

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05640

研究課題名(和文) ダイナミックなヒストン複合体形成による植物転写制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of transcriptional regulation mechanisms by dynamic histone complex formation in plants

研究代表者

藤原 すみれ (Fujiwara, Sumire)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：50532131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：移動の自由を持たない植物は、絶妙かつダイナミックに各種遺伝子の発現を制御することで、日々の激しい環境変動に適応しながら生きている。転写因子はそのような発現の制御(転写制御)を行うタンパク質である。未だに多くの部分が未解明である転写因子による遺伝子発現制御機構の解明は、基礎研究の進展や有用植物の開発に大きく貢献すると期待される。本研究では、植物特有の転写抑制因子の働きの制御に主に着目して解析を行い、関連する複数のタンパク質によるダイナミックな制御機構を見出した。当初想定していた機構に加え、既知の知見から想定されるものとは異なる機構も転写抑制に関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子の発現制御機構は、植物の発生や成長、環境応答などすべての生命現象の制御に関わるものであり、植物を理解するための基礎研究から有用植物の開発などの応用研究まで広く関わるものである。一方で不明な点も非常に多く残されており、そのことが個々の生命現象の理解や有用植物の開発の律速ともなっている。本研究の成果は、そのような遺伝子発現制御機構についてこれまでにない新たな知見を提供するものであり、今後の各種の研究や技術開発、育種などの進展に広く貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Plants survive daily and seasonal environmental changes by regulating the expression of various genes exquisitely and dynamically. Transcription factors are proteins that control such expression. Elucidation of the gene expression control mechanism by transcription factors, which is still largely unknown, is expected to contribute greatly to the progress of basic research and the development of useful plants. In this study, we mainly focused on the molecular function of plant-specific transcriptional repressors and found a dynamic regulation mechanism by multiple factors. In addition to the initially assumed mechanism, new factors were also found to be involved in transcriptional repression mechanisms.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：転写制御 遺伝子発現 植物 シロイヌナズナ 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

移動の自由を持たない植物は、絶妙かつダイナミックに各種遺伝子の発現を制御することで、日々の激しい環境変動に適応しながら生きている。植物の遺伝子のはたらきを制御する転写因子には、遺伝子のはたらきを ON にする活性化因子と OFF にする抑制因子が存在し、それぞれアクセルとブレーキのように互いにそのはたらきを調整しながら適切な遺伝子発現制御を行っていると考えられている。転写因子のはたらきをうまく制御する斬新な技術を開発することができれば、有用植物の開発や基礎研究の大幅な効率化が期待できる。そのためには、転写制御機構の解明、特に植物特有で不明な点の多い転写抑制因子の作用機構を解明する必要がある。

モデル植物シロイヌナズナにおいて、転写因子をコードする遺伝子は全遺伝子の約一割を占めるとされており、さらにそのうち約 15% が、植物特有の転写抑制ドメイン( Repression domain, RD, 例 LxLxL ) を持ち、転写の抑制因子として機能していると想定されている ( Hiratsu et al 2003 Plant J, Mitsuda and Takagi, 2009, PCP )。しかし、この配列を持つ転写因子がどのように転写の抑制に関与するのか、そのメカニズムの解明はほとんど進んでいなかった。

