

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04445

研究課題名(和文) オミクス統合シミュレーションを基軸にしたダイズ出芽期に耐湿性を付与する技術の開発

研究課題名(英文) Development of flooding-tolerant soybean using omics-integration simulation based technology

研究代表者

小松 節子 (KOMATSU, Setsuko)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：90355751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズは出芽期の梅雨による湿害に起因する収量低下が問題となっており、生産拡大が進んでいない。そこで、出芽期の冠水抵抗性および除水後の回復過程をオミクス技術で解析し、シミュレーション法で絞り込んだ遺伝子について分子生物学的に検証する。冠水抵抗性突然変異ダイズやアブシジン酸を添加して冠水抵抗性を付加したダイズを用いて、プロテオミクス、トランスクリプトミクス、メタボロミクス解析を行った。その結果、解糖系とクエン酸回路周辺の代謝系の調節による、エネルギー供給制御の重要性を示唆した。さらに、ヘキソキナーゼの抑制によるフルクトースの蓄積が冠水耐性に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Soybean is sensitive to flooding stress, which markedly reduces its growth. To identify the mechanism of flooding tolerance at initial stage in early-stage soybean, omics techniques and simulation analysis were used. Flooding tolerant mutant line and abscisic acid (ABA)-treated soybean, which exhibited flooding tolerant phenotype, were used as materials. Soybean roots were collected for proteomic as well as metabolomic and transcriptomic analyses. Commonly changed metabolites, proteins, and genes between mutant and ABA-treated soybeans were considered as flooding-tolerance related candidate factors. Finally, omics results were integrated to analyze the flooding tolerant mechanism in soybean at initial stage. Integrated omics suggests that fructose might be the critical metabolite through regulation of hexokinase/phosphofructokinase and the regulation of energy metabolism might be crucial step to confer initial-flooding tolerance in early-stage soybean.

研究分野：分子生物学

キーワード：オミクス シミュレーション ダイズ 湿害

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本においてダイズの播種は梅雨期に重なっているため、生育初期の湿害が問題であり、出芽不良による欠株、雑草との生育競合、および土壌病原菌の感染につながり、最終的に収穫量の低下を招く。この生育初期の湿害を3期に分けると、「発芽前」の湿害に関しては栽培学的に種子含水率の調節等により実用的に回避でき、「生育1週間」以降の湿害に関しては遺伝学的に活発に研究されている。しかし「出芽期」の湿害に関しては表現型の解析や一部の遺伝子の解析にとどまり、分子生物学的・生化学的な解析による湿害の発生機構は未解明であった。一方でダイズのゲノム塩基配列情報が公開され、湿害研究をゲノムサイエンス規模で加速させる材料が整った。

(2) ダイズ出芽期の湿害には多数の因子が相互作用しており、ダイズに耐湿性を付与するには複数の関連因子を改変する必要がある、膨大な労力を要する。したがって、冠水抵抗性および回復応答機構を支配している転写調節因子を解析し、これを改変することにより多数の関連因子を一斉に制御するアプローチで、耐湿性研究を加速化することが可能となる。転写調節因子の解析は、電気泳動を介さないプロテオミクス技術であるゲルフリープロテオミクス解析技術が微量タンパク質を同定できる手法として期待される。得られた膨大なデータ群を情報科学的に処理することは有用である。

2. 研究の目的

(1) ダイズ出芽期の耐湿性のメカニズムを解析し、耐湿性を制御する遺伝子を同定する。そのために、冠水抵抗性を示すダイズ素材を用いて、冠水抵抗時および回復時に変動するタンパク質群および遺伝子群を包括的に同定する。

(2) 検出されたタンパク質群と遺伝子群については、オミクス統合シミュレーション法により抽出された鍵となる耐湿性遺伝子群を絞り込み、その有用性を検証する。

(3) バイオインフォマティクス的にドライな実験において候補遺伝子を絞り込み、分子生物学的なウェットな実験で検証する。本研究は科学的基盤研究を目指すのみならず、過湿土壌条件下でも栽培可能なダイズの素材を提供し、水田転換畑でのダイズの安定多収栽培を可能とすることに貢献する。

