

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450127

研究課題名(和文)植物におけるcGMP/NOシグナリングの標的転写因子の同定と転写調節機構の解明

研究課題名(英文) Identification of target transcription factor of cGMP/NO signaling in plants and elucidation of the mechanisms of the transcriptional regulation

研究代表者

山形 裕士 (Yamagata, Hiroshi)

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号：00159203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：サイクリックGMP(cGMP)や一酸化窒素(NO)は、動物の視覚や血管平滑筋弛緩など、重要な働きを担うシグナル分子である。近年、植物においても、光応答、感染防御応答、根の発達などの重要な生理的機能がcGMPやNOにより調節されていることが明らかになったがその分子機構は不明である。我々はこれまでにダイズやシロイヌナズナの遺伝子の発現がcGMP/NOにより調節されることを報告してきた。本研究ではそれらの遺伝子発現調節機構を転写レベルで解析し、cGMP/NO応答性遺伝子プロモーター中にcGMP/NO応答シス配列を見出すと共に、それらの配列に結合する転写因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Cyclic GMP (cGMP) and nitrogen oxide (NO) are important signal molecules controlling vision and smooth muscle expansion of blood vessels in animal. Recently it has been clarified that photo responses, protection against infection of pathogen, root development, etc. in plants are regulated by cGMP/NO. However, their molecular mechanisms remain to be elucidated. We have been reported that several genes of soybean and Arabidopsis are controlled by cGMP/NO. In this study, we identified cis-elements in promoters of several cGMP/NO regulated genes, and transcription factors that bind to these cis-elements.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：cGMP NO 遺伝子発現調節 転写因子 シグナル伝達 フラボノイド ダイズ シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物遺伝子の発現はホルモンや内在性の発達プログラム、および光、温度、湿度、栄養条件、各種の生物的・非生物的ストレスなど様々な環境因子等によって調節されている。一般にこれらの刺激は受容体やセンサーにより感知され、その後、セカンドメッセンジャーが介する細胞内シグナル伝達を経て核に伝わり遺伝子の発現が調節される。サイクリック GMP (cGMP) や一酸化窒素 (NO) は動物の視覚シグナルや血管平滑筋弛緩において細胞内情報伝達を担う重要なセカンドメッセンジャーである。NO は、その他にもアポトーシス、免疫反応、細胞増殖、分化等の様々な生理反応を仲介するシグナル伝達分子である。

(2) 動物ではシグナル伝達物質としての cGMP や NO の合成機構や作用機構がよく知られている。すなわち、NO の合成は主に NO 合成 (NOS) 酵素によって触媒され、L-アルギニンが L-シトルリンに変換する際に NO が産生される。また、NO の生理作用はサイクリック cGMP に仲介されることが多く、その詳細な機構も解明されている。例えば、NO による血管拡張においては、産生された NO が可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) のヘムに結合することにより sGC を活性化させる。GC は cGMP 合成酵素であり、GTP を基質として cGMP を生成する反応を触媒し、細胞内の cGMP 濃度を上昇させる。細胞内 cGMP 濃度の上昇により活性化された PKG がミオシン軽鎖脱リン酸化酵素をリン酸化して活性化させ、リン酸化ミオシン軽鎖を脱リン酸化して筋細胞の弛緩を引き起こし、血管を広げる。

(3) 近年、植物においても cGMP/NO が様々な機能を持つことが明らかにされつつある。すなわち、cGMP はフィトクロームのシグナル伝達、開花、発芽、塩ストレスに対する応答など多様な生理現象に重要な役割を果たしている。cGMP により発現が調節されている遺伝子も少数例が知られている。また、NO は病原菌に対する防御応答をはじめとして、根の伸長や鉄の吸収、開花、花粉管伸長、気孔閉口、発芽、プログラム細胞死、等の様々な生理過程に与する重要な細胞内シグナル分子である。これらの生理応答を引き起こすオーキシン、アブシジン酸などの植物ホルモンのシグナル伝達経路とのクロストークも報告されている。また、NO は様々なストレスや紫外線 (UV-B) により発生する。

(4) 植物においては cGMP/NO の合成機構や作用機構は不明な点が多い。NOS、GC、PKG などの動物ホモログ遺伝子も同定されており、cGMP の合成機構と作用機構については動物との違いが指摘されている。すなわち、植物では動物とは異なる複数の NO の合成経路が報告されている。植物において NO 合成を担う主要酵素である硝酸還元酵素 (NR) は硝酸を亜硝酸に還元する同化的反応に加え、

