

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15147

研究課題名(和文) トランスオミクスに基づく一次代謝を介した芽生えの発生制御システムの解明

研究課題名(英文) Deciphering developmental signal intertwined with primary metabolism by trans-omics approach

研究代表者

川出 健介 (Kawade, Kensuke)

基礎生物学研究所・共生システム研究部門・助教

研究者番号：90612086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生物の形づくりに細胞の増殖や肥大が欠かせない。したがって、その活発な増殖や肥大を維持もしくは駆動するような代謝の活性化メカニズムがあるはずである。本研究では、植物の芽生えを題材とし、そのような代謝活性化を担う遺伝的な仕組みの解明を進めた。そして、細胞の増殖とアミノ酸代謝をつなぐ新しい制御機構を同定することができた。また、その制御機構が進化の過程でどのように成立してきたのか理解するための、重要なヒントも得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、植物の形づくりに関して代謝生理的な視点から重要な知見が得られた。このような発生と代謝のつながりを強く意識した研究は未開拓な領域であり、新しい学術領域を展開する基盤となることが大いに期待できる。また本成果は、作物における有用形質の改良を目指した育種戦略の構築や、フィールドにおける栽培戦略の予測的展開についても貢献しているものである。より地球規模で考えた場合、深刻化が進んでいる環境問題を解決するバイオマス増産などの指針についても関係する成果であると言える。

研究成果の概要(英文)：Pattern formation of organisms requires cell proliferation and expansion, indicating that there are mechanisms, which connect tissue patterning with metabolic reprogramming to stimulate these cellular processes. However, it is unclear how metabolism is modified in response to cell proliferation and expansion. We here addressed this question using plant seedlings as a model. One important finding is an identification of a mechanism for cell proliferation mediated by a regulation of amino acid metabolism. Moreover, we clarified that the integration between tissue patterning and amino acid metabolism has been already established in an early land plant. Interestingly, in the early land plant, this mechanism may facilitate complex tissue patterning including shoot formation because we observed stunted and simple shoot morphology when disrupted. These results thus augmented our understanding in mechanisms by which developmental and metabolic processes are integrated for tissue patterning.

研究分野：植物発生生理学

キーワード：シロイヌナズナ ヒメツリガネゴケ ANGUSTIFOLIA3 アミノ酸代謝 茎葉体 トランスオミクス シュート形成 アルギニン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) シロイヌナズナの転写共役因子 ANGUSTIFOLIA3 (AN3) は、クロマチンリモデリング因子や転写因子との相互作用を介して、葉における細胞増殖を活性化させる。それに加えて、マイクロアレイ解析やゲノムワイドな相互作用因子の探索からは、転写調節を通して代謝系も制御している可能性が示唆されていた。しかし、代謝系への関与については全く研究されていないのが現状だった。

(2) 本研究の予備的な実験から、*an3* 変異株は分岐鎖アミノ酸の一種であるロイシンに高感受性を示し、芽生えの発生が停止して枯死するという表現型が見いだされていた。さらに、質量分析装置を用いた代謝物のターゲット分析からは、ロイシンの分解経路に関わる代謝プロファイルが乱されていることが明らかにされていた。他方、同じ分岐鎖アミノ酸であるバリンやイソロイシンに対しては、ロイシンと同様の濃度範囲では発生抑制の影響が認められなかった。

2. 研究の目的

(1) シロイヌナズナの芽生えにおいて AN3 が関わる転写調節ネットワークを同定し、その中でも特に代謝制御へ寄与する分子メカニズムを解明する。さらに、そこから得られる知見をもとに分子遺伝学的なアプローチを進めて、当該転写調節ネットワークの芽生えの発生における分子機能を明らかにする。

(2) *an3* 変異株の芽生えで生じている代謝プロファイルの変化を網羅的に同定し、芽生えにおける代謝生理状態を AN3 がどのように制御しているのか解明する。そして、上記(1)で明らかにした転写調節ネットワークとの関係性や、ロイシン高感受性との関係性を調べることで、芽生えにおける発生と代謝のつながりを理解する。

3. 研究の方法

(1) これまでは、マイクロアレイ解析で AN3 が関わる転写調節ネットワークの同定が進められてきた。しかし本研究では、RNA-seq にもとづくトランスクリプトーム解析に取り組むことで、より高精度のデータ取得を目指した。そして、野生株と *an3* 変異株の芽生えにおける転写プロファイルと比較解析し、AN3 の下流応答だと推定される代謝生理的な兆候を検出するとともに、その分子メカニズムを担う遺伝子群をリスト化した。さらに、当該遺伝子に変異を持つ系統を準備して、芽生えにおけるロイシン感受性や代謝プロファイル、細胞増殖に関する形態などを評価した。

