

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度

平成30年度

受付番号

201860752

氏名

田中 慧太

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ワーゲニンゲン (国名： オランダ)
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
オーキシン応答転写因子の機能多様性を生む構造的要因
3. 派遣期間： 平成・令和 30 年 10 月 15 日 ~ 令和 3 年 1 月 14 日
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名： ワーゲニンゲン大学
部局名： Laboratory of Biochemistry, Agrotechnology and Food Sciences Group
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入**

も可）

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

多細胞生物の成長、環境応答、および個体間コミュニケーションは、様々なシグナル分子を介した緻密な制御網の上に成り立っている。生命現象の深い理解と人為的な制御のためには、それに寄与するシグナル分子がいかんして機能を発揮するのか知ることが欠かせない。

植物が生産するシグナル分子の代表として、植物ホルモンと称される、ごく低濃度で細胞応答を誘導する化合物群が挙げられる。その一種オーキシンは、胚発生や器官形成、種子休眠、そして老化に至るまで、生活環を通じて様々な発生イベントの制御に寄与するほか、光・重力に応じた屈性などの環境応答においても中心的な役割を果たし、さらには虫こぶ形成などの植物-昆虫間相互作用や、植物-微生物間相互作用にも関わる、陸上植物の生命活動にとって極めて重要な分子である。植物体の各組織において、オーキシンレベルの変化は、数百から数千におよぶ遺伝子の発現に影響し、細胞分化などの様々な応答を引き起こす。

オーキシン応答性遺伝子制御の中核を担う転写因子群が、AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) ファミリーである。オーキシンが細胞核内で受容体タンパク質に結合すると、シグナル伝達系を介して、ARF の働きが促される。ARF は、主に、ゲノム上の 5'-TGTCNN-3'モチーフを含むシスエレメントに結合し、その周辺にある遺伝子の転写を促進または抑制する。ARF の標的となりオーキシン応答性を決定づけるシスエレメントは、しばしば auxin response element (AuxRE) と称される。

これまで調べられた全ての陸上植物が、ゲノム上に複数種類の ARF をコードしている。たとえばシロイヌナズナゲノムには 23 の ARF 遺伝子が存在し、各遺伝子の機能欠損株（または多重遺伝子欠損株）は、それぞれ特徴的な表現型を示す。つまり、ARF メンバー毎に、ある程度重複しているものの、異なる生理的役割を担っている。植物進化の過程で、ARF ファミリーの拡大と機能多様化に伴い、オーキシン応答性制御の多様性と時空間特異性も増してきたと考えられる。しかし、ARF メンバー毎の役割を決定づける生化学的特性、たとえば「どのような構造的・配列的特徴を持つシスエレメントを好むのか」など、の解明は未だ進んでいない。近年、*in vitro* 試験やタンパク質構造解析が進み、ARF-DNA 間結合の生化学的基盤に関する情報が蓄積してきたが、それらの知見が遺伝子発現制御などの *in planta* で起こる現象をどこまで説明できるのか、生きた植物を用いて調べた例はほとんどなかった。

私は、ARF の機能多様性、すなわちオーキシン応答の多様性、を生む要因に迫るため、Wageningen (オランダ) に滞在し、各国の研究者と協力しながら、構造生物学、生物情報科学、分子生物学、および生化学的手法を取り入れた研究を進めた。その内容と進捗を下に記す。

【研究の実施状況および成果】

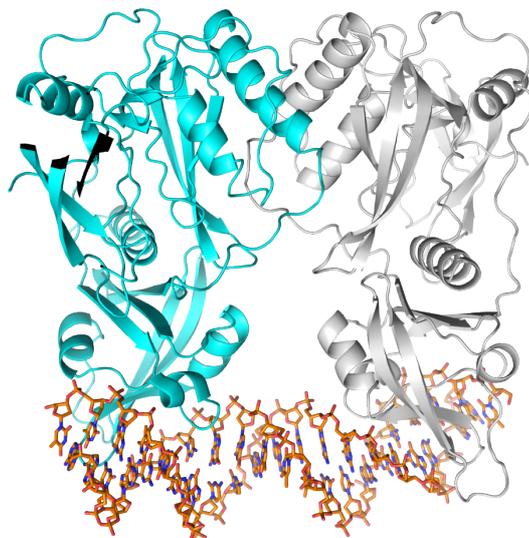
TM05 の制御におけるモチーフ反復型 AuxRE の重要性の検証

近年の異種発現タンパク質を用いた構造解析と *in vitro* 試験により、ARF の DNA-binding domain (DBD) は二量体を形成し得ることがわかった (図)。加えて、二量体化した ARF-DBD は、2 個の 5'-TGTCNN-3' (N は A, T, G または C) モチーフが 7 または 8 塩基対のスペーサを挟む逆向き反復状に並べられた DNA 鎖と特に強く結合する、ということが示唆されていた。しかし、ARF 二量体による逆向き反復型 AuxRE の認識の、生きた植物体内での遺伝子調節における重要性は明らかにされていなかった。

