

平成23年 5月 30日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2007～2010
 課題番号： 19510206
 研究課題名(和文)
 シロイヌナズナにおけるケミカルフェノームと新規表現型スクリーニング系の開発
 研究課題名(英文) Feasible study of a phenome analysis using chemicals and a high throughput screening system in Arabidopsis
 研究代表者
 黒森 崇 (KUROMORI TAKASHI)
 独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・研究員
 研究者番号： 80332295

研究成果の概要(和文)： 化合物等を植物体に与えた場合に見られる表現型を多検体同時に探索するために、植物の初期の育成段階である種子の発芽からその後の幼苗育成に注目した。マルチ・タイター・プレート内で発芽育成させた様子を経時的にスキャナーで取り込んで観察することにより、ハイスループットな化合物応答検定試験を確立することができた。また、この手法を実際に遺伝子破壊型変異体リソースであるトランスポゾンタグラインに適用することで、植物ホルモン ABA に高感受性を示す新規変異体を得ることができた。

研究成果の概要(英文)： Conditional phenotypes are mutant phenotypes which can be detected under some stress treatment or environmental conditions. We developed a high throughput assay system to detect the conditional phenotypes for many tagging lines quickly using multi-titer plates. According to image scanning, we could calculate the green parts of each well that is indicating the growth status. By this detection system, we could find a novel ABA hypersensitive mutant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：植物、シロイヌナズナ、ゲノム、フェノーム

1. 研究開始当初の背景

モデル植物シロイヌナズナは遺伝子への挿入変異による変異体リソースが作成できることから、全ての遺伝子に関して遺伝子破

壊系統を確立すること (saturation mutagenesis) が可能である。このことはシロイヌナズナが、変異体を用いることで全遺伝子の機能解析が実現可能な多細胞生物であり、ゲノム的な解析に非常に

有利なモデル生物種であると捉えることができる。一方、変異体リソースを用いたこれまでの研究において形態異常を指標とした網羅的な表現型観察が試みられた例はあるが、目視で見付けることが難しい表現型 (non-visible phenotypes) まで包括的に探索した表現型解析の研究例はない。

2. 研究の目的

本研究課題では、シロイヌナズナの遺伝子破壊型変異系統を用いたフェノーム解析の新たな試みとして、化合物等を与えた条件下で育成させることで環境条件依存的に観察され得る表現型 (conditional phenotypes) を効率的に調べる方法を確立することを目的とした。各遺伝子変異体の生育環境条件によって現れる表現型の探索と、変異体ラインの化合物添加による新規表現型スクリーニング系の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) トランスポゾンタグラインからのホモ挿入変異体 (遺伝子破壊系統) の選別

これまでに作製してきたモデル植物シロイヌナズナのトランスポゾンタグラインを基にして、遺伝子ドリブンな表現型探索を行うための新しい変異体リソースとして、遺伝子破壊型ラインの系統的な確立を行った。トランスポゾンの挿入変異が遺伝子コード領域内にホモの状態が存在する変異体ラインの選別を進めた。

(2) シロイヌナズナの変異体ラインを用いたハイスループット化合物応答試験の構築

化合物等を植物体に与えた場合に見られる表現型を多検体同時に探索するために、ハイスループットな化合物応答試験の構築に向けた検定実験を行った。植物の初期の育成段階である種子の発芽からその後の幼苗育成に関して、マルチ・タイター・プレートにおける生育の様子をスキャナーで取り込んで分析した。得られた画像データはデジタルファイルとして保存する。

(3) 化合物応答の生育試験データの取得と新規変異体の選別

約 2,000 ラインの遺伝子破壊型トランスポゾンタグラインを用いて、植物ホルモン ABA と塩ストレス (NaCl) に関して、各々 3 種類から 4 種類の濃度の存在下での成長段階初期の生育状況データの取得を行った。

4. 研究成果

(1) トランスポゾンタグラインからのホモ挿入変異体 (遺伝子破壊系統) の選別

現在までに、約 2,000 ラインのホモ挿入変異 (遺伝子破壊型) ラインを選抜して種子を使用できるように整えた。

(2) シロイヌナズナの変異体ラインを用いたハイスループット化合物応答試験の構築

当初、目標としていたケミカルフェノームを実現するために様々な溶液や化合物を用いた生物的 (条件的) な表現型を調べる方法の開発に関して、種子発芽から初期育成時期に関してマルチ・タイター・プレートを使うハイスループットなストレス応答試験を構築することができた。

