

転写開始点の光操作により実現する革新的タンパク質局在制御技術

研究代表者

松下 智直 京都大学大学院理学研究科 教授



1. 研究の背景と達成目標

生命現象の基盤はタンパク質の機能であり、これまでのバイオ産業の多くは個々のタンパク質の機能改変に基づくものであった。しかしながら、1つの生物に存在するタンパク質の種類は数万・数十万にも及ぶため、従来方法による生命現象の人為的制御は極めて限定的である。

そこで本研究では、タンパク質の細胞内での局在部位およびその機能をゲノム規模で自由自在に制御し、これまで成し得なかったレベルで生命現象を操る技術の開発を目指し、それを実現させるための技術的基盤の構築を行う。

フィトクロムは、赤色光で活性化され、遠赤色光で不活性化される、植物の主要な光受容体であり、PIF と呼ばれる転写因子群の働きを阻害し、その 2,000 ほどの標的遺伝子の転写量を変化させることで、植物の様々な光応答を引き起こすと考えられている。しかしながら我々は最近、フィトクロムが、上記の転写量制御に加えて、さらに別の 2,000 を超える遺伝子に直接働きかけそれらの転写開始点を変化させること、そしてこれに伴い 400 以上ものタンパク質の細胞内局在が、様々な細胞内区画の間で、様々な方向に、様々なタイムコースで変化することを発見した (Ushijima et al., *Cell* 2017)。

したがって、これらの多様なタンパク質局在変化パターンを示す標的遺伝子の、プロモーター領域を含む 5 末端断片を、それぞれ異なる任意タンパク質遺伝子のコード領域に付加し、それら全てを1つの細胞に導入することで、シグナル配列以外の余計なドメインを付加することなく、複数タンパク質の細胞内局在を、任意の細胞内区画間で、任意の方向に、任意のタイムコースで、それぞれ自由自在に同時光操作することが可能になると考えられる。

そこで本研究では、現在不明であるフィトクロムによる転写開始点制御の分子機構をモデル植物であるシロイヌナズナにおいて解明し、その制御系を酵母や動物細胞で再構成することで、転写開始点の光操作によって、複数のタグ無しタンパク質の細胞内局在を、それぞれ自由自在に、同時に操る、革新的タンパク質局在制御技術の開発を目指す。そしてそのために、具体的に以下の4つの研究項目の達成を目標とする。

フィトクロムによる転写開始点制御の分子機構解明

転写因子の標的遺伝子への結合様式の解明、フィトクロムによる転写開始点制御に必要な因子の順遺伝学的同定。

フィトクロムによる転写開始点制御の出芽酵母における再構成

上記研究開発項目で同定された構成要素とフィトクロム遺伝子を、標的遺伝子のゲノム DNA 断片と共に、出芽酵母に導入する。

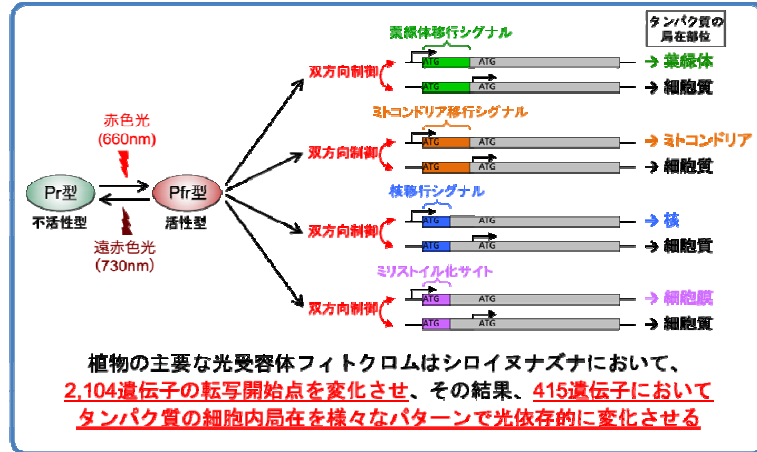
様々なパターンでタンパク質局在変化を示すプロモーターライブラリーの作製

形質転換シロイヌナズナの実験系で、当該制御を受けるのに十分な最短のプロモーター領域を同定する。

再構成系における複数任意タンパク質の細胞内局在の同時光操作

複数のプロモーター最小断片の3末端に、それぞれ異なる蛍光タンパク質遺伝子を付加し、これら全ての断片を、上記の再構成系において1つの出芽酵母ゲノムへ挿入する。

＜最近我々が発見したフィトクロムによるゲノムワイドな転写開始点制御＞



＜本研究のねらい＞

- 1) フィトクロムによる転写開始点制御の分子機構を解明する
- 2) 当該制御系を酵母や動物細胞で再構成する

赤色光/遠赤色光の強度比により転写開始点をアナログ可変的に光操作することで、**複数のタグ無しタンパク質の細胞内局在を、それぞれ自由自在に、同時に操る**革新的タンパク質局在制御技術の開発を目指す。

