



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

AtALMT1のアルミニウム誘導を制御する転写因子S TOP1内部の調節領域に関する研究

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-06-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伊藤, 弘樹 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/20.500.12099/78512 |

要 約

氏 名
Name

伊 藤 弘 樹

題 目
Title of Dissertation

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

シロイヌナズナの転写因子 *STOP1*; Sensitive TO Proton rhizotoxicity1 は、低 pH 耐性関連遺伝子や、アルミニウム (Al)耐性遺伝子である *AtALMT1*; *Arabidopsis thaliana Aluminum-activated Malate Transporter 1* など多数の酸性土壌耐性遺伝子群の発現を制御している。

AtALMT1 は、Al ストレス下で遺伝子発現が誘導され、根圏のアルミニウムイオン (Al^{3+})害を軽減することが報告されており、加えて、低 pH, ABA や IAA, H_2O_2 , flg22 でも遺伝子発現が誘導されることが報告されている。本研究では、*STOP1* 変異体 (*stop1*)と *STOP1* 過剰発現体 (*STOP1-OX*)のマイクロアレイ解析により、転写因子 *STOP1* と下流耐性遺伝子とのネットワークを推定することを目的とした。*stop1* において野生株 (WT: Col-0)より著しく低下しており、*STOP1-OX* で発現量の上昇がみられたものは Al ストレスでは 30 遺伝子、低 pH ストレスでは 17 遺伝子存在した。これらの中には、Al や低 pH ストレス条件だけではなく、コントロール条件でも遺伝子発現が上昇しているものが *AtALMT1* を始めとした 10 遺伝子存在した。また、コントロール条件では遺伝子発現が上昇せず、Al や低 pH ストレス条件下でのみ遺伝子発現が上昇したものは *MATE*; *Multidrug And Toxic compound Extrusion* や *PGIP1*; *PolyGalacturonase-Inhibiting Protein 1* など 24 遺伝子が存在した。*STOP1* 制御下の *STOP2* は恒常的に発現している遺伝子で、*STOP1-OX* において、大きな遺伝子発現の上昇は確認出来なかった。これらのことから、*STOP1* 転写制御下の遺伝子は一律に制御されている訳ではなく、*STOP1* 単独で制御されていると考えられるもの、もしくは、*STOP1* に加え他のストレス誘導性の因子が転写誘導に関わっているものといった複数の *STOP1* 転写制御経路の存在が示唆された。

一方、タバコ (*Nicotiana tabacum*)において *NiSTOP1* 遺伝子発現抑制株 (*NiSTOP1-KD*)の解析により、*NiMATE* の遺伝子発現量は *NiSTOP1-KD* において発現が抑制されていた。また、この *NiMATE* は Al, 低 pH, ABA や IAA, H_2O_2 , flg22 といったシグナルに対してシロイヌナズナ *AtALMT1* と同様の発現応答を示した。これは、*STOP1* 制御下の有機酸トランスポーター遺伝子の発現制御機構が植物種を超えて保存されていることを示している。また、Al ストレス下の WT と *NiSTOP1-KD* のマイクロアレイ解析により、シロイヌナズナ *STOP1* やその相同遺伝子であるイネ *ART1*; *Al Resistance Transcription factor 1* 制御遺伝子群の相同遺伝子と共通する 16 遺伝子を選抜した。その中には、Al 耐性を担うことが報告されている *ALS3*; *Aluminum Sensitive 3* や *STAR1*; *Sensitive To Aluminum Rhizotoxicity1*, イオン恒常性に関わる遺伝子、窒素代謝に重要な遺伝子群、細胞壁の維持に関わるものなどが含まれていた。これらの結果から、基本的な *STOP1* 制御機構は、植物種間で保存されている重要なストレス耐性機構であることが示された。また、タバコやヒメツリガネゴケなど複数の植物種の *STOP1-like* 遺伝子をシロイヌナズナの *stop1* 変異体に導入し表現型や転写解析を行ったところ、低 pH 耐性機構は機能していたものの、ヒメツリガネゴケを除くタ

