

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871101

研究課題名(和文) 単子葉イネ科牧草トールフェスクにおける二次細胞壁合成機構の解明

研究課題名(英文) Analyses of transcriptional network regulating secondary wall biosynthesis in tall fescue

研究代表者

佐藤 広子 (Sato, Hiroko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター作物開発研究領域・主任研究員

研究者番号：50391363

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)：植物の二次細胞壁は生育が進むにつれ肥厚し、特に出穂期において牧草の消化性を著しく低下させる。イネ科牧草の二次細胞壁合成機構の解明に取り組むため、トールフェスクの野生型から二次細胞壁合成に関与する転写因子SWN2の機能を抑制した組換え体の発現遺伝子を差し引くサブトラクション法を行い、SWN2の下流遺伝子を単離した。さらに、ディファレンシャルスクリーニングと相同性検索の結果から、野生型の出穂茎で発現量が高く、二次細胞壁合成への関与が推定される2つの転写因子FaMYBとFaNACを単離した。転写因子の機能解析を行うため、CRES-T法を用いてトールフェスク組換え体を作成した。

研究成果の概要(英文)：Forage digestibility decreases with secondary wall deposition during stem development. To analyze transcriptional network regulating secondary wall biosynthesis in forage grasses, suppression subtractive hybridization was used to identify differentially expressed genes between wild-type tall fescue and transgenic one expressing OsSWN2 chimeric repressor that caused a reduction of cell wall thickening in sclerenchyma cells. After differential screening, differentially expressed genes were categorized into various functional categories according to their putative functions by BLAST analysis. Two transcription factors, FaMYB and FaNAC, were isolated as candidate genes involved in secondary wall biosynthesis. To characterize their function, transgenic tall fescue was generated by using CRES-T.

研究分野：遺伝育種学

キーワード：トールフェスク 牧草 細胞壁 消化性 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の二次細胞壁は繊維細胞や導管などの木質細胞において発達する。生育が進むにつれセルロースやリグニン等の蓄積とともに肥厚し、特に出穂茎において牧草の消化性を著しく低下させる。

(2) 単子葉植物の二次細胞壁はセルロース、リグニン等から構成され、双子葉植物に多く含まれるペクチンやキシログルカン少量しか存在しない。単子葉植物と双子葉植物では細胞壁構成成分が異なるため、二次細胞壁の合成機構が異なると予想される。

(3) シロイヌナズナの二次細胞壁合成は、花茎の繊維細胞では NST1 と NST3/SDN1、葯の内皮細胞、導管など各組織においても一群の NAC 転写因子に制御され、さらにこれら転写因子の下流において、NAC や MYB 等による複数の転写因子の関与が示された。(Yamaguchi and Demura, 2010)。双子葉植物では、厳密な転写ネットワークによる二次細胞壁合成機構が明らかになった。

(4) 単子葉植物では、イネとトウモロコシで NST3/SDN1 の同祖遺伝子 SWNs が単離されたことにより、二次細胞壁合成に関与する転写因子の存在が初めて見出された (Zhong *et al.*, 2011)。これまでに研究代表者は、CREST法により、転写抑制因子に変換したイネ *SWN2* (*OsSWN2SRDX*) を導入したイネ科牧草トールフェスクの組換え体を作成し、*SWN2* が二次細胞壁合成に関与すること、また飼料として消化性が向上したことを確認した。しかし、生育阻害を示す組換え体も観察され、より精密な制御を行うためには、時期・組織特異的な二次細胞壁合成機構の解明が不可欠であるが、単子葉植物では *SWNs* が二次細胞壁合成に関与することが示されたところで、圧倒的に知見が少ない。

2. 研究の目的

トールフェスク *OsSWN2SRDX* 組換え体は、*SWN2* 下流の細胞壁合成関連遺伝子の発現が抑制されており、野生型の遺伝子発現との比較によって、単子葉植物の細胞壁合成関連遺伝子を同定するための優れた材料となる。また、*SWN2* が制御する下流の細胞壁関連遺伝子のプロモーターは、二次細胞壁合成に関わる転写ネットワークの解明に役立つだけでなく、上流の *SWN2* よりも発現部位と発現量を抑制でき、生育に悪影響を及ぼさずに二次細胞壁合成を制御するために有効である。本研究では、これまで未知であった単子葉植物の二次細胞壁合成機構の解明に取り組むため、*SWN2* 下流の細胞壁合成関連遺伝子を単離し、その機能を明らかにする。