3. 研究の方法

(1) ダイズ出芽期の耐湿性を制御する遺伝子の同定と耐湿性を付与する技術の開発

ダイズ冠水抵抗時および回復時におけるオミクス解析：冠水下および冠水除去時の核内における転写制御機構、および細胞質にお

ける代謝調節機構を解明する。冠水処理後、核タンパク質を精製しあるいは可溶性タンパク質を抽出しゲルフリープロテオミクス解析を行うことにより、核内における転写制御機構、および細胞質における代謝調節機構を包括的に解明する。得られた実験データについて、クラスター解析およびタンパク質間相互作用解析等により、耐湿性候補遺伝子を絞り込む。ダイズ出芽期の冠水抵抗性および回復時に変動するタンパク質群・遺伝子群のうち、鍵となる酵素等に対しては活性を経時的に解析する。さらに、リン酸化プロテオミクス解析を行い、翻訳後修飾による調節機構を明らかにする。

ダイズ出芽期の耐湿性を制御する機構の同定：冠水時にアブシジン酸処理を行うことにより生存率の向上を図ることができるので、冠水処理時にアブシジン酸添加あるいは無添加時および水除去後の回復時に試料を経時的に採取する。さらに冠水抵抗性線照射突然変異ダイズは冠水下に生育を抑制し水除去時に生存率を向上することができるので、戻し交雑した突然変異体と野生型を用いて、冠水時および水除去後の回復時に試料を経時的に採取する。タンパク質を抽出しゲルフリープロテオミクス法を行うと同時に、RNAを抽出しRNAシーケンス法にて変動する遺伝子群を包括的に解析し、タンパク質レベルでの変動と比較検討する。さらに、代謝産物を包括的に解析し、ダイズの耐湿性機構のシミュレーションに供する。

(2) ダイズ出芽期のオミクスネットワーク解析と耐湿性遺伝子群の抽出技術の開発

ダイズ湿害オミクス統合シミュレイトの開発および利用：ダイズ出芽期の冠水時および冠水解除時におけるタンパク質、遺伝子、代謝産物の変動について、情報解析する。冠水時のダイズ解糖系およびクエン酸回路周辺の代謝系について、ダイズ湿害オミクス統合シミュレイト装置を用いて、冠水時および冠水解除時におけるシミュレーション解析を実施し、耐湿性遺伝子群の候補を抽出する。

ダイズ冠水抵抗時と回復時のバイオインフォマティクス解析：遺伝子相互作用推定ソフトウェア Minos を用いて、タンパク質間ネットワークの解析を実施し、ダイズ湿害および湿害からの回復機構の解明に必要なデータを収集する。代謝系シミュレイトとタンパク質間ネットワーク解析結果を統合したオミクス統合シミュレイトを構築し、耐湿性候補遺伝子群を与えたシミュレーションを行う。

4. 研究成果

(1) 冠水ストレス早期のダイズの情報伝達機構を明らかにするために、リン酸化プロテオミクス解析を行った。結果として、顕著にリン酸化されるタンパク質22個に対してタンパク質間相互作用解析を行い、eukaryotic

translational initiation factor 4G が冠水ストレスにより、ネットワークの中心で作用することが明らかになった (図1)。このタンパク質はエチレン情報伝達に参与しているため、冠水下でエチレン濃度を上昇させた場合の影響を解析した。その結果、対照と比較して、ダイズの生長の亢進が認められた。

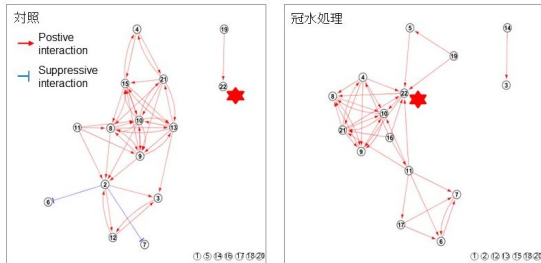


図1 冠水下のダイズの22個のリン酸化タンパク質群の相互作用解析: 赤矢印は活性化、青T字線は抑制に作用することを示す。図中の番号はタンパク質IDを示す。赤の星印(22番タンパク質)は eukaryotic translational initiation factor 4G を指す。

