

〈一般研究課題〉 植物のエピジェネティックな転写制御因子

PFP標的遺伝子の網羅的探索

助成研究者 名古屋市立大学 横山 悠理



植物のエピジェネティックな転写制御因子 PFP標的遺伝子の網羅的探索

横山 悠理
(名古屋市立大学)

Comprehensive analysis of genes whose expression is under
the control of the plant-epigenetic transcription factor PFP

Yuri Yokoyama
(Nagoya City University)

Abstract :

PHD finger domain-containing proteins are widely conserved in eukaryotes and play crucial roles in epigenetic transcriptional regulation through chromatin remodeling. In plants, these proteins are implicated in various physiological processes including flower development and gametogenesis. In this study, we focused on a PHD finger protein in *Arabidopsis thaliana*, designated as PFP (PHD Finger Protein), which is a homolog of *Schizosaccharomyces pombe* Mlo2 and is known to enhance the expression of the floral repressor FLC, thereby inhibiting floral initiation. However, the precise molecular mechanisms underlying FLC regulation by PFP and its potential functions beyond flowering remain unclear. To investigate the physiological roles of PFP, we conducted transcriptome-wide RNA-seq analyses using PFP-overexpressing and knockdown lines. The results revealed that altered PFP expression affects a broad range of genes involved in transcription regulation, metabolism, and stress responses. Notably, the *QQS* gene, which is associated with starch metabolism and stress responses, was significantly influenced across multiple tissues. These findings suggest that PFP not only regulates flowering but also plays a key role in stress-responsive transcriptional networks in *Arabidopsis*.

1. はじめに

植物におけるエピジェネティックな遺伝子制御は、その発生過程や環境応答において重要な役割を果たし、後胚発生段階での表現型の可塑性および多様な環境刺激への適応能力に寄与している[1]。シロイヌナズナでは、これまでに130以上のエピジェネティック制御因子が同定されているものの、その作用機構は未だ完全には解明されていない。

近年、分裂酵母において植物ホメオドメイン (PHD) フィンガーを含むタンパク質、すなわち Mlo2 が同定された。Mlo2 の過剰発現は染色体分裂を阻害することが示唆され[2]、またそのヒトホモログである hUBR7 がヒストン H3 に結合することから、クロマチン制御への関与が予想される[3]。PHD 型亜鉛フィンガードメインは、ヒストン H3 タンパク質サブユニットのリジン 4 トリメチル化 (H3K4me3) を認識し、クロマチン構造を介した転写制御に寄与する[4,5]。これらの知見を背景に、シロイヌナズナのシーケンスデータベースからそのホモログを同定し、本研究ではこれを PHD フィンガードメイン含有タンパク質 (PFP) と命名した。これまでの我々の研究により、PFP はヒストン媒介性の転写制御を通じて FLC の発現を促進し、その結果として花芽形成を抑制する役割を有することを明らかにしている[6]。しかし、PFP による FLC 発現制御の分子機構は依然として未解明であり、また PFP は根や未熟種子における局在など、花芽形成制御以外の生理機能にも関与している可能性がある。そこで本研究では、PFP の発現を人工的に変動させた過剰発現系統および抑制系統を用いて RNA-seq 解析を行い、PFP による標的遺伝子の網羅的探索とその機能的意義の解明を試みるものである。

2. 試料および実験方法

2.1 シロイヌナズナ生育条件及びサンプル

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*、エコタイプ *Columbia-0*) の種子を殺菌液 (1% 次亜塩素酸ナトリウム, 0.2% Tween20) で 10 分間表面殺菌し、MS 培地[7]上で 4℃ にて発芽させた。発芽した実生を 23℃、長日条件下 (16 時間明期/8 時間暗期、光強度 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で本葉 6 枚が展開するまで生育させた。また、蕾及び長角果の採取には、発芽後 7 日目の実生を土壤に移植し、上記の長日条件下で生育を継続した。サンプルには、シロイヌナズナの野生型、PFP 過剰発現系統、PFP 発現抑制系統の 3 系統を用いた。対象とする組織は、本葉 6 枚が展開している時期の植物体における基部及び根、Smyth らにより定義される花器官発達ステージ 11 未満を集めた蕾[8]、Kleindt らにより定義されるステージ 3 前後の長角果[9]を用いた。

