

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ストレプト藻類Klebsormidium nitensにおけるオーキシン応答遺伝子の発現制御に関わる転写因子の研究
Title(English)	
著者(和文)	唐司典明
Author(English)	Noriaki Tounosu
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12514号, 授与年月日:2023年9月22日, 学位の種別:課程博士, 審査員:下嶋 美恵,本郷 裕一,増田 真二,吉田 啓亮,加藤 明,太田 啓之
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12514号, Conferred date:2023/9/22, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

博士論文要約

ストレプト藻類 *Klebsormidium nitens* における
オーキシン応答遺伝子の発現制御に関わる
転写因子の研究

東京工業大学

生命理工学院

唐司 典明

指導教員 太田 啓之 教授

副指導教員 下嶋 美恵 准教授

目次

第1章. 序論	3
1-1. 陸上植物におけるオーキシニン応答	3
1-2. 核オーキシニン経路の確立	5
1-3. 藻類におけるオーキシニン応答	5
1-4. ストレプト藻類 <i>Klebsormidium nitens</i> におけるオーキシニン応答	6
1-5. 本研究の目的	8
第2章. 結果	9
2-1. KnRAV は <i>KnLBD1</i> のプロモーター配列を介して遺伝子を活性化する	9
2-2. B3 ドメイン転写因子の配列比較	9
2-3. KnRAV は <i>KnLBD1</i> プロモーターの特定領域を介して発現誘導に関わる	10
2-4. KnRAV は <i>KnLBD1</i> に存在する 5'-CCTG-3'配列に直接的に結合する	11
2-5. KnRAV は複数の IAA 応答遺伝子を活性化する	12
2-6. KnRAV の PB1 ドメインはホモダイマーの形成に関わる	14
2-7. 早期オーキシニン応答遺伝子の発現誘導に関わるシスエレメント探索	15
2-8. 2つの bZIP 転写因子はは複数の IAA 応答遺伝子を活性化する	15
第3章. 考察	16
3-1. <i>K. nitens</i> のオーキシニン応答遺伝子の発現に関わる転写因子 KnRAV	16
3-2. RY モチーフに結合する発現制御因子	18

3-3.	<i>K. nitens</i> におけるオーキシン応答に関わる二次的な遺伝子発現制御.....	19
第4章.	材料と方法	19
4-1.	プラスミド作製	20
4-2.	<i>N. benthamiana</i> におけるアグロインフィルトレーション	21
4-3.	GUS 活性の測定.....	22
4-4.	GUS:LUC 比の測定	23
4-5.	KnRAV-DBD 組み換えタンパク質の精製.....	23
4-6.	DNase I フットプリンティング	24
4-7.	ゲルシフトアッセイ	25
4-8.	<i>K. nitens</i> の培養	25
4-9.	RNA の調製.....	26
4-10.	CAGE-seq	27
4-11.	RT-qPCR.....	27
4-12.	酵母ツーハイブリッド法.....	27
4-13.	モチーフ解析.....	29
参考文献	56	
謝辞	63	

第1章. 序論

代表的な植物ホルモンであるオーキシンは、様々な植物で幅広い生理プロセスに関わる重要なシグナル分子であり、陸上植物の生活環や環境応答において、中心的な役割を果たしている。陸上植物においては、オーキシシグナルの主要な伝達機構として、核オーキシシ経路が知られており、多くの先行研究によって、その詳細な分子機構が明らかになっている。しかし、藻類においては、細胞内でのオーキシンの蓄積やオーキシンの添加による生育変化等、オーキシンの生理作用を示唆する報告があるにも関わらず、その役割や分子機構については未だ明らかになっていない。したがって、本研究では、藻類におけるオーキシシ応答機構を解明し、植物におけるオーキシシシグナル伝達機構の進化について知見を得るため、陸上植物の姉妹群であるストレプト藻類に属する *Klebsormidium nitens* (図 1) におけるオーキシシ応答機構の解明を目指した。

本章では、陸上植物及び藻類におけるオーキシシの作用とその応答機構について、先行研究によって明らかになっている知見を概説し、本研究の学術的意義について論述する。

1-1. 陸上植物におけるオーキシシ応答

植物ホルモンは、様々な発生段階や環境の変化に対する応答を担う重要なシグナル分子である (Santner et al., 2009; Wolters et al., 2009; Waadt et al., 2022)。その中でも、オーキシシは胚 (Friml et al., 2003; Stepanova et al., 2008) や組織の発生 (Yamada et al., 2009; Berleth et al., 2000)、光や重力に対する適応反応である屈性 (Friml et al., 2002; Okushima et al., 2005; Möller et al., 2010) を含む多くの生理プロセスに関わる代表的な植物ホルモンである。植物におけるオーキシシの生理作用についての研究は 1880 年に出版された Darwin 親子の著書 (Darwin and Darwin, 1880) に遡るが、オーキシシシグナル伝達を担う詳細な分子機構につ

いては、ここ数十年の研究によって多くのことが解明されてきた(Lavy and Estelle, 2016; Salehin et al., 2015)。

植物のオーキシンに対する中心的なシグナル伝達経路は、核オーキシン経路として知られ、遺伝子発現制御を介して細胞応答を誘導する。核オーキシン経路は、主要なシグナル伝達因子として、オーキシン受容体である transport inhibitor response 1/auxin signaling F-box (TIR1/AFB) (Ruegger et al., 1998; Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005; Tan et al., 2007; Calderón et al., 2012)、オーキシン応答の負の制御因子である auxin/indole-3-acetic acid (Aux/IAA) および転写因子である auxin response factor (ARF) によって構成される(図 2)。細胞内のオーキシン濃度が低い条件では、ARF 転写因子の機能は、Aux/IAA との相互作用によって抑制されている(Ulmasov et al., 1999; Korasick et al., 2014; Nanao et al., 2014)。それに対して、オーキシン濃度が高い条件では、細胞内に存在するオーキシン受容体 TIR1/AFB がオーキシンとの非共有結合を介して Aux/IAA と相互作用し、ユビキチンリガーゼとして機能する Skp1-Cullin-F-box (SCF) 複合体へリクルートすることで Aux/IAA のポリユビキチン化を誘導する(Gray et al., 2001; Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005)。ポリユビキチン化された Aux/IAA タンパク質はユビキチン-プロテアソーム系によって速やかに分解され(Maraschin et al., 2009)、Aux/IAA から遊離した ARF 転写因子の増加によって、その標的となるオーキシン応答遺伝子の発現が活性化される(Ulmasov et al., 1999; Korasick et al., 2014)。このような核オーキシン経路を介したオーキシン応答性の遺伝子発現制御機構は主に被子植物を用いた解析によって明らかにされてきた。特に、被子植物のモデル植物である *Arabidopsis thaliana* では 6 個の *TIR1/AFB* 遺伝子、29 個の *Aux/IAA* 遺伝子、23 個の *ARF* 遺伝子が同定されており(Hagen and Guilfoyle, 2002; Liscum and Reed, 2002)、これらのシグナル伝達因子が特異的に相互作用し合う組み合わせによって複雑な制御ネットワークが形成されていると考えられている(Calderón et al., 2012; Hong et al., 2013; Shimizu-Mitao and Kakimoto et al., 2014)。

1-2. 核オーキシン経路の確立

近年の比較ゲノム解析によって、これらの核オーキシン経路を構成する遺伝子はコケ植物を含む陸上植物に広く保存されていることが示された(Mutte et al., 2018)。コケ植物は陸上植物の中でも初期に分岐した基部陸上植物として知られており、セン類、タイ類およびツノゴケ類に分類される(図3)。セン類 *Physcomitrella patens* は、ゲノム配列が初めて解読されたコケ植物であり(Rensing et al., 2008; Lang et al., 2018)、5個の *TIR1/AFB* 遺伝子、3個の *Aux/IAA* 遺伝子、14個の *ARF* 遺伝子を獲得している(Mutte et al., 2018)。また、*P. patens* においては、実際にこれらの遺伝子がオーキシンシグナル伝達に関わっていることも実験的に示されている(Prigge et al., 2010; Lavy et al., 2016)。タイ類 *Marchantia polymorpha* が保有している核オーキシン経路は、1個の *TIR1/AFB* 遺伝子、1個の *Aux/IAA* 遺伝子、3個の *ARF* 遺伝子で構成され(Bowman et al., 2017)、*A. thaliana* と比較してはるかに単純である。しかし、これらのシグナル伝達因子の欠損は *M. polymorpha* の組織発生や成長において重大な表現型を引き起こすことから(Flores-Sandoval et al., 2015; Kato et al., 2015; Kato et al., 2020)、*M. polymorpha* においても、核オーキシン経路を介したオーキシンシグナル伝達が発生や生育といった基幹的な生理プロセスに関わっていることが示唆されている。また、ツノゴケ類 *Anthoceros agrestis* においても、同様に単純な構成からなる核オーキシン経路因子が見出されており、オーキシンシグナル伝達への関与が見込まれている(Mutte et al., 2018 ;Li et al., 2020)。これらの基部陸上植物においても核オーキシン経路が機能している事から、陸上植物の分岐以前に *TIR1/AFB*、*Aux/IAA*、*ARF* といった遺伝子が獲得され、核オーキシン経路が確立されたことが示唆される。

1-3. 藻類におけるオーキシン応答

一方、陸上植物と比較して、陸上植物以前に分岐した植物種におけるオーキシシンシグナル伝達機構については未だ未解明な点が多い。陸上植物において最も一般的な天然オーキシシンであるインドール-3-酢酸(IAA)は、様々な原核性のシアノバクテリアや真核性の藻類など、幅広い光合成生物で検出が報告されている(Lau et al., 2009; Tan et al., 2021)。また、それらの IAA が検出されたいくつかの生物種では、IAA や他のオーキシシン類縁体の処理が成長やその他の生理プロセスに影響を及ぼすことが報告されている。これらのことから、何らかのオーキシシンシグナル伝達機構が陸上植物の出現以前に存在していたと考えられるが、そのシグナル伝達機構については明らかではない。近年、多くの藻類のゲノム配列やトランスクリプトームデータが利用可能となったことによって、藻類に保存されているオーキシシン関連遺伝子の予測や配列解析が可能となった。その結果、陸上植物の側系統群であるストレプト藻類(図 3)に属するいくつかの生物種においては、Aux/IAA や ARF といった核オーキシシン経路の構成因子の祖先的なタンパク質が部分的に獲得されているものの、オーキシシン受容体である TIR1/AFB は陸上植物以外では見つかっていない(Mutte et al., 2018; Martin-Arevalillo et al., 2019)。よって、TIR1/AFB 受容体を含む完全な核オーキシシン経路は陸上植物でのみ確立されており、ストレプト藻類においては原始的なオーキシシンシグナル伝達機構として TIR1/AFB を介さないシグナル伝達機構が機能していることが予想された。このような原始的なオーキシシンシグナル伝達の分子機構を解明することによって、植物におけるオーキシシンシグナルの進化過程に対する重要な知見を得られると考えられるが、現在に至るまで、藻類のオーキシシンシグナル伝達やそれを担う因子について明らかになっていない。

1-4. ストレプト藻類 *Klebsormidium nitens* におけるオーキシシン応答

当研究室の先行研究では、ストレプト藻類の一種である *Klebsormidium nitens* (図 1)において、IAA が検出され(Hori et al., 2014)、外生オーキシシン処理によって細胞増殖の抑制や

細胞サイズの増大が観察された(Ohtaka et al., 2017)。また、*K. nitens*では、他の多くの藻類と同様に核オーキシン経路に関わる *TIR1/AFB*、*Aux/IAA*、*ARF* 遺伝子が存在しないにもかかわらず、オーキシン処理によって、*lateral organ boundary domain 1 (KnLBD1)*を初めとした多くの遺伝子の発現が誘導されることが示された。特に、*KnLBD1* 遺伝子の発現誘導はオーキシン処理後 1 時間でも観察され、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド(CHX)の存在下においても発現が誘導される。これらのことから、*K. nitens*は *TIR1/AFB* 非依存性のオーキシンシグナル伝達を介して、遺伝子発現や成長を制御していると考えられる。また、*K. nitens*と同属である *K. flaccidum*を用いた研究では、陸上植物においてオーキシントランスポーターとして知られる PIN-formed(PIN)のホモログが *K. flaccidum*においても保存され、発現していることが示された(Skokan et al., 2019)。また、KfPIN タンパク質は細胞膜に局在し、オーキシンの排出輸送体としての機能を保持していることから、オーキシンを介した細胞間コミュニケーションの存在が示唆された。以上の事から *Klebsormidium*のオーキシン応答は植物が藻類における原始的なオーキシン応答機構から陸上植物型の核オーキシン経路を獲得するまでの初期段階にあると考えられる。従って *Klebsormidium*のオーキシン応答機構の解明は、藻類から陸上植物に至るオーキシンシグナルの進化過程を明らかにする上で重要な知見となる。

当研究室では、*K. nitens*におけるオーキシン応答機構に関わるシグナル伝達因子を同定するために、オーキシン応答性の遺伝子発現制御に関わる転写因子の探索を行ってきた。その解析の1つとして、*K. nitens*の遺伝子上流に存在するプロモーター配列に対してモチーフ解析を行った結果、いくつかの配列モチーフが *K. nitens*のオーキシン応答遺伝子のプロモーター配列に高頻度で存在することが示された(堀、未発表、図4)。それらのモチーフには viviparous 1 (VP1)/abscisic acid insensitive 3 (ABI3)や fusca 3 (FUS3)を含むいくつかの B3 ドメイン転写因子の結合モチーフである RY モチーフ(Suzuki et al., 1997; Kroj et al., 2003; Mönke et al., 2004)が見出された。この結果から、B3 ドメインを持つ転写因子が関与

していると考え(瀬底、平成 30 年度修士論文、図 5)、被子植物 *Nicotiana benthamiana* における一過的発現系を用いて、代表的なオーキシン応答遺伝子 *KnLBD1* のプロモーター配列を介した転写活性化能を持つ B3 転写因子を探索した。その結果、被子植物における related to ABI3/VP1 (RAV) 転写因子(Kagaya et al., 1999)と類似した KnRAV 転写因子が *KnLBD1* の発現誘導に関わる転写活性化因子であることが示唆された(瀬底、平成 30 年度修士論文、図 6)。

1-5. 本研究の目的

KnRAV タンパク質は被子植物の RAV 転写因子と同様に、DNA 結合ドメインとして B3 ドメイン以外にも、*apetala 2* (AP2) ドメインを保持している(図 5)。また、オーキシシンシグナル伝達因子である ARF や Aux/IAA に広く保存されている Phox and Bem1 (PB1) ドメインが、KnRAV にも存在していた。PB1 ドメインは ARF および Aux/IAA タンパク質と、他の ARF や Aux/IAA 分子との間の相互作用を担う機能ドメインであり、核オーキシン経路を介した発現制御のスイッチ機構に重要な役割を果たしている(Lavy and Estelle, 2016; Salehin et al., 2015)。したがって、KnRAV の機能解析は *K. nitens* におけるオーキシン応答性の遺伝子発現制御機構についてだけでなく、陸上植物における核オーキシン経路の確立に関与した分子基盤の知見にも繋がることを期待できる。

本研究では、*K. nitens* のオーキシン応答における遺伝子発現制御と KnRAV 転写因子との関係を明らかにし、原始的なオーキシン応答に関わる転写因子の関与を明らかにする事を目的とした。そのため、KnRAV の DNA 結合に関わるシスエレメント配列の同定や、KnRAV による活性化の標的となる遺伝子についてさらなる解析を行い KnRAV の特性を明らかにした。さらに、cap analysis of gene expression (CAGE)-seq を用いたトランスクリプトーム解析のデータをもとに、早期オーキシン応答遺伝子を同定し、その発現誘導に関わる

