

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月14日現在

機関番号：24402
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22510205
 研究課題名（和文） T-DNAラインの物性フェノーム解析によるシロイヌナズナのゲノム機能解明
 研究課題名（英文） Arabidopsis functional genomics by mechanical property-based phenotypic analysis of T-DNA insertion lines
 研究代表者
 保尊 隆享（HOSON TAKAYUKI）
 大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号：70135771

研究成果の概要（和文）：シロイヌナズナ純系T-DNA挿入ラインを対象として、胚軸の物性を形質指標とするフェノーム解析を行った。網羅的な解析の結果、従来は関与が全く考えられていなかった新規遺伝子多数が、物性制御において重要な働きをすることがわかった。また、物性変化を生ずる可能性が高い遺伝子のラインを対象とした選択的な解析により、これらの遺伝子の機能が検証できた。さらに、成長形質と物性との変化の違いや生育環境による影響も明らかにになり、植物の柔軟かつ複雑なゲノム機能制御の実態が示された。

研究成果の概要（英文）：We conducted functional genomics in Arabidopsis by phenotypic analysis of hypocotyls of T-DNA insertion lines with the mechanical properties as a measure. By comprehensive random analysis, we identified a new group of genes that are involved in regulation of the mechanical properties. We also confirmed, by selective analysis, the function of genes that have been assumed to be responsible for regulation of the mechanical properties. The differences in modifications to growth properties and to the mechanical properties by T-DNA insertion, as well as prominent effects of environmental conditions on growth and mechanical properties, show flexible and complex regulation of genomic functions in plants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学、ゲノム生物学

キーワード：ゲノム、植物

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナなどの植物の全ゲノム塩基配列が決定されて以来、個々の遺伝子の機能と遺伝子間の相互作用の解明が植物ゲノム科学の主要な目標となっている。そのために、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロ

ーム解析が進められ、続いて個体形質（フェノーム）の解析による各遺伝子機能の網羅的解析が行われつつある。このようなフェノーム解析を有効に進めるためには、遺伝子の機能を正しく評価できる指標を見いだす必要がある。しかし、従来用いられてきたのは、形

態や成長量など取り扱いが容易な可視的表現型であり、顕著な形質変異が起る場合以外は、機能を正しく把握するのに限界があった。研究代表者は、植物ホルモンや環境シグナルによる植物の形態や成長の調節機構を長年研究しており、その過程で、「物性」が植物体の生理状態を最も直接的に反映することを見いだした。すなわち、植物体の代謝や生理活性の変化の多くは、最終的に物性の変化を介して発揮されている。このような物性をフェノーム解析の指標として用いることにより、各遺伝子の機能を体系的に理解することが可能になる。

植物体のフェノーム解析におけるもう1つの問題は、信頼の置ける変異体ラインが利用できなかったことである。これまでも、ゲノム機能解明のための有力な手段として、各遺伝子のノックアウトあるいはノックオンラインの作出、開発が行われてきた。しかし、大部分のラインでは、挿入タグの欠失や変異、あるいは交配の不安定性の結果、各系統の変異の信頼性が低く、網羅的な解析に使用しにくかった。この問題に対処するため、SALK 研究所では、純系 (confirmed, homozygous) T-DNA 挿入ラインの整備を進めており、2008 年以降 ABRC より順次提供され始めた。研究代表者は、ABRC との契約に基づいて、全ラインを確保している。このラインの物性を網羅的に解析し、物性変化をもたらす機構を明らかにすることを通して、シロイヌナズナのゲノム機能の全容が解明できる。

2. 研究の目的

フェノーム解析はゲノム機能解明のための有効な手段であるが、従来の可視的表現型を用いる解析では、植物ゲノムの機能を正しく把握するのに限界があった。本研究の目的は、植物体の生理状態を直接的に反映する「物性」を新たな形質指標として導入し、シロイヌナズナのゲノムの機能を明らかにすることにあつた。そのために、SALK 研究所で整備が進められつつある純系 T-DNA 挿入ラインを提供状況に合わせて入手し、その芽ばえの胚軸の物性を予備実験で確立した手法に基づいて網羅的に解析することにした。物性変化を示したラインについては、変化を誘導する機構を生理、生化学的に解析した。各遺伝子の変異と物性との関

