

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05531

研究課題名（和文）細胞質局在型アイソフォームを利用した新奇育種素材の開発

研究課題名（英文）Development of novel breeding materials using cytosol-localized isoforms

研究代表者

牛島 智一（Ushijima, Tomokazu）

摂南大学・農学部・准教授

研究者番号：50815058

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）：本研究は、イネにおいて、光依存的な転写開始点制御によって生じる細胞質局在型アイソフォームの過剰発現体や欠損変異体を作成し、細胞質局在型アイソフォームの機能を明らかにすることで、当該遺伝子の育種素材としての評価を行うことを目的として行った。その結果、イネにおいて光依存的な転写開始点変化が生じることを改めて確認した。そこで当該制御で生じる細胞質局在型アイソフォームを解析するためのベクターを構築した。そして作製したベクターに解析候補遺伝子をクローニングすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は赤色光依存的に転写開始点の選択が変化し、その結果生じるタンパク質の局在が変化するという新しい知見に基づいて行った。その結果、イネにおいても当該制御で新奇の細胞質局在型タンパク質が生じることが再確認された。これらの細胞質局在型タンパク質は環境ストレスの低減に働くと考えられることから、当該制御で生じる細胞質局在型タンパク質の機能を明らかにすることで、環境変動に対する育種に有効な遺伝子の発見につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to generate overexpressors and deficient mutants of cytoplasm-localized isoforms produced by light-dependent transcription start site regulation in rice, to clarify the function of the cytoplasm-localized isoforms, and to evaluate these genes as breeding materials. As a result, we confirmed again that light-dependent transcriptional start site changes occur in rice. Therefore, we constructed a vector to analyze the cytoplasm-localized isoforms generated by this regulation. We were able to clone the candidate genes into the vector.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：環境ストレス応答 細胞質局在型アイソフォーム 光応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の主要な光受容体であるフィトクロムは、赤色光依存的に PIF と呼ばれる転写因子群を阻害し、その 2,000 ほどの標的遺伝子の転写量を変化させることで、植物の様々な光応答を引き起こすと考えられている。

しかし、mRNA の 5' 末端配列だけを次世代シーケンサーによって解読する TSS-seq 解析により、転写開始点の位置と発現量をシロイヌナズナにおいて網羅的に解析した結果、フィトクロムが、上記の転写量制御に加えて、さらに別の 2,000 を超える遺伝子に対して直接働きかけ、転写開始点を制御することで、mRNA の 5' 末端の長さを変化させ、その結果、およそ 400 ものタンパク質の細胞内局在が光依存的に変化することを発見した (Ushijima et al. *Cell* 2017)。

ここで興味深いことに、当該制御を受けるタンパク質の大部分において、N 末端に存在する、特定の細胞内小器官への移行シグナル配列が失われることで、ある光条件にて細胞質局在型アイソフォームが生じる。

光呼吸に必須なグリセリン酸キナーゼは、これまで葉緑体にのみ局在すると考えられてきたが、フィトクロムによる転写開始点制御により、日陰条件にて細胞質局在型のアイソフォームが発現し、光呼吸の細胞質バイパス経路を構成することで、変動光条件における光阻害を低減させる (Ushijima et al. *Cell* 2017)。これは、木漏れ日による変動光に曝される可能性の高い日陰条件への適応機構であると考えられる。

このように、これまで特定の細胞内小器官にしか局在しないと考えられていたタンパク質について、当該制御により N 末端のシグナル配列が失われることで、機能未知の細胞質局在型アイソフォームがある光条件において出現し、それらが様々な光環境への植物の適応に働くことが明らかとなった。

そこで同様の制御機構が他の植物種においても存在するのかを明らかにするため、栽培植物であるイネにおいて光依存的な転写開始点の変化を TSS-seq 解析により網羅的に解析した。その結果、当該制御機構によってイネにおいても細胞質局在型アイソフォームが生じることが明らかとなった。

このことから当該制御機構によって生じる新奇細胞質局在型アイソフォームの育種利用を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、機能未知の細胞質局在型アイソフォームを利用した新奇育種技術の開発を目指し、まず申請者がイネにおいて同定した、光依存的な転写開始点制御によって生じる細胞質局在型アイソフォームの機能を明らかにし、細胞質型アイソフォームの育種素材としての評価と利用を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