シスエレメントと転写因子の探索を行った。これらの結果に基づき、*K. nitens* における原始的なオーキシン応答機構の特徴とその進化について議論する。

第2章. 結果

2-1. KnRAV は *KnLBD1* のプロモーター配列を介して遺伝子を活性化する

本研究では、初めに *Klebsormidium* のオーキシン応答に関与することが期待された KnRAV による *proKnLBD1* のプロモーター活性の上昇を *N. benthamiana* 葉における一過発現系により再確認した。瀬底らの先行研究と同様に、カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーターに接続した KnRAV 遺伝子(*pro35S::KnRAV*)と *proKnLBD1::β-glucuronidase (GUS)*を、*N. benthamiana* 葉において共発現させた。その結果、陰性コントロールとして *GFP* 遺伝子を共発現させたサンプルと比較して、顕著な GUS 活性の上昇が観察された(図7)。これらの結果から、KnRAV 転写因子が RY モチーフを介して *proKnLBD1* に結合し、下流の遺伝子発現を誘導していることを期待し、KnRAV に対する解析を行った。

2-2. B3 ドメイン転写因子の配列比較

KnRAV と他の B3 ドメインタンパク質との配列比較を行うため、KnRAV タンパク質の B3 ドメイン配列を用いた BLAST 検索(Altschul et al., 1990)によって得られた類似タンパク質の配列に対して、系統解析を行った。その結果、KnRAV が保有する B3 ドメインは、被子植物において RY モチーフへの結合が報告されている VP1/ABI3 や FUS3 といった leafy cotyledon 2-ABI3-VAL (LAV)サブファミリー(Romanel et al., 2009)とは異なる RAV サブファミリーに分類されることが示された(図8)。さらに、被子植物の B3 ドメインタンパク質を用いた過去の研究では、立体構造解析によって、B3 ドメインを構成するアミノ酸配列の中で、DNA と直接的に相互作用するアミノ酸残基が同定されている(Swaminathan et al., 2008; Sasnauskas et al., 2018; Martin-Arevalillo et al., 2019)。これを参考に B3 ドメ

ンのアミノ酸配列を比較したところ、KnRAV-B3 ドメインを構成するアミノ酸の内、DNA との相互作用に関わることが予測されるアミノ酸残基は、VP1/ABI3 や FUS3 よりもむしろ、RAV に分類される転写因子に類似した特徴を持っていることが示された(図 9)。

これらの結果によって、KnRAV 転写因子の B3 ドメインが、当初の予想とは異なり、*KnLBD1* プロモーター領域に存在する RY モチーフとは別の DNA 配列を介して遺伝子発現を誘導している可能性が示唆された。

2-3. KnRAV は *KnLBD1* プロモーターの特定領域を介して発現誘導に関わる

KnRAV による遺伝子発現の制御に関わる DNA 配列を同定するために、転写因子のスクリーニングに使用した *KnLBD1* プロモーター(転写開始点から上流の-1,727 bp)の数カ所から上流側を除去した配列(翻訳開始点から上流の-711, -643, -589, -489, -396, -296 bp)(図 10A)について、GUS 遺伝子を接続したアグロバクテリウム感染用コンストラクトを作製した。このコンストラクトの T-DNA 領域には GUS 遺伝子カセットの他に、アグロバクテリウムに由来するノパリン合成酵素プロモーターとホタルルシフェラーゼ遺伝子を接続したカセット(*proNOS::LUC*)を導入した。これによって、GUS 活性と LUC 活性の比率を用いた正確なプロモーター活性の測定を可能にした。-1,727 から-589 までの配列を除去した *KnLBD1* プロモーター配列は、陰性対照として行った 35S 最小プロモーター(*pro35Smini*)と比較して、KnRAV の共発現により GUS : LUC 比の変化が顕著に増加し、転写の活性化がみられた(図 10B)。それに対して、-489 の位置で切断した *KnLBD1* プロモーター配列は、KnRAV による GUS : LUC 比の変化が *pro35Smini* と比較して顕著ではなかった。さらに、-396 および-296 では、-489 より上流の位置で切断した *KnLBD1* プロモーターよりもさらに KnRAV に対する応答性が低下した(図 10B)。このことから、KnRAV による遺伝

子の発現誘導に必要な配列が *proKnLBD1* の-589 から-396 の領域に存在することが示唆された。

2-4. KnRAV は *KnLBD1* に存在する 5'-CCTG-3'配列に直接的に結合する

KnRAV が *proKnLBD1* の-589 から-396 までの領域に直接結合するか検証するために、*in vitro* DNA 結合アッセイを用いた DNA-タンパク質間の相互作用解析を行った。まず、KnRAV タンパク質の AP2 および B3 ドメインを含む DNA 結合ドメイン領域配列の C 末端に 6xHis タグ配列を付加した組み換えタンパク質(KnRAV-DBD、図 11A)を、大腸菌内で isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)によって発現誘導するコンストラクトを作製した。この KnRAV-DBD タンパク質を発現誘導した菌体を用いて、ニッケルレジンによる精製を行い、KnRAV-DBD タンパク質の精製溶液を得た(図 11B)。

次に、KnRAV の *KnLBD1* プロモーター配列に対する結合性とその結合サイトを検証するために、KnRAV-DBD タンパク質と、*KnLBD1* プロモーターの-589 から-296 までの領域を含む蛍光標識 DNA 断片を用いた DNase I フットプリンティング解析を行った。DNase I フットプリンティング解析は、末端を標識した DNA 断片の DNase I 消化断片を電気泳動によって分析することによって、DNA 結合タンパク質存在下では、その結合領域の DNase I 消化が立体障害的に阻害され、対応する泳動位置のピーク(バンド)強度が減衰することを利用した解析手法である(図 12)。KnRAV-DBD タンパク質と、*KnLBD1* プロモーターの-589 から-296 までの領域を含む 6-carboxyfluorescein(FAM)蛍光標識 DNA 断片を用いて DNase I フットプリンティング解析を行ったところ、-460 から-425 までの領域で切断された DNase I 消化ピークが顕著に減少していた(図 13、14A-C)。この結果から、KnRAV-DBD

タンパク質が *KnLBD1* プロモーターの当該領域に存在する DNA 配列に特異的に結合することが示唆された。

過去の研究によって、*A. thaliana* に存在する RAV 転写因子である AtRAV1 の B3 ドメインは、5'-CACCTG-3'を含む配列に対して優先的に結合するが、それ以外にも、5'-CCTG-3'を含む広い配列に結合しうることが示されている(Kagaya et al., 1999)。*KnLBD1* プロモーターの-460 から-425 までの領域には、5つの 5'-CCTG-3'配列が存在しており(図 15A)、KnRAV-DBD がこれらの複数の配列に対して結合していることが考えられた。よって、これらの DNA 配列が KnRAV-DBD の DNA 結合に寄与しているかどうか検証するため、ゲルシフトアッセイ(electrophoresis mobility shift assay)を行った。その結果、*KnLBD1* プロモーターの-462 から-421 までの領域を含む cyanine 5.5(Cy5.5)蛍光標識プローブでは、KnRAV-DBD の存在下で泳動度が遅延したバンドが観察された(WT、図 15B)。また、当該領域に存在する 5つの 5'-CCTG-3'配列の内、3つに対して変異を導入したところ(mut1、図 15B)、WT と同様のバンドシフトが観察された。それに対して、全ての 5'-CCTG-3'配列に対して変異を導入したプローブでは、WT で観察されたバンドシフトは観察されなかった(mut2、図 15B)。この結果は、KnRAV-DBD は複数の 5'-CCTG-3'を介して直接的に *KnLBD1* プロモーターに結合し、下流の遺伝子を活性化していることを示唆している。

2-5. KnRAV は複数の IAA 応答遺伝子を活性化する

KnRAV が *KnLBD1* を直接標的とする転写活性化因子であることが示唆されたことから、KnRAV が他のオーキシン応答遺伝子も活性化するか検証した。

まず、*K. nitens* におけるオーキシシンシグナル伝達によって一次的に制御されている可能性の高い遺伝子を同定するため、外生 IAA を 1 時間処理した藻体を用いて、トランスクリプトーム解析を行った。また、オーキシン応答を介して発現が誘導された制御因子による二

次的な影響を抑制するために、翻訳阻害剤である CHX の存在下で IAA 処理した藻体に対しても同様に解析を行った。これらの藻体から抽出した RNA を用い、CAGE-seq によるトランスクリプトーム解析(Murata et al., 2014)を行った。CAGE-seq は、RNA プロセッシングの過程で mRNA の 5'末端に付加される 7-メチルグアニル酸によるキャップ構造をビオチン化し、ストレプトアビジンによって精製することで、転写開始点付近の cDNA 配列に由来するリード(CAGE タグ)を特異的に取得することが可能である(図 16)。CAGE タグは、mRNA の 5'キャップで逆転写が停止した位置を反映していることから、遺伝子発現量の算定に利用できるだけでなく、遺伝子の転写開始点の予測が可能である(CAGE-tag transcription start site, CTSS)。近隣にマッピングされた CTSS の集団は CTSS クラスターと呼ばれ、同一クラスター内にマッピングされた CAGE タグのリード数が該当する転写開始点から転写された mRNA 量を表す。それぞれのサンプルに対して検出された CTSS クラスターにマッピングされたリード数を比較すると、CHX 非存在下(図 17A)および存在下(図 17B)ともに、IAA 処理後 1 時間という短時間においても様々な遺伝子の発現に影響があることがわかった。特に、IAA 処理によって、CHX 非存在下では 86 遺伝子、CHX 存在下では 150 遺伝子の発現が顕著に増加した(図 17A-C)。これらのうち 16 遺伝子は CHX の有無に関わらず発現の増加が見られた(図 17C)。

これらの IAA 処理による発現上昇の再現性を確認するために、CHX の有無に関わらず IAA によって発現上昇が見られた 5 つの遺伝子に対して、RT-qPCR を用いた発現解析を行った。また、CHX 存在下での CAGE-seq 解析では発現上昇が有意でなかったものの、CHX 非存在下では発現上昇し、先行研究においては CHX 存在下における 6 時間の IAA 処理で発現誘導が観察された *KnLBD1* についても同様に解析を行った。その結果、*KnLBD1*、*kfl00026_0070*、*kfl00255_0070*、*kfl00664_0040* の 4 遺伝子は、CHX の有無に関わらず IAA 処理によって顕著に発現上昇した(図 18)。*kfl00322_0070* と *kfl00322_0100* の 2 遺伝子は、

IAA によって発現が上昇する傾向はあるものの有意ではなかったが、CHX の存在下では IAA によって顕著に発現が上昇した(図 18)。

これらの遺伝子において、CHX の有無に関わらず IAA による発現上昇が生じる遺伝子は特にオーキシシグナル伝達による直接的な標的遺伝子である可能性が高いと考え、その内、*kn00255_0070* と *kn00664_0040* の KnRAV による活性化を検証した。*KnLBD1* プロモーターと同様、これらの遺伝子プロモーターに *GUS* 遺伝子を接続し、*N. benthamiana* 葉において、KnRAV と共発現したところ、どちらの遺伝子プロモーターも KnRAV によって顕著に *GUS* 活性が上昇した(図 19)。これらの結果から、KnRAV 転写因子はオーキシシグナル応答遺伝子を広く活性化しており、TIR1/AFB 受容体を持たない *K. nitens* においてオーキシシグナル応答の遺伝子発現制御に関わっている可能性を提示している。

2-6. KnRAV の PB1 ドメインはホモダイマーの形成に関わる

オーキシシグナル応答遺伝子の発現制御に KnRAV が寄与する可能性が示されたことから、核オーキシシグナル経路と同様に、PB1 ドメインを介して KnRAV と相互作用する因子が、KnRAV の機能を制御していることが期待された。Pfam データベースを用いて、ドメイン検索を行ったところ、KnRAV 以外に、6 個の PB1 ドメインを保有するタンパク質が検出された。そこで、KnRAV 以外の 6 つの PB1 ドメインタンパク質と KnRAV タンパク質を用いて、酵母ツーハイブリッド法を用いた相互作用解析を行った。その結果、KnRAV は他の 6 つの PB1 ドメインタンパク質とは相互作用を示さなかった一方で、KnRAV 自身と相互作用することが示された(図 20)。したがって、KnRAV の PB1 ドメインはホモダイマー(オリゴマー)の形成を通して、KnRAV の機能に関わっている可能性が示唆された。

2-7. 早期オーキシン応答遺伝子の発現誘導に関わるシスエレメント探索

先述の通り、*K. nitens*において、1時間のオーキシン処理によって発現上昇する遺伝子群が CAGE-seq によって同定された。これらの早期オーキシン応答遺伝子の発現誘導に関わる制御機構についてさらなる知見を得るため、それらのプロモーター領域に対するモチーフ解析をおこなった。

まず、オーキシン処理によって発現上昇を示す CTSS クラスターの上流 800 塩基から下流 200 塩基までの領域の配列を取得し、モチーフ解析を行った。また、これらのオーキシン応答性プロモーターと比較するため、オーキシンによる発現変化がほとんど見られない CTSS クラスターに対しても同様にモチーフ解析を行った。その結果、オーキシン応答を示すプロモーター領域に高頻度で存在する 6 塩基配列のパターンは翻訳阻害剤 CHX の有無によって大きく変化することが見出された。また、CHX 非存在下と比較して、CHX 存在下でオーキシン応答を示すプロモーターにおいては、特定の配列モチーフが、より有意に濃縮されていた。このことから、CHX 存在下ではオーキシンシグナル伝達の一次的な標的となる遺伝子発現が濃縮されて観察されていると考えられた。CHX 存在下におけるオーキシン応答性プロモーターに高頻度で存在する複数のモチーフは被子植物において特定の bZIP 転写因子の結合モチーフとして既知の配列であった。このことから、当該モチーフに結合する bZIP 転写因子が、*K. nitens*における早期オーキシン応答遺伝子の発現制御に関わっている可能性が考えられた。

2-8. 2つの bZIP 転写因子は複数の IAA 応答遺伝子を活性化する

*K. nitens*において当該モチーフへの結合が予想された2つの bZIP 転写因子に対して、それぞれオーキシン応答遺伝子のプロモーター活性への影響を測定した。その結果、どちらの bZIP 遺伝子を共発現した場合においても、*KnLBD1* や *kfl00255_0070*、*kfl00664_0040* といったオーキシン応答性遺伝子のプロモーター活性が顕著に上昇することが示された。

このことは、これらの bZIP 転写因子が、*K. nitens* におけるオーキシシン応答遺伝子を広く活性化しうることを示唆している。

これらの結果は、*K. nitens* におけるオーキシシン応答性遺伝子の発現には KnRAV や、本解析によって同定した 2 つの bZIP 転写因子を含む複数の転写因子が関わっており、このような遺伝子発現の制御機構が *K. nitens* に存在するオーキシシンシグナル伝達に関わっている可能性を提示している。

第3章. 考察

TIR1/AFB 受容体を介した核オーキシシン経路は、植物の発生段階や環境刺激に応じて遺伝子発現を制御する機能モジュールとして、陸上植物に幅広く保存されており、TIR1/AFB は中心的なオーキシシン受容体として広く認められている (Mutte et al., 2018; Lavy et al., 2016; Flores-Sandoval et al., 2015; Kato et al., 2015; Kato et al., 2020)。それに対して、藻類では TIR1/AFB 受容体は発見されておらず、何らかのオーキシシン応答の存在が推定される藻類においても、そのオーキシシンシグナル伝達機構については全く明らかになっていなかった。

本研究では、藻類におけるオーキシシンシグナル伝達を担う分子機構を解明し、陸上植物の核オーキシシン経路の成り立ちを明らかにする事を目的とした。そこで、TIR1/AFB が介さないオーキシシンシグナル伝達機構の存在が推定されるストレプト藻類 *K. nitens* において、オーキシシン応答性の遺伝子発現制御に関わる制御因子の探索を行った。

3-1. *K. nitens* のオーキシシン応答遺伝子の発現に関わる転写因子 KnRAV

当研究室の先行研究において、オーキシシン応答遺伝子 *KnLBD1* の発現を活性化する KnRAV 転写因子が同定されている (瀬底、平成 30 年度修士論文)。この *KnLBD1* 遺伝子の活性化に KnRAV がどのように作用しているか明らかにするために、タンパク質-DNA 間の

