

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22572

研究課題名(和文) 逆遺伝学的手法による温度感受性変異株の創出と解析

研究課題名(英文) A novel approach to establish temperature sensitive mutants through reverse genetics and the functional analysis

研究代表者

友井 拓実 (Takumi, TOMOI)

基礎生物学研究所・生命熱動態研究室・研究員

研究者番号：70880996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、進化的な観点から、近縁種において同じ機能の遺伝子(相同遺伝子)を有していても、適応した温度環境が異なれば、同一の温度下でも異なる生理応答を示すという可能性に着目した。本研究では、寒冷地に生育する植物の遺伝子を、モデル植物シロイヌナズナに対して導入し、異なる温度下での生理応答を比較解析する。現在、寒冷地に生育する約10種の植物を入手し、網羅的に遺伝子配列を取得するための準備を整えることができ、さらに研究を進めている。また、シロイヌナズナ等の植物を用いて、異なる温度に対する応答を適切に評価できるように顕微鏡イメージングと数理解析を組み合わせた手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物は様々な環境で進化してきた。そのため、生物がもつ遺伝子は、それぞれの環境で効率よく働けるように最適化されてきたと考えられる。本研究では、異なる温度環境で生育する植物の相同遺伝子を入れ替えることで、温度に対する応答を変化させる手法の確立を目指す。そのための遺伝的資源を確保し、温度に対する応答を的確に評価する顕微鏡イメージングと数理解析の手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Different two species may show different physiological responses at the same temperature, when they have been adapted to different temperature environments. In this study, physiological responses of the model plant of *Arabidopsis thaliana* possessing genes derived from plants in different temperature environments are comparatively analyzed under different temperatures. Around 10 plants from different temperature environments were obtained, then ready for comprehensive gene sequencing, and now further research is underway. In addition, we have established a method that combines microscopic imaging and mathematical analysis to properly evaluate the response to different temperatures using plants such as *Arabidopsis thaliana*.

研究分野：植物生理学

キーワード：温度生物学 植物生理学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物はそれぞれの温度環境に合わせて、最適な機能タンパク質を持つように進化してきたと考えられる。園芸や育種の観点から、ある生物を遺伝資源として有用遺伝子を目的の生物に導入する例はよく知られている。しかし、基礎生物学における実験の観点から他の生物種の相同遺伝子を実験生物に導入し、温度による生理応答の変化を比較するような研究はされてこなかった。

2. 研究の目的

シロイヌナズナを基準に、それよりも冷涼な環境に生育する植物を探索し、相同遺伝子をシロイヌナズナに導入する。そして、シロイヌナズナの温度（特に高温）に対する生理応答がどのように変化するかを明らかにする。さらに、どのような遺伝子を導入あるいは交換しても温度変化に応じた生理応答の変化が現れるのかを検証することを目指した。

3. 研究の方法

シロイヌナズナは実験室環境では、22°Cで培養されることが多い。22°Cよりも冷涼な環境で生育するアブラナ科植物の近縁種を収集する。収集した実験植物を植物用のインキュベーターで生育させ、至適生育温度を調べる。シロイヌナズナよりも至適生育温度が低いことが示唆される植物の熱ショック転写因子を、熱ショック誘導的に蛍光タンパク質を発現するシロイヌナズナの系統に導入する。このシロイヌナズナの系統を、異なる条件で熱処理し、蛍光タンパク質を発現する条件を解明する。そして、より小さな加温で蛍光タンパク質を発現することができるシロイヌナズナ系統を同定する。この際に、熱処理を顕微鏡下で行い、蛍光タンパク質の発現を検出することで、異なる熱条件に対する植物の感受性を細胞レベルで比較できるような実験評価系を構築する。また、温度応答に関連のない遺伝子に関して、選抜した近縁種の相同遺伝子をシロイヌナズナにて交換し、ある温度域で欠損変異株様の表現型が現れるのかを検証する。

4. 研究成果

本研究では、冷涼な環境に生育するアブラナ科植物の相同遺伝子をシロイヌナズナに導入する段階には至らなかった。しかし、その実験を行う際に、温度に対する応答性を的確に評価する手法を確立することができた。また、この手法の確立を通して、熱ショック応答に対する細胞の特性や熱ショック応答そのものの性質を解明することができた。

本研究を申請した年度とその次年度は、国内で新型コロナウイルスの感染が拡大し、目的の植物を収集が遅れ、採集する機会も一度のみであった。それによって本研究が遅れた期間で、上記の通り熱ショック応答に関係する新しい知見を得るとともに本研究の基盤を形成するまでに至った。また、RNA-seq解析による実験環境を構築し、冷涼な環境に生育するアブラナ科植物に関して、異なる温度に対する応答の解析に取り組んでいる。

(1) 冷涼な環境に生育する植物を収集することが困難な状況が続いていたため、身近なアブラナ科植物を用いて異なる温度条件での成長を比較することにした。国内ではダイコンやキャベツは寒冷地で栽培されることもあるため、これらの異なる温度条件における成長を調べた。具体的には、家庭菜園で使われるスプラウト用のダイコンとキャベツの種子を用いて、暗所における芽生えの成長を16°Cから24°Cまで2°C間隔で比較した。成長の指標には、播種後1週間の胚軸長および主根長を用いた。ダイコンに関しては、温度の上昇に伴って胚軸長が増加したが、主根長は20°Cで最大となった。また、キャベツに関しては、胚軸長と主根長はそれぞれ22°Cで頭打ちになることが分かった。シロイヌナズナは22°Cで培養されることが多いが、暗所芽生えでは22°Cよりも27°Cで胚軸が徒長することが知られている (e.g. Jung et al., 2016, Science)。また、暗所芽生えにおけるシロイヌナズナの主根長を異なる温度条件で比較した研究は、現時点で見つけることができなかった。通常の光条件と暗所条件では、植物体の大きさが最大になる温度が異なることから、暗所芽生えにおける胚軸長から直接的に至適生育温度を求めることは難しい。しかし、異なる温度条件における植物体の大きさの変化を調べることで、生育温度を相対的に種間比較できる可能性がある。このような観点から、ダイコンとキャベツはシロイヌナズナより相対的に低い温度で成長しやすいことが考えられる。

