

研究報告書

「バイオマス生産性を支配している細胞機能転換転写制御ネットワークの人工構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 塚越 啓央

1. 研究のねらい

根端における細胞の分裂から伸長への機能転換を制御している転写ネットワーク (intra-cellular Gene Regulatory Network: iGRN) をマルチカラーイメージングやシステムバイオロジー学的解析を用いて明らかにする。

根は物理的な支持組織としてだけでなく、土壌中の栄養を吸収して個体に循環させ、さらには周りの環境を敏感に感じ取って個体全体を環境へバランスよく適応させる重要な器官である。このバランスが崩れると植物個体全体が小さくなり、植物のバイオマス低下を引き起こす。よって根のサイズ決定機構を解明し、それを人為的にコントロールできることは環境要因に左右されにくい安定した植物バイオマスを供給する制御系の構築に繋がる。

正常な根の成長には根端での細胞分裂から細胞伸長への細胞機能転換が鍵となっている。しかし、植物細胞には細胞壁が存在し、細胞伸長の物理的障壁となっている。すなわち細胞の伸長には細胞壁のルーズニングが一過的に起こり、伸長を停止する際には強化させるといった複雑で連続的な細胞壁リモデリングが協調的に行われる必要がある。私は、根端の細胞分裂から細胞伸長への細胞機能転換を制御する UP BEAT1 (UPB1) 鍵転写因子と共に、ROS がシグナル因子として細胞機能転換を制御していることを見いだしている。UPB1 の機能解析から、UPB1 は細胞壁リモデリングに関わる遺伝子発現を直接制御していなかった。このことから、UPB1 の下流の転写因子が細胞壁リモデリングに関わると仮定された。細胞壁リモデリングに関わる一連の複雑な現象を制御していると考えられる UPB1 をノードとする細胞機能転換に関わる転写ネットワーク (iGRN) の解明は、単に根のサイズ決定のみならず細胞壁成分の人工制御という点においても優れている。

そこで本研究のねらいをおおまかに以下の二つとする。(1) UPB1 を介した iGRN のイメージングを行う。イメージングにより時空間的に制御される細胞機能転換を司る転写ネットワークを明らかにし、根のサイズ決定機構の人工構築を目標とする。(2) UPB1 の下流に位置する転写因子の標的因子をゲノムワイドに探索し、UPB1 をインプットとする細胞機能転換のシグナルを細胞壁合成というアウトプットまでシステムバイオロジー学的アプローチを利用してプロファイリングする。これらの知見から様々な植物種に展開可能な、ロバストな制御系を構築することで従来の育種学で得られてきたバイオマス生産性の向上を超えるような分子基盤技術の創出を目標とする。

2. 研究成果

(1) 概要

UPB1 が制御する iGRN を多色蛍光タンパク質 (マルチカラー) によるイメージング (1) とシステムバイオロジー (2) を組み合わせ解析する。本研究では根端の細胞機能転換の鍵転写因子

UPB1 を iGRN のインプットとし、細胞壁リモデリングにかかわる遺伝子をアウトプットと考え、UPB1 の iGRN を明らかにする。UPB1 の遺伝子破壊株では伸長領域の最後の細胞(伸長が完了した細胞)は長くなり、UPB1 の過剰発現株では短くなる。よって UPB1-iGRN を明らかにすることで細胞のサイズを人工デザインできると考えられる。

(1)UPB1 が制御する iGRN をリアルタイムイメージングで可視化する。

UPB1 には少なくとも 166 のダイレクトターゲット遺伝子があり、その中には 18 の転写因子遺伝子を含み、残りの遺伝子の中で細胞壁合成に関わるのはペルオキシダーゼのみであった。よって、マイクロアレイ解析でみられた多くの細胞壁合成系遺伝子発現の変化は UPB1 下流の転写因子に制御されていると考えられる。UPB1 標的転写因子の一つである MYB46 は細胞壁合成関連遺伝子の転写活性化因子であることが報告されている。そこで MYB46 を第一の候補とする。また、その他に MYB50 も報告は無いが MYB46 と同様の MYB 型の DNA 結合ドメインを持つことから、UPB1 の下流で細胞壁合成系遺伝子発現制御に関わっている可能性が考えられた。そこで、UPB1→MYB46/MYB50→細胞壁合成遺伝子という UPB1 の iGRN を想定した。UPB1、MYB46/MYB50、細胞壁合成関連遺伝子を 3 種の異なる蛍光タンパク質でラベルしたレポーターを持つ植物体(マルチカラーレポーター植物)を作成し、RootArray システムを用いた根のライブイメージングを行う。タイムラプスイメージング後に画像処理を行い、細胞の形態変化、細胞のサイズや蛍光強度を数値化することで UPB1 をインプットとする細胞機能転換に関わる iGRN の時空間的な動態を可視化する。

(2)MYB46/MYB50 の転写制御ネットワークを分子生物学的に決定する。

MYB46/MYB50 結合ゲノム配列を ChIP-seq 解析を行いゲノムワイドに同定する。ChIP-seq からは数多くの MYB46/MYB50 結合領域が検出されると予想されるが、同時に MYB46/MYB50 の誘導系の形質転換体を用いたトランスクリプトーム解析を行い、遺伝子発現に変化が見られ、かつ ChIP-seq 解析でポジティブな領域を遺伝子コード領域近傍に持つ物をダイレクトターゲットとして同定する。UPB1 のトランスクリプトームデータと MYB46/MYB50 のダイレクトターゲット遺伝子の情報をシステムバイオロジー学的解析で統合することにより UPB1 をインプットとした細胞壁合成へ繋がる iGRN を構築する(図 1)。

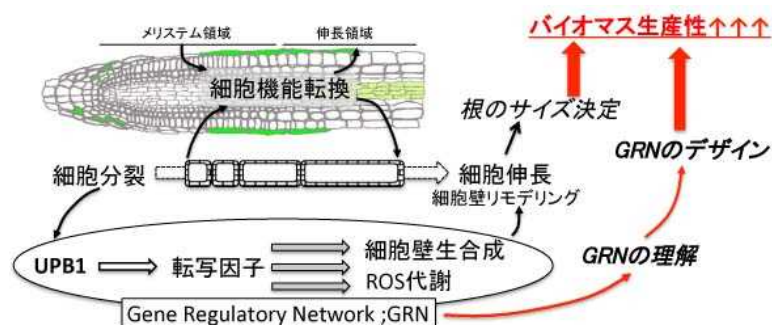


図1.細胞機能変換を制御しているGRNによるバイオマス生産性
 根端における細胞分裂から細胞伸長への機能転換にはUPB1を中心としたGene Regulatory Network (GRN)が鍵となる。
 このGRNを理解することで根のサイズ決定メカニズムを利用した植物のバイオマス生産性の向上が可能となる。
 本研究ではライブイメージングとシステムバイオロジーを併せ、UPB1-GRNの人工デザインによるバイオマスの向上に挑む。

(2) 詳細

(1) UPB1 が制御する iGRN をリアルタイムイメージングで可視化する。

- ・マルチカラーレポーターラインの作成

インプットである UPB1 の機能を人為的に ON にする為に、UPB1 cDNA 断片の 5' 側に YFP、3' 側に GR レセプターを融合させたレポーターライン、また、UPB1 cDNA と GR レセプターの間には転写活性化ドメイン VP16x2 を融合させた。YFP-UPB1-GR および YFP-UPB1-VP16x2-GR を UPB1 プロモーター並びに 35S プロモーターと結合させた translational fusion をシロイヌナズナ *upb1-1* 変異株に導入した形質転換体を作成した。UPB1 下流の転写因子 MYB46 と MYB50 に関しても同様に MYB46/MYB50 プロモーターと MYB46 cDNA、MYB50 cDNA と GFP を融合させた translational fusion を *upb1-1* 変異株に導入した形質転換体を作成した。さらに、UPB1-iGRN のアウトプットとして細胞壁合成系遺伝子 *AtCesa04*, *AtCesa05*, *AtCesa07*, *AtCesa08*, *XTH18*, *IRX12*, *EXPL1*, *CTL1(POM1)*, *CTL2* の 9 つの遺伝子の各々のプロモーターと CFP と融合させた translational fusion を *upb1-1* に導入した形質転換体を作成した。これら細胞壁合成系遺伝子は UPB1 マイクロアレイデータより発現変動が有意であったものを選抜した。しかしながら細胞壁合成系の CFP 蛍光は非常に弱く、CFP の代わりに RFP を融合させた translational fusion を作成したが、これらも蛍光が弱く以後の解析には向いていないと判断した。そこで、translational fusion の代わりに transcriptional fusion に変換し、さらに蛍光強度を強める工夫として CFP を二回直列に繋いだ形質転換体を作成した。細胞壁合成関連遺伝子群の transcriptional fusion は CFP を 2 回繋いだため、強い蛍光を示す形質転換体を得ることができた。特に、*AtCesa04*, *XTH18*, *CTL1(POM1)* の発現が良好であった。T2 世代が得られた時点で、YFP-UPB1-GR, YFP-UPB1-VP16x2-GR, *pMYB50::cMYB50-GFP*, *pMYB46::cMYB46-GFP* ラインと掛け合わせを進めた。シングルレポーターラインの発現は良好で、UPB1-GR に関しては 10 μ M DEX 処理により核に移行することが観察された。MYB46 は維管束の分化を開始する細胞の核で特異的な GFP 蛍光が観察された。MYB50 は UPB1 と同様に根端伸長領域から強い発現を示した。実験項目 B で後述するが、*pMYB46::cMYB46-GFP* 形質転換体を用いたクロマチン免疫沈降から ChIP 解析に十分量のクロマチンを獲得できず、以後は MYB50 を中間転写因子とする UPB1-iGRN の構築に集中した (図 2)。

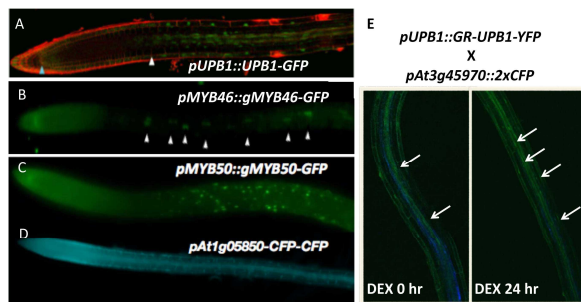


図2: UPB1をインプットとするマルチカラーレポーターラインの構築 (A) UPB1, (B) MYB46, (C) MYB50, (D) CTL1のそれぞれの根端での発現場所。(E) 二重レポーターラインの発現様式。UPB1をDEXで24hr誘導後、下流の細胞壁合成関連CFPの発現レベルが減少した。矢印はUPB1の発現を示す。

また上記 UPB1 の own promoter のみならず、UPB1 の発現を estradiol (est)により誘導的に強く発現させ、その際の UPB1-iGRN の劇的な変化を捉える為のレポーターラインの作成も行った。その為に est 誘導性プロモーター領域(*pXVE*)のクローニングを済ませ、その下流に YFP-UPB1 と YFP-MYB50 を融合させた形質転換体も作成した。これらの est による誘導タイムラプスイメージングを行った結果、これらのラインはいずれも est 添加後約1時間半という早い段階で核に強い蛍光を観察することができた。現在はこれら誘導系レポーターラインと細胞壁合成系遺伝子レポーターラインの掛け合わせを進めている。

これらのマルチカラーラインのタバコ培養細胞 BY2 を用いた GRN の構築も同時に行った。しかし、UPB1 プロモーターが BY2 細胞では発現しない・二番目のレポーターラインを導入した形質転換体を獲得することができなかったことから、培養細胞を用いた GRN の再構築は作成した誘導系 *pXVE::YFP-UPB1*・*pXVE::YFP-MYB50* の核での発現を確認したのみで留まった。

二重レポーターラインを獲得するのに2年以上経過したので、交配は継続しつつ新たなマルチレポーターライン作成の手法として、島根大学・中川強教授との共同研究でリサイクリング gateway システムを用いたマルチカラーレポーターラインの作成にも着手した。リサイクリングシステムは一つのバイナリーベクター上に多数の遺伝子単位を導入することが可能で、一度の形質転換によりマルチカラーレポーターラインをもつ T1 植物を獲得することが可能になる。そこで現在は *pUPB1::YFP-UPB1-GR* とその下流の *pMYB50::cMYB50-GFP* と *pCTL1::2xCFP* のリサイクリングベクターを作成した。現在までに一番目のレポーターラインを導入したクローンの作成は完了したが、2番目のレポータークローンを導入することが進まず、中川教授と原因究明を行いくローニングの加速を測っている。

・タイムラプスイメージング

RootArray を生育させるための条件検討を行い、研究室内に RootArray 生育システムを立ち上げ、光、温度、培地循環速度の検討を行った。その結果、安定して RootArray 上でシロイヌナズナを生育させることが出来る条件を確定した(図 3)。しかしながら、実際に共焦点顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングにおいて培地成分の沈殿物が根の周りに付着してイメージングの支障をきたすことや夏場の室温をコントロールできない環境での温度上昇(30 度以上)と解析に資する為の高解像度イメージを得ることが困難を極めた。そこで、RootArray システムと比較してハイスループットではないが簡易なバージョンの RootArray 構築を進めた。様々な条件を試し、現在非常に簡便で高解像度のデータが得られるシステムを構築し、タイムラプスイメージングを順次進めている。

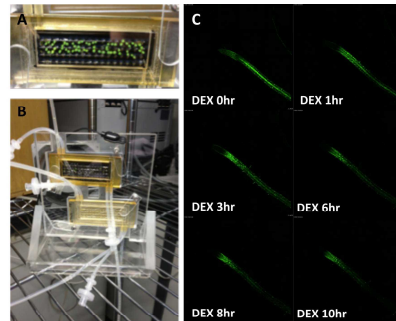


図3. RootArrayシステムと取得画像例。(A)RootArray本体。(B)RootArray培養方法。(C)RootArrayを用いて*pUPB1::GR-UPB1-VP32-YFP*のDEX誘導画像取得例。10 μ M Dexで10時間画像取得を行った。

(2) MYB46/MYB50 の転写制御ネットワークを分子生物学的に決定する。

実験項目(1)において作成した YFP-UPB1, MYB46-GFP 及び MYB50-GFP を持つ形質転換体からタンパク質を抽出して GFP によるクロマチン免疫沈降実験を行った。MYB46 の発現場所が道管細胞に限られており、タンパク質量が少ないことから、MYB46-GFP を発現する形質転換体からは免疫沈降をすることができなかった。一方、MYB50-GFP を発現する形質転換体からは良好な免疫沈降結果を得たので、ChIP-qPCR 解析を進めた。マルチカラーレポーターラインを作成した9つの細胞壁合成関連遺伝子のプロモーター領域を用いた ChIP-qPCR から、MYB50 が *CTL1(POM1)* のプロモーター領域に結合することを見いだした。この結果を受け、名古屋大学 ITbM・中道範人特任准教授と共同研究で ChIP-seq 解析を現在進めている。さらに、*est* 発現誘導系 *pXVE::YFP-UPB1* ならびに *pXVE::YFP-MYB50* 形質転換体を用いた発現解析を行った。まず UPB1 の誘導系のタイムコース解析を行った。その結果、以前に報告した UPB1 のダイレクトターゲット *Peroxidase57* と同様に MYB46 と MYB50 の発現抑制が時間依存的に検出された。ついで MYB50 のタイムコース解析では *Per57* の発現変動は見られなかったが、ChIP で得られた、*CTL1* は早い段階からその遺伝子発現が誘導を受けていた。当初使用していた *est* 濃度が根の伸長阻害を引きおこし、遺伝子発現に影響を受けることから *est* 濃度の条件検討を行い 1 μ M が適切であることを見いだし、現在この濃度でタイムコース処

理を行い龍谷大学・永野惇講師との共同研究で RNAseq 解析を行う準備をしている。
 CTL1 はセルロース合成に関わっている事が報告されており、当初に想定した UPB1→中間転写因子(MYB50)→細胞壁合成関連遺伝子(CTL1)という転写ネットワークの一端を明らかにすることができた (図 4)。今後は実験項目(1)によりこの UPB1-iGRN の時空間的制御系の定量ならびに、実験項目(2)によるゲノムワイドな網羅的解析から MYB50 下流の CTL1 以外の細胞壁合成関連遺伝子への制御系を明らかにして行く。

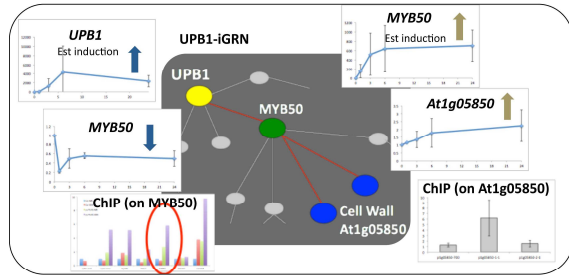


図4. 本研究より明らかになったUPB1-iGRNの一部。Est誘導系・ChIP-qPCRの結果から、UPB1はMYB50を介してCTL1 (At1g05850)の発現を調節し、細胞壁合成に関わり根の大きさを調節していることが示唆された。

3. 今後の展開

本“さきがけ”研究期間において根の伸長制御の鍵因子 UPB1 をインプットとした遺伝子発現ネットワーク(UPB1-iGRN)の一端を明らかにすることができた。研究のねらいでも述べたが、直接周りの環境変化に素早く応答し、個体全体の成長を支える根のサイズ決定機構を人為的に調節可能になれば、外環境に影響されにくいバイオマスの安定供給に繋がる。UPB1 の下流の転写因子 MYB50 が細胞壁合成因子 CTL1 を調節することが明らかになったことにより、MYB50 の発現量を人為的に変化させることにより、根の成長のみならず植物の重要なバイオマス成分であるセルロース量を調節することが可能になる。今後は MYB50 のオルソログをシロイヌナズナ以外の植物で過剰発現させることでセルロース含量を増やすことができるであろう。また、UPB1→ MYB50 と類似の GRN を他の植物種から抽出し、それらを DNA マーカーとして利用することで分子育種のスピードを上げる有効な手段となりうる。

現在進めている MYB50 のゲノムワイドな解析から、CTL1 以外の新たな標的因子群も発見できる物と考えられるので、今後はそれらの因子の解析をすすめ根の成長制御機構に新たな知見を得て行きたい。

また本研究でシステム構築を行ったマルチカラーレポーターラインを用いたイメージングは様々な目的に応用することが可能である。単に複数の転写因子の発現パターンを根の成長とともに時空間的に捉える事自体も非常に有効な分子メカニズム研究になる。さらに UPB1-iGRN を様々なストレスにさらすことでストレス応答と根の伸長制御と遺伝子発現ネットワークを可視化することが出来る。UPB1-iGRN のみならず、乾燥・塩ストレス応答に重要な転写因子をインプットとする iGRN のマルチカラーラインを作成することによりストレス応答と根の成長制御を評価することが可能になる。GRN の評価のみならず、有用物質の輸送や蓄積様式もライブで評価することが可能で、様々な現象の根における時空間制御機構を評価することが可能である。このライブイメージングによる遺伝子発現の可視化は、ストレス応答評価用のツールとしても使用可能で、非常に汎用性の高い基盤技術となるであろう。

4. 評価

- (1)自己評価
 (研究者)

まず研究目的の達成状況に関する評価であるが、ゲノムワイドな網羅的な UPB1-iGRN を現時点で明らかにすることができていないことは評価できない。チャレンジングな研究課題を設定していたが、早い段階での方向修正や共同研究の開始をすべきであったと考えられる。しかしながら、UPB1→MYB50→CTL1 という少なくとも一本の多段階転写制御系を明らかにできたことは評価に値するであろう。自分が保持するマイクロアレイデータセットや ChIP-Chip データから仮想 GRN を抽出し、分子生物学的な検証を行えたことは研究者自身の研究の方向付けが正しかったことを裏付けている。実際には多くの形質転換体やタンパク質免疫沈降の条件検討に時間がかかってしまったが、上記 GRN を抽出できたことは着実に課題研究を遂行できたと考えられる。イメージングシステムに関しても、申請段階でのハイスループット化を継続できなかった事は反省すべき点である。問題点としてあげられるのが、顕微鏡設置場所の温度調節等物理的な障壁が大きかった。しかし今年度から顕微鏡の設置場所を変更し、温度コントロールができるプレハブを利用、また、RootArray に変わる小さなイメージングチャンバーの使用への変更で、ハイスループットではないが高解像度イメージングを可能とした。このイメージング基盤技術は汎用性が高く、植物成長制御機構の可視化と言う点では非常に大きな貢献が可能と考えられる。

ついで研究の進め方への自己評価であるが、技術補佐員一名との研究体制ではなく、研究室に配属された学生や技術補佐員を2名にする等、人数を増やす必要があったと考えられた。ただし、特任の立場であると学生の配属はままならず制度上不可能であった。研究費執行に関しては蛍光顕微鏡を一年目に購入したことは非常に良かったと考えられる。作成した形質転換体や培養細胞のイメージングや条件検討を非常にスムーズに行うことができた。また、リアルタイム qPCR 機器(illumine Eco)の購入により、遺伝子発現解析ならびに ChIP-qPCR も常時行うことができた。ChIP-seq や RNAseq 用の高額試薬を購入することもでき、分子生物学的な実験も非常に良く進めることができていた。以上のように研究費執行は必要なレベルで行うことができ、研究の推進に非常に大きな力となった。

以上、二酸化炭素資源化研究領域において、本研究課題が果たすべき根の成長制御機構に関する転写ネットワークの人工構築に関わる基盤技術の構築に関しては最低限の成果をあげることができたといえる。すなわち、UPB1 をインプットとした細胞壁合成に関わる転写ネットワークの一端を可視化することができ、汎用性の高い根のタイムラプスイメージングの基盤を示すことができた。本研究課題の成果は根の成長制御に関する学樹的な重要な発見につながり、また、この研究成果を利用することによる根における根のセルロース含量の人為的コントロールへの基盤技術、ならびに根の環境応答に関する遺伝子発現と成長制御のモニタリングシステムへの展開と言う点で非常に有益な研究成果だと言える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

塚越氏は、バイオマス増産への一つの道筋として、根の発育を増進するシステムの解明のため、根の細胞における転写ネットワークの人工構築をめざした。その結果、基礎となった転写因子について、いくつかの標的因子を解明することに成功した。また、根の成長・発達について、遺伝子ネットワークをリアルタイムで解析できる細胞のイメージング技術実験系を確立した。し

かし、ネットワーク解析については、まだまだ全貌が見えてきたとはいえ、今後、このさきがけ研究の経験を生かして、自ら設定した研究テーマに果敢に挑戦して欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hironaka Tsukagoshi, "Control of root growth and development by reactive oxygen species", <i>Curr. Opin. Plant Biol.</i> , (2016) 29:57-63
2.
3.
4.
5.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

日本植物生理学会年会(第55回、第56回)においてシンポジウムのオーガナイザーを務めた。第56回年会においては当領域の協賛を得てのシンポジウムを開催した。さらに平成26年には第38回内藤コンファレンス「生物システムの物質的基盤」に採択されポスター発表を行った。同平成26年には第12回日仏植物科学ワークショップ「植物の環境応答」、日本農芸化学会 関西支部例会、日本植物学会第78回大会 シンポジウム、日本遺伝学会第86回大会 ワークショップでの招待講演を行った。平成27年にはイメージングに関する共同研究をオーストリア Gregor Mendel Insutitute (GMI) Wolfgang Busch 博士と開始し、GMI 国際セミナーの講演者として招待講演を行った。

公募研究の応募として、新学術領域「発生ロジック 代表:東京大学 塚谷祐一教授」の公募班員として採択され、活性酸素シグナルと根の成長制御に関する研究を進めている。

また、科学研究費補助金 若手研究Bに採択され、アイスプラントの耐塩性機構に関する論文を PLoS One 誌に報告した(Hironaka Tsukagoshi et al., "RNA-Seq Analysis of the Response of the Halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum* (Ice Plant) to High Salinity.", PLoS One, 2015, 10:e0118339)。