

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18667

研究課題名(和文)「エキソンの組合せ制御」を介した植物の無機栄養応答の検証

研究課題名(英文) Plant response to mineral nutrition through the modification of exon-exon combinations

研究代表者

西田 翔(Nishida, Sho)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：40647781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、シロイヌナズナ由来の転写因子MYB59がカリウムトランスポーター遺伝子であるNPF7.3の転写制御を介して、根から地上部へのカリウムの輸送を正に制御していることが明らかとなった。さらに、MYB59の転写産物のエキソンの組み合わせ構造が低カリウム条件に応答して調節されることでMYB59が活性化され、地上部におけるカリウム欠乏症が抑制されることが明らかとなった。本研究は、エキソンの組み合わせ制御を介した植物の無機栄養応答の存在を初めて示す重要な成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、「エキソンの組み合わせ制御」という、これまで知られていなかった全く新しい植物の無機栄養応答機構を立証したものである。これは、植物栄養学分野に留まらず、植物生理学や植物分子生物学など、植物科学全般に重大なパクトを与えうる成果である。今後、本研究をさらに発展させ、メカニズムを詳細に明らかにすることで、エキソン構造の人為的制御を用いた全く新しい植物機能の強化技術の開発に繋がらうものと考えられ、将来的に農業・産業・環境と幅広い分野での活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Here we show that the Arabidopsis transcription factor MYB59 positively regulates potassium translocation from roots to shoots through the transcriptional regulation of potassium transporter NPF7.3. Furthermore, MYB59 is activated by modifying the exon-exon combination under the low potassium condition, contributing the suppression of potassium deficiency in shoots. This study establish the existence of plant response to mineral nutrition through the modification of exon-exon combinations.

研究分野：植物栄養学

キーワード：選択的スプライシング カリウム 転写因子 植物栄養

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の遺伝子には、「エキソン」と「イントロン」という2種類の構造があり、転写後にイントロンは除去されエキソンがつながり合わさり、成熟 mRNA として翻訳へと進む。エキソンの組み合わせ方は、選択的スプライシングや選択的転写開始点により変化し、これにより1つの遺伝子から複数のタンパク質が翻訳されることは良く知られている。さらに、特定の条件に反応してエキソンの組み合わせが変化する「エキソンの組み合わせ制御」が幾つかの生物学的現象に重要な役割を担っていることが動物を中心に知られている。

研究代表者は先行研究において、次世代シーケンサーとバイオインフォマティクスを用いてモデル植物であるシロイヌナズナを低栄養条件に暴露したときの根に含まれる mRNA の網羅的な構造解析を試みた。その結果、600 個以上の遺伝子において低栄養条件に反応して mRNA のエキソンの組み合わせパターンが変化することを見出した。これは、エキソンの組み合わせ制御を介した植物の無機栄養応答機構の存在を初めて示唆するものであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、低栄養条件下において mRNA のエキソンの組み合わせが変化するこの生物学的意義を明らかにし、「エキソンの組み合わせ制御」という植物の新しい栄養応答機構の立証を目指す。本研究では、先行研究により同定された解析候補遺伝子の中から、エキソンの組み合わせパターンの変化が明確な「*MYB59*」という転写因子（他の遺伝子の転写制御を担うタンパク質）をコードするに遺伝子に焦点を絞った。

3. 研究の方法

先行研究により、*MYB59*からはエキソンの組み合わせ構造が異なる二種類の ORF (*MYB59α*、*MYB59β*) が生成されること、低カリウム条件により *MYB59α* の存在量が増加し *MYB59β* の存在量が減少することが明らかとなっていた。このことを踏まえ、以下の実験を行った。

(1) *MYB59* の機能解析

MYB59 の欠損型植物を用いた各種試験により、*MYB59* の遺伝子としての機能を調査した。*MYB59* を欠損した形質転換体を Arabidopsis Biological Resource Center より入手し、ホモ系統を確立した。植物体の低カリウム耐性は、寒天培地栽培および水耕栽培時の生育量で評価した。また、このときの植物体中のカリウム濃度を測定するために、植物体を根と地上部に分け湿式分解し、ICP-MS による元素分析を行った。欠損型と野生型 (Col-0 系統) の遺伝子発現パターンの網羅的な比較を行うために、水耕栽培において欠損型および野生型をカリウム十分条件とカリウム欠乏条件に一週間暴露し、根を対象に HiSeq による RNA-Seq 解析を行った。また、*MYB59* に発現制御されていると予測された遺伝子については、RT-qPCR により再現性を調査した。