得られたデジタルファイルを用いて、プレートの各ウェル画像を切り取り、画像処理作業によって各植物体の生育状況を定量的データ化できることが分かった。

(3) 化合物応答の生育試験データの取得と新規変異体の選別

実際上記 (2) の方法を用いて遺伝子破壊系統約 2,000 ライン (1) に関する試験データが得られた。さらに、得られたデータセットから植物ホルモンへの感受性が変化する新規変異体を選別することができた。得られた新規変異体については解析を進めており、今回開発したシステムがフェノームデータの網羅的取得だけでなく、有用遺伝子の発見にも有効であることを示すことができた。

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 18 件)

- ① Kuromori T (9 名中 3 番目) Functional compensation of primary and secondary metabolites by duplicate genes in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Biol. Evol. 28, 377-382, 2011, 査読有
- ② Kuromori T, Shinozaki K. ABA transport factors found in *Arabidopsis* ABC transporters. Plant Signal Behav. 5, 1124-1126, 2010, 査読有
- ③ Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular basis of the core regulatory network in abscisic acid responses: sensing, signaling, and transport. Plant Cell Physiol. 51, 1821-1839, 2010, 査読有
- ④ Yuguchi M, Yokouchi T, Tominaga-Wada R, Kuromori T, Shinozaki K, Okada K, Wada T. Phenome analysis of root development in *Arabidopsis*. Plant Biotech. 27, 345-347, 2010, 査読有
- ⑤ Kuromori T (11 名中 4 番目) Toward genome-wide metabolotyping and elucidation of metabolicsystem: metabolic profiling of

- large-scale bioresources. J. Plant Res. 123, 291-298, 2010, 査読有
- ⑥ Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Shimizu H, Sugimoto E, Kamiya A, Moriyama Y, Shinozaki K. ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. Proc. Natl Acad. Sci. USA 107, 2361-2366, 2010, 査読有
- ⑦ Kuromori T (9 名中 4 番目) T-DNA-tagged homozygous lines for nuclear-encoded chloroplast proteins and their systematic phenotype analysis. Plant J. 61, 529-542, 2010, 査読有
- ⑧ Hanada K, Kuromori T, Myoga F, Toyoda T, Shinozaki K. Increased expression and protein divergence in duplicate genes is associated with morphological diversification. PLoS Genet. 5, e1000781, 2009, 査読有
- ⑨ Hanada K*, Kuromori T*, Myoga F, Toyoda T, *Li WH, Shinozaki K. (*equally contri.) Evolutionary persistence of functional compensation by duplicate genes in Arabidopsis. Gen. Biol. Evol. 2009, 409-414, 2009, 査読有
- ⑩ Kuromori T, Takahashi S, Kondou Y, Shinozaki K, Matsui M. Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants. Plant Cell Physiol. 50, 1215-1231, 2009, 査読有
- ⑪ Kuromori T (17 名中 14 番目) PosMed-plus: an intelligent search engine that inferentially integrates cross-species information resources for molecular breeding of plants. Plant Cell Physiol. 50, 1249-1259, 2009, 査読有
- ⑫ Matsuda F, Yonekura-S. K, Niida R, Kuromori T, Shinozaki K, Saito K. MS/MS spectral tag (MS2T)-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. Plant J. 57, 555-577, 2009, 査読有
- ⑬ Kuromori T, Azumi Y, Hayakawa S, Kamiya A, Imura Y, Wada T, Shinozaki K. Homologous chromosome pairing is completed in crossover defective *atzip4* mutant. Biochem. Biophys. Res. Commun. 370, 98-103, 2008, 査読有
- ⑭ Hayashi S, Ishii T, Matsunaga T, Tominaga R, Kuromori T, Wada T, Shinozaki K, Hirayama T. The novel glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like proteins SHV3 and SVLs are pivotal players in cell wall organization. Plant Cell Physiol. 49, 1522-1535, 2008, 査読有
- ⑮ Kuromori T (10 名中 5 番目) A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. Plant Cell. 20, 3148-3162, 2008, 査読有
- ⑯ Ukitsu H*, Kuromori T*, Toyooka K, Goto Y, Matsuoka K, Sakuradani E, Shimizu S, Kamiya A, Imura Y, Yuguchi M, Wada T, Hirayama T, Shinozaki K. (*equally contri.) Cytological and Biochemical Analysis of *COF1*, an *Arabidopsis* Mutant of an ABC Transporter Gene. Plant Cell Physiol. 48, 1524-1533, 2007, 査読有
- ⑰ Tian C, Chikayama E, Tsuboi Y, Kuromori T, Shinozaki K, Kikuchi J, Hirayama T. Top-down phenomics of *Arabidopsis thaliana* - metabolic profiling by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance SPECTROSCOPY and transcriptome analysis of albino mutants. J. Biol. Chem. 282, 18532-18541, 2007, 査読有
- ⑱ Kuromori T (11 名中 5 番目) Multiple loss-of-function of *Arabidopsis* gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. Plant J. 50, 958-966, 2007, 査読有
- [学会発表] (計 4 6 件)
- ① Shinozaki K. Regulatory gene network in early responses to drought stress. Plant Abiotic Stress Tolerance Mechanisms, Water and Global Agriculture (Keystone Symposia), 17-21 January 2011, Colorado, USA
- ② Doi K. Development of a database focusing phenome of *Arabidopsis thaliana* on RIKEN SciNeS. 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸
- ③ Kuromori T. ABA transport and the functional factors found in *Arabidopsis* ABC transporters. From Plant Biology to Crop Biotechnology (2010 Cold Spring Harbor Asia Conference), 25-29 October 2010, Suzhou, China
- ④ Shinozaki K. AtABCG25 is an ABC transporter involved in abscisic acid transport and response. Plant Biology 2010, 31 July to 4 August 2010, Montreal, Canada
- ⑤ Kuromori T. Arabidopsis AtABCG25 is an ABC transporter involved in ABA transport and responses. 20th International Conference on Plant Growth Substances (IPGSA), 28 June to 2 July 2010, Tarragona, Spain
- ⑥ Kuromori T. ABC transporter AtABCG25 involved in ABA transport and responses. International Conference on Arabidopsis

