

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05822

研究課題名(和文) 無細胞翻訳系を基盤としたイネ高温不稔の分子制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on molecular regulatory mechanisms in thermo-sensitive male sterility of rice based on cell-free translation system

研究代表者

戸澤 譲 (Tozawa, Yuzuru)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：90363267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：急速に進む地球温暖化は、イネなどの主要穀類の生産に大きな影響を与え、花期の高温条件が米の品質劣化のみならず、時に不稔を招くことが明らかになってきた。この高温不稔の問題は、将来的な食糧生産維持のために解決すべき重要課題の一つである。研究代表者らは、転写因子の機能解析をタンパク質レベルで解析することを主な目的とし、小麦胚芽抽出液を利用する無細胞翻訳系を利用して、イネの高温雄性不稔に関係すると予想してきた転写因子候補を完全長タンパク質として合成・精製し、さらに転写因子OsMyb80の制御下にある花粉形成に必須な遺伝子CYP703の転写制御領域へのOsMyb80の特異的結合を生化学的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高温雄性不稔に関連する転写因子のタンパク質レベルでの機能解析系の構築は、温度感受性を生化学的に検証する上で重要な技術的プラットフォームの提供につながると期待される。高温条件で影響を受けやすい分子機構の解明を加速することにより、タンパク質工学やゲノム編集を利用した転写制御様式のオーダーメイド型改変など、イネなどの主要作物の高温条件対策を具体的に進める応用研究の下地になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The rapid global warming has a great impact on the production of major cereals such as rice, and the high-temperature conditions during the flowering season not only deteriorate the quality of seeds but also sometimes cause sterility. This problem of high-temperature sterility is one of the important issues to be solved in order to maintain food production in the future. The principal investigators predicted transcription factors that it might be involved in high-temperature male sterility in rice. To conduct a functional analysis of these transcription factors at the protein level, the candidates were synthesized and purified as a full-length protein by using a cell-free translation system based on the wheat germ extract. It has been confirmed that one transcription factor, OsMyb80, shows specific binding to the regulatory region of the gene CYP703, which is essential for pollen formation.

研究分野：タンパク質科学、分子生物学

キーワード：転写因子 イネ 高温不稔

1. 研究開始当初の背景

研究分担者らは、高温により一群のタペート特異的遺伝子が発現抑制されること、柱頭上での花粉の発芽が低下することを明らかにし (Endo *et al.* 2009)、タペートでの遺伝子発現制御の異常が花粉稔性の低下の主因であるとするモデルを立てた。タペートは葯壁の最内層の組織で、花粉に酵素や構成成分等を供給する役割を担っており、転写、翻訳、酵素活性、生成産物の高次構造などの各ステップで高温ストレスの影響を受ける可能性が考えられる。主にシロイヌナズナとイネから、タペートで発現する転写制御因子は十数種類報告されており、いずれも花粉形成に必須であり (Li *et al.* 2006; Aya *et al.* 2009)、多種類のターゲット遺伝子に対する緻密な制御メカニズムの存在が想起される。

転写因子タンパク質の機能を明らかにするためには、一般的に該当するタンパク質をコードする遺伝子の欠損個体を作成し、この遺伝子欠損変異株と野生株の転写物の比較解析を進めるとともに、転写因子の DNA 結合領域の特定 DNA シス配列への結合能を指標とした生化学的解析データを得る必要がある場合が多い。一方、転写因子には DNA 結合領域の他にも他の因子との相互作用に必要なタンパク質領域も存在するため、他の因子との関係性を正確に理解するためには、各転写因子の全長タンパク質を用いた生化学的解析が可能となることがより望ましい。大腸菌によるタンパク質調製系は、この目的には不向きなケースが多く、実際には全長タンパク質を利用した転写因子解析は技術的に極めて困難な状況にあった。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が基盤整備してきた無細胞翻訳系をイネ転写因子タンパク質の発現および機能解析に適用し、合成した転写因子を用いて、複数の転写因子による転写活性化の分子制御を明らかにするとともに、転写・翻訳されたターゲット因子をも含めて、一連の反応に関わるタンパク質因子の形態や活性を解析することを目的に研究を開始した。