(2) 冠水下で変動するダイズタンパク質群の上流で制御するタンパク質群を明らかにする目的で核プロテオミクス解析を行った。結果として、プレ mRNA プロセッシングおよびプレリボソーム構築が抑制され翻訳が阻害され (図2)、ヒストンH3を中心とするクロマチン構造が変化することが証明された。

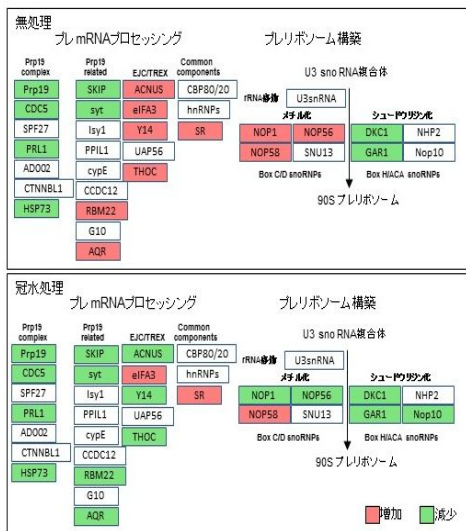


図2 冠水下のダイズの核タンパク質群のプロテオミクス解析: 核内で変動するタンパク質群について、KEGGパスウェイデータベースを用いて解析した。図はプレ mRNA プロセッシングおよびプレリボソーム構築に関するタンパク質のマップを示す。播種後48時間と比較して、無処理あるいは冠水処理で、赤は増加するタンパク質、緑は減少するタンパク質を示す。

(3) ダイズの冠水耐性機構を解明するために、冠水耐性を示すアブシジン酸処理および冠水抵抗性線照射突然変異体を用いて、オミクス解析を行った。まず、タンパク質を抽出しゲルフリー・ラベルフリープロテオミクス解析にて変動するタンパク質群を包括的に解析した。結果として、タンパク質合成お

よび RNA 発現調節に関するタンパク質群が耐湿性ダイズ素材の間で、共通に顕著に変動していた。これらタンパク質遺伝子群に対して遺伝子発現レベルでの変動を解析し、タンパク質レベルと同様に増加することを明らかにした (図3)。

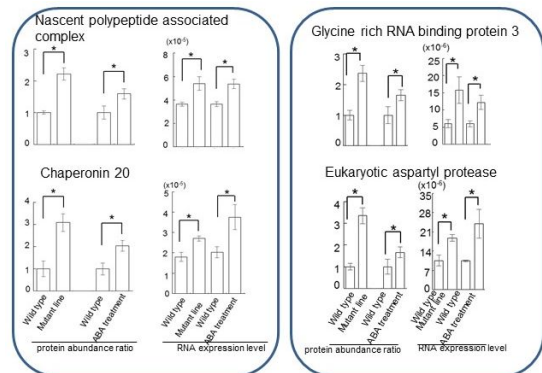


図3 耐湿性ダイズ素材において変動するタンパク質遺伝子の発現解析: 冠水耐性を示すアブシジン酸処理および冠水抵抗性線照射突然変異体を冠水処理し根を採取した。各遺伝子の発現量を定量PCRにより解析した。星印は Student's t test により顕著であることを示す。

(4) さらに、RNA を抽出し RNA シーケンス法にて変動する遺伝子群を包括的に解析した。結果として、耐湿性ダイズ素材の間で共通に変動した遺伝子群は31個であった。そこで、全ての遺伝子に対して、器官特異的、時期特異的、ストレス特異的に試料を採取し、定量PCRにより解析した。cytochrome P450 77A1 は、冠水ストレス特異的にストレス早期に根端部分で発現することが明らかになった (図4)。その阻害剤であるウニコナゾールを用いた結果、冠水ストレスで増加する cytochrome P450 77A1 の発現は抑制され、冠水による生存率の低下は回復した。

