

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06280

研究課題名(和文)クレブソルミディウムのTIR1を介さないオーキシン応答を誘導する転写因子の探索

研究課題名(英文) Search for transcription factors that induce TIR1-independent auxin responses in Klebsiormidium

研究代表者

堀 孝一 (Hori, Koichi)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：70453967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オーキシン応答は陸上植物の成長や形態を制御する重要な植物ホルモンであるが、その起源や進化過程はまだまだ明らかではない。我々は、陸上植物が出現する前に分岐した藻類の一種であるクレブソルミディウムにおいて、オーキシンは細胞伸長や分裂に関与する可能性が高いが、陸上植物と同じオーキシン応答を制御する遺伝子を持たないことを明らかにしている。したがって、その制御遺伝子を明らかにする事で、その起源や成り立ちにせまる事が期待できる。解析の結果、クレブソルミディウムではKnRAVタンパク質がオーキシンに応答する遺伝子の upstream に結合し、その応答を制御していることを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の進化を考えていくうえで、植物ホルモンの起源や進化過程は欠かすことができない重要な要素である。本研究で明らかとなった結果は今まで全く明らかでなかった陸上植物のオーキシン応答の起源に光を当てるものである。今後このKnRAVがクレブソルミディウムにおいてどのような仕組みでオーキシン応答を行い、何を実現しているか明らかにしていく事で、植物の陸上への進出と適応機構や、多様な光合成生物の生き方を知る大きな礎となる。さらには地球の歴史の理解に繋がっていく事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The auxin response is an important phytohormone that regulates the cell growth and morphogenesis in land plants. However, its origin and evolutionary processes are still unclear. We had shown that auxin is likely involved in cell elongation and division in Klebsiormidium, a streptophyte algae that is diverged before the emergence of land plants. However, Klebsiormidium lacks genes similar to those that regulate auxin response in land plants. Therefore, it will be expected that the elucidation of genes that regulate the auxin response in Klebsiormidium insight into the origin of the auxin response in land plants. Our analysis suggested that the KnRAV protein binds upstream of auxin-responsive genes and regulates the auxin response in Klebsiormidium.

研究分野：植物分子生物、生理学 / 多様性生物学 / 進化生物学 /

キーワード：植物進化 藻類 クレブソルミディウム オーキシン ストレプト藻類 陸上進出

## 1. 研究開始当初の背景

陸上植物においてオーキシンは細胞の伸長や分裂、屈性の制御など植物の形態形成や環境応答に深く関わっており、陸上環境に適応するために重要な植物ホルモンの一つである。シロイヌナズナの研究によりオーキシン応答の理解は大きく進んでおり、基部陸上植物としてヒメツリガネゴケ、ゼニゴケにおいてもオーキシン応答の解析が進みつつある。しかしながら、陸上植物が誕生する過程で、どのようにオーキシン情報伝達機構が構築されていったのか明らかとなっていない。

そこで研究代表者らは緑藻から陸上植物が出現する過程で分岐したストレプト藻類のなかで、比較的初期に分岐したクレブソルミディウム(*Klebsormidium nitens* NIES-2285)のゲノム解析を行った。その結果、クレブソルミディウムは糸状性の単純な多細胞藻類であるが、極性輸送に関わる PIN 遺伝子などオーキシン応答に関わる因子が存在している一方、陸上植物全般において主要な受容体と情報伝達因子である TIR1-Aux/IAA-ARF 複合体は存在しない事が明らかとなった (Hori, K. et al., 2014)。

しかしながら、クレブソルミディウムはオーキシンを蓄積し、オーキシンを処理すると細胞の分裂、伸長に異常をきたす事も明らかとなった (Hori, K. et al., 2014, Ohtaka, K. et al., 2017) したがって、何らかのオーキシン情報伝達経路の存在が期待されたが、その実体は全く明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが明らかにしたクレブソルミディウムの TIR1 を介さないオーキシン情報伝達経路を明らかにし、オーキシン情報伝達経路が進化の過程でどのように形成されたか解明するための土台として、クレブソルミディウムのオーキシン一次応答遺伝子を広く同定し、この情報伝達経路にて活性化される転写因子を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) クレブソルミディウムのオーキシン応答に関連するシスエレメント配列の予測

現在までに蓄積したオーキシン応答のトランスクリプトーム情報を利用し、シスエレメント解析を行いオーキシン応答に関わる転写因子の結合配列を推定した。

### (2) クレブソルミディウムのオーキシン応答に関連する転写因子の同定

(1)により推定された配列から転写因子の候補を絞り込み、レポーター解析により該当転写因子の同定を試みた。さらに、同定した転写因子について、その DNA 結合能の特性を解析した。

