

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650096

研究課題名(和文) UV-B受容体と超短パルスレーザーを用いた遺伝子発現誘導系の開発

研究課題名(英文) Development of an inducible gene expression system with a plant UV-B receptor and pulse laser

研究代表者

青山 卓史 (Aoyama, Takashi)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：80202498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年同定されたシロイヌナズナの紫外線受容体タンパク質UVR8と紫外線パルスレーザーを利用して、時空間分解能に優れた遺伝子発現誘導系の開発を試みた。UVR8は、植物体において通常生育条件下では安定なホモ二量体として細胞核に存在し、280～300nmを中心とする波長帯の紫外線照射により可逆的に単量体化され、特定のタンパク質と結合できるようになる。このような性質をもつUVR8とLexA、VP16の転写活性化ドメイン、SRDXモチーフ、COP1のWD40ドメイン等との融合タンパク質により紫外線誘導的転写系の構築を試みた。

研究成果の概要(英文)：The Arabidopsis UV-B receptor UVR8 and UV pulse laser are utilized for the purpose of developing an artificial induction system of gene expression with a high spatiotemporal resolution. UVR8 forms a homodimer in the nucleus under normal plant growth conditions, and reversibly dissociates to interact with other regulatory proteins in response to UV-B irradiation. Taking advantage of these characteristics of UVR8, construction of an UV-inducible transcription system was attempted by combining molecular functions of LexA, the transcription activation domain of VP16, the SRDX motif, and the WD40 domain of COP1.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：転写誘導系 紫外線 シロイヌナズナ UVレーザー UV-B受容体

1. 研究開始当初の背景

基礎生物学の実験手法の多くはその分野の研究から得られた知見に基づいており、また、それら実験手法は新たな知見の獲得へとつながる。遺伝子発現の人為的誘導系もそのような実験手法の例であり、これまでにステロイドホルモンや熱ショックなどを利用した誘導系が遺伝子機能の解明において威力を発揮してきた。しかし、それら誘導系では、時間的、空間的分解能に関して不十分な場合があり、例えば、任意の単一細胞における遺伝子転写誘導や、タンパク質機能発現の秒単位での制御は困難であった。一方、時間的、空間的な分解能を向上させるためには光刺激を用いることが有効であることから、これまでに植物の光受容体であるフィトクロムやクリプトクロムの光依存的なタンパク質間相互作用を利用した誘導系が提案されてきた。

シロイヌナズナの紫外線受容体 UVR8 の研究は、近年急速に進展し、その作用機序が明らかにされた。UVR8 は通常条件において安定なホモ二量体として細胞核に存在し、280~300nm を中心とした波長体の紫外線照射により可逆的に単量体化し、特定のタンパク質と結合できるようになる。また、クロモフォアとなる化合物を必要とせず、紫外線はホモ二量体間の2つのトリプトファンピラミッド構造において吸収される。この UVR8 を利用して単一細胞を標的とした誘導系を構築できれば、基礎生物学研究において大きな利用価値があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナ UVR8 がもつユニークな特徴を活かすことにより、紫外線照射による転写誘導系を開発するという着想を得た。また、紫外線は生体組織内部への透過性が低い、短パルスレーザーを用いた二光子励起によりこの弱点が克服できると考えた。

そこで、UVR8 と転写因子の DNA 結合ドメイン、転写活性化ドメイン、転写抑制ドメインなどを融合することにより、紫外線照射下でのみ転写活性化因子が形成されるような系をデザインし、植物個体内で有効に働く転写誘導系を開発を目指した。

3. 研究の方法

DNA 結合ドメインとして大腸菌の LexA を、転写活性化ドメインとしてヘルペスウィルスの VP16 の転写活性化ドメインを、転写抑制ドメインとしては植物で一般的に用いられている SRDX モチーフを使用した。また、単量体 UVR8 に対する結合ドメイン候補として COP1 の WD40 ドメインを使用した。それらと UVR8 を融合したタンパク質をコードする遺伝子は、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (35Spro) の制御下で発現するようにした。レポーター遺伝子

としては、LexA 結合配列の 8 回繰り返しの下流に 35S の TATA-box 領域を配置したプロモーター (LA8pro) にヒストン H2B と YFP または td-Tomato との融合タンパク質のコード配列をつないだものを使用した。

