

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291055

研究課題名(和文)植物における転写因子複合体を形成する因子の網羅的な解析

研究課題名(英文)Comprehensive analyses of the protein factors that interact with transcription factors in plants

研究代表者

高木 優 (TAKAGI, Masaru)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：40357348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子と結合し、標的遺伝子の発現を制御するWD40ドメインを持つタンパク質の網羅的な解析を、申請者が開発したトランスリプレッションシステムと転写因子だけを対象にした酵母ツーハイブリッド法を利用しておこなった。具体的には、個々のWD40タンパク質にSRDXリプレッションドメインを付与したコンストラクトをシロイヌナズナに導入し、形態が変化するラインを探索した。その結果、これまでに30個のリプレッションドメインを付与したWD40発現体で、形態が変化することが明らかになり、その中で特に矮性を誘導するWD40遺伝子について、相互作用する転写因子の同定を酵母ツーハイブリッド法によって解析をおこなった。

研究成果の概要(英文)：In this project, we performed comprehensive analyses of the WD40 proteins that interact with transcription factors in Arabidopsis, using the trans-repression system and yeast two hybrid system with cDNA library containing only transcription factors, which we had developed. We prepared transgenic Arabidopsis that expressed the chimeric genes of the WD40 protein fused with the SRDX repression domain, and screened the lines with altered phenotype. As a results, we identified that 30 lines that expressed each of WD40-SRDX exhibited altered morphological phenotype. We focused the dwarf lines among them and analysed the transcription factors that interact with the WD40 protein using the yeast two hybrid system.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：転写因子 シロイヌナズナ キメラリプレッサー WD40タンパク質 タンパク質相互作用 トランスリプレッション 転写抑制 酵母ツーハイブリッド

1. 研究開始当初の背景

転写調節には、転写因子のみならず、転写因子に結合する多様な因子が転写因子の活性調節等に重要な役割を果たしている事が明らかになってきた。例えば、オーキシン応答転写因子 ARF1 に結合する Aux/IAA は、ARF1 が転写活性化因子あるいは抑制因子と機能するかを決めている。別の例として bHLH 転写因子に結合する WD40 ドメインタンパク質である TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG1) は、表皮細胞の制御に中心的な役割を果たしている事が知られており、この遺伝子が欠損すると、それぞれ結合する転写因子の欠損型と同様な表現型を示す。WD40 ドメインをもつタンパク質はシロイヌナズナゲノム中に約 240 個あるとされ、そのうち核に局在すると予測もしくは実証されているものは約 160 個(約 70%)ある。(Pfam データベースおよび SUBAII データベースによる)。これら細胞内局在の予測数は多く見積もった場合であるが、同じ手法を全タンパクコード遺伝子に適用した場合、約 45%しか核に局在すると予測もしくは実証されないことから、WD40 タンパク質は統計的に有意に高頻度に核に局在すると予測もしくは実証されている。そして、それらの中には、TTG1, TPL, FIE 等、転写因子と相互作用して重要な転写調節に関わることが実証されているものが散見されることから、他の多くの WD40 タンパク質も転写調節に関与していることが推察される。しかしながら上記のように機能解明されている WD40 タンパク質はごくわずかであり、多くは未だ機能不明であり、相互作用する因子も不明である。タンパク質間相互作用を検出する方法としては、主に酵母 Two-hybrid (Y2H)系が一般に用いられている。しかし、転写因子の多くは、酵母内で転写活性化能を持っている場合が多く、そのままでは bait として用いることが出来ないため、転写活性化領域を除く必要があり、その領域に結合する因子の検出は不可能であるという欠点がある。一方、免疫沈降によって、転写因子に結合する複合体を調べる方法は、大変有効であるが、システムが複雑で実験コストが高いという欠点があり、網羅的な解析にまだ不向きであると考えられる。我々は、これまでに EAR-motif を含む転写抑制化ドメイン(リプレッションドメイン[RD])を、転写因子に網羅的に付加したキメラリプレッサーを植物に発現させ(CRES-T 法)、その表現型を観察してきた。