### (2) オーキシン一次応答に関わる転写因子の同定

研究開始前までに蓄積していたオーキシン処理 10 時間、3 日、7 日の比較的長時間のトランスクリプトーム情報を蓄積していたが (Ohtaka, K. et al., 2017) オーキシン処理後に比較的長時間経過しているため一次応答遺伝子の同定には適していなかった。そこでオーキシン処理後 1 時間の CAGE-seq データを取得し、オーキシン一次応答遺伝子の同定を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) クレブソルミディウムのオーキシン応答に関連するシスエレメント配列の予測

オーキシン応答する遺伝子上流配列にはオーキシン応答に関わる転写因子との結合配列が存在することが期待される。そこで、まず現在までに我々が行ったトランスクリプトーム情報に基づき、オーキシンに反応し発現上昇する 87 遺伝子および、オーキシン非反応の 157 遺伝子を抽出した。これらの遺伝子群の上流 1 kbp に共通して存在する塩基配列モチーフの存在を抽出するために、6mer 配列の全 2080 パターンの組み合わせそれぞれの出現頻度を解析した結果、いくつかのパターンがオーキシン非反応遺伝子群にたいしてオーキシン反応遺伝子上流に有意に存在していることが示された (図 1)。

その中で、特に顕著に濃縮された配列は RY モチーフを構成する配列であった。RY モチーフ

は viviparous 1 (VP1)/abscisic acid insensitive 3 (ABI3), FUSCA 3, leafy cotyledon1 などの B3 ドメイン転写因子の結合サイトを構成する配列である。したがって、B3 ドメインを持つタンパク質がオーキシン応答に何らかの関与をしているのではないかと考えた。

そこで、クレブソルミEDIUMに存在する B3 ドメインを持つタンパク質を検索した結果、9つの B3 ドメイン含有タンパク質が同定された。この内、転写が確認されたされた8遺伝子についてオーキシン応答転写因子の候補とした(図2)。

### (2) オーキシン応答に関わる転写因子の同定

これら候補にオーキシン応答を促進する転写因子が存在すると考え、それぞれの候補転写因子のオーキシン応答遺伝子のプロモーター配列に対する転写活性化作用を測定した。転写活性化作用の測定はニコチアナタバコ葉にアグロバクテリウムを感染させる一過的発現系を用いたプロモーターアッセイにより行った。オーキシン応答プロモーターとして、クレブソルミEDIUMにオーキシン処理後1時間で誘導されることが明らかとなっている *KnLBD1* 遺伝子のプロモーター領域を使用し、レポーターとして *KnLBD1* プロモーターの下流に -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を配置したコンストラクトを作成した。このレポーターとエフェクターであるそれぞれの候補転写因子を共発現させ、GUS 活性を測定した。

その結果、候補遺伝子の1つ *kfl00094\_0070* がコードする転写因子を共導入させた場合のみ GUS 活性が顕著に増加し、*kfl00094\_0070* が *KnLBD1* の発現調節に関与している可能性が示唆された(図3)。

遺伝子 *kfl00094\_0070* は、B3 ドメインの他に AP2 DNA 結合ドメインを持つ RAV 転写因子であり、B3 ドメインの配列は陸上植物の RAV と同じグレードに位置する。さらに *kfl00094\_0070* は陸上植物の PB1 ドメインも保持していた(図2)。PB1 ドメインは陸上植物のオーキシン応答に関わる ARF や AUX/IAA に共通して存在し、他の PB1 ドメインとの相互作用を介してオーキシン応答の調節に関与していることが知られている。この3つのドメインの組み合わせを持った転写因子は一部のストレプト藻類やゼニゴケに存在することが報告されている (Martin-Arevalillo *et al.*, 2019)。

以上の結果は、クレブソルミEDIUMに1コピーのみ存在するこの遺伝子はオーキシン応答を調節している可能性を示唆する。これらのドメインを持つタンパク質が陸上応答植物のオーキシン応答に深くかかわっていることは、進化を考える上で非常に興味深い。したがってこの *KnRAV* の特性を明らかにすることが、オーキシン応答を明らかにするための重要なキーになると考え、*KnRAV* の結合モチーフについて、より詳細な解析を進めた。