連が明らかになれば、植物の種々の生理機能の調節において重要な働きをする遺伝子を特定でき、それら遺伝子間の相互作用解明の糸口も得られる。T-DNA は上流領域やイントロンにも挿入されているので、ORF 以外の領域の機能解明にも貢献する。これらを通して、今まで機能が全く不詳であった遺伝子について、その機能を明らかにできる。以上のアプローチにより、シロイヌナズナのゲノム機能の包括的な理解をめざした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、解析を効率的に進めるため、試料を得るまでの時間とスペースが最小限ですむ胚軸を試料とし、その物性を解析した。まず、ABRC より入手した4種類の種子セット (CS27941, CS27942, CS27951, CS27952) より SALK No. に基づいて使用ラインをランダムに選択した。これらの種子を24穴ウェル内の寒天培地上に播種し、低温保存した後、白色光照射により発芽を誘導した。これを、暗所、25°C で4日間生育させて、胚軸の長さを測定し、24穴ウェル内に熱メタノールを注入して芽ばえを固定した。回収した芽ばえの胚軸を引っ張り試験機のクランプ間に固定し、その胚軸の物性を、予備研究において開発した荷重一伸び解析法と応力緩和法を連続的に適用するプログラムを用いて、測定した。

(2) 純系 T-DNA 挿入ラインの中から、細胞壁代謝、微小管の構築と機能、細胞膜構成成分の合成と機能、イオンチャネル類などに関わるラインを選択し、(1)と同様に培養、処理を行った。得られた胚軸の物性を荷重一伸び解析法により測定した。

(3) 純系 T-DNA 挿入ラインの中から、ランダムに、あるいは遺伝子の機能予測に基づいて対象ラインを選択し、白色光下または高浸透圧条件下で生育させた。胚軸の成長と全伸展性を同様に測定し、(1)及び(2)の解析結果と比較した。

(4) 以上の解析により、有意な物性変化を示した純系 T-DNA 挿入ラインについては、細胞壁多糖量の測定と細胞内構造の蛍光顕微鏡観察を行った。また、得られた成長形質及び物性パラメータと、既に公開されている遺伝子構造及び発現データのデータベースとを対照させた。

4. 研究成果

(1) 網羅的解析

SALK 研究所により開発され ABRC を通して提供されたシロイヌナズナ純系 T-DNA 挿入ライン (ABRC CS27941, CS27942, CS27951, CS27952) を対象として、芽ばえの胚軸の物性を形質指標とするフェノーム解析を実施した。解析には、種子セットの構成ラインを SALK No. に沿ってランダムに使用する網羅的なアプローチと、物性変化を生ずる可能性が高い遺伝子のラインを対象とした選択的なアプローチの 2 つを併用した。また、環境シグナルの影響が最も小さい暗所、貧栄養を、本研究の基本的な生育条件として定めた。

予備実験で確立したプロトコールにしたがって、24 穴ウェルを用いて各ラインの芽ばえを効率的に生育させ、荷重-伸び解析法と応力緩和法を連続的に適用するプログラムにより、引っ張り試験機を用いて各々の胚軸の物性を解析した。解析に要する時間を考慮し、研究期間の後半からは、5 種の物性パラメータのうち、全伸展性の解析に集中するようにプロトコールを変更した。このような解析の結果、本研究に用いた純系 T-DNA 挿入ラインには、発芽能力が全くないか非常に低いラインや、生育初期に芽ばえが枯死してしまうラインが予想外に多く含まれており、物性の解析を行うのに十分な数の測定データが実際に得られたラインは、全体の半分程度に留まった。発芽率の低さや生育状況の悪さが偶発的な要因によるのかどうかをチェックするため、実験は 2 回ずつ独立に行ったが、状態が悪いラインの生育状況はほとんど改善しなかった。また、研究室での保管期間が 3 年を経過した CS27941 及び CS27951 については、ABRC より再度提供してもらい追加解析を行ったが、改善が見られないラインも多く見られた。なお、2 回の独立した物性解析結果はお互いによく一致しており、再現性が高いことが確認された。

以上の条件下で、物性を指標とする解析を行ったところ、約 3% のラインで有意な物性変化が認められた。胚軸の物性に明瞭な変化を示したラインの中には、細胞壁代謝関連遺伝子など、物性変化が期待されるものも偶然含まれており、ポジティブコントロールとして有効であった。また、全伸展性が増加したラインの数が、低下したライン

の数より 50% 程度多かった。そして、従来の知見では物性とは直接関係ないと思われていた新規遺伝子多数が、物性制御において重要な働きをしていることが明らかになった。同定された新規遺伝子群について、Gene Ontology 解析を行ったところ、Biological process 及び Cellular component のカテゴリーは多岐にわたっていたが、Molecular function に関しては、GO:0003700 : sequence-specific DNA binding transcription factor activity、GO:0016740 : transferase activity、GO:0016301 : kinase activity、GO:0005515 : protein binding などに属す遺伝子が比較的多かった。

