

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14444

研究課題名(和文)機能未知の細胞質局在型アイソフォームを利用した新奇育種技術の開発

研究課題名(英文)Development of novel breeding techniques using cytoplasmically localized isoforms with unknown functions

研究代表者

牛島 智一 (USHIJIMA, TOMOKAZU)

摂南大学・農学部・講師

研究者番号：50815058

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)：シロイヌナズナにおいて発見した光依存的な転写開始点制御が、実用植物であるイネとトマトにおいても存在することを検証するために、イネおよびトマトについて次世代シーケンサーによる転写開始点解析(TSS-seq解析)を行い、イネやトマトにおいても光依存的な転写開始点制御が存在することを明らかにした。

さらに、イネにおいて光依存的な転写開始点制御によって細胞質局在型アイソフォームを生じる遺伝子について、形質転換のためのコンストラクションを行い、バイナリーベクターの整備を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネやトマトでも光依存的な転写開始点制御が行われていたことから、環境に応答したゲノムワイドな転写開始点の制御が様々な植物で行われていることが示唆された。このことから、様々な植物種で環境変化に応答した転写開始点制御によって機能未知の細胞質局在型アイソフォームが生じると考えられる。これらの機能未知の細胞質局在型アイソフォームは植物の環境への適応に働いていると考えられ、環境ストレスへの耐性の付与を目的とした育種への利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To verify that the light-dependent regulation of transcription start sites discovered in Arabidopsis also exists in rice and tomato, which are practical plants, we performed transcription start site analysis (TSS-seq analysis) using next-generation sequencers for rice and tomato, and found that the light-dependent regulation of transcription start sites also exists in rice and tomato. We found that light-dependent regulation of transcription start sites also exists in rice and tomato.

In addition, we have constructed and prepared binary vectors for the transformation of genes that produce cytoplasmic isoforms by light-dependent transcription start site regulation in rice.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：転写開始点選択 遺伝子発現制御 環境シグナル伝達 フィトクロム 光環境応答 光受容体 タンパク質局在

1. 研究開始当初の背景

植物の主要な光受容体であるフィトクロムは、赤色光依存的に PIF と呼ばれる転写因子群を阻害し、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。

しかし、申請者らは、mRNA の 5' 末端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、上記の転写量制御に加えて、さらに別の 2,000 を超える遺伝子に対して直接働きかけ、転写開始点を制御することで、mRNA の 5' 末端の長さを変化させ、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., *Cell*, 2017)。

ここで興味深いことに、当該制御を受けるタンパク質の大部分において、N 末端に存在する、特定細胞内小器官への移行シグナル配列が失われることで、ある光条件にて細胞質局在型アイソフォームが生じる。

光呼吸に必須なグリセリン酸キナーゼは、これまで葉緑体にのみ局在すると考えられてきたが、フィトクロムによる転写開始点制御により、日陰条件にて細胞質局在型のアイソフォームが発現し、光呼吸の細胞質バイパス経路を構成することで、変動光条件における光阻害を低減させる (Ushijima et al., *Cell*, 2017)。これは、木漏れ日による変動光に曝される可能性の高い日陰条件への適応機構であると考えられる。

このように、これまで特定の細胞内小器官にしか局在しないと考えられていたタンパク質について、当該制御により N 末端のシグナル配列が失われることで、機能未知の細胞質局在型アイソフォームがある光条件において出現し、それらが様々な光環境への植物の適応に働くことが明らかとなった。それらの機能を利用することで、植物の環境ストレス耐性などを人為的に向上できるのではないかと考えられた。また、グリセリン酸キナーゼのように、植物の生存に必須であるためこれまで利用が困難であった遺伝子も、細胞質局在型アイソフォームのみをターゲットにすることで、育種利用が可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、機能未知の細胞質局在型アイソフォームを利用した新奇育種技術の開発を目指し、まず、我々がシロイヌナズナにおいて発見した光依存的な転写開始点制御が、実用植物であるイネとトマトにおいても存在することを検証した上で、光依存的な転写開始点制御によって生じる細胞質局在型アイソフォームの機能をイネで明らかにし、育種に利用可能な細胞質型アイソフォームを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