3. 研究の方法

本研究では、イネ (*Oryza sativa* NIPPOBARE) が高温条件下で雄性不稔を引き起こす際に鍵となることが予想されてきた転写因子 OsMYB80 およびその関連因子を材料として、近縁のコムギの無細胞翻訳系を利用した全長転写因子タンパク質の合成および精製系を確立し、タンパク質レベルでの全長型の転写因子の機能解析系の構築を進めた。ここでは、転写制御を受ける遺伝子上流の DNA に結合する領域のみではなく、多量体形成や他の転写関連因子との相互作用に重要な制御ドメインを含む完全長の転写因子タンパク質の調製と精製の系を確立し、さらに精製した転写因子タンパク質を利用するインビトロでの生化学的機能解析系の構築を目指して研究を進めた。また、ここで利用したコムギ胚芽抽出液による無細胞翻訳系は膜結合型酵素の調製にも有効であることより、並行してイネの高温雄性不稔に深く関連、もしくは標的そのものの可能性を秘めると考えた花粉形成期に重要な機能を果たす CYP703 (Morant *et al.* 2007) の機能型タンパク質再構成系の構築を進めた。

4. 研究成果

(1) イネ転写因子あるいは転写因子候補として、GAMYB、OsMYB80、TDR、EAT1、bHLH142 の各 cDNA のタンパク質コード領域を無細胞翻訳の鋳型 mRNA 転写調製用プラスミド pYT08 ヘキサブローニングした。コムギ胚芽抽出液を利用した無細胞翻訳系により、個々のタンパク質合成試験を進めタンパク質発現を確認した。高温条件において転写制御の乱れが不稔を招くと予想される CYP703 遺伝子上流の DNA 領域を DNA 断片として領域ごとに調製し、末端をラジオアイソトープ ³²P で標識し、転写因子結合の予備実験を行なった。各転写因子タンパク質の共存条件で標識 DNA の移動度の変化が見られたため、さらに詳細なコントロール区との比較実験を進めた。その結果、転写因子の量比ではなく、合成反応液に共存するコムギ胚芽抽出液の内在性のタンパク質の量比が、DNA 断片の移動度に優勢に影響することが判明した。これは、用いた DNA 断片に特異的あるいは非特異的に結合するタンパク質が、コムギ胚芽抽出液内に存在することを示している。

(2) CYP703 タンパク質の再構成系の構築に関しては、イネ遺伝子を pYT08 ヘキサブローニングし、さらに足場となるナノディスクを membrane scaffold protein (MSP) とダイズリン脂質 (アゾレクチン) より調製した (Kuroiwa *et al.* 2022)。酵素解析に必要な CYP への電子供与体 cytochrome P450 reductase (CPR) については、イネ遺伝子を新たにクローニングし、これも pYT08 ヘキサブローニング

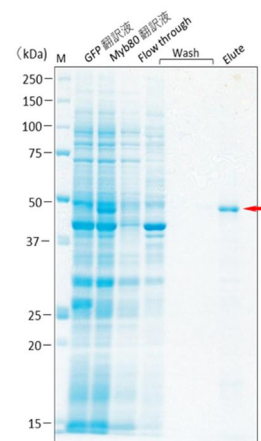


図1. OsMYB80 の合成と精製。矢印は OsMYB80 の位置を、M は分子量マーカーを示す。

し、無細胞翻訳系によるタンパク質発現を確認した。

(3) 各転写因子を精製するためにタグペプチドを付加したタンパク質発現系を新たに構築した。また、転写制御領域結合タンパク質のコントロールとして、大腸菌発現系での発現・精製により機能解析が可能という報告が複数ある GAMYB タンパク質についても、発現・精製の系を構築した。イネの OsMYB80 および TDR については、精製用のアミノ末端の His6 タグおよびその除去に利用する TEV プロテアーゼ切断配列を導入した発現用ベクターを構築し、コムギ胚芽無細胞翻訳系による合成確認および精製を進めた。OsMYB80 については可溶性の全長タンパク質を得ることができ、SDS-PAGE およびクマシーブリリアントブルー染色で 95% 以上の精製度を確認した (図 1)。一方、大腸菌発現系で合成した OsMYB80 は、全長タンパク質の発現は確認できず、切り縮めた DNA 結合領域を不溶性タンパク質として発現させ、回収した。この不溶化タンパク質を塩酸グアニジンで可溶化し、既報に従いリフォールディングを施した。精製した完全長 OsMYB80 タンパク質と大腸菌で発現、精製、リフォールディングを施した OsMYB80 の DNA 結合領域部分に相当するタンパク質をそれぞれ利用して、Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) を実施した。イネ CYP703 遺伝子上流配列末端を ³²P 標識し、試験を進めたところ、特異的結合を示す領域を確認できた。大腸菌で調製した部分タンパク質に比べ、完全長タンパク質結合による泳動シフト幅は顕著に大きいことより、完全長 OsMYB80 は多量体を形成し得ることが示唆された (図 2)。

