

Genome-wide Studies on Structure of Arabidopsis Promoters and Application to a Promoter of Aluminum-activated Malate Transporter 1

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2018-08-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 時澤, 睦朋 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/56222

氏 名 (本 国 籍)	時澤 睦朋 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 6 7 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 9 年 3 月 1 3 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	Genome-wide Studies on Structure of Arabidopsis Promoters and Application to a Promoter of <i>Aluminum-activated Malate Transporter 1</i> (ゲノム科学的手法によるシロイヌナズナプロモーター構造理解と酸性土壌適応に関わる <i>ALMT1</i> 遺伝子プロモーターへの適用)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 小 山 博 之 副査 岐阜大学 教授 山 本 義 治 副査 静岡大学 教授 森 田 明 雄

論 文 の 内 容 の 要 旨

植物は、同じ場所に定着しながら、生活環を完結させる必要がある。このことは、移動によりストレスを回避できる動物の場合と比べて、相対的に大きく変化する環境に適応する能力を持つことが必要であることを意味する。また、動物のような循環器系を持たない特徴から、細胞・組織レベルでの応答反応により適応することが重要な意味を持つ。このような背景から、植物は動物に比較して転写全体（トランスクリプトーム）を大きく変化させる特徴を持っている。その仕組みを理解することは、植物環境抵抗性獲得機構を分子レベルで解明することに繋がり、それを活用した画期的な品種改良戦略の構築することにも可能である。このような背景から、モデル植物シロイヌナズナでゲノムワイドなプロモーター構造の解析と、重要遺伝子のプロモーター解析に関する研究に取り組んだ研究である。

1) モデル植物シロイヌナズナの転写開始点の大規模解析によるゲノムワイドなプロモーター構造の解明

mRNA の合成反応である転写は、ゲノム DNA 上で 5' 方向に位置するプロモーターが、様々な転写(制御)因子との結合により、時間やストレス特異性、さらには強度が決定される反応である。従って、プロモーターの構造を理解することは、転写制御配列の決定や、転写制御の進化の解明などから極めて重要であるが、そのためにはゲノムワイドに、個々の遺伝子のプロモーター領域を決定することが重要である。この項目では、

①SAGE法と次世代シーケンサ解析によりCAP構造を持つ転写産物の大規模解析を実施して、異なる組織から単離した転写産物の転写開始点を20万以上の情報を獲得したこと、それに対して、②生物情報学解析を実施して転写開始点の使い分けが複数のTATAに対応することやCoding領域の内部からの転写や遺伝子モデルにリンクしないゲノム領域での転写が頻繁に生じていることを見出したこと、さらには、③プロモーター構造の進化や転写位置改編の生物学的意義に関する議論など、データの有用性と活用例を提示している。

2)アルミニウム耐性に必須な *AtALMT1* プロモーター構造・機能の解明

転写開始点情報の整備などにより飛躍的な進歩を遂げるプロモーターに関わる植物科学では、環境抵抗性で重要な役割を持つ遺伝子の転写制御を理解することが、主要な研究課題となっている。このような背景から、1)の取り組みに加えて、植物の重要な環境抵抗性遺伝子である酸性土壌耐性遺伝子の転写制御系を、プロモーターバイオインフォマティクスに基づく分子生理学実験により解明した。対象とした、*AtALMT1*（アルミニウム活性化型リンゴ酸トランスポーター遺伝子）は、酸性土壌耐性に必須のタンパクをコードし、典型的な複雑な転写制御を受ける遺伝子である。上述の、プロモーターバイオインフォマティクスに基づく極めて効率的な実験により、解明したシス因子には、転写誘導と基本転写に関わるSTOP1転写因子の結合部位、後期応答に関わるCMTA2の結合部位および、根端特異的な発現に必要な部位などを含んでいた。また、全体としての予測精度は8割を超えるものであった。

以上の2点は、転写制御系の分子的な理解と、その応用による作物の品種改良の基盤となる情報、概念、方法論を提供するものである。

審 査 結 果 の 要 旨

植物は変化する環境に適応するために、転写全体（トランスクリプトーム）を大きく変化させる。この機構を理解することは、植物の生産性を向上させるためには、極めて重要と考えられる。とりわけ、様々なシグナル伝達の末にスイッチとして機能するプロモーターの構造・機能を理解することが、残されている重要な課題であった。学位申請者は、このような観点から、モデル植物シロイヌナズナでゲノムワイドなプロモーター構造の解析と、重要遺伝子のプロモーター解析に関する研究に取り組み、その成果は以下の2点にまとめられる。

1) SAGE法による転写開始点の大規模解析によるゲノムワイドなプロモーター構造の解明

転写は、ゲノム上で5'方向に位置するプロモーターにより、強さ、時間、ストレス特異性などが決定される。この転写開始点上流に位置するプロモーター領域を、網羅的な転写開始点解析から明らかにして、その配列の情報を統計学的に解析することで、コア構造やシス因子を予測することも可能である。申請者は、次世代シー

ケンサを用いて、CAP 構造を持つ転写産物の大規模解析を実施した。異なる組織から単離した転写産物の転写開始点を 20 万以上解析した結果、転写開始点の使い分けが複数の TATA に対応することや、Coding 領域の内部からの転写や遺伝子モデルにリンクしないゲノム領域での転写が頻繁に生じていることを明らかにした。この解析は、植物の転写制御に関する理解を飛躍的に向上させるものであるとともに、遺伝子モデルにリンクしない転写現象の解析など、生物学的にも重要な知見を与えるものである。

2)アルミニウム耐性に必須な *AtALMT1* プロモーター構造・機能の解明

*AtALMT1*アルミニウム活性化型リンゴ酸トランスポーターは、酸性土壌耐性に必須のタンパクで、その転写制御は典型的な複雑制御を受けることが知られている。申請者は、前項で明らかにした複数のTATAによる制御などを、すでに確立されているプロモーターバイオインフォマティクスに組み合わせて、極めて効率的に複雑制御の分子機構の一端をシス因子の網羅的な解明から明らかにした。解明したシス因子には、転写誘導と基本転写に関わるSTOP1転写因子の結合部位、後期応答に関わるCMTA2の結合部位および、根端特異的な発現に必要な部位などを含んでいた。この内、STOP1及びCAMTA2とcis因子の関係については、変異を挿入したプロモーターの *in planta*活性測定と*in vitro*のタンパク・核酸結合活性測定などの詳細な解析を伴うものであるとともに、全体としての予測精度は8割を超えるものであった。

以上の研究は、植物の生産性向上に関する実用形質に関してモデル植物で展開したもので、新規性・拡張性が高い研究として評価できる。このことから、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

(基礎となる論文)

- 1) Tokizawa M, Kobayashi Y, Saito T, Kobayashi M, Iuchi S, Nomoto M, Tada Y, Yamamoto Y. Y & Koyama H (2015) SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY1, CALMODULIN BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR2, and other transcription factors are involved in ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER1 expression. *Plant Physiol.* 167: 991–1003
- 2) Tokizawa M, Kusunoki K, Koyama H, Kurotani A, Sakurai T, Suzuki Y, Sakamoto T, Kurata T & Yamamoto Y Y (2017) Identification of Arabidopsis Genic and Non-genic Promoters by Paired-end Sequencing of TSS Tags. *Plant J in press*