Research (ICAR 2010), 6-10 June 2010, Yokohama, Japan

- ⑦ Doi K. RIKEN SciNES: A semantic-web database integrating phenome of *Arabidopsis thaliana*. International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2010), 6-10 June 2010, Yokohama, Japan
- ⑧ Doi K. セマンティックウェブを利用したシロイヌナズナの表現型および関連情報の統合の試み、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9-12日、横浜
- ⑨ Makita Y. PosMed-plus: An information system making the utmost use of Arabidopsis knowledge to assist molecular breeding of crops. International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2009), June 30 to July 4, 2009, Edinburgh, UK
- ⑩ Kuromori T. Systematic phenotype analysis of *Arabidopsis* *Ds*-tagged mutants to unravel gene functions in abiotic stress response as well as growth and development. International Symposium on Induced Mutations in Plants (ISIM), 12-15 August 2008, Vienna, Austria
- ⑪ Kuromori T. Cytological and biochemical analysis of Arabidopsis mutants of ABC transporter gene COF1/WBC11. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会)、2007年12月11-15日、横浜
- ⑫ Kuromori T. A mutant-based phenome analysis and collection of mutant phenotype information. International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2010), 20-23 June 2007, Beijing, China

[図書] (計2件)

- ① Kuromori T, Hirayama T. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Molecular Plant Biology Handbook Series, The Handbook of Plant Mutation Screening: Mining of Natural and Induced Alleles. (Chapter 2) *Ds* transposon mutant lines for saturation mutagenesis of the *Arabidopsis* genome. 2010, pp17-30
- ② Kuromori T, Shinozaki K. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Induced Plant Mutations in the Genomics Era. Systematic phenotype analysis of *Arabidopsis* *Ds*-tagged mutants to unravel gene functions in abiotic stress response as well as growth and development. 2009,

pp131-133

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①

名称: アブシジン酸輸送タンパク質を過剰発現する植物及びその作出方法

発明者: 黒森 崇、篠崎 一雄

権利者: (独) 理化学研究所

種類: 特願

番号: PCT / JP2010 / 073664

出願年月日: 2010年12月21日

国内外の別: 国外

②

名称: アブシジン酸輸送タンパク質を過剰発現する植物及びその作出方法

発明者: 黒森 崇、篠崎 一雄

権利者: (独) 理化学研究所

種類: 特願

番号: 2009-289457

出願年月日: 2009年12月21日

国内外の別: 国内

[その他]

プレスリリース

2010年1月19日

乾燥耐性を誘起する植物ホルモン「アブシジン酸」の輸送因子を発見

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2010/100119/index.html>

ホームページ

http://labs.psc.riken.jp/gdrg/index.html#g_project2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒森 崇 (KUROMORI TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・研究員

80332295

(2) 連携研究者

能年 義輝 (NOTOSHI YOSHITERU)

独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究チーム・客員研究員

70332278

明賀 史純 (MYOUGA FUMIYOSHI)

独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・研究員

10342859