(2) AN3 が転写調節を介してどのような代謝経路を制御しているのか明らかにするため、野生株と *an3* 変異株の芽生えを用いた比較メタボローム分析に取り組んだ。ここでは、これまでアミノ酸に関連する代謝物に蓄積量の変化が見られていたので、主に一次代謝に主眼を置いたガスクロマトグラフ質量分析計による分析を選択した。そして、*an3* 変異株で蓄積量に変化のみられた代謝物については投与実験を進めて、芽生えの発生に対する影響を調査した。

4. 研究成果

本研究において得られた成果は、主に以下の5点にまとめられる。

(1) AN3 タンパク質と相互作用して転写調節を行う GROWTH REGULATING FACTOR5 (GRF5)の変異株などを用いてロイシン感受性を調べたところ、*an3* 変異株とは異なり野生株と同等の感受性を示した。この結果は、AN3 による代謝制御が既存の転写調節メカニズムとは異なる経路で機能していることを示唆する。

(2) 野生株と *an3* 変異株の芽生えを用いた比較トランスクリプトーム解析を行ったところ、*an3* 変異株では低酸素応答や生体異物応答といった非生物学的ストレスに対する応答が、恒常的に誘導されていることが分かった。そこで、低酸素応答に関わる変異株を準備してロイシン感受性を調べたところ、*an3* 変異株と同じくロイシン高感受性を示すことが分かった。

(3) トランスクリプトーム解析の結果から、*an3* 変異株ではロイシン分解経路に関わる酵素遺伝子の発現制御が異常になっていることが分かった。低酸素応答には N-end rule 経路を介したタンパク質分解が関わっていることから、タンパク質の分解、さらにはその分解産物であるアミノ酸の分解といった一連の分解経路が *an3* 変異株で乱されている可能性が考えられた。

(4) 野生株と *an3* 変異株の芽生えを用いた比較メタボローム分析を行ったところ、*an3* 変異株ではアミノ酸含量が全体的に増加していることが分かった。また、ヒドロキシプロリン、プロリン、オルニチン、シトルリンなどのプロリン代謝に関わる代謝物については蓄積量の変化が最も顕著であった。

(5) *an3* 変異株においてロイシン分解経路に関わる酵素遺伝子群の発現レベルが異常になって

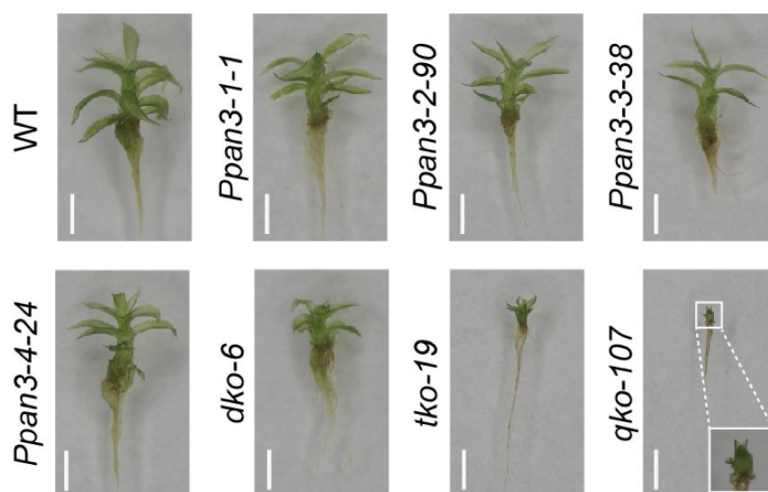
いるというトランスクリプトーム解析の結果と一致して、関連する代謝物の蓄積量についても明らかな変化がメタボローム分析の結果にみられた。したがって、*an3* 変異株におけるロイシン高感受性は、ロイシン分解経路の異常が関わっていることが強く示唆される。

以上、トランスクリプトーム解析およびメタボローム分析によるトランスオミクスの結果を総合すると、AN3 は特定の代謝経路を直接的に制御しているのではなく、非生物学的ストレスなどのストレス応答に関わる経路が過剰に活性化し、それが主に一次代謝における広範な異常を引き起こしていると考えられる。また、その仕組みには GRF5 などが関わる既知の転写活性化経路ではない、未同定の経路を介していると考えられる。

この成果は、ほぼ未着手であった AN3 による代謝制御機構について明らかにする重要な知識基盤になると考えられる。現在、AN3 による発生制御機構は国内外を問わず盛んに研究されていることを鑑みると、今回の成果は全く違う視点で AN3 の分子機能、ひいては発生と代謝の統合メカニズムを理解することにつながると期待される。今後は、AN3 がどのように非生物学的ストレス応答に関わっているのか解明することで、芽生えにおける発生と代謝のつながりをより豊かに理解できると考えられる。