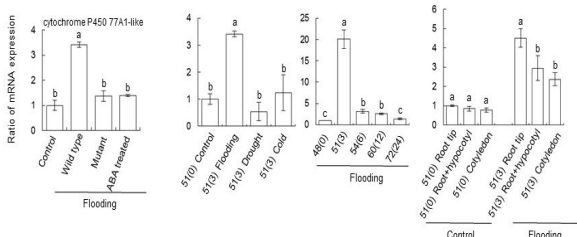


図4 cytochrome P450 77A1 の遺伝子発現解析: 冠水耐性を示すアブシジン酸処理および冠水抵抗性線照射突然変異体を冠水処理した (左)。播種48時間後のダイズを冠水、乾燥、低温処理した (左から2番目)。ダイズ試料を採取し、cytochrome P450 77A1 の発現量を定量PCRにより解析した。異なるアルファベットは ANOVA 解析により顕著であることを示す。

(5) さらに、代謝物を抽出し質量分析計を用いて代謝産物を包括的に解析した。耐湿性ダイズ素材の間で共通に変動した207代謝物に対して、KEGGパスウェイマップを利用して解析した。特に、糖代謝に関する経路が、耐湿性に参与していることが明らかになった (図5)。そこで、これら代謝産物に生成および分解に関与する10個の酵素遺伝子の発現量を解析した。結果として、ヘキソキナー

ぜが、ダイズ早期の冠水耐性機構において、中心的な役割を果たしていることが明らかになった。

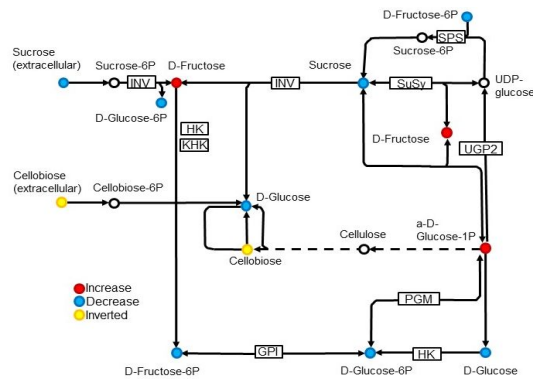


図5 耐湿性ダイズ素材において変動する代謝物のKEGGパスウェイマップ: 冠水耐性を示すアブシジン酸処理および冠水抵抗性 線照射突然変異体を冠水処理した。播種 48 時間後と比較して、耐湿性ダイズ素材において、増加(赤)および減少(青)する代謝産物を示す。

(6) 冠水耐性を示すアブシジン酸処理および冠水抵抗性 線照射突然変異体を用いて得られたオミクス(プロテオミクス、トランスクリプトミクス、メタボロミクス)データを、KEGGパスウェイマップを利用して統合した。ヘキソキナーゼの抑制によるフルクトースの蓄積が冠水耐性に関与していることが明らかになった(図6左)。さらに、ダイズの冠水時にフルクトースを添加することにより、冠水による一過的な重量増加を、対照レベルまで回復できることが証明された(図6右)。

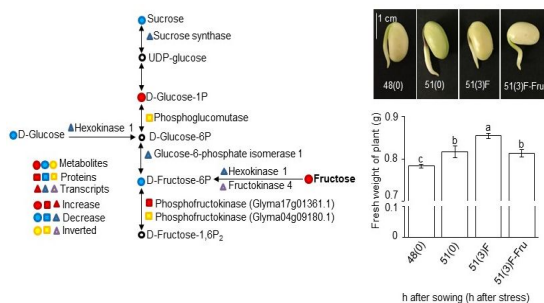


図6 ダイズ冠水耐性に関するオミクスデータの統合とその証明: 冠水耐性を示すアブシジン酸処理および冠水抵抗性 線照射突然変異体を冠水処理後、プロテオミクス、トランスクリプトミクス、メタボロミクス解析を行った。得られたデータを KEGGパスウェイマップを利用して統合した(左)。ダイズ冠水時(F)にフルクトース添加(F+ Fru)し、ダイズの湿重量を測定した(右)。異なるアルファベットはANOVA解析により顕著であることを示す。

