

**最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書**

研究課題名	遺伝子転写制御機構の改変による環境変動適応型スーパー植物の開発
研究機関・部局・職名	独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員
氏名	藤原 すみれ

【研究目的】

本研究では、植物の転写制御機構の基本メカニズムの解明と、転写抑制因子に活性化ドメインを付加した系統の網羅的作出および有用系統のスクリーニングという二つのアプローチから、グリーン・イノベーションの推進につなげることを目指した。

これまで、遺伝子の機能を欠損させるなどして有用形質を持つ植物の探索などは行われてきたが、そのような手法では劇的な改善点を持った植物を単離するのは難しかった。それは、植物の遺伝子は多くの場合において他の遺伝子と機能重複しており、また倍数性の問題もあることから、一つの遺伝子の機能を欠損させても、他の重複遺伝子の機能による補償的作用によりその形質があらわれないことが多いからである。

その問題を解決する革新的な技術が、申請者の所属研究室で開発された。この技術は(Chimeric REpressor Gene-Silencing Technology (CRES-T)法と名付けられた(Hiratsu et al, 2003)。これは、転写抑制因子の植物特有のリプレッションドメイン(RD)として単離された12アミノ酸(最少わずか6アミノ酸)を付加するだけで、転写活性化因子を強力な転写抑制因子に転換できるというものである。この転写抑制作用はドミナントネガティブに作用するため、

倍数性の高い植物においてもその機能を強力に抑えうる。また、相同転写因子の機能も同時に抑えるため、機能重複遺伝子の存在により機能欠損では形質が得られない場合でも形質を得られるケースが多く報告されており、乾燥耐性、耐塩性、高温耐性、低温耐性、種子の油脂含量増加など、有用形質を持った様々な植物の作出にも成功している(reviewed by Mitsuda and Takagi 2009, PCP)。さらに、このCRES-T法は、シロイヌナズナ以外の植物にも有効であり、バラ咲きのシクラメンの開発(Tanaka et al, 2013)など、各方面で利用されている。しかし、転写を抑制する因子が制御する生理現象や遺伝子経路に関する知見は限られている。その上、転写抑制因子がターゲット遺伝子の発現を抑制するメカニズムは解明されておらず、CRES-T法においても、なぜわずか6アミノ酸を付加するだけで転写活性化因子が強力な転写抑制因子となりうるのか、そのメカニズムも未解明であった。このメカニズムを解明することは、植物の遺伝子発現制御の基本部分を理解する上で必須である。また、遺伝子転写抑制のメカニズムが解明されれば、斬新な人為的な遺伝子発現制御システムや、有用

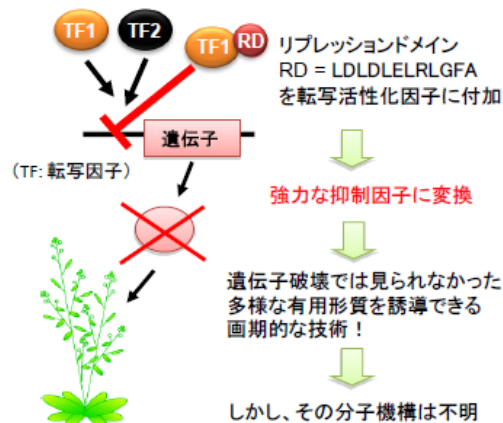


図1 新規植物遺伝子発現サイレンシング技術 CRES-T法

形質を持つ植物の画期的な作出法の開発につなげることができると考えられる。

そこで、本研究では、所属研究室が所有する転写因子研究のノウハウや豊富なリソースと、補助事業者が得意とする生化学的解析手法を融合することにより、転写制御機構の基本メカニズムを解明し、それをさらに展開した斬新なスーパー植物作出法の開発につなげるための知見を得ることを目指した。また、転写抑制因子の機能を逆転させることで有用形質を獲得した植物の単離と応用化に向けた知見の獲得も目指した。

1. 転写抑制機構に関わる新規因子の単離およびメカニズム解明

一つ目は、生化学的手法から攻めるアプローチである。RD を付加して発現させたときに形質が現れる転写因子のタンパク質複合体を網羅的に単離し、その複合体構成要員を同定することとした。転写抑制時に特異的に単離され、なおかつ複数の転写因子に対する解析において共通して単離される