さらに、当初の計画には無かった以下の3点についても本研究を進める過程で成果があがってきた。

(1) ヒメツリガネゴケにおける AN3 オルソログの遺伝子破壊株では、茎葉体において細胞増殖と細胞肥大の欠損がみられ、著しい矮化を引き起こすことが分かった(右図)。トランスクリプトーム解析を行ったところ、一次代謝に関わる酵素遺伝子の発現レベルが遺伝子破壊株で顕著に減少していた。

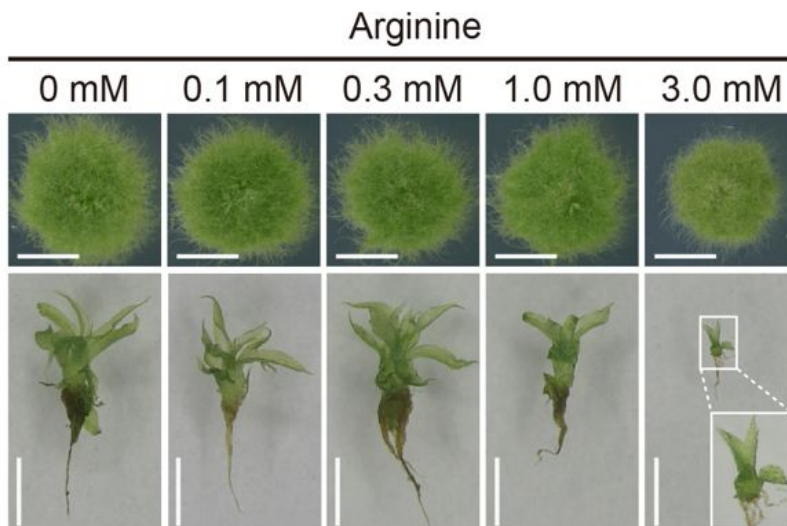


(*dko*, *tko* and *qko* mean double, triple and quadruple knock out)

(2) ヒメツリガネゴケ AN3 の遺伝子破壊株の茎葉体を用いてメタボローム分析を進めたところ、シロイヌナズナの場合とは異なり、アルギニンが特異的かつ顕著に過剰蓄積していることが分かった。また、野生株にアルギニンを処理することで、遺伝子破壊株のように茎葉体の矮化(下図)や転写プロファイルの変化が再現された。

(3) ヒメツリガネゴケ AN3 の遺伝子破壊株にシロイヌナズナの AN3 を発現させると、茎葉体の矮化やアルギニンの過剰蓄積という表現型が完全に相補された。このように分子機能の点では共通性が認められるが、茎葉体の芽ではヒメツリガネゴケ AN3 の細胞間移動が見られなかったことから、相違点もあることが分かった。

これらの成果は、発生と代謝をつなぐ仕組みを進化的な視点から考察するための新しい知見だと言える。それは、本研究が当初の計画で掲げていた目標を達成するうえでも非常に重要なものであると考えられる。そこで、ヒメツリガネゴケにおける研究結果も本研究内における成果と考え、現在は論文として投稿中である (Kawade et al., submitted)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawade Kensuke, Li Yimeng, Koga Hiroyuki, Sawada Yuji, Okamoto Mami, Kuwahara Ayuko, Tsukaya Hirokazu, Hirai Masami Yokota	4. 巻 145
2. 論文標題 The cytochrome P450 CYP77A4 is involved in auxin-mediated patterning of the Arabidopsis thaliana embryo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev168369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.168369	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 -
1. 著者名 Ferjani Ali, Kawade Kensuke, Asaoka Mariko, Oikawa Akira, Okada Takashi, Mochizuki Atsushi, Maeshima Masayoshi, Hirai Masami Yokota, Saito Kazuki, Tsukaya Hirokazu	4. 巻 8
2. 論文標題 Pyrophosphate inhibits gluconeogenesis by restricting UDP-glucose formation in vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-32894-1	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 Sawada Yuji, Tsukaya Hirokazu, Li Yimeng, Sato Muneo, Kawade Kensuke, Hirai Masami Yokota	4. 巻 13
2. 論文標題 A novel method for single-grain-based metabolic profiling of Arabidopsis seed	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Metabolomics	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11306-017-1211-1	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 -
1. 著者名 Kawade Kensuke, Tanimoto Hirokazu, Horiguchi Gorou, Tsukaya Hirokazu	4. 巻 113
2. 論文標題 Spatially Different Tissue-Scale Diffusivity Shapes ANGUSTIFOLIA3 Gradient in Growing Leaves	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 1109 ~ 1120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2017.06.072	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 該当する

1. 著者名 Kawade Kensuke, Tsukaya Hirokazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Probing the stochastic property of endoreduplication in cell size determination of <i>Arabidopsis thaliana</i> leaf epidermal tissue	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0185050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0185050	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 -