### (3) *KnRAV* の結合配列の決定

*KnRAV* による遺伝子発現制御に関連する配列を決定するために、レポーターアッセイに使用する *KnLBD1* プロモーター領域を短くしたコンストラクトにより、プロモーター活性の測定を行った。その結果、開始コドンから-589塩基対までの領域を使用した場合、*KnRAV* による転写活性化作用が見られたが、-396塩基対までの領域を使用した場合、転写活性化能は消失した。したがって、*KnLBD1* プロモーターへの *KnRAV* の結合に必須な配列は-589から-396塩基対の領域に存在すると考えられる(図4)。この領域には予想に反して典型的な RY モチーフは存在しない。そこで *KnLBD1* プロモーターの *KnRAV* の結合に必要な領域をより詳細に解析した。

そのために、*KnRAV* の AP2 領域と B3 DNA 結合ドメインからなる His タグ付き組換えタンパク質を用いて *KnLBD1* の-589から-396の領域を含む配列を用いた DNase I フットプリントアッセイを行った。その結果、複数の 5'-CCTG-3'配列が存在する領域に結合していることが示唆された(図5)。この結合をさらに検証するためにゲルシフトアッセイを行ったところ、この領域内に存在する5つの 5'-CCTG-3'配列のうち2つの部位が *KnRAV*-DBD の結合に強く寄与していることも明らかとなった(図5、図6)。

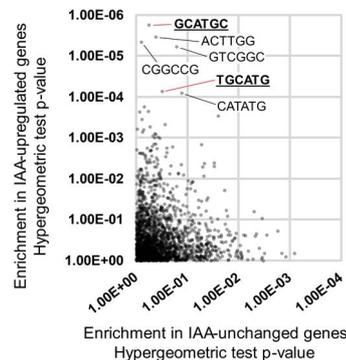


図1 6塩基の組み合わせ 2080パターンがオーキシン応答(非応答)遺伝子のの上流領域に存在する期待値(X軸:応答遺伝子、Y軸:非応答遺伝子)。図左上にプロットされるほどオーキシン応答遺伝子のの上流領域に出現する。

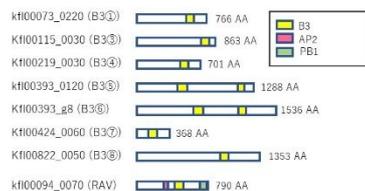


図2 クレブソルミEDIUMに存在する B3 ドメインを持つオーキシン応答に関わる転写因子の候補

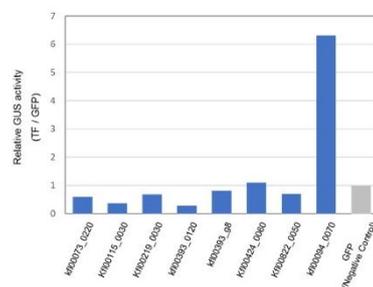


図3 候補転写因子とレポーターコンストラクトを共導入したベンサムタバコ葉における GUS 活性

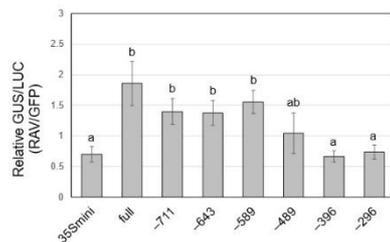


図4 使用する *KnLBD1* プロモーターを短くしたレポーターコンストラクトにおける GUS 活性、縦軸は *KnRAV* のコントロールとして GFP を発現させた際の GUS 活性との比率を示した。

KnRAV の B3 ドメインは RY モチーフではなく、5'-CCTG-3'配列と結合することが示唆され、(1)にて行ったシスエレメント配列解析による予想とは異なっていた。しかし、シロイヌナズナ AtRAV1 の B3 ドメインは、5'-CACCTG-3'配列を優先的に結合するが、5'-CCTG-3'配列を含む幅広いターゲット配列にも結合できることが報告されている (Kagaya, Y. *et al.*, 1999)。5'-CCTG-3'を含む配列がシスエレメント解析で検出されなかった事はコアとなる4塩基以外の領域は影響が少ない可能性や、隣接する5'-CCTG-3'配列や他とモチーフとの位置関係など様々な要因が考えらる。また KnRAV が結合しない可能性が高い RY モチーフが検出された事については、クレブソルミディウムの他の B3 は *KnLBD1* の転写活性化作用を示さなかったことから、いずれかの B3 タンパク質が間接的にオーキシン応答に関与する可能性など様々な要因が考えられる。これらの可能性を精査するために、今後さらなる解析を要する。