胚軸の物性に変化を示したラインの多くでは、成長形質には明瞭な差が見られなかった。この結果が、暗所、貧栄養という生育条件の特質に由来するかどうか検討するため、白色光下あるいは浸透ストレス条件下で同様の解析を行った。その結果、 $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色光下では、暗所における約 3 倍の数のラインで成長形質に明瞭な差が認められた。また、0.1 M マニトール存在下では、水対照と比べて約 1.5 倍のラインで成長形質の有意な変化が検出できた。すなわち、本研究での基本的な培養条件である暗所、貧栄養下では、成長形質や物性がより安定的に制御されていることが明らかになった。

(2) 選択的解析

網羅的な解析と平行して、物性変化を生ずる可能性が高い細胞壁代謝、微小管の構築と機能、並びに細胞膜構成成分の合成と機能に関わる遺伝子のラインを対象とした選択的な解析を行った。予想通り、これらのラインでは、かなりの割合で物性変化が認められた。また、多くの場合、細胞壁代謝や細胞内構造の変異の程度と物性変化の程度の間に関連が見られた。すなわち、これらの遺伝子が細胞小器官の形成や機能を通して物性制御に関わるということが明瞭に支持された。

イオンチャネルなど、物質の取り込みや輸送に関わる遺伝子のラインでも、かなりの高頻度で物性や成長形質の変化が認められた。例えば、重金属の取り込みや輸送・解毒に関与する遺伝子のラインの中で変化を示した割合は、重金属の種類や器官 (胚軸と根) で多少異なっていたが、10 ~ 20% 程度であった。また、成長に関しては、重金属

による成長阻害が軽減したラインより、阻害の程度が増加したラインの方が多かった。

(3) 成果と展望

本研究の結果、従来は物性制御に直接関与しないと思われていた新規遺伝子多数が、重要な制御要因として同定された。同時に、細胞小器官の形成や機能を通して植物体の物性制御に関わることが予想された遺伝子群の機能が明確に支持された。また、物性変化を示すことが予想された後者の解析対象の中にも、全く成長速度や物性に变化を示さないラインが多く含まれていたことから、遺伝子機能の欠損が他の遺伝子によって補償される現象が普遍的に存在することがわかった。さらに、これらの過程は環境シグナルによる強い影響を受け、暗所、貧栄養下では安定的に維持されていることが示された。以上の結果より、植物の柔軟かつ複雑なゲノム機能制御の実態が明らかになった。

物性などのフェノーム解析によりゲノム機能を効率的に解明するためには、信頼の置ける変異体ラインの存在が不可欠である。本研究で用いた SALK 研究所の純系 T-DNA 挿入ラインは、十分にその目的を果たしたと言える。ただし、かなりの数のラインで種子の発芽率が急速に低下する減少が見られ、その原因が T-DNA 挿入による遺伝子破壊にそのものに起因することが示唆された。また、本研究の当初計画では、理化学研究所が開発した全長 cDNA を過剰発現する FOX (Full-length cDNA overexpressor gene) hunting system を用いて、T-DNA 挿入ラインで得られた結果を検証することを予定していたが、まだ各遺伝子個別の系統の提供が行われておらず、利用できなかった。多重変異体ラインの整備と合わせて、今後の課題である。

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 1 件)

- ① Miedes E, Zarra I, Hoson T, Herbers K, Sonnewald U, Lorences EP, Xyloglucan endotransglucosylase and cell wall extensibility, *Journal of Plant Physiology*, 査読有、168 巻 p. 196-203、2011 年

DOI: 10.1016/j.jplph.2010.06.029

[学会発表] (計 4 件)

- ① 小糸和子、Pb によるシロイヌナズナ及びイネ芽ばえの成長阻害機構、近畿植物学会、2012 年 11 月 10 日、奈良
- ② Takayuki Hoson、Mechanisms of gravity resistance in plants, ISLSWG International Symposium、2012 年 08 月 02 日、フライブルク、ドイツ
- ③ Takayuki Hoson、Plant perception and response to the signal in gravity resistance、39th COSPAR Scientific Assembly、2012 年 07 月 18 日、マイソール、インド
- ④ Takayuki Hoson、Growth and cell wall changes in stem organs under microgravity and hypergravity conditions、38th COSPAR Scientific Assembly、2010 年 7 月 21 日、ブレーメン、ドイツ

[図書] (計 1 件)

- ① Takayuki Hoson、Nova Science Publishers、Cellulose: Structure and Properties, Derivatives and Industrial Uses、p. 293-307、2010 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保尊 隆享 (HOSON TAKAYUKI)
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：70135771

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

馬淵 敦士 (MABUCHI ATSUSHI)
大阪市立大学・大学院理学研究科・後期博士課程大学院生
小糸 和子 (KOITO KAZUKO)
大阪市立大学・大学院理学研究科・前期博士課程大学院生
土谷 謙太 (TSUCHIYA KENTA)
大阪市立大学・理学部・学生
天保 英治 (TENPO EIJI)
大阪市立大学・理学部・学生