この問題の解決を目指して、既知 ARF 標的遺伝子の分子生物学的な解析により、転写因子二量体-モチーフ反復型 AuxRE 間相互作用の重要性を探った。対象には、派遣先研究室にて同定された ARF5 の直接標的の一つ、TARGET OF MONOPTEROS5 (TM05) を選択した。まず TM05 の 5'-制御領域を調べたところ、二つの AuxRE 様モチーフ (GGTCTC; TGTCGA) が、7 塩基対を挟んだ逆向き反復状 (7-bp-spaced inverted repeat, IR7) に配置された部位が見つかった。レポ

ーター遺伝子を用いた解析の結果、この部位は *TMO5* の発現を大きく左右するシスエレメントだとわかった。加えて、二つのモチーフが、相加的ではなく相乗的に機能していることが示唆された。すなわち、このシスエレメントは、二量体化した ARF の標的となっている可能性が高いと考えられる。

さらに、この遺伝子スイッチの発生学的重要性を確かめた。*tmo5 tmo5ll* 機能欠損株シロイヌナズナを用いた表現型回復試験の結果から、根の bisymmetric な維管束組織の形成には、二つのモチーフの協調的な働きが必要であることがわかった。同様の配列が維管束植物のゲノム上で高度に保存されていることから、ARF 多量体による、*TMO5* 上流のモチーフ反復型 AuxRE の認識は、シロイヌナズナに限らず、様々な植物種の維管束パターン形成を支える生化学的要素だと推測する。



5' -TGTCGGCCTTTGGCCGACA-3'
3' -ACAGCCGGAAACCGGCTGT-5'

図. (上) DNA に結合したシロイヌナズナ ARF1-DBD の結晶構造。二量体化したタンパク質が、7 塩基対のスペーサを挟む逆向き反復状に配置された 5'-TGTCGG-3'モチーフに結合している。個々のタンパク質分子をシアンまたは灰色、DNA 鎖をオレンジで示す。(下) 結晶化に使用した二本鎖 DNA の配列。TGTCGG モチーフにあたる部位をオレンジで示す。

(Freire-Rios, Tanaka *et al.* 2020
PNAS で発表した図を一部改変)

モチーフ反復型エレメントとオーキシン応答性のゲノムワイドな関連解析

TMO5 を用いた試験から得られた知見は、細胞内でも、ARF は多量体を形成し、複数の結合モチーフが特定の向き・間隔で配置された DNA 鎖に強く結合する、という考えを支持する。続いて、同様の制御機構がオーキシン応答一般に共通して見られるのか、IR7 以外にどのような構造の DNA エレメントが ARF と高親和性結合し得るのか、という問いが生まれた。これらに答えるには *in vivo* での網羅的な解析が必要となる。

モチーフ反復型 AuxRE の構造と機能の関係をゲノムワイドスケールで調べるため、シロイヌナズナトランスクリプトームデータセットを収集し、オーキシン応答性遺伝子（オーキシン処理後に発現レベルが上昇または低下する遺伝子）の 5'-上流領域（-1500 bp まで）に TGTCNN モチーフの反復が出現する頻度を解析した。なお、このとき、モチーフの向きやスペーサの長さが異なる 30 種類の構造について別個に調べている。その結果、特定の反復エレメントとオーキシン応答性の間の関連が見出された。

5 塩基間隔の直列反復エレメント (5-bp-spaced direct repeat, DR5) は、オーキシン処理後に発現レベルが上がる遺伝子の 5'-上流に高い頻度で見られた。他方、8 塩基を挟んだ逆向き反復エレメント (8-bp-spaced inverted repeat, IR8) は、発現上昇に加えて、発現低下型の応答との関連も示した。これらの発見から、反復型 AuxRE の働き方は、構成するモチーフの向きやスペーサの長

さによって変化すると考えられる。

以前から、レポーター遺伝子上流に、TGTCTC または TGTCGG モチーフを 5 ヌクレオチド間隔で直列に並べた配列をつなぐことで、優れたオーキシンセンサーを構築できることが知られていた。一方、IR8 構造のシスエレメントと遺伝子のオーキシン応答性の関係は、深く研究されていなかった。そこで、早期オーキシン応答性遺伝子 *IAA11* の発現制御における IR8 エレメントの重要性を、レポーター遺伝子を用いた試験などにより調べた。その結果、*TMOS5* 遺伝子上流の IR7-AuxRE を対称とした実験で見られたのと同様に、多量体化した ARF によって IR8 エレメントが認識されることを支持するデータが得られた。

