

研 究 報 告 書

「転写抑制因子を活用したリグノセルロース低含有植物の作出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研 究 者: 山口 雅利

1. 研究のねらい

植物細胞壁はセルロースやヘミセルロースなどの多糖やリグニンなど、いわゆるリグノセルロースと呼ばれる超高分子により構成されており、持続的で再生可能なバイオマスとして期待されている。中でも、道管要素や繊維細胞などの木部を構成する木質細胞は肥厚した二次細胞壁を形成しており、リグノセルロースバイオマスの主要な資源となっている。二次細胞壁形成には、非常に多くの遺伝子が関与しており、リグノセルロースバイオマスの量的な改変を行うためには、二次細胞壁各構成因子の生合成遺伝子全体を統合するマスター因子を標的とすることが有効であると考えられる。私はこれまでに、道管分化マスター因子として機能する転写活性化因子 VND ファミリーを同定した。また、VND ファミリーと結合する因子として 3 つの NAC ドメイン転写因子 VNI1、VNI2、ANAC103 を同定した(Yamaguchi et al. 2010, Plant Cell; 文献1)。中でも、VNI2 は VND7 ファミリーの機能を抑えることを明らかにした。また、他のグループにより、VND ファミリーと隣のクレードに属する NST ファミリーが繊維細胞のマスター因子として機能することが報告されている。リグノセルロースバイオマスの利活用を考えると、二次細胞壁の量を向上させることについてはバイオマスの増産につながる一方で、飼料や樹木のリグノセルロース量を抑えることで、それぞれ家畜の消化率やパルプ作出のための糖化率を高めることが知られている。そこで本研究では、転写抑制因子を活用することで、成長性を損なうことなく二次細胞壁量を抑えた植物の創出を目的とする。

また、NAC ドメイン転写因子は木質細胞分化だけでなく、メリステムの維持、ストレス応答、免疫応答など、植物の成長に重要な制御機構に重要な役割は果たしている。申請者は VNI2 と相互作用する因子を探索したところ、VND 以外の NAC ドメイン転写因子を単離した。そこで、NAC-NAC 複合体の生物学的役割について明らかにする。さらに、VNI2 相互作用因子としてユビキチン E3 ライゲースを単離した。これらの相互作用因子の作用機構を詳細に解析し、新しいバイオマス改変技術の可能性を追求する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、まずリグノセルロース含有量が低下した双子葉、および単子葉植物の作出に向けて、二次細胞壁形成を負に制御する転写抑制因子に着目し、双子葉植物のモデルとしてシロイヌナズナを、単子葉植物としてイネを材料に解析を行った。また、イネのリグノセルロースバイオマスが低下したカマイラズ変異体の原因遺伝子の探索を行ったところ、原因遺伝子が未だ同定されていない変異体について、マッピングで絞り込んだ領域に存在する機能未

知遺伝子に塩基置換が生じていることを見出した。

これまでに NAC ドメイン転写因子 VNI2 は積極的なタンパク質分解制御を受けていることを見出しており、また VNI2 との相互作用因子としてユビキチン E3 ライゲースとして機能する BPM3 を単離していた。本研究では、BPM3 はタンパク質分解の標的配列として知られる、PEST モチーフを含む VNI2 の C 末端 40 アミノ酸の領域を介して結合することを明らかとした。また、BPM を介したユビキチン E3 ライゲース活性を低下させた変異体を観察したところ、子葉において道管の途切れが観察された。このことは、VNI2 タンパク質の制御は正常な道管分化制御に重要であることを示している。さらに、VNI2 はその発現パターンより、道管形成以外の制御にも関与していることが示唆されている。VNI2 と相互作用する因子の探索を新たに行ったところ、30 もの NAC ドメイン転写因子が単離された。