相互作用を解析したところ、KnRAV の B3 ドメインが複数の 5'-CCTG-3'モチーフを介して、*KnLBD1* プロモーターに直接結合することによって制御されていることが示唆された(図 13-15)。また、KnRAV は、オーキシン処理によって短時間で発現上昇する複数の遺伝子の発現を活性化した(図 7、19)。これらの結果は、KnRAV がオーキシン応答性の遺伝子発現制御に関わっている可能性を示している。

KnRAV には、B3 ドメインの他に、DNA 結合ドメインである AP2 ドメインが存在している(図 5)。近年の研究では、B3 ドメインと同様、KnRAV の AP2 ドメインが典型的な AtRAV1 の AP2 ドメイン結合モチーフ(5'-CAACA-3')に結合しうる(Martin-Arevalillo et al., 2019)ことが報告されているため、B3 ドメインと協働することによって DNA との親和性やその特異性が制御されている可能性が考えられる。これらの DNA 結合ドメインに加えて、KnRAV は、核オーキシン経路における遺伝子発現のスイッチ機構を担う PB1 ドメインを保有している。KnRAV に加えて、他のストレプト藻類やコケ植物 *M. polymorpha* の RAV 遺伝子には PB1 ドメインを保有するものが存在するが、その一方で、被子植物等の RAV 遺伝子には PB1 ドメインが保存されていない(Martin-Arevalillo et al., 2019; Mutte et al., 2018)。 *K. nitens* を始めとして、Aux/IAA や TIR1 が存在しない植物種において、これらの PB1 ドメインがオーキシシンシグナル伝達の制御に寄与するかどうかは未だ不明であるが、*K. nitens* に存在する他の PB1 ドメインタンパク質の内、KnRAV と PB1 ドメインを介して相互作用するものは見出されなかった(図 20)。したがって、KnRAV の PB1 ドメインはホモ多量体の形成に寄与していると思われる。KnRAV における PB1 ドメインの機能と原始的なオーキシン応答との関係は、植物におけるオーキシシンシグナルの進化過程を明らかにするためにさらなる研究の必要がある。

3-2. RYモチーフに結合する発現制御因子

先行研究におけるトランスクリプトームデータを用いたモチーフ解析では、10時間および3日間のオーキシン処理によって発現上昇した遺伝子のプロモーター領域に、RYモチーフ配列が高頻度で存在することが示された(図4)。これによって、被子植物においてRYモチーフとの結合が報告されているVP1/ABI3等のB3ドメイン転写因子(Suzuki et al., 1997; Kroj et al., 2003; Mönke et al., 2004)と配列類似性の高い転写因子が、*K. nitens*のオーキシン応答性遺伝子発現に関与していることが予測された。しかし、RYモチーフとの結合が期待されたKnRAVのB3ドメインについては、5'-CCTG-3'モチーフとの結合性が示された(図15)。*KnLBD1*プロモーター領域には複数のRYモチーフが存在するが、*N. benthamiana*を用いた一過的発現系で*KnLBD1*プロモーターを活性化したB3ドメイン転写因子はKnRAVのみであった(図6)。これらのことは、*K. nitens*においてRYモチーフへの結合を介してオーキシン応答性遺伝子の発現制御に関わる未同定の転写因子の存在が期待される。被子植物では、VP1/ABI3タンパク質は他のタンパク質と相互作用し、標的遺伝子の発現を制御することが報告されている(Bulgakov and Koren, 2022)。例えば、*A. thaliana*において、ABI3はABI5(Nakamura et al., 2001)やphytochrome-interacting factor 1/phytochrome-interacting factor 3-like 5(PIF1/PIL5)(Park et al., 2011)といった転写因子と相互作用し、協働することで遺伝子発現を調節することが知られている。*K. nitens*において、RYモチーフとオーキシン応答制御の関係は、B3転写因子と他の因子との機能的な相互作用の有無、あるいは発現抑制因子としての機能を含めてさらなる解析が必要である。

いくつかの緑藻では、B3転写因子を獲得しているが、その遺伝子数は少ない(Romanel et al., 2009; Bowman et al., 2017)。しかし、B3転写因子ファミリーは、ストレプト植物の進化の過程で、RAVやARF、reproductive meristem(REM)等の出現によって、大幅に遺伝子数が増加したことが明らかにされている。このようなB3ドメイン転写因子の多様化は、

植物の進化において、核オーキシシン経路を確立するための分子基盤の一つとなった可能性が期待される。

3-3. *K. nitens* におけるオーキシシン応答に関わる二次的な遺伝子発現制御

CAGE-seq と RT-qPCR による遺伝子発現解析データを比較すると、CHX の有無にかかわらず、外生 IAA を 1 時間処理することによって、一定数の遺伝子が発現上昇していた(図 17)。これらの結果は、*K. nitens* において、オーキシシンシグナルを介して遺伝子発現が制御されていることを示唆する先行研究を支持するものである(Ohtaka et al., 2017)。一方で、CHX 非存在下での IAA 応答遺伝子と、CHX 存在下での IAA 応答遺伝子は、大半が重複していなかった(図 17C)。このことは、オーキシシンシグナル伝達因子を介した直接的な遺伝子発現制御以外にも、新規のタンパク質合成が 1 時間という短時間であってもオーキシシン応答の制御に重要であることが示唆された。

本研究では、*K. nitens* におけるオーキシシンシグナル伝達機構との関係が強く示唆されるシスエレメントや、RAV や bZIP といった転写因子の同定と解析によって、*K. nitens* における IAA 応答性の遺伝子発現制御について新たな知見を提供する事ができた。*K. nitens* におけるオーキシシンシグナル伝達機構を解明するうえで、これらの転写因子がどのようにオーキシシン応答に関わっているかを評価することが重要な課題である。そのためには、遺伝学的なアプローチが必要であり、*K. nitens* に適用可能な形質転換法の開発が必須であるが、より解析を深めることで、光合成生物におけるオーキシシンシグナル伝達の進化を理解するための重要な手がかりとなるだろう。

第4章. 材料と方法

4-1. プラスミド作製

GUS 遺伝子によるプロモーター活性測定用のプラスミドは、*in vivo E. coli cloning* (iVEC)法(Nozaki et al., 2019)を用いた相同組み換えによって作製した。プラスミドバックボーンには、pBI121 配列を、プライマーpBI121_right_R と GUS_F を用いた PCR によって増幅した断片を用いた。挿入するプロモーター配列は、相同組換えを行うため、5'末端に pBI121 由来の PCR 断片の末端配列を含むプライマーを用いて増幅した。プロモーター配列の鋳型には、*K. nitens* のゲノム DNA を使用した。これらの pBI121 と遺伝子プロモーターの DNA 断片を、大腸菌 iVEC3 株に形質転換することによって相同組み換えを行った。

GUS および LUC 遺伝子を含むプラスミド作製には、SLiCE 法による相同組換えを用いた(Okegawa et al., 2015)。まず、pBI121 を鋳型として、プライマーGUS_F_xhoI_pBI121_self と NOster_R_xhoI_pBI121_self で増幅した PCR 産物を分子内での相同組み換えによって閉環させた。この改変した pBI121 からプライマー M13_Fwd と pBI121_NOster_pEGB3_Fluc_fusion_F によって GUS 遺伝子カセットを増幅した。次に、プライマーRluc_Cter_F と Fluc_Cter_R で pEGB3 バックボーンを増幅し、先述の GUS カセットを接続した。最後に、プライマーpBI121_self_pvuII-XhoI_F と pBI121_self_pvuII-XhoI_R からプライマー伸長によって作製した 70bp 断片を、先述の改変 pEGB3 の PvuII 部位と XhoI 部位との間に挿入した。これによって得られたプラスミド pLG_XhoI を XhoI で消化し、組み換え配列を付加したプライマーを用いて増幅した *proLBD1* 配列をプラスミドに挿入した。

N. benthamiana における転写因子の発現プラスミドの作製には、*in vivo E. coli cloning* (iVEC)法による相同組み換えを用いた。まず、pBI121 プラスミドをプライマー ivec_pBI121_XhoI_fwd と ivec_pBI121_XhoI_rev で増幅した PCR 産物を XhoI 消化後、セルフライゲーションを行い、プラスミド pBI121-XS を作製した。次に、*K. nitens* の cDNA

から組換え配列を含むプライマーを用いて転写因子のコード領域の配列を増幅し、iVEC 法によりプライマー-ivec_35S_R および pBI121_left_F で増幅した PBI121-XS バックボーンに接続した。

大腸菌における KnRAV 組換えタンパク質の発現のために、KnRAV の DNA 結合ドメイン(AP2 および B3 ドメイン)を含む領域の配列をプライマー-EcoRI_NdeI_KnRAV_DBD_F と SalI_KnRAV_DBD_R を用いて増幅した。この PCR 産物と pET-21b(+)プラスミドを NdeI および SalI で消化し、ライゲーション反応によってプラスミド pET21b(+)/KnRAV-DBD を得た。

DNase I フットプリントに用いる FAM 標識プローブの調製のため、プライマー EcoRI_KnLBD1_pro_589_F および HindIII_KnLBD1_pro_296_R を用いて GUS 活性測定に用いたプラスミドから *proKnLBD1* 配列を増幅した。この DNA 断片とプラスミド pUC19 を EcoRI および HindIII で消化し、ライゲーションによって融合した。

EMSA に用いる Cy5.5 標識プローブ調製のため、*proKnLBD1* 配列(-462 から-421 まで)とその変異配列を含む DNA 断片を、DNA オリゴのアニーリングによって調製した。アニーリングした断片は、pUC19 の EcoRI と SalI サイトの間にライゲーションした。

4-2. *N. benthamiana* におけるアグロインフィルトレーション

GUS 活性および GUS:LUC 比の算出のため、アグロバクテリウム GV3101 株(pMP90)を用いたアグロインフィルトレーション(Ma et al., 2014)を実施した。アグロインフィルトレーションに用いる *N. benthamiana* 植物体は、事前に連続光(40-50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)下で 5~6 週間生育させた。作製した感染用プラスミドをアグロバクテリウムに凍結法を用いて形質転換した。加えて、GUS 測定では、サイレンシングサブレッサー-p19 発現用プラスミド pBIN61 P19 を導入した菌株をグリセロールストックから YEP 固体培地に播種した。得ら

れたコロニーを液体 YEP 培地で 30°C、20 時間培養した。培養液は 8000 × g、室温で 5 分間遠心分離後、上清を捨て、洗浄バッファー(10 mM MES/KOH pH 5.6、10 mM MgSO₄)で再懸濁した。この洗浄操作を計 3 回繰り返した後、インフィルトレーションバッファー(10 mM MES/KOH pH 5.6、10 mM MgSO₄、150 μM アセトシリンゴン)で懸濁した。この懸濁液を用いて、濃度を調整した菌液を用意した。GUS 測定の場合は、転写因子および GFP 発現プラスミド、GUS プラスミド、p19 発現用プラスミドを導入した菌液の OD₆₀₀ がそれぞれ 1.0、0.6、0.8 となるように調製した。GUS:LUC 比の測定の場合は、転写因子および GFP 発現プラスミド、GUS/LUC プラスミドを導入した菌液の OD₆₀₀ がすべて 0.6 となるように調製した。濃度調整したそれぞれの菌液を等量ずつ混合し、1 mL の針なしシリンジを用いて *N. benthamiana* 葉に浸潤させた。サンプリングは感染 2 日後に行い、浸潤したスポット内を 5 mm 角ずつ切り取り、1.5 mL チューブに回収し、液体窒素で凍結後、-80°C で保存した。

4-3. GUS 活性の測定

N. benthamiana 葉の凍結サンプルに 100 μL 抽出バッファー(50 mM リン酸ナトリウム pH 7.0, 10 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM Na₂EDTA, 0.1% lauryl sarcosine sodium, 0.1% (v/v) Triton X-100)を加え、ペッスルで磨砕し、13,000 × g、4°C で 5 分間遠心分離した上清を別のチューブに回収した。この GUS 抽出液の内、50 μL を等量のアッセイバッファー(2mM 4-methylumbelliferyl-d-glucuronide[4-MUG]を抽出バッファーで溶解したもの)と混合し、37°C で GUS 反応を行った。反応液はそれぞれ 0、30、60 分で 20 μL ずつ回収し、80 μL の 0.2 M 炭酸ナトリウムを加えて反応を停止した。反応生成物である 4-Methylumbelliferone (4-MU) の蛍光強度は、マルチラベルプレートリーダー(EnSpire 2300-00J、Perkin-Elmer)を用いて定量した。さらに、GUS 抽出液の内、10 μL を用いて、ブラッドフォード試薬によるタンパク質定量を行った。

4-4. GUS:LUC 比の測定

GUS:LUC 比の測定は過去の研究を参考にして実施した(Kanchiswamy et al., 2010)。 *N. benthamiana* 葉の凍結サンプルに 200 μ L の破碎バッファー(100 mM リン酸カリウム pH 7.8、 1 mM EDTA、 7 mM 2-mercaptoethanol、 0.1% (v/v) Triton X-100、 10% (v/v) グリセロール)を加え、ペッスルで破碎し、13,000 \times g、4°Cで5分間遠心分離後、上清を別のチューブに回収し、GUS および LUC 活性の測定に使用した。GUS 活性の測定では、タンパク質抽出液の4倍希釈液の内、50 μ L に対して、等量の GUS アッセイ溶液(2 mM 4-MU を破碎バッファーで希釈したもの)を加え、先述の GUS 活性の測定と同様に定量を行った。LUC 活性の測定では、タンパク質抽出液の20倍希釈液の内、10 μ L に対して、PIKAGENE アッセイキット(東洋インキ)およびマルチラベルプレートリーダー(EnSpire 2300-00J、Perkin-Elmer)を用いて定量を行った。

4-5. KnRAV-DBD 組み換えタンパク質の精製

大腸菌株 ArcticExpress (DE3) RIL (Agilent Technologies) に対して、プラスミド pET21b(+)/KnRAV-DBD を形質転換したコロニーを、100 mg/L アンピシリン、20 mg/L ゲンタマイシン、1%グルコースを含む 20 mL LB 培地で 37°C、一晩振とう培養した。次に、この培養液の内、10 mL を、抗生物質を含まない 500 mL の LB 培地 2 本にそれぞれ播種し、30°Cで振とう培養した。培養液が OD₆₀₀ = 0.5 になるまで培養した後、培養液を 13°C に移し、0.4 mM IPTG 処理下で一晩培養した。2,000 \times g、4°Cで10分間の遠心分離によって細胞を回収し、ペレットを 12.5 mL の超音波破碎バッファー(20 mM Tris-HCl pH 8.0、300 mM NaCl、1 mM dithiothreitol)で懸濁し、ULTRASONIC DISRUPTOR UD-211(TOMY)で細胞を破碎した。破碎液を 20,000 \times g、4°Cで5分遠心分離をした後、上清(タンパク質粗抽出液)を別のチューブに回収した。これによって得られた粗抽出液に対して、His60 Ni Superflow (Clontech)を用いた His-tag 精製を行った。Ni レジンによる精製

後、溶出バッファーに含まれるイミダゾールを除去するため、カラム溶出液を 500 mL のタンパク質保存バッファー(20 mM Tris-HCl pH 8.0、300 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM dithiothreitol)を用いて 4°Cで透析を行った。透析中は、2 回のバッファー交換を行った。透析後の精製溶液は、1.5 mL チューブに小分けし、-80°Cで保存した。

