

令和元年6月10日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07723

研究課題名(和文)統合的アプローチによるフラボノイドの核内倍加への機能解明

研究課題名(英文) Integrated approach for elucidating molecular actions of flavonoids in endoreduplication and development

研究代表者

諸橋 賢吾 (Morohashi, Kengo)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・准教授

研究者番号：60748937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物は極めて多岐にわたる低分子化合物を生産するが、植物ホルモン以外の生体内の働きはほとんどわかっていない。特に二次代謝産物フラボノイドは様々な生体内イベントに関与しているにも関わらず、その分子メカニズムは不明の点が多い。本研究ではA)フラボノイドと相互作用するタンパク質候補の同定、B)フラボノイドとトライコーム形成制御遺伝子との関係、について新知見を得ることに成功した。これらの結果は、フラボノイドが多様なタンパク質に作用している可能性や、形態形成プログラムにおいて遺伝子発現を調整している可能性を考えられるものであり、当初の予想よりも遥かに多岐に渡っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フラボノイドが多様なタンパク質に作用している可能性や、形態形成プログラムにおいて遺伝子発現のばらつきを調整している可能性を示唆する結果を得ることに成功した。これはフラボノイドが動物においても多様な動態を示すことと矛盾はなく、本研究結果を健康医学に適用することも視野に入れたい。

研究成果の概要(英文)：Plants produce secondary metabolites that significantly affect biological systems in diverse organisms and are beneficial for microbes, plants, and animals. Despite the importance of flavonoids to various biological systems, their role, particularly in gene regulation, is largely unknown. However, identification of flavonoid-associated proteins is technically challenging since affinities between small molecules and proteins are relatively low. To overcome the problem, I used an innovative method called phage display coupled with next-generation sequencing (PD-Seq), which I have developed to successfully dissect individual metabolite-protein interactions. Successfully, more than 2,000 amino acid sequences were identified as potential targets of flavonoids. These results lead me for further elucidation of the biological processes underlying development and flavonoid interactions.

研究分野：システム生物学

キーワード：システム生物学 ケミカルバイオロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は極めて多岐にわたる低分子化合物を生産するが、植物ホルモン以外の生体内の働きはほとんどわかっていない。そもそも、様々な低分子化合物がどのような分子と作用するか、標的分子について不明なことがほとんどである。その理由として、低分子化合物標的分子を見出すことが技術的に困難であることがあげられる。特に抗生物質とはことなる比較的毒性の低い二次代謝産物は、標的分子が多岐にわたること考えられるため標的分子同定の困難さが増している。二次代謝産物フラボノイドは様々な生体内イベントに関与しているにも関わらず、その分子メカニズムは不明の点が多い。

シロイヌナズナのトライコームは表皮細胞から分化する毛状構造体であり1つの細胞からなる。トライコームは防虫防御として機能すると考えられるが、実験室内の生育環境ではトライコームの有無による生育の違いは認められてない。トライコームの形成は大きくわけて3つの段階がある¹。トライコーム形成開始、核内倍加、トライコーム構造形成である。トライコーム形成開始ではbHLH型の転写因子GL3とR2R3-MYB型の転写因子GL1が結合したGL3-GL1複合体^{1,2}によって誘導される。その際、トライコーム分布パターン(分布パターン)の形成はチューリングの反応拡散モデルに当てはめられ³、トライコーム形成初期での遺伝子発現のばらつきを必要とすると考えられている。その後、細胞分裂をともなわないDNA複製すなわち核内倍加が進行する。平均で16回のDNA複製が行われる。それと同時期にトライコーム特有の枝が分岐した構造が形成される。トライコーム細胞にはフラボノイドが蓄積しており、トライコームとフラボノイドの関連が想定される。一方、GL3はGL1のみではなく、異なるR2R3-MYB型の転写因子PAP1とも複合体を形成する。GL3-PAP1複合体はフラボノイドの一種であるアントシアニン合成を誘導する⁴。アントシアニンは紫色を呈する色素であり、葉発達初期においては未熟な葉緑体を保護する働きをもつ。このように、トライコーム形成およびフラボノイド合成はどちらも葉発達初期に共通の転写因子GL3によって制御されている。

これまでに申請者はフラボノイドが細胞内で様々なタンパク質と相互作用すること、フラボノイド欠損シロイヌナズナにおいて植物表皮細胞から分化した器官であるトライコームの核内倍加が低下することを見出していた。

