

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32704

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450158

研究課題名(和文) 遺伝子組換えと同等の形質を植物に付与する化合物開発システムの構築

研究課題名(英文) Development of system for synthesis of Py-Im polyamide causing useful phenotypes to plants

研究代表者

近藤 陽一 (Kondou, Youichi)

関東学院大学・理工学部・准教授

研究者番号：00391954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、任意に選択したDNA配列に結合する化合物であるPy-Imポリアミドを植物に添加することで、遺伝子組換えと同等の効果を植物に付与することが出来るシステムの構築を目指した。まず被子植物であるシロイヌナズナの細胞壁の合成を制御している遺伝子を抑制出来る様に設計したPy-Imポリアミドを合成し、その化合物が期待通りの活性を示すことを、酵母を用いた評価系により証明した。実際にシロイヌナズナに添加したところ、細胞壁関連の遺伝子群の発現が低下することを見いだした。本研究はPy-Imポリアミドの添加により、植物の遺伝子発現を人為的に制御し得ることを示した最初の例である。

研究成果の概要(英文)：We have been constructed novel technique, in which a plant can acquire useful phenotypes by a chemical compound, pyrrole-imidazole (Py-Im) polyamide, which may bind to any nucleotide sequences. In order to construct this technique, we selected an Arabidopsis transcription factor, NST3, of which suppress cause inhibition of cell wall synthesis, and synthesized a compound, of which can bind to NST3 target sequence in MYB46 promoter. By using yeast-one hybrid system, the interaction between synthesized compound and the MYB46 promoter was verified. So we checked the effectiveness of the compound on the Arabidopsis plant. When plants were planted in the compound-containing medium, we observed the growth retardation. The transcriptome analysis suggested that growth retardation was caused by decreasing of expression levels of many genes including these related with synthesis of cell wall. This study is first possibility of regulation of gene expression in plant by using Py-Im polyamide.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：Py-Imポリアミド 遺伝子組換え 転写因子 シロイヌナズナ 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

植物科学は分子生物学の進歩と共に急速な発展を遂げ、その成果は応用研究にも活かされてきた。現在の植物科学では分子生物学に基づいた遺伝子組換え技術を利用して研究を行うことが多く、作物の機能改良といった応用技術についても遺伝子組換えの技術が多用されている。しかしながら遺伝子組換え植物の実用化には、関係各省からの認可を得る必要がある。このような認可が必要な理由の一つは、遺伝子組換えにより植物に付与される有用な形質が遺伝し、世代を超えて持続するためである。このことは遺伝子組換え植物の必ずしも高くない社会的イメージの原因の一つにもなっている。逆に遺伝子組換え植物と同等の有用形質を、遺伝しない形質として植物に付与することが出来れば、組換え植物の実用化へのハードルは大きく下がることになると思われる。

ピロール-イミダゾール (Py-Im) ポリアミドは、メチルピロールアミド骨格を持った有機化合物である。この化合物は特定の二本鎖 DNA 塩基配列の塩基対を認識して結合することが知られており、Py と Im の重合の順番を変えることでその配列を任意に選択可能である。また重合する Py と Im のポリアミドの鎖を長くすることで、認識配列も長くすることが出来る。そのため遺伝子発現の調節配列に結合するように設計した Py-Im ポリアミドは、遺伝子発現を制御する分子として機能することが知られている (図 1)。しかしながら植物に Py-Im ポリアミドを添加し、植物の遺伝子発現を制御した報告はこれまでなかった。

2. 研究の目的

遺伝子組換え技術を利用して植物に機能改良を付与するためには遺伝子組換え植物を利用することが基本になるが、前述のように実用化へのハードルは高い。そこで本研究では、添加することにより植物に遺伝子組換えと同等の効果を付与することが出来る Py-Im ポリアミドの合成システムの構築を目指した。

このシステムの基盤は、機能を抑制すると植物に有用な形質が付与される転写因子を選び出し、その転写因子が制御している調節配列に結合する Py-Im ポリアミドを合成することである。合成した Py-Im ポリアミドを野生型の植物に添加することで、選び出した転写因子の機能を抑制し、有用な形質を付与する。このシステムの構築を目指し、まず合成した Py-Im ポリアミドの標的遺伝子に対する転写抑制化能を評価することを目的として、酵母のワンハイブリッド系を利用した Py-Im ポリアミドの評価系の構築を目指した。次に評価系で評価が完了した Py-Im ポリアミドが、実際に植物の遺伝子発現を制御出来るか確認することを目的として、マイクロアレイ解析を行った。

