

令和元年6月7日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18223

研究課題名(和文)植物細胞の成熟への転換をつかさどる転写メカニズムの分子イメージング

研究課題名(英文)Imaging for transcriptional network that controls transition of cell maturation in the root

研究代表者

塚越 啓央 (Tsukagoshi, Hironaka)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：30594056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生物の正常な成長には厳密に制御された細胞の機能転換が必須である。本研究では根端での細胞機能転換の鍵となるUPB1の下流で働く転写因子MYB50の機能解析を通じて細胞の成熟に関わる細胞機能転換分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。RNAseq解析からMYB50の標的遺伝子を4つに絞り込んだ。さらにUPB1の発現量を変化させると、それに応じて、MYB50の発現が減少すること、かつMYB50下流遺伝子の発現が有意に減少することがわかった。以上のことから、UPB1がMYB50の発現量を根端で制御し、それに引き続きMYB50がさらに下流にシグナルを伝達して細胞伸長を制御することが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかになった根端の細胞機能転換に関わる遺伝子発現ネットワークを利用し、それらの発現様式を人為的に変化させることで、細胞の機能転換を促すことが可能になり、分化した植物細胞がもつ特有の二次細胞壁成分や貯蔵物質を効率よく生産できる基盤技術の進展につながる。また、本研究過程で構築したイメージング法を応用することで、遺伝子発現と細胞変化を同時に捉えることが可能になり、環境応答マーカーを用いイメージングを行うことで、環境変化をモニタリングするシステムの構築が可能になる。

研究成果の概要(英文)：For normal plant root growth, transition from the cell proliferation to the cell differentiation is a key event. UPB1 is one of the key transcription factor that regulates this event. In this study, we try to reveal gene regulatory network that regulates transition of the cell function through the UPB1 to MYB50 transcriptional network. By using RNAseq transcriptome analysis, we were able to find four MYB50 direct target genes. From analysis of transcription reporter lines of these 4 genes, we found that these four genes expressed in the same cell files of MYB50 at the root tip. The expression of these genes were upregulated by MYB50, on the other hand downregulated in the UPB1 inducible expression lines. These results strongly indicated that MYB50 is an intermediate transcription factor that regulates root growth under UPB1 gene regulatory network.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：遺伝子発現ネットワーク 根端分裂組織 細胞機能転換 根の成長制御 イメージング

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

1. 研究開始当初の背景

高等生物において、異なる組織での細胞の適切な機能転換は正常な生育や発達の上で重要なイベントである。植物根端では細胞分裂により細胞を供給するメリステム領域から、細胞を長軸方向に伸長させる伸長領域への細胞機能転換が根のサイズ決定に重要である。申請者は植物ホルモンとは独立に UPB1 と名付けた転写因子による活性酸素種 (ROS) のホメオスタシスが根端での細胞運命決定に重要であることを発見した (Tsukagoshi et al., 2010)。UPB1 の報告を契機に植物ホルモンとは独立に細胞機能転換が制御されている事例が明らかにされつつある。

分裂から伸長への細胞機能転換のみならず、伸長を停止し、分化を開始する細胞成熟期への細胞機能転換も正常な根の生育に必須である。upb1-1 では細胞長が野生型より長く、UPB1 が伸長から成熟への細胞機能転換にも関わっていると考えられる。伸長を終えた細胞の最外層で細胞強度を保つ細胞壁の構成が変化し、二次壁を形成することが植物細胞成熟の一つの指標となる。マイクロアレイ解析から多くの細胞壁再構築に関わる遺伝子発現変動が upb1-1 で見られた。しかし、UPB1 はこれらの遺伝子のプロモーター上に結合しない。そこで、UPB1 の下流の転写因子が中間因子として細胞壁再構築に関わる遺伝子発現を制御して、伸長から成熟への細胞機能転換に関わっているモデルを立てた。

中間転写因子を UPB1 のトランスクリプトームデータセットと ChIP-chip データセットから検索したところ、MYB50 がその候補として考えられた。MYB50 の発現は伸長領域のどの細胞種でもみられ、かつその機能がわかっていない。また、MYB50 の T-DNA 挿入遺伝子破壊株もなく、ゲノム編集技術などで MYB50 変異体を作成することで、遺伝学的にも新たな知見が得られると考えられた。