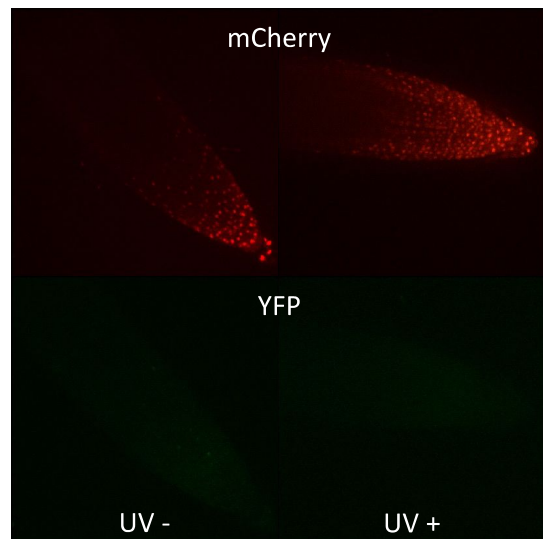
作成された様々な人工転写因子遺伝子およびレポーター遺伝子は別々に形質転換シロイヌナズナに導入され、その後掛け合わせにより同一植物体内に統合した。

4. 研究成果

人工転写因子遺伝子 35Spro-LexA-mCherry-UVR8、35Spro-VP16-WD40、35Spro-LexA-VP16-mCherry-UVR8、35Spro-UVR8-SRDx、およびレポーター遺伝子 LA8pro-H2B-YFP、LApro-H2B-tdTomato を別々に形質転換シロイヌナズナへと導入した。それら人工転写因子遺伝子およびレポーター遺伝子のホモ挿入株を樹立した後、それらの掛け合わせにより、35Spro-LexA-mCherry-UVR8、35Spro-VP16-WD40、LA8pro-H2B-YFP または LApro-H2B-tdTomato を併せもつ植物体、および 35Spro-LexA-VP16-mCherry-UVR8、35Spro-UVR8-SRDx、LA8pro-H2B-YFP または LApro-H2B-tdTomato を併せもつ植物体を作成した。

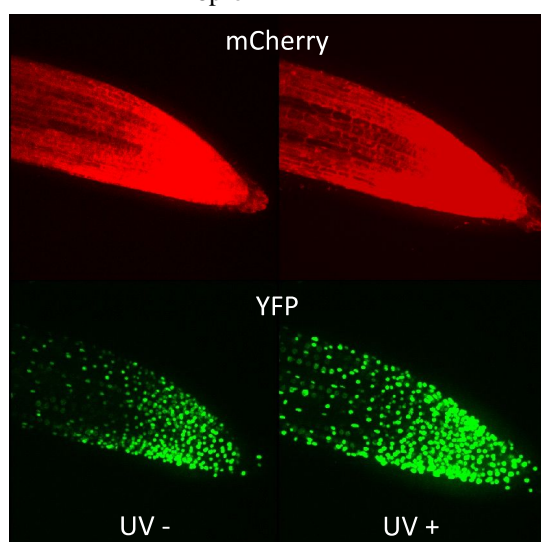
それらの植物体の発芽後 7 日の幼苗の根に対して 300nm の紫外線を照射し、6 時間後に根端部を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。その結果を以下に示す。

35Spro-LexA-mCherry-UVR8
35Spro-VP16-WD40
LA8pro-H2B-YFP



LexA-mCherry-UVR8 および VP16-WD40 を用いた系では LexA-mCherry-UVR8 の核局在は観察されたが、紫外線照射による YFP 蛍光の誘導は認められず、レポーター遺伝子の転写誘導が起こっていないものと考えられた。その原因の一つとして VP16-WD40 を安定して高発現する株が得られていないことがあげられる。

35Spro-LexA-VP16-mCherry-UVR8
35Spro-UVR8-SRDX
LA8pro-H2B-YFP



LexA-VP16-mCherry-UVR8 および UVR8-SRDX を用いた系では紫外線照射がない条件においても H2B-YFP の強い発現が観察された。紫外線照射により幾分かの YFP 蛍光の増加が見られたので、紫外線照射なしにおける UVR8-SRDX による抑制効果が働いた可能性がある。一方、LexA-VP16-mCherry-UVR8 は紫外線照射の有無にかかわらずその大部分が細胞質に局在した。これは LexA-mCherry-UVR8 が強い核局在性を示したことと対照的であり、VP16 ドメインの融合による何らかの影響が考えられる。