2.2 RNA 抽出と品質評価

RNA 抽出には、シロイヌナズナの野生型、PFP 過剰発現系統、PFP 発現抑制系統の 3 系統を用いた。対象とする組織は、本葉 6 枚が展開している時期の植物体における基部及び根、花器官発達ステージ 11 未満を集めた蕾、ステージ 3 前後の長角果とした。各組織から十分な RNA 量を回収するため、同一条件下で生育した 10 個体以上のシロイヌナズナを使用して、ISOSPIN Plant RNA kit (NIPPON GENE) を用いて Total-RNA を抽出した。抽出後、RNA 6000 Pico Kit (Agilent) を使用し、2100 Bioanalyzer (Agilent) による RNA の品質および濃度を評価した。RNA Integrity Number (RIN) の計測を行い、RIN ≥ 5.8 以上、RNA 濃度 $\geq 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ のサンプルを使用した。

2.3 RNA-Seq解析及びバイオインフォマティクス解析

RNAサンプルはNovogene (Novogene, Co. Ltd.) に受託解析を依頼し、ライブラリ作成及びNovaSeq Xによる約6Gbのシーケンス解析、得られたシーケンスデータからの基礎的なバイオインフォマティクス解析について実施した。さらに、詳細な解析について、NovoMagic (Novogene, Co. Ltd.)を使用して、差次的発現解析、GO enrichment 解析を行った。また、ggVolcanoR (Mullan et al. 2021) を使用して、Volcano plots及びCorrelation plotsの描画を行った。

3. 実験結果

3.1 差次的遺伝子発現解析

PFPの標的遺伝子を網羅的に同定するため、*Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) の野生型 (Columbia-0) と、PFP過剰発現系統 (PFP-OX)、PFP発現抑制系統 (PFP-KD) の3系統を用いてRNA-seq解析を実施した。さらに、PFPが組織特異的に異なる制御機構を介して作用する可能性を考慮し、4種の組織(栄養成長から生殖成長へと転換する時期(本葉6枚展開期)の基部および根、Smythらにより定義された花器官発達ステージ11未満の蕾[8]、Kleindt らにより定義される球状胚が形成される長角果(ステージ3前後)[9])を対象とした。これらの組織からRNAを抽出し、RNA-seqによる網羅的な発現解析を行った。得られたデータに基づき、各組織における野生型とPFP変異系統との間での遺伝子発現レベルを比較し、差次的発現遺伝子 (DEGs) を抽出した。統計的有意性の基準として、 $p\text{-value} \leq 0.05$ および $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1.0$ を用い、Volcano plotにより視覚化した(図1)。その結果、全約25,000遺伝子のうち、本葉6枚展開期の基部では、PFP-KDにおいて764遺伝子が発現低下し、1208遺伝子が発現上昇していた(図1A)。PFP-OXでは582遺伝子が発現低下し、639遺伝子が発現上昇していた(図1B)。これらのDEGsには、RNAポリメラーゼIIを介