(2) 詳細

研究テーマ「相互作用因子による VNI2 の機能、および制御機構の解明」

前述の通り、VNI2 は積極的なタンパク質分解制御を受けていることが知られていた。また、VNI2 と相互作用する因子を探索したところ、BPM3 が単離された。この BPM 遺伝子はシロイヌナズナに6つ存在し、CUL3、RBX1 と複合体を形成することで、ユビキチン E3 ライゲースとして機能することが知られている。そこで、BPM-CUL3-RBX1 複合体が VNI2 タンパク質の安定性を制御しているか検証を行った。その結果、酵母 Two-hybrid 法により、BPM3 は VNI2 の PEST モチーフを含む C 末端領域に結合することが明らかとなった。また、CUL3 はシロイヌナズナゲノム中に *CUL3a* と *CUL3b* の 2 つの遺伝子が存在する。そこで、ユビキチン E3 ライゲース活性が低下した植物体として *cul3ab* 二重変異体を作出した。野生型、および *cul3ab* 変異体に、VNI2 プロモーター制御下で VNI2-GUS 融合タンパク質を発現させる形質転換体を作出した。その結果、野生型と比較して *cul3ab* 変異体背景の形質転換体の根の伸長領域において、多くの GUS による染色された核が観察された。このことから、BPM3 は VNI2 タンパク質安定性を促進する働きを持つことが示唆された。さらに、*cul3ab* 変異体を観察したところ、子葉において道管形成の阻害が観察された(図1)。BPM3 は VNI2 以外の転写因子とも相互作用することが報告されており、*vni2* 変異体と掛け合わせた三重変異体を作出し、表現型を比較したところ、子葉における道管の途切れの頻度は低下した。これらの結果は、VNI2 タンパク質の制御は正常な道管形成に重要であることが示している。

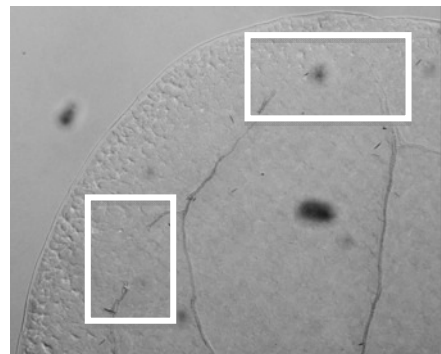


図1 *cul3ab* 二重変異体の子葉。白枠の領域で道管が途切れている。

また、VNI2 との相互作用因子として、VND ファミリー以外の NAC ドメイン転写因子が単離されていた。そこで、産業技術総合研究所の光田博士らが開発した 1,500 以上の転写因子 cDNA を含んだ酵母 Two-hybrid 解析用ライブラリーを用いて更なる VNI2 相互作用因子を探索したところ、30もの NAC ドメイン転写因子が単離された。得られた、転写因子の中には、ストレス応答に関与することが知られているものが複数存在していた。現在、VNI2 の新たな

VNI2 タンパク質制御の生物学的役割を理解するためにこれらの相互作用機構についても解析を行っている。

3. 今後の展開

VNI2 と相互作用する因子の解析より、VNI2 のタンパク質制御の分子機構が明らかになりつつある。成果をまとめるためには、BPM3 が実際に VNI2 タンパク質安定性を制御しているか変異体等を用いて評価を行う必要がある。さらに、VNI2 と相互作用する NAC ドメイン転写因子については、この作用機構を解明することで、VNI2 の生物学的役割を明らかにしたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況

当初本研究を行うにあたって前提として考えていた、転写抑制因子 VNI2 を繊維細胞で働かせることで、二次細胞壁形成を抑制することについては、大筋で実証できたと考えられる。今後の展開でも示したように、樹木への展開や、新たなリグノセルロースバイオマスの量的・もしくは質的形質を改変する多型の取得などに展開するうえで重要な成果であると考えている。その一方で、成果としてまとめるためのデータの取得には、当初の見立てよりも時間を要しているのも事実である。