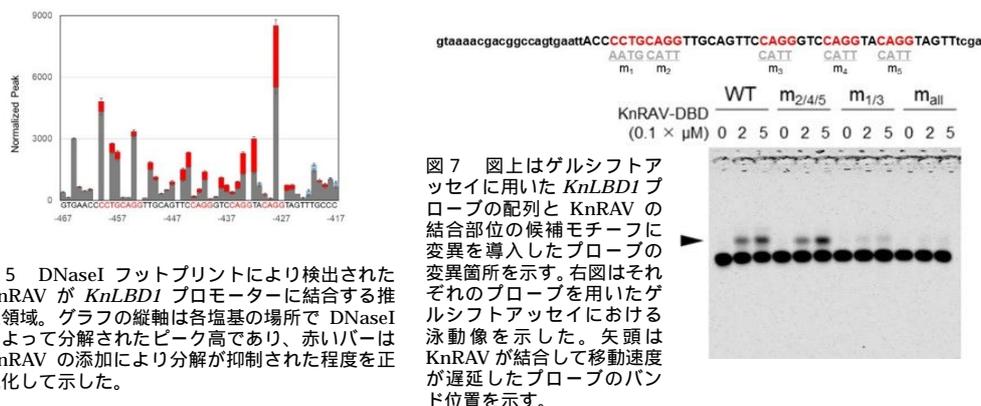


図5 DNaseI フットプリントにより検出された KnRAV が *KnLBD1* プロモーターに結合する推定領域。グラフの縦軸は各塩基の場所で DNaseI によって分解されたピーク高であり、赤いバーは KnRAV の添加により分解が抑制された程度を正規化して示した。

図7 図上はゲルシフトアッセイに用いた *KnLBD1* プロンプの配列と KnRAV の結合部位の候補モチーフに変異を導入したプロンプの変異箇所を示す。右図はそれぞれのプロンプを用いたゲルシフトアッセイにおける泳動像を示した。矢頭は KnRAV が結合して移動速度が遅延したプロンプのバンド位置を示す。

#### (4) クレブソルミディウムにおけるオーキシン一次応答遺伝子の探索

クレブソルミディウムにおいてオーキシン応答において初期に応答する遺伝子群を明らかにするために、オーキシン処理後1時間の発現上昇遺伝子を探索した。さらに翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) 処理も同時に行ったサンプルも合わせて解析し、新たな転写因子が翻訳されない状況下においてもオーキシンに応答する遺伝子がオーキシン一次応答遺伝子である可能性が高いと考え、各サンプルにおいて CAGE-seq によりトランスクリプトーム情報を取得した。その結果、オーキシンにより86遺伝子 (CHX なし) および150遺伝子 (CHX あり) の発現が有意に増加した (図7)。このうち16遺伝子は-CHX 群と+CHX 群で共通しており、特にオーキシンの一次応答遺伝子である可能性が高いと期待される。そこで、そのうち6遺伝子を q-RT-PCR により再検証した結果、4遺伝子は再現性良く発現が上昇した。また2遺伝子についてはプロモーターアッセイも行い、KnRAV により転写が活性化される事も明らかにした。

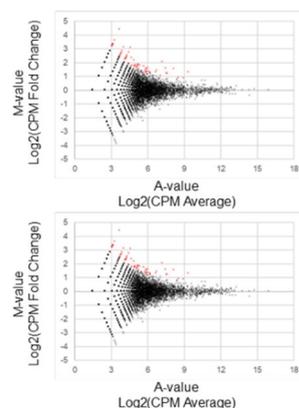


図7 図上はオーキシン処理における発現量変化、図下は CHX 存在下でオーキシン処理を行ったサンプルにおける発現量変化を MA plot で示した。赤点はオーキシン処理による発現変動遺伝子を示す (P < 0.05)。

以上の結果に基づき、本研究により KnRAV がクレブソルミディウムのオーキシン応答遺伝子の発現制御に関与している可能性が高い事を明らかにし、いくつかのオーキシン一次応答遺伝子を同定した。この KnRAV はオーキシン応答に関わる重要なドメインである B3, PB1 を持つタンパク質であり、オーキシン応答の起源を明らかにする上で重要な手がかりとなる。この特性を明らかにし、クレブソルミディウムにおけるオーキシン情報伝達経路を明らかにすることで、さらなるオーキシン情報伝達経路の進化を明らかにする事が期待できる。

#### ・参考文献

Hori, K. *et al.* Klebsormidium flaccidum genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation., *Nat. Commun.* **5**, 3978 (2014).

