



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	AtALMT1のアルミニウム誘導を制御する転写因子STOP1内部の調節領域に関する研究(内容と審査の要旨(Summary))
Author(s)	伊藤, 弘樹
Report No.(Doctoral Degree)	博士(農学) 甲第718号
Issue Date	2019-06-30
Type	博士論文
Version	none
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/78512

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏 名 (本国籍)	伊 藤 弘 樹 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第718号
学 位 授 与 年 月 日	令和元年6月30日
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	<i>AtALMT1</i> のアルミニウム誘導を制御する転写因子 STOP1 内部の調節領域に関する研究
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 山 本 義 治 副査 岐阜大学 教授 小 山 博 之 副査 静岡大学 准教授 一 家 崇 志

論 文 の 内 容 の 要 旨

STOP1 (SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1) はシロイヌナズナから見出された転写因子で、酸耐性とともアルミニウム耐性遺伝子群を転写制御する。シロイヌナズナの場合、その被制御遺伝子には *AtALMT1* リンゴ酸輸送体などのアルミニウム耐性遺伝子が含まれる。本研究では、このシステムの転写活性化機構に関して、STOP1 自身のタンパク構造と被制御遺伝子の転写活性化の関係の一端を、分子生物学的な解析を組み合わせることで解析し考察を加えた。

1. *In planta* 相補試験などによる被制御遺伝子相補の不完全性

シロイヌナズナ STOP1 は、シロイヌナズナのアルミニウム耐性に必須な *AtALMT1* を転写制御する。この制御は、過剰発現体を用いたトランスクリプトーム解析から、*AtALMT1* を含む他の遺伝子群とともに、STOP1 タンパク量に依存することを突き止めた。この、STOP1 様タンパク質は陸上植物に維持され、DNA 結合部位である C2H2 タイプのジンクフィンガー領域は高度に保存されている。しかし、シロイヌナズナ *stop1* を宿主とする *in planta* 相補試験では、ヒメツリガネゴケ以外のタンパクは *AtALMT1* の転写を活性化せず Al 耐性を回復しない反面、低 pH 耐性は相補することが分かった。この不完全な相補は、タンパク内部に Al シグナル応答機構を持つためと考えられた。

2. 比較トランスクリプトーム解析による STOP1 被制御系の植物種間比較

異種由来 STOP1 の不完全相補の原因は、被制御遺伝子の違いにより説明される可能性がある。これを否定するために、タバコの *STOP1-RNAi* 組換え体と、シロイヌナズナ及びイネの STOP1 様タンパク質変異体のトランスクリプトームを比較した。アジレント社の 44k アレイにより *NtSTOP1-RNAi* で、アルミニウム応答性を喪失した凡そ 100 遺伝子を同定した。それら

を, MapMan データベースによるアノテーション情報などからシロイヌナズナ相同遺伝子に変換後比較解析したところ, シロイヌナズナではイネ及びタバコの被制御遺伝子の欠落があることなどの違いが明らかになる反面, 基本的な被制御遺伝子は種間で保持されることがわかった。さらに, *AtALMT1* プロモーターには, 相補能力がない *NtSTOP1* も強固に結合することから, 不完全相補は *STOP1* タンパク構造の違いに起因すると考えることが妥当であると結論した。

3. 改変 *STOP1* 相補組換えによる Al シグナル認識構造の推定

NtSTOP1 と *STOP1* のキメラタンパク質を発現する相補組換え体の解析から, N 端中央部に位置する Helix-turn-Helix 構造と, C 端側のタンパク質相互作用を持つと推定される領域が *AtALMT1* 転写活性化能力に必要であることが分かった。これらの領域の必須性は, 部分欠損タンパクの相補組換えからも支持された。その一方で, *AtALMT1* の転写制御能力を欠落させても, 低 pH 耐性とそれに依存する hypoxia 耐性を維持することが分かった。この多面発現の制御能力は, *NtSTOP1*-RNAi が hypoxia 耐性を喪失する事実と矛盾せず, *STOP1* が低 pH 及び hypoxia 耐性を制御するコアに, Al 応答部位を獲得・進化させていることを示唆するものである。