・研究の進め方

イメージングプレートやリニアスライサー、サーマルサイクラーなど本研究を進めるうえで必要な設備を購入することができた。研究者自身が現職に赴任する前と研究に向き合える時間や環境が大きく変わってしまったものの、技術補佐員を雇用することで、効率的に研究を進めることができたと考えている。また国内外の学会等に出席することで、最新の知見や人的ネットワークを構築できた。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究で行ったリグノセロースバイオマス改変技術の知見を通じて、実際に用いる植物や樹木に展開できる道筋はつけられたと考えている。さらに、花茎の自立を指標としたシロイヌナズナサプレッサー変異体のスクリーニングを行うことで、新たなリグノセルロースバイオマスの改変に寄与する遺伝子が多数得られると期待している。近年、ポプラなどの有用植物種を用いたゲノムワイド関連解析が世界中で行われている。このようなゲノム情報基盤と本研究の知見を利用することで、リグノセルロースバイオマス利活用に応用可能な多型を持つ個体を容易に見つけ出すことが可能となることが期待される。

また、VNI2 タンパク質制御機構、や VNI2 と相互作用する様々な NAC ドメイン転写因子の制御とその役割、イネ *bc4* 変異体の同定とその機能解析等、本研究を通じて学術的な成果をまとめられると期待される。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

樹木資源、特にセルロースの効率的な利用を図るため、樹木のリグノセルロース含量を低減させる基盤技術を転写因子の活用によって開発しようと研究が進められた。その結果、発見した転写抑制因子によって、モデル植物において、二次細胞壁量の低下が図れるとともに、糖化率の上昇が図れることを明らかにできた。また、この転写因子の機能解析についても一定の成果が得られている。しかし、作物や樹木のレベルでの、低リグノセルロース植物の生育への影響などの解析が遅れ、こうした植物体が栽培可能であり、有用であることを示すことはできなかった。また、当初予定した内容に関し、未解決の問題も残されている。

今後は、本研究課題で得られた成果を基盤に、樹木ばかりでなく草本系のバイオマスなども視野に入れ、研究を発展させて欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Yamaguchi M, Nagahage ISP, Ohtani M, Ishikawa T, Uchimiya H, Kawai-Yamada M, Demura T “Arabidopsis NAC domain protein VND-INTERACTING1 and ANAC103 interacts with multiple NAC domain proteins” Plant Biotechnol. 2015, in press
2. Endo H, Yamaguchi M, Tamura T, Nakano Y, Nishikubo N, Yoneda A, Kato K, Kubo M, Kajita S, Katayama Y, Ohtani M, Demura T “Multiple classes of transcription factors regulate the expression of VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7, a master switch of xylem vessel differentiation” Plant Cell Physiol. 2014, in press
3. Xu B, Ohtani M, Yamaguchi M, Toyooka K, Wakazaki M, Sato M, Kubo M, Nakano Y, Sano R, Hiwatashi Y, Murata T, Kurata T, Yoneda A, Kato K, Hasebe M, Demura T “Contribution of NAC transcription factors to plant adaptation to land” Science 2014, 343, 1505-1508

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・Masatoshi Yamaguchi, Ami Sato, Mami Yoshimura, Tetsuya Kurata, Maki Kawai-Yamada, Shinji Kawasaki, Yoichi Tsumuraya, Toshihisa Kotake “Brittle culm4 mutant decreases in secondary cell wall formation in rice” The 5th International Conference on Plant Cell Wall Biology 2014 July (Palm Cove, Australia)

・Masatoshi Yamaguchi “Transcriptional regulation in secondary wall formation” UK-Japan joint meeting on Plant Cell Biology 2013 July (Cambridge UK)

・山口雅利、松田浩平、加藤晃、出村拓「VNI2 と相互作用する RING フィンガータンパク質」第 54 回植物生理学会2013年3月(岡山)

・ Masatoshi Yamaguchi, Kohei Matsuda, Ko Kato, Taku Demura “Isolation and

characterization of interacting factors with VND-INTERACTING PROTEIN2” International
Conference on Arabidopsis Research 2012 July (Wien, Austria)

・日本植物細胞分生物学会奨励賞 2014年