(1) トールフェスク野生型と *OsSWN2SRDX* 組換え体の遺伝子発現を比較して、出穂茎で特

異的に発現する *SWN2* 下流の遺伝子をサブトラクション法により単離する。

(2) (1) で単離した遺伝子の機能を抑制したトールフェスク組換え体を作成し、表現型、二次細胞壁の構造、飼料成分を解析して遺伝子機能を明らかにする。

(3) (1) のプロモーターを単離し、細胞壁合成に関わる転写因子ネットワークを推定する。

3. 研究の方法

(1) サブトラクション法による細胞壁合成関連遺伝子の単離

SWN2 が制御する二次細胞壁合成に関わる下流遺伝子は、野生型では正常に発現している。一方、*SWN2* の機能が抑制されたトールフェスク *OsSWN2SRDX* 組換え体では、*SWN2* が制御する下流の細胞壁合成遺伝子が発現できず、二次細胞壁の合成が抑制されている。野生型と *OsSWN2SRDX* 組換え体の遺伝子発現を比較すると、多くの mRNA は共通して存在するが、*SWN2* 下流の細胞壁合成関連遺伝子の mRNA は、野生型で特異的に存在する。そこで、サブトラクション法を用いて、野生型でのみ発現している遺伝子を単離する。

トールフェスク野生型と *OsSWN2SRDX* 組換え体の出穂茎から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社) により RNA を抽出し、SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech 社) を用いて cDNA を合成した。野生型と組換え体の cDNA をハイブリダイズさせ、野生型から *OsSWN2SRDX* 組換え体の発現遺伝子を差し引くサブトラクションを PCR-select cDNA Subtraction Kit (Clontech 社) を用いて行った (図 1)。両者に差がない 2 本鎖 cDNA を取り除き、残った野生型の 1 本鎖 cDNA を鋳型にして、PCRにより 2 本鎖 cDNA を合成した。cDNA をプラスミドベクターに挿入し、大腸菌に形質転換してクローニングした。

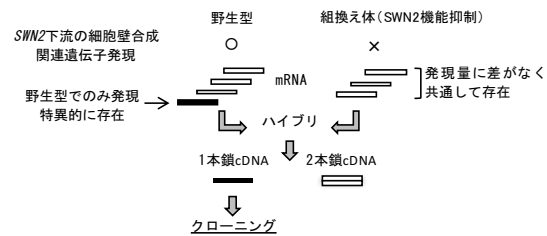


図 1 サブトラクション法による細胞壁合成関連遺伝子の単離

さらに、サザン法によるディファレンシャルスクリーニングにより、野生型で発現量が高い cDNA の絞り込みを行った。サブトラクション法で得られた野生型特異的 cDNA (野生型 cDNA-組換え体 cDNA) を 2 反復ずつメンブレンにスポットした。野生型特異的 cDNA

及び *OsSWM2SRDX* 組換え体特異的 cDNA (組換え体 cDNA-野生型 cDNA) から作製したプローブをハイブリダイズさせ、DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit (Roche Diagnostics 社) でシグナルを検出した。発現差が確認できた cDNA について、相同性検索プログラム BLAST を利用して、既知の細胞壁合成関連遺伝子との関連性を調べた。得られた cDNA は部分塩基配列のため、RACE 法によって全遺伝子配列を単離した。

(2) 単離した転写因子の機能解析

(1) で単離した転写因子の機能を抑制するため、CRES-T 法を用いて組換え体を作成した。SWN 下流の細胞壁合成関連遺伝子は、上流の SWN が発現するいずれかの組織で活性をもつと考えられるため、本来の活性部位で効率よく発現できるように、繊維細胞と導管の二次細胞壁で発現を誘導する *OsSWN1* プロモーター (Yoshida *et al.*, 2013) と連結したコンストラクトを作製した (図 2)。