(2) *MYB59* が持つ2種類の ORF の機能解析

MYB59 の上流領域 (2632bp) をプロモーター配列として単離し、この下流に *MYB59α* および *MYB59β* の配列を連結したコンストラクトをそれぞれ作成した。そしてこれらを (1) で使用した *MYB59* の欠損型に遺伝子組み換えにより導入し、*MYB59α* と *MYB59β* のどちらか一方のみを発現する形質転換体を作成した。これらの形質転換体の T3 世代からホモ系統を単離し、実験に使用した。これらの低カリウム耐性、体内カリウム濃度、および遺伝子発現解析を *MYB59* の野生型および欠損型と比較した。また、それぞれの ORF から翻訳されるタンパク質の構造からその機能を予測した。

(3) *MYB59* の ORF を過剰発現する形質転換体の作成と低カリウム耐性の評価

MYB59α および *MYB59β* の配列を過剰発現プロモーターである 35SCaMV プロモーターに連結したコンストラクトを作成し、*MYB59* の欠損型に導入した形質転換体を作成した。そして、これらの T3 世代からホモ系統を単離し実験に使用した。寒天培地栽培を用いて形質転換体の低カリウム耐性を評価した。

4. 研究成果

(1) *MYB59* の欠損変異体を用いた機能解析

MYB59 の欠損型植物の低カリウム耐性を野生型植物と比較した。寒天培地栽培および水耕栽培の両方において、欠損型は野生型と比較し低カリウム条件において生育量が小さく、明確な低カリウム耐性の低下が認められた (写真1)。また、このときの体内カリウム濃度を比較した結果、野生型と比較し欠損型において地上部におけるカリウム濃度が有意に低下しており、一方、地下部におけるカリウム濃度は有意差が無いが、あるいは欠損型でわずかに上昇する傾向が認められた。これは、欠損型では根から地上部へのカリウムの移行量が低下していることを示している。以上のことから、*MYB59* はシロイヌナズナの低カリウム耐性に必要であること、また根から地上部へのカリウムの移行に関与していることが明らかとなった。

つづいて、カリウム十分条件およびカリウム欠乏条件における野生型と欠損型でトランスクリプトームの比較解析を行った。その結果、252 個の遺伝子で野生型と比較し欠損型において発現が低下していた。これらの中には、栄養輸送体遺伝子や低 pH ストレス耐性関連遺伝子、根伸長関連遺伝子などが濃縮されていた。一方、欠損型で発現が上昇していた遺伝子は 162 個あり、

栄養応答や酸化ストレス応答に関連する遺伝子が濃縮されていた。体内カリウム輸送に関与する遺伝子に着目し発現量を比較した結果、根の導管にカリウムを積み込みことで地上部へのカリウムの輸送に関わる「*NPF7.3*」の発現量が欠損型において有意に低下していることが明らかとなった。以上の結果から、*MYB59*は*NPF7.3*の発現量の制御を介して、根から地上部へのカリウム輸送に必須な役割を担っていることが明らかとなった。

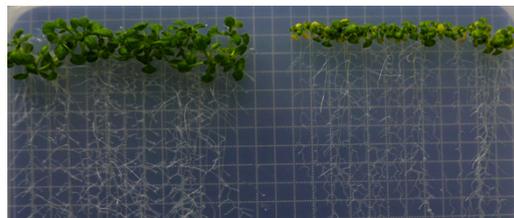


写真1 低カリウム条件下における *MYB59* の欠損型 (右) および野生型 (左) の生育

(2) *MYB59*が持つ2種類のORFの機能解析

*MYB59*の欠損型に*MYB59α*を導入した形質転換体は、野生型と同程度まで低カリウム耐性が回復していることが認められ、一方、*MYB59β*を導入した形質転換体は欠損型と同様に低カリウムに高い感受性を示した。また、これらの植物体からRNAを抽出し、RT-qPCRにより*NPF7.3*の発現量を定量したところ、*MYB59α*導入植物の*NPF7.3*発現量は野生型と同程度であったが、*MYB59β*導入植物では*NPF7.3*の発現量は欠損型と同程度と回復は認められなかった。以上のことから、*MYB59α*は*NPF7.3*の発現制御活性を示すが、*MYB59β*は*NPF7.3*の発現制御活性を示さないことが明らかとなった。