LApr0-H2B-tdTomato レポーター遺伝子を用いた実験においても以上と同様の結果が得られている。また、紫外線の強度、照射時間、照射後から観察までの時間などを変化させても結果は基本的に変わらなかった。

これまでのところ紫外線照射による有意な転写誘導は達成されていないが、(1) VP16-WD40 タンパク質は細胞毒性が高い可能性があり高発現が難しいこと、(2) LexA-VP16-mCherry-UVR8 の発現量を制限して UVR8-SRDX による抑制を確実にすることでバックグラウンドレベルを低下させられる可能性があることなど、今後の UVR8 を用いた転写誘導系開発のために有用な知見が得られた。

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 8 件)

Tanaka, N., Uno, H., Okuda, S., Gunji, S., Ferjani, A., Aoyama, T., and Maeshima, M. (2017) SRPP, a cell wall protein is involved in development and protection of seeds and root hairs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Cell.*

Physiol. 58: 760-769. doi: 10.1093/pcp/pcx008. (査読有り)

Tatsumi, K., Yano, M., Kaminade, K., Sugiyama, A., Sato, M., Toyooka, K., Aoyama, T., Sato, F., and Yazaki, K. (2016) Characterization of shikonin derivative secretion in *Lithospermum erythrorhizon* hairy roots as a model of lipid-soluble metabolite secretion from plants. *Front. Plant Sci.* 7: [01066-1]-[01066-11]. doi: 10.3389/fpls.2016.01066. (査読有り)

Wu, Z., Zhu, D., Lin, X., Miao, J., Gu, L., Deng, X., Yang, Q., Zhu, D., Cao, X., Tsuge, T., Dean, C., Aoyama, T., Gu, H., and Qu, L.-J. (2016) RNA binding proteins RZ-1B and RZ-1C play critical roles in regulating pre-mRNA splicing and gene expression during development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 28: 55-73. doi: 10.1105/tpc.15.00949. (査読有り)

Lin, Q., Ohashi, Y., Kato, M., Tsuge, T., Gu, H., Qu, L.-J., and Aoyama, T. (2015) GLABRA2 directly suppresses basic helix-loop-helix transcription factor genes with diverse functions in root hair development. *Plant Cell* 27: 2894-2906. doi: 10.1105/tpc.15.00607 (査読有り)

Wada, Y., Kusano, H., Tsuge, T., and Aoyama, T. (2015) Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase genes respond to phosphate deficiency for root hair elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 81: 426-437. doi: 10.1111/tbj.12741 (査読有り)

Hayashi, K., Nakamura, S., Fukunaga, S., Nishimura, T., Jenness, M.K., Murphy, A.S., Motose, H., Nozaki, H., Furutani, M., and Aoyama, T. (2014) Auxin transport sites are visualized in planta using fluorescent auxin analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111: 11557-11562. doi: 10.1073/pnas.1408960111. (査読有り)

Tanaka, N., Kato, M., Tomioka, R., Kurata, R., Fukao, Y., Aoyama, T., and Maeshima, M. (2014) Characteristics of a root hair-less line of *Arabidopsis thaliana* under physiological stresses. *J. Exp. Bot.* 65: 1497-1512. doi: 10.1093/jxb/eru014. (査読有り)

Zhu, D., Wu, Z., Cao, G., Li, J., Wei, J., Tsuge, T., Gu, H., Aoyama, T., and Qu, L.-J. (2014) TRANSLUCENT GREEN, an ERF family transcription factor, controls water balance in *Arabidopsis* by activating the expression of aquaporin genes. *Mol. Plant* 7: 601-615.

[学会発表] (計 29 件)

日本植物生理学会・2017 年度年会、2017 年 3 月 16-18 日、(鹿児島大学、鹿児島)
「 Biological function of type-B phosphatidylinositol phosphate 5-kinase genes of *Arabidopsis thaliana* 」 Takashi Aoyama, Mariko Kato, Yukika Wada, Machiko Watari, Tomohiko Tsuge, Blanc-Mathieu Romain, Hiroyuki Ogata, Hiroaki Kusano

日本植物生理学会・2017 年度年会、2017 年 3 月 16-18 日、(鹿児島大学、鹿児島)
「 Distinct localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate controls root hair morphogenesis in *Arabidopsis* 」 Tomoko Hirano, Mariko Kato, Seiji Takeda, Takashi Aoyama, Yalovsky Shaul, Masa H. Sato