研究項目 細胞質局在型アイソフォームの過剰発現体の作成および育種利用のための評価

光依存的な転写開始点変化によって、コードするタンパク質の N 末端のアミノ酸配列が変化することが明らかとなったイネ遺伝子について短い転写産物由来の cDNA を形質転換によりイネ標準品種で過剰発現させ、カルスから再生した T0 植物の表現型を観察することで細胞質局在型アイソフォームの機能を網羅的に解析するため、過剰発現用のベクターを作製した。また作製したベクターに候補遺伝子を導入するコンソトラクションを行った。候補遺伝子を含む過剰発現ベクターを使用してアグロバクテリウム法によりカルスへの形質転換を行い、イネ過剰発現体の作製を試みた。

候補遺伝子選抜のため、日本晴およびフィトクロム欠損変異体について CAGE-seq 解析を行い、フィトクロムを介した光依存的な転写開始点選択制御を受ける遺伝子の解析を行った。

研究項目 細胞質局在型アイソフォームの欠損変異体の作成および育種利用のための評価

光依存的な転写開始点変化によって、コードするタンパク質の N 末端のアミノ酸配列が変化

することが明らかとなったイネ遺伝子について機能を欠損したイネ変異体候補を MiRiQ Database (Kubo et al. 2024)を用いて探索し、変異について解析を行った。

4. 研究成果

研究項目

本研究でターゲットとする細胞質局在型アイソフォームは、自然条件における急な環境の変化に俊敏に応答するために、敢えて mRNA やタンパク質の安定性が低く保たれている可能性があるため、導入した遺伝子由来の mRNA やタンパク質の安定性を高め、過剰発現を可能にする目的で、GFP タンパク質を N 末端に融合するよう設計した。しかし、導入する遺伝子によっては GFP タンパク質の融合位置により機能が阻害される可能性がある。そこで、多くの細胞質局在型アイソフォームの機能を確実に解析するために C 末端に GFP タンパク質を融合したベクターも作製した。具体的には N 末端融合用、C 末端融合用それぞれについて、トウモロコシのユビキチンプロモーター(ZmUbi1P): GFP 遺伝子: Nos ターミネーターのカセットを作製した。このカセットには候補の cDNA を in-fusion または NEBuilder を利用してのコンストラクションを可能にするため、GFP 遺伝子と Nos ターミネーター (図 1) または ZmUbi1 プロモーターと GFP 遺伝子 (図 2) の間に BlnI (AvrII) (認識配列 CCTAGG) を導入した。これによりハイスループットのコンストラクションが可能なベクターを構築することができた。

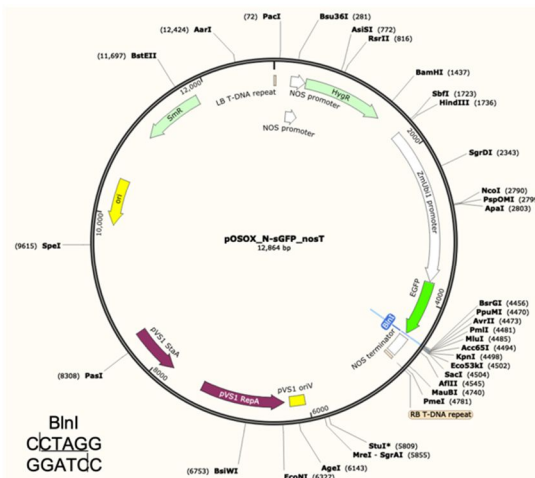


図 1 イネ過剰発現用ベクター (N末端GFP融合)

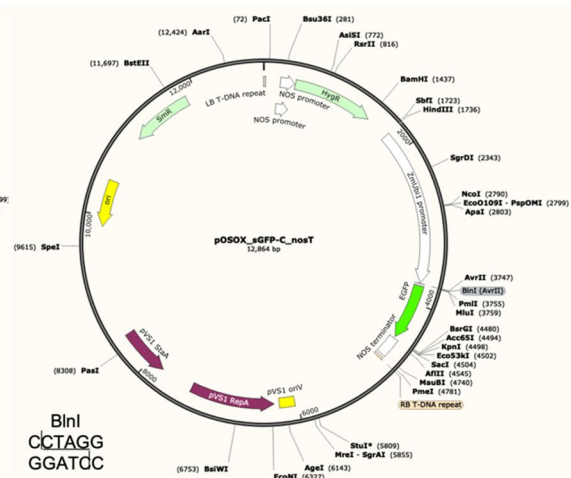


図 2 イネ過剰発現用ベクター (C末端GFP融合)

