

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22585

研究課題名（和文）相転換に関する遺伝子群の時空間的な発現制御機構に関わるゲノム領域の包括的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of genomic regions involved in gene expression regulation related to juvenile-adult phase transition

研究代表者

小郷 裕子 (Ogo, Yuko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・主任研究員

研究者番号：90572214

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）：全ての作物において、相転換のタイミングは収量とクオリティーの最適化に重要である。モデル作物であるイネは、光と概日時計のシグナルを統合することにより、厳密な限界日長応答を可能にしていると考えられている。本研究では、いくつかのNGS解析を組み合わせ、光と概日時計による遺伝子発現制御に関わる機能性エレメントを網羅的に解析し、相転換に関わる遺伝子発現の制御機構を明らかにすることを目的とする。フィトクロムを用いたChIP-seqでは、いくつかの光応答や概日時計に関わる遺伝子上流に時間特異的なピークが見られた。今後、single cell解析などにより、更なる詳細な解析が必要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の相転換に関する分子機構は、イネやシロイヌナズナなどに詳しく解析されているものの、非コーディング領域に着目したものは少なく包括的な研究が求められていた。また、光と概日時計は代謝や細胞伸長など生命活動の根幹を担う多くの活動に作用するため、本研究のデータは相転換だけでなく様々な研究分野にイネのクロマチン状態に関する情報を提供できる。近年、エンハンサー領域を用いた育種が注目されており、予測した機能性エレメントにゲノム編集を用いて変異や欠失を起こすことにより、出穂や収量性に関わる育種リソースや作物そのものの開発に寄与できる。

研究成果の概要（英文）：For all crops, the timing of the juvenile-adult phase transition is important for yield and quality optimization. Rice, a model crop, is thought to enable a strict critical daylength response by integrating light and circadian clock signals. The purpose of this study is comprehensively analyzing the enhancer elements involved in gene expression control by light and circadian clock and clarify the mechanism of gene expression that controls juvenile-adult phase transition by combining a few NGS analyzes. ChIP-seq with phytochrome showed time-specific peaks upstream of some genes that are involved in light responses and circadian clock, although peaks of genes expressing in minor cells were not detected. In the future, more detailed analysis will be required, such as by single cell analysis.

研究分野：生物学

キーワード：イネ 出穂

1. 研究開始当初の背景

全ての有用植物において、相転換のタイミングはその収量やクオリティーを最適化するために重要であり、最も重要な農業形質の一つである。相転換は様々な内外的環境により影響を受けるが、主要なものの一つに光と概日時計シグナルによる限界日長応答がある。申請者は、イネの厳格な限界日長応答に関する遺伝子ネットワークの中心的な転写因子 Ghd7 について解析を行っている。Ghd7 以外にも、光と時計シグナルにより発現制御を受ける遺伝子が多数解析されているが、その発現制御機構はほとんどわかっていない。遺伝子の発現制御機構を理解するには、長大な非コーディング領域から数 bp ~ 数百 bp の転写制御に関わるシスエレメントやエンハンサーなどの機能性エレメントを特定することが重要である。これまで、主要な遺伝子について個別に、突然変異体を用いた実験やプロモーターデレション法などにより、エンハンサーやシスエレメントが同定されてきたが、大変な時間と労力が必要であった。近年、ヒトにおいては、エンハンサー等の機能性エレメントに関して膨大な情報が蓄積されており、健康・疾患に関する基礎及び応用研究に用いられている。近年も、ATAC-seq やキャプチャーオリゴを用いた Hi-C などにより機能性エレメントの解析が報告されている。植物では、イネなどの作物に関する ATAC-seq は数報であり、ChIA-PET を用いたエンハンサーの解析がトウモロコシやイネで数報報告されているのみである。