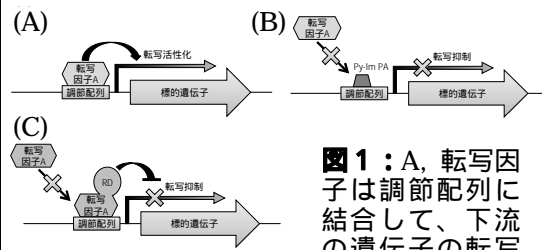


図 1 : A, 転写因子は調節配列に結合して、下流の遺伝子の転写を制御する。

B, 調節配列に結合する Py-Im ポリアミド (Py-Im PA) は、転写因子が調節配列に結合するのを阻害し、下流の遺伝子の転写を抑制する。

C, CRES-T 系統の植物中では、転写因子と転写抑制化ドメイン (RD) のキメラタンパク質が発現している。キメラタンパク質は調節配列に結合し、下流の遺伝子の転写を抑制する。

3. 研究の方法

機能を抑制すると植物に有用な形質が付与される転写因子を選び出す方法として、シロイヌナズナの CRES-T 系統を利用した。CRES-T 系統とは、様々な機能未知の転写因子に「強力な転写抑制化ドメイン (RD ドメイン)」を融合し、転写抑制化因子に機能変換したキメラタンパク質を植物体に導入したものである。キメラタンパク質はその標的配列に結合することにより、標的配列下流の遺伝子の転写を抑制し、結果的に標的配列に本来結合すべき転写因子の機能を抑制する。このキメラタンパク質の機能は、Py-Im ポリアミドによって代替可能であると考えられる (図 1)。したがって野生型に Py-Im ポリアミドを添加して得られる表現型は、CRES-T 系統の表現型と類似したものと推測される。これを確認するため、明確な表現型を示す NST3 の CRES-T 系統に関する解析結果を利用した。この系統は二次細胞壁の合成が抑制され、花序がしなだれる表現型を示す。この原因は RD ドメインが融合した NST3 が、MYB46 のプロモーター配列に結合し、MYB46 の発現を抑制することにより起こることが分かっている。そこで、Py-Im ポリアミドの評価系の構築に、既知の転写因子 NST3 と、NST3 が結合する MYB46 のプロモーター配列の組み合わせを用いることとした。

実際の Py-Im ポリアミドの評価系は酵母のワンハイブリッドシステムを利用したものであり、MYB46 プロモーターの直下にマーカー遺伝子 [AUR1-C: 抗生物質オーレオバシジン (AbA) に対する耐性遺伝子] を挿入したレポーターコンストラクトと、酵母内で NST3 を発現させるための発現コンストラクトを酵母に導入することで構築した。その後、MYB46 プロモーター配列に結合するように合成した新規の Py-Im ポリアミドが、NST3 の MYB46 プロモーター配列への結合を阻害し、遺伝子の発現を制御出来るか、構築した

評価系により評価を行った。

更に評価系により、遺伝子の発現を制御しようと評価された Py-Im ポリアミドを植物生育用培地に添加し、野生型シロイヌナズナを生育させることで、期待される表現型が現れるか、また植物の遺伝子を期待通り制御出来るか、解析を行った。

4. 研究成果

・評価系による Py-Im ポリアミドの評価

NST3 が MYB46 プロモーターを認識する配列は、既に報告が為されている。その配列の一部 (GAAAC) に結合するようデザインした Py-Im ポリアミド (Im-Py-Py-Py-Py) を使用し、MYB46 プロモーター制御のレポーターコンストラクトと、NST3 の発現コンストラクトを導入した形質転換酵母への添加試験を行った。Py-Im ポリアミドの添加により形質転換酵母中の NST3 と、MYB46 プロモーターの相互作用が阻害されることが予想される。その結果、AUR1-C の発現が抑制され、形質転換酵母の AbA 耐性が低下することが期待される。そこで、AbA のみを含む培地と、AbA と Py-Im ポリアミドを含む培地で形質転換酵母を生育させ、生育速度の差を観察した。その結果、Py-Im ポリアミド 10 μ M 含有培地では、各酵母の生育に差が観察されなかった。しかし、Py-Im ポリアミド 100 μ M 含有培地では、MYB46 プロモーターが導入された形質転換酵母に極端な生育阻害が生じた (図 2)。対照的に空のレポーターベクターのみが導入された形質転換酵母は、生育阻害が観察されなかった。これらの結果は、想定した塩基配列に結合した Py-Im ポリアミドが、NST3 が MYB46 プロモーターに結合するのを阻害しうること示唆している。更に新規に合成した Py-Im ポリアミドが、遺伝子の発現を制御出来る可能性のある添加濃度は、10-100 μ M の範囲であることを示している。

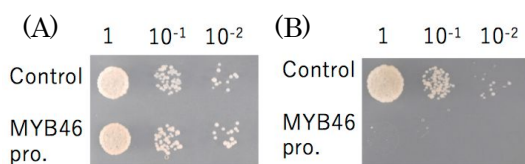


図 2 : 空レポーターベクターを導入した形質転換酵母 (Control) と、MYB46 プロモーター制御のレポーターコンストラクトを導入した形質転換酵母 (MYB46 pro.) の、10 μ Py-Im ポリアミド添加培地上 (A) 及び 100 μ Py-Im ポリアミド添加培地上 (B) での生育実験。写真の上の数字は酵母の希釈率を表す。

・Py-Im ポリアミド添加による植物への影響

新規に合成した Py-Im ポリアミドを、構築した評価系により評価したところ、遺伝子発現を制御しうることを見いだしたので、実際にシロイヌナズナに添加 (評価系の結果から

50 μ M を添加) し表現型を観察した。もし期待通り、Py-Im ポリアミドの添加が NST3 の機能を強く抑制し、MYB46 の発現を低下させた場合、二次細胞壁の合成が抑制され、花序がしなだれる表現型を示すはずであるが、そのような表現型は観察出来なかった。しかしながら、Py-Im ポリアミドを添加していない培地で生育させた植物と比較して、Py-Im ポリアミドの添加により、明らかに生育の遅延が観察された (図 3)。この結果は、Py-Im ポリアミドの添加が、植物に何らかの生理的効果をもたらしていることを示している。

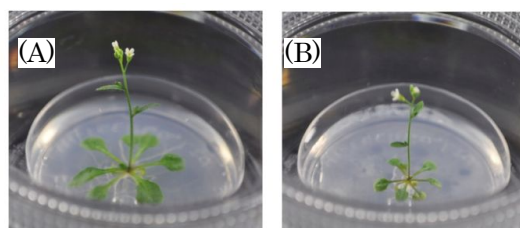


図 3 : 通常生育用の培地で生育させたシロイヌナズナ (A) と、50 μ M Py-Im ポリアミド含有培地上で生育させたシロイヌナズナ (B) の表現型の比較。

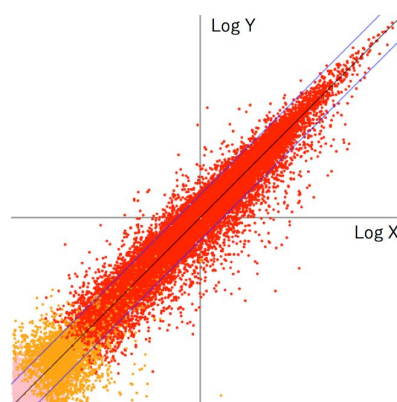


図 4 : Py-Im ポリアミド含有培地上で生育させたシロイヌナズナのトランスクリプトーム解析結果。Log X と Log Y は、それぞれ通常生育用の培地と、50 μ M Py-Im ポリアミド含有培地上で生育させたシロイヌナズナの各遺伝子の発現量の対数を表す。

Py-Im ポリアミドの添加によって引き起こされた生育遅延が、どのような原因によるものか確認を行うため、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。解析の結果、Py-Im ポリアミドの添加により、発現が上昇した遺伝子もあったが、発現が低下した遺伝子の方が多いことが分かった (図 4)。発現が低下した遺伝子群のプロモーター領域に、Py-Im ポリアミドの結合が期待される配列 (GAAAC) がないか検索したが、そのような配列を見いだすことは出来なかった。次に発現が低下した遺伝子群のオントロジー解析を行ったところ、細胞壁関連の遺伝子群の発現が有意に低下していることが分かった。この結果は、Py-Im ポリアミドの

添加が、期待通り細胞壁の合成を抑制していることを示唆している。

細胞壁合成を促進するNST3の機能を阻害するよう設計したPy-Imポリアミドは、細胞壁関連の遺伝子の発現を低下させる効果を示した。しかしながら、それ以外の多くの遺伝子の発現も低下させた。この原因は合成したPy-Imポリアミドが認識する配列の長さ（特異性の低さ）によるのかもしれない。ゲノム中の領域の至る所にPy-Imポリアミドが結合することで、標的以外の様々な遺伝子の発現の低下を招き、これが植物体の生育遅延を引き起こした可能性がある。もっと長いPy-Imポリアミドを合成し、配列特異性を上げることで、より厳密に植物の遺伝子の発現を制御することが可能になると考えられる。本研究は、Py-Imポリアミドが植物の遺伝子発現を制御しうることを示した最初の例であり、化合物だけで植物の遺伝子の発現を人為的にコントロール出来る可能性を示したと言えよう。

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) Kondou Y, Development of a novel system for the isolation of useful genes that can function in most land plants using *Marchantia polymorpha*. The Journal of Technology Researches. Society of Science and Engineering /Architecture and Environmental Design, Kanto Gakuin University. 57(2):49-56, 2014

[学会発表](計 8件)

- 1) Takahiro Sato, Shouta Hirose, Yuusuke Akatsu, Hirokazu Iida, Youichi Kondou Investigation of the effectiveness of neurodegenerative disease therapeutic agent, 4-PBA, on root hair, 第57回日本植物生理学会年会(2016年3月)岩手大学上田キャンパス
- 2) Takuya Terasawa, Ryota Nihei, Miyuki Kobayashi, Takeshi Yoshizumi, Minami Matsui, Youichi Kondou Establishment of a novel system for the isolation of useful genes functioning in most land plants using *Marchantia polymorpha* and *Arabidopsis thaliana*, 第57回日本植物生理学会年会(2016年3月)岩手大学上田キャンパス
- 3) 古川 陽介、廣瀬 翔太、佐藤 貴大、赤津 悠輔、名取 将、水上 和史、高橋 希恵、飯田 博一、近藤 陽一 4-PBA及びその類似体添加による植物の高温ストレス耐性向上の検討、2015年度 関東学院大学理工/建築・環境学部研究発表講演会(2015年11月)

- 4) 寺澤 拓弥、小林 美由希、二瓶 遼太、宮城 祐太、西浜 竜一、石崎 公庸、河内 孝之、近藤 陽一 植物の有用遺伝子を探る新たなシステムの確立、2015年度 関東学院大学理工/建築・環境学部研究発表講演会(2015年11月)
- 5) 中田 周斗、石渡 周平、鈴木 優衣、小糸 喜来美、井上 卓也、大高 霞、飯田 博一、近藤 陽一 植物に有用形質を付与する化合物の合成、2014年度 関東学院大学理工/建築・環境学部研究発表講演会(2014年11月)
- 6) 古川 陽介、佐藤 貴大、眞島 瑠里、中里 真侑、赤津 悠輔、飯田 博一、近藤 陽一 4-PBA及びその類似体添加による植物のストレス耐性向上の検討、2014年度 関東学院大学理工/建築・環境学部研究発表講演会(2014年11月)
- 7) 中田周斗、小糸喜来美、鈴木優衣、飯田 博一、近藤陽一 Py-Imポリアミド結合判定系の開発、第55回日本植物生理学会年会(2014年3月)富山大学五福キャンパス
- 8) 中田 周斗、小糸 喜来美、鈴木 優衣、大高 霞、井上 卓也、飯田 博一、近藤 陽一 Py-Imポリアミド結合判定系の開発、2013年度 関東学院大学理工/建築・環境学部研究発表講演会(2013年11月)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]
特になし

6. 研究組織

- (1)研究代表者
近藤 陽一(Kondou, Youichi)
関東学院大学・理工学部・准教授
研究者番号:00391954
- (2)研究分担者
光田 展隆(Mitsuda, Nobutaka)
産業技術総合研究所・その他部局等・研究員
研究者番号:80450667
- (3)連携研究者
飯田 博一(Iida, Hirokazu)
関東学院大学・理工学部・准教授
研究者番号:10335797