

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06212

研究課題名（和文）種内ナチュラルバリエーションを用いた植物プロモーターの進化的側面の解明

研究課題名（英文）Analysis of promoter evolution in plants using natural variations in Arabidopsis

研究代表者

山本 義治（Yamamoto, Yoshiharu Y.）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50301784

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アクセシオン間のTSS-seqデータの比較解析により、申請者らが以前同定した GenicTop, GenicCompanion, Intragenic, Antisense, Orphanの各プロモーターグループについて、配列の安定性及びTSSの安定性の両面から遺伝的安定性を評価することができた。また、それぞれのグループについて遺伝子発現量とプロモーターの安定性に相関があることも明らかにすることができた。環境ストレスの有無による転写応答の比較からは、シロイヌナズナがより温暖な地域に生息地を移す際に、光合成関連遺伝子群の発現増加、環境ストレス応答性遺伝子群の発現低下を伴うことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子の転写を行わないノンカノニカルなプロモーターとして、Intragenic, Antisense, Orphanグループがあることをこれまでに報告してきたが、これらはそれぞれのグループ全体としては遺伝的安定性が低く、機能についての淘汰圧がかかっていないものが大多数であることを明らかにした。この発見は各プロモーターグループの生理学的な重要性としては低いことを強く示唆しつつ、例外的に保存性が高いプロモーター群の存在を同定することができた。後者の発見は今後の機能解析のための指針となる重要な発見である。

研究成果の概要（英文）：I could evaluate genetic stability of GenicTop, GenicCompanion, Intragenic, Antisense, and Orphan promoter groups which I had discovered in previous works. The evaluation was achieved based on sequence stability and stability of TSS position among Arabidopsis accessions. Comparison of gene expression among the accessions revealed reduced expression of frost resistance genes which are regulated by DREB1 and of photoprotection genes including anthocyanin biosynthesis, and also increased expression of photosynthesis-related genes. These change in gene expression was supposed to be achieved during shift of the habitat from Northern cold area to Southern warm regions.

研究分野：植物ゲノム科学

キーワード：シロイヌナズナ プロモーター 進化 遺伝的安定性 局所適応 遺伝子発現

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者(山本)らが植物科学分野として初のゲノムワイド転写開始点解析(TSS-seq)を実施した(2009)。その後ペアエンドシーケンシングによりさらに詳細な解析を行い(2019)、以下のようなことを報告した。1) 遺伝子の転写を担う Genic プロモーターは遺伝子あたり平均 3 つあり、発現が最も強い Genic Top、それ以外の Genic Companion とに分かれる、2) カノニカルな Genic プロモーター以外に Intragenic、Antisense プロモーターが多数存在する、3) さらに該当する遺伝子モデルが見当たらない Orphan プロモーターも多数存在している。これらのプロモーターグループの発現強度、配列安定性、プロモーターコンテキストの強弱(2022)については山本らによりこれまである程度の解析が進められてきたが、それだけでは各プロモーターグループの進化的な安定性について結論を出すには至っていない(特に Intragenic と Antisense)。

### 2. 研究の目的

上記の経緯により発見された Genic Top、Genic Companion、Intragenic、Antisense、Orphan の各プロモータータイプについてシロイヌナズナの種内地域系統(アクセシオン)の TSS-seq 解析により遺伝的安定性を計測する。また、TSS-seq データから得られる遺伝子発現多型を解析し、シロイヌナズナの局所適応の実態を理解する。

### 3. 研究の方法

シロイヌナズナの 4 アクセシオン(Altenb2, Kly1, Shigu2, Vash1)について、ストレスなし、低温+強光ストレスありの 2 処理区 3 反復を用意し TSS-seq 解析を行う(計 24 ライブラリ)。シーケンズデータより、TSS(転写開始点)をクラスター化し、クラスター = プロモーターとして扱う。各クラスターの総タグ数を発現量、クラスター内のピーク位置をそのプロモーターを代表する「転写開始点」とする。

Col-0 での TSS-seq 解析データ(2019、未発表)では上記の解析に加えて、クラスターと遺伝子モデルとの関係づけ及び、GenicTop、GenicCompanion、Intragenic、Antisense、Orphan のグループ分けができています。今回解析した 4 アクセシオンの TSS データを Col-0 のクラスターとピーク位置に参照し、各グループの特徴としてまとめる。

