

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03753

研究課題名(和文) イネ種子における遺伝子発現制御ネットワークの網羅的解析

研究課題名(英文) The regulatory DNA Landscape in the rice endosperm

研究代表者

川勝 泰二 (Kawakatsu, Taiji)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：30435614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではイネ胚乳における遺伝子発現制御ネットワークの理解のため、332個のイネ転写因子の結合領域およびターゲット遺伝子候補をカタログ化し、イネシストロームリソースを構築した。全転写因子を統合すると約160万の領域に転写因子が結合し、イネゲノムの36%は遺伝子発現制御に関わりうる領域であることが明らかとなった。同じファミリーの転写因子間でも共通のターゲット遺伝子に加えて、異なる機能を持つ遺伝子群をターゲット遺伝子としており、機能分化が可視化された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築したリソースは各研究者が興味を持つ転写因子もしくは転写因子ファミリーが制御する遺伝子を推定することを可能とする。多くの転写因子は胚乳以外の組織でも発現しているため、全てのイネ研究者にとって重要なリソースと考えられる。今後、クロマチンアクセシビリティやヒストン修飾パターン情報と統合することで、より精度の高い遺伝子発現制御ネットワークの構築が可能になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Gene expression regulation plays central roles in all biological processes, such as development and response to environmental signals. Recognition of cis-elements by transcription factors (TFs) fundamentally shapes the gene regulatory networks. Comprehensive collection of TFs and their binding sites is critical for understanding of gene regulatory network in an organism. We presented in vitro TF binding atlas in rice, using DNA affinity purification sequencing (DAP-seq). We transferred >1000 rice TF cDNAs from Gateway entry clones to pIX-Halo vector. DAP-seq identified in vitro binding sites of 332 TFs. TF binding sites spanned 136 Mb, suggesting that 36% of rice genome potentially has gene expression regulatory functions. We also identified distinct recognition motives between closely related TFs. Collectively, we provide the novel resource for deciphering gene regulatory network in rice.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：イネ 胚乳 転写因子 遺伝子発現 物質生産

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

イネ種子成熟は植物の形態形成の基盤となる胚形成と、光合成を開始するまで生育に必要な養分を蓄積する胚乳形成からなる。人類はこの物質生産能力を利用してコメを主食とし、また、組換えタンパク質・ペプチド等のバイオリクターとして利用している。物質生産に特化した胚乳であるが、どのようにしてその物質生産能を得ているのかは不明な点が多い。増加し続ける人口を養うため、二酸化炭素を資源とした有用物質生産の更なる拡大のためには胚乳を理解し、そのポテンシャルを向上させる必要がある。全ての生命現象は遺伝子発現制御ネットワークを基盤としており、これまでにイネ種子貯蔵タンパク質遺伝子やデンプン合成遺伝子の発現を冗長的に制御する bZIP 型転写因子 RISBZ1 と DOF 型転写因子 RPF を同定してきたが (Kawakatsu et al., *Plant J* 2009; *Plant Cell Physiol* 2010) これら以外にイネ胚乳において物質生産に関わる転写因子は報告されていない。これは転写因子間の機能の冗長性と、従来の胚乳特異的に発現している転写因子に絞った逆遺伝学的アプローチが原因であると考えられた。

### 2. 研究の目的

イネ胚乳における遺伝子発現制御ネットワークを理解するためには、イネ胚乳で発現している全ての転写因子を対象に解析を行う必要がある。従来の遺伝学的手法は“特定の遺伝子”発現を制御する転写因子の同定には有効であり、既知の転写因子が持つ、異なる生物学的役割を同定することも可能である (Song et al., *Science* 2016)。しかし全ての遺伝子に対して、どの転写因子によって制御を受けているかを遺伝学的にスクリーニングすることは非現実的である。一方で、次世代シーケンサーの進歩によって、転写因子が制御する遺伝子群を同定することが可能になった。従って、イネ種子で発現する転写因子と、その転写因子が結合し、遺伝子発現を制御するエンハンサー領域をカタログ化することで、効率的に種子成熟の基盤となる転写制御の全容解明に結びつける