研究項目 イネとトマトにおける赤色光依存的な転写開始点変化の網羅的な解析

イネおよびトマトの芽生えを暗所で生育させた後、連続赤色光を 3 時間照射したサンプルと、そのまま暗所で生育させたサンプルを準備し、それらから RNA を抽出して、次世代シーケンサーによる転写開始点解析 (TSS-seq 解析) を行った。

転写開始点は、植物の形態変化に伴って大きく変化することが知られている (Mejía-Guerra et al., 2015)。そして植物の形態は、光シグナルの有無によって劇的に変化する。そこで本研究では、黄化芽生えに連続赤色光を 3 時間のみ照射することで、形態変化を引き起こすことなく、光シグナルのみに依存した転写開始点変化を解析することが

可能となる。

しかし、標的遺伝子の中には、転写開始点変化の光応答性が遅く、3時間の赤色光照射ではごく僅かな変化しか示さないものも存在すると考えられる。そこで、そのような遺伝子についても同定を可能にするために、連続赤色光下で生育し続けたサンプルも用意し、暗所で育てたサンプルの結果と比較解析した。

同定された赤色光依存的な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するかどうか、またその結果、タンパク質の細胞内局在変化が予測されるかどうかを解析した。そしてそれらの結果を、シロイヌナズナにおいて既に得られている結果 (Ushijima et al., *Cell*, 2017) と比較することで、光依存的な転写開始点制御が植物において普遍的な現象であることを検証した。

研究項目 細胞質局在型アイソフォームの機能解析

研究項目の結果、光依存的な転写開始点変化によって、コードするタンパク質のN末端のアミノ酸配列変化を示すことが判明した遺伝子について、短い転写産物由来のcDNAを、形質転換イネにおいて過剰発現させ、カルスから再生したT0植物の表現型を観察することで、細胞質局在型アイソフォームの機能を網羅的に解析する。

導入する短いcDNAに対して、N末端にGFPタンパク質が融合されるようにベクターを構築する。これは、結合したGFPタンパク質を利用して、蛍光観察や抗GFP抗体を用いたウエスタンブロット分析を行うことで、導入遺伝子に由来するタンパク質の蓄積確認や定量が可能となるためである。また、本研究でターゲットとする細胞質局在型アイソフォームは、自然条件における急な環境の変化に俊敏に応答するために、敢えてmRNAやタンパク質の安定性が低く保たれている可能性がある。そこで、導入した遺伝子由来のmRNAやタンパク質の安定性を高め、過剰発現を可能にする目的で、GFPタンパク質をN末端に融合するよう設計する。

4. 研究成果

TSS-seq解析によって、おおよそ350、350、480百万リードがシロイヌナズナ、トマト、イネから得られた。Trimmomatic (version 0.32) (Bolger et al. 2014)を用いて、シーケンス用のアダプターシーケンスを取り除いた後、得られたリードのクオリティチェックを行い、おおよそ8%のリードを、Qualityスコアが20以下の条件で排除した。リードは、三種のゲノム[The Arabidopsis Information Resource version 10; TAIR10、<https://www.arabidopsis.org/>、International Tomato Genome Sequencing Project version 3; ITAG3.0 https://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome、International Rice Genome Sequencing Project version 1; IRGSP1.0、<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/download/irgsp1.html>]にBowtie2 software (Langmead and Salzberg 2012)を用いてマップされた。マップされた塩基サイトは、RECLU(Ohmiya et al. 2014)によって、条件ごとにクラスター化され、クラスター同士が1塩基でも重なっている場合、冗長性のないピークとしてまとめた。本研究では、この冗長性のないピークの範囲を転写開始点(TSS)と定義した。

推定されたTSS多様性の精度を検証するため、マップされたリードがシロイヌナズナ、トマト、イネのデータベース(TAIR10、ITAG3.0、IRGSP1.0)に登録されているTSSからどれだけ離れているかを検証した。その結果、データベースに登録されている代表的なTSSに、TSSリードの5'末端が最も数多くマップされていた。そのため、TSS-seqのリード情報はこれまでの遺伝子アノテーションと大きく矛盾しないことが示唆された。