その一方で、転写因子と相互作用するタンパク質に RD を付加して植物体内で発現させることにより、転写制御因子複合体全体を転写抑制因子複合体に機能変換でき、複合体を形成する転写因子遺伝子の欠損型あるいはその転写因子のキメラリプレッサーを発現する形質転換体と同様な表現型を誘導できることを見出した。このことは、あるタンパク質にリプレッションドメインを付加して発現させたときに表現型が現れ、リプレッションドメインを付加せずに発現させた場合には表現型が現れないか、異なる表現型が現れるならば、そのタンパク質は、転写因子と結合していること可能性が高いことを示している。つまり、RD によるトランスリプレッション機能を利用することによって、植物体内で転写因子に結合する因子の同定、機能解析が可能となることを示している。

2. 研究の目的

遺伝子発現の第一段階である転写制御を担う転写因子は、シグナルを介在する多様な因子と複合体を形成し、転写の調整を行っていると考えられている。とくに WD40 ドメインをもつタンパク質は、その多くが核に局在すると想定され、転写因子と相互作用して協働する可能性が高い重要な研究対象である。本研究では、CRES-T 法が転写因子と相互作用する因子に対しても有効に働く(トランスリプレッション)ことや、転写因子だけを対象にした酵母ツーハイブリッド法を利用して、転写因子と相互作用する WD40 タンパク質を網羅的に見つけ出し、キメラリプレッサー発現体の表現型解析と連動して機能解析を行う。本研究により転写因子が生体内でどのように制御され、働いているのかなど、包括的な理解が進むものと期待される。

3. 研究の方法

シロイヌナズナゲノムに存在する約 240 個の WD40 ドメインをもつタンパク質遺伝子を解析対象とする。発現様式などを参考に優先順位を付け、SRDX リプレッションドメインを融合したキメラ遺伝子が発現する形質転換シロイヌナズナを作成する。一方でこれら WD40 タンパク質遺伝子を単純過剰発現する植物の作成も同時に行い、T1 世代の表現型を比較解析することにより、両者が異なる表現型を示すラインを探索す

る。そのようなラインが同定できた場合、これまでに観察したキメラリプレッサー発現植物の表現型データベースから類似する表現型を示すものを探索し、且つ転写因子遺伝子のみからなるライブラリーを用いた Y2H 法により相互作用する転写因子の探索を行い、発現パターンが類似する転写因子のキメラリプレッサー発現植物の表現型を観察することによって、相互作用する転写因子を同定する。さらに複合体を形成する因子が転写制御にどのように影響を及ぼしているのか、その分子機構について詳細な解析を行う。

まず、転写因子と結合して複合体を形成し、転写制御に関与する可能性が高いタンパク質因子として、シロイヌナズナゲノム中に約 240 個存在する WD40 ドメインを持つタンパク質を研究対象とする。公的マイクロアレイデータベースなどの情報を参考に、環境ストレス応答に対する関連性が小さく、かつ組織特異的な発現するものから優先的に cDNA の収集を行う。具体的には、リソースセンターおよび cDNA ライブラリーから PCR により単離する (100 個の遺伝子の cDNA については、既に取得済み)。これら収集した cDNA のタンパク質コード領域を適切なプライマーを用いて PCR で増幅し、研究代表者の研究室で作成したキメラリプレッサー作成用および単純過剰発現作成用 Gateway カセットベクターにクローニングする。これらを個別に植物に形質転換するのは多大な労力を必要とするので、個々のキメラ遺伝子で形質転換されたアグロバクテリア形質転換体 10 種類を混合し、バッチ 1~20 までの 20 個のプールを作成する。各バッチでシロイヌナズナの形質転換をおこない、バッチごとに 50~100 個の形質転換を単離し、形態観察を行う。形態、生育速度、大きさ、生殖生長への移行、花器官等について詳細に観察し、野生型と比較し何らかの変異が見られる形質転換体から、ゲノム PCR によって導入された WD40 タンパク質遺伝子を同定する。並行して、単純過剰発現用コンストラクトで形質転換した植物体も同様の手法で作成して表現型観察および導入遺伝子の同定を行う。キメラ遺伝子導入ラインと単純過剰発現導入ラインとは常に同じバッチを同時に育成、観察するようにする。この時点で、キメラ遺伝子を導