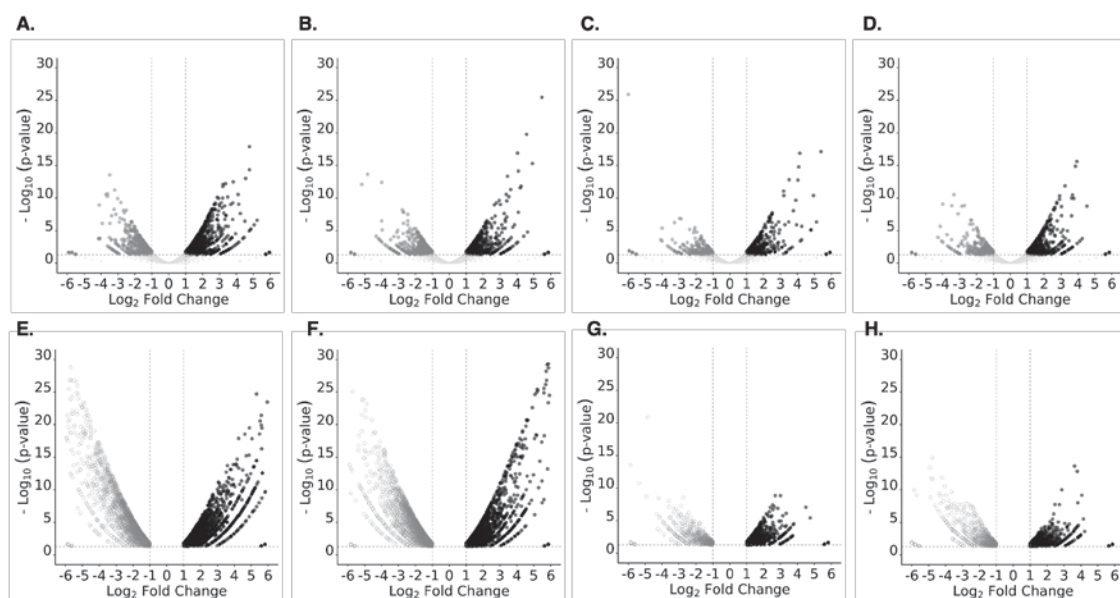


図1. 各組織におけるPFP発現変動系統(PFP-KDおよびPFP-OX)における差次的遺伝子発現解析(DEG)結果をVolcano plotにより示した。有意な発現変動を示す遺伝子の抽出には、 $p\text{-value} \leq 0.05$ かつ $|\log_2 \text{FC}| \geq 1.0$ の基準を用いた。有意な発現上昇遺伝子は黒、発現低下遺伝子は濃い灰色で示している。A.本葉6枚展開期の基部(PFP-KD vs WT)、B.本葉6枚展開期の基部(PFP-OX vs WT)、C.本葉6枚展開期の根(PFP-KD vs WT)D.本葉6枚展開期の根(PFP-OX vs WT)、E.ステージ3前後の長角果(PFP-KD vs WT)、F.ステージ3前後の長角果(PFP-OX vs WT)、G. 蕾(発達ステージ11未満、PFP-KD vs WT)、H. 蕾(発達ステージ11未満、PFP-OX vs WT)

した転写制御、酸化還元酵素活性、鉄イオンやヘム結合に関与する代謝およびシグナル伝達経路、さらには酸化ストレス応答や低酸素応答に関係するGOカテゴリが多く含まれていた。同様に、本葉6枚展開期の根においては、PFP-KDで329遺伝子が発現低下して524遺伝子が発現上昇し(図1C)、PFP-OXでは350遺伝子が発現低下して572遺伝子が発現上昇していた(図1D)。根で発現が変動した遺伝子群には、多糖結合因子、細胞膜構成因子、細胞外マトリックス関連遺伝子、さらに活性酸素種(ROS)代謝、過酸化水素応答、低酸素ストレス、熱ストレス応答に関連するGOが多く含まれていた。一方、長角果(ステージ3前後)では、PFP-KDにおいて4952遺伝子が発現低下し、2664遺伝子が発現上昇していた(図1E)。PFP-OXでは4023遺伝子が発現低下し、2301遺伝子が発現上昇していた(図1F)。この組織では、細胞分裂、DNA複製、微小管形成、二次代謝、器官の形態形成に関与する遺伝子群が多く変動しており、特にG2/M期の進行促進、細胞骨格の活性化、DNA損傷修復機構に関わる遺伝子が顕著に検出された。ただし、検出された遺伝子数が非常に多いことから、サンプル組織の均質性や解析手法の再検討が必要である可能性が示唆された。最後に、花器官発達ステージ11未満の蕾においては、PFP-KDで804遺伝子が発現低下して922遺伝子が発現上昇し(図1G)、PFP-OXでは959遺伝子が発現低下して914遺伝子が発現上昇していた(図1H)。蕾では、生殖発達の制御、環境ストレス応答(免疫・防御反応)、細胞壁形成、代謝調節に関連するGOカテゴリの遺伝子が多く検出された。

3.2 相関解析

前節の差次的発現解析において、各組織で多数の遺伝子がPFPの発現変動に伴い発現量を変化させることが明らかとなった。そこで、各組織においてPFP過剰発現系統(PFP-OX)および発現抑制系統(PFP-KD)と野生型(WT)との比較解析結果をもとに、発現変動の傾向を評価する相関解析(correlation plots)を実施した(図2)。本解析により、PFPの発現変動に対して逆方向の発現変動(逆相関)を示す遺伝子を抽出し、PFPにより強く制御されている可能性のある標的遺伝子群を同定した。その結果、本葉6枚展開期の基部では23個、根では20個、長角果では684個、蕾では10個の遺伝子の発現が逆相関関係にあることが明らかとなった。これらの遺伝子は、PFPの直接的な標的またはPFPと協調して発現制御を受ける下流因子である可能性がある。さらに、これら逆相関遺伝子群の中で複数の組織に共通して発現変動が確認された遺伝子として*QQS*(Qua-Quine Starch)が同定された。*QQS*は、デンプン代謝およびストレス応答に関与することが報告されており[10,11]、PFPの機能との関連が示唆される。また、特定の組織では、PDF(Plant Defensin)ファミリーに属する複数の遺伝子(PDF1.2, PDF1.2b, PDF1.2c)が顕著な発現変動を示していた。これらは、ジャスモン酸によるシグナル伝達経路を介した病害抵抗性に関与することが知られている。以上の結果は、PFPが病害応答やストレス応答に関わる転写制御ネットワークの一部として機能している可能性を示唆しており、PFPが植物の環境応答制御において重要な役割を果たしていることが期待される。