次にフィットクロムを介した赤色光依存的転写開始点選択制御を受ける遺伝子から解析候補遺伝子の選抜を行った。解析候補遺伝子の選抜は 4 日目の芽生えを 3 時間の赤色光照射または暗所で生育させたサンプルを用いて CAGE-seq を行い、得られたデータから赤色光依存的 (図 3 比較) かつフィットクロム依存的 (図 3 比較) な遺伝子リストから行った。本研究では局在が変化すると予想される全ての遺伝子を対象とするが、実験系構築のためまずフィットクロム介した赤色光依存的な転写開始点選択の変動が大きかった 17 遺伝子を選抜した。

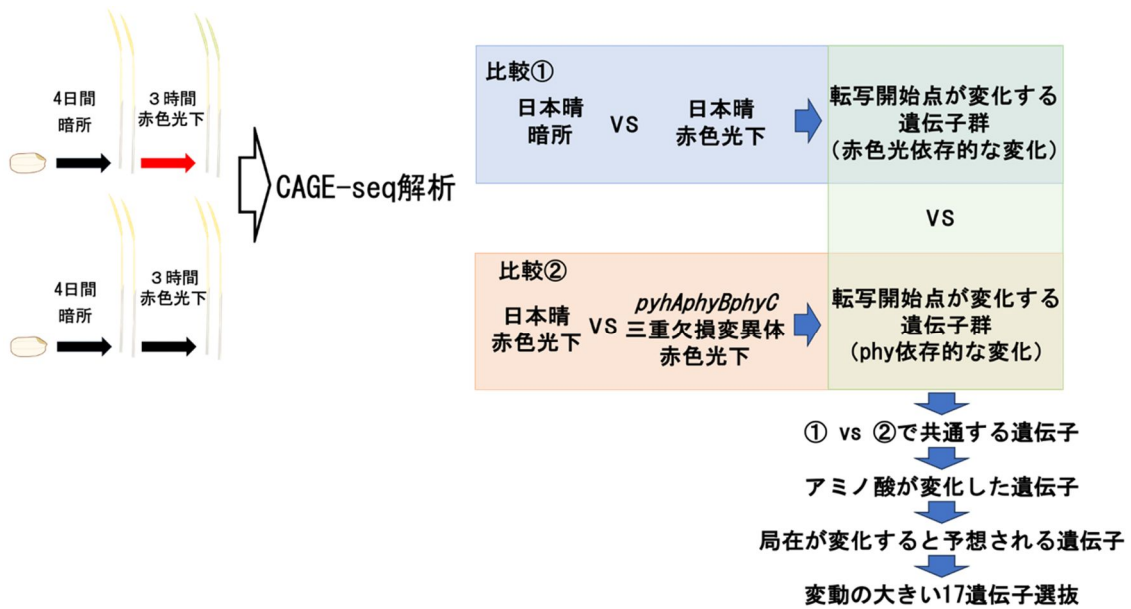


図3 解析候補遺伝子の選抜

選抜した遺伝子の3'側に存在する転写開始点に存在するATGを含む配列に5' GTGTTACTTCTGCAGACTAGACCTAGG3'、終止コドン側に5' TCCTCCTCCACGCGTCACGTGCCTAGG3'の配列を付加したプライマーを作製し、候補遺伝子のPCRを行った。その結果、明所または暗所のサンプルのいずれかでPCR産物が得られた遺伝子は10遺伝子であった(図4)。