2. 研究の目的

本研究では植物二次代謝産物であるフラボノイドの生体内機能解明を最終目的として、フラボノイド結合タンパク質群の同定と、統合的解析によりフラボノイドの核内倍加への分子メカニズムとその生物学的意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

シロイヌナズナ生育環境

特に記載がない限りシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)Col-0を用いた。1/2MS培地プレートで24°C、連続光で培養した。

核内倍加測定法

播種後14日後の葉を45%酢酸で3時間固定し、70%EtOH、1xPBSで洗浄後、20 μM ヨウ化プロピジウムで8分間染色した。1xPBSで洗浄後、スライドガラスに葉を載せ、十分な1xPBSを浸した後カバーガラスで封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

PD-Seq法

ファージライブラリーはランダムな9もしくは12アミノ酸配列を挿入したT7ファージライブラリーを使用した。ビオチン化したケンフェロールおよびビオチン化したアストラガリンは東京理科大学倉持幸司博士より提供を受けた。担体はNeutrAvidinビーズを用いた(ThermoFisher社)。ビオチン化フラボノイドとビーズを4時間混合したのち、1xTBSで洗浄し、ファージライブラリーと混合した。4°Cで回転混合を8時間以上行い、1xTBSで洗浄後、1%SDSを用いてフラボノイド結合ファージを溶出した。溶出したファージ粒子にたいしてフェノールクロロホルム処理を行いDNAのみを回収した後、挿入DNAをKM_T7_insert_up(5'-NNNATGCTCGGGGATCCGAATT-3')およびKM_T7_insert_down(5'-NNNAACCCCTCAAGACCCGTTTAG-3')を用いてPCRによって増幅した。次世代シーケンス用のライブラリーづくりはNEBNext ChIP-Seq Library Prep Master Mix Set for Illumina(NEB社)を用いて付属のプロトコールに沿って行った。

4. 研究成果

本研究ではフラボノイドの核内倍加への寄与のみならず、A)フラボノイドと相互作用するタンパク質候補の同定、B)フラボノイドとトライコーム形成遺伝子制御との関係、について新知見を得ることに成功した。

多くの植物において、フラボノイド生合成経路は、まずフェニルプロパノイド経路において、4 クマリル CoA とマロニル CoA との縮合反応によりナリンゲニンカルコンが生成されるところから始まる。ナリンゲニンカルコンはカルコン合成酵素によりナリンゲニンとなり一連のフラボノイドが生合成される。そのため、カルコン合成酵素欠損シロイヌナズナではフラボノイドが作られない。一方、表皮細胞から分化した毛状器官であるトライコーム細胞では核内倍加が進行しており、興味深いことにカルコン合成酵素欠損変異体 *tt4* では核内 DNA 量が低下していた (図 1)。これは再現性よく観察された。

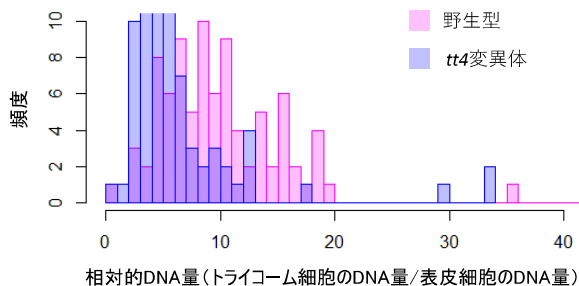


図 1. フラボノイド欠損変異体では核内倍加が低下していた

フラボノイドの一種であるケンフェロールの標的タンパク質探索を計画した。申請者が過去に開発した、ファージディスプレイ法と次世代シーケンス法を組み合わせた PD-Seq 法を用いてケンフェロール結合タンパク質の網羅的探索を行った。具体的には、ビオチン化したケンフェロールおよびケンフェロール配糖

表 2. ケンフェロールおよびアストラガリン PD-Seq で得られた DNA 断片数のまとめ

Kaempferol	Input	Control rep1	Control rep2	Control rep3	K rep1	K rep2	K rep3
Total read#	8,458,425	9,365,145	8,202,481	16,402,293	10,284,329	7,848,898	8,868,395
Filtered read# (30bp)	7,883,368	8,155,506	7,195,916	12,309,216	9,268,344	6,296,563	5,943,210