Kagaya, Y., Ohmiya, K., & Hattori, T. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res.* **27**(2), 470–478 (1999).

Martin-Arevalillo *et al.* Evolution of the Auxin Response Factors from charophyte ancestors. *PLoS*

*Genet.* **15**(9), e1008400 (2019).

Ohtaka, K., Hori, K., Kanno, Y., Seo, M., & Ohta, H. Primitive Auxin Response without TIR1 and Aux/IAA in the Charophyte Alga *Klebsormidium nitens.*, *Plant Physiol.* **174**(3), 1621–1632 (2017).

Tounosu N, Sesoko K, Hori K, Shimojima M, & Ohta H Cis-regulatory elements and transcription factors related to auxin signaling in the streptophyte algae *Klebsormidium nitens.*, *Scientific Reports* (Accepted)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tounosu N, Sesoko K, Hori K, Shimojima M, Ohta H	4. 巻 -
2. 論文標題 Cis-regulatory elements and transcription factors related to auxin signaling in the streptophyte algae <i>Klebsormidium nitens</i> .	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-36500-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yuno-Ohta N, Shimonomura N, Hoshi Y, Leocmach M, Hori K, Ohta H	4. 巻 198
2. 論文標題 Characterization of the gelation and resulting network of a mixed-protein gel derived from sodium caseinate and ovalbumin in the presence of glucono- $\delta$ -lactone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 111472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.colsurfb.2020.111472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakami H, Kakutani N, Kuroyanagi Y, Iwai M, Hori K, Shimojima M, Ohta H	4. 巻 594
2. 論文標題 MYB-like transcription factor NoPSR1 is crucial for membrane lipid remodeling under phosphate starvation in the oleaginous microalga <i>Nannochloropsis oceanica</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS letters	6. 最初と最後の頁 3384
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13902	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hidayati Nur A., Yamada Oshima Yui, Iwai Masako, Yamano Takashi, Kajikawa Masataka, Sakurai Nozomu, Suda Kunihiro, Sesoko Kanami, Hori Koichi, Obayashi Takeshi, Shimojima Mie, Fukuzawa Hideya, Ohta Hiroyuki	4. 巻 100
2. 論文標題 Lipid remodeling regulator 1 (LRL1) is differently involved in the phosphorus depletion response from PSR1 in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 610 ~ 626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.14473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 普喜幹, 堀孝一, 井原雄太, 石崎公庸, 下嶋美恵, 太田啓之
2. 発表標題 ゼニゴケ GPAT 遺伝子群の表層脂質合成における機能の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関根伸輔, 堀孝一, 唐司典明, 井原雄太, 清水信介, 下嶋美恵, 太田啓之
2. 発表標題 車軸藻類クレブソルミEDIUMにおけるリン欠乏応答とグルクロノシルジアシルグリセロール合成酵素の解析
3. 学会等名 第18回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀孝一, 唐司典明, 瀬底かなみ, 下嶋美恵, 太田啓之
2. 発表標題 車軸藻類クレブソルミEDIUMの乾燥・沈水応答に関する転写因子の解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関根伸輔, 堀孝一, 唐司典明, 井原雄太, 清水信介, 下嶋美恵, 太田啓之
2. 発表標題 車軸藻類クレブソルミEDIUMはリン欠乏時に酸性糖脂質GlcADGとベタイン脂質DGTSを増加させる
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関根伸輔, 堀孝一, 唐司典明, 井原雄太, 清水信介, 下嶋美恵, 太田啓之
2. 発表標題 車軸藻類クレブソルミEDIUMにおけるリン欠乏応答とグルクロノシルジアシルグリセロール合成酵素の解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀孝一, 唐司典明, 瀬底かなみ, 下嶋美恵, 太田啓之
2. 発表標題 車軸藻類クレブソルミEDIUMのAREB様bZIP転写因子は水ストレスの共通制御因子として働く
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 唐司典明, 瀬底かなみ, 堀孝一, 下嶋美恵, 太田啓之
2. 発表標題 Klebsormidium nitensにおけるオーキシン応答性遺伝子の発現制御に関わる転写因子の解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koichi Hori, Noriaki Tounosu, Kanami Sesoko, Mie Shimojima and Hiroyuki Ohta
2. 発表標題 Analysis of transcription factors involved in the drought response of Klebsormidium nitens
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬底かなみ、堀孝一、下嶋美恵、太田啓之
2. 発表標題 車軸藻植物門クレブソルミEDIUMにおける原始的オーキシン応答に関わる新規因子の探索
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関