TSS-seq 解析は、暗条件で発芽後 4 日以上経過した植物体と、その植物体に赤色光を照射してから 3 時間または 4 日以上経過した植物体を用いた。暗条件と赤色光 3 時間、暗条件と赤色光 4 日以上各 TSS を持つ mRNA の転写量を比較することで、赤色光に应答する TSS 変動を、シロイヌナズナ、トマトおよびイネで、それぞれ同定した。これらの TSS 変動は、シロイヌナズナ、トマトおよびイネの、数百～数千個の遺伝子に対応していた。

以上の結果から、光に应答した転写開始点制御がシロイヌナズナだけでなく、イネやトマトにも存在しており、当該制御により機能未知の細胞質局在型アイソフォームが生じることを明らかにした(図 1)。このことは光だけでなく、植物の様々な環境応答に転写開始点制御が普遍的に存在する可能性を示し、当該制御により生じる細胞質局在型アイソフォームが様々な植物種の新奇育種技術のターゲットとして利用できることを示唆している。

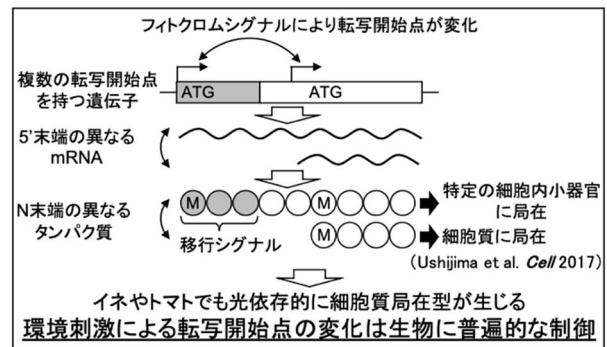


図 1 光依存的な転写開始点制御

ベクターは、ユビキチンプロモーター: *GFP* 遺伝子: Nos ターミネーターのカセットをあらかじめ準備したバイナリーベクターを構築し、そこに候補の cDNA を in-fusion 技術を利用して、相同組換えにより導入できるようにした。これにより、ハイスループットのベクター構築を可能にし、機能未知の細胞質局在型アイソフォームの育種利用における評価が可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阿久根 清羅、牛島 智一、松下 智直
2. 発表標題 フィットクロムの転写開始点制御によって生じる細胞質局在型アイソフォームの機能解明
3. 学会等名 育種学会 第136回講演会（近畿大学）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿久根 清羅、牛島 智一、松下 智直
2. 発表標題 フィットクロムの転写開始点制御によって生じる細胞質局在型アイソフォームの機能解析法の検討
3. 学会等名 九州育種談話会 第14回講演会（東海大学）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江副 晃洋、牛島 智一、Zhang Ping、You - Liang Cheng、Shih-Long Tu、鈴木 穰、阿久根 清羅、白井 一正、松下 智直、花田 耕介
2. 発表標題 植物での赤色光シグナル下での転写開始点制御と重複遺伝子の代替的役割
3. 学会等名 日本分子生物学会 第42回年会（福岡）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomokazu Ushijima, Kousuke Hanada, Tomonao Matsushita
2. 発表標題 Phytochrome induces genome-wide changes in alternative promoter selection to modulate protein localization
3. 学会等名 1st Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牛島 智一, 花田 耕介, 松下 智直
2. 発表標題 赤色光受容体フィトクロムによるゲノムワイドな転写開始点制御
3. 学会等名 日本育種学会 第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江副 晃洋、牛島 智一、岡義人、金載旭、Zhang Ping、You - Liang Cheng、Shih-Long Tu、鈴木 穰、白井 一正、松下 智直、花田 耕介
2. 発表標題 Frequently observed convergent evolution by either protein divergence generated by transcription starting sites (TSS) shifts or by gene duplication under red-light response in three plants
3. 学会等名 日本進化学会 第22回年会 (オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牛島智一
2. 発表標題 光受容体フィトクロムによるゲノムワイドな転写開始点制御の発見
3. 学会等名 第59回植物バイテクシンポジウム (オンライン) (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/read0106304
--

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