

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14625

研究課題名(和文)次世代プロテオーム解析によるイネ初期胚パターンニングの新規制御レイヤー探索

研究課題名(英文) Exploring new regulatory layers for embryo patterning by a proteome approach in rice

研究代表者

佐藤 豊 (SATO, Yutaka)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：40345872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：従来のプロテオーム解析では、プロテアーゼによりペプチドに分解されやすく、かつイオン化しやすいペプチドを量の多い順番に解析するため、試料中に微量含まれる転写因子等の制御因子に関する情報はほとんど得られない。本研究代表者はイネの胚形成機構の解明に長年分子遺伝学的手法で取り組んできた。この間、転写レベルでの制御ネットワークの重要性を多数明らかにしてきた。一方、転写ネットワークの上流で何が起きているのか全く情報は得られていない。本研究では、イネ初期胚形成過程をモデルにして次世代プロテオームプラットフォームを活用のための情報収集を行った。

研究成果の概要(英文)：So far, abundant proteins or easily ionized proteins are dominantly detected by the proteome analysis. This makes sometimes difficult to detect rare proteins or proteins with difficulties in ionization. This could often be a big obstacle to analyze developmental processes by proteomic analysis because developmental processes are usually regulated by small amount of signaling molecules or proteins. I am engaged in rice developmental biology for a long time. Using this background, I conducted to set up condition to apply proteomic approach to rice developmental approach.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：イネ

1. 研究開始当初の背景

従来のプロテオーム解析では、プロテアーゼによりペプチドに分解されやすく、かつイオン化しやすいペプチドを量の多い順番に解析するため、試料中に微量含まれる転写因子等の制御因子に関する情報はほとんど得られない。申請者はイネの胚形成機構の解明に長年分子遺伝学的手法で取り組んできた。この間、転写レベルでの制御ネットワークの重要性を多数明らかにしてきた。一方、転写ネットワークの上流で何が起きているのか全く情報は得られていない。

2. 研究の目的

植物の胚形成過程では、受精卵が不等分裂したのに生じる頂端細胞ならびに基部細胞が、それぞれ細胞分裂と分化を繰り返し胚が形成される。この過程は多数の転写因子等の制御因子が関与する転写レベルのネットワークの制御下にあることが、イネやシロイヌナズナで単離されてきた突然変異体の解析から明らかになっている。一方で、転写レベルの制御の上位にある制御レイヤーを明らかにしなければ、永遠に転写因子のネットワークの堂々巡りで、細胞の分化や胚のパターニング機構の本質に迫ることはできない。そこで、本研究ではイネの胚で機能する転写因子等の制御因子に着目し、これらの中から、転写レベルではなく、タンパク質レベルでの制御(量的制御/修飾などの質的制御)を受ける分子を解明する土台となる基礎プラットフォームの構築を目指す。具体的には、近年、ヒトの試料を材料にして発展してきた次世代プロテオーム解析技術を導入した網羅的解析適応の可能性を検討する。

3. 研究の方法

研究代表者は、これまでに東京大学の伊藤博士・桧原博士および(独)生物資源研究所の佐藤博士らとの共同研究により、野生型イネ胚で mRNA 発現が局在する遺伝子や発生段階で mRNA 発現が変動する遺伝子の網羅的解析を行ってきた (Itoh et al.,

Development 2016)。この中から、イネの胚で発現する代表的な転写因子等の制御因子約 60 個、ならびに研究代表者が独自の解析から初期胚で機能することが予想される因子約 50 個について、mRNA レベルでの挙動をまず解析する。次に、次世代プロテオーム解析の適用によりタンパク質レベルでの挙動が mRNA レベルでの挙動と一致しない転写因子等制御因子を見つけ出しリン酸化などの修飾を網羅的に同定するための解析プラットフォーム構築の準備を行う。

これまで、植物の胚形成を制御する転写因子が多数同定され、これらの発現局在が胚のパターニングに必須であることがいくつも知られている。一方で、どうしてこれらの転写因子の発現が局在するのかは全く明らかになっていない。転写因子の発現を制御する転写因子を探しても、疑問点は堂々巡りするだけで解決しない。本研究が、タンパク質レベルでの制御因子の挙動を網羅的に記述するプラットフォーム構築を目指すことにより、これまでブラックボックスであった胚形成を制御する転写因子の上位制御レイヤーを世界に先駆けて明らかにできる可能性を示す。