(4) TDR に関しては、TEV による His6 タグの除去後、すなわちタグの無い完全長 TDR 自体にも Ni-NTA カラム樹脂への結合能があり、イミダゾールによる溶出が確認された。イネ TDR のアミノ酸配列にはヒスチジンに富む領域が認められることより、イネ TDR はタグの無い状態でも Ni-NTA カラムでタンパク質精製可能であるという特殊な性質を有することを発見するに至った (図 3)。現時点では仮説に過ぎないが、TDR の安定した金属イオンとの結合能は、植物細胞内での TDR への金属イオンの配位による構造および機能の制御系が存在する可能性を示唆するものである。

(5) イネ CYP703 遺伝子上流の転写制御を司る DNA 領域を 140 塩基領域まで狭め、合成 DNA での結合競合試験により OsMYB80 の結合シス配列候補の絞り込みを行った。さらに合成プライマーにより 18 塩基対の断片を 6 種類作製し EMSA を実施した。その結果、CYP703 遺伝子上流の特定の 18 塩基の断片に OsMYB80 結合領域を絞り込むことに成功した (図 4) (論文投稿予定)。

(6) 共同研究者により、イネの高温不稔条件において、通常温度条件で生育させた対照区と比較して、発現量が顕著に低下していることを確認した CYP703 以外の遺伝子 5 種が推定された。これらに対し EMSA により完全長 OsMYB80 タンパク質を利用して DNA 結合領域を調査したところいずれにおいても特異的結合領域を確認するに至った (論文投稿予定)。

<まとめと展望>

OsMYB80 のみならず、GAMYB や TDR などの転写因子タンパク質を可溶化状態で精製することに成功し、Myb 様領域を有する転写因子については、ゲルシフトアッセイにより特定のシス配列を含む DNA 断片との特異的結合を確認できた。さらに、OsMYB80 欠損株において野生株と比較して転写量が顕著に低下した遺伝子 5 種について、その転写調節領域と推定される DNA 配列に OsMYB80 が結合することを確認でき、OsMYB80 の結合シス配列を絞り込むことに成功した。想定外の結果として、TDR タンパク質の金属イオン結合能の発見が加わり、転写制御における特定金属イオンの寄与が可能性として新たに浮かび上がってきた。今後は、この新知見に関する詳細な解析を進めるとともに、この完全長転写因子タンパク質の調整によるインビトロ機能解析系の汎用性についてヒトの転写因子も視野に応用展開を予定している。

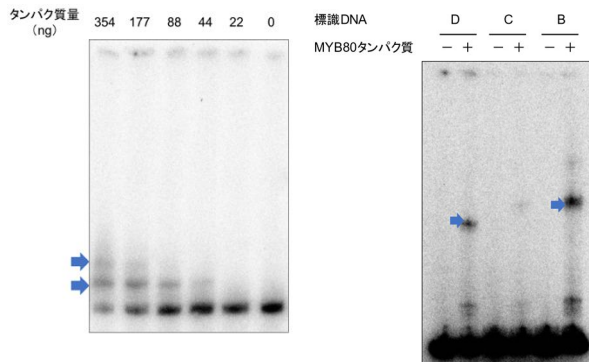


図 2. DNA 結合領域のみの OsMYB80 (左) と完全長 OsMYB80 (右) による EMSA の結果。標識 DNA 量は 7 fmol (左パネル) 8 fmol (右パネル)、タンパク質量は 320 ng。矢印が OsMYB80 の結合を示すシフトバンドのシグナルを示す。

