

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840102

研究課題名(和文)シグナルを統合して植物細胞の伸長を総合的に制御するbHLH拮抗阻害システムの解明

研究課題名(英文)Analysis of the antagonistic bHLH system which regulate the plant cell elongation

研究代表者

池田 美穂(樋口美穂)(IKEDA, Miho)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：10717698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては研究代表者が発見した植物の細胞伸長制御システム、tri-antagonistic bHLH system研究の発展研究であり、内的な要因(植物ホルモンや発生プログラムなど)と生育環境(光、温度など)のシグナル下で細胞伸長に関連する因子を網羅的に解析するために、酵母two hybrid法を用いて、既知因子の相互作用因子を網羅的に単離し、個々の因子間の関連性と機能を解析した。本研究の成果として、既知の因子であるPIF4, ACE, PREを含む新規相互作用因子候補116因子を単離し、複数の因子について細胞伸長への関与や、各種シグナル下での発現変動が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Plants regulate cell elongation in response to various phytohormones and environmental conditions, and competitive HLH/bHLH systems, controls cell elongation under various signals. The competitive HLH/bHLH systems are composed of typical bHLH transcriptional activators and non-DNA-binding atypical HLH inhibitors; typical bHLH activators directly bind to the DNA and regulate gene expression, and atypical HLH interfere with the DNA binding of the bHLH activators by forming heterodimers. In this study, we tried to isolate novel transcription factors which related to regulation of plant cell elongation. By using the yeast two hybrid method, we isolated 116 candidate factors. The candidate factors included various novel factors in addition to known elongation regulators, PIF4, ACE and PREs.

研究分野：植物分子発生生理学

キーワード：細胞伸長 転写因子 拮抗阻害

1. 研究開始当初の背景

細胞伸長を適切に制御することは、植物の正常な発生や、光や温度などの外環境に適切に応答するために重要である。そのため、細胞伸長は内的要因と、環境に由来するさまざまな外的要因によって総合的に制御されている。内外的な要因はレセプターによって受容され、細胞内にシグナルとして伝達されるが、これに加えて、これらのシグナルの下流、あるいは、これと平行して、各種の植物ホルモン(ジベレリン、オーキシン、ブラシノステロイドなど)が細胞伸長を制御している。つまり、植物の細胞内では多くのシグナルが細胞伸長を制御しているのである。従来の研究では、個別のシグナルによってどのように細胞伸長が制御されているかが研究され、多くの成果が得られてきた。しかし、複数のシグナルがどのように統合されるのかについてはこれまで全く明らかにされてこなかった。

近年、細胞伸長を制御する因子として複数の DNA 非結合型 bHLH 因子(PRE1, AIFs, AtIBH1 など)が報告されてきた。我々は 2012 年に細胞伸長に関わる酵素遺伝子 EXP8 の発現を直接活性化する転写活性化因子 ACE1 を同定し、AtIBH1 が ACE1 と相互作用して転写活性化能を阻害していること、さらに、PRE1 が AtIBH1 と結合して AtIBH1 による阻害を邪魔することを発見、ACE, AtIBH1, PRE1 の 3 者が転写を拮抗的に阻害するシステム(tri-antagonistic bHLH system)を構築することを解明した。このシステムにおいては、ACE1, AtIBH1, PRE1 の存在量のバランスによって下流の酵素遺伝子の発現量が促進、あるいは抑制されている。さらに各々の因子の量を制御する要因として、ブラシノステロイド、ジベレリン、細胞の加齢が AtIBH1 と PRE1 の遺伝子発現を同定した。このことから、これら 3 種のシグナルはこの tri-antagonistic bHLH システムに統合され、細胞伸長を制御することが示唆された。

その後、我々と Bai らがそれぞれ AtIBH1 や ACE1 と機能重複する可能性のある因子を報告した。これらの因子の存在は tri-antagonistic bHLH システムが 3 つの因子の量比ではなく、3 つのグループの因子の量比で下流因子の発現を調節していることを暗示している。そこで、私は細胞伸長を制御する内外的要因や各種植物ホルモンなどの個別のシグナルが、tri-antagonistic bHLH システムを構成する特定の因子の量を制御し、その結果、3 つのグループのタンパク質の総量比が変わって、下流の酵素遺伝子の発現が総合的に調節されるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究は、植物の細胞伸長を制御する新規転写因子の単離とその機能解析を通して、植

物の細胞伸長制御メカニズムを解明する事を目的としている。

3. 研究の方法

過去の我々の研究から、植物の細胞伸長を制御する複数の植物ホルモン(ジベレリン、ブラシノステロイド)のシグナルなどを統合するハブ的なシステム、tri-antagonistic bHLH system の存在が知られている。この tri-antagonistic bHLH system は 3 グループの bHLH 因子によって構成されており、お互いに相互作用することによって、細胞伸長レベルを制御している。