亜硝酸を NO に還元する反応も触媒する ($2\text{NO}_2^- + 3\text{H}^+ + \text{NADH} \rightarrow 2\text{NO} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$)。NR 以外の様々な酵素でも同様の亜硝酸の還元による NO 生成反応が見られる。また、ミトコンドリア呼吸鎖や光合成電子伝達系も NO の発生源である。これら酵素的反応に加え、アスコルビン酸やポリフェノールなどの還元剤でも化学的に NO が生成することが知られている。

以上のように、cGMP/NO は植物の様々な生理機能に与する遺伝子の発現を調節していることが明らかになってきたが、それらの遺伝子発現調節の分子機構はほとんど不明であった。また、遺伝子発現調節における cGMP と NO の相互関係も不明であった。

2. 研究の目的

我々はこれまでにダイズのアントシアニンやイソフラボンの蓄積およびそれらフラボノイド類合成系酵素遺伝子の発現が cGMP と NO により調節されることを報告した。また、シロイヌナズナの cGMP/NO 応答性遺伝子の網羅的発現解析より、多くの遺伝子が cGMP/NO によって発現が調節されることを明らかにした。しかし、cGMP/NO シグナルによる遺伝子発現調節機構は不明である。

そこで、本研究においては、cGMP/NO シグナルによるこれらの遺伝子発現調節機構の分子機構を転写レベルで解明することを目的とした。cGMP に関しては特にダイズのカルコン合成酵素遺伝子 *CHS8* の cGMP による発現誘導機構を中心に解析した。また、*GmMYB176* と cGMP シグナリングの関連も調べた。一方、NO に関しては cGMP と NO により発現が強く誘導されるシロイヌナズナ遺伝子の中で特にニコチアミン合成酵素遺伝子 (*AtNAS1*) の NO による発現調節機構を調べた。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

ダイズ (*Glycine max* cv. Corsoy) の光独立栄養培養細胞 (SB-P 細胞) を既報に従い、連続照射光下、5 g/L の蔗糖を含む KN1 medium 中で懸濁培養した (25 °C)。3 日間の暗所適応後、50 μM の 8-Br-cGMP で 3 時間処理した。すべての処理は緑色安全光下で行った。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* cv. Columbia) 由来の T-87 細胞は理化学研究所より分譲を受けた。懸濁培養にはショ糖を除いた JPL 培地を用いた。細胞の薬剤処理は既報に従った。NO ドナーとして 100 μM の SNP (sodium nitroprusside)、または DEANONOate (2-(*N,N*-dimethylamino)- diazenolate-2-oxide-Na) を、SNP のコントロールとしてフェロシアン化ナトリウムを用いた。

(2) 定量的 RT-PCR

ダイズ SB-P 細胞より Sepsol RNA I (ナカ

ライテスク)を用いてトータル RNA を抽出した。DNase I で処理した RNA をもとに ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO)を用いて逆転写反応を行い cDNA を得た。cDNA に THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) とプライマーセットを加え、Roche 社の LightCycler 480 装置を用いて定量的 RT-PCR 反応を行い、装置付属のソフトウェアを用いてダイズアクチン mRNA 量を基準に各 mRNA の相対的発現量を算出した。また、シロイヌナズナ T87 細胞を 300 μ M のシクロヘキシミドで 30 分処理後、*AtNAS1* と *AtGT-1* の mRNA 量を qRT-PCR で定量した。

(3) プロトプラストを用いた一過的遺伝子発現系によるプロモーター解析

CTAB 法で抽出した大豆ゲノム DNA を鋳型としプライマー対 (Fw; GGGGTCTAGATGAGCAAGTATACCAACCAT, Rv; GGGGGGATCCCTTTCCTTCAAATTAAGTGA) を用いて *CHS8* の翻訳開始コドンから上流の配列 (1,661 bp) を PCR で増幅した。プロモーター-*GUS* 融合遺伝子コンストラクトは既報に従い作成した。また、*GmMYB176* 結合配列や Unit I 配列をプロモーターとするコンストラクトを作成した。SB-P 細胞より既報に従いプロトプラストを調製し、ポリエチレングリコール (PEG4000) を用いてプロモーター-*GUS* 融合遺伝子をプロトプラストに導入した。細胞を暗所下 8-Br-cGMP で処理し 25 で 3 時間静置後、細胞抽出液中の GUS 活性を測定した。同時に内部標準として導入した pBI_{OFF} によるルシフェラーゼ (LUC) 活性で除し標準化した。さらに、エフェクターとして CaMV35S プロモーターに *GmMYB176* の全長コード領域を連結したコンストラクトをレポーター遺伝子と共導入して同様に GUS 活性を測定した。