*MYB59α*および*MYB59β*からそれぞれ翻訳されるタンパク質構造を予測した結果、*MYB59α*は転写活性に必須な2箇所のDNA結合領域を有しているものの、*MYB59β*はDNA結合領域を一つ欠損していた。このことから、*MYB59α*は活性型、*MYB59β*は不活性型の転写因子をコードすると考えられた。

さらに、野生型における*MYB59*の発現パターンに着目したところ、*MYB59*の転写量は低カリウム条件にตอบสนองして低下していた。しかし、*MYB59α*と*MYB59β*の存在比が変化することで結果的に*MYB59α*の存在量を増加していることがわかった。従って、*MYB59*の機能自体は低カリウム条件によって活性化されることがわかった。

(3) *MYB59*のORFを過剰発現する形質転換体の作成と低カリウム耐性の評価

*MYB59α*および*MYB59β*をそれぞれ過剰発現する形質転換体の低カリウム耐性を寒天培地栽培を用いて評価した。その結果、期待とは異なり、どの形質転換体においても低カリウム耐性の向上は認められず、むしろ欠損型と同程度の低カリウム感受性を示した。35S CaMVプロモーターを用いた場合、すべての組織において恒常的に導入遺伝子が発現する。一方、Arabidopsis eFP browserを用いて*MYB59*の発現部位を調べた結果、*MYB59*は内鞘細胞特異的に発現が検出されており、さらに*NPF7.3*の発現部位と一致していた。おそらく、組織非特異的に*MYB59*を発現させることで内鞘細胞以外においても*NPF7.3*の発現が誘導されてしまい、それにより組織間でのカリウム輸送が正常に行われなくなり、結果的に地上部へのカリウムの輸送量が低下したのだと推測された。今後、内鞘細胞で特異的に働く高発現プロモーターを使用した検証が必要となる。

以上の(1)から(3)で得られた成果を右図にまとめた。*MYB59*は低カリウムストレスにより転写抑制されるものの、エキソンの組み合わせ制御を介して活性化される。その結果、下流遺伝子である*NPF7.3*の発現が誘導され、地上部へのカリウム輸送が活性化されることで、葉におけるカリウム欠乏症を抑制している。以上の発見は、エキソンの組み合わせ制御を介した植物の無機栄養応答の存在を初めて立証するものであり、植物栄養学分野、あるいは植物分子生物学分野において大きなインパクトを与える成果である。低カリウムにตอบสนองした*MYB59*のエキソンの組み合わせ制御は未知のスプライシング制御因子を介して行われていると推測される。今後、低カリウム時に働くこのスプライシング制御因子を発見しその機能を解明していくことが、エキソンの組み合わせ制御を介した無機栄養応答機構の理解の深化には必須となる。またこれらの知見は、転写産物の構造調節を利用した植物機能の強化という、これまでに無い新しいバイオテクノロジーの開発に繋がらうものと期待される。

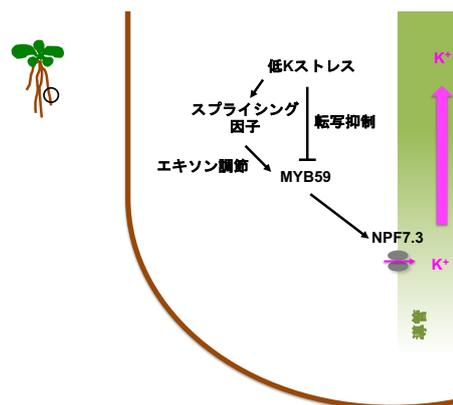


図1 *MYB59*のエキソンの組み合わせ制御を介した低カリウム応答機構のモデル図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Makiha Fukuda, Sho Nishida, Yusuke Kakei, Yukihisa Shimada, Toru Fujiwara	4. 巻 60
2. 論文標題 Genome-Wide Analysis of Long Intergenic Noncoding RNAs Responding to Low-Nutrient Conditions in Arabidopsis thaliana: Possible Involvement of Trans-Acting siRNA3 in Response to Low Nitrogen	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1961–1973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz048	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 西田 翔	4. 巻 3
2. 論文標題 植物の栄養環境に応じた伝令RNAの構造調節	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 55-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Dissanayaka D. M. S. B., Nishida Sho, Tawaraya Keitaro, Wasaki Jun	4. 巻 64
2. 論文標題 Organ-specific allocation pattern of acquired phosphorus and dry matter in two rice genotypes with contrasting tolerance to phosphorus deficiency	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 282-290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2018.1436941	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 Sho Nishida, D. M. S. B. Dissanayaka, Soichiro Honda, Yoshiko Tateishi, Masaru Chuba, Hayato Maruyama, Keitaro Tawaraya, Jun Wasaki	4. 巻 64
2. 論文標題 Identification of genomic regions associated with low phosphorus tolerance in japonica rice (Oryza sativa L.) by QTL-Seq	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 278-281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2017.1412238	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 Sho Nishida, Yusuke Kakei, Yukihisa Shimada, Toru Fujiwara	4. 巻 91
2. 論文標題 Genome-wide analysis of specific alterations in transcript structure and accumulation caused by nutrient deficiencies in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 741-753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.13606	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 西田翔	4. 巻 88
2. 論文標題 次世代トランスクリプトーム解析による植物の新しい無機栄養応答機構の探索	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本土壤肥科学雑誌	6. 最初と最後の頁 242-247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20710/dojo.88.3_242	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 西田 翔	4. 巻 90
2. 論文標題 大規模塩基配列解析技術を利用した植物の低栄養条件に対する適応機構の研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本土壤肥科学雑誌	6. 最初と最後の頁 347-348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.20710/dojo.90.5_347	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 Sho Nishida, Ryoji Tanikawa, Shota Ishida, Junko Yoshida, Takafumi Mizuno, Hiromi Nakanishi, Naoki Furuta	4. 巻 11
2. 論文標題 Elevated expression of vacuolar nickel transporter gene IREG2 is associated with reduced root-to-shoot nickel translocation in <i>Nocca japonica</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3389/fpls.2020.00610	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10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西田 翔
2. 発表標題 植物の栄養環境に応じた伝令RNAの構造調節
3. 学会等名 第11回農芸化学の未来開拓セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田 翔
2. 発表標題 大規模塩基配列解析技術を利用した植物の低栄養条件に対する適応機構の研究
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度静岡大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田 翔
2. 発表標題 植物の低窒素応答におけるTrans-Acting siRNA3の関与
3. 学会等名 第五回植物の栄養研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田翔, 福田牧葉, 寛雄介, 嶋田幸久, 藤原徹
2. 発表標題 シロイヌナズナの低窒素応答におけるtrans-acting siRNA3の関与の可能性
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田翔, 福田牧葉, 寛雄介, 嶋田幸久, 和崎淳, 藤原徹
2. 発表標題 長鎖ノンコーディングRNAを介した植物の低窒素・低リン適応戦略
3. 学会等名 日本植物学会第82会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sho Nishida, Nobuhiro Tanaka, Toru Fujiwara
2. 発表標題 Involvement of a transcription factor in root-to-shoot translocation of potassium 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 西田翔
2. 発表標題 次世代トランスクリプトーム解析による未知の無機栄養応答機構の探索
3. 学会等名 第三回植物の栄養研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sho Nishida, Ryoji Tanikawa, Toru Fujiwara, Naoki Furuta
2. 発表標題 Splicing isoform of NjZNT1 expressed in the zinc hyperaccumulator <i>Noccaea japonica</i> encodes full active zinc transporter
3. 学会等名 6th International Symposium of Metallomics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sho Nishida, Makiha Fukuda, Yusuke Kakei, Yukihisa Shimada, Toru Fujiwara, Naoki Furuta
2. 発表標題 Comprehensive prediction of the nutrient responsive lincRNAs-RNAs interaction in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第57回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西田翔、福田牧葉、笈雄介、古田直紀、嶋田幸久、藤原徹
2. 発表標題 シロイヌナズナの栄養欠乏応答に関わるlincRNAの網羅的探索
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2016年度佐賀大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://nishida.ag.saga-u.ac.jp/home.html

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
研究協力者	藤原 徹 (Fujiwara Toru)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田中 伸裕 (Tanaka Nobuhiro)		
研究協力者	福田 牧葉 (Fukuda Makiha)		