### 3. 研究の方法

まず登熟期における胚乳の時系列トランスクリプトームを取得し、胚乳登熟を遺伝子発現の観点から俯瞰する。次に、種子で発現する転写因子が結合する領域をゲノム・トランスクリプトーム上にマッピングすることで転写因子・遺伝子発現制御配列・遺伝子発現間の対応を明らかにする。具体的にはイネ転写因子 cDNA の Gateway クローンライブラリーに含まれている 816 のイネ種子で発現している転写因子について DAP-seq を行い、イネゲノム上に結合する領域を網羅的に同定する。これらを統合することで、胚乳における遺伝子発現制御ネットワークを可視化する。

### 4. 研究成果

#### (1) イネ胚乳登熟期トランスクリプトーム解析

イネ胚乳におけるトランスクリプトーム変動を明らかにするために、開花 5、7、12 日後の胚乳をサンプリングして RNA を抽出し、mRNA-seq を行った。イネ胚乳では 19,199 遺伝子が発現していた。イネ胚乳で発現する遺伝子の内、転写因子をコードする遺伝子は 1,014 個で、その内の 86 個は胚乳で強く発現する傾向があった。

#### (2) イネ転写因子タンパク質発現ベクターライブラリーの構築

DAP-seq を行うためには転写因子タンパク質を無細胞系で合成するプラスミドにクローニングが必要がある。農研機構の市川博士、産総研の光田博士、埼玉大の高木博士らが構築したイネ転写因子 Gateway クローンライブラリーの分譲を受けた。このライブラリーには 5'UTR を一部含む cDNA がクローン化されており、通常の Gateway システムの発現ベクターとフレームが合わない。そこでまず pIX-Halo ベクターを改変し、フレームを 1 つずつずらした pIX-Halo-F0、pIX-Halo-F1、pIX-Halo-F2 を作製した。このベクターでは SP6 プロモーター下流に向けて、N 末に Halo-tag が融合したタンパク質を wheat germ 系で発現することが可能である。次に、イネ転写因子 Gateway クローンを個別に大腸菌で増殖した。カスタムスクリプトを用いてそれぞれの転写因子クローンがどのフレームと適合するか調べ、Gateway クローニングによって 96 穴 x 14 プレーットのイネ転写因子タンパク質発現ベクターライブラリーを構築した。

#### (3) イネシストローム

発芽後 8 日目のイネシュートから抽出したゲノム DNA を Covaris M220 で平均 150bp に断片化し、NEBNext Ultra II library prep kit を用いて DAP-seq のインプットライブラリーを調整した。イネ転写因子タンパク質発現ベクターライブラリーから TNT Wheat germ system (Promega) を用いて Halo-tag 融合転写因子を合成し、MagneHalo ビーズで捕捉後、DAP-seq インプットライブラリーと混合し、転写因子が結合する配列を含むゲノム DNA 断片を濃縮した。Index hopping を避けるため、unique dual index が付加されるように PCR で増幅後、HiSeq4000 の 50SE モードでデータを取得した。Bowtie2 を用いてイネリファレンスゲノム IRGSP-1.0 にマッピングし、gem を用いてピークコーリングを行った。合計で 864 転写因子に

ついて DAP-seq を行い、332 転写因子についてはイネゲノム上の 50 ヶ所以上に結合することを示すピークが検出され、約 40%の成功率であった。全転写因子を統合すると約 160 万の領域に転写因子が結合し、イネゲノム上の 136Mb (36%)は転写因子が結合し、遺伝子発現制御に関わりうる領域であることが明らかとなった(図1)。また、DNA メチル化が濃縮している領域で転写因子の結合イベント数が減少しており、DNA メチル化 が転写因子の結合を阻害していることを示唆している(図1)。