(2) 上記のダイコンとキャベツに加えて寒冷地の植物を収集した。本研究では、高山や北方に分布するアブラナ科の7属11種を、植物用インキュベーターで培養することに成功した。各種分子遺伝学的な実験を行うには、それぞれの植物種の個体数は少なかった。そのため、まず種子をつくらせ世代交代ができるように整備することを目指した。収集の時点で、花や実をつけていた植物に関しては、種子を得ることができた。この種子から次世代を培養することができ、花芽形成の段階までは導くことができていた。しかし、収集した植物の中には、他殖性の植物も含まれているようで、本研究の期間内には種子が得られない種もあった。このような他殖性の植物は全て多年草であったため、挿し木で増殖させることに成功している。以上の植物の成長は、インキ

ューベーター内での培養条件を 4°C~16°Cの間で明暗条件と合わせて定期的に変化させることで実現したが、引き続き最適な生育条件の探索を行う。

(3) 本研究では、植物の熱ショック応答を指標として、収集した各植物種の温度応答性がシロイヌナズナとどのように異なるかを明らかにする。本研究では熱ショック転写因子の活性に着目しており、近縁種由来の熱ショック転写因子の導入がシロイヌナズナの熱ショック応答にどのように影響するのかを細胞レベルで理解することを目指す。再現性よく細胞に熱を与えるために、赤外レーザー誘起遺伝子発現操作顕微鏡 (IR-LEGO) を用いた。本研究で用いた IR-LEGO は、任意の一細胞に対して、赤外レーザーを照射することで加温する。赤外レーザーの出力と照射時間は自在にコントロールできるため、再現性よく細胞の熱ショック応答の特性を評価することが可能である。本研究では、熱ショック応答を介して蛍光タンパク質が発現するシロイヌナズナ系統の根の細胞に対して、異なる出力 (加温の程度) および照射時間 (加温時間) で赤外レーザーを照射し、熱ショック応答が起こる条件範囲を蛍光観察により明らかにした。蛍光タンパク質の遺伝子発現および細胞死が起こる確率は、赤外レーザーの出力が大きくなるほど、また照射時間が長くなるほど高くなる。本研究では、照射時間が長い方が、少ない出力で安定した遺伝子発現が実現できることを明らかにした。加えて、細胞サイズが遺伝子発現効率に影響することを明らかにした。これは細胞の熱容量が熱ショック応答の起こりやすさに関わることを示唆している。本研究の成果により、近縁種の熱ショック転写因子をシロイヌナズナに導入した際の熱ショック応答を正確に比較解析することが可能となった。

(4) 上記の研究と同様に、コケ植物ヒメツリガネゴケにおいても IR-LEGO を使った実験を行った。シロイヌナズナを用いた IR-LEGO の実験 (研究成果(3)) では、細胞分裂活性のある細胞のサイズが小さい。そのため、赤外レーザーを照射した後に蛍光が見られない場合には、照射された細胞を追跡し続けることが困難であった。ヒメツリガネゴケは細胞分裂活性のある細胞のサイズが大きく、細胞を追跡し続けることが容易であり、より詳細に細胞ダメージの観察することが可能である。実際に、細胞ダメージには細胞死だけでなく、生きてままであるが細胞分裂ができなくなってしまう細胞も存在した。さらに、赤外レーザーの出力と照射時間の条件ごとに 24 時間のタイムラプスイメージングを行い、輝度値を測定した。これにより、熱ショックに反応して蛍光輝度が上昇し始めてから減少するまでの様子をグラフ化することに成功した。さらに、このグラフはシグモイド関数でフィッティングでき、各赤外レーザーの照射条件における熱ショック応答の強さ、開始タイミング、持続時間そして応答速度を比較し算出することが可能になった。この研究成果は、シロイヌナズナにおける熱ショック応答を比較定量解析するための基盤的知識として非常に有用である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tomoi Takumi, Sakamoto Joe, Ohe Suguru, Tamada Yosuke, Kamei Yasuhiro	4. 巻 11925
2. 論文標題 Application of infrared laser to living cells for manipulation of gene expression, and in vivo temperature measurement method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of SPIE	6. 最初と最後の頁 27-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/12.2615414	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoi Takumi, Sakamoto Joe, Ohe Suguru, Tamada Yosuke, Kamei Yasuhiro
2. 発表標題 Application of infrared laser to living cells for manipulation of gene expression, and in vivo temperature measurement method
3. 学会等名 Biomedical Imaging & Sensing Conference 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 友井 拓実, 吉田 優佳, 大江 駿, 坂本 丞, 玉田 洋介, 亀井 保博
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケにおける熱ショック応答を介した局所的遺伝子発現誘導に関する定量的解析
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田 優佳, 友井 拓実, 大江 駿, 坂本 丞, 亀井 保博, 玉田 洋介
2. 発表標題 コケ植物における赤外光を用いた局所的遺伝子誘導法の確立
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大江 駿、友井 拓実、坂本 丞、亀井 保博、玉田 洋介
2. 発表標題 IR-LEGOを用いたヒメツリガネゴケにおける局所的遺伝子誘導法の確立
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会
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