

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14734

研究課題名(和文) CAPTURE法による植物の成長制御に関わる転写制御機構の解析

研究課題名(英文) The analysis of the transcriptional regulation for plant growth by CAPTURE approach

研究代表者

吉田 英樹 (Hideki, Yoshida)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・特任助教

研究者番号：10814353

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)：dCas9タンパク質およびビオチン化酵素をプロトプラスト内で安定的に発現させるコンストラクトについて検討した結果、特定のプロモーターと最適化したdCas9遺伝子配列を用いることでdCas9を安定的に発現させることができた。また、dCas9とビオチン化酵素を発現させたプロトプラストをビオチンを含むバッファーでインキュベートして、ビオチン化されたdCas9を検出することができたが、ストレプトアビジンによる沈降を確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物において特定のプロモーター領域上に結合している転写制御因子の網羅的な解析は未だに確立されておらず、本研究は最近ヒト培養細胞において確立されたCAPTURE法を利用し、植物において解析を行う試みであった。実際にタンパク質を解析する段階までは進めなかったものの、プロトプラスト内で特定のタンパク質にビオチン化を引き起こすことができる技術は、通常のタグ付きタンパク質発現では得られなかった成果を得られる可能性があり、重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：As a result of investigating the plasmids, we were able to stably express dCas9 protein and biotinyltransferase in protoplasts by using a specific promoter and an optimized dCas9 gene sequence. We were also able to detect biotinylated dCas9 by incubating protoplasts expressing dCas9 and biotinyltransferase in the specific buffer containing biotin, but we could not confirm precipitation of biotinylated dCas9 by streptavidin.

研究分野：植物生理学

キーワード：成長制御 転写調節 CRISPR/Cas9 技術開発

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現はゲノム上の cis-regulatory element (CRE) 領域とそこに結合する転写制御因子によって制御される。遺伝子をコードしている領域と比較して、CRE についての知見は遙かに少ない。転写制御機構の解析においては、これまで順遺伝学的手法により様々な成長制御に関わる転写制御因子が明らかにされてきているが、順遺伝学的手法では冗長的に働く転写因子の同定は非常に難しい。一方で、逆遺伝学的手法では酵母を使った yeast one hybrid, two hybrid による網羅的な解析が主流であるが、この手法は酵母内で解析するものであり、植物細胞内で特定の CRE と結合する転写制御因子を網羅的に解析する手法は確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では、植物において成長制御に重要な遺伝子のプロモーター上の CRE がどのように遺伝子発現を制御しているのか、つまりどのような転写制御因子が trans 因子として CRE と結合するのかを同定し、その作用機序を解析することを目的に研究を行う。

3. 研究の方法

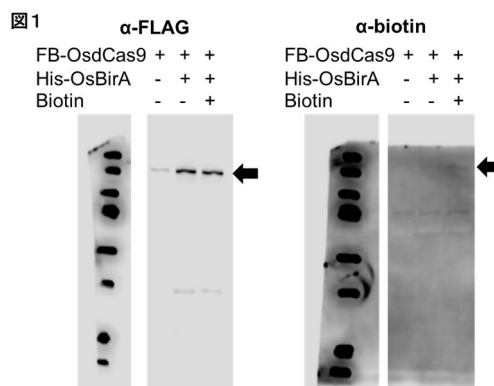
動物細胞の研究において確立された CAPTURE 法 (CRISPR affinity purification in situ of regulatory elements; Liu et al., Cell, 2017) を植物のプロトプラストを用いた実験系に援用することを重要な目標とする。CAPTURE 法とは、biotinylated site を付加させた上、nuclease 活性を失わせた Cas9 タンパク質 (dCas9) と、biotin 化酵素、および目的の CRE に対応する single-guide RNA (sgRNA) を同時に細胞内で発現させることで、biotin-dCas9-sgRNA-DNA の複合体を in situ において形成させ、biotin-streptavidin 結合によってアフィニティー精製し、質量分析計による解析を行うという手法である。