この背景を踏まえ、本研究においては、下記の 4 点について研究を行った。

(1) tri-antagonistic bHLH system 構成因子の相互作用因子の網羅的探索

シロイヌナズナの転写因子のみからなるライブラリーを用い、既知の tri-antagonistic bHLH system 構成因子 13 因子を bait にした酵母ツーハイブリッド法により、既知の因子に相互作用する転写因子を網羅的にスクリーニングする。

(2) tri-antagonistic bHLH system 構成因子の網羅的相互作用性の解析

酵母ツーハイブリッド法で単離した候補因子の間で、総当たりに相互作用解析を行い、これらの因子の相互作用ネットワークを明らかにするとともに、各因子をグループ化し、メカニズムの全容を推察する。

(3) tri-antagonistic bHLH system 構成因子の相互作用因子の遺伝子発現解析

各種公開アレイデータなどを用いて、既知の細胞伸長関連要因(光、温度、植物ホルモン処理など)の条件を変化させた際の、候補因子の発現パターンを解析する。

(4) 候補因子の機能解析

キメラリプレッサー体、過剰発現体、変異体の形態観察や、遺伝子発現解析などを通して、各因子の機能や上下関係などを解析する。

4. 研究成果

(1) tri-antagonistic bHLH system 構成因子の相互作用因子の網羅的探索

まず、IBH1SRDX 体、および、IBH1 過剰発現体におけるマイクロアレイ解析の結果から、IBH1 遺伝子を過剰に発現した際に IBH1 グループの遺伝子の発現が低下する傾向を見だし、新たな IBH1 グループ候補因子を複数同定、ACE グループ・PRE グループとの

結合性をイーストツーハイブリッド法で確認した。これらにより、現在までに、ACE グループ因子 5 種類、IBH1 グループ因子 9 種類、PRE グループ因子 6 種類を単離・同定している。これらの因子のうち、13 因子を bait にして、シロイヌナズナの全転写因子 1700 個からなるライブラリーを対象とした酵母ツーハイブリッドスクリーニング(Y2H)を行なった。1st スクリーニング、2nd スクリーニングの結果、既知の tri-antagonistic bHLH system 因子に結合する候補因子 116 個を単離した。これらの中には細胞伸長制御に関連する植物ホルモンであるブラシノステロイドやジベレリン、オーキシンのシグナル伝達や生成に関連するものが含まれていた。この結果は tri-antagonistic bHLH システムが各植物ホルモンの上下で細胞伸長を制御することを示している。また、青色光受容体 CRY の結合因子や、光受容体結合因子 PIF と相互作用する因子など、細胞伸長と関連性のある光関連の因子も複数含まれていた。この結果は tri-antagonistic bHLH システムと光による細胞伸長制御が関連していることを暗示している。一方で、候補因子の中には未だ報告の無い未知の因子も多数含まれていた。新しいグループの non-DNA binding bHLH や、MADS family, NAC family など既知の bHLH システムの枠に収まらない因子や、転写リプレッサーなどが多数含まれており、システムの全体像が従来の理解よりも複雑である可能性が示された。

(2) tri-antagonistic bHLH system 構成因子の網羅的相互作用性の解析

酵母ツーハイブリッドスクリーニング(Y2H)から単離した 116 の候補因子のうち、bHLH family 因子を中心とした 70 超個の転写因子について個別に総当たりの相互作用解析を行った。その結果、40 種近い多数の因子と相互作用する non-DNA binding bHLH の存在も明らかになり、3 グループの因子から構成されていた既知の tri-antagonistic bHLH システムの枠に収まらない新奇グループの存在が強く示唆されている。当初の予定よりも多くの相互作用因子が単離されたために、全ての因子の総当たり Y2H 解析を終了するに至らなかったが、一方で、non-DNA binding bHLH を中心としたタンパク質-タンパク質相互作用による転写因子の機能制御という巨大な未知のメカニズムの存在を明らかにすることができたことは大きな成果と言える。現在、これらの Y2H 相互作用解析結果、表現型観察結果、遺伝子構造などの知見を総合し、インフォマティクスの手法を用いて、立体的な相互作用メカニズムモデルを構築し、細胞伸長を制御するメカニズムの全容解明につなげる準備を行っている。

(3) tri-antagonistic bHLH system 構成因子

の相互作用因子の遺伝子発現解析

酵母ツーハイブリッドスクリーニング(Y2H)から単離した 116 の候補因子について、公開アレイデータなどを用いた遺伝子発現解析を行った結果、光誘導性、遠赤色光誘導性、ホルモン誘導性などを示す因子が含まれていることがわかった。また、各種植物ホルモンによって発現変動する因子や、鞘、花器官、根毛などの組織特異的発現パターンを示す因子も含まれていた。これらの結果は、tri-antagonistic bHLH システムが多様な植物ホルモンや光などのシグナル伝達下で、細胞伸長を制御する可能性や、個別の植物組織・器官の伸長制御にも関与する可能性が示唆され、tri-antagonistic bHLH 関与する植物現象について、より深い理解と、多様な可能性が得られたといえる。

