

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 5 月 3 0 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15137

研究課題名（和文）in plantaからの転写複合体単離法iChIPを用いた乾燥ストレス応答の解明

研究課題名（英文）Analysis of drought stress responses by the iChIP method to isolate transcriptional complexes in planta

研究代表者

佐藤 輝（Sato, Hikaru）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任助教

研究者番号：90756058

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、植物の乾燥ストレス応答を制御する植物ホルモンであるアブシジン酸（ABA）の生合成機構を明らかにすること、また植物体から遺伝子発現制御複合体を単離する技術である insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP) を開発することである。iChIP法により、様々な新規ABA合成制御因子の候補が単離された。特にいくつかの候補遺伝子の活性を抑制することで、植物の高塩・乾燥ストレス耐性が向上することが明らかとなった。本研究により解明された新規乾燥ストレス応答機構は、ストレス耐性作物作出のための有用な知見となると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により開発された植物体から転写複合体を単離する手法であるiChIPは、ストレス応答の分野のみだけでなく、発生や生殖などに関わる遺伝子発現制御機構の研究分野にも適用可能な技術であり、今後多くの植物の分子生物学研究に役立つ方法だと言える。またiChIPを用いて新規ABA合成制御因子が数多く単離され、それぞれの乾燥ストレス応答機構が明らかになった。これらの実験結果は、どのようにすれば様々な作物種の乾燥ストレス耐性を向上させることができるか、多くの分子生物学的知見を含んでおり、社会的意義のある研究成果であったと言える。

研究成果の概要（英文）：Drought stress is one of the major environmental conditions which causes a crop yield reduction all over the world. Furthermore, it is known that the currently ongoing global warming would cause the severe drought stress conditions more frequently. Purposes of the project are (1) to reveal drought stress responses in plants which are regulated by a drought stress-inducible plant hormone abscisic acid (ABA) and (2) to develop an insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP) method to isolate transcriptional complexes in planta using a model plant *Arabidopsis thaliana*. As a result of the iChIP, multiple candidate proteins were identified which regulate ABA biosynthesis during drought and salt stress. The novel molecular mechanisms we revealed in this project can include useful insights to generate drought stress tolerant crops in future.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：シロイヌナズナ 環境ストレス 乾燥ストレス ABA 転写制御 エピジェネティック制御 クロマチン高次構造 転写複合体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化やそれに伴う異常気象による農作物への被害が世界各地で報告され、環境ストレス耐性を向上した作物の必要性は高まっている。植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) は乾燥ストレス応答を誘導する主要な因子であるが (Iuchi et al., 2001)、その生合成がどのように制御されているか詳細な分子機構は未だ明らかになっていない。ABA の合成経路における鍵酵素である NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 3 (NCED3) は乾燥ストレス時に遺伝子発現が誘導され、ABA 合成を促進する。申請者らは近年、乾燥ストレス時に *NCED3* 遺伝子領域に結合する転写活性化因子 NGA1 を同定した (Sato et al., 2018)。一方で *NCED3* の遺伝子発現誘導には約 2.5 kbp の長距離遺伝子領域が必要であることが知られている。このような長距離領域は高次立体構造を取ることで転写複合体形成を行うことが知られているが、どのような制御因子が *NCED3* 遺伝子の高次構造制御に関与しているかは明らかになっていない。この課題を解決するために、申請者らは近年、植物体内から任意の遺伝子領域上の転写複合体を単離する手法である Insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP) の開発に取り組んできた。iChIP はヒト培養細胞系において開発された手法で (Hoshino et al., 2009)、ゲノム上に挿入した遺伝子領域にタグとなる DNA 配列を融合して、その配列に結合するタンパク質を単離・精製し、質量分析に供することで任意の遺伝子領域上に存在するタンパク質群を同定できる (図 1)。この手法の長所は(1)植物体内で実際に標的遺伝子上に存在する制御因子を単離でき、(2)ゲノム高次構造の制御因子など直接 DNA 結合能力を持たない因子を単離できることである。この方法により申請者は *NCED3* の約 2.5 kbp プロモーター上に結合する候補因子を同定した。本研究ではこれら候補因子の機能解析を行うことによって *NCED3* 遺伝子領域上のゲノム高次構造制御因子を明らかにすると共に、植物体内から転写複合体を単離・同定する手法である iChIP を確立することを目指す。