4-6. DNase I フットプリンティング

FAM 標識 DNA プローブを調製するために、-589 から-296 までの *KnLBD1* プロモーター配列を挿入したプラスミド pUC19 をプライマー FAM_M13_Fwd と KnLBD1_excised_-296_EMSA を用いて PCR 増幅し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)を用いてゲル精製を行った。次に、100 fmol の FAM 標識プローブを 50 μ L の 2 \times バッファー(20 mM Tris-HCl pH 7.5、100 mM KCl、10 mM MgCl₂、0.2 mM CaCl₂)および 2 μ g サケ精子 DNA、2 μ L の 5 mg/mL BSA (前述のタンパク質保存バッファーに溶解) と混合し、nuclease-free water で 90 μ L になるようにメスアップした。反応液での終濃度 3 μ M となるように事前に希釈した 5 μ L KnRAV-DBD 溶液を加え、25°C、30 分間インキュベートした。その後、酵素保存用バッファー(20 mM Tris-HCl pH 7.5、50 mM NaCl、0.1 mM CaCl₂、50% (v/v) グリセロール)で希釈した 10 mM recombinant DNase I (TaKaRa)を 5 μ L 加え、さらに 25°Cで 2 分間インキュベートした。最後に、反応を停止するために、反応液に対して等量の酸性フェノール：クロロホルム(1：1)を用いてフェノール-クロロホルム抽出を行った。20,000 \times g、4°Cで 5 分間遠心分離した後、上清をエタノール沈殿し、70%エタノールで 2 回洗浄した。ペレットを GeneScan 600 LIZ dye Size Standard (Thermo Fisher Scientific)を含む 15 μ L HiDi formamide (Thermo Fisher Scientific)に溶解し、3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific)でフラグメント解析を行い、Peak Scanner 2 (Applied Biosystems)で解析を行った。また、ピークの泳動度から *KnLBD1* プロモーター上の対応する位置を算出するために、プライマー FAM_M13_Fwd と-296, -368, -403, -442, -476, -532

から始まるプライマーで増幅した PCR 産物も同様にフラグメント解析を行った。サンプル間のエレクトロフェログラムの比較解析のために、検出ピークの正規化を以下の通り行った。各検出ピークについて、0 μ M KnRAV-DBD 条件の 3 サンプルのピーク平均と 3 μ M KnRAV-DBD 条件のピーク平均の log2 比を算出し、この log2 比が全検出ピーク中、上位 30%のピークと下位 30%のピークの値を除去した。残ったピークに対して、0 μ M KnRAV-DBD 条件のピーク平均に対する各サンプルのピークの log2 比の合計が 0 となるように正規化係数を計算した。

4-7. ゲルシフトアッセイ

Cy5.5 標識プローブ作製用に構築したプラスミドの配列を、プライマー Cy5.5_M13_Fwd、SalI_pLBD1_-462to-421_R またはこれらの変異プライマーを用いて増幅した。PCR 産物は MinElute Gel Extraction kit (Qiagen)を用いてゲル精製した。200 fmol の Cy5.5 標識プローブをそれぞれ 10 μ L の 2 \times 結合バッファー(20 mM Tris-HCl pH 7.5、0.2% (v/v) Triton X-100、5% (v/v) グリセロール)、2 μ L の 2 mg/mL BSA、2 μ L の 1 M KCl、2 μ g/mL heparin と混合し、DNase free water で 19 μ L までメスアップした。0、0.2、0.5 μ M の終濃度となるように事前に希釈した KnRAV-DBD タンパク質を 1 μ L を加え、25°C で 30 分間インキュベートした。2%アガロースゲル(0.25 \times TBE)を 100V で 90 分間プレラン後、反応液を 20 μ L ずつアプライし、150V で 60 分間、室温で電気泳動した。Cy5.5 で標識したプローブの蛍光は Odyssey Classic (RI-COR)で検出した。

4-8. *K. nitens* の培養

継代培養として、*K. nitens* NIES-2285 株を、0.1%グルコースを含む 50 mL BCDAT 液体培地で、23°C、10~20 μ mol photons m⁻² s⁻¹ の光照射下で 2 週間通気培養した。

RNA 抽出用サンプルの調製は以下の通り行った。培養液を $130 \times g$ 、10 分間の遠心分離により細胞を濃縮し、ペレットを 15 mL の遠心管に移し、新鮮な培地に懸濁した後、 $130 \times g$ で 5 分間遠心し、上清を廃棄した。同様に新鮮な培地でペレットを 3 回洗浄し、パッキングされたペレット容量の 8 倍となるように再懸濁した。CAGE-seq 用のサンプルでは、500 mL の新鮮な培地に 10 mL の懸濁液播種し、RT-qPCR 用のサンプルでは、50 mL の新鮮な培地に 1 mL の懸濁液を播種した。この細胞懸濁液に対して、24 時間の通気培養(前培養)を行った。この前培養液に対して、CHX は終濃度 0 mg/L または 10 mg/L、IAA は終濃度 0 μ M または 100 μ M となるよう薬剤ストック溶液を添加し、1 時間の通気培養を行った。CHX ストック溶液は 10 mg/mL となるように DMSO に溶解したものを使用した。IAA ストック溶液は 500 mM となるように 1 N NaOH に溶解したものを使用した。薬剤処理後は吸引ポンプを用いてニトロセルロース膜上に試料を採取し、液体窒素で凍結した。

4-9. RNA の調製

凍結した *K. nitens* サンプルは乳鉢と乳棒で細かい粉末上に破碎し、RNA 抽出バッファ (0.8% SDS, 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 25 mM MgCl₂, 25 mM KCl) と酸性フェノールをサンプル量の 3 倍量以上加え、更に破碎した後、2 mL チューブに回収し、 $20,000 \times g$ 、4° C で 10 分間遠心分離を行った。次に、分離した水層を等量の酸性フェノール:クロロホルム (1:1) で液液抽出を 3 回行い、抽出した水層をイソプロパノール沈殿した後、70%エタノールで洗浄した。このペレットを RNase free water に溶解し、recombinant DNase I (TaKaRa) で消化した。その後、酸性フェノール:クロロホルム(1:1)で 2 回抽出し、エタノール沈殿を行い、ペレットを RNase free water に溶解した。RT-qPCR にはこの RNA 溶液を用いた。CAGE-seq 用のサンプルには、RNA サンプルの 1/3 量の 10 M 塩化リチウムと混合し、-20°C で 1 時間以上インキュベート後、 $20,000 \times g$ 、4°C で 10 分間遠心した。ペレットは 2 M 塩化リチウムと 50 mM EDTA を含む溶液で洗浄後、70%エタノールでリンスした。さ

らに精製度を向上するために、RNeasy Mini or Midi kit (Qiagen)を用いてカラム精製を行い、CAGE-seq に使用した。

4-10. CAGE-seq

CAGE ライブラリーの調製と次世代シーケンス解析は株式会社 DNAFORM に委託して行った。CAGE タグのリードデータは、GFF ファイル(version 1.1) (Hori et al., 2014)と infernal (version 1.1.4) (Nawrocki and Eddy, 2013)による予測をもとに rRNA 配列をマスクした後、HISAT2 (version 2.2.1)(Kim et al., 2019)を用いて *K. nitens* ゲノム(version 1.0)にマッピングした。CTSS とクラスターの検出には CAGEr (version 2.2.0) (Haberle et al., 2015)を使用した。TMM 正規化やクラスターの統計解析には edgeR (version 3.38.1) (Robinson et al., 2010)を用いた。

4-11. RT-qPCR

cDNA 合成には、SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)とオリゴ dT プライマーを用いた。qPCR には、TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (TaKaRa)および Thermal Cycler Dice Real Time System III (TaKaRa)を用いて行った。ハウスキーピング遺伝子にはクエン酸合成酵素遺伝子(kf100009_0420)を使用した。

4-12. 酵母ツーハイブリッド法

酵母ツーハイブリッド法を用いた相互作用解析を行う前に、Pfam データベースを用いたドメイン検索によって、*K. nitens* に存在する KnRAV 以外の PB1 ドメインを含むタンパク質の探索を行った。その結果、同定された 7 遺伝子の内、先行研究で実施したトランスクリプトームデータをもとに、発現が確認できた 6 遺伝子について酵母ツーハイブリッド用プラスミドへのクローニングを行った。各遺伝子の PB1 ドメイン領域をライゲーションを用いて pGAD T7 プラスミドのマルチクローニングサイトに挿入し、同様に KnRAV タンパク

質を挿入した pGBK T7 プラスミドとともに酵母 AH109 株に形質転換した。酵母の形質転換には、酢酸リチウム法を用いた。AH109 酵母をグリセロールストック個体 YPD 培地にストリークし、3 日間 30°C で培養し、得られたコロニーを 1 mL YPD または SD 培地(すでに導入したプラスミドを維持するための適切な選択培地を使用する)に播種し、ボルテックスによって懸濁した。この懸濁液を 50 mL の YPD または SD 培地を含むフラスコに移し、30°C で 16~18 時間振とう培養した。この培養液の内、300 mL YPD の入ったフラスコに移し、OD600 が 0.2-0.3 になるように希釈し、30°C で OD600 が 0.4-0.6 になるまで振とう培養した。その後、この培養液を室温で 1,000 x g、5 分間遠心分離し、上清を捨て、30 mL 滅菌 TE バッファーに懸濁した。これを室温で 1,000 x g、5 分間遠心分離し、上清を捨て、1.5 mL の TE/LiAc 溶液に懸濁したものをコンピテントセルとして使用した。100 μ L のコンピテントセルに、100 ng の導入プラスミドと 0.1 mg のサケ精子 DNA(熱変性済み)を加え、よく混和した後、0.6 mL PEG/LiAc 溶液を加え、ボルテックスで激しく 10 秒混和した。これを 30°C で 30 分間振盪した後、70 μ L DMSO を加え、転倒混和した。次に、42°C の水槽で 15 分間ヒートショックを行った。これを 1 分間の氷冷の後、13,000 x g で 5 秒間遠心分離し、上清を捨て、TE バッファーで懸濁した細胞懸濁液を適切な選択 SD 培地(pGAD T7 はロイシン、pGBK T7 はトリプトファンの欠乏培地)にストリークし、2-4 日後に得られたコロニーを解析に用いた。相互作用解析には、pGAD T7 および pGBK T7 コンストラクト両方のコンストラクトを導入した酵母を、OD600 がすべての細胞ラインで同程度になるように希釈した後、選択用 SD 個体培地(-LW、-LWH、-LWHA)にスポットし 3-5 日後の細胞生育を観察した。

4-13. モチーフ解析

CHX 非処理下、および非処理下における CAGE-seq データに対して、 P 値にもとづいて、IAA 応答($P < 0.05$)および IAA 非応答($P > 0.9$)を示す CTSS クラスタを選抜した。選抜された CTSS クラスタの内、対応する遺伝子の mRNA(GFF ファイルを参照)開始位置の上流 1500 塩基から、遺伝子コード領域の下流 500 塩基までの領域に存在し、同一遺伝子の当該領域に位置するクラスタの中で最もリード数が多いものを、モチーフ解析のためのプロモーター配列の収集に使用した。プロモーター配列の収集については、クラスタに最も高頻度で出現する CTSS(ドミナント CTSS)を基準に、上流 800 塩基から下流 200 塩基を取得した。この際、アセンブリギャップやスキファールドにおける位置等によって、N ギャップを含まない 1000 bp の配列が取得できないクラスタに関しては収集配列から除外した。これらのプロモーター配列に対して、重複する逆相補鎖配列を除去した 2080 パターンの 6 塩基配列が存在するか否かを判定し、R(version 4.2.1)を使用して超幾何分布検定による P 値の算出を行った。

参考文献

Altschul, Stephen F., et al. "Basic local alignment search tool." *Journal of molecular biology* 215.3 (1990): 403-410.

Berleth, Thomas, Jim Mattsson, and Christian S. Hardtke. "Vascular continuity and auxin signals." *Trends in plant science* 5.9 (2000): 387-393.

Bowman, John L., et al. "Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome." *Cell* 171.2 (2017): 287-304.

Bulgakov, Victor P., and Olga G. Koren. "Basic Protein Modules Combining Abscisic Acid and Light Signaling in *Arabidopsis*." *Frontiers in Plant Science* (2022): 2986.

Calderón Villalobos, Luz Irina A., et al. "A combinatorial TIR1/AFB–Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin." *Nature chemical biology* 8.5 (2012): 477-485.

Darwin, Charles, and Francis Darwin. "Sensitiveness of plants to light: it's transmitted effect. The power of movement in plants." (1880): 574-592.

Dharmasiri, Nihal, et al. "Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins." *Developmental cell* 9.1 (2005): 109-119.

Dharmasiri, Nihal, Sunethra Dharmasiri, and Mark Estelle. "The F-box protein TIR1 is an auxin receptor." *Nature* 435.7041 (2005): 441-445.

dos Santos Maraschin, Felipe, Johan Memelink, and Remko Offringa. "Auxin - induced, SCFTIR1 - mediated poly - ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation." *The Plant Journal* 59.1 (2009): 100-109.

Finn, Robert D., et al. "Pfam: the protein families database." *Nucleic acids research* 42.D1 (2014): D222-D230.

Flores-Sandoval, Eduardo, D. Magnus Eklund, and John L. Bowman. "A simple auxin transcriptional response system regulates multiple morphogenetic processes in the liverwort *Marchantia polymorpha*." *PLoS genetics* 11.5 (2015): e1005207.

Friml, Jiří, et al. "Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*." *Nature* 426.6963 (2003): 147-153.

Friml, Jiří, et al. "Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*." *Nature* 415.6873 (2002): 806-809.

Gray, William M., et al. "Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins." *Nature* 414.6861 (2001): 271-276.

Haberle, Vanja, et al. "CAGEr: precise TSS data retrieval and high-resolution promoterome mining for integrative analyses." *Nucleic acids research* 43.8 (2015): e51-e51.

Hagen, Gretchen, and Tom Guilfoyle. "Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors." *Plant molecular biology* 49.3 (2002): 373-385.

Hori, Koichi, et al. "*Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation." *Nature communications* 5.1 (2014): 1-9.

Kagaya, Yasuaki, Kunio Ohmiya, and Tsukahara Hattori. "RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants." *Nucleic acids research* 27.2 (1999): 470-478.

Kanchiswamy, Chidananda Nagamangala, et al. "Regulation of Arabidopsis defense responses against *Spodoptera littoralis* by CPK-mediated calcium signaling." *BMC plant biology* 10.1 (2010): 1-10.

Kato, Hirotaka, et al. "Auxin-mediated transcriptional system with a minimal set of components is critical for morphogenesis through the life cycle in *Marchantia polymorpha*." *PLoS genetics* 11.5 (2015): e1005084.

Kato, Hirotaka, et al. "Design principles of a minimal auxin response system." *Nature plants* 6.5 (2020): 473-482.

Kepinski, Stefan, and Ottoline Leyser. "The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor." *Nature* 435.7041 (2005): 446-451.

Kim, Daehwan, et al. "Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype." *Nature biotechnology* 37.8 (2019): 907-915.

Korasick, David A., et al. "Molecular basis for AUXIN RESPONSE FACTOR protein interaction and the control of auxin response repression." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.14 (2014): 5427-5432.

Kroj, Thomas, et al. "Regulation of storage protein gene expression in Arabidopsis." (2003): 6065-6073.

Lang, Daniel, et al. "The *Physcomitrella patens* chromosome - scale assembly reveals moss genome structure and evolution." *The Plant Journal* 93.3 (2018): 515-533.

Lau, Steffen, et al. "Auxin signaling in algal lineages: fact or myth?." *Trends in plant science* 14.4 (2009): 182-188.

Lavy, Meirav, and Mark Estelle. "Mechanisms of auxin signaling." *Development* 143.18 (2016): 3226-3229.

Lavy, Meirav, et al. "Constitutive auxin response in *Physcomitrella* reveals complex interactions between Aux/IAA and ARF proteins." *Elife* 5 (2016): e13325.

Li, Fay-Wei, et al. "Anthoceros genomes illuminate the origin of land plants and the unique biology of hornworts." *Nature Plants* 6.3 (2020): 259-272.

Liscum, E., and J. W. Reed. "Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development." *Plant molecular biology* 49.3 (2002): 387-400.

Ma, Shisong, and Savithramma Dinesh-Kumar. "SGR-based Reporter to Assay Plant Transcription Factor-promoter Interactions." *Bio-protocol* 4.16 (2014): e1214-e1214.

Martin-Arevalillo, Raquel, et al. "Evolution of the auxin response factors from charophyte ancestors." *PLoS genetics* 15.9 (2019): e1008400.