日本植物生理学会・2017 年度年会、2017 年 3 月 16-18 日、(鹿児島大学、鹿児島)
「 細胞壁タンパク質 SRPP は種子形成と根毛伸長に重要な機能を果たしている 」、田中奈月、鶴野裕、奥田祥平、郡司玄、Ali Ferjani、青山卓史、前島正義

日本植物生理学会・2017 年度年会、2017 年 3 月 16-18 日、(鹿児島大学、鹿児島)
「 Functional analysis of CFI_m protein complex in *Arabidopsis thaliana* 」、Xiaojuan Zhang, Ryo Kuroda, Tsuyoshi Furumoto, Takashi Aoyama, Tomohiko Tsuge

日本植物生理学会・2017 年度年会、2017 年 3 月 16-18 日、(鹿児島大学、鹿児島)、
「 選択的スプライシングを介した *COP/DET/FUS* による光環境応答制御機構 」
黒田凌、張曉娟、松下智直、青山卓史、柘植知彦

日本植物生理学会・2017 年度年会、2017 年 3 月 16-18 日、(鹿児島大学、鹿児島)
「 シロイヌナズナ *PLDζ1* の T-DNA 挿入変異体の新規な表現型 」、島村亮太、安齋尚子、加藤真理子、青山卓史

日本植物生理学会・2017 年度年会、2017 年 3 月 16-18 日、(鹿児島大学、鹿児島)
「 配偶子形成と胚発生における *PIP5K2* と *PIP5K4* の機能解析 」 巨真智子、和田悠貴香、柘植知彦、加藤真理子、青山卓史

日本植物生理学会・2017 年度年会、2017 年 3 月 16-18 日、(鹿児島大学、鹿児島)
「 ムラサキの毛状根の表皮細胞におけるシコニン分泌機構の解析 」、巽奏、上撫健太、高梨功次郎、佐藤繭子、豊岡公徳、青山卓史、矢崎一史

Asia Research Node Symposium, February 20-21, 2017 (Penang, Malaysia), “Biochemical analysis of

shikonin transport machinery using hairy roots of *Lithospermum erythrorhizon*”, Kanae Tatsumi, Kenta Kaminade, Kojiro Takanashi, Takashi Aoyama, Mayoko Sato, Kiminori Toyooka, Kazufumi Yazaki

第 29 回植物脂質シンポジウム、2016 年 11 月 25-26 日、(大阪大学、豊中)
「 *PI(3,5)P₂* と *PI(4,5)P₂* の排他的領域形成モデル 」、平野朋子、青山卓史、Shaul Yalovsky、武田征士、佐藤雅彦

第 29 回植物脂質シンポジウム、2016 年 11 月 25-26 日、(大阪大学、豊中)
「 ムラサキの脂溶性色素シコニンの分泌機構の解明 」、矢崎一史、巽奏、上撫健太、中川友喜美、杉山暁史、高梨功次郎、豊岡公徳、佐藤繭子、青山卓史

第 29 回植物脂質シンポジウム、2016 年 11 月 25-26 日、(大阪大学、豊中)
「 シロイヌナズナの ζ クラス $\square\square\square$ の細胞内局在性 」、島村亮太、谷口(山本)幸美、加藤真理子、青山卓史

第 11 回トランスポーター研究会年会、2016 年 7 月 2-3 日 (京都大学、宇治)
「 薬用植物ムラサキを用いたシコニン分泌機構の解析 」、巽奏、岡咲洋三、斎藤和季、杉山暁史、青山卓史、矢崎一史

22nd International Conference on Plant Growth Substances, June 21-25, 2016 (Tronto, Canada), “Intracellular auxin gradient is essential for the tip growth of protonema cell in moss *Physcomitrella patens*”, Kousuke Fukui, Akihiro Oochi, Naoki Takeuchi, Hiroyasu Motose, Takashi Aoyama, Tomomichi Fujita, Ken-ichiro Hayashi

日本植物生理学会・2016 年度年会、2016 年 3 月 18-20 日、(岩手大学、盛岡)
「 植物細胞形態形成における *PIP5K* 遺伝子の機能重複性と制御の役割 」、巨真智子、Romain Blanc-Mathieu、加藤真理子、柘植知彦、緒方博之、青山卓史

日本植物生理学会・2016 年度年会、2016 年 3 月 18-20 日、(岩手大学、盛岡)
「 シロイヌナズナ *PLDDζ2* の細胞生物学的機能 」、島村亮太、谷口(山本)幸美、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史