2. 研究の目的

生物の正常な成長には厳密に制御された細胞機能の転換が必須である。この過程を制御している UPB1 の転写ネットワークを明らかにすることを第一の目的とした。UPB1 は伸長から成熟への細胞機能転換にも関わる可能性が示唆されている。しかし、UPB1 がこの現象を直接に転写レベルで制御する可能性は低く、中間の転写因子が重要だと考え、その候補として MYB50 を同定した。現在までに (I) MYB50 が細胞成熟の指標である細胞壁再構築にかかわる遺伝子の一つを直接制御、(II) 異所発現により根冠の離脱が遅延することを見出し、さらに (III) 実用的なライブイメージング法を確立している。本研究ではこれらの点をふまえ、MYB50 に着目して、細胞成熟への機能転換をつかさどる転写制御メカニズムを明らかにすることを目的とする。

本申請研究の目的が達成されることで、MYB50 の発現場所やタイミングを人為的に変化させ、未分化な状態の細胞を成熟期に変化させることができる。これにより、成熟期の細胞特有な二次細胞壁成分や貯蔵物質を効率よく生産させることができる基盤技術の進展につながると考えられる。また、このような分子生物学的知見のみならず、簡便でかつ効率の良いイメージング法の確立は将来の発生学研究に大きな利点となる。今まで見過ごされてきたごく短期間での出来事をイメージングにより捉えることが可能になり、また遺伝子発現様式と細胞変化を同時に捉えられるシステムは応用の幅が広い。発生学のみならず、環境等応答マーカーを用いたイメージングを行えるようになれば、環境変化をモニタリングできるシステムの構築が可能になる。

3. 研究の方法

(1) MYB50 が制御する転写ネットワークの解析

I. タイムコース RNA シークエンシング (RNA-seq) を用いたトランスクリプトーム解析

転写因子の機能解析では直接の標的遺伝子の同定が重要である。エストラジオールにより発現を誘導させる XVE システムを用い MYB50 の誘導発現株を作成する。この pXVE-YFP-MYB50 形質転換体を、1, 3, 6, 12, 24 時間エストラジオール誘導し、RNA を抽出する。この RNA を用い RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析を進める。MYB50 の標的遺伝子群の発現はエストラジオール誘導後早い段階で発現変動を示すものと考えられる。

II. ChIP-Seq による MYB50 結合ゲノム領域の同定

MYB50-YFP を発現する形質転換体によるクロマチン免疫沈降-ゲノムシークエンス (ChIP-seq) を行う。申請者は GFP や YFP 融合転写因子を用いた ChIP 法を確立しており (Tsukagoshi et al., Cell, 2010)、さらに、予備実験として MYB50-YFP 発現形質転換体を用いた ChIP-qPCR 法により MYB50 が細胞壁の構築に関わる CTL1 プロモーター上に結合する結果を得ている。

I と II の結果を統合し、RNA-seq 解析で発現が有意に変動し、かつ ChIP-seq 解析でポジティブである遺伝子群を MYB50 の直接の標的遺伝子とする。

(2) MYB50 下流遺伝子の発現様式と根の成長に与える影響の解析

(1) から得られた MYB50 ダイレクトターゲット遺伝子群の根での発現様式、並びに遺伝学的に根の成長に与える影響を調べる。また、MYB50 の遺伝子を破壊した際の根の表現型を調べるために、CRISPR/Cas9 を用いた MYB50 遺伝子編集株を作成する。

(3)タイムラプスイメージングを用いた UPB1-MYB50 転写ネットワークの可視化

UPB1 のエストラジオール誘導発現系を用いて UPB1 から MYB50 といった MYB50 上流の転写ネットワークを可視化する。pXVE-UPB1-GFP 植物を作出済みであるので、この形質転換体を用いたイメージングを行う。特にこの形質転換体に pMYB50-CFP を持つ transcriptional fusion を組み込み、UPB1 から MYB50 への転写制御系を GFP と CFP を用いて可視化する。同時に根の伸長スピードの変化を定量することで、UPB1 が制御する転写ネットワークの時空間制御系を明らかにする。本研究の目的遺伝子ではないが、申請者らは MYB30 を用いたエストラジオール誘導発現系のタイムラプスイメージング、並びに遺伝子発現解析から有用な結果を得ている (Mabuchi et al., 2018)。