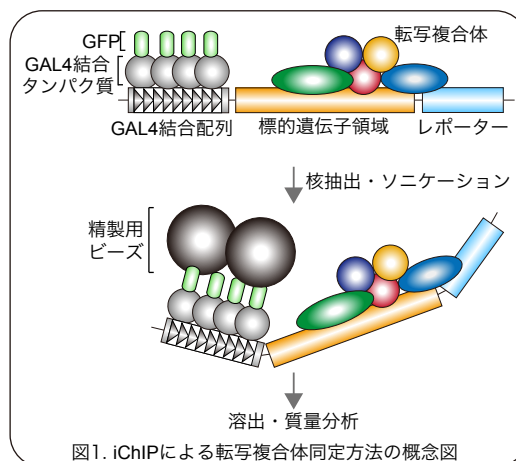


図1. iChIPによる転写複合体同定方法の概念図

2. 研究の目的

本研究の目的は(1)iChIP により *NCED3* の長距離遺伝子領域における高次構造を制御する新規因子を単離し、(2)単離した因子が *NCED3* の遺伝子発現および植物のストレス応答をどのように制御するかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では新規の分子生物学的手法を開発し、さらにそれらを用いて植物の乾燥・高塩ストレス応答の最初期の分子メカニズムを解析する。

(1) 植物体内から任意のプロモーター上に存在する転写複合体を単離する手法である iChIP を確立する。

(2) iChIP で単離され、三重変異体において高塩ストレス耐性が低下することが明らかになった NCC1/2/3 についてさらに解析を進める。

(3) iChIP で単離された NCC4/5 ファミリータンパク質について機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) iChIP による *NCED3* 遺伝子領域上の転写複合体構成因子の単離と選抜

NCED3 遺伝子領域に GAL4 結合モチーフの反復配列を繋ぎ、さらにそのモチーフに結合する GAL4 結合タンパク質を発現させる形質転換植物体を作出した。GAL4 結合タンパク質には共免疫沈降を行うために GFP タグを付与した。また、ネガティブコントロールの植物として、同様の *NCED3* 遺伝子領域に GAL4 結合モチーフを融合しない植物体を作出した。iChIP によるスクリーニングで質量分析により検出されたタンパク質を定量化し、ネガティブコントロールより多く検出されるタンパク質を同定した。この実験を 2 反復繰り返すことで、*NCED3* 遺伝子領域上に存在する可能性のある 128 タンパク質が明らかとなった (図 2)。さらに 2 次スクリーニングとしてデータベース等を利用し、(1) 細胞内で核に局在性を持つと予測される、(2) *NCED3* 遺伝子と同様に維管束組織で発現することが確認されている、(3) 転写制御を行う可能性のあるタンパク質を選別し、結果として 30 個の新規 *NCED3* 制御タンパク質群を同定した。これらのタ

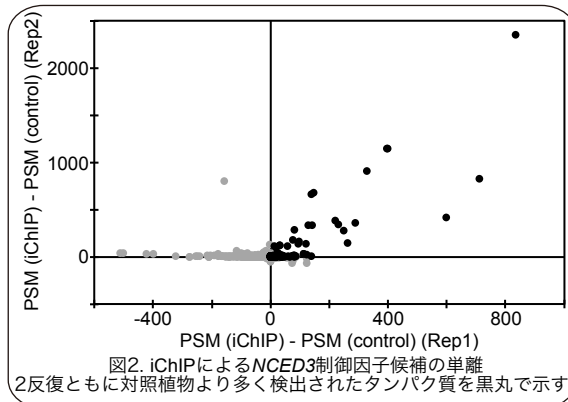


図2. iChIPによる*NCED3*制御因子候補の単離
2反復ともに対照植物より多く検出されたタンパク質を黒丸で示す

ンパク質をそれぞれ、転写因子と予測される *NCED3*-promoter-associated factors in Transcriptional regulation (NCTs)、エピジェネティック制御因子と予測される *NCED3*-promoter-associated factors in Epigenetic regulation (NCEs)、ゲノム高次構造を制御すると予測される *NCED3*-promoter-associated factors in regulation of Chromatin conformation (NCCs)、機能不明な *NCED3*-promoter-associated factors of Unknown functions (NCUs) として分類した。*NCED3* 遺伝子の活性化に長距離遺伝子領域が必要であることに着目し、ゲノム高次構造を制御すると予測される NCC タンパク質を中心に解析を進めた。

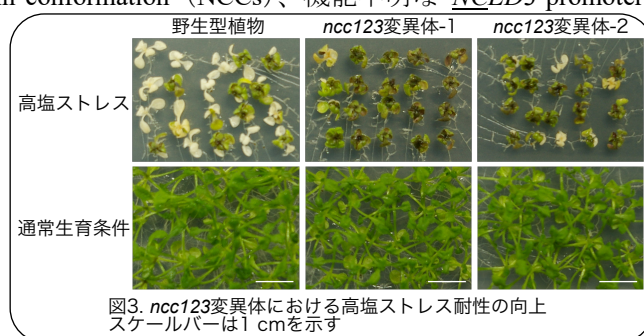


図3. *ncc123*変異体における高塩ストレス耐性の向上
スケールバーは1 cmを示す

(2) NCC1、NCC2、NCC3 の機能解析

NCC1、NCC2、NCC3 は相同性のあるタンパク質領域を持つファミリータンパク質である。まず CRISPR-Cas9 のシステムを用いて3つの遺伝子を破壊した三重変異体を作出し (*ncc123*)、様々なストレス環境下における表現型の観察を行った。*ncc123* 変異体では高塩ストレス条件下で、種子発芽が抑制される傾向が観察され、高塩ストレス条件下において植物体の生存率が上昇することが明らかとなった (図 3)。さらに全自動で環境ストレス条件をコントロールしながら表現型解析を行う施設/ソフトウェアである RIKEN Integrated Plant Phenotyping System (RIPPS) (Fujita et al., 2018) により、乾燥ストレス条件下における表現型を観察した。その結果、*ncc123* 変異体は葉面温度がコントロール植物より高く、乾燥ストレス条件下での生育が抑制される傾向が観察された。これらの表現型は、*ncc123* 変異体において、乾燥・高塩ストレス条件下で ABA 蓄積が上昇し、発芽抑制、塩ストレス耐性の向上、葉面温度上昇、生育遅延が生じていると解釈できる。

さらに *ncc123* 変異体に乾燥ストレス・高塩ストレス処理を施し、*NCED3* 遺伝子発現の活性化を定量 PCR により測定した。その結果、表現型解析と一致して *ncc123* 変異体では野生型の植物よりも高い *NCED3* 遺伝子発現の活性化が検出された。また、同様に *ncc123* 変異体を用いて乾燥ストレス・高塩ストレス条件下のトランスクリプトーム解析を行い、シロイヌナズナ全遺伝子の活性化状態を測定した。その結果、*ncc123* 変異体では野生型植物に比較して、*NCED3* 遺伝子のみならず、乾燥・高塩ストレス時に働く、多くの遺伝子の発現がより活性化していることが明らかとなった。一方で、植物の生育や生長に関与するような遺伝子群の発現活性は低下する傾向を示し、RIPPS によって観察された、乾燥ストレス条件下における *ncc123* 変異体の生育遅延の表現型と一致していた。

また NCC1 の細胞内局在性を観察するために、*ncc123* 変異体に GFP タグを付与した NCC1 を発現する植物体を作出した (*proNCC1::gNCC1-GFP/ncc123*)。まずこの植物において *ncc123* 変異体で観察された、高塩ストレス条件下における発芽抑制、また高塩ストレス耐性の向上が見られず、表現型が野生型同様に回復していることを確認した。非ストレス条件下と高塩ストレス条件下における NCC1 の細胞内局在性を観察したところ、NCC1 は非ストレス条件下では主に細胞質に局在すること、そして高塩ストレス条件下では細胞質および核内にドット状の構造として観察されることが明らかになった。NCC1 は天然変性領域 (intrinsically disordered region: IDR) と呼ばれるタンパク質配列を有している。近年、このような IDR を有するタンパク質が、特定の環境ストレス条件下において細胞内に液液層分離を介したドット状の構造を作ることが明らかになりつつある。このようなドット状の構造は膜構造を持たない細胞小器官 (membrane-less organelle: MLO) と呼ばれ、それぞれの MLO に固有の細胞内機能を持つと考えられている。これらのことから、NCC1、NCC2、NCC3 も乾燥・高塩ストレス条件特異的に液液相分離によって核内に MLO を形成し、*NCED3* の遺伝子発現活性を負に制御する因子であることが示唆された。

(3) NCC4、NCC5 の機能解析

iChIP で単離され、NCC1/2/3 とは別のファミリータンパク質に属する因子として NCC4、NCC5 の機能解析を行った。NCC4/5 は同一タンパク質ファミリーに属すると予測され、NCC1/2/3 と同様にゲノム立体構造を制御すると考えられている。タンパク質間相互作用を予測する機械学習プログラムである AlphaFold2 (Mirdita et al., 2022) を用いて解析したところ、NCC1/2/3 と NCC4/5 はタンパク質間相互作用を示すことが示唆された。さらに CRISPR-Cas9 によって、NCC4 と NCC5 を破壊した二重変異体 (*ncc45*) を作出したところ、*ncc123* 変異体と同様に、高塩ストレス条件下における発芽抑制と、高塩ストレス条件下における生存率の向上が観察された。これらの結果から、NCC4/5 は NCC1/2/3 と協調して *NCED3* の発現抑制に寄与する転写複合体を形成していると予測された。

(引用文献)

Iuchi et al., 2001, Plant J 27, 325-333; Sato et al., 2018, Proc Natl Acad Sci U S A 115, E11178-E11187; Hoshino et al., 2009, J Biosci Bioeng 108, 446-449; Fujita et al., 2018, Plant Cell Physiol 59, 2030-2038; Mirdita et al., 2022, Nat Method 19, 679-682.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sato Hikaru, Kohler Claudia	4. 巻 69
2. 論文標題 Genomic imprinting regulates establishment and release of seed dormancy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Plant Biology	6. 最初と最後の頁 102264 ~ 102264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pbi.2022.102264	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 該当する

1. 著者名 Temman Haruka, Sakamoto Takuya, Ueda Minoru, Sugimoto Kaoru, Migihashi Masako, Yamamoto Kazunari, Tsujimoto-Inui Yayoi, Sato Hikaru, Shibuta Mio K, Nishino Norikazu, Nakamura Tomoe, Shimada Hiroaki, Taniguchi Yukimi Y, Takeda Seiji, Aida Mitsuhiro, Suzuki Takamasa, Seki Motoaki, Matsunaga Sachihiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Histone deacetylation regulates de novo shoot regeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pnasnexus/pgad002	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 Xu Wenjia, Sato Hikaru, Bente Heinrich, Santos-Gonzalez Juan, Kohler Claudia	4. 巻 35
2. 論文標題 Endosperm cellularization failure induces a dehydration-stress response leading to embryo arrest	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 874 ~ 888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koac337	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 該当する

1. 著者名 Sato Hikaru, Yamane Hisayo	4. 巻 -
2. 論文標題 Histone modifications affecting plant dormancy and dormancy release: common regulatory effects on hormone metabolism	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erae205	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 Sato Hikaru, Mizoi Junya, Shinozaki Kazuo, Yamaguchi - Shinozaki Kazuko	4. 巻 117
2. 論文標題 Complex plant responses to drought and heat stress under climate change	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1873 ~ 1892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.16612	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 Liang Bingyi, Sato Hikaru, Matsunaga Sachihito	4. 巻 88
2. 論文標題 Genome editing based on in vitro-assembled ribonucleoproteins in plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 283 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1508/cytologia.88.283	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 Ito Nanami, Sakamoto Takuya, Oko Yuka, Sato Hikaru, Hanamata Shigeru, Sakamoto Yuki, Matsunaga Sachihito	4. 巻 27
2. 論文標題 Nuclear pore complex proteins are involved in centromere distribution	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108855 ~ 108855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2024.108855	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hikaru Sato, Juan Santos-Gonzalez and Claudia Kohler
2. 発表標題 Combinations of maternal-specific repressive epigenetic marks in the endosperm control parental-specific gene expression patterns during germination
3. 学会等名 Cold Spring Harbor in Asia: Integrative Epigenetics in Plants (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hikaru Sato, Juan Santos-Gonzalez and Claudia Kohler
2. 発表標題 Combinations of maternal-specific repressive epigenetic marks in the endosperm control seed dormancy
3. 学会等名 26th International Conference on Sexual Plant Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wenjia Xu, Hikaru Sato, Heinrich Bente, Juan Santos-Gonzalez and Claudia Kohler
2. 発表標題 植物ホルモンABA は異数倍数体間交雑を正に制御する
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 輝, Juan Santos-Gonzalez and Claudia Kohler
2. 発表標題 胚乳細胞における複合的エピジェネティック抑制機構と母性由来ゲノムによる種子発芽の制御
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wenjia Xu, Hikaru Sato, Heinrich Bente, Juan Santos-Gonzalez and Claudia Kohler
2. 発表標題 植物ホルモンABA は倍数体間交雑の障壁を緩和する
3. 学会等名 日本植物形態学会第34回総会
4. 発表年 2022年

1 . 発表者名 Wenjia Xu, Hikaru Sato, Heinrich Bente, Juan Santos-Gonzalez and Claudia Kohler
2 . 発表標題 The plant hormone ABA alleviates the interploidy barrier
3 . 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Reserach (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Wenjia Xu, Hikaru Sato, Heinrich Bente, Juan Santos-Gonzalez and Claudia Kohler
2 . 発表標題 植物ホルモンABA は倍数体間交雑の障壁を緩和する
3 . 学会等名 日本植物形態学会第35 回総会・大会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Wenjia Xu, Hikaru Sato, Heinrich Bente, Juan Santos-Gonzalez and Claudia Kohler
2 . 発表標題 ABA increases the interploidy hybridization success
3 . 学会等名 日本植物学会第87回大会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Hikaru Sato, Wenjia Xu, Heinrich Bente, Juan Santos-Gonzalez and Claudia Kohler
2 . 発表標題 Analysis of the Relationships Among Gene Imprinting, Seed Dormancy and Reproductive Barriers
3 . 学会等名 7th International Plant Dormancy Symposium (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1．発表者名 Hikaru Sato, Satoru Fujimoto, Miki Fujita, Fuminori Takahashi, Keiko Kuwata, Sachihiro Matsunaga, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki
2．発表標題 iChIP, a screen method to isolate transcriptional complexes on a specific promoter in planta, identified novel
3．学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4．発表年 2024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			
スウェーデン	SLU			
ドイツ	MPI			