



Study on the Regulation Mechanisms of cGMP-dependent Gene Expression of Soybean Chalcone Synthase

Hamad Abu Zahra

(Degree)

博士（農学）

(Date of Degree)

2014-03-25

(Date of Publication)

2015-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6025号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006025>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏 名 Hamad Abu Zahra

専攻・講座 生命機能科学専攻・応用生命化学

論文題目 (外国語の場合は, その和訳を併記すること。)

Study on the Regulation Mechanisms of cGMP-dependent Gene Expression of Soybean Chalcone Synthase.

ダイズカルコン合成酵素の cGMP 依存的遺伝子発現調節機構に関する研究

指導教員 Prof. Dr. Hiroshi Yamagata

Summary

The cyclic nucleotides cGMP and cAMP have been reported to play key roles in the regulation of plant processes and responses. We have previously reported that several genes encoding flavonoid biosynthetic enzymes, including chalcone synthase (CHS) in soybean (*Glycine max* L.), were induced by cGMP but not cAMP. The soybean genome contains nine CHS gene copies (*GmCHS1*–9). We investigated the responsiveness of several *GmCHS* genes to cGMP, cAMP, NO, and white light. Quantitative RT-PCR analysis showed that the transcript levels of *GmCHS7* and *GmCHS8* were increased by 3.6- and 3.8-fold, respectively, with cGMP whereas the transcript levels of *GmCHS2* remained constant. Although cAMP had no effect on the transcript levels of the three genes, NO had an activation effect on all three. White light activated the three genes in a transient manner, with *GmCHS2*, *GmCHS7*, and *GmCHS8* transcript levels increasing 3-fold after three hours and decreasing to basal levels after nine hours. The *GmCHS8* promoter contains several important *cis*-elements, including the G-box and H-box forming the Unit-I-like sequence and the MYB binding sequence, a target of the GmMYB176 transcription factor regulating the expression of *GmCHS8*. A transient gene expression assay revealed the activation of the Unit-I-like sequence, but not of the MYB binding sequence, by cGMP. The combination of G-box and H-box was necessary for cGMP responsiveness. Taken together, these results suggest that the Unit-I-like sequence in the promoters

(氏名 : Hamad Abu Zahra NO. 2)

of *GmCHS7* and *GmCHS8* is a cGMP responsive *cis*-element in these genes and that NO exerts its effect via *cis*-elements other than the Unit-I-like sequence.

We also describe an attempt to confirm whether GmMYB176 TF is involved in cGMP regulation in soybean. Transient gene expression assay revealed the upregulation of GmCHS8 gene by GmMYB176 TF. However, results of RT-qPCR showed that GmMYB176 TF is not regulated in cGMP.

氏名	Hamad Abu Zahra		
論文 題目	Study on the Regulation Mechanisms of cGMP-dependent Gene Expression of Soybean Chalcone Synthase (ダイズカルコン合成酵素の cGMP 依存的遺伝子発現調節機構に関する研究)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	山形 裕士
	副 査	教授	野村 啓一
	副 査	准教授	金丸 研吾
	副 査	准教授	宇野 雄一
	副 査		
要 旨			
植物遺伝子の発現はホルモンや内在性の発達プログラム、および光、温度、湿度、栄養条件、各種の生物的・非生物的ストレスなど様々な環境因子等によって調節されている。一般にこれらの刺激は受容体やセンサーにより感知され、その後、セカンドメッセンジャーが介する細胞内シグナル伝達を経て核に伝わり遺伝子の発現が調節される。サイクリック GMP (cGMP) は動物の視覚シグナルや血管平滑筋弛緩において細胞内情報伝達を担う重要なセカンドメッセンジャーであるが、近年、植物においても様々な機能を持つことが明らかにされつつある。cGMP により遺伝子発現が調節されることも報告されているがその詳細な分子機構は明らかにされておらず、cGMP 依存的遺伝子発現に関わるプロモーター中のシス配列も不明である。学位申請者である Hamad Abu Zahra 氏は、ダイズフラボノイド合成系の鍵酵素であるカルコン合成酵素遺伝子 (<i>GmCHS</i>) の発現が cGMP や一酸化窒素 (NO) により誘導されることを見出し、cGMP による <i>GmCHS</i> の発現誘導機構を転写レベルで解析し、初めて cGMP 応答性シス配列を同定した。本学位論文はそれらの結果をまとめたものである。 本学位論文は第1章、第2章、要約、謝辞、ならびに引用文献からなる。各章の概要を以下に記す。 第1章は序論である。前半では cGMP の植物細胞における機能を概観している。すなわち、cGMP はフィトクロームのシグナル伝達、開花、発芽、塩ストレスに対する応答など多様な生理現象に重要な役割を果たしている。また、転写レベルで cGMP により発現が調節されている遺伝子は少数例が知られているが、最近フラボノイド合成系酵素の多くの遺伝子の発現が cGMP により誘導されることが明らかにされた。これらの遺伝子の cGMP による発現誘導の分子機構は不明である。また、cGMP とともに一酸化窒素 (NO) が遺伝子発現に関与するものが含まれるが、cGMP と NO の相互関係など詳細な調節機構は不明である。序論の後半では、フラボノイド類の生理機能とダイズのフラボノイド類合成系酵素を概括している。その中で、特にフラボノイド合成系の鍵酵素である CHS に着目し、その機能と発現制御に関する報告をごく最近の報告も含めて概括している。特に CHS 遺伝子のプロモーター解析に関するこれまでの研究報告をまとめている。 第2章では、9 個あるダイズの CHS 遺伝子のうち、プロモーター中に G-box と H-box から成る Unit-I 様配列をもつ <i>GmCHS7</i>、<i>GmCHS8</i>、および Unit-I 様配列を持たない <i>GmCHS2</i> を材料として、プロモーターの刺激応答性を解析した。<i>GmCHS7</i>、<i>GmCHS8</i> のプロモーター (1.6 kbp) の塩基配列は 67% の類似性を有するが、<i>GmCHS2</i> のプロモーターは <i>GmCHS7</i> および <i>GmCHS8</i> とそれぞれ 3% および 4% しか類似していない。まず、RT-qPCR により 3 種類の <i>GmCHS</i> mRNA の発現に及ぼす cGMP、cAMP、NO			