(7) シミュレーションモデル構築と検証により、解糖系とクエン酸回路周辺の代謝系を対象にした好気・嫌気呼吸を切替えるモデルで再現でき、冠水ストレス時に濃度が差分的に変化する複数の酵素の存在が新たに示唆された。特に冠水ストレス応答には、ピルビン酸脱炭酸酵素の遮断に加え、アラニンアミノ基転移酵素の抑制とグルタミン酸脱水素酵素の亢進も重要であることが明らかとなった(図7)。従来説では、冠水時にピルビ

ン酸脱炭酸酵素を遮断するとされてきたが、アラニンアミノ基転移酵素を介する酵素反応を抑制したモデルの方が高い決定係数が得られることを示唆した。

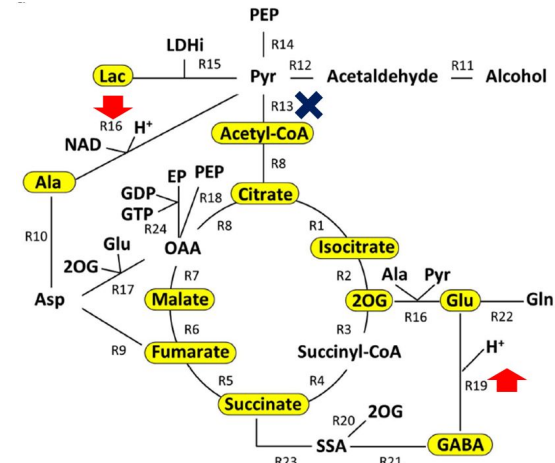


図7 冠水下のダイズにおける解糖系とクエン酸回路周辺のシミュレーションモデル: 黄色は実験値があった代謝物で、それらがフィッティングターゲット代謝物である。赤矢印は抑制あるいは亢進、青Xは遮断を示す。RXXは酵素名を示し、特にR16はアラニンアミノ基転移酵素、R19はグルタミン酸脱水素酵素、R13はピルビン酸脱炭酸酵素を示す。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計25件)

Li X, Rehman SU, Yamaguchi H, Hitachi K, Tsuchida K, Yamaguchi T, Sunohara Y, Matsumoto H, Komatsu S. Proteomic analysis of the effect of plant-derived smoke on soybean during recovery from flooding stress. *J Proteomics*. 査読有, 181, 2018, 238-248. doi: 10.1016/j.jpro.2018.04.031.

Wang X, Sakata K, Komatsu S. An integrated approach of proteomics and computational genetic modification effectiveness analysis to uncover the mechanisms of flood tolerance in soybeans. *Int J Mol Sci*. 査読有, 19, 2018, E1301. doi: 10.3390/ijms19051301.

Komatsu S, Hashiguchi A. Review-Subcellular proteomics: application to elucidation of flooding-response mechanisms in soybean. *Proteomes*. 査読有, 6, 2018, E13. doi:10.3390/proteomes6010013.

Wang X, Komatsu S. Proteomic approaches to uncover the flooding and drought stress response mechanisms in soybean. *J Proteomics*. 査読有, 172, 2018, 201-215. doi: 10.1016/j.jpro.2017.11.006.

Komatsu S. Isolation, Purity assessment, and proteomic analysis of nuclei. *Methods Mol*

Biol. 査読有, 1696, 2018, 81-90. doi: 10.1007/978-1-4939-7411-5_5.