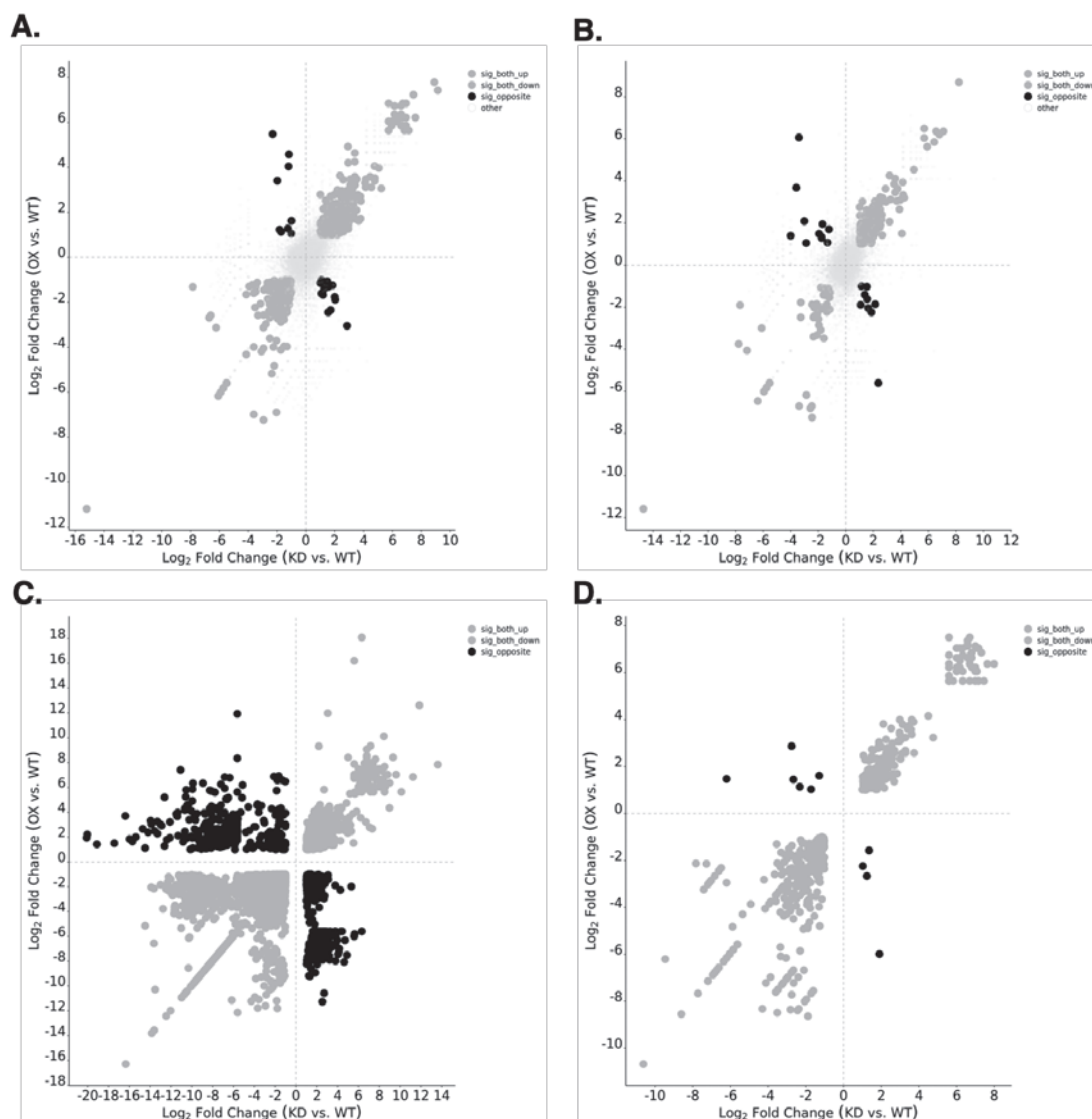


図2. 相関解析により各組織におけるPFP 発現抑制系統とPFP過剰発現系統の遺伝子発現変動が逆相関示す遺伝子群を Correlation plotにより示した。有意な発現変動を示す遺伝子の抽出には、 $p\text{-value} \leq 0.05$ かつ $|\log_2FC| \geq 1.0$ の基準を用いた。A.本葉6枚展開期の基部、B.本葉6枚展開期の根、C.ステージ3前後の長角果、D.発達ステージ11未満の蕾

4. まとめ

本研究におけるRNA-seq解析の結果、PFPの発現変動が多岐にわたる遺伝子の転写動態に影響を及ぼすことが明らかとなった。特に、転写制御因子、代謝関連遺伝子、細胞外マトリックス構成因子、環境ストレス応答因子など、複数の生物学的プロセスに関与する遺伝子群において顕著な発現変動が認められた。一方で、従来PFPの機能と関連が示唆されていた開花制御関連遺伝子の多くには顕著な変動は確認されなかったものの、発育関連の転写因子や細胞間シグナル伝達に関与する遺伝子群の発現変動が観察され、これらが下流で花成や開花時期に影響を及ぼす可能性が示唆された。さらに、基部および根領域において、酸化ストレス、低酸素応答、熱ストレス、毒性応答に関連する遺伝子の発現変動が検出されたことから、PFPが環境変動に対する適応応答機構にも関与している可能性が示された。とりわけ、全組織で共通して発現変動を示した遺伝子としてQQSが同定され、PFPが糖代謝やストレス応答経路を介して植物の環境応答に広く関与している可能性が示された。現在、これらの知見を基盤として、PFPが制御するストレス応答経路に関与する

遺伝子群の機能解明を目的とした遺伝子組換え植物の作出を進めている。今後は、これらの遺伝子組み換え植物を用いた詳細な機能解析や形態学的評価を通じて、PFPの生物学的役割およびその分子機構のさらなる解明を目指す。

参考文献

- [1] Pikaard, C. S., & Scheid, O. M. (2014). Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(12), a019315.
- [2] Javerzat, J. P., Cranston, G., & Allshire, R. C. (1996). Fission yeast genes which disrupt mitotic chromosome segregation when overexpressed. *Nucleic acids research*, 24(23), 4676-4683.
- [3] Ji, X., Dadon, D. B., Abraham, B. J., Lee, T. I., Jaenisch, R., Bradner, J. E., & Young, R. A. (2015). Chromatin proteomic profiling reveals novel proteins associated with histone-marked genomic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(12), 3841-3846.
