス時の生長制御機構の解析、第57回日本植物生理学会年会、3月18~20日、岩手大学(岩手・盛岡市)

小泉慎也、城所聡、大濱直彦、中嶋正敏、篠崎一雄、篠崎和子 (2016) 高温ストレス下における植物の生長制御機構の解明、第57回日本植物生理学会年会、3月18~20日、岩手大学(岩手・盛岡市)

工藤まどか、城所聡、溝井順哉、戸高大輔、篠崎和子 (2016) 遺伝子集積法による乾燥

ストレス耐性植物の生長促進制御、第57回日本植物生理学会年会、3月18～20日、岩手大学(岩手・盛岡市)

篠崎和子(2015)環境ストレス応答の分子機構の解明と耐性作物開発、東京理科大学 アグリ・バイオ工学研究部門公開シンポジウム、7月17日、東京理科大学(東京・葛飾区)(招待)

Yamaguchi-Shinozaki K (2015) Regulatory networks for osmotic and heat stress responses in plant, the International Symposium on “Plant Responses to Stress”, Jun.15-22, Beijing (China)(招待)

戸高大輔, 趙宇, 工藤まどか, 篠崎一雄, 篠崎和子(2015)環境ストレス時の生長制御機構の解析、第56回日本植物生理学会年会、3月16～18日、東京農業大学(東京・世田谷区)

工藤まどか, 戸高大輔, 篠崎和子(2015)バイオマス生産性を向上させた乾燥ストレス耐性植物の創出、第56回日本植物生理学会年会、3月16～18日、東京農業大学(東京・世田谷区)

Moon J-S, Kidokoro S, Todaka D, Igusa S, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2015) Analysis of transcriptional regulation of Arabidopsis *PIF* family genes in response to abiotic stresses, 第56回日本植物生理学会年会、3月16～18日、東京農業大学(東京・世田谷区)

Yamaguchi-Shinozaki K (2014) Water and Plants, Women in Global Science 2014, Oct. 27 – 29, Hokkaido Univ. (Hokkaido, Japan)(招待)

篠崎和子(2014)植物の乾燥ストレス応答と成長制御、日本植物学会第78回大会、9月12日～14日、明治大学(神奈川・川崎市)(招待)

篠崎和子(2014)植物の環境ストレス耐性機構と分子育種、第53回ガンマーフィールドシンポジウム、7月16日、三の丸ホテル(茨城・水戸市)(招待)

戸高大輔, 工藤まどか, 趙宇, 有賀遥平, 本多剛志, 佐藤輝, 篠崎一雄, 篠崎和子(2014)環境ストレス時の細胞伸長と生長制御、第55回日本植物生理学会年会、3月18～20日、富山大学(富山・富山市)

戸田智美, 城所聡, 溝井順哉, 篠崎一雄, 篠崎和子(2014)シロイヌナズナにおける低温誘導性の転写因子遺伝子DREB1の転写制御機構の解析、第55回日本植物生理学会年会、3月18～20日、富山大学(富山・富山市)

本多剛志, 城所聡, 戸高大輔, 篠崎一雄, 篠崎和子(2014)ストレス条件下における光合成関連遺伝子群の発現抑制機構に関する解析、第55回日本植物生理学会年会、3月18～20日、富山大学(富山・富山市)

Yamaguchi-Shinozaki K (2013) Plant responses and adaptation to water stress, 7th EPSO Conference, Sep.

1-4, Porto Heri (Greece)(招待)

〔その他〕

アウトリーチ活動情報

高校生対象研究室見学会(平成25年7月4日)

小学生向け植物の実験教室(平成25年8月25日)

廈門大学関係者研究室見学会(平成26年4月11日)

高校生対象研究室見学会(平成26年8月20日)

スタンフォード大学生対象研究室見学会(平成26年9月8日)

シンガポール高校生対象研究室見学会(平成26年12月19日)

Amgen サマープログラムキャンパスツアー(平成26年7月3日)

小学生向け植物の実験教室(平成27年8月9日)

高校生対象研究室見学会(平成27年8月27日)

高校生対象研究室見学会(平成27年10月16日)

報道関連情報

「干ばつ時でも植物の黄化抑制」日本農業新聞に掲載(平成27年12月15日)

「乾燥による葉の黄化制御 理研が関与遺伝子発見」化学工業日報に掲載(平成27年12月7日)

「理研と東大、長期の乾燥による葉の黄化防止に関わる遺伝子のメカニズムを解明 長期の乾燥による葉の黄化防止に関わる遺伝子を発見-作物の黄化制御技術の開発に応用-」日経電子版に掲載(平成27年11月27日)

「植物の高温ストレス耐性を高める新遺伝子戦略」日経バイオテクに掲載(平成28年2月18日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

篠崎 和子

(YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko)

東京大学大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 30221295