(4) 候補因子の機能解析

酵母ツーハイブリッドスクリーニングから単離した候補因子のうち、特に新規の転写因子について、キメラリプレッサー発現体の形態観察を行い、矮性や短い鞘といった細胞の伸長阻害に由来する形質、あるいは、葉や茎の伸長など細胞の伸長促進に由来する形質を多数のラインで確認した。

特に、遠赤色光と 28°C で発現誘導される bHLH 転写活性化因子、ACE4 (Activator for Cell Elongation 4) については詳細な解析を行った。ACE4 のキメラリプレッサー発現体は実生の胚軸長が遠赤色光照射下と 28°C 条件下において野生型よりも短くなることから、ACE4 は遠赤色光下や高温条件下での胚軸伸長を促進する因子と思われた。そこで、我々は遠赤色光と高温条件下での細胞伸長に關与する既知の因子 PIF4 と ACE4 の関係に着目して解析を進めた。まず、PIF4 過剰発現体、および、変異体における ACE4 の発現解析を行ったところ、PIF4 過剰発現体においては ACE4 の発現が促進され、*pif4* 変異体などでは逆に発現が低下することがわかった。また、トランジェントアッセイから、PIF4 が ACE4 プロモーターを活性化すること、その活性化が HFR1 と PAR1 によって阻害されることが示された。さらに、ゲルシフトアッセイの結果、PIF4 が ACE4 プロモーターに特異的に結合すること、PAR1 によってその結合が阻害されることが明らかとなった。これらの結果から、ACE4 は PIF4, PAR1, HFR1 の制御下で発現制御される因子と思われる。さらに興味深いことに、PAR1 は ACE4 とも結合し、ACE4 の DNA 結合も阻害した。この結果から、遠赤色光と高温条件下での細胞伸長は 2 段階の antagonistic bHLH system によって制御されていることがわかった。

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)

(1) 池田美穂、高木優、TCPs, WUSs, and WINDs: families of transcription factors that regulate shoot meristem formation, stem cell maintenance, and somatic cell differentiation. 査読有 Front. Plant Sci.2014, 427. DOI: 10.3389/fpls.2014.00427.eCollection 2014.

〔学会発表〕(計 16 件)

(1) 高橋未来哉, 池田美穂, 高木優、細胞パターンニングに關与する転写因子 HR0109 の機能解析、第 58 回 日本植物生理学会、20170316、鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)

(2) 池田美穂、光田展隆、高木優、光と高温のシグナル下で細胞伸長を制御する bHLH 転写因子 ACE4、第 58 回 日本植物生理学会、20170317、鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)

(3) 藤井美翔、池田美穂、高木優、塩ストレス誘導性形態変化の分子メカニズム解析、第 58 回 日本植物生理学会、20170318、鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)

(4) 田口玲花、池田美穂、山上あゆみ、光田展隆、中野雄司、高木優、ブラシノステロイドのシグナルリングに關与する新規転写因子の同定、第 58 回 日本植物生理学会、20170318、鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)

(5) 高橋未来哉, 池田美穂, 高木優、形態形成を制御する転写因子 HR0109 の機能的解析、第 57 回 日本植物生理学会、20160318、岩手大学 (岩手県盛岡市)

(6) 池田美穂、光田展隆、高木優、シロイヌナズナ CRES-T は他の植物でも汎用的に効くか、第 33 回日本植物細胞分子生物学会大会、20150810、東京大学 (東京都文京区)

(7) 高橋未来哉, 池田美穂, 高木優、植物を矮性化させる GARP ファミリー転写因子の解析、第 56 回 日本植物生理学会、20150317、東京農業大学 (東京都世田谷区)

(8) 池田美穂、植物転写制御因子の分子機能および生物学的機能の解明、第 32 回日本植物細胞分子生物学会大会、奨励賞受賞講演、20140821、アイーナ (いわて県民情報交流センター) (岩手県盛岡市)

(9) 池田美穂、光田展隆、高木優、PIF の下流で細胞伸長を促進する bHLH 転写活性化因子の解析、第 32 回日本植物細胞分子生物学

会大会、20140821、アイーナ (いわて県民情報交流センター) (岩手県盛岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 美穂 (IKEDA, Miho)
埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 10717698

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

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: 80450667

高木 優 (TAKAGI, Masaru)

埼玉大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 4035738

(4) 研究協力者

石塚 徹 (ISHIZUKA, Tohru)
埼玉大学・大学院理工学研究科・研究支援
者