ARF-モチーフ反復型 AuxRE 間結合親和性の比較解析

反復型 AuxRE の構造と生理的機能の関係は、ARF メンバーに対する結合親和性の差を反映していると予想される。そこで、ARF-DNA 間相互作用を定量的に比較評価するための *in vitro* 解析を実施した。

陸上植物の ARF は、系統的に 3 つのクラス (A, B, C) に分けられる。これまでの研究で、クラス A に属する ARF は標的遺伝子の転写を活性化できること、一方、クラス B または C に属する ARF は転写抑制能を持つことが示されている。シロイヌナズナ ARF5 (A クラス) とシロイヌナズナ ARF1 (B クラス) を大腸菌を用いて調製し、IR8 配列と DR5 配列それぞれに対する結合の強さを比べた。結合親和性は、蛍光標識した二本鎖 DNA を用いた一分子 Förster resonance energy transfer (FRET) 法で求めた。いずれの DNA 配列を用いた場合も、ARF5 は、ARF1 に比べて高い結合親和性 (小さい解離定数) を示した。さらに、どちらの ARF も、IR8 に対して、より高い親和性を示した。言い換えると、A クラス ARF と IR8 の結合が最も強く、A クラス-DR5 ならびに B クラス-IR8 の組み合わせがそれに続く。そして、B クラス ARF と DR5 の結合は、他の組み合わせに比べて格段に弱い (表)。

表. ARF-DNA 間相互作用解析にて算出された解離定数

	IR8	DR5
ARF5 (A クラス)	9 ± 4 nM	60 ± 20 nM
ARF1 (B クラス)	140 ± 80 nM	570 ± 90 nM

これら結合親和性解析の結果と、上のトランスクリプトームデータ解析および分子生物学試験で得られた知見をもとに、ARF 多量体とモチーフ反復型 AuxRE による遺伝子制御の生化学的基盤について考察した。「IR8 などの逆向き反復 AuxRE は、A クラスと B クラスの ARF いずれとも強く結合できるので、両クラスの ARF が混在する細胞内では、オーキシンによる発現上昇と低下の両面で機能し得る。一方、DR5 などの直列反復エレメントは、B クラス ARF とは十分に強く結合しないため、A クラス ARF に占有される。その結果、発現上昇に偏った AuxRE として働いている」というモデルを新たに提案した。

上記の成果をまとめた論文を *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 誌に発表した [文献]。また、植物成長調節物質に関する学会では最大規模である The 23rd international conference on plant growth substances をはじめ、複数の国際学会と国内学会にて成果を報告した [学会発表]。植物化学調節学会第 55 回大会では優秀発表賞を受賞した。

未発表のため詳細は伏せるが、上記の成果の他にも、ARF タンパク質分子内のとあるドメインが、これまで報告されていないタンパク質-タンパク質間相互作用に関わる可能性を示す実験結果を得ている。派遣先の受入研究者 Dolf Weijers 教授からデータ・試料の持ち出しについて許可をいただいているので、今後、機会が得られたら研究を大きく展開したいと考えている。

文献

1. Freire-Rios, A.* **Tanaka, K.***, Crespo I., van der Wijk, E., Sizentsova, Y., Levitsky, V., Lindhoud, S., Fontana, M., Hohlbein, J., Boer, DR., Mironova, V., and Weijers, D. (2020) Architecture of DNA elements mediating ARF transcription factor binding and auxin-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 117(39): 24557–24566.
*: 2 人は平等に貢献した

学会発表

1. オーキシン応答転写因子と高親和性結合する DNA エLEMENTの構造と働き (口頭), 植物化学調節学会第 55 回大会, 2020 年 11 月 15 日, オンライン開催
優秀発表賞受賞
2. Dissecting structure-function relationships of ARF-AuxRE genetic switches (口頭), AUXENTRIC Meeting, September 12 and 13, 2019, Zürich, Switzerland
3. Biochemical basis and physiological significance of the interactions between AUXIN RESPONSE FACTORS and high-affinity binding motifs (ポスター), The 23rd international conference on plant growth substances, June 25–29, 2019, Paris, France
4. *In planta* evaluation of interaction between auxin-responsive transcription factors and composite *cis*-elements (ポスター), Life2019, May 28 and 29, 2019, Bunnik, the Netherlands
5. Corroborating the association of composite *cis*-elements with auxin-mediated gene regulation (ポスター), Annual Meeting Experimental Plant Sciences, April 8 and 9, 2019, Lunteren, the Netherlands
6. Structure and action of auxin-responsive genetic switches (ポスター), 第 60 回日本植物生理学会年会, 2019 年 3 月 13 日～15 日, 名古屋