Möller, Benjamin, Daniel Schenck, and Hartwig Lüthen. "Exploring the link between auxin receptors, rapid cell elongation and organ tropisms." *Plant signaling & behavior* 5.5 (2010): 601-603.

Mönke, Gudrun, et al. "Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: molecular interaction with DNA." *Planta* 219.1 (2004): 158-166.

Murata, Mitsuyoshi, et al. "Detecting expressed genes using CAGE." *Transcription Factor Regulatory Networks*. Humana Press, New York, NY, 2014. 67-85.

Mutte, Sumanth K., et al. "Origin and evolution of the nuclear auxin response system." *Elife* 7 (2018): e33399.

Nanao, Max H., et al. "Structural basis for oligomerization of auxin transcriptional regulators." *Nature communications* 5.1 (2014): 1-8.

Nawrocki, Eric P., and Sean R. Eddy. "Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches." *Bioinformatics* 29.22 (2013): 2933-2935.

Nozaki, Shingo, and Hironori Niki. "Exonuclease III (XthA) enforces in vivo DNA cloning of *Escherichia coli* to create cohesive ends." *Journal of bacteriology* 201.5 (2019): e00660-18.

Ohtaka, Kinuka, et al. "Primitive auxin response without TIR1 and Aux/IAA in the charophyte alga *Klebsormidium nitens*." *Plant Physiology* 174.3 (2017): 1621-1632.

Okegawa, Yuki, and Ken Motohashi. "A simple and ultra-low cost homemade seamless ligation cloning extract (SLiCE) as an alternative to a commercially available seamless DNA cloning kit." *Biochemistry and biophysics reports* 4 (2015): 148-151.

Okushima, Yoko, et al. "Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19." *The Plant Cell* 17.2 (2005): 444-463.

Park, Jeongmoo, et al. "ABI3 and PIL5 collaboratively activate the expression of SOMNUS by directly binding to its promoter in imbibed *Arabidopsis* seeds." *The Plant Cell* 23.4 (2011): 1404-1415.

Prigge, Michael J., et al. "Physcomitrella patens auxin-resistant mutants affect conserved elements of an auxin-signaling pathway." *Current Biology* 20.21 (2010): 1907-1912.

Rensing, Stefan A., et al. "The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants." *Science* 319.5859 (2008): 64-69.

Robinson, Mark D., Davis J. McCarthy, and Gordon K. Smyth. "edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data." *bioinformatics* 26.1 (2010): 139-140.

Romanel, Elisson AC, et al. "Evolution of the B3 DNA binding superfamily: new insights into REM family gene diversification." *PloS one* 4.6 (2009): e5791.

Ruegger, Max, et al. "The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p." *Genes & development* 12.2 (1998): 198-207.

Salehin, Mohammad, Rammyani Bagchi, and Mark Estelle. "SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development." *The Plant Cell* 27.1 (2015): 9-19.

Santner, Aaron, Luz Irina A. Calderon-Villalobos, and Mark Estelle. "Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth." *Nature chemical biology* 5.5 (2009): 301-307.

Sasnauskas, Giedrius, et al. "DNA recognition by Arabidopsis transcription factors ABI 3 and NGA 1." *The FEBS journal* 285.21 (2018): 4041-4059.

Skokan, Roman, et al. "PIN-driven auxin transport emerged early in streptophyte evolution." *Nature Plants* 5.11 (2019): 1114-1119.

Stepanova, Anna N., et al. "TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development." *Cell* 133.1 (2008): 177-191.

Suzuki, Masaharu, Chien Yuan Kao, and Donald R. McCarty. "The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity." *The Plant Cell* 9.5 (1997): 799-807.

Swaminathan, Kankshita, Kevin Peterson, and Thomas Jack. "The plant B3 superfamily." *Trends in plant science* 13.12 (2008): 647-655.

Tan, Cheng-Yau, et al. "Regulation of algal and cyanobacterial auxin production, physiology, and application in agriculture: an overview." *Journal of Applied Phycology* 33.5 (2021): 2995-3023.

Tan, Xu, et al. "Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase." *Nature* 446.7136 (2007): 640-645.

Tan, Xu, et al. "Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase." *Nature* 446.7136 (2007): 640-645.

Ulmasov, Tim, Gretchen Hagen, and Tom J. Guilfoyle. "Activation and repression of transcription by auxin-response factors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96.10 (1999): 5844-5849.

Waadt, Rainer, et al. "Plant hormone regulation of abiotic stress responses." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2022): 1-15.

Wolters, Hanno, and Gerd Jürgens. "Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development." *Nature Reviews Genetics* 10.5 (2009): 305-317.

Yamada, Masashi, et al. "The TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2 gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development." *Plant physiology* 151.1 (2009): 168-179.

Yu, Hong, et al. "Mutations in the TIR1 auxin receptor that increase affinity for auxin/indole-3-acetic acid proteins result in auxin hypersensitivity." *Plant physiology* 162.1 (2013): 295-303.

謝辞

本研究は、堀孝一助教の JSPS 科研費・基盤研究(C)(18K06280 および 22K06354)の助成をもとに行われました。

本研究で実施した DNA シーケンス解析および DNA フラグメント解析は東京工業大学・オープンファシリティセンターのご協力のもと実施しました。

本研究を進めるにあたり、多くの方々にご指導ご鞭撻賜りました。

太田啓之教授、下嶋美恵准教授、堀孝一助教には、本研究を通して温かくご指導・ご助言いただきました。厚く御礼申し上げます。

東京工業大学増田真二准教授を始め、同研究室 Rajalakshmi Balasubramanian さん、東京大学清水隆之助教には、*in vitro* DNA 結合アッセイについて、度々ご相談させていただき、実験試薬もご提供いただきました。ここに御礼申し上げます。

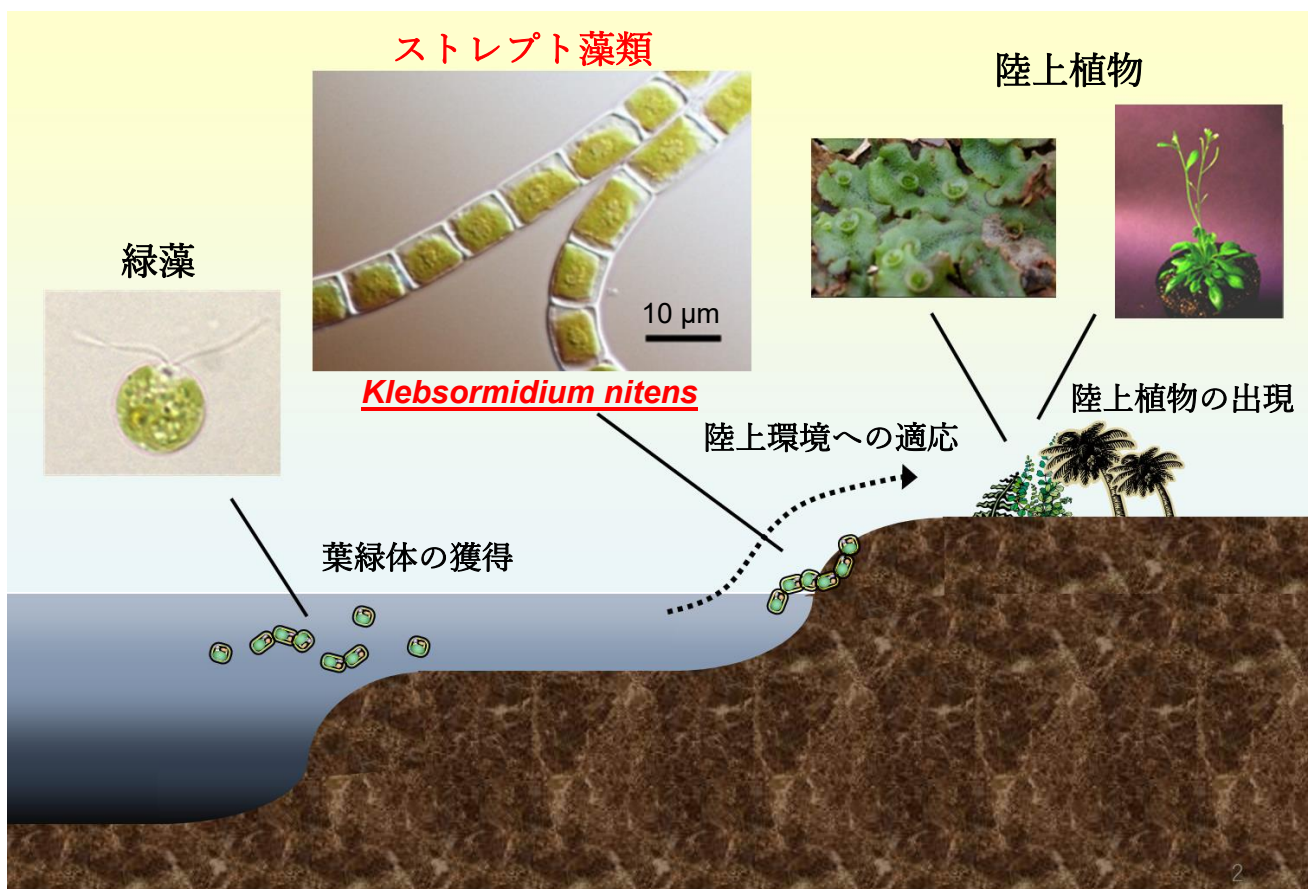
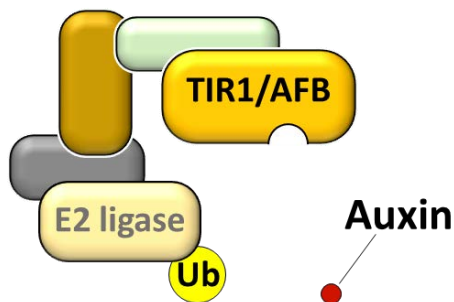


図1. ストレプト藻類は、緑藻および陸上植物と祖先を共有する多系統群である。ストレプト藻類に属する *Klebsormidium nitens* は多細胞性ながら、細胞分化のない糸状性の体制を呈する。

低オーキシン条件



高オーキシン条件

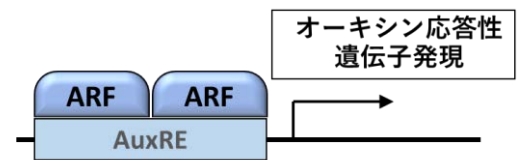
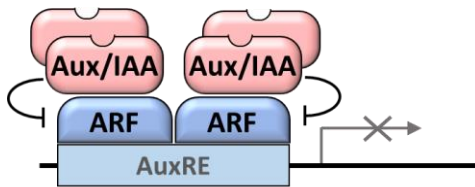
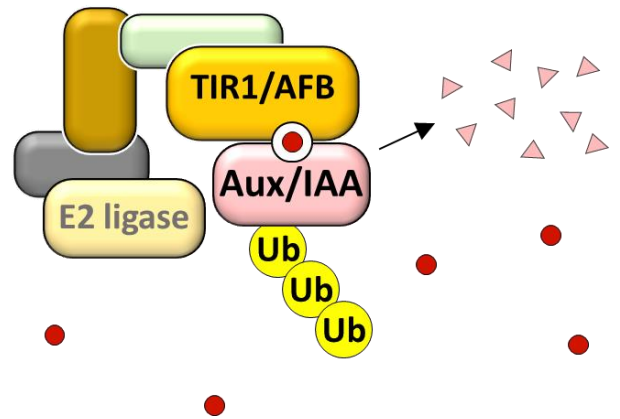
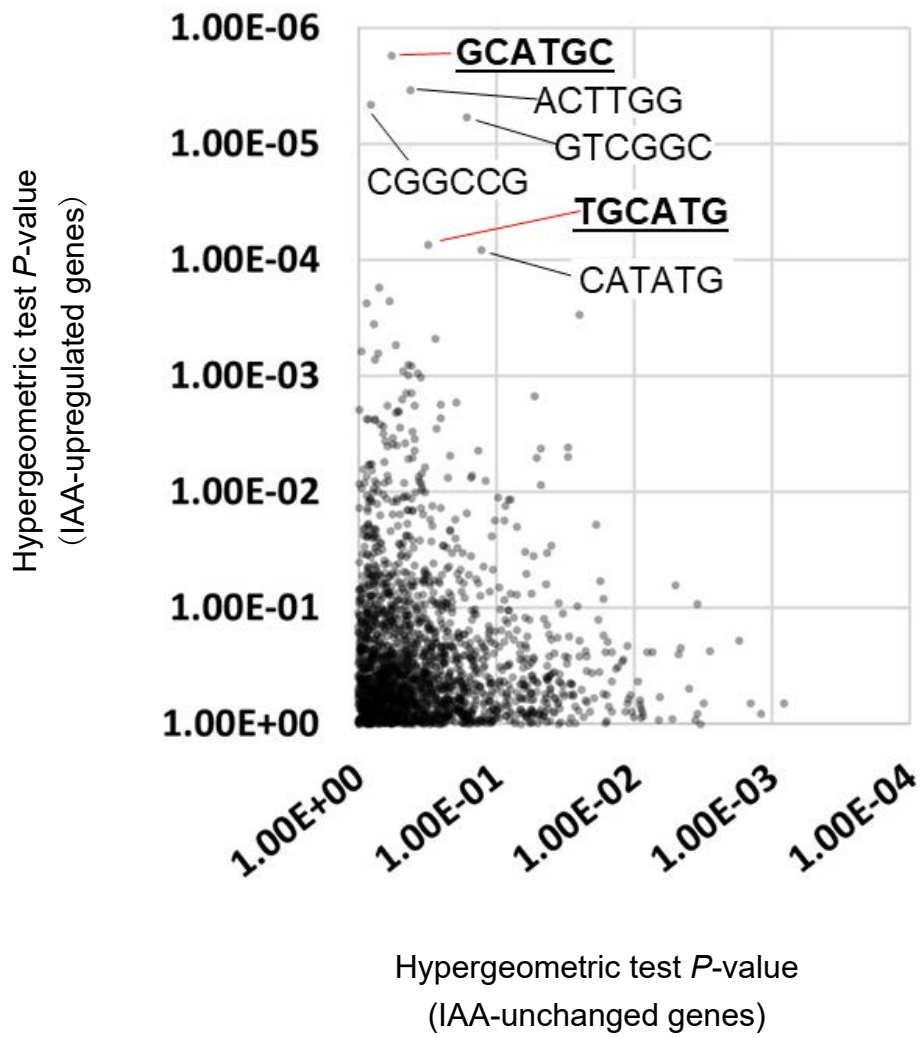


図2. 陸上植物における主要なオーキシンシグナル伝達機構・核オーキシン経路

低オーキシン条件では、負の制御因子・Aux/IAAとの相互作用によってARF転写因子の機能が抑制される(左)。それに対して、高オーキシン条件では、オーキシン受容体TIR1/AFBがオーキシンとの結合によってAux/IAAと相互作用し、SCF複合体へ誘導することによって、Aux/IAAのエビキチン-プロテアソーム系による分解を促す。ARFがAux/IAAから遊離することによって、その標的となるオーキシン応答遺伝子の発現が活性化される。



(堀、未発表)

図 4. モチーフ解析によるオーキシン応答に関わるシスエレメント配列の探索

10 時間および 3 日間の 100 μ M IAA 処理によって発現上昇した遺伝子のプロモーター配列に存在する全 6mer 配列の出現頻度解析(*P*値は hypergeometric test を用いて算出)。