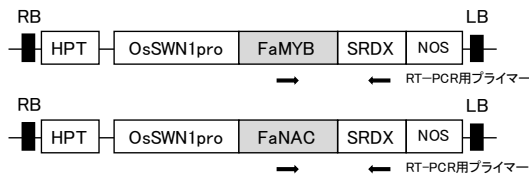


図 2 機能解析用コンストラクト

アグロバクテリウム法 (佐藤・高溝、2012) により機能解析用コンストラクトをトールフェスク (品種: ナンリョウ) に導入し、組換え体栽培用温室で植物を育成した。ハイグロマイシン耐性遺伝子から作製したプローブを用いて DIG システム (Roche) によるサザン解析を行い、導入された遺伝子数を確認した。葉における遺伝子発現は、illustra Ready-to-Go RT-PCR Beads (GE ヘルスケア社) を用いた RT-PCR により確認した。葉の横断切片をマイクロームで作製し、リグニンを特異的に染色するフロログルシノールで切片を染色し、繊維細胞や維管束細胞の二次細胞壁の構造やリグニンの蓄積を光学顕微鏡で観察した。また、ADF 含量とセルラーゼとアミラーゼを用いた酵素分析法により乾物分解率を測定するため、展開した葉をサンプリングし、70°C で 2 日間乾燥させた。その後、出穂を促すため春化处理を行った。

(3) プロモーター解析

Inverse PCR 法により、トールフェスクのゲノム DNA から (1) で単離した転写因子のプロモーター領域を単離して、*GUS* 遺伝子と連結したコンストラクトをアグロバクテリウム法によりトールフェスクに導入した。

4. 研究成果

(1) 細胞壁合成関連遺伝子の単離

サブトラクション法によりトールフェスク野生型の出穂茎に特異的な 1,536 クローン

の cDNA を単離した。また、野生型で発現量の高い cDNA を絞り込むため、ディファレンシャルスクリーニングにより野生型特異的プローブと *OsSWN2SRDX* 組換え体特異的プローブをハイブリダイズしたメンブレンを比較し、発現差のある cDNA を検出した (図 3)。1,536 クローンの内、636 クローンが野生型で特異的な発現あるいは *OsSWN2SRDX* 組換え体より強い発現を示した (表 1)。

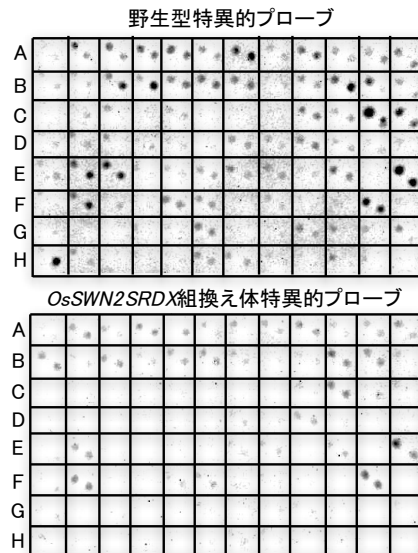


図 3 ディファレンシャルスクリーニングによる発現差のある cDNA の検出

表 1 ディファレンシャルスクリーニングにより検出された cDNA

発現パターン	クローン数	割合 (%)
野生型で特異的に発現	548	36
強	167	11
中	181	12
弱	200	13
両方で発現	277	18
野生型の方が強く差が大きい	78	5
野生型の方が強く差が小さい	10	1
組換え体の方が強い	21	1
差がない	168	11
組換え体で特異的に発現	22	1
両方でシグナルなし	689	45
計	1536	100

野生型で特異的に発現し、発現強度が強もしくは中の 348 クローンの内、162 クローンが既知の遺伝子にヒットした (表 2)。既知の細胞壁合成関連遺伝子との関連性を調べたところ、リグニン生合成経路上の酵素遺伝子と高い相同性を示す cDNA が得られた。また、NAC と MYB 転写因子は、シロイヌナズナ等において二次細胞壁合成に関与することが明らかになっており、トールフェスクにおいても二次細胞壁合成への関与が推定されるため、これら転写因子の機能解析を行った。

表2 発現強度強・中の cDNA と既知遺伝子の相同性

分類	クローン数
General metabolism	7
Maintenance genes	6
Plastid/mitochondrial genome	3
Protein degradation, folding and transport	6
Protein metabolism	11
Signal transduction	3
Stress defense	13
Transcription factor (転写因子)	16
Transport and membrane bound	4
Other proteins	93
Unknown proteins	83
Unidentified proteins	54
その他	49
計	348