補助事業者の所属グループにおいて開発された CRES-T 法 ( Chimeric REpressor Gene-Silencing Technology ) は、転写抑制配列 SRDX を転写活性化因子に付加することで、ドミナントにはたらく強力な転写抑制因子 ( キメラリプレッサー ) に機能転換する技術であり、機能の重複する転写活性化因子やそのターゲット遺伝子の多重機能欠損株と同等の強い形質を植物に付与できることから、世界で広く利用されている ( Hiratsu et al, 2003, Plant J )。特に、ランダムな変異導入系統群から目的の形質を示す個体をスクリーニングし原因遺伝子を同定するという従来の手法では、多くの場合において機能重複遺伝子のはたらきにより遺伝子が一つ破壊されても形質が出ないため、その遺伝子の機能が発見されないという問題点があったが、CRES-T 法ではこのような課題を解消することができ、目的の表現型の制御に関わる転写活性化因子を発見できるというメリットがある。一方、CRES-T 法では内生の転写抑制因子の機能を SRDX 付加により抑えることができないため、申請者らは、CRES-T 法とは逆バージョンの、転写抑制因子に転写活性化配列 VP16 を付加することで転写活性化因子に機能転換する技術の有効性を検証し、内生の転写抑制因子に VP16 を付加し過剰発現することで、その転写抑制因子および機能重複転写抑制転写因子の二重機能欠損株よりも強い形質を示すことなどを報告した ( Fujiwara et al, 2014, FEBS Lett; Fujiwara et al. 2014, Plant Biotech. )。しかし、これらの技術がはたらくメカニズムも、転写抑制機構そのものが解明されていないため、ほぼ未解明と言わざるを得ない状況にあった。

我々は、このような課題を解決するために、RD を持つタンパク質と特異的に *in vivo* で複合体を形成するタンパク質の探索を行った。その結果、ヒストン関連因子など、複数の種類のタンパク質を同定することに成功し、植物の転写抑制機構は、複数の種類のタンパク質の関与により複雑かつダイナミックに成し遂げられている可能性を示唆する結果を得た。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記のような植物の遺伝子転写制御機構に関与する因子やその作用メカニズムを解析することで、未だ未解明な点が多く残されている遺伝子転写制御機構、特に転写抑制機構の解明の鍵となる新規の知見を得ること、そして得られた知見を利用した新規遺伝子制御技術の開発に貢献することを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

本研究では、これまでに申請者らが同定した RD と特異的に相互作用するタンパク質に加え、さらなる解析により直接的・間接的に転写抑制機構に関与する可能性が示唆される新規因子を探索し、それらの転写抑制機構において果たす機能を解析することにより、複雑かつダイナミックな転写制御機構の全体像の理解につなげるための新規な知見を得ることを目指した。

具体的には、共免疫沈降法や機能欠損株の解析などによりさらなる転写抑制関連因子の候補を同定し、さらに共免疫沈降法や Yeast Two Hybrid 法、BiFC 法による同定した転写抑制関連タンパク質群同士および SRDX 配列との相互作用および複合体形成の解析、ウエスタンブロット法やアミノ酸置換、薬剤処理などによる各種翻訳後修飾の有無と機能の解析、当該因子の ChIP 解析によるターゲット遺伝子への結合様式の検証、当該因子の機能欠損時に転写抑制ターゲット遺伝子の発現や他の遺伝子群の発現に与える影響の RT-PCR 法や RNA sequencing 法による解析および植物体の表現型に与える影響の解析などを行った。

また、内生の RD を持つ転写抑制因子について、上記の SRDX と相互作用する因子との相互作用の解析、RD に変異を導入した際に転写抑制活性やターゲット遺伝子の発現抑制、表現型等

に与える影響の解析なども実施した。

#### 4. 研究成果

転写抑制因子およびその機能制御に関与する因子を同定し機能を解明するために、共免疫沈降法などにより SRDX 配列を付加したタンパク質と複合体を形成する新規の関連因子を複数単離した。SRDX 付加タンパク質との複合体形成が確認されなかったが機能欠損により SRDX による転写抑制活性を弱める因子も複数単離した。

これまでに単離していた因子とこれらの新規に単離した因子について、各種解析に必要なコンストラクトおよび形質転換体等を作成した。表現型等の解析により、SRDX 付加転写活性化因子（キメラリプレッサー）の過剰発現時に使用するターミネーターの種類とキメラリプレッサーの組み合わせにより、ターゲット遺伝子の転写抑制による形質の出現の有無が変化することを見出したため、解析するキメラリプレッサーによって適したターミネーターを選定し形質転換体等の研究材料を作製した。