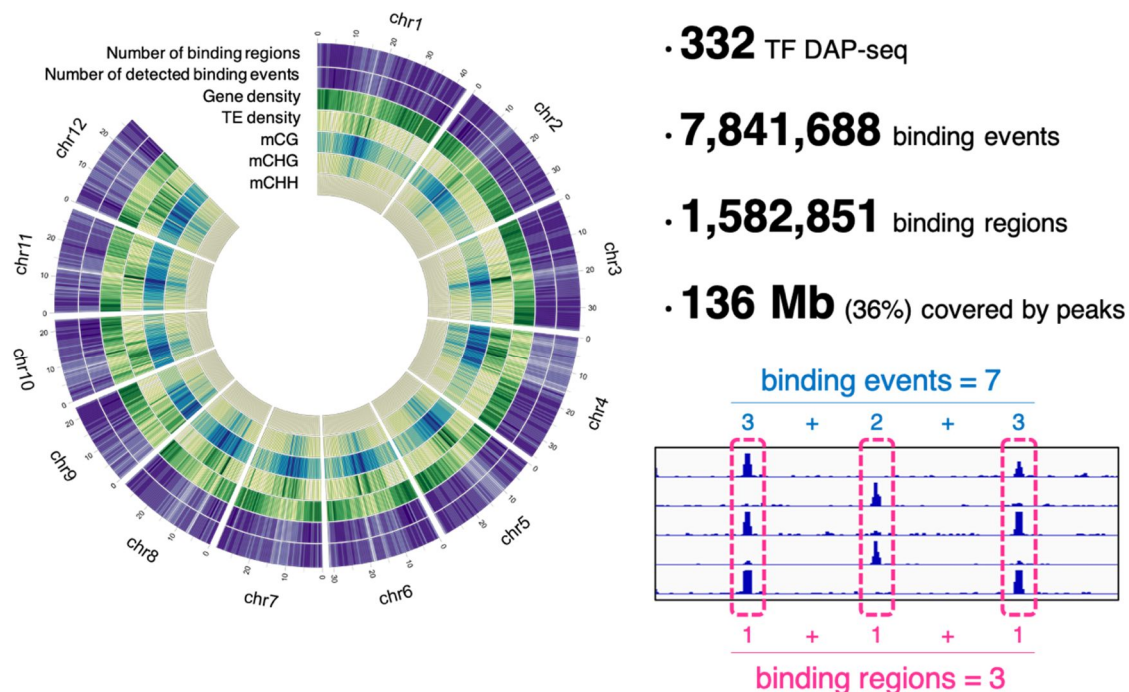


図1. イネ転写因子結合領域の分布  
ゲノムワイドな転写因子結合領域、結合イベント、遺伝子数、トランスポゾン数、DNA メチル化レベル (CG、CHG、CHH コンテキスト) を示す。

同じファミリーの転写因子の結合パターンは似ている一方で、それぞれユニークな結合パターンを示した。一例として 30 個の bZIP 型転写因子の DAP-seq を以下に示す。転写開始点から 2kb 以内の遺伝子を転写因子のターゲット候補とすると、ほぼ全ての bZIP 型転写因子がターゲットとする遺伝子は少数で、それぞれ固有のターゲット遺伝子を持っていた(図2A)。また、ターゲット遺伝子をクラスタリングすると、個々の bZIP 型転写因子が異なる biological process に関わる遺伝子を制御しており、機能分化が進んでいることが示唆された(図2B)。

