

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15818

研究課題名(和文) イネ茎頂メリステムでの直接制御標的の同定によるフロリゲン機能の解明

研究課題名(英文) Understanding florigen function by identifying direct regulatory targets in the rice shoot apical meristem

研究代表者

肥後 あすか (Higo, Asuka)

名古屋大学・高等研究院(遺伝子)・特任助教

研究者番号：70812387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物の地上部組織の幹細胞を含む茎頂分裂組織(SAM)を高純度で単離できるイネに対して、微小器官でのオミクス解析手法を応用することで、花成ホルモン(フロリゲン)の制御標的の網羅的な同定を機能の場であるSAMで行い、花成誘導機構の詳細を明らかにすることを目指した。本研究では、まずSAMでのDNAメチル化動態を解析し、花成の際のエピゲノム動態に関する特徴を明らかにし論文として発表した。また、Cel-seq2法を用いて、花成前後の様々な発生段階にある単一のSAMにおけるトランスクリプトーム解析を実施することで、花成前後の遺伝子発現変動について、既存のものよりも時間解像度の高いデータを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりSAMでの花成誘導に特徴的なエピゲノム動態を見出したことから、エピゲノム動態という新たな視点からの花成研究の切り口を提示することとなった。また、本研究で得られたトランスクリプトームデータは、既存のデータよりも時間分解能が高いことから、これまで着目されていなかった花成開始関連遺伝子が同定されることが期待される。このような新規の制御点・制御遺伝子は、花成を人工的に操作する化合物等のスクリーニングの新規標的となりうることから、これまでとは異なる花成制御物質の創出につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：I aimed to comprehensively identify regulatory targets of florigen in the SAM, the site of florigen function to clarify the details of floral transition induction mechanisms. I tried to apply omics analysis approach with limited materials to rice from which shoot apical meristem (SAM) containing stem cells of above-ground plant tissues can be isolated with high purity. In this study, I first analyzed DNA methylation dynamics in the SAM to characterize the epigenomic dynamics during floral transition and published the results in a paper. Next, I performed the transcriptome analysis in a single SAM at various developmental stages before and after floral transition by using the Cel-seq2 method and obtained the transcriptome data with higher temporal resolution than existing ones.

研究分野：植物発生学

キーワード：茎頂分裂組織 花成 花成ホルモン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

適切な時期に花芽形成を開始 (花成)し種子を実らせることは、植物が繁殖するために重要であるとともに、農業において安定した収量を得るために重要な過程であると言える。花成の時期と花序形態には密接な関係が見られることから、適切な花成時期の制御の重要性は示される。花成ホルモンであるフロリゲンはSAMにおいて転写因子FDと14-3-3タンパク質との転写活性化複合体を形成し機能することで、葉を分化している栄養成長相SAMから花芽を分化する生殖成長相SAMへと形質の転換を引き起こす。花成開始のメカニズムを理解するためには、フロリゲンの制御標的をゲノムワイドに同定することが不可欠である。しかし、フロリゲンの機能の場であるSAMが微小な器官であるために、ChIP-seq法など多量な資料を必要とする従来の手法によってフロリゲンの制御標的を網羅的に同定することは困難であった。そのために、他の植物ホルモンと比較して、フロリゲンの制御する花成開始に関わるシグナリング経路の理解は進んでいなかった。

#### 2. 研究の目的

本研究課題では、SAMを短時間かつ高純度で単離することが可能であるイネを材料として、新たに開発された微小器官でのタンパク質-DNA間相互作用を検出する技術であるChIL-seq法および微量サンプルでのトランスクリプトーム解析が可能であるCell-seq2法を合わせて用いることで、フロリゲンの機能の場であるSAMでの制御標的の網羅的な同定を行うことを通して、SAMでの花成誘導機構の詳細を明らかにすることを目指した。

#### 3. 研究の方法

植物での研究例がなかったため、はじめにChIL-seq法の実験条件の検討を行なった。確立した手法を用いてイネのフロリゲン遺伝子とGFPの融合タンパク質(Hd3a-GFP)を発現する形質転換イネの単離SAMを用いたChIL-seq法により、イネゲノムにおいてフロリゲンを含む転写活性化複合体が結合する領域を網羅的に同定することを計画した。さらに、RNA-seq解析により発芽から花成前および花成後の単離SAMにおけるトランスクリプトームを比較し、花成時に発現上昇する遺伝子を解析した。single cellでRNA-seqを行うために開発された手法であるCell-seq2法により単離した単一のSAMからライブラリー調製を行い、RNA-seq解析を実施した。得られたデータを合わせて解析することで、フロリゲンの制御標的遺伝子を網羅的に同定することを目指した。

#### 4. 研究成果

単離したイネのSAM (図1)についてタンパク質-DNA間の相互作用をゲノムワイドに同定するためにChIL-seq法の条件検討を進め、さらにCell-seq2法により様々な発生段階にある1つずつの単離したイネのSAMについてトランスクリプトーム解析を実施した。また、単離したSAMでのDNAメチル化動態を発芽から花成前、花成後について経時的に解析した。

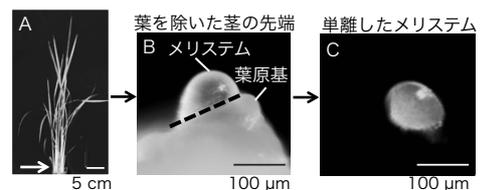


図1 イネのSAMの単離方法

イネのSAMは葉の付け根(A、矢印)に位置する。実体顕微鏡下で、メスを用いて葉を外側から剥がし、茎の先端に位置するSAMを露出させる(B)。露出したSAMを点線部分で切り取り、解析に用いた(C)。