以上, 本研究では *STOP1* 転写因子が植物の陸上適応で必須であることや, その陸上進出過程でアルミニウム耐性遺伝子の制御能力を獲得した可能性が高いことなど, 農学上の有用形質の分子進化モデルを提供するものである。

審査結果の要旨

申請者 伊藤弘樹は *STOP1* 転写因子のタンパク内構造に, 複数の制御構造があることの一端を, タンパク進化, 比較トランスクリプトーム, 多面発現解析などの実験から見出しその考察を深めた。マスタースイッチとよばれる転写因子は, 自身の構造と制御遺伝子を共に保存し, さらに様々なストレスに応答する局面では, 他の制御系とクロストークする。*STOP1* は, *in vivo* 相補実験などから, タンパク内部に複数のストレス応答を担う領域を持つことが予測されていたが, これに対して比較アレイ, 多面発現解析, プロモーターとの結合実験などを実施して, その一端を明らかにした。植物種を超えて基本的に保存される *STOP1* は, 低酸素耐性に対応する転写因子としての基本構造に, アルミニウム耐性遺伝子制御部位を付加したものであると考察した。審査委員会は, 上記の内容が学術的に充分であることを確認した。

基礎となる学術論文

- 1) 伊藤 弘樹, 小林 安文, 小林 佑理子, 小山 博之: シロイヌナズナ *STOP1* 遺伝子過剰発現組換え体のトランスクリプトーム解析, *無菌生物*, 44, 142-146, 2014
- 2) Hiroki Ito, Yuriko Kobayashi, Yoshiharu Y. Yamamoto & Hiroyuki Koyama (2019) Characterization of *NtSTOP1*-regulating genes in tobacco under aluminum stress, *Soil Science and Plant Nutrition*, DOI: 10.1080/00380768.2019.1603064

既発表論文

- 1) Yoshinao Ohyama, **Hiroki Ito**, Yuriko Kobayashi, Takashi Ikka, Akio Morita, Masatomo Kobayashi, Ryujiro Imaizumi, Toshio Aoki, Kenji Komatsu, Yoichi Sakata, Satoshi Iuchi, and Hiroyuki Koyama, Characterization of *AtSTOP1* Orthologous Genes in Tobacco and Other Plant Species, *Plant Physiology*, 162, 1937–1946, 2013
- 2) Yuriko Kobayashi, Yoshinao Ohyama, Yasufumi Kobayashi, **Hiroki Ito**, Satoshi Iuchi, Miki Fujita, Cheng-ri Zhao, Tazib Tanveer, Markkandan Ganesan, Masatomo Kobayashi, and Hiroyuki Koyama, STOP2 Activates Transcription of Several Genes for Al- and Low pH-Tolerance that Are Regulated by STOP1 in *Arabidopsis*, *Molecular Plant*, 7, 311-322, 2014
- 3) Liujie Wu, Ayan Sadhukhan, Yuriko Kobayashi, Naohisa Ogo, Mutsutomo Tokizawa, Raj Kishan Agrahari, **Hiroki Ito**, Satoshi Iuchi, Masatomo Kobayashi, Akira Asai, Hiroyuki Koyama, Involvement of phosphatidylinositol metabolism in aluminum-induced malate secretion in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, in press 2019
doi:10.1093/jxb/erz179
- 4) Takuo Enomoto, Mutsutomo Tokizawa, Hiroki Ito, Satoshi Iuchi, Masatomo Kobayashi, Yoshiharu Y Yamamoto, Yuriko Kobayashi, Hiroyuki Koyama, STOP1 regulates the expression of HsfA2 and GDHs that are critical for low-oxygen tolerance in *Arabidopsis*, *Journal of Experimental Botany*, , erz124,
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz124>