本研究は、これまでの分子遺伝学では取り扱うことのできなかった、発生に関わる制御因子のタンパク質レベルでの挙動を網羅的に解明することを可能にする次世代プロテオーム導入への道筋をつける斬新かつ極めてチャレンジングな課題である。本研究が構築を目指す「次世代プロテオーム解析プラットフォーム」はもともとヒトのタンパク質解析ですでに活用実績がある。従来、質量分析機を用いた複雑性の高い試料のプロテオーム解析では、ペプチドに消化され易くかつイオン化され易いものを、ピークの高い順に検出している。この手法は、試料中にメジャーに含まれている遺伝子産物を解析するのに適したアプローチといえる。しかしながら、転写因子などの量的には微量でも重要な制御機能を担っているような遺伝子産物は、従

来の質量分析器ではほとんど解析できない。

本研究ではMRMトランジション法と呼ばれる、ヒトのタンパク質解析で実績のある質量分析の方法をイネの胚に含まれる微量タンパク質解析系へ導入するプラットフォーム構築に必要な情報を集めることにより、植物でも、複雑性の高いサンプル中に含まれる転写因子などの微量因子の解析を可能にする道筋を見出す。この方法では、研究者が着目する遺伝子産物について、タンパク質中のどのペプチド分解物が効率よくイオン化し、どの質量ゲート条件で高純度（単一）のピークを生じるかを予めデータベース化しておくことにより、高感度の検出を可能にしている。現在、九州大学の中山敬一教授らのグループがヒトのすべての遺伝子産物についてMRMトランジション情報のデータベース化を行っている。ただし、ヒトの場合、莫大な資金を投入して人工合成したヒトの遺伝子産物を実際にペプチド消化/イオン化させて、一つ一つ質量分析器にかけることにより、MRM情報を取得している。

植物科学分野では、ヒトの解析のように莫大な資金を投入した研究は実質不可能である。そこで、本研究では、安価にMRMトランジション情報を取得するための様々なアイデアをもちより、植物における初の「次世代プロテオーム解析」への道を開拓する。具体的には、材料にイネを用いることが大きな利点を生み出す。イネには高品質のESTクローンが日本国内に整備されており、迅速な入手が可能である。これを鋳型に、*in vitro* 転写/翻訳系により合成した遺伝子産物が実際に得られるか否かを本研究では検証する。もしうまくいけば、安価にMRMトランジション情報を取得できる道筋が建てられる。*in vitro* 転写/翻訳系についても、市販のキットを用いると高額だが、名古屋大学の多田教授らが開発した安価な自作 *in vitro* 転写/翻訳系を利用することにより、低コスト化実現を目指す。

4. 研究成果

「次世代プロテオーム解析」イメージを一言で表現するなら、一つ一つの遺伝子産物に対する抗体を作成し、ウエスタンブロットを大量に行うのと同等の実験ということになる。各遺伝子産物に対する抗体にあたる部分がMRMトランジション情報に対応する。自分が見たい遺伝子産物のMRMトランジション情報さえあれば、抗体が無くても、ウエスタンブロットをしなくても、複雑性の高いサンプルからでもタンパク質レベルでの発現情報が、理論的には予め取得済みMRMトランジション情報の数だけ得られる。更に質量分析器をもちいた解析なので、ウエスタンではわからない修飾情報なども得られる可能性がある。

本研究では、イネ研究用の「次世代プロテオーム解析」のプラットフォーム構築の可能性を検討し、将来イネの胚形成に機能する転写因子群の上位に位置する制御レイヤーを明らかにする可能性を確かめる。この目的の達成のために、本申請研究は上述の(1)～(3)の三つのステージに分けて進めた。

(1) イネ胚で発現する遺伝子のESTクローンを多数取得し、*in vitro* 転写を高効率に行う条件検討を行った。転写産物は、*in situ* ハイブリダイゼーションに使うRNA probe作成にも必要であるし、*in vitro* 翻訳によるタンパク質合成にも必要になる。

まず、ESTクローンについては、二回に分けて合計110クローンを農林水産省のジーンバンクから取得した。また、研究代表者がこれまでに収集したイネ胚形成遺伝子13を加えた合計123クローンについて、実験を行った。プローブ作成と*in vitro* 翻訳の両方で転写が必要であるので、T7配列をこの遺伝子プライマーに組み込んだPCRにより、転写の鋳型を用意することとした。GO-TAQ等の常法によるPCRではほとんどの鋳型の増幅ができなかった。予想されたことではあるが、GC含量が多いクローンがほとんどであった。そこで、PCRのコンディションを検討