氏名	Hamad Abu Zahra
----	-----------------

に対する応答性を調べた。すなわち、暗所適応させたダイズの光独立栄養培養細胞 (SB-P 細胞) を暗所下、50 μ M の 8-Br-cGMP (cGMP の膜透過性アナログ) で 3 時間処理すると、*GmCHS7* と *GmCHS8* の mRNA 量は約 4 倍に増加したが *GmCHS2* mRNA 量は変化しなかった。一方、8-Br-cAMP で同様に処理した場合は 3 種の *GmCHS* mRNA 量はどれも変化しなかった。また、NO 供与体であるニトロプルシドナトリウム塩 (SNP, 100 μ M) で同様に処理すると 3 者とも 2 倍程度に増加した。この結果、*GmCHS2* の発現に対する cGMP と NO の作用は異なることが示唆された。*GmCHS7* と *GmCHS8* の 8-Br-cGMP による誘導は 300 μ M のシクロヘキシミドを添加しても阻害されなかったことから、*GmCHS7/8* の cGMP による発現誘導には新たなタンパク質合成を必要としないことが示唆された。一方、暗所適応 SB-P 細胞に白色光を照射すると 3 種の *GmCHS* の発現はいずれも 3 時間後に約 3 倍に増加したが、光照射 9 時間後には暗所のレベルに下がり、一過的に発現が誘導されることが示唆された。白色光による *GmCHS* の一過的発現機構の詳細は不明である。

次に、*GmCHS8* のプロモーター解析を行い、プロモーター中の cGMP 応答性シス配列を一過的遺伝子発現系で解析した。すなわち、まず *GmCHS8* プロモーター (1.6 kbp) を β -グルクロニダーゼ (GUS) レポーター遺伝子に連結した融合遺伝子 (*GmCHS8p::GUS*) を CaMV35S プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子の融合遺伝子 (*35Sp::LUC*) とともに SB-P 細胞のプロトプラストにポリエチレングリコールを用いて導入した。プロトプラストを各種の薬剤で処理し、3 時間インキュベート後抽出液中の GUS 活性と LUC 活性を測定し、LUC 活性で標準化した相対 GUS 活性を算出した。その結果、無処理プロトプラストに比べて、8-Br-cGMP 処理により相対 GUS 活性は 3.4 倍に上昇した。NO と白色光によっても相対 GUS 活性はそれぞれ 3.1 倍および 3.4 倍上昇した。これらの結果は RT-qPCR の結果と類似していた。一方、Unit-I 配列を除去した *GmCHS8* プロモーターと GUS の融合遺伝子を導入した場合は 8-Br-cGMP による発現誘導が見られなかったが、SNP 処理により 3 倍に増加した。この結果は NO の応答性エレメントが Unit-I 以外の配列であることを示唆している。また、Unit-I 様配列だけを 35S 最小プロモーターに連結した場合でも 8-Br-cGMP または光照射により相対 GUS 活性が 3 倍に上昇したが、SNP によつては変動しなかった。また、Unit-I 様配列中の G-box または H-box に変異を導入すると cGMP や白色光による相対 GUS 活性の変動が見られなくなったことから、Unit-I 中の G-box と H-box の両者の組み合わせが cGMP による *GmCHS8* 発現の誘導に必要であることが明らかになった。一方、ダイズの転写因子 GmMYB176 が *GmCHS8* の発現を調節していることが最近報告されたので GmMYB176 と cGMP の関連を調べた。すなわち、まず、*35Sp::GmMYB176* 融合遺伝子をエフェクターとし、*GmCHS8p::GUS* をレポーターとして SB-P プロトプラストに共発現するとエフェクターのない場合に比べて GUS の発現は 2 倍に増加した。しかし、*GmCHS8* プロモーター中の MYB176 結合配列は cGMP に応答しなかった。また、*GmMYB176* の発現量は cGMP により減少した。以上の結果、*GmCHS8* プロモーター中の Unit-I 様配列が cGMP 応答性に関わるシス配列であること、cGMP による *GmCHS8* の発現誘導に GmMYB176 は関与しないことが明らかになった。第 2 章の研究成果の一部は、Plant Physiology and Biochemistry の 74 巻 92-98 ページ (2014) に掲載されている。

以上のように、本論文は、植物細胞における cGMP の作用機作を解析し、特に cGMP 応答性遺伝子プロモーター中の cGMP 応答性シス配列を初めて同定し、cGMP 応答性遺伝子発現調節機構を解明した。これらの知見は、植物の遺伝子発現調節における cGMP と NO の機能に関してあらたな概念を提唱するものとして価値ある集積であると認める。よって学位申請者の Hamad Abu Zahra は、博士 (農学) の学位を得る資格があると認める。