Yin X, Hiraga S, Hajika M, Nishimura M, Komatsu S. Transcriptomic analysis reveals the flooding tolerant mechanism in flooding tolerant line and abscisic acid treated soybean. *Plant Mol Biol*. 査読有, 93, 2017, 479-496. doi: 10.1007/s11103-016-0576-2.

Yin X, Komatsu S. Review-Comprehensive analysis of response and tolerant mechanisms in early-stage soybean at initial-flooding stress. *J Proteomics*. 査読有, 169, 2017, 225-232. doi: 10.1016/j.jprot.2017.01.014.

Wang X, Khodadadi E, Fakheri B, Komatsu S. Organ-specific proteomics of soybean seedlings under flooding and drought stresses. *J Proteomics*. 査読有, 162, 2017, 62-72. doi: 10.1016/j.jprot.2017.04.012.

Wang X, Komatsu S. Proteomic analysis of calcium effects on soybean root tip under flooding and drought stresses. *Plant Cell Physiol*. 査読有, 58, 2017, 1405-1420. doi: 10.1093/pcp/pcx078.

Wang X, Zhu W, Hashiguchi A, Nishimura M, Tian J, Komatsu S. Metabolic profiles of flooding-tolerant mechanism in early-stage soybean responding to initial stress. *Plant Mol Biol*. 査読有, 94, 2017, 669-685. doi: 10.1007/s11103-017-0635-3.

Kazemi Oskuei B, Yin X, Hashiguchi A, Bandehagh A, Komatsu S. Proteomic analysis of soybean seedling leaf under waterlogging stress in a time-dependent manner. *Biochim Biophys Acta*. 査読有, 1865, 2017, 1167-1177. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.06.022.

Komatsu S, Wang X, Yin X, Nanjo Y, Ohyanagi H, Sakata K. Integration of gel-ased and gel-free proteomic data for functional analysis of proteins through Soybean Proteome Database. *J Proteomics*. 査読有, 163, 2017, 52-66. doi: 10.1016/j.jprot.2017.05.009.

Kamal AHM, Komatsu S. Jasmonic acid induced protein response to biophoton emissions and flooding stress in soybean. *J Proteomics*. 査読有, 133, 2016, 33-47. doi: 10.1016/j.jprot.2015.12.004.

Kamal AH, Komatsu S. Proteins involved in biophoton emission and flooding-stress

responses in soybean under light and dark conditions. *Mol Biol Rep*. 査読有, 43, 2016, 73-89. doi: 10.1007/s11033-015-3940-4.

Wang X, Oh M, Sakata K, Komatsu S. Gel-free/label-free proteomic analysis of root tip of soybean over time under flooding and drought stresses. *J Proteomics*. 査読有, 130, 2016, 42-55. doi: 10.1016/j.jprot.2015.9.007.

Wang X, Komatsu S. Review-Plant subcellular proteomics: Application for exploring optimal cell function in soybean. *J Proteomics*. 査読有, 143, 2016, 45-56. doi: 10.1016/j.jprot.2016.01.011.

Yin X, Komatsu S. Review-Plant nuclear proteomics for unraveling physiological function. *N Biotechnol*. 査読有, 33, 2016, 644-654. doi: 10.1016/j.nbt.2016.03.001.

Yin X, Nishimura M, Hajika M, Komatsu S. Quantitative proteomics reveals the flooding-tolerance mechanism in mutant and abscisic acid-treated soybean. *J Proteome Res*. 査読有, 15, 2016, 2008-25. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00196.

Wang X, Komatsu S. Gel-free/label-free proteomic analysis of endoplasmic reticulum proteins in soybean root tips under flooding and drought stresses. *J Proteome Res*. 査読有, 15, 2016, 2211-27. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00190.

Yin X, Komatsu S. Nuclear proteomics reveals the role of protein synthesis and chromatin structure in root tip of soybean during the initial stage of flooding stress. *J Proteome Res*. 査読有, 15, 2016, 2283-98. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00330.

21 Oh M, Komatsu S. Characterization of proteins in soybean roots under flooding and drought stresses. *J Proteomics*. 査読有, 114, 2015, 161-81. doi:10.1016/j.jprot.2014.11.008.