し、基本的には全てのクローンで in vitro 転写ができるようになった。

(2) RNA レベルでの発現局在を in situ ハイブリダイゼーションにより明らかにした。この実験は、将来 MRM トランジション情報が蓄積した際に、転写レベルでの制御とその上位の制御に関わる因子を見つけ出すのに必須の情報となる。また、初期胚を材料に、網羅的に一つ一つ遺伝子発現を詳細に解析することは非常に手間のかかる困難な実験であり、本研究課題の大きな山場である。

in situ ハイブリダイゼーションの結果、まだ器官分化が見られない未分化なイネ初期胚において局在した発現を示すクローンを多数同定することができた。これらは、初期胚の各領域のマーカー遺伝子としての利用価値も高い。

(3) in vitro 翻訳および MRM トランジション情報の取得準備については、2名の連携研究者の協力の下に研究を進めた。in vitro 翻訳(コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系)系に必要な情報を入手し、鋳型等の準備を行った。実際に、数クローンは in vitro 翻訳まで行い、本研究のコンセプトが実現可能であることを確かめた。翻訳後は、タグを用いて簡易的に精製を行った。タンパク質としては、ある程度の量が回収できていた。このことから、今後は業者への外注などで MRM トランジション情報を少しずつ蓄積し、将来的には、イネにおいても「次世代プロテオーム解析プラットフォーム」が構築できると考えられる。

上記の結果は、以下のようなインパクトをもたらすことが期待できる。

・研究代表者等らがこれまでに解析してきたイネ初期胚で発現する転写因子等の制御因子をコードする RNA の挙動とその遺伝子産物の変動を対応づけることにより、転写因子の機能制御に関する未知の制御レイヤーを提示できる。

・本研究の過程で得られるイネ転写因子の MRM トランジション情報をデータベース化して公開することにより、植物科学では初の

「次世代プロテオーム」の技術をイネの研究コミュニティにさきがけて導入することができる。

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 5 件)

Eriko Honda, Chow-Lih Yew, Takanori Yoshikawa, Yutaka Sato, Ken-ichiro Hibara, Jun-ichi Itoh (2018) LEAF LATERAL SYMMETRY1, a Member of the WUSCHEL-RELATED HOMEBOX3 Gene Family, Regulates Lateral Organ Development Differentially from Other Paralogs, NARROW LEAF2 and NARROW LEAF3 in Rice. *Plant Cell Physiol.*, 59, 376-391. 査読あり

Fumika Clara Kubo, Yukiko Yasui, Toshihiro Kumamaru, Yutaka Sato, Hiro-Yuki Hirano (2016) Genetic analysis of rice mutants responsible for narrow leaf phenotype and reduced vein number. *Genes Genet. Syst.*, 91, 235-240. 査読あり

Jun-ichi Itoh, Yutaka Sato, Yutaka Sato, Ken-ichiro Hibara, Sae Shimizu-Sato, Hiromi Kobayashi, Hinako Takehisa, Karen Sanguinet, Nobukazu Namiki, and Yoshiaki Nagamura (2016) Genome-wide prediction of spatio-temporal gene expression patterns during early embryogenesis in rice. *Development*, 143, 1217-1227, 2016. 査読あり

Masaharu Suzuki, Yutaka Sato, Shan Wu, Byung-Ho Kang, Donald R. McCarty (2015) Conserved functions of the MATE transporter BIG EMBRYO 1 in regulation of lateral organ size and initiation rate. *Plant Cell*, 27, 2288-2300. 査読あり

Tomomi Hara, Hirokazu Katoh, Daisuke Ogawa, Yasuaki Kagawa, Yutaka Sato, Hidemi Kitano, Yasuo Nagato, Ryo Ishikawa, Akemi Ono, Tetsu Kinoshita, Shin Takeda, Tsukaho Hattori (2015) Rice SNF2 family helicase ENL1 is essential for syncytial endosperm development. *Plant J.*, 81, 1-12. 査読あり

[図書](計 2 件)

Yutaka Sato, Misuzu Nosaka-Takahashi, Toshiya Suzuki, Sae Shimizu-Sato (2018) Small RNAs in rice: Molecular species and their functions. In *Rice Genomics*,

Genetics and Breeding. Springer pp21-36.

都筑正行、濱田隆宏、佐藤 豊：植物が持つ内在性 small RNA とその機能、ノンコーディング RNA, 化学同人、104-110, 2016.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 豊 (SATO, Yutaka)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：40345872

(2)連携研究者

多田 安臣 (TADA, Yasuomi)

名古屋大学・遺伝子実験施設・教授

研究者番号：40552740

(3)連携研究者

森 仁志 (MORI, Hitoshi)

名古屋大学大学院・生命農学研究科・教授

研究者番号：20220014