日本植物生理学会・2016 年度年会、2016 年 3 月 18-20 日、(岩手大学、盛岡)
「 シロイヌナズナにおける *CPSF6* の機能解析 」、張曉娟、青山卓史、柘植知彦

Institute for Chemical Research International Symposium 2016, March 7-8, 2016 (Uji, Japan), “GLABRA2 targets basic helix-loop-helix transcription factor genes promoting root hair development”, Qing Lin, Yohei Ohashi, Mariko Kato, Tomohiko Tsuge, Hongya Gu, Li-Jia Qu, Takashi

Aoyama

Institute for Chemical Research International Symposium 2016, March 7-8, 2016 (Uji, Japan), “Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and dynamics of the Ca²⁺-binding protein PCaP2 during root hair elongation in *Arabidopsis*”, Mariko Kato, Tomohiko Tsuge, Takashi Aoyama

Institute for Chemical Research International Symposium 2016, March 7-8, 2016 (Uji, Japan), “Biochemical analysis of shikonin transport machinery across plant plasma membrane”, Kanae Tatsumi, Ryosuke Munakata, Kenta Kaminade, Takashi Aoyama, Mayoko Sato, Kiminori Toyooka, Shiro Futaki, Takeshi Yoshizumi, Kenji Numata, Kazufumi Yazaki

- 21 日本植物化学調節学会・第50回大会、2015年10月25日(静岡大学、静岡)、「オーキシン極性輸送はヒメツリガネゴケの原系体成長を制御する」竹内直樹、大地啓寛、本瀬宏康、青山卓史、野崎 浩、藤田知道、林謙一郎
- 22 日本植物生理学会・2015年度年会、2015年3月16-18日、(東京農業大学、東京)、「側方根冠におけるシロイヌナズナ *PLDD2* の役割」、島村亮太、谷口(山本)幸美、谷口雅俊、加藤真理子、柘植知彦、林謙一郎、青山卓史
- 23 日本植物生理学会・2015年度年会、2015年3月16-18日、(東京農業大学、東京)、「COP9 シグナルソーム結合因子 AtPr43 の機能解析」、後藤翔、野元美佳、多田安臣、青山卓史、柘植知彦
- 24 日本植物生理学会・2015年度年会、2015年3月16-18日、(東京農業大学、東京)、「シロイヌナズナ根毛における Ca²⁺結合タンパク質 PCaP2 とホスファチジルイノシトール 4,5 ニリン酸の細胞内動態」、加藤真理子、柘植知彦、前島正義、青山卓史
- 25 日本植物生理学会・2015年度年会、2015年3月16-18日、(東京農業大学、東京)、「PIP5K3 と他のタイプ B PIP5K 遺伝子との機能重複に関する解析」、齊藤涼、和田悠貴香、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史
- 26 日本植物生理学会・2015年度年会、2015年3月16-18日、(東京農業大学、東京)、「Functional analyses of CPSF6 in *Arabidopsis thaliana*」、Xiaojuan Zhang, Takashi Aoyama, Tomohiko Tsuge
- 27 第27回植物脂質シンポジウム、2014年11月28-29日、(静岡市産学交流センター、静岡)、「シロイヌナズナの根毛伸長における PIP5K 遺伝子の役割」、和田悠

貴香、草野博彰、巨真智子、齊藤涼、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史

- 28 第27回植物脂質シンポジウム、2014年11月28-29日、(静岡市産学交流センター、静岡)、「根毛伸長時におけるシロイヌナズナ Ca²⁺結合タンパク質 PCaP2 とホスファチジルイノシトール-4,5 ニリン酸の細胞内動態」、加藤真理子、柘植知彦、前島正義、青山卓史
- 29 第27回植物脂質シンポジウム、2014年11月28-29日、(静岡市産学交流センター、静岡)、「シロイヌナズナの側方根冠における PLDD2-PA シグナルの役割」、島村亮太、谷口(山本)幸美、谷口雅俊、加藤真理子、柘植知彦、青山卓史

〔図書〕(計 1件)

Kusano, H., Tominaga, R., Wada T., Kato, M., and Aoyama, T. (2014) Phosphoinositide signaling in root hair tip growth. in “*Plant Cell Wall Patterning and Cell Shape*”(ed., Fukuda, H.: Wiley-Blackwell) pp239-268.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~molbio/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

青山 卓史 (AOYAMA TAKASHI)
京都大学・化学研究所・教授
研究者番号：80202498

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし