

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560421

研究課題名(和文)ケミカルフェノミクスによる植物のサイズを制御する低分子化合物の探索

研究課題名(英文)Searching chemicals affecting plant growth using chemical phenomics approach

## 研究代表者

栗原 恵美子 (Emiko, Kurihara)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：90639585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではバイオマスの増産を目的とし、低分子化合物ライブラリを処理した植物の表現型を解析することで、有用な低分子化合物を探索した。まず、シロイヌナズナ種子にケミカルを添加した後、青色光下で培養し、画像を取得・評価した。開発した計算プログラムを用い、22項目について定量的な数値を算出した。本研究では植物が伸長し、子葉の面積が小さいフェノタイプを持つもので特に著しく差異を示した化合物の#203を候補とした。#203を添加すると、青色光下のみで伸長が亢進した。#203およびその類似化合物について遺伝子発現解析を行ったところ、#203のみ青色光受容関連遺伝子の発現に変化が起こらないことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Aim of this research is to increase plant biomass. I quantitatively analyzed phenotypes of the plants which are treated with a library comprising many small molecular chemicals and then looked for useful chemicals. First, I added chemicals into Arabidopsis seeds, grew them under blue light and evaluated images obtained. I calculated quantitative scores to 22 items using a newly-developed computer program. As a result, I picked up a candidate chemical, #203, of which treatment strongly increased hypocotyl length and decreased size of cotyledons. Such phenotypes were seen only under blue light but not under other light waves. Transcriptome analysis of plants treated with #203 or an analogous chemical revealed that expression changes of blue-light-related genes only in #203-treated plants hardly occurred.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー フェノーム解析 青色光 植物生長

### 1. 研究開始当初の背景

近年、化石エネルギー資源の枯渇が刻々と進行するとともに、地球温暖化が深刻な問題となっている。そこで、石油等の化石燃料を代替するものとして、バイオマスに期待が寄せられ、利用されはじめてきている。バイオマスとは言葉通り“生物資源の量”であるが、植物のサイズを大きくすることにより、マス(量)の増産が可能となれば、より効率的なバイオマス植物の利用が可能となると考える。植物個体の大きさを決定する因子は細胞の“数”および“大きさ”である。特に植物では、分裂後の細胞1つ1つが著しく細胞体積を増大させることが特徴的であり、植物個体の大きさなどフェノタイプの決定に大きく寄与している。これまでも、核相を倍加することにより植物を大きくする薬剤などが少数知られていたが、稔性が著しく低下することや晩成化などがデメリットであった。そこで、現在応募者が行っている研究領域であるケミカルバイオロジーに着目した。

ハイスループットスクリーニング(HTS)とはスクリーニングをシステム化することで数万~数十万の化合物資源を短時間に活性評価し、生理活性のある化合物を見出すことである。HTSを実施するにあたり、「HTSに適したアッセイ系の構築やデータ収集・処理の効率をいかにあげるか」が非常に重要となる。これまで、植物のフェノタイプを指標とした、細胞の大きさやオルガネラの顕微鏡で撮影できるHTSは行うことは困難であった。その理由として、数万種のケミカルを処理したときに、対応する画像を迅速に撮影するような観察系、つまり植物用IN Cell Analyzerがなかった。しかしながら、申請者の研究室では所属する研究室で開発したマルチウェル用の全焦点・全可視自動撮影顕微鏡を用いることにより、大量かつオルガネラレベルでの詳細な画像撮影および画像解析が可能となった。また、タイリング撮影により植物個体と細胞の同時撮影も可能であることは非常に強力なツールである。

### 2. 研究の目的

近年、大規模なケミカルスクリーニングを行い、目的を達成しうる化合物を特定するケミカルジェネティックスと呼ばれる手法が注目を集めている。そこで、将来的に植物のバイオマスの質向上に寄与することを目指して、本課題では様々な低分子化合物を植物に添加し、対応する植物のフェノタイプを定量的に評価することにより、植物の大きさを制御する有用な低分子化合物の探索を行うことを目的とした。候補ケミカルの解析により、植物の大きさをコントロールする機構の一端を明らかにできれば、学術的にも非常に意義のある研究内容である。

### 3. 研究の方法

#### (1) ハイスループットケミカルスクリーニン

### グ

機器は植物個体および細胞、オルガネラの撮影には、当研究室オリジナルで開発された全自動全焦点可視、蛍光撮影顕微鏡を使用した。また、本研究ではケミカルライブラリとしてLATCAおよび東大創薬オープンイノベーションから購入した8千ケミカルを用いた。シロイヌナズナ植物個体をスクリーニングに用いた。単色青色光下でシロイヌナズナを育成すると、暗所での育成時と比較し、胚軸長が短くなるため、植物が伸長し大きくなっているものが目視でも迅速に判定しやすい。具体的にはケミカル添加後、青色光下で3日間培養し、自動撮影顕微鏡で撮影を行った。

#### (2) 画像解析プログラムの開発および利用

株式会社エルピクセルと共同で、図1のような画像から、植物の組織長や占有面積などのパラメータを計算するコンピュータプログラムを開発した。その画像解析プログラムによって、スクリーニング結果の定量解析をおこなった。このプログラムによる解析手順を図1に示す。

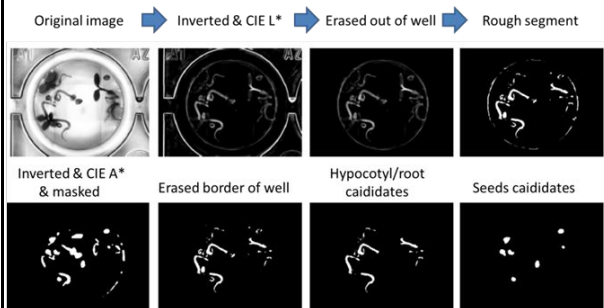


図1 開発した画像開発プログラムの解析手順図

#### (3) 胚軸を伸長させるケミカルの同定および生理的な解析

画像解析から得られた研究対象とする候補化合物を含む培地上にシロイヌナズナ種子を播種し、青色光、赤色光、遠赤色光下で生育させ、胚軸長の測定をおこなった。

#### (4) ケミカル#203 処理時のトランスクリプトーム解析

青色光非感受性を誘発するケミカル#203または#203の類似ケミカル(ネガティブコントロール)を処理した植物と未処理植物間でマイクロアレイ解析比較を行った。マイクロアレイチップはアギレント社製44Kアレイチップを用いた。また、野生型と光形態形成が弱まった $hy5$ 変異体との間においても比較を行った。 $HY5$ 遺伝子はbZIP型の転写因子をコードし、光形態形成カスケードの中心的役割を担う遺伝子である。

### 4. 研究成果

#### (1) ケミカルスクリーニングの結果

ケミカル添加後、青色光下で3日間培養し、自動撮影顕微鏡で撮影を行った。撮影結果の一例を図2に示す。

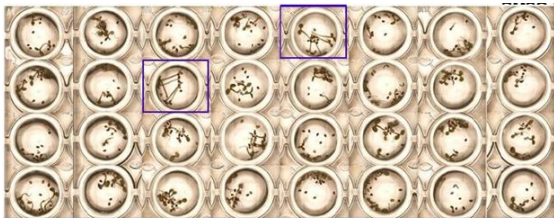


図2 ケミカルスクリーニングの結果の一例  
シロイヌナズナを青色光下で3日間育成させた。四角で囲まれたウェル内の植物個体は右端列のコントロール(破線四角)よりも伸長していた。

### (2) 画像解析プログラムによる定量結果

画像解析プログラムによって、スクリーニング結果の定量解析をおこなった。このプログラムは22種の定量値を出力する。それらのうち2種の値を用いて、定量結果をドットプロットしたものが図3である。

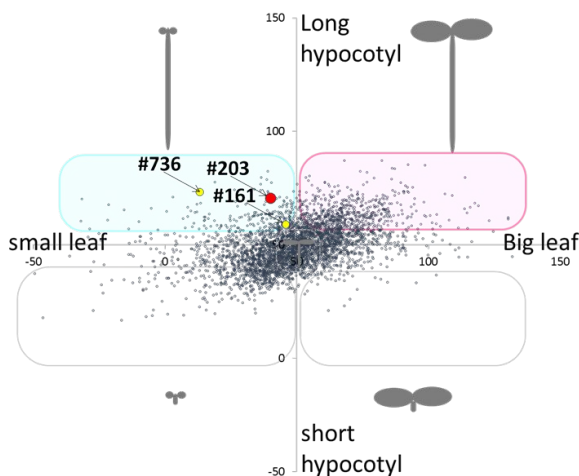


図3 画像解析によるケミカルの影響を示すプロット  
青色で囲った箇所は、青色光に非感受性の形態を誘発したケミカル群。ケミカル#161, #203, #736を研究対象とする候補ケミカルとした。

図3に示す青色公光に非感受性を誘発したケミカルの中で、入手の容易さを考慮して、#161, #203, #736の3つを今後の研究対象とする候補とした。光は植物の形態形成にとって非常に重要なファクターであり、本課題において、光応答をコントロールできるケミカルの同定および作用を知ることはバイオマス研究にとって重要であると考えられる。

### (3) 候補ケミカルを処理した植物の単色光応答への影響の解析

青色光下、候補ケミカル(#161, #203, #736)を含む培地上で植物を育成したときの胚軸長を計測した(図4)。その結果、3つのケミカル処理は未処理に比べて、胚軸長を

長くする(非感受性である)ことが分かった(図4A)。それらの中で、ケミカル#203は、青色光のみに非感受性であり、赤色光、遠赤色光には感受性である結果を得た(図4B)。

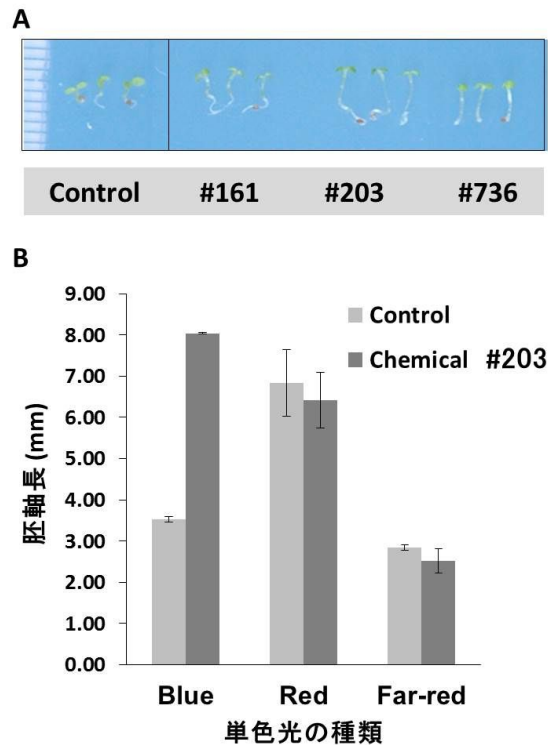


図4 各ケミカルの植物の単色光応答への影響

- (A) 青色光下で生育したシロイヌナズナの写真。ケミカルを含んだ培地で生育すると胚軸が長くなる。  
(B) ケミカル#203処理の単色光の種類に対する胚軸長。青色光特異的に作用することがわかる。

### (4) マイクロアレイ解析の結果

まず、ケミカル#203または#203の側鎖を変えた類似ケミカル(ネガティブコントロール)を処理した植物と未処理植物間でマイクロアレイ解析比較を行った。その結果、#203処理植物では、青色光特異的な遺伝子の発現変化が阻害されることがわかった。ネガティブコントロールではその阻害は起こらなかった。

hy5変異体はすでに青色光非感受性であり、ケミカル#203処理によって青色光下で胚軸長がさらに長くことはなかった。ケミカル#203処理した野生型とhy5変異体との間におけるマイクロアレイ比較を行った。その結果のまとめをテーブル1にまとめる。野生型とhy5変異体の両方で変化した遺伝子群が青色光に対するケミカル#203による阻害の影響を反映していると考えられる。それらの遺伝子群を遺伝子オンロジー別に分類したところ、約半数が代謝経路に關与する遺伝子群であった(図5)。

マイクロアレイ解析の結果からでは、ケミカル#203の直接の標的がわからなかった。

テーブル1: ケミカル#203が野生型シロイヌナズナとhy5変異体のトランスクリプトームに与える影響のまとめ

分類	野生型(遺伝子数)	hy5(遺伝子数)
2倍以上または1/2以下の変化 (p-value < 0.05)	1270	761
2倍以上の変化 (p-value < 0.05)	328	302
1/2以下の変化 (p-value < 0.05)	942	459

現在、ケミカルビーズを用いた標的の探索などを行っているところである。

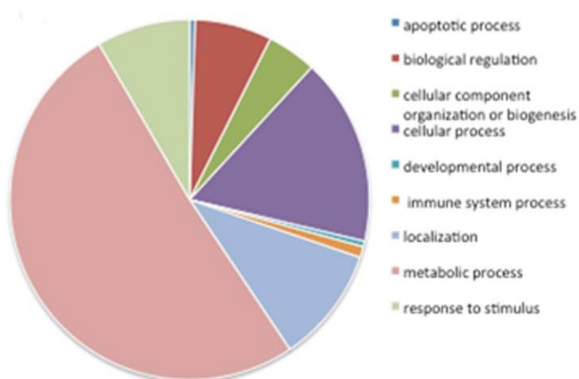


図5 ケミカル#203を処理した野生型とhy5変異体とで共通して発現変化した遺伝子群の分類

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

栗原(大窪)恵美子、栗原志夫、大谷美沙都、朽名夏磨、永田典子、小林恵、小松功典、菊地淳、掛川弘一、WenDee Ong、松井南、Chemical phenomics for biomass engineering, 第56回日本植物生理学会年会、2015年3月17日、東京農業大学・世田谷キャンパス(東京・世田谷)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

栗原 恵美子 (KURIHARA, Emiko )  
理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員  
研究者番号：90639585

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：