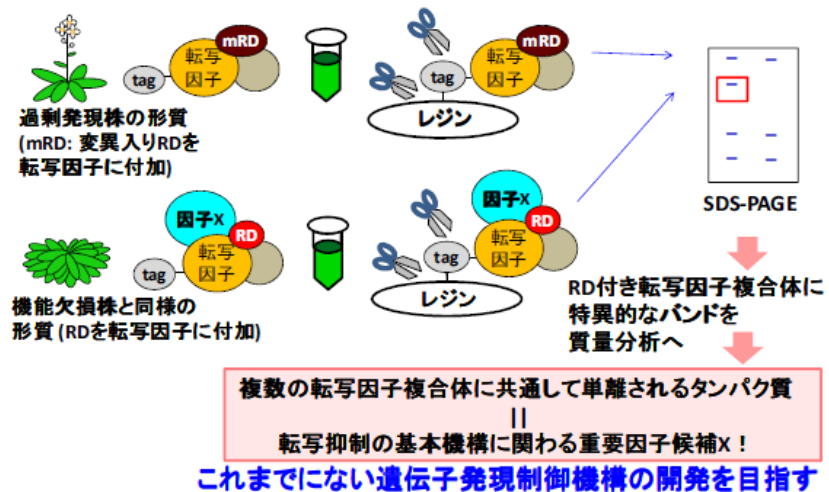


図2 転写抑制機構に関わる新規因子の単離手法の概要

ものに着目し、さらに解析を進めることとした(図2)。これにより、単に個々の遺伝子発現制御に関わる因子ではなく、転写抑制機構の基本部分に関わる重要因子を発見することができると期待された。これまでに広く行われてきた遺伝学的手法でなく、タンパク質複合体を網羅的に解析するという手法を取ることで、破壊すると致死になる、機能重複

遺伝子の存在により変異体の形質が現れないなどの理由で発見されることになかった重要因子が同定されることが期待された。転写抑制の機構が解明されていないために応用展開も不可能な状況にあったが、本研究により重要因子が単離され、その制御機構やそれに関わる機構が判明すれば、人工的に遺伝子発現を制御するための斬新かつ強力な技術の開発が可能になると期待された。



図3 ブレーキ(転写抑制因子)をアクセラレーター(転写活性化因子)に変換した植物を用いた有用植物のスクリーニング

2. 転写抑制因子に転写活性化ドメインを付加した植物の網羅的作出・解析、ストレス耐性や他の有用形質を持った植物の探索

二つ目のアプローチとして、既存のリソースやノウハウを生かして有用植物を探索するプロジェクトも同時に進めた。シロイヌナズナの転写因子のうち約15%は内生の

RD を持ち、その多くが転写抑制因子として働くと想定される。これらの転写因子の機能は CRES-T 法で抑えることができない。そこで、本プロジェクトでは、CRES-T 法とは逆に、転写抑制因子に転写活性化ドメイン VP16 を付加し機能を転換させた系統を網羅的に作出することとした（図3）。これらの系統の中から、ストレスに耐性を持った植物や、他の有用形質を持った植物のスクリーニングを行うこととした。転写抑制因子は、転写の活性化経路とのバランスを取りながら植物の生理現象を制御し、ブレーキ的な役割を担うことによって、状況に応じて働きを抑えていると考えられる。このブレーキを人工的に外すことにより、通常では得られないような形質を持つ植物の作出が可能になると考えられた。本プロジェクトでは、これらの形質転換体の表現型を解析することにより、転写抑制因子がどのような生理現象の制御に関わるのかも解明することができると考えられた。また、形質転換体を各種のストレス条件下で栽培し、通常の植物体は生存できないような環境下で生存することのできる系統を網羅的にスクリーニングすることとした。さらに、各種の有用形質を持つ系統のスクリーニングも行い、得られた形質に応じて実用植物に導入することとした。これらにより、CRES-T 法では得られなかった新規有用形質を持つ植物を作出することができると期待された。このシステムではドミナントに遺伝子を発現させるため、倍数性が高く品種改良が難しい植物内でも強気に働かせることができると想定され、応用性が高い手法になると期待された。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

総合所見

本研究課題は、植物研究者の間で広く利用されている RD モチーフによる遺伝子転写抑制機構の解明と利用を目的とし、以下の2つの小課題からなる。(1)植物の転写抑制因子の機構解明、(2)抑制因子を促進因子に変換することによる有用植物表現型の選抜。東日本大震災の影響で当初大幅に遅れたが、優れたマネジメントでこれを克服した。(1)については、RD モチーフを有する抑制因子と特異的に相互作用する複数の因子の同定に成功し、その中の一つヒストンの一種が RD を持つ転写因子による転写の抑制や CRES-T 法が働くメカニズムにおける鍵因子であることを明らかにしたことはじめとして、他の因子についても多くの知見を得、所期の目標を達成した。単離した因子が CRES-T の機能発現に関与することをおおむね証明しており、転写抑制機構のメカニズムの解明につながる足がかりになる成果であると評価できる。本プロジェクト終了後もさらに研究を発展させ、このメカニズムが転写制御全体に占める位置付けも含めて、明確にするものと期待される。(2)についても有用な形質転換体が多数得られており、実用化の可能性も期待できる。インパクトの高い雑誌での成果公表を目指しており、プロジェクト期間内に重成果公表に至らなかった点は惜しまれるが、今後数年以内にインパクトの高い研究成果を社会に還元できるものと考えられ、優れた結果を得ていると評価できる。グリーン・イノベーションに貢献する植物の作成に道を開きつ

つあり、さらに研究を進展させていただきたい。

目的の達成状況

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

当初、震災による甚大な被害で研究に遅れが生じたが、状況に好く対応し、所期の目的を達成した。

網羅的な形質転換体の作成は当初の予定よりも早いペースで完了させ、栽培試験も順調に進め、強い有用形質を持つ系統を多数単離し、イネなどの実用植物への導入も進めている。個別の転写因子が有用形質を付与する機構の解析においても、当初の想定を上回って、新規の機構を複数見つけることにも成功している。

転写抑制メカニズムの解明に関しては、関連する複数の新規因子の単離に成功し、当初の目標どおり、転写抑制の鍵因子を同定することに成功した。

1. 転写抑制機構に関わる新規因子の単離およびメカニズム解明

リプレッションドメイン (RD) を持つタンパク質と特異的に植物体内で複合体を形成するタンパク質を複数同定した。さらに、その中の一つヒストンの一種が RD を持つ転写因子による転写の抑制や CRES-T 法が働くメカニズムにおける鍵因子であることを明らかにしたことはじめとして多くの知見を得、所期の目標を達成した。

2. 転写抑制因子に転写活性化ドメインを付加した植物の網羅的作出・解析、ストレス耐性や他の有用形質を持った植物の探索

約 300 個の転写因子に転写活性化ドメインを付加し高発現させる系統の形質転換体作成、全系統の T1 個体の形質データ取得と T2 種子採集を完了した。さらに、有用形質を含む強い形質をもつ系統を多数得て解析を進めており、所期の目的を達成している。

得られた成果については、既に 16 件の学術雑誌への発表に加え、トップジャーナルへの投稿に向けて準備を進めている。また、知的財産権の取得に向けても 5 件を準備中であり、所期の目的を達成している。

研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が (ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が (創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

1. 転写抑制機構に関わる新規因子の単離およびメカニズム解明

本研究では、RD を取り巻くタンパク質群に着目し、RD を持つタンパク質が転写を抑える機構の解明を目指して研究を進めてきた。その結果、RD を持つタンパク質と特異的に植物体内で複合体を形成するタンパク質を複数同定することに成功した。その中の一つが、ヒストンの一種である (図 4)。このヒストンは、ここ数年シロイヌナズナの研究において転写の活性化に重要な機能を持つことが示唆されつつあるが、転写抑制における機能は報告されていない。このヒストンは、RD と共に一過的に植物細胞で発現させると、RD を持つタンパク質の核内局在を大きく変化させることを発見した。また、このヒストンを過剰に発現させると、複数の CRES-T 系統の形質を複合させたような多様で強い形質が

見られた。逆に、RNAi 法により機能を抑えると、転写活性化因子による活性化と転写抑制因子による抑制の両方が見られなくなり（図5）、CRES-T 系統の形質もほぼ現れなくなった（図6）。これらの結果から、このヒストンが RD を持つ転写因子による転写の抑制や CRES-T 法が働くメカニズムにおける鍵因子として同定された。さらに、クロマチンレベルでの制御に関連することが知られているヒストンテイルの修飾がこのヒストンにも起こることを発見し、この修飾を受けたヒストンが核内で RD と特異的に相互作用することを発見した（図7）。これらの結果は、RD を持つ転写抑制因子による転写抑制にもクロマチンレベルでの制御が関わることを示唆している。その他にも、RD 付加タンパク質について、核内でこのヒストンと共局在すること、分解されやすく、分解関係酵素と相互作用すること、翻訳後修飾を受け、その修飾が RD への変異導入、活性化ドメイン付加、コリプレッサーの強発現により見られなくなることなどを発見した。

さらに、後生動物において転写の活性化ドメイン VP16 と相互作用し転写の活性化に必要とされることが報告されている MED25 (MED25) について、シロイヌナズナの MED25 も植物体内において VP16 と相互作用することを発見し (Fujiwara et al, 2014) さらに MED25 は RD とも特異的に相互作用することを確認した (図8)。MED25 は、転写因子と基本転写装置の間で動的に働く巨大タンパク質複合体 (Mediator Complex) の一員であり、植物においては転写活性化因子の活性化ドメインと相互作用し、ストレス応答、病害抵抗性や花成時期の制御などに関与することが報告されている (Kidd et al, 2011, review)。

また、最近になって、MED25 は転写のコリプレッサー TPOLESS (TPL) との相互作用も報告された (Çevik et al, 2012)。これらのことから、我々が植物体内で RD と相互作用することを発見した MED25 は、TPL など他のタンパク質との複合体形成やタンパク質修飾状態などに応じて、転写の活性化や抑制の両方に動的に関わると考えられる。

また、MED25 に限らず、上に一例をあげた RD と複合体を形成するするタンパク質群は、RD の転写抑制能をなくすと複合体形成が見られなくなる (一例 図8)。

これらの結果から、転写の抑制のメカニズムは、複数のタンパク質との複合体形成やタンパク質修飾、クロマチンレベルでの制御などにより、複雑に制御されていることが示唆された (投稿準備中)。

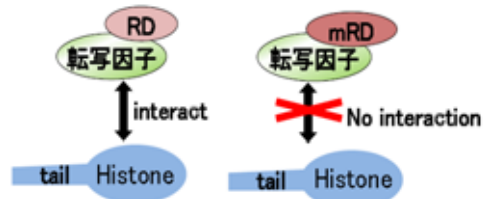
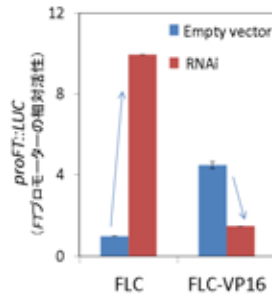


図4 ヒストン の一種はRDを付加した転写因子と特異的に相互作用する



※FLC: 転写抑制因子。FTプロモーターに結合し転写を抑える。

図5 当該ヒストンのRNAiは転写活性化および抑制の両方を変化させる

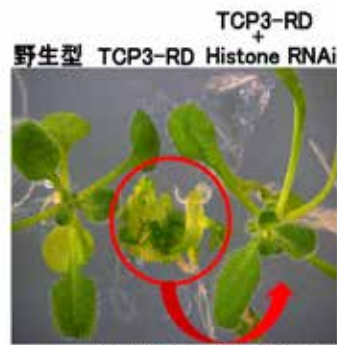


図6 CRES-T系統の形質を当該ヒストンのRNAiがキャンセルする例

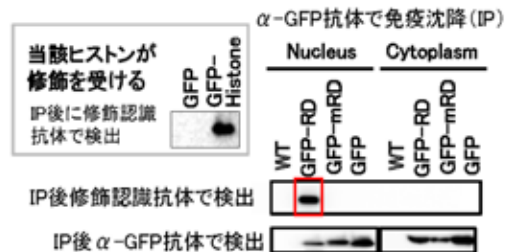


図7 RDは修飾を受けたヒストンの一種と核内で特異的に相互作用する

2. 転写抑制因子に転写活性化ドメインを付加した植物の網羅的作出・解析、ストレス耐性や他の有用形質を持った植物の探索

二つ目のプロジェクトでは、転写抑制因子として機能すると想定される約 300 個の転写因子(および機能が不明な転写因子約 20 個)に転写活性化ドメインを付加し高発現させる系統の形質転換体作成、全系統の T1 個体の形質データ取得と T2 種子採集を完了した。現在、所属グループの研究者の協力を得ながら全形質を網羅するデータベースを作成中であり、リソース配布、形質データベース公開、論文発表の準備を進めている。当初の予想を超え、非常に強い形質を示す植物が多数単離された(図 9, 一部 Fujiwara et al, 2014 にて発表)。また、VP16 付加により転写抑制因子を活性化因子に転換できたことを示す分子生物学的データや、相同転写抑制因子の二重機能欠損株よりも強い形質を誘導できたことを示すデータを、代表的な転写抑制因子を用いた解析により取得した(Fujiwara et al, 2014 および Fujiwara et al, accepted)。網羅的に作成した VP16 付加系統の中には、コンパクトなスペースに多数結実、光条件に関わらず早咲き、物質蓄積、細胞接着状態の変化、バイオマスの増加、花の形態変化、根の伸長など、有用形質を持つものが含まれていた(図 10、一部特許出願準備中、一部実用植物に形質転換を実施)。また、VP16 付加系統を用いて過酷な条件下で生存できる植物の探索も実施した。低温、乾燥、高塩濃度、高浸透圧、ジャスモン酸処理などの条件下で栽培試験を進め、耐性系統を複数単離することに成功した(図 10、一部論文準備および特許出願準備中)。現在は探索をさらに進めると共に、単離された

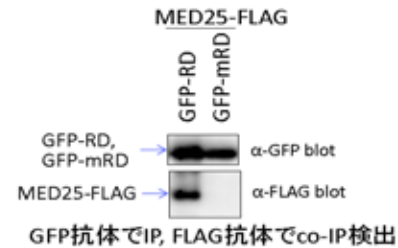


図8 メディエーターの一種が RDと相互作用する

系統のうち有望なものに関してさらに個々の解析を進めている。一例として、今回単離した乾燥耐性系統の一つが、気孔が野生型よりも閉じており、原因転写因子が気孔で発現していること、リン酸化状態に依存して他のタンパク質と相互作用して機能することなどを確認している。単離した転写因子のほとんどがストレス耐性との関連が未だ報告されておらず、新規のストレス耐性経路の同定につながる事が期待される。その他にも、上記 1、2 などの研究を進める上で有用形質付与に重要であることが示唆された転写因子に関する機能解析を進めている。その中で、VASCULAR PLANT ONE-



図9 網羅的に作成したVP16付加系統の形質例



図10 有用形質を獲得した植物の例

図10、一部論文準備および特許出願準備中)。現在は探索をさらに進めると共に、単離された

ZINC-FINGER PROTEINS (VOZs)転写因子が凍結耐性、乾燥耐性、病害抵抗性などの複数のストレス耐性機構の制御に関わること、これらの転写因子の機能を人為的に操作することで植物にストレス耐性を付与できることを報告した(Nakai et al, 2013a/ Nakai et al, 2013b, 京都府立大学 佐藤雅彦准教授のグループ他との共同研究)。

成果の先進性・優位性

転写抑制因子を転写活性化因子に転換した系統の網羅的解析においては、想定以上に強い形質を持つ系統が多く単離されており、機能欠損株のスクリーニングなどでは得られなかった情報や有用形質を多く獲得できている。本プロジェクトのストレス条件下でのスクリーニングで単離した転写因子にはストレス耐性との関連が未だ報告されていないものが多く、新規のストレス耐性経路の同定につながることを期待され、先進性・優位性が認められる。

ブレークスルーと呼ばれる成果については、

植物における転写抑制が、コリプレッサータンパク質 TPL のみならず複数のタンパク質や翻訳後制御機構が複雑にかつ動的に転写抑制を制御していることを示したこと、さらに、ヒストン H3.3 が転写抑制の鍵因子でもあるという今回の発見は、「植物特異的な転写抑制ドメイン RD による転写抑制は転写活性化機構を利用する形で起こる」という補助事業者の仮説を支持する大変興味深いもので、さらに実証を重ねることにより CRES-T を活用した、安定した有用作物作製というブレークスルーが果たされる期待がある。

研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

転写因子による遺伝子の発現制御は、生命にとって必須の機構である。遺伝子の発現制御は直接・間接的にすべての生命現象に関わることから、転写因子の働きを自由に操作することが可能になれば、将来的には植物の性質や形態を任意に操作できるようになると期待される。

植物の転写抑制機構については、既知のコリプレッサータンパク質 TPL のみならず複数のタンパク質や翻訳後制御機構が複雑にかつ動的に転写抑制を制御していることを示した。この事業担当者らの成果は、転写抑制機構の理解を大きく前進させるものである。転写制御のメカニズムが解明されれば、それに対応したこれまでにないタイプの遺伝子発現制御システムの開発につながると考えられる。また、申請者の所属する研究室で開発され、世界で幅広く活用されている CRES-T 法の作用機構不明であったが、本研究により CRES-T 法が働くメカニズムが解明されつつあり、非常に重要な成果であると言える。本研究で得られた転写因子が働くメカニズムに関する知見をもとに、新たな遺伝子発現操作法を開発することで、より自由に安定して植物の持つポテンシャルを引き出した有用植物を作り出せるようになることも期待される。

さらに、転写抑制因子を活性化因子に変換させた植物体を網羅的に各種環境下で栽培し、有用形質を持つものをスクリーニングするという方向からも、様々な有用形質

を持つ植物が単離されている。本研究の成果をさらに発展させることにより、まだ報告されていない転写因子の機能の解明や、新たなストレス耐性や有用形質付与経路の発見や理解に大きく貢献するとともに、実用植物開発への寄与も期待できる。

本プロジェクトでの研究成果から転写制御のメカニズムの詳細の解明につながれば、それに対応したこれまでにないタイプの遺伝子発現制御システムの開発につながると考えられる。本研究課題で作成したコンストラクトを直接(もしくは多少の改変のみで)他の作物(イネ等の単子葉植物を含む)に応用することが可能であり、従来手法では得られなかったような大幅な改良点を持つスーパー植物作出の可能性が広がり、社会的・経済的課題解決に貢献、グリーン・イノベーションへの貢献が期待できる。

しかしながら、現段階では、有用植物のストレス耐性に向けた新しい育種戦略の創出に成功したとまでは言えない。社会的・経済的波及効果の大きさは、今後の成果を待たなければならないと言える。

研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが(行われた ・ 行われなかった)

当初の困難を乗り越えて、優れた成果を上げており、研究計画、研究実施体制、指摘事項への対応など、本事業全般にわたって、マネジメントは優れていたと言える。

成果の公表は、下記に示すとおり適切に行われている。インパクトの高い雑誌への挑戦も進めていることを評価したい。知的財産権の取得についても、出願準備中の段階にあるが、積極的に取り組んでいると言える。その他、新聞・一般雑誌等による成果・研究内容の公表、国民との科学・技術対話についても、所属機関との連携に立って適切に取り組んでいる。

【成果の公表】

雑誌論文：合計 8 件(掲載済み・査読有 6 件、査読無 1 件、掲載決定・査読有 1 件)(他に、投稿予定・査読有 9 件)

会議発表：合計 21 件(専門家向け 17 件、一般向け向け 4 件)

図書：0 件

知的財産権：合計 5 件(いずれも出願準備中)

新聞・一般雑誌等の掲載：合計 3 件

国民との科学・技術対話の累積実施件数：合計 8 件

一般向けサイエンスカフェ 3 件、出張授業 1 件、広報誌や一般誌での研究紹介 3 件、ホームページでの研究紹介 1 件

その他の発信：

研究所のホームページにおける研究紹介、研究所の広報雑誌・サイエンストーク(ウェブ公開の URL)

http://www.aist.go.jp/aist_j/aistinfo/aist_today/vol12_06/special2/p18.html

http://www.aist.go.jp/aist_j/event/ev2013/ev20130125_2/old_ev20130125_2.html

l。 <http://www.kpu.ac.jp/cmsfiles/contents/0000002/2906/press.pdf>