入しても、単純過剰発現コンストラクトを導入しても同様の表現型を示すものが相当程度リストアップできると考えられるが、それらは転写因子と相互作用して表現型を誘導したとは考えにくいので、その後の解析対象から外す。キメラ遺伝子導入ラインでのみ表現型を観察した遺伝子に関しては、単純過剰発現ラインとともに個別に遺伝子組換え体を作成し直し、キメラ遺伝子導入ラインでのみ表現型が観察されることを確認する。これらは転写因子と相互作用する WD40 タンパク質の有望候補となる。

次に有望な WD40 タンパク質を同定した場合、そのキメラ遺伝子発現植物の表現型と類似した表現型を示すキメラリプレッサー発現植物を、すでに構築してあるデータベースからの検索によって探索する。そのような候補が見つかる場合は、すでに作成済であるキメラリプレッサー発現個別 T1 種子を再播種して表現型観察を行い類似性を検証する。

一方、データベース検索で類似する表現型が見つからない場合は、対象としている WD40 タンパク質遺伝子と類似した発現パターンを示す転写因子を一般的なデータベースなどで検索し、それらのキメラリプレッサー発現植物を観察して表現型に類似性があるかどうかを検証する。類似性が認められる場合は、酵母ツーハイブリッド法や BiFC 法、免疫沈降法などを駆使して物理的相互作用の有無を慎重に検証する。

相互作用に確認のため、研究代表者らはこれまでに収集した転写因子クローンを利用して、転写因子だけからなる酵母ワン/ツーハイブリッドライブラリーを作成済である。本ライブラリーを使用すると、非常に高効率に特定の DNA もしくはタンパク質に結合する転写因子を同定することができる。さらに最近では 96 穴プレート 4 枚を利用して準一対一にスクリーニングする手法も開発しており、より高感度なスクリーニング系を確立している。そこで、本ライブラリーを駆使し Y2H スクリーニングにより同定した優先順位の高い WD40 遺伝子について、相互作用する転写因子を網羅的に探索する。相互作用する転写因子を同定できた場合は、それらのキメラリプレッサー発現植物を観察して、WD40 キメラ遺伝子発現植物との

間に表現型の類似性があるかどうかを検証する。類似性が認められる場合は、BiFC 法、免疫沈降法などを駆使して物理的相互作用の有無を再検証する。

転写因子とアクセサリタンパク質(本研究の場合は WD40 タンパク質)の相互作用の意義としては、転写因子の活性調節(転写活性化 / 抑制化能力の変化)、DNA 結合能力の変化(アクセサリタンパク質と相互作用したときのみ DNA に結合する、あるいは DNA から解離する)などがあげられる。いずれであるにせよ転写因子とアクセサリタンパク質の複合体もしくは転写因子がどのような塩基配列に結合するか明らかでなければ、検証実験を行うのは難しい。そのため、まず CASTing 法などを用いて結合塩基配列を明らかにする。結合塩基配列がわかればそれらを繰り返してレポーター遺伝子に連結したコンストラクトを作成することができるため、転写因子のみを発現させた場合と、転写因子および WD40 タンパク質を発現させた場合とでレポーター遺伝子の活性化(抑制化)度合いを調べることができる。さらに、ゲルシフトアッセイにより転写因子のみの場合と転写因子および WD40 タンパク質の場合とで DNA 結合能力に変化があるかを調べることができる。また、そのほか一般的な実験手法により、転写因子と相互作用する WD40 タンパク質との間でプロモーター活性(組織特異性)にどの程度差異があるかを解析することができ、また、ノックアウトラインにおける表現型を比較するなどの研究が可能であり、本相互作用の意義を明らかにできると期待される。