本手法の利点について、4点あげることができる。

1. in situ におけるタンパク質-DNA 結合を解析することができ、さらにタンパク質-タンパク質結合も解析できるため、co-regulator も含めた特定の cis-element の制御に関わる転写制御マシーナリーを網羅的に同定することができる。
2. 一般的に抗原抗体結合よりも biotin-streptavidin 結合の方が 1000 倍以上アフィニティーが高く、通常のタグ付きタンパク質や抗 Cas9 抗体を用いるよりもタンパク質-DNA 複合体を効率よく回収することができる。
3. 抗体を用いないことで非特異的な結合を抑えることができる。また、biotin-streptavidin 結合が強力であることから、アフィニティー精製の条件を強くすることで、特異的な結合のみを回収できる確率が高い。
4. 複数の CRE について検討を行おうとしたときに sgRNA の配列を変えればよいだけであり、簡便である。またタンパク質ライブラリーを作成する必要もない。

4. 研究成果

まず、先行研究を参考にビオチン化酵素 (BirA) および deactivated Cas9 (dCas9) をプロトプラストで安定的に発現させるコンストラクトの検討を行った (Liu et al., Cell, 2017)。コンストラクションは dCas9 には FLAG タグおよびビオチン化サイト (FLAG and biotin-acceptor site, FB) を、BirA には 6xHA タグを付加するように設計した。先行研究で用いられている BirA および dCas9 の遺伝子配列を用いたところ、プロトプラスト内の目的タンパク質の発現が検出できなかったことから、それぞれコーディング配列をのイネコドンに最適化した配列に変更し (OsBirA, OsdCas9) 発現させたところ、発現を確認できた。しかし、dCas9 についてはタンパク質の存在量が少なかつたことからプロモーター配列の検討を行った。35S プロモーター、Enhanced 35S プロモーター (Yoshida et al., PNAS, 2014)、トウモロコシのユビキチンプロモーターを検討した結果、トウモロコシユビキチンプロモーターが最もタンパク質の発現が高かつた。作成したプラスミドをイネ葉肉細胞由来のプロト



プラストに導入し、ストレプトアビジンを用いてビオチン化された dCas9 を検出することを試みた。通常のバッファーで実験を行ったところ、ビオチン化された dCas9 を検出できなかったことから、プロトプラストをインキュベートするバッファー条件の検討を行い、バッファー中にビオチンを添加し、48 時間インキュベートすることでビオチン化 dCas9 を検出することができた (図 1)。本研究期間中では当初の目的としていた CAPTURE 法を確立することはできなかったが、イネ葉肉細胞由来プロトプラストにおいて特定のタンパク質にビオチンを付加ことができるようになったことは、様々な免疫沈降を必要とする同種の実験への応用が考えられる技術であり、今度の活用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hideki Yoshida, Sayaka Takehara, Masaki Mori, Reynante Lacsamana Ordonio, Makoto Matsuoka	4. 巻 61
2. 論文標題 Evolution of GA Metabolic Enzymes in Land Plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1919-1934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcaa126	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 Sayaka Takehara, Shun Sakuraba, Bunzo Mikami, Hideki Yoshida, Hisako Yoshimura, Aya Itoh, Masaki Endo, Nobuhisa Watanabe, Takayuki Nagae, Makoto Matsuoka, Miyako Ueguchi-Tanaka	4. 巻 11
2. 論文標題 A common allosteric mechanism regulates homeostatic inactivation of auxin and gibberellin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 2143-2143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16068-0	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 -

1. 著者名 吉田 英樹、上口（田中） 美弥子	4. 巻 57
2. 論文標題 ジベレリン受容体GID1の分子進化 受容システムの最適化と双子葉類における多様化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 331-333
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 Yoshida Hideki, Tanimoto Eiichi, Hirai Takaaki, Miyanoiri Yohei, Mitani Rie, Kawamura Mayuko, Takeda Mitsuhiro, Takehara Sayaka, Hirano Ko, Kainosho Masatsune, Akagi Takashi, Matsuoka Makoto, Ueguchi-Tanaka Miyako	4. 巻 115
2. 論文標題 Evolution and diversification of the plant gibberellin receptor GID1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E7844 ~ E7853
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1806040115	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田英樹、島谷善平、鈴木寿法、寺田理枝、上口美弥子、松岡信、辻寛之
2. 発表標題 イネbZIP型転写因子によるブラシノステロイド関連遺伝子発現制御の解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------