(2) 単離した転写因子の機能解析

(1) でトールフェスクから単離した 2 つの転写因子 FaMYB と FaNAC について、CRES-T 法により転写因子機能を抑制した 4 個体の *FaMYBSRDX* 組換え体と 13 個体の *FaNACSRDX* 組換え体を作成した。サザン解析により、導入されたハイグロマイシン耐性遺伝子数は、*FaMYBSRDX* 組換え体で 1~2 コピー、*FaNACSRDX* 組換え体で 1~4 コピーであることを確認した。また、葉を用いた RT-PCR により、4 個体の *FaMYBSRDX* 組換え体、7 個体の *FaNACSRDX* 組換え体で導入遺伝子の発現を検出した。

葉身の横断切片をフロログルシノールで染色し、繊維細胞と維管束細胞における二次細胞壁の構造とリグニンの蓄積を観察した。春化処理後、出穂茎においても二次細胞壁の構造とリグニンの蓄積を観察し、栄養生長期にサンプリングした葉とともに出穂茎の ADF 含量と乾物分解率を測定し、繊維含量と消化性を評価する。

(3) プロモーター解析

Inverse PCR 法により、*FaNAC* 及び *FaMYB* の上流約 2kb をプロモーター領域として単離した。*FaMYB* プロモーターと *GUS* 遺伝子を連結したコンストラクトを導入したトールフェスク再分化植物を作成した。これらの葉と茎を用いて *GUS* 染色を実施し、活性部位を特定する。

本研究では、牧草の消化性に大きな影響を与える二次細胞壁合成機構の解明に取り組むため、トールフェスクの野生型から SWN2 の転写因子機能を抑制した組換え体の発現遺伝子を差し引くサブトラクション法を行い、SWN2 下流の遺伝子を単離した。さらに、ディファレンシャルスクリーニングと相同性検索の結果から、野生型の出穂茎で発現量が高く、二次細胞壁合成への関与が推定される 2 つの転写因子 FaMYB と FaNAC を単離して、機能解析を行うための組換え体を作成した。今後、組換え体の詳細な解析を行うことによ

り、二次細胞壁合成への関連性や消化性への影響を明らかにできる。

近年、TALEN や CRISPR 等の人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術が、狙った配列に変異を導入できる新しい育種技術として注目されている。この技術は遺伝子組換え技術を使用するが、交配により導入遺伝子を除くことができるため、組換え体として扱われない可能性があり、遺伝子組換え技術を用いて作出した植物の実用化を促進することが期待されている。本研究で得られた成果は、ゲノム編集を含む遺伝子組換え技術により、高消化性牧草の作出に貢献する。高消化性牧草は、家畜生産性の増大に大きく寄与するだけでなく、単位面積あたりの可消化養分総量 (TDN) を増加できるため、TDN ベースとして算出される飼料自給率の向上につながる。

<引用文献>

- ① Yamaguchi M and Demura T Transcriptional regulation of secondary wall formation controlled by NAC domain proteins. *Plant Biotech.* 27, 2010, 237-242
- ② Zhong R, Lee C, McCarthy RL, Reeves CK, Jones EG and Ye ZH Transcriptional activation of secondary wall biosynthesis by rice and maize NAC and MYB transcription factors. *Plant Cell Physiol.* 52, 2011, 1856-1871
- ③ Yoshida K, Sakamoto S, Kawai T, Kobayashi Y, Sato K, Ichinose Y, Yaoi K, Akiyoshi-Endo M, Sato H, Takamizo T, Ohme-Takagi M and Mitsuda N Engineering the *Oryza Sativa* cell wall with rice NAC transcription factors regulating secondary wall formation. *Front. Plant Sci.* 4, 2013, 383-389
- ④ 佐藤広子、高溝正 2-1 トールフェスクの形質転換プロトコール 形質転換プロトコール【植物編】、2012、81-87

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

- ① 佐藤 広子、光田 展隆、高木 優、高溝 正、イネ SWN2 キメラリプレッサー導入によるトールフェスク二次細胞壁形成の制御、日本草地学会、平成 26 年 4 月 1 日、宮崎観光ホテル (宮崎県宮崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 広子 (SATO, Hiroko)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター・作物研究開発領域・主任研究員

研究者番号：50391363