一方、転写因子と相互作用する WD40 タンパク質が一對一に対応し、且つ表現型も類似しているならば、転写因子キメラリプレッサー発現植物と WD40 キメラ遺伝子発現植物とでは、そのトランスクリプトームが高い類似性を示すはずである。このような観点からマイクロアレイ実験を行い、下流遺伝子発現に及ぼす影響を比較解析する。また、クロマチン免疫沈降-次世代シーケンシング(ChIP-seq)解析も、転写因子および相互作用する WD40 タンパク質の両方について実施し、標的(結合)領域に明確な違いがあるかどうかを調べる。非転写因子に対する ChIP-seq 解析はあまり前例がないが、原

理的には可能であると考えられる。もし転写因子と相互作用する WD40 タンパク質が複数対一のような関係の場合は標的(結合)領域に違いが見られる可能性があり非常に興味深い。

WD40 タンパク質遺伝子(キメラ遺伝子および単純過剰発現遺伝子)導入ラインおよび転写因子キメラリプレッサー遺伝子導入ラインの表現型は、類型化された約 40 種類の表現型リストから選択することによってデータベースに記録し、後日類似性などを検索しやすいようにしておく。データベースプラットフォームはすでに整備してある FioreDB を介して順次一般公開していくものとする。

4. 研究成果

遺伝子発現の第一段階である転写制御を担う転写因子は、シグナルを介する多様な因子と複合体を形成し、転写の調整を行っていると考えられている。とくに WD40 ドメインをもつタンパク質は、その多くが核に局在すると想定され、転写因子と相互作用して協働する可能性が高い重要な研究対象である。本研究では、CRES-T 法が転写因子と相互作用する因子に対しても有効に働く(トランスリプレッション)ことや、転写因子だけを対象にした酵母ツーハイブリッド法を利用して、転写因子と相互作用する WD40 タンパク質を網羅的に見つけ出し、キメラリプレッサー発現体の表現型解析と連動して機能解析をおこなった。本研究により転写因子が生体内でどのように制御され、働いているのかなど、包括的な理解が進むものと期待される。

本研究では、転写因子と結合し、標的遺伝子の発現を制御する WD40 ドメインを持つタンパク質の網羅的な解析を、研究代表者が開発したトランスリプレッションシステムと転写因子だけを対象にした酵母ツーハイブリッド法を利用しておこなった。具体的には、転写因子と結合し、標的遺伝子の発現を制御する WD40 ドメインを持つタンパク質の網羅的な解析を、研究代表者高木が開発したトランスリプレッションシステムと転写因子だけを対象にした酵母ツーハイブリッド法を利用しておこなった。そのため、シロイヌナズナゲノム解析から明らかになった WD40 タンパク質をコードする遺伝子の cDNA からタンパク質コード領域を PCR で増幅した。それらをリプレッショ

ンドメイン(SRDX)に融合するためのベクターにクローニングしたコンストラクトを用いてシロイヌナズナを形質転換した。形質転換したそれぞれの WD40-SRDX を発現するシロイヌナズナの表現型について、形態、生育速度、大きさ、生殖生長への移行時期、花器官などの多様な形質について詳細に観察をおこなった。その結果、これまでに 30 個のリプレッションドメインを付与した WD40 発現体で、形態が変化することが明らかになり、その中で特に矮性を誘導する WD40 遺伝子について、相互作用する転写因子の同定を酵母ツーハイブリッド法によって解析をおこなった。

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)

Nagatoshi Y, Ikeda M, Kishi H, Hiratsu K, Muraguchi A, Ohme-Takagi M. Induction of a dwarf phenotype with IBH1 may enable increased production of plant-made pharmaceuticals in plant factory conditions. Plant Biotechnology Journal 査読有り (2016) 14(3):887-894.

[学会発表](計 1 件)

山形翼、池田美穂、高木 優 形質変化を制御する転写因子の探索 第 57 回日本植物生理学会年会 2016 年 3 月 18 日 岩手県盛岡市

[その他]

ホームページ等

<http://gr-en.saitama-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高木 優 (TAKAGI, Masaru)
埼玉大学・理工学研究科・教授
研究者番号：4 0 3 5 7 3 6 8

(2)研究分担者

光田展隆 (MITSUDA, Nobutaka)
産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員
研究者番号：8 0 4 5 0 6 6 7