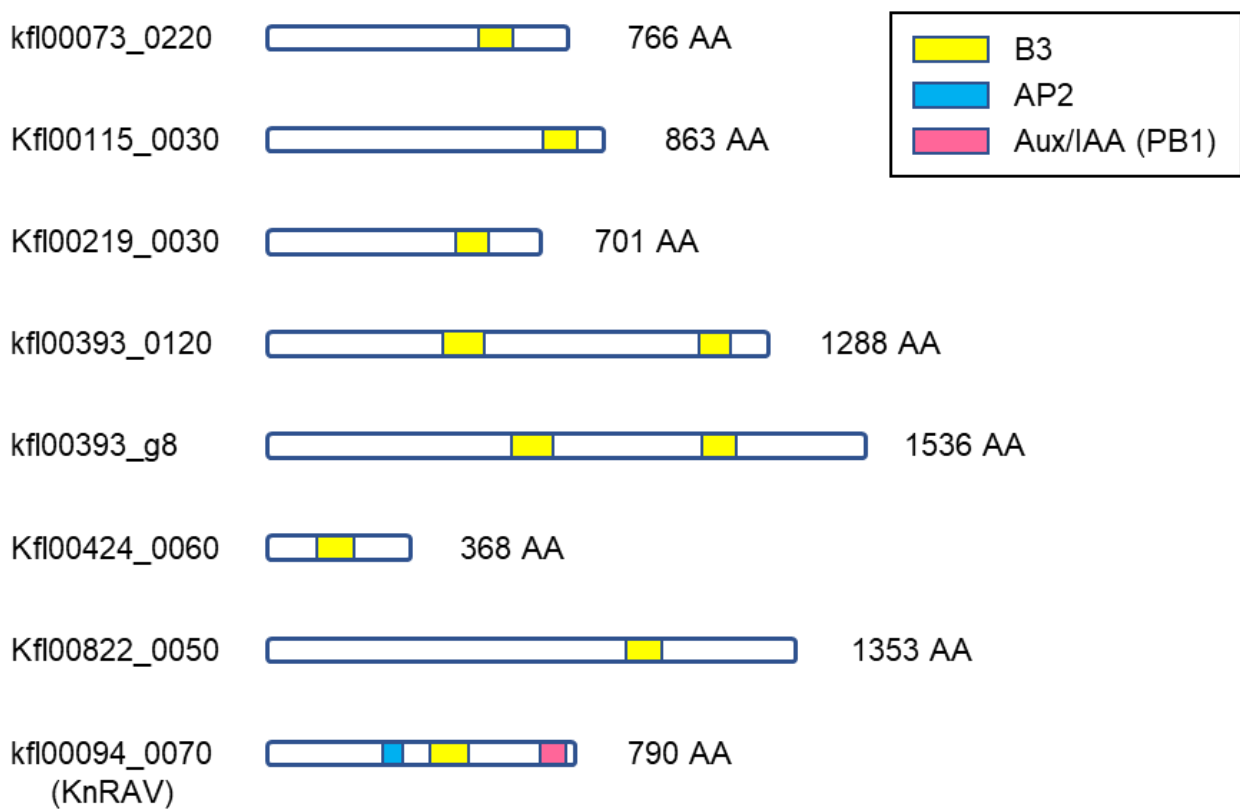


図 5. *K. nitens* に存在する B3 ドメイン転写因子

Pfam データベース(version27.0)によって予測されたドメイン構造は図内に色分けして示す。

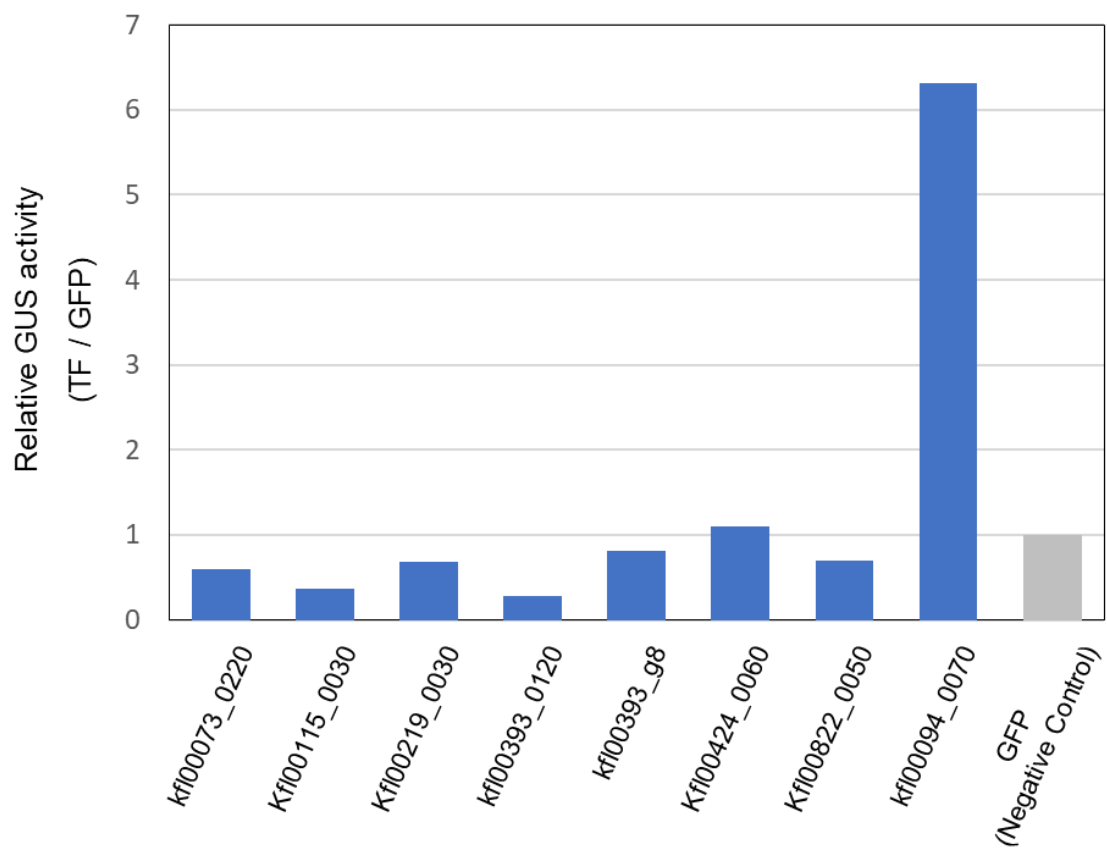


図 6. オーキシシン応答遺伝子 *KnLBD1* を活性化する B3 転写因子の探索

N. benthamiana 葉における *proKnLBD1::GUS* 活性測定。エフェクターとして *K. nitens* における B3 転写因子を共発現し、プロモーター活性の変化を観察した。グラフは陰性コントロール(GFP を共発現したもので)で正規化した値を示す。

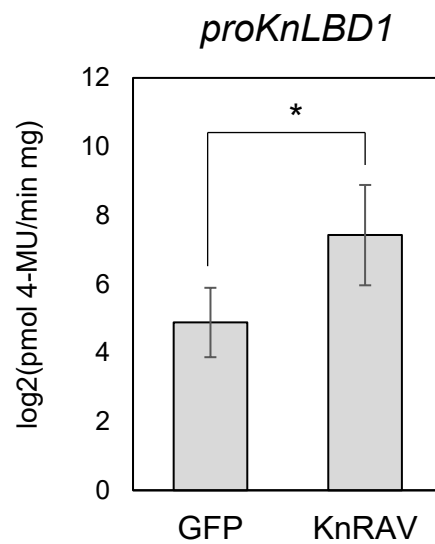


図 7. KnRAV はオーキシン応答遺伝子 *KnLBD1* を活性化する。

N. benthamiana 葉における *proKnLBD1::GUS* 活性測定。エフェクターとして *K. nitens* における KnRAV 転写因子を共発現し、プロモーター活性の変化を観察した。グラフは測定された GUS 活性を \log_2 変換した値の平均 \pm SD (n = 5) を示す。* $P < 0.05$: Student's *t* test)。

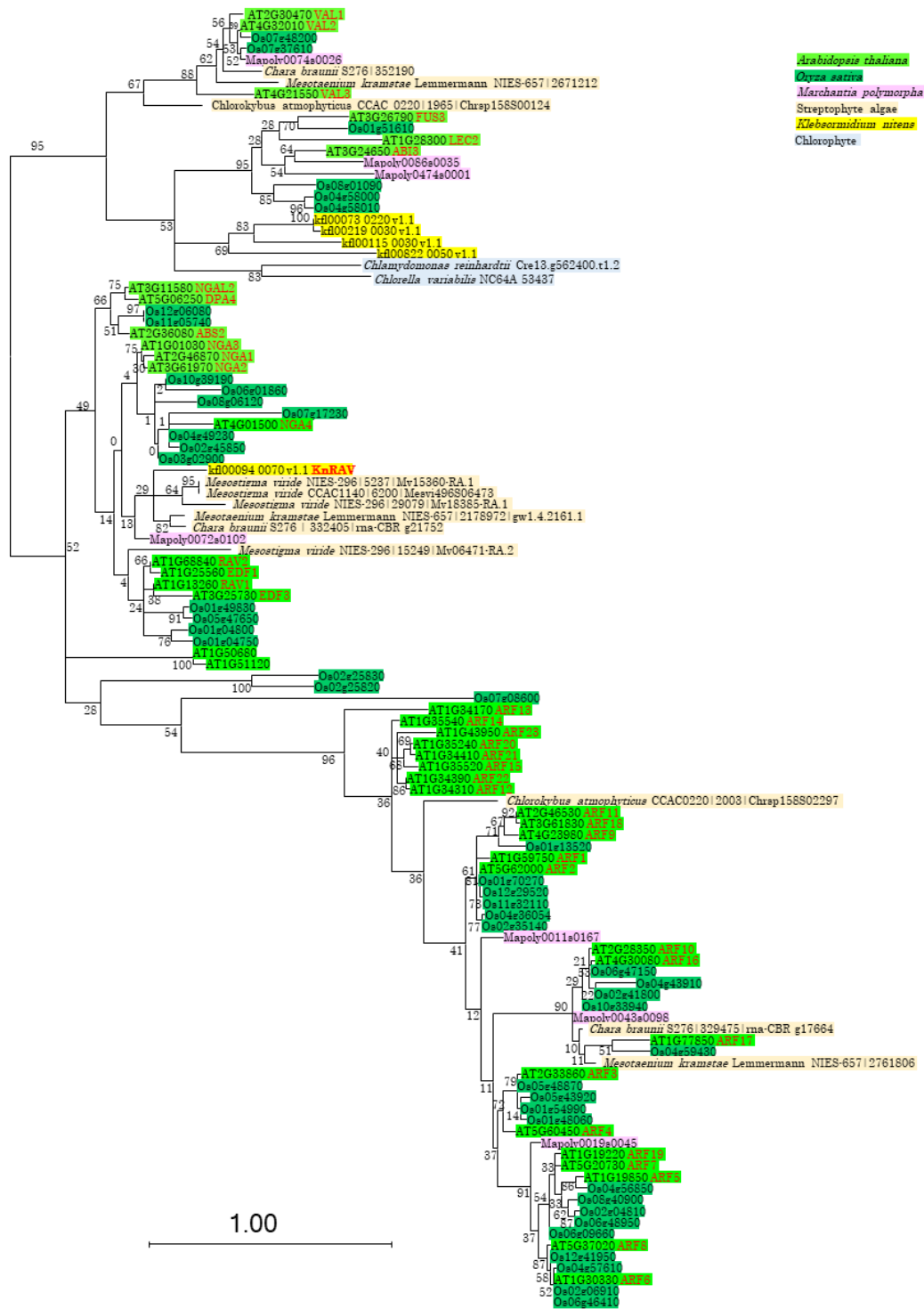


図 8. 植物における B3 ドメインタンパク質の系統解析

A. thaliana, *O. sativa*, *M. polymorpha*, *K. nitens* と他のストレプト藻、緑藻の B3 ドメイン配列を Phytozome および Phycocosm データベースから、KnRAV をクエリとした BLASTP 検索によって収集した (E 値カットオフ: $1e^{-5}$)。MEGAX を用いた最尤法によって系統解析を行った (ML heuristic method: the Subtree-Pruning-Regrafting algorithm with search level 3; branch swap filter: Moderate; amino acid substitution model: LG + F with 8 gamma categories and invariant sites)。ブートストラップ値は 500 反復におけるデータを示す。系統樹の各枝の長さは座位ごとの置換数を示す。

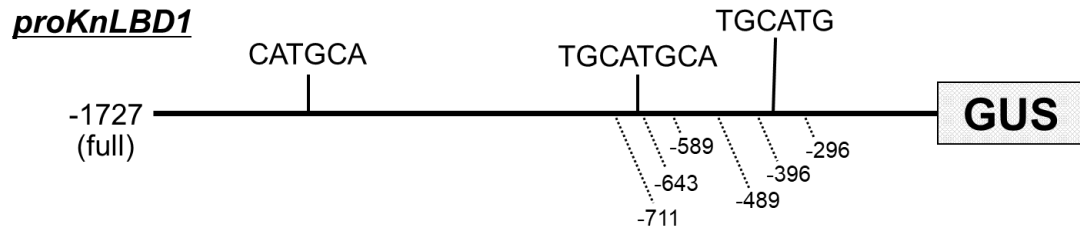
AtABI3 AT3G24650.1	E A R D G I S L A M E D I G T S R V W N M R Y R F W P N N K S R M Y L L E N T - G D F V K T N G L Q E G D F I V I Y S D V K C G K Y
AtFUS3 AT3G26790.1	E C K E G I P I R M E D L D G F H V W T F K Y R Y W P N N S R M Y V L E N T - G D F V N A H G L Q L G D F I M V Y Q D L Y S N N Y
AtRAV1 AT1G13260.1	S V K - G V L L N F E D V N G - K V W R F R Y S Y W - - N S S Q S Y V L T K G W S R F V K E K N L R A G D V V S F S R S N G Q D Q Q
AtRAV2 AT1G68840.1	A V T K G V L I N F E D V N G - K V W R F R Y S Y W - - N S S Q S Y V L T K G W S R F V K E K N L R A G D V V T F E R S T G L E R Q
KnRAV k#00094_0070_v1.1	S V - - G Q T L Q F E D E R G - K F W R F R Y S Y W - - N S S Q S Y V L T K G W S R F V K E K G L L P G D N V V F E K - - G H T G Q

★ ★★★★★

図 9. B3 タンパク質のアライメント解析

KnRAV の B3 ドメインには、AtRAV1/2 の DNA との結合に関わるアミノ酸残基(星印で示すもの)がよく保存されている。

(A)



(B)

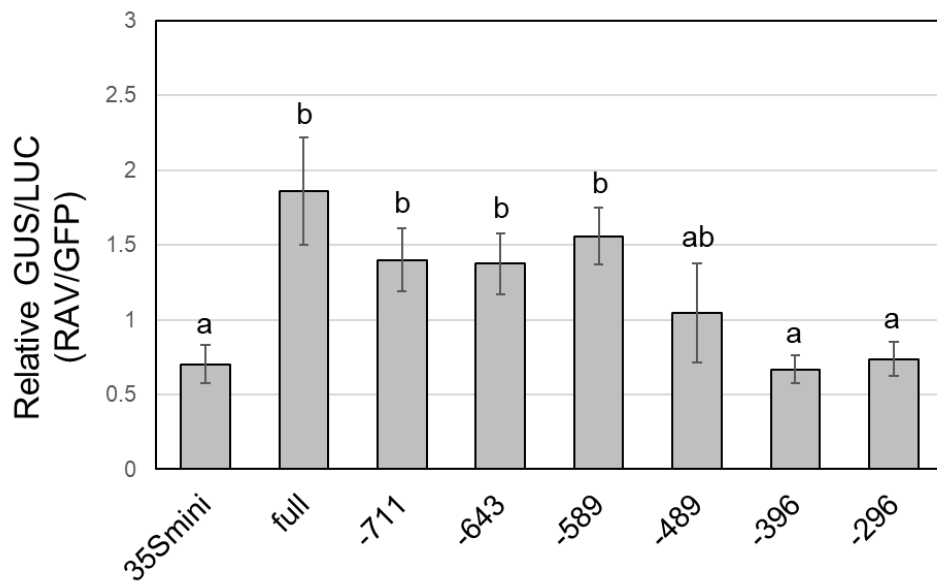
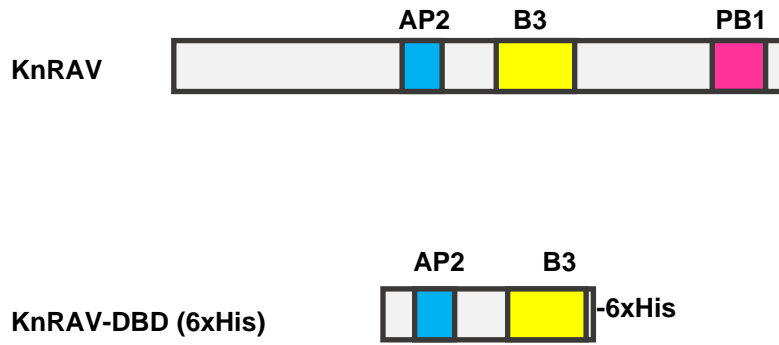