Astragalgin	Input	Control rep1	Control rep2	Control rep3	AG rep1	AG rep2	AG rep3
Total read#	6,194,969	10,751,100	11,455,130	175,302,814	9,469,958	10,009,370	12,109,354
Filtered read# (39bp)	5,759,093	9,977,539	10,634,746	162,354,889	8,788,864	9,241,958	11,253,816

体であるアストラガリンをストレプトアビジンビーズ担体に固定化し、ランダムペプチドファージライブラリーと混合した。一晚混合し続けた後、十分に洗浄し、1% SDS によって変性溶出させたファージ粒子からランダムペプチド配列領域のみを PCR によって増幅した。次世代シーケンスに供試するためのライブラリー作成を行い、次世代シーケンスを行った。対照としてビオチンのみを結合させたコントロールビーズに対しても同様の作業をおこなった。計 3 回の独立したスクリーニングを行い、もとのライブラリーを加えた 7 サンプルのシーケンスを行った。ケンフェロールおよびアストラガリンそれぞれ独立に行った結果、それぞれで合計 1 億リード以上の DNA 断片情報を得ることに成功した (表 1)。この大量の配列情報を効率的に処理するために、フリーで利用できる情報解析プラットフォーム Galaxy と組み合わせたワークフローを開発した。

表 1. PD-Seq 法によって得られた各フラボノイド標的候補ペプチ

	# of sequences (P<0.05)
Kaempferol	35
Astragalgin	1,972

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、播種後3日の植物体の第1,2本葉におけるアントシアニンの自家蛍光を観察

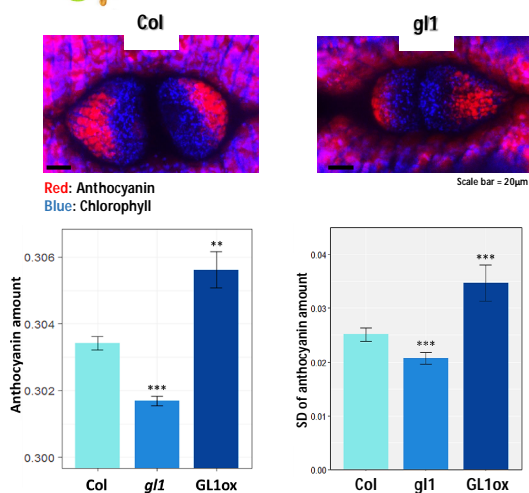


図 2. 表皮細胞中のアントシアニン量の分布。Col:野生型、*gl1*:GL1 欠損変異体、GL1ox: GL1 過剰発現体。

その結果、ケンフェロール溶出画分では約 30 の、アストラガリンでは約 2,000 にわたるペプチド配列情報が統計的に有意に存在することがわかった (表 2)。

フラボノイドとトライコーム形態形成に関しては研究をすすめる過程で、遺伝子発現のばらつきが関与することが示唆された。しかし、ゆらぎの制御の観点から両者に着目した研究はほとんど見られなかった。アントシアニン GRN がトライコーム GRN によるゆらぎの制御を受けるか確かめるため、共焦点レーザー顕微鏡を用いて実際の植物体のアントシアニン自家蛍光の定量を行ったところ、*gl1* 変異体におけるアントシアニン量およびゆらぎの減少が観察された (図 2)。よって、GL1 はアントシアニン GRN に内在するゆらぎを増幅させることが示唆された。これらの結果は、フラボノイドが遺伝子発現制御に関して、オンオフ (だけ) ではなく、遺伝子発現のゆらぎの調整にも寄与することを示唆し

ており、非常に興味深い知見となった。

<引用文献>

1. Ishida, T., Kurata, T., Okada, K. & Wada, T. A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. *Annual review of plant biology* 59, 365–386 (2008).
2. Pattanaik, S., Patra, B., Singh, S. K. & Yuan, L. An overview of the gene regulatory network controlling trichome development in the model plant, Arabidopsis. *Frontiers in plant science* 5, 259 (2014).
3. Torii, K. U. Two-dimensional spatial patterning in developmental systems. 22, 438–446 (2012).
4. Lloyd, A. *et al.* Advances in the MYB-bHLH-WD Repeat (MBW) Pigment Regulatory Model: Addition of a WRKY Factor and Co-option of an Anthocyanin MYB for Betalain Regulation. *Plant Cell Physiol.* 58, 1431–1441 (2017).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

