

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成26年度博士課程進学
氏名 吉田 悠里
指導教員名 野尻秀昭

論文題目 イネの根における JA 誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン生産制御機構に関する研究

ファイトアレキシンは、植物が病原体などの感染を受けると生産される抗菌性の二次代謝化合物であり、イネにおいては、これまでに 17 種類のファイトアレキシンが同定されている。フラボノイド型のサクラネチンを除き、残りの 16 種は全て環状ジテルペン型の構造を持つが、その中でも momilactone および phytocassanes が主要なジテルペン型ファイトアレキシン(DP)として知られる。これらの生合成遺伝子はイネ染色体上においてそれぞれ遺伝子クラスターを形成し、ストレスに応答して一過的な発現誘導を示す。キチンエリクター応答性 bZIP 型転写因子 OsTGAP1 は、momilactone および phytocassanes の各生合成遺伝子クラスターおよび生合成上流に位置するメチルエリスリトールリン酸(MEP)経路遺伝子の転写制御に関与し、DP 生産を誘導する転写因子としてイネの培養細胞で同定された。先行研究における ChIP-seq 解析により、MEP 経路で働く *OsDXS3* 遺伝子上流域に結合が見出される一方で、クラスター内の生合成遺伝子については、多くの遺伝子上流域で明白な結合が認められなかったことから、OsTGAP1 による DP 生産制御機構の解明には、その他の関連因子の探索を含む、より詳細な解析が必要とされた。また、先行研究ではイネ培養細胞を用いた解析が行われていたため、植物体における OsTGAP1 の生理機能や組織特異的あるいは誘導時特異的な制御の実態を明らかにする必要があると考えられた。

そこで、本研究においては、OsTGAP1 による DP 生産における転写制御機構の解明を目的として、野生型株および OsTGAP1 の発現が増強あるいは抑制されたイネ植物体の表現型を解析するとともに、クロマチン免疫沈降法

(ChIP)により、植物体における OsTGAP1 の標的遺伝子プロモーターへの結合性について検討を行った。さらに、OsTGAP1 とその相互作用因子による DP 生産制御への関与についても検討した。

イネ植物体での DP 生産制御における OsTGAP1 の機能

DP 生産での OsTGAP1 の重要性を検討するため、野生型株を用いて遺伝子発現解析、DP 蓄積量の定量解析を行った。その結果、OsTGAP1 は根で恒常的に高い発現レベルを維持しており、ジャスモン酸(JA)処理による根特異的な発現誘導を示した。この結果を支持するように、DP 生合成遺伝子(*OsDXS3*, *OsKSL4*, *OsKSL7*)の発現量および DP の蓄積は、JA 処理により根でのみ増加した。これらの結果は、OsTGAP1 がイネの根における DP の生産誘導の制御に関与することを示唆する。そこで、OsTGAP1 の発現量が変化した *ostgap1 tos17* 挿入変異体および過剰発現体を用いてさらに解析を行ったところ、*OsTGAP1* のノックダウンおよび過剰発現が *OsDXS3*, *OsKSL4*, *OsKSL7* の発現量および DP 蓄積量に対し、それぞれ抑制的あるいは誘導的な影響を示すことを明らかにした。

次に、OsTGAP1 による遺伝子のプロモーター領域への結合を介した直接的な転写制御の可能性を検討するため、OsTGAP1 をエフェクターとしてこれらの生合成遺伝子の TGACGT-sequence(OsTGAP1 結合配列)を含むプロモーター領域に対するレポーター遺伝子アッセイを行った。*OsDXS3* プロモーターについては、TGACGT-sequence 依存的に転写を活性化することが示された。一方でクラスター内の遺伝子については *OsKSL4* プロモーターについては OsTGAP1 による明瞭な転写活性が観察されたが、*OsKSL7* プロモーターについては強い影響が認められなかった。以上の結果から OsTGAP1 はイネの根における DP 生産において、*OsDXS3* および *OsKSL4* の転写を直接制御することで特に momilactone の生産に関与することが示唆された。

さらに、OsTGAP1 による直接的な転写制御の実態を明らかにするため、JA 処理有無の条件下での、根における OsTGAP1 の *OsKSL4* プロモーターに対する結合を、OsTGAP1 特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降によって検討した。その結果、JA 未処理の定常時において、恒常的な OsTGAP1 の結合が認められたが、JA 処理による結合性の変化は認められなかった。

野生型株において JA 処理により *OsKSL4* の発現が顕著に誘導されることを考えると、クラスター遺伝子の発現誘導には OsTGAP1 の結合以外に OsTGAP1 の翻訳後修飾や OsTGAP1 と相互作用するタンパク質などの他の因子が関与していると予想される。

植物体の根における OsTGAP1 によるモミラクソン生産制御の生理的意義

OsTGAP1 による根での momilactone 生産制御の生理的意義を明らかにするため、イヌビエとの混植実験によるアレロパシー活性試験を行い *OsTGAP1* の発現量の変化がイネのアレロパシー活性に及ぼす影響を解析した。その結果、*ostgap1 tos17* 挿入変異体と混植したイヌビエでは野生型と混植した場合と比較して生育阻害効果の抑制がみられ、対照的に OsTGAP1 過剰発現体と混植した場合には生育阻害効果の亢進を確認した。以上の結果から、OsTGAP1 はイネの根において JA 誘導的に機能し、momilactone 生産を制御することでイネのアレロパシー活性に寄与することが示された。