図 10. KnRAV による発現誘導に関わる *proLBD1* 領域の同定

(A)GUS:LUC 比の測定に使用した *proLBD1* の切断箇所を示す模式図。図内には *proLBD1* 内に存在する RY モチーフも示す。(B)*N. benthamiana* 葉における切断 *proLBD1* または 35S 最小プロモーターのプロモーター活性を GUS:LUC 比を用いて測定した。グラフには陰性コントロール(GFP を発現したもので正規化した値の平均値 \pm SD を示す(n = 3)。異なる英小文字は $P < 0.05$ (Tukey's test)を示す。

(A)



(B)

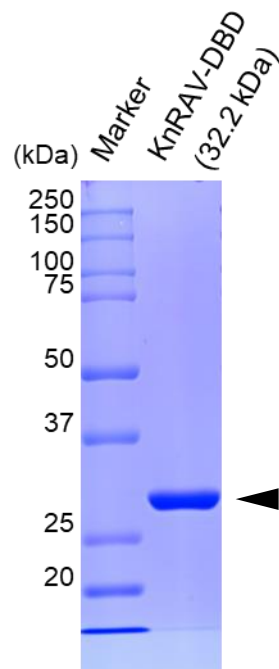


図 11. His タグによる KnRAV-DBD 組み換えタンパク質の精製

(A)KnRAV のタンパク質全長(上)と KnRAV-DBD(下)の模式図を示す。(B)Ni-IDA レジンをを用いた His タグ精製によって得られた KnRAV-DBD タンパク質サンプルの SDS-PAGE(CBB 染色)。矢尻は KnRAV-DBD に対応するバンドの泳動位置を示す。

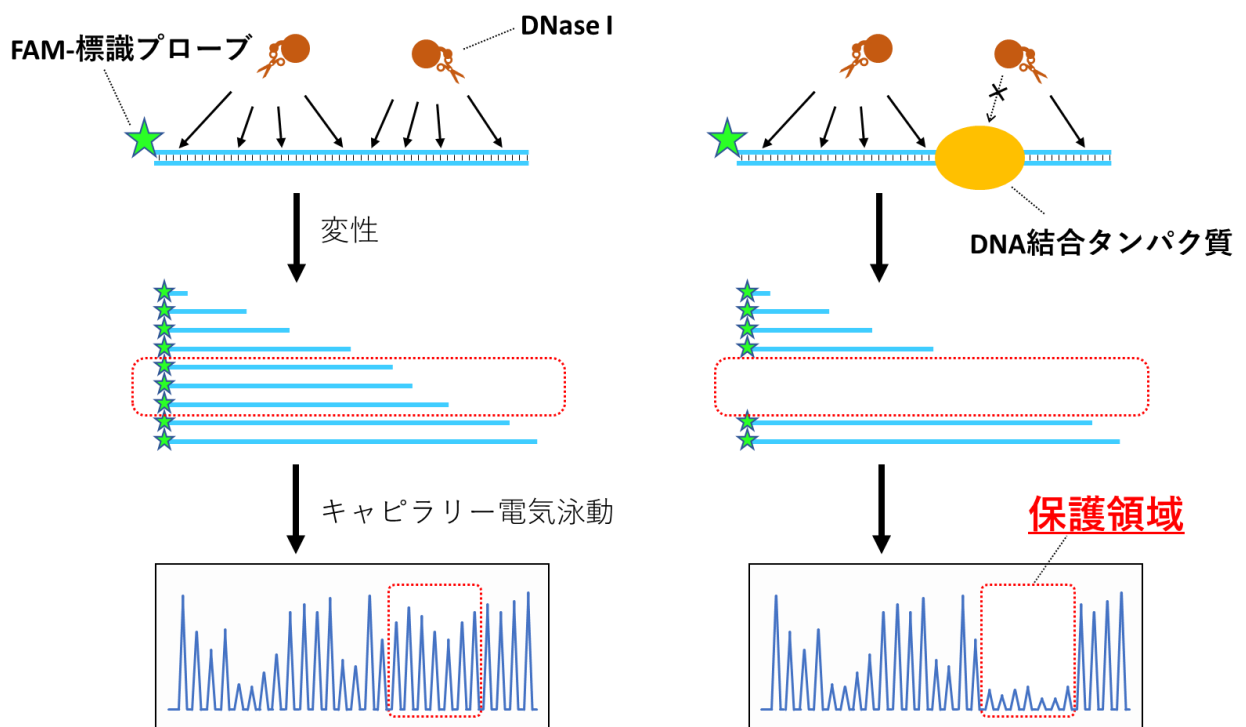


図 12. DNase I フットプリンティングを用いた DNA-タンパク質相互作用の解析手法

蛍光標識(FAM)した DNA プローブを DNase I 消化し、キャピラリー電気泳動することで塩基配列による特有の消化断片のピークパターンが観察される(左)。このようなピークパターンは DNA 結合タンパク質の存在下では、そのタンパク質が結合する DNA 配列特異性に応じて DNase I 消化が阻害され、結合部位周辺のピーク強度が減衰する(右)。

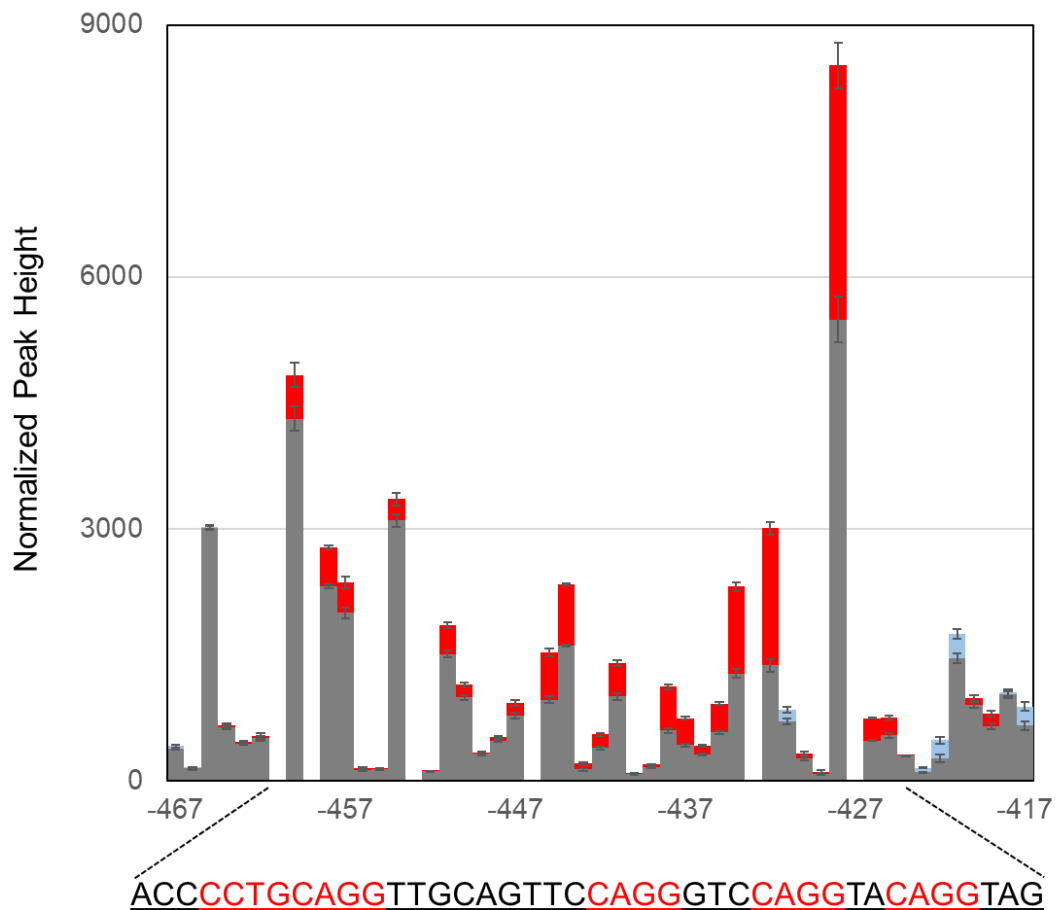


図 13. DNase I フットプリンティングを用いた KnRAV-DBD の結合モチーフの同定(一部)
 KnRAV-DBD および FAM 標識 *LBD1* プロモーター配列(-589~-296)による DNase I フットプリント。
 グラフは正規化したピーク高の平均値±SD (n = 3)を示す。赤色部は 3 μM KnRAV-DBD 存在下で 0 μM
 KnRAV-DBD 条件と比較して減衰したピーク高を示し、青色部は逆に増幅したピーク高を示す。横軸は
 proLBD1 上の対応する(翻訳開始点からの)位置を示す。

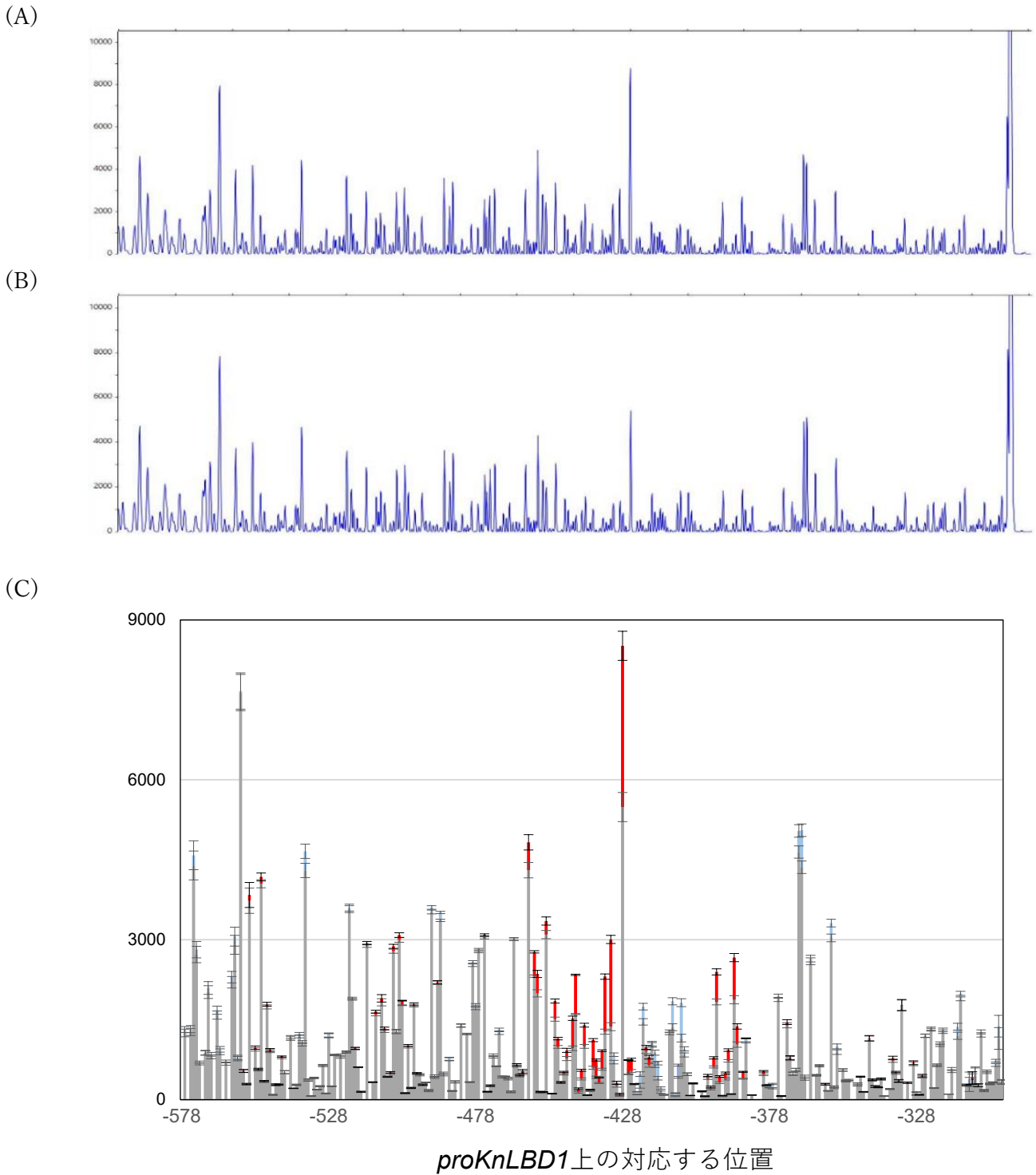


図 14. DNase I フットプリンティングを用いた KnRAV-DBD の結合モチーフの同定(全体)
 (A) 0 μM KnRAV-DBD および(B) 3 μM KnRAV-DBD 条件における DNase I フットプリント(キャピラリー電気泳動のエレクトロフェログラム)。(C) KnRAV-DBD および FAM 標識 *LBD1* プロモーター配列(-589~-296)による DNase I フットプリント。正規化したピーク高の平均値 \pm SD ($n=3$)を示す。赤色部は 3 μM KnRAV-DBD 存在下で 0 μM KnRAV-DBD 条件と比較して減衰したピーク高を示し、青色部は逆に増幅したピーク高を示す。横軸は *proLBD1* 上の対応する(翻訳開始点からの)位置を示す。

(A)

gtaaaacgacggccagtgaatt**ACCCTGCAGG**TTGCAGTTC**CAGG**GTCC**CAGG**TAC**CAGG**TAGTTtga
mut1 : ACC**CCTG**CATTTTGCAGTTC**CAGG**GTCCATTTACATTTAGTT
mut2 : ACCAATGCATTTTGCAGTTC**CATT**GTCCATTTACATTTAGTT

(B)

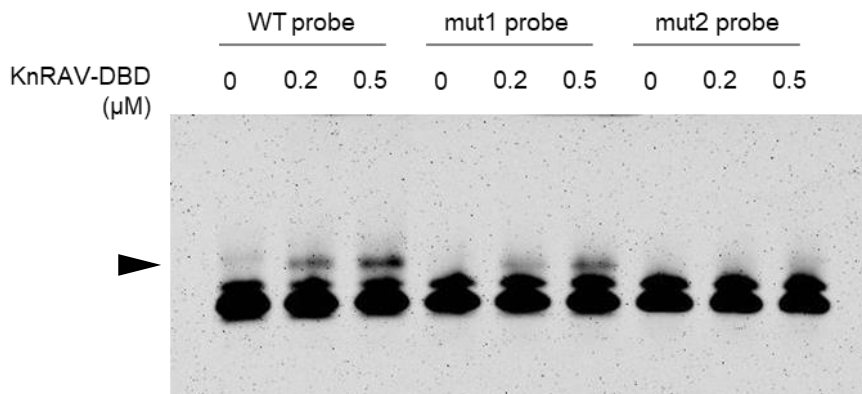


図 15. ゲルシフトアッセイを用いた KnRAV-DBD の DNA 結合に関わる配列モチーフの同定

(A)ゲルシフトアッセイに用いた Cy5.5 標識プローブ (WT、mut1、mut2)の塩基配列を示す。英大文字は *proKnLBD1*の-462 から-421 までの配列を示し、英赤字は当該プローブにおいて残存している 5'-CCTG-3'配列を示す。(B)KnRAV および Cy5.5 標識プローブを用いたゲルシフトアッセイの泳動像。矢尻は KnRAV-DBD によるシフトバンドの泳動位置を示す。