また、*AtNAS1* プロモーターの部分配列と GUS レポーター遺伝子の融合遺伝子をシロイヌナズナの光独立栄養培養細胞 (T87 細胞) のプロトプラストに PEG 法で導入し、100 μ M SNP で 3 時間処理後、GUS 活性を測定して一過的遺伝子発現を解析した。

(4) ゲルシフト分析 (EMSA)

転写因子 *AtGT-1* を大腸菌で発現・精製し、NO 応答配列への結合や、SNP 溶液中でインキュベートすることによる *AtGT-1* の DNA 結合能の変化をゲルシフト分析 (EMSA) で解析した。*AtNAS1* の NO 応答性シスエレメント中に存在した *GT-1* core 配列を含む 30 塩基 (ACCCTTAGCGAGGGTTAAAGCCACAACA CA) のフルオレセイン標識プローブを調製し、*AtGT-1* と結合反応を行ったのち、ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、Typhoon 9400 で FITC 蛍光シグナルを検出した。

(1) cGMP/NO 依存的遺伝子発現に関わるプロモーター中のシス配列は不明である。我々はダイズフラボノイド合成系の鍵酵素であるカルコン合成酵素遺伝子 (*GmCHS*) の発現が cGMP/NO により誘導されることを見出した。cGMP による *GmCHS* の発現誘導機構を転写レベルで解析し、初めて cGMP 応答性シス配列を同定した。すなわち、9 個あるダイズの *CHS* 遺伝子のうち、プロモーター中に G-box と H-box から成る Unit-I 様配列をもつ *GmCHS7*, *GmCHS8*, および Unit-I 様配列を持たない *GmCHS2* を材料として、プロモーターの刺激応答性を解析した。*GmCHS7*, *GmCHS8* のプロモーター (1.6 kbp) の塩基配列は 67% の類似性を有するが、*GmCHS2* のプロモーターは *GmCHS7* および *GmCHS8* とそれぞれ 3% および 4% しか類似していない。まず、RT-qPCR により 3 種類の *GmCHS* mRNA の発現に及ぼす cGMP、cAMP、NO に対する応答性を調べた。すなわち、暗所適応させたダイズの光独立栄養培養細胞 (SB-P 細胞) を暗所下、50 μ M の 8-Br-cGMP (cGMP の膜透過性アナログ) で 3 時間処理すると、*GmCHS7* と *GmCHS8* の mRNA 量は約 4 倍に増加したが *GmCHS2* mRNA 量は変化しなかった。一方、8-Br-cAMP で同様に処理した場合は 3 種類の *GmCHS* mRNA 量はどれも変化しなかった。また、NO 供与体であるニトロプルシドナトリウム塩 (SNP, 100 μ M) で同様に処理すると 3 者とも 2 倍程度に増加した。この結果、*GmCHS2* の発現に対する cGMP と NO の作用は異なることが示唆された。*GmCHS7* と *GmCHS8* の 8-Br-cGMP による誘導は 300 μ M のシクロヘキシミドを添加しても阻害されなかったことから、*GmCHS7/8* の cGMP による発現誘導には新たなタンパク質合成を必要としないことが示唆された。一方、暗所適応 SB-P 細胞に白色光を照射すると 3 種類の *GmCHS* の発現はいずれも 3 時間後に約 3 倍に増加したが、光照射 9 時間後には暗所のレベルに下がり、一過的に発現が誘導されることが示唆された。白色光による *GmCHS* の一過的発現機構の詳細は不明である。

(2) 次に、*GmCHS8* のプロモーター解析を行い、プロモーター中の cGMP 応答性シス配列を一過的遺伝子発現系で解析した。すなわち、まず *GmCHS8* プロモーター (1.6 kbp) を β -グルクロニダーゼ (GUS) レポーター遺伝子に連結した融合遺伝子 (*GmCHS8p::GUS*) を CaMV35S プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子の融合遺伝子 (*35Sp::LUC*) とともに SB-P 細胞のプロトプラストにポリエチレングリコールを用いて導入した。プロトプラストを各種の薬剤で処理し、3 時間インキュベート後抽出液中の GUS 活性と LUC 活性を測定し、LUC 活性で標準化した相対 GUS 活性を算出した。その結果、無処理プロトプラストに比べて、8-Br-cGMP 処理により相対 GUS 活性は 3.4 倍に上昇した。NO と白色光によっても