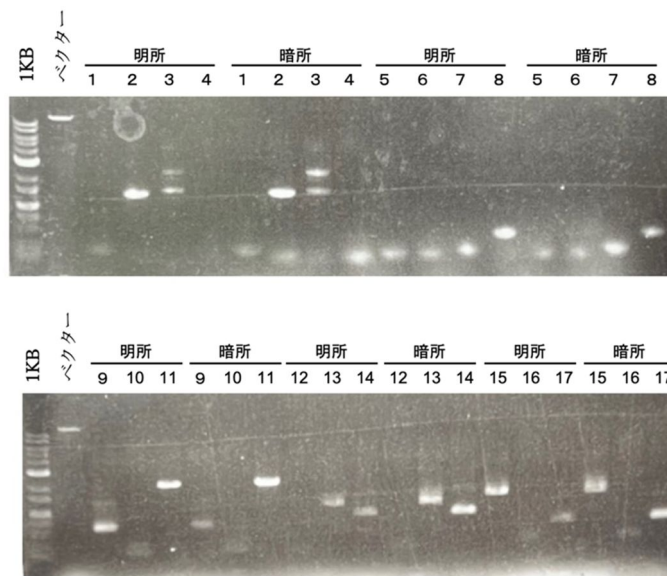


図4 候補遺伝子のPCR産物

これらの10遺伝子についてNEBuilder(NEB)を用いて過剰発現用ベクターへの導入を試みた。しかし大腸菌への形質転換を行ったところポジティブなコロニーは得られなかった。これは今回用いた大腸菌のコンピテントセルの組成とNEBuilderで作製したサンプルに含まれる試薬の組成が原因であると考えられた。そこでNEBuilderで得られた産物の希釈系を作製し、再度大腸菌への形質転換を試みた。

その結果 8 遺伝子についてポジティブなコロニーを得ることができた (図 5)

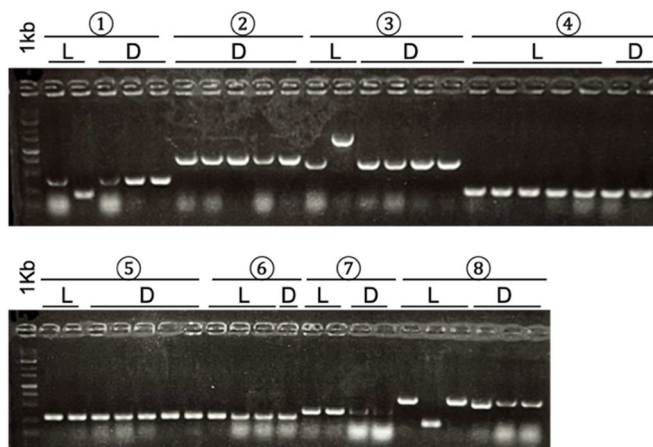


図 5 候補遺伝子のコロニーPCR

これら 8 遺伝子についてアグロバクテリウムを用いて日本晴カルスへの形質転換を試みたが、現在のところ再分化に至っていない。

今後、本研究で作製した過剰発現用ベクターを使用して形質転換体の作製を進めることで、有用な遺伝子の発見につながることを期待される。

研究項目

光依存的な転写開始点変化によって、コードするタンパク質の N 末端のアミノ酸配列が変化することが明らかとなったイネ遺伝子から、研究項目 で選抜した解析候補遺伝子を中心に機能を欠損したイネ変異体候補を MiRiQ Database (Kubo et al. 2024) を用いて探索した。その結果 2 つの遺伝子について欠損の可能性がある変異体が存在したため、取り寄せて栽培を行った。その結果、NIM074 系統では密穂、NIM211 では細桿で小分けつの表現型が認められた。しかし表現型を示した個体の塩基配列をシーケンスにより解析したところ、候補遺伝子内に変異は認められなかった。

MiRiQ Database は本研究使用時からさらに情報が更新されているため、探索する遺伝子候補を拡げることで目的の変異体が得られると考えられる。

本研究で得られた知見や作製したベクターは遺伝子の新規機能の解明に寄与すると考えられ、新品種の開発に貢献す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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeda T, Shirai K, Kim Y, Higuchi-Takeuchi M, Shimizu M, Kondo T, Ushijima T, Matsushita T, Shinozaki K and Hanada K	4. 巻 111
2. 論文標題 A de novo gene originating from the mitochondria controls floral transition in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 p189-203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11103-022-01320-6	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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牛島智一
2. 発表標題 新奇細胞質局在タンパク質の育種利用に向けた基盤づくり
3. 学会等名 第18回けいはんな地区植物科学談話会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------