1. Ishihara, H., Sugimoto, K., Tarr, P.T., Temman, H., Kadokura, S., Inui, Y., Sakamoto, T., Sasaki, T., Aida, M., Suzuki, T., Inagaki, S., **Morohashi, K.**, Seki, M., Kakutani, T., Meyerowitz, E.M., Matsunaga, S. (2019). Primed histone demethylation regulates shoot regenerative competency. *Nat Commun.* 10:1786.
2. Arai, H., Yanagiura, K., Toyama, Y., **Morohashi, K.** (2019). Genome-wide analysis of MpBHLH12, a IIIb basic helix-loop-helix transcription factor of *Marchantia polymorpha*. *J Plant Res.* 132:197-209.
3. **Morohashi, K.**, Russinova, E. (2019). Towards a next step of the research of regulatory networks in plant growth and development. *J Plant Res.* 132:155-157.
4. Jones, M.A., **Morohashi, K.**, Grotewold, E., Harmer, S.L. (2019). Arabidopsis JMJD5/JMJ30 acts independently of LUX ARRHYTHMO within the plant circadian clock to enable temperature compensation. *Front. Plant Sci.* 10:57.
5. Ilias, I.A., Negishi, K., Yasue, K., Jomura, N., **Morohashi, K.**, Baharum, S.N., Goh, H.H. (2018). Transcriptome-wide effects of expansin gene manipulation in etiolated Arabidopsis seedling. *J Plant Res.* 132:159-172.
6. Shibata, M., Breuer, B., Kawamura, A., Clark N.M., Rymen, B., Braidwood, L., **Morohashi, K.**, Busch, W., Benfey, P.N., Sozzani, R., and Sugimoto, K. (2018). GTL1 and DF1 regulate root hair growth through transcriptional repression of ROOT HAIR DEFECTIVE 6-LIKE 4 in Arabidopsis. *Development* 145:dev159707.
7. Siarot, L., Toyazaki, H., Hidaka, M., Kurumisawa, K., Hirakawa, T., **Morohashi, K.**, and Aono, T. (2017). A novel regulatory pathway for K⁺ uptake in the legume symbiont *Azorhizobium caulinodans*: TrkJ acts as a repressor of kdpFABC operon at high extracellular K⁺ concentration. *Appl Environ Microbiol.* 83(19):pii: e01197-17.
8. Matsuoka, J.-I., Ishizuna, F., Kurumisawa, K., **Morohashi, K.**, Ogawa, T., Hidaka, M., Saito, K., Ezawa, T., and Aono, T. (2017). Stringent expression control of pathogenic R-body production in legume symbiont *Azorhizobium caulinodans*. *MBio* 8(4):pii: e00715-17.
9. Dhillon, T., **Morohashi, K.**, Stockinger, E.J. (2017). CBF2A–CBF4B genomic region copy numbers alongside the circadian clock play key regulatory mechanisms driving expression of FR-H2 CBFs. *Plant Mol. Biol.* 94:333-347.
10. Iwase, A., Harashima, H., Ikeuchi, M., Rymen, B., Ohnuma, M., Komaki, S., **Morohashi, K.**, Kurata, T., Nakata, M., Ohme-Takagi, M., Grotewold, E., and Sugimoto K. (2017). WIND1 promotes shoot regeneration through transcriptional activation of ESR1 in Arabidopsis. *Plant Cell* 29:54-69.
11. Yang, F., Li, W., Jiang, N., Yu, H., **Morohashi, K.**, Ouma, Z.W., Morales-Mantill, D.E., Cano, F.A.G., Mukundi, E., Prad, L.D., Velazquez, R.A., Valentin, J., Mejía-Guerra, M.K., Gary, J., Doseff, A.I., Grotewold, E. (2017). A maize gene regulatory network for phenolic metabolism. *Mol. Plant* 10:498-515.

[学会発表](計 3 件)

1. Toyama, Y., **Morohashi, K.** An interaction of the multiple gene regulatory networks balances the stochastic variances of the distinct biological activities. International Conference on Arabidopsis Research 2016, Gyeongju, Korea. (2016) 6.29.-7.3.
2. Toyama, Y., Okamoto, S., **Morohashi, K.** Interaction between multiple gene regulatory networks balances stochastic variances in distinct biological activities. Taiwan-Japan Plant Biology 2017, Academia Sinca, Taipei, Taiwan. (2017) 11.3.-11.6.
3. **Morohashi, K.** A dynamics of gene regulatory networks involved in development and metabolism in Arabidopsis. 千葉県野田市・東京理科大学. (2017) 9. 8.-9.10.

〔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〕

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。