

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H04001

研究課題名(和文)植物の光受容体フィトクロムによる転写開始点制御の分子機構解明

研究課題名(英文)Elucidating molecular mechanism of phytochrome-regulated alternative promoter selection

研究代表者

松下 智直 (Matsushita, Tomonao)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：20464399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物の主要な光受容体フィトクロムは、PIFと呼ばれる転写因子群を介して標的遺伝子の転写量を制御することで、光シグナルを伝達すると考えられている。しかしながら我々は最近、フィトクロムが、2,000を超える遺伝子に直接働きかけ、それらの転写開始点を変化させることで、プロテオームの多様化に寄与していることを発見したが、その制御の分子機構は不明である。本研究では、このフィトクロムによる転写開始点制御の分子機構を解明することを目的として解析を進め、この制御に関わるいくつかの重要な因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同規模の転写開始点変化は、フィトクロムシグナルに限らず、ありとあらゆる事象に伴って、真核生物において共通の分子機構で起こるものである可能性が高いと考えられるため、本研究によって明らかとなったその分子機構は、1つの遺伝子から機能の異なる複数のタンパク質を生み出す普遍的な仕組みを世界に先駆けて明らかにすることとなり、生物学上の大きな進歩となることは間違いない。また、本基礎研究の成果は、「遺伝子発現制御」という一般的な概念に新たな次元をもたらすことで、将来的には教科書に記載されるなどして、科学的啓発という観点から社会・国民に広く還元されるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Phytochrome, a major photoreceptor of plants, is known to regulate several transcription factors to induce genome-wide changes in mRNA levels of the target genes. Recently, however, our group has found that phytochrome also directly induce the selection of alternative promoters in more than 2,000 genes, therefore contributing to diversification of the proteome in Arabidopsis. In this work, in order to unravel the molecular mechanism of alternative promoter selection by phytochrome, we identified several crucial factors involved in this regulatory mechanism.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：転写開始点 フィトクロム 遺伝子発現制御 植物 光受容体

1. 研究開始当初の背景

生物の複雑さはプロテオームの多様さに依存するが、ある 1 つの生物種が持つ遺伝子の数には限りがある。したがって、より高度な生命活動を営むためには、機能の異なる複数のタンパク質を 1 つの遺伝子から生み出す仕組みが必要となる。

選択的転写開始点は、1 つの遺伝子内に存在する異なる転写開始点から、長さの異なる mRNA 分子が転写される現象であり、選択的スプライシングと並んで、プロテオームの拡大に貢献する機構として知られている (Davuluri et al., 2008; Landry et al., 2003)。しかしながら、殆どのケースで 5' UTR の変化しか生み出さず、プロテオームに対するインパクトは小さいと考えられていたため、その重要性はこれまで軽んじられてきた。

フィトクロムは、植物の主要な光情報受容体であり、赤色光依存的に PIF と呼ばれる転写因子を阻害し、その 2,000 ほどの標的遺伝子の転写量を変化させることで、植物の様々な光応答を引き起こすと考えられている。

このような背景のなか、我々は最近、キャップ構造を持つ mRNA 5' 末端の配列だけを次世代シーケンサーによって解読する TSS-seq 解析により、転写開始点の位置と発現量をシロイヌナズナにおいて網羅的に解析した結果、フィトクロムが、ゲノムワイドに 2,000 を超える遺伝子の転写開始点を変化させることにより、mRNA の 5' 末端の長さを制御し、その結果、およそ 400 ものタンパク質の細胞内局在が光依存的に変化することを発見した (Ushijima et al., 2017)。

さらに我々は、上記の仕組みにより、ある光環境において、1 つの遺伝子から細胞内局在の異なる複数のタンパク質が生じ、それらが細胞内の異なる場所で異なる機能を果たすことが、植物の様々な光環境への適応に働くことを明らかにした (Ushijima et al., 2017)。

これらの結果は、転写開始点制御が、転写・スプライシング・翻訳と並んで、真核生物の遺伝子発現制御における新たな普遍的な過程として、プロテオームの機能的な多様化に少なからず寄与することを示している。