＜この技術により「何が」可能となるのか？＞

- 1) 数十、数百という数の異なるタンパク質局在変化の同時光操作が可能となる
→具体的には特定細胞内区画における人工代謝経路の設計・操作などが可能となる。
- 2) 付加ドメイン無しでタンパク質局在の光操作が可能となる
→将来的にはゲノム編集技術と組み合わせることで、内在性タンパク質の局在操作が可能となる。
- 3) 個々の標的タンパク質に対する煩雑な最適化作業が不要となる
→標的タンパク質の発現量調整や付加ドメイン位置の検討等、従来必要だった作業が不要となる。
- 4) 任意機能ドメインの付加/除去によるタンパク質機能の光操作も可能となる
→複数タンパク質の局在変化に加えて機能変化も組み合わせた同時光操作が可能となる。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

・フィトクロムによる転写開始点制御系の構成に十分なタンパク質性因子における要素を明らかにするために、当該制御に必要な因子の順遺伝学的・逆遺伝学的同定を進めた。そして逆遺伝学的解析により当該制御に必要な因子として特定の転写因子を同定し、さらにこの転写因子が通常とは異なる特殊な結合様式によって標的遺伝子上に結合していることを明らかにした。また変異体スクリーニングによる順遺伝学的解析により、当該制御に必要な因子の同定を進めた。

・標的遺伝子のプロモーター解析により、タバコ植物を用いた Agrobacterium infiltration 法による一過的発現系において、当該制御に必要なプロモーター上の特定の領域を同定し、また当該制御に十分なプロモーター領域を大幅に狭めることに成功した。そしてそれらの結果を、シロイヌナズナの形質転換植物を用いた安定発現系において確認することに成功した。

・転写開始点選択という現象は、転写・スプライシング・翻訳と並んで、真核生物の遺伝子発現制御における普遍的な一過程であると考えられるため、本研究によりそのユニークな制御機構が解明されれば、生物学一般における極めて重要な成果となる。したがってその知識は、将来的に教科書に記載されるなどして、科学的啓蒙という観点から社会・国民に広く還元されるべきものと考えられる。

3. 研究成果

フィットクロムによる転写開始点制御系を酵母や動物細胞で再構成するためには、まずその分子機構を解明し、当該制御の構成に十分な、タンパク質性因子とDNAシス配列における要素をそれぞれ明らかにする必要がある。そのために我々は、フィットクロムによる転写開始点制御に必要な因子の順遺伝学的・逆遺伝学的同定、および当該制御に必要な十分なプロモーター領域の同定を進めた。そしてその結果、逆遺伝学的解析により、当該制御において中心的な役割を担う転写因子の同定に至った。

また変異体スクリーニングによる順遺伝学的解析では、当該制御に必要な因子の候補を複数得た。一方、標的遺伝子のプロモーター解析では、タバコ植物を用いた *Agrobacterium infiltration* 法による一過的発現系において、当該制御に必要なプロモーター上の特定の領域を同定し、また当該制御に十分なプロモーター領域を大幅に狭めることに成功した。そしてそれらの結果を、シロイヌナズナの形質転換植物を用いた安定発現系において確認することに成功した。

さらに、フィットクロムによる転写開始点制御に必須の因子として同定した特定の転写因子が、通常とは異なるしくみで標的遺伝子のプロモーター領域に結合していることを発見したが、その詳細な分子機構を解明するまでには至らず、当該制御を受けるのに十分なプロモーター最小断片を同定したものの、当該制御の酵母細胞内での再構成を果たすことはできなかった。

4. 今後の展開

本研究で解明される転写開始点制御の分子機構は、真核生物に共通に備わる機構である可能性が高く、したがって本研究で開発する技術は全ての真核生物に応用可能な、極めて汎用性の高い技術として、基礎・応用の両面から様々な場面で活用されると考えられるため、本技術を開発後は、直ちに特許を取得し知的財産を確保する必要がある。