本研究は、イネにおいていくつかの NGS 解析を組み合わせ、光と概日時計による発現制御機構に関わる機能性エレメントを調べる。植物の相転換に関する分子機構は、シロイヌナズナなどによって春化や概日時計においてはエピジェネティックな制御が中心的な役割を果たすことが報告されている。しかし、gene body とその近傍に着目したものが多く、非コーディング領域に着目したものは少ない。近年は、相転換についてもモデル植物だけでなくマイナー作物など幅広く有用植物において出口を目指した研究が行われている。また、光と概日時計は、代謝や細胞伸長など生命活動の根幹を担う多くの活動に作用するため、本研究のデータは相転換だけでなく様々な研究分野にイネのクロマチン状態に関する情報を提供できる。近年、エンハンサー領域を用いた育種が注目されており、様々な有用な表現型変化へのポテンシャルを秘めていると考えられている。本研究により、機能性エレメントが調べられれば、近年規制が緩和されつつあるゲノム編集を用いて予測した機能性エレメントに変異・欠失を起こすことにより、出穂や収量性に関わる育種リソースや作物そのものの開発に直接的に寄与できる。

2. 研究の目的

本研究では、光と概日時計による遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目的とする。厳密な限界日長反応を示し、モデル作物であるイネを用いて、フィットクロムが相互作用するゲノム領域を調べる。また、ATAC-seq を用いて、長日条件、短日条件、明期、暗期における転写因子がアクセスする領域を調べる。

3. 研究の方法

(1) 赤色光シグナルの作用点を解析するため、フィットクロムを用いて ChIP-seq 解析を行う。フィットクロムミュータントイネに、35S プロモーターまたはフィットクロムプロモーターにより、フィットクロムと GFP を融合したタンパク質を発現する形質転換イネを作製する。この形質転換体を用いて、抗 GFP 抗体で ChIP-seq を行う。フィットクロムは直接 DNA に結合するという報告は無いため、ChIP 解析では詳細な条件検討を行う。

(2) 長日条件、短日条件、明期、暗期における転写因子結合領域の変化を調べるため、これらの条件において ATAC-seq を行う。

4. 研究成果

(1) フィットクロムに関して ChIP-seq を行うため、フィットクロムミュータントイネに、35S プロモーターまたはフィットクロムプロモーターにより、フィットクロムと GFP を融合するタンパク質を発現する形質転換イネを作製した。どちらのプロモーターでも、フィットクロムミュータントのフェノタイプを相補して、極端な早咲きにならない形質転換体を得られた。それぞれ数十ラインについて抗 GFP 抗体と抗フィットクロム抗体により、全長のタンパク質を検出したところ、35S プロモーターを用いた形質転換体のうち、数ラインがタンパク質の蓄積が高かった。全長タンパク質の蓄積が高かった数ラインについて、長日または短日において育成し、長日の明期(ZT2, ZT8)と暗期(ZT20)、短日の明期(ZT2, ZT8)においてサンプリングを行った。ホルムアルデヒドで固定した後、抗 GFP 抗体により免疫沈降した。その後、ライブラリーを作製し、次世代シーケンサーにより ChIP-seq 解析を行った。長日の ZT2, ZT8, ZT20, 短日の ZT2, ZT8 で検出されたピークは、それぞれ 9, 30, 4686, 82, 46 個であった。長日の ZT20 のピークのみ非常に多かった。これは、長日の ZT20 の植物体は、他の植物体よりも長く栽培したものだのため、固定時間を長くした。このため、より多くのタンパク質とゲノム DNA が固定されて、ピークが多く検出されたと考えられる。ピークの重複は、長日でも短日でも ZT2 と ZT8 の重複は非常に多かった。ZT2,

ZT8 における、長日と短日のピークの重複もある程度多かった。このことから、明期において、フィトクロムを介した光シグナルは、時間や日長に関わらず同じエンハンサー領域を介していることが多いと考えられる。ピークの存在位置は、ゲノム領域全体における存在率に比べると、intergenic region (gene body から ±3K 以外の領域) に少なかった。明期においては、gene body から +500bp に多く、プロモーター領域 (gene body から -500bp) にピークが多い転写因子などのピークパターンとやや異なっていた。ピークから最も近い遺伝子において G0 enrichment analysis を行ったところ、長日の ZT20 において、転写因子やシグナル伝達に関わる G0 がエンリッチされた。光シグナルは、フィトクロムを介して、まず転写因子やシグナル伝達関連遺伝子に作用することを示唆している。長日の ZT20 においては、開花、時計、光シグナルに関わる遺伝子 (OsGI, OsELF3.2, OsPRR1, OsPRR37, CAB1R, DTH2 など、図) の転写開始地点近傍にピークが検出された。どの遺伝子の発現も日周変動するが、フィトクロムはこれらの遺伝子を直接的に発現制御しているのかもしれない。Ghd7 はフィトクロムを介して明期のはじめに発現誘導されると考えられており、その上流にフィトクロムが相互作用すると考えられるが、Ghd7 の上流には明確なピークが存在しなかった。Ghd7 の発現量は低く、フロリゲン遺伝子等と同様に維管束のみで発現していると推測されると考えられる。マイナー細胞由来の ChIP-seq のピークは、葉肉細胞など存在比率が高い細胞由来のピークに覆い隠されると考えられている。このため、Ghd7 上流はフィトクロムの相互作用が推測されるものの、マイナーピークであったため検出できなかった可能性がある。