[学会発表] 計19件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kensuke Kawade, Yuu Hirose, Gorou Horiguchi, Akira Oikawa, Masami Yokota Hirai, Kazuki Saito, Tomomichi Fujita, Hirokazu Tsukaya
2. 発表標題 Transcriptome landscape connecting arginine metabolism with gametophore formation in <i>Physcomitrella patens</i>
3. 学会等名 第61回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川出 健介
2. 発表標題 植物の幹細胞活性とアルギニン代謝を紐付ける仕組み
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川出 健介、堀口 吾朗、及川 彰、平井 優美、斉藤 和季、藤田 知道、塚谷 裕一
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケ茎葉体の発生とアルギニン代謝
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川出 健介、堀口 吾朗、及川 彰、平井 優美、斉藤 和季、藤田 知道、塚谷 裕一
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケ茎葉体の発生とアルギニン代謝
3. 学会等名 日本植物形態学会第31回総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawade Kensuke, Li Yimeng, Koga Hiroyuki, Sawada Yuji, Kuwahara Ayuko, Tsukaya Hirokazu, Hirai Yokota Masami
2. 発表標題 A CYTOCHROME P450 CYP77A4 IS REQUIRED FOR AUXIN-MEDIATED PATTERNING OF THE ARABIDOPSIS THALIANA EMBRY
3. 学会等名 29th International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川出 健介, 李 一蒙, 古賀 皓之, 澤田 有司, 岡本 真美, 桑原 亜由子, 塚谷 裕一, 平井 優美
2. 発表標題 シトクロムP450酵素変異株のフェノーム解析
3. 学会等名 日本植物形態学会第30回総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川出 健介
2. 発表標題 核内倍加の確率論的なふるまいと表皮細胞のサイズ分布
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川出 健介
2. 発表標題 発生シグナルの時空間動態を解くための実験と理論
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kensuke Kawade
2. 発表標題 Plant morphogen intertwined with metabolism
3. 学会等名 ConBio2017（2017年度 生命科学系学会合同年次大会）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川出 健介
2. 発表標題 組織内の偏った拡散性が細胞間シグナル因子の発現勾配を形づくる
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川出 健介
2. 発表標題 植物における「発生シグナル」を介したレドックス調節;トランスオミクスによるアプローチ
3. 学会等名 生理学研究所 研究会「オルガネラダイナミクスの新規制御機構とその病態生理」（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kensuke Kawade
2. 発表標題 Biased distribution of tissue-scale diffusivity shapes ANGUSTIFOLIA3 signaling gradient in growing leaf tissue
3. 学会等名 第50回日本発生生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川出 健介
2. 発表標題 核内倍加の確率論的な特性を組み込んだ細胞サイズ決定モデル
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kensuke Kawade, Yimeng Li, Yuji Sawada, Hirokazu Tsukaya, Masami Yokota Hirai
2. 発表標題 A cytochrome P450 epoxidase regulates embryonic patterning in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第59回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野崎 守、川出 健介、塚谷 裕一、杉山 宗隆
2. 発表標題 不定根形成を指標としたシロイヌナズナDMSO高感受性変異体の単離と表現型解析
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野崎 守、川出 健介、堀口 吾朗、塚谷 裕一
2. 発表標題 an3-dependent compensation during the leaf development acts cell-autonomously in epidermis and non-cell-autonomously in palisade mesophyll tissue
3. 学会等名 第59回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takumi Tomoi, Munenori Kitagawa, Yoichi Sakata, Kensuke Kawade, Hirokazu Tsukaya, Tomomichi Fujita
2. 発表標題 Quantitative dissection of ABA-mediated suppression of macromolecular transport through plasmodesmata
3. 学会等名 第59回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Griffin St. Clair, Kensuke Kawade, Gorou Horiguchi, Tomomichi Fujita, Hirokazu Tsukaya
2. 発表標題 AN3 regulates gametophytic growth in <i>Physcomitrella patens</i>
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川出 健介、塚谷 裕一
2. 発表標題 核内倍加の確率論的な特性を組み込んだ細胞サイズ決定モデル
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ情報など http://www.oib.orion.ac.jp/metabolo/ https://orcid.org/0000-0003-1701-4567
報道関連情報 プレスリリース「植物細胞の大きさを決めるサイコロゲームを発見」 http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2017/09/20.html 日刊工業新聞（2017年10月6日付 掲載） ScienceDaily（2017年9月20日付 Web掲載）
アウトリーチ活動情報 2019年 基礎生物学研究所 一般公開 2018年 岡崎市立美川中学校 特別講義 2017年 愛知県立豊田西高等学校 特別講義

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
--	---------------------------	-----------------------	----