22 Yin X, Komatsu S. Quantitative proteomics of nuclear phosphoproteins in the root tip of soybean during the initial stages of flooding stress. *J Proteomics*. 査読有, 119, 2015, 183-95. doi: 10.1016/j.jprot.2015.02.004.

23 Khan MN, Sakata K, Komatsu S. Proteomic analysis of soybean hypocotyl during recovery after flooding stress. *J Proteomics*. 査読有, 121, 2015, 15-27. doi: 10.1016/

j.jprot.2015.03.020.

- 24 Kamal AH, Komatsu S. Involvement of reactive oxygen species and mitochondrial proteins in biophoton emission in roots of soybean plants under flooding stress. J Proteome Res. 査読有, 14, 2015, 2219-36. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00007.
- 25 Komatsu S. Tougou M, Nanjo Y. Review-Proteomic techniques and management of flooding tolerance in soybean. J Proteome Res. 査読有, 14, 2015, 3768-78. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00389.

[学会発表](計27件)

Komatsu S. Sakata K. Invited speaker-Soybean omics to reveal the flooding-tolerant mechanism at initial stage. Conference on Mass Spectrometry and Proteomics 2018, 2018.

Komatsu S. Sakata K. Invited speaker-Soybean proteomics to reveal the flooding-tolerant mechanism. Plant & Animal Genomes XXVI Conference, 2018.

Komatsu S. Invited speaker-Characterization of stress responsive mechanisms in soybean under abiotic stress using quantitative proteomic approach. International Proteomic Conference 2017, 2017.

Komatsu S. Invited speaker-Omics technique to enhance flooding tolerance of soybean. The 6th National Plant Protein Research Conference, 2016.

Komatsu S. Invited speaker-Nuclear phosphoproteomics to identify the abiotic stress tolerant mechanism in crop. 8th Annual Meeting of Proteomics Society India & 3rd AOAPPO Conference, 2016.

Komatsu S. Invited speaker-Gel-free/ label-free phosphoproteomics reveals response mechanism in soybean under flooding stress. Maritime Silk Road, 2016.

Komatsu S. Invited speaker-Quantitative proteomics reveals initial-response mechanism in soybean under flooding stress. 2nd INPPO World Congress, 2016.

Komatsu S. Invited speaker-Proteomics to identify the abiotic stress tolerant mechanism in crop. The 8th Asia Oceania Human Proteome Organization (AOHUPO) Congress, 2016.

Komatsu S. Invited speaker-Proteomic technique to identify the abiotic stress tolerant mechanism in crop. The Korean Human Proteome Organization, 16th Annual International Proteomics Conference, 2016

Komatsu S. Invited speaker-Characterization of flooding tolerance mechanisms in soybean using proteomic techniques. Plant Biotechnology: Green for Good III, 2015.

Komatsu S. Invited speaker-Proteomic technique for identifying flooding-tolerant mechanism in soybean. Plant Abiotic Stress Tolerant III, 2015.

Komatsu S. Invited speaker-Proteomic techniques and management of flooding tolerance in soybean. 7th International Symposium on Frontiers in Agricultural Proteome Research, 2015.

Khan MN, Komatsu S. Functional analysis of post-flooding recovery in soybean using proteomic technique. 7th International Symposium on Frontiers in Agricultural Proteome Research, 2015.

Oh MW, Wang X, Komatsu S. Characterization of stress-response mechanism in soybean roots under flooding and drought stresses using proteomic technique. 7th International Symposium on Frontiers in Agricultural Proteome Research, 2015.

[その他]

ホームページ等

Soybean Proteome Database

<http://proteome.dc.affrc.go.jp/Soybean/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 節子 (KOMATSU, Setsuko)
筑波大学・生命環境系・研究員
研究者番号: 90355751

(2) 研究分担者

坂田 克己 (SAKATA, Katsumi)
前橋工科大学・工学部・教授
研究者番号: 90545419