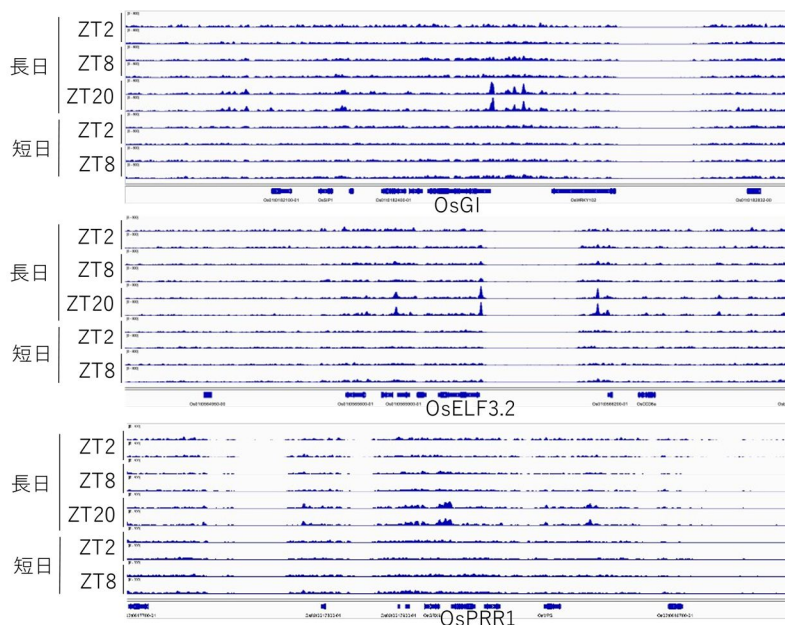


図 光と概日時計に関与する遺伝子のフィトクロムによる ChIP-seq の様子

(2) ATAC-seq を行うため、日本晴イネを長日および短日で育成し、明期 (ZT2) と暗期 (ZT20) においてサンプリングを行った。どの条件においても、20000 前後のピークを検出した。長日または短日において、明期と暗期のピークの重複は 10000 個ほどであり、明期または暗期における長日と短日の重複も 10000 個ほどであった。ピークの位置は gene body に 40~50% 程度存在し、転写開始地点に多いとされる植物の ATAC-seq とは少し異なる結果となった。これは、栽培条件や組織などの植物体に関する違いや、実験条件の違いによるものと考えられる。Intergenic region には 30% 程度しか存在しなかった。このことから、転写因子は gene body とその前後に集中的にアクセスすることが示唆された。Ghd7 の上流には明確なピークが存在しなかった。これは、上述した通り Ghd7 の上流のマイナーなピークが検出されなかったと考えられる。本実験を行っている時期に、中国のグループが、イネを 4 時間おきにサンプリングして ATAC-seq を行い、転写因子が結合する領域の日周変動を調べる研究を発表した。そのデータを解析したところ、日の出から 2 時間程度後の 8:00 採取のサンプルにおいて、Ghd7 の上流に弱いピークが観察された。また、H3K27ac と H3K9ac の ChIP-seq においても、Ghd7 の上流に弱いピークが観察された。申請者は別の実験によって、Ghd7 の上流に Ghd7 の赤色光による朝の発現誘導を制御する領域が存在することを確かめており、この結果と一致した。今後はマイナー細胞における機能的エレメントの解析や、遺伝子発現の空間的制御機構を解析するために、single cell 法による NGS 解析などが必要と考えられる。

< 引用文献 >

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------