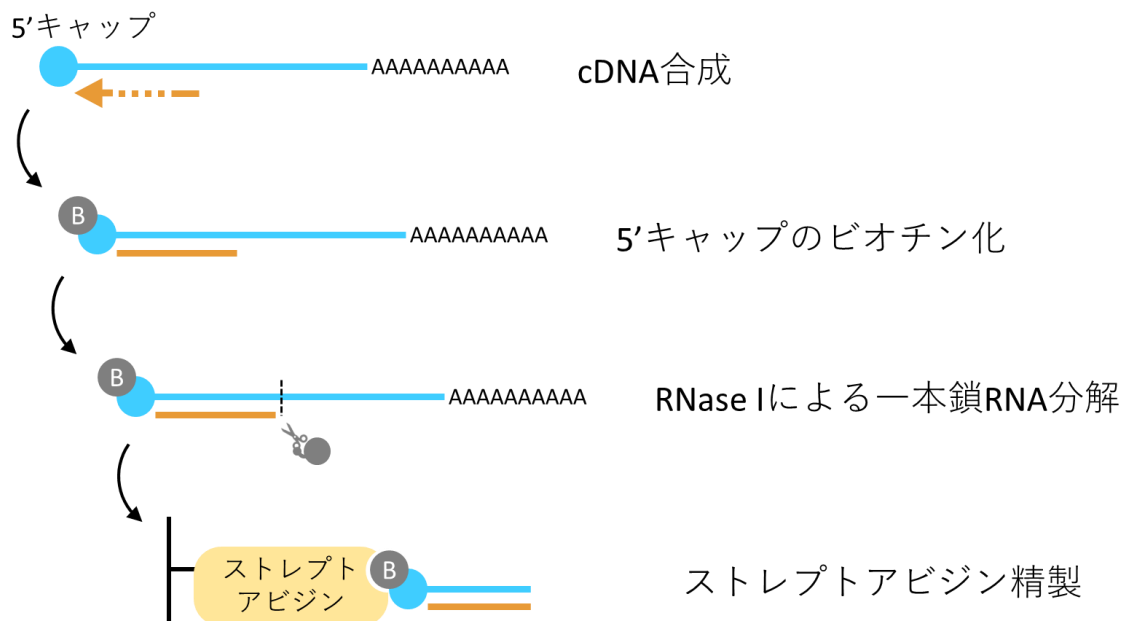
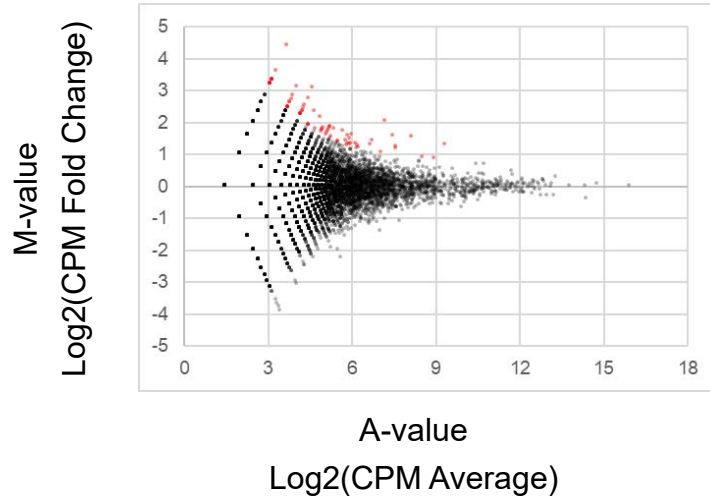


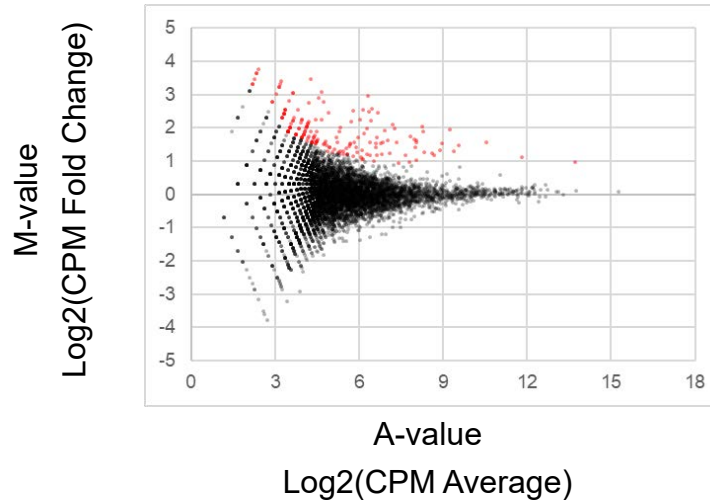
図 16. CAGE ライブラリーの作製手法

CAGE 解析技術は、mRNA の 5'末端の 7-メチルグアニル酸によるキャップ構造をビオチン化し、ストレプトアビジン精製を行うことにより、ランダムプライマーによってキャップ構造の近傍に合成された cDNA 配列を特異的に回収することが可能である。ストレプトアビジン精製に先立って、RNase I による一本鎖 RNA の分解を行うことで、逆転写がキャップ構造付近に到達していない cDNA を除去している。

(A)



(B)



(C)

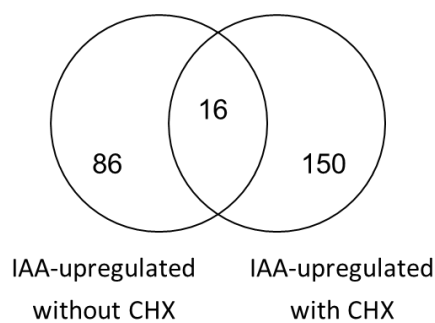


図 17. CAGE-seq による IAA 処理 *K. nitens* のトランスクリプトーム解析

(A)CHX 非存在下および(B)CHX 存在下(10 mg/L)において 0 または 100 μ M IAA を 1 時間処理した *K. nitens* サンプルの発現変動を示す MA プロット。各プロットは検出された CTSS クラスターの発現変動を示す。赤点は発現量に顕著な変化($P < 0.05$)が見られるクラスターを示す。(B)ベン図は CHX 非存在下および存在下それぞれにおいて IAA による発現上昇が見られた遺伝子数を示す。この内、16 遺伝子については CHX の有無に関わらず IAA による発現上昇が見られた。

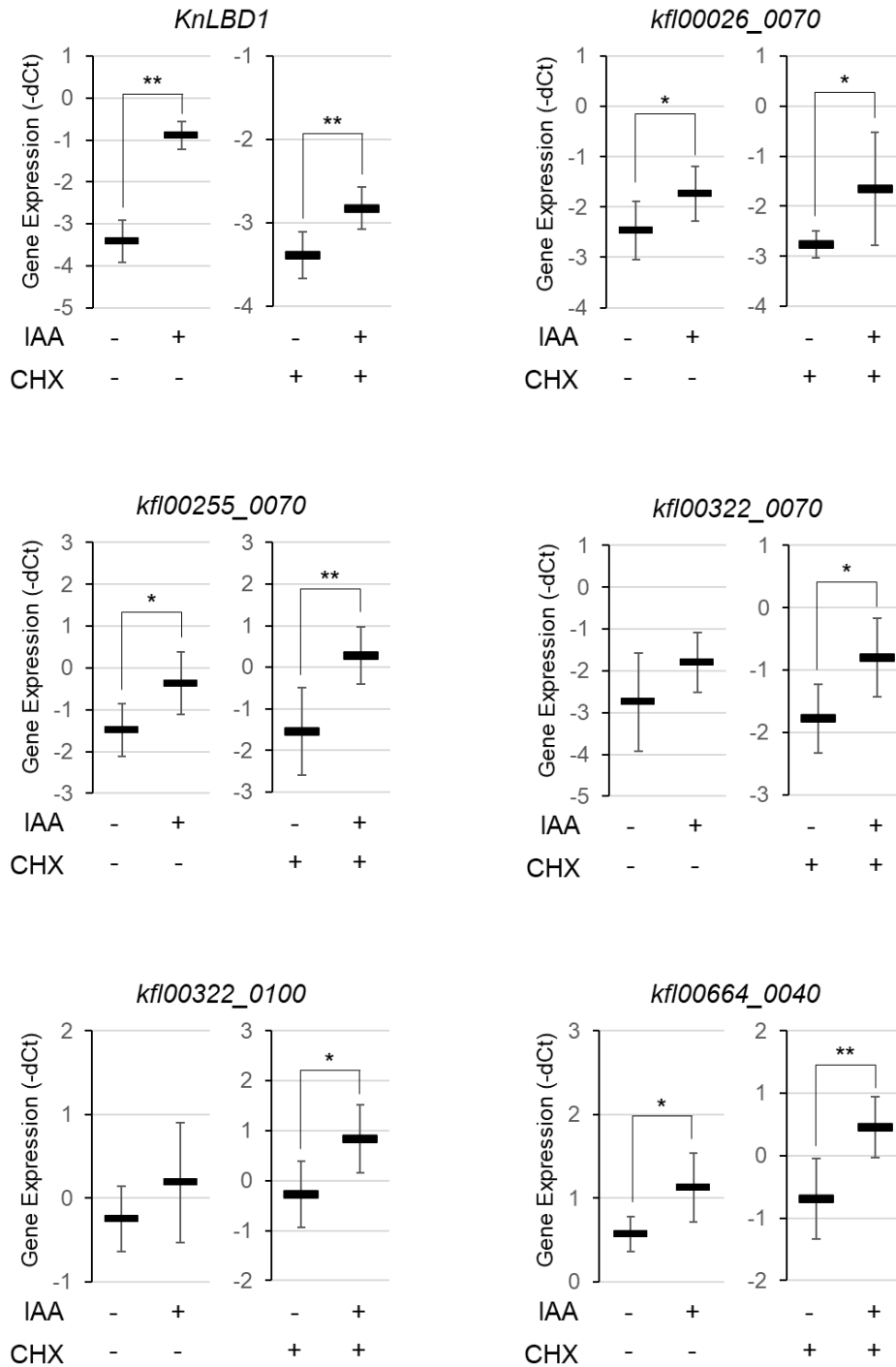


図 18. *K. nitens* における早期オーキシン応答遺伝子の発現解析

CAGE-seq データをもとに選抜された IAA 応答遺伝子に対する発現解析。グラフは CHX 非存在下(0 mg/L)または存在下(10 mg/L)における 1 時間の 100 μ M IAA 処理による各遺伝子の発現変化を示す。グラフの値は RT-qPCR 解析によって検出された dCt 値の平均 \pm SD (n = 6)を示す。* P < 0.05; ** P < 0.01 (Student's *t* test)。dCt 値の算出にはハウスキーピング遺伝子としてクエン酸シンターゼを用いた (*kfl00009_0420*)。

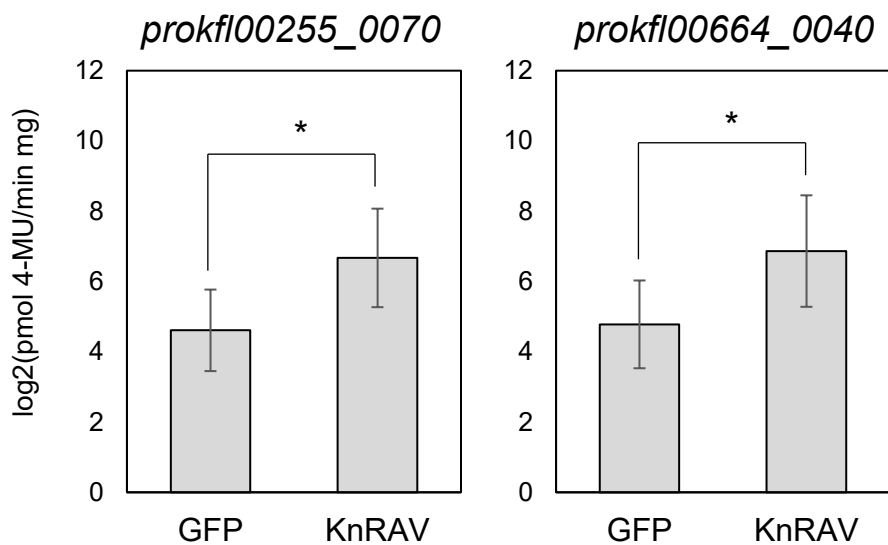


図 19. KnRAV は複数のオーキシン早期応答遺伝子を活性化する

N. benthamiana 葉における *prokfl00255_0070::GUS* および *prokfl00664_0040::GUS* 活性測定。エフェクターとして KnRAV 転写因子を共発現し、プロモーター活性の変化を観察した。グラフは測定された GUS 活性を \log_2 変換した値の平均 \pm SD ($n = 5$) を示す。(* $P < 0.05$; Student's *t* test)

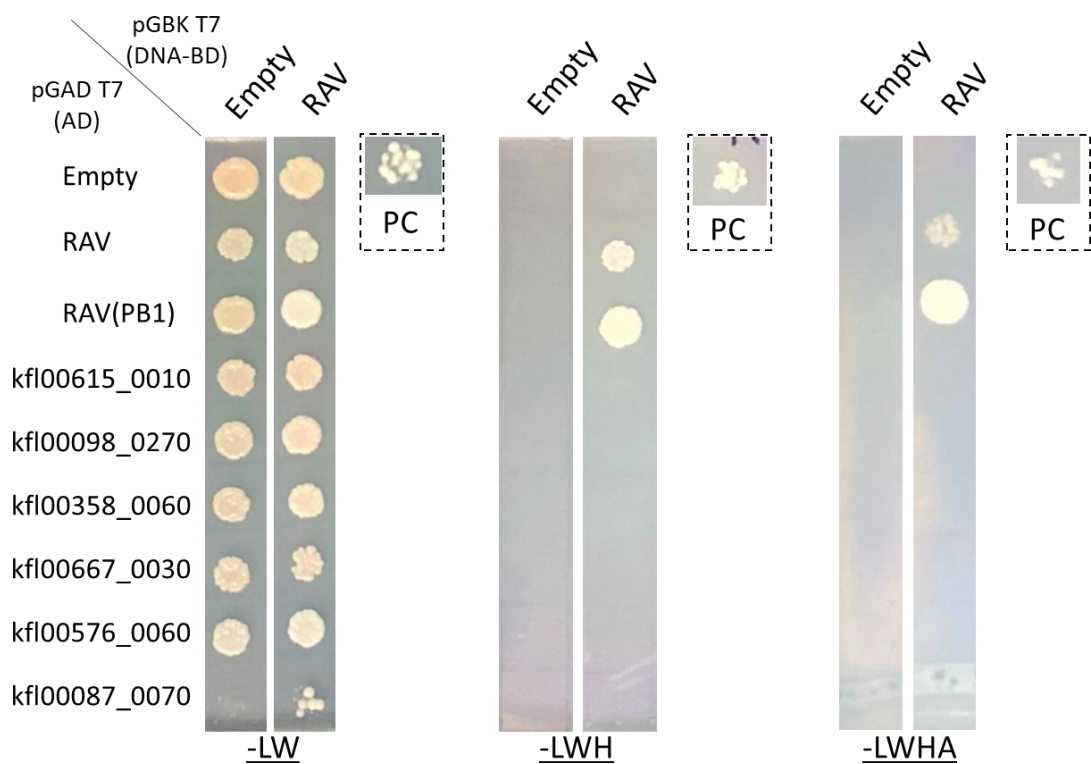


図 20. *K. nitens* の PB1 ドメインタンパク質と KnRAV との相互作用解析

酵母 AH109 株を使用し、KnRAV と *K. nitens* における他の PB1 ドメインを保有するタンパク質について酵母ツーハイブリッド解析を行った。-LW(ロイシントリプトファン欠乏培地)は導入プラスミドの選択培地、-LWH(ヒスチジン欠乏培地)および-LWHA(ヒスチジン/アデニン欠乏培地)はタンパク質相互作用の選択培地を示す。