相対 GUS 活性はそれぞれ 3.1 倍および 3.4 倍上昇した。これらの結果は RT-qPCR の結果と類似していた。一方、Unit-I 配列を除去した *GmCHS8* プロモーターと GUS の融合遺伝子を導入した場合は 8-Br-cGMP による発現誘導が見られなかったが、SNP 処理により 3 倍に増加した。この結果は NO の応答性エレメントが Unit-I 以外の配列であることを示唆している。また、Unit-I 様配列だけを 35S 最小プロモーターに連結した場合でも 8-Br-cGMP または光照射により相対 GUS 活性が 3 倍に上昇したが、SNP によっては変動しなかった。また、Unit-I 様配列中の G-box または H-box に変異を導入すると cGMP や白色光による相対 GUS 活性の変動が見られなくなったことから、Unit-I 中の G-box と H-box の両者の組み合わせが cGMP による *GmCHS8* 発現の誘導に必要であることが明らかになった。一方、ダイズの転写因子 *GmMYB176* が *GmCHS8* の発現を調節していることが最近報告されたので *GmMYB176* と cGMP の関連を調べた。すなわち、まず、*35Sp::GmMYB176* 融合遺伝子をエフェクターとし、*GmCHS8p::GUS* をレポーターとして SB-P プロトプラストに共発現するとエフェクターのない場合に比べて GUS の発現は 2 倍に増加した。しかし、*GmCHS8* プロモーター中の MYB176 結合配列は cGMP に応答しなかった。また、*GmMYB176* の発現量は cGMP により減少した。以上の結果、*GmCHS8* プロモーター中の Unit-I 様配列が cGMP 応答性に関わるシス配列であること、cGMP による *GmCHS8* の発現誘導に *GmMYB176* は関与しないことが明らかになった。これらの研究成果の一部は、論文に発表した。

(3) 一方、T87 プロトプラストを用いる一過的遺伝子発現解析により、*AtNAS1* の翻訳開始コドンの上流 -94~-82 塩基の配列 (GCGAGGGTTAAAG) を NO 応答に必要なかつ十分な配列 (NO-responsive element, NORE) として同定した。NORE は転写因子 GT-1 の標的配列として知られている GT-1 box のコア配列 (GGTTAA) を含んでいたため、*AtGT-1* を大腸菌で発現・精製し、NORE への結合を EMSA で調べたところ、組換え *AtGT-1* は NORE に強く結合した。さらに、変異コンペティターを用いる競合実験により、結合には GGTTAA 配列が重要であることを示した。

(4) 一方、組換え *AtGT-1* を SNP 溶液中でインキュベートすることにより NORE への結合能が SNP の濃度依存的に低下したことから、*AtGT-1* の NORE への結合が S-ニトロシル化等の修飾によって調節される可能性が示唆された。また、シクロヘキシミド存在下での T87 細胞中の *AtNAS1* mRNA 量は NO 処理しても増加しなかった。*AtGT-1* の mRNA 量は NO 処理による影響を受けなかった。以上の結果、NO による *AtNAS1* の発現誘導に

AtGT-1 の関与が示唆されたが、NO によって誘導される *AtGT-1* 以外の新たなタンパク質の合成も必要であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Abu Zahra, H., Kuwamoto, S., Uno, T., Kanamaru, K., Yamagata, H.
A cis-element responsible for cGMP in the promoter of the soybean chalcone synthase gene.
Plant Physiol. Biochem., 査読有, 74 (1), 92-98 (2014)
doi=10.1016/j.plaphy.2013.10.034&domain=pdf

〔学会発表〕(計 3 件)

打田拓也、小原達矢、矢野俊介、土井萌子、宇野知秀、金丸研吾、山形裕土
一酸化窒素による *AtNAS1* 遺伝子の発現調節機構の解析
第 38 回日本分子生物学会年会(2015 年 12 月 1 日)(神戸国際会館、兵庫県神戸市)

打田拓也、小原達矢、矢野俊介、土井萌子、宇野知秀、金丸研吾、山形裕土
AtNAS1 プロモーター中の NO 応答性シスエレメントの解析
日本農芸化学会 2015 年度大会(2015 年 3 月 29 日)(岡山大学、岡山県岡山市)

打田拓也、小原達矢、矢野俊介、土井萌子、宇野知秀、金丸研吾、山形裕土
AtNAS1 プロモーター中の NO 応答性シスエレメントの解析
神戸大学研究基盤センター若手フロンティア研究会 2014(2014 年 12 月 25 日)(神戸大学、兵庫県神戸市)

〔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 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.agr.ryukoku.ac.jp/teacher/yamagata.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山形 裕士 (Yamagata, Hiroshi)
龍谷大学・農学部・教授
研究者番号：00159203

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

ハマド アブ ザフラ (Hamad Abu Zahra)

桑本 知 (Kuwamoto, Satoru)

打田 拓哉 (Uchida, Takuya)