同規模の転写開始点変化によるタンパク局在制御は、植物のフィットクロムシグナルに限らず、真核生物におけるありとあらゆるシグナルによっても引き起こされると考えられる。よって、今後動物でも、様々なシグナルによる同規模のタンパク局在制御が発見されると思われるが、その際、それらの生命現象の解析には、本研究で得られる知識と技術が不可欠となるであろう。

技術的には、プロモーターライブラリーを、1) タンパク質の局在変化のパターン、そしてその変化の 2) 方向と、3) タイムコース、の3点について、さらに選択肢を増やして充実させる必要がある。そのためには、まずはフィットクロムによる制御系において、さらに様々なタイムコースで TSS-seq を行い、より多くの標的遺伝子を同定する必要があるだろう。そして将来的には、それらの何千という数の標的遺伝子を解析することで、転写開始点変化の方向やタイムコースを規定する分子機構も解明されるものと思われる。

本技術がすぐに応用されることが想定される用途の一例として、酵母などにおける人工代謝経路設計による有用物質の効率的な生産などが挙げられる。本技術により、ある代謝経路上の全ての酵素の細胞内局在を、他の任意細胞内区画に一気に変化させることが可能となる。その際、本技術の特徴である、赤色光 / 遠赤色光の強度比によるアナログ可変操作と、個々の遺伝子の total mRNA 量を一定に保ったままの転写開始点制御によって、これまで困難であった内在性代謝経路からバイパス経路への状況に応じた精密な切り換え制御が可能となる。これはあくまでも応用の一例に過ぎず、同様の繊細かつ大胆な光操作は、真核生物におけるありとあらゆる系に応用可能であると考えられる。

5. 発表実績

原著論文

1. Kobayashi H, Murakami K, Sugano SS, Tamura K, Oka Y, Matsushita T, Shimada T. Comprehensive analysis of peptide-coding genes and initial characterization of an LRR-only microprotein in *Marchantia polymorpha*. *Front Plant Sci.* 13: 1051017 (2023)
2. Moriya KC, Shirakawa M, Loue-Manifel J, Matsuda Y, Lu YT, Tamura K, Oka Y, Matsushita T, Hara-Nishimura I, Ingram G, Nishihama R, Goodrich J, Kohchi T, Shimada T. Stomatal regulators are co-opted for seta development in the astomatous liverwort *Marchantia polymorpha*. *Nat Plants* 9: 302-314 (2023)
3. Takeda T, Shirai K, Kim YW, Higuchi-Takeuchi M, Shimizu M, Kondo T, Ushijima T, Matsushita T, Shinozaki K, Hanada K. A de novo gene originating from the mitochondria controls floral transition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 111: 189-203 (2023)
4. Nomoto M, Skelly MJ, Itaya T, Mori T, Suzuki T, Matsushita T, Tokizawa M, Kuwata K, Mori H, Yamamoto YY, Higashiyama T, Tsukagoshi H, Spoel SH, and Tada Y. Suppression of MYC transcription activators by the immune cofactor NPR1 fine-tunes plant immune responses. *Cell Rep.* 37: 110125 (2021)
5. Yagi H, Tamura K, Matsushita T, and Shimada T. Spatiotemporal relationship between auxin dynamics and hydathode development in *Arabidopsis* leaf teeth. *Plant Signal Behav.* 16: 1989216 (2021)
6. Yagi H, Nagano AJ, Kim J, Tamura K, Mochizuki N, Nagatani A, Matsushita T, and Shimada T. Fluorescent protein-based imaging and tissue-specific RNA-seq analysis of *Arabidopsis* hydathodes. *J. Exp. Bot.* 72: 1260-1270 (2021)

招待講演

1. Matsushita T “Phytochrome regulates alternative promoter selection in *Arabidopsis*”
International Conference of the Genetics Society of Korea 2022 (Jeju, South Korea, October 2022)
2. 松下智直 「植物の光受容体フィトクロムによる遺伝子発現の多段階制御機構」
DIC 総合研究所セミナー (佐倉、2022年5月)
3. 松下智直 「植物の不均一環境変動への適応を支える転写開始点制御機構」
植物科学シンポジウム 2021 (東京、2021年11月)
4. 松下智直 「植物が光を感じる秘密」
特別展「植物」オンライン講演会 特別講演 (東京、2021年7月)