### 4. 研究成果

#### <各プロモータータイプの遺伝的安定性の評価>

Col-0 での TSS-seq 解析データ(2019、未発表)をレファレンスとして、今回解析した 4 系統での TSS クラスターのピーク位置が完全に保存されている(=塩基のずれもない)割合を調べた。予想通り最も保存性が高かったのが GenicTop グループであった。Orphan グループの保存性が低いのも予想通りであったが、Intragenic、Antisense のグループは予想外に保存性が低かった。また、シロイヌナズナ 1001 ゲノムの SNP 情報を用いてプロモーターの配列安定性を比較したところ、GenicTop が高く Orphan が低かった。これまでの解析で得られていた発現量、プロモーターコンテキストの比較結果と合わせると、発現量が高い GenicTop が最も保存性(配列及び TSS ピーク位置)が高く、発現量が低い Orphan が保存性も低い、という結論になった。

これらの比較から Orphan グループはゲノム中に数万あり数が多いが現れては消える遺伝的安定性の低いプロモーターであることを明らかにすることができた。

また、Intragenic 及び Antisense のグループは TSS ピーク位置が保存されているクラスターが特に低く、Intragenic で 0.74%、Antisense で 5.6%しかなかった。これらの結果は、Intragenic 及び Antisense のグループは生理学的な重要性を担うプロモーターが非常に少ない、ということを示唆している。それぞれのグループで 800 程度のプロモーターは TSS ピーク位置が保存されていたが、これらについてはなにがしかの生理学的な役割を担っている可能性が考えられた。Intragenic 及び Antisense グループは構造遺伝子と配列を共有するため、塩基配列の安定性を評価するだけでは遺伝的安定性について結論を得ることはできなかったが、今回の TSS ピーク位置のアクセシオン比較により初めて結論が得られた。

#### <アクセシオン間の遺伝子発現比較による局所適応>

ゲノム配列を元にしたシロイヌナズナアクセシオンの進化過程の研究によれば、Altenb2 及び Vash1 は Clade 4 に属し、Shigu2 及び Kly1 が属する Clade 1 より派生した、と考えられている(佐藤壮一郎(京都府立大学)私信)。現在の生息地から考えると、Clade 1 から Clade 4 へとより温暖な土地へ生息地を遷移してきたことになる。

TSS-seq データを元にした遺伝子発現量の解析結果から、Clade 1 から Clade 4 への変遷により、DREB レギュロン系の凍結耐性応答性遺伝子群の発現低下、光防御系強光応答性遺伝子群の発現低下、ROS 応答性転写因子群の発現低下、そして光合成関連遺伝子群の発現量の増加が検出された。これらの発現量の変化は、低温ストレスに対する応答を下げ、植物の成長の源である光合成装置の生合成を上げる、という方向性にフィットしており、より温暖な土地での局所適応にプラスに働いていると考えられた。これらの解釈は、成長速度及びストレス耐性の生理学的な比較解析の結果とも一致していた。

