

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成21年度博士課程進学  
氏名 宮本 皓司  
指導教員名 山根 久和

論文題目 イネの bZIP 型転写因子 OsTGAP1 の機能解析

植物は病原体の表層由来の物質（キチンエリシターなど）が細胞膜上のレセプターに結合することで、病原体の感染を認識する。そして、これが引き金となって、様々な二次シグナル物質を介したシグナル伝達が起こり、エリシター応答性転写因子の発現が誘導される。発現した転写因子は、下流の標的遺伝子の発現を誘導し、最終的に抗菌性タンパク質の生産や抗菌性二次代謝産物であるファイトアレキシンの生産などの一連の防御応答が誘導される。イネにおいては、15種類のファイトアレキシンが同定されている。このうちフラボノイド型の sakuranetin を除いた14種類はジテルペン型の構造を持つ。ジテルペン型では、momilactone および phytocassane が主要なファイトアレキシンであることが知られている。また、momilactone および phytocassane の生合成酵素遺伝子は、イネ染色体上においてそれぞれ遺伝子クラスターを形成していることが明らかになっている。高等植物において二次代謝産物の生合成に関与する一連の酵素遺伝子が遺伝子クラスターを形成している例は、数例しか報告例がなく、その発現制御機構に興味を持たれた。これまでに我々の研究グループにより、キチンエリシター応答性 bZIP 型転写因子 OsTGAP1 が momilactone 生合成酵素遺伝子の1つである *OsKSL4* の上流域に存在するキチンエリシター応答性シスエレメントに結合し、*OsKSL4* の転写制御を行う転写因子として同定されていた。さらに、その後の OsTGAP1 過剰発現株を用いた解

析から、OsTGAP1は*OsKSL4*以外の momilactone 生合成酵素遺伝子の転写制御にも関与していることが明らかになり、OsTGAP1が momilactone 生産を制御する鍵転写因子として機能することが明らかになっていった。しかしながら、momilactone 生合成酵素遺伝子以外のジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の発現制御への OsTGAP1の関与や OsTGAP1による momilactone 生合成酵素遺伝子クラスターの転写制御機構などについては未解明であった。

そこで、本研究においては、OsTGAP1の機能解明を目的として、OsTGAP1過剰発現株におけるファイトアレキシン生産能の解析やトランスクリプトーム解析を行うとともに、クロマチン免疫沈降法 (ChIP)と次世代シーケンサーによる高速シーケンシングを組み合わせた ChIP-seq 解析により OsTGAP1の標的遺伝子の網羅的同定を行った。また、OsTGAP1と相互作用するタンパク質の探索も行った。

### ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の発現制御への OsTGAP1の関与

まず、OsTGAP1が phytocassane 生産に関与するかを検討するため、OsTGAP1過剰発現株における phytocassane の蓄積量を解析したところ、momilactoneと同様にエリシター処理後の phytocassane の蓄積量が、野生型株と比較して OsTGAP1過剰発現株において顕著に増加した。このことから、OsTGAP1が momilactone 生産だけでなく phytocassane 生産の制御にも関わっていることが示された。次に、ファイトカサン生合成酵素遺伝子の1つである *OsKSL7*の OsTGAP1過剰発現株における発現量を定量的 RT-PCRにより解析した。その結果、エリシター処理後に OsTGAP1過剰発現株において野生型株と比較して、*OsKSL7*の発現量が顕著に増加していた。また、さらに上流の生合成段階である methylerythritol phosphate (MEP)経路の酵素遺伝子である *OsDXS3*についても同様に、OsTGAP1過剰発現株における発現量を定量的 RT-PCRにより解析したところ、エリシター処理後では OsTGAP1過剰発現株において野生型株と比較して、*OsDXS3*の発現量が顕著に増加していた。また、OsTGAP1過剰発現株を用いてトランスクリプトーム解析を行ったところ、エリシター処理後では OsTGAP1過剰発現株において野生型株と比較して、すべての phytocassane 生合成酵素遺伝子・MEP経路遺伝子の発現量が上昇していた。これらのことから OsTGAP1がイネのジテルペン型ファイトアレキシン生産を制御するマスター転写因子であることが明らかになった。

### OsTGAP1の結合領域の網羅的同定

イネゲノム中における OsTGAP1の結合領域を網羅的に同定するため、キチンエリシター未処理および処理後6時間の OsTGAP1過剰発現株培養細胞を用いて、抗 OsTGAP1抗体による ChIP-seq 解析を行い、OsTGAP1の結合領域の網羅的同定を行った。その結果、エリシター未処理時において2,763箇所を、エリシター処理後6時間において2,777箇所を、それぞれ OsTGAP1の結合領域として同定した。さらに、先に行ったトランスクリプトーム解析の結果と合わせることで、OsTGAP1が転写開始点上流2 kbp

以内に結合していて、かつ OsTGAP1 過剰発現株において発現量が上昇する遺伝子が 161 遺伝子、OsTGAP1 が転写開始点上流 2 kbp 以内に結合していて、かつ OsTGAP1 過剰発現株において発現量が低下する遺伝子が 88 遺伝子存在していることを見出した。これらが OsTGAP1 の標的候補遺伝子と考えられる。