### (1) SAMでのDNAメチル化動態の解析

葉で発現したフロリゲンが到達して機能する場であるSAMにおけるDNAメチル化状態を栄養成長相と生殖成長相とで比較し、花成の際のエピゲノムの動態に関する特徴(図2)を明らかにし論文として発表した [Higo at al. 2020 Nature Commun.]. DNAメチル化状態は、ヒストン修飾状態・クロマチンの高次構造に

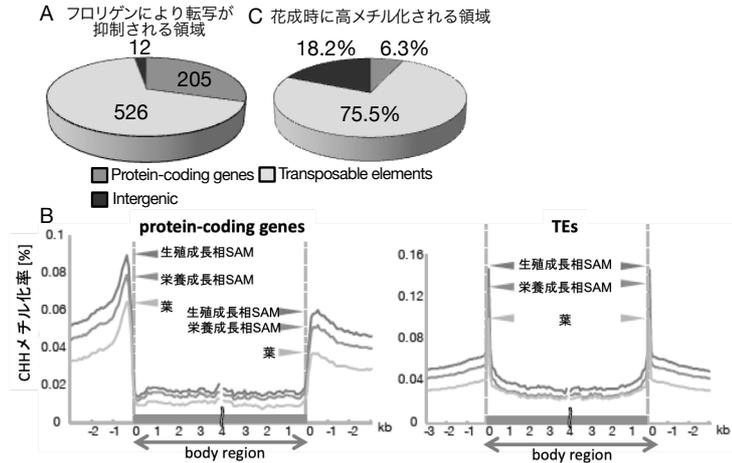


図2 SAMでの遺伝子発現 (A)およびDNAメチル化の動態 (B, C)

寄与するなどして、遺伝子の転写制御にも関連することから、得られた結果は、今後、フロリゲンの転写制御標的を探索する際に、有用な情報となることが期待される。

### (2) 単離したイネSAMでのChIL-seq法の実験系の確立

植物での実施例がなかったChIL-seq法を植物の研究にも利用できるように、実験系の検討を行った。申請期間内では、バッファの交換を複数回繰り返す必要がある中で、微小なSAMを失わないための技術的な改善点がわかったが、最終的にシーケンスするためのライブラリーを得ることはできていない。大量に調整した植物の単離核に対してChIL-seqを実施した結果が論文として報告されたので、論文中で行われている実験の方法を参考にし、今後さらに改善していく必要がある。

### (3) Cel-seq2法を用いた単離したイネSAMでのトランスクリプトーム解析

トランスクリプトーム解析では、発芽から花成前、花成後までのイネのSAMを経時的にサンプリングし解析対象とした。見た目の発達段階(葉数)だけでは、SAMの発生段階を正確に捉えることできないために、複数のSAMをまとめて解析していたこれまでの発現データでは、正確な発生段階毎のSAMの遺伝子発現情報がえられていなかった。本研究では1つずつのSAMについて発現解析を行ったことで、花成前後の遺伝子発現についてこれまで以上に高い解像度の情報を得ることができた。トランスクリプトームデータから、(1)で述べたSAMで花成前後でCHH配列(HはA, T, Cのいずれか)のメチル化率が上昇する原因を探るために、CHHメチル化に関わる因子の発現パターンを調べた。その結果、CHHメチル化に関わる主要な因子をコードする遺伝子の発現量が、栄養成長の途中で上昇することを見出した。花成前後のトランスクリプトームデータを解析する中で、一群の特徴的なタンパク質をコードする遺伝子が多数の発現上昇していることを見出した。被子植物であるシロイヌナズナの相同遺伝子について、公開されているトランスクリプトームデータをもとに花成前後で発現変化を検証すると、イネで見出したのと同様に発現が上昇する遺伝子が多数あった。これらの結果をもとに、今後新たな研究を展開するきっかけを見出すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Higo Asuka, Saihara Noriko, Miura Fumihito, Higashi Yoko, Yamada Megumi, Tamaki Shojiro, Ito Tasuku, Tarutani Yoshiaki, Sakamoto Tomoaki, Fujiwara Masayuki, Kurata Tetsuya, Fukao Yoichiro, Moritoh Satoru, Terada Rie, Kinoshita Toshinori, Ito Takashi, Kakutani Tetsuji, Shimamoto Ko, Tsuji Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 DNA methylation is reconfigured at the onset of reproduction in rice shoot apical meristem	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-17963-2	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 -

1. 著者名 Behnam Babak, Higo Asuka, Yamaguchi Kaho, Tokunaga Hiroki, Utsumi Yoshinori, Selvaraj Michael Gomez, Seki Motoaki, Ishitani Manabu, Ceballos Hernan, Lopez-Lavalle Luis Augusto Becerra, Tsuji Hiroyuki	4. 巻 106
2. 論文標題 Field-transcriptome analyses reveal developmental transitions during flowering in cassava (Manihot esculenta Crantz)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 285 ~ 296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11103-021-01149-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 肥後あすか
2. 発表標題 茎頂分裂組織の成長相転換におけるエピゲノムの動態 ~ 生殖細胞の分化の理解に向けて ~
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------