タバコなどの STOP1 では *AtALMT1* や *ALS3* といった Al 耐性機構が機能していなかった。このことから、STOP1 による低 pH 耐性と Al 耐性遺伝子の転写制御機構は異なる経路で行われていることが示唆された。 STOP1-like タンパク質はシロイヌナズナやタバコだけでなく、イネやコムギといった単子葉類、コケ植物からユウカリ、チャ、ポプラといった木本植物まで幅広く保存されていることが報告されている。それぞれの植物種間の STOP1-like タンパク質の 4 つの C₂H₂ ジンクフィンガードメインは高度に保存されていることから、*AtALMT1* などの Al 耐性遺伝子群の転写活性化に重要な領域は、シロイヌナズナと異種植物間で保存されていないジンクフィンガードメインの N 末端側もしくは C 末端側のタンパク質領域にあることが考えられた。

次に、これまでの研究結果に基づき、N 末端または C 末端欠損 STOP1 導入株や STOP1 の一部領域をタバコの STOP1 に置換した組換え体を作成し、解析を行った。まず、シロイヌナズナ STOP1 の N 末端欠損株の解析により、低 pH 耐性関連遺伝子群の転写には必須ではないが、転写活性の増強に必要な領域が存在することが分かった。また、C 末端欠損株の解析により、C 末端には低 pH、Al 耐性遺伝子群双方の転写制御に重要な領域が含まれており、STOP1 タンパク質の安定性に大きく関わるということが明らかになった。一方、*AtALMT1* プロモーター上の cis 配列との結合能力は N 末端や C 末端が欠損しても完全長の STOP1 と有意な差は無く、GFP を結合した N 末端や C 末端を欠損させた STOP1 タンパク質の局在も完全長の STOP1 と変わらなかった。次に、シロイヌナズナ/タバコ STOP1 キメラ組換え体の解析により、N 末端の 76-149 番目のアミノ酸 (aa.) と C 末端 388-499aa. をタバコの配列に置換 (⇔Nt₇₆₋₁₄₉STOP1 組換え体, ⇔Nt₃₈₈₋₄₉₉STOP1 組換え体) すると *ALMT1* の転写が上手く行えないことが分かった。加えて、STOP1 の C 末端部分欠損株の解析において 1-480aa. のアミノ酸を持つ組換え体 (C 末端 481-499aa. の欠損) では Al 及び低 pH 耐性の回復はみられたが、1-460aa. を持つ組換え体 (C 末端 461-499aa. の欠損; ΔC₄₆₁₋₄₉₉ STOP1 組換え体) では Al 耐性のみが失われたままであった。これらのことから、STOP1 の N 末端側 76-149aa. の 73 アミノ酸と C 末端 461-480aa. の 20 アミノ酸領域は STOP1 転写因子による *AtALMT1* など Al 耐性遺伝子群の転写制御に極めて重要な領域を含んでおり、タンパク質翻訳後の制御が重要な働きをしていることが考えられた。この N 末端 73 アミノ酸と C 末端 20 アミノ酸領域は低 pH 耐性遺伝子の転写制御には必須ではないことから、一つの転写因子が独立した機構で 2 つ以上の環境ストレス耐性遺伝子を転写制御しているといえる。興味深いことに、*PGIP1* は Al、低 pH ストレスの両方に転写応答を示す遺伝子であるが、⇔Nt₇₆₋₁₄₉STOP1 組換え体と ΔC₄₆₁₋₄₉₉ STOP1 組換え体は低 pH ストレス応答性の遺伝子発現はみられたものの、Al ストレス応答性の遺伝子発現はみられなかった。このことから、*PGIP1* の Al 及び低 pH 応答性の遺伝子発現は独立した STOP1 制御機構によるものであると示された。加えて、1-400aa. を持つ組換え体 (C 末端 400-499aa. の欠損; ΔC₄₀₀₋₄₉₉ STOP1 組換え体) では、Al と低 pH 両方に感受性を示し、ΔC₄₆₁₋₄₉₉ STOP1-mCherry/STOP1-GFP 組換え体では mCherry 蛍光が観察できたのに対し、ΔC₄₀₀₋₄₉₉ STOP1-mCherry/STOP1-GFP 組換え体では mCherry 蛍光のみが観察できなかったことから、401-459aa. の間に STOP1 タンパク質の安定化 (分解) もしくは、翻訳効率に関わる重要な領域があると考えられた。