次に、ジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子近傍における OsTGAP1 の結合位置を解析した。まず、MEP 経路遺伝子については、*OsDXS3* の転写開始点近傍にエリシター未処理時・処理時のどちらにおいても OsTGAP1 の結合領域が見出された。このことから、OsTGAP1 が *OsDXS3* の上流域に結合し、直接転写制御を行っていると考えられる。その一方で、他の MEP 経路遺伝子については遺伝子領域近傍への OsTGAP1 の結合は見出されなかった。次に momilactone 生合成酵素遺伝子クラスターについては、*CYP99A2*, *OsKSL4*, *CYP99A2* については上流域への OsTGAP1 の結合が確認された。しかし、*CYP99A3*, *OsMAS* の上流域には OsTGAP1 の結合領域は認められなかった。さらに、phytocassane 生合成酵素遺伝子クラスターにおいても、phytocassane 生合成酵素遺伝子の上流域に OsTGAP1 の結合は見出されず、遺伝子間領域やクラスター領域の外側において OsTGAP1 の結合が認められた。このことから、OsTGAP1 は全てのジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の上流域それぞれに結合して転写制御を行っているのではなく、未知の制御機構が存在することが示唆された。また、遺伝子間領域やクラスター領域の外側における OsTGAP1 の結合がこれらの遺伝子の転写制御においてどのような意味を持つのかは興味深く、今後解析していく必要がある。

また、OsTGAP1 が上流域に結合しているジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子についてはエリシター未処理時・処理時どちらにおいても OsTGAP1 の結合が認められた。しかし、OsTGAP1 過剰発現株において、エリシター未処理時にはジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の発現は微弱にしか誘導されず、エリシター処理によりその発現が顕著に誘導されることがわかっている。このことから、これらの遺伝子の発現誘導には OsTGAP1 の結合以外に OsTGAP1 の翻訳後修飾や OsTGAP1 と相互作用するタンパク質などの他の因子が関与していると予想される。

### **OsTGAP1 と相互作用するタンパク質の探索**

細胞質における GTP 結合タンパク質の活性化を指標とした yeast two-hybrid 法を用いて、OsTGAP1 と相互作用するタンパク質を探索した。エリシター未処理時および処理後 6 時間の野生型株培養細胞から cDNA ライブラリーを作製し、スクリーニングを行った。スクリーニングにより得られた陽性クローンのシーケンスを解析したところ、10 個の候補遺伝子を得た。その中には、トウモロコシにおいてヒストン修飾に関与することが報告されている ENT-domain containing protein のホモログ遺伝子が含まれていた。これを TIF1 (OsTGAP1 Interacting Factor 1) と名付け、以後の解析対象とした。まず、pull-down assay により TIF1 と OsTGAP1 との相互作用を確認した。さらに、ヒストン抗体を用いた ChIP 解析により、*OsKSL4* の遺伝子

領域および上流域のヒストン修飾を解析したところ、翻訳開始点付近の領域においてキチンエリシター処理により、ヒストン H3 の K9/14 のアセチル化およびヒストン H3 の K4 のトリメチル化が誘導されることが示唆された。さらに、他の momilactone 生合成酵素遺伝子におけるヒストン修飾を解析したところ、*OsCPS4* についても、翻訳開始点付近の領域においてヒストン H3 の K9/14 のアセチル化およびヒストン H3 の K4 のトリメチル化が誘導されることが示唆された。*CYP99A2*, *CYP99A3*, *OsMAS* については、翻訳開始点付近の領域においてヒストン H3 の K4 のトリメチル化が誘導された。また、MEP 経路遺伝子である *OsDXS3* については、転写開始点付近の領域において、エリシター処理によりヒストン H3 の K4 のトリメチル化が誘導された。これらのことから、*OsKSL4*, *OsCPS4* の転写制御にヒストン H3 の K9/14 のアセチル化およびヒストン H3 の K4 のトリメチル化が関与していることが考えられた。また、*CYP99A2*, *CYP99A3*, *OsMAS*, *OsDXS3* の転写制御についても、ヒストン H3 の K4 のトリメチル化が関与していることが示唆された。今後 ChIP-seq 解析や ChIP-chip 解析により、*OsTGAP1* 下流遺伝子の遺伝子領域近傍におけるヒストン修飾を網羅的に解析していくとともに、これらのヒストン修飾に *OsTGAP1* や TIF1 が関係しているかを解析することが必要であると考えられる。

## 総括

本研究においては、イネの bZIP 型転写因子 *OsTGAP1* の機能解析を行い、*OsTGAP1* がジテルペン型ファイトアレキシン生合成を制御するマスター転写因子であることを示すとともに、*OsTGAP1* の標的候補遺伝子の網羅的同定を行った。さらに、*OsTGAP1* によるジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の転写制御機構については、生合成酵素遺伝子の上流域それぞれに結合して転写制御を行っているのではなく、未知の制御機構が存在する可能性を示した。今後は、遺伝子間領域やクラスター領域の外側における *OsTGAP1* の結合の意義の解明も含め、さらなる解析を行っていくことが必要である。また、momilactone 生合成酵素遺伝子クラスターおよび *OsDXS3* の転写制御にはヒストン H3K9/14 のアセチル化とヒストン H3K4 のトリメチル化の両方またはいずれか一方が関与していることが示唆された。今後は *OsTGAP1* や TIF1 を介したこれらの遺伝子の転写制御とヒストン修飾の関係を明らかにしていくことで、*OsTGAP1* によるジテルペン型ファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の転写制御機構が明らかになると考えられる。

## 発表論文

A. Okada, K. Okada, K. Miyamoto, J. Koga, N. Shibuya, H. Nojiri, and H. Yamane: *OsTGAP1*, a bZIP transcription factor, coordinately regulates the inductive production of diterpenoid phytoalexins in rice. *J Biol Chem* (2009) 284:26510-8