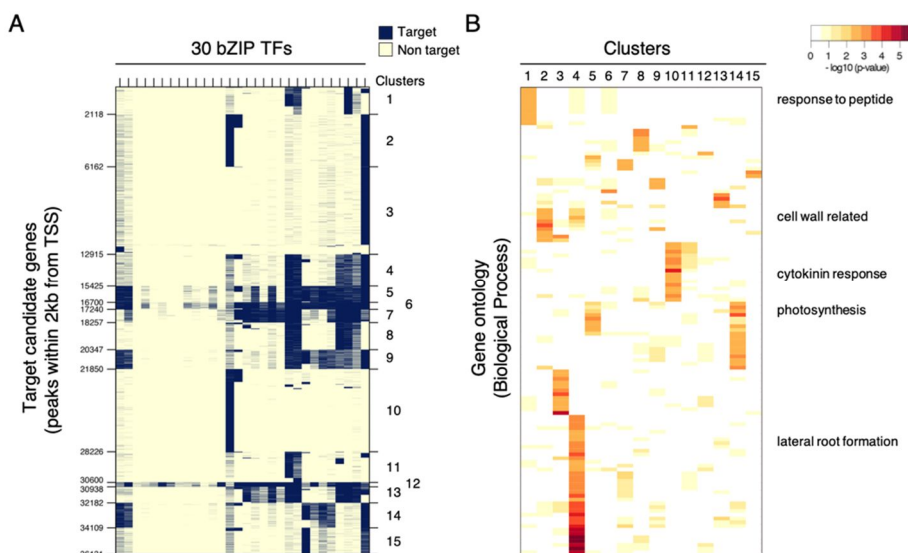


図2. bZIP 型転写因子のターゲット候補遺伝子  
A. bZIP 型転写因子がターゲットとする遺伝子。B. bZIP 型転写因子のターゲット候補遺伝子の gene ontology。クラスター番号は A のクラスター番号に相当する。

ターゲット候補遺伝子情報を元にネットワークを作成すると、22 個の bZIP 型転写因子間で 96 個の制御ノードによる遺伝子発現制御ネットワークが構築された（図 3）。従って、bZIP 型転写因子が複雑な遺伝子発現制御ネットワークを形成することで様々な生命現象のクロストークが行われていることが示唆された。

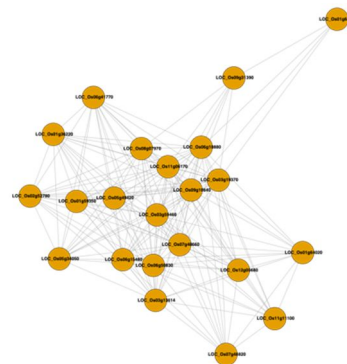


図 3. bZIP 型転写因子による遺伝子発現制御ネットワークの推定

22 個の bZIP 型転写因子（オレンジ丸）が他の bZIP 型転写因子を制御（灰色線）することで遺伝子発現制御ネットワークを形成している。

以上のように、本研究では 332 個のイネ転写因子の結合領域およびターゲット遺伝子候補をカタログ化し、イネシストロームリソースを構築した。このリソースは各研究者が興味を持つ転写因子もしくは転写因子ファミリーが制御する遺伝子を推定することを可能とする。今後、クロマチンアクセシビリティやヒストン修飾パターン情報と統合することで、より精度の高い遺伝子発現制御ネットワークの構築が可能になることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawakatsu Taiji, Ecker Joseph R.	4. 巻 69
2. 論文標題 Diversity and dynamics of DNA methylation: epigenomic resources and tools for crop breeding	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 191 ~ 204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1270/jsbbs.19005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taiji Kawakatsu
2. 発表標題 Rice Transcription Factor Binding Atlas
3. 学会等名 Plant and Animal Genomes XXVIII（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川勝泰二
2. 発表標題 イネENCODE：データ駆動型アプローチによる遺伝子発現制御機構の全容解明に向けて
3. 学会等名 植物科学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川勝泰二
2. 発表標題 データ駆動型アプローチによる遺伝子発現制御ネットワークの解明に向けて
3. 学会等名 第1回つくば植物研究者ネットワーク研究集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	川原 善浩  (Kawahara Yoshihiro)  (30546370)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代 作物開発研究センター・主任研究員    (82111)	