- [4] Aasland, R., Gibson, T. J., & Stewart, A. F. (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends in biochemical sciences*, 20(2), 56-59.
- [5] Sanchez, R., & Zhou, M. M. (2011). The PHD finger: a versatile epigenome reader. *Trends in biochemical sciences*, 36(7), 364-372.
- [6] Yokoyama, Y., Kobayashi, S., & Kidou, S. I. (2019). PHD type zinc finger protein PFP represses flowering by modulating FLC expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 88, 49-59.
- [7] Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3).
- [8] Smyth, D. R., Bowman, J. L., & Meyerowitz, E. M. (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2(8), 755-767.
- [9] Kleindt, C. K., Stracke, R., Mehrrens, F., & Weisshaar, B. (2010). Expression analysis of flavonoid biosynthesis genes during *Arabidopsis thaliana* silique and seed development with a primary focus on the proanthocyanidin biosynthetic pathway. *BMC research notes*, 3, 1-12.
- [10] Li, L., Foster, C. M., Gan, Q., Nettleton, D., James, M. G., Myers, A. M., & Wurtele, E. S. (2009). Identification of the novel protein QQS as a component of the starch metabolic network in *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*, 58(3), 485-498.
- [11] Qi, M., Zheng, W., Zhao, X., Hohenstein, J. D., Kandel, Y., O'Conner, S., ... & Li, L. (2019). QQS orphan gene and its interactor NF - YC 4 reduce susceptibility to pathogens and pests. *Plant biotechnology journal*, 17(1), 252-263.