共免疫沈降解析、BiFC 解析、Yeast Two Hybrid 解析などにより、SRDX 配列を付加したタンパク質および内生の RD を持つ転写因子と相互作用するタンパク質を解析をおこなった。内生の RD を持つ転写抑制因子については SRDX 付加タンパク質と異なる相互作用様式を示すものが見られた。また、内生の RD を持ち転写抑制能を持つことが明確に示された転写抑制因子について、既知の RD を破壊しても抑制機能が維持されるものが複数発見された。これらの因子については、未知の転写抑制配列を持つ、もしくは未知の機構で転写を抑制する可能性が示唆されたことから、別途さらに詳細な解析を進めることとした。

転写活性化因子に SRDX を付加することで転写抑制因子に機能転換したキメラリプレッサーについては、転写抑制機構において重要な機能を持つことが示唆された複数の因子の機能欠損による影響を検証した。表現型の解析、RT-PCR 法による発現解析などの結果、SRDX を付加した転写活性化因子の本来の機能によって異なる因子群が転写抑制経路で機能することが示唆された。また、機能欠損により SRDX による転写抑制効果をキャンセルことが示された因子については、キメラリプレッサーの転写抑制機能でなく発現を弱めることで抑制効果が弱まる可能性もあることから、トランジェントアッセイ等を活用した解析を行い、キメラリプレッサーの発現を弱めるのではなく転写抑制能自体を弱めていることを確認した。

転写抑制機構において重要な機能を持つことが示唆された因子についてさらに解析を進めるために、RNA sequencing 法などによりさらに情報を得た。

また、これまでの知見により転写抑制機構への関与が示されている制御経路について、変異導入や阻害剤などを用いた解析を実施したところ、SRDX による抑制については異なる機構が関与している可能性が示唆された。これらの解析から、既知の知見から想定される機構に加え、それとは異なる因子や機構も転写抑制に関与することを見出した。

上記のように、本研究では、SRDX を活用した解析により植物の転写抑制機構においてはたらく鍵因子を複数同定し、それらの因子が転写抑制機構においてはたらくメカニズムの一端を解明することに成功した。また、キメラリプレッサーおよび内生の転写抑制因子の解析により、今回解明した機構やこれまで想定されている既知のものとは異なる未知の機構が転写抑制因子の機能において重要なはたらきを持つことも新たに示唆されたため、今後詳細な解析を進めることでさらなる転写抑制機構の解明につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sumire Fujiwara
2. 発表標題 Toward realizing a low-carbon society by genetic engineering of plant transcription factors
3. 学会等名 Innovation for Coll Earth Forum (ICEF) 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原すみれ、中井勇介、坂本真吾、野村有子、中神弘史、高木優
2. 発表標題 植物の転写制御機構に関わる新規因子の探索と解析
3. 学会等名 第35回日本植物細胞分子生物学会（さいたま）大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤原すみれ、中井勇介、坂本真吾、野村有子、中神弘史、高木優
2. 発表標題 植物の転写制御機構に関わる新規因子の探索と解析
3. 学会等名 第58回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

【学会以外での発表】

- ・「転写制御技術を利用したスーパー植物の開発」, 藤原 すみれ, 筆頭・登壇, 第16回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会, つくば, 2017/01 他複数

【報道・広報】

- ・「遺伝子の力を活かして生み出すスーパー植物!」, 藤原 すみれ, ラヂオつくば「サイエンスQ」、2018/03
- ・「世界を救うスーパー植物を創りたい! ~植物遺伝子制御技術が生み出す無限の可能性~」, 産総研LINK vol12, pp12-15, 2017/04
- ・「スーパー植物 プレーキをアクセルに」, 東京新聞、中日新聞 (2016/10、2016/11)

【サイエンス・コミュニケーション活動】

- ・小学校~高等学校での出張授業
- ・産総研一般公開における研究紹介 他複数

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----