科研費で支援されている期間に解明できた以上の成果に加えて、期間終了後も解析を続けており、可能であれば発現多型の原因とゲノム配列多型を繋ぐような成果を出したい、と考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Hiratsuka, T., Makita, Y., Yamamoto, Y. Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Sequence-based evaluation of promoter context for prediction of transcription start sites in Arabidopsis and rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 6976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-11169-w	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 Matsumura, M. Nomoto, M. Itaya, T. Aratani, Y., Iwamoto, M., Matsuura, T., Hayashi, Y., Mori, T., Skelly, M. J., Yamamoto, Y. Y., Kinoshita, T., Mori, I.C., Suzuki, T., Betsuyaku, S., Spoel, S. H., Toyota, M., Tada, Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Mechanosensory trichome cells evoke a mechanical stimuli-induced immune response in Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 1216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28813-8	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 該当する
1. 著者名 Tokizawa Mutsutomo, Enomoto Takuo, Ito Hiroki, Wu Liujie, Kobayashi Yuriko, Mora-Maci?as Javier, Armenta-Medina Dagoberto, Iuchi Satoshi, Kobayashi Masatomo, Nomoto Mika, Tada Yasuomi, Fujita Miki, Shinozaki Kazuo, Yamamoto Yoshiharu Y, Kochian Leon V, Koyama Hiroyuki	4. 巻 72
2. 論文標題 High affinity promoter binding of STOP1 is essential for early expression of novel aluminum-induced resistance genes <i>GDH1</i> and <i>GDH2</i> in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 2769 ~ 2789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/erab031	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 Hayami Natsuki, Y. Yamamoto Yoshiharu	4. 巻 9
2. 論文標題 Primary Metabolism and Transcriptional Regulation in Higher Plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reviews in Agricultural Science	6. 最初と最後の頁 117 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7831/ras.9.0_117	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 Sharma Prabin Kumar, Goud Vaibhab V., Yamamoto Y., Sahoo Lingaraj	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficient Agrobacterium tumefaciens-mediated stable genetic transformation of green microalgae, Chlorella sorokiniana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 3 Biotech	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13205-021-02750-7	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 該当する

1. 著者名 Kudo Hisayuki, Matsuo Mitsuhiro, Satoh Soichirou, Hata Takayuki, Hachisu Rei, Nakamura Masayuki, Yamamoto Yoshiharu Y., Kimura Hiroshi, Matsui Minami, Obokata Junichi	4. 巻 108
2. 論文標題 Cryptic promoter activation occurs by at least two different mechanisms in the Arabidopsis genome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 29 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15420	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 Agrahari Raj Kishan, Enomoto Takuo, Ito Hiroki, Nakano Yuki, Yanase Emiko, Watanabe Toshihiro, Sadhukhan Ayan, Iuchi Satoshi, Kobayashi Masatomo, Panda Sanjib Kumar, Yamamoto Yoshiharu Y., Koyama Hiroyuki, Kobayashi Yuriko	4. 巻 12
2. 論文標題 Expression GWAS of PGIP1 Identifies STOP1-Dependent and STOP1-Independent Regulation of PGIP1 in Aluminum Stress Signaling in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.774687	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 該当する

1. 著者名 Nomoto Mika, Skelly Michael J., Itaya Tomotaka, Mori Tsuyoshi, Suzuki Takamasa, Matsushita Tomonao, Tokizawa Mutsutomo, Kuwata Keiko, Mori Hitoshi, Yamamoto Yoshiharu Y., Higashiyama Tetsuya, Tsukagoshi Hironaka, Spoel Steven H., Tada Yasuomi	4. 巻 37
2. 論文標題 Suppression of MYC transcription activators by the immune cofactor NPR1 fine-tunes plant immune responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110125 ~ 110125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.110125	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 該当する

1. 著者名 Chen Yingxi, Nishimura Kohji, Tokizawa Mutsutomo, Yamamoto Yoshiharu Y, Oka Yoshito, Matsushita Tomonao, Hanada Kousuke, Shirai Kazumasa, Mano Shoji, Shimizu Takayuki, Masuda Tatsuru	4. 巻 -
2. 論文標題 Alternative localization of HEME OXYGENASE 1 in plant cells regulates cytosolic heme catabolism	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Physiology	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) 10.1093/plphys/kiae288	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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yingxi Chen, Nishimura K, Yamamoto YY, Masuida S
2. 発表標題 Light- and tissue-dependent regulation of transcriptional start sites of H01 in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Debbarma A, Chaturvedi R, Maruyama K, Yamamoto YY	4. 発行年 2024年
2. 出版社 Springer Nature Sqtizerland AG	5. 総ページ数 -
3. 書名 COnservation and diversification of the cold stress response in higher plants. In Plant in challenging environments, eds Panda SK, Khan MA	

〔産業財産権〕

〔その他〕

山本研HP <a href="https://www1.gifu-u.ac.jp/~yyy/yyy/Top.html">https://www1.gifu-u.ac.jp/~yyy/yyy/Top.html</a> 山本研究室HP <a href="https://www1.gifu-u.ac.jp/">https://www1.gifu-u.ac.jp/</a>
--

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
---------	---------