根における OsTGAP1 の生理的役割をさらに追究するため、JA 未処理時もしくは処理 24 時間における

ostgap1 tos17 挿入変異体と野生型株の根を用いた RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行い *OstGAP1* の下流標的遺伝子を探索した。その結果、野生型株で JA 誘導性を示した遺伝子のうち、*OstGAP1* 依存的に JA による発現誘導が抑制される遺伝子の中には、MYB 型、bZIP 型、Homeobox タンパク質などの制御因子や、シクロロム P450 やフェニルアラニン合成に関与する酵素などの二次代謝産物合成に関わる遺伝子が含まれていた。*OstGAP1* による DP 生合成遺伝子の転写制御はこれらの転写因子との協調的もしくは拮抗的な作用が存在している可能性や、DP 以外のアレロパシー化合物の根における生産も *OstGAP1* の制御下にある可能性が考えられる。

OstGAP1 とその相互作用因子(*OstTIF*)による DP 生合成遺伝子の発現制御

OstGAP1 による DP 生合成遺伝子のクラスターレベルでの転写制御メカニズムを明らかにするため、相互作用因子の機能解析を足掛かりとして、相互作用因子との協調作用を検討した。先行研究において yeast two-hybrid 法により *OstGAP1* の相互作用因子(*OstGAP1*-interacting Factor: *OstTIF*)として 10 種の候補遺伝子が得られている。このうち、これまでに転写制御に関与する可能性が示唆されている遺伝子 *OstTIF1*(ENT-domain タンパク質)、*OstTIF3*(serine/threonine kinase)、*OstTIF4*(Kinesin heavy chain)を解析対象として選抜した。まず BiFC (Bimolecular fluorescence complementation)法により植物細胞内での *OstGAP1* と各 *OstTIF* との相互作用を確認した。次に、*OstTIF* 単独もしくは *OstGAP1* との共導入において *OsDXS3*、*OsKSL4* および *OsKSL7* のプロモーター活性に対する影響を解析した。その結果、全ての *OstTIF* が単独で *OsDXS3*、*OsKSL4* プロモーターにおけるレポーター活性を上昇させることが示された。また、*OstTIF3* については *OstGAP1* との共導入により、*OsDXS3*、*OsKSL4* プロモーターの *OstGAP1* による転写活性化を亢進することが示された。

次に、*OstTIF* による遺伝子プロモーター活性への影響が、*OsKSL4* プロモーターへの *OstGAP1* の結合性の変化に起因する可能性を検討するため、イネプロトプラストー過剰発現系を用いて *OstTIF* および *OstTIF/OstGAP1* 過剰発現細胞における *OstGAP1* の結合を ChIP アッセイにより解析した。その結果、いずれの *OstTIF/OstGAP1* 過剰発現時においても *OstGAP1* の結合性に変化はみられなかった。このことから *OstTIF* と *OstGAP1* の相互作用による DP 生産制御には *OstGAP1* の結合性以外の要因の存在が考えられるため、ヒストン修飾や翻訳後修飾による活性状態の変化についても検討する必要がある。

総括

本研究では、イネの bZIP 型転写因子 *OstGAP1* の植物体における機能解析を行い、*OstGAP1* が根特異的に JA 誘導性の DP 生合成を制御する転写因子であることを示し、特に momilacton e 生産を制御することでイネのアレロパシー活性において重要な役割を担うことを示した。また、*OstGAP1* が *OsKSL4* プロモーター活性を促進すること、根においてプロモーター領域に恒常的に結合していることを明らかにした。さらに、*OstGAP1* とその相互作用因子が *OsDXS3*、*OsKSL4*、*OsKSL7* のレポーター活性に影響を与えることを示した。一方で、*OstTIF* によるこれらの遺伝子プロモーター活性への影響は、*OstGAP1* の結合性の変化によるものでないことが ChIP アッセイによって示された。最近の研究で DP 生産に関与すると考えられる転写因子がいくつか報告されており、*OstGAP1* とこれらの

転写因子の関係性についても解析を進める必要があると考えられる。今後はこれらの転写因子および OsTF の詳細な機能解析を進めるとともに、ChIP-seq による生合成遺伝子プロモーターのヒストン修飾状況などクロマチンレベルの網羅的解析を行うことで、クラスター生合成遺伝子の転写制御機構を解明する足掛かりになると考えられる。

発表論文

Yoshida, Y., Miyamoto, K., Yamane, H., Nishizawa, Y., Minami, E., Nojiri, H., Okada, K.:

OsTGAP1 is responsible for JA-inducible diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice roots with biological impacts on allelopathic interaction. ***Physiologia Plantarum*** (2017) Vol. 161, No.4 , pp. 532-544