4. 研究成果

(1) MYB50 が制御する転写ネットワークの解析

MYB50 のエストラジオール誘導発現株を 5 μ M エストラジオールで 1,3,6 時間処理し、それぞれ根のみから RNA を抽出し illumina GA II を用いた RNAseq 解析を行なった。1,3,6 時間後にコントロールと比較して優位に発現が上昇した遺伝子を検索した ($|\text{Fold Change}| > 2, p \text{ value} < 0.001$)。その結果、エストラジオール処理 3 時間後には 105 遺伝子、6 時間後には 163 遺伝子が見つかった。また、MYB50-GFP を発現する形質転換体を用いた ChIP-seq 解析も行なった。ChIP-seq 解析からは数多くのプロモーター領域に MYB50 が結合している結果が得られた。これらエストラジオール誘導系で発現変動が見られた遺伝子の中でも UPB1 のトランスクリプトーム結果でも発現変動が見られ、ChIP-seq により MYB50 がそのプロモーター領域に結合し、かつ細胞伸長に関連のあると考えられる 4 遺伝子を選抜した。これらの遺伝子の発現は独立したリアルタイム qPCR でも十分に発現変動が見られた。さらに、MYB50 の恒常過剰発現株である 35S-MYB50 形質転換体でもこれらの遺伝子の発現量は上昇していた。これらの結果から MYB50 が転写活性化因子であることが示唆された。また、興味深いことにこれらの遺伝子の発現は UPB1 のエストラジオール誘導発現株ではその発現が抑制されることがわかった。この発現抑制はエストラジオールによる処理時間に依存することより、UPB1-MYB50 標的遺伝子群が発現解析から示すことができた。

(2)MYB50 下流遺伝子の発現様式と根の成長に与える影響の解析

(1) から得られた 4 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、GFP と融合させた transcriptional fusion を作成した。これら、4 遺伝子の cDNA 領域を 35S プロモーター下につないだ過剰発現株を作成した。Transcriptional fusion は 4 遺伝子中 3 遺伝子プロモーターの発現が根で確認され、それらの発現は MYB50 transcriptional fusion とよく似ていた。これらの結果は(1)で選抜した遺伝子群が MYB50 の下流で働いていることを示唆する結果となった。MYB50 の遺伝子破壊株に関して、CRISPR/Cas9 を用いた形質転換体の作成を試みた。研究初年度に作成した MYB50 ゲノム編集ラインでは MYB50 の発現量の変化は見られず、目的とする形質転換体は得られなかった。そこで、ベクターやガイド RNA を異なる配列を用いた CRISPR/Cas9 形質転換体を作成した。T1 世代ではあるが、作成し直した形質転換体では根が短くなる傾向が観察された。この結果は UPB1 過剰発現株で根が短くなる表現系と一致している。

(3)タイムラプスイメージングを用いた UPB1-MYB50 転写ネットワークの可視化

pXVE-YFP-MYB50 発現誘導株を用いたタイムラプスイメージングでは、エストラジオール誘導時間につれて、pXVE-YFP-MYB50 発現誘導株の根の伸長は野生型よりも早くなることがわかった。この結果は MYB50 が根の伸長を正に制御していることを示している。upb1-1 遺伝子破壊株では根が長くなること、MYB50 の発現が上昇していることから本結果は支持される。反対に pXVE-UPB1-GFP 発現誘導株ではエストラジオール処理とともに根の伸長は抑制されていた。この pXVE-UPB1-GFP 発現誘導株に pMYB50-CFP を形質転換し、2 色蛍光によるタイムラプスイメージングを試みた。しかしながら、CFP の発現が弱く、UPB1 誘導後の MYB50 の発現変動を可視化することができなかった。そこで、pMYB50 に CFP を二回繰り返した pMYB50-2xCFP 形質転換体を作成した。

以上(1)から(3)の研究成果から、UPB1 の下流で MYB50 が中間転写因子として働き、根の伸長をコントロールしていることがわかった。さらに MYB50 が制御する下流の遺伝子は細胞伸長に関わるものが存在し、UPB1 からの転写ネットワークがこれらの遺伝子の発現を制御することで根の伸長制御を行っていることを示すことができた。今後はそれら下流遺伝子の細胞伸長に関わる機能を詳細に研究して、細胞壁のリモデリングに着目した MYB50 を中心とした細胞の成熟の制御系を明らかにしていく。また、2 色蛍光タイムラプスイメージングを進め、転写ネットワークの可視化の可能性を実証していく。

<引用文献>

Tsukagoshi H., Busch W., Benfey PN. Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell*, 2010, 143:606-616.

Mabuchi K., Maki H., Itaya T., Suzuki T., Nomoto M., Sakaoka S., Morikami A., Higashiyama T., Tada Y., Busch W., Tsukagoshi H. MYB30 links ROS signaling, root cell elongation, and plant immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2018 **115**: E4710-E4719.

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。