ここで興味深い事に、フィトクロムによる転写制御 (mRNA 総量の制御) と転写開始点制御をそれぞれ受ける標的遺伝子群は、互いに殆どオーバーラップしないことが判明した。この結果は、フィトクロムによる転写開始点制御を受ける遺伝子のほとんどが、転写量 (mRNA の総量) を一定に保ったまま、フィトクロムシグナルに応じて転写開始点を変化させることを示すが、その分子機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、フィトクロムによる転写開始点制御の分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

フィトクロムによる転写開始点制御に本質的に関わる因子を同定するために、逆遺伝学的手法と順遺伝学的手法を両方駆使して研究を進める。さらに、転写開始点制御の一般性を検証するために、植物において様々なシグナルに応じた転写開始点変化を網羅的に解析する。

(1) 逆遺伝学的手法に関しては、これまでにフィトクロムによる転写量制御に関与することが知られている因子の変異体において、フィトクロムによる転写開始点制御の異常が見られないかを調べることで、当該制御に関わる因子を探索する。

(2) 順遺伝学的手法では、まず、フィトクロムによる転写開始点制御を受け、タンパク質の細胞内局在変化を顕著に示す標的遺伝子について、ゲノム DNA 断片の 3' 末端に GFP 遺伝子を融合したものを各ノックアウト変異体に導入し、形質転換相補系統を作製する。そして各変異表現型が相補され、そして GFP 蛍光の細胞内局在が期待通り光依存的に変化することを確認した上で、それらを EMS により変異原処理し、M2 世代において、光依存的なタンパク質の細胞内局在変化が起こらない変異体をスクリーニングする。そして、その原因遺伝子を同定することで、当該制御に必要なトランス因子の同定を狙う。

(3) ゲノムワイドな転写開始点変化と、それに起因するタンパク質局在変化が、フィトクロムシグナルに限らず、植物においてありとあらゆるシグナルに伴って起こるものであることを検証するために、様々な条件で TSS-seq 解析を行う。

4. 研究成果

(1) 上記の順遺伝学的手法により、フィトクロムが、転写量制御の際と同様に、PIF を阻害することによって転写開始点制御を行うことを明らかにした。さらに、ChIP-seq 解析の結果、フィトクロムによる転写量制御の標的遺伝子のみならず、転写開始点制御の標的遺伝子においても、その近傍に PIF が結合していることが確認された。しかしながら、フィトクロムによる転写開始点制御の標的遺伝子において、その近傍に濃縮するシス配列を解析した結果、予想に反して、それらの標的遺伝子近傍には、PIF の認識結合配列である G-box は一切存在しないことが明らかとなった。このことは、PIF がそれらの DNA 上に、他の因子を介して間接的に結合していることを意味する。

次に PIF が何を介して標的遺伝子近傍に結合しているのかを明らかにするために、PIF の相互作用因子を 2 通りの手法で同定することを試みた。1 つは、PIF を bait とした yeast two-hybrid スクリーニングであるが、従来法では、転写活性化能を有する転写因子などを bait として用いることはできないため、split-ubiquitin 法を用いて、PIF 全長分子を細胞膜の内側にアンカーさせ、prey 分子との相互作用を細胞質にて評価することでスクリーニングを行うものである。もう 1 つは、植物組織からの粗抽出液中で PIF を免疫沈降させた時の共沈降タンパク質を質量分析 (LC-MS/MS) により同定する手法である。これらの解析の結果、それぞれ興味深い因子がいくつか同定され、現在それらの因子の変異体においてフィトクロムによる転写開始点制御に異常が見られないかを調べることで、当該制御への関与を解析中である。

(2) 順遺伝学的手法では、フィトクロムによる転写開始点制御に異常を示す変異体をこれまでに多数単離した。さらにそれらの変異体の遺伝様式を解析し、一遺伝子性の劣性変異体を多数選抜した。現在それらの原因遺伝子を解析中である。