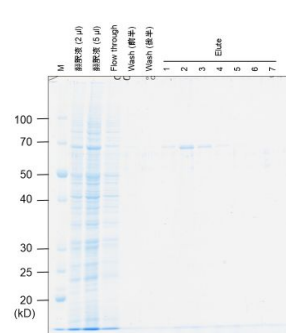


図 3. TDR の Ni-NTA レジンへの結合能を利用した完全長 TDR タンパク質の精製。M は分子量マーカー。Elute 画分 1 から 3 にかけて TDR が溶出している。

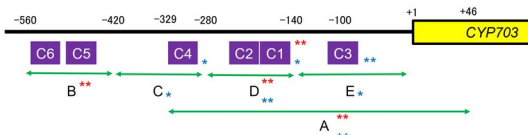


図 4. EMSA に用いた CYP703 の DNA 断片の位置。緑色の矢印で示した断片 (A~E) と、紫色で示した 18 bp の DNA 断片 (Com1~6) を使用した。断片の名前の右側に * を付けたものは OsMYB80 が結合した断片、* を付けたものは GAMYB が結合した断片である。シフトバンドが特に濃く見えたものは * を 2 つ付けた。黄色で示した領域は CYP703 のコード領域である。

<引用文献>

- Makoto Endo, Tohru Tsuchiya, Kazuki Hamada, Shingo Kawamura, Kentaro Yano, Masahiro Ohshima, Atsushi Higashitani, Masao Watanabe, and Makiko Kawagishi-Kobayashi (2009). High Temperatures Cause Male Sterility in Rice Plants with Transcriptional Alterations During Pollen Development. *Plant Cell Physiol.* 50: 1911-1922.
- Na Li, Da-Sheng Zhang, Hai-Sheng Liu, Chang-Song Yin, Xiao-xing Li, Wan-qi Liang, Zheng Yuan, Ben Xu, Huang-Wei Chu, Jia Wang, Tie-Qiao Wen, Hai Huang, Da Luo, Hong Ma, and Da-Bing Zhang (2006). The Rice *Tapetum Degeneration Retardation* Gene Is Required for Tapetum Degradation and Anther Development. *Plant Cell* 18: 2999-3014.
- Koichiro Aya, Miyako Ueguchi-Tanaka, Maki Kondo, Kazuki Hamada, Kentaro Yano, Mikio Nishimura, and Makoto Matsuoka (2009). Gibberellin Modulates Anther Development in Rice via the Transcriptional Regulation of GAMYB. *Plant Cell* 21: 1453-1472.
- Marc Morant, Kirsten Jørgensen, Hubert Schaller, Franck Pinot, Birger Lindberg Møller, Daniele Werck-Reichhart, and Søren Baka (2007). CYP703 Is an Ancient Cytochrome P450 in Land Plants Catalyzing in-Chain Hydroxylation of Lauric Acid to Provide Building Blocks for Sporopollenin Synthesis in Pollen. *Plant Cell* 19: 1473-1487.
- Fu Kuroiwa, Akira Nishino, Yasuko Mandal, Masataka Honzawa, Miki Suenaga-Hiromori, Kakeru Suzuki, Yukie Takani, Yukino Miyagi-Inoue, Haruhiko Yamaguchi, Satoshi Yamashita, Seiji Takahashi, Yuzuru Tozawa. (2022) Reconstitution of prenyltransferase activity on nanodiscs by components of the rubber synthesis machinery of the Para rubber tree and guayule. *Sci Rep* 12: 3734.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 戸澤讓、黒田隆司、東谷篤志、川岸万紀子
2. 発表標題 高温雄性不稔に関連するMyb様イネ転写因子のタンパク質機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makiko Kawagishi-Kobayashi, Ryuji Kuroda, Atsushi Higashitani, Yuzuru Tozawa
2. 発表標題 Expression of the anther-specific transcription factor OsMYB80 is impaired under high-temperature-induced male sterility conditions in rice.
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒田隆司、高荷幸恵、川岸万紀子、戸澤讓
2. 発表標題 無細胞翻訳系を利用した完全長Myb様イネ転写因子の調製と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年大会
4. 発表年 2022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
研究分担者	川岸 万紀子 (Kawagishi Makiko) (50355707)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員 (82111)	

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