(3) 植物における様々なシグナルの代表として、代表的な植物ホルモンであるオーキシン、アブシシン酸、サイトカイニンの 3 つを取り上げ、これらによって特異的に引き起こされる転写開始点変化を、シロイヌナズナにおける TSS-seq 解析により網羅的に解析した結果、フィトクロムシグナルによって引き起こされるのと同規模のゲノムワイドな転写開始点変化が、これらの植物ホルモン処理によっても引き起こされることが明らかとなった。さらに、それぞれの転写開始点変化によって、コードするタンパク質のアミノ酸配列が変化し、そしてその結果タンパク質の細胞内局在が変化することが予測された。以上の結果より、ゲノムワイドな転写開始点変化と、それに起因するタンパク質局在変化が、フィトクロムシグナルに限らず、植物においてありとあらゆるシグナルに伴って起こるものであることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yagi Hiroki, Nagano Atsushi J, Kim Jaewook, Tamura Kentaro, Mochizuki Nobuyoshi, Nagatani Akira, Matsushita Tomonao, Shimada Tomoo	4. 巻 72
2. 論文標題 Fluorescent protein-based imaging and tissue-specific RNA-seq analysis of Arabidopsis hydathodes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 1260 ~ 1270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/eraa519	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 Matsushita T	4. 巻 2026
2. 論文標題 Regulation of alternative splicing by phytochromes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 143-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9612-4_11	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 Sakaguchi J, Matsushita T, Watanabe Y	4. 巻 -
2. 論文標題 DWARF4 accumulation in root tips is enhanced via blue light perception by cryptochromes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Cell Environ.	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) 10.1111/pce.13510	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 Ishishita K, Higa T, Tanaka H, Inoue SI, Chung A, Ushijima T, Matsushita T, Kinoshita T, Nakai M, Wada M, Suetsugu N, Gotoh E	4. 巻 183
2. 論文標題 Phototropin2 Contributes to the Chloroplast Avoidance Response at the Chloroplast-Plasma Membrane Interface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiol.	6. 最初と最後の頁 304-316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00059	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 Yagi H, Tamura K, Matsushita T, Shimada T	4. 巻 16
2. 論文標題 Spatiotemporal relationship between auxin dynamics and hydathode development in Arabidopsis leaf teeth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Signal Behav.	6. 最初と最後の頁 1989216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2021.1989216	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 Nomoto M, Skelly MJ, Itaya T, Mori T, Suzuki T, Matsushita T, Tokizawa M, Kuwata K, Mori H, Yamamoto YY, Higashiyama T, Tsukagoshi H, Spoel SH, Tada Y	4. 巻 37
2. 論文標題 Suppression of MYC transcription activators by the immune cofactor NPR1 fine-tunes plant immune responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 110125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.110125	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

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Matsushita T
2. 発表標題 Phytochrome diversifies the proteome through alternative promoter selection to confer adaptability to light environments
3. 学会等名 2019 Cold Spring Harbor Asia Conference on Plant Cell & Developmental Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsushita T
2. 発表標題 Phytochrome diversifies the proteome through alternative promoter selection to confer adaptability to light environments
3. 学会等名 Frontiers in plant environmental response research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nanako Katake, Jaewook Kim, Tomokazu Ushijima, Tomonao Matsushita
2. 発表標題 フィットクロムによる転写開始点制御に関わるトランス因子の順遺伝学的解析
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 Jaewook Kim, Mika Nomoto, Yasuomi Tada, Tomonao Matsushita
2. 発表標題 フィットクロムによる転写開始点制御の標的遺伝子に見出されるシス配列の解析
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 Jaewook Kim, Mika Nomoto, Yasuomi Tada, Tomonao Matsushita
2. 発表標題 Cis-Element Analysis of Phytochrome-Mediated Alternative Promoter Selection in Arabidopsis
3. 学会等名 Japan-Taiwan Plant Biology 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsushita T
2. 発表標題 光環境変動への適応を支える転写開始点制御機構
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsushita T
2. 発表標題 不均一光環境変動に対する植物の適応を支える転写開始点制御機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsushita T
2. 発表標題 植物の不均一環境変動への適応を支える転写開始点制御機構
3. 学会等名